



HAL
open science

Nouvelles stratégies thérapeutiques dans les carcinomes épidermoïdes des voies aéro-digestives supérieures

Anaïs Hagege

► **To cite this version:**

Anaïs Hagege. Nouvelles stratégies thérapeutiques dans les carcinomes épidermoïdes des voies aéro-digestives supérieures. Médecine humaine et pathologie. Université Côte d'Azur, 2022. Français. NNT : 2022COAZ6009 . tel-03710391

HAL Id: tel-03710391

<https://theses.hal.science/tel-03710391v1>

Submitted on 30 Jun 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.

THÈSE DE DOCTORAT

Nouvelles stratégies thérapeutiques dans les carcinomes épidermoïdes des voies aéro-digestives supérieures

Anais HAGEGE

Institut de Recherche sur le Cancer et le Vieillessement de Nice,
CNRS UMR 7284, Inserm U1081

Présentée en vue de l'obtention du grade
de docteur en Interactions moléculaires
et cellulaires d'Université Côte d'Azur

Dirigée par : Dr Gilles Pagès

Soutenue le : 25 mars 2022

Devant le jury, composé de :

Dr Patrick Auberger, Président, UCA

Dr Marcel Blot-Chabaud, Rapporteur,
Aix-Marseille Université

Dr Luc Friboulet, Rapporteur, Institut
Gustave Roussy

Pr Christophe Le Tourneau,
Examineur, Institut Curie

Dr Maeva Dufies, Examinatrice, UCA

Nouvelles stratégies thérapeutiques dans les carcinomes épidermoïdes des voies aéro-digestives supérieures

JURY

PRÉSIDENT DU JURY

Dr Patrick Auberger, DR-HDR, C3M, Université Nice Côte d'Azur

RAPPORTEURS

Dr Marcel Blot-Chabaud, DR-HDR, Aix-Marseille Université, Centre de recherche en cardiovasculaire et nutrition

Dr Luc Friboulet, CR-HDR, Institut Gustave Roussy

EXAMINATEURS

Pr Christophe Le Tourneau, PU-PH – HDR, Institut Curie

Dr Maeva Dufies, CR-HDR, IRCAN, Université Nice Côte d'Azur

DIRECTEUR DE THÈSE

Dr Gilles Pagès, DR-HDR, IRCAN, Université Nice Côte d'Azur

RESUME

Les carcinomes des voies aéro-digestives supérieures (VADS) représentent le 5ème cancer le plus agressif au monde. Des résistances innées ou acquises entraînent des rechutes locales ou à distance malgré l'efficacité des traitements de référence, tels que la chirurgie, la chimiothérapie à base de cisplatine et la radiothérapie. Ces progressions sont malheureusement fatales à courte échéance.

Le but de ma thèse, est donc de découvrir de nouvelles cibles et stratégies thérapeutiques pertinentes pour les patients en impasse thérapeutique.

Les lignées cellulaires CAL33 et CAL27 issues de carcinomes épidermoïdes de la langue ont été utilisées comme modèles d'étude. Des cellules résistantes à la radiothérapie et/ou au cisplatine ont été générées, pour la première fois.

Mon projet de recherche repose sur l'identification de plusieurs kinases : PLK1 (Polo-like kinase), c-MET et AXL, surexprimées dans les cancers des VADS. Elles caractérisent la forte prolifération et les capacités migratoires et invasives des cellules cancéreuses. Elles sont surexprimées dans les tumeurs résistantes aux traitements de référence et une forte expression est corrélée à un mauvais pronostic vital. Mon travail comportait deux axes ;

- 1) La compréhension des mécanismes conduisant à la surexpression de PLK1
 - 2) La détermination de la pertinence du ciblage thérapeutique de PLK1, c-MET et AXL.
- Pour la partie 1, j'ai déterminé que la protéine « Roundabout Guidance Receptor 2 (ROBO2) », un récepteur impliqué dans l'organogenèse et le guidage axonal lors du développement est un élément clé du contrôle de l'expression de PLK1. L'inhibition par hyper-méthylation ou délétion de ROBO2 dans les cancers des VADS, favoriserait la surexpression de PLK1. ROBO2 agirait donc comme un suppresseur de tumeur.
- Pour la partie 2, j'ai montré que l'onvansertib (ciblage de PLK1) et le cabozantinib (ciblage d'AXL et de c-MET) diminuent la prolifération et l'invasion de cellules sensibles et résistantes aux traitements de référence (cisplatine et radiothérapie) générées en laboratoire. Ces traitements induisent la mort des cellules cancéreuses avec une faible toxicité sur les cellules saines. L'onvansertib et le cabozantinib réduisent fortement la croissance et les capacités invasives de cancers des VADS expérimentaux chez la souris immunodéprimée et le poisson zèbre. Ces deux inhibiteurs sont efficaces sur des coupes 3D réalisées à partir de biopsies de patients du Centre Antoine Lacassagne. L'onvansertib montre un gain d'efficacité en combinaison avec les traitements de référence. Ces associations permettent de réduire les doses et donc les toxicités de chaque traitement tout en conservant une efficacité maximale. L'onvansertib et le cabozantinib offrent donc de nouvelles perspectives de rémissions pour les patients en impasse thérapeutique à progression sous traitement par cisplatine et radiothérapie.

MOTS CLES : PLK1, AXL, c-MET, ROBO2, RÉSISTANCE CISPLATINE, RESISTANCE RADIOTHERAPIE

Head and Neck squamous cell carcinomas represent the 5th most aggressive cancer in the world. Innate or acquired resistances result in local or distant relapses following reference treatments including surgery, chemotherapy with cisplatin, and radiation therapy. Unfortunately, relapses are fatal shortly.

The goal of my thesis is therefore to discover new therapeutic targets and strategies relevant for patients in therapeutic deadlock.

The CAL33 and CAL27 cell lines from squamous cell carcinomas of the tongue were used as models. I derived cells resistant to radiation therapy and / or cisplatin for the first time.

My research project is based on the identification of several kinases: PLK1 (Polo-like kinase), c-MET and AXL, overexpressed in HSNCC tumors. They are overexpressed in tumors resistant to standard treatments and high expression is correlated with a poor vital prognosis. My work had two axes.

- 1) Understanding the mechanisms leading to the overexpression of PLK1
- 2) Determining the relevance of the therapeutic targeting of PLK1, c-MET and AXL.

For Part 1, I determined that the protein "Roundabout Guidance Receptor 2 (ROBO2)", a receptor involved in organogenesis and axonal guidance during development, is a key component in controlling PLK1 expression. Inhibition by hypermethylation or deletion of ROBO2 in HSNCC cancers, would promote the overexpression of PLK1. ROBO2 would therefore act as a tumor suppressor.

For Part 2, I showed that onvansertib (targeting PLK1) and cabozantinib (targeting AXL and c-MET) decrease the proliferation and invasion of sensitive and treatment-resistant cells (cisplatin and radiotherapy) that I generated in the laboratory. These treatments induce the death of cancer cells with low toxicity on normal cells. Onvansertib and cabozantinib strongly reduce the growth and invasiveness of experimental HNSCC tumors in nude mice and zebrafish. These two inhibitors are effective on 3D sections from biopsies of patients treated at the Cancer Center of Nice (Centre Antoine Lacassagne). Onvansertib shows a gain in efficacy in combination with standard treatments. These combinations make it possible to reduce the doses and therefore the toxicities of each treatment while maintaining maximum effectiveness. Therefore, onvansertib and cabozantinib offer new perspectives for patients with therapeutic deadlock on treatment with cisplatin and radiotherapy.

KEYWORDS : PLK1, AXL, c-MET, ROBO2, CISPLATIN RESISTANCE, RADIOTHERAPY RESISTANCE

REMERCIEMENTS

Aux membres du jury,
Docteur **Patrick AUBERGER**,
Docteur **Marcel BLOT-CHABAUD**,
Docteur **Luc FRIBOULET**,
Professeur **Christophe LE TOURNEAU**.

Je vous remercie de tout cœur de m'avoir fait l'immense honneur de faire partie de mon jury de thèse.

J'adresse tous mes remerciements au Docteur **Marcel BLOT-CHABAUD**, ainsi qu'au Docteur **Luc FRIBOULET**, de l'honneur qu'ils m'ont fait en acceptant d'être rapporteurs de ma thèse.

J'exprime toute ma gratitude au Professeur **Christophe LE TOURNEAU**, d'avoir accepté d'être examinateur de ma thèse.

Enfin je remercie très chaleureusement le Docteur **Patrick AUBERGER**, de présider ma thèse.

Je remercie le Dr **Gilles Pagès** et le Dr **Maeva Dufies**, de m'avoir choisie pour effectuer cette thèse. Ça a été un grand privilège pour moi de pouvoir travailler avec vous. Je vous remercie de m'avoir fait confiance sur ce projet et pour tous les challenges relevés grâce à votre soutien. Je vous remercie pour tout ce que vous m'avez appris sur le plan professionnel et humain. Travailler avec vous, m'a permis de construire mon avenir professionnel et au-delà, vous m'avez permis de grandir, d'avoir confiance en moi et de me surpasser. Je n'aurai jamais les mots pour vous exprimer toute ma reconnaissance. Merci de m'avoir donné cette chance incroyable.

Merci pour votre optimisme sans faille et pour tous vos encouragements tout au long de cette thèse. Gilles, Maeva, je vous souhaite encore d'accomplir de grandes choses avec ROCA Therapeutics, et de vous surpasser au niveau scientifique. Je vous serai à jamais reconnaissante ! Merci pour tout ! Vous êtes des personnes, fonceuses et travailleuses ! Des modèles de réussite pour moi !

Merci à toute mon équipe. Ce qui fait le succès d'une thèse ne dépend pas seulement du projet scientifique mais dépend aussi des personnes qui nous entourent. Je vous dois toute ma réussite, je vous dois tous ces moments de soutiens scientifiques et humains. Je suis plus que reconnaissante d'avoir vécu cette aventure avec vous car j'ai connu bien plus qu'une équipe mais une véritable famille qui vous épaula quand ça ne va pas et qui vous porte et vous encourage pour vous dépasser. Je vous remercie pour tous vos conseils, pour votre bienveillance, pour tous les moments partagés avec vous. J'ai une chance folle de vous avoir tous rencontrés et je doute retrouver cette ambiance extraordinaire dans l'avenir. Alors je vous dis un grand merci et sachez que je ne vous oublierai jamais :

Merci à la team ERK : **Roser, Philippe, Cercina**, pour tous vos conseils, votre aide sur mon projet, votre bienveillance et vos encouragements. Merci Philippe pour nos discussions au labo pendant qu'on manipulait. Merci Roser et Cercina pour vos oreilles attentives, votre patience et vos bons conseils

Merci à la team **Sonia, Manon Campillo**, ce fut un plaisir de partager mon bureau avec vous, merci pour toutes nos discussions scientifiques et personnelles, nos rires et nos pleurs. Merci à Sonia pour toutes tes chansons à tue-tête et ta gentillesse. A **Thomas et Saharnaz**, je vous souhaite un très bel avenir scientifique et des très belles années au sein de l'équipe !

Merci à la team **Sandy, Julien, Manon Teisseire**, pour tous vos conseils, pour tout votre soutien, vous former un trio de choc tellement incroyable. Merci Sandy pour tout ce que tu organises (dégustations, Noël, Pâques, Halloween, la Chandler...), pour ton souci de cohésion du groupe, de partage et de sourires. On oublie nos soucis de labo et on partage des moments merveilleux grâce à toi. Merci Julien pour ta bonne humeur, tes compétences parfaites de lab manager et ton souci du détail (pointes parallèles et propreté de la salle de culture). Je pense que tu as un peu déteint sur moi haha.

Merci à **Fred**. Je n'ai pas fait ma thèse avec toi mais j'ai eu la chance que tu rejoignes l'équipe pour profiter de ta présence. Merci pour tout Fred ! J'ai un lien très particulier avec toi car tu m'as connue quand j'étais toute petite (en M1 haha). Tu m'as appris tous les rudiments du labo, les principes de la recherche scientifique et je te serai à jamais reconnaissante. Merci pour ton soutien sans faille surtout dans les moments difficiles, pour tous tes conseils personnels et scientifiques. Tu es une personne de confiance et attachante, et d'une bienveillance infinie envers moi mais aussi envers tous les étudiants. Merci pour tous nos délires, nos fous rires et nos discussions existentielles. Tu es un chercheur de talent qui ira au bout de ses objectifs. Prend soins de tous tes futurs étudiants/étudiantes (**Saharnaz et Jessie**).

Merci à la team Maeva, **Olivia, Charlotte et Anne-Laure**. Merci Olivia pour ton soutien, pour ton aide moral et pour les manips, j'ai eu la chance de te former et aujourd'hui l'élève a largement dépassé le maître. Tu es une personne bosseuse et formidable qui ira loin ! A Charlotte et Anne-Laure, très bonne chance au sein du labo, vous serez bien entourées par cette équipe. Je vous souhaite à toutes les trois un avenir rempli de réussites au sein de ROCA Therapeutics.

Je remercie très chaleureusement aux chercheurs de l'équipe du Pr Hofman : **Patrick, Jeremy, Valerie**.

Merci Patrick pour tes conseils, ton implication et ton aide.

Clément, Laurent, Serena, Titou, Barnabé, Ben, Victoria, Karine, Iris, Ludo, Mickaël, Jonathan. Merci d'avoir participé tous les jours à la bonne humeur du labo. Merci pour ces 4 années passées ensemble. J'ai été ravie de tous vous connaître et d'avoir passé de beaux moments avec vous. Vous allez tous me manquer.

A Marie-Angela. Merci pour ta douceur, ta patience, ton soutien et tous tes conseils. Merci pour toutes nos discussions, tu es une personne incroyable que je n'oublierai jamais ! Je te souhaite une belle réussite dans tous tes futurs projets.

A Serena. La prochaine c'est toi ! Je te souhaite une merveilleuse carrière.

A Clément. Merci pour ta gentillesse, ta générosité et tous les moments passés avec les filles. Je te souhaite une belle réussite dans tes futurs projets.

Aux GIRLS : Sandy, Manon Campillo, Manon Teisseire et Olivia Vidal

Merci à vous toutes ! J'étais vraiment heureuse d'appartenir à votre groupe ! Merci à tous les moments partagés, les sorties, les vacances ensemble, les B****ages. Merci pour toutes nos discussions tard le soir, pour tous les petits apéros improvisés et nos petites pauses thé au labo. Merci pour votre soutien sans faille, votre capacité à me remonter le moral, à me faire sourire et rire. Merci d'avoir vu la vraie Anaïs ☺.

Merci Sandy, pour ton humour, ta créativité et tes capacités extraordinaires d'organisatrices (les $\frac{3}{4}$ de tout ce qu'on a fait c'est grâce à toi !).

Merci Manon Campillo et Manon Teisseire, mes deux compères de thèse, quel regret de ne pas vous avoir rencontrées dès le début de ma thèse où j'étais seule à la paillasse. Je n'oublierai pas tes chaussettes carna et tes millions de baskets Manon Teisseire, ni ton drôle de langage Manon Campillo (et un zabo ! Un !). Je vous souhaite le meilleur possible pour la suite de votre thèse !

Merci Olivia Vidal (nous la team vénère !). Sous ta carapace béton j'ai découvert ton cœur d'artichaut, ta générosité et ta douceur. Bosseuse et fonceuse, tu vas les éclater à Chicago !

A **Deborah**, J'ai la chance de t'avoir rencontrée il y a maintenant 13 ans. Merci pour ton humour, ton optimisme, ta bonne humeur et ton soutien infailible ! Tu me manques beaucoup, mais je te souhaite de t'épanouir et de te construire dans tous les projets que tu entreprendras B'H.

A **toute ma famille**. Merci de m'avoir soutenue pendant ces années de thèse pas toujours faciles. Merci d'avoir eu la patience, la compréhension et le soutien dont j'avais besoin. Que vous puissiez avoir la santé, la réussite et le bonheur B'H.

A **mes grands-pères** ; j'aurais aimé que vous soyez là en ce jour, j'espère que vous êtes fiers de moi, vous me manquez profondément.

A **mes grands-mères**. Merci d'être toujours là près de moi, pour votre sagesse, votre soutien et vos conseils. Que vous puissiez avoir une longue vie en bonne santé sDv.

A **Elisa**. Merci d'être là, merci de mettre l'ambiance à la maison, merci d'être la meilleure petite sœur du monde. Promets-moi de ne jamais perdre ta joie de vivre, ton optimisme et ta confiance en toi. Reste telle que tu es et tu réussiras tout ce que tu entreprendras B'H. Je serai toujours là pour toi.

A **Annaëlle**. Que tu t'épanouisses dans tous tes projets et que tu réussisses tout ce que tu entreprendras B'H.

A **mon beau-père**. Merci d'être là tous les jours, merci de rendre heureuse maman. Merci pour ton soutien, ta gentillesse et ta bienveillance.

A **mes parents**. Merci pour tout l'amour que vous me portez. Merci pour l'éducation que vous m'avez donnée. Merci pour votre patience, votre écoute et vos encouragements surtout dans les moments difficiles et de doutes. Je vous dois tout.

TABLE DES MATIERES

RESUME	3
--------------	---

REMERCIEMENTS.....	6
INTRODUCTION.....	15
I. LES CARCINOMES EPIDERMOÏDES DES VOIES AERO-DIGESTIVES SUPERIEURES (VADS)	16
1. DESCRIPTION DES VOIES AERO-DIGESTIVES SUPERIEURES.....	16
a. Les voies aériennes supérieures.....	16
b. Les voies digestives supérieures.....	17
c. Structure et organisation de la muqueuse orale.....	18
2. ÉPIDEMIOLOGIE ET ETIOLOGIE DES CANCERS DES VADS.....	20
a. Données épidémiologiques.....	20
b. Topographie des cancers des VADS.....	21
c. Facteurs de risque.....	22
3. CARCINOGENÈSE DES CANCERS DES VADS.....	25
a. Altérations tissulaires.....	25
b. Altérations chromosomiques.....	26
c. Altérations des voies de signalisation.....	28
4. PRISE EN CHARGE THERAPEUTIQUE.....	33
a. Diagnostic clinique.....	33
b. Traitements.....	36
II. LA POLO-LIKE KINASE 1 (PLK1).....	48
1. LA FAMILLE DES POLO-LIKE KINASES.....	48
a. Découverte : de la levure à l'Homme.....	48
b. Les membres de la famille Polo-like kinase.....	48
2. PLK1 : ACTEUR MAJEUR DU CYCLE CELLULAIRE.....	53
a. Organisation du cycle cellulaire.....	53
b. Régulation du cycle cellulaire par PLK1.....	54
3. PLK1 ET CANCER.....	64
a. PLK1 : promoteur de tumeurs et d'agressivité tumorale.....	64
b. PLK1 : suppresseur de tumeur.....	66
c. PLK1 dans les carcinomes épidermoïdes des VADS.....	67
4. PLK1 COMME CIBLE THÉRAPEUTIQUE.....	69
a. PLK1 et résistance aux traitements.....	69
b. Inhibiteurs de PLK1 et essais cliniques.....	70
III. AXL/C-MET.....	76

1.	STRUCTURES ET FONCTIONS	76
a.	Structure et fonctions biologiques de la famille TAM (TYRO3, AXL, MER).....	76
b.	Structure et fonctions biologiques de la famille HGFR (c-MET).....	80
2.	IMPLICATION D'AXL ET C-MET DANS LE CANCER	84
a.	Dérégulation d'AXL et c-MET	84
b.	AXL et c-MET facteurs d'agressivité	87
c.	Activation d'AXL et c-MET dans les carcinomes épidermoïdes des VADS.....	91
3.	AXL ET C-MET COMME CIBLES THÉRAPEUTIQUES	94
a.	AXL et c-MET : acteurs de la résistance aux traitements.....	94
b.	Inhibiteurs d'AXL et c-MET et essais cliniques.....	95
IV.	ROUNDABOUT GUIDANCE RECEPTOR (ROBO)	101
1.	LES FAMILLES ROUNDABOUT GUIDANCE RECEPTOR (ROBO) ET SLIT	101
a.	Présentation des récepteurs ROBO et des ligands SLIT	101
b.	Fonctions biologiques	103
2.	ROBO/SLIT ET CANCER	112
a.	Altération de l'expression des ligands SLITs et des récepteurs ROBOs.....	112
b.	SLITs et ROBOs en tant que suppresseurs de tumeurs.....	114
c.	SLITs et ROBOs en tant que promoteurs de tumeurs.....	119
V.	OBJECTIFS	125
	RÉSULTATS	127
1.	ARTICLE N°1	128
2.	ARTICLE N°2	129
3.	ARTICLE N°3	130
	DISCUSSION	143
1.	ARTICLE N°1	145
2.	ARTICLE N°2	151
3.	ARTICLE N°3	156
	BIBLIOGRAPHIE	162

TABLE DES FIGURES

Figure 1 : Schéma des voies aéro-digestives supérieures (VADS)	18
Figure 2 : Organisation et structure de la muqueuse buccale.....	19
Figure 3 : Organisation du tissu conjonctif appelé chorion de la muqueuse buccale	20
Figure 4 : Modifications génétiques associées à la progression des cancers des VADS	27
Figure 5 : Voies de signalisation impliquées dans la carcinogenèse des cancers des VADS.....	32
Figure 6 : Principales cibles des inhibiteurs et des anticorps monoclonaux des récepteurs anti-angiogéniques testés dans les cancers des VADS.....	42
Figure 7 : Inhibition des voies CTLA-4 et PD-1/PD-L1	45
Figure 8 : Prise en charge thérapeutique des patients aux stades précoce et avancé	46
Figure 9 : Les membres de la famille Polo-like kinase.....	50
Figure 10 : Fonctions cellulaires des membres de la famille Polo like kinase.....	52
Figure 11 : La progression du cycle cellulaire régulée par les complexes Cdk-Cyclines	53
Figure 12 : Déroulement du cycle cellulaire et des étapes de la mitose.....	54
Figure 13 : Rôles de PLK1 dans le cycle du centrosome	57
Figure 14 : PLK1 durant l'entrée en mitose	58
Figure 15 : Rôle de PLK1 dans le point de contrôle de l'assemblage du fuseau mitotique.....	60
Figure 16 : PLK1 durant la cytokinèse.....	61
Figure 17 : PLK1 dans la réponse aux dommages à l'ADN.....	63
Figure 18 : PLK1, promoteur de tumeurs et d'agressivité tumorale	66
Figure 19 : Les récepteurs de la famille TAM (AXL, TYRO3, MER) et leur ligands (GAS6 et PROS1).....	77
Figure 20 : Le récepteur c-MET et son ligand HGF.....	81
Figure 21 : Étapes d'activation du récepteur c-MET.....	82
Figure 22 : Régulation du récepteur AXL	85
Figure 23 : Régulation du récepteur c-MET	87
Figure 24 : Voies de signalisation de c-MET	90
Figure 25 : Voies de signalisation du récepteur AXL.....	91
Figure 26 : Structure des récepteurs ROBO et des ligands SLIT	102
Figure 27 : Schéma de l'orientation classique des axones dans la moelle épinière d'embryons de souris.....	105
Figure 28 : Régulation du guidage axonal par SLIT/ROBO via l'activation des protéines c-ABL ou MENA, régulateurs du cytosquelette d'actine.....	106
Figure 29 : Régulation du guidage axonal par SLIT/ROBO via l'activation des protéines RHO GTPases, régulateurs du cytosquelette d'actine.	108
Figure 30 : ROBO4 inhibe l'angiogenèse induite par VEGFR2.....	109

Figure 31 : SLIT/ROBO inhibe la prolifération et la migration en induisant la dégradation de la β -caténine	116
Figure 32 : Mécanismes de la voie SLIT/ROBO en tant que gène suppresseur de tumeur dans la progression tumorale	118
Figure 33 : SLIT/ROBO favorise la prolifération.....	120
Figure 34 : SRC active c-ABL pour stabiliser l'expression de ROBO1 pour favoriser la migration cellulaire	121
Figure 35 : SLIT2/ROBO1 favorisent la migration cellulaire	122

TABLEAUX

Tableau 1 : Répartition topographique et histologique des cancers des VADS et facteurs de risque	22
Tableau 2 : Classification TNM des cancers des VADS.....	35
Tableau 3 : Classification générale par stades des tumeurs des VADS.....	36
Tableau 4 : Inhibiteurs de PLK1 en essais cliniques.....	74
Tableau 5 : Inhibiteurs de c-MET et AXL en essais cliniques dans les cancers des VADS.....	99
Tableau 6 : Rôle oncogène et suppresseur de tumeur de la signalisation SLIT/ROBO dans les cancers humains	123

INTRODUCTION

I. LES CARCINOMES EPIDERMOÏDES DES VOIES AERO-DIGESTIVES SUPERIEURES (VADS)

1. Description des voies aéro-digestives supérieures

Les VADS comprennent les **voies aériennes supérieures** et les **voies digestives supérieures**. Elles font donc parties des systèmes respiratoire et digestif (**Figure 1**).

a. Les voies aériennes supérieures

Elles ont pour fonction, le **passage** et le **traitement de l'air** jusqu'à la trachée qui se dirigera ensuite dans les poumons. Plusieurs organes les composent.

Le **nez** est constitué de différentes structures dont les fonctions principales sont de réchauffer et filtrer l'air inspiré par les narines. Il contribue à la production de la voix appelé phonation, et dans la perception des odeurs appelée olfaction.

Les deux narines débouchent sur deux **fosses nasales** qui s'étendent jusqu'au nasopharynx. Les fosses nasales communiquent avec d'autres cavités, les **sinus**, appelés maxillaires, ethmoïdaux, frontaux et sphénoïdaux. Ce sont des cavités remplies d'air dans les os du crâne et dont l'objectif est le réchauffement et l'humidification de l'air inspiré.

Le passage de l'air se poursuit jusqu'au **pharynx**. Il représente un conduit long de 13 centimètres. Il relie les fosses nasales au larynx et la cavité buccale à l'œsophage. Il constitue un carrefour entre les voies aériennes supérieures (respiration) et les voies aéro-digestives supérieures (alimentation). Il se compose de trois parties, à savoir le nasopharynx, l'oropharynx et l'hypopharynx. Le **nasopharynx** fait partie des voies aériennes et se distingue de l'oropharynx et de l'hypopharynx qui font partie des voies digestives. Il est obstrué par la luvette pour éviter que les aliments ne remontent vers les fosses nasales.

L'air passe donc par le nasopharynx et rejoint le larynx.

Le **larynx** est constitué de cartilage et contient les cordes vocales qui sont des replis ligamentaires et musculaires. Le larynx possède donc un rôle majeur dans la phonation mais aussi dans la protection des voies aériennes. Il active la fermeture d'une structure cartilagineuse, appelée épiglote lors de l'activité digestive pour éviter le passage

d'aliments dans la **trachée** qui apporte ensuite l'air préalablement filtré jusqu'aux **bronches**.

Les muqueuse naso-sinusiennes et trachéales sont recouvertes de cils qui permettent la clairance muco-ciliaire, c'est à dire la circulation du mucus pour l'élimination des déchets et des bactéries.

b. Les voies digestives supérieures

Les voies digestives supérieures sont constituées de la cavité buccale, des glandes salivaires, de l'oropharynx, de l'hypopharynx et de l'œsophage. Ces structures ont pour but d'assurer la **déglutition** ainsi que la **digestion** des aliments.

La **cavité buccale** est constituée des lèvres, des gencives, des dents qui reposent sur le squelette osseux de la face (mandibule et maxillaire), des joues, du palais, de la langue et du plancher buccal.

L'intérieur de la cavité buccale est tapissé d'une muqueuse buccale sur laquelle les **glandes salivaires** assurent l'humidification de la bouche et jouent un rôle actif dans la digestion. Les rôles principaux de la cavité buccale sont la mastication et la perception du goût des aliments ainsi que la phonation.

Les aliments sont donc broyés par les dents et refoulés à l'arrière de la langue vers **l'oropharynx** pendant la déglutition.

Le bol alimentaire rejoint ensuite la partie basse du pharynx, **l'hypopharynx** puis **l'œsophage**.

Cet organe fait partie du tube digestif. Il permet de diriger les aliments grâce aux contractions de ses fibres musculaires lisses vers **l'estomac**.

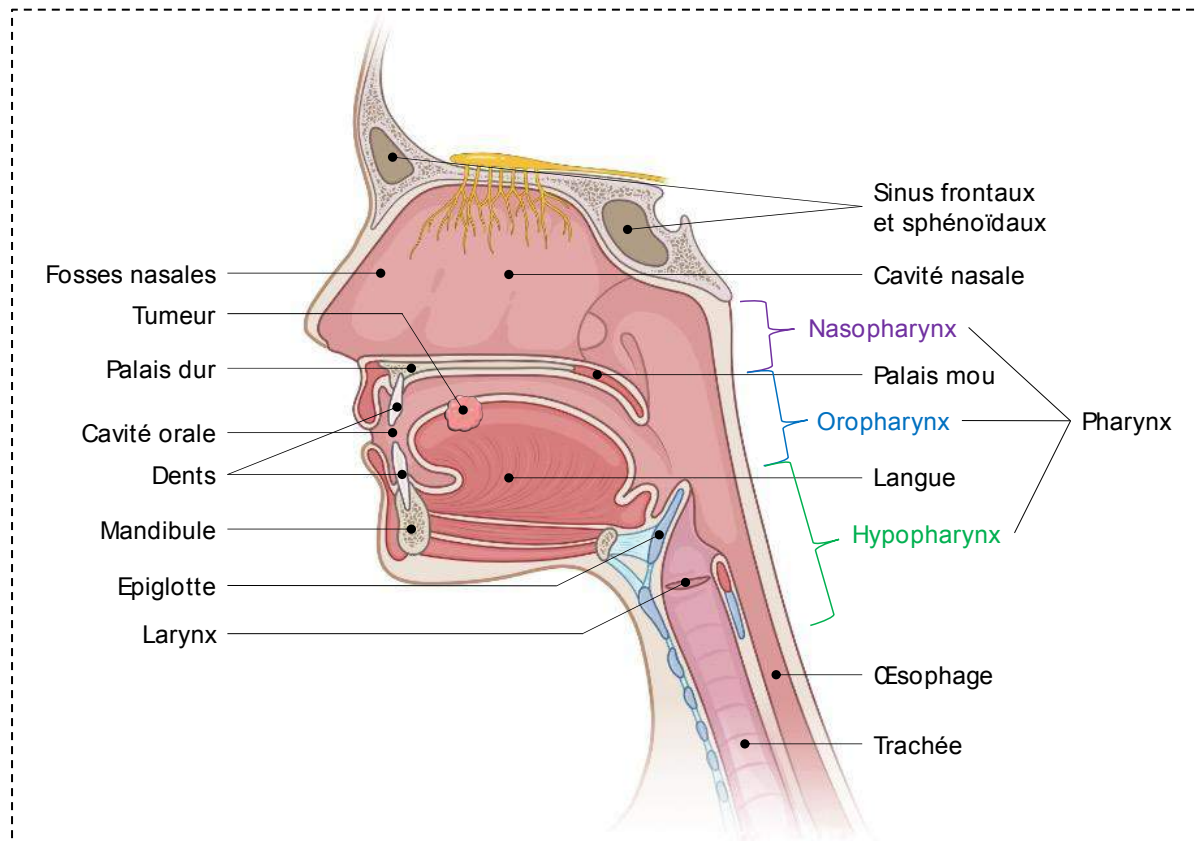


Figure 1 : Schéma des voies aéro-digestives supérieures (VADS)

c. Structure et organisation de la muqueuse orale

Histologiquement, l'ensemble des voies aéro-digestives supérieures est tapissée d'une **muqueuse épithéliale de type malpighienne**, pluristratifiée plus ou moins kératinisée selon le type de muqueuse à savoir **bordante** (majorité de la cavité buccale, non kératinisée), **masticatrices** (les gencives et le palais osseux, kératinisée) ou **spécialisée** (la langue, kératinisée). Il offre une protection contre les dommages mécaniques, microbiens et chimiques¹.

L'épithélium malpighien se divise en quatre parties distinctes : les couches **basale**, **épineuse**, **granuleuse** et **cornée** (Figure 2). La couche basale la plus profonde est en contact avec la lame basale sous-jacente. Les cellules épithéliales de la couche basale sont indifférenciées et se divisent en continu pour évoluer ensuite vers les couches supérieures jusqu'à la couche cornée où les cellules sont différenciées puis exfoliées pour être renouvelées².

L'épithélium malpighien est composé à 90% par les cellules **kératynocytes** qui offrent une protection contre les dommages mécaniques, microbiens et chimiques.

L'épithélium est aussi constitué de **mélanocytes** chargés de la pigmentation de la muqueuse, de **cellules de Merkel** jouant un rôle sensoriel, de **cellules de Langherans** et de **des cellules de défense** composées de cellules immunitaires sentinelles et de lymphocytes T³.

Les cellules de l'épithélium sont liées par des desmosomes et reposent sur une **lame basale**. Elle maintient la structure épithéliale et contrôle la filtration de substances destinées aux cellules épithéliales, la migration, la différenciation et l'organisation des cellules.

La lame basale sépare l'épithélium du **chorion**, un tissu conjonctif qui assure le support de l'épithélium (**Figure 3**). Il est composé de fibroblastes, de cellules immunitaires, de fibres de collagène, de vaisseaux sanguins et de nerfs⁴.

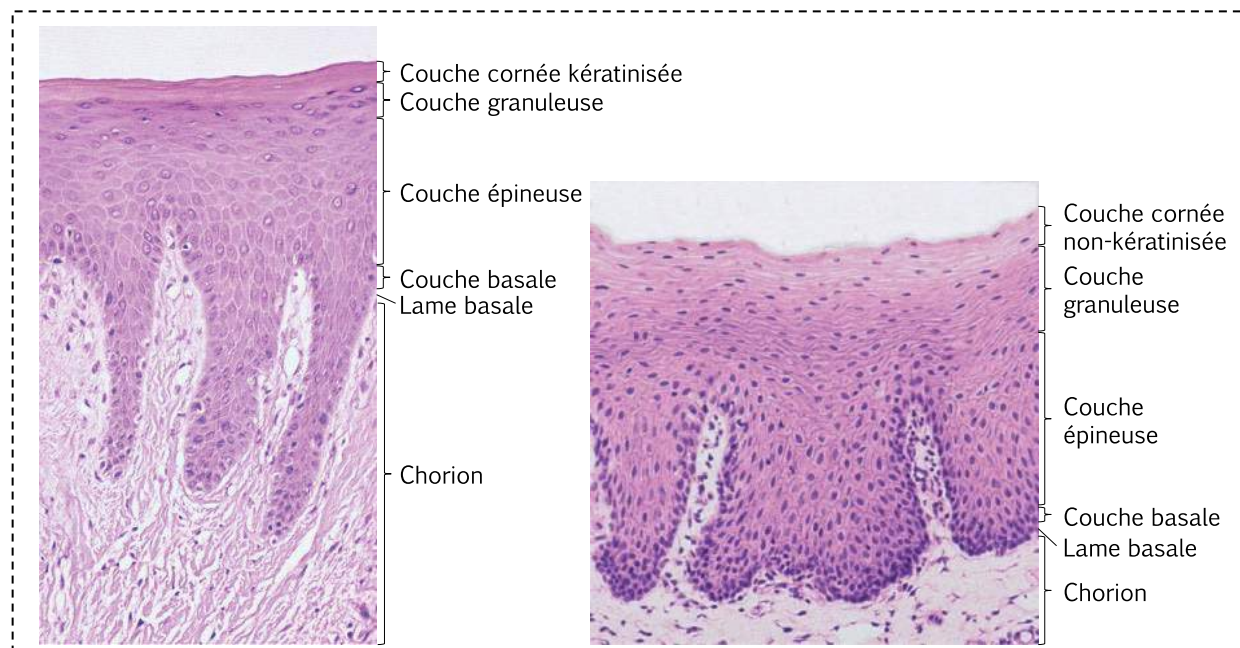


Figure 2 : Organisation et structure de la muqueuse buccale (D'après Squier et al, 2010)⁵. Coupe histologique d'une gencive (à gauche), kératinisée et d'une cavité buccale (à droite), non kératinisée.

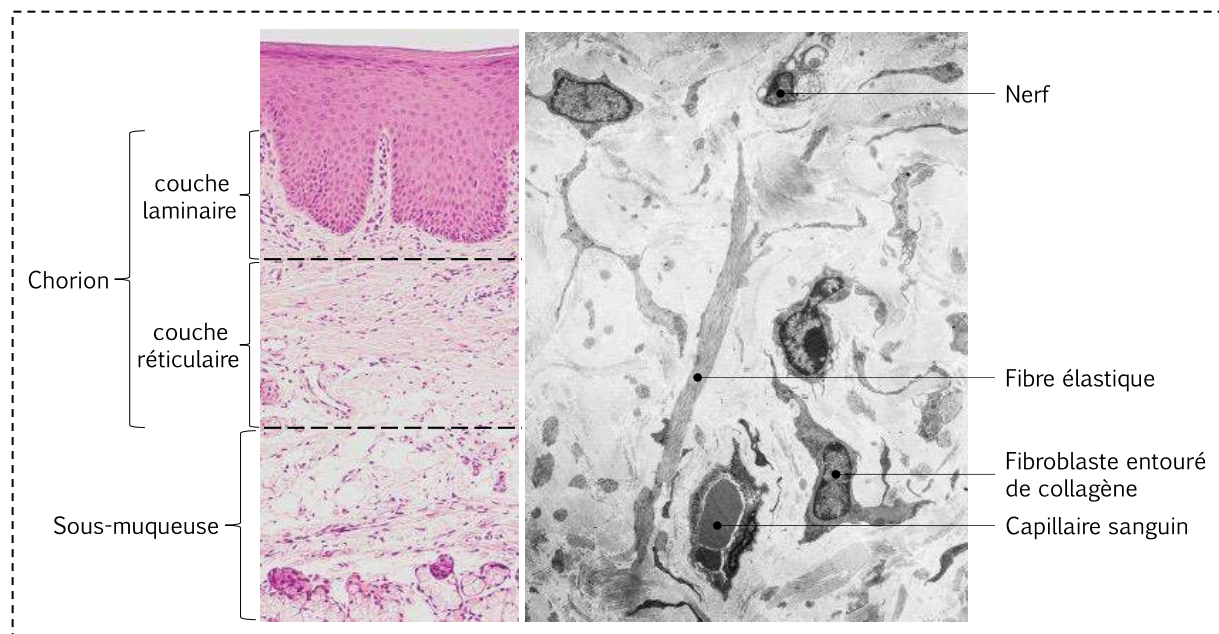


Figure 3 : Organisation du tissu conjonctif appelé chorion de la muqueuse buccale (D'après Squier et al, 2010)⁵. Coupe histologique (gauche) et en microscopie électronique (droite) de la composition du chorion.

2. Épidémiologie et étiologie des cancers des VADS

a. Données épidémiologiques

Environ **90%** des cancers des VADS sont des carcinomes épidermoïdes. 890 000 nouveaux cas dans le monde ont été diagnostiqués pour 450 000 décès en 2018⁶. Ils représentent 2,1% de l'ensemble des cancers hommes-femmes confondus. 11 610 nouveaux cas en France en 2015 ont été diagnostiqués.

Les carcinomes épidermoïdes touchent en moyenne des hommes et des femmes âgés respectivement de 63 ans et 61 ans (estimation en 2012).

Chez l'homme, ils se situent au **6^{ème} rang** des cancers et représentent 3,8 % des cancers masculins. Chez la femme, ces cancers se placent au **10^{ème} rang**, soit près de 2,1 % des cancers féminins. Le taux d'incidence de ces cancers chez **l'homme a fortement diminué depuis 1980** (-2,8% par an entre 1980 et 2012). Cependant, le taux d'incidence est **en augmentation chez la femme** (+1,5% par an entre 1980 et 2012) lié aux facteurs de risque alcoolotabagiques plus récents chez les femmes.

3 027 décès par cancers lèvre-bouche-pharynx sont dénombrés en 2015 en France métropolitaine, **soit 2% des décès par cancer** (2,7 % des décès par cancer chez l'homme et 1,2 des décès par cancer chez la femme)⁷.

Le taux de survie globale à 10 ans (sur la période 1989-2010) est seulement de **18 à 31% selon l'âge** (21% en France, dont 17% chez l'homme et 36% chez la femme, données INCA, 2015).

Ce type de cancers montre donc un pronostic sombre en raison des retards dans le diagnostic. La proximité des ganglions lymphatiques situés au niveau de la tête et du cou permet également une dissémination métastatique par voie lymphatique. **Ces chiffres soulignent donc l'importance du dépistage précoce et de la recherche de nouvelles stratégies thérapeutiques.**

b. Topographie des cancers des VADS

Les carcinomes épidermoïdes se développent au niveau de la cavité buccale (majoritairement sur la langue), de la lèvre et du pharynx (selon la Haute Autorité de Santé) ([Tableau 1](#)).

Le site le plus courant où se développent les carcinomes épidermoïdes est la **langue**. Ces tumeurs représentent environ 40% de tous les cas de la cavité buccale proprement dite⁸. Le plancher buccal est la deuxième localisation orale la plus fréquente. Les sites moins courants comprennent la gencive, la muqueuse buccale, la muqueuse labiale et le palais dur.

La langue latérale et le plancher buccal (avec une extension vers le palais mou latéral et la région amygdalienne) représentent les zones avec le plus grand risque de développement de ce cancer. Deux facteurs principaux sont responsables de ce haut risque : tout d'abord, tous les agents cancérigènes se mélangent à la salive, s'accumulent au fond de la bouche et baignent constamment ces sites ; d'autre part, ces régions de la bouche sont recouvertes d'une muqueuse plus fine et non kératinisée, ce qui offre une plus faible protection contre les agents cancérigènes⁸.

TOPOGRAPHIE	REPARTITION	TYPE HISTOLOGIQUE	PRINCIPAUX FACTEURS DE RISQUE
Cavité buccale	20-25 %	Carcinome épidermoïde	Alcool et tabac (effet synergique)
Oropharynx	10-15 %		Alcool, tabac (effet synergique) et HPV
Hypopharynx	25-30 %		Alcool et tabac (effet synergique)
Larynx	30-35 %		Tabac (prédominant), alcool
Sinus ethmoïde Fosses nasales	< 1 %	Adénocarcinome	Exposition professionnelle (poussières de bois, nickel, aldéhyde formique, acide chromique)
Nasopharynx	< 1 %	Carcinome nasopharyngé	Virus d'Epstein Barr (EBV)

Tableau 1 : Répartition topographique et histologique des cancers des VADS et facteurs de risque

(Selon la Haute Autorité de Santé)⁹

c. Facteurs de risque

Les facteurs de risques consistent à déterminer les éléments qui contribuent aux cancers des VADS.

Les effets du tabagisme, de la forte consommation d'alcool et d'une mauvaise alimentation expliquent probablement plus de 90% des cas de cancer de la tête et du cou¹⁰. D'autres facteurs environnementaux interviennent tels qu'une infection virale ou une exposition professionnelle à des agents cancérigènes.

- **Le tabac**

Le risque de développer un cancer buccal est cinq à neuf fois plus élevé pour les fumeurs que pour les non-fumeurs, et ce risque peut augmenter jusqu'à 17 fois pour les gros fumeurs (80 cigarettes ou plus par jour)⁸. Les produits du tabac provoquent divers cancers, notamment ceux du poumon, de la cavité buccale, des fosses nasales, du larynx, de l'oropharynx, de l'hypopharynx, de l'œsophage, de l'estomac, du foie, du pancréas, de la vessie, de l'uretère, des reins, du col de l'utérus, et des leucémies myéloïdes¹¹. La nicotine non reconnue comme cancérigène contribue néanmoins à la dépendance au tabac. Les cancérigènes contenus dans les produits du tabac sont responsables de ces cancers. La fumée de tabac contient plus de 60 cancérigènes

et au moins 16 dans le tabac non brûlé évalués par l'Agence Internationale pour la Recherche sur le Cancer (IARC)¹¹. Ces produits chimiques sont tous des cancérogènes toxiques pour l'ADN qui peuvent jouer un rôle clé dans l'initiation et la promotion de types spécifiques de cancer tels que le carcinome épidermoïde¹². Parmi ceux-ci, les **nitrosamines** spécifiques au tabac (4-(méthylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK) et N'-nitrosonornicotine (NNN)), les **hydrocarbures aromatiques polycycliques** tels que le benzo(a)pyrène (PAHs), les **amines aromatiques** telles que le 4-aminobiphényle, ou encore des **métaux lourds** tels que le cadmium, le plomb, le chrome et le mercure semblent jouer un rôle important dans l'initiation de ce cancer. La quantité totale de cancérogènes dans la fumée de cigarette s'élève de 1 à 3 mg par cigarette (similaire à la quantité de nicotine, qui est de 0,5 à 1 mg par cigarette)¹¹. Les PAHs sont à l'origine de mutations de l'ADN. Ces mutations permanentes se produisent dans des régions cruciales d'oncogènes tels que RAS et c-MYC, ou sur des gènes suppresseurs de tumeurs tels que TP53 et p16. Il en résulte une perte des mécanismes normaux de contrôle de la prolifération cellulaire et le développement d'un cancer^{13,14}. Les NNKs et NNNs induisent des cancers de la cavité orale chez le rat tout comme le tabac à priser¹⁵.

- **L'alcool**

La relation entre l'alcool, en particulier les alcools forts, et le carcinome épidermoïde est reconnue depuis longtemps¹⁶. Aucun seuil de consommation sans risque n'a été identifié, et même une consommation faible ou modérée d'alcool augmente le risque de cancers¹⁷.

L'effet cancérigène des boissons alcoolisées serait dû à des **enzymes incapables de métaboliser correctement l'alcool**. En effet, le risque de cancer des VADS chez les buveurs d'alcool dépend de polymorphismes des gènes codant pour les enzymes du métabolisme de l'éthanol tels que les **alcools déshydrogénases** (les variants ADH1C*1 et ADH1B*2), les **aldéhydes déshydrogénases** (le variant ALDH2*2 Lys/Lys)^{18,19} ou encore le **cytochrome P450 2E1**, qui oxyde l'éthanol en acétaldéhyde et active les procarcinogènes du tabac, notamment les nitrosamines²⁰.

Outre ces prédispositions génétiques, l'éthanol pur n'agissant pas comme cancérigène, agirait comme un solvant pour la pénétration de cancérigènes à travers la muqueuse des organes aérodigestifs supérieurs²¹.

- **Les infections virales**

Les **papillomavirus humains** (HPV), les virus des **hépatites B et C** (VHB et VHC)²², le **virus Epstein-Barr** (EBV) ainsi que la bactérie **Helicobacter pylori**²³ sont les quatre principaux agents infectieux à l'origine des cancers des VADS.

Les infections par **papillomavirus humains** (HPV) et en particulier HPV16 et HPV18 ont été définies comme facteurs de risque à cause de leur potentiel oncogénique. Ce type de virus est composé d'un ADN double brin qui s'incorpore dans le génome humain. Ils produisent des oncoprotéines virales telles que E6 et E7. Elles inactivent des gènes suppresseurs de tumeur tels que pRb²⁴ et p53²⁵, ce qui favorisent la progression tumorale. L'oncoprotéine E6 favorise la surexpression des protéines du cycle cellulaire FOXM1, la cycline B1, D1 et Cdc25 ainsi que la translocation nucléaire de la β -caténine, contribuant à l'EMT (transition épithélium-mésenchyme). L'oncoprotéine E7 active la voie de signalisation PI3K/AKT favorisant la résistance aux traitements. Ensemble, ces modifications conduisent à la prolifération des kératinocytes et à la formation de métastases^{26,27}.

L'infection par HPV est typiquement à l'origine de carcinomes épidermoïdes oropharyngés. Le statut HPV tumoral est un facteur pronostique important et indépendant de survie chez les patients atteints d'un cancer de l'oropharynx. Les patients HPV positifs présentent une meilleure réponse à la chimio-radiothérapie et donc un meilleur pronostic que les patients HPV négatifs²⁸. La vaccination anti-HPV dans le cadre de la prophylaxie des cancers de l'utérus a grandement contribué à la diminution des cancers des VADS chez les femmes. Cette vaccination recommandée actuellement chez les hommes pour les cancers oropharyngés et du canal anal permettrait une prophylaxie des cancers des VADS.

Le **virus Epstein-Barr** est un virus qui fait partie de la famille des Herpès Virus responsable par exemple de la mononucléose infectieuse et qui se transmet par la salive. Il s'accumule dans les cellules épithéliales et entraîne la prolifération continue des lymphocytes B, présents dans les tissus lymphoïdes telles que les amygdales²⁹.

Le virus persiste ensuite toute la vie chez l'hôte infecté, surtout dans les lymphocytes B mémoires³⁰. Il induit des modifications épigénétiques à l'origine de cancers des VADS^{31,32}.

- **Les expositions professionnelles**

Certains cancers rares de type adénocarcinomes sont favorisés par les expositions professionnelles notamment les poussières de bois irritantes et cancérogènes inhalées qui multiplient les risques du tabac et de l'alcool. D'autres substances cancérogènes ont été recensées telles que l'amiante, certaines huiles minérales, les hydrocarbures, les peintures, les acides forts, les fumées de diesel et certains solvants qui sont autant de facteurs de risques pour le développement de cancers des VADS³³.

3. Carcinogénèse des cancers des VADS

a. Altérations tissulaires

Les cancers des VADS précoces et les **lésions précancéreuses** sont souvent subtiles et asymptomatiques, ce qui entraîne la découverte du cancer à des stades avancés chez les patients. Par conséquent, il est important pour le clinicien de maintenir un indice de suspicion élevé, surtout si des facteurs de risque tels que le tabagisme ou l'abus d'alcool sont présents.

Le carcinome épidermoïde buccal invasif (métastases) est souvent précédé de **modifications précancéreuses** cliniquement identifiables de la muqueuse buccale. Ces lésions se présentent souvent sous forme de plaques blanches ou rouges, appelées respectivement **leucoplasie** et **érythroplasie**, toutes deux causées par le tabac et l'alcool⁸. Histologiquement, la mise en place d'un carcinome invasif implique différentes lésions intra-épithéliales³⁴:

L'hyperplasie se caractérise par une augmentation du volume tissulaire due à une forte activité mitotique dans ces cellules.

Le stade de **dysplasie** se définit par une accumulation de mutations dans ces cellules qui favorisent leur prolifération. Elles se caractérisent par des changements **architecturaux** de l'épithélium : stratification épithéliale irrégulière, perte de polarité des cellules basales, augmentation du nombre de cellules mitotiques, kératinisation

prématurée des cellules (dyskératose). Il subit également des changements **cytologiques** : tailles et formes des noyaux et/ou cellules anormales, défauts du nombre de chromosomes et de mitoses³⁵.

Le classement de la dysplasie dépend de l'étendue de l'envahissement des couches épithéliales par les modifications dysplasiques. La plupart des dysplasies de **bas grade** (dysplasie **légère** ou **modérée**) n'évoluent pas en cancer. Cependant, la dysplasie de **haut grade** (dysplasie **sévère**), progresse souvent si elle n'est pas traitée.

Un **carcinome in situ** se met en place lorsque les cellules tumorales sont présentes dans toute l'épaisseur de l'épithélium.

Il devient **invasif** lorsque la lame basale est rompue. Les cellules du carcinome gagnent le tissu conjonctif pour rejoindre la circulation sanguine ce qui entraîne une dissémination métastatique et donc un mauvais pronostic³⁶.

b. Altérations chromosomiques

Les cancers des VADS sont caractérisés par une instabilité génétique, avec une perte ou un gain de régions chromosomiques. Certaines anomalies chromosomiques sont associées à des stades spécifiques de la progression de la maladie³⁴ (**Figure 4**).

La perte du chromosome **9p21** se produit lors de la progression de la muqueuse épithéliale normale de la tête et du cou vers l'hyperplasie. La perte de cette région inclue les gènes suppresseurs de tumeur **CDKN2A** et **ARF** qui codent respectivement pour la protéine **p16**, inhibiteur des kinases du cycle CDK4/CDK6, et pour la protéine **p14**, inhibiteur des CDK4/6 et stabilisateur de p53.

La progression du stade de l'hyperplasie à la dysplasie est marquée par la perte des chromosome **3p21** et **17p13** où se trouve le gène **TP53**.

La transition du stade dysplasique jusqu'au carcinome *in situ* implique un gain de fonction des chromosomes **11q13**, **3q** et **8q** et une perte de fonction des chromosomes **13q21** et **14q32**. Les régions 11q13, 3q et 8q qui contiennent le locus des gènes **Cycline D1 (CCND1)**, **EGFR**, **PI3K (PI3KCA)**, semblent directement impliquées dans la carcinogénèse. Ces protéines favorisent la croissance tumorale et la dissémination métastatique.

Enfin, la progression vers le carcinome invasif se caractérise par la perte des chromosomes **6p**, **8**, **4q27** et **10q23** où se situe le gène **PTEN** responsable de l'inhibition de la voie de signalisation **PI3K/AKT**³⁷.

Collectivement, ces études sur les anomalies chromosomiques révèlent que de multiples altérations génétiques sont nécessaires pour donner lieu à un carcinome invasif.

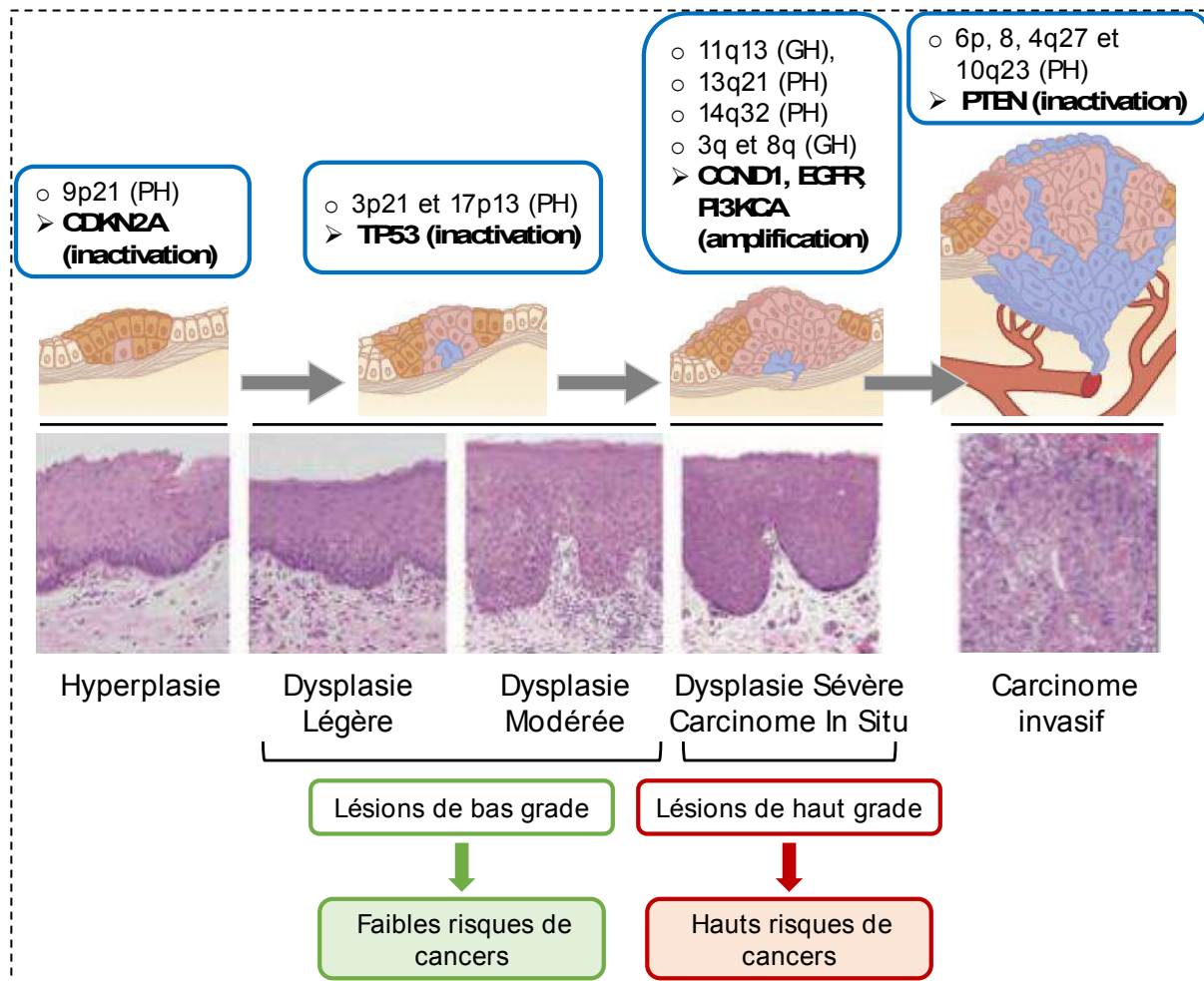


Figure 4 : Modifications génétiques associées à la progression des cancers des VADS (D'après Polanska et al, 2014³⁸ et Poh et al, 2008³⁵). La mise en place du cancer débute par des lésions tissulaires caractérisées par l'hyperplasie, la dysplasie de bas et de haut grade. Ces modifications conduisent à un carcinome in situ puis invasif lorsque les cellules atteignent la circulation sanguine. Ces différents stades s'accompagnent de pertes (PH) ou de gains d'hétérozygotie (GH). Ils impliquent l'inactivation de gènes suppresseurs de tumeurs ou l'activation d'oncogènes, tels que *CDKN2A* et *TP53* (*p16* et *p53*) aux stades précoces, et *CCND1* (cycline *D1*), *EGFR*, *PI3KCA* (*PI3K*) et *PTEN* aux stades ultérieurs.

Le séquençage d'exomes de tumeurs des VADS ainsi que les données du TCGA (« *The Cancer Genome Atlas* ») ont mis en évidence plusieurs gènes mutés ou avec un nombre altéré de copies. Les **tumeurs HPV positives** présentent en majorité, une perte

fréquente de **TRAF3** (réponse immunitaire déficiente) et une amplification de **E2F1** (prolifération cellulaire accrue) alors que les **tumeurs HPV négatives** présentent des modifications fréquentes de **CDKN2A** et **TP53**³⁹.

Les gènes majoritairement altérés ont été regroupés en différentes catégories, dont ceux impliqués dans la **survie et la prolifération cellulaires** (**TP53**, **PIK3CA**, **CDKN2A** et **CCND1**), la **différenciation cellulaire** (**NOTCH1**, **FAT1**, **AJUBA**, **CTNNB1**), la **signalisation d'adhésion et d'invasion cellulaire** (**EGFR**, **VEGF**, **FGFR**, **E-cad**, **N-cad**) et les **fonctions épigénétiques** (**NSD1** et **KMT2D**)³⁹⁻⁴¹.

c. Altérations des voies de signalisation

Les tumeurs des VADS expriment de manière aberrante des protéines de signalisation et/ou d'activation des voies de signalisation (**Figure 5**).

- **Cycle cellulaire et prolifération cellulaire**

P16 (codée par le gène **CDKN2A**) et **p53** (codée par le gène **TP53**) sont des suppresseurs de tumeurs fréquemment inhibées dans les cancers des VADS. P16 bloque l'activité de la **cycline D1** (codée par le gène **CCND1**) en phase G1/S et contrôle donc la progression du cycle et la prolifération cellulaire. La perte de p16 est associée à un mauvais pronostic chez les patients⁴². L'amplification du gène **CCND1** se retrouve chez 30% des patients VADS et entraîne à une survie globale plus courte^{43,44}.

Comme énoncé plus haut, p16 inhibe l'activité de la cycline D1 et de ses kinases associées, les **CDK4** et **CDK6**. Cette inhibition permet l'activité du suppresseur de tumeurs **pRb** (codée par **RB1**) qui freine le cycle cellulaire. La dérégulation du gène **RB1** contribue au stade dysplasique et la mise en place d'un carcinome épidermoïde⁴⁵. **P53** régule la prolifération cellulaire et induit la mort des cellules par apoptose notamment lors d'un stress pouvant être causé par des dommages à l'ADN. Le gène **TP53** est muté dans 84% des tumeurs des VADS³⁹.

Les mutations de **TP53** sont des marqueurs de mauvais pronostic des tumeurs des VADS et sont associées au stade de la tumeur et au grade dysplasique de la tumeur⁴⁶. Le gène **CASP8** (code pour la protéine **Caspase 8**) induisant l'apoptose est fréquemment muté dans les cancers des VADS ce qui permet à la cellule cancéreuse de survivre et de proliférer³⁹.

D'autre part, **PIK3CA**, codant pour la sous-unité catalytique de la phosphoinositide 3-kinase (**PI3K**), est le seul oncogène qui se trouve être fréquemment muté ou amplifiée (entre 14% et 16% des tumeurs VADS) à la fois dans les tumeurs HPV négatives ou positives. La voie de signalisation **PI3K/AKT/mTOR** joue un rôle important dans la prolifération, la survie de la tumeur, la migration et la différenciation cellulaire. La perte de fonction du gène **PTEN** contribue également à l'activation de cette voie de signalisation³⁷ qui est impliquée dans la chimio-⁴⁷ et la radio-résistance⁴⁸.

- **Différenciation cellulaire**

NOTCH (codé par le gène **NOTCH**) est un récepteur qui favorise le renouvellement des cellules souches et la différenciation cellulaire notamment lors du développement embryonnaire⁴⁹.

Dans les cancers des VADS, le gène **NOTCH** subit une mutation inactivatrice dans environ 20% des tumeurs VADS et agit comme suppresseur de tumeur^{39,41}. **NOTCH** est physiologiquement exprimé dans les cellules de l'épithélium buccal, mais son expression est inhibée dans les cancers des VADS au stade dysplasique⁵⁰.

La voie de signalisation **Wnt/ β -caténine** (β -caténine codée par le gène **CTNNB1**) contribue à la prolifération des cellules souches et à leur différenciation. La β -caténine est surexprimée dans les cancers des VADS⁵¹, bien que les mutations du gène **CTNNB1** soient rares³⁹. Cependant, les mutations inhibitrices des gènes **NOTCH**, **FAT1** (codé par le gène **FAT1**) et **Ajuba** (codée par le gène **AJUBA**) conduisent à l'activation de la voie **Wnt/ β -caténine** qui contribue alors à la tumorigenèse^{52,53}.

- **Invasion cellulaire et formation de métastases**

La formation de métastases à distance fait intervenir : **1) l'angiogenèse tumorale** permettant la formation d'un nouveau réseau de vaisseaux sanguins ; **2) la transition épithéliale-mésenchymateuse (EMT)** durant laquelle les cellules acquièrent des propriétés migratoires et invasives pour former des métastases.

La formation de nouveaux vaisseaux lors de **l'angiogenèse tumorale** permet l'apport de nutriments et d'oxygène aux cellules tumorales.

Ce processus met en jeu plusieurs récepteurs comme les récepteurs de l'EGF et du FGF : **EGFR** (« *Epidermal Growth Factor* ») et **FGFR** (« *Fibroblast Growth Factor* »), ainsi que le **VEGF** (« *Vascular Endothelial Growth Factor* »).

La voie EGF joue un rôle clé dans la tumorigenèse, la progression tumorale et la résistance à la radiothérapie (RT)⁵⁴. Ce récepteur est surexprimé dans 90% des cas et associé à un mauvais pronostic chez les patients⁵⁵. L'amplification du gène et la surexpression de la protéine EGFR sont corrélées au stade de la tumeur, à l'invasion ganglionnaire et à la formation de métastases⁵⁶.

L'activation de l'EGFR stimule les voies de signalisation MAPK, PI3K/AKT, ERK et JAK/STAT impliquées dans la prolifération des cellules tumorales, l'angiogenèse, l'invasion et la formation de métastases⁵⁷. La voie EGF stimule notamment la production de VEGF, acteur majeur de l'angiogenèse⁵⁸. La production de VEGF est induite dans les tumeurs via l'hypoxie et le facteur de transcription **HIF1- α** (Hypoxia-Inducible Factor 1 α)⁵⁹ ou la perte de suppresseurs de tumeurs, comme **PTEN**⁶⁰. Surexprimé dans 90% des tumeurs VADS, le VEGF est associé à un mauvais pronostic chez les patients^{61,62}. La croissance et l'angiogenèse tumorales dépendent aussi des récepteurs **FGFR1**, **FGFR2** et **FGFR3**. L'amplification de ces gènes et la surexpression des récepteurs chez les patients sont corrélées au stade de la tumeur et à l'invasion ganglionnaire, ce qui suggère leur rôle dans la transformation de la muqueuse normale vers le stade dysplasique⁶³⁻⁶⁵.

L'EMT implique l'inhibition des molécules d'adhésion de type **E-cadhérine** et l'activation des molécules mésenchymateuses telles que la **N-cadhérine** et la **vimentine**. Les analyses en immunohistochimie réalisées sur des tumeurs des VADS, ont montré une diminution de l'expression de E-cadhérine et une surexpression de la N-cadhérine et la vimentine favorisant la migration des cellules tumorales^{66,67}.

L'EMT dépend aussi de facteurs du microenvironnement tumoral tels que le **TGF- β** ⁶⁸ et l'**hypoxie** (HIF1- α)⁶⁹ qui favorisent les capacités invasives et migratoires des cellules cancéreuses des VADS.

- **Épigénétique et réponse immunitaire**

Les modifications épigénétiques régulent l'expression du génome. Des mécanismes tels que la méthylation ou la déméthylation sur le promoteur d'un gène, inhibe ou bien active son expression.

L'inactivation des gènes suppresseurs de tumeurs due à la méthylation est l'une des caractéristiques de la cancérogenèse. Par exemple, les promoteurs des **gènes p16 et E-cadhérine sont hyperméthylés, donc inactivés dans les cancers des VADS**⁷⁰.

Les délétions et les mutations inactivatrices de l'histone H3K36 méthyltransférase **NSD1** (*Nuclear receptor binding SET domain protein 1*) induit une hypométhylation de certains gènes spécifiques du développement. La perte de NSD1 inhibe également l'infiltration des lymphocytes T CD8⁺ dans le microenvironnement tumoral et réduit donc la réponse immunitaire dans un modèle murin de cancer des VADS⁷¹.

Des mutations de l'histone H3K4 méthyltransférase **KMT2D** (*Histone-lysine N-méthyltransferase 2D*), permettrait une immuno-surveillance déficiente. La perte de KMT2D dans le modèle murin, affecte la production d'IFN- γ par les lymphocytes T CD8⁺ effecteurs et contribue à la croissance tumorale⁷².

Les gènes régulés aux méthyltransférases NSD1 et KMT2D sont considérés comme suppresseurs de tumeurs. Leurs mutations dans environ 18% des cancers des VADS contribue donc à la cancérogenèse et à la progression tumorale³⁹.

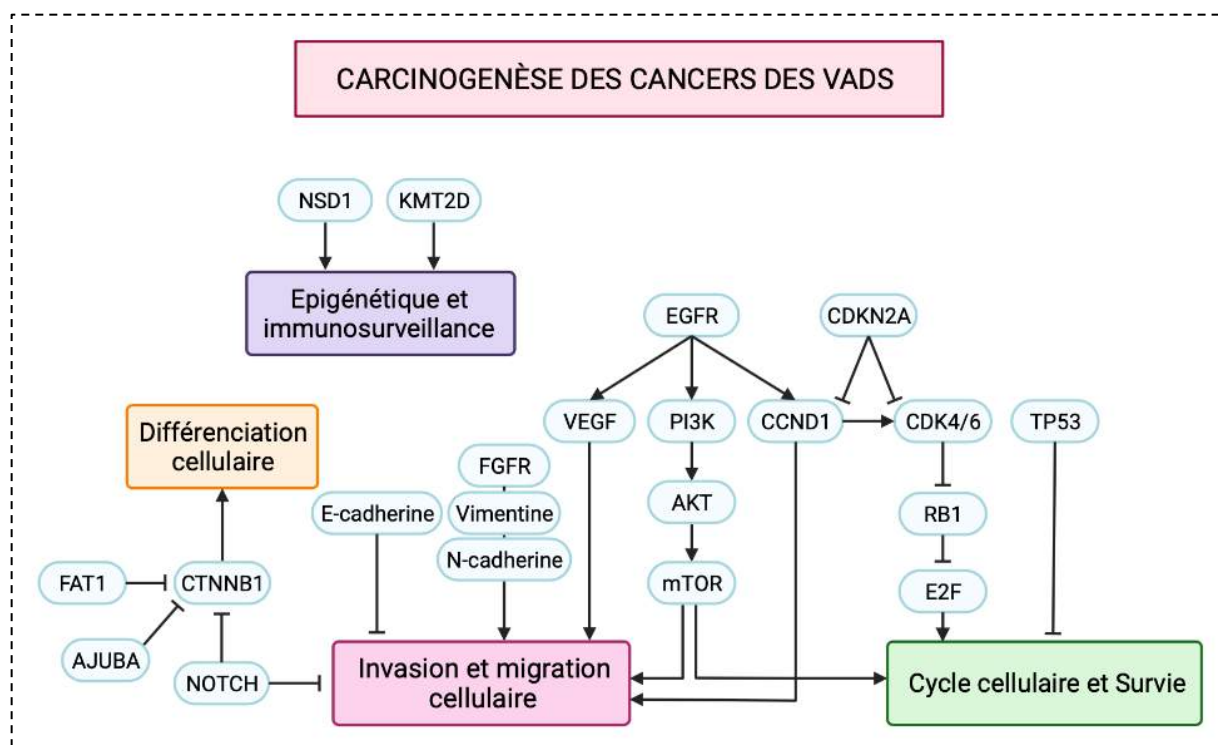


Figure 5 : Voies de signalisation impliquées dans la carcinogenèse des cancers des VADS

(Selon Hsu et al, 2020)³. La perte ou le gain chromosomique ainsi que des modifications épigénétiques, favorisent l'altération de voies de signalisation impliquées dans la carcinogenèse.

4. Prise en charge thérapeutique

a. Diagnostic clinique

- **Bilan initial**

La découverte et la prise en charge des carcinomes épidermoïdes doivent être le plus rapide possible en raison du caractère évolutif et agressif de la maladie.

Le carcinome épidermoïde peut être découvert lors d'un examen de routine par un professionnel de santé notamment le chirurgien-dentiste dont le rôle est capital dans le dépistage d'un cancer des VADS.

La découverte d'une tumeur dépend aussi de sa localisation et quelques symptômes peuvent alerter le patient. Au niveau de la cavité buccale et de l'oropharynx, il peut sentir une tuméfaction, un trouble de la mobilité linguale, une gêne à la déglutition ou bien une ulcération persistante de la muqueuse (selon la Haute Autorité de Santé). Ces signes sont souvent négligés par le patient ce qui explique sa prise en charge tardive. Une tuméfaction cervicale correspondant à un gonflement d'un ganglion lymphatique amène le plus souvent le patient à consulter.

Un **questionnaire** et un **examen clinique** ont donc lieu dans le but d'effectuer un **bilan initial** pour dépister un cancer des VADS. L'interrogatoire vise à rechercher des facteurs de risque (exposition professionnelle, dépendance alcoolo-tabagique) à l'origine d'une éventuelle tumeur maligne. L'examen clinique inclut une inspection complète de la cavité buccale et de l'oropharynx avec palpation endobuccale. Il consiste aussi à rechercher une ou plusieurs adénopathies cervicales au niveau des aires ganglionnaires. Toute suspicion d'une présence d'une tumeur doit conduire à un examen complet des VADS en milieu spécialisé lors d'une consultation ORL (Oto-Rhino-Laryngologiste) ou maxillo-faciale.

- **Bilan d'extension**

Un **bilan d'extension** a lieu après un diagnostic d'un carcinome épidermoïde oral. Il a pour but de déterminer l'état d'avancement et de rechercher selon les facteurs de risque, la présence d'autres localisations synchrones (pulmonaires, osseuses...). Différents examens cliniques ont donc lieu⁹.

- Une **endoscopie** des VADS vise à récupérer des biopsies de la tumeur et à rechercher d'autres tumeurs synchrones des VADS.
- L'**analyse histologique** des biopsies permet ensuite d'évaluer le caractère malin ou bénin de la tumeur et de poser le diagnostic.
- Les examens d'imagerie tomодensitométrique (**TDM**), d'imagerie par résonance magnétique (**IRM**), ou encore de tomographie par émission de positrons (**TEP**) permettent d'évaluer l'extension tumorale locale, l'ensemble des aires ganglionnaires cervicales, et de rechercher une localisation synchrone ou secondaire.

Au terme de ce bilan, la tumeur est classée selon la classification internationale **TNM**⁷⁴ de l'UICC qui prend en compte la taille de la tumeur (T) et la présence de métastases dans les ganglions lymphatiques (N) ou bien à distance (M). La classification TNM permet d'évaluer l'ampleur de la progression du cancer mais également son stade allant de I à IV ([Tableau 2](#), [Tableau 3](#)).

Tumeur primitive (T)	
TX	La tumeur primitive ne peut être évaluée
T0	Pas de tumeur primitive
Tis	Carcinome In Situ
T1	Tumeur < 2 cm
T2	2 cm < Tumeur < 4 cm
T3	Tumeur < 4 cm
T4	Tumeur envahissant les structures adjacentes
Envahissement ganglionnaire (N)	
NX	La région ganglionnaire ne peut être évaluée
N0	Pas de métastases dans les ganglions lymphatiques
N1	Métastase dans un seul ganglion lymphatique homolatéral, N < 3 cm
N2	Métastases dans un seul ganglion lymphatique homolatéral, 3 cm < N < 6 cm
N2a	Métastases dans un seul ganglion lymphatique homolatéral, 3 cm < N < 6 cm
N2b	Métastases dans plusieurs ganglions lymphatiques homolatéraux, N < 6 cm
N2c	Métastases dans les ganglions lymphatiques bilatéraux ou controlatéraux, N < 6 cm
N3	Métastase dans un ganglion lymphatique de plus de 6 cm
Métastase à distance (M)	
MX	Métastase à distance ne peut être évaluée
M0	Pas de métastase à distance
M1	Métastase à distance

Tableau 2 : Classification TNM des cancers des VADS.

D'après « Overview of the 8th edition TNM classification for Head and Neck Cancer » (2017).

Stade global	Taille (T)	Invasion ganglionnaire (N)	Métastases (M)
Stade 0	T0	N0	M0
Stade I	T1	N0	M0
Stade II	T2	N0	M0
Stade III	T3	N0	M0
	T1-3	N1	M0
Stade IVA Maladie locale modérément avancée	T4	N0/N1/N2	M0
	T1-3	N2	M0
	T4a	N2	M0
Stade IVB Maladie locale très avancée	T4b	N0-2	M0
	Tout T	N3	M0
Stade IVC Maladie métastatique à distance	Tout T	Tout N	M1

Tableau 3 : Classification générale par stades des tumeurs des VADS

La décision de traitement fait l'objet d'une réunion de concertation pluridisciplinaire (RCP) à laquelle participent des médecins de différentes spécialités, impliqués dans la prise en charge du cancer (radiothérapeute, oncologue, chirurgien et radiologue). Elle tient compte du bilan des examens ainsi que de l'état de santé général du patient (douleur, état nutritionnel précaire, état psychologique, contexte social défavorable).

b. Traitements

La **chirurgie** suivie de la **chimiothérapie** et la **radiothérapie** sont les traitements de référence à but curatif.

30 à 40 % des patients présentant une maladie de **stade I ou II**, pouvant être traités par chirurgie seule ou radiothérapie définitive seule. La chirurgie ou la radiothérapie seule peut fournir un contrôle de la tumeur similaire et des taux de survie à long terme améliorés chez environ 70 à 90 % des patients atteints d'une maladie à un stade précoce.

Plus de 60 % des patients atteints d'un cancer des VADS présentent une maladie de **stade III ou IV**, caractérisée par un envahissement des ganglions lymphatiques ou la présence de métastases à distance. La maladie localement avancée comporte un

risque élevé de récurrence locale (15 à 40 %) et de métastase à distance, avec un mauvais pronostic.

La survie globale à 5 ans pour les stades avancés est approximativement de 50 %⁷⁵.

- **La chirurgie**

La chirurgie est le **premier traitement** des cancers des VADS. Elle traite la tumeur et les ganglions lymphatiques^{33,76}.

Elle est réalisée par voie externe ou interne. La chirurgie d'exérèse est une procédure longue et délicate. Elle permet une résection la plus complète de la tumeur tout en préservant au maximum les fonctions de l'organe telles que la phonation, la déglutition et la respiration. Selon la localisation de la tumeur cette intervention s'accompagne d'une reconstruction chirurgicale pour limiter des séquelles esthétiques et fonctionnelles.

La chirurgie consiste aussi au curage des ganglions cervicaux. Ils sont ensuite analysés afin de déterminer la présence de cellules cancéreuses et par conséquent d'indiquer l'avancement de la maladie⁹. D'autres part, les nouvelles techniques de chirurgie robotique pour le cancer de l'oropharynx⁷⁷ et la microchirurgie au laser mini-invasive pour les cancers du larynx et de l'hypopharynx⁷⁸ peuvent augmenter la probabilité de préserver les fonctions des organes.

- **La radiothérapie**

- ***La photonthérapie***

La radiothérapie vise les cellules cancéreuses tumorales (ou l'emplacement tumoral après la chirurgie) et/ou les aires ganglionnaires cervicales par des rayonnements ionisants, tout en évitant autant que possible les cellules saines environnantes.

La radiothérapie est utilisée seule ou en combinaison avec une chimiothérapie classique ou une thérapie ciblée et/ou la chirurgie⁹.

Lorsque la radiothérapie est le traitement principal, les patients reçoivent généralement des rayonnements ionisants de type photons, pendant plusieurs semaines lors de séances quotidiennes. Une dose standard de 70 Gy en 35 fractions est généralement administrée sur 7 semaines, à raison d'une séance par jour, 5 jours par semaine⁷⁹. Lorsque la radiothérapie vient compléter un traitement chirurgical, elle peut être

délivrée avec la même fréquence qu'en traitement principal et débute entre 1 et 2 mois après la chirurgie.

L'exposition cellulaire au rayonnement provoque des dommages à l'ADN dus aux particules chargées qui traversent et ionisent l'ADN et/ou à des espèces réactives de l'oxygène (ROS) qui ionisent les molécules d'eau voisines.

La dose de fractionnement standard de 2 Gy par cycle produit 40 cassures double brins et environ 3000 lésions d'ADN pour induire la mort cellulaire⁸⁰.

La sensibilité de la tumeur aux radiations est donc un déterminant essentiel dans le contrôle local du cancer. Or, la surexpression de l'EGFR et les mutations de p53 ont été liées à la résistance au traitement dans les cancers des VADS.

- **La protonthérapie**

L'inconvénient principal de la radiothérapie par photons, demeure dans le ciblage imprécis des cellules tumorales. Les tissus sains environnants comme les glandes salivaires, reçoivent de hautes doses de rayonnement à l'origine d'effets secondaires chez les patients tels que des mucites, rendant leur qualité de vie difficile⁸¹.

Bien qu'elle soit plus onéreuse, la protonthérapie est plus précise et permet de cibler précisément la tumeur. La dose de rayonnement peut donc être augmentée sans risque de toucher les cellules ou tissus environnants sains. *In vivo*, la protonthérapie a montré des effets antiprolifératifs, anti-angiogéniques, anti-lymphangiogéniques, en comparaison de la photonthérapie⁸². La protonthérapie augmente donc l'efficacité antitumorale, entraîne une faible toxicité et une réduction de cancers radio-induits en comparaison à la photon-thérapie⁸³. Cependant, en raison de son coût et de l'accessibilité des machines dispensant de tels rayonnements, la protonthérapie représente aujourd'hui moins de 1% des traitements par radiothérapie.

- **La chimiothérapie**

Il existe plusieurs types de traitements médicamenteux pour traiter les cancers des VADS : les **molécules de chimiothérapie** et les **thérapies ciblées**.

Ces traitements systémiques agissent sur l'ensemble du corps pour cibler la totalité des cellules cancéreuses quelle que soit leur localisation.

Plusieurs molécules peuvent être utilisées ensemble avant un traitement par chirurgie ou par radiothérapie (**chimiothérapie néoadjuvante**) pour réduire la taille de la tumeur afin d'éviter une chirurgie trop lourde.

Ces traitements médicamenteux peuvent aussi être associés de manière concomitante à la radiothérapie en concomitance (**radio-chimiothérapie**) tels que le cisplatine associé au 5-FU (fluoro-uracile)⁸⁴. Ils potentialisent les effets de la radiothérapie utilisée en traitement principal ou après traitement par chirurgie.

Les molécules thérapeutiques les plus souvent utilisées sont les **sels de platine (cisplatine)**, le **5-FU (fluoro-uracile)**, le **docetaxel** et le **méthotrexate**.

Le choix du protocole à suivre dépend de l'état général et des éventuelles comorbidités du patient.

- **Les thérapies ciblées**

Les thérapies ciblées anticancéreuses utilisent des composés dirigés contre des **cibles moléculaires spécifiques** jouant un rôle dans la carcinogenèse, l'avancée de la maladie et le mauvais.

Les thérapies ciblées ont donc pour objectif de bloquer la croissance et la propagation tumorale.

Les trois cibles majeures de ces thérapies sont les récepteurs de surface des cellules cancéreuses, la signalisation intracellulaire et l'environnement tumoral (facteurs de croissance et facteurs pro-inflammatoires) (**Figure 6**).

- **Les anticorps monoclonaux**

Le **cetuximab (ERBITUX®)** est un anticorps monoclonal de sous-classe IgG1 qui cible le récepteur de l'EGF. La voie EGFR est impliquée dans **l'angiogenèse tumorale**^{58,85} et dans la progression tumorale.

À ce jour, le cetuximab est le seul anticorps anti-EGFR dont l'efficacité et le gain de survie ont été prouvés pour le traitement de première ligne à la fois de la maladie locorégionale avancée (LA) (associé à la radiothérapie)^{86,87} et récurrente/métastatique (R/M) (associé au cisplatine et 5-FU : essai EXTREME)^{87,88}, ou en deuxième ligne chez les patients devenus résistants au cisplatine.

Le **zalutumumab (HuMax-EGFR®)** est un anticorps monoclonal qui cible le récepteur de l'EGF. Utilisé en association avec la radiothérapie, il améliore de la survie

globale chez les patients qui développent des éruptions cutanées⁸⁹. Dans un essai clinique de phase III, son utilisation en deuxième ligne, a montré une augmentation de la survie sans progression chez les patients en rechute à la suite d'une chimio-radiothérapie⁹⁰.

Testé en phase II/III en association aux traitements de référence, le **panitumumab (VECTIBIX®)**, un autre anticorps monoclonal spécifique du récepteur de l'EGF, n'améliore pas la survie globale mais augmente la survie sans progression avec une tolérance acceptable chez les patients récurrents/métastatiques (R/M)^{91,92}.

Le **bevacizumab (AVASTIN®)**, est un anticorps monoclonal humanisé dirigé contre le VEGF, un acteur important de **l'angiogenèse tumorale**.

Un essai clinique randomisé de phase III associant cisplatine ou carboplatine plus docetaxel ou 5-FU avec ou sans bevacizumab chez des patients atteints d'un cancer des VADS R/M a été mené. Malheureusement, le bevacizumab n'augmente pas la survie globale médiane de manière significative en comparaison à la chimiothérapie seule⁹³.

L'association du bevacizumab et du cetuximab en phase II a montré un taux de réponse de 16% chez des patients en rechute/métastatiques⁹⁴.

- *Les inhibiteurs des récepteurs à activité tyrosine kinase (RTK)*

L'**erlotinib (TARCEVA®)** et le **gefitinib (IRESSA®)** inhibent l'activité tyrosine kinase du récepteur à l'EGF.

En phase II, l'erlotinib n'a pas montré d'avantage thérapeutique par rapport à une chimio-radiothérapie classique⁹⁵ ou en association avec le bevacizumab chez des patients en rechute ou métastatiques⁹⁶.

Le gefitinib n'améliore pas la survie globale des patients métastatiques, en comparaison du docetaxel⁹⁷ en phase III ou du méthotrexate +/- 5-FU en phase II mais tend à améliorer la qualité de vie des patients en rechute⁹⁸.

D'autres inhibiteurs TKI du récepteur de l'EGF ont été testés en phase II/III tels que **lapatinib (TYKERB®)** et le **dacomitinib (VIZIMPRO®)**.

Le lapatinib inhibe l'EGFR et un membre de la même famille de récepteurs, HER2. Couplé à la chimio-radiothérapie en phase III, il n'offre aucun avantage en termes d'efficacité et montre une toxicité supplémentaire par rapport au placebo chez les patients traités chirurgicalement et à haut risque de récurrence⁹⁹.

Le dacomitinib se lie de manière irréversible à l'EGFR, HER2 et HER4 (un autre membre de la famille des EGFR). Il est notamment spécifique du variant oncogénique EGFR VIII impliqué dans la résistance au cetuximab.

Évalué en essai clinique de phase II, en première ligne ou en deuxième ligne chez les patients R/M, cet inhibiteur a montré une efficacité clinique satisfaisante (réponse en moyenne chez 20% des patients avec une stabilisation de la maladie dans 65% des cas) et un profil de toxicité modulable^{100,101}.

Le **sunitinib (SUTENT®)** et l'**axitinib (INLYTA®)**, des inhibiteurs des récepteurs du PDGF (*Platelet-derived Growth Factor Receptors*), du VEGF, de CSF1 et Flt-3, sont initialement utilisés dans le cancer du rein et ont été testés en essai clinique dans les cancers des VADS R/M. Le sunitinib seul a montré des taux de réponse minimes dans des études de phase II mais des complications (hémorragie, ulcérations, fistules) ont été observées¹⁰². Un essai clinique de phase II sur l'axitinib a démontré un faible taux de réponse chez les patients, cependant une stabilisation favorable de la maladie a été recensé dans 77% des cas avec une survie globale médiane de 10,9 mois et un profil de toxicité acceptable¹⁰³.

Le **sorafenib (NEXAVAR®)** est utilisé pour traiter le cancer du rein métastatique et les carcinomes hépatocellulaires. Il s'agit d'un inhibiteur de plusieurs récepteurs de RTK et kinases intracellulaires (VEGFR2, VEGFR3, PDGF- β , Flt-3, C-KIT, C-RAF et B-RAF) qui a été évalué en monothérapie dans le cancer des VADS R/M. Les données de phase II ont montré une faible probabilité de réponse des patients au sorafenib¹⁰⁴.

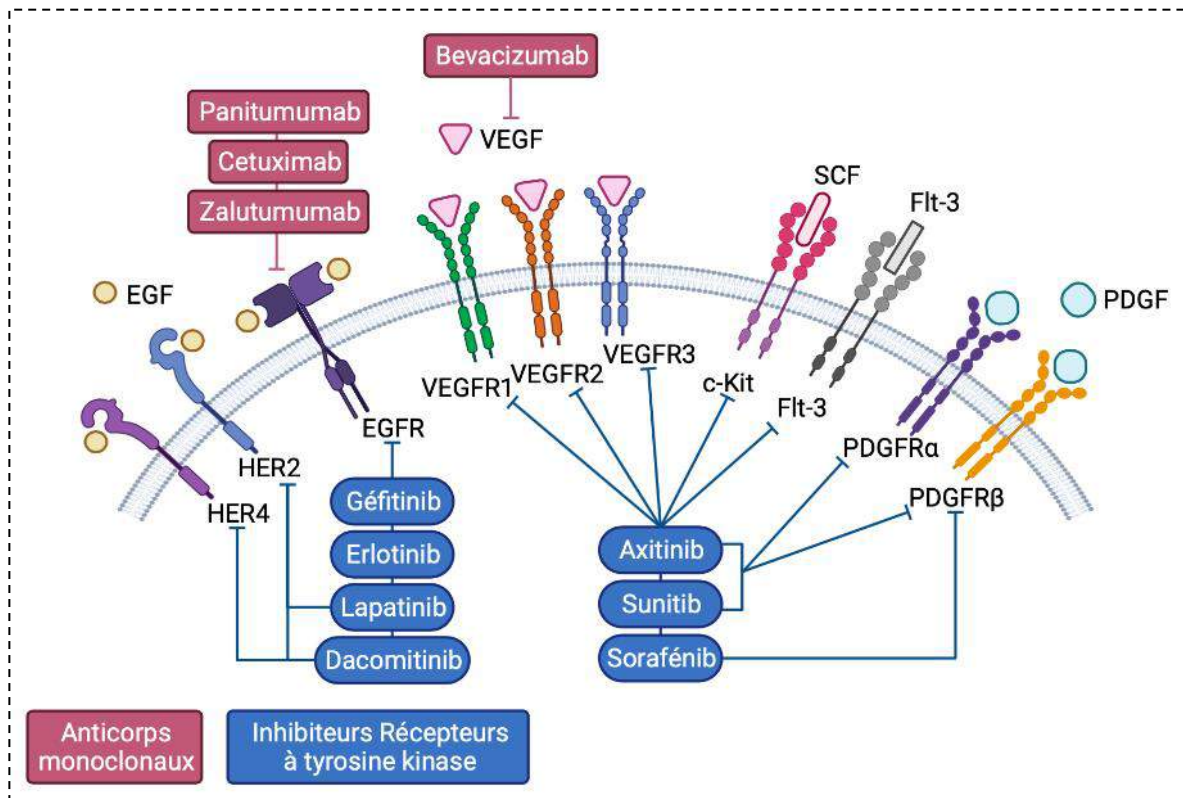


Figure 6 : Principales cibles des inhibiteurs et des anticorps monoclonaux des récepteurs anti-angiogéniques testés dans les cancers des VADS

Ces inhibiteurs anti-angiogéniques peuvent cibler plusieurs récepteurs simultanément. Ce sont des récepteurs à activité tyrosine kinase qui sont impliqués dans la survie, la prolifération et la migration des cellules cancéreuses. Ils sont donc considérés comme cibles thérapeutiques pertinentes.

▪ L'immunothérapie

La surveillance immunitaire est cruciale pour permettre l'élimination précoce des cellules cancéreuses par le système immunitaire. Les cellules cancéreuses libèrent des antigènes détectés par les cellules présentatrices d'antigènes (CPA) telles que les cellules dendritiques (CDs) chargées de présenter ces antigènes aux lymphocytes B (LB) et T (LTs) grâce aux complexes majeur d'histocompatibilité I et II (CMH I et II) afin de générer une réponse antitumorale spécifique à l'antigène¹⁰⁵. Une immunité antitumorale optimale nécessite l'action des LTs CD4+ helper (Th1 et Th17) pour favoriser la réponse immunitaire des cellules T effectrices CD8¹⁰⁶. Une fois activées, les LTs migrent et s'infiltrant dans le microenvironnement tumoral. Enfin, les LTs se lient aux cellules cancéreuses cibles via leurs récepteurs (TCR) et les éliminent par de multiples mécanismes. La destruction de la cellule cancéreuse libère des antigènes

supplémentaires associés à la tumeur pour amplifier la réponse immunitaire. Après la **phase d'élimination**, les cellules cancéreuses atteignent une **phase d'équilibre** dans laquelle elles ne sont plus systématiquement éliminées mais ne prolifèrent plus. Cet état d'équilibre peut persister durant des années jusqu'à la **phase d'échappement** durant laquelle les cellules cancéreuses se multiplient de manière incontrôlée à l'origine d'une tumeur¹⁰⁷.

Cependant, les cancers des VADS, comme d'autres cancers, peuvent échapper ou supprimer la réponse immunitaire par l'émergence de clones tumoraux résistants.

La surexpression d'EGFR¹⁰⁸ et l'inactivation de STAT1¹⁰⁹ entraînent une altération du système HLA (« *Human Leucocyte Antigen* ») du CMH I et II. Les antigènes tumoraux ne sont donc pas détectés et reconnus par le système immunitaire, créant ainsi des LT régulateurs et non des LT CD8⁺ effecteurs.

Les cellules présentatrices d'antigènes peuvent être en nombre insuffisant et rester à l'état immature. Chez les patients atteints d'un cancer des VADS, le nombre de CD8 est significativement réduit¹¹⁰. De même certains facteurs du microenvironnement tels que le VEGF¹¹¹, le MCS-F, l'IL-6¹¹² et l'IL-10¹¹³ inhibent la maturation des CD8.

La tumeur peut également empêcher les LT de s'infiltrer dans le microenvironnement tumoral ou bien, des facteurs issus du microenvironnement tumoral pourraient également supprimer les cellules T effectrices qui sont produites. Les points de contrôle (« immune control checkpoints ») du système immunitaire représentent aussi des points clés de l'échappement tumoral. Les lymphocytes T obéissent à des règles strictes via la stimulation de leurs récepteurs membranaires pour prévenir une réponse auto-immune. **Les voies CTLA-4 et PD-1** fonctionnent à différents stades de la réponse immunitaire.

Le récepteur CTLA-4 ou CD152 reconnaît son ligand B7 présent sur les CPA et inhibe l'activation des LTs naïfs au stade précoce de la réaction immunitaire, notamment dans les ganglions lymphatiques¹¹⁴. Le récepteur PD-1 se lie à son ligand PD-L1 présent sur les CPA mais aussi sur les cellules non-hématopoïétiques et inactivent les lymphocytes T aux derniers stades d'une réponse immunitaire, principalement dans les tissus périphériques¹¹⁵. PD-L1 est présent sur les cellules tumorales et est associé à un mauvais pronostic chez les patients atteints d'un cancer des VADS¹¹⁶.

Ces points de contrôle peuvent être exploités par les tumeurs pour induire **un état immunosuppresseur** qui permet aux tumeurs de se développer au lieu d'être éliminées par le système immunitaire.

L'inhibition des voies CTLA-4 et PD-1/PD-L1 diminue la croissance tumorale et améliore la survie des patients (**Figure 7**). Des anticorps monoclonaux bloquant ces voies, sont maintenant utilisés dans plusieurs cancers incluant les cancers du poumon et du rein¹¹⁷. Dans les cancers des VADS, le **pembrolizumab (KEYTRUDA®)**^{118,119} et le **nivolumab (OPVIDO ®)**^{120,121}, des anticorps anti-PD-1 sont testés en phase III en première ligne et ont montré une amélioration de la survie globale des patients R/M en comparaison aux traitements de référence (cetuximab, méthotrexate, docetaxel).

L'**ipilimumab (YERVOY®)**, un anticorps anti-CTLA-4 est testé en combinaison avec le nivolumab en phase III chez les patients R/M en traitement néoadjuvant avant chirurgie (NCT03003637)¹²².

Le **tremelimumab**, un autre anticorps anti-CTLA-4, a été évalué en association avec le **durvalumab (IMFINZI®)**, un anticorps anti-PD-L1, en phase II et III, en seconde ligne de traitement. Dans les deux études, l'ajout de tremelimumab n'améliore pas la survie globale des patients R/M^{123,124}.

Malgré des effets spectaculaires des immunothérapies, **seul 20% des patients en bénéficient.**

Nous devons donc poursuivre les efforts de recherche pour améliorer la survie des patients non répondeurs.

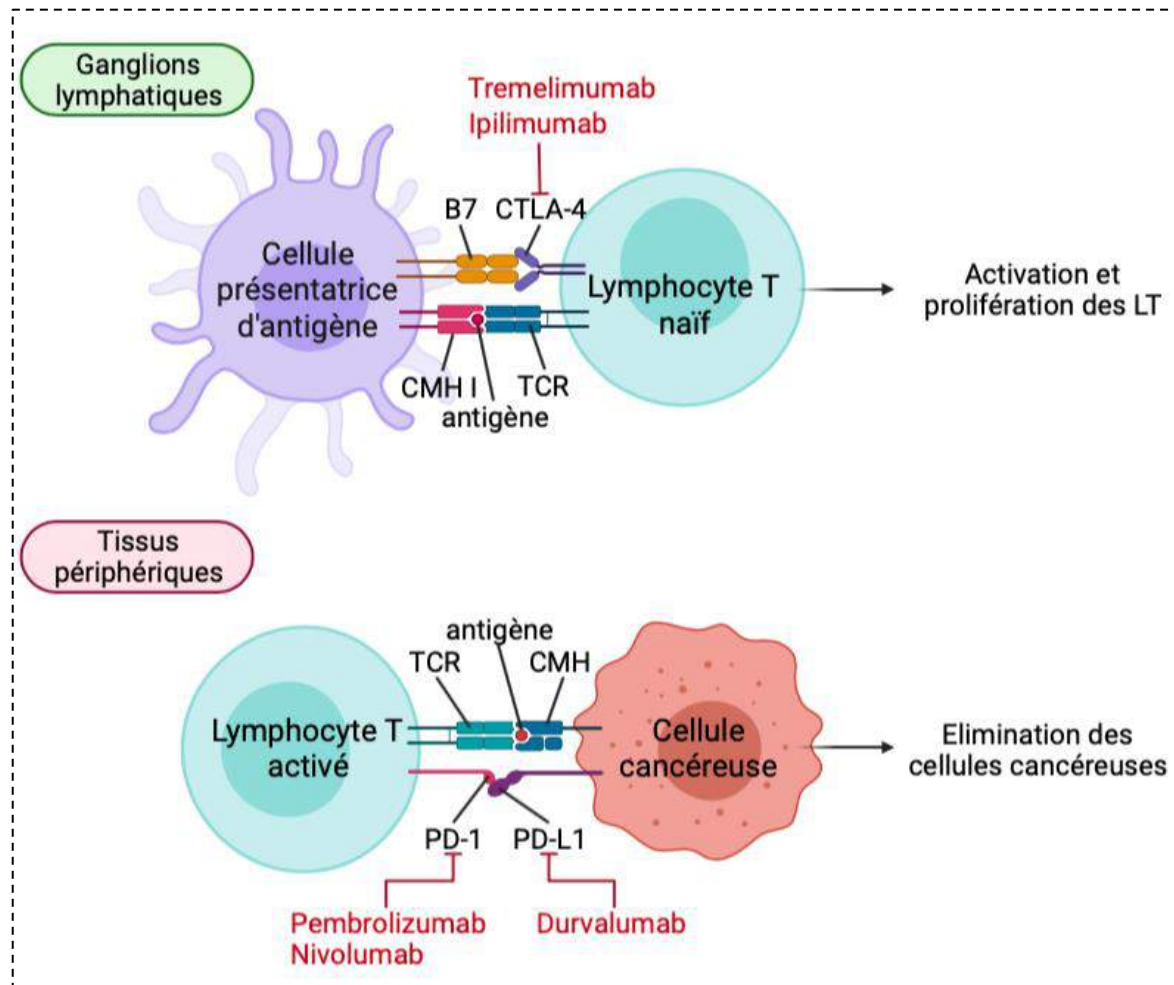


Figure 7 : Inhibition des voies CTLA-4 et PD-1/PD-L1

Le blocage de CTLA-4 permet l'activation et la prolifération d'un plus grand nombre de LTs effecteurs et réduit l'immunosuppression dépendante des LTs régulateurs. Le blocage de la voie PD-1/PD-L1 restaure l'activité des LTs antitumoraux devenus quiescents. Un blocage à double voie (CTLA-4 + PD-1/PD-L1) pourrait avoir un effet synergique, entraînant une réponse immunitaire antitumorale plus importante et plus durable.

En dépit de toutes les stratégies thérapeutiques développées ou en développement, 80% des patients ne répondent pas à l'immunothérapie ou 50% des patients rechutent après 5 ans à la suite d'un traitement à base de chimiothérapie et radiothérapie (Figure 8).

Il est donc nécessaire de découvrir de nouveaux marqueurs responsables de la tumorigenèse, de l'agressivité tumorale et de la résistance aux traitements de référence.

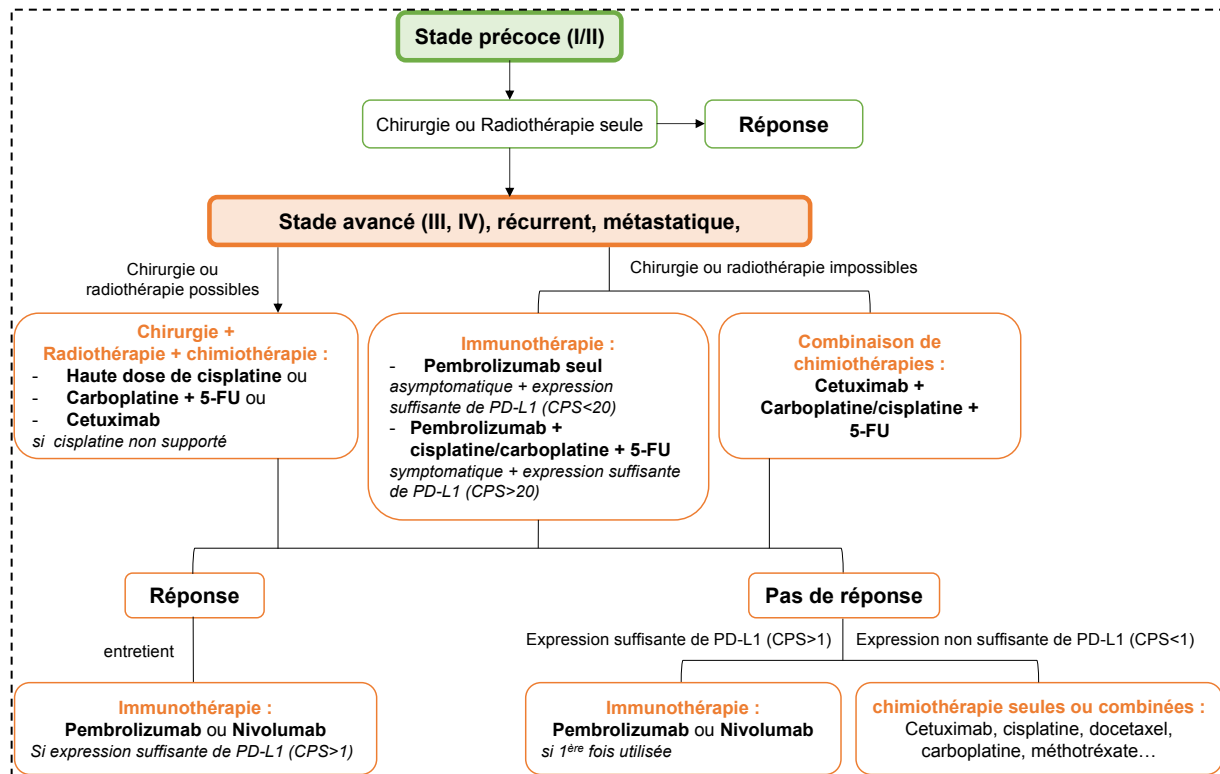


Figure 8 : Prise en charge thérapeutique des patients aux stades précoce et avancé (Selon « Head and Neck Cancers, Version 2.2020, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology », 2020)

Comme autres cibles thérapeutiques, j'ai basé mon travail sur l'étude des kinases dérégulées dans les cancers des VADS : PLK1, AXL et c-MET, dont je parlerai dans la suite de cette introduction.

II. LA POLO-LIKE KINASE 1 (PLK1)

1. La famille des Polo-like kinases

a. Découverte : de la levure à l'Homme

La kinase Polo a été identifiée pour la première fois chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* en générant des mutants de gènes importants pour le cycle cellulaire dont l'expression dépend de la température (mutants thermosensibles). A des températures restrictives, *cdc5*, un homologue de PLK1 chez les mammifères, provoquait une cytokinèse défectueuse durant la télophase puis l'arrêt du cycle cellulaire suivant. **La régulation temporelle de *cdc5*/PLK1 est nécessaire pour l'initiation et la progression correcte de la mitose**¹²⁵.

La kinase Polo a ensuite été étudiée chez la *Drosophila melanogaster*. Deux mutants homozygotes du gène Polo ont été générées chez cette espèce. Le premier a induit la mort des larves. Le second mutant entraîne des défauts de mitose lors du développement, avec une structure anormale des centrosomes, un défaut de maturation du fuseau mitotique, plusieurs pôles mitotiques, et un arrangement circulaire des chromosomes. Ce mutant induit également un défaut de ségrégation des chromosomes lors de l'anaphase et l'apparition de cellules polyplœides. **Polo présente donc un rôle essentiel durant les différents stades de la mitose et conserve le caractère diploïde des cellules (stabilisation du génome)**^{126,127}. Enfin, un gène homologue chez la levure *Schizosaccharomyces pombe*, code pour la protéine PLO1 qui dirige le cycle cellulaire¹²⁸. D'autres gènes homologues ont par la suite été identifiés chez les espèces *Caenorhabditis elegans* et *Xenopus laevis* respectivement appelés Plc1 et Plx1^{129,130}. **Polo est donc un gène conservé entre les espèces au cours de l'évolution.** Chez les mammifères, cinq membres de la famille Polo-like kinase ont été identifiés¹³¹.

b. Les membres de la famille Polo-like kinase

- **Composition**

Les espèces *Caenorhabditis elegans* et *Xenopus laevis* expriment trois membres de la famille Polo-like kinases appelées respectivement PLC1, PLC2, PLC3 et PLX1, PLX2,

PLX3. En revanche, la *Drosophila melanogaster*, les levures *Saccharomyces cerevisiae* et *Schizosaccharomyces pombe* n'en possèdent qu'un seul (POLO, CDC5 et PLO1).

Chez les mammifères, la famille Polo-like kinase se compose de cinq membres : **PLK1**, **PLK2 (Snk)**, **PLK3 (Fnk, Prk)**, **PLK4 (Sak)**, **PLK5**.

- **Structure**

Les Polo-like kinases sont donc retrouvées chez tous les **eucaryotes**. Elles sont caractérisées par un **domaine kinase (KD)** très conservé en N-terminal et un ou **deux domaines Polo-Box (PB) en C-terminal**, qui confère l'activité, la localisation et les fonctions des Polo-like kinases¹³². Le domaine PB forme une poche de liaison pour les motifs phosphorylés des protéines cibles^{133,134}. Le domaine kinase comprend un site **T-loop** permettant l'activation de la kinase Polo par phosphorylation et un site de **liaison à l'ATP** permettant la phosphorylation des substrats. La kinase Polo est phosphorylée et polyubiquitinée sur son domaine **D-box** pour être dégradée par le protéasome.

PLK1, PLK2 et PLK3 partagent une forte homologie selon l'analyse phylogénétique tandis que PLK4 présente peu d'homologies¹³⁵ et PLK5 est considérée comme une pseudo kinase.

Contrairement aux autres membres de cette famille, qui ont deux domaines PB, PLK4 contient trois domaines PB, dont deux sont non canoniques et forment ensemble un domaine cryptique PB (CPB). Grâce à son domaine CPB, PLK4 s'homo-dimérise.

Enfin, certains substrats peuvent ne pas nécessiter de phosphorylation par la kinase Polo dans le cadre de leur régulation. C'est le cas de PLK5, dont le domaine kinase n'est presque pas présent dû à un codon STOP dans le 6^{ème} exon, y compris le site de phosphorylation de la T-loop qui est absent. PLK5 a donc perdu sa fonction de kinase¹³⁶ (**Figure 9**).

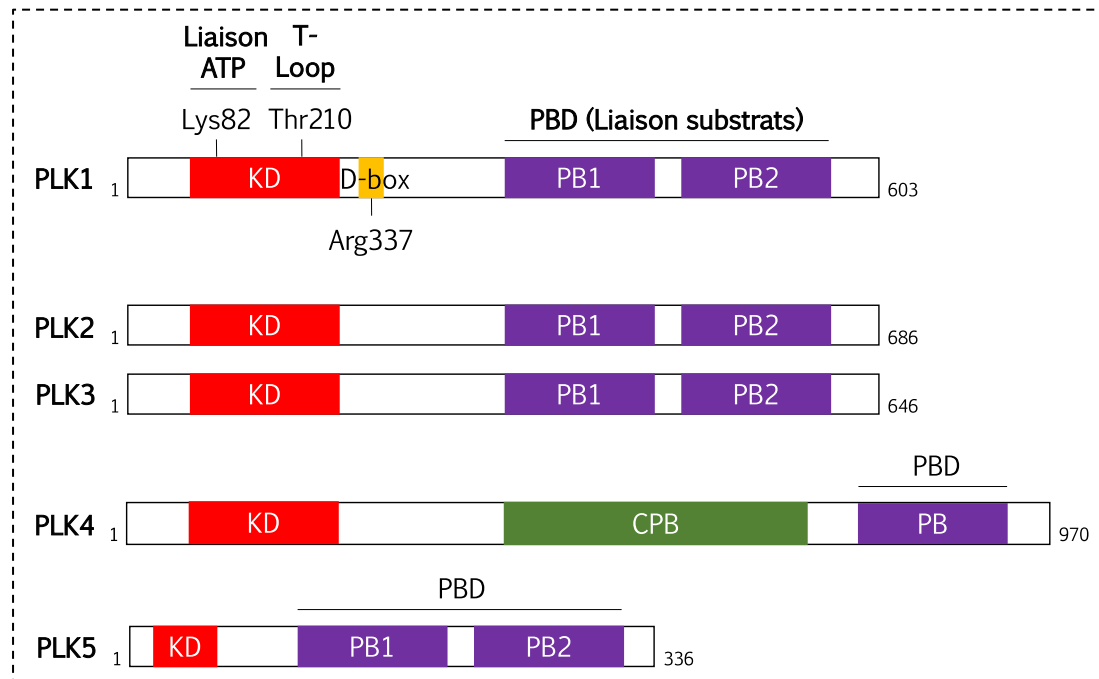


Figure 9 : Les membres de la famille Polo-like kinase (Selon De Cárcer et al., 2011)¹³⁷. Les cinq membres de cette famille contiennent un domaine kinase catalytique en N-terminal (KD, rouge) et un domaine polo-box en C-terminal (PBD, violet). Le domaine cryptique polo-box (CPB) de PLK4 est représenté en vert.

• Fonctions

PLK1 est majoritairement exprimée dans les tissus embryonnaires puis dans les organes reproducteurs et la moelle osseuse¹³⁸. Elle est localisée dans le cytoplasme et les centrosomes¹³⁹ en interphase, et se concentre ensuite au niveau des kinétochores et du pont de la cytokinèse lors de la mitose. Elle possède un rôle majeur dans la maturation des centrosomes, l'assemblage du fuseau mitotique, l'entrée en mitose et la cytokinèse. La **perte homozygote de PLK1 est létale chez la souris**. Les embryons présentent des retards de développement et un défaut d'assemblage du fuseau mitotique au jour embryonnaire 3.5. Ils ne survivent pas au-delà du stade de huit cellules (morula)¹³¹. Les souris hétérozygotes pour PLK1 (PLK1+/-) survivent sans défauts morphologiques, mais développent des tumeurs à un âge avancé.

Les fonctions de PLK2 et PLK3 sont fortement similaires. PLK2 est exprimée dans les organes reproducteurs, le sein, la rate, l'utérus, la trachée, les cardiomyocytes et le système nerveux central (homéostasie synaptique, différenciation neuronale). PLK3 se concentre dans les organes respiratoires, dans la muqueuse gastro-intestinale et

dans le système nerveux. Elles interviennent toutes les deux durant le cycle cellulaire. PLK2 participe à l'entrée en phase S et favorise la biogenèse des centrioles^{140,141}. PLK3 se situe au niveau du nucléole¹⁴² et est requis pendant la phase G1-S lors de la réplication de l'ADN¹⁴³. PLK2 et PLK3 sont des cibles directes de p53 et sont activées lors d'un stress cellulaire tels que les dommages à l'ADN^{144,145}, afin de maintenir la stabilité génomique, contrairement à PLK1 qui est inactivé par p53. **PLK2 et PLK3 sont considérées comme des supresseurs de tumeurs.** La perte homozygote de PLK2 et de PLK3 chez la souris n'est pas létale mais génère des retards de croissance chez les embryons¹⁴⁶ et le développement de tumeurs dans différents organes¹⁴⁷. Dans les cancers du poumon non à petites cellules, des leucémies aiguës myéloïdes et le lymphome de Burkitt, la perte de PLK2 contribue à la croissance tumorale¹⁴⁸⁻¹⁵⁰. De la même manière, l'inhibition de PLK3 favorise la surexpression du facteur hypoxique HIF-1 α et l'angiogenèse tumorale¹⁵¹. Dans la plupart des tumeurs (cancers du poumon, cancers des VADS, carcinomes hépatocellulaires, leucémies et lymphomes)¹⁵²⁻¹⁵⁴, sa faible expression est corrélée à un mauvais pronostic chez les patients.

PLK4 est fortement exprimée dans tous les tissus embryonnaires et se retrouve principalement dans les tissus prolifératifs, tels que les organes reproducteurs et la moelle osseuse¹⁵⁵. PLK4 intervient dans le cycle cellulaire lors de la duplication du centrosome en phase G1/S¹⁵⁶. **La perte homozygote de PLK4 (PLK4^{-/-}) est létale** et entraîne l'arrêt du développement après la gastrulation au jour embryonnaire 7.5 avec une augmentation du nombre de cellules apoptotiques chez l'embryon. Les souris hétérozygotes pour PLK4 (PLK4^{+/-}) présentent un nombre de centrosomes élevé et une instabilité chromosomique donnant lieu à des tumeurs¹⁵⁷. Une activité excessive de PLK4 entraîne la formation aberrante de centrioles et une amplification des centrosomes observés dans le cancer de la prostate¹⁵⁸. Son interaction avec Arp2, une protéine induisant l'EMT, favorise l'invasion cellulaire et la formation de métastases dans des modèles expérimentaux de cancers du sein¹⁵⁹. PLK4 interagit aussi avec les voies de signalisation PI3K/AKT et Wnt/ β -caténine^{160,161}. **Elle est donc déjà considérée comme cible thérapeutique dans le traitement du cancer du sein et du poumon**^{162,163}.

PLK5 est exprimée dans les tissus non prolifératifs. Elle est cependant fortement exprimée dans le système nerveux central notamment le cervelet où elle induit la différenciation neuronale¹³⁶. Elle semble agir comme un signal antiprolifératif à la fois

chez l'Homme et le modèle murin. Elle est activée lors de dommages à l'ADN¹⁶⁴, et son expression conduit à un arrêt du cycle cellulaire dépendant de p53 et p21. Chez l'homme, PLK5 est hyperméthylée, donc inactivée dans les tumeurs cérébrales. Sa réexpression entraîne la mort par apoptose des cellules de glioblastome¹³⁶. De plus, la délétion du gène PLK5 semble être associée à la forme métastatique du cancer du rein¹⁶⁵. Elle semble donc jouer un rôle de suppresseur de tumeur (Figure 10).

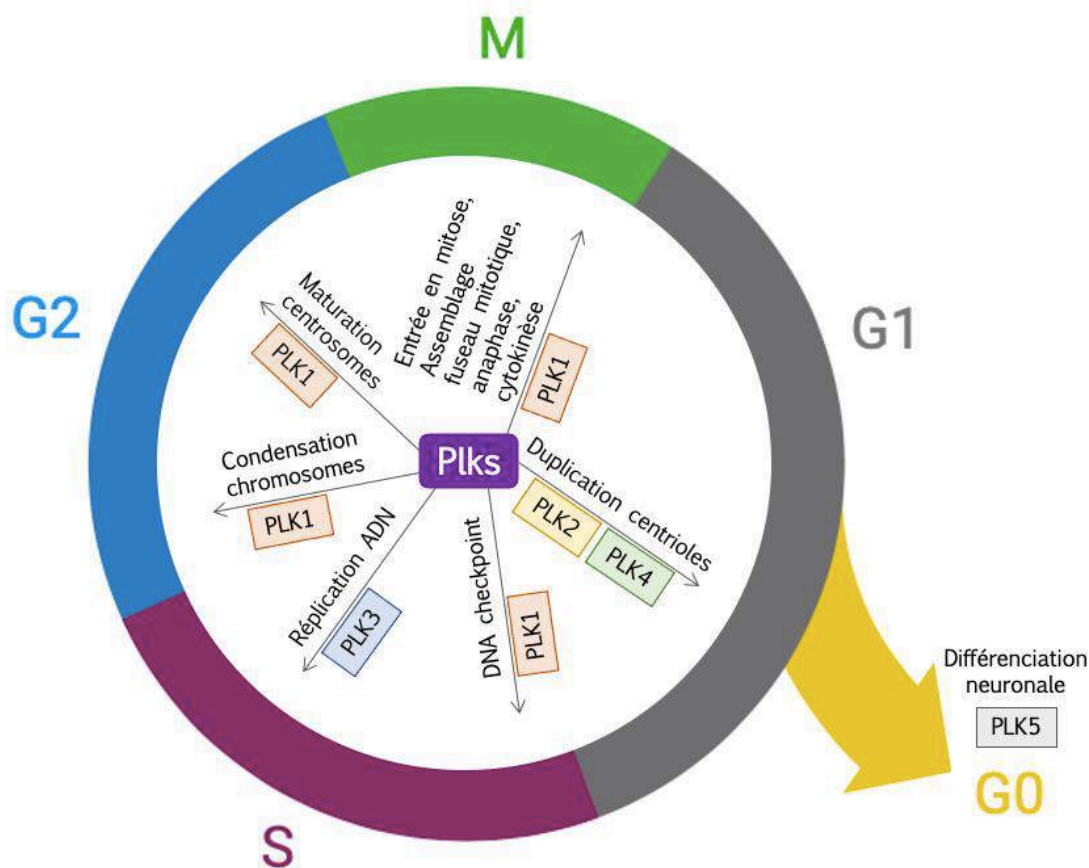


Figure 10 : Fonctions cellulaires des membres de la famille Polo like kinase (D'après Lee et al. 2014)¹⁶⁶. PLK1 joue un rôle dans l'entrée mitotique, l'assemblage du fuseau mitotique, l'entrée en anaphase et la cytokinèse en phase mitotique. Il participe au point de contrôle de l'ADN (DNA checkpoint), à la condensation chromosomique et la maturation des centrosomes en interphase. En phase G1, PLK2 et PLK4 favorisent la duplication des centrioles et en phase S, PLK3 régule la réplication de l'ADN. PLK5 est impliqué dans la différenciation des neurones.

2. PLK1 : acteur majeur du cycle cellulaire

a. Organisation du cycle cellulaire

Le cycle cellulaire est un processus complexe et omniprésent stimulé ou inhibé lors de la prolifération des cellules, le développement de l'organisme, la régulation de la réparation des dommages à l'ADN, l'hyperplasie tissulaire en réponse à une blessure et dans des maladies telles que le cancer. Il implique de nombreuses protéines régulatrices qui dirigent la cellule vers la mitose et la production de deux cellules filles. Au cœur de ce processus se trouvent les **kinases dépendantes des cyclines** (Cdk) et les protéines **cyclines** qui régulent la progression de la cellule à travers les différentes phases du cycle cellulaire : **G1, S, G2 et M**¹⁶⁷ (Figure 11).

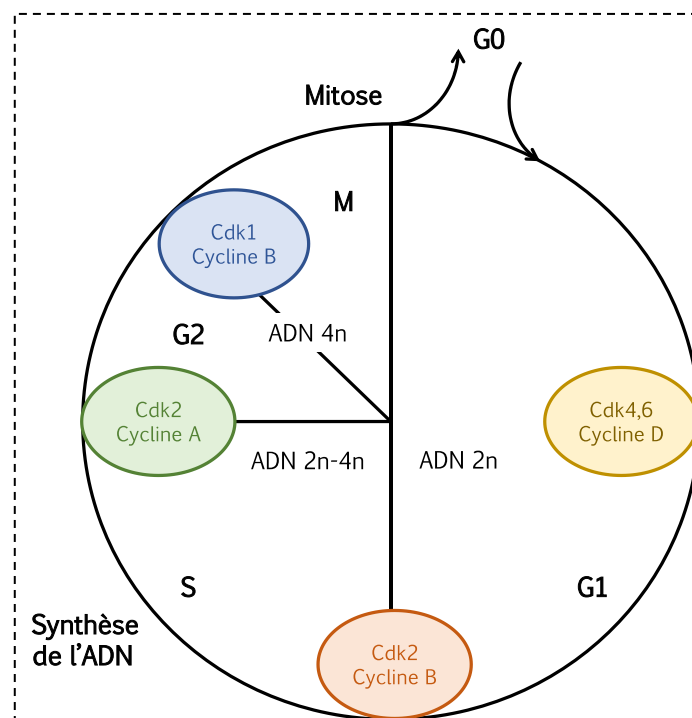


Figure 11 : La progression du cycle cellulaire régulée par les complexes Cdk-Cyclines (D'après Schafer et al. 1998)¹⁶⁷.

Durant la **phase G1/S**, le centrosome constitué des centrioles, se duplique. En **phase S**, l'ADN se réplique et passe de 2n à 4n chromosomes. En **phase G2/M**, les centrosomes génèrent le fuseau mitotique composé de microtubules de part et d'autre de la cellule.

La cellule entre ensuite en **mitose** qui est constituée de plusieurs étapes : la **prophase**, la **métaphase**, l'**anaphase** et la **télophase**. Durant la prophase, les chromosomes se condensent et l'enveloppe nucléaire disparaît. En métaphase, les chromosomes s'alignent sur la plaque équatoriale de la cellule et les chromosomes s'attachent aux microtubules par leurs kinétochores. Lors de l'anaphase, les chromatides sœurs de chaque chromosome se séparent et migrent vers chaque pôle opposé de la cellule. Pendant la télophase, l'enveloppe nucléaire se reforme et un anneau contractile se forme au centre de la cellule lors la cytokinèse pour séparer les cellules filles produites (Figure 12).

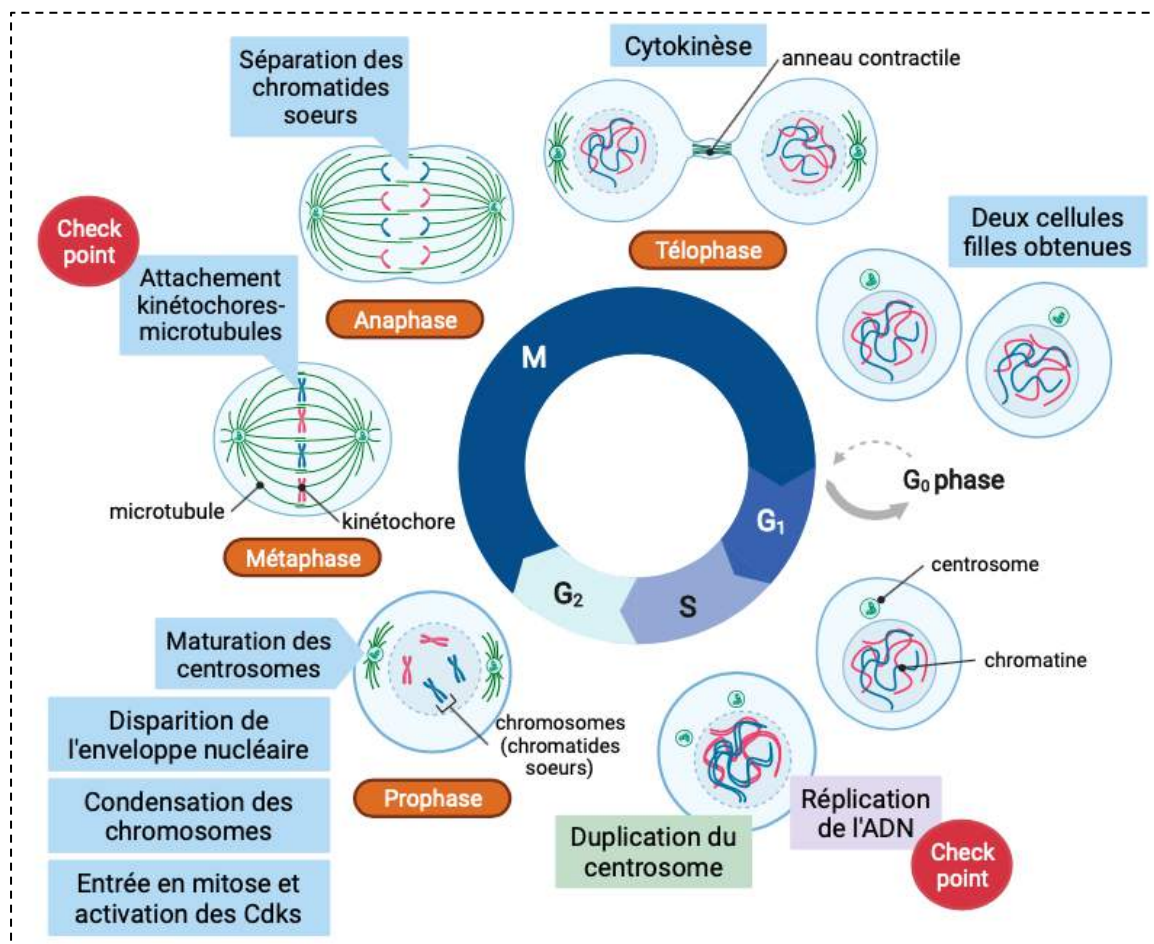


Figure 12 : Déroulement du cycle cellulaire et des étapes de la mitose

b. Régulation du cycle cellulaire par PLK1

Grâce aux études *in vitro* sur les cellules de mammifères et le système de la *Drosophile*, nous savons que PLK1 est nécessaire durant toutes les étapes de la

mitose, telles que l'assemblage du fuseau mitotique bipolaire¹⁶⁸, la ségrégation de chromosomes¹²⁸, la maturation des centrosomes¹⁶⁹ ou encore l'anaphase¹⁷⁰. **Son inhibition dans des cellules, par ARN interférent ou pharmacologiquement entraîne une anomalie de la formation du fuseau mitotique, de la ségrégation chromosomique et la mort des cellules¹⁷¹⁻¹⁷³.**

L'expression de PLK1 augmente à partir de **la fin de la phase S jusqu'à la mitose** durant laquelle PLK1 est la plus active. Sa localisation est très dynamique ; elle est présente dans le cytoplasme puis dans le noyau à partir de la phase G2¹⁶⁸.

En prophase, PLK1 est située au niveau des **centrosomes**. Elle s'accumule ensuite au niveau des **kinétochores** en métaphase. Elle est ensuite recrutée au centre du **fuseau mitotique** en anaphase puis **au centre des deux cellules** durant la télophase¹⁷⁴. Sa localisation reflète sa fonction dans le cycle cellulaire.

- **Le cycle du centrosome**

Le centrosome est composé d'une paire de centrioles (mère et fille). Il est intégré dans la **matrice péricentriolaire (PCM)** qui contient un complexe **γ -tubuline (γ -TuRCs)** essentiel à la nucléation des centrosomes. Le centromère représente le centre organisateur de microtubules. Il assure la formation du fuseau mitotique et la ségrégation des chromosomes¹⁷⁵.

Les protéines d'échafaudage Cep-192 et Gravin du centrosome, permettent le recrutement de **PLK1** et **Aurora A** au centrosome^{176,177}. Aurora A est activée par autophosphorylation. **Bora** induit la **liaison entre Aurora A et PLK1**. **Aurora A phosphoryle alors PLK1 sur la Thréonine 210¹⁷⁸**.

Lors de la **séparation des centrioles mère-fille**, en phase G1, PLK1 phosphoryle la protéine **Scc1** (cohésine) qui est ensuite clivée par la protéase **Séparase¹⁷⁹** qui permet la séparation des centrioles mère-fille. Cependant, pour éviter une séparation précoce, PLK1 peut également phosphoryler la protéine du fuseau mitotique, **Astrin** pour inhiber la **Separase¹⁸⁰** et maintenir la liaison des centrioles mère-fille.

Les centrioles mère-fille se dupliquent ensuite durant la phase S, au même moment que la duplication de l'ADN.

La maturation du centrosome est définie par l'accumulation du complexe **γ -tubuline** et d'autres protéines du PCM au centrosome pour favoriser la genèse du

fuseau de microtubules. PLK1 phosphoryle certaines protéines du PCM telles que la **Pericentrine** sur les Sérines 1235 et 1241 et **Cep-192** sur la Thréonine 44 et la Sérine 995 afin de recruter la protéine **NEDD1** et la γ -tubuline au centrosome^{181,182}. Cdk1 et PLK1 phosphorylent NEDD1 pour lui permettre d'interagir avec la γ -tubuline¹⁸³. Ce procédé fait intervenir la sérine thréonine kinase **Nek9** nécessaire à la phosphorylation de NEDD1 et au recrutement de la γ -tubuline¹⁸⁴. **NEDD1** recrute et interagit avec la γ -tubuline pour permettre la formation du fuseau mitotique au centrosome.

La séparation des centrosomes est initiée durant la prophase en phase M par la sérine thréonine kinase **Nek2A** qui forme un complexe avec la protéine d'échafaudage **Cep85**. La phosphorylation de Cep85 par PLK1 libère Nek2A. PLK1 phosphoryle ensuite la sérine thréonine kinase **Mst2** qui active Nek2A¹⁸⁵.

Nek2A phosphoryle alors la protéine de liaison des centrosomes **C-Nap1** et permet la disjonction des centrosomes¹⁸⁶.

PLK1 et la Cdk1 phosphorylent ensuite **Nek9** sur la Sérine 869 qui active la sérine thréonine kinase **Nek6** sur la Thréonine 926 permettant le recrutement et l'activation d'**Eg5**^{187,188}. Le mouvement de la protéine motrice Eg5 (kinésine 5) phosphorylée ainsi que celui d'autres protéines motrices, tels que la dynéine et la myosine, le long des microtubules génèrent des forces de poussée et de traction qui propulsent les centrosomes aux deux pôles opposés de la cellule pour maintenir un fuseau mitotique bipolaire¹⁸⁹ (**Figure 13**).

L'inhibition de PLK1 conduit à la formation d'un fuseau monopolaire avec une organisation des microtubules altérée dû à une anomalie de la maturation des centrosomes^{169,190}. PLK1 est donc indispensable à l'initiation de la maturation des centrosomes et à la formation d'un fuseau bipolaire.

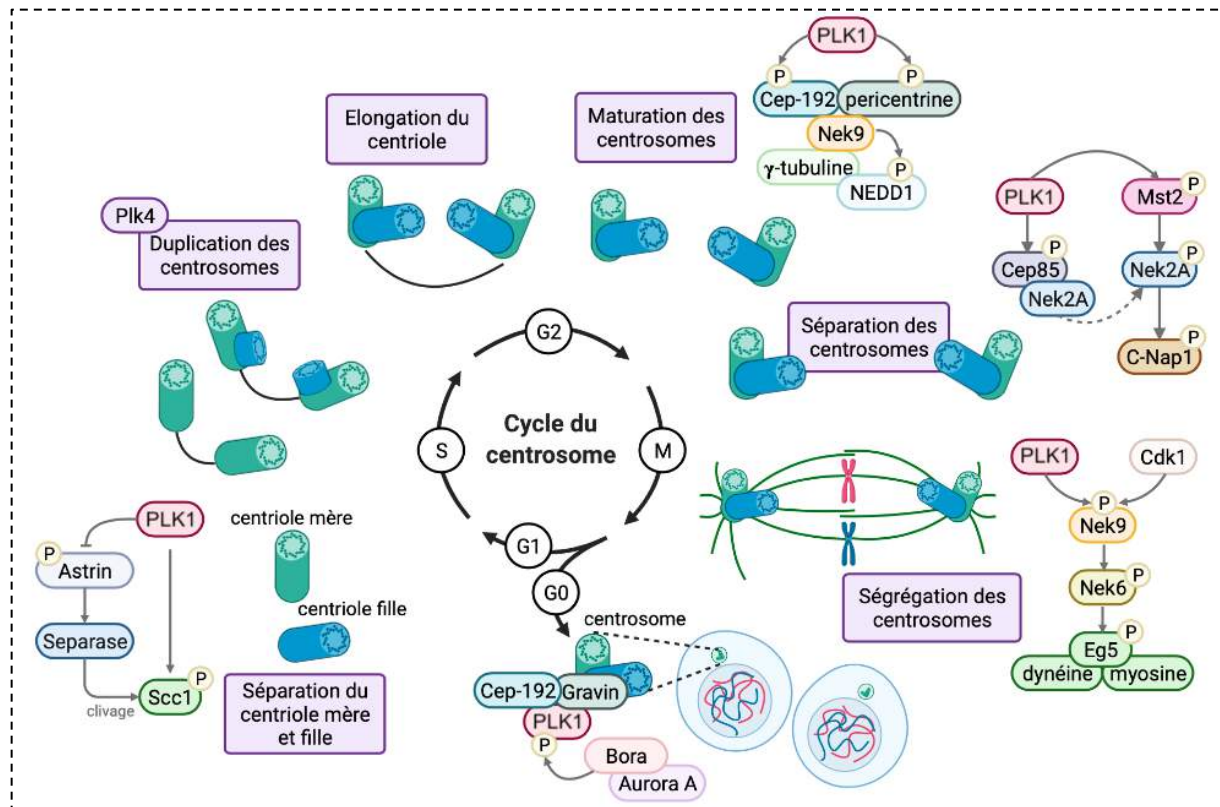


Figure 13 : Rôles de PLK1 dans le cycle du centrosome

- L'entrée en mitose

L'entrée en mitose dépend de l'activation du complexe **Cdk1/Cycline B** par **PLK1** au **niveau du centrosome**¹⁹¹. Ce complexe est inhibé par phosphorylation de la Cdk1 sur la Thr14 et la Tyr15 par deux kinases **WEE1**¹⁹² et **MYT1**¹⁹³ durant les phases G1 et S pour éviter une mitose prématurée.

Après le checkpoint de l'ADN en phase G2, **PLK1** est essentiel pour la continuité du cycle cellulaire. **CDK1** contribue à l'activation de **PLK1** via la phosphorylation de **Bora**¹⁹⁴. **Aurora A** et **Bora** activent **PLK1** sur la **Thr210**¹⁷⁸. **PLK1** active à son tour la phosphatase **Cdc25C**^{130,195} ce qui induit la dégradation des kinases **WEE1**¹⁹⁶ et **MYT1**¹⁹⁷.

PLK1 phosphoryle la **Cycline B** pour permettre sa localisation au centrosome¹⁹⁸.

Ainsi, le complexe **CDK1/Cycline B** est activé et la cellule entre en mitose (Figure 14).

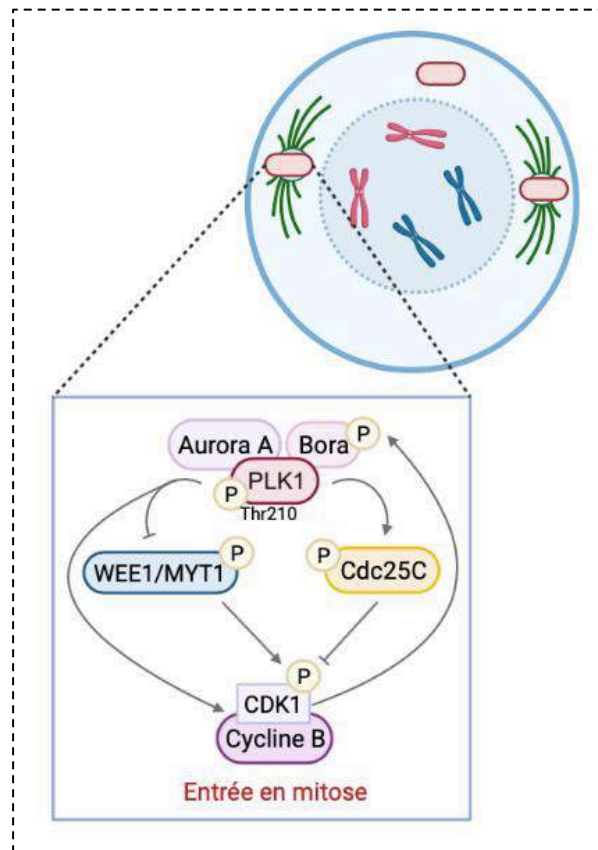


Figure 14 : PLK1 durant l'entrée en mitose

- **L'attachement kinétochore-microtubule et la stabilité génomique**

La répartition chromosomique égale dans chaque cellule fille est important pour l'intégrité du génome. Elle est contrôlée par le point de contrôle de l'assemblage du fuseau mitotique appelé « **Spindle Assembly Checkpoint (SAC)** ». Le SAC inhibe l'anaphase jusqu'à ce que toutes les chromatides sœurs se fixent via leur kinétochore aux microtubules émergeant des pôles opposés du fuseau. La cohésine est une protéine qui assure l'attachement des chromatides sœurs¹⁹⁹. Elle est présente depuis la phase S jusqu'au moment de l'anaphase où les chromatides sœurs se séparent. Le principal effecteur du SAC est le **complexe mitotique checkpoint (MCC)** qui regroupe les protéines responsables de ce point de contrôle : **BubR1**, **Bub1/3**, **Mad2** et **Cdc20**. Lors de l'activation du SAC, **PLK1** et la sérine thréonine kinase **Mps1**, phosphorylent et activent la protéine d'échafaudage aux kinétochores **KNL1**²⁰⁰. Celle-ci interagit avec les protéines adaptatrices **Bub1** et **Bub3** pour le recrutement de BubR1, Cdc20, et Mad2 aux kinétochores^{201,202}. Ce complexe inhibe l'activité de l'ubiquitine ligase E3

APC/C pour éviter la séparation précoce des chromatides sœurs avant l'entrée en anaphase²⁰³.

Le **complexe passager chromosomique (CPC)**, composé de la kinase **Aurora B**, et des protéines du centromère **INCENP**, **Survivin** et **Borealin**, joue un rôle important dans la correction des erreurs d'attachement kinétochore-microtubule (KT-MT) en déstabilisant les liaisons KT-MT anormales²⁰⁴. Il permet notamment la localisation de **PLK1** au centromère²⁰⁵ : **INCENP** interagit avec **PLK1** au centromère pour permettre à **Aurora B** de le phosphoryler. Son inhibition perturbe la localisation de **PLK1**²⁰⁶. Le **CPC** et la protéine **Bub1** collaborent pour recruter **PLK1** aux kinétochores^{207,208}. **Aurora B** est activée par **PLK1** sur la Thréonine 236 puis par autophosphorylation sur la Thréonine 232²⁰⁹.

Lorsque tous les kinétochores sont correctement attachés aux microtubules, **PLK1** exerce des tensions sur les kinétochores et déphosphoryle les substrats d'**Aurora B** via la phosphatase **PP2A-B56 α** pour stabiliser les attachements KT-MT²¹⁰. **PLK1** phosphoryle **BubR1**²¹¹ pour le recrutement et l'activation des phosphatases **PP2A-B56**²¹² et **PP1**²¹³ aux kinétochores. Ces phosphatases déphosphorylent alors **Mps1** et **Cdc20** permettant l'activation de l'ubiquitine ligase **APC/C**²¹⁴⁻²¹⁶. En anaphase, **PLK1** contribue à l'activation de l'**APC/C** en favorisant la dégradation de **EMI-1**, un inhibiteur majeur de l'**APC/C** dans les cellules mitotiques²¹⁷. **APC/C active ensuite la Séparase pour dégrader la cohésine et permettre la séparation des chromatides sœurs (Figure 15)**.

PLK1 participe à la stabilité génomique et assure l'alignement des chromosomes sur la plaque équatoriale du fuseau mitotique, en métaphase. Elle phosphoryle **BRCA2** un suppresseur de tumeur impliqué dans le maintien de l'intégrité du génome (réparation de l'ADN) et l'alignement des chromosomes. La phosphorylation de **BRCA2** par **PLK1** facilite la formation d'un complexe entre **BRCA2**, **BubR1** phosphorylée par **PLK1**²¹⁸ et la phosphatase **PP2A**. Un défaut dans cette fonction de **BRCA2** se manifeste par un désalignement chromosomique, des erreurs de ségrégation chromosomique, un retard mitotique et une aneuploïdie, conduisant à une instabilité chromosomique²¹⁹.

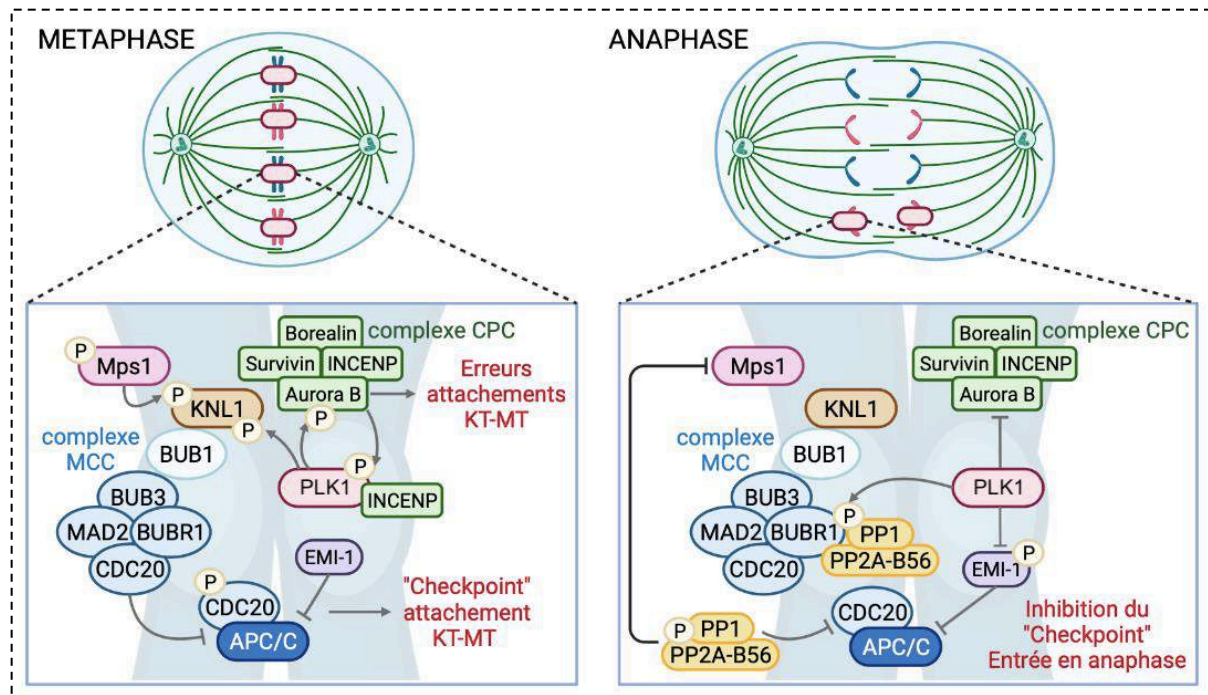


Figure 15 : Rôle de PLK1 dans le point de contrôle de l'assemblage du fuseau mitotique.

Lors de la métaphase et de la transition métaphase-anaphase, le complexe MCC recruté au centromère, inhibe le complexe APC/C pour éviter la séparation précoce des chromatides sœurs. En parallèle, le complexe CPC déstabilise les liaisons KT-MT anormales. A l'entrée de l'anaphase, les complexes CPC et MCC sont inactivés, le complexe APC/C favorise alors la séparation des chromatides sœurs.

- La cytokinèse

La cytokinèse conclut la mitose en produisant deux cellules filles. Elle débute en anaphase avec l'assemblage d'un anneau contractile à base d'actine et de myosine II. Cet anneau marque le plan de division cellulaire, conduisant à la formation du sillon de clivage²²⁰. PLK1 phosphoryle une kinésine **MKLP2**²²¹ et une protéine associée aux microtubules **PRC1**²²², permettant sa localisation au fuseau mitotique pendant l'anaphase et la télophase. Au niveau de l'anneau contractile, PLK1 phosphoryle la protéine GAP **HsCyk-4** (RacGAP) pour permettre son interaction avec la protéine GEF **Ect2**²²³. Ect2 active ensuite la GTPase RHOA pour permettre la contraction du sillon contractile. Parallèlement, PLK1 phosphoryle et inhibe une protéine centrosomale **Cep55** pour éviter l'abscission précoce entre les deux cellules. PLK1 est polyubiquitinée et dégradée par le protéasome, et Cep55 est recrutée au centre du fuseau mitotique pour favoriser l'abscission et la séparation des cellules filles. La mutation ou l'inhibition

pharmacologique de PLK1 entraîne le recrutement prématuré de Cep55 et l'abscission n'a pas lieu^{224,225} (Figure 16).

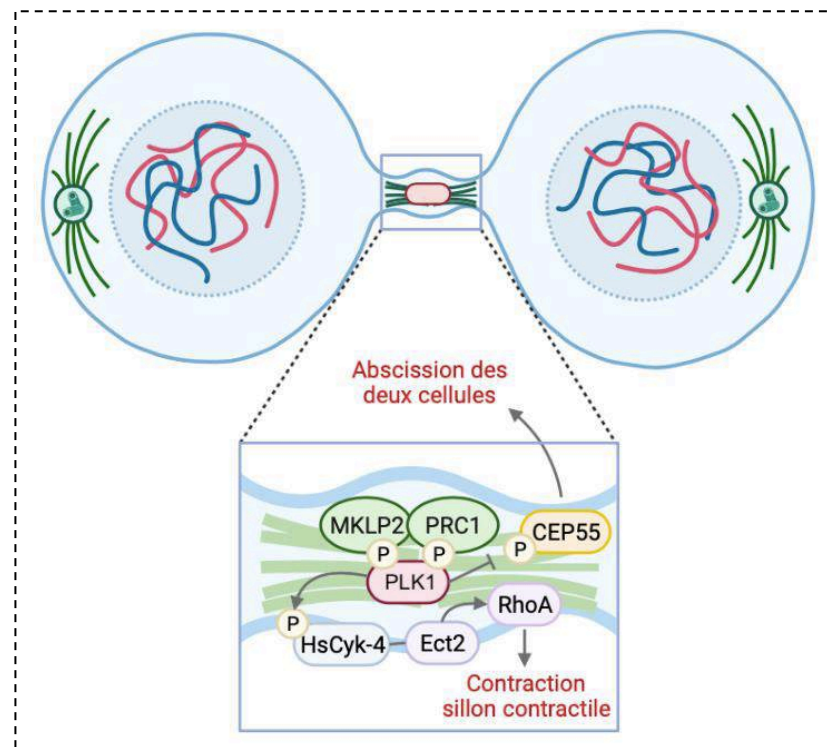


Figure 16 : PLK1 durant la cytokinèse

PLK1 est recrutée au niveau du sillon contractile et active via les protéines GAP (HsCdk-4) et GEF (Ect2), la protéine G RHOA pour permettre la contraction du sillon. CEP55 active ensuite la séparation des cellules filles.

- **PLK1 dans la réponse aux dommages à l'ADN et la stabilité génomique**

Les dommages à l'ADN peuvent apparaître tout au long du cycle cellulaire. S'ils ne sont pas réparés correctement, ils entraînent des mutations et éventuellement un processus tumoral. La **réponse aux dommages à l'ADN** (DDR), consiste à détecter les lésions de l'ADN, à signaler les dommages à l'ADN pour interrompre le cycle cellulaire et à favoriser la réparation de l'ADN. Durant la phase G1/S, le DDR assure que l'ADN n'est pas endommagé avant le cycle cellulaire. Les kinases **ATM** et **ATR** sont les premières activées lors de dommages à l'ADN. Elles activent d'autres kinases **CHK1** et **CHK2** (complexe DDR).

Les extrémités d'ADN cassées sont reconnues et délimitées par le complexe **Mre11-Rad51-Nbs1** (MRN) qui favorise l'activation d'ATM/ATR²²⁶.

Lors de dommages à l'ADN en G1, les kinases Chk1 et Chk2 phosphorylent et inhibent la phosphatase **Cdc25A** sur la Sérine 123, ce qui empêche l'activation de la kinase **CDK2** et l'entrée en phase S^{227,228}.

En phase G2, PLK1 perd son activité en réponse aux dommages à l'ADN. ATM/ATR phosphorylent sa kinase activatrice Bora sur la Thréonine 501. Bora est ensuite polyubiquitinée par l'ubiquitine ligase **SCF- β -TRCP** et éliminée par le protéasome. Une mutation du site de phosphorylation de Bora ne permet plus la réparation de l'ADN après une irradiation par UV²²⁹. Si Bora est dégradée, PLK1 n'est plus activée et le cycle cellulaire est arrêté en phase G2. L'inhibition complète de PLK1 fait intervenir la phosphatase PP2A qui déphosphoryle PLK1 par l'intermédiaire de **B55 α** ²³⁰. La phosphatase **Cdc25C** est également inhibée par les kinases **CHK1** et **CHK2** sur la Sérine 216, empêchant l'activation du complexe **Cdk1/Cycline B**^{231,232}.

Lorsque les dommages à l'ADN ont été réparés, PLK1 est à nouveau activée et phosphoryle la **Claspin**, une protéine adaptatrice de l'ATR qui est ensuite polyubiquitinée par les E3 ligase β -TrCP1/2 et dégradée par le protéasome. Le complexe DDR est inhibé et les cellules entrent alors en mitose²³³.

La réparation des dommages à l'ADN peut également se produire lors de la mitose. Le complexe DDR se reforme et active la phosphatase **PP2A** chargée de déphosphoryler PLK1 sur la thr210 afin d'interrompre son activité en métaphase²³⁴⁻²³⁶.

P53 et PLK1 interviennent lors des dommages à l'ADN. P53 induit l'arrêt du cycle dans des conditions de stress et éventuellement la mort par apoptose de la cellule. P53 est activé par le complexe DDR lors de dommages à l'ADN et induit la transcription de **p21** pour inhiber les CDKs et donc la progression du cycle cellulaire²³⁷. P53 se fixe sur le promoteur de PLK1 et inhibe directement l'activité des facteurs de transcription **E2F1**²³⁸ et **FoxM1**²³⁹ responsables de la transcription de PLK1. P53 inhibe également indirectement la transcription de PLK1 via p21²⁴⁰. Une fois les dommages à l'ADN corrigés, PLK1 phosphoryle et induit la dégradation de p53 via la topoisomérase **Topors** et l'ubiquitine ligase **MDM2**²⁴¹ (**Figure 17**).

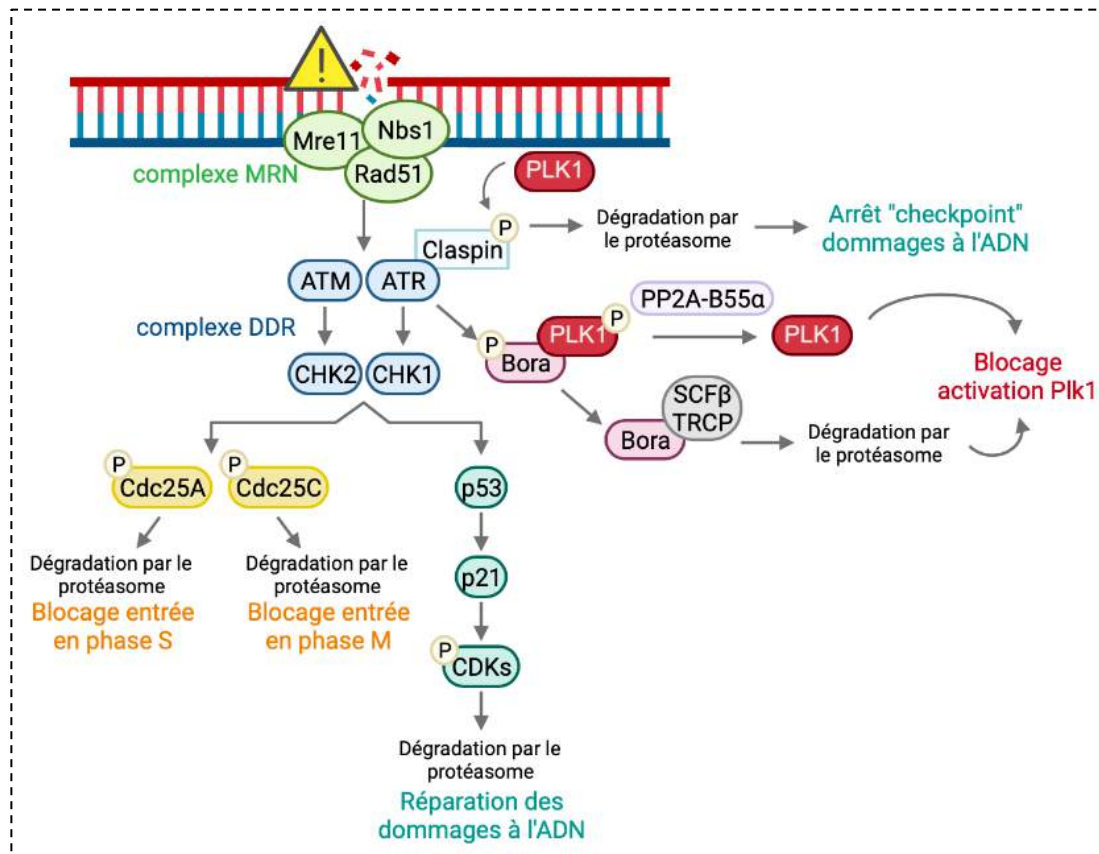


Figure 17 : PLK1 dans la réponse aux dommages à l'ADN

Le complexe MRN détecte les dommages à l'ADN et active le complexe DDR. Ce complexe inhibe l'activation de PLK1 et des protéases Cdc25A et C bloquant l'entrée en phase S (réplication de l'ADN) ou en phase M (mitose). Ce complexe favorise aussi la réparation des dommages à l'ADN via p53. Une fois les dommages réparés, PLK1 inhibe le complexe DDR et dégrade p53

PLK1 est donc un acteur clé dans toutes les étapes du cycle cellulaire. Son inhibition ou des altérations génétiques entraînent des défauts dans la maturation des centrosomes, l'assemblage du fuseau mitotique, l'entrée en mitose et la cytokinèse. Sa surexpression empêche les points de contrôles des dommages à l'ADN et l'attachement des kinétochores aux microtubules, causant donc une instabilité génétique et la transformation cancéreuse.

3. PLK1 et cancer

En raison de son rôle essentiel dans la prolifération cellulaire, PLK1 est exprimé dans les tissus hautement prolifératifs (testicules, thymus, rate) ou lors du développement embryonnaire¹⁶⁸. La surexpression de PLK1 entraîne une transformation maligne des fibroblastes humains normaux *in vitro*. Ces fibroblastes génèrent des tumeurs lorsqu'ils sont injectés dans des souris immunodéprimées. Ce résultat suggère que PLK1 contribue directement à la **carcinogenèse**²⁴². De même, la surexpression de PLK1 dans les tumeurs favorise un taux de prolifération accru des cellules cancéreuses. Certains mécanismes moléculaires contrôlés par PLK1 participent à la signalisation oncogénique (points de contrôles KT-MT ou des dommages à l'ADN).

a. PLK1 : promoteur de tumeurs et d'agressivité tumorale

Durant le cycle cellulaire, PLK1 est majoritairement régulée **transcriptionnellement** par **FoxM1** notamment durant la phase G2/M^{243,244}. FoxM1 contribue donc au développement de plusieurs types de cancers tels que l'adénocarcinome œsophagien²⁴⁵ et le cancer du rein²⁴⁶ par l'intermédiaire de PLK1. Le facteur de transcription **E2F** se lie également à la région promotrice (éléments CDE/CHR et CCAAT) de PLK1 et peut stimuler son expression²⁴⁷. Ainsi, la surexpression d'E2F favorise la dérégulation de PLK1 et conduit à la prolifération accrue des cellules cancéreuses de prostate et de la vessie²⁴⁸.

P53, est le « gardien du génome », chargé d'arrêter le cycle cellulaire lors d'un stress à l'origine de dommages à l'ADN et éventuellement, d'induire l'apoptose de la cellule²⁴⁹. Les suppresseurs de tumeur **p53** et **p21** peuvent se fixer sur le **promoteur de PLK1** et réprimer son expression. Or, soit le gène TP53 est muté dans approximativement 50% des cancers, soit la protéine p53 n'est pas fonctionnelle. Cette perte de fonction de p53 contribue à la **tumorigenèse**, à la surexpression de PLK1 et donc à l'augmentation de la prolifération cellulaire²⁵⁰. De plus, PLK1 déstabilise p53 via son stabilisateur **MDM2**²⁵¹. Elle phosphoryle GTSE1 qui transporte p53 hors du noyau pour être dégradée²⁵². Elle active aussi l'ubiquitine ligase TOPORS qui ubiquitine p53 et favorise sa dégradation par le protéasome²⁴¹. La surexpression de PLK1 contribue donc à l'inhibition de p53 et favorise ainsi le développement tumoral²⁵³.

PLK1 phosphoryle d'autres suppresseurs de tumeurs tels que **REST** dont la dégradation par le protéasome favorise le développement du cancer du sein triple négatif²⁵⁴. PLK1 phosphoryle également les répresseurs de l'ARN non-codant **SUZ12** et **ZNF198**, et l'oncogène **HOTAIR**, dans l'hépatocarcinome^{255,256}. PLK1 inhibe l'activité transcriptionnelle de **FOXO1**, un suppresseur de tumeur clé qui favorise l'apoptose dans les cellules cancéreuses de la prostate²⁵⁷.

Le suppresseur de tumeur **PTEN** est également considéré comme suppresseur de tumeur. Il interagit avec p53 afin de maintenir la stabilité du génome lors du « checkpoint » des dommages à l'ADN²⁵⁸. Il régule également l'expression de PLK1 afin de maintenir la stabilité chromosomique tout au long du cycle²⁵⁹. La perte du gène **PTEN** entraîne une instabilité chromosomique en inhibant la réponse aux dommages à l'ADN^{260,261}. **PTEN** réprime également la voie de signalisation **PI3K/AKT**⁴⁷. PLK1 est capable de phosphoryler **PTEN** sur la Sérine 385, ce qui entraîne sa délocalisation du noyau vers le cytoplasme. **PTEN** ne peut donc plus contribuer à la réparation des dommages à l'ADN²⁶². Ainsi, l'inhibition de **PTEN** par PLK1, entraîne la suractivation de **PI3K/AKT** qui favorisent la tumorigenèse et l'agressivité tumorale. **PI3K/AKT** phosphoryle PLK1 sur la Sérine 99 durant la transition métaphase/anaphase. La dérégulation de **PI3K/AKT** contribue donc à la surexpression de PLK1 : dans les cellules cancéreuses de pancréas, l'inhibition de **PI3K/AKT** réduit l'expression de PLK1, conduit à l'apoptose et réprime la croissance tumorale²⁶³.

PLK1 contribue aussi à la **transition épithélio-mésenchymateuse (EMT)** des cellules cancéreuses dans les cancers gastriques et le carcinome pulmonaire^{264,265}. Elle participe donc à l'**agressivité** des cellules cancéreuses.

PLK1 phosphoryle et active la voie de signalisation **cRAF-MEK/ERK-ZEB1/2** pour induire l'expression de gènes de l'EMT²⁶⁶. PLK1 induit également l'EMT par l'intermédiaire de la voie de signalisation **PI3K/AKT-mTOR** dans l'ostéosarcome²⁶⁷. En activant la voie de signalisation **TGF-β**, PLK1 amplifie les propriétés métastatiques des cellules de carcinome pulmonaire²⁶⁸.

L'oncogène **c-MYC** stimule également la transcription du gène PLK1. La surexpression de **c-MYC** entraîne la surexpression de PLK1 dans les cellules cancéreuses de lymphome et de neuroblastome. PLK1 peut stabiliser et surexprimer

c-MYC, en inhibant sa dégradation par le protéasome post ubiquitination par l'ubiquitine ligase SCF^{Fbw7} , ou en activant de la voie $AKT-GSK3\beta$ ^{269,270}.

Par ces multiples mécanismes, PLK1 est surexprimée dans différents cancers tels que : le cancer sein²⁵⁴, l'hépatocarcinome¹⁵⁴, l'adénocarcinome du côlon²⁷¹, le carcinome épidermoïde du poumon²⁷², l'adénocarcinome de la prostate²⁷³, le cancer gastrique²⁷⁴, le cancer de l'ovaire²⁷⁵ et le mélanome²⁷⁶. De plus, la surexpression de PLK1 est souvent corrélée à un mauvais pronostic et une agressivité tumorale. PLK1 est donc utilisée comme marqueur pronostique dans ces cancers (Figure 18).

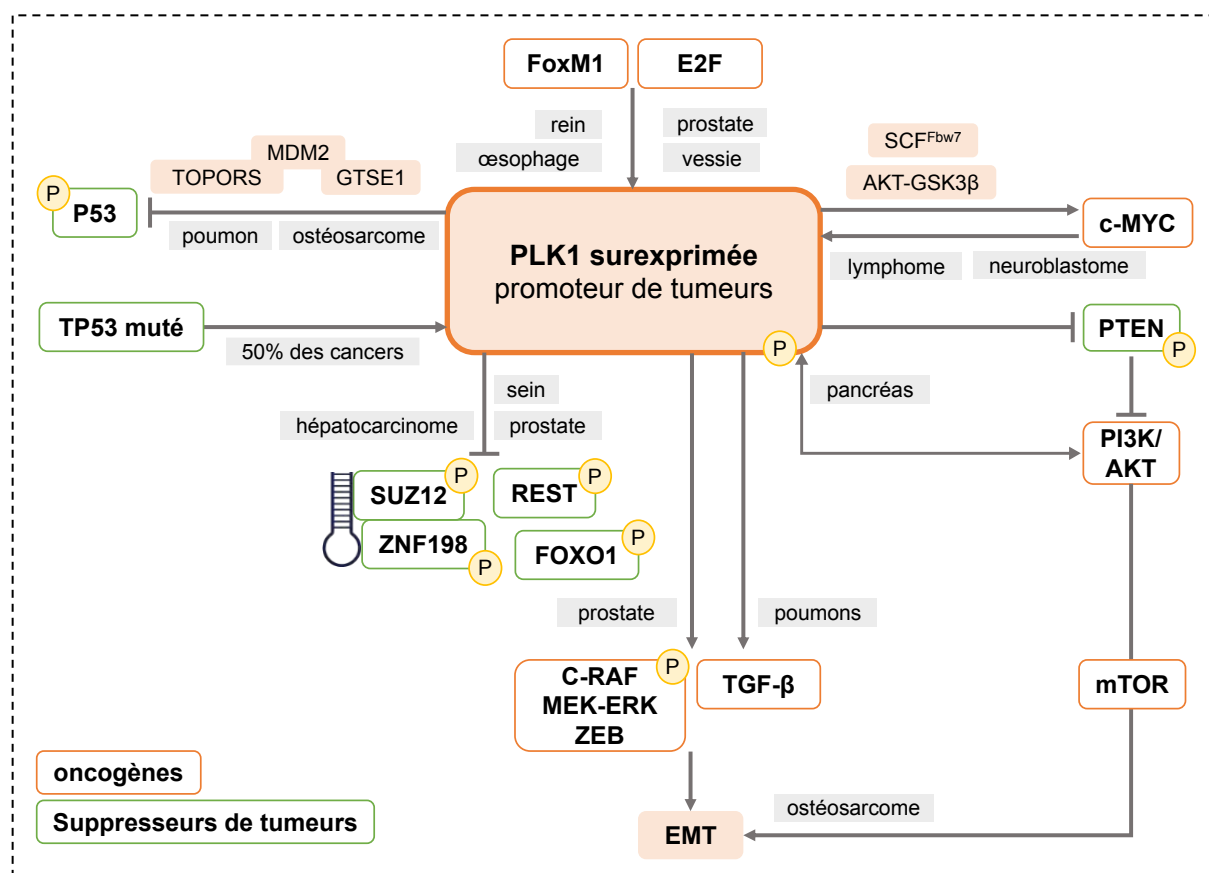


Figure 18 : PLK1, promoteur de tumeurs et d'agressivité tumorale

b. PLK1 : suppresseur de tumeur

Malgré son activité importante en tant qu'oncogène, **PLK1 peut également agir comme suppresseur de tumeur** dans certaines circonstances.

Les souris hétérozygotes pour **PLK1** ($PLK1^{-/+}$) développent des tumeurs en comparaison des souris contrôles. Ce résultat suggère des effets antagonistes de PLK1 dans la division cellulaire suivant le contexte physiopathologique¹³¹.

Les souris PLK1 (-/+) développent des lymphomes, des carcinomes pulmonaires, des carcinomes épidermoïdes et des sarcomes. Les cellules de ces souris montrent une aneuploïdie, donc une instabilité génomique. Ce mécanisme pourrait donc expliquer la formation de tumeurs à la suite de la baisse de PLK1.

Dans le cancer du sein, PLK1 module le récepteur de l'œstrogène. Sa surexpression est corrélée à un bon pronostic dans les sous-types génétiques **HER2+** (Récepteur 2 de la famille des récepteurs du facteur de croissance épidermique humain 2) et **ER-** (récepteur à l'œstrogène). Les patientes surexprimant **PLK1** et **ER (ER+)** présentent un mauvais pronostic. De plus, la surexpression de PLK1 réduit la formation de tumeurs du sein dans des modèles murins KRAS et HER2 mutés²⁷⁷.

Certains patients atteints de cancers colorectaux présentent des mutations non-sens de l'APC, responsables de l'instabilité chromosomique. Cependant, la surexpression de PLK1 améliore significativement la survie de ces patients. Chez le modèle murin présentant des mutations de l'APC, le blocage de PLK1 inhibe le point de contrôle d'attachement kinétochores-microtubules (KT-MT) et favorise le développement de tumeurs intestinales dû aux instabilités chromosomiques²⁷⁸.

En résumé, la surexpression de PLK1 conduit à un bon ou à un mauvais pronostic selon le type de cancer. Une expression élevée de PLK1 est associée à un mauvais pronostic dans les adénocarcinomes de poumons, les cancers de la vessie et du rein. Cependant, elle est associée à un bon pronostic chez les patients atteints de carcinomes épidermoïdes pulmonaires, du thymome (tumeur épithéliale du thymus) et d'adénocarcinomes du rectum. D'autre part, la surexpression de PLK1 n'influence pas la survie de patients ayant développé des cancers de l'ovaire, de l'estomac et du col de l'utérus²⁷⁹.

c. PLK1 dans les carcinomes épidermoïdes des VADS

Le développement des carcinomes épidermoïdes des VADS se caractérise par une cellule souche de l'épithélium buccal qui subit des altérations génétiques et épigénétiques. Ces changements pré-néoplasiques ont fait l'objet d'études sur une lignée cellulaire provenant d'un patient au stade T4aN0 (non invasif). Un criblage de plus de **300 ARN interférents** sur cette lignée a été effectué afin de recenser les gènes essentiels dans le développement des carcinomes épidermoïdes invasifs. L'un

des ARN interférents ayant l'effet le plus fort sur **la transformation maligne de la muqueuse buccale**²⁸⁰, cible PLK1.

PLK1 ainsi que d'autres facteurs tels que p63, p40, Survivine et Bcl-2 jouent un rôle dans la tumorigenèse de la muqueuse buccale. Ils représentent des biomarqueurs dans la transformation des cellules non malignes en cellules tumorales puis dans la **formation d'un carcinome des VADS invasif**²⁸¹.

PLK1 est surexprimée dans les cancers des VADS et est associée à un mauvais pronostic chez ces patients²⁸². PLK1 constituerait donc un cible thérapeutique pertinente dans les cancers des VADS. Ce sujet a été traité dans l'article que je signe en première auteure dans le journal Theranostics : « The Polo-like kinase 1 inhibitor onvansertib represents a relevant treatment for head and neck squamous cell carcinoma resistant to cisplatin and radiotherapy ».

4. PLK1 comme cible thérapeutique

a. PLK1 et résistance aux traitements

En raison de son rôle central dans la progression du cycle cellulaire, et la voie des dommages à l'ADN, PLK1 est impliquée dans les **mécanismes de résistance à plusieurs chimiothérapies**.

La **doxorubicine** est un intercalant de l'ADN. Elle inhibe la réplication et la réparation de l'ADN. Elle est utilisée dans différents types de cancers mais une résistance thérapeutique contre cette molécule a été décelée chez certains patients. PLK1 inhibe prématurément **p53** lors du point de contrôle des dommages à l'ADN, ce qui contribue à la résistance à la doxorubicine^{241,283}.

La **metformine** impacte le métabolisme de la cellule cancéreuse et est utilisée dans le traitement du diabète de type 2 et les maladies cardio-vasculaires. PLK1 est à l'origine de la résistance à la metformine dans le cancer de la prostate en bloquant ses effets anticancéreux. L'ajout d'un inhibiteur de PLK1, le BI2536, améliore la réponse à la metformine en réactivant la voie de signalisation **p53** et les **voies de signalisation du métabolisme**, pour induire la mort cellulaire²⁸⁴. De plus, la surexpression de PLK1 conduit à l'inactivation de **PTEN** et à l'augmentation du métabolisme des cellules cancéreuses permettant leur survie²⁶². Les inhibiteurs de PLK1 pourraient donc améliorer les activités anticancéreuses de la metformine ou d'autres agents régulateurs du métabolisme et de la prolifération cellulaire.

La **gemcitabine** est utilisée dans le cancer du pancréas. Cet intercalant de l'ADN, en bloquant la réplication, inhibe la croissance tumorale. Or, la surexpression de PLK1 favorise la réplication de l'ADN et réduit la réponse cellulaire à la gemcitabine. PLK1 phosphoryle **Orc2** (« Origin recognition complex ») et **Hbo1** (« Histone acetyltransferase binding to ORC»), deux facteurs induisant la réplication de l'ADN et favorisent donc la survie des cellules cancéreuses de pancréas, traitées à la gemcitabine²⁸⁵.

La surexpression de PLK1 induit également la résistance au cisplatine. L'inhibition de PLK1 par ARN interférent et par le BI2536, restaure la sensibilité des cellules

cancéreuses gastriques au cisplatine^{286,287}. L'inhibition de PLK1 par ARN interférent induit également la sensibilité au cisplatine dans les cancers du col de l'utérus²⁸⁸.

La surexpression de PLK1 induit l'anaphase prématurément et contourne le point de contrôle de l'attachement des kinétochores aux microtubules. Ces phénomènes entraînent une instabilité du génome et contribuent au développement tumoral. Ce mécanisme favorise la résistance au cisplatine dans le cancer épithélial de l'ovaire²⁸⁹.

PLK1 est aussi impliquée dans la résistance à la radiothérapie. Le traitement des cellules d'ostéosarcome avec le BI2536, augmente leur radio-sensibilité²⁹⁰.

L'inhibition de PLK1 par ARN interférent en combinaison avec la radiothérapie, sensibilise à nouveau les cellules de **carcinomes des VADS** à la radiothérapie²⁹¹. PLK1 induit la radorésistance dans plusieurs autres cancers tels que le médulloblastome (tumeur pédiatrique du cervelet)²⁹² et le cancer du sein notamment via **l'autophagie pro-survie**²⁹³. Ce processus de dégradation lysosomale implique l'autodégradation puis le recyclage des organites de la cellule. L'autophagie favorise le développement du cancer du sein et la résistance à la radiothérapie²⁹⁴. L'inhibition de PLK1 a conduit à l'inhibition de l'autophagie pro-survie, augmentant ainsi la radiosensibilité des cellules cancéreuses.

La surexpression de PLK1 induit la résistance à la chimio-radiothérapie dans plusieurs modèles de cancers. Son inhibition favorise leur sensibilité à la chimiothérapie et à la radiothérapie. Plusieurs inhibiteurs spécifiques de PLK1 ont donc été développés.

b. Inhibiteurs de PLK1 et essais cliniques

Les inhibiteurs de PLK1 peuvent être classés en deux catégories : 1) **les inhibiteurs compétitifs du domaine de liaison de l'ATP** qui ciblent le domaine kinase ; 2) **les inhibiteurs allostériques ciblant le domaine catalytique PB** (Tableau 4).

- **Les inhibiteurs du domaine kinase**

Le **BI2536** a été le premier inhibiteur compétitif de PLK1. Il inhibe la prolifération cellulaire et la croissance tumorale (*in vitro et in vivo*)²⁹⁵. Le BI 2536 présente un profil de toxicité acceptable dans certains essais cliniques. En raison du faible taux de réponse en monothérapie, les essais cliniques n'ont pas été concluants notamment dans les leucémies aiguës myéloïdes, les cancers du poumon, du sein, de l'ovaire et des **carcinomes épidermoïdes des VADS**²⁹⁶⁻²⁹⁸. En revanche il a montré une forte efficacité en combinaison avec d'autres chimiothérapies dans le cancer du sein triple négatif, le neuroblastome et glioblastome^{254,299,300}.

Le **volasertib** (deuxième génération du BI6727), actuellement en essais cliniques de phase III dans les leucémies aiguës myéloïdes en combinaison avec la cytarabine (NCT01721876) n'a pas montré de réponse efficace chez les patients. En phase II, le volasertib associé à la cytarabine améliore la survie en comparaison de la **cytarabine** seule chez ces patients³⁰¹. En phase I, le volasertib combiné à la **decitabine** a montré une tolérance acceptable³⁰². Le volasertib a également été testé en essai clinique dans plusieurs cancers solides tels que le cancer du poumon non à petites cellules, le cancer de l'ovaire et le cancer urothélial³⁰³⁻³⁰⁵. Cependant, son efficacité est modérée et a été accompagnée d'une toxicité.

Le volasertib induit également une sensibilisation des cancers du poumon non à petites cellules au **cetuximab**, l'inhibiteur du récepteur de l'EGF³⁰⁶. Dans les cancers des VADS, il entraîne l'arrêt en G2/M et la mort par apoptose des lignées cellulaires qui présentaient les mutations Ajuba et SMAD4 *in vitro* et *in vivo*³⁰⁷.

L'**onvansertib** (NMS-P937) a été testé en essai clinique de phase I/II en association avec la **cytarabine** ou la **decitabine** dans les leucémies aiguës myéloïdes³⁰⁸ (NCT03303339). Il est testé dans les cancer colorectaux KRAS-muté, en phase II en combinaison avec le **bevacizumab** en deuxième ligne de traitement (NCT03829410). Il est aussi testé en phase II dans le cancer de la prostate métastatique en combinaison avec l'**abiraterone** (NCT03414034) et dans les cancers du pancréas métastatiques (NCT04752696). Il a également été testé en phase I dans plusieurs cancers solides dont les **cancers des VADS**³⁰⁹.

Il entraîne l'arrêt du cycle cellulaire et la mort par apoptose des cellules/xénogreffes d'ostéosarcomes en association avec la **doxorubicine**³¹⁰, et des cellules de leucémie

lymphoblastique aiguë³¹¹. Plus récemment, il a montré sa forte efficacité en association à la **radiothérapie** dans le médulloblastome³¹², ou avec le **paclitaxel** dans le cancer de l'ovaire²⁷⁵ et dans le cancer du sein triple négatif³¹³.

L'onvansertib présente une forte spécificité pour PLK1 à partir de 2nmol/L, par rapport aux autres inhibiteurs ATP-compétitifs. Une concentration supérieure à 10µmol/L est nécessaire pour inhiber les autres membres de la famille Polo-like kinase tels que PLK2 et PLK3³¹⁴, considérés comme suppresseurs de tumeur.

Le **TAK-960** induit l'arrêt en G2/M et la mort des cellules cancéreuses colorectales et de sarcomes^{315,316}. TAK-960 montre une activité anti-tumorale dans des modèles de xénogreffes de cancer colorectal et une re-sensibilisation d'un modèle murin de leucémie résistant au **paclitaxel**³¹⁶.

En phase I, le TAK-960 induit plusieurs effets secondaires sans amélioration de la survie des patients atteints de cancers avancés non-hématologiques.

Le **GSK461364** induit l'arrêt en G2/M et la mort par apoptose des cellules issues de plusieurs types de tumeurs et réduit la croissance de plusieurs tumeurs expérimentales chez la souris³¹⁷. Il induit une activité antitumorale dans le neuroblastome³¹⁸, dans le cancer du sein triple négatif et l'ostéosarcome en combinaison avec le docetaxel ou le paclitaxel^{313,319}.

En phase I, cet inhibiteur a été testé sur des patients atteints de cancers solides³²⁰ et dans le lymphome non-Hodgkinien mais a présenté une toxicité.

- **Les inhibiteurs du domaine catalytique Polo-box**

Les inhibiteurs allostériques inhibent l'interaction de PLK1 via son domaine PBD avec d'autres protéines. Cette interaction entraîne une conformation inactive de la protéine et empêche sa localisation subcellulaire correcte et donc sa fonction durant le cycle cellulaire.

La **poloxine** est le premier inhibiteur du domaine PBD de PLK1³²¹. Elle induit *in vitro* des défauts de duplication du centrosome, d'assemblage du fuseau mitotique, d'alignement des chromosomes. Elle entraîne l'arrêt de la mitose et induit la mort par apoptose des cellules HeLa. *In vivo*, elle inhibe la croissance de différents modèles de tumeurs expérimentales chez la souris^{322,323}. Les inconvénients majeurs de ce composé sont sa toxicité et son manque de spécificité. Des concentrations élevées

sont nécessaires pour un effet anticancéreux efficace et ils sont susceptibles de cibler d'autres protéines.

Le **rigosertib (ON0910)** est un autre inhibiteur du domaine PBD (non-ATP compétitif). Il induit des anomalies du fuseau mitotique entraînant la mort par apoptose, et l'inhibition de la croissance tumorale dans des modèles xénogreffes de cancers du sein, cervicaux et de prostate³²⁴. Le rigosertib cible également les voies **PI3K/AKT**³²⁵ et **RAS**³²⁶, ce qui le rend moins spécifique de PLK1. Il se lie à la tubuline et induit la déstabilisation des microtubules ce qui entraîne l'arrêt du cycle cellulaire³²⁷. Le rigosertib est testé en phase III chez des patients atteints de syndromes myélodysplasiques à très haut risque mais n'a pas amélioré leur survie comparé au traitement standard³²⁸. La combinaison du rigosertib avec la **gemcitabine** en phase II/III, chez les patients atteints d'un cancer du pancréas métastatique n'a pas amélioré la réponse au traitement, par rapport à la gemcitabine seule³²⁹. Une étude clinique de phase I a été développée dans les cancers solides comprenant deux patients atteints de **cancers des VADS** qui ont partiellement ou totalement répondu au traitement³³⁰. Dans les cancers des VADS, le rigosertib induit la mort des cellules cancéreuses via l'inhibition de la voie de signalisation PI3K/AKT/mTOR et montre une réduction de la croissance tumorale dans des modèles de tumeurs expérimentales chez la souris^{325,331}.

Inhibiteurs	Type	Cibles (Ki/IC50)	Phase essai clinique	Cancers ciblés
BI2536	ATP compétitif	PLK1 : 0,8nmol/L PLK2 : 3,5nmol/L PLK3 : 9nmol/L BRD4 : 37nmol/L	I/II (terminé)	Tumeurs solides/hématologiques
Volasertib (BI6727)		PLK1 : 0,87nmol/L PLK2 : 5nmol/L PLK3 : 56nmol/L	III (terminé)	Leucémie aigüe myéloïde
Onvansertib (NMS-P937)		PLK1 : 2nmol/L PLK2 > 10µmol/L PLK3 > 10µmol/L	II (en cours) I (terminé)	<ul style="list-style-type: none"> - Cancer colorectal KRAS-muté - Cancer de la prostate métastatique - Cancer du pancréas métastatique - Cancers solides métastatiques
TAK-960		PLK1 : 0,8nmol/L PLK2 : 16,9nmol/L PLK3 : 50,2nmol/L	I (terminé)	Cancers non-hématologiques avancés
GSK461364		PLK1 : 2,2nmol/L PLK2 > 1µmol/L PLK3 > 1µmol/L	I (terminé)	<ul style="list-style-type: none"> - Cancers solides métastatiques - Lymphome non-Hodgkinien
Rigosertib (ON0910)		Non-ATP compétitif	PLK1 : 9nmol/L PLK2 : 260nmol/L PDGFR : 18nmol/L BCR-Abl : 32nmol/L FLT1 : 42nmol/L SRC : 155nmol/L FYN : 182nmol/L Cdk1 : 260nmol/L	III (terminé) I (terminé)

Tableau 4 : Inhibiteurs de PLK1 en essais cliniques

Les combinaisons d'inhibiteurs de PLK1 avec des chimiothérapies conventionnelles a montré des effets synergiques. Elles sont donc beaucoup plus efficaces que la monothérapie. Afin de maximiser cet effet synergique, une compréhension de la régulation de PLK1 et de son interaction avec d'autres voies de signalisation est nécessaire.

Ma thèse fait également l'objet de l'étude de deux récepteurs AXL et c-MET, dont la surexpression favorise le mauvais pronostic et la résistance dans les cancers des VADS.

III. AXL/C-MET

1. Structures et fonctions

Les tyrosines kinases (TKs) se divisent en deux groupes : les récepteurs (RTKs) et les protéines cytoplasmiques. **AXL et c-MET font parties des récepteurs tyrosine kinases.** Les RTKs sont des protéines transmembranaires et sont activées par des ligands fixés à leur domaine extracellulaire. Suite à la liaison de protéines stimulatrices, les RTK se dimérisent ce qui conduit à leur transphosphorylation et à l'activation de leur domaine kinase.

Les TKs sont des médiateurs essentiels du mécanisme de transduction du signal et jouent un rôle important dans la **différenciation cellulaire**, la **migration**, la **prolifération**, **l'apoptose** et le **métabolisme**. Plusieurs d'entre elles sont oncoprotéines.

Les TKs sont une classe d'enzymes qui catalysent la phosphorylation de résidus tyrosine sur leurs protéines cibles à l'aide d'ATP. Cette modification post-traductionnelle permet l'homéostasie cellulaire. La dérégulation des TKs ainsi que la modification de leurs cascades de signalisation conduisent à une transformation maligne via de multiples processus cellulaires³³².

a. Structure et fonctions biologiques de la famille TAM (TYRO3, AXL, MER)

- **Structure**

Le gène AXL, situé sur le chromosome 19q13.2, a été identifié pour la première fois chez des patients atteints de **leucémie myéloïde chronique (LMC)**³³³. Le mot AXL, vient du grec « anelecto » signifiant « incontrôlé ».

La protéine AXL (aussi connue sous le nom UFO) est un **récepteur tyrosine kinase** appartenant à la famille **TAM**.

La famille TAM se compose des **récepteurs TYRO3, AXL et MER**. Le « **Growth Arrest Specific 6** » (**GAS6**) et la **protéine S (PROS1)** sont les deux ligands conventionnels des membres de la famille TAM. **GAS6** se lie à chacun des membres de la famille TAM, avec une meilleure affinité pour **AXL et TYRO3**. **PROS1** est un ligand de **MER** et

TYRO3, mais se lie à AXL dans les cellules de glioblastome ou de carcinomes des VADS³³⁴⁻³³⁶.

La structure extracellulaire des membres de la famille TAM, se compose de deux domaines de type **immunoglobuline (Ig)** et de deux domaines de type **fibronectine III (Fro III)**. Les motifs Ig et Fro III induisent sa liaison avec GAS6. Le domaine **kinase** intracellulaire est essentiel pour l'autophosphorylation et l'activité des kinases. La séquence **KW(I/L)A(I/L)ES** du domaine kinase est spécifique de la famille TAM et partage une homologie avec les RTK liées à AXL (**Figure 19**).

La dimérisation ligand-dépendante des récepteurs TAM entraîne une transphosphorylation des résidus tyrosine du domaine intracytoplasmique. Pour AXL, la transphosphorylation se fait sur les résidus **Tyrosine 779, 821 et 866**, supportant les interactions avec PLC γ , PI3K et GRB2.

Les membres de la famille TAM sont exprimés dans les **cellules dendritiques**, les **macrophages**, les **plaquettes**, les **cellules endothéliales**, les **tissus nerveux** (l'hippocampe et le cervelet), les **tissus reproducteurs** (cellules de Sertoli et Leydig), le **cœur**, la **rétine**, le **rein**, le **poumon**, le **foie**, le **muscle squelettique** et les **ostéoclastes**³³⁷.

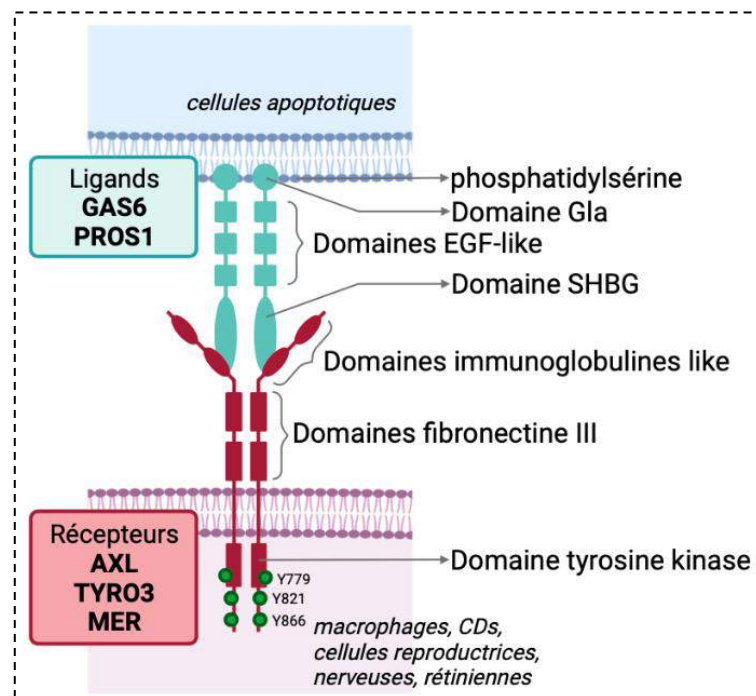


Figure 19 : Les récepteurs de la famille TAM (AXL, TYRO3, MER) et leur ligands (GAS6 et PROS1)

- Fonctions biologiques

- *Inflammation*

Les récepteurs TAM et leurs ligands sont des régulateurs négatifs essentiels du système immunitaire inné et adaptatif. Ils sont présents sur les cellules présentatrices d'antigènes (CPA) telles que les cellules dendritiques (CDs) et les macrophages. Ils agissent spécifiquement sur le système immunitaire inné pour inhiber la présentation d'antigènes et la production de cytokines^{338,339}. Le traitement au LPS (inducteur de l'inflammation) de cellules isolées de souris MER (-/-) entraîne une sécrétion plus importante du $TNF\alpha$ ³⁴⁰. Les souris KO pour AXL, TYRO3 et MER (TAM KO) ne présentent pas d'anomalies développementales à la naissance. Elles développent ensuite une inflammation chronique, une auto-immunité systémique, des hémorragies et des lésions cutanées³⁴¹, dues à une hyperprolifération des lymphocytes B et T et à une hypersécrétion des cytokines pro-inflammatoires $IFN-\gamma$ et $d'IL-12$.

AXL et MER freinent également la réponse immunitaire induite par la microglie, en inhibant les récepteurs d'antigènes (TLR « Toll-Like Receptors ») présents sur les cellules immunitaires de la microglie. Ce mécanisme est nécessaire pour limiter l'inflammation à l'origine de plusieurs maladies neuro-dégénératives (Alzheimer et sclérose en plaque)³⁴².

L'activation de la réponse immunitaire innée par les agents pathogènes, stimule l'expression et active le récepteur de l'interféron de type I (IFN de type I, IFNAR) et la voie de signalisation JAK/STAT. L'activation de cette voie de signalisation stimule la production de cytokines pro-inflammatoires, et la transcription d'AXL³⁴³. Lors de l'activation de la réponse adaptative, les récepteurs TAM associés à l'IFNAR, entraînent la transcription de SOCS1 et SOCS3, les suppresseurs des voies de signalisation de cytokines. SOCS1 et SOCS3 inhibent les récepteurs Toll-Like 3, 4 et 9, présents sur les cellules immunitaires afin d'inhiber la réponse immunitaire^{344,345}.

L'induction de SOCS1 est réduite chez les souris TAM KO. De plus, les souris SOCS1 (-/-) sécrètent davantage de cytokines pro-inflammatoires $IFN-\gamma$, $TNF-\alpha$, $IL-12$ par rapport aux souris sauvages³⁴⁶. Les récepteurs TAM protègent donc l'organisme de maladies auto-immunes en freinant la réponse immunitaire et l'inflammation.

- *Phagocytose des cellules apoptotiques*

La mort cellulaire par apoptose est nécessaire dans de nombreux processus biologiques tels que le développement des tissus, l'homéostasie, la maturation des lymphocytes et les réponses pathologiques à l'inflammation. La **phagocytose** élimine les cellules apoptotiques et les débris cellulaires pour éviter la nécrose tissulaire et la libération de composés intracellulaires qui conduisent à l'inflammation. **Les macrophages et les CD sont responsables de la phagocytose dépendante des récepteurs TAM des cellules apoptotiques.** L'inhibition des récepteurs TAM conduit à une polyarthrite rhumatoïde et un lupus^{347,348}. Les souris KO pour MER, AXL ou TYRO3, montrent des défauts de phagocytoses des cellules apoptotiques par les macrophages et les CD^{349,350}. Les récepteurs TAM fonctionnent comme des ponts entre les cellules phagocytaires et les cellules apoptotiques. Le récepteur TAM est situé sur le phagocyte (macrophage, CD...) et son ligand TAM est lié à la membrane de la cellule apoptotique via des phosphatidylsérines^{351,352}. En plus de leurs rôles de la phagocytose dans la réponse immunitaire, **les récepteurs TAM induisent aussi la clairance des cellules apoptotiques et des fragments cellulaires** notamment les cellules reproductrices³⁵³, les cellules de la rétine³⁵⁴, et les astrocytes pour le remodelage synaptique ou les cellules de Schwann après une lésion nerveuse^{355,356}.

Dans de nombreuses cellules, l'activation de la voie TAM est couplée à l'activation en aval de la voie **PI3K/AKT**. Les récepteurs TAM activent GRB2 par autophosphorylation. Ils recrutent directement ou via GRB2, PI3K. La voie PI3K/AKT permet la phagocytose.

- *Intégrité vasculaire*

Les récepteurs TAM participent à l'homéostasie vasculaire. Lorsqu'un vaisseau est lésé, les plaquettes s'agrègent et initient l'homostasie (coagulation sanguine) pour refermer le vaisseau. Les souris TAM KO présentent des défauts d'agrégation plaquettaire³⁵⁷.

La signalisation TAM RTK favorise la stabilisation des agrégats plaquettaires en cas de lésion vasculaire. Les plaquettes activées exposent des phosphatidylsérines (**PtdSer**) et expriment les récepteurs TAM à leur surface. L'activation de ces récepteurs stimule la voie PI3K/AKT/ β 3-intégrine et potentialise l'agrégation plaquettaire et la rétraction des lésions³⁵⁸. La voie de signalisation TAM fonctionne également dans les cellules musculaires lisses endothéliales et vasculaires pour favoriser la cicatrisation des plaies du système vasculaire endommagé.

AXL favorise la formation de nouveaux vaisseaux appelée **angiogenèse**. Les souris AXL KO montrent des vaisseaux plus perméables³⁵⁹. Ce récepteur favorise la prolifération, la migration et l'organisation des cellules endothéliales via le VEGFA (« Vascular Endothelial Growth Factor A »)^{360,361}.

b. Structure et fonctions biologiques de la famille HGFR (c-MET)

- **Structure**

Le récepteur c-MET a été identifié comme oncogène pour la première fois dans des cellules d'ostéosarcome. Le gène *c-MET* présent sur le chromosome 7 (7q31.2), fusionné avec le gène TPR (« Translocated Promoter Region ») présent sur le chromosome 1, conduit à l'activation du domaine kinase de c-MET³⁶².

Le récepteur transmembranaire c-MET, est composé d'une partie extracellulaire caractérisée par les domaines **Immunoglobuline-Like-Région**, ainsi que de **deux domaines SEMA (Sémaphorine α et β)**. Sa partie intracellulaire se compose d'un **domaine tyrosine kinase**.

La protéine c-MET est produite sous forme immature **pro-c-MET**. La **furine**, une sérine protéase clive le domaine SEMA **au niveau de** la séquence R-X-(R/K)-R//S en deux domaines α et β . Ce clivage génère **le récepteur actif c-MET**^{363,364}.

Son ligand **HGF** (« Hepatocytes Growth Factor ») a été identifié pour la première fois dans les plaquettes et dans le plasma de rats partiellement hépatectomisés³⁶⁵. Comme son récepteur, HGF subit une **modification post-traductionnelle**. La forme **pro-HGF** inactive est sécrétée par les cellules **endothéliales**, les **macrophages** et les **fibroblastes**, et s'accumulent dans la matrice extracellulaire. Cette forme est convertie en un hétérodimère actif par une protéase qui clive la forme immature au niveau d'un site localisé entre l'Arginine 494 et la Valine 495³⁶⁶. L'HGF comprend six domaines séparés sur 2 chaînes : la **sous-unité α** , composée du domaine N-terminal (N) suivi de quatre domaines **kringle** (K1-K4) ; la **sous-unité β** composée uniquement d'un domaine **homologue aux sérines protéases (SPH)**. L'HGF se lie à au domaine SEMA β de c-MET par ses domaines N-K1 et SPH (**Figure 20**).

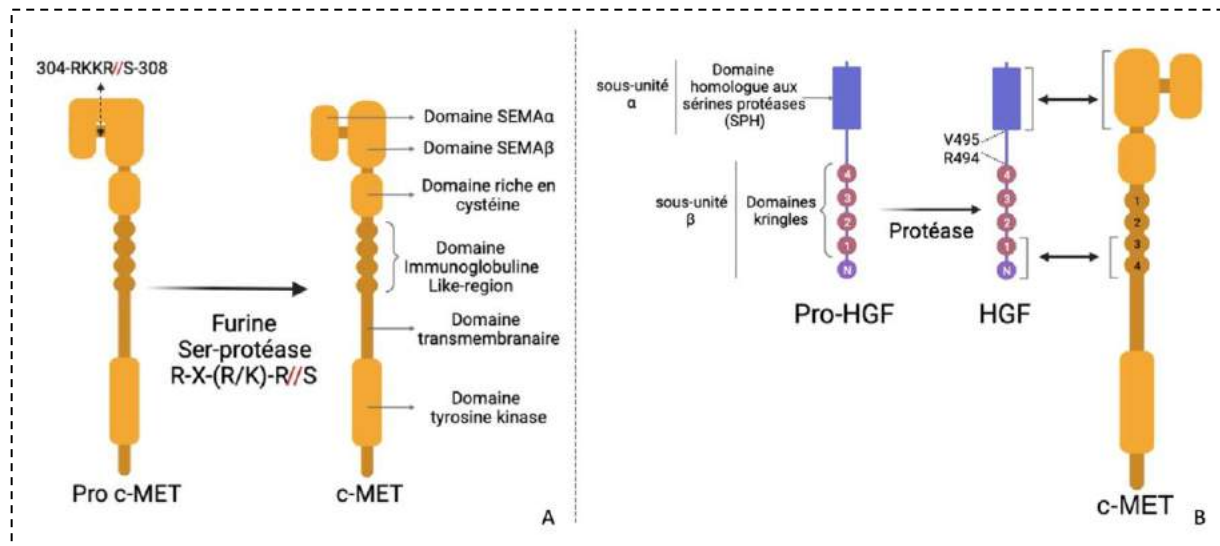


Figure 20 : Le récepteur c-MET et son ligand HGF

(A) Le récepteur Pro c-MET devient mature par l'action de la furine qui divise le domaine SEMA en deux domaines α et β . (B) Le récepteur Pro-HGF devient mature par l'action d'une protéase qui clive le domaine situé entre la Valine 495 et l'Arginine 494.

La liaison de HGF et de c-MET induit son **homo-dimérisation** qui favorise deux séries d'autophosphorylation sur les **Tyrosines 1234** et **1235**³⁶⁷ puis les **Tyrosines 1349** et **1356**³⁶⁸. c-MET est alors activé et recrute ses effecteurs (Figure 21).

Le récepteur est régulé par la protéine kinase C (PKC) qui le phosphoryle sur la **Sérine 985**³⁶⁹. Sa dégradation lysosomale, s'effectue post ubiquitination par l'ubiquitine ligase E3 c-Cbl qui le phosphoryle sur la **Tyrosine 1003**³⁷⁰.

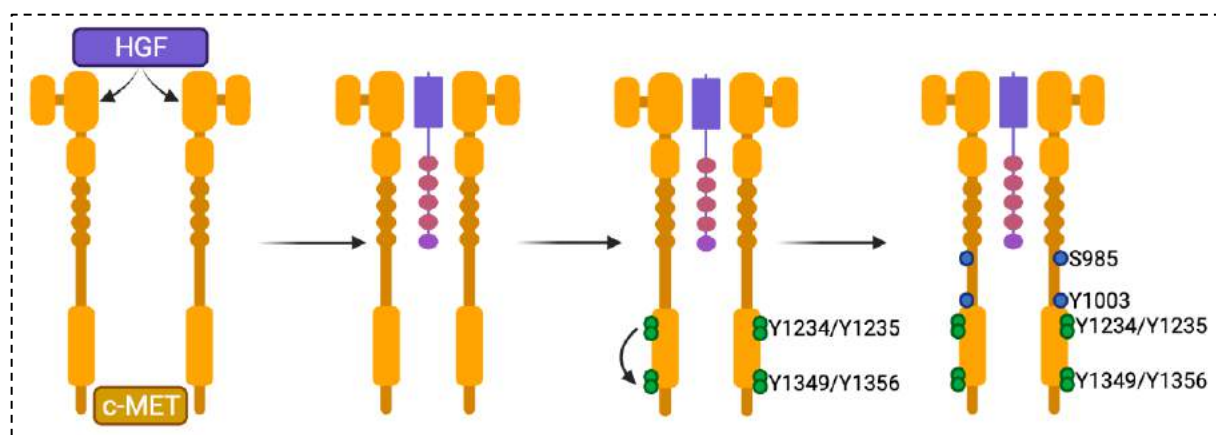


Figure 21 : Étapes d'activation du récepteur c-MET.

L'HGF permet la dimérisation du récepteur et la trans-autophosphorylation des monomères c-Met au niveau des tyrosines intracellulaires Y1234/1235 pour son activation et Y1349/1356 pour induire les voies de signalisation du récepteur. La régulation négative du récepteur s'effectue par phosphorylation de la serine S985 et de la tyrosine Y1003 conduisant à sa dégradation.

- Fonctions biologiques

- Principales voies de signalisation impliquées

Le couple HGF/c-MET contrôle différentes voies de signalisation impliquées dans la **prolifération, la migration cellulaire, la survie et la morphogénèse**.

Les Tyrosines **1349** et **1356** phosphorylées sont spécifiquement reconnues par des protéines adaptatrices : la protéine **GAB1** associée à **GRB2** et **PI3K**. Elles sont à l'origine de l'activation des voies de signalisation post stimulation du récepteur. GAB1 se fixe sur la Tyrosine 1349 ou bien, de manière indirecte sur la Tyrosine 1356 via GRB2³⁷¹. Elle représente une protéine adaptatrice pour les protéines **PLC γ , SHP2, STAT3, SHC** et **FAK**.

Chacun des partenaires servira à l'initiation d'une voie de signalisation particulière principalement impliquée dans la prolifération cellulaire.

La **prolifération cellulaire** dépend des voies STAT3³⁷², PI3K/AKT et RAS/MAPK³⁷³.

Les **capacités migratoires** des cellules dépendent des protéines SRC et FAK³⁷⁴.

L'activation de la voie PI3K/AKT stimule la **survie cellulaire et inhibe l'apoptose** en induisant l'expression des protéines anti-apoptotiques Bcl-XL et Mcl-1³⁷⁵. Parallèlement, cette voie active MDM2 permettant l'inhibition de p53 via mTOR durant le **développement**³⁷⁶.

Les différentes voies de signalisation associées, expliquent les activités multifonctionnelles du couple HGF/c-MET.

- *Organogenèse*

Le récepteur c-MET est impliqué dans le développement embryonnaire de nombreux organes. Des souris invalidées pour les gènes c-MET ou HGF, présentent des anomalies importantes du développement des **muscles squelettiques**, du **placenta** et du **foie**³⁷⁷⁻³⁷⁹. Ces invalidations sont donc létales au bout de 15 jours du stade embryonnaire. L'invalidation de c-MET dans les **cellules pulmonaires** ou **rénales** inhibe le développement alvéolaire et montre des anomalies développementales du néphrons^{380,381}. c-MET est également impliqué dans la **croissance axonale** et la survie des **neurones sensoriels**. Une mutation inactivatrice du récepteur c-MET est responsable du retard d'apprentissage ou de troubles neurologiques tels que l'autisme^{382,383}.

- *Régénération et homéostasie tissulaire*

A l'âge adulte, le récepteur c-MET est principalement exprimé par les **cellules épithéliales**, **endothéliales**, **neuronales** et les **lymphocytes B**. L'HGF est produit par les **cellules mésenchymateuses**.

Le couple HGF/c-MET est principalement impliqué dans la **régénération** et **l'homéostasie tissulaire**.

L'inhibition conditionnelle de c-MET dans l'épiderme murin réduit la régénération du tissu épidermique et la cicatrisation³⁸⁴. Le ligand HGF est également sécrété à la suite d'une lésion rénale (fibrose rénale)³⁸⁵, pulmonaire³⁸⁶, du foie³⁸⁷ ou de la moelle épinière³⁸⁸. L'administration d'HGF améliore la réparation tissulaire de tous ces organes alors que son inhibition accentue ces lésions.

La famille **MET** est plus étroitement liée à la famille **TAM** sur la base de la séquence d'acides aminés du domaine kinase³⁸⁹. **Les récepteurs c-MET et TAM activent des voies de signalisation communes résultant en des fonctions similaires des deux familles RTK**³⁹⁰. Ainsi, le domaine extracellulaire et le domaine kinase intracellulaire sont des déterminants importants des processus cellulaires régulés par des RTK spécifiques.

2. Implication d'AXL et c-MET dans le cancer

a. Dérégulation d'AXL et c-MET

- Dérégulation d'AXL

AXL est contrôlé par des **mécanismes épigénétiques**, des modifications **transcriptionnelles, traductionnelles** et **post-traductionnelles** (Figure 22).

Le gène AXL fait l'objet de **modifications épigénétiques**, dont l'acétylation et la méthylation des histones et de l'ADN. Ces processus dépendent d'ADN méthyltransférases (DNMT) et d'histones déacétylases (HAT ou HDAC). La méthyltransférase 3 (METTL3) du complexe **m6A méthyltransférase** induit l'expression d'AXL et l'EMT, et favorise l'initiation et la progression du cancer de l'ovaire³⁹¹.

AXL est régulé de manière transcriptionnelle par « YES-associated proteon1 » (YAP1), myeloid zinc finger 1 (MZF1), activator protein 1 (AP1), Sp1/Sp3, HIF1 α et c-JUN.

Les facteurs de transcription YAP1³⁹² et MZF1³⁹³ stimulent la transcription d'AXL et initient l'EMT dans le cancer de l'utérus et colorectal. Le facteur de transcription **AP-1** induit la surexpression d'AXL dans lignées résistantes aux inhibiteurs de PI3K/AKT dans les cancers des VADS³⁹⁴. Sp1 et Sp3 peuvent se lier aux régions riches en guanines et cytosines et surexprimer AXL³⁹⁵. EGFR et MEK/ERK activent c-JUN et induisent la surexpression d'AXL dans les cancers du poumon non à petites cellules et des VADS³⁹⁶.

Les **formes mutées de p53** (R175H, R273H, et D281G) dans le cancer du poumon stimulent la surexpression d'AXL³⁹⁷.

Les **micro-ARNs 7 et 34a** régulent de manière **post-transcriptionnelle** AXL. Leur inhibition induit la surexpression d'AXL dans les cancers de la prostate³⁹⁸.

La surexpression d'AXL peut conduire à son homo-dimérisation et à son activation dans les cellules NIH3T3 de fibroblastes embryonnaires murins, de manière indépendante de son ligand GAS6³⁹⁹. **AXL est également activé par hétéro-dimérisation avec d'autres récepteurs à activité tyrosine kinase tels que c-MET, PDGFR, HER2/HER3 et EGFR.** Elle active notamment la métalloprotéase MMP9, pour induire l'invasion cellulaire⁴⁰⁰.

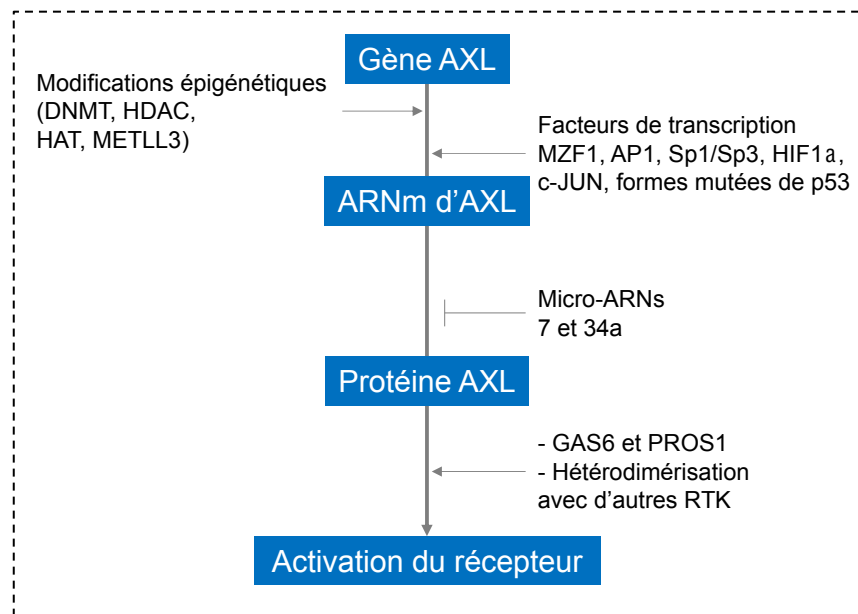


Figure 22 : Régulation du récepteur AXL

L'expression d'AXL dépend de mécanismes épigénétiques (DNMT, HDAC...), des modifications transcriptionnelles (facteurs de transcription), traductionnelles (micro-ARNs) et post-traductionnelles (ligand, RTKs...).

- **Dérégulation de c-MET**

Comme AXL, c-MET peut-être contrôlé par des **mécanismes génétiques et épigénétiques**, des modifications **transcriptionnelles, traductionnelles et post-traductionnelles**.

Les quatre principaux événements génomiques de c-MET sont les **mutations faux-sens**, les **mutations d'épissage**, les **amplifications** et les **réarrangements génétiques**. Les mutations introniques somatiques de c-MET entraînent le saut de l'exon 14 lors de la transcription de son gène dans le cancer du poumon non à petites cellules⁴⁰¹, l'adénocarcinome pulmonaire, le gliome, les cancers du pancréas, gastriques, du rein et du sein⁴⁰². L'amplification du gène *c-MET* est également à l'origine de sa surexpression dans plusieurs cancers tels que le médulloblastome⁴⁰³. La modification génétique la moins courante de c-MET inclut son réarrangement avec le gène TPR dans le cancer gastrique⁴⁰⁴.

Certaines aberrations de c-MET, comme le polymorphisme c-MET^{N375S}, augmentent l'agressivité cancéreuse des carcinomes pulmonaires et des VADS⁴⁰⁵.

c-MET fait également l'objet de régulations épigénétiques. L'histone méthyltransférase **SMYD3** se lie au promoteur de c-MET, augmente son expression et induit la migration et l'invasion des cellules tumorales⁴⁰⁶.

Comme AXL, la transcription de *c-MET* est stimulée par les facteurs de transcription **Sp1**⁴⁰⁷, **AP1**⁴⁰⁸ et **HIF-1 α** ⁴⁰⁹. Le facteur de transcription **ETS1**, surexprimé dans les cellules cancéreuses murines mammaires, contribue à la surexpression de c-MET et à l'invasion tumorale⁴¹⁰. De plus, la surexpression de **PAX8** est corrélée à celle de c-MET. Son inhibition réduit l'expression de c-MET dans le cancer du poumon⁴¹¹. **P53** inhibe le facteur de transcription Sp1 dans les cellules cancéreuses d'ovaire⁴¹² et active aussi le miARN-34 afin d'inhiber l'expression de c-MET dans le cancer de la prostate⁴¹³. L'inhibition de p53 dans la majorité des cancers, entraîne la surexpression de c-MET via ces mécanismes.

En termes de régulation post-transcriptionnelle, c-MET est réprimé par des micro-ARNs. L'inhibition du **micro-ARN 1** induit la surexpression de c-MET dans le cancer du poumon et du colon^{414,415}. Le **micro-ARN-139-5p** est également un suppresseur de tumeur et fréquemment inhibé dans le cancer du poumon⁴¹⁶. L'expression de c-MET peut être inhibée par plus de **30 miARNs**⁴¹⁷.

L'activation de SRC induit la phosphorylation de c-MET sur les tyrosines 1230, 1234 et 1235. La mutation ou l'inhibition pharmacologique de SRC abolit la phosphorylation constitutive de c-MET dans le cancer du sein. Cette phosphorylation dépend d'une autre kinase **FAK**⁴¹⁸. La voie de signalisation de c-MET est également régulée par l'**EGFR** par transactivation dans le cancer gastrique⁴¹⁹.

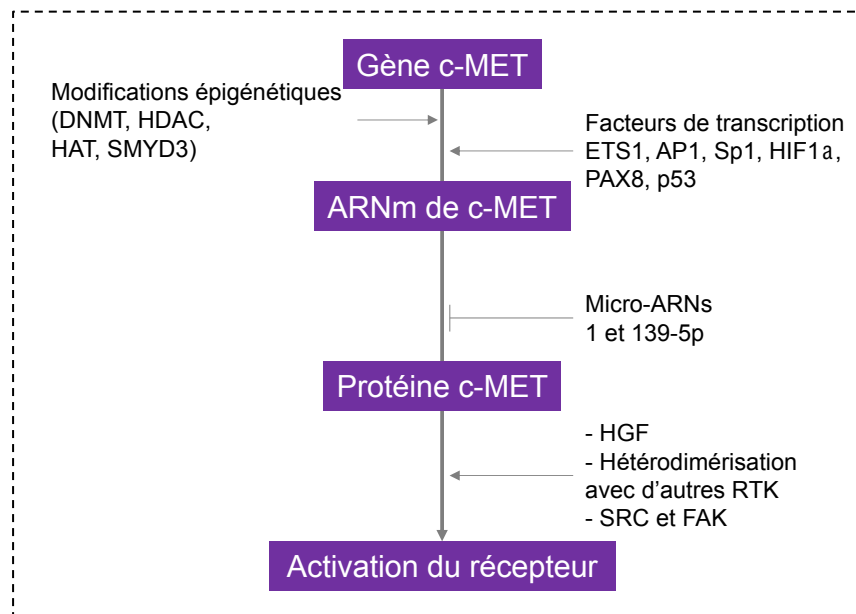


Figure 23 : Régulation du récepteur c-MET

L'expression de c-MET dépend de mécanismes épigénétiques (DNMT, HDAC...), des modifications transcriptionnelles (facteurs de transcription), traductionnelles (micro-ARNs) et post-traductionnelles (ligand, RTKs...).

b. AXL et c-MET facteurs d'agressivité

La dérégulation d'AXL et c-MET par des mécanismes communs entraîne une aberration des voies de signalisation contrôlant la **prolifération**, la **migration**, l'**invasion**, l'**angiogenèse** et l'**échappement immunitaire** (Figures 24 et 25).

- **Prolifération cellulaire**

La surexpression d'AXL et de c-MET induit l'activation des voies de signalisation impliquées dans la prolifération cellulaire. AXL active notamment les voies **PI3K/AKT/mTOR**, **NF- κ B**, **RAC/JNK**, **RAS/RAF/MEK/ERK** (Voie de signalisation MAPK) et **JAK/STAT** (via le récepteur **IL-6**). Ces voies de signalisation sont activées dans les cancers du poumon non à petites cellules⁴²⁰, de la prostate^{421,422} et les leucémies aiguës myéloïdes⁴²³. L'inhibition d'AXL inactive ces voies de signalisation et induit l'apoptose des cellules tumorales.

c-MET active la voie de signalisation **RAS/MAPK** et les facteurs de transcription **c-MYC** et **c-JUN** pour stimuler le cycle cellulaire⁴²⁴, la voie **PI3K/AKT** et l'expression de **NF- κ B**⁴²⁵, **Bcl-2**⁴²⁶ et **mTOR**⁴²⁷. L'activation de ces voies de signalisation induit la survie et la prolifération cellulaire.

- **Invasion et migration cellulaire**

La surexpression d'AXL et de c-MET est également responsable d'une invasion et d'une migration cellulaire. L'inhibition d'AXL réduit fortement la migration et l'invasion cellulaire dans plusieurs cancers solides. AXL active de la voie de signalisation **PI3K/RAC/P38/MAPKAP-Kinase2/HSP25** et favorise le remodelage de l'actine et la migration des cellules neuronales⁴²⁸. L'activation d'AXL stimule l'expression de **p-AKT** et **MMP9** via l'activation de **NF-κB** et **Brg-1** dans les cancers ovariens⁴²⁹. **YAP1**, un effecteur de la migration, induit AXL et la formation de métastases dans le carcinome pulmonaire⁴³⁰. AXL contribue à la migration et à l'invasion des cellules souches du cancer du sein⁴³¹. Son inhibition réduit les marqueurs d'EMT (**Slug**, **Snail** et **Twist**) et donc l'invasion et la migration des cellules de carcinomes oraux⁴³².

La surexpression de c-MET active la voie **Wnt** et stabilise la **β-caténine** qui favorise ensuite la transcription de marqueurs métastatiques tels que les **MMP-2** et **MMP-9** dans le glioblastome⁴³³.

La voie c-MET active la cascade de signalisation **PI3K/RAC1/p38/MMPs** des cellules souches du foie et leur motilité⁴³⁴. Elle induit la voie de signalisation **ERK/NF-κB** qui entraîne la transcription de **YAP1** et la formation de métastases dans le carcinome hépatocellulaire⁴³⁵.

En interagissant avec HGF, c-MET favorise la phosphorylation d'AXL pour activer la migration et l'invasion cellulaire dépendantes de **RAC1**⁴³⁶. AXL interagit avec GAS6 pour phosphoryler **SRC** afin d'activer c-MET et de maximiser l'invasion cellulaire⁴³⁷.

- **Angiogenèse**

AXL et c-MET favorisent l'angiogenèse. La surexpression d'AXL induit l'activation d'un membre de la voie Wnt, **DKK3** et induit la formation de vaisseaux sanguins dans le mélanome. AXL inhibe l'angiopoïétine 2 (**Ang2**) induisant l'interaction entre les protéines **Ang1** et **Tie2**, et la survie des cellules endothéliales. Le KO d'AXL dans les cellules endothéliales altère la formation de tubes mimant l'angiogenèse⁴³⁸.

c-MET active **STAT3** et **HIF-1α** via les voies de signalisation **PI3K/AKT** et **MAPK**. **HIF-1α** et **STAT3** se fixent au promoteur de **VEGFA** et induisent son expression dans les cellules de carcinome de colon⁴³⁹.

L'hypoxie (HIF-1 α) induite par les cellules cancéreuses, active transcriptionnellement c-MET qui favorise l'angiogénèse via le **VEGF-A**⁴⁴⁰. c-MET induit également l'angiogénèse en inhibant la thrombospondine-1 (**TSP-1**), un régulateur négatif de l'angiogénèse⁴⁴¹.

- **Echappement immunitaire**

AXL inhibe l'activité des cellules dendritiques (**CDs**) et exclut les lymphocytes T (**LTs**) de la tumeur. Dans les modèles murins de cancers, AXL inhibe l'expression du CMH de classe I (**CMH I**) et réduit les niveaux de cytokines pro-inflammatoires sécrétées et infiltrées dans les cellules immunitaires. En inhibant AXL par la méthode CRISPR, l'expression du CMH I augmente et la signalisation des cytokines immunosuppressives diminue, ce qui entraîne l'augmentation des CDs et des LTs. La **radiothérapie** et l'**immunothérapie** (anti-PD-1/anti-CTLA-4) augmentent la réponse immunitaire antitumorale avec une diminution des macrophages **M2** antitumoraux, une augmentation des cellules présentatrices d'antigène et un plus grand recrutement de **LTs CD4+/ CD8+**⁴⁴². L'inhibition d'AXL resensibilise donc les cellules tumorales à la radiothérapie et à l'immunothérapie⁴⁴³. Chez les patients atteints de mélanome métastatique, des niveaux élevés d'ARN messager AXL sont associés à une **résistance au traitement anti-PD-1**⁴⁴⁴.

Les cancers du poumon non à petites cellules résistants aux inhibiteurs d'EGFR montrent une surexpression d'HGF et une amplification de c-MET corrélées à une surexpression de PD-L1. HGF/c-MET induisent les voies de signalisation PI3K/AKT et MAPK qui activent le facteur de transcription AP-1, responsable de la surexpression de PD-L1 et de l'invasion immunitaire⁴⁴⁵. La signalisation HGF/c-MET a également induit une surexpression de PD-L1 dans le cancer du rein⁴⁴⁶. Dans un modèle murin de carcinome rénal, le cabozantinib, un inhibiteur d'AXL et de c-MET induit l'expression de cytokines liées aux neutrophiles (CCL11 et CXCL12) et de cytokines liées aux cellules T (CCL8 et CX3CL1) dans le microenvironnement tumoral. Il augmente donc significativement à la fois l'infiltration intra-tumorale et la fonction antitumorale des neutrophiles et des LTs⁴⁴⁷.

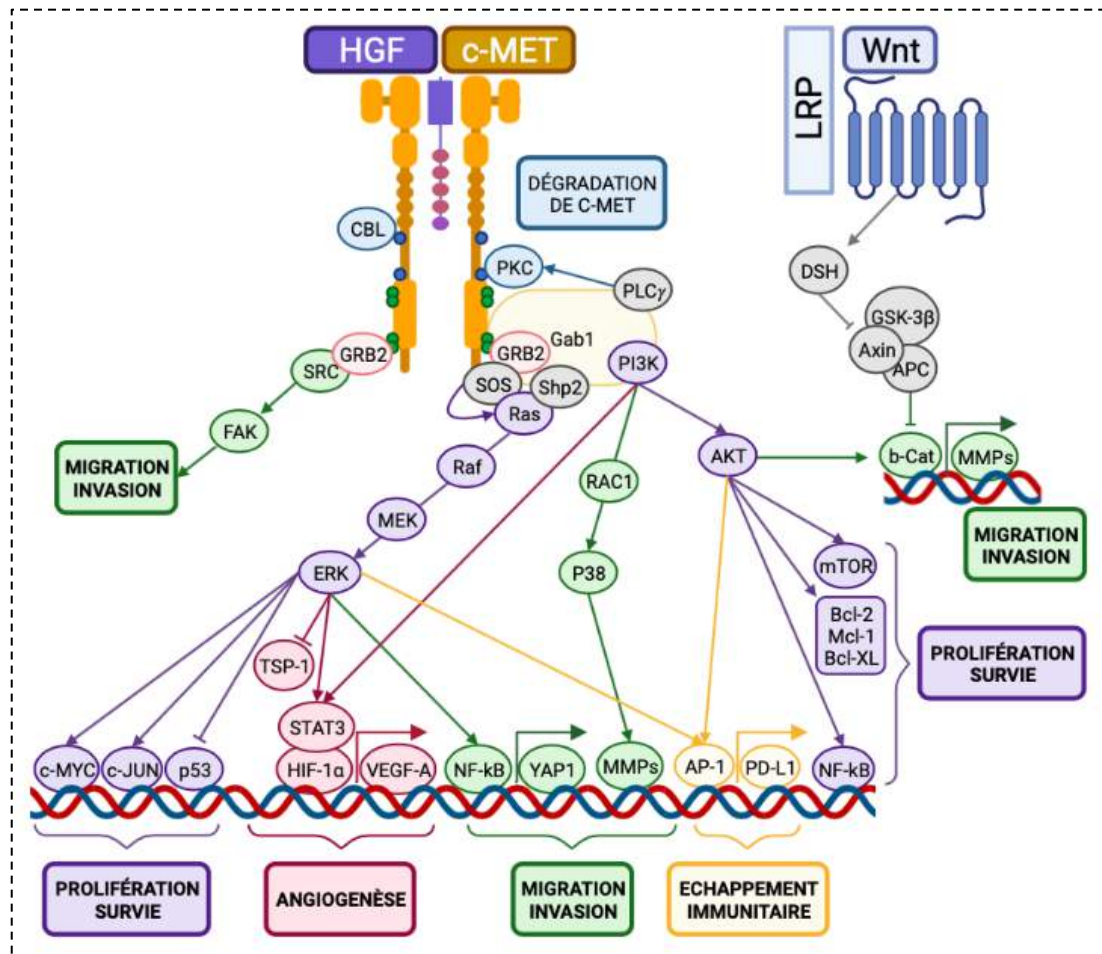


Figure 24 : Voies de signalisation de c-MET

La voie de signalisation de c-MET favorise les processus d'angiogenèse, de migration, d'invasion et de prolifération cellulaire, et d'échappement immunitaire.

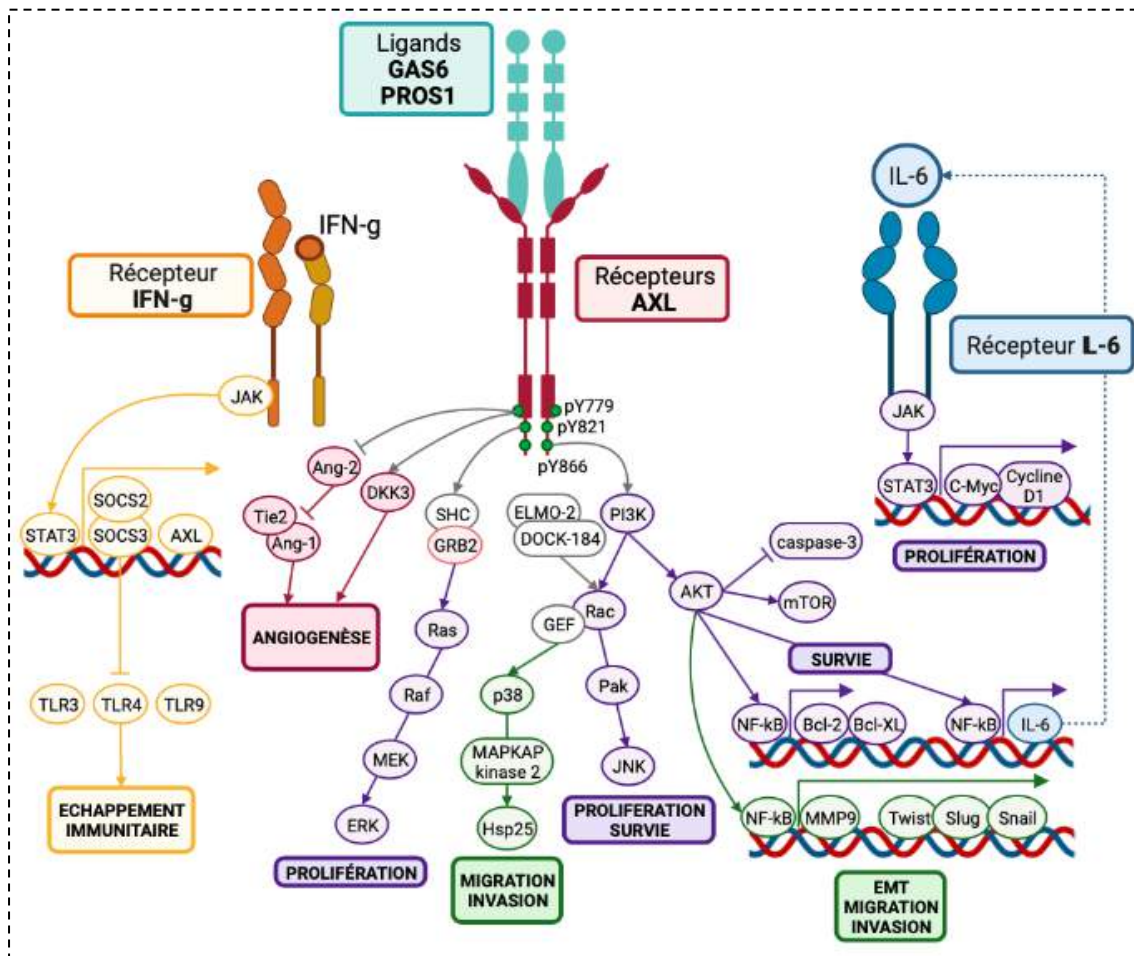


Figure 25 : Voies de signalisation du récepteur AXL

La voie de signalisation d'AXL favorise les processus d'angiogenèse, de migration, d'invasion et de prolifération cellulaire, et d'échappement immunitaire.

c. Activation d'AXL et c-MET dans les carcinomes épidermoïdes des VADS

AXL et c-MET sont surexprimés dans les cancers des VADS et associés à un mauvais pronostic. Selon l'étude de Madoz-Gurpide, 78% des cancers des VADS surexpriment c-MET. Une surexpression de la protéine c-MET est détectée chez 58 % des patients, l'amplification du gène c-MET chez 39 % des patients et l'activation du récepteur c-MET (p-MET) chez 30 % des patients. L'amplification a été associée à une surexpression de c-MET⁴⁴⁸.

L'HGF sécrété par les fibroblastes associés au cancer (CAF) active de manière paracrine c-MET exprimé par les cellules cancéreuses.

Les mutations dans le domaine kinase impliquant les Tyrosines Y1235D et Y1230C sont des activateurs importants de la voie c-MET dans les cancers des VADS^{449,450}. Son activation constitutive augmente le potentiel métastatique des cellules cancéreuses. L'inhibition de c-MET dans un modèle de tumeurs expérimentales chez la souris diminue la formation de métastases⁴⁵¹. **Un gain de copies du gène c-MET est retrouvé dans 16% des cas.**

Dans les cancers des VADS, c-MET active plusieurs voies de signalisation tels que **Wnt/ β -caténine, SRC, TGF- β et EGFR.**

L'inhibition synergique de c-MET et des cellules souches cancéreuses (CSC) réduit la croissance tumorale et la formation de métastases *in vivo*, par l'intermédiaire de la voie Wnt/ β -caténine. **La voie c-MET/Wnt/ β -caténine contribue donc au maintien des CSC des VADS⁴⁵².**

SRC induit la résistance à l'erlotinib (inhibiteur de l'EGFR) dans les cancers des VADS en stimulant le récepteur c-MET indépendamment du ligand HGF⁴⁵³. L'inhibition combinée de c-MET et SRC *in vitro* et *in vivo*, entraîne une cytotoxicité synergique et une diminution de la taille de la tumeur⁴⁵⁴.

Le TGF- β active plusieurs facteurs de transcription ; SMAD2, SMAD3 et SMAD4. Les cancers des VADS montrent une faible expression de **SMAD2** et **SMAD4**. La délétion de SMAD2 dans les kératinocytes (souris SMAD2(-/-)), induit la suractivation d'HGF/c-MET et favorise l'angiogenèse dans les carcinomes épidermoïdes. **Le TGF- β contribue à l'inhibition d'HGF dans les fibroblastes et au potentiel oncogénique des épithéliaux⁴⁵⁵.** De plus, l'activation de c-MET par l'inhibition de SMAD4 induit une résistance au cetuximab⁴⁵⁶.

L'EGFR et c-MET active des voies de signalisation similaires : MAPK (RAS/RAF/MEK/ERK) et PI3K/AKT/mTOR. **En l'absence d'HGF, le TGF- α un ligand d'EGFR active c-MET.** L'inhibition de ces récepteurs par le crizotinib (c-MET) et le gefitinib (EGFR) réduit la prolifération, l'invasion et la migration des cellules cancéreuses des VADS et diminue la progression tumorale *in vivo*⁴⁵⁷.

AXL est fortement exprimé dans des tumeurs primaires de patients VADS. Il est corrélé au grade de la tumeur, à la présence de métastases à distance et à une survie sans rechute plus courte chez les patients.⁴⁵⁸ Il contribue également à la progression du cancer⁴⁵⁹.

Les données du TCGA et de tissus de patients VADS ont montré une corrélation positive entre **AXL** et **YAP**. Cette co-expression élevée est associée à un mauvais pronostic chez ces patients. Le **complexe Hippo** (kinases LATS1 et MOB1) inhibe l'activation de YAP et induit sa dégradation. Cependant l'activation d'AXL par son ligand GAS6 phosphoryle STAT3 qui séquestre LATS1 et inhibe la fonction du complexe Hippo. YAP est transloqué dans le noyau et permet la transcription d'AXL. **AXL et YAP favorisent donc la progression tumorale dans les cancers des VADS**⁴⁶⁰.

La surexpression d'un autre ligand d'AXL, **PROS1**, favorise également la progression des cancers des VADS en induisant la prolifération, la migration cellulaire *in vitro* et la croissance tumorale *in vivo*³³⁶.

Les données de la littérature sur AXL dans les cancers des VADS sont peu nombreuses. Cependant, puisqu'il partage les mêmes voies de signalisation avec le récepteur c-MET, nous pouvons nous attendre à des mécanismes similaires.

AXL et c-MET favorisent la progression et l'agressivité tumorales et sont donc considérés comme cibles thérapeutiques évidentes dans les cancers des VADS.

3. AXL et c-MET comme cibles thérapeutiques

a. AXL et c-MET : acteurs de la résistance aux traitements

Les récepteurs TK contrôlent des voies de signalisation similaires qui contribuent à l'agressivité tumorale. Ils sont donc la cible d'outils thérapeutiques. Cependant, **l'inhibition d'un récepteur TK est compensé par la surexpression des autres récepteurs qui maintiennent l'activation des voies de signalisation en aval.**

Dans les cancers des VADS, l'inhibition de l'EGFR induit la surexpression d'autres récepteurs TK tels que **c-MET, AXL mais aussi HER2/HER3.**

Le cetuximab inhibe la prolifération des cellules cancéreuses en se liant au domaine extracellulaire d'EGFR à la place de son ligand.

L'un des mécanismes de compensation de cette inhibition est la surexpression et l'activation des récepteurs **HER2 et HER3**. En conséquence, les voies PI3K et MAPK sont réactivées et contournent l'inhibition par cetuximab⁴⁶¹.

L'activation de la voie c-MET prédit une **faible réponse au cetuximab** chez les patients atteints d'un cancer des VADS récurrent ou métastatique⁴⁴⁸. La surexpression de c-MET à la suite de l'inhibition de l'EGFR conduit à l'activation de la voie MAPK et à l'inhibition des récepteurs HER2/HER3 dans les cancers des VADS⁴⁶².

Ce mécanisme de compensation a été associé à la résistance aux agents anti-EGFR⁴⁶³.

De même, l'inhibition combinée de c-MET, EGFR et HER2 est plus efficace que l'utilisation des inhibiteurs seuls dans des modèles *in vitro*, xénogreffes et des modèles animaux PDX (« patients-derived xenograft ») de cellules de patients en rechute⁴⁶⁴.

AXL contribue également aux mécanismes de résistance des cancers des VADS au cetuximab. AXL est surexprimée chez les patients résistants au cetuximab.

Dans les cellules cancéreuses des VADS résistantes au cetuximab, une production accrue d'EGF entraîne une association et une transactivation d'AXL et d'EGFR. La voie de signalisation **MAPK et c-JUN** induit la transcription d'AXL. L'amplification du gène et donc la surexpression d'AXL maintient l'activation de la signalisation de l'EGFR. Cette boucle de rétroaction positive entraîne l'activation constitutive d'AXL et d'EGFR et induit la résistance au cetuximab³⁹⁶.

De plus, l'activation d'AXL sur la **Tyrosine 821** par son ligand GAS6, induit l'expression de **c-ABL** ce qui contribue à la résistance au **cetuximab** et à la **radiothérapie**.

L'inhibition de c-ABL sensibilise les cellules cancéreuses résistantes au cetuximab⁴⁶⁵. D'autre part, l'inhibition d'AXL par le R428 resensibilise les cellules cancéreuses et les modèles PDX au **cetuximab** et à la **radiothérapie**⁴⁵⁸.

Les cellules résistantes surexpriment **BRD4**, un facteur de transcription responsable de l'expression d'AXL et de c-MET. L'inhibition de BRD4 réduit l'expression de ces récepteurs et sensibilise les cellules cancéreuses des VADS au cetuximab⁴⁶⁶. De plus, la stratification de patients VADS a permis de mettre en évidence des biomarqueurs impliqués dans la réponse au cetuximab. **AXL, BRD4, Caveoline 1 et Sox2** font parties de ces biomarqueurs. L'expression de la Caveoline 1 et Sox2 est suffisante pour induire la résistance au cetuximab⁴⁶⁷.

L'inhibition de c-MET par l'AMG-102 induit la sensibilisation des cellules cancéreuses à la **radiothérapie**⁴⁶⁸.

La surexpression de c-MET dans les cellules souches de cancers des VADS leur confère une résistance au **cisplatine** et des capacités de migration⁴⁶⁹.

La surexpression d'AXL active **c-ABL** dans le cancer œsophagien et induit la résistance au **cisplatine et au carboplatine**⁴⁷⁰.

La surexpression d'AXL par les facteurs de transcription c-JUN et c-FOS (voie de signalisation JNK) induit la **résistance aux inhibiteurs de PI3K**. Un inhibiteur de JNK resensibilise les cellules cancéreuses des VADS aux inhibiteurs de PI3K⁴⁷¹.

L'inactivation du gène *c-MET* sensibilise les cellules cancéreuses à **l'erlotinib**, un autre inhibiteur d'EGFR⁴⁵³. L'utilisation d'un inhibiteur spécifique d'AXL, le R428, sensibilise les cellules cancéreuses des VADS résistantes à **l'erlotinib**⁴⁷².

b. Inhibiteurs d'AXL et c-MET et essais cliniques.

Plusieurs inhibiteurs ciblant c-MET et/AXL ont été développés (**Tableau 5**).

Le **ficlatuzumab** est un inhibiteur monoclonal qui séquestre HGF et empêche sa liaison au récepteur c-MET. Il inhibe la prolifération, la migration et l'invasion des cellules cancéreuses des VADS. Le ficlaruzimab est actuellement en essai clinique de **phase Ib** en combinaison avec le **cetuximab** chez les patient R/M atteints d'un cancer des VADS (NCT02277197)⁴⁷³.

Le **tivantinib** (ARQ 197) bloque l'autophosphorylation de c-MET. Il inhibe la prolifération cellulaire et induit la mort par apoptose des cellules cancéreuses de

poumons⁴⁷⁴. Testé en phase III dans les carcinomes hépatocellulaires, le tivantinib n'a pas amélioré la survie chez les patients en rechute après traitement au sorafenib, un inhibiteur multi-kinases⁴⁷⁵. Dans un essai randomisé de phase II en cours, le tivantinib associé au cetuximab est comparé au cetuximab seul chez des patients R/M ou atteints d'un carcinome des VADS chirurgicalement non résécable (NCT01696955).

Le **foretinib** est un inhibiteur de classe II ciblant plusieurs récepteurs : c-MET, VEGFR2, RON, KDR, Flt-1. Il inhibe fortement la prolifération des cellules cancéreuses des VADS et présente un effet synergique en combinaison avec l'**erlotinib**⁴⁷⁶. Le foretinib resensibilise les cellules et les modèles xénogreffes murines à la **radiothérapie**^{477,478}. Utilisé en phase II chez les patients R/M atteints d'un cancer des VADS, le foretinib n'a pas montré de réponse partielle ou complète chez ces patients mais a montré une stabilisation de la maladie (NCT00725764)⁴⁷⁹.

Le **golvatinib** (E7050) est un inhibiteur des récepteurs c-MET et VEGFR2. Il diminue la croissance de tumeurs des VADS expérimentales et la densité de vaisseaux sanguins⁴⁸⁰. Il est actuellement utilisé en phase I/II en combinaison avec le **cetuximab**, dans les cancers des VADS résistants aux sels de platine mais les résultats n'ont pas été communiqués (NCT01332266). Le golvatinib a également été comparé au **cisplatine** combiné à la **capecitabine** en phase I mais a montré de sérieux effets secondaires chez certains patients (tachycardie, convulsion, embolie pulmonaire, NCT01355302).

Le **capmatinib** (INC-280) est un inhibiteur de classe Ib de c-MET qui se fixe sur son site ATP. Il induit la mort des cellules tumorales par apoptose et inhibe la croissance tumorale dans des modèles expérimentaux de tumeurs des VADS⁴⁸¹. La phase Ia/II en combinaison avec le **cetuximab** chez les patients en rechute après cetuximab, n'a pas présenté de toxicité mais n'a pas amélioré leur survie.

Le **crizotinib** (PF2341066) est un inhibiteur d'ALK et de c-MET qui inhibe leur domaine d'activation. En combinaison avec le **gefitinib**, il inhibe la prolifération et l'invasion des cellules cancéreuses des VADS. Il diminue la croissance tumorale de modèles xénogreffes. Le crizotinib associé à la **radiothérapie**, n'améliore pas la sensibilité à l'irradiation dans un modèle expérimental chez la souris⁴⁸². Actuellement, le crizotinib n'est pas utilisé en essai clinique dans les cancers des VADS⁴⁵⁷. **En revanche il a été approuvé pour le traitement des cancers du poumon non à petites cellules surexprimant la protéine ALK.**

Le **bemcentinib** (R428), un inhibiteur d'**AXL** a déjà montré sa forte efficacité *in vitro* et *in vivo* sur des modèles PDX. Il inhibe la prolifération, la migration et l'invasion des cellules, et resensibilise ces modèles au **cetuximab** et à la **radiothérapie**⁴⁵⁸. Actuellement, aucun essai clinique n'a été entrepris dans les cancers des VADS.

Le **sitravatinib** (MGCD516) est un inhibiteur à large spectre de plusieurs récepteurs TK : VEGFR, PDGFR, c-KIT, DDR2, EPHA, FLT3, **c-MET**, TYRO3, **AXL** et MER. Il a montré son effet antiprolifératif *in vitro* sur plusieurs lignées de sarcomes, et anti-tumoral dans un modèle xéno greffe. Il est plus efficace que l'imatinib et le crizotinib, *in vitro* et *in vivo*⁴⁸³. Le sitravatinib induit la mort de cellules cancéreuses métastatiques de sein et de rein résistantes aux inhibiteurs anti-angiogéniques, le sunitinib et l'axitinib, ciblant VEGFR. Son utilisation en deuxième ligne pourrait donc améliorer la survie chez ce type de patients⁴⁸⁴. Le sitravatinib cible le microenvironnement tumoral en réduisant la quantité des macrophages M2 immunosupresseurs⁴⁸⁵. Dans une étude clinique de phase II dans le cancer du poumon non à petites cellules, réfractaire aux « immune checkpoints », le sitravatinib restaure la réponse au **nivolumab** (anti-PD-1) avec un profil de toxicité acceptable⁴⁸⁶. Une étude similaire est en cours dans le cancer du rein métastatique (NCT03015740). Le sitravatinib est testé en combinaison avec le **nivolumab**, en phase I dans les cancers des VADS (NCT03575598). Cet inhibiteur a montré son effet antitumoral et une forte réduction du taux de macrophage M2⁴⁸⁷.

Le **cabozantinib** (XL184) est un inhibiteur de c-MET, VEGFR2, AXL, ROS1, TYRO3, MER, c-Kit, TIE-2 et RET. Cet inhibiteur agit via l'inhibition de c-MET, d'AXL et du VEGFR, réduisant la migration, l'invasion des cellules tumorales et la néo-angiogenèse. L'activité spécifique contre le VEGFR inhibe l'angiogenèse dans le tissu tumoral. Le cabozantinib interfère avec l'agressivité tumorale et la progression du cancer^{488,489}. Il est approuvé pour le traitement du **cancer de la thyroïde** et du **carcinome rénal** en 1^{ère} ligne chez les patients à faible risque métastatique ou en 2^{ème} ligne après un traitement anti-angiogénique. Le cabozantinib a également obtenu l'AMM pour le traitement du **carcinome hépatocellulaire** en 2^{ème} ligne après un traitement au sorafenib.

Dans l'étude METEOR de phase III (NCT01865747), le cabozantinib a été comparé à l'**everolimus** (inhibiteur de mTOR) chez les patients atteints d'un cancer du rein qui ont progressé sous inhibiteurs de VEGFR. Une survie sans progression (7,4 contre 3,8

mois) et un taux de réponse (21% contre 5%) significativement meilleurs ont été observés dans le bras cabozantinib⁴⁹⁰.

Dans la deuxième étude CABOSUN de phase II (NCT01835158), le cabozantinib est comparé au sunitinib (anti-angiogénique) comme traitement de première intention dans le carcinome rénal à faible risque métastatique. La survie sans progression (8,2 mois contre 5 mois) et le taux de réponse (33% contre 12%) sont supérieurs chez les patients traités au cabozantinib⁴⁹¹.

Le cabozantinib a été combiné aux inhibiteurs du récepteur de l'EGFR tels que le **panitumumab** en phase Ib (NCT02008383) dans les cancers colorectaux métastatiques. Les patients ont présenté une survie globale moyenne de 12,5 mois et une faible toxicité⁴⁹². En revanche, sa combinaison à l'erlotinib (anti-EGFR) en phase 1b/II dans le cancer du poumon résistant (NCT00596648), n'a pas resensibilisé les patients à l'erlotinib⁴⁹³.

Le cabozantinib a également été combiné au nivolumab (anti-PD-1) et comparé au sunitinib en phase III (NCT03141177) chez des patients atteints de cancers du rein métastatiques non traités. Cette combinaison a montré sa forte efficacité comparée au sunitinib (taux de réponse de 55.7% contre 27.1%)⁴⁹⁴. Le cabozantinib est actuellement utilisé en combinaison avec le **durvalumab** (anti-PD-L1), en phase II, chez les patients atteints d'un carcinome urothélial après rechute aux sels de platine (NCT03824691)⁴⁹⁵. Enfin, le cabozantinib a été couplé au **nivolumab** avec ou sans l'**ipilimumab** (anti-CTLA-4) dans le carcinome urothélial avancé ou métastatique en phase I (NCT02496208). Ne présentant pas de toxicité, l'étude est poursuivie en phase II⁴⁹⁶.

Dans les cancers des VADS, le cabozantinib est combiné à l'**afatinib** (anti-EGFR) et a montré une importante efficacité *in vitro*, sur des modèles xénogreffes et PDX. Cette étude démontre la pertinence d'utiliser cette combinaison en essai clinique dans les cancers des VADS⁴⁶⁴. En essai clinique, il est utilisé en association avec le pembrolizumab (NCT03468218) en phase 2 et avec le cetuximab (NCT03667482) en phase 1 chez les patients métastatiques.

Le cabozantinib a montré sa forte efficacité dans plusieurs carcinomes. Son utilisation dans les carcinomes épidermoïdes des VADS serait donc prometteur.

Inhibiteurs	Classe	Co-traitement	Stade de développement
ficlatusumab	Anticorps monoclonal HGF	cetuximab	Phase Ib (NCT02277197)
tivantinib	Inhibiteurs Tyrosines kinases	cetuximab	Phase II (NCT01696955)
foretinib		erlotinib radiothérapie seule	Pré-clinique Pré-clinique Phase II (NCT00725764)*
golvatinib		cetuximab cisplatine+capecitabine	Phase I/II (NCT01332266) Phase I (NCT01355302)*
capmatinib		cetuximab	Phase Ib/II (NCT02205398)
crizotinib		gefitinib	Pré-clinique
bemcentinib		cetuximab radiothérapie	Pré-clinique Pré-clinique
sitravatinib		nivolumab	Phase I (NCT03575598)
cabozantinib		pembrolizumab cetuximab	Phase II (NCT03468218) Phase I (NCT03667482)

Tableau 5 : Inhibiteurs de c-MET et AXL en essais cliniques dans les cancers des VADS (: essais cliniques arrêtés)*

PLK1, AXL et c-MET sont donc des facteurs surexprimés dans les carcinomes épidermoïdes des VADS, favorisent la résistance aux traitements et sont associés à un mauvais pronostic chez ces patients.

L'expression de PLK1 est inversement corrélée à l'expression d'un récepteur ROBO2. Ce récepteur fortement inhibé dans les cancers des VADS pourrait expliquer la surexpression de PLK1. La suite de ma thèse présente donc la famille des récepteurs ROBO.

IV. ROUNDABOUT GUIDANCE RECEPTOR (ROBO)

1. Les familles Roundabout guidance receptor (ROBO) et SLIT

a. Présentation des récepteurs ROBO et des ligands SLIT

- Structure des ligands SLIT et des récepteurs ROBO

Les protéines ROBO font parties d'une classe de récepteurs transmembranaires avec 1000 à 1600 acides aminés, bien conservés entre espèces. Nous retrouvons un récepteur présent chez les nématodes (*Sax-3*), trois récepteurs chez la drosophile, le poulet et le xénope (*ROBO1-3*), et enfin **quatre récepteurs chez les mammifères** et le poisson zèbre (***ROBO1-4***)⁴⁹⁷⁻⁵⁰⁰.

Les gènes *ROBO1* et *ROBO2* se situent sur le chromosome **3p12.3** et les gènes *ROBO3* et *ROBO4* se situent se le chromosome **11q24.2**.

ROBO1, 2 et 3 possèdent la même structure avec **cinq domaines immunoglobuline**, **trois domaines fibronectines** et **un domaine transmembranaire**. Le domaine extracellulaire *ROBO4* se compose de seulement deux domaines immunoglobuline, de deux domaines fibronectine et d'une région transmembranaire⁵⁰¹.

Le domaine intracellulaire de *ROBO1* et *ROBO2* contient quatre régions riches en prolines (CC0-CC3). Le domaine intracellulaire de *ROBO3* et *ROBO4* contient respectivement trois (CC0, CC2 et CC3) et deux régions riches en prolines (CC0 et CC2) (**Figure 26A**).

Les invertébrés n'ont qu'un seul ligand SLIT, tandis que les vertébrés en ont plusieurs (*SLIT1-3*). Les gènes *SLIT1*, 2, 3 sont situés respectivement sur les chromosomes **10q24.1**, **4p15.31** et **5q34-35.1**⁵⁰².

Les ligands SLIT se composent de cinq régions : un peptide signal, quatre domaines riches en leucines (LRR, D1-D4), six domaines de type facteur de croissance épidermique (de type EGF), un domaine Agrin-Perlecan-Laminin-SLIT (ALPS), un (invertébrés) ou trois (vertébrés) domaines EGF et un nœud C-terminal riche en cystéines (**Figure 26B**).

- Interactions et régulations des récepteurs ROBO et des ligands SLIT

SLIT se lie à ROBO sur la 2^{ème} leucine et la 1^{ère} IgG de ROBO⁵⁰³ (Figure 26C), mais ne peut se lier à ROBO3 en raison d'une différence dans sa région IgG1.

Le ligand **netrine-1** déclenche sélectivement la phosphorylation de **ROBO3** via la kinase SRC. ROBO3 ne lie pas directement netrine-1, mais interagit avec son récepteur **DCC** notamment lors du guidage axonal⁵⁰⁴.

ROBO1 et **DCC** interagissent via le motif CC1 de ROBO1 et le domaine P3 de DCC⁵⁰⁵.

Les ligands SLIT peuvent s'homo-dimériser par la 4^{ème} leucine⁵⁰⁶.

Les récepteurs ROBO peuvent **s'hétéro-dimériser**. SLIT2 présente plus d'affinité pour ROBO1. **ROBO4 s'hétéro-dimérise donc avec ROBO1** pour lier SLIT2 et être activé⁵⁰⁷.

ROBO4 peut interagir avec le récepteur **UNC5B** notamment lors de l'angiogenèse⁵⁰⁸.

HSPG stabilise l'interaction ROBO et SLIT à la membrane⁵⁰⁹. L'interaction SLIT/ROBO est stabilisée par des glycosaminoglycanes (GAG) qui sont présents soit dans la matrice extracellulaire, soit attachés à des protéines associées à la membrane telles que le protéoglycane de sulfate d'héparane (HSPG).

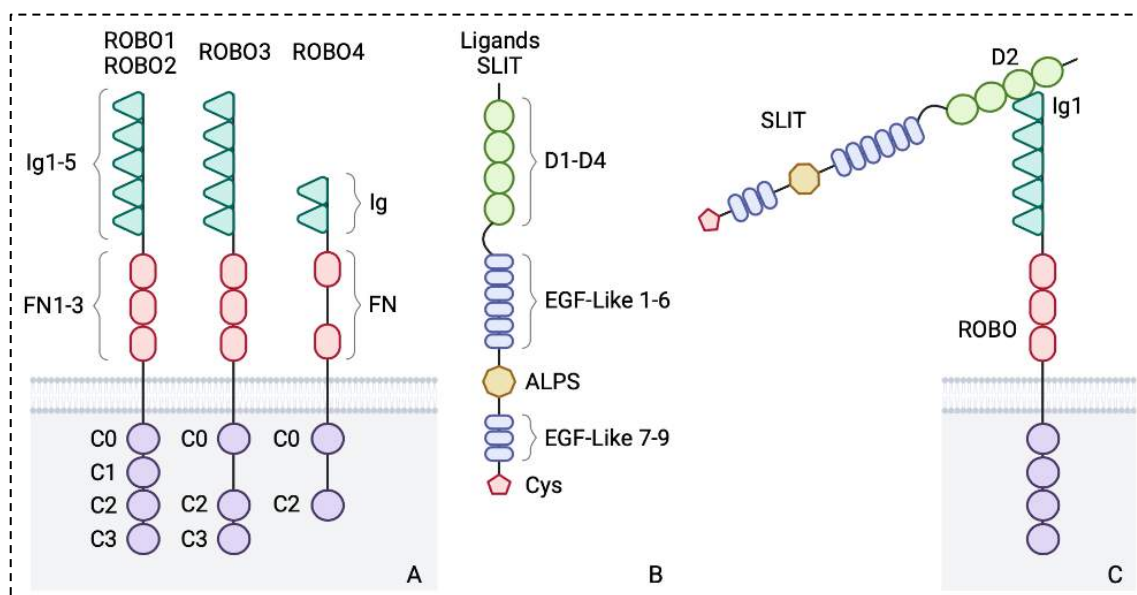


Figure 26 : Structure des récepteurs ROBO et des ligands SLIT

(D'après Tong et al. 2019)⁵¹⁰. Structure des récepteurs ROBO (A) et des ligands SLIT (B). SLIT et ROBO interagissent via la 4^{ème} leucine et la 1^{ère} Ig (C).

- Clivages des récepteurs ROBO et des ligands SLIT

La liaison de SLIT à ROBO induit le clivage de ROBO par la **métalloprotéinase ADAM10** sur son site transmembranaire⁵¹¹.

Ce clivage est important pour le recrutement des protéines en aval et la chémo-répulsion de la protéine SOS (« Son Of Sevenless »). Dans les cellules cancéreuses humaines, le fragment clivé par la **g-sécrétase** est transloqué dans le noyau. Le fragment C-terminal résultant peut ensuite être transloqué vers le noyau, mais sa fonction reste à déterminer⁵¹².

La protéine SLIT est clivée par des protéases entre le cinquième et le sixième domaine de type EGF pour générer le long segment SLIT N-terminal (**SLITN**) et le court segment SLIT C-terminal (**SLITC**). **Seuls la forme entière et SLITN peuvent se lier à ROBO**⁵¹³.

SLITC active la voie de signalisation de la **protéine kinase A (PKA)** nécessaire au métabolisme du glucose et à la thermorégulation des adipocytes⁵¹⁴. SLITC peut se lier aux protéines de la matrice extracellulaire **plexinA1** (nécessaire pour la ramification axonale)⁵¹⁵, **collagène IV**⁵¹⁶, **netrine-1**⁴⁹⁹ et **dystroglycan**⁵¹⁷.

SLITN se lie avec le récepteur **Dscam1** (« Down syndrome cell adhesion molecule 1 ») indépendamment de ROBO et permet la déphosphorylation intracellulaire du récepteur via la phosphatase RPTP69D (Ptp69D). Cette liaison permet l'extension axonale des neurones⁵¹⁸.

b. Fonctions biologiques

- **Régulation du système nerveux**

SLIT1, SLIT2 et SLIT3, sont exprimés dans le **tube neural** pendant la neurulation. Les récepteurs **ROBO1**, **ROBO2**, **ROBO3** et **ROBO4**, sont principalement exprimés sur les **cônes de croissance des axones** dans le **système nerveux central (SNC)**.

Dans le SNC, la signalisation SLIT/ROBO est importante pour le **guidage axonal (répulsion ou attraction axonale)** et la **migration neuronale**^{519,520}.

Dans la moelle épinière de la souris au stade embryonnaire (E10.5-11), des interneurons donnent naissance à des populations d'axones longitudinaux médiaux, intermédiaires et latéraux qui traversent la partie postérieure de la moelle épinière. Les récepteurs ROBO1 et ROBO2 sont exprimés dans chaque population axonale et **repoussent les axones loin de la ligne médiane ventrale et maintiennent la croissance longitudinale droite**. Les doubles mutants pour les deux récepteurs provoquent des erreurs de guidage axonal⁵²¹.

Cependant, une connexion des deux côtés bilatéraux est essentielle au bon fonctionnement du SNC et nécessite un franchissement de la ligne médiane de manière stricte. Un sous-ensemble de **neurones commissuraux** traverse la ligne médiane pour la connexion, tandis qu'un autre, les **neurones ipsilatéraux**, restent du même côté. Les neurones **commissuraux** expriment la protéine **COMM**. En l'absence de COMM, tous les neurones sont ipsilatéraux et expriment **ROBO** ce qui les empêche de traverser la ligne médiane. Les neurones commissuraux ne réexpriment les récepteurs **ROBO** qu'après avoir traversé la ligne médiane pour empêcher leur recroisement, tandis que les neurones ipsilatéraux maintiennent l'expression des récepteurs ROBO pour rester toujours du même côté et longer la ligne médiane⁵²².

Les **trois ligands SLIT sont exprimés dans la ligne médiane et favorisent la répulsion axonale**. Leur inhibition entraîne le recroisement des axones au niveau de cette ligne^{523,524} (**Figure 27**).

SLITs/ROBO1/2 contribuent également à la structuration des branches périphériques et centrales des neurones sensoriels⁵²⁵.

ROBO4 est exprimé dans le cerveau en développement et active la migration radiale des neurones des nouveau-nés dans le néocortex⁵²⁶.

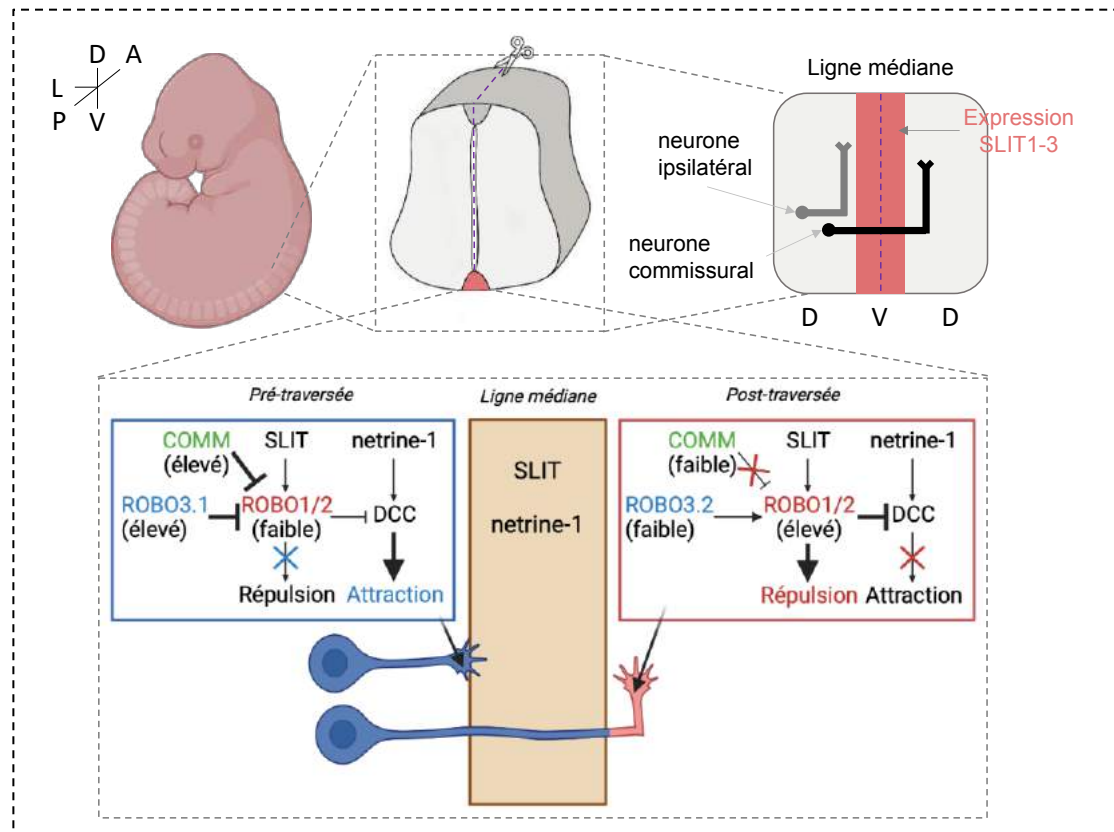


Figure 27 : Schéma de l'orientation classique des axones dans la moelle épinière d'embryons de souris.

Section de moelle épinière d'un embryon de souris montrant des axones commissuraux et ipsilatéraux, et une ligne médiane. Les récepteurs ROBO 1/2 sont exprimés dans les neurones ipsilatéraux empêchant leurs axones de traverser la ligne médiane. Les neurones commissuraux expriment COMM mais réexpriment ROBO1/2 une fois que leurs axones ont traversé la ligne médiane afin de connecter les deux hémisphères. SLIT, exprimé par la ligne médiane, se lie aux récepteurs ROBO, permet la répulsion axonale et une croissance axonale le long de la ligne médiane. netrine-1 exprimé par la ligne médiane, se fixe sur le récepteur DCC et favorise l'attraction axonale (Selon Bisiak et al, 2019)⁵²². L : latéral, P : postérieur, A : antérieur, D : dorsal, V : ventral

La signalisation SLIT-ROBO joue donc un rôle crucial lors de la formation d'axones dans la moelle épinière.

- *Netrine-1/DCC*

La fixation de ligand netrine-1 à DCC permet un **signal d'attraction**, celle de SLIT2 à ROBO1 favorise un signal de **répulsion**.

ROBO3 régule le franchissement de la ligne médiane en inhibant la répulsion induite par ROBO1/2 à partir des ligands SLITs exprimés par la ligne médiane et en potentialisant l'attraction des axones vers la ligne médiane induite par **netrine-1/DCC**⁵⁰⁴.

Le gène *ROBO3* subit un épissage alternatif près du domaine codant le C-terminal. Cet épissage génère deux isoformes **ROBO3.1** et **ROBO3.2**⁵²⁷. ROBO3.1 est exprimé avant de franchir la ligne médiane et supprime la répulsion induite par SLIT/ROBO1/2⁵²⁸. En revanche, ROBO3.2 contribue aux effets répulsifs des ligands SLIT et ne s'exprime qu'après que les axones ont traversé la ligne médiane⁵⁰⁴ (Figure 27).

A l'inverse, **FLRT3** identifié comme un corécepteur de ROBO1, peut activer la réactivité axonale de DCC/netrine-1⁵²⁹.

▪ *c-ABL/MENA*

Un autre mécanisme permettant la répulsion ou l'attraction axonale a été mis en évidence. Chez la drosophile, la tyrosine kinase **Abelson (c-ABL)** et son substrat **Enabled (ENA) (MENA chez les vertébrés)**, jouent des rôles opposés dans la transduction du signal SLIT/ROBO. c-ABL et MENA se lient à la sous-unité CC2 de ROBO. MENA favorise la répulsion axonale tandis que c-ABL inhibe la répulsion induite par ROBO en phosphorylant la Tyrosine 1073 de la sous-unité CC1⁵³⁰ (Figure 28).

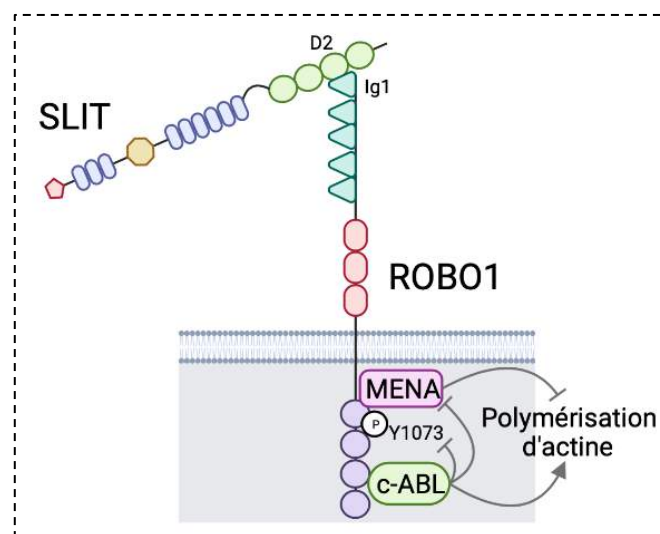


Figure 28 : Régulation du guidage axonal par SLIT/ROBO via l'activation des protéines c-ABL ou MENA, régulateurs du cytosquelette d'actine.

c-ABL et son substrat MENA jouent des rôles opposés dans la voie de signalisation SLIT/ROBO. C-ABL inhibe le récepteur ROBO1 et favorise la polymérisation du cytosquelette d'actine nécessaire à la traversée de la ligne médiane des axones. A l'inverse, MENA inhibe la polymérisation de l'actine et favorise la répulsion axonale.

- *RHO GTPases*

Les petites GTPases de la **famille RHO (RHO, RAC1 et CDC42)** jouent un rôle critique dans la signalisation SLIT/ROBO. Elles modulent le cytosquelette d'actine nécessaire à la croissance et au guidage axonal. **Ces RHO GTPases sont actives lorsqu'elles sont liées au GTP et inactives lorsqu'elles sont liées au GDP.** L'hydrolyse du GTP en GDP est favorisée par des protéines activatrices des GTPases (**GAP**) tandis que la substitution du GDP par du GTP est réalisée par des facteurs d'échange de nucléotides guanyliques (**GEF**). Une nouvelle famille de GAP, spécifique de la voie SLIT/ROBO, a été identifiée : les **SRGAP** (SLIT-ROBO RHO GTPase Activating Protein) nommées **srGAP1**, **srGAP2** et **srGAP3**. En présence de SLIT, srGAP1 se lie au domaine CC3 des récepteurs ROBOs et inactive CDC42⁵³¹. srGAP2 favorise l'extension des axones durant le développement cortical de la souris⁵³². srGAP3 inhibe l'activité de RAC1 et CDC42 en perturbant la dynamique du cytosquelette d'actine et des microtubules⁵³³. Une autre protéine de la famille **RHO/GAP**, appelée **vilse crGAP** se fixe au domaine CC2 de ROBO et active la répulsion axonale de SLIT/ROBO en inactivant CDC42 et RAC1 de la même manière que les srGAP⁵³⁴.

La présence de formes constitutionnellement actives de RAC1 et CDC42 permet aux axones de traverser la ligne médiane. La voie de signalisation SLIT/ROBO empêcherait donc les axones de franchir la ligne médiane en diminuant l'activité de RAC1 et de CDC42⁵³⁵.

Cependant, **SLIT active RAC1**. La protéine adaptatrice **NCK** se lie aux domaines CC2 et CC3 de ROBO, recrutant les protéines **PAK** (« p21-activated protein kinase ») et **GEF SOS** qui active alors RAC1^{536,537}. Cette voie de signalisation contrôle la répulsion et la dynamique du cytosquelette. **L'activation et l'inhibition de RAC1 conduisent donc à une répulsion axonale.** Deux explications sont plausibles : ces GAPs et GEFs fonctionnent en étapes distinctes, chacune étant requise pour différentes actions moléculaires qui soutiennent la répulsion. Il est possible que RAC1 soit suffisant pour la répulsion et ne dépende pas du maintien d'un niveau spécifique de RAC-GTP. Ces résultats mettent en évidence l'importance des GAPs et des GEFs dans la régulation de la signalisation SLIT/ROBO en contrôlant l'état d'activité des petites GTPases⁵³⁸ (**Figure 29**).

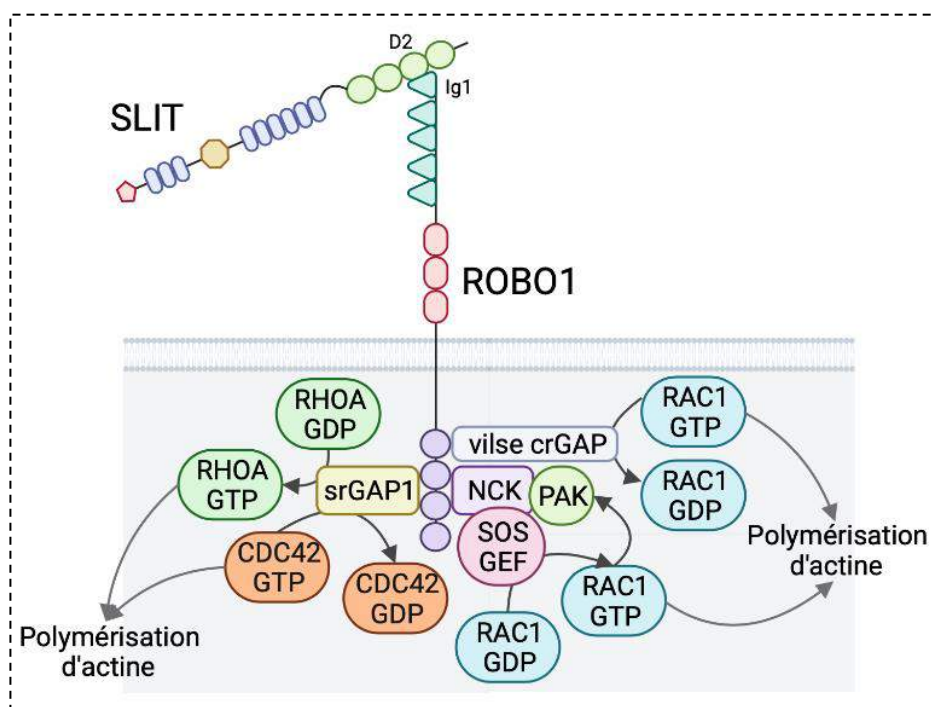


Figure 29 : Régulation du guidage axonal par SLIT/ROBO via l'activation des protéines RHO GTPases, régulateurs du cytosquelette d'actine.

La signalisation SLIT/ROBO régule la polymérisation de l'actine, et donc le guidage axonal, en contrôlant le niveau d'activité des RHO GTPases. La signalisation SLIT/ROBO recrute des srGAPs qui inactivent les petites RHO GTPases RHOA, CDC42 et RAC1. Dans d'autres contextes, la signalisation SLIT/ROBO entraîne la polymérisation de l'actine en recrutant NCK, qui à son tour recrute SOS GEF et PAK. SOS GEF active RAC1 qui active PAK et la polymérisation de l'actine.

- **Angiogenèse**

ROBO4 est exprimé par les cellules endothéliales et contrôle l'angiogenèse et la perméabilité des vaisseaux sanguins. SLIT2 présente plus d'affinité pour ROBO1 suggérant que **ROBO4 s'hétéro-dimérise avec ROBO1** pour lier SLIT2⁵⁰⁷.

Le VEGF induit l'angiogenèse en activant une protéine G **ARF6** puis **RAC1**⁵³⁹. La voie **ROBO4/SLIT2** inhibe ARF6 et par conséquent l'angiogenèse⁵⁴⁰. De plus, ROBO4 interagit et active le récepteur vasculaire **UNC5B** conduisant à l'inhibition de l'interaction entre la kinase SRC et le récepteur VEGFR2. L'angiogenèse et la perméabilité des vaisseaux sont donc diminuées⁵⁰⁸. La dérégulation de ce mécanisme induit une angiogenèse anormale notamment au niveau de la **rétine**, et entraîne de nombreux problèmes de vue, allant de l'opacification cornéenne à l'augmentation de la perméabilité rétinienne (**Figure 30**).

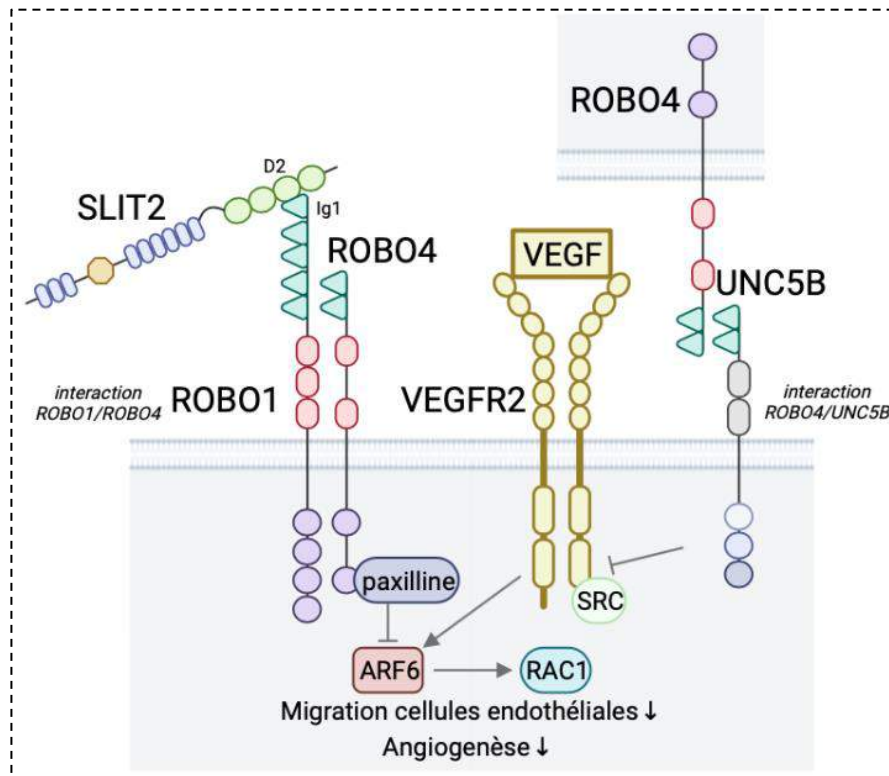


Figure 30 : ROBO4 inhibe l'angiogenèse induite par VEGFR2

La voie de signalisation du VEGFR2 induit l'activation d'ARF6 et de RAC1 et donc l'angiogenèse. ROBO4 s'hétéro-dimérise avec ROBO1 et recrute la paxilline, ce qui inhibe ARF6 et RAC1 et donc l'angiogenèse. ROBO4 s'hétéro-dimérise avec UNC5B et inhibe l'interaction entre SRC et VEGFR2, inhibant ainsi l'angiogenèse et la perméabilité des vaisseaux.

Cependant, **ROBO4** possède des propriétés pro-angiogéniques, notamment en induisant la migration des cellules endothéliales par l'intermédiaire des RHO GTPases **CDC42** et **RAC1**⁵⁴¹.

SLIT2 sécrété par les cellules stromales mésenchymateuses multipotentes placentaires et son récepteur ROBO4 induisent la migration des cellules endothéliales et la formation de tubes pour moduler l'angiogenèse dans le **placenta**⁵⁴².

Les cellules endothéliales exprimant **ROBO1** et **ROBO2**, interagissent avec **ROBO4** pour promouvoir la migration des cellules endothéliales HuVEC (« Human Umbilical Vein Endothelial Cell »). SLIT2 se fixe sur les récepteurs hétéro-dimérisés ROBO et active **CDC42**. Cette interaction permet le recrutement de la protéine **WASP** pour initier la polymérisation d'actine et la formation de filopodes nécessaires à la migration des cellules endothéliales favorisant l'angiogenèse⁵⁴³.

Dans les vaisseaux sanguins, SLIT2-ROBO1/2 coopèrent avec le **VEGFR** et activent les protéines d'échafaudage **NCK1/2** et **RAC1** pour induire la **néovascularisation de la rétine** au cours du développement^{544,545}.

- **Organogenèse**

En plus de son rôle dans le développement des neurones, la signalisation SLIT/ROBO intervient également dans le développement des **reins**, du **cœur**, des **muscles** et des **systèmes, reproducteur, digestif et respiratoire**.

SLITs et ROBO1/ROBO2 permettent le développement des **reins**⁵⁴⁶. Chez la souris, la perte de ROBO2 et SLIT2 induit la formation de reins multi-lobulaires⁵⁴⁷. Même après le développement, ROBO2 est nécessaire pour la stabilité des podocytes dans le rein de la souris⁵⁴⁸. Le séquençage d'exomes de patients souffrant d'anomalies congénitales des reins et des voies urinaires a identifié des mutations dans srGAP1 (GAP1 associée à SLIT/ROBO) et SLIT2. La mutation srGAP1 entraîne son activation constitutive qui inhibe RAC1. Les mutations SLIT2 se regroupent toutes dans les régions codant pour les domaines LRR et empêche sa liaison avec ROBO⁵⁴⁹.

La voie de signalisation SLIT/ROBO intervient lors du développement du **cœur**. La perte de SLIT2/3 et de ROBO1/2 induit des malformations cardiaques chez la souris⁵⁵⁰. Cette voie permet également le développement des **glandes mammaires**, en limitant le nombre de ramifications lors de la morphogenèse. ROBO1 et SLIT2/3 répriment **PI3K/AKT** et le facteur de transcription **β-caténine**, ce qui inhibe la transcription de gènes impliqués dans la prolifération. Les mutations de ROBO1 et SLIT2/3 augmentent la prolifération cellulaire et donc le nombre de ramifications des glandes mammaires⁵⁵¹.

Au cours du développement, la réorganisation des tubes intestinaux donne naissance aux **systèmes digestif et respiratoire**. Sa morphogenèse appropriée nécessite une séparation de la paroi corporelle, un processus perturbé chez les modèles murins qui présentent des mutations de ROBO1/2⁵⁵².

La voie de signalisation SLIT/ROBO contrôle **l'allongement musculaire** le long des tendons. ROBO2 se lie à SLIT à la surface des tendons, facilitant le clivage de SLIT et la formation d'oligomères SLITN. Les oligomères SLITN présents sur les tendons

se lie aux récepteurs ROBO1/3 exprimés sur le muscle et induisent une répulsion ou un signal d'arrêt de l'élongation musculaire⁵⁵³.

La voie de signalisation SLIT/ROBO est nécessaire pour une morphogenèse appropriée des îlots de Langerhans du **pancréas**⁵⁵⁴. Les ligands SLIT2/3 sont exprimés dans les tissus endocriniens et non endocriniens à la fin du développement du pancréas. SLIT fonctionne comme un signal répulsif pour les cellules β afin qu'elles se regroupent⁵⁵⁵.

- **Prolifération cellulaire et cellules souches**

Lors de la formation du SNC, **ROBO1/2** contribue à la **prolifération des cellules progénitrices neuronales**. Le volume cortical et la densité des cellules souches en mitose sont largement réduits aux premiers stades embryonnaires chez les souris knock-out (KO) pour ROBO1/2⁵⁵⁶.

La signalisation SLIT-ROBO contrôle également le mode de division des **cellules souches mammaires** : en l'absence de ROBO1, les divisions symétriques (cellules souches), plutôt qu'asymétriques (cellules différenciées), sont privilégiées, entraînant un auto-renouveau accru de la population des cellules souches et à une excroissance mammaire⁵⁵⁷.

ROBO4 coopère avec le récepteur CXCR4 pour spécifier la localisation des **cellules souches hématopoïétiques** dans les niches de la moelle osseuse. Les souris ROBO4 (-/-) surexpriment CXCR4 comme effet de compensation afin de maintenir cette fonction biologique⁵⁵⁸.

2. ROBO/SLIT et cancer

L'expression de SLIT et ROBO est altérée dans une longue liste de cancers. Il existe des exemples de régulation à la fois à la hausse et à la baisse de ces gènes. Ces résultats suggèrent que **la voie SLIT/ROBO peut favoriser ou inhiber la survie, la prolifération et la migration des cellules tumorales.**

a. Altération de l'expression des ligands SLITs et des récepteurs ROBOs

Dans les cas les plus fréquents, l'expression de SLIT est diminuée.

Une **délétion allélique** de SLIT2 est observée dans 63% des carcinomes du sein, 35% du carcinome du col de l'utérus et dans plus de 60% des carcinomes pulmonaires à petites cellules⁵⁵⁹⁻⁵⁶¹. Ainsi l'inhibition du gène SLIT induit directement l'altération de la voie de signalisation SLIT/ROBO.

En plus de la perte du gène par délétion, le promoteur du gène SLIT peut être également **hyper-méthylé** notamment dans les cancers de l'ovaire. L'inhibition de SLIT2 induit la croissance tumorale et, par conséquent, la réexpression de SLIT2 inhibe considérablement la prolifération cellulaire.⁵⁶² De la même manière, SLIT1 et SLIT3 sont inhibés par hyper-méthylation dans les lignées cellulaires tumorales de sein (41%), de colon (33%) et de gliome (29%)⁵⁶³. De plus, **EZH2**, un répresseur de la transcription, est responsable de l'hyper-méthylation de SLIT2. Son inhibition pharmacologique, rétablit l'expression de SLIT2. Chez des patients atteints de cancer de la prostate, une faible expression de SLIT2 est associée à la surexpression d'EZH2, à l'agressivité tumorale et à la formation de métastases⁵⁶⁴.

Une conséquence de l'hyper-méthylation de SLIT2 et SLIT3 est l'inhibition de **microARNs miARN-218-1** et **miARN-218-2** codés par *SLIT2* et *SLIT3*⁵⁶⁵.

Les microARNs inhibent l'expression de **ROBO1/2** et de **GLCE**. Ce dernier est responsable de la synthèse du **HSPG** qui stabilise la liaison SLIT2/ROBO1/2. Il s'agit donc d'une **boucle de régulation négative**. L'expression de ROBO1/2 à la surface des cellules cancéreuses leur permet de migrer en réponse au ligand SLIT, produit par les cellules non tumorales environnantes. L'inhibition des microARNs induit la liaison entre SLIT2 et ROBO1 et permet la formation de métastases dans les cancers gastriques, de la tête et du cou et du nasopharynx^{566,567}. **Ce mécanisme met en évidence le rôle oncogénique de la signalisation SLIT/ROBO dans le cancer.**

L'altération de la voie de signalisation SLIT/ROBO peut aussi être induite via la délétion ou l'hyper-méthylation du promoteur des gènes ROBOs.

Les gènes **SLIT2**, **ROBO1** et **ROBO2** présentent une **délétion** ou une **hyper-méthylation** dans le carcinome de l'utérus. La perte d'interaction SLIT2/ROBO1 et SLIT2/ROBO2 dans ce type de cancer est corrélée à un mauvais pronostic chez ces patients⁵⁶⁸.

ROBO1 est **déléte** dans la lignée cellulaire du cancer du poumon à petites cellules U2020, d'où le nom « Deleted in U twenty twenty », ou **Dutt1**⁵⁶⁹. Les gènes ROBO1 et Dutt1 sont dérivés de promoteurs alternatifs du même gène. **Dutt1** est hyper-méthylé dans le cancer du sein invasif primaire (19%), le cancer du rein à cellules claires (18%) et le cancer du poumon non à petites cellules (4%). Cependant, les tumeurs du sein et du rein présentent également des **pertes alléliques** dans la région génomique contenant Dutt1. Ces résultats suggèrent le rôle suppresseur de tumeurs de Dutt1⁵⁷⁰.

Plus récemment, une **hyper-méthylation aux loci des gènes ROBO1 et ROBO2 a été rapportée dans les lésions dysplasiques du carcinome des VADS**, ainsi que dans le cancer du col de l'utérus⁵⁷¹.

De plus, **ROBO1 et ROBO3** sont inhibés respectivement par les micro-ARNs **miARN-92** et **miARN-383** notamment dans le cancer du pancréas^{572,573}. De même, ROBO4 est transcriptionnellement activé par le complexe **AP-1** et **c-JUN**. La dérégulation de ces facteurs de transcription dans le cancer modifie l'expression de ROBO4 et favorise la carcinogénèse⁵⁷⁴.

Enfin, **USP33**, une déubiquitineuse qui stabilise **ROBO1**, est faiblement exprimée dans les cancers du poumon et colorectaux. La dégradation de ROBO1 favorise donc la progression tumorale.

Plusieurs études rapportent donc l'inhibition des ligands SLITs et des récepteurs ROBOs permettant la progression tumorale. Une surexpression des ligands SLITs et des récepteurs ROBOs est toutefois observée dans les cancers de la prostate⁵⁷⁵.

Les changements dans l'expression de SLIT et ROBO affectent la survie, la prolifération et la migration des cellules tumorales.

b. SLITs et ROBOs en tant que suppresseurs de tumeurs

- Prolifération et survie

En plus de servir de médiateur du guidage axonal, le couple **netrine-1/DCC** agit également comme **facteur de survie pour les cellules cancéreuses** pendant la progression tumorale. Netrine-1 permet la progression des cancers gastriques via la voie de signalisation **ERK/MAPK**⁵⁷⁶ et induit la prolifération des cellules de cancers du pancréas en activant **MDM2** responsable de la dégradation de **p53**⁵⁷⁷.

SLIT/ROBO se lient et inhibent netrine-1/DCC lors de la répulsion axonale⁵⁷⁸. Par conséquent, **SLIT/ROBO peuvent agir comme des facteurs pro-apoptotiques en inhibant netrine-1/DCC**. Cette boucle de régulation suggère un mécanisme par lequel SLIT exerce une fonction antitumorale en favorisant l'apoptose des cellules cancéreuses. L'inhibition des ligands SLITs, qui se produit dans de nombreux types de cancers, pourrait donc contribuer à la prolifération des cellules.

La perte de SLIT2 dans les cellules de cancer de poumon active **AKT**, un marqueur de la survie cellulaire⁵⁷⁹. A l'inverse, la surexpression de SLIT2 dans les cellules du cancer du sein inhibe l'activation de **PI3K/AKT** et réduit *in vivo* la taille de tumeurs expérimentales⁵⁸⁰. La surexpression de SLIT2 favorise également l'apoptose de cellules de carcinomes épidermoïdes et de fibrosarcomes *in vitro* et *in vivo*⁵⁸¹.

Le cancer de l'ovaire présente une faible expression de **SLIT2, SLIT3, ROBO1, ROBO2** et **ROBO4**. Le cortisol sécrété par les ovaires inhibe l'expression de **SLIT/ROBO**, ce qui réduit l'apoptose des cellules tumorales PEO-14 et SKOV-3 et favorise la croissance tumorale⁵⁸². Dans l'adénocarcinome du pancréas, la perte d'expression de **ROBO2** est également associée à un mauvais pronostic chez les patients⁵⁸³.

De plus, l'utilisation d'un **anticorps R5** ciblant le domaine extracellulaire de **ROBO1**, empêche sa liaison avec SLIT2 et induit la prolifération des cellules de carcinomes épidermoïdes oraux. La signalisation SLIT2/ROBO1 est donc importante pour la réduction de la prolifération et l'induction de l'apoptose des cellules cancéreuses⁵⁸⁴.

De plus, l'expression de **ROBO4** diminue la prolifération des cellules de gliome *in vitro*. ROBO4 inhibe notamment la voie de signalisation **VEGFR2** impliquant **PI3K/AKT**, responsable de la croissance tumorale⁵⁸⁵. Des niveaux faibles d'expression de **ROBO4** et **SLIT3** favorisent la progression des carcinomes hépatocellulaires⁵⁸⁶.

- **Invasion et métastases**

ROBO inhibe en aval de sa voie de signalisation des kinases cytoplasmiques, responsables de la **polymérisation de l'actine**, de la **réorganisation du cytosquelette des microtubules**, et donc de la migration cellulaire : **Hakai, Famille RHO (RAC, CDC42, RHOA) et c-ABL**.

SLIT2 inhibe la GTPase **GEF** responsable de l'activation de **CDC42** et s'oppose à l'invasion des cellules de médulloblastome et de gliome. L'utilisation d'un ARN interférent ciblant ROBO1 ou SLIT2 rétablit l'activation de CDC42 et l'invasion tumorale. A l'inverse, les cellules de gliome surexprimant SLIT2 présentent une activité réduite de CDC42^{587,588}.

SLIT2/ROBO1 inhibe également CDC42, induit par la voie de signalisation **HGF/c-MET** et par conséquent l'invasion de différentes lignées cancéreuses⁵⁸⁹.

SLIT2 active la GTPase **srGAP1** responsable de l'inhibition de **CDC42**. L'inhibition de srGAP1 induit l'activation de CDC42 et la migration cellulaire⁵⁹⁰. Dans le cancer colorectal, l'activation de srGAP1 par SLIT2/ROBO1, réprime CDC42 et par conséquent la migration cellulaire⁵⁹¹. De la même manière, l'expression de la protéine SrGAP2 est réduite ou absente dans plusieurs échantillons d'ostéosarcome primaire, ce qui favorise la formation de métastases⁵⁹². SLIT inhibe donc la migration des cellules tumorales en régulant négativement la RHO GTPase **CDC42** ; par conséquent, une perte de l'expression de SLIT par les cellules durant la progression tumorale induit de façon inappropriée la migration.

L'inactivation du gène *SLIT2* (SLIT2^{-/-}) entraîne la translocation de la **β-caténine** dans le noyau permettant la surexpression de **Snail**. Il inhibe alors la production de l'**E-cadhérine** et augmente le potentiel métastatique des cellules cancéreuses de poumon⁵⁷⁹ (**Figure 31A**).

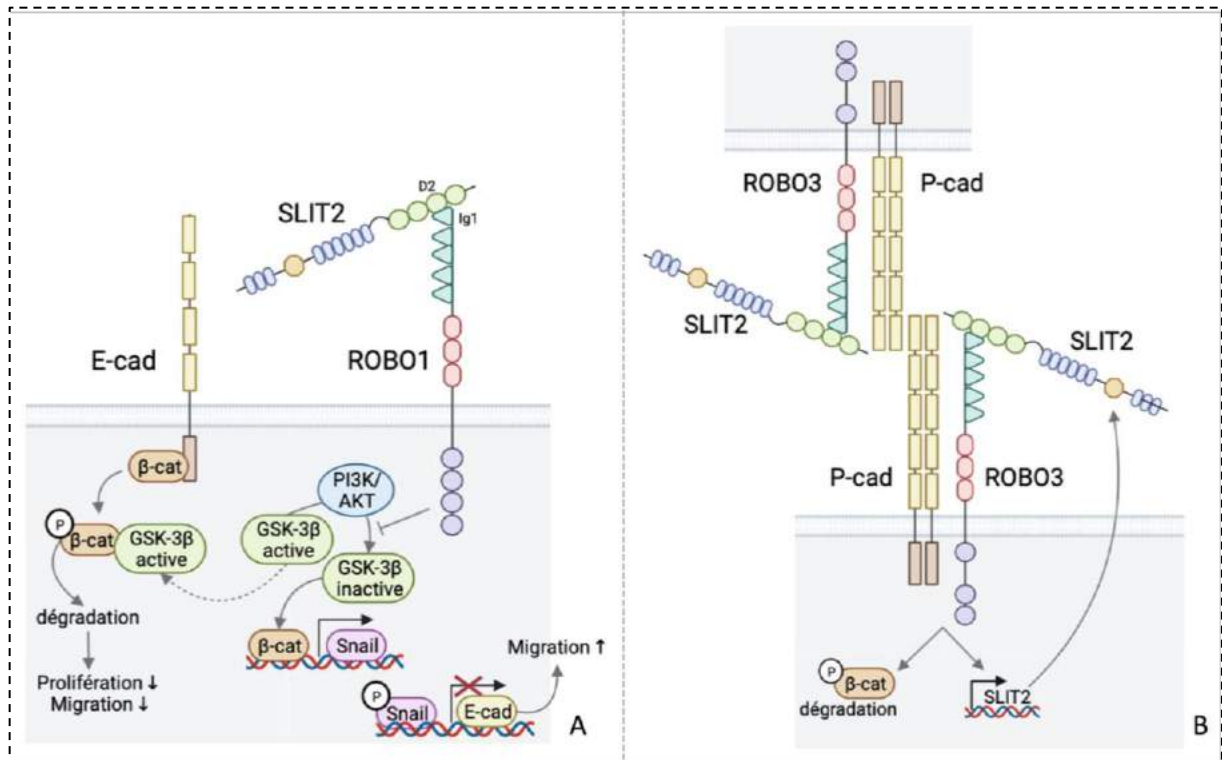


Figure 31 : SLIT/ROBO inhibe la prolifération et la migration en induisant la dégradation de la β -caténine

(A) SLIT2/ROBO1 induit la dégradation de la β -caténine en activant la protéine GSK-3 β . Cette voie inhibe la translocation de la β -caténine et l'activation de Snail. L'expression de l'E-cadhérine est préservée ce qui diminue la migration cellulaire. (B) SLIT2/ROBO3 s'auto-dimérise avec la P-cadhérine et induit la transcription de SLIT2 correspondant à une boucle de rétroaction et contribue à la dégradation de la β -caténine.

SLIT2 facilite l'interaction entre **ROBO3** et la **P-cadhérine**. Ce complexe induit la dégradation de la **β -caténine** et la transcription de SLIT2 dans une boucle de rétroaction pour permettre la migration cellulaire des carcinomes oraux⁵⁹³ (**Figure 31B**). L'expression de **SLIT3** est également inhibée dans les cancers du poumon ce qui favorise l'EMT, par la diminution de l'**E-cadhérine** et l'augmentation de la **vimentine** et des **métalloprotéases MMP2/MMP9**⁵⁹⁴. La perte de SLIT3 favorise la migration et l'invasion des cellules cancéreuses de poumon. En outre, le traitement par **SLIT3** réduit la migration des cellules de mélanome. SLIT3 inhibe l'activation d'**AP-1** et de de ses gènes cibles, et donc la migration⁵⁹⁵. La surexpression de **SLIT2** dans un modèle murin de cancer du pancréas, inhibe la migration et l'invasion des cellules cancéreuses⁵⁹⁶ (**Figure 32**).

ROBO4 diminue la migration des cellules de gliome *in vitro* en inhibant la voie de signalisation VEGFR2⁵⁸⁵ .

Les cellules métastatiques répondent à des facteurs de croissance (PDGF, HGF) et des **cytokines (CXCL12)**. Dans ce contexte, la voie **SLIT/ROBO** inhibe la migration induite par ces différents facteurs, notamment l'axe **CXCL12/CXCR4**.

CXCR4 est associé à un mauvais pronostic dans le cancer du sein et du pancréas. La perte de **SLIT2**, **SLIT3** et **ROBO1** dans des modèles cellulaires et xénotreffes de cancer du sein induit la surexpression de CXCR4. La protéine SLIT2 recombinante inhibe les métastases des cellules cancéreuses du sein induites par CXCL12/CXCR4⁵⁹⁷. SLIT2 inhibe la migration induite par CXCL12 des cellules de cancer du sein possédant les récepteurs CXCR4 et ROBO1, en inhibant la phosphorylation et l'activation de **FAK**, **paxilline**, **PI3K**, **MAPK** ou bien **MMP2/9**⁵⁹⁸ (**Figure 32**).

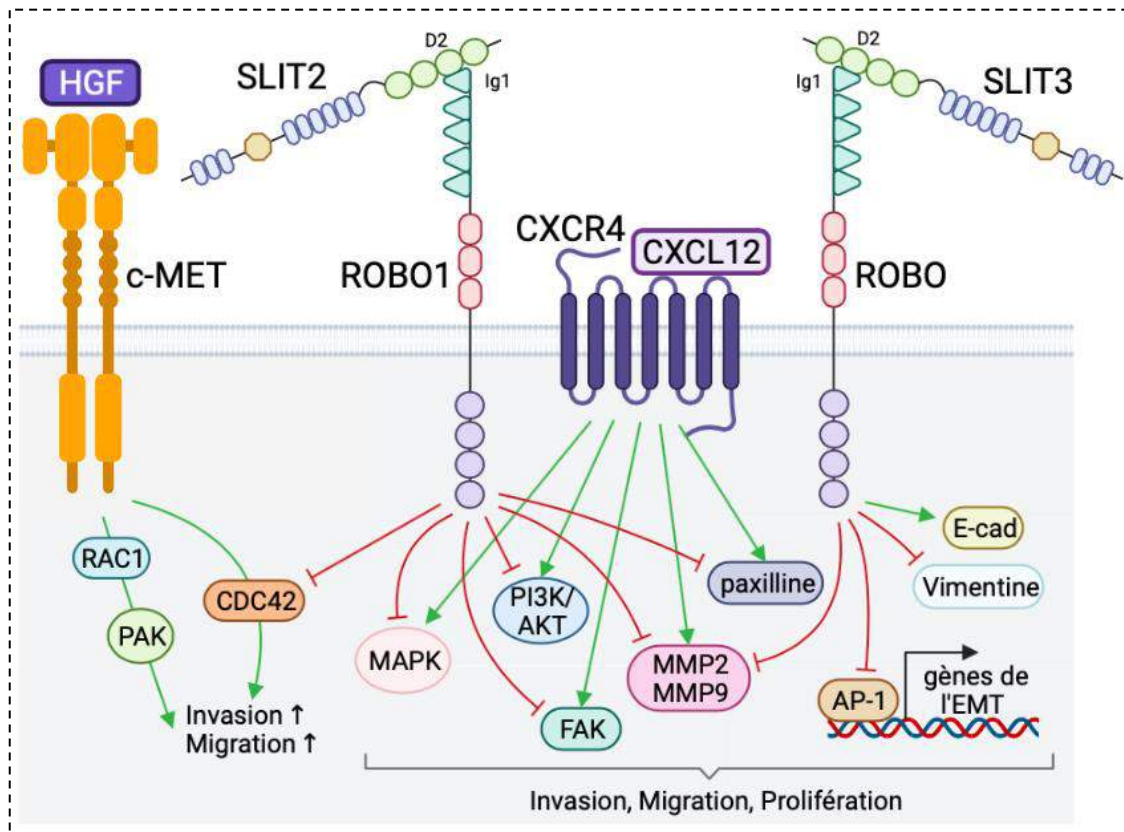


Figure 32 : Mécanismes de la voie SLIT/ROBO en tant que gène suppresseur de tumeur dans la progression tumorale

Le signal SLIT2/ROBO1 diminue la progression tumorale. ROBO/SLIT3 inhibe les métalloprotéases MMP2 et MMP9, AP1 et la vimentine qui favorisent la migration et l'invasion. Le signal SLIT2/ROBO1 inhibe les réponses induites par c-MET/HGF, réduit l'activation du CDC42 et de RAC1 et, par conséquent, inhibe la prolifération, la survie et la migration cellulaire. SLIT2/ROBO1 inhibe les effecteurs MAPK, PI3K/AKT, FAK et la paxilline de la voie CXCL12/CXCR4 en réprimant l'invasion, la migration et la prolifération.

- Angiogenèse

Comme rapporté précédemment, ROBO4 inhibe l'angiogenèse en bloquant le récepteur VEGFR2^{508,540}. La perte de ROBO4 dans les cellules cancéreuses modifie ce mécanisme et favorise l'angiogenèse.

Ainsi, ROBO4 représente un marqueur de bon pronostic dans le cancer du poumon⁵⁹⁹ et de la prostate⁶⁰⁰.

ROBO4 se lie à SLIT2 et inhibe la formation de vaisseaux dans le gliome. La première stratégie de ciblage ROBO4 est l'injection de fortes doses de la protéine SLIT2 recombinante. L'inhibition de ROBO4 (-/-) dans des modèles murins de gliome

augmente le nombre de vaisseaux sanguins et diminue l'expression de **ZO-1** une protéine présente sur les jonctions serrées des cellules épithéliales tumorales⁵⁸⁵.

Cependant, ROBO4 inhibe **ARF6** une protéine qui favorise l'angiogenèse. L'inhibiteur spécifique d'ARF6, **SecinH3**, diminue la croissance tumorale chez la souris, les métastases pulmonaires et rétablit l'expression de la protéine ZO-1 dans les cellules endothéliales⁶⁰¹.

c. SLITs et ROBOs en tant que promoteurs de tumeurs

- **Prolifération et survie**

Plusieurs SLITs et ROBOs se sont également exprimés de manière aberrante au cours du développement du **cancer de l'ovaire**, de **l'endomètre**, du **col de l'utérus** et de la **prostate**⁶⁰².

Des niveaux élevés de SLIT et de ROBO sont présents dans de nombreux types de tumeurs et la signalisation SLIT/ROBO favorise la croissance tumorale.

Des niveaux élevés de **ROBO1** et **ROBO2** favorisent la progression tumorale des carcinomes hépatocellulaires et sont associés à un mauvais pronostic⁵⁸⁶.

ROBO1 et **ROBO4** sont surexprimés dans le carcinome colorectal en comparaison aux tissus normaux. L'expression de ROBO1 est élevée dans les cellules tumorales, tandis que ROBO4 est surexprimé dans les cellules endothéliales des vaisseaux tumoraux⁶⁰³. La surexpression de SLIT2 et ROBO1 favorise la progression tumorale et est associée à une survie globale plus courte chez les patients atteints de carcinome colorectal⁶⁰⁴ ou de cancer du sein⁶⁰⁵.

L'utilisation d'un anticorps R5 permettant de rompre la liaison SLIT/ROBO inhibe la prolifération des cellules cancéreuses de glandes salivaires, MC3⁶⁰⁶.

SLIT/ROBO favorise aussi la prolifération cellulaire via c-ABL. La protéine **Cables** favorise la liaison c-ABL et β -caténine. C-ABL phosphoryle la β -caténine sur la Tyrosine 489. La β -caténine transloque ensuite dans le noyau et permet la transcription de gènes impliqués dans la prolifération⁶⁰⁷. (**Figure 33**).

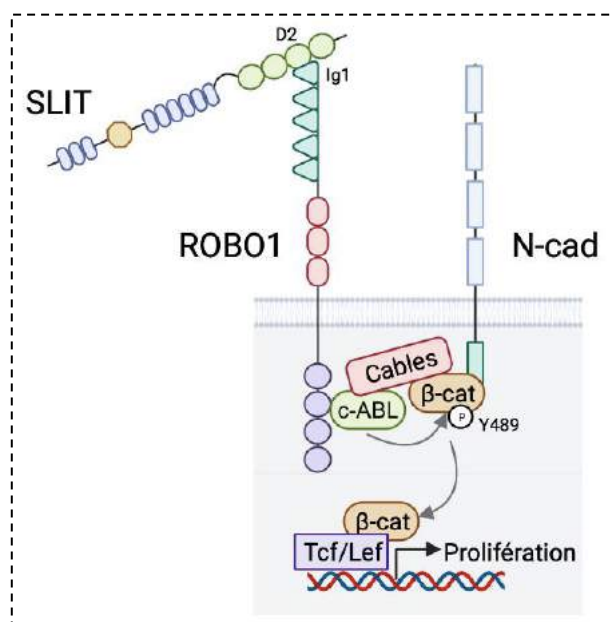


Figure 33 : SLIT/ROBO favorise la prolifération

SLIT/ROBO permet la translocation de la β -caténine qui favorise la transcription de gènes induisant la prolifération cellulaire.

- **Migration et invasion**

La surexpression de SLIT2 favorise le développement de cancer de la peau. Les modèles murins surexprimant SLIT2 développent plus de tumeurs de la peau que les souris contrôles, et montrent une surexpression de **MMP9** induisant la migration cellulaire. L'anticorps R5 inhibe l'invasion des cellules de carcinome de la peau⁶⁰⁸. La voie de signalisation **SLIT2/ROBO1** induit l'invasion des cellules du cancer du sein via la surexpression de **MMP9**⁶⁰⁵.

La surexpression de **ROBO3** favorise la prolifération, l'invasion et la migration des cellules cancéreuses du pancréas *in vitro* et la croissance de xénogreffes chez la souris. La surexpression de ROBO3 active la **β -caténine** et permet la transcription de gènes favorisant l'EMT⁵⁷².

La transcription de SLIT2/ROBO1 est réprimée par **SRC**. Cependant, cette kinase active **c-ABL** qui stabilise la protéine ROBO1 et conduit à l'activation de **CDC42** et **RAC1**, et la migration des cellules cancéreuses⁶⁰⁹ (**Figure 34**).

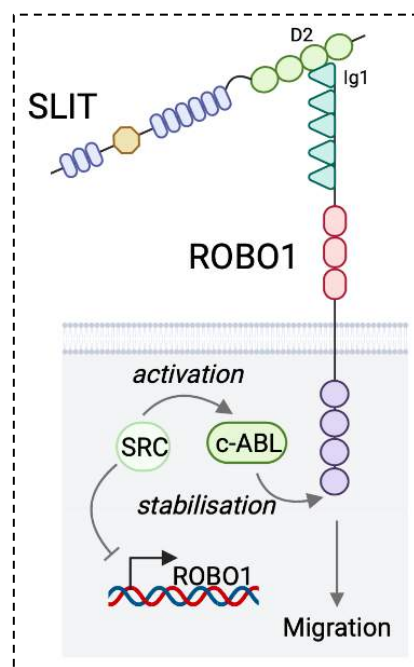


Figure 34 : SRC active c-ABL pour stabiliser l'expression de ROBO1 pour favoriser la migration cellulaire

SRC réprime la transcription de ROBO1 mais active c-ABL qui stabilise ROBO1 et conduit à la migration cellulaire.

La surexpression de **srGAP2** est associée à un mauvais pronostic chez les patients atteints d'un carcinome hépatocellulaire et induit la migration et l'invasion des cellules cancéreuses indépendamment de l'EMT. Le séquençage ARN des cellules cancéreuses srGAP1 KO a montré l'implication de voies de signalisation du métabolisme⁶¹⁰.

La surexpression de **SLIT2** et **ROBO1** est associée un risque métastatique élevé et à une survie globale plus courte chez les patients atteints d'un carcinome colorectal. La surexpression de SLIT2/ROBO1 active l'ubiquitine ligase **Hakai** qui dégrade l'**E-cadhérine** par le lysosome et permet l'EMT⁶⁰⁴. La surexpression de Hakai favorise la tumorigenèse et la formation de métastases *in vivo*. Hakai représente donc une cible thérapeutique pertinente pour inhiber la formation de métastases⁶¹¹. L'inhibition d'Hakai favorise la sensibilité des cellules au cisplatine dans le cancer du poumon⁶¹² (figure 35).

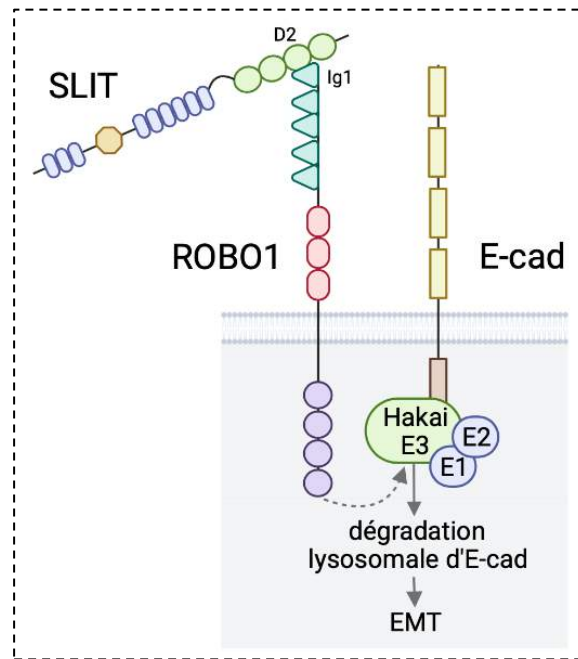


Figure 35 : SLIT2/ROBO1 favorisent la migration cellulaire

La voie SLIT/ROBO stimule la migration cellulaire en recrutant l'ubiquitine ligase Hakai en E-cadhérine. Hakai induit la dégradation lysosomale de l'E-cadhérine entraînant la migration cellulaire.

- **Angiogenèse**

L'expression de **ROBO1** et **ROBO4** a été observée dans les cellules endothéliales vasculaires. SLIT2 est sécrété dans un large spectre de lignées cellulaires tumorales et interagit avec ROBO1 exprimé sur les cellules endothéliales associées à la tumeur. Ainsi, les cellules endothéliales migrent vers la tumeur et forment de nouveaux vaisseaux sanguins⁶¹³.

L'anticorps R5 empêche l'angiogenèse tumorale et la croissance tumorale dans un modèle de carcinome épidermoïde de peau induit chimiquement. A l'inverse, la surexpression SLIT2 *in vivo* induit la formation de métastases dans les ganglions lymphatiques de souris porteuses de tumeurs expérimentales de pancréas⁶¹⁴. L'inhibition de **ROBO1** par le **microARN-218** inhibe l'angiogenèse dans les cancers gastriques⁶¹⁵. Ainsi, la signalisation SLIT2/ROBO1 favorise l'angiogenèse tumorale.

De plus, l'utilisation d'ARNs interférents ciblant **ROBO1** et **ROBO4** diminue la motilité endothéliale et perturbe la formation de tubes via la protéine **WASP**⁶¹⁶.

Les patients atteints de leucémie myéloïde aiguë (LAM) qui surexpriment **ROBO3** et **ROBO4**, ont une survie globale plus courte. La surexpression de ROBO4 augmente le nombre de vaisseaux tumoraux chez ces patients^{617,618}.

Les souris vaccinées contre **ROBO4** montrent une diminution de croissance du carcinome pulmonaire et d'angiogenèse par rapport aux souris contrôles⁶¹⁹. L'expression de ROBO4 est limitée aux sites d'angiogenèse intra-tumoraux. Il représente un marqueur pertinent de la vascularisation tumorale, contrairement au **VEGFR2** qui est aussi exprimé dans les vaisseaux non-tumoraux. La vaccination contre ROBO4 n'a pas montré les effets indésirables connus des traitement anti-VEGF.

Ainsi, l'expression des ligands SLITs et des récepteurs ROBOs est dérégulée en fonction des cancers. Leur inhibition ou leur surexpression régule positivement ou négativement la progression et l'agressivité tumorale en fonction du type de cancer (**Tableau 6**).

Type de tumeur	Statut SLIT/ROBO	Fonction
Poumon	ROBO4↓, SLIT2↓, SLIT3↓, USP33↓	Suppresseurs de tumeur
Sein	SLIT2↓, SLIT3↓	Suppresseurs de tumeur
	ROBO1↑, SLIT2↑	Oncogènes
Ovaire	ROBO1,2,3↓, SLIT2,3↓	Suppresseurs de tumeur
Adénocarcinome	ROBO2↓,	Suppresseurs de tumeur
Carcinome oral	SLIT2↓, ROBO1↓, ROBO2↓	Suppresseurs de tumeur
Gliome	ROBO1↓, ROBO4↓, SLIT2↓	Suppresseurs de tumeur
Carcinome hépatocellulaire	ROBO4↓, SLIT3↓	Suppresseurs de tumeur
	ROBO1↑, ROBO2↑, srGAP2↑	Oncogènes
Carcinome colorectal	SLIT2↓	Suppresseurs de tumeur
	ROBO1↑, ROBO4↑, SLIT2↑	Oncogènes
Ostéosarcome	srGAP2↓	Suppresseurs de tumeur
Prostate	ROBO4↓	Suppresseurs de tumeur
Utérus	ROBO1↓, ROBO2↓, SLIT2↓	Suppresseurs de tumeur
Pancréas	ROBO3↑, SLIT2↑	Oncogènes
Carcinome de la peau	SLIT2↑	Oncogènes
Leucémie aigüe myéloïde	ROBO3↑, ROBO4↑	Oncogènes

Tableau 6 : Rôle oncogène et suppresseur de tumeur de la signalisation SLIT/ROBO dans les cancers humains

L'hyper-méthylation de ROBO1 et ROBO2 dans les carcinomes épidermoïdes des VADS induit l'activation de voies de signalisation impliquées dans la prolifération, la migration

et l'invasion tumorale. Ces récepteurs sont donc considérés comme suppresseurs de tumeurs chargés de freiner la croissance tumorale.

L'**azacitidine** utilisée en tant que déméthylant, pourrait réhabiliter l'expression des récepteurs ROBOs dont les promoteurs sont hyper-méthylés et donc inactivés.

A l'inverse, dans les tumeurs pour lesquelles SLIT/ROBO jouent le rôle d'oncogènes, des anticorps de type **R5** pourraient inhiber l'interaction SLIT/ROBO et par conséquent la progression tumorale.

V. OBJECTIFS

Les carcinomes épidermoïdes des voies aéro-digestives supérieures représentent le 5^{ème} cancer le plus fréquent en France, avec près de 12 000 cas diagnostiqués par an en France. De plus, 60-70% des cancers sont dépistés à des stades avancés.

Les traitements de référence sont la chirurgie en premier lieu, suivie d'un traitement par chimiothérapie (cisplatine) couplé à la radiothérapie. Ces traitements ont amélioré la survie des patients. Néanmoins, environ 30 à 50% des patients présentent des récurrences locales ou distantes (métastases) en raison d'une résistance innée ou acquise aux traitements. Plus récemment, l'immunothérapie à base de pembrolizumab ou de nivolumab (anticorps anti-PD-1) a montré sa forte efficacité mais chez seulement 20% des patients. **Le but de de ma thèse, était donc de découvrir de nouvelles cibles et de nouveaux traitements pertinentes pour les patients en impasse thérapeutique.**

Dans un premier temps, je me suis intéressée à la thréonine kinase : la Polo like kinase 1 (PLK1) et aux récepteurs à activité tyrosine kinase : AXL et c-MET. Les cancers des VADS font partis des cancers qui surexpriment le plus ces protéines. L'utilisation des lignées cellulaires résistantes à la chimiothérapie et à la radiothérapie puis d'échantillons de patients au diagnostic et à la rechute, ont montré que leur surexpression est associée à un mauvais pronostic et à une résistance aux traitements de référence (la radiothérapie et le cisplatine).

Dans un deuxième temps, j'ai ciblé ces protéines avec deux inhibiteurs : l'onvansertib (inhibiteur de PLK1) et le cabozantinib (inhibiteur d'AXL et de c-MET) qui ont montré une forte efficacité dans les cancers des VADS.

Ces deux premiers objectifs ont fait l'objet de deux articles :

- « The Polo-like kinase 1 inhibitor onvansertib represents a relevant treatment for head and neck squamous cell carcinoma resistant to cisplatin and radiotherapy » (publié dans Theranostics, 2021)
- « Cabozantinib, a promising therapeutic strategy for resistant head and neck squamous cell carcinoma patients » (En révision dans Cell Reports Medicine, 2022)

Dans un troisième temps, je me suis focalisée sur les mécanismes de surexpression de PLK1. ROBO2, un récepteur impliqué dans le guidage axonal lors du développement du SNC, a montré une faible expression qui est inversement corrélée à l'expression de PLK1 chez les patients. Considéré comme suppresseur de tumeurs dans les cancers des VADS, son inhibition par délétion ou hyper-méthylation pourrait expliquer la surexpression de PLK1.

Cet objectif fait l'objet d'un troisième article dont je présenterai les premiers résultats.

RÉSULTATS

1. ARTICLE N°1

The polo-like kinase 1 inhibitor onvansertib represents a relevant treatment for head and neck squamous cell carcinoma resistant to cisplatin and radiotherapy

En tant que 5^{ème} cancer le plus répandu dans le monde, les carcinomes épidermoïdes des VADS représentent près de 6% de tous les cancers. La résistance aux traitements de référence associant chirurgie, radiothérapie et cisplatine entraîne la mort de 50% des patients. Le taux de prolifération élevé de HNSCC a stimulé l'activation de la polo-like kinase (PLK1), un acteur clé du cycle cellulaire. L'analyse de la base de données du TCGA a révélé que la surexpression de PLK1 était associée à un mauvais pronostic chez les patients HNSCC. Par conséquent, nous avons étudié la pertinence thérapeutique d'un inhibiteur spécifique de PLK1, l'onvansertib. Il provoque la mort par apoptose de cellules HNSCC sensibles et résistantes au cisplatine et/ou à la radiothérapie (CAL27, CAL33) à des concentrations de l'ordre du nanomolaire sans aucune toxicité sur les cellules épithéliales normales. De plus, l'association de l'onvansertib, du cisplatine et de la radiothérapie s'est avérée très efficace sur les cellules de cancers des VADS à faibles doses. Ce résultat suggère que cette triple combinaison conservera une efficacité élevée avec des effets toxiques limités.

L'onvansertib a démontré son potentiel anti-tumoral et anti-métastatique dans deux modèles expérimentaux de tumeurs *in vivo* : chez un modèle de souris xénotransgreffe et chez le poisson zèbre. Le rôle antitumoral de l'onvansertib a ensuite été démontré sur des coupes de biopsies prélevées sur des patients avec des tumeurs des VADS. Nos résultats favorisent donc fortement le ciblage de PLK1 comme alternative thérapeutique prometteuse pour les patients atteints de cancers des VADS au diagnostic ou suite aux rechutes.

Research Paper

The Polo-like kinase 1 inhibitor onvansertib represents a relevant treatment for head and neck squamous cell carcinoma resistant to cisplatin and radiotherapy

Anais Hagege^{1,2}, Damien Ambrosetti^{1,3}, Julien Boyer⁴, Alexandre Bozec⁴, Jérôme Doyen⁴, Emmanuel Chamorey⁴, Xingkang He⁵, Isabelle Bourget¹, Julie Rousset⁴, Esma Saada⁴, Olivia Rastoin^{1,2}, Julien Parola^{1,2,4}, Frederic Luciano^{1,2}, Yihai Cao⁵, Gilles Pagès^{1,2,6}✉ and Maeva Dufies^{2,6}✉

1. University Côte d'Azur, Institute for Research on Cancer and Aging of Nice (IRCAN), CNRS UMR 7284; INSERM U1081, Centre Antoine Lacassagne, 06189 Nice, France.
2. LIA ROPSE, Laboratoire International Associé Université Côte d'Azur - Centre Scientifique de Monaco.
3. University Côte d'Azur, Centre Hospitalier Universitaire (CHU) de Nice, Hôpital Pasteur, Central laboratory of Pathology, 06000 Nice, France.
4. Centre Antoine Lacassagne, 06189 Nice, France.
5. Department of Microbiology, Tumor and Cell Biology, Karolinska Institutet, SE-171 77 Stockholm, Sweden.
6. Centre Scientifique de Monaco, Biomedical Department, 8 quai Antoine Premier, 98 000 Monaco, Principality of Monaco.

✉ Corresponding authors: Maeva Dufies (E-mail: maeva.dufies@gmail.com) and Gilles Pagès (E-mail: gilles.pages@unice.fr). These authors co-supervised the work.

© The author(s). This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>). See <http://ivyspring.com/terms> for full terms and conditions.

Received: 2021.04.16; Accepted: 2021.09.04; Published: 2021.09.21

Abstract

Rationale: Head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) represent the 4th most aggressive cancer. 50% of patients relapse to the current treatments combining surgery, radiotherapy and cisplatin and die two years after the diagnosis. Elevated expression of the polo-like kinase 1 (Plk1) correlated to a poor prognosis in epidermoid carcinomas.

Methods: The molecular links between Plk1 and resistance to cisplatin/radiotherapy were investigated in patients and cell lines resistant to cisplatin and/or to radiotherapy. The therapeutic relevance of the Plk1 inhibitor onvansertib, alone or combined with cisplatin/radiotherapy, was evaluated on the proliferation/migration on HNSCC cell lines, in experimental HNSCC in mice, in a zebrafish metastasis model and on patient-derived 3D tumor sections.

Results: Plk1 expression correlated to a bad prognosis in HNSCC and increased after relapse on cisplatin/radiotherapy. Onvansertib induced mitotic arrest, chromosomic abnormalities and polyploidy leading to apoptosis of sensitive and resistant HNSCC cells at nanomolar concentrations without any effects on normal cells. Onvansertib inhibited the growth of experimental HNSCC in mice and metastatic dissemination in zebrafishes. Moreover, onvansertib combined to cisplatin and/or radiotherapy resulted in a synergic induction of tumor cell death. The efficacy of onvansertib alone and in combination with reference treatments was confirmed on 3D viable sections of HNSCC surgical specimens.

Conclusions: Targeting Plk1 by onvansertib represents a new strategy for HNSCC patients at the diagnosis in combination with reference treatments, or alone as a second line treatment for HNSCC patients experiencing relapses.

Key words: Plk1; Head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC); cisplatin resistance; radiation resistance; onvansertib

Introduction

Head and neck squamous cell carcinomas (HNSCC) represent the fifth most common cancer worldwide and cause high mortality every year due to the failure of reference treatments by surgery, cisplatin and radiotherapy. Currently, 50% of patients locally relapse and succumb to the disease because of

resistance to chemotherapy and radiotherapy [1].

The principal risk factors of the pathology are tobacco, alcohol [2, 3] and human papillomavirus (HPV) infection [4].

HNSCC are characterized by a high proliferation rate and tumor cells that undergo resistance to

standard therapies continue to proliferate uncontrollably. One of most important regulators of the cell cycle is the Polo like kinase 1 (Plk1). Plk1 is overexpressed in HNSCC and its overexpression correlates to a bad prognosis [5-7].

Polo was first identified in *Drosophila melanogaster* [8]. The family of polo-like serine/threonine kinases is conserved in nearly all organisms and includes 5 members: Plk1, Plk2, Plk3, Plk4 and Plk5 [9]. Plk1 comprises a C-terminal polo-box domain which interacts with its substrates, and a N-terminal kinase catalytic domain to phosphorylate its substrates. Plk1 activates 622 substrates during the different steps of the cell cycle [10]. It controls centromere maturation, mitosis entry, chromosome segregation and cytokinesis [11]. It plays a key role in the DNA damage checkpoint [12] and it is an essential actor of cell proliferation and maintenance of genomic stability. Plk1 is activated by Aurora A and Bora [13] to initiate mitosis' entry. This major role in cell proliferation appears relevant to stop tumor progression by specific inhibitors of Plk1.

The depletion of Plk1 in cancer cells resulted in cell cycle arrest, polyploidy, and apoptosis [14, 15]. Onvansertib, a Plk1-specific ATP competitive inhibitor, blocks the phosphorylation of Plk1 substrates [16]. *In vivo*, onvansertib reduces osteosarcoma [17] and ovarian carcinoma growth [18] and it increases median survival of acute myeloid leukemia (AML) patients [19]. Onvansertib is currently tested in solid metastatic cancers. Three phase II clinical trials are ongoing in AML (NCT03303339) and in metastatic prostate (NCT0341403) and colorectal (NCT03829410) cancers.

In this study, we showed that onvansertib is more efficient on HNSCC cell lines as compared to cell lines representative of other solid or hematologic cancers. We generated for the first time, HNSCC cell lines resistant to both cisplatin and radiotherapy. Inhibition of Plk1 by onvansertib induced mitotic catastrophe and the death of cisplatin/radiotherapy-sensitive and -resistant HNSCC cells. Onvansertib strongly inhibited the growth of experimental cisplatin/radiotherapy-sensitive and -resistant HNSCC tumors in mice and the metastatic dissemination of resistant HNSCC cells in zebrafishes. Moreover, we clearly showed that onvansertib combining with cisplatin and radiotherapy exerts a synergistic inhibition on cell proliferation *in vitro* but also on viable sections of surgical resections of HNSCC. These experiments, in strong collaboration with oncologists, pathologists and surgeons, showed that onvansertib represents a relevant drug for the treatment of HNSCC.

Methods

Cell lines

CAL33 (named 33) and CAL27 (named 27), two human head and neck cancer cell from the Centre Antoine Lacassagne have been used to establish cell lines resistant to cisplatin (CAL27 cis-R and CAL33 cis-R), to radiotherapy (CAL33 rad-R) or to both treatments (CAL33 RR and CAL27 RR).

CAL27 cis-R and CAL33 cis-R were obtained by cultivating the cells with increased concentrations of cisplatin until 10 μ M. CAL33 rad-R cells were obtained after 25 rounds of 8 Gy irradiation. CAL33 RR and CAL27 RR were obtained from CAL33 cis-R and CAL27 cis-R and after 25 rounds of 8 Gy irradiation.

Human fibroblast (FHN) and keratinocytes, non-cancer cells, were obtained from ATCC. Cancer cell lines BT549, Detroit, 786, Mel202, DU145 and MDA-MB-231 were obtained from ATCC. NB4, U937, U266 and 8226 were kindly provided by Dr Patrick Auberger (C3M, Nice).

Cells were cultured in DMEM high glucose, GlutaMAXTM Supplement, pyruvate - (Thermo Fisher Scientific) and supplemented with 7% FCS and 0.1% penicillin streptomycin (10 000 μ g/mL, Gibco[®] Life Technologies).

Keratinocytes (given by Dr Magnaldo Thierry) were obtained as waste tissues following plastic mammary surgery of a 40 years-old female patient after informed consent according to approval of the local ethical comity. After trypsin/EDTA dissociation, primary keratinocytes were cultured on a feeder layer of lethally irradiated 3T3-J2 Swiss mouse fibroblasts (3T3-J2) in cFAD medium as described by Rheinwald and Green [20]. When reaching about 60% confluency, mouse cells feeder layer was removed by 5 min incubation in 0.02% EDTA. Then, 48 h before harvesting, sub-confluent keratinocytes were washed twice in PBS and then solubilized in cell lysis buffer, followed by sonication treatment.

Immunoblotting

Cells were lysed in SDS 7.5%; glycerol 30%; Tris 0.3 M pH 6.8 lysis buffer.

30 μ g of proteins were separated on 10% SDS-polyacrylamide gels and transferred on PVDF membranes. The following primary antibodies were used: Plk1 (Abcam, ab17056, mouse) and ARD1 (home-made antibody, rabbit), Histone H3 (Cell signaling, #9715), phospho-Histone H3 (Cell signaling, #53348), NPM (Cell signaling, #3542), phospho-NPM (Cell signaling, #3541), PARP (Cell signaling, #9532), HSP90 (Cell signaling, #4877), HSP60 (Cell signaling, #12165), GAPDH (Cell

signaling, #2118), phospho-TCTP (Cell signaling, #5251), phospho-Cdc25C (Cell signaling, #9529).

RNA interference

Plk1 siRNA was purchased from Ambion (Plk1, Silencer Select siRNA, Standard, Cat#: 4390824). Control siRNA was purchased from Sigma (Universal, Negative Silencer #1). 150 000 cells were plated and transfected with Plk1 siRNA or Control siRNA (50 nM/ well for 6 well culture plates) using the 500 μ L of opti-MEM medium (Gibco) in presence of 5 μ L of Lipofectamine RNAiMAX (Invitrogen) and 2 mL of DMEM medium without penicillin streptomycin. After 48 h, 96 h and 120 h post-transfection, cells were analyzed.

Flow cytometry

50 000 cells of each line were cultured in a 6-wells plates with onvansertib (Selleckchem, NMS-P937, NMS1296937) and/or cisplatin for 48 h.

Apoptotic and dead cells were stained with Annexin V-APC (Biolegend, 8 μ g/ml) and propidium iodide (PI, Biolegend, 0.5 mg/ml) for 15 min at 4 °C and analyzed with FACSCalibur cytometer (BD Biosciences).

To analyze cell cycle and polyploidy, 200 000 cells were cultured with onvansertib or cisplatin for 24 h and conserved in ethanol 70% at -20 °C. They were incubated in PBS containing 3 μ g/ml RNase A and 40 μ g/ml PI for 30 min at 4 °C and analyzed with FACSCalibur cytometer (BD Biosciences).

XTT assays

5000 cells exposed to different concentrations of onvansertib and/or cisplatin, were cultured in 96-wells plates for 48 h. XTT tests (Cell Proliferation kit II, Sigma-Aldrich®) allowed to measure cell metabolism at 490 nm (Promega GloMax®-Microplate).

Colony formation assays

3000 cells were treated with onvansertib and/or cisplatin and/or irradiated at 2 and 4 Gy. After 10 days, clones were colored with GIEMSA (Sigma-Aldrich®).

Migration assays

50 000 cells were cultured in DMEM 0% FCS and seeded in Boyden chambers. After 24 h, Boyden chambers were washed with PBS. Migrative cells were fixed with paraformaldehyde 3% and colored with crystal violet.

Invasion assays

2000 cells were plated in 48 multi-wells plates covered with agarose 0.8%. After two days, spheroids

were mixed with 200 μ L matrigel (Corning® Matrigel® Matrix), 100 μ L collagen I (8 mg/ml; Corning), 80 μ L HEPES 1M and DMEM 7% FCS in 12 multi-wells plates. 1 h after DMEM 7% FCS was added with or without treatment. Pictures were recorded every day.

Staining by hematoxylin eosin safran (HES)

10 000 cells were seeded in control condition or in the presence of onvansertib. The staining was performed by the pathology department of the University Hospital of Nice (Dr Ambrosetti).

Analyses by RT-qPCR

RNA from cells were purified with the RNeasy Mini Kit (Qiagen). The “QuantiTect Reverse Transcription Kit” (Qiagen) was used for cDNA obtention. The PCR program was executed on “Professional Basic Thermocycler” (Biometra). SYBR master mix plus (Eurogentec) was used for qPCR. The mRNA level was normalized to 36B4 mRNA.

Mice models

10⁶ CAL33 and CAL33RR cells were injected subcutaneously into the flanks of 5-week-old nude (nu/nu) female mice (Janvier, France). Tumor volume was determined with a caliper ($v = L \times l^2 \times 0.5$). When the tumor reached 80 mm³, mice were treated five times a week for 4 weeks by gavage with onvansertib (60 mg/kg), and once a week for 4 weeks with cisplatin (4 mg/kg) administered intraperitoneally. This study was carried out in strict accordance with the recommendations of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. Our experiments were approved by the “Comité national institutionnel d'éthique pour l'animal de laboratoire (CIEPAL)” (reference: 2018102510495275 - PEA 535).

Zebrafish models

All animal experiments were approved by the Northern Stockholm Experimental Animal Ethical Committee. Zebrafish embryos were raised at 28°C under standard experimental conditions. Zebrafish embryos at the age of 24-hpf were incubated in water containing 0.2 mmol/L 1-phenyl-2-thio-urea (PTU, Sigma). At 48-hpf, zebrafish embryos were dechorionated with a pair of sharp-tip forceps and anesthetized with 0.04 mg/mL of tricaine (MS-222, Sigma). Anesthetized embryos were subjected for microinjection. CAL33 RR tumor cells were labeled *in vitro* with a Vybrant DiD cell-labeling solution (LifeTechnologies). Tumor cells were resuspended in PBS and approximately 5 nL of the cell solution were injected into the perivitelline space (PVS) of each embryo by an Eppendorf microinjector (FemtoJet 5247). Non-filamentous borosilicate glass capillaries

needles were used for injection and the injected zebrafish embryos were immediately transferred into PTU aquarium water. Fish are immediately treated with onvansertib (50 nM). For Figure 5E-F, 24 h after injection, only zebrafish with metastasis were chosen and treated with onvansertib (50 nM). Zebrafish embryos were monitored 72 h for investigating tumor metastasis using a fluorescent microscope (Nikon Eclipse 90).

Patients

All patients gave written consent for the use of tumor samples for research. This study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki.

TCGA cohort: HNSCC patients - Plk1 mRNA analysis

Normalised RNA sequencing (RNA-Seq) data produced by The Cancer Genome Atlas (TCGA) were downloaded from cBioportal (www.cbioportal.org, TCGA Provisional; RNA-Seq V2). Data were available for 530 HNSCC tumor samples TCGA subjected to mRNA expression profiling.

DFS and OS were calculated from patient subgroups with Plk1 mRNA levels (z-score) that were less or greater than the third quartile value.

French cohort: HNSCC patients from Centre Antoine Lacassagne

Centre Antoine Lacassagne pathology department provided us with paraffin embedded samples of HNSCC at diagnosis and relapse. These samples have been deparaffinized and RNA has been extracted with RNeasy FFPE Kit (Quiagen 73504). qPCR has been performed to measure Plk1 expression.

Treatment of primary HNSCC viable 3D sections - HNSCC patients from Centre Antoine Lacassagne

HNSCC tumors obtained just after surgery were provided through a collaboration with the Centre Antoine Lacassagne (Pr Bozec). Viable tumor sections (250 μ m, tumor samples were obtained with a vibratome HM650V (Thermo Scientific) and the presence of tumor cells was confirmed by a pathologist (Dr Boyer). They were seeded in Airway Epithelial Cell Growth Medium (PromoCell) supplemented with Normocure™ (Invivogen) and treated with a range of onvansertib, cisplatin concentrations or radiotherapy, alone or in combination. The ATP concentration (ATP Bioluminescence Assay Kit CLS II, Roche) was measured in the lysed tumor sections and represented a read-out of their viability. Tumor sections were then paraffin-embedded and analysed using HES for the

quantification of necrotic areas or KI-67 staining to quantify cell proliferation. Tumor sections were then deparaffined and treated by TUNEL immunofluorescence (*In situ* Cell Death Detection Kit, Fluorescein, Roche) to evaluate the amounts of apoptotic cells.

Immunohistochemistry

Xenograft model

Experimental HNSCC were embedded in paraffin for immunostaining. Tumor sections were incubated with CD31 (clone MEC 13.3, BD Pharmingen, diluted at 1:500), Ki67 (clone MIB1, DAKO, Ready to use) or α SMA (clone 1A4, DAKO, Ready to use).

Statistical analysis

For *in vitro* and *in vivo*

Statistical analyses were performed with Prism 8 software. Results are expressed as the mean \pm the standard error (SEM). Significance was determined by Student's t-test. ANOVA with Bonferroni post hoc test was used for multiple comparisons.

For patients

The Student's t-test was used to compare continuous variables and chi-square test, or Fisher's exact test (when the conditions for use of the χ^2 -test were not fulfilled), were used for categorical variables. DFS was defined as the time from surgery to the appearance of metastasis. PFS was defined as the time between surgery and progression, or death from any cause, censoring live patients and progression free at the last follow-up. OS was defined as the time between surgery and the date of death from any cause, censoring those alive at the last follow-up. The Kaplan-Meier method was used to produce survival curves and analyses of censored data were performed using Cox models.

For clonogenicity tests

Analyses of synergic effect has been done by the statistic department of the Centre Antoine Lacassagne. Potentialisation effect (synergy or antagonism) were evaluated by using interaction test for linear regression model. An interaction with $p < 0.05$ will be considered as significant (Figure S5E).

Results

Plk1 is strongly expressed in HNSCC, is associated with a poor prognosis and its expression increased at relapse on cisplatin/ radiotherapy first-line treatment

Plk1 mRNA levels have been determined in solid

cancers using the TCGA database. Plk1 mRNA levels are high in kidney, lung, breast, ovarian, colon cancers, melanoma and particularly in HNSCC (Figure 1A). Plk1 mRNA levels were higher in HNSCC as compared to healthy tissue ($p < 0.0001$, Figure 1B). They were also increased in node-positive tumors (N1, aggressive and invasive tumor, $p = 0.035$, Figure S1A). However, Plk1 mRNA levels did not depend on the HPV status (Figure S1B). In HNSCC from the TCGA cohort, high levels of Plk1 mRNA correlated with shorter disease-free survival (DFS, 19.05 months vs 46.81 months, $p = 0.006$, Figure 1C) and shorter overall survival (OS, 32.36 months vs 64.78, $p = 0.0009$, Figure 1D). Equivalently, in HNSCC from the Centre Antoine Lacassagne (French cohort, Table S1), high levels of Plk1 mRNA correlated with shorter DFS (27.45 months vs 53.27 months, $p = 0.011$, Figure 1E) and shorter OS (78.13 months vs undefined, $p = 0.031$, Figure 1F). Plk1 is overexpressed in HNSCC that relapse after first-line treatment with cisplatin and radiotherapy ($p = 0.038$, Figure 1G). These observations suggested that Plk1 represents a marker of poor prognosis and confirmed previous results [7]. Our results suggested that Plk1 is also a marker of relapse/resistance in HNSCC and could represent a relevant therapeutic target for these cancers at the diagnosis as previously suggested [21, 22] but also at relapse on reference treatments by chemo/radiotherapy.

Cisplatin and/or radiotherapy-resistant cells are more aggressive

CAL33 and CAL27 cells resistant to cisplatin, radiotherapy or both have been generated. Curiously, no CAL27 cells only resistant to radiotherapy could be obtained, suggesting that resistance to cisplatin favors resistance to radiotherapy. CAL33 and CAL27 cells overexpressed Plk1 as compared to human fibroblasts (FHN) and keratinocytes, two healthy cell types (Figure 2A). Plk1 was expressed to a comparable extent in sensitive and resistant CAL27 and CAL33 cells that already overexpress Plk1 (Figure S2A).

A clonogenicity test performed on CAL27 and CAL33 sensitive and resistant cells after a 4 Gy irradiation confirmed resistance to radiotherapy (Figure 2B; Figure S2B). CAL33 Cis-R and CAL27 Cis-R cells formed clones after irradiation, suggesting cross-resistance mechanisms.

CAL33 and CAL27 cell viability was strongly decreased after exposure to moderate and high concentrations of cisplatin (3-10 μM) which was not the case for all resistant cells (Figure 2C; Figure S2C). CAL33 Rad-R were resistant to cisplatin suggesting a "cross resistance".

All resistant CAL33 cells acquired migration

abilities but the ability to migrate was more important for sensitive as compared to resistant CAL27 cells (Figure 2D-E; Figure S2D and S2E). This result suggests that CAL27 cells are intrinsically more aggressive as compared to CAL33 cells. In 3D cell culture conditions, CAL33 and CAL27 resistant cells were more invasive as compared to sensitive cells (Figure 2F-G; Figure S2F-G). These observations strongly suggest that cisplatin and/or radiation resistant cells acquired a more aggressive phenotype.

Onvansertib, a Plk1 inhibitor, is efficient on sensitive and resistant HNSCC cells and enhances cell death by mitotic catastrophe and apoptosis

The efficacy of onvansertib was studied on several types of cancer cells including HNSCC. The translationally controlled tumor protein (TCTP) and the dual specificity phosphatase Cdc25 are both substrates of Plk1. The inhibition of Plk1 by onvansertib decreases the phosphorylation (specific phosphorylation site by Plk1) of these two substrates. This result favors the specificity of action of onvansertib (Figure S3A).

The lowest IC₅₀ was obtained for HNSCC cells as compared to the other cancer cell lines. Onvansertib showed low toxicity on healthy cells even at high concentrations (250 nM, Table S2). The low toxicity and the efficacy at low concentrations suggest the relevance of onvansertib for the treatment of HNSCC. The efficacy of onvansertib assessed by viability tests was confirmed by clonogenicity tests with increasing concentrations of onvansertib, cisplatin and irradiation doses (Figure S3B-C).

Onvansertib inhibited the formation of naïve CAL33 and CAL27 cells from 10 nM (Figure 3A; Figure S4A). Some clones persisted at 3 μM of cisplatin. Onvansertib 25 nM inhibited the formation of clones with all resistant CAL33 and CAL27 cells (Figure 3A; Figure S4A) while 3 μM of cisplatin did not. This experiment suggested the relevance of using onvansertib at relapse on cisplatin/radiotherapy.

Since Plk1 plays a central role in mitosis' entry [23], the impact of onvansertib on the cell cycle was evaluated. Onvansertib induced a misalignment of the chromosomes and therefore a mitotic defect in CAL33 cells (Figure 3B). Onvansertib treatment induced the accumulation of all sensitive and resistant CAL33 and CAL27 cells in the G₂/M phase in a dose dependent manner (Figure 3C; Figure S4B). The phosphorylation on serine 10 of histone 3 (p-H3) and phosphorylation on threonine 199 of nucleophosmin (p-NPM) are hallmarks of condensation of chromosomes [24], duplication of centrosomes and mitosis [25, 26]. Onvansertib increased the

phosphorylation of histone H3 and NPM and clearly induced mitotic arrest of CAL33 and CAL27 cells (Figure 3D; Figure S4C). Basal polyploidy was observed in control condition, however onvansertib enhanced polyploidy with an increased number of

nuclei (accumulation of nuclei, from 8 to 16N, Figure 3E and Figure S4D) as it was shown for CAL27 RR and CAL33 RR (Figure 3F; Figure S4E). These observations are characteristics of the mitotic catastrophe leading to cell death.

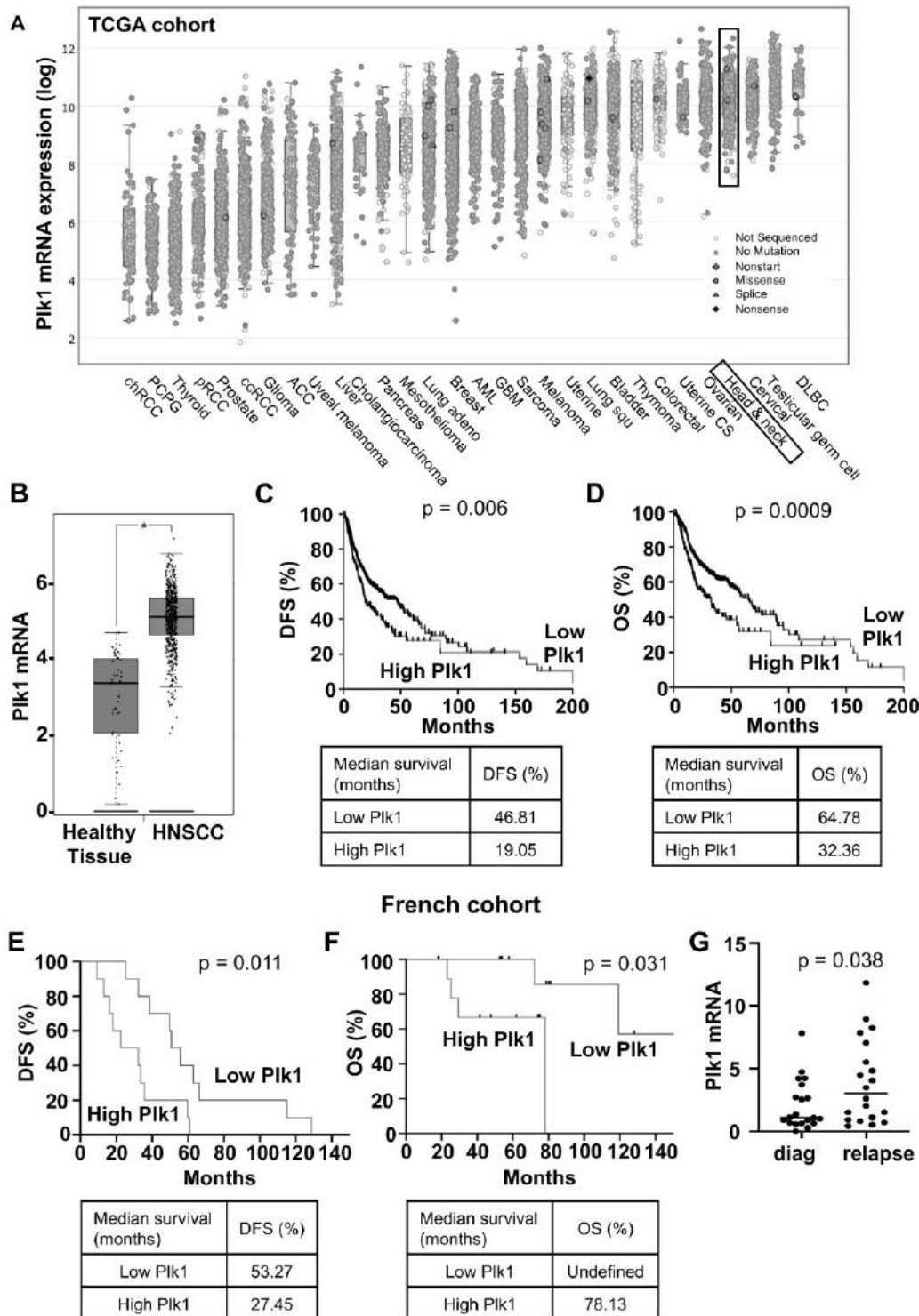


Figure 1. PIK1 is overexpressed in HNSCC patients and is associated with a poor prognosis. The tumors of HNSCC patients were analyzed for PIK1 mRNA levels (z-score). These results are in whole based upon data generated by the TCGA Research Network. **(A)** Comparison of PIK1 mRNA levels in several cancer. **(B)** Comparison of PIK1 mRNA levels between healthy (n = 44) and HNSCC tissues (n = 519). **(C-D)** The levels of PIK1 mRNA in tumors of HNSCC patients correlated with DFS **(C)** and OS **(D)**. **(E-F)** The levels of PIK1 mRNA in patients' tumors from Centre Antoine Lacassagne correlated with DFS **(E)** and OS **(F)**. DFS and OS were calculated from patient subgroups with mRNA levels that were less or greater than the third quartile value. Statistical significance (p value) is indicated. **(G)** PIK1 mRNA measured by qPCR in tumors from Centre Antoine Lacassagne's patients at diagnosis and after relapse to usual treatments (n = 20).

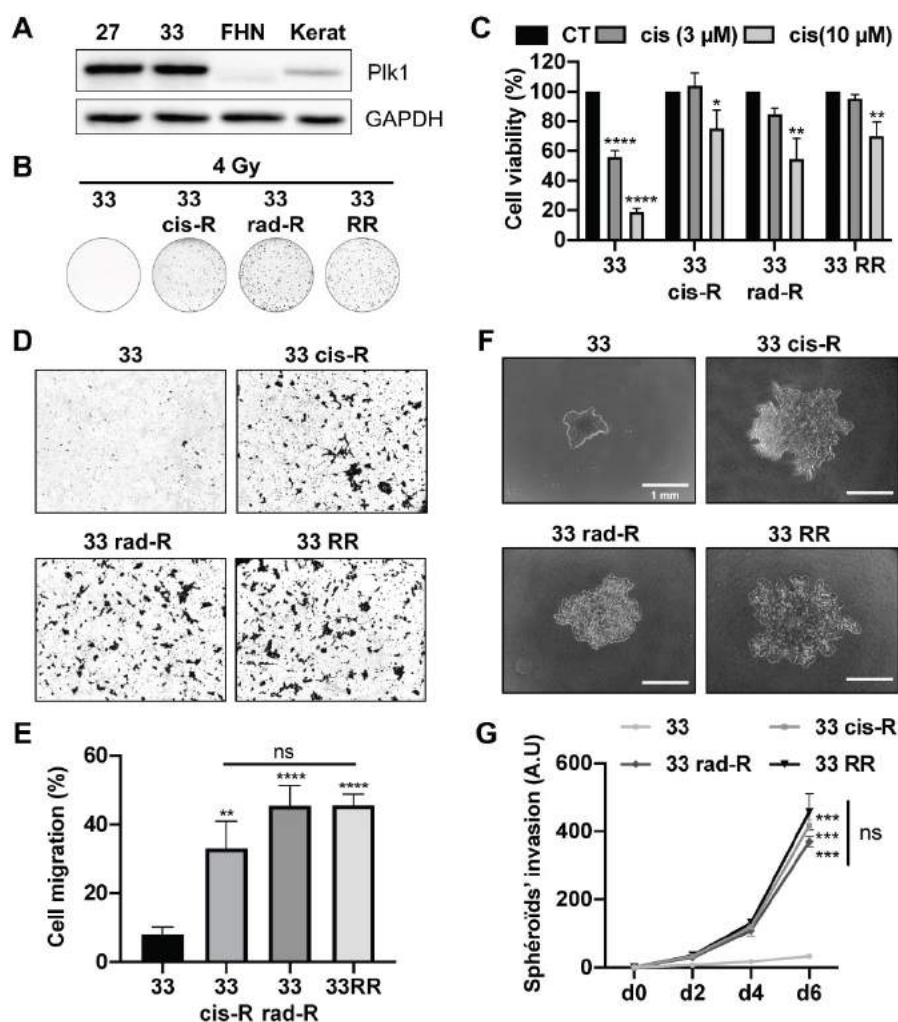


Figure 2. Characterization of CAL33 sensitive and resistant cell lines. (A) Plk1 immunoblotting on keratinocytes (kerat), human fibroblasts (FHN), CAL27 and CAL33 cells. GAPDH served as a loading control. (B) Clonogenicity assay of CAL33, CAL33 cis-R, CAL33 rad-R and CAL33 RR after 4 Gy of radiation (n = 2). (C) Cell viability of CAL33, CAL33 cis-R, CAL33 rad-R and CAL33 RR after 48 h of cisplatin treatment (3 and 10 μM) (n = 3). (D-E) Cell migration using Boyden's chamber assay on CAL27 and CAL33 sensitive and resistant cell lines. Results are expressed as the percentage of the control (n = 3). (F-G) Spheroids' invasion using 3D culture cell assays on sensitive and resistance CAL33 and CAL27 cells (n = 2). Results are expressed as arbitrary units (day 0 used as the control). Statistics were performed using ANOVA test: * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001, **** p < 0.0001.

Onvansertib induced the apoptosis of sensitive and resistant CAL33 and CAL27 cells in a dose dependent manner (annexinV/propidium iodide positive cells, Figure 3G; Figure S4F; PARP cleavage, Figure 3H; Figure S4G).

We confirmed that decreased expression of Plk1 expression by Plk1 siRNA induced apoptosis cell death like onvansertib (Figure S4H).

Onvansertib also inhibited the growth of spheroids and invasive properties of sensitive and resistant CAL33 and CAL27 cells (Figure 3I-J; Figure S4I). Therefore, by targeting Plk1, onvansertib inhibits several hallmarks of cancer aggressiveness *in vitro*.

Onvansertib inhibits the growth of experimental HNSCC in nude mice

Experimental tumors were generated by xenografting CAL33 and CAL33 RR in nude mice. Onvansertib and cisplatin efficacy was compared

when tumors reached 100 mm³. Onvansertib strongly reduced the growth of tumors generated with sensitive (CAL33) cells while cisplatin was less efficient (Figure 4A). Cisplatin did not affect the growth of tumors generated with resistant (CAL33 RR) cells confirming the inefficacy observed *in vitro*. However, onvansertib inhibited the growth of tumors generated with CAL33 RR as efficiently as those generated with sensitive cells (Figure 4A). The onvansertib-treated tumors were smaller (Figure 4B) and necrotic (Figure 4C). The number of proliferating cells assessed by KI-67 (Figure 4D) and the blood vessels density determined by αSMA staining by IHC (Figure 4E) or VEGFA, αSMA and CD31 mRNA levels (Figure 4F-H) were reduced in onvansertib-treated tumors. These results strongly suggest that onvansertib efficacy not only relies on the blockade of tumor cell proliferation but also on the inhibition of angiogenesis.

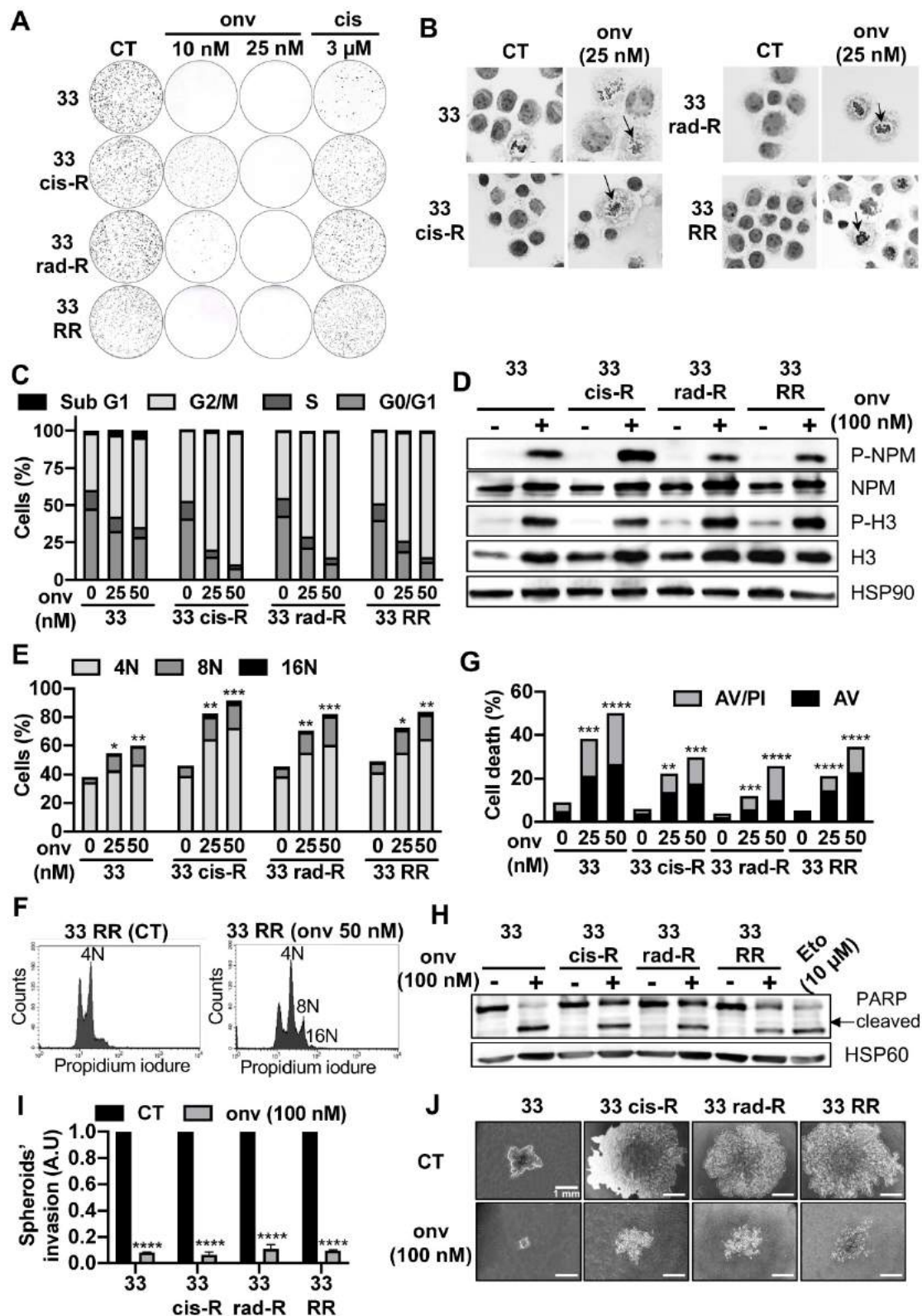


Figure 3. Onvansertib effects on sensitive and resistant CAL33 cell lines. (A) Clonogenicity assay of sensitive and resistant CAL33 cell lines after onvansertib (10 nM and 25 nM) or cisplatin (3 μ M) treatment (n = 2). **(B)** Hematoxylin eosin saffron staining of sensitive and resistant CAL33 cell lines treated with onvansertib (25 nM) for 24 h. Abnormal mitosis was indicated with an arrow. **(C-D)** Cells were treated with onvansertib (25 nM, 50 nM or 100 nM) for 24 h. Cell cycle was measured by flow cytometry (n = 3) **(C)**, G2/M arrest was evaluated by phospho-NPM and, phospho-H3 immunoblotting. HSP90 served as a loading control (n = 2) **(D)**. **(E-F)** Polyploidy (number of nuclei 8N and 16N) was assessed by flow cytometry (n = 3) **(E)**. Representation of polyploidy in CAL33 RR **(F)**. **(G)** Cells were treated with onvansertib (25 nM and 50 nM) for 48 h. Cell death was evaluated by flow cytometry. Cells were stained with propidium iodide (PI) and Annexin V (AV). Histograms show AV⁺/PI⁻ cells (early apoptosis) and AV⁺/PI⁺ cells (late-apoptosis or another cell death) (n = 3). **(H)** Immunostaining of PARP expression on CAL33 cell lines after exposure to onvansertib (100 nM) for 24 h. HSP60 served as loading control (n = 2). **(I-J)** Invasion of sensitive and resistant CAL33 cells using 3D cell culture assay (spheroids) after 6 days of onvansertib treatment (100 nM) grown in **(I)**. Results are represented as arbitrary units (the no-treatment condition was used as a control) (n = 2) **(J)**. Statistics were analyzed using ANOVA tests: * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001, **** p < 0.0001.

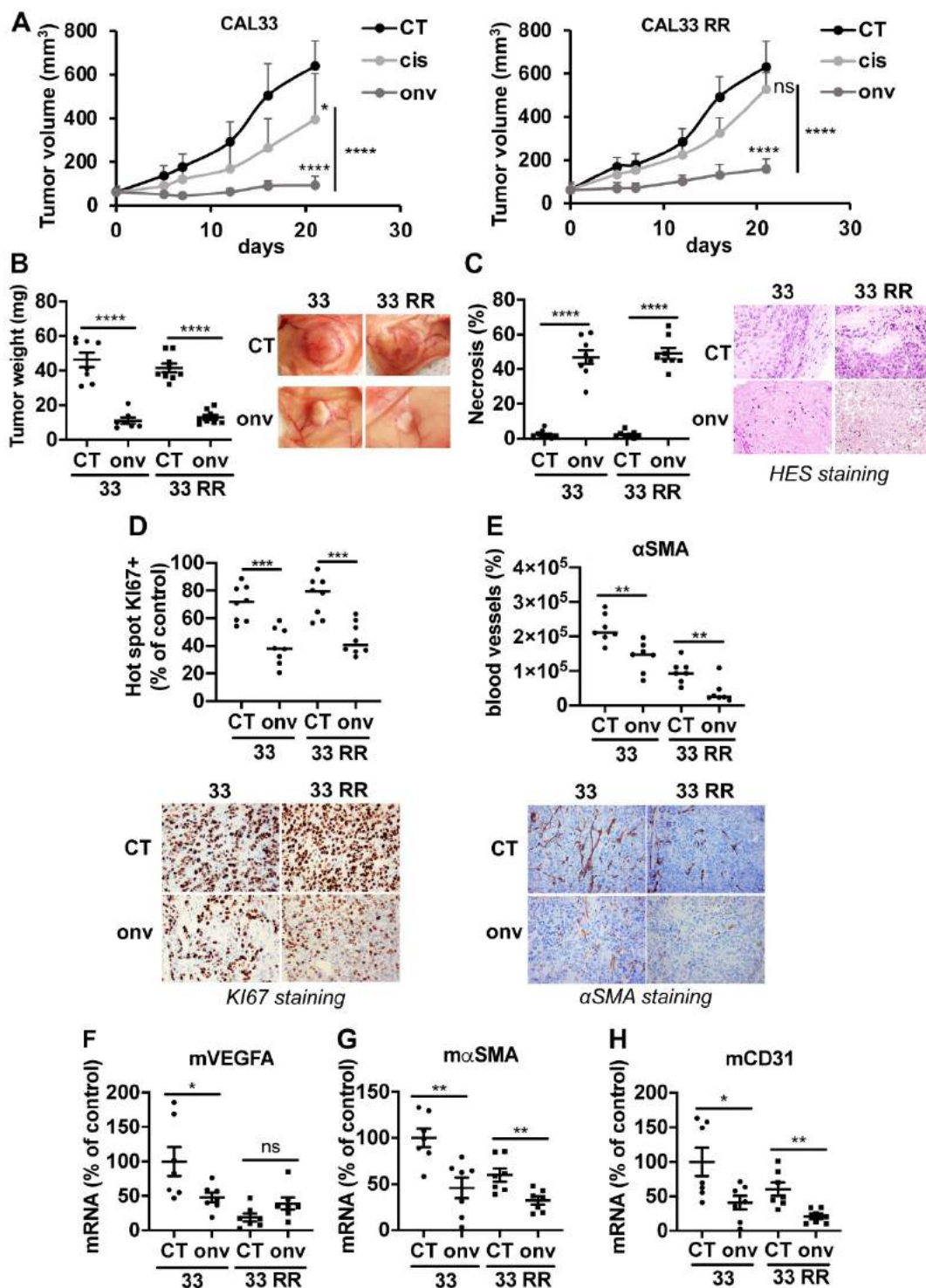


Figure 4. Onvansertib inhibits the growth of experimental tumors in mice. 10⁶ CAL33 or CAL33 RR cells were subcutaneously injected in the flank of nude mice. When the tumors reached 100 mm³, mice were treated with onvansertib (60 mg/Kg) or with cisplatin (4 mg/Kg). (A) The tumor volume was measured twice a week. (B) At the end of the experiment, the weight of tumors has been evaluated and representative pictures of tumors treated or not with onvansertib are shown. (C) Necrosis was quantified in control and onvansertib-treated tumors (HES staining). (D) Pictures and quantification of proliferative cells measured by KI-67 staining. (E) Pictures of blood vessels and quantification evaluated by IHC of α SMA. (F-H) Murine VEGFA (mVEGFA, F), α SMA (m α SMA, G) and CD31 (mCD31, H) mRNA levels in tumors were determined by qPCR. Results are expressed as percent of control. Statistics were performed using an unpaired Student's t test: * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$.

Onvansertib inhibits metastatic spreading and the growth of metastases in the zebrafish

Zebrafishes were used as a relevant model of metastatic dissemination of tumor cells from the site

of injection to the tail [27]. Onvansertib inhibited the local invasion after 72 h of treatment (Figure 5A-B) and the formation of distant metastases from 24 h (Figure 5A-C). From 48 h, onvansertib decreased the size of distant metastases that settled in the tail

(Figure 5D) compared to the control group. Onvansertib reduced the size (more than 60% reduction) and the number of already existing distant

metastases (Figure 5E-F). These results suggest that onvansertib is as efficient on primary tumors as on metastases.

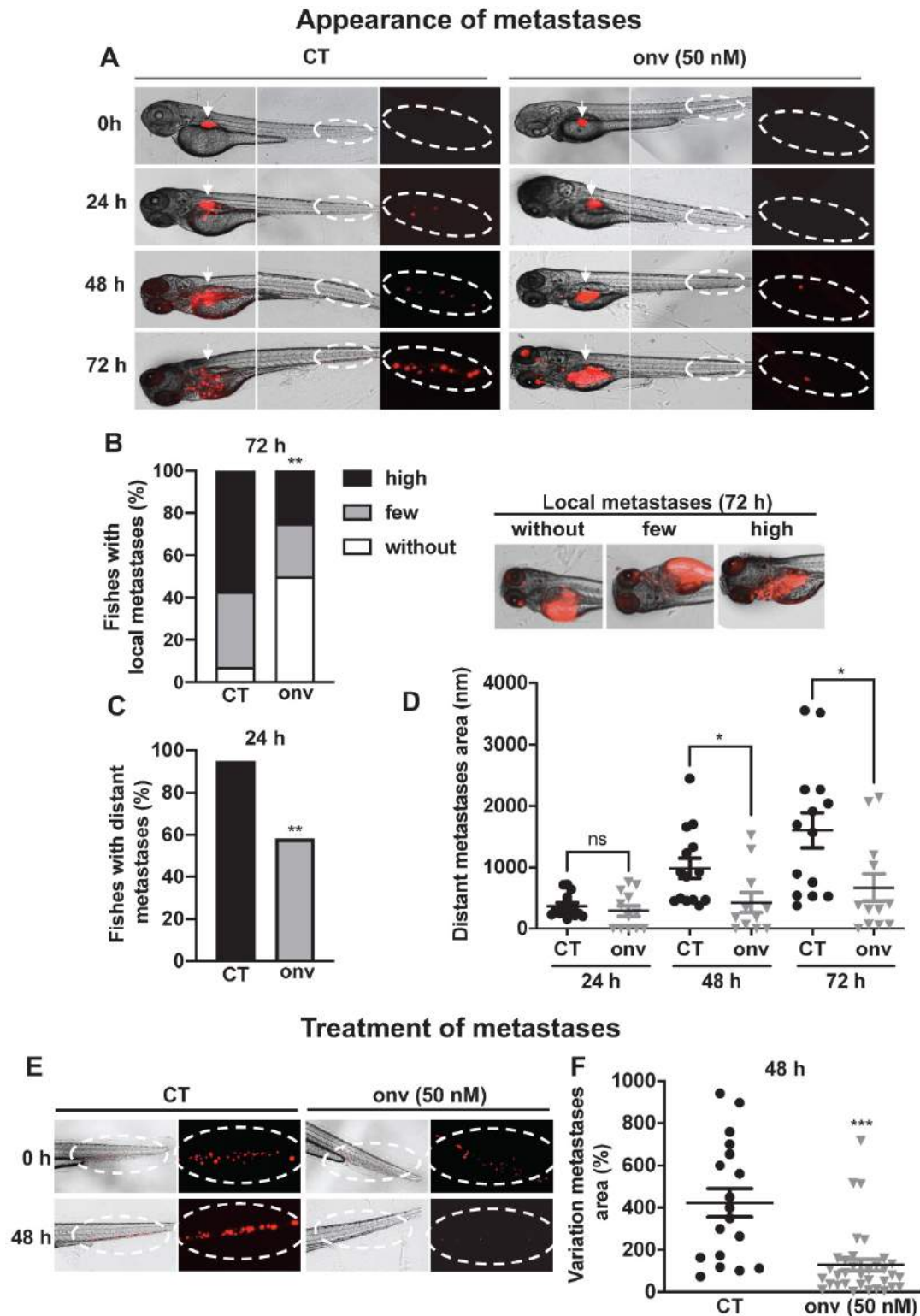


Figure 5. Onvansertib inhibits the formation and growth of CAL33 RR metastases in zebrafish. (A-D) Zebrafish embryos (n = 28) were injected with CAL33 RR (labelled in red) into the perivitelline space and immediately treated with onvansertib (50 nM) for 72 h. Representative images of zebrafishes are shown at 24 h, 48 h and 72 h (A). Quantification and representative images of no, few and high local metastases in the head after 72 h of treatment (B). Percentage of zebrafishes with tumor cells in the tail (distant metastasis) at 24 h were quantified (C). Area of distant metastases at 72 h were quantified (D). (E-F) Zebrafish embryos (n = 48) were injected with CAL33 RR (labelled in red) into the perivitelline space. 24 h later, zebrafish embryos with metastases were treated with onvansertib (50 nM) for 48 h. Representative image of zebrafish are shown (E) and variations of the metastases area before and after treatment were quantified (F). Statistics were performed using an unpaired Student's t test: ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Synergic effect of onvansertib with cisplatin and radiotherapy

To determine a potential synergy, we chose concentrations/doses of each treatment that do not affect clone formation (onvansertib: 5 nM, cisplatin: 1 μ M, irradiation: 2 Gy, Figure S5). In all CAL27 and CAL33 cells, the decrease of clones was obtained with onvansertib 5 nM/2 Gy of irradiation (Figure S5A-B) and onvansertib 5 nM/cisplatin 1 μ M (Figure S5C-D).

For a clinical perspective we then tested the triple combination. Sensitive and resistant CAL27 and CAL33 cells were irradiated at 8 Gy and exposed to onvansertib 25 nM and cisplatin 3 μ M for 72 h (higher but suboptimal doses of each treatment because of a short exposure). Apoptotic cell death increased in sensitive and resistant cells (Figure 6A; Figure S6A). For colony formation assays, we used 2.5 nM onvansertib (Onvansertib 5 nM was lethal when used in a triple combination), cisplatin 1 μ M and 2 Gy of irradiation. The number of clones was reduced as compared to the double combination experiments (Figure 6B-C; Figure S5).

The triple combination (onvansertib 25 nM, cisplatin 3 μ M and 2 Gy) reduced the invasive properties of CAL33 RR and CAL27 RR grown in 3D (Figure 6D-E; Figure S6D-E).

These results suggest that onvansertib could be associated with low concentrations of cisplatin and low doses of irradiations to limit toxicity however inducing a robust therapeutic effect.

Onvansertib alone or in combination with reference treatments induces the death of tumor cells in sections from surgical specimens of HNSCC

HNSCC were operated from six patients, and biopsies were analysed by a pathologist to choose viable parts of the tumors. Two samples correspond to primary HNSCC and three to local relapses after cisplatin and radiotherapy (Table S3).

250 microns sections of these different samples were obtained using a vibratome and contained all the cell populations of the tumor environment. They were treated with increasing concentrations of onvansertib and cisplatin for 4 days. ATP levels were then quantified as a read out of cell viability (illustration of the process in Figure 7A). HES staining detected the different architecture of healthy and tumor tissue. Onvansertib (100 nM) induced necrosis (Figure 7B). Onvansertib (100 nM) and irradiation (2 Gy) presented a high and equivalent efficacy as compared to cisplatin (3 μ M). However, irradiation was more toxic on healthy tissue as compared to onvansertib

(Figure S7). Moreover, we observed differences in the viability of sections treated with cisplatin or irradiation, suggesting an heterogeneous response of the patients (Figure 7C). In combination with cisplatin (3 μ M) and/or irradiation (2 Gy), onvansertib at 50 nM presented a higher efficacy as compared to the treatment alone (Figure 7D). This association showed a low toxicity on healthy tissues (Figure S7). The reference treatments induced heterogeneous efficacy suggesting that half of patients would not experience objective rate response (ORR, Figure 7D). A TUNEL quantification has been done on sections following treatments to evaluate the number of tumor apoptotic cells. This technique eliminates the possible biases encountered with the ATP quantifications. The number of apoptotic cells was higher in sections treated with onvansertib (50 nM and 10 nM) as compared to cisplatin (3 μ M) and irradiation (2 Gy)-treated sections (Figure 7E). The number of apoptotic cells was higher with the triple combination onvansertib (50 nM), cisplatin (3 μ M), 2 Gy as compared to onvansertib alone or cisplatin plus radiotherapy (Figure 7F). The number of apoptotic cells was equivalent to those obtained with onvansertib 100 nM (Figure 7G). Onvansertib, and the combination of onvansertib with the reference treatments also decreased the number of proliferative cells assessed by KI-67 staining (Figure 7H-I). Onvansertib and the triple combination were as effective on primary tumors as on local relapse after cisplatin/radiotherapy.

These experiments represent an upgraded determination of onvansertib relevance on human HNSCC specimens. We suggest its use as a combination treatment with cisplatin/radiotherapy in the first line or alone at relapse. Predetermination of efficacy on diagnostic biopsies may serve to determine the patients eligible for such treatment.

Discussion

To our knowledge, double resistant HNSCC cells to cisplatin and radiotherapy has never been described. They represent ideal tools to identify mechanisms responsible for the relapses in HNSCC. These cells acquired increased migratory and invasive capacities. Unexpectedly, cisplatin resistant cells acquired resistance to radiotherapy and cells resistant to radiotherapy acquired cisplatin resistance. We can consider the term of "cross resistances" induced by radiotherapy and cisplatin. The intercalating agent properties of cisplatin and the induction of DNA breaks by radiotherapy could explain this phenomenon which depends on DNA damages.

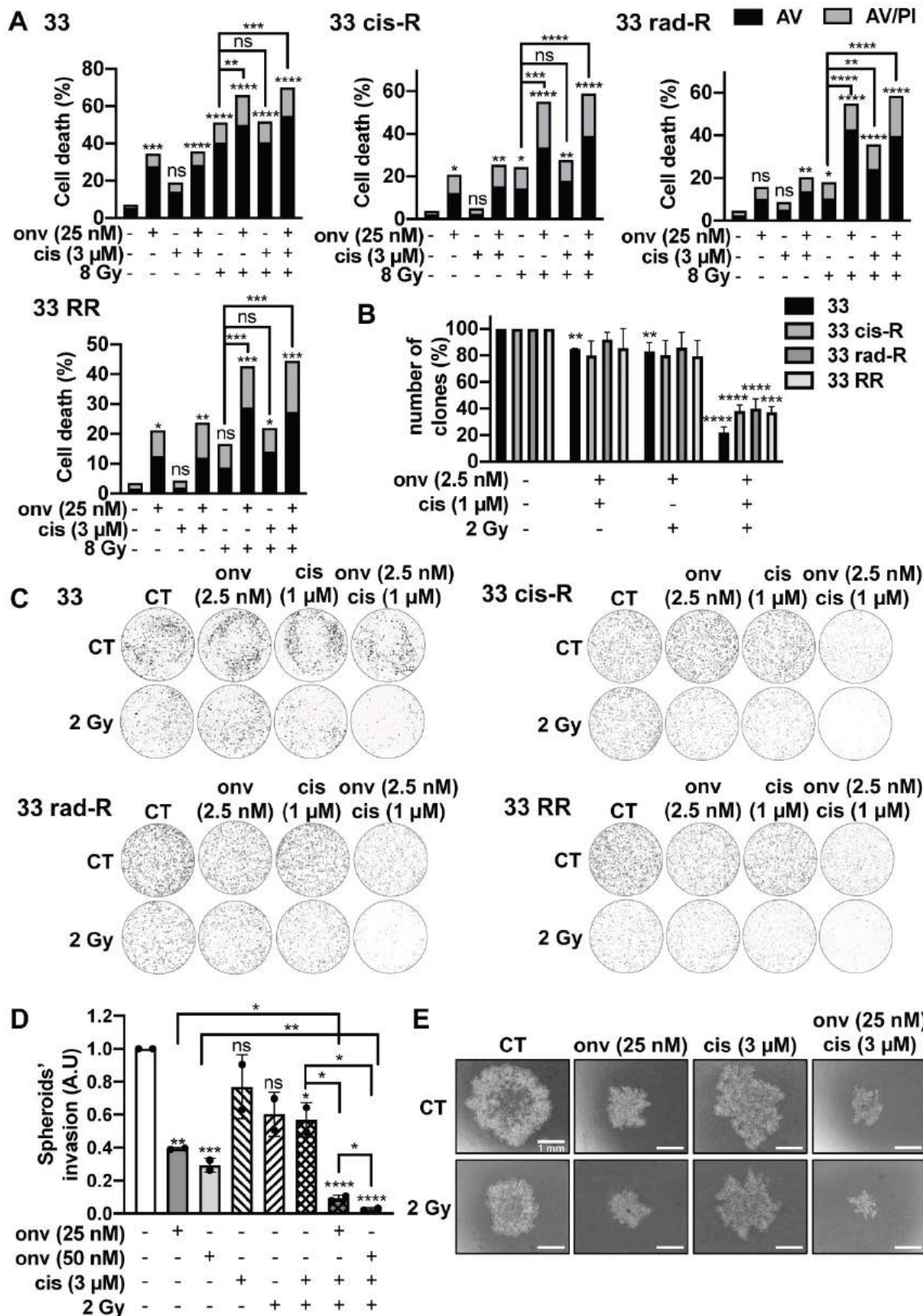


Figure 6. Onvansertib effects in combination with reference treatments (cisplatin and radiotherapy) on sensitive and resistant CAL33 cell lines. (A) Cells were treated 72 h with onvansertib (25 nM) in combination with cisplatin (3 μM) and radiotherapy (8 Gy). Cell death was evaluated by flow cytometry (n = 3). Cells were stained with Propidium Iodure (PI) and Annexin V (AV). Histograms show AV⁺/PI⁻ cells (early-apoptosis) and AV⁺/PI⁺ cells (late-apoptosis or another cell death). **(B-C)** Cells were treated with onvansertib (2.5 nM), cisplatin (1 μM) and radiotherapy (2 Gy). Quantification **(B)** and representative image of clonogenicity assay **(C)** (n = 3). **(D-E)** 3D cell culture assay (spheroid) was treated with the combination of the three treatments: onvansertib (25 nM and 50 nM), cisplatin (3 μM) and radiation (2 Gy) and evaluated after 6 days. Quantification **(D)** and representative image of invasion assay **(E)** (n = 2). Statistics were analyzed using ANOVA test: * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001, **** p < 0.0001 and unpaired Student's t test: * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001, **** p < 0.0001.

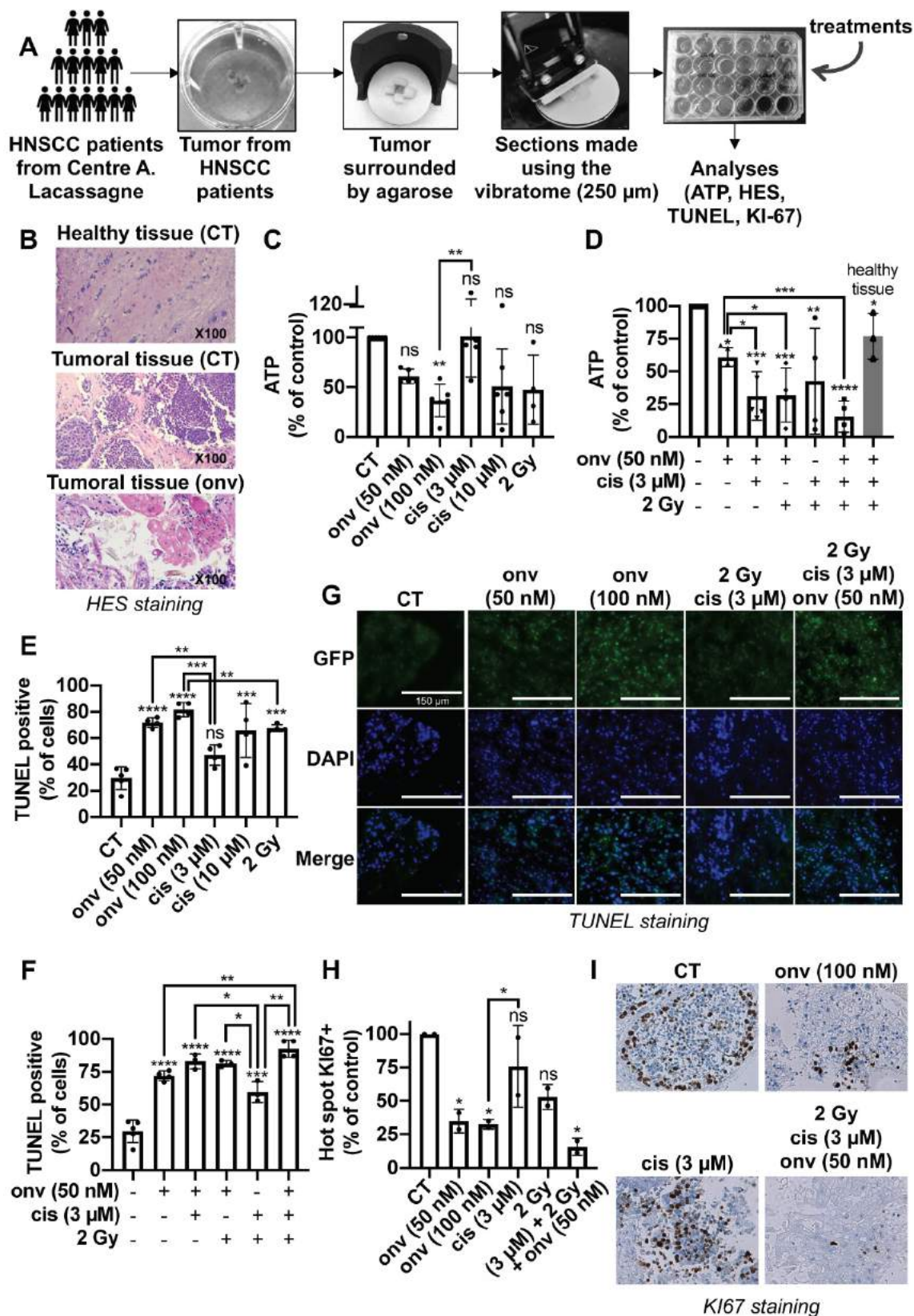


Figure 7. Onvansertib on human tumor sections from HNSCC patients. (A) Tumors from HNSCC patients surrounded by agarose and tumor sections were done using a vibratome. These sections were cultured in a specific medium and treated for 4 days with onvansertib or/and cisplatin or/and radiotherapy. Analyses were then performed (n = 6). (B) Necrosis of biopsies' sections assessed using HES (Hematoxylin Eosin Saffran) staining. (C-I) Biopsies' sections treated with onvansertib (50 nM and 100 nM), cisplatin (3 μM and 10 μM) or radiotherapy (2 Gy) (C, E and H), or treated with onvansertib alone or in combination with cisplatin and radiotherapy (D, F and H). (C-D) ATP quantification of biopsies' sections. (E-G) Quantification of cell death by apoptosis by TUNEL assays on biopsies' sections. (H-I) Pictures and quantification of cell proliferation evaluated by KI-67 staining. Statistics were performed using ANOVA test: * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001, **** p < 0.0001 and unpaired Student's t test: * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001, **** p < 0.0001.

Our objectives were to identify new therapeutic targets to eradicate persistent and/or resistant cells to cisplatin and radiotherapy. Plk1 is a promising target. It is the most investigated member of the Plk family, it plays a central role in the cell cycle [11] and it is overexpressed and associated with a poor prognosis in many cancers including HNSCC [6, 7], melanoma [28], and colon cancer [29]. Hence, we considered Plk1 as an interesting target in these cancers [30]. By *in silico* analysis, we showed that HNSCC express the most Plk1 transcript and its overexpression is associated with a poor prognosis. In the French cohort from Centre Antoine Lacassagne, Plk1 overexpression is higher in patients who relapsed after cisplatin and radiotherapy treatments which strongly suggests an important role during tumor genesis and progression.

Surprisingly, both resistant and sensitive cell lines express the same level of Plk1. Plk1 levels of sensitive cells therefore probably reached a maximal non-modifiable threshold in the resistant cells. This high level is probably due to the low degradation of the protein by the proteasome, a process already described [31]. Moreover, Plk1 interacts with proteins essential for the cell cycle. Dysfunction of these interactions could be associated with the overexpression of Plk1 and its capacity to induce tumor development. Bora/Aurora A activates Plk1 at mitosis entry and have an essential role in ovarian tumor development [32]. E2F and FoxM1, two transcription factors regulate Plk1 expression [33, 34], thus they could be closely related to Plk1-dependent tumor development [35]. Plk1 contributes to carcinogenesis through communication with multiple pathways promoting cancer. Several partners of Plk1 are either tumor suppressor genes or oncogenes. In CAL27 and CAL33, p53 is mutated and inactive. This tumor suppressor is mutated in HNSCC 50% of tumors. Its principal role is to repress Plk1 expression to curb cellular proliferation [36]. However, Plk1 phosphorylates and inhibits p53 activity to avoid its anti-proliferative role [37]. Non-functional p53 does not repress Plk1 expression, allowing its overexpression and the increase of cell proliferation. Plk1 also interacts with tumor suppressors presented as “guardians of genome”. They are involved in checkpoints like DNA damage checkpoints [38, 39] and spindle assembly checkpoint [40-42] to abrogate cell cycle and protect stability of genome. However, in tumor cells, Plk1 deregulation inhibits the activity of checkpoint actors, maintains cell cycle activity, promotes chromosomal instability and tumorigenesis [43].

The hypomethylation of Plk1 promoter could also explain its overexpression and the aggressiveness of HNSCC cells [44].

In addition of its role in tumorigenesis, Plk1 is involved in EMT which leads to cancer cell dissemination and metastasis through c-RAF-ERK signaling among others [45]. Plk1 inhibition using siRNA or pharmacological inhibitors abrogates cancer cell invasion in various cancers like gastric cancer [46].

These arguments are in favor of targeting Plk1 at the diagnosis or after relapse under standard treatments.

Different inhibitors of Plk1 were tested in clinical trials for hematologic and solid tumors, alone or in combination with reference treatments. Rigosertib (ON01910.Na), a non-ATP competitive molecule and a specific inhibitor of Plk1 and PI3K [47], was tested in phase I in patients with advanced solid tumors. An objective response was described for HNSCC patients, but it did not improve the overall survival of patients with pancreatic carcinoma in combination with gemcitabine in phase III [48].

Volasertib is an ATP-competitive and specific inhibitor of Plk1. It has been tested in phase I of advanced solid tumors, in combination with nintedanib. An objective response was obtained and the treatment was well tolerated [49]. In a phase III trial in combination with cytarabine, no benefit was described for patients with relapse/refractory acute myeloid leukemia (clinicaltrials.gov, NCT01721876).

Onvansertib is the most specific and selective Plk1 inhibitor. It shows 5000-fold selectivity for Plk1 compared to Plk2/Plk3 [16] while Plk1 inhibition by volasertib exhibits only 6- and 65-fold greater selectivity against Plk2 and Plk3 respectively. Rigosertib targets Plk1 and shows only a 30-fold greater selectivity against Plk2, PDGFR, Flt1, BCR-ABL, Fyn, Src, and CDK1 [50]. These observations confirmed that onvansertib presents a higher specificity for Plk1 as compared to the others Plk1 inhibitors.

Onvansertib is already tested in clinical trial and is now in phase II trials to determine its efficacy on a larger sample of patients. These trials involve patients with untreated acute myeloid leukemia (clinicaltrials.gov, NCT03303339), metastatic colorectal cancer (clinicaltrials.gov, NCT03829410) and metastatic castration-resistant prostate cancer (clinicaltrials.gov, NCT03414034). The patients received onvansertib in combination with reference treatments usually used in each type of cancers.

Despite these clinical trials using onvansertib, HNSCC is the cancer for which the inhibition of Plk1 is the most promising regarding our results (Table S2). Hence, testing onvansertib in clinical trials to increase the lifespan of HNSCC patients represents an important follow-up of our experiments.

Plk1 inhibition results in mitotic catastrophe leading to the decrease of proliferation, cell cycle arrest and apoptosis in HNSCC cells. Onvansertib inhibitor is promising since it has low toxicity on healthy cells and high efficacy on HNSCC sensitive and resistant cells. The inhibition of Plk1 function by onvansertib induced a cell cycle arrest, a defect of mitosis, polyploidy, and apoptosis in resistant and sensitive cells. Onvansertib inhibits their capacities to proliferate, to invade and to form metastases. To complete this *in vitro* study, we also used onvansertib *in vivo*, in two different and complementary models (mice and zebrafish). Tumor growth and metastasis formation were reduced with onvansertib in both models. Plk1 inhibition also induced sensitivity to cisplatin like in ovarian cancer [51] and also to radiotherapy in glioblastoma [52] and osteosarcoma [53]. The association of onvansertib and cisplatin and/or radiotherapy, increased cell death meaning that Plk1 inhibition potentiated cisplatin and radiotherapy effects and re-sensitized resistant cell lines to cisplatin and radiotherapy treatments. The association of the three treatments should reduce concentrations of each treatment to avoid toxicity and side effects in patients. Hence, onvansertib could be combined to radiotherapy and cisplatin at the diagnosis (reduce doses to limit toxicity and increased anti-tumor efficacy) but also when patients relapse.

To complete *in vitro* and *in vivo* experiments, onvansertib has been tested on tumors sections of biopsies from HNSCC. It presented a higher efficacy at low concentrations compared to cisplatin and radiotherapy. By combining onvansertib with cisplatin and radiotherapy, its concentration has been divided by two and its efficacy was improved. This association re-sensitize to cisplatin and radiotherapy all tumors that are resistant to these treatment (60% of HNSCC patients tested have already have cisplatin/radiotherapy treatment and relapse). In patients, reduced concentrations of each treatment should decrease their toxicity and side effects while maintaining high efficiency. Moreover, this triple association is as efficient in primary tumors as in local relapse. Thus, onvansertib could be used as a first-line treatment in combination with cisplatin and radiotherapy to increase their efficacy and to prevent acquired resistance but also when patients relapse to cisplatin/radiotherapy.

This study represents a proof of concept to initiate clinical trials using onvansertib for patient in therapeutic failure or in the first line in combination with cisplatin and radiotherapy. Based on our results we can expect spectacular responses with increase progression free or overall survival.

Supplementary Material

Supplementary figures and tables.

<http://www.thno.org/v11p9571s1.pdf>

Acknowledgements

This work was supported by the French Association for Cancer Research (ARC), the Fondation de France, the Ligue Nationale contre le Cancer (Equipe Labellisée 2019) the French National Institute for Cancer Research (INCA), the National Agency for Research (ANR) and the FX Mora and Flavien Foundations. This study was conducted as part of the Centre Scientifique de Monaco Research Program, funded by the Government of the Principality of Monaco. We thank the IRCAN core facilities (animal, cytometry and histopathology facilities) for technical help. We thank Dr Thierry Magnaldo for keratinocyte cells. We also thank the Department of Pathology, especially Arnaud Borderie and Sandrine Destree, for technical help.

Author Contributions

M.D and G.P supervised the entire project and participated to the design and analyses of experiments, A.H designed, conducted experiments, and make analyses. O.R and J.P performed experiments. AH, M.D and G.P wrote the manuscript. F.L participated to the writing of manuscript. J.D and E.S reunited clinical information on HNSCC patients. E.C performed informatics analysis of clonogenic tests. A.B, J.B and J.R provided patients' biopsies. J.R provided samples of patients at diagnosis and relapse, and gave clinical information of HNSCC patients. I.B supervised the irradiation experiments. Y.C and H.X participated to zebrafish experiments in Sweden. D.A made HES, KI-67 and α SMA staining on patients' biopsies.

Competing Interests

The authors have declared that no competing interest exists.

References

1. Inglehart RC, Scanlon CS, D'Silva NJ. Reviewing and reconsidering invasion assays in head and neck cancer. *Oral oncology*. 2014; 50: 1137-43.
2. Hunter KD, Parkinson EK, Harrison PR. Profiling early head and neck cancer. *Nat Rev Cancer*. 2005; 5: 127-35.
3. Neville BW, Day TA. Oral cancer and precancerous lesions. *CA Cancer J Clin*. 2002; 52: 195-215.
4. Báez A. Genetic and Environmental Factors in Head and Neck Cancer Genesis. *Journal of Environmental Science and Health, Part C*. 2008; 26: 174-200.
5. Takai N, Hamanaka R, Yoshimatsu J, Miyakawa I. Polo-like kinases (Plks) and cancer. *Oncogene*. 2005; 24: 287-91.
6. Knecht R, Oberhauser C, Strebhardt K. PLK (polo-like kinase), a new prognostic marker for oropharyngeal carcinomas. *Int J Cancer*. 2000; 89: 535-6.
7. Knecht R, Elez R, Oechler M, Solbach C, von Ilberg C, Strebhardt K. Prognostic significance of polo-like kinase (PLK) expression in squamous cell carcinomas of the head and neck. *Cancer Res*. 1999; 59: 2794-7.
8. Sunkel CE, Glover DM. polo, a mitotic mutant of *Drosophila* displaying abnormal spindle poles. 1988: 14.

9. de Cárcer G, Manning G, Malumbres M. From Plk1 to Plk5: Functional evolution of polo-like kinases. *Cell Cycle*. 2011; 10: 2255-62.
10. Lowery DM, Clauser KR, Hjerrild M, Lim D, Alexander J, Kishi K, et al. Proteomic screen defines the Polo-box domain interactome and identifies Rock2 as a Plk1 substrate. *The EMBO Journal*. 2007; 26: 2262-73.
11. Petronczki M, Lénárt P, Peters J-M. Polo on the Rise – from Mitotic Entry to Cytokinesis with Plk1. *Developmental Cell*. 2008; 14: 646-59.
12. Takaki T, Trenz K, Costanzo V, Petronczki M. Polo-like kinase 1 reaches beyond mitosis-cytokinesis, DNA damage response, and development. *Current opinion in cell biology*. 2008; 20: 650-60.
13. Seki A, Coppinger JA, Jang C-Y, Yates JR, Fang G, Bora and the Kinase Aurora A Cooperatively Activate the Kinase Plk1 and Control Mitotic Entry. *Science*. 2008; 320: 1655-8.
14. de Boer DV, Martens-de Kemp SR, Buijze M, Stigter-van Walsum M, Bloemena E, Dietrich R, et al. Targeting PLK1 as a novel chemopreventive approach to eradicate preneoplastic mucosal changes in the head and neck. *Oncotarget*. 2017; 8: 97928-40.
15. Spänkuch-Schmitt B, Bereiter-Hahn J, Kaufmann M, Strebhardt K. Effect of RNA silencing of polo-like kinase-1 (PLK1) on apoptosis and spindle formation in human cancer cells. *J Natl Cancer Inst*. 2002; 94: 1863-77.
16. Valsasina B, Beria I, Alli C, Alzani R, Avanzi N, Ballinari D, et al. NMS-P937, an Orally Available, Specific Small-Molecule Polo-like Kinase 1 Inhibitor with Antitumor Activity in Solid and Hematologic Malignancies. *Molecular Cancer Therapeutics*. 2012; 11: 1006-16.
17. Sero V, Tavanti E, Vella S, Hattinger CM, Fanelli M, Michelacci F, et al. Targeting polo-like kinase 1 by NMS-P937 in osteosarcoma cell lines inhibits tumor cell growth and partially overcomes drug resistance. *Investigational New Drugs*. 2014; 32: 1167-80.
18. Affatato R, Carrassa L, Chilà R, Lupi M, Restelli V, Damia G. Identification of PLK1 as a New Therapeutic Target in Mucinous Ovarian Carcinoma. *Cancers (Basel)*. 2020; 12.
19. Casolaro A, Golay J, Albanese C, Ceruti R, Patton V, Criolioli S, et al. The Polo-Like Kinase 1 (PLK1) Inhibitor NMS-P937 Is Effective in a New Model of Disseminated Primary CD56+ Acute Monoblastic Leukaemia. *PLoS ONE*. 2013; 8: e58424.
20. Rheinwald JG, Green H. Epidermal growth factor and the multiplication of cultured human epidermal keratinocytes. *Nature*. 1977; 265: 421-4.
21. Wagenblast J, Hirth D, Eckardt A, Leinung M, Diensthuber M, Stover T, et al. Antitumoral effect of PLK-1-inhibitor BI2536 in combination with cisplatin and docetaxel in squamous cell carcinoma cell lines of the head and neck. *Mol Clin Oncol*. 2013; 1: 286-90.
22. Wagenblast J, Hirth D, Thron L, Arnoldner C, Diensthuber M, Stover T, et al. Effects of the Polo-like-kinase-1-inhibitor BI2536 in squamous cell carcinoma cell lines of the head and neck. *Oncol Lett*. 2012; 4: 175-7.
23. Roshak AK, Capper EA, Imburgia C, Fornwald J, Scott G, Marshall LA. The human polo-like kinase, PLK, regulates cdc2/cyclin B through phosphorylation and activation of the cdc25C phosphatase. *Cell Signal*. 2000; 12: 405-11.
24. Wang F, Higgins JM. Histone modifications and mitosis: countermarks, landmarks, and bookmarks. *Trends Cell Biol*. 2013; 23: 175-84.
25. Chan N, Lim TM. Cytoplasmic nucleophosmin has elevated T199 phosphorylation upon which G2/M phase progression is dependent. *Sci Rep*. 2015; 5: 11777.
26. Okuda M, Horn HF, Tarapore P, Tokuyama Y, Smulian AG, Chan PK, et al. Nucleophosmin/B23 is a target of CDK2/cyclin E in centrosome duplication. *Cell*. 2000; 103: 127-40.
27. Lu J, Xin S, Meng H, Veldman M, Schoenfeld D, Che C, et al. A novel anti-tumor inhibitor identified by virtual screen with PLK1 structure and zebrafish assay. *PLoS One*. 2013; 8: e53317.
28. Kneisel L, Strebhardt K, Bernd A, Wolter M, Binder A, Kaufmann R. Expression of polo-like kinase (PLK1) in thin melanomas: a novel marker of metastatic disease. *J Cutan Pathol*. 2002; 29: 354-8.
29. Takahashi T, Sano B, Nagata T, Kato H, Sugiyama Y, Kunieda K, et al. Polo-like kinase 1 (PLK1) is overexpressed in primary colorectal cancers. *Cancer Sci*. 2003; 94: 148-52.
30. Liu Z, Sun Q, Wang X. PLK1, A Potential Target for Cancer Therapy. *Transl Oncol*. 2017; 10: 22-32.
31. Shirayama M, Zachariae W, Ciosk R, Nasmyth K. The Polo-like kinase Cdc5p and the WD-repeat protein Cdc20p/fizzy are regulators and substrates of the anaphase promoting complex in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J*. 1998; 17: 1336-49.
32. Parrilla A, Barber M, Majem B, Castellví J, Morote J, Sánchez JL, et al. Aurora Borealis (Bora), Which Promotes Plk1 Activation by Aurora A, Has an Oncogenic Role in Ovarian Cancer. *Cancers*. 2020; 12: 886.
33. Laoukili J, Kooistra MRH, Brás A, Kauw J, Kerkhoven RM, Morrison A, et al. FoxM1 is required for execution of the mitotic programme and chromosome stability. *Nature Cell Biology*. 2005; 7: 126-36.
34. Olsson AY, Feber A, Edwards S, Te Poole R, Giddings I, Merson S, et al. Role of E2F3 expression in modulating cellular proliferation rate in human bladder and prostate cancer cells. *Oncogene*. 2007; 26: 1028-37.
35. Wilson JL, Wang L, Zhang Z, Hill NS, Polgar P. Participation of PLK1 and FOXM1 in the hyperplastic proliferation of pulmonary artery smooth muscle cells in pulmonary arterial hypertension. *PLOS ONE*. 2019; 14: e0221728.
36. McKenzie L, King S, Marcar L, Nicol S, Dias SS, Schumm K, et al. p53-dependent repression of polo-like kinase-1 (PLK1). *Cell Cycle*. 2010; 9: 4200-12.
37. Ando K, Ozaki T, Yamamoto H, Furuya K, Hosoda M, Hayashi S, et al. Polo-like kinase 1 (Plk1) inhibits p53 function by physical interaction and phosphorylation. *J Biol Chem*. 2004; 279: 25549-61.
38. Lee HJ, Hwang HI, Jang YJ. Mitotic DNA damage response: Polo-like kinase-1 is dephosphorylated through ATM-Chk1 pathway. *Cell Cycle*. 2010; 9: 2389-98.
39. Zhang W, Fletcher L, Muschel RJ. The role of Polo-like kinase 1 in the inhibition of centrosome separation after ionizing radiation. *J Biol Chem*. 2005; 280: 42994-9.
40. von Schubert C, Cubizolles F, Bracher Jasmine M, Sliedrecht T, Kops Geert JPL, Nigg Erich A. Plk1 and Mps1 Cooperatively Regulate the Spindle Assembly Checkpoint in Human Cells. *Cell Reports*. 2015; 12: 66-78.
41. Ehlén Å, Martin C, Miron S, Julien M, Theillet F-X, Ropars V, et al. Proper chromosome alignment depends on BRCA2 phosphorylation by PLK1. *Nature Communications*. 2020; 11: 1819.
42. Elowe S, Hummer S, Uldschmid A, Li X, Nigg EA. Tension-sensitive Plk1 phosphorylation on BubR1 regulates the stability of kinetochore microtubule interactions. *Genes & Development*. 2007; 21: 2205-19.
43. Gheghiani L, Wang L, Zhang Y, Moore XTR, Zhang J, Smith SC, et al. PLK1 induces chromosomal instability and overrides cell cycle checkpoints to drive tumorigenesis. *Cancer Res*. 2020.
44. Ward A, Sivakumar G, Kanjeeal S, Hamm C, Labute BC, Shum D, et al. The deregulated promoter methylation of the Polo-like kinases as a potential biomarker in hematological malignancies. *Leuk Lymphoma*. 2015; 56: 2123-33.
45. Wu J, Ivanov AI, Fisher PB, Fu Z. Polo-like kinase 1 induces epithelial-to-mesenchymal transition and promotes epithelial cell motility by activating CRAF/ERK signaling. *Elife*. 2016; 5.
46. Song R, Hou G, Yang J, Yuan J, Wang C, Chai T, et al. Effects of PLK1 on proliferation, invasion and metastasis of gastric cancer cells through epithelial-mesenchymal transition. *Oncol Lett*. 2018; 16: 5739-44.
47. Bowles DW, Diamond JR, Lam ET, Weekes CD, Astling DP, Anderson RT, et al. Phase I study of oral rigosertib (ON 01910.Na), a dual inhibitor of the PI3K and Plk1 pathways, in adult patients with advanced solid malignancies. *Clin Cancer Res*. 2014; 20: 1656-65.
48. O'Neil BH, Scott AJ, Ma WW, Cohen SJ, Aisner DL, Menter AR, et al. A phase II/III randomized study to compare the efficacy and safety of rigosertib plus gemcitabine versus gemcitabine alone in patients with previously untreated metastatic pancreatic cancer. *Ann Oncol*. 2015; 26: 1923-9.
49. de Braud F, Cascinu S, Spitaleri G, Pilz K, Clementi L, Liu D, et al. A phase I, dose-escalation study of volasertib combined with nintedanib in advanced solid tumors. *Ann Oncol*. 2015; 26: 2341-6.
50. Gumireddy K, Reddy MVR, Cosenza SC, Nathan RB, Baker SJ, Papatani N, et al. ON01910, a non-ATP-competitive small molecule inhibitor of Plk1, is a potent anticancer agent. *Cancer Cell*. 2005; 7: 275-86.
51. Guo P, Xiong X, Zhang S, Peng D. miR-100 resensitizes resistant epithelial ovarian cancer to cisplatin. *Oncol Rep*. 2016; 36: 3552-8.
52. Tandle AT, Kramp T, Kil WJ, Halthore A, Gehlhaus K, Shankavaram U, et al. Inhibition of polo-like kinase 1 in glioblastoma multiforme induces mitotic catastrophe and enhances radiosensitisation. *Eur J Cancer*. 2013; 49: 3020-8.
53. Gerster K, Shi W, Ng B, Yue S, Ito E, Waldron J, et al. Targeting polo-like kinase 1 enhances radiation efficacy for head-and-neck squamous cell carcinoma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2010; 77: 253-60.

Figure S1. Impact of Plk1 expression on lymph node invasion and HPV status.

(A) Analysis of the levels of Plk1 mRNA in HNSCC patients with (N1) or without (N0) lymph node metastasis. (B) Analysis of the levels of Plk1 mRNA in HNSCC patients with or without (N0) HPV infection.

Figure S2. Characterization of CAL27 sensitive and resistant cell lines. (A) Plk1

Immunoblotting realized on CAL33 and CAL27 sensitive and resistant cell lines. GAPDH and ARD1 served as loading controls. (B) Clonogenicity assays of CAL27, CAL27 cis-R and CAL27 RR after 4 Gy of radiation (n = 2). (C) Cell viability evaluated by XTT assays on CAL27, CAL27 cis-R and CAL27 RR after 48 h of cisplatin treatment (n = 3). (D-E) Cell migration using Boyden's chamber assay on CAL27 sensitive and resistant cell lines (D). Results are expressed as the percentage of the control (n = 3) (E). (F-G) Spheroids' invasion using 3D culture cell assays on sensitive and resistance CAL27 cells (F). Results are expressed as arbitrary units (day 0 used as the control) (n = 2) (G). Statistics were performed using ANOVA test: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$.

Figure S3. Specificity and efficacy of onvansertib. (A) Onvansertib inhibits the

phosphorylation of two Plk1 substrates, TCTP and Cdc25C. The phosphorylation of TCTP and Cdc25C in CAL27RR (left) and CAL33RR (right) was determined by immunoblots. GAPDH served as a loading control. (B) Quantification of the number of colonies in naive, Cis-R, Rad-R, and RR CAL33 and CAL27 cells treated with increasing doses of onvansertib, cisplatin and radiotherapy. (C) Clonogenicity assays on sensitive and resistant CAL33 and CAL27 cells treated with increasing doses of onvansertib, cisplatin and radiotherapy. Statistics were performed using ANOVA test: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$.

Figure S4. Onvansertib effects on sensitive and resistant CAL27 cells. (A) Clonogenicity assays on sensitive and resistant CAL27 cells after treatment by onvansertib (10 nM, 25 nM) or cisplatin (3 μ M) (n = 2). (B-C) CAL27 cells were treated with different concentrations of onvansertib (10 nM, 25 nM, 50 nM) for 24 h. Cell cycle was measured by flow cytometry (n = 3) (B). G2/M arrest was evaluated by phospho-NPM and, phospho-H3 immunoblotting. HSP90 served as a loading control (n = 2) (C). (D-E) Polyploidy (number of nuclei 8N and 16N) was assessed by flow cytometry (D). Representation of polyploidy in CAL27 RR (n = 3) (E). (F) Cells were treated with onvansertib (25 nM, 50 nM) for 48 h. Cell death was evaluated by flow cytometry. Cells were stained with PI and Annexin V. Histograms show AV⁺/PI⁻ cells (apoptosis) and AV⁺/PI⁺ cells (post-apoptosis or another cell death) (n = 3). (G) Immunostaining of PARP expression on sensitive and resistant CAL27 cells after an exposure to different concentrations of onvansertib (100 nM) for 24h. HSP60 antibody was used as a loading control (n = 2). (H) Apoptosis mediated by siRNA dependent inhibition of Plk1 expression evaluated by annexin V and propidium iodide staining after 96 h and 120 h. Effects of Plk1-directed siRNA on Plk1 expression by immunoblot after 48 h. GAPDH is shown as a loading control. Statistics were performed using Student's *t test*: *** $p < 0.001$ (n = 3). (I) Spheroid invasion using 3D cell culture assay on sensitive and resistant CAL27 cells after 6 days of onvansertib treatment (100 nM). Results are represented as arbitrary units (CT condition used as the reference 100%) (n = 2). Statistics were performed using ANOVA test: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$.

Figure S5. Efficacy of onvansertib alone or in combination with cisplatin or radiotherapy. (A-D) Clonogenicity assays realized on sensitive and resistant CAL33 and CAL27 cells treated with onvansertib (5 nM) in combination with radiotherapy (2

Gy) (**A-B**) or in combination with cisplatin (1 μ M) (n = 3) (**C-D**). (**E**) Analyzes of synergic effects of onvansertib (2.5 nM or 5 nM) in combination with cisplatin (1 μ M) or radiotherapy (2 Gy) or both (n = 3).

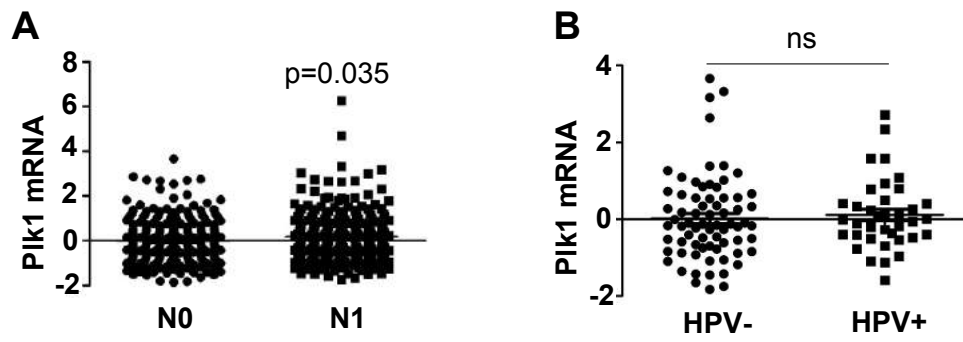
Figure S6. Onvansertib effects in combination with reference treatments (cisplatin and radiotherapy) on sensitive and resistant CAL27 cells. (**A**) CAL27 cells were treated with onvansertib (25 nM) in combination with cisplatin (1 μ M) and radiotherapy (8 Gy) for 72 h. Cell death was evaluated by flow cytometry (PI and Annexin V). Histograms show AV⁺/PI⁻ cells (apoptosis) and AV⁺/PI⁺ cells (post-apoptosis or another cell death). (**B-C**) Cells were treated with onvansertib (2.5 nM), cisplatin (1 μ M) and radiotherapy (2 Gy). Representative images (**B**) and quantification (**C**) of clonogenicity assays. (**D-E**) Spheroids were treated with onvansertib (25 nM), cisplatin (3 μ M) and radiotherapy (2 Gy) for 6 days. Results are represented as arbitrary units (no treatment condition used as the reference 100%) (n = 2). Statistics were performed using ANOVA test: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ and unpaired Student's *t* test: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, **** $p < 0.0001$.

Figure S7. onvansertib effects in combination with reference treatments (cisplatin and radiotherapy) on healthy tissues. ATP quantification of healthy tissues treated with onvansertib (100 nM), cisplatin (10 μ M) and radiotherapy (2 Gy) alone or in combination.

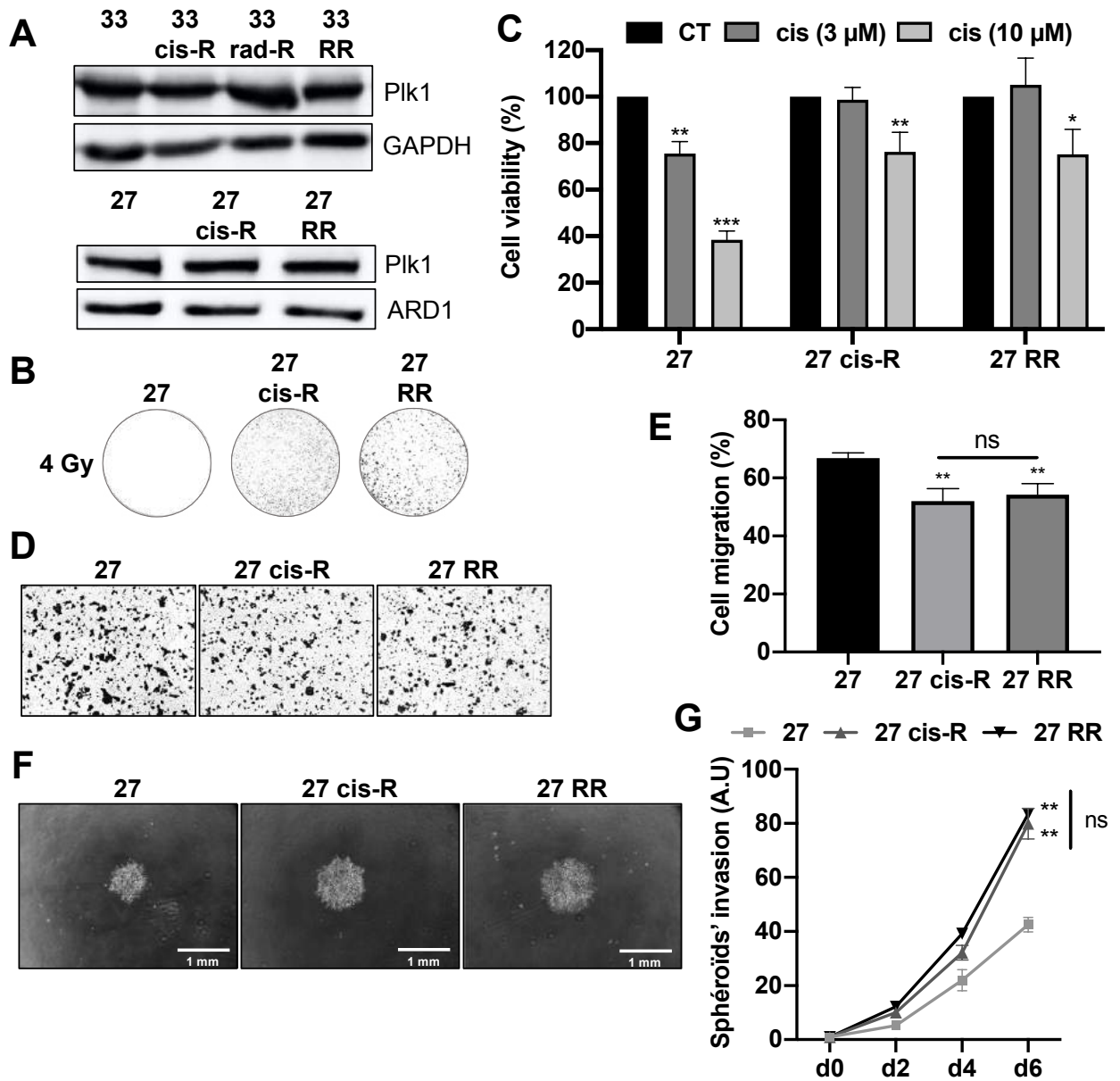
Table S1. Characteristics of the patients included in the study (n = 20).

Table S2. IC50 for cell viability (XTT assays) under onvansertib on different cancer cell lines.

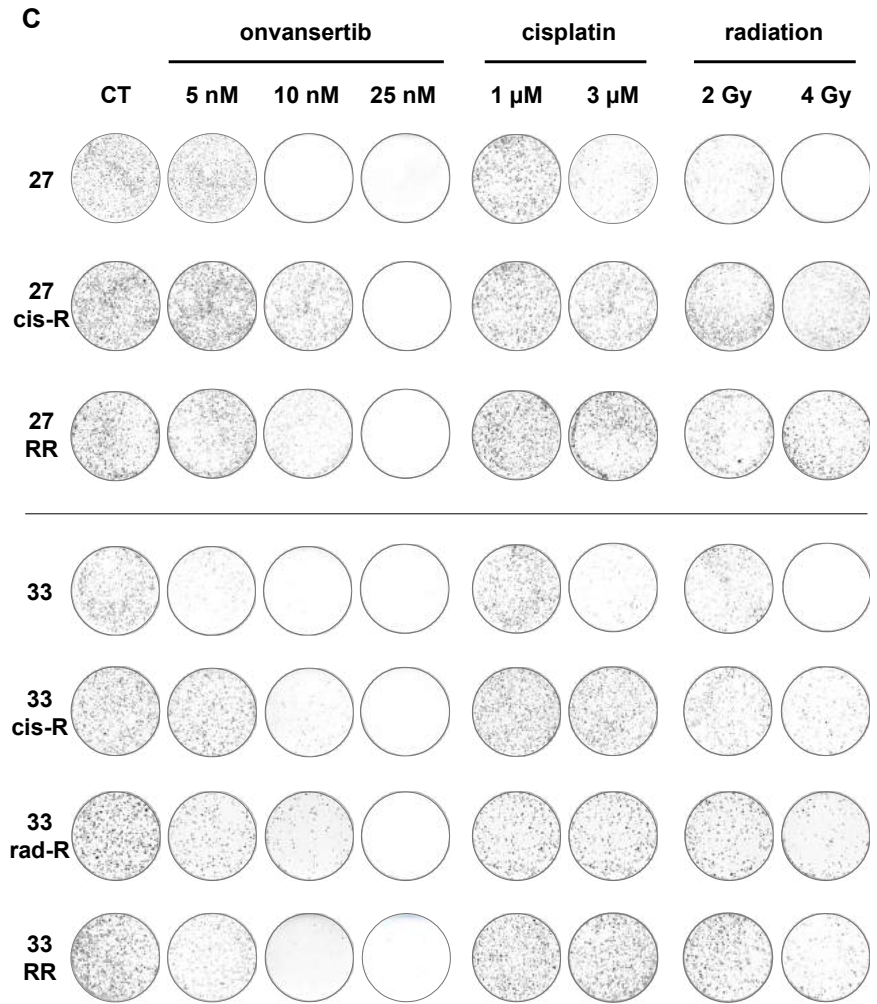
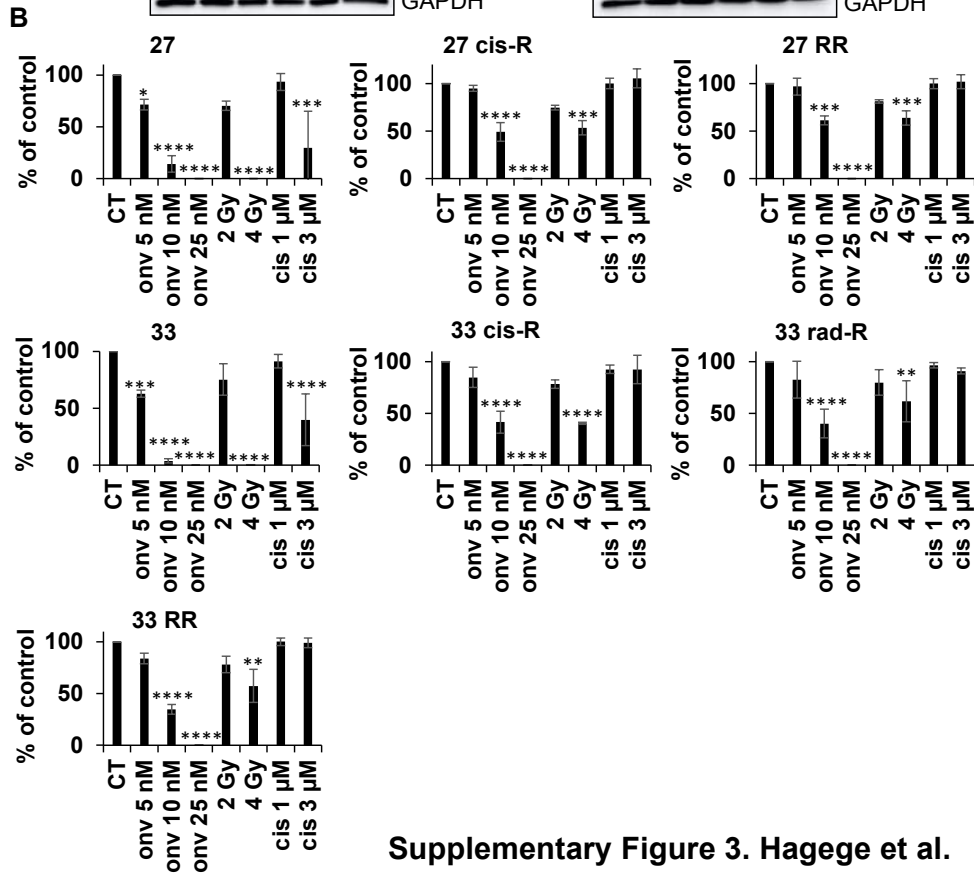
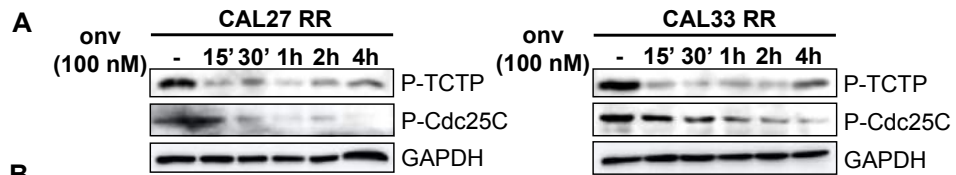
Table S3. Clinical parameters of HNSCC patients from which biopsies were obtained
(n = 6).



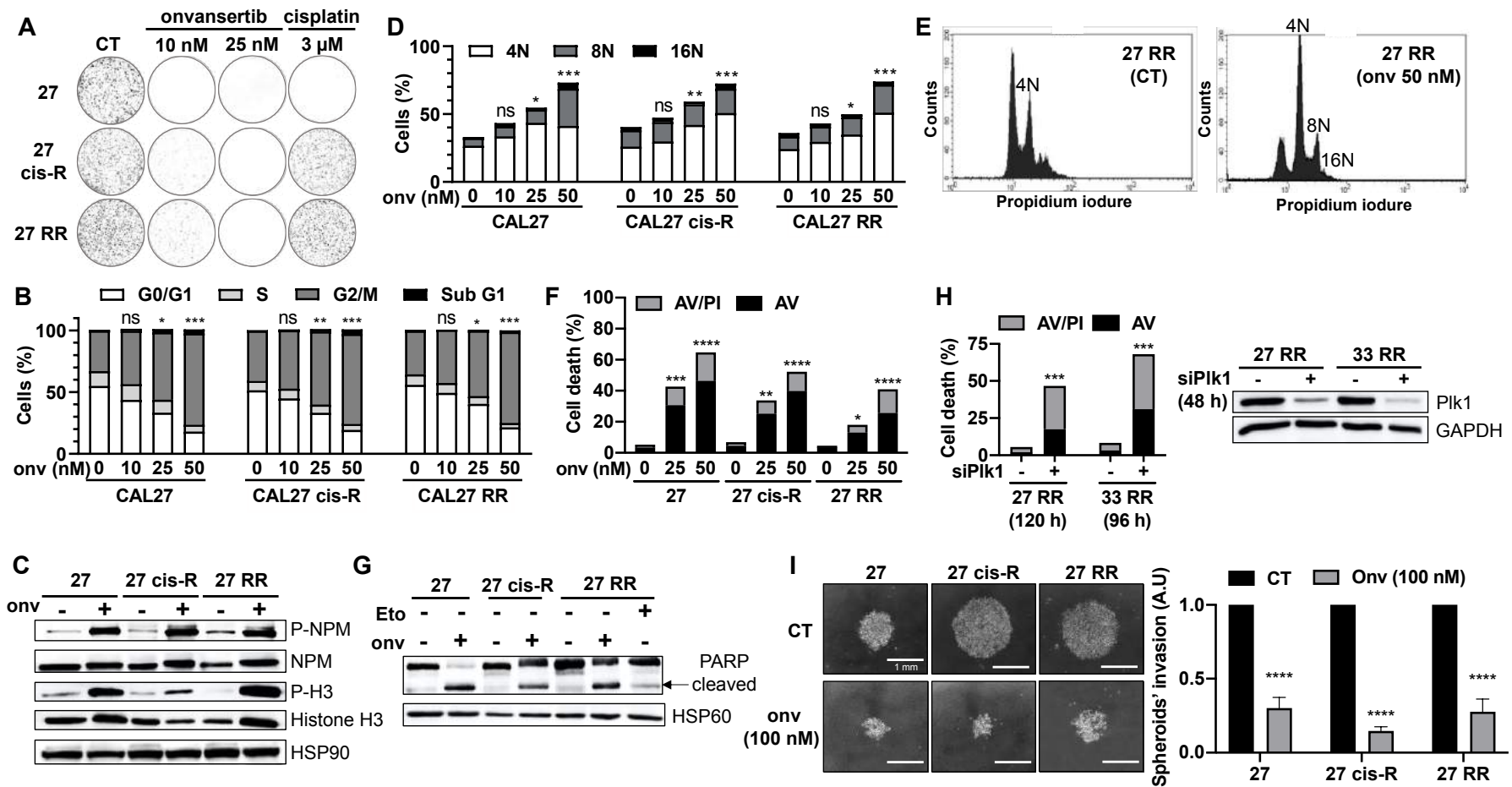
Supplementary Figure 1. Hagege et al.



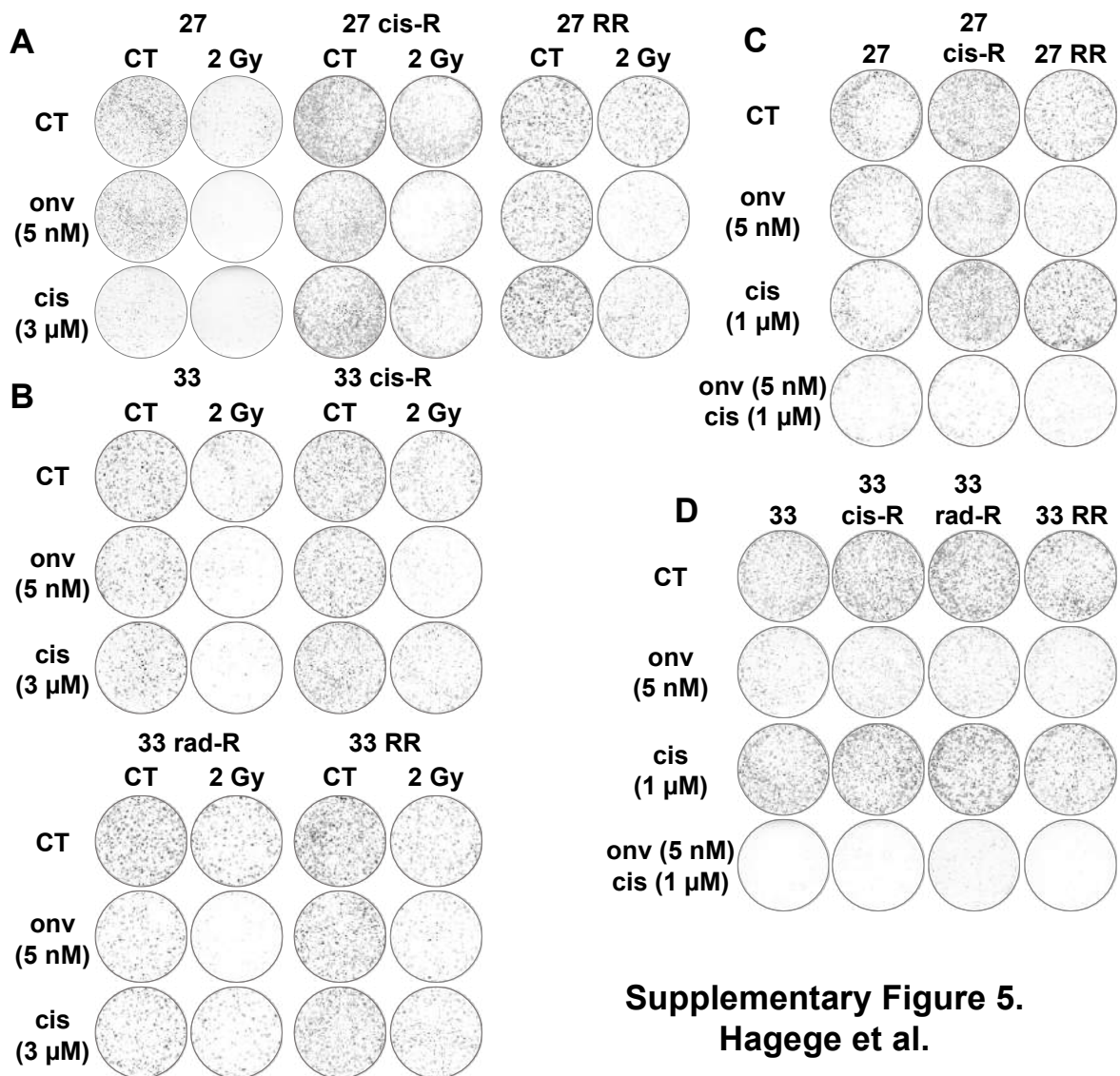
Supplementary Figure 2. Hagege et al.



Supplementary Figure 3. Hagege et al.

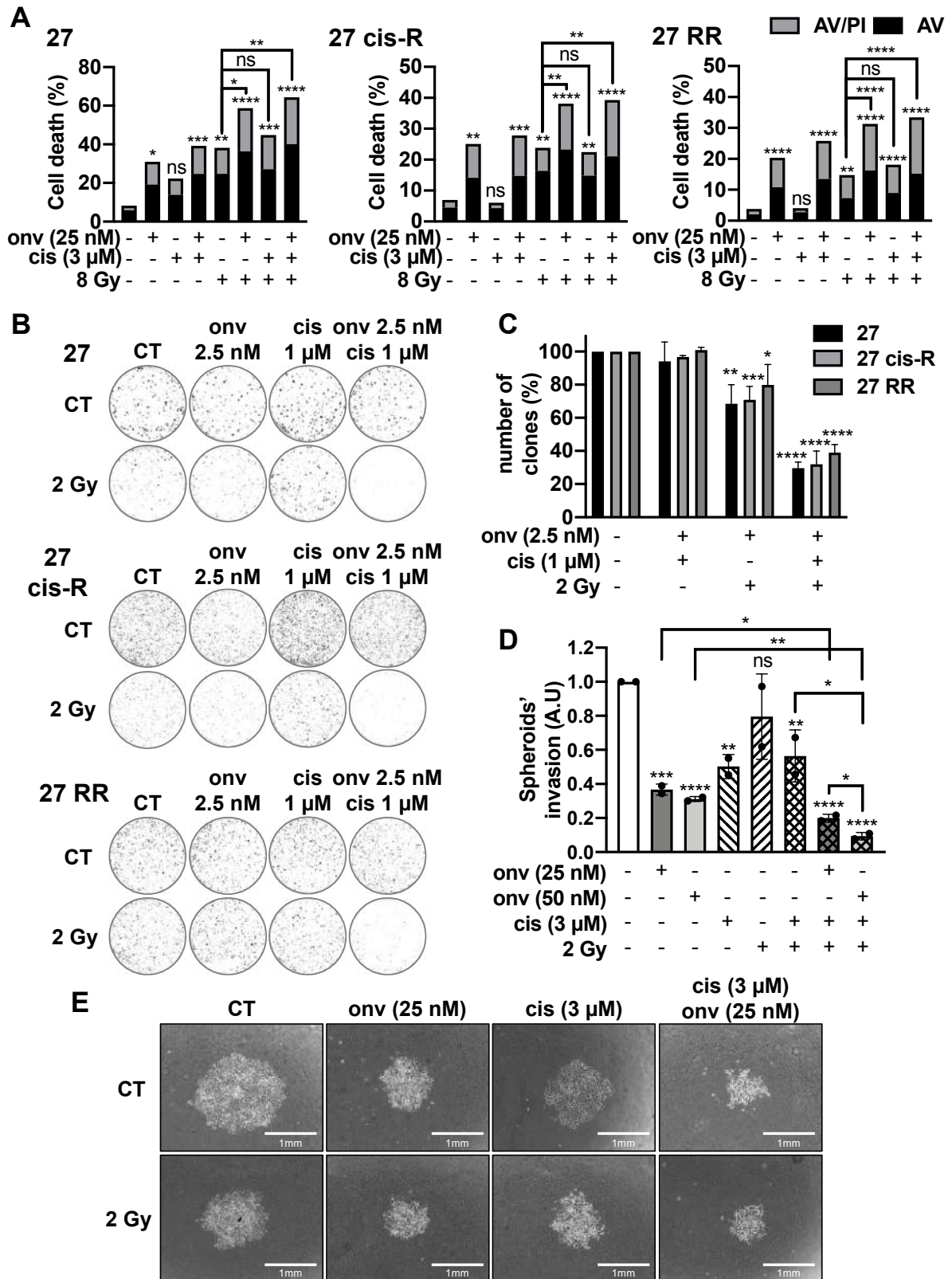


Supplementary Figure 4. Hagege et al.

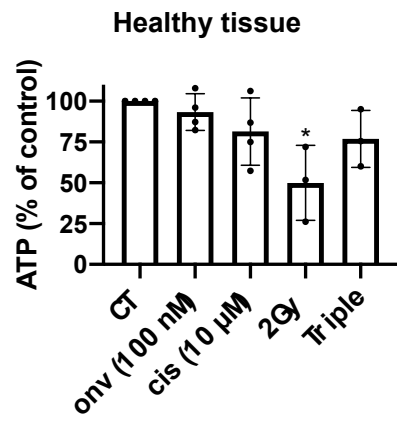


Supplementary Figure 5.
Hagege et al.

E		cis (1 μ M)	2 Gy	onv (2.5 nM)	onv (5 nM)	cis (1 μ M) + 2 Gy	onv (5 nM) + 2 Gy	onv (5 nM) + cis (1 μ M)	onv (2.5 nM) + cis (1 μ M) + 2 Gy
CAL27	Estimated value					-7	-19	-14	-20
	True value	0	0.27	3.1	1.3	-12	-38	-40	-41
	p value					ns	0.02	0.005	0.0014
CAL27 cis-R	Estimated value					-28	-40	-23	-31
	True value	0	-25	-1.7	-5	-28	-74	-58	-68
	p value					ns	2.90E-05	4.60E-04	7.90E-05
CAL27 RR	Estimated value					-19	-39	-8	-30
	True value	0	-18	-1.8	-3.2	-21	-67	-38	-61
	p value					ns	8.00E-05	0.012	2.6E-04
CAL33	Estimated value					-18	-23	-21	-28
	True value	0	-16	8	-28	-23	-62	-60	-69
	p value					0.069	1.00E-07	1.00E-07	1.00E-07
CAL33 cis-R	Estimated value					-10	-27	-13	-28
	True value	0	-14	-2	-8	-17	-51	-30	-54
	p value					0.03	1.00E-07	1.40E-04	1.00E-07
CAL33 rad-R	Estimated value					-16	-34	-30	-26
	True value	0	-5	5	-14	-18	-62	-58	-56
	p value					ns	9.00E-06	2.30E-05	3.10E-05
CAL33 RR	Estimated value					-10	-25	-14	-32
	True value	0	-12	-2	-16	-21	-53	-44	-63
	p value					0.016	1.00E-07	2.00E-06	1.00E-07



Supplementary Figure 6. Hagege et al.



Supplementary Figure 7. Hagege et al.

HNSCC	Diagnostic	Relapse after radiotherapy + platin treatment
Number	20	
Sex		
Female	5 (15%)	
Male	15 (75%)	
pT		
1/2	7 (77.8%)	6 (54.5%)
3/4	2 (22.2%)	5 (45.5%)
x	11	9
pN		
0	3 (33.3%)	10 (90.9%)
≥ 1	6 (66.7%)	1 (9.1%)
x	11	9
pM		
0	20 (100%)	16 (80%)
1	0 (0%)	4 (20%)
Location		
Oral cavity	10 (50%)	5 (25%)
Oropharynx	7 (35%)	13 (65%)
Larynx	3 (15%)	0 (0%)
Lung	0 (0%)	2 (10%)
DFS (median)	37 months	
OS (median)	119.1 months	

Supplementary Table 1. Hagege et al.

cell lines	cancer type	onvansertib IC50 (nM)
FHN (fibroblasts)	healthy	> 250
keratynocytes	healthy	> 250
BT-549	Carcinoma breast ductal	150
Detroit 562	Squamous cell carcinoma	25
CAL33	Squamous cell carcinoma	25
CAL33 cis-R	Squamous cell carcinoma	25
CAL33 rad-R	Squamous cell carcinoma	25
CAL33 RR	Squamous cell carcinoma	25
CAL27	Squamous cell carcinoma	25
CAL27 cis-R	Squamous cell carcinoma	25-50
CAL27 RR	Squamous cell carcinoma	25-50
NB4	Acute promyelocytic leukemia (LAM)	100
U937	Histiocytic lymphoma	50
U266	Multiple Myeloma	50
8226	Multiple Myeloma	100
786	Renal cells carcinoma (RCC)	125
Mel202	Uveal melanoma	125
DU-145	Prostate cancer	250
MDA-MB-231	Breast carcinoma	200

Supplementary Table 2. Hagege et al.

HNSCC patients	
Number	6
Tumor from	
Diagnostic	3 (50%)
Relapse after after radiotherapy + platin treatment	3 (50%)
Sex	
Female	3 (50%)
Male	3 (50%)
pT	
1/2	1 (20%)
3/4	5 (80%)
pN	
0	3 (70%)
≥ 1	2 (30%)
x	1
pM	
0	5 (80%)
1	1 (20%)
Location	
Oral cavity	4 (70%)
Oropharynx	2 (30%)

Supplementary Table 3. Hagege et al.

2. ARTICLE N°2

Cabozantinib, a promising therapeutic strategy for resistant head and neck squamous cell carcinoma patients

Le carcinome épidermoïde de la tête et du cou (HNSCC) représente le 5^{ème} cancer le plus agressif au monde. 50% des patients rechutent consécutivement aux traitements de référence combinant chirurgie, radiothérapie et cisplatine et décèdent deux ans en moyenne après le diagnostic.

Nous nous intéressons à l'AXL et au c-MET, de nouvelles cibles thérapeutiques potentielles, pour le HNSCC. c-MET et AXL sont surexprimés dans les tumeurs. Ils induisent la tumorigenèse, la propagation métastatique et sont associés à une survie plus courte.

Par une analyse transcriptomique, nous montrons une surexpression de c-MET et d'AXL dans des lignées cellulaires résistantes à la radiothérapie et au cisplatine générées dans notre laboratoire. Cette surexpression induit de fortes capacités de migration et d'invasion, les rendant plus agressives et pourrait être la cause de leur résistance aux traitements de référence.

Nous avons donc choisi de cibler AXL et le c-MET à l'aide d'un inhibiteur déjà utilisé en 2^{ème} ligne de traitement des cancers du rein métastatiques : le cabozantinib. *In vitro*, il inhibe la phosphorylation des substrats d'AXL et de c-MET tels que les kinases SRC et AKT. Le cabozantinib inhibe la migration, l'invasion et la prolifération cellulaire. Il induit également l'apoptose par catastrophe mitotique des lignées cellulaires des cancers des VADS. Le cabozantinib a montré sa forte efficacité antitumorale et antimétastatique *in vivo*, dans un modèle de xénogreffe de souris immunodéprimées ainsi que chez le poisson-zèbre. Le rôle antitumoral du cabozantinib a ensuite été démontré sur des sections 3D de biopsies prélevées sur des patients atteints de cancers des VADS.

Nos résultats favorisent donc fortement le ciblage d'AXL et c-MET par le cabozantinib en 2^{ème} ligne chez les patients HNSCC résistants aux thérapies actuelles.

Cabozantinib, a promising therapeutic strategy for resistant head and neck squamous cell carcinoma patients

Anais Hagege^{1,2}, Esma Saada-Bouزيد³, Damien Ambrosetti⁴, Olivia Rastoin^{1,2}, Julien Boyer³, Xingkang He⁵, Julie Rousset³, Christopher Montemagno^{1,2,6}, Florence Pedeutour¹, Julien Parola^{1,2,3}, Isabelle Bourget¹, Frederic Luciano^{1,2}, Alexandre Bozec³, Yihai Cao⁵, Gilles Pagès^{1,2,6*}, and Maeva Dufies^{1,2,6*\$}

1. University Côte d'Azur, Institute for Research on Cancer and Aging of Nice (IRCAN), CNRS UMR 7284; INSERM U1081, Centre Antoine Lacassagne, 06189 Nice, France
2. LIA ROPSE, Laboratoire International Associé Université Côte d'Azur - Centre Scientifique de Monaco
3. University Côte d'Azur, Centre Antoine Lacassagne, 06189 Nice, France
4. University Côte d'Azur, Centre Hospitalier Universitaire (CHU) de Nice, Hôpital Pasteur, Central laboratory of Pathology, 06000 Nice, France
5. Department of Microbiology, Tumor and Cell Biology, Karolinska Institutet, SE-171 77 Stockholm, Sweden
6. Centre Scientifique de Monaco, Biomedical Department, 8 Quai Antoine Ier, MC-98000 Monaco, Principality of Monaco.

* These authors co-supervised the work.

\$ Corresponding author: Maeva Dufies (maeva.dufies@gmail.com)

Keywords: AXL, c-MET, head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC), radiotherapy, cisplatin, resistance, cabozantinib, anti-angiogenic, VEGFR inhibitor, therapy repositioning

SUMMARY

Local or metastatic relapse following surgery, radiotherapy, and chemotherapy (cisplatin) is the leading cause of death of patients with head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC).

Our study showed that acquired resistance to radiotherapy and cisplatin of HNSCC cells and patients is dependent on overexpression of c-MET and AXL.

We demonstrated that Cabozantinib, an inhibitor of VEGFR, c-MET and AXL, decreased migration, invasion and proliferation, and induced mitotic catastrophe and apoptotic cell death of naive and radiotherapy- and cisplatin-resistant HNSCC cells.

Cabozantinib inhibited the growth and metastatic spread of experimental HNSCC in zebrafish and the growth of experimental HNSCC in mice by blocking tumor cell proliferation and angiogenesis. The efficacy of cabozantinib was further confirmed on viable sections of surgically removed specimens of human HNSCC and in one multi-treated HNSCC patient.

These results suggest that cabozantinib is highly relevant for the treatment of HNSCC patients following relapses after radiotherapy and cisplatin.

INTRODUCTION

As the sixth most common cancer in the world, head and neck squamous cell carcinomas (HNSCC) represents nearly 6% of all cancers, with two-thirds of cases occurring in developing countries.

Addiction to tobacco +/- alcohol and infection with the human papilloma virus (HPV) are risk factors for the development of HNSCC.

HNSCC causes the death of more than 140 000 patients every year following relapse after surgery, radiotherapy, chemotherapy, or a radio/chemotherapy combination. 30 to 50% of patients develop local relapse related to acquired resistance to conventional treatments resulting in the patients' death within a few months. Moreover, the radiotherapy-dependent destruction of the salivary glands significantly reduces the quality of life of cured patients. FDA approved therapies include methotrexate, 5 - fluorouracil, bleomycin, cisplatin, cetuximab, docetaxel and, more recently, immunotherapy (anti-PD-1, pembrolizumab or nivolumab) (1,2).

High levels of Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) and its receptors (VEGFR1/2/3) are frequently observed in HNSCCs and correlate with shorter survival (3). Hence, high levels of VEGF in HNSCC may play a radioprotective role, which lowers the efficacy of radiotherapy and contributes to relapse (5,6). Anti-VEGF and anti-angiogenic therapies may potentiate the effect of radiotherapy on the tumor vasculature (4).

In addition to the involvement of angiogenesis in HNSCC, lymphangiogenesis seems to play an important role in the aggressiveness of this pathology. Indeed, lymph node invasion represents the main pathway for metastatic dissemination of HNSCC. Lymphangiogenesis is the most significant detrimental prognostic indicator for these cancers (7).

VEGFC and VEGFD stimulate respectively VEGFR2 and VEGFR3. They are the main "drivers" of lymphangiogenesis. High levels correlate to lymphatic vessel density, lymph node metastasis, and poor prognosis in HNSCC (5). We have previously shown that radiotherapy

stimulates VEGFC expression in HNSCC cells resulting in increased aggressiveness (ability to form fast growing experimental tumors when injected into nude mice) (8).

Moreover, anti-angiogenic drugs (bevacizumab, axitinib, sunitinib or sorafenib) combined with radiotherapy lead to additive therapeutic effects in HNSCC (3,9). Combining bevacizumab with chemotherapy did not improve the overall survival (OS) but improved the response rate and progression-free survival (PFS) with increased toxicity in HNSCC.

c-MET (MET) is a tyrosine kinase receptor (RTK) stimulated by the hepatocyte growth factor (HGF). Activation of this pathway promotes epithelial-mesenchymal transition (EMT), a process characterized by enhanced cell migration, drug resistance, invasion, proliferation, and metastasis in HNSCC and other types of cancers (10). MET and AXL are overexpressed in HNSCC and their expression correlates with high grade tumors, distant metastasis, and shorter relapse-free survival. Proliferation, migration, and invasion of HNSCC cells depend on AXL in these tumors (11).

Cabozantinib is a small-molecule tyrosine kinase inhibitor administered per os. It displays a potent inhibitory activity against VEGFR2, MET, AXL, and other RTKs such as RET, KIT and Tie2, which are involved in cancer development and progression (12,13). Targeting these RTKs leads to inhibition of angiogenesis, tubule formation, tumor cell migration, and extensive endothelial and tumor cell apoptosis. Cabozantinib is approved for the treatment of medullary thyroid cancers, advanced renal cell carcinomas with an intermediate or poor risk and following prior VEGF-targeted therapy and hepatocellular carcinomas that were previously treated with sorafenib.

Our study showed that resistance to cisplatin and/or radiotherapy depends on overexpression of AXL and MET resulting in increased tumor aggressiveness. AXL and MET may be used as predictive markers of resistance to standard treatments and subsequent tumor relapse. Based on these results, we proposed that cabozantinib is a relevant treatment for

HNSCC patients experiencing relapse after cisplatin and radiotherapy. We provided compelling experimental evidence to support the clinical relevance of our findings.

RESULTS

HNSCC resistant cells are more aggressive and overexpress *AXL* and *MET*.

Sensitive cells (CAL33 (33) and CAL27 (27)) were made resistant to cisplatin (CAL33R (33R) and CAL27R (27R) (Figures 1A and 1B), radiotherapy (CAL33xR (33xR) (Figures 1C and 1D; Figure S1B)) or both (CAL33RR (33RR) and CAL27RR (27RR) (Figures 1A-D; Figure S1B)). Unexpectedly, the 33R and 27R cells were also resistant to radiotherapy (Figures 1C and 1D; Figure S1B) and radiotherapy-resistant cells were resistant to cisplatin (Figures 1A and 1B). While we were unable to generate CAL27xR cells, we obtained 27RR cells from cisplatin-resistant cells (27R). These results suggest that resistance to cisplatin and radiotherapy involves common molecular mechanisms.

CAL33 cells had a low capacity to migrate while all resistant cells (33R, 33xR and 33RR) acquired high capacities to migrate. CAL27, 27R and 27RR cells had the same ability to migrate (Figures 1E and 1F; Figure S1C). 33R, 33xR, 33RR, 27R and 27RR cells easily formed spheroids (anchorage independent proliferation, a characteristic of aggressive tumor cells) and invaded the matrix from the spheroids. Resistant cells were more invasive compared to sensitive cells (33 and 27) (Figures 1G and 1H; Figure S1D).

A RNAseq analysis showed that *AXL* was overexpressed in 33RR and 27RR cells and *MET* was overexpressed in 33RR cells (Figure S1A). Transcriptomic results were further challenged by analyzing the levels of *AXL* and *MET* mRNA and protein. *MET* mRNA was up-regulated only in 33xR and in 33RR cells (Figures 1I and 1J). However, *MET* and its phosphorylated form (p-MET) were increased in all resistant cells (33R, 33xR, 33RR, 27R and 27RR) suggesting a transcriptional and a post-transcriptional level of regulation, which ultimately resulted in overexpression and over-activation of *MET* in resistant cells (Figures 1K and 1L).

AXL mRNA and protein levels and activity (p-AXL) were increased in all resistant cells, 33R, 33xR, 33RR, 27R and 27RR (Figures 1I-L).

Hence, cisplatin and/or radiotherapy-resistant HNSCC cells exhibited increased aggressiveness compared to sensitive cells based in part on the two major drivers of cell proliferation and invasiveness, MET and AXL.

MET and AXL are overexpressed in tumors from patients at relapse on cisplatin and radiotherapy and correlate with shorter survival.

Analysis of the TCGA cohort showed that the MET and AXL mRNA levels were higher in HNSCC samples compared to healthy tissue ($p < 0.0001$, Figure 2A).

In a French cohort from the Centre Antoine Lacassagne, the Cancer Center of Nice, FRANCE, ($n=20$, Table S1), the mRNA levels of MET ($p=0.04$) and AXL ($p=0.015$) increased following relapse on cisplatin and radiotherapy (Figure 2B). Moreover, in the primary untreated tumor, high levels of *MET* (median OS: 78.1 vs 119.1 months, p =tendency, Figure 2C) and *AXL* mRNA (median OS: 75.1 vs more than 140 months, $p=0.0035$, Figure 2D) correlated with shorter OS.

High levels of *MET* mRNA correlated with shorter disease-free survival (DFS, median: 25 vs 45 months, $p=0.15$, Figure S2A) and shorter OS (median: 45.8 vs 60.4 months, $p=0.0213$, Figure 2E) in the samples of the TCGA cohort ($n=520$). High *AXL* mRNA levels correlated with shorter DFS (median: 25.5 vs 42.8 months, $p=0.0098$, Figure S2B) and shorter OS (median: 26.5 vs 60.4 months, $p=0.0007$, Figure 2F). High AXL protein levels (available for 212 patients) correlated with shorter DFS (median: 18.2 vs 49.9 months, $p=0.0275$, Figure S2C) and shorter OS (median: 22.8 vs 56.4 months, $p=0.048$, Figure S2D).

Since the two targets of the clinically approved drug cabozantinib, AXL and MET, are overexpressed in resistant cells, we evaluated the impact of other cabozantinib targets

(VEGFR2 and VEGFR3) and their respective ligands (VEGF and VEGFC) on the prognosis of HNSCC. VEGF, VEGFR2 and VEGFR3 mRNA expression had no impact on DFS (Figures 2E-G). However, high levels of VEGFC mRNA correlated with shorter DFS (median: 12.2 vs 42.8 months, $p=0.027$, Figure S2H).

These observations suggested that VEGFC, MET, and more importantly AXL, are relevant markers of poor prognosis for HNSCC patients and could represent relevant therapeutic targets for these cancers.

Cabozantinib inhibits migration and invasion of HNSCC cells.

While considering the relevance of MET and AXL as markers of HNSCC aggressiveness, we tested the efficacy of cabozantinib on naive and resistant HNSCC cells.

Cabozantinib inhibited the activity of AXL and MET, (p-AXL, p-MET) and two downstream signaling pathways, AKT and SRC (p-AKT and p-SRC), in 33RR and 27RR cells (Figure 3A and Figure S3A).

Cabozantinib inhibited the migration of 33R, 33xR and 33RR cells (Figure 3B) and cell sprouting from spheroids, a phenomenon mimicking invasion, of all resistant cells (33R, 33xR, 33RR, 27R and 27RR, Figure 3C and Figure S3B).

Hence, cabozantinib inhibited the aggressiveness of sensitive or cisplatin and/or radiotherapy-resistant HNSCC cells.

Cabozantinib decreases the proliferation and induces the death by mitotic catastrophe of HNSCC cells.

Cabozantinib inhibited the clonogenic potential and decreased the viability of sensitive and resistant HNSCC cells (Figures 4A and 4B; Figures S3C-E).

The decreased number of viable cells prompted us to evaluate the cell cycle and the effects of cabozantinib on cell death. Cabozantinib arrested the cell cycle of sensitive and resistant cells in the G2M phase (Figure 4C; Figure S4A). This G2M arrest was accompanied by an increased number of nuclei (polyploidy, Figure 4D, Figures S4B and S4C), a phenomenon known as mitotic catastrophe (34).

Cabozantinib decreased the expression of Plk1, one of the major events involved in mitotic catastrophe (14) (Figure 4E). Polyploid cells underwent apoptosis, visualized by the cleavage of PARP (Figure 4E; Figure S4D) and annexinV/propidium iodide labeling (Figure 4F; Figure S4E). Hence, the anti-tumor effects of cabozantinib depend on accelerated cell death by mitotic catastrophe.

These results suggested that cabozantinib is relevant as first-line therapy but also following relapse to reference treatments.

Cabozantinib has a strong anti-tumor effect on experimental HNSCC in mice.

When compared to cisplatin, cabozantinib inhibited more efficiently the growth of experimental HNSCC generated from sensitive cells (CAL33, Figure 5A). It completely inhibited the growth of experimental tumors obtained with resistant cells (CAL33RR, Figure 5B) while cisplatin had no effect. Tumors generated with sensitive and resistant cells and recovered from mice treated with placebo (CT) or cisplatin (cis) weighted significantly more compared to tumors from cabozantinib (cabo)-treated mice (Figures 5C). “Cabo tumors” presented high levels of necrosis (Figures 5D; Figure S5A), decreased activation of AXL and MET (p-AXL and p-MET, Figure 5E), fewer proliferating cells (Ki67 labeling, Figure 5F), and a lower number of blood vessels reaching the cells (Figure S5B). The downregulation of *CD31* mRNA levels (Figure S5C), and the decrease in the blood vessel density (CD31 staining, Figure 5G) confirmed cabozantinib-dependent inhibition of angiogenesis.

These results suggest that the dual effects of cabozantinib on tumor cells and blood vessels are responsible of its anti-tumor efficacy.

Cabozantinib inhibits metastatic spread and decreases the size of existing metastases in zebrafish.

Zebrafish were used as a relevant model of metastasis by assessing dissemination of tumor cells from the site of injection to the tail (21). In this model, 33 and 33RR cells were highly invasive, formed local metastases (Figure S6A and S6B) and metastasized to the tail (distant metastases). At 24 h, 33RR cells formed more distant metastases compared to 33 cells (Figure S7C), and after three days, the volume of the total metastases was higher (Figures S6D-F) suggesting seeding and growth of distant metastases.

We evaluated the efficacy of cabozantinib on the most aggressive cells, ie the 33RR cells. Cabozantinib inhibited the appearance of local and distant metastases (Figures 6A and 6D). At 24 h, cabozantinib inhibited the appearance of more than 60% of distant metastases (Figure 6B) and local invasion (Figure 6C) when compared to the control group.

Cabozantinib reduced the size and the number of pre-existing distant metastases (Figure 6E). While metastases from untreated zebrafish grew after 48 h, cabozantinib reduced their size by more than 50% (Figure 6F). These results strongly suggest that cabozantinib prevents metastatic dissemination and inhibits the growth of metastases.

Cabozantinib induces tumor cell death of viable tumor sections from HNSCC patients.

Surgically resected HNSCC tumors were analyzed and sampled by a pathologist (JB). Two samples' biopsies from primary HNSCC and three from local relapses after cisplatin and radiotherapy treatments (Table S2) were used. Sections of these tumor specimens (Figure 7A) that conserved all the cells of the tumor microenvironment and tumor architecture are a highly

relevant model to evaluate the efficacy of standard or innovative therapies. These sections were exposed to cabozantinib or cisplatin for 4 days and the ATP levels that indirectly reflect the cell viability were evaluated. Cabozantinib (5 μ M) decreased the viability of tumor sections more efficiently when compared to a high concentration of cisplatin (10 μ M, Figure 7B). Cabozantinib induced necrosis (HES staining, Figure 7C), inhibited tumor cell proliferation (Ki67 staining, Figure 7D) and tumor cell death (TUNEL staining, Figure 7E) in tumors sections.

Hence, the higher anti-tumor efficacy of cabozantinib (when compared to cisplatin) that was observed in experimental tumors (mouse and zebrafish), was confirmed with surgical specimens of human HNSCC. These results strongly suggest that cabozantinib is highly relevant for the treatment of HNSCC.

Cabozantinib is efficient in a multi-resistant HNSCC patient.

Mr A, a 56 years-old patient, was diagnosed with a localized oropharyngeal HNSCC in 2012 and underwent an oropharyngectomy. In 2015, a first locally-advanced relapse was treated with a sub-glosso-laryngectomy followed by radiotherapy. In 2019, a second relapse in irradiated fields was treated by surgery and followed by anti-PD1 checkpoint inhibitor. In October 2019, a third locally advanced relapse was treated in a palliative intent with a combination of cisplatin 75 mg/m², docetaxel 75 mg/m², cetuximab 400 mg/m² then weekly 250mg/m², 4 cycles followed by maintenance with cetuximab. In April 2020, he progressed and was rechallenged with an anti-PD1 checkpoint inhibitor (May to July 2020). Molecular analyses were performed after prescription of the molecular tumor board of PACA-East region (Nice, FRANCE) and showed an amplification of *MET* and *CCND1* genes. Hence, he received cabozantinib 60mg/day from January to September 2021. A stabilization followed by a partial and confirmed response were observed between December 2020 and June 2021. In June, the dosage of

cabozantinib was decreased to 40mg/day then 20mg/day because of adverse events (diarrhea). The treatment was stopped after progression of the disease observed in September 2021. The treatment of this patient with cabozantinib in the fifth-line of treatment showed a clinically significant efficacy with a reduction of the tumor mass by 39% (47 to 29mm in the longest axis, Figure 7F). The duration of cabozantinib efficacy was therefore clinically significant for a heavily pretreated recurrent HNSCC patient.

DISCUSSION

Our study showed that acquired resistance of HNSCC to radiotherapy and cisplatin (HNSCC cell lines and patients) depends on MET and AXL. Moreover, high expression of MET or AXL correlates with shorter survival.

Cabozantinib is a first in class inhibitor of VEGFR, MET and AXL. Promising effects of cabozantinib were observed in several cancers especially metastatic renal cell carcinoma (15). Our results pave the way to early phase clinical trials to validate cabozantinib as a second-line treatment for HNSCC patients following relapse on radio/chemotherapy. Moreover, comparison of cabozantinib to cisplatin with several *in vitro* and *in vivo* models but also with human HNSCC specimens suggests better efficacy of the targeted therapy. The inhibition of MET and AXL that results in decreased migration and invasion and then death of tumors cells plus inhibition of angiogenesis depending on VEGFR blockade explains in part the anti-tumor effects of cabozantinib. Hence, inhibiting angiogenesis alone (bevacizumab) in such tumors is insufficient and does not increase survival of HNSCC patients (35)

Like cabozantinib, other multitarget antiangiogenic agents, such as lenvatinib, an anti-VEGFR, anti-FGFR and anti-RET showed promising results in combination with pembrolizumab (anti-PD1) in the first-line for HNSCC patients (36). A phase III clinical trial (NCT04199104)

combining pembrolizumab and lenvatinib for patients with HNSCC is ongoing after encouraging results in phase IB/II (37).

Plk1 is a mitotic kinase, which is expressed in proliferating cells during the G2 and M phases of the cell cycle. High levels of Plk1 correlate with HNSCC aggressiveness (33). Degradation of cabozantinib-dependent Plk1 correlated with mitotic catastrophe resulting in generation of multinucleated giant cells that ultimately died from apoptosis and/or other modes of cell death (34).

Two somatic mutations of MET have been identified in HNSCC: Y1230C, known as the MET germline mutation, which predisposes to hereditary renal cell carcinoma, and Y1235D that induces a constitutive kinase activity (16). Despite a low frequency of mutations in MET, overexpression of HGF and its receptor was observed in more than 80% of HNSCC. MET signaling, which is activated by HGF, results in receptor dimerization and phosphorylation leading to the recruitment of a network of intracellular adapters and effector proteins such as phosphoinositide 3-kinase (PI3K), phospholipase C γ 1 (PLC γ 1), growth factor receptor-bound protein 2 (Grb2), Grb2-associated binding protein 1 (GAB1), and signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3). Consequently, activated MET stimulates several intracellular signaling pathways, including the PI3K/AKT, STAT3, SRC/FAK (FAK, focal adhesion kinase) and mitogen-activated protein kinase (MAPK)/ERK pathways. Activation of these pathways results in increased cell proliferation, survival, inhibition of apoptosis, migration, invasion, and metastasis. HGF/MET signaling correlates with increased rates in relapse and shorter survival of HNSCC patients (17,18). In addition, the HGF/MET pathway mediates resistance to anti-EGFR inhibitors that entered the therapeutic arsenal of HNSCC (19–21).

AXL, which stems from the Greek word for uncontrolled “anexelekto,” is a RTK belonging to the tumor-associated macrophage (TAM) family, including TYRO-3, AXL, and MER (22). The MET-RTK family, includes MET and RON, and shares a high degree of sequence similarity

with the kinase domain of AXL. Gas6/AXL signaling mediates survival, proliferation, motility, and invasion by harnessing a diverse repertoire of signaling networks. Gas6/AXL signaling stimulates the expression of antiapoptotic proteins such as Bcl-2 and Bcl-xL, phosphorylation, and activation of NF- κ B, phosphorylation and stabilization of Bad, and inhibition of proapoptotic proteins such as caspase 3. Moreover, AXL activates the MET signaling pathway (23).

Overexpression of AXL induces resistance to cetuximab (24), erlotinib (25) and radiotherapy (26) in HNSCC. AXL activation stimulates the PI3K pathway and induces overexpression of PD-L1 resulting in resistance of HNSCC to radiotherapy (26).

Despite the benefits of immune checkpoint inhibitors, their use as a monotherapy was disappointing. Indeed, the efficacy of anti-PD-1 or anti-PD-L1 as monotherapy in first- and second-line therapy for recurrent or metastatic HNSCC (15 to 20 % ORR) was modest.

Various combinations of inhibitors of angiogenesis and anti-PD-1 and anti-PD-L1 antibodies are in clinical development for patients with advanced solid tumors, with promising results.

Increased levels of local and circulating VEGF have immunosuppressive effects (30). VEGF inhibits differentiation of monocytes into dendritic cells and promotes the accumulation and proliferation of immunosuppressive cell types such as myeloid-derived suppressor cells (MDSCs) and regulatory T cells.

AXL excludes T-cells from tumors and inhibits the dendritic cell activity (27). In experimental tumors in mice, AXL inhibits the expression of MHC class I proteins and reduces the levels of infiltrated immune cells and the production of cytokines (28). In patients with metastatic melanoma, high levels of AXL mRNA correlate with resistance to anti-PD-1 (29).

HGF/MET signaling stimulates the expression of PD-L1 by tumor cells resulting in immunosuppressive effects (31,32). *In vivo*, cabozantinib reduced the number and activity of

MDSCs, impairing their ability to inhibit the proliferation of effector T cells, and increased tumor CD8⁺ T-cell infiltration (30).

Importantly, our preliminary results showed that cabozantinib, stimulates the expression of immune checkpoint PD-L1 and PD-L2. Hence, we anticipate that the combination of cabozantinib and anti-PD-1 or anti-PD-L1 could represent a highly relevant combination as first-line treatment.

The combination of cabozantinib and nivolumab is very efficient for the treatment of metastatic renal cell carcinoma (phase III clinical trial, intermediate results, median PFS = 16.6 months). Cabozantinib should decrease angiogenesis and the number of blood vessels. Moreover, by inhibiting VEGFR2, AXL and MET, cabozantinib should enhance the efficacy of anti-PD1 with an increase in CD8⁺ T lymphocytes within the tumor and a decrease in the number of immunosuppressive MDSC.

Based on these hypotheses, a phase 2 clinical trial combining pembrolizumab (anti-PD-1) and cabozantinib in recurrent or metastatic HNSCC (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT03468218) is ongoing. Based on our results, these patients should overexpress AXL and MET (relapse after cisplatin/radiotherapy) and should benefit from cabozantinib.

We also obtained the first proof-of-concept for the efficacy of cabozantinib in a multi-treated HNSCC patient. Cabozantinib was administered in the fifth line and was efficient for 8 months. In conclusion, our results strongly suggest that cabozantinib is very relevant to treatment of HNSCC at relapse following radiotherapy and cisplatin. These very encouraging results require clinical validation.

METHODS

Cell culture

CAL27 HNSCC cells were purchased from the American Tissue Culture Collection. CAL33 HNSCC cells were purchased from DSMZ. CAL27R and CAL33R are cisplatin resistant cells

and were obtained by chronic exposure to increasing concentrations of cisplatin up to 10 μ M. CAL33xR cells are resistant to irradiation and were obtained with 25 rounds of 8Gy irradiation. CAL33RR and CAL27RR cells are resistant to cisplatin and irradiation and were obtained from CAL33R and CAL27R cells and after 25 rounds of 8Gy irradiation.

Cell viability (XTT)

5×10^3 cells were incubated in 96-well plates with different effectors for the times indicated in the figure legends. 50 μ l of sodium 3'-[1-phenylaminocarbonyl]-3,4- tetrazolium]-bis(4-methoxy-6-nitro) benzene sulfonic acid hydrate (XTT) was added to each well (Roche). The assay is based on the cleavage of the yellow tetrazolium salt XTT to form an orange formazan dye by metabolically active cells. Absorbance of the formazan product, reflecting cell viability, was measured at 490 nm. Each assay was performed in quadruplicate.

Cell number - ADAM

Cell viability and cell death was assessed using the ADAM-MC apparatus (NanoEnTek, Gurogu, Seoul, Korea) based on fluorescent propidium iodide staining according to the manufacturer's instructions.

Colony formation assays

HNSCC cells (3000 cells per condition) were treated or not with cabozantinib (BMS-907351, Cat No.S1119). Colonies were detected after 10 days of culture. Cells were then washed, fixed and stained with GIEMSA (Sigma).

Immunoblotting

Cells were lysed in buffer containing 7.5% SDS, 30% glycerol, 0.3 M Tris pH6.8. 30 to 50 µg of proteins were separated on 10% SDS-PAGE, transferred onto a PVDF membrane (Immobilon, Millipore) and then exposed to the appropriate antibodies. Proteins were visualized with the ECL system using horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit or anti-mouse secondary antibodies. The following primary antibodies were used: Plk1 (Abcam, ab17056, mouse), phospho-AXL (Cell signaling, #5724S), phospho-MET (Cell signaling, #3077S), phospho-ERK (Cell signaling, #9101S), phospho-AKT (Cell signaling, #9271S), phospho-SRC (Cell signaling, #2101S), ERK 1/2 (abcam, ab32538), AKT (Cell signaling, #9272) SRC (Cell signaling, #2109S), MET (Invitrogen, 37-0100), PARP (Cell signaling, #9532), HSP90 (Cell signaling, #4877) and HSP60 (Cell signaling, #12165).

Flow cytometry

Analysis of apoptosis

Following incubation with cabozantinib, cells were washed with ice-cold PBS and stained with the annexin-V-fluo and propidium iodide (PI) according to the manufacturer's procedure (Biolegend). Fluorescence was measured using the FL2 and FL3 channels of a fluorescence-activated cell sorter apparatus (FACS-Calibur cytometer).

Cell cycle analysis

After treatment, cells were washed, fixed in ethanol 70% and, finally, left overnight at -20°C. Cells were next incubated in PBS, 3 µg/ml RNase A and 40 µg/ml of PI for 30 min at 4 °C. Cellular distribution across the different phases of the cell cycle or DNA content was analyzed with a FACS-Calibur cytometer.

Quantitative Real-Time PCR (qPCR) experiments

1µg of total RNA was used for the reverse transcription, using the QuantiTect Reverse Transcription kit (QIAGEN, Hilden, Germany), with a blend of oligo (dT) and random primers to prime first-strand synthesis. SYBR master mix plus (Eurogentec, Liege, Belgium) was used for qPCR. The mRNA level was normalized to 36B4 mRNA.

Migration assays

8×10^4 cells were seeded into the top chamber of cell culture inserts with 8.0 µm pore transparent PET membrane (Corning, Falcon, Cat No: 353097) in medium without FBS, while medium with 10% FBS was present in the bottom chamber. After 24 h, media and remaining cells were removed from the top chamber. Inserts were fixed with 3% PFA. Cells that migrated through the filter and adhered to the lower surface were stained for 10 min with 0.5% crystal violet in 25% ethanol and were analyzed and quantified.

Tumor spheroid invasion assays

A cell suspension of 1.5×10^4 cells/ml was prepared and 200 µl of this suspension were seeded in 24 wells containing solidified agarose 1% incubated at 37°C for 48 h. Spheroids containing 3000 cells each were placed on the inside face of the cover of a culture dish and incubated at 37°C. Formed spheroids were transferred into 12 wells containing 50 µL of the following mix: 200 µl matrigel (Corning® Matrigel® Matrix), 100 µl collagen I (8mg/ml; corning), 80 µl HEPES 1 M and 320 µL DMEM 7% FCS and grown for the designated time. The diameters of spheroids were monitored with a EVOS optical microscope. Cell invasion through the surrounding matrigel/collagen was measured using ImageJ software and the final spheroid size was compared to the initial size at time zero.

Tumor xenograft experiments

5x10⁵ CAL33 or CAL33RR cells were injected subcutaneously into the flanks of 5-week-old nude (nu/nu) female mice (Janvier, France). The tumor volume was determined with a caliper ($v = L \cdot l^2 \cdot 0.5$). When the tumor reached 80 mm³, mice were treated five times a week for 4 weeks, by gavage with placebo (dextrose water vehicle), cabozantinib (40 mg/kg) or by intraperitoneal injection three times per week with cisplatin (4 mg/kg). This study was carried out in strict accordance with the recommendations of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. Our experiments were approved by the “Comité national institutionnel d'éthique pour l'animal de laboratoire (CIEPAL)” (reference: 2018102510495275 – PEA 535).

Toxicity evaluation

At the end of the experiment, blood from mice was drawn. The blood formula was tested using Hemavet (HV950FS - Drew Scientific) after treatments (alone or combined).

Immunohistochemistry

Sections of formol-fixed and paraffin-embedded tumors were stained with HES and necrotic area were quantified. Sections were incubated with anti-mouse CD31 (clone MEC 13.3, BD Pharmingen, diluted at 1:500) or Ki67 (clone MIB1, DAKO, Ready to use) antibodies.

Zebrafish metastatic tumor model

All animal experiments were approved by the Northern Stockholm Experimental Animal Ethical Committee. Zebrafish embryos were raised at 28°C under standard experimental conditions. Zebrafish embryos at the age of 24 hpf were incubated in aquarium water containing 0.2 mmol/L 1-phenyl-2-thio-urea (PTU, Sigma). At 48 hpf, zebrafish embryos were dechorionated with a pair of sharp-tip forceps and anesthetized with 0.04 mg/mL of tricaine

(MS-222, Sigma). Anesthetized embryos were subjected to microinjection. CAL33RR tumor cells were labeled with a Vybrant DiD cell-labeling solution (LifeTechnologies). Tumor cells were resuspended in PBS and approximately 5 nl of the cell solution was injected into the perivitelline space (PVS) of each embryo by an Eppendorf microinjector (FemtoJet 5247). Non-filamentous borosilicate glass capillarie needles were used for injection. The injected zebrafish embryos were transferred into PTU aquarium water. For figure 6, fish were treated with cabozantinib (1 μ M). For figure 7, 24 h after injection, only zebrafish with metastases were chosen and treated with cabozantinib (1 μ M). Zebrafish embryos were monitored for 72 h to investigate tumor metastasis using a fluorescent microscope (Nikon Eclipse 90).

Patients

Informed consent was obtained from all individual participants included in the study. All patients gave written consent for the use of tumor samples for research. This study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki (Centre Antoine Lacassagne Biological Resource Center).

HNSCC patients from Centre Antoine Lacassagne - Treatment of primary HNSCC viable 3D sections

Five HNSCC tumor specimens obtained just after surgery were provided through collaboration with the Centre Antoine Lacassagne (Pr A. Bozec). Viable tumor sections (250 μ m, tumor samples were confirmed by a pathologist (Dr J. Boyer)) were obtained with a vibratome HM650V machine. They were seeded in Airway Epithelial Cell Growth Medium (PromoCell) supplemented with NormocureTM (Invivogen) and treated with a range of cabozantinib (5 μ M) or cisplatin concentrations (3 μ M and 10 μ M). Tumor sections were then paraffin-embedded and analyzed using HES for the quantification of necrotic areas and TUNEL staining (In Situ Cell Death Detection Kit, sigma) for the quantification of dead cells. Tumor sections were

lysed and the ATP concentration evaluated (ATP Bioluminescence Assay Kit HSII, Roche), normalized to the protein concentration and represented as a read-out of viability (see Figure 7; Table S2).

French cohort: HNSCC patients from the Centre Antoine Lacassagne – mRNA analysis

The mRNA level of different genes was analyzed in tumor/metastasis, for the same patients, at diagnosis and at relapse after cisplatin and radiotherapy for twenty HNSCC patients (see Table S1).

OS was calculated from patient subgroups with mRNA levels that were less or greater than the median value.

TCGA cohort: HNSCC patients - mRNA analysis:

Normalized RNA sequencing (RNA-Seq) data produced by The Cancer Genome Atlas (TCGA) were downloaded from cBioportal (www.cbioportal.org, TCGA Provisional; RNA-Seq V2). Data were available for 530 HNSCC tumor samples TCGA subjected to mRNA expression profiling.

DFS and OS were calculated from patient subgroups with mRNA levels (z-score) that were less or greater than the third quartile value.

Statistical analysis

For *in vitro* and *in vivo*:

Statistical analyses were performed with Prism 8 software. Datas are expressed with mean +/- the standard error (SEM). Significance was determined with the Student's *t*-test. The ANOVA with Bonferroni post hoc test was used for multiple comparisons.

For patients:

The Student's *t*-test was used to compare continuous variables and the chi-square test, or Fisher's exact test (when the conditions for use of the χ^2 -test were not fulfilled), were used for categorical variables. DFS was defined as the time from surgery to the appearance of metastasis. OS was defined as the time between surgery and the date of death from any cause, censoring those alive at the last follow-up. The Kaplan-Meier method was used to produce survival curves and analyses of censored data were performed using Cox models.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Investigation, AH, OR, DA, XH, JP, IB, MD; Methodology, MD; Resources; JB, JR, ES, AB; Conceptualization, MD and GP; Statistical analysis, MD; Writing-original draft, FL, YC, MD and GP; Supervision, Project administration and funding acquisition, MD and GP.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by IPSEN funding, the French Association for Cancer Research (ARC), the Fondation de France, the Ligue Nationale contre le Cancer (Equipe Labellisée 2019), the French National Institute for Cancer Research (INCA), the National Agency for Research (ANR) and the FX Mora, Cordons de vie and Flavien Foundations. This study was conducted as part of the Centre Scientifique de Monaco Research Program, funded by the Government of the Principality of Monaco. The samples and associated data were collected, selected and made available within the "Centre de ressource biologique (CRB)" of Centre Antoine Lacassagne. We thank the IRCAN core facilities (animal and cytometry facilities) for technical help. We also thank the CHU of Nice Department of Pathology, especially Arnaud Borderie and Sandrine Destree, for technical help.

COMPETING INTEREST

Part of this work was financed through IPSEN funding. The authors have declared that no conflict of interest exists.

REFERENCES

1. Ferris RL, Blumenschein G, Fayette J, Guigay J, Colevas AD, Licitra L, et al. Nivolumab for Recurrent Squamous-Cell Carcinoma of the Head and Neck. *N Engl J Med*. 10 nov 2016;375(19):1856-67.
2. Burtneß B, Harrington KJ, Greil R, Soulières D, Tahara M, de Castro G, et al. Pembrolizumab alone or with chemotherapy versus cetuximab with chemotherapy for recurrent or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck (KEYNOTE-048): a randomised, open-label, phase 3 study. *Lancet*. 23 nov 2019;394(10212):1915-28.
3. Vassilakopoulou M, Psyrri A, Argiris A. Targeting angiogenesis in head and neck cancer. *Oral Oncology*. mai 2015;51(5):409-15.
4. Jain RK. Normalization of tumor vasculature: an emerging concept in antiangiogenic therapy. *Science*. 7 janv 2005;307(5706):58-62.
5. Akervall J, Nandalur S, Zhang J, Qian C-N, Goldstein N, Gyllerup P, et al. A novel panel of biomarkers predicts radioresistance in patients with squamous cell carcinoma of the head and neck. *Eur J Cancer*. févr 2014;50(3):570-81.
6. Gorski DH, Beckett MA, Jaskowiak NT, Calvin DP, Mauceri HJ, Salloum RM, et al. Blockage of the vascular endothelial growth factor stress response increases the antitumor effects of ionizing radiation. *Cancer Res*. 15 juill 1999;59(14):3374-8.

7. Karatzanis AD, Koudounarakis E, Papadakis I, Velegrakis G. Molecular pathways of lymphangiogenesis and lymph node metastasis in head and neck cancer. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* mars 2012;269(3):731-7.
8. Lupu-Plesu M, Claren A, Martial S, N'Diaye P-D, Lebrigand K, Pons N, et al. Effects of proton versus photon irradiation on (lymph)angiogenic, inflammatory, proliferative and anti-tumor immune responses in head and neck squamous cell carcinoma. *Oncogenesis.* juill 2017;6(7):e354-e354.
9. Swiecicki PL, Zhao L, Belile E, Sacco AG, Chepeha DB, Dobrosotskaya I, et al. A phase II study evaluating axitinib in patients with unresectable, recurrent or metastatic head and neck cancer. *Invest New Drugs.* déc 2015;33(6):1248-56.
10. Moosavi F, Giovannetti E, Saso L, Firuzi O. HGF/MET pathway aberrations as diagnostic, prognostic, and predictive biomarkers in human cancers. *Crit Rev Clin Lab Sci.* déc 2019;56(8):533-66.
11. Brand TM, Iida M, Stein AP, Corrigan KL, Braverman CM, Coan JP, et al. AXL Is a Logical Molecular Target in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Clin Cancer Res.* 1 juin 2015;21(11):2601-12.
12. Rathi N, Maughan BL, Agarwal N, Swami U. Mini-Review: Cabozantinib in the Treatment of Advanced Renal Cell Carcinoma and Hepatocellular Carcinoma. *Cancer Manag Res.* 2020;12:3741-9.
13. D'Angelo A, Bagby S, Di Pierro G, Chirra M, Nobili S, Mini E, et al. An overview of the clinical use of cabozantinib in the treatment of advanced non-clear-cell renal cell carcinoma (NCCRCC). *Crit Rev Oncol Hematol.* mai 2020;149:102921.

14. Cheng C-Y, Liu C-J, Huang Y-C, Wu S-H, Fang H-W, Chen Y-J. BI2536 induces mitotic catastrophe and radiosensitization in human oral cancer cells. *Oncotarget*. 20 avr 2018;9(30):21231-43.
15. Choueiri TK, Escudier B, Powles T, Tannir NM, Mainwaring PN, Rini BI, et al. Cabozantinib versus everolimus in advanced renal cell carcinoma (METEOR): final results from a randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet Oncol*. juill 2016;17(7):917-27.
16. Di Renzo MF, Olivero M, Martone T, Maffe A, Maggiora P, Stefani AD, et al. Somatic mutations of the MET oncogene are selected during metastatic spread of human HNSC carcinomas. *Oncogene*. 16 mars 2000;19(12):1547-55.
17. Wood GE, Hockings H, Hilton DM, Kermorgant S. The role of MET in chemotherapy resistance. *Oncogene*. mars 2021;40(11):1927-41.
18. Kim JH, Kim BJ, Kim HS. Clinicopathological impacts of high c-Met expression in head and neck squamous cell carcinoma: a meta-analysis and review. *Oncotarget*. 22 déc 2017;8(68):113120-8.
19. Rothenberger NJ, Stabile LP. Hepatocyte Growth Factor/c-Met Signaling in Head and Neck Cancer and Implications for Treatment. *Cancers (Basel)*. 24 avr 2017;9(4).
20. Hartmann S, Bhole NE, Grandis JR. HGF/Met Signaling in Head and Neck Cancer: Impact on the Tumor Microenvironment. *Clin Cancer Res*. 15 août 2016;22(16):4005-13.
21. Xu Y, Fisher GJ. Role of met axis in head and neck cancer. *Cancers (Basel)*. 26 nov 2013;5(4):1601-18.
22. Antony J, Huang RY-J. AXL-Driven EMT State as a Targetable Conduit in Cancer. *Cancer Res*. 15 juill 2017;77(14):3725-32.

23. Rankin EB, Fuh KC, Castellini L, Viswanathan K, Finger EC, Diep AN, et al. Direct regulation of GAS6/AXL signaling by HIF promotes renal metastasis through SRC and MET. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 16 sept 2014;111(37):13373-8.
24. Brand TM, Iida M, Stein AP, Corrigan KL, Braverman CM, Luthar N, et al. AXL mediates resistance to cetuximab therapy. *Cancer Res*. 15 sept 2014;74(18):5152-64.
25. Giles KM, Kalinowski FC, Candy PA, Epis MR, Zhang PM, Redfern AD, et al. Axl mediates acquired resistance of head and neck cancer cells to the epidermal growth factor receptor inhibitor erlotinib. *Mol Cancer Ther*. nov 2013;12(11):2541-58.
26. Skinner HD, Giri U, Yang LP, Kumar M, Liu Y, Story MD, et al. Integrative Analysis Identifies a Novel AXL-PI3 Kinase-PD-L1 Signaling Axis Associated with Radiation Resistance in Head and Neck Cancer. *Clin Cancer Res*. 1 juin 2017;23(11):2713-22.
27. Aguilera TA, Rafat M, Castellini L, Shehade H, Kariolis MS, Hui AB-Y, et al. Reprogramming the immunological microenvironment through radiation and targeting Axl. *Nat Commun*. 23 déc 2016;7:13898.
28. Guo Z, Li Y, Zhang D, Ma J. Axl inhibition induces the antitumor immune response which can be further potentiated by PD-1 blockade in the mouse cancer models. *Oncotarget*. 27 oct 2017;8(52):89761-74.
29. Hugo W, Zaretsky JM, Sun L, Song C, Moreno BH, Hu-Lieskovan S, et al. Genomic and Transcriptomic Features of Response to Anti-PD-1 Therapy in Metastatic Melanoma. *Cell*. 24 mars 2016;165(1):35-44.
30. Bergerot P, Lamb P, Wang E, Pal SK. Cabozantinib in Combination with Immunotherapy for Advanced Renal Cell Carcinoma and Urothelial Carcinoma: Rationale and

Clinical Evidence. *Mol Cancer Ther.* déc 2019;18(12):2185-93.

31. Owusu B, Galemno R, Janetka J, Klampfer L. Hepatocyte Growth Factor, a Key Tumor-Promoting Factor in the Tumor Microenvironment. *Cancers.* 17 avr 2017;9(12):35.

32. Balan M, Mier y Teran E, Waaga-Gasser AM, Gasser M, Choueiri TK, Freeman G, et al. Novel roles of c-Met in the survival of renal cancer cells through the regulation of HO-1 and PD-L1 expression. *J Biol Chem.* 27 mars 2015;290(13):8110-20.

33. Wagenblast J, Hirth D, Thron L, Arnoldner C, Diensthuber M, Stöver T, et al. Effects of the Polo-like-kinase-1-inhibitor BI2536 in squamous cell carcinoma cell lines of the head and neck. *Oncol Lett.* juill 2012;4(1):175-7.

34. Dufies M, Jacquel A, Robert G, Cluzeau T, Puissant A, Fenouille N, et al. Mechanism of action of the multikinase inhibitor Foretinib. *Cell Cycle.* 1 déc 2011;10(23):4138-48.

35. Argiris A, Li S, Saccides P, Oht JP, Gilbert J, et al. Phase III Randomized Trial of Chemotherapy With or Without Bevacizumab in Patients With Recurrent or Metastatic Head and Neck Cancer. *J Clin Oncol.* 1 Dec 2019;37(34):3266-3274.

36. Chen TH, Chang PMH, Yang MH. Combination of pembrolizumab and Lenvatinib is a potential treatment option for heavily pretreated recurrent and metastatic head and neck cancer. *J Chin Med Assoc.* 1 Apr 2021;84(4):361-367.

37. Taylor MH, Lee CH, Makker V, Rasco D, Dutcus CE, et al. "Phase IB/II of Lenvatinib Plus Pembrolizumab in Patients With Advanced Renal Cell Carcinoma, Endometrial Cancer, and Other Selected Advanced Solid Tumors. *J Clin Oncol.* 10 Apr 2022;38(11):1154-1163.

FIGURE LEGENDS

Figure 1 HNSCC resistant cells are more aggressive and overexpress AXL and c-MET.

(A) Naive (33), cisplatin resistant CAL33 (33R), irradiation resistant CAL33 (33xR) and double resistant (33RR) CAL33 cells were incubated with cisplatin for 48 h. Cell viability was evaluated with XTT assays.

(B) Naive (27), cisplatin resistant CAL27 (27R) and double cisplatin and irradiation resistant (27RR) CAL27 cells were incubated with cisplatin for 48 h. Cell viability was evaluated by XTT assays.

(C and D) 33, 33R, 33xR, 33RR, 27, 27R and 27RR cells were irradiated with 4Gy and the clonogenic potential was evaluated after 10 days (see Figure S1A)

(E and F) Serum-stimulated cell migration after 24 h was analyzed using Boyden chamber assays for 33, 33R, 33xR, 33RR, 27, 27R and 27RR cells. (see Figure S1B).

(G and H) 33, 33R, 33xR, 33RR, 27, 27R and 27RR cell invasion after 3 days was evaluated using spheroid assays.

(I and J) AXL and MET mRNA levels in 33, 33R, 33xR, 33RR, 27, 27R and 27RR cells were determined by qPCR. Control conditions were considered as the reference value (1) (see Figure S1C).

(K and L) phospho-AXL (p-AXL), AXL, phospho-MET (p-MET), MET were evaluated by immunoblotting of 33, 33R, 33xR, 33RR, 27, 27R and 27RR cells. HSP60 served as a loading control.

Statistics were performed using the *ANOVA test*: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

Figure 2 MET and AXL are overexpressed in patient tumors following relapse after cisplatin plus irradiation and correlate to poor prognosis.

(A) The levels of MET and AXL mRNAs in healthy tissue and in HNSCC (TCGA cohort) were compared.

(B) The levels of MET and AXL mRNA in HNSCC at diagnosis were compared with the levels in HNSCC after relapse on cisplatin plus irradiation (paired samples for each patient at diagnosis and relapse, French cohort, see Table S1).

(C to F) The levels of MET (C and E) and AXL (D and F) mRNA in HNSCC patients (diagnosis) from the French (C and D) and the TCGA cohorts (E and F) correlated with OS. The Kaplan-Meier method was used to produce survival curves and analyses of censored data were performed using Cox models. Statistical significance (p values) is indicated.

Figure 3 Cabozantinib inhibits migration, invasion and proliferation of HNSCC cells.

(A) CAL33RR cells were treated with cabozantinib (5 μ M) for 1 to 24 h. phospho-AXL (p-AXL), AXL, phospho-MET (p-MET), MET, phospho-AKT (p-AKT), AKT, phospho-SCR (p-SCR), SCR were evaluated by immunoblotting. Actin served as a loading control.

(B) Serum-stimulated cell migration, with cabozantinib (cabo) after 24 h was analyzed using Boyden chamber assays in 33, 33R, 33xR and 33RR cells. Representative images are shown.

(C) 33, 33R, 33xR and 33RR cells were treated with cabozantinib (5 μ M) and cell invasion was evaluated after 3 days using spheroid assays. Representative images are shown.

Statistics were performed using the *ANOVA test*: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Figure 4 Cabozantinib induces cell cycle arrest, polyploidy and cell death.

(A) 33, 33R, 33xR and 33RR cells were treated with increasing concentrations of cabozantinib for 48 h. Viable cells were evaluated with ADAM assays.

(B) 33, 33R, 33xR and 33RR cells were treated with cabozantinib 2.5 or 5 μ M and clonogenic potential was evaluated after 10 days. Representative images are shown (see Figure S2D).

(C) 33, 33R, 33xR and 33RR cells were treated with 5 μ M cabozantinib for 24 h. The cell cycle was analyzed by cytometry.

(D to F) 33, 33R, 33xR and 33RR cells were treated with 5 μ M cabozantinib for 48 h.

(D) Cells were labeled for 15 min with PI and analyzed by flow cytometry. Histograms represent the percentage of cells with a DNA content of 4N, 8N and 16N.

(E) Plk1, PARP and cleaved PARP (reflecting apoptosis) were detected by immunoblotting. HSP90 served as a loading control.

(F) Cells were stained with PI/AV. Histograms showed AV⁺/PI⁻ cells (apoptosis) and AV⁺/PI⁺ cells (post-apoptosis and/or another cell death).

Statistics were performed using *ANOVA test*: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Figure 5 Cabozantinib has a strong anti-tumor effect on experimental HNSCC in mice

5x10⁵ CAL33 or CAL33RR cells were injected subcutaneously into the flanks of nude mice. When the tumors reached 80 mm³, mice were treated five times a week for 4 weeks, by gavage with placebo (dextrose water vehicle), cabozantinib (40 mg/kg) or by intraperitoneal injection, three times per week with cisplatin (4 mg/kg).

(A and B) The tumor volume was measured twice weekly as described in the materials and methods.

(C) The tumor weight was measured at the end of the experiment.

(D) Necrosis was evaluated (HES staining).

(E) Detection of p-MET and p-AXL expression in the tumor. Representative images are shown.

(F) Ki67 IHC (proliferative cells). Representative images are shown.

(G) Detection of blood vessel CD31⁺ by IHC. Representative images are shown.

Statistics were performed using *ANOVA test*: p value are indicated.

Figure 6 Cabozantinib inhibits appearance of HNSCC metastases and decreases the size of pre-existing HNSCC metastases in zebrafish

(A to D) Zebrafish embryos (n=30) were injected with 33RR cells (labeled with red DiD) into the perivitelline space and treated with cabozantinib for 72 h (cabo, 1 μ M). Zebrafish embryos were monitored for tumor metastases using a fluorescent microscope. Representative images are shown, and the area of metastases was quantified.

(A) Representative images of local and distant metastases. Arrow indicates injection space at t0.

(B) Percentage of fish with distant metastases after 24 h.

(C) Evaluation of invasion of local metastases after 72 h.

(D) Quantification of the area of distant metastases during 72 h.

(E and F) Zebrafish embryos (n=20) were injected with 33RR cells (labeled with red DiD) into the perivitelline space. 24 h later, only zebrafish with metastases were chosen and treated for 48 h with cabozantinib (cabo, 1 μ M). Zebrafish embryos were monitored to visualize tumor spreading using a fluorescent microscope.

(E) Representative images are shown.

(F) Comparison of the area of distant metastases between the cabozantinib and control-treated groups. Representative images are shown.

Statistics were performed using the *ANOVA test*: ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Figure 7 Cabozantinib is efficient on 3D viable sections of surgically resected HNSCC.

Samples of HNSCC obtained from patients following surgery were analyzed by a pathologist (HNSCC samples, Table S2). The tumor samples were surrounded by agarose and viable 3D tumor sections (250 μ m) were obtained with a vibratome. Viable 3D tumor sections were cultured in a specific medium and treated for 96 h with cabozantinib (5 μ M) or cisplatin (3 and

10 μ M). The results of the sections of tumors from diagnosed patients are shown in black and from patients who relapsed after cisplatin and radiotherapy are shown in red in the different panels.

(A) The experimental protocol is shown.

(B) The concentration of ATP provides a read-out of the tumor section viability.

(C to E) Viable 3D tumor sections were paraffin-embedded and stained with HES to quantify the areas of necrosis (C), with Ki67 to quantify cell proliferation (D), and with TUNEL to quantify apoptotic cells (E). Representative images are shown.

Statistics were performed using the *ANOVA test*, p value are indicated.

(F) A HNSCC patient treated with cabozantinib. Mr A had a HNSCC and was treated in fifth-line with cabozantinib 60mg/day from January to September 2021 at the Centre Antoine Lacassagne. The tumor burden was stable from December 2020 to March 2021 followed by a partial response from March to September 2021. CT-scans of the tumor mass enhanced with contrasting product are shown (baseline, after 3 months of cabozantinib, after 6 months of cabozantinib).

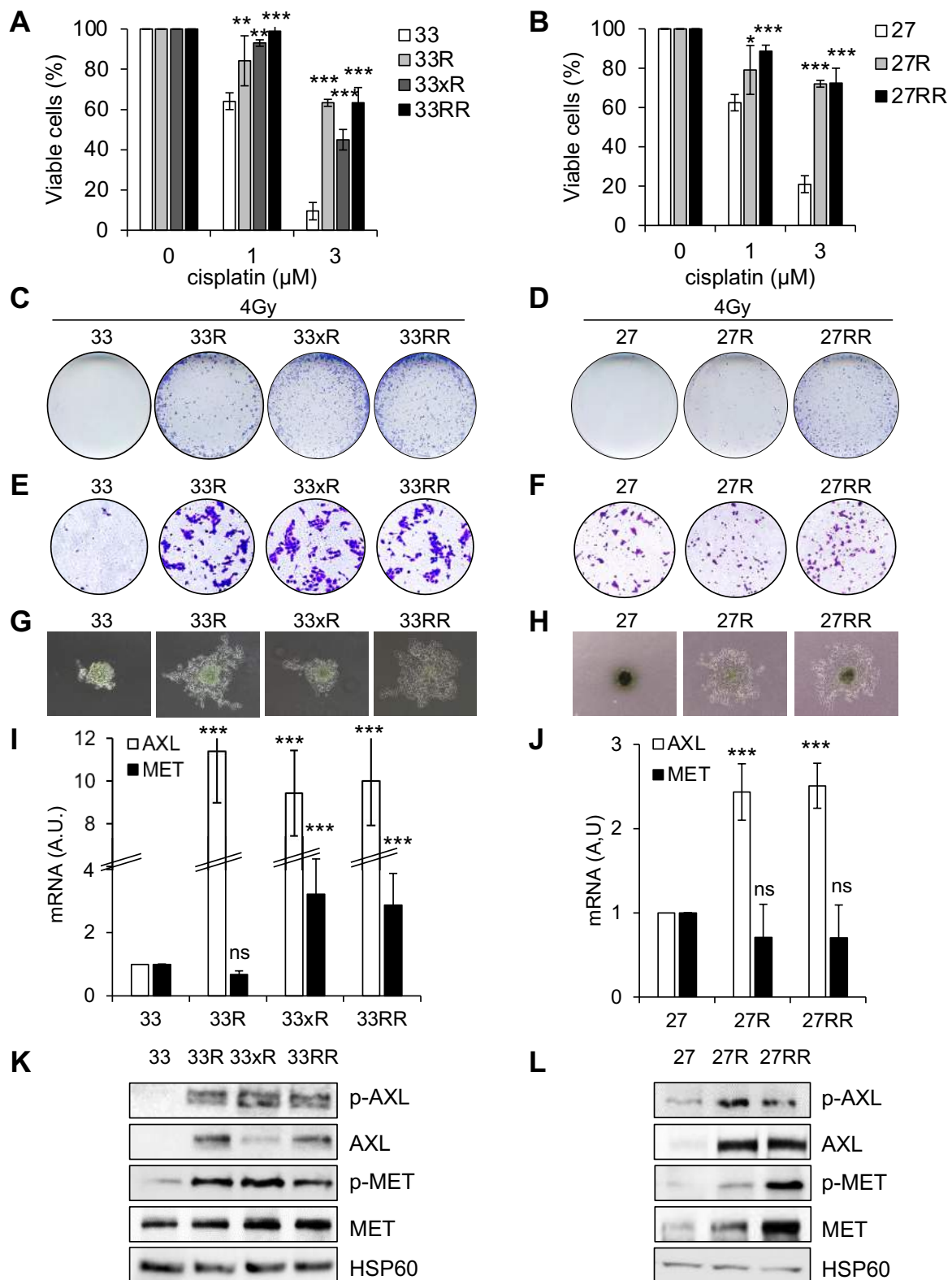


Figure 1

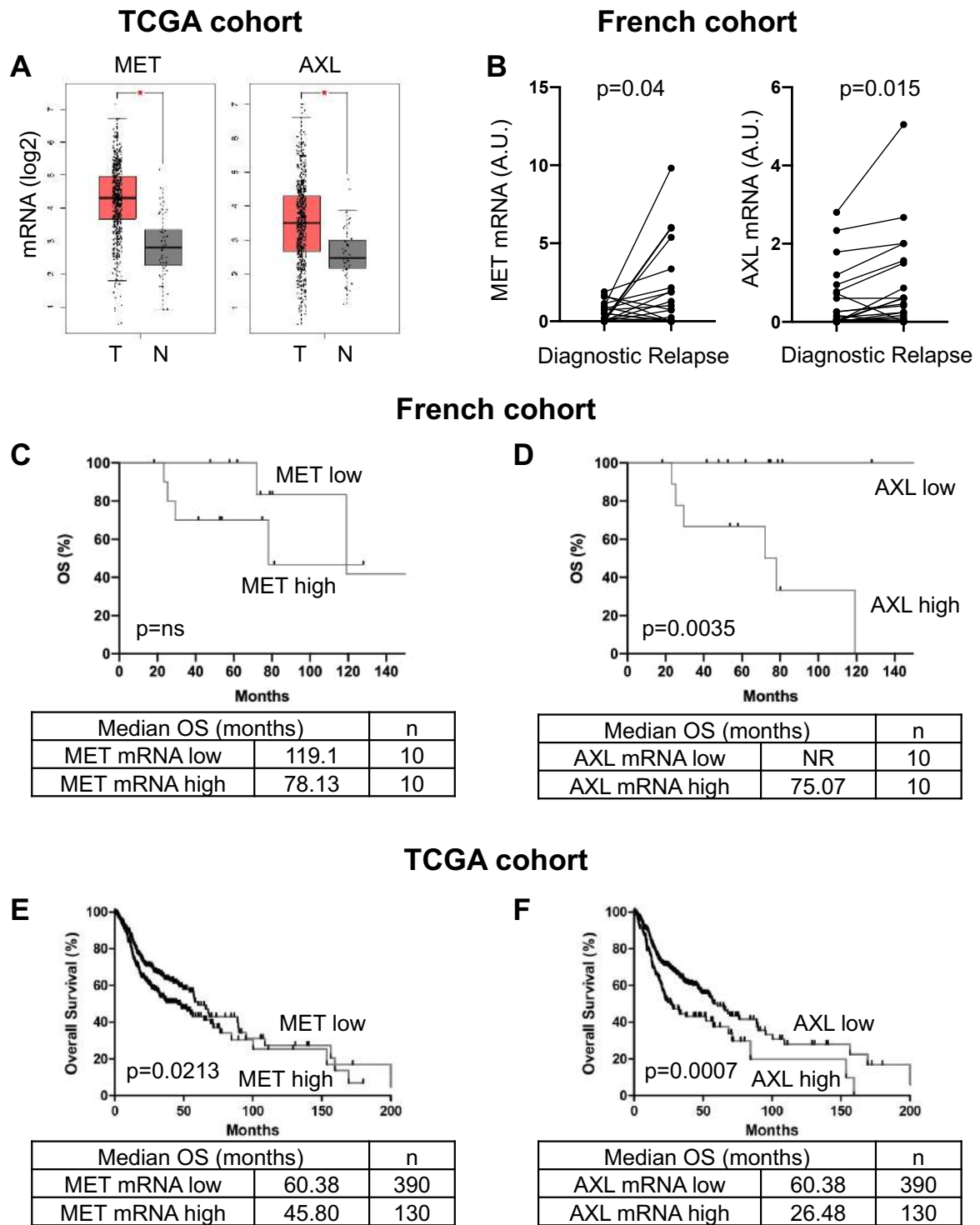


Figure 2

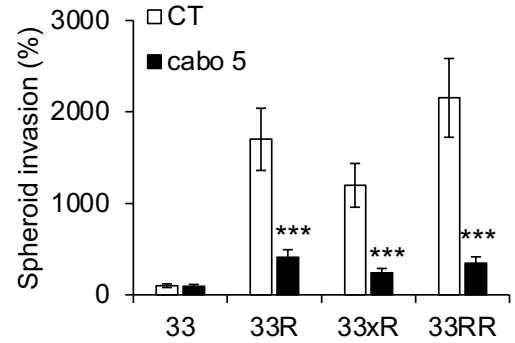
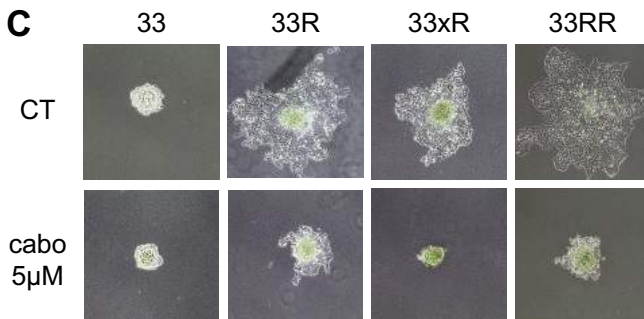
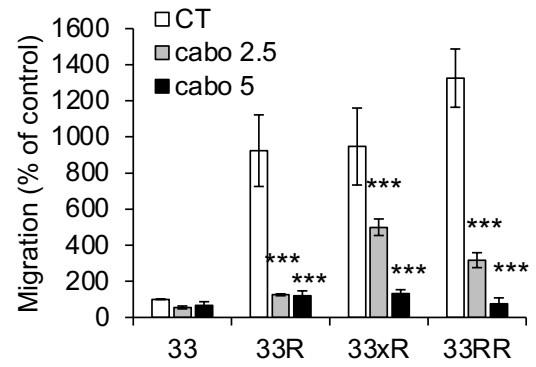
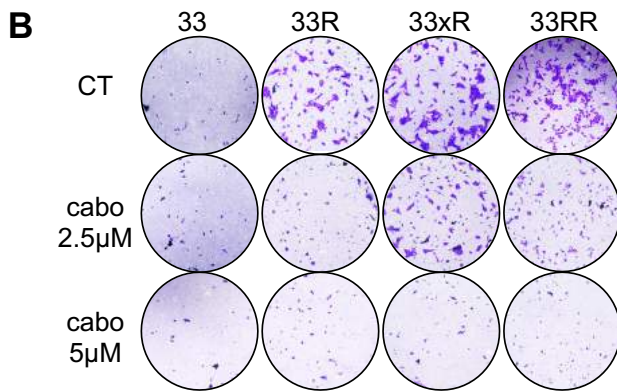
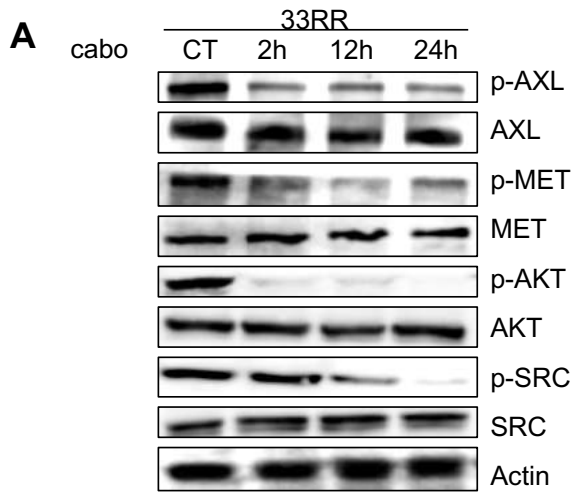


Figure 3

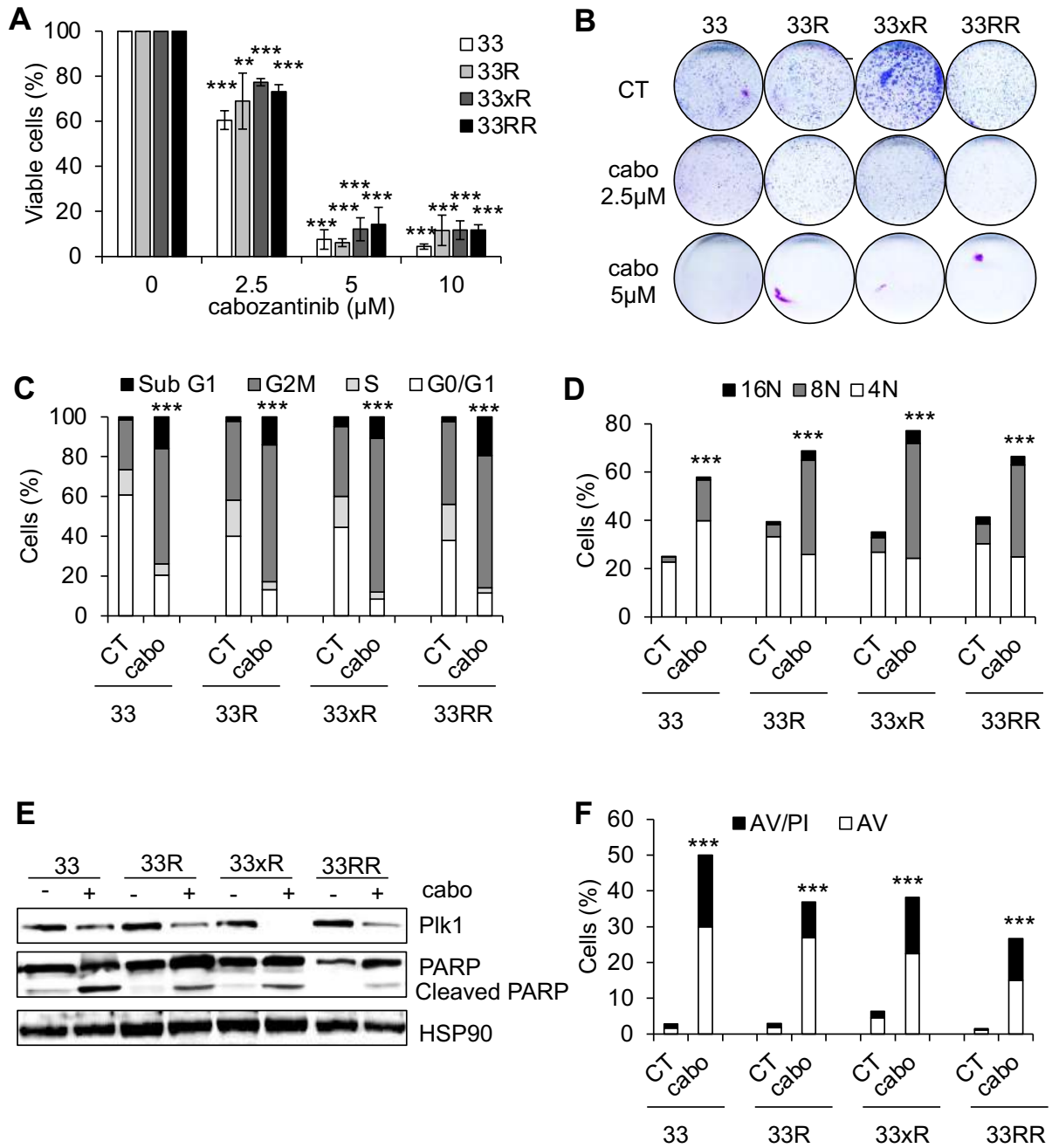


Figure 4

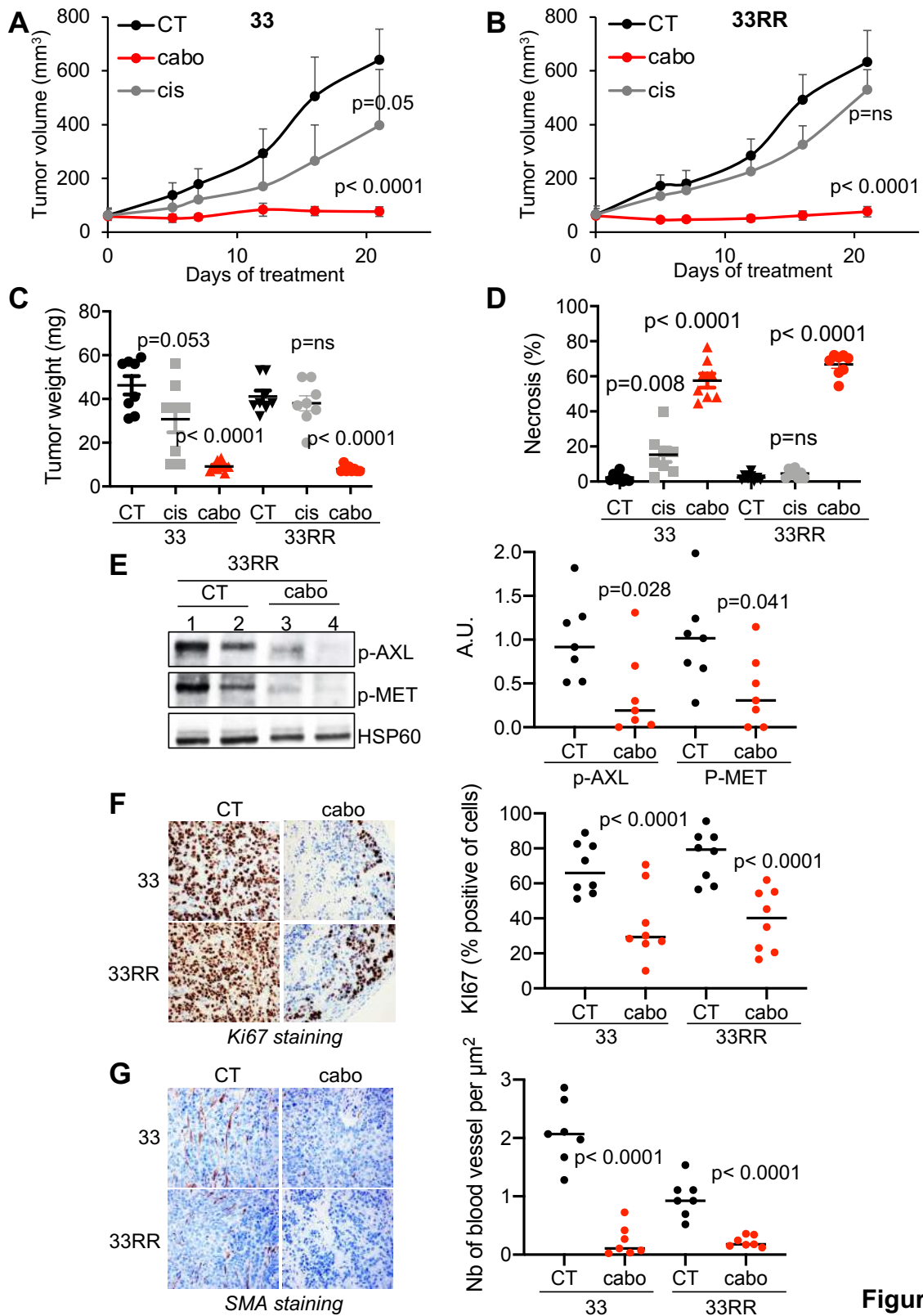


Figure 5

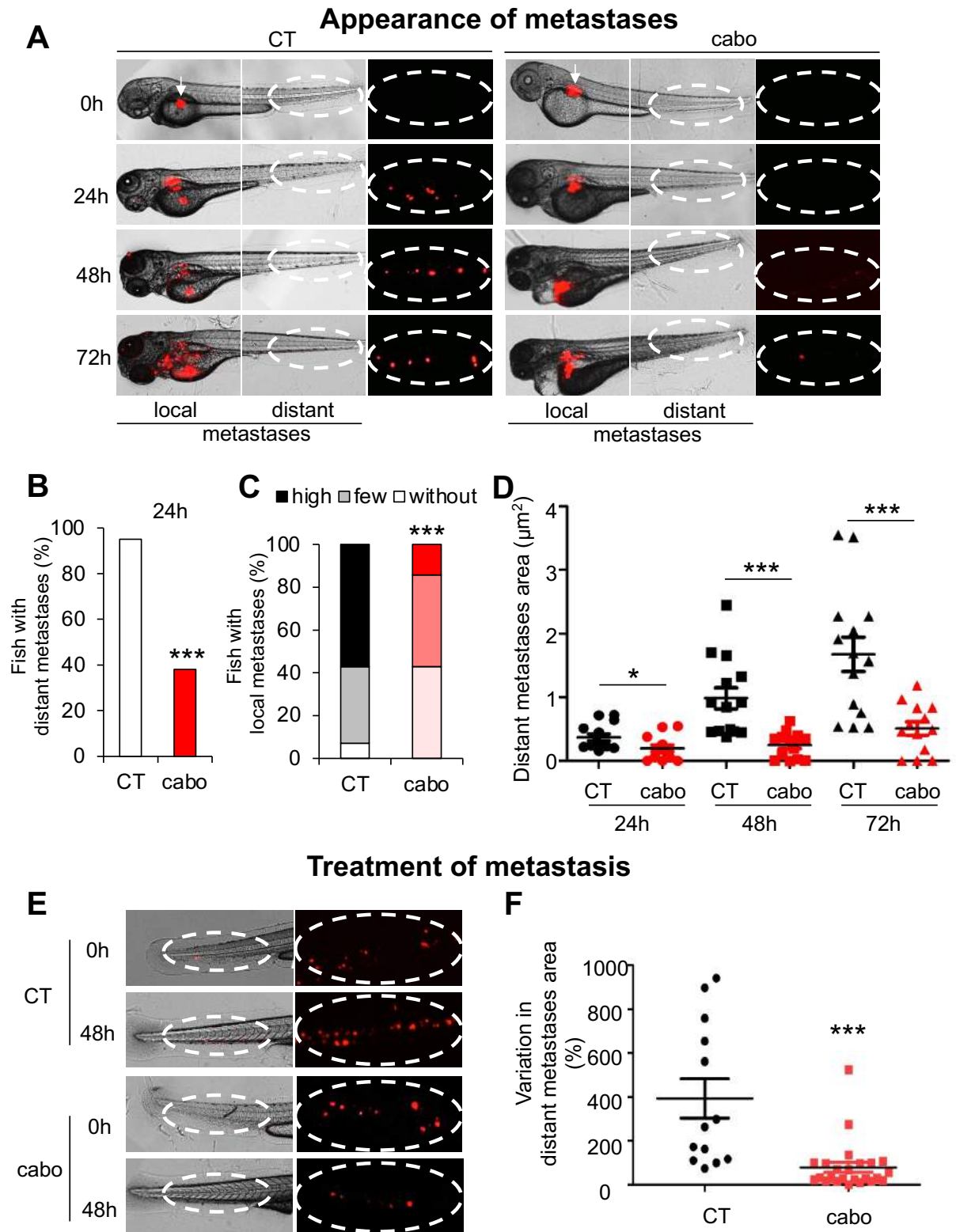


Figure 6

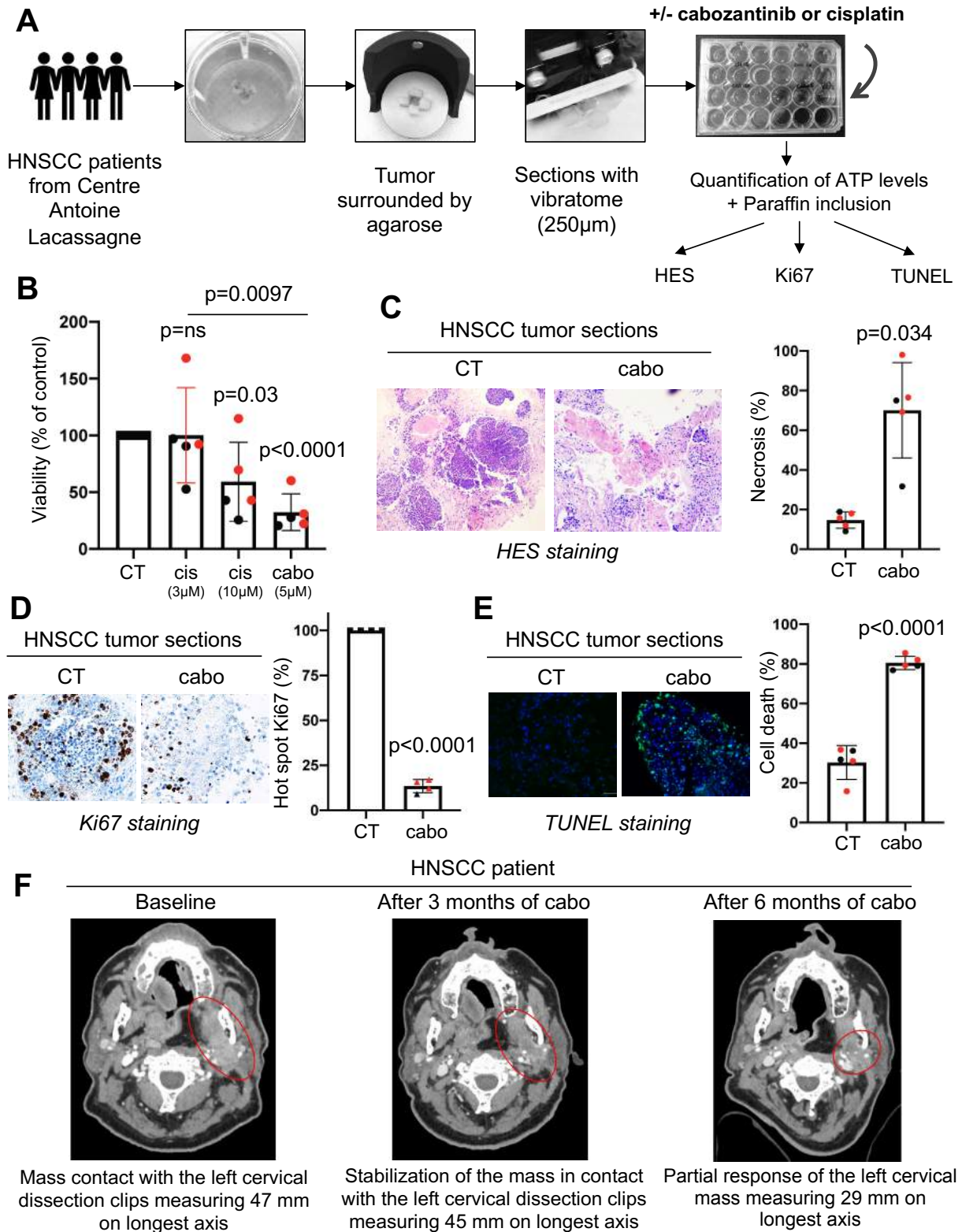


Figure 7

SUPPLEMENTARY FIGURE LEGENDS

Figure S1 HNSCC resistant cells are more aggressive and overexpress AXL and c-MET.

(A) Results from RNAseq of CAL33 vs CAL33RR and CAL27 vs CAL27RR cells.

(B) Quantification of the clonogenic potential of 33, 33R, 33xR, 33RR, 27, 27R and 27RR cells irradiated with 2 or 4 Gy.

(C) The quantification of serum-stimulated cell migration after 24 h was analyzed using Boyden chamber assays in 33, 33R, 33xR, 33RR, 27, 27R and 27RR cells.

(D) 33, 33R, 33xR, 33RR, 27, 27R and 27RR cell invasion after 4 or 7 days was evaluated using spheroid assays. Day 0 was considered as the reference value (1).

Statistics were performed using the *ANOVA test*: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Figure S2 MET and AXL are associated with a poor prognosis of HNSCC.

HNSCC patients' samples were analyzed for MET, AXL, VEGFR2 and VEGFR3 mRNA or protein (AXL) levels (z-score). These results are in whole or in part based upon data generated by the TCGA Research Network. The levels of MET (A), AXL (B), VEGFR2 (E), VEGFA (F), VEGFR3 (G) and VEGFC (H) mRNA in HNSCCs correlated with DFS. The AXL protein levels correlated with DFS (C) and OS (D). DFS and OS were calculated from patient subgroups with mRNA or protein levels that were less or greater than the third quartile value. The Kaplan-Meier method was used to produce survival curves and analyses of censored data were performed using Cox models. Statistical significance (p value) is indicated.

Figure S3 Cabozantinib inhibits migration, invasion and proliferation of HNSCC cells.

(A) CAL27RR cells were treated with 5 μ M cabozantinib (cabo) for 1h and phospho-AXL (p-AXL), phospho-MET (p-MET) and phospho-AKT (p-AKT) were evaluated by immunoblotting. GAPDH served as a loading control.

(B) 27, 27R and 27RR cells were treated with cabozantinib 5 μ M (cabo) and cell invasion after 3 days was evaluated using spheroid assays. Representative images are shown.

(C) 27, 27R and 27RR cells were treated with increasing concentrations of cabozantinib for 48 h. Viable cells were evaluated with ADAM assays.

(D) 27, 27R and 27RR cells were treated with cabozantinib 2.5 or 5 μ M and the clonogenic potential was measured after 10 days. Representative images are shown.

(E) 27, 27R and 27RR cells were treated with cabozantinib 2.5 or 5 μ M and the clonogenic potential was determined after 10 days. Representative images are shown.

Statistics were performed using the *ANOVA test*: *** $p < 0.001$.

Figure S4 Cabozantinib induces cell cycle arrest, polyploidy and cell death.

(A) 27, 27R and 27RR cells were treated with cabozantinib 5 μ M for 24 h. The cell cycle was analyzed by cytometry.

(B to E) 27, 27R and 27RR cells were treated with cabozantinib 5 μ M for 48 h.

(B) Cells were labeled for 15 min with PI and analyzed by flow cytometry. Histograms represent the percentage of cells with a DNA content of 4N, 8N and 16N.

(C) Representative cell cycles and polyploidy are shown (27RR cells).

(D) PARP and cleaved PARP (reflecting apoptosis) were evaluated by immunoblotting. HSP60 served as a loading control.

(E) Cells were stained with PI/AV. Histograms show AV⁺/PI⁻ cells (apoptosis) and AV⁺/PI⁺ cells (post-apoptosis and/or another cell death).

Statistics were performed using the *ANOVA test*: *** $p < 0.001$.

Figure S5 Cabozantinib induces necrosis and acts as an anti-angiogenic drug in experimental HNSCC.

(A) Representative images of necrosis of tumors from control and cabozantinib-treated mice at different magnifications (x40, x100, x200).

(B) Representative images of tumors with blood vessels are shown.

(C) Mouse CD31 mRNA levels were measured by qPCR.

Figure S6 Comparison of the ability of CAL33 and CAL33RR cells to form local and distant metastases in zebrafish.

(A to F) Zebrafish embryos (n=30) were injected with CAL33 or CAL33RR cells (labeled with red DiD) into the perivitelline space. Zebrafish embryos were monitored for tumor metastases using a fluorescent microscope.

(A) Representative images of local metastases (without, few or high local metastases).

(B) The appearance and development of local metastases were visualized during 72 h.

(C) Percentage of fish with distant metastases after 24 h.

(D) Evaluation of the development of distant metastases after 72 h.

(E) Determination of the development of CAL33 cell distant metastases during 72 h.

(F) Evaluation of the development of CAL33RR cell distant metastases during 72 h.

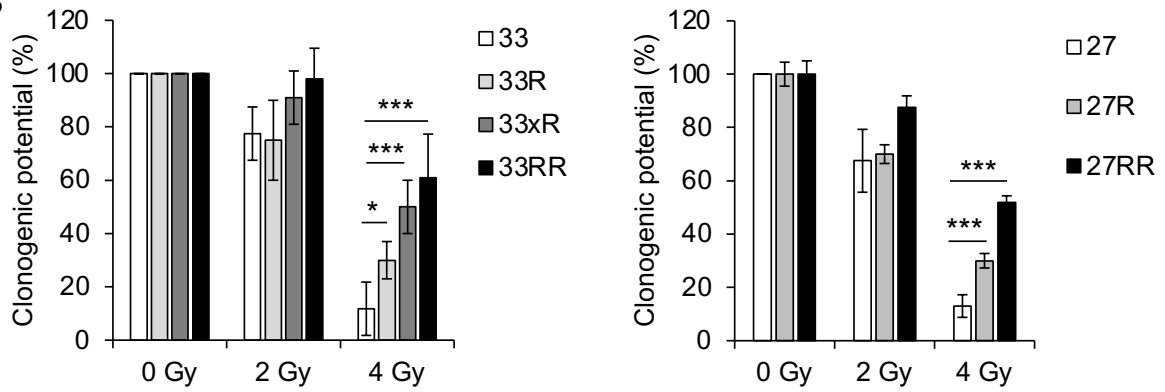
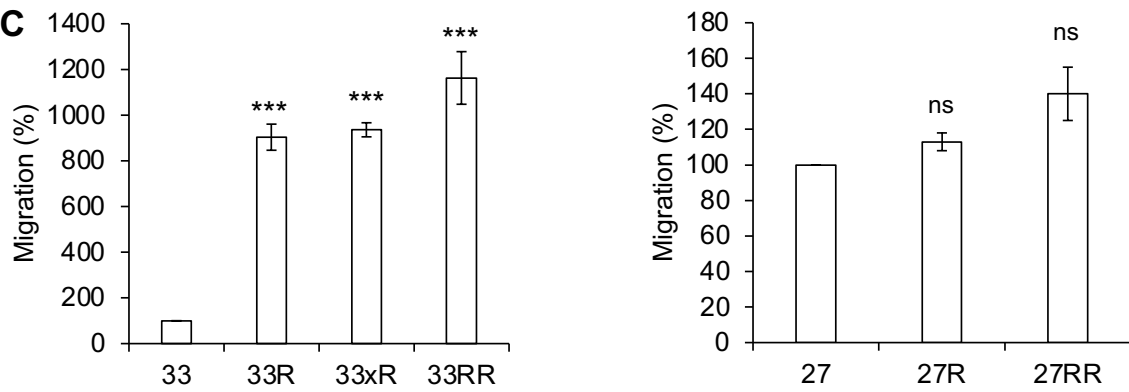
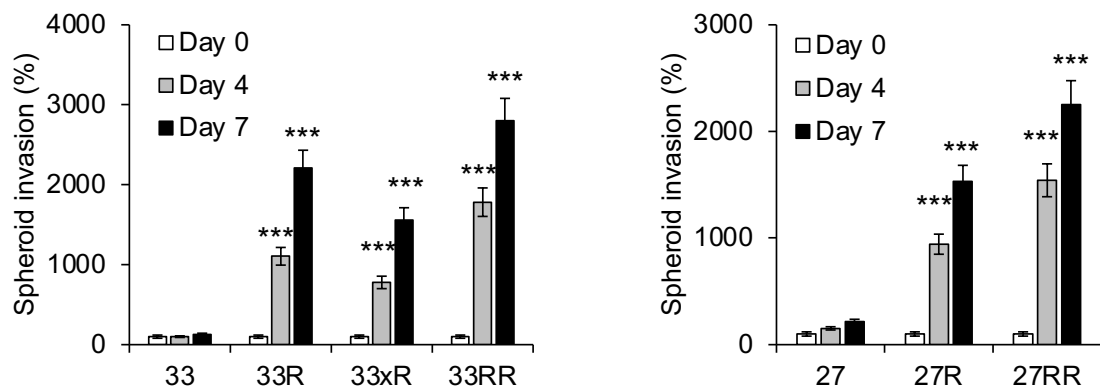
(G) Zebrafish embryos (n=20) were injected with CAL33RR cells (labeled with red DiD) into the perivitelline space. 24 h later, only zebrafish with metastases were chosen and treated for 48 h with cabozantinib (cabo, 1 μ M). Zebrafish embryos were monitored for tumor metastasis using a fluorescent microscope. Areas of distant metastases were quantified. Statistics were performed using the *ANOVA test*: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Table S1 The characteristics of the HNSCC patients (French cohort) included in the study (see Figure 2).

Table S2 The characteristics of the HNSCC patients included in the study (see Figure 7).

A

gene	CAL33 vs CAL33RR		CAL27 vs CAL27RR	
	log2FoldChange	p value	log2FoldChange	p value
AXL	-5.63	9.9-56	-0.93	1.0E-05
MET	-0.97	7.0E-05	0.07	0.84

B**C****D****Figure S1**

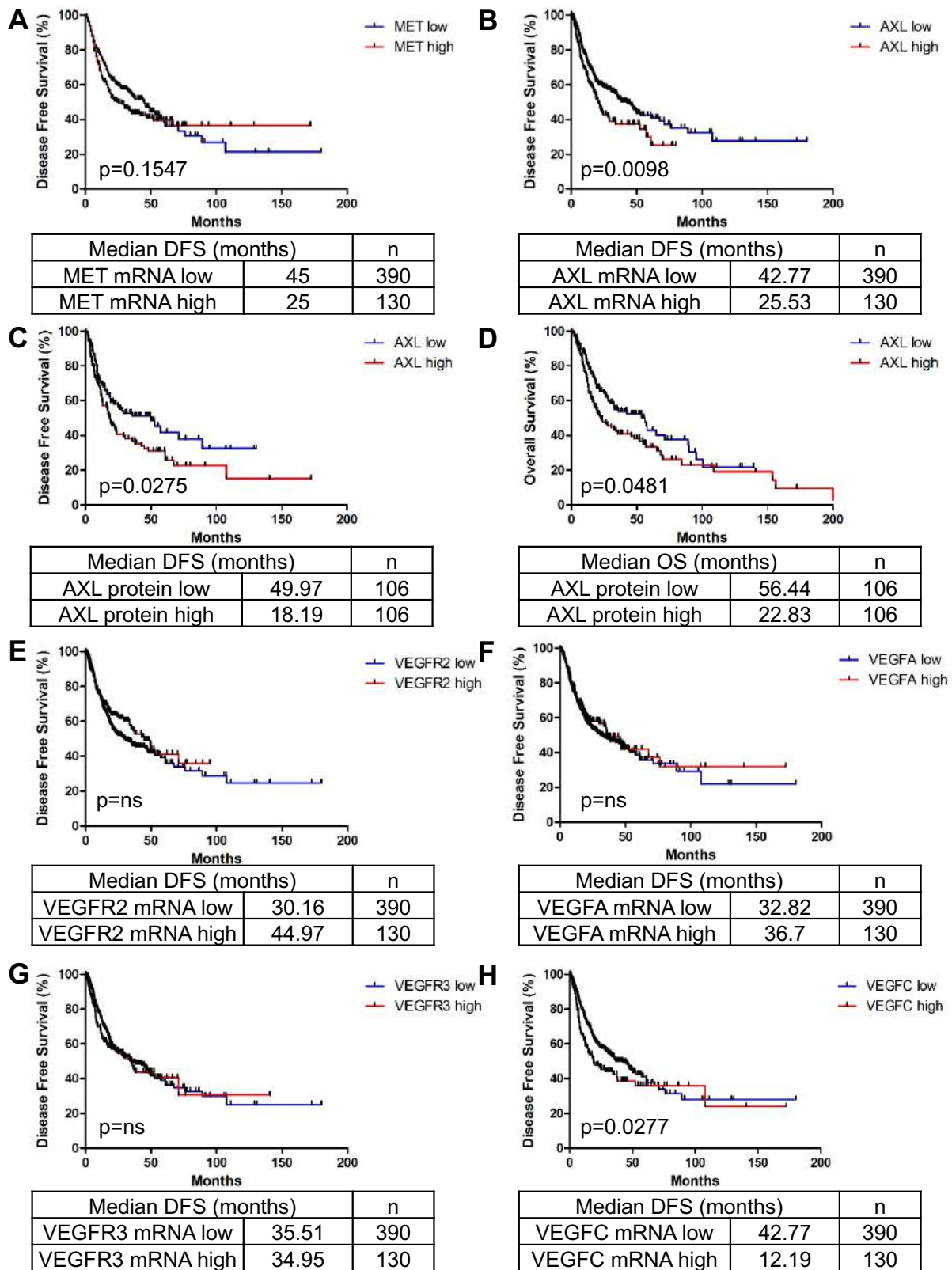
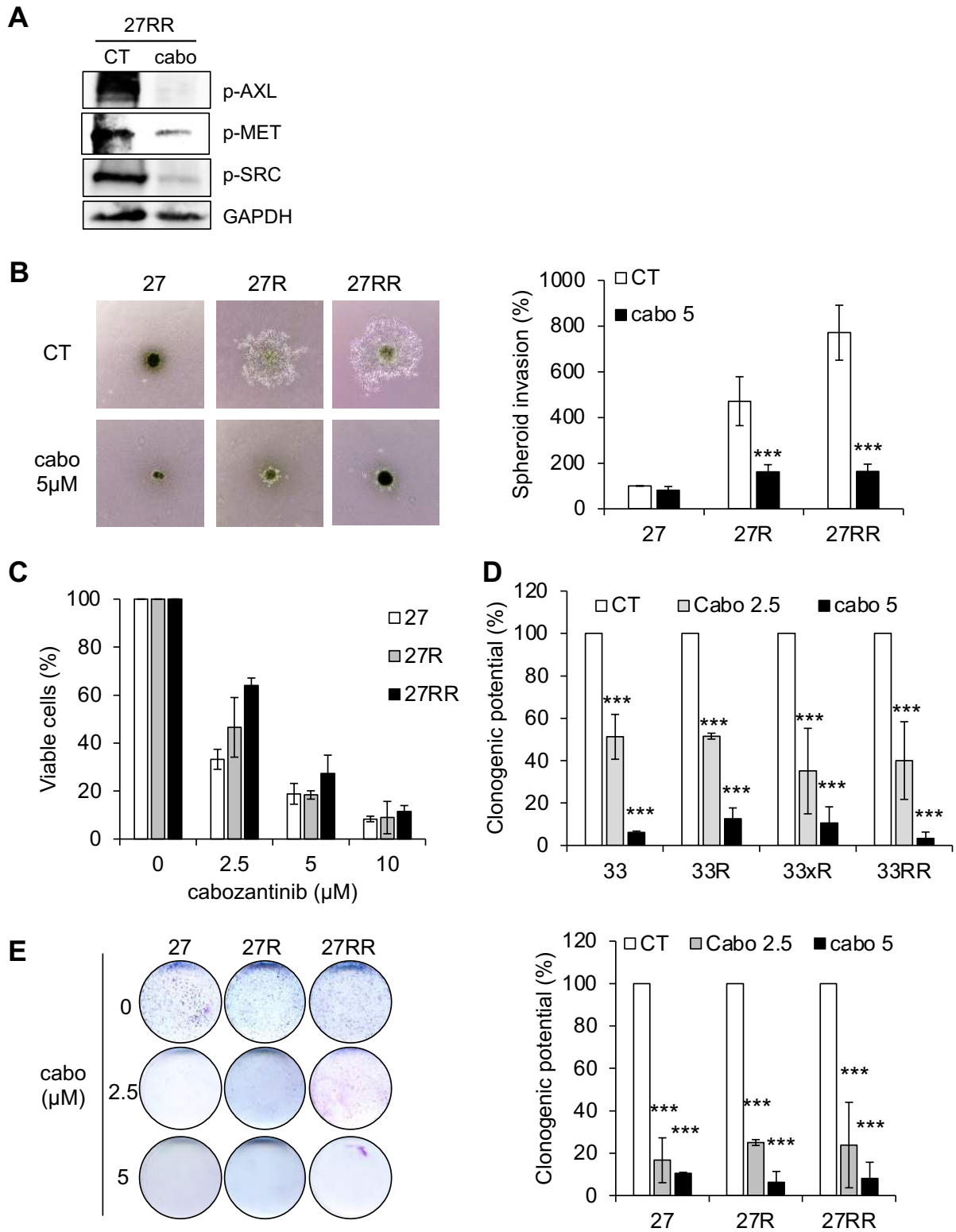


Figure S2



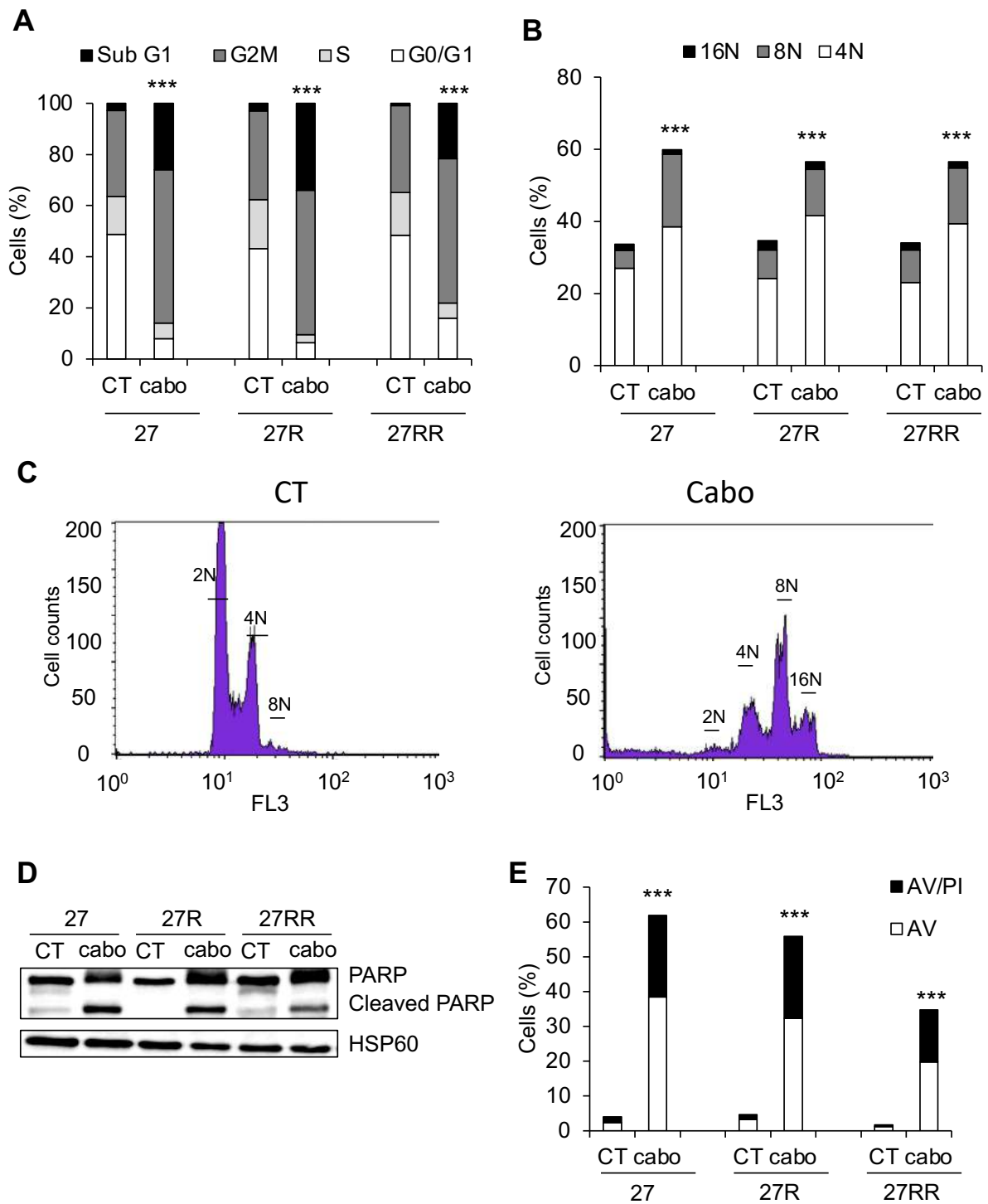


Figure S4

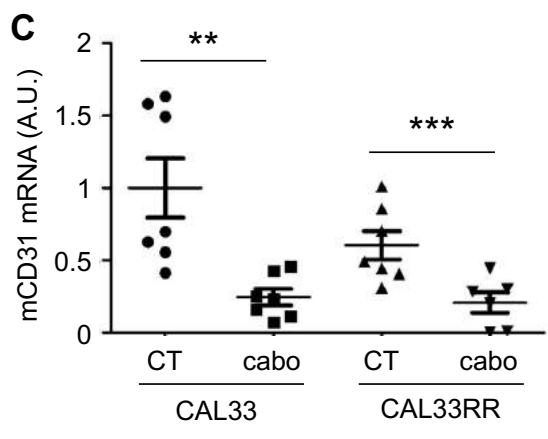
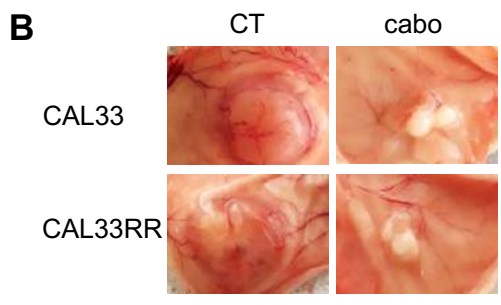
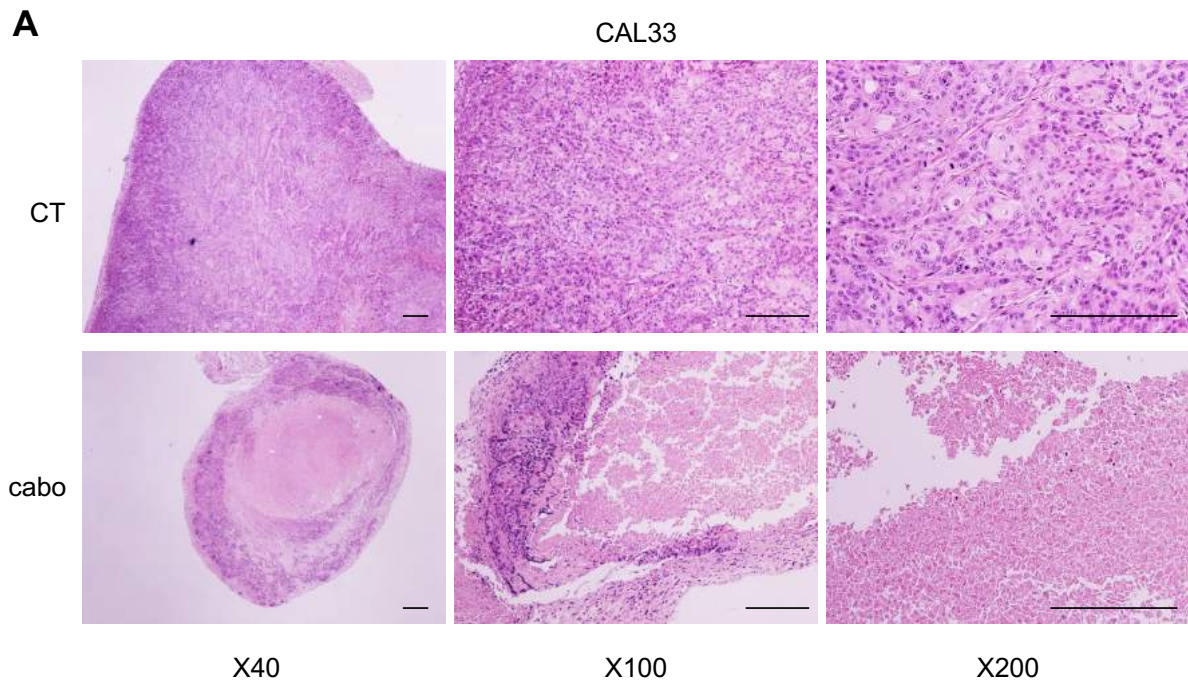


Figure S5

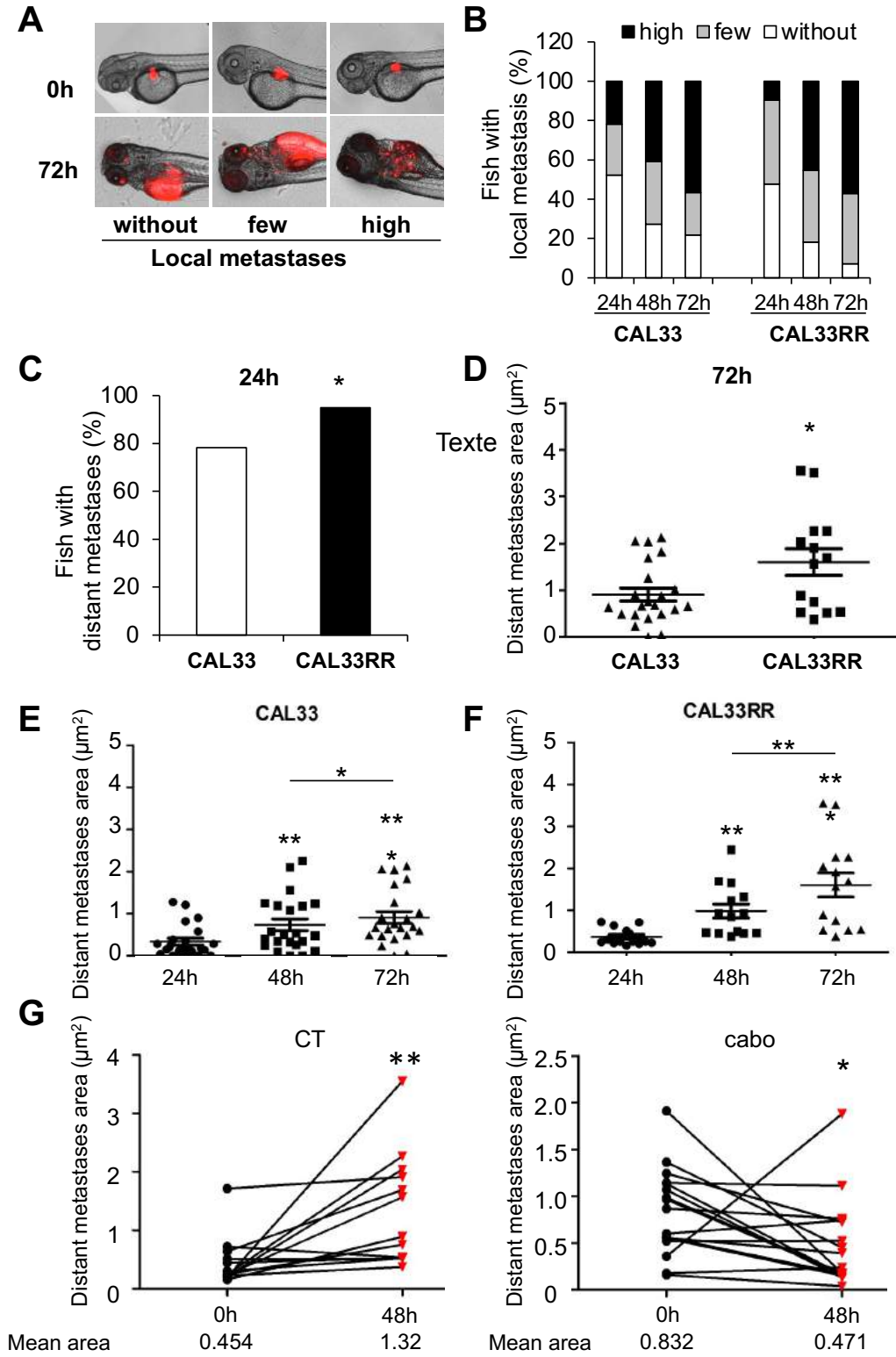


Figure S6

HNSCC	Diagnostic	Relapse after radiotherapy + platin treatment
Number	20	
Sex		
Female	5 (15%)	
Male	15 (75%)	
pT		
1/2	7 (77.8%)	6 (54.5%)
3/4	2 (22.2%)	5 (45.5%)
x	11	9
pN		
0	3 (33.3%)	10 (90.9%)
≥ 1	6 (66.7%)	1 (9.1%)
x	11	9
pM		
0	20 (100%)	16 (80%)
1	0 (0%)	4 (20%)
Location		
Oral cavity	10 (50%)	5 (25%)
Oropharynx	7 (35%)	13 (65%)
Larynx	3 (15%)	0 (0%)
Lung	0 (0%)	2 (10%)
DFS (median)	37 months	
OS (median)	119.1 months	

Table S1

HNSCC patients	
Number	5
Tumor from	
Diagnostic	2 (40%)
Relapse after radiotherapy + platin treatment	3 (60%)
Sex	
Female	2 (40%)
Male	3 (60%)
pT	
1/2	1 (20%)
3/4	4 (80%)
pN	
0	3 (75%)
≥ 1	1 (25%)
x	1
pM	
0	5 (100%)
1	0 (0%)
Location	
Oral cavity	3 (60%)
Oropharynx	2 (40%)

Table S2

3. ARTICLE N°3

Le suppresseur de tumeur ROBO2 réduit l'expression de PLK1 et l'agressivité des cancers des VADS

INTRODUCTION

Les carcinomes épidermoïdes des voies aéro-digestives supérieures (VADS) représentent le cinquième cancer le plus fréquent au monde. Il induit une forte mortalité en raison de la prise en charge tardive et de l'échec des traitements de référence par chirurgie, cisplatine et radiothérapie. Actuellement, 50% des patients rechutent localement et succombent à la maladie en raison de la résistance à la chimiothérapie et à la radiothérapie. Les cancers des VADS sont très agressifs et caractérisés par plusieurs altérations génétiques, induisant de fortes capacités prolifératives et métastatiques^{1,2}.

PLK1 a été identifiée chez *Drosophila melanogaster* et présente un domaine catalytique très conservé chez la majorité des espèces. PLK1 appartient à une famille de sérine thréonine kinases qui comprend cinq membres : PLK1, PLK2, PLK3, PLK4 et PLK5³. Tous les membres possèdent deux domaines : un domaine kinase en N-terminal de 252 acides aminés excepté PLK5, et un domaine polo-box en C-terminal, contenant deux polo-box excepté PLK4 qui n'en contient qu'une seule de 60 à 70 acides aminés⁴. PLK1 est exprimée dans les cellules en division. Elle est essentielle à la prolifération cellulaire et au maintien de la stabilité du génome⁵.

622 protéines partenaires peuvent se lier à PLK1 pendant les différentes étapes du cycle cellulaire⁶ et son expression augmente en phase G2 du cycle cellulaire. Son activité catalytique atteint son maximum en phase M (mitose) et diminue à la fin de la mitose.

Lors de la phase G2, PLK1 est activée par la kinase Aurora A et son cofacteur Bora⁷. En début de mitose, PLK1 phosphoryle Cdc25C pour former le complexe Cdk1/Cycline B qui permettra la progression du cycle cellulaire⁸. Durant la mitose, PLK1 permet la maturation des centrosomes, la réponse aux dommages à l'ADN, l'attachement des microtubules aux kinétochores, la ségrégation des chromosomes et la cytokinèse. En fin de mitose, PLK1 est alors dégradée par le protéasome ce qui met fin à la mitose⁹. PLK1 est seulement exprimée dans les cellules qui prolifèrent dans le thymus, la rate et les organes reproducteurs. En revanche, son expression est fortement augmentée dans de nombreuses tumeurs comme les cancers des VADS. Cette surexpression favorise la résistance aux traitements et est associée à un mauvais pronostic¹⁰.

ROBO2 (Roundabout Guidance Receptor 2) fait partie la famille ROBO comprenant quatre membres : ROBO1, ROBO2, ROBO3 et ROBO4. Cette famille de

récepteurs membranaires fait partie de la superfamille des immunoglobulines. ROBO2 est stimulé par SLIT2, une glycoprotéine sécrétée appartenant à une famille comprenant trois membres, SLIT1, SLIT2, SLIT3. SLIT2 lie par son domaine LRR2 (régions riches en leucines) le premier domaine Ig1 (immunoglobuline 1) de ROBO2¹¹. Le complexe ROBO2-SLIT2 a été découvert chez la drosophile¹² et se forme majoritairement dans le système nerveux mais aussi dans certains organes tels que les reins et les poumons.

Les couples ROBO/SLIT induisent la mise en place des circuits neuronaux lors du développement des vertébrés et des invertébrés¹³. Ils favorisent l'organogenèse^{14,15} et également l'angiogenèse en permettant la motilité des cellules vasculaires endothéliales^{16,17}. Une dérégulation de l'expression de ROBO/SLIT est responsable du développement et de la progression tumorale et à long terme, de métastases. En fonction des cancers, la voie de signalisation ROBO/SLIT est activée ou inhibée. Elle est considérée comme oncogène dans les cancers colorectaux et les carcinomes hépatocellulaires¹⁸⁻²⁰ mais possède un rôle anti-tumoral dans les cancers du sein²¹, de la vessie²², des ovaires²³ et l'ostéosarcome²⁴.

L'hyper-méthylation du promoteur de ROBO2 diminue son expression et stimule la prolifération, la migration et l'invasion des cellules tumorales dans les cancers des VADS²⁵. Aucune étude n'a encore fait le lien entre PLK1 et ROBO2. Nous supposons ici que l'inhibition par hyper-méthylation de ROBO2 serait à l'origine de la surexpression de l'oncogène PLK1 conduisant à un mauvais pronostic chez ces patients.

MATERIELS ET METHODES

• Culture cellulaire et transfection

Les cellules CAL27 ont été achetées auprès de l'ATCC (« l'American Tissue Culture Collection »). Les cellules CAL33 ont été achetées auprès de DSMZ (« German Collection of Microorganisms and Cell Cultures »). Les fibroblastes sains humains ont été isolés à partir d'un tissu sain de patient, qui nous a été donné par le centre de ressources biologiques du Centre Antoine Lacassagne (patient identifié H2O-3893). Les cellules ont été cultivées dans un milieu DMEM (glutaMAX™, Thermo Fisher Scientific) complémenté avec du sérum de veau fœtal 7% et 1% de pénicilline/streptomycine (10 000 µg/ mL, Gibco® Life Technologies).

Les cellules CAL27 et CAL33 ont été transfectées avec un plasmide vide résistant à l'hygromycine (pcDNA3.1/Hygro(+), V87020, addgene) ou avec un plasmide ROBO2 résistant à l'hygromycine (Human ROBO2 transcript variant 2 natural ORF mammalian expression plasmid, HG10310-UT, Sino Biological Inc). Les clones CAL27 et CAL33 ont été sélectionnés respectivement avec de 200 µg/mL et 400 µg/mL d'hygromycine B Gold (100 mg/mL, ant-hg-5, invivogen). Les clones survivants ont été repiqués puis amplifiés et testés. Les clones positifs pour ROBO2 ont été à nouveau sélectionnés avec de l'hygromycine pour confirmer leur pureté, puis amplifiés et testés. Trois clones positifs pour ROBO2 et 2 clones contrôles ont été sélectionnés.

Comme inhibiteurs, le bortezomib (Velcade ®) (100nM) et le QVD (20µM) (Sigma, SML0063-1MG) ont été utilisés respectivement pour inhiber le protéasome et la mort cellulaire.

• Test de clonogénicité

5000 cellules par condition ont étéensemencées en diamètre 60. Les colonies ont été détectées après 10 jours de culture. Les cellules ont ensuite été lavées, fixées et colorées avec du GEMSA (Sigma).

• Immunoblots

Les cellules ont été lysées dans un tampon contenant 7,5% de SDS, 30% de glycérol, 0,3 M Tris pH6,8. 30 à 50 µg de protéines ont été séparés sur des gels polyacrylamide 8-10% de SDS-PAGE, transférés sur une membrane PVDF (Immobilon, Millipore) puis exposés aux anticorps appropriés. Les protéines ont été visualisées avec le système ECL à l'aide d'anticorps secondaires conjugués à la peroxydase de raifort anti-lapin ou anti-souris. Les anticorps primaires suivants ont été utilisés : PLK1 (Abcam, ab17056), ROBO2 (Cell signaling, #45568S), ERK 1/2 (abcam, ab32538), AKT (Cell signaling, #9272), c-ABL (Santa Cruz, sc-23), PAK1 (Cell signaling, #2602T), p38 (Abcam, ab32142), CDC42 (BD Biosciences, 610929), RAC1 (BD Biosciences, 610651), phospho-ERK (Cell signaling, #9101S), phospho-AKT (Cell signaling, #9271S), phospho-p38 (Cell signaling, #), phospho-ABL (Cell signaling, #2865S), phospho-PAK1 (Cell signaling, #2601T).

- **Analyses par RT-qPCR**

L'ARN des cellules a été purifié avec le kit RNeasy (Quiagen). Le kit « QuantiTect Reverse Transcription » (Quiagen) a été utilisé pour obtenir l'ADNc. Le programme de PCR a été exécuté sur l'appareil « Professional Basic Thermocycler » (Biometra). Le SYBR green (Eurogentec) a été utilisé pour la qPCR. Le niveau d'ARNm a été normalisé avec de l'ARN messenger contrôle 36B4.

- **ARN interférent**

Le siRNA de PAK1 et le siContrôle ont été obtenu auprès d'Ambion (siPAK1 Silencer® Select - Validated (S10019) Cat#: 4390824 ; Silencer™ Select Negative Control No. 1 siRNA Cat#: 4390843). Le siROBO2 a été obtenu auprès de ThermoFisher (s12094). 150 000 cellules ont étéensemencées et transfectées avec les siRNAs PAK1 ou Contrôle (100nM/puit en plaque de culture de 6 puits) en utilisant 500 µL de milieu opti-MEM (Gibco), en présence de 5 µL de Lipofectamine RNAiMAX (Invitrogen) et de 2 mL de milieu DMEM sans pénicilline/streptomycine. Après 48 h de transfection, un immunoblot a été effectué.

- **Test d'invasion en matrigel**

2000 cellules ont étéensemencées dans une plaque 48 puits, recouvertes d'agarose 0,8%. Après deux jours, les sphéroïdes ont été mélangés avec 200 µL de matrigel (Corning® Matrigel® Matrix), 100 µL de collagène I (8 mg/mL; Corning), 80 µL HEPES 1M et DMEM 7% FCS dans une plaque 12 puits. Le milieu de culture DMEM 7% a été ajouté après 2h, une fois le matrigel polymérisé. Des photos ont été effectuées à J0, J2, J6 et J10.

- **Test de migration par scratch assay (test de blessure)**

Le test de blessure permet de mesurer la vitesse de migration cellulaire. Les cellules sont cultivées jusqu'à la confluence (50 000-75 000 cellules respectivement pour les CAL33 et CAL27 dans 75µL) dans les puits « ibidi » en diamètre 35 (Culture-Insert 3 Well in µ-Dish 35 mm, high, ibidi, 80366). Le lendemain matin (CAL27) et le lendemain soir (CAL33) les puits sont enlevés et les cellules au bord de la plaie se polarisent et migrent dans l'espace de la plaie. Des photos sont prises à J0, J12 et J24.

- **Expérience de Pull-down**

Le pull-down est une méthode *in vitro* utilisée pour détecter ou confirmer les interactions entre plusieurs protéines.

Ce test est similaire dans la méthodologie aux expériences de co-immunoprécipitation dans son utilisation d'un ligand d'affinité pour capturer des protéines d'interaction. L'approche pull-down utilise une protéine purifiée et étiquetée comme « appât » pour lier toutes les protéines en interaction. 150µL de billes GST-PAK/condition (Laboratoire C3M, Équipe Laurent Boyer) sont resuspendues dans 100µL de tampon RAC/condition.

Les cellules sontensemencées à confluence et lysées dans 1mL de tampon RAC (25mM Tris pH 7.5 + 150mM NaCl + 5mM MgCl₂+ 0,5% Triton-X100 + 4% glycérol + 10mM NaF dans 100mL d'eau). Le lysat est centrifugé pendant 10 min à 4°C. 65µL de surnageant est resuspendu dans du Laemmli 4X (lysat total).

Le reste du surnageant est mélangé à 100µL de billes GST-PAK puis incubés 1h à 4h sur agitateur à rotation. Le surnageant est aspiré puis les billes sont lavées trois fois avec du tampon RAC. Le culot est ensuite resuspendu dans du Laemmli 4X. les échantillons sont chauffés 5min à 95°C. Le surnageant est récupéré à la seringue Hamilton. Un immunoblot est ensuite réalisé sur les échantillons des lysats totaux et GST-PAK.

- **Patients**

Tous les patients ont donné leur consentement écrit pour l'utilisation d'échantillons de tumeurs pour la recherche. Cette étude a été menée conformément à la Déclaration d'Helsinki.

Cohorte TCGA : patients atteints d'un cancer des VADS - Analyse de l'ARN messager de PLK1 et de ROBO2 : Les données sur le séquençage normalisé de l'ARN messager (RNA-Seq) produites par The Cancer Genome Atlas (TCGA) ont été téléchargées à partir de cBioportal (www.cbioportal.org, TCGA Provisional ; ARN-Seq V2). Les données sont disponibles pour 530 échantillons de tumeurs VADS soumis à un profilage d'expression d'ARNm.

La survie sans progression (DFS) et la survie globale (OS) ont été calculées à partir de sous-groupes de patients dont les niveaux de ROBO2 (z-score) étaient inférieurs ou supérieurs à la valeur du 1^{er} quartile. Les corrélations entre l'expression de PLK1 et de ROBO2 ont été établies à partir de sous-groupes de patients dont les niveaux de ROBO2 ou PLK1 (z-score) étaient supérieurs au 1^{er} quartile.

Cohorte de patients atteints d'un cancer des VADS du Centre Antoine Lacassagne : Le service d'anatomopathologie du Centre Antoine Lacassagne nous a fourni des échantillons de tumeurs de patients (N = 20) en paraffine au moment du diagnostic et de la rechute. Ces échantillons ont été déparaffinés et l'ARN a été extrait avec le kit RNeasy FFPE (Quiagen 73504). Une RT-qPCR a été réalisée pour mesurer l'expression de PLK1 et de ROBO2.

- **Analyses statistiques**

Des analyses statistiques ont été réalisées avec le logiciel Prism 8. Les résultats sont exprimés sous la forme de la moyenne +/- l'écart-type. La signification statistique a été déterminée par le test t de Student. L'ANOVA avec le test de Bonferroni a été utilisée pour de multiples comparaisons.

Pour les patients :

Le test *t* de Student a été utilisé pour comparer les variables continues et le test χ^2 , ou le test exact de Fisher (lorsque les conditions d'utilisation du test χ^2 n'étaient pas remplies), ont été utilisés pour les variables catégorielles. La survie sans progression

(DFS) a été défini comme le temps écoulé entre la chirurgie et l'apparition de métastases. La survie globale (SG) a été définie comme le temps écoulé entre la chirurgie et la date du décès, quelle qu'en soit la cause, censurant les personnes vivantes lors du dernier suivi. La méthode Kaplan-Meier a été utilisée pour produire des courbes de survie et des analyses de données ont été effectuées à l'aide de modèles de Cox.

RESULTATS

La perte de ROBO2 est associée à un mauvais pronostic chez les patients atteints d'un cancer des VADS

Les niveaux d'ARNm de ROBO2 ont été déterminés chez les patients atteints de cancers des VADS à l'aide de la base de données TCGA. L'ARNm de ROBO2 est plus faible dans le tissu VADS en comparaison au tissu sain ($p=0,05$, Figure 1A). Dans les cancers des VADS provenant de la cohorte du TCGA, de faibles niveaux d'expression de ROBO2 sont corrélés à une survie sans progression (DFS, 56,9 mois vs 34,1 mois, $p=0,0151$) et une survie globale (OS, 71,2 mois vs 67,7 mois, $p=0,0397$) plus courtes (Figure 1B et 1C).

L'expression de ROBO2 est plus faible chez les patients VADS ($N = 20$) en rechute après une première ligne de traitement à base de cisplatine et de radiothérapie ($p = 0,0444$, Figure 1D).

In vitro, les lignées CAL33 et CAL27 montrent une très faible expression de l'ARNm et de la protéine ROBO2 en comparaison des cellules saines fibroblastiques (Figures 1E et 1F). A l'inverse, les lignées CAL33 et CAL27 montrent une surexpression de PLK1 comparée aux cellules saines humaines fibroblastiques (Figure 1F).

Ces résultats suggèrent donc le rôle de suppresseur de tumeur de ROBO2 dans les cancers des VADS.

La surexpression de ROBO2 dans les lignées VADS diminue leur agressivité

Pour comprendre le rôle de suppresseur de tumeur de ROBO2, nous avons surexprimé ROBO2 dans les lignées CAL33 et CAL27 et nous avons évalué les effets biologiques de cette surexpression. Trois clones surexprimant ROBO2 ont été sélectionnés pour chaque lignée CAL27 et CAL33 (Figure 2A). La prolifération des clones (27 pROBO2 et 33 pROBO2) a été mesurée et comparée aux clones vides (27 pVide et 33 pVide). Les clones 27 et 33 pROBO2 prolifèrent trois fois moins que les clones 27 et 33 pVide (Figure 2B et 2C). En test de clonogénicité les clones pVide et pROBO2 ne diffèrent pas en termes de nombre. Cependant les clones 27 et 33 pROBO2 sont plus petite que les clones 27 et 33 pVide, confirmant leur faible capacité de prolifération (Figure 2D et 2E). En culture 3D, les clones 27 et 33 pROBO2 envahissent moins que les clones 27 et 33 pVide (Figure 2F et 2G).

Le test de blessure appelé « scratch assay » mesure les capacités et la vitesse de migration cellulaire. Les clones 27 et 33 pROBO2 migrent moins vite que les clones 27 et 33 pVide (Figure 2H). Ces résultats suggèrent que ROBO2 diminue les capacités migratoires des cellules tumorales des VADS.

L'inhibition de ROBO2 induit la surexpression de PLK1 dans les cancers des VADS

A partir des données du TCGA, la corrélation entre l'expression de PLK1 et ROBO2 a été établie chez les patients VADS. Les patients avec un faible taux d'expression de ROBO2 montrent une faible expression de PLK1 ($p<0,0001$). A l'inverse, les patients

présentant une forte expression de PLK1 montrent une faible expression de ROBO2 ($p=0,0162$) (Figure 3A).

La corrélation entre l'expression de PLK1 et ROBO2 a également été établie chez 20 patients VADS provenant du Centre Antoine Lacassagne. Les patients qui surexpriment PLK1 montrent une faible expression de ROBO2, avec un résultat proche de la significativité statistique ($p=0,0542$). Cependant, les patients qui surexpriment ROBO2 montre une forte expression significative de PLK1 ($p=0,0053$) (Figure 3B).

In vitro, l'inhibition de ROBO2 par ARN interférent dans les fibroblastes humains issus d'un tissu sain, induit l'augmentation de l'expression protéique de PLK1 (Figure 3C).

La surexpression transitoire de ROBO2 dans les cellules CAL27 et CAL33 entraîne une diminution de PLK1 (Figure 3D). Les clones CAL27 et CAL33 pROBO2 montrent une diminution significative de PLK1 (Figure 3E).

Nous faisons l'hypothèse que la réexpression de ROBO2 entraîne la dégradation de PLK1 par le protéasome. Nous avons donc utilisé le Bortezomib (inhibiteur du protéasome) et du QVD (inhibition des caspases et donc de l'apoptose). L'utilisation de ces deux inhibiteurs entraîne une surexpression de PLK1 dans les clones surexprimant ROBO2. Ainsi, la surexpression de ROBO2 diminue l'expression de PLK1 qui est dégradé par le protéasome (Figure 3F). La surexpression de ROBO2 dans les CAL27 et les CAL33 diminue l'expression de PLK1 et baisse également l'activité des voies de signalisation AKT (p-AKT), p38 (p-p38) et ERK (p-ERK) qui contrôlent la prolifération, la migration et l'inflammation. La surexpression de ROBO2 inhibe de ce fait des paramètres d'agressivité tumorale (Figure 3G).

Les mécanismes de surexpression de PLK1 dans les cancers de VADS

Dans le contexte de la répulsion axonale lors du développement, la voie de signalisation de ROBO2 inhibe l'activation de RAC1 et CDC42 via des GAPs liées à SLIT/ROBO (srGAP et Vlse crGAP)²⁶⁻²⁸. A l'inverse, la répression de ROBO2 dans les cancers des VADS permettrait l'activation de RAC1 ou CDC42 et de la protéine PAK1 activant la polymérisation du cytosquelette d'actine et la migration axonale²⁹.

Des expériences de Pull-down avec des billes GST-PAK montrent que seules les formes activées RAC1-GTP et CDC42-GTP se lient aux billes. Les clones CAL27 et CAL33 pVide montrent une forte expression de RAC1 et CDC42 activés. L'expression de RAC1-GTP ne change pas dans les clones CAL27 et CAL33 pROBO2. En revanche ils présentent une forme moins active de CDC42-GTP (Figure 4A).

La surexpression de ROBO2 dans ces cellules permettrait donc de diminuer l'activation de CDC42. De plus les clones CAL27 et CAL33 pROBO2 montrent une activation plus faible de PAK1 (P-PAK1) comparé aux clones CAL27 et CAL33 pVide (Figure 4B). La perte d'activité de CDC42 empêcherait donc l'activation de PAK1. L'utilisation d'un ARN interférent ciblant PAK1 (siPAK1) dans les clones 27 et 33 pVide entraîne la diminution de l'expression de PLK1 (Figure 4C). Ainsi, la surexpression de ROBO2 diminue l'activation de CDC42 empêchant l'activation de PAK1 et la surexpression de PLK1.

Cependant la diminution de PLK1 peut faire intervenir une autre voie de signalisation de ROBO2. c-ABL inhibe le récepteur ROBO et favorise la polymérisation du cytosquelette d'actine nécessaire à la migration axonale³⁰. L'inhibition de PAK1 n'induit pas de différence d'expression de c-ABL (Figure 4C). De plus, les clones CAL27 et CAL33 pROBO2 montrent une activation plus faible de c-ABL (p-ABL) comparé aux clones CAL27 et CAL33 pVide (Figure 4D).

L'utilisation de l'imatinib (5 μ M), un inhibiteur spécifique de c-ABL, dans les clones 27 et 33 pVide entraîne la diminution de l'expression de PLK1 à partir de 16h de traitement et induit la surexpression de PAK1 (Figure 4E).

En condition physiologique, l'expression basale de ROBO2 inhibe l'activation de CDC42-GDP en CDC42-GTP, empêchant la phosphorylation de PAK1 et donc de PLK1.

Dans le cas des cancers des VADS, la perte d'expression de ROBO2 par hyperméthylation induit l'activation de CDC42-GTP, permettant la phosphorylation de PAK1 puis l'activation de PLK1 sur la sérine 49³¹ (Figure 4F).

En parallèle, l'expression basale de ROBO2 réprime l'expression de c-ABL et donc l'activation de PLK1. Dans les cancers des VADS, la perte de ROBO2 réactive l'expression de c-ABL qui phosphoryle PLK1 sur la tyrosine 425³² (Figure 4F).

Cependant, l'inhibition de c-ABL dans ces cancers pourrait induire l'activation de la voie PAK1 comme mécanisme de secours.

La diminution de ROBO2 dans les cellules de carcinomes épidermoïdes stimule l'expression de PLK1 et des voies de signalisations impliquées dans la prolifération, l'invasion et la migration des cellules cancéreuses. La surexpression de ROBO2 diminue l'activation de ces voies, permettant de réduire les caractéristiques d'agressivité des cellules cancéreuses. La cascade de signalisation entre ROBO2 et PLK1 impliquant PAK1 et c-ABL ouvre de nouvelles pistes thérapeutiques dans les cancers des VADS, notamment chez les patients résistants aux traitements actuels (radiothérapie et cisplatine).

- 1 Bray, F. *et al.* Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin* **68**, 394-424, doi:10.3322/caac.21492 (2018).
- 2 Johnson, D. E. *et al.* Head and neck squamous cell carcinoma. *Nat Rev Dis Primers* **6**, 92, doi:10.1038/s41572-020-00224-3 (2020).
- 3 de Cárcer, G., Manning, G. & Malumbres, M. From PLK1 to PLK5: Functional evolution of polo-like kinases. *Cell Cycle* **10**, 2255-2262, doi:10.4161/cc.10.14.16494 (2011).
- 4 Glover, D. M., Hagan, I. M. & Tavares, A. A. M. Polo-like kinases: a team that plays throughout mitosis. *Genes & Development* **12**, 3777-3787, doi:10.1101/gad.12.24.3777 (1998).
- 5 Gutteridge, R. E. A., Ndiaye, M. A., Liu, X. & Ahmad, N. PLK1 Inhibitors in Cancer Therapy: From Laboratory to Clinics. *Molecular Cancer Therapeutics* **15**, 1427-1435, doi:10.1158/1535-7163.MCT-15-0897 (2016).
- 6 Lowery, D. M. *et al.* Proteomic screen defines the Polo-box domain interactome and identifies Rock2 as a PLK1 substrate. *The EMBO Journal* **26**, 2262-2273, doi:10.1038/sj.emboj.7601683 (2007).
- 7 Archambault, V. & Glover, D. M. Polo-like kinases: conservation and divergence in their functions and regulation. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **10**, 265-275, doi:10.1038/nrm2653 (2009).
- 8 Weng Ng, W. T., Shin, J.-S., Roberts, T. L., Wang, B. & Lee, C. S. Molecular interactions of polo-like kinase 1 in human cancers. *Journal of Clinical Pathology* **69**, 557-562, doi:10.1136/jclinpath-2016-203656 (2016).
- 9 Iliaki, S., Beyaert, R. & Afonina, I. S. Polo-like kinase 1 (PLK1) signaling in cancer and beyond. *Biochem Pharmacol* **193**, 114747, doi:10.1016/j.bcp.2021.114747 (2021).
- 10 Hagege, A. *et al.* The Polo-like kinase 1 inhibitor onvansertib represents a relevant treatment for head and neck squamous cell carcinoma resistant to cisplatin and radiotherapy. *Theranostics* **11**, 9571-9586, doi:10.7150/thno.61711 (2021).
- 11 Morlot, C. *et al.* Structural insights into the SLIT-Robo complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **104**, 14923-14928, doi:10.1073/pnas.0705310104 (2007).
- 12 Brose, K. *et al.* SLIT proteins bind Robo receptors and have an evolutionarily conserved role in repulsive axon guidance. *Cell* **96**, 795-806, doi:10.1016/s0092-8674(00)80590-5 (1999).
- 13 Wang, K. H. *et al.* Biochemical Purification of a Mammalian SLIT Protein as a Positive Regulator of Sensory Axon Elongation and Branching. *Cell* **96**, 771-784, doi:10.1016/S0092-8674(00)80588-7 (1999).
- 14 Piper, M., Georgas, K., Yamada, T. & Little, M. Expression of the vertebrate SLIT Gene family and their putative receptors, the Robo genes, in the developing murine kidney. *Mechanisms of Development* **94**, 213-217, doi:10.1016/S0925-4773(00)00313-0 (2000).
- 15 Vogler, G. & Bodmer, R. Cellular Mechanisms of Drosophila Heart Morphogenesis. *Journal of Cardiovascular Development and Disease* **2**, 2-16, doi:10.3390/jcdd2010002 (2015).
- 16 Dubrac, A. *et al.* Targeting NCK-Mediated Endothelial Cell Front-Rear Polarity Inhibits Neovascularization. *Circulation* **133**, 409-421, doi:10.1161/circulationaha.115.017537 (2016).
- 17 Rama, N. *et al.* SLIT2 signaling through Robo1 and Robo2 is required for retinal neovascularization. *Nature Medicine* **21**, 483-491, doi:10.1038/nm.3849 (2015).
- 18 Sanz-Pamplona, R. *et al.* Aberrant gene expression in mucosa adjacent to tumor reveals a molecular crosstalk in colon cancer. *Molecular Cancer* **13**, 46, doi:10.1186/1476-4598-13-46 (2014).
- 19 Avci, M. E., Konu, O. & Yagci, T. Quantification of SLIT-ROBO transcripts in hepatocellular carcinoma reveals two groups of genes with coordinate expression. *BMC Cancer* **8**, 392, doi:10.1186/1471-2407-8-392 (2008).
- 20 Li, Y. *et al.* Identification of SRGAP2 as a potential oncogene and a prognostic biomarker in hepatocellular carcinoma. *Life Sciences* **277**, 119592, doi:https://doi.org/10.1016/j.lfs.2021.119592 (2021).
- 21 Dallol, A. *et al.* SLIT2, a Human Homologue of the Drosophila SLIT2 Gene, Has Tumor Suppressor Activity and Is Frequently Inactivated in Lung and Breast Cancers. **8** (2002).
- 22 Krafft, U. *et al.* Nuclear Localization of Robo is Associated with Better Survival in Bladder Cancer. *Pathology & Oncology Research*, doi:10.1007/s12253-018-0447-z (2018).
- 23 Dickinson, R. E., Fegan, K. S., Ren, X., Hillier, S. G. & Duncan, W. C. Glucocorticoid Regulation of SLIT/ROBO Tumour Suppressor Genes in the Ovarian Surface Epithelium and Ovarian Cancer Cells. *PLoS ONE* **6**, e27792, doi:10.1371/journal.pone.0027792 (2011).
- 24 Marko, T. A. *et al.* SLIT-Robo GTPase-Activating Protein 2 as a metastasis suppressor in osteosarcoma. *Scientific Reports* **6**, doi:10.1038/srep39059 (2016).

- 25 Ghosh, S. *et al.* Alterations of ROBO1/DUTT1 and ROBO2 loci in early dysplastic lesions of head and neck: clinical and prognostic implications. *Hum Genet* **125**, 189-198, doi:10.1007/s00439-008-0610-9 (2009).
- 26 Wong, K. *et al.* Signal transduction in neuronal migration: roles of GTPase activating proteins and the small GTPase CDC42 in the SLIT-Robo pathway. *Cell* **107**, 209-221, doi:10.1016/s0092-8674(01)00530-x (2001).
- 27 Fritz, J. L. & VanBerkum, M. F. A. Regulation of RHO Family GTPases Is Required to Prevent Axons from Crossing the Midline. *Developmental Biology* **252**, 46-58, doi:https://doi.org/10.1006/dbio.2002.0842 (2002).
- 28 Hu, H. *et al.* Cross GTPase-activating protein (CrossGAP)/Vilse links the Roundabout receptor to Rac to regulate midline repulsion. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 4613-4618, doi:10.1073/pnas.0409325102 (2005).
- 29 Fan, X., Labrador, J. P., Hing, H. & Bashaw, G. J. SLIT stimulation recruits Dock and Pak to the roundabout receptor and increases Rac activity to regulate axon repulsion at the CNS midline. *Neuron* **40**, 113-127, doi:10.1016/s0896-6273(03)00591-9 (2003).
- 30 Bashaw, G. J., Kidd, T., Murray, D., Pawson, T. & Goodman, C. S. Repulsive axon guidance: Abelson and Enabled play opposing roles downstream of the roundabout receptor. *Cell* **101**, 703-715, doi:10.1016/s0092-8674(00)80883-1 (2000).
- 31 Maroto, B., Ye, M. B., von Lohneysen, K., Schnelzer, A. & Knaus, U. G. P21-activated kinase is required for mitotic progression and regulates PLK1. *Oncogene* **27**, 4900-4908, doi:10.1038/onc.2008.131 (2008).
- 32 Yang, X. *et al.* Cervical Cancer Growth Is Regulated by a c-ABL-PLK1 Signaling Axis. *Cancer Res* **77**, 1142-1154, doi:10.1158/0008-5472.Can-16-1378 (2017).

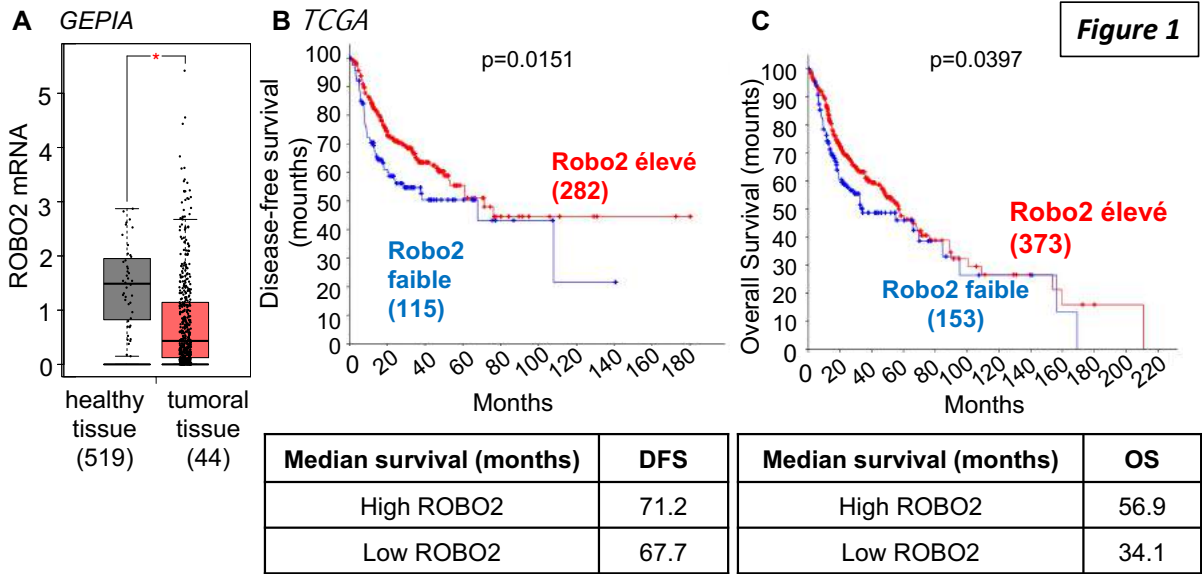


Figure 1

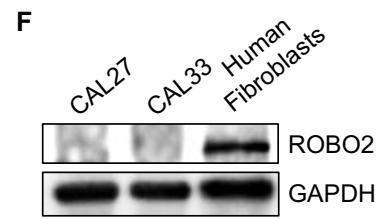
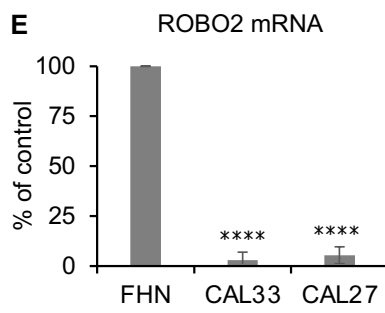
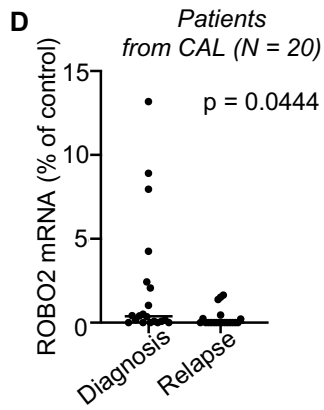


Figure 2

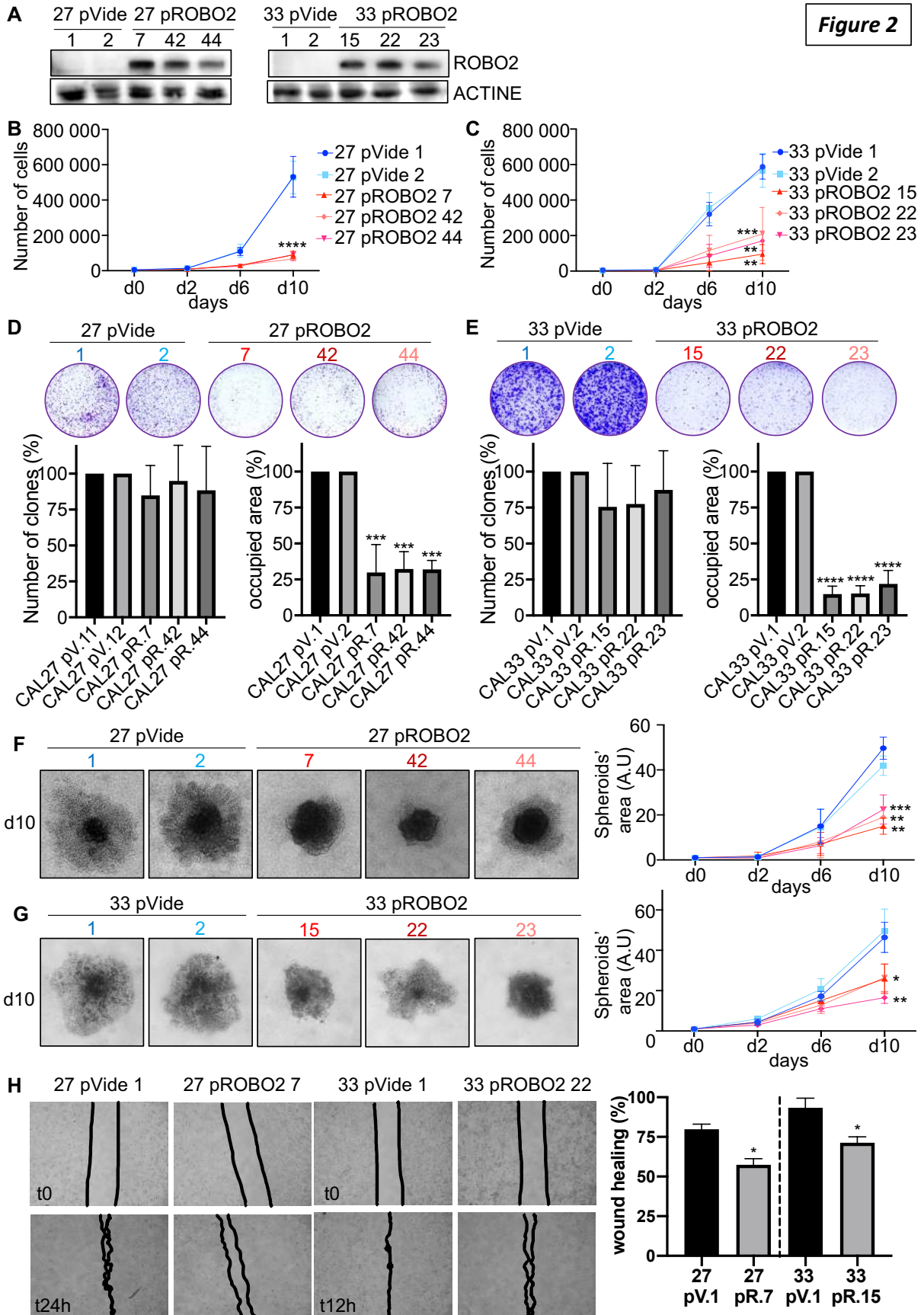
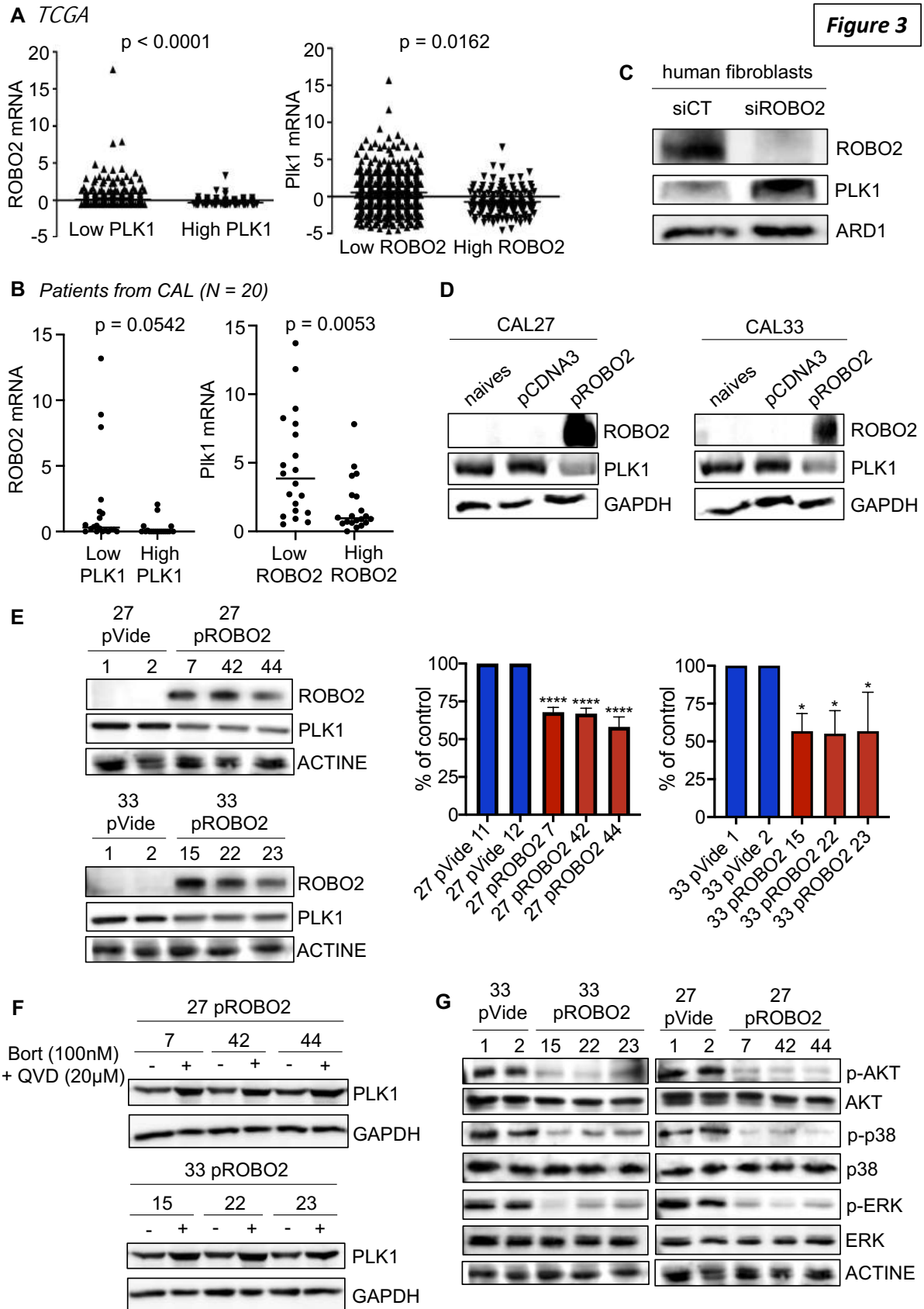


Figure 3



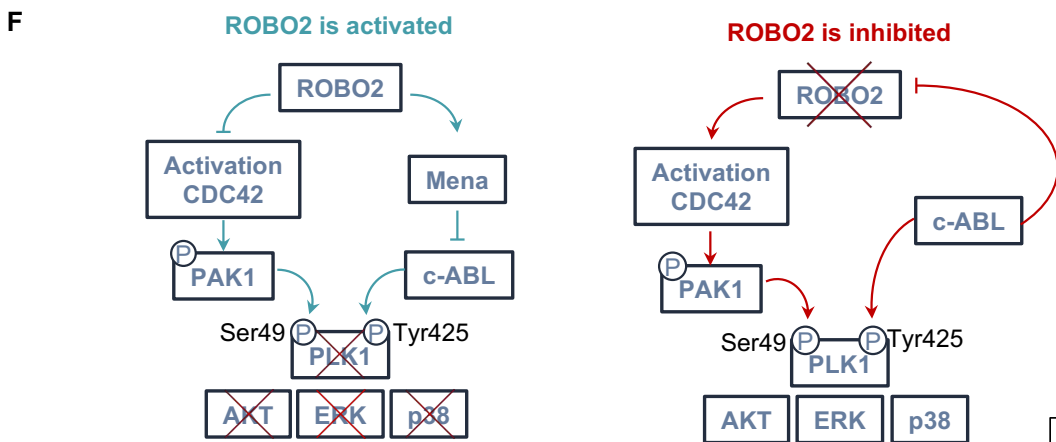
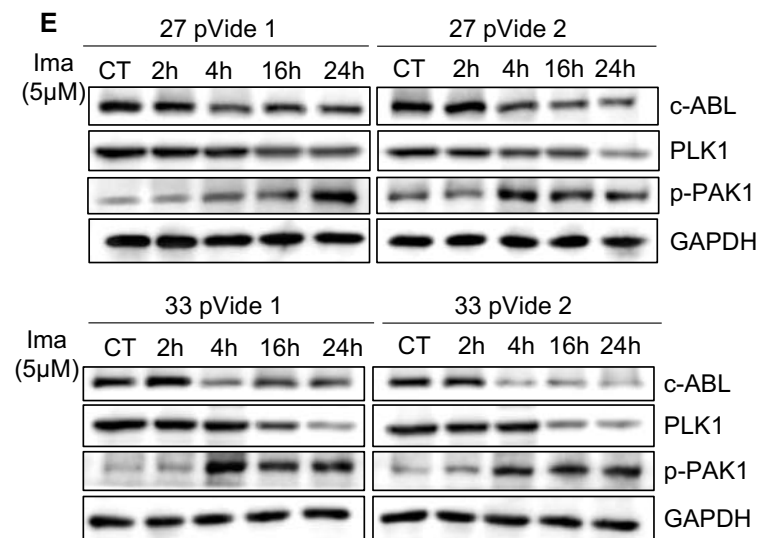
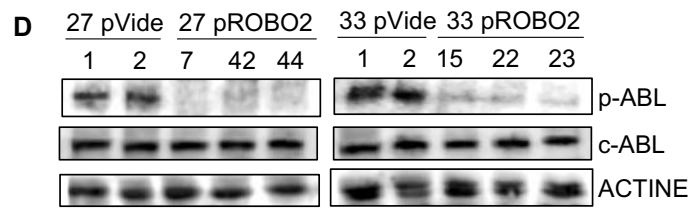
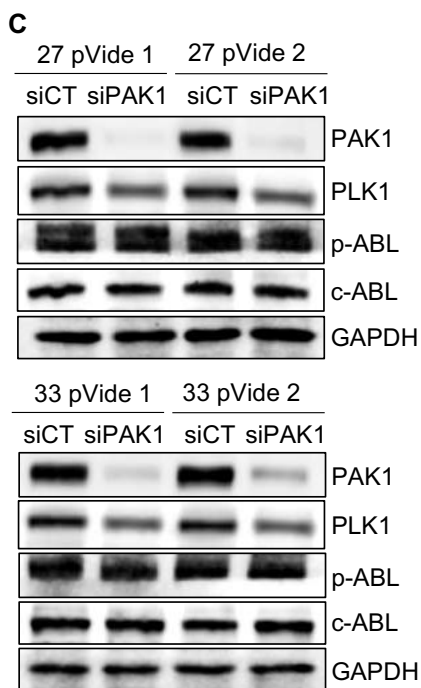
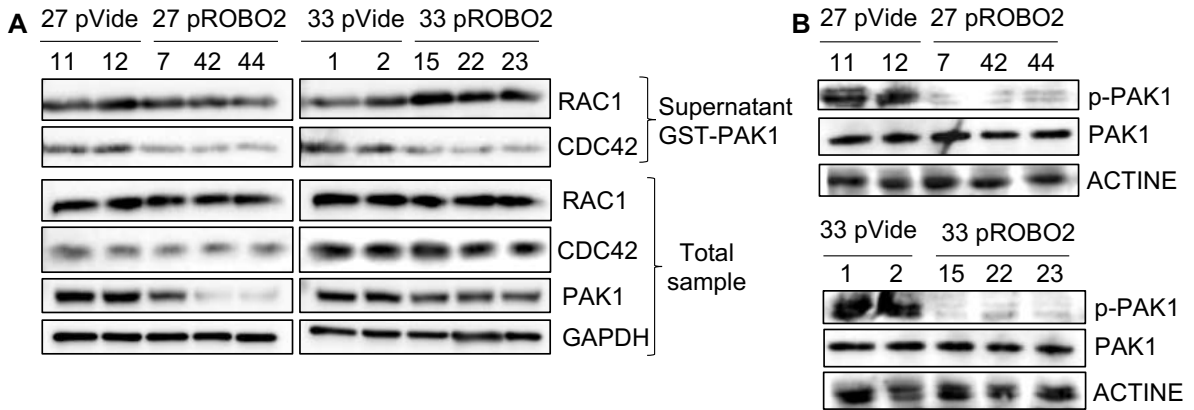


Figure 4

LEGENDES AUX FIGURES

Figure 1 : ROBO2 est faiblement exprimé dans les cancers des VADS et est associé à un mauvais pronostic

(A) Expression de l'ARN messager de ROBO2 dans des tissus sains (519) et tumoraux (44) (données in silico obtenues sur GEPIA). (B-C) Les niveaux d'ARNm de ROBO2 dans les tumeurs des patients atteints d'un cancer des VADS sont corrélés avec la DFS (survie sans maladie) (B) et la survie globale (OS) (C). (D) ARN messager de ROBO2 mesuré par qPCR dans les tumeurs des patients du Centre Antoine Lacassagne au diagnostic et après rechute aux traitements de référence (N = 20). (E) Comparaison de l'ARN messager de ROBO2 mesuré par qPCR dans les cellules saines fibroblastes et, les cellules cancéreuses CAL27 et CAL33. (F) Comparaison de l'expression protéique de ROBO2 mesurée par immunoblot dans les cellules saines fibroblastes et, les cellules cancéreuses CAL27 et CAL33. GAPDH et ARD1 sont utilisés en tant que contrôle de charge. Les statistiques ont été réalisées à l'aide du test ANOVA : **** p<0.0001.

Figure 2 : Effets biologiques de la surexpression de ROBO2 dans les cellules cancéreuses des VADS

(A) Expression protéique de ROBO2 mesurée par immunoblot dans les clones vides CAL27 et CAL33 (pVide) et les clones surexprimant ROBO2 CAL27 et CAL33 (pROBO2). L'actine est utilisée en tant que contrôle de charge. (B-C) Mesure de la prolifération cellulaire des clones CAL27 (B) et CAL33 (C) pVide et pROBO2 effectuée à J0 (d0), J2 (d2), J6 (d6) et J10 (d10). (D-E) Test de clonogénicité effectué sur les clones CAL27 (D) et CAL33 (E) pVide et pROBO2. Le nombre de clones et l'aire occupée ont été mesurés après 10 jours. (F-G) Invasion des sphéroïdes à l'aide de tests cellulaires de culture 3D effectuée sur les clones CAL27 (F) et CAL33 (G) pVide et pROBO2 à J0 (d0), J2 (d2), J6 (d6) et J10 (d10). Les résultats sont exprimés sous forme d'unités arbitraires (J0 utilisé comme contrôle). (H) Mesure de la migration cellulaire par « scratch assay » (test de blessure) sur les clones CAL27 pVide n°1 et pROBO2 n°7 après 24h ainsi que sur les clones CAL33 pVide n°1 et pROBO2 n°22 après 12h. N=1 (duplicat) (t0 est utilisé comme contrôle).

Les statistiques ont été réalisées à l'aide du test ANOVA : * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001, **** p<0.0001.

Figure 3 : La surexpression de ROBO2 diminue l'expression de PLK1 et de l'agressivité tumorale

(A) Corrélation inverse de l'expression de l'ARNm de ROBO2 et de PLK1 chez les patients VADS du TCGA. (B) Corrélation inverse de l'expression de l'ARNm de ROBO2 et de PLK1 chez les patients VADS du Centre Antoine Lacassagne (N = 20). (C) ARN interférent ciblant ROBO2 (48h) dans les fibroblastes isolés de tissu sain. L'expression de PLK1 a été évaluée par immunoblot et ARD1 est utilisé comme contrôle de charge.

(D) Expression de PLK1 évaluée par immunoblot, dans les cellules CAL27 et CAL33 surexprimant ROBO2. GAPDH est utilisé comme contrôle de charge. (E) Comparaison de l'expression de PLK1 dans les clones CAL27 et CAL33 pVide et pROBO2. L'expression de PLK1 a ensuite été quantifiée. L'actine est utilisée comme contrôle de charge. (F) L'expression de PLK1 a été évaluée par immunoblot dans les clones CAL27 et CAL33 pROBO2 traités avec du bortezomib (100nM) et du QVD (20 μ M) pendant 48h. GAPDH est utilisé comme contrôle de charge. (G) Evaluation de l'activation des voies de signalisation de p-AKT, AKT P-ERK, ERK, p-p38 et p38 dans les clones CAL27 et CAL33 pVide et pROBO2 par immunoblot. L'actine est utilisée en tant que contrôle de charge. Les statistiques ont été réalisées à l'aide du test ANOVA : * $p < 0.05$, **** $p < 0.0001$.

Figure 4 : Mécanismes de l'inhibition de PLK1 par ROBO2

(A) Expérience de Pull-down et mesure de l'expression de CDC42-GTP et RAC1-GTP dans les clones CAL27 et CAL33 pVide et pROBO2. GAPDH est utilisée en tant que contrôle de charge (B) Mesure de l'expression de P-PAK1 et PAK1 évaluée par immunoblot. L'actine est utilisée comme contrôle de charge. (C) ARN interférent ciblant PAK1 (48h) dans les clones CAL27 et CAL33 pVide. Expression de PLK1 évaluée par immunoblot. GAPDH est utilisé comme contrôle de charge. (D) Expression de p-ABL et c-ABL évaluée par immunoblot dans les clones CAL27 et CAL33 pVide et pROBO2. L'actine est utilisée comme contrôle de charge. (E) Les expressions de PLK1 et de c-ABL ont été mesurées dans les clones CAL27 et CAL33 pVide traités par imatinib (5 μ M) pendant 24h. GAPDH est utilisé comme contrôle de charge. (F) Schéma représentant les mécanismes d'inhibition de PLK1 lorsque ROBO2 est exprimé (conditions physiologiques) et de surexpression de PLK1 lorsque ROBO2 est diminué (cancer des VADS).

DISCUSSION

Les carcinomes épidermoïdes des voies aéro-digestives supérieures (VADS) représentent le 5^{ème} cancer le plus répandu dans le monde. Du fait de son agressivité et de sa rapide progression, le dépistage de ce type de cancer est réalisé dans 60 à 70% des cas à des stades avancés de la maladie. Néanmoins, plusieurs traitements existent pour soigner ces cancers : la chirurgie en premier lieu, suivie de la radiothérapie et de la chimiothérapie à base de cisplatine.

Cependant, 50% des patients rechutent après ces traitements, à la suite de résistances innées ou acquises et succombent à la maladie. Il est donc crucial pour ces patients de trouver des alternatives thérapeutiques.

Mon projet de thèse a consisté à identifier le rôle de plusieurs kinases : **PLK1**, **c-MET** et **AXL**, surexprimées dans les cancers des VADS. Nous avons montré qu'elles induisent une forte prolifération et une augmentation des capacités migratoires et invasives des cellules cancéreuses. Elles sont également responsables des résistances et du mauvais pronostic des patients. La compréhension des mécanismes de surexpression de ces kinases, notamment de PLK1, a permis d'identifier une nouvelle protéine **ROBO2**, dont l'inhibition par hyper-méthylation ou délétion chez ces patients, favoriserait la surexpression de PLK1.

Des inhibiteurs spécifiques ont été utilisés pour cibler ces kinases : **l'onvansertib** (ciblage de PLK1) et le **cabozantinib** (ciblage d'AXL et de c-MET) entraînent la mort par apoptose de cellules cancéreuses sensibles et résistantes générées dans notre laboratoire. Ils réduisent fortement la croissance et l'invasion tumorale chez la souris immunodéprimée et le poisson zèbre. Ces deux inhibiteurs sont efficaces sur des coupes 3D réalisées à partir de biopsies de patients du Centre Antoine Lacassagne. L'onvansertib augmente l'efficacité des traitements de référence permettant la réduction de leurs doses et donc de leurs effets toxiques.

L'onvansertib et le cabozantinib offrent donc de nouvelles perspectives pour les patients soit au diagnostic soit à progression sous traitement au cisplatine et à la radiothérapie, un état représentatif d'une impasse thérapeutique.

1. ARTICLE N°1

The polo-like kinase 1 inhibitor onvansertib represents a relevant treatment for head and neck squamous cell carcinoma resistant to cisplatin and radiotherapy

Dans cette étude nous nous sommes focalisés sur la Polo-like kinase 1. Elle possède un rôle majeur dans la prolifération cellulaire qui est une forte caractéristique des carcinomes épidermoïdes. Elle favorise également la tumorigenèse des cancers des VADS. Le criblage à l'aide de 300 ARN interférents dans une lignée prénéoplasique, a montré le rôle important de PLK1 dans la transformation des cellules normales en cellules tumorales. Les cancers des VADS font partie des cancers qui surexpriment le plus PLK1. Sa surexpression dans les cancers des VADS est associée à un mauvais pronostic. L'inhibition de PLK1 induit la mort cellulaire par catastrophe mitotique des cellules cancéreuses. Cette inhibition resensibilise ces cellules aux thérapies de référence de type cisplatine et radiothérapie⁶²⁰. La surexpression de PLK1 peut donc être à l'origine de la résistance aux thérapies actuelles chez les patients VADS. Ces arguments ont donc montré la pertinence de cibler PLK1 particulièrement dans les cancers des VADS.

Pour cibler PLK1, deux autres inhibiteurs, en plus de l'onvansertib, étaient candidats pour le traitement des cancers des VADS : le volasertib et le rigosertib. Le volasertib associé à la cytarabine n'a pas obtenu d'approbation pour le traitement de la leucémie myéloïde aiguë après un essai de phase III négatif. Un essai clinique utilisant cet inhibiteur dans les cancers des VADS serait donc peu probable. Les essais du volasertib ont été arrêtés. De plus, il présentait une spécificité limitée pour PLK1 puisqu'il inhibait PLK2 et PLK3, membres de la famille Polo-like kinase, décrits comme étant supresseurs de tumeurs³²⁴. Nous avons testé les effets du rigosertib sur la viabilité des cellules normales et cancéreuses (*Figure 1*). Il inhibe la prolifération des cellules des VADS avec une IC50 de 50-100nM, mais inhibe également la prolifération des fibroblastes normaux (FHN) aux mêmes concentrations. Nous aurions dû mesurer l'expression dans les cellules saines des autres cibles du rigosertib : PLK2, PDGFR, BCR-ABL, FLT1, SRC, FYN, CDK1. J'émetts donc l'hypothèse que certaines cibles du

rigosertib sont exprimées dans les FHN. Ainsi, le rigosertib inhibe également la prolifération des FHN à la même concentration que les cellules cancéreuses.

De plus, le rigosertib cible PLK1 avec une sélectivité 30 fois supérieure à PLK2 et PLK3, mais reste moins spécifique que l'onvansertib.

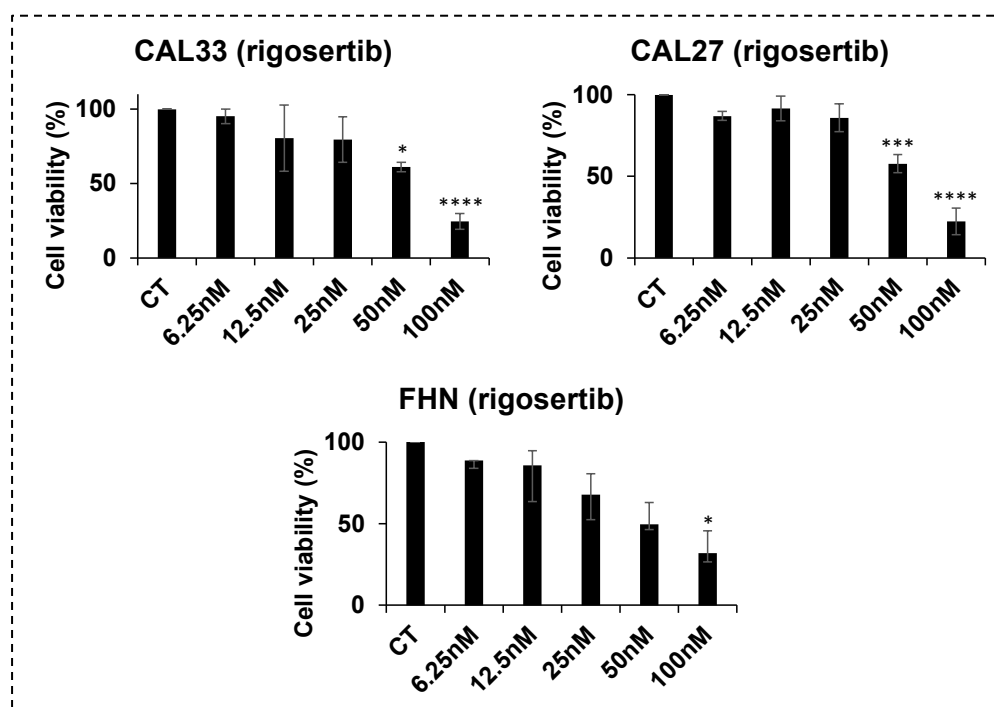


Figure 1 : Effets dose-dépendants du rigosertib sur la viabilité des cellules tumorales (CAL33 et CAL27) et des fibroblastes normaux (FHN)

*Les statistiques ont été réalisées à l'aide du test ANOVA : * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.*

Nous avons donc choisi d'utiliser l'onvansertib, un inhibiteur spécifique de PLK1 qui cible la poche ATP, évitant ainsi la phosphorylation de ses substrats. Il a montré des résultats encourageants, en essais cliniques de phase II dans les leucémies aiguës myéloïdes, les cancers de la prostate, du col de l'utérus et les cancers colorectaux. Notre étude a montré une meilleure efficacité de l'onvansertib dans les cancers des VADS (IC₅₀ = 25nM-50nM), comparé à d'autres lignées cancéreuses (IC₅₀ = minimum 100nM). Ces résultats montrent donc la pertinence d'entreprendre des essais cliniques dans les cancers des VADS.

En termes de spécificité, l'onvansertib montre une sélectivité 5000 fois plus élevée pour PLK1 par rapport à PLK2 et PLK3. Il ne présente pas de toxicité dans les cellules saines de type fibroblastes et kératinocytes qui n'expriment pas PLK1. L'onvansertib n'a donc pas d'effets sur les cellules n'exprimant pas PLK1. Nous avons également

utilisé différentes lignées de cellules cancéreuses. Les lignées cellulaires MDA-MB-231 et BT-549 (cancer du sein) ont une faible expression de PLK1 par rapport aux cellules CAL33 et CAL27 et présentent une faible réponse à l'onvasertib. Au contraire, les cellules ACHN et A549 (respectivement cellules tumorales du rein et du poumon) qui ont une expression quasi équivalente de PLK1 par rapport aux cellules CAL33 et CAL27, sont sensibles à l'onvasertib (Figure 2). De cette façon, nous montrons un indice sur la spécificité de cet inhibiteur envers PLK1.

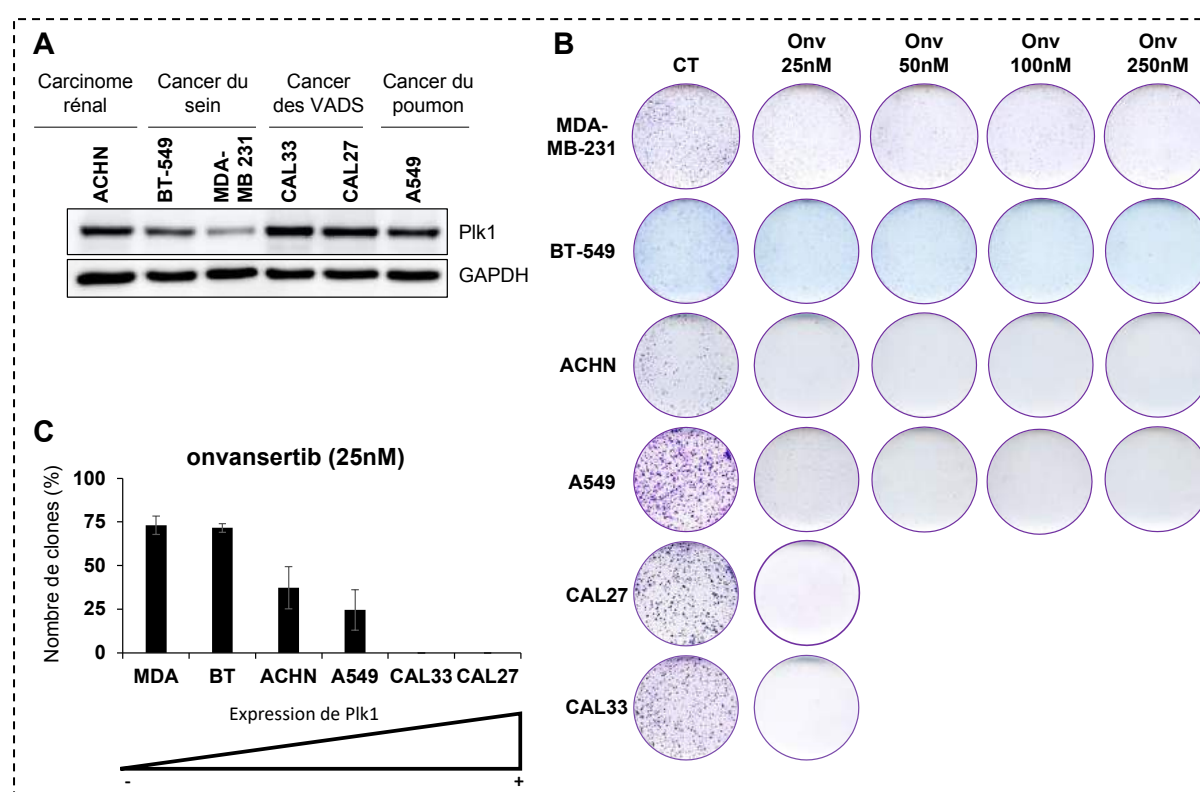


Figure 2 : Efficacité de l'onvasertib sur différentes lignées cancéreuses en fonction du niveau d'expression de Plk1 (A) Niveaux de PLK1 déterminés par immunoblot dans différentes cellules cancéreuses. GAPDH est utilisé comme contrôle de charge. (B) Inhibition dose-dépendante de la formation de colonies dans les différentes cellules cancéreuses en test de clonogénicité. (C) Inhibition de la formation de colonies dans les différentes cellules cancéreuses sous onvasertib (25nM) en fonction des niveaux d'expression de PLK1.

L'onvasertib a montré sa forte efficacité dans les cancers des VADS à seulement 25nM. Il induit la mort cellulaire par apoptoses des cellules sensibles et résistantes, suggérant la possibilité de l'utiliser à la fois sur les patients au diagnostic et à la rechute. Il inhibe la croissance tumorale chez la souris et la formation de

métastases chez le poisson-zèbre. L'efficacité de l'onvansertib a ensuite été déterminée directement sur des coupes de biopsies de patients. Cette dernière technique originale et prometteuse a permis en quelques jours de définir l'efficacité d'une molécule, en mesurant la viabilité des cellules et la mort cellulaire par apoptose. La viabilité du tissu en culture est conservée comme nous pouvons le voir dans les coupes contrôles non-traitées. La limite se situerait seulement dans la taille de l'échantillon (biopsie) qui rend les coupes difficiles à effectuer et peu nombreuses (maximum 25 coupes par échantillon). La rapidité de cette technique permettrait de s'affranchir de la longueur des modèles de xénogreffes chez des souris « avatar » (PDX) de cellules de patients dont les résultats sont obtenus après plusieurs semaines. La durée de ces expériences est incompatible avec une délivrance optimale du médicament pour les tumeurs sensibles. Les résultats sur les coupes vivantes sont obtenus seulement après quelques jours, un temps compatible avec la prise en charge du patient.

Cependant, les résultats obtenus sur les coupes de patients auraient toutefois, pu être confirmés sur des modèles PDX. Les fragments restants de ces biopsies de patients sensibles et résistants auraient pu être a) dissociés afin d'établir des lignées cancéreuses stables ou b) utilisés sur des souris nude ou NOD scie gamma (NSG).

a) L'onvansertib (de la même manière pour le cabozantinib dans le second article) serait testé directement sur cette lignée, seul ou en combinaison avec la radiothérapie et le cisplatine. La viabilité et la mort cellulaire auraient été mesurées sur les cellules issues de patients sensibles et résistants afin de confirmer nos résultats observés sur les coupes de biopsies.

b) Si le greffon n'est pas rejeté par les modèles murins et si les cellules peuvent proliférer et former une tumeur, alors ces modèles pourront être traités avec l'onvansertib +/- cisplatine et radiothérapie. La taille de ces tumeurs serait ensuite évaluée. Des marquages Ki67 et TUNEL seraient alors utilisés pour déterminer le nombre de cellules en prolifération et en apoptose.

L'efficacité de l'onvansertib pourrait ne pas dépendre seulement de l'expression de PLK1 dans ces cellules mais également d'autres marqueurs prédictifs d'efficacité. Dans le cancer gastrique, la cycline A1 est associée à la réponse aux inhibiteurs de PLK1 (BI-2536 et volasertib). Une expression élevée du gène CCNA2 (cycline A1)

confère une sensibilité aux inhibiteurs de PLK1 par une augmentation de la catastrophe mitotique et de l'apoptose. CCNA2 est un nouveau biomarqueur prédictif de la sensibilité aux inhibiteurs de PLK1 pour le traitement du cancer gastrique avancé, en particulier les cas porteurs de la mutation KRAS⁶²¹. L'expression de la cycline A1 et de PLK1 prédirait la réponse à l'onvansertib chez les patients atteints d'un cancer des VADS.

L'utilisation de l'onvansertib en combinaison avec le cisplatine et la radiothérapie resensibilise les cellules résistantes à 10 μ M de cisplatine et à 8Gy d'irradiation. Cette combinaison a également réduit les concentrations de chaque traitement (3 μ M de cisplatine, 2Gy d'irradiation, 50nM d'onvansertib) notamment sur les coupes de biopsies de patients. L'irradiation et la chimiothérapie sont responsables du développement de mucites chez les patients, rendant leur quotidien difficile. La réduction des doses si associées avec l'onvansertib, éviterait leurs effets toxiques tout en conservant leur efficacité thérapeutique. La protonthérapie est de plus en plus utilisée pour le traitement des tumeurs des VADS pour sa précision et ses faibles effets secondaires sur les patients. Des combinaisons protonthérapie/onvansertib seraient particulièrement pertinentes. Des cellules résistantes à ce type d'irradiation permettraient de comprendre les mécanismes associés aux rechutes et donc de les anticiper. Les effets bénéfiques de l'onvansertib sur ces cellules constitueraient des données scientifiques solides pour son utilisation chez les patients en progression post protonthérapie.

Outre la radiothérapie et le cisplatine, l'onvansertib pourrait être aussi associé à l'immunothérapie. Dans 33 types de cancer différents (dont les cancers des VADS), la corrélation entre la sensibilité aux inhibiteurs de PLK1 et l'immunité tumorale dans ces lignées cancéreuses a été effectuée. Les cancers avec des niveaux d'expression plus élevés de PLK1 montrent une expression du CMH plus faible et une diminution de l'infiltration intra-tumorale des lymphocytes B et T (LBs et LTs), et des cellules « Natural Killer » (NK). L'inhibition de PLK1 favorise la réactivation du système immunitaire, avec une augmentation du nombre de cellules immunitaires activées et infiltrées dans la tumeur, une diminution du nombre de macrophages M2 anti-inflammatoires et une augmentation du nombre de cellules dendritiques (CDs) et LTs effecteurs (actifs).

L'inhibition de PLK1 notamment par l'onvansertib associée à une immunothérapie, conduirait à une réponse anti-tumorale synergique. Le nivolumab et le pembrolizumab sont utilisés en 1^{ère} ou en 2^{ème} ligne de traitement chez les patients à des stades avancés de la maladie ou bien lors des rechutes. La pertinence de combinaison de l'onvansertib avec l'immunothérapie pourrait être testée sur des tumeurs des VADS expérimentales générées avec des cellules murines (cellules SCC), sensibles ou résistantes au cisplatine et à la radiothérapie⁶²². L'activité et le nombre de cellules immunitaires du micro-environnement tumoral mesurés par cytométrie en flux permettrait une évaluation plus détaillée de l'efficacité de ces traitements.

Le microenvironnement tumoral joue un rôle essentiel dans l'apparition et la progression du cancer. Les fibroblastes associés à la tumeur (CAFs) favorisent l'invasion et l'agressivité tumorale. Dans le cancer du sein, la signature génétique des fibroblastes associés à la tumeur (CAFs) montre une surexpression de PLK1 et de ses facteurs de transcription FOXM1 et E2F⁶²³. Si l'onvansertib diminue l'expression de PLK1 dans les CAFs, son utilisation permettrait alors d'inhiber le rôle pro-métastatique des CAFs.

Néanmoins, un effet négatif de l'association entre l'onvansertib et l'immunothérapie pourrait également exister. L'immunothérapie permet la réactivation des LTs mais induit également leur prolifération. Or l'inhibition de PLK1 pourrait inhiber la prolifération des cellules immunitaires et éventuellement induire leur mort. L'onvasnertib pourrait donc bloquer l'effet bénéfique de l'immunothérapie.

2. ARTICLE N°2

Cabozantinib, a promising therapeutic strategy for resistant head and neck squamous cell carcinoma patients

Dans cette seconde étude nous nous sommes intéressés à AXL et c-MET. Physiologiquement impliquées dans la régulation de l'inflammation, la phagocytose et l'organogenèse, leur surexpression induit la tumorigenèse et favorise un mauvais pronostic. Cependant, la surexpression d'AXL et de c-MET est également impliquée dans la résistance aux traitements chez les patients contribuant à leur rechute. La transcriptomique effectuée sur les CAL33 et CAL27 sensibles et résistantes au cisplatine et à la radiothérapie, a montré une surexpression d'AXL et c-MET. L'analyse des échantillons de patients du Centre Antoine Lacassagne au diagnostic et à la rechute a montré une surexpression significative de c-MET et d'AXL chez les patients en échec thérapeutique. Une analyse similaire utilisant les mêmes échantillons a montré une surexpression de PLK1 chez les patients en rechute. Si les tumeurs qui expriment fortement AXL et c-MET sont les mêmes que celles qui expriment PLK1, des combinaisons cabozantinib et l'onvansertib seraient particulièrement pertinentes. Le cabozantinib entraîne une diminution de PLK1 à l'origine de la catastrophe mitotique. Le foretinib, un inhibiteur de première génération d'AXL et c-MET diminue l'expression de PLK1, qui est dégradée par le protéasome dans les cellules de Leucémie Myéloïde Chronique⁶²⁴. Nous supposons qu'AXL et/ou c-MET activerai(en)t l'expression de la voie PI3K/AKT. PTEN étant muté dans les cancers des VADS, la voie PI3K/AKT est suractivée et pourrait stimuler PLK1²⁶³ directement ou via l'oncogène c-MYC⁶²⁵. L'expression de PLK1 serait donc fortement liée à l'expression d'AXL et c-MET. Cependant, le cabozantinib induit la mort par catastrophe mitotique des cellules sensibles qui montrent une activité faible d'AXL et c-MET. Le cabozantinib inhibe les récepteurs AXL et c-MET, les membres de la famille AXL (TYRO3 et MERK) et c-MET (RET) mais aussi VEGFR2⁶²⁶, ROS1⁶²⁷, c-KIT⁶²⁸ et TIE-2 surexprimés dans les cancers des VADS. L'inhibition de ces autres récepteurs à activité tyrosine kinase par le cabozantinib, antagonise les voies de signalisation activées par c-MET et AXL

notamment PI3K/AKT. Cette inactivation conduirait à l'inhibition de PLK1 et à la mort cellulaire par catastrophe mitotique indépendamment d'AXL et c-MET.

En complément des études *in vitro*, le cabozantinib a montré son efficacité sur les coupes de biopsies patients au diagnostic et à la rechute.

Cependant, cette étude était surtout centrée sur les patients en rechute dont les tumeurs surexpriment AXL et c-MET. Le cabozantinib a été testé en collaboration avec le Centre Antoine Lacassagne sur un patient après cinq lignes de traitements. Cet inhibiteur a montré un effet impressionnant sur ce patient dont la survie sans progression a atteint exceptionnellement 8 mois.

Plusieurs patients atteints de cancers des VADS sont traités au cetuximab (inhibiteur d'EGFR) après rechute au cisplatine. Cependant, les récepteurs c-MET et AXL contribuent au mécanisme de résistance des cancers des VADS au cetuximab⁴⁴⁸. AXL et c-MET favorisent également la résistance des cancers de l'œsophage au lapatinib (inhibiteur d'EGFR) notamment via les voies PI3K/AKT et MAPK/ERK⁶²⁹.

La surexpression de c-MET à la suite de l'inhibition de l'EGFR conduit à l'activation de la voie MAPK⁴⁶². La résistance au cetuximab active les voies de signalisation MAPK et c-JUN responsables de la transcription d'AXL. Par transactivation, AXL maintient l'activation d'EGFR⁴⁶³. L'inhibition d'EGFR par le cetuximab, induit donc un mécanisme de compensation impliquant c-MET et AXL qui maintiennent actives, les voies de signalisation de la voie EGFR. Mais, la résistance au cetuximab et au cisplatine par AXL et c-MET s'effectue aussi via c-ABL^{465,470}.

Des cellules résistantes au cetuximab auraient pu être générées pour déterminer l'expression d'AXL et c-MET mais aussi celle d'EGFR, HER2, HER3 et c-ABL. Le traitement au cabozantinib pourrait alors inhiber AXL et c-MET et permettre de resensibiliser les cellules au cetuximab, via l'inhibition d'EGFR, HER2, HER3 et c-ABL.

Cependant, c-ABL phosphoryle et active PLK1 dans les cancers du col de l'utérus⁶³⁰. AXL et c-MET pourraient donc favoriser la résistance au cetuximab et au cisplatine via l'activation de la voie c-ABL-PLK1.

Dans les cellules résistantes au cisplatine, le cabozantinib devrait diminuer l'expression des récepteurs EGFR, HER2, HER3. Par mécanisme de compensation, l'inhibition d'AXL et c-MET induirait la surexpression des récepteurs à activité tyrosine kinase qui à terme favoriserait les rechutes thérapeutiques. Le ciblage d'AXL et c-MET par le

cabozantinib inhiberait également c-ABL dans les cellules résistantes au cisplatine. A son tour c-ABL pourrait être responsable de l'inhibition de PLK1 et donc de la mort des cellules résistantes.

Le cabozantinib est associé au cetuximab (anti-EGFR), (NCT03667482)) en essais cliniques en phase I dans les cancers des VADS.

Nous avons également évalué l'expression de PD-L1 et PD-L2 dans les lignées CAL33 et CAL27 sensibles et résistantes. Les cellules résistantes CAL33RR et CAL27RR surexpriment PD-L1 et PD-L2 par rapport aux cellules sensibles (*Figure 3A-C*). La même caractéristique a été observée dans les tumeurs expérimentales générées avec les cellules CAL33RR. Le cabozantinib augmente les niveaux d'ARNm de PD-L1 et PD-L2 uniquement dans les tumeurs expérimentales générées avec les cellules CAL33 (*Figure 3D*) et sur les cellules de microenvironnement (*mPD-L1 et mPD-L2, Figure 3E*). Bien que le cabozantinib présente un effet antitumoral, il favorise la tolérance immunitaire en surexprimant les points de contrôle du système immunitaire. Des résultats similaires ont été obtenus avec le sunitinib (anti-angiogénique comme le cabozantinib) dans les cancers du rein.

Par conséquent, des combinaisons cabozantinib plus anti-PD-1 ou anti-PD-L1 pourraient être pertinentes en tant que traitement de première intention ou seconde intention chez les patients éligibles à l'immunothérapie.

Des modèles murins immunocompétents injectés avec des cellules murines de carcinomes épidermoïdes SCC sensibles ou résistantes au cisplatine et à la radiothérapie auraient pu être utilisés. L'étude du microenvironnement tumoral à la suite du traitement par cabozantinib, aurait été intéressant à étudier. L'inhibition par le cabozantinib d'AXL et de c-MET induirait l'activation du CMH I sur les CD, l'augmentation du nombre de LTs cytotoxiques infiltrés et la diminution du nombre de macrophages M2 anti-inflammatoires dans nos tumeurs générées avec les cellules SCC sensibles et SCC résistantes.

De plus, les CAFs montrent une sécrétion importante de GAS6 et HGF, les ligands respectifs d'AXL et c-MET. Nous aurions donc pu tester l'effet du cabozantinib sur les capacités de prolifération et de migration des cellules cancéreuses en coculture avec des CAFs isolées de tumeurs de patients ou bien des modèles immunocompétents⁶³¹. Nous aurions pu étudier l'activation d'AXL (p-AXL) et de c-MET (p-MET) en immunoblot,

les capacités de migration en chambre de Boyden et de prolifération des cellules cancéreuses.

Le cabozantinib est par ailleurs, utilisé en association avec le pembrolizumab (NCT03468218) en essais cliniques de phase II dans les cancers des VADS.

L'utilisation d'inhibiteurs spécifiques d'AXL (bemcentinib) ou c-MET (capmatinib), ou d'ARN interférents aurait été intéressants à tester notamment sur nos cellules sensibles et résistantes. Ces inhibiteurs ou ces ARN interférents nous auraient permis de valider nos expériences avec le cabozantinib et d'étudier le rôle spécifique d'AXL et c-MET sur la prolifération, la migration et l'invasion *in vitro* mais aussi son lien direct avec PLK1.

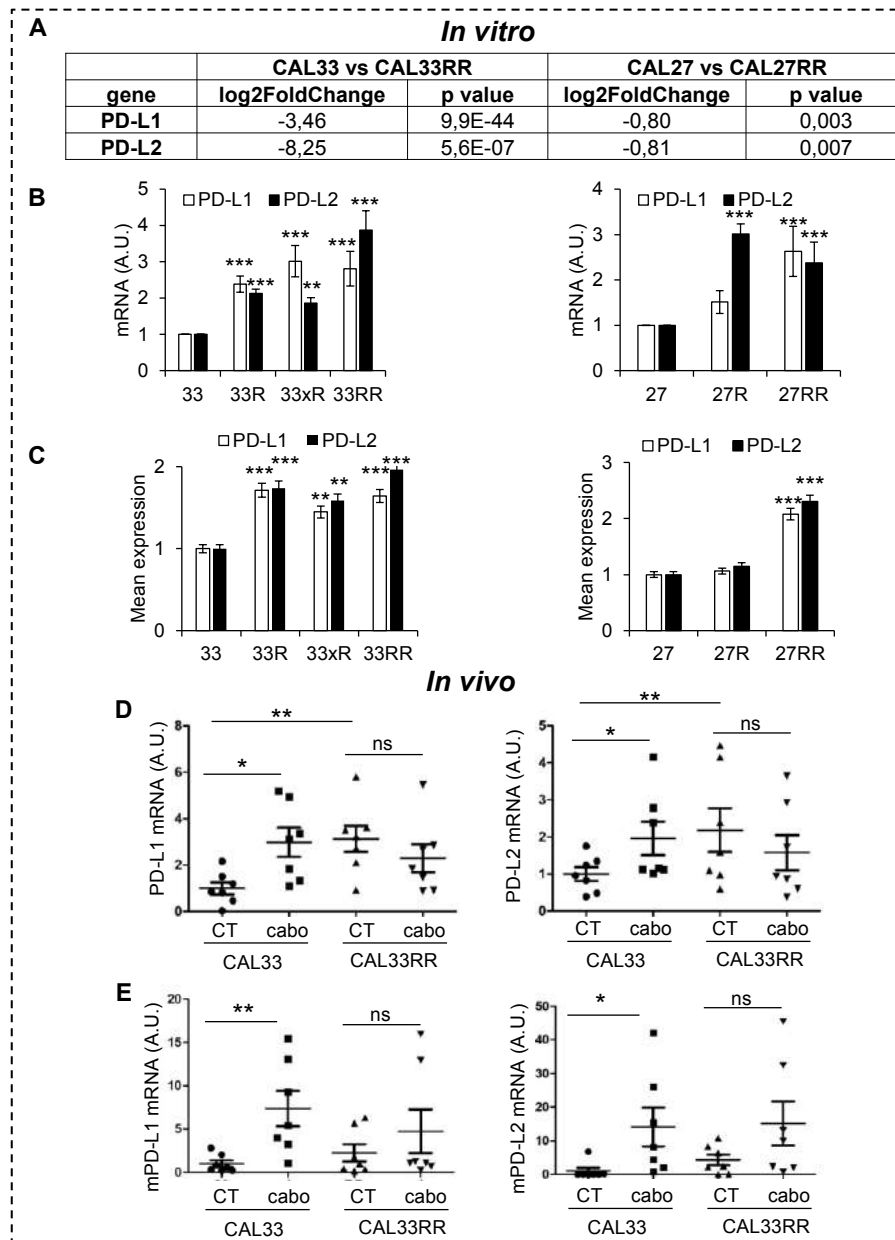


Figure 3 : Expression de PD-L1 et PD-L2 dans des cellules sensibles et résistantes in vitro et in vivo.

(A) Résultats de RNAseq sur CAL33 vs CAL33RR et CAL27 vs CAL27RR. (B) Les concentrations d'ARNm PD-L1 et PD-L2 ont été déterminées par qPCR. Les conditions de contrôle ont été considérées comme la valeur de référence (1). (C) L'expression membranaire des PD-L1 et PD-L2 a été évaluée par FACS. Les conditions de contrôle ont été considérées comme la valeur de référence (1). (D) Niveaux d'ARNm de PD-L1 et PD-L2 sur des tumeurs générées avec les cellules CAL33 et CAL33 RR. Cellules tumorales (humaines) niveaux d'ARNm de PD-L1 et PD-L2 de HNSCC expérimental. (E) Niveaux d'ARNm de PD-L1 et PD-L2 des cellules de microenvironnement (souris) provenant de tumeurs expérimentales.

CAL33/CAL27 (sensibles), CAL33R/CAL27R (résistantes au cisplatine), CAL33xR (résistantes à la radiothérapie), CAL33RR/CAL27RR (résistantes au cisplatine et à la radiothérapie). Les statistiques ont été réalisées à l'aide du test ANOVA : * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

3. ARTICLE N°3

Tumor suppressor ROBO2 inhibits PLK1 and reduces the aggressiveness of Head and Neck cancers

Dans cette troisième étude, nous voulions comprendre le mécanisme de surexpression de PLK1. Nous nous sommes intéressés au récepteur ROBO et à son récepteur SLIT. Dans les cancers des VADS, ROBO1, ROBO2 et SLIT2 sont décrits comme suppresseurs de tumeurs dans les cancers des VADS. Cependant, leur expression est inhibée par hyper-méthylation dans ce type de cancer. Nous nous sommes focalisés sur ROBO2 dans cette étude. Les patients dont les tumeurs expriment faiblement ROBO2 montrent une plus faible survie. ROBO2 n'est pas exprimé dans les cellules cancéreuses CAL27 et CAL33 en comparaison des cellules saines fibroblastiques. Nous aurions pu également regarder l'expression de ROBO1 et SLIT2 eux aussi inhibés dans les cancers des VADS.

L'inhibition de ROBO2 dans les fibroblastes sains induit la surexpression de PLK1. Nous avons donc voulu comprendre le lien entre PLK1 et ROBO2. La surexpression de PLK1 et l'inhibition de ROBO2 favorisent la rechute des patients. De plus, les cohortes de patients du TCGA et du Centre Antoine Lacassagne montrent une corrélation inverse entre l'expression de ROBO2 et de PLK1. L'inhibition de ROBO2 dans les fibroblastes sains a montré une surexpression de PLK1. La surexpression de ROBO2 de manière transitoire dans les cellules cancéreuses CAL27 et CAL33 diminue l'expression de PLK1.

Nous avons donc généré des clones surexprimant ROBO2 de manière stable, dans chaque lignée CAL27 et CAL33. Ces clones ont montré une diminution de la prolifération, de l'invasion et de la migration cellulaire. SLIT2 étant diminué dans les cancers des VADS, la protéine recombinante SLIT2 en tant que ligand aurait pu également être utilisée pour potentialiser les effets de la surexpression de ROBO2 sur la prolifération, la migration et l'invasion. Des expériences de tumorigenèse chez la souris auraient permis de cerner les effets *in vivo* de ROBO2. Suivant nos résultats *in*

in vitro, les tumeurs générées avec les clones ROBO2 devraient être plus petites que les tumeurs générées avec les clones contrôles.

La surexpression de ROBO2 dans ces clones diminue l'expression de PLK1 mais n'inhibe pas totalement son expression. ROBO1 et ROBO2 peuvent s'homo-dimériser et fonctionner ensemble dans différents contextes physiologiques. L'inhibition de PLK1 aurait pu être maximale si ROBO1 et ROBO2 avaient été surexprimés ou si les cellules avaient été traitées avec la protéine SLIT2 recombinante. La double expression ROBO1/ROBO2 dans le mécanisme de surexpression de PLK1 aurait été intéressant à explorer. Cependant, nous avons fait le choix d'étudier principalement ROBO2 qui présentait une corrélation inverse avec PLK1 plus significative.

Le mécanisme de régulation de PLK1 par ROBO2 a donc été étudié. La voie de signalisation de ROBO2, implique notamment la GTPase CDC42 sous forme GDP (inactive) lorsque ROBO2 est activé. La surexpression de ROBO2 inhibe CDC42 qui est alors sous forme GDP (inactive). Ils présentent également une inhibition de l'activation de PAK1. L'inhibition de PAK1 par ARN interférent diminue l'expression de PLK1. La diminution de PLK1 étant faible, nous nous sommes intéressés à une voie de signalisation de ROBO2 complémentaire impliquant c-ABL. Cette kinase favorise l'activation de PLK1 et la croissance tumorale dans les cancers du col de l'utérus⁶³⁰. L'inhibition de c-ABL par l'imatinib diminue l'expression de PLK1 mais augmente l'expression de PAK1. Il s'agirait donc d'un mécanisme de secours pour réactiver ensuite l'expression de PLK1. Cependant la perte de PAK1 n'entraîne pas d'augmentation de c-ABL. La diminution maximale de PLK1 nécessiterait donc l'inhibition de PAK1 et c-ABL que nous pourrions vérifier en utilisant des ARN interférents.

Une étude similaire avait démontré la corrélation inverse entre le récepteur tyrosine kinase EPHA2 et le récepteur ROBO1. EPHA2 phosphorylé par AKT induisait la prolifération des cellules cancéreuses des VADS. Son hétéro-dimérisation avec ROBO1/SLIT2 atténuait fortement cet effet dans les cancers des VADS⁶³². Notre étude a montré une corrélation inverse entre ROBO1/ROBO2 et PLK1 (données c-biportal) mais avec une meilleure significativité entre ROBO2 et PLK1. EPHA2 pourrait s'homo-dimériser aussi avec ROBO2. EPHA2 peut activer c-MYC et favoriser la progression tumorale notamment dans les cancers de sein triple négatifs⁶³³. Cependant c-MYC

active PLK1 et induit la progression tumorale²⁷⁰. Il pourrait donc s'agir d'un nouveau mécanisme à explorer pour comprendre la surexpression de PLK1, inhibée par ROBO2.

ROBO2 est inhibé dans les cancers des VADS par des mécanismes d'hyperméthylation. En utilisant de l'azacitidine, un inhibiteur des méthyltransférases de l'ADN (DNMT), donc un inhibiteur de la méthylation. Nous avons remarqué une réexpression de ROBO2 importante dans les CAL27 mais faible dans les CAL33, qui s'accompagne d'une diminution de l'expression de PLK1. L'azacitidine cible toutes les DNMTs de l'ADN. Ainsi, la diminution de l'expression de PLK1 ne serait pas seulement due à la déméthylation du gène ROBO2 (Figure 4). L'utilisation de TSA, un inhibiteur des histones désacétylases (HDAC), n'a pas permis de réexprimer complètement ROBO2 dans les CAL33, nous signifiant que la répression de ROBO2 ne dépend pas des histones désacétylases. (Figure non montrée). L'inhibition de ROBO2 dans les CAL27 et les CAL33 dépend d'évènements impliquant la méthylation. Ces résultats préliminaires doivent être confirmés par des expériences de méthylations spécifiques afin de confirmer cette hypothèse.

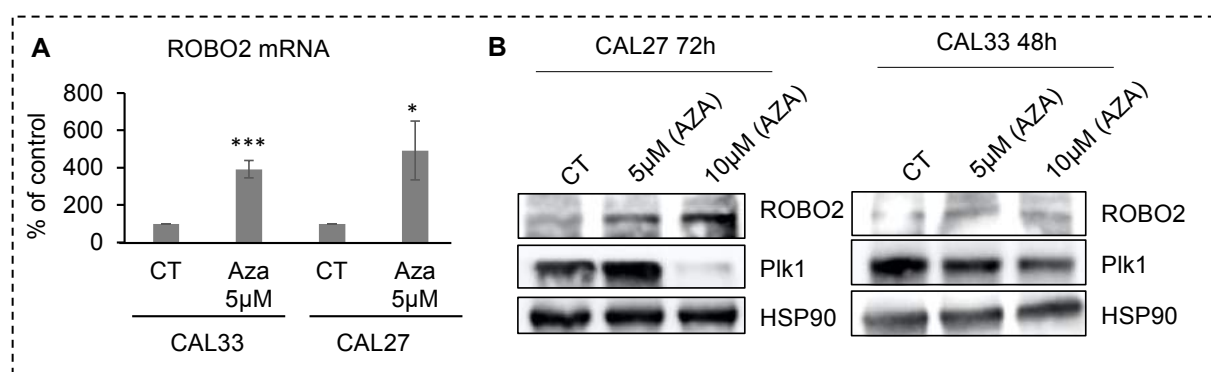


Figure 4 : Déméthylation par l'azacitidine du gène ROBO2

(A) Mesure de l'expression du gène ROBO2 par RT-qPCR dans les cellules CAL27 et CAL33 traitées avec l'azacitidine (5μM). (B) Mesure de l'expression des protéines ROBO2 et Plk1 par immunoblot dans les cellules CAL27 et CAL33 traitées avec l'azacitidine (5 et 10μM). HSP90 est utilisé en tant que contrôle de charge. Les statistiques ont été réalisées à l'aide du test t de Student : * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$.

PLK1 et ROBO2 présentent des expressions opposées chez les patients. Il pourrait s'agir d'une régulation croisée entre PLK1 et ROBO2. PLK1 pourrait-il permettre une inhibition directe ou indirecte de la méthylation du promoteur de ROBO2 en

activant les méthyltransférases 1 et 3a de l'ADN (DNMT1, DNMT3a) et/ou les histones déacétylases (HDAC) responsables de méthylations de novo dans la tumorigenèse ? L'inhibition de PLK1 par ARN interférent augmente l'expression de ROBO2 (*Figure 5A-B*). De la même manière, l'inhibition de PLK1 par son inhibiteur spécifique, l'onvansertib augmente l'expression transcriptionnelle et protéique de ROBO2 (*Figure 5C-D*). Comme nous l'avons montré dans le premier article, l'onvansertib ne bloque pas l'expression de PLK1 mais, sa capacité à phosphoryler ses substrats tels que TCTP ou encore Cdc25C. Il n'est donc pas surprenant de ne pas voir de changements dans son expression. Le QVD inhibe la mort cellulaire induite par l'onvansertib et favorise donc l'expression maximale de ROBO2 (*Figure 5D*). Le traitement de l'onvansertib, de tumeurs générées avec des CAL33 et des CAL33RR dans des modèles murins, augmente l'expression de ROBO2 dans la majorité des tumeurs traitées. Plk1, en comparaison à une autre chimiothérapie : le cisplatine (*Figure 5E-F*). Nous confirmons ces résultats en immunoblot : les tumeurs traitées par onvansertib montrent en majorité une augmentation de l'expression de ROBO2 (*Figure 5G-H*).

PLK1 jouerait donc un rôle direct ou indirect dans l'inhibition de l'expression de ROBO2.

Au vue de cette hyper-méthylation de ROBO2 et de cette double régulation entre ROBO2 et PLK1, combiner l'onvansertib avec l'azacitidine dans des modèles immunodéprimés ou dans des modèles immunocompétents serait particulièrement pertinent. La combinaison onvansertib/azacitidine pourrait être envisageable pour les patients présentant le profil PLK1 élevée/ROBO2 faible. Cependant, l'utilisation de l'azactidine permettrait de réexprimer ROBO2, ce qui diminuerait PLK1. Ces patients pourraient donc être moins sensibles à l'onvansertib à cause de la diminution de PLK1. Il s'agit donc d'une combinaison à tester et à discuter.

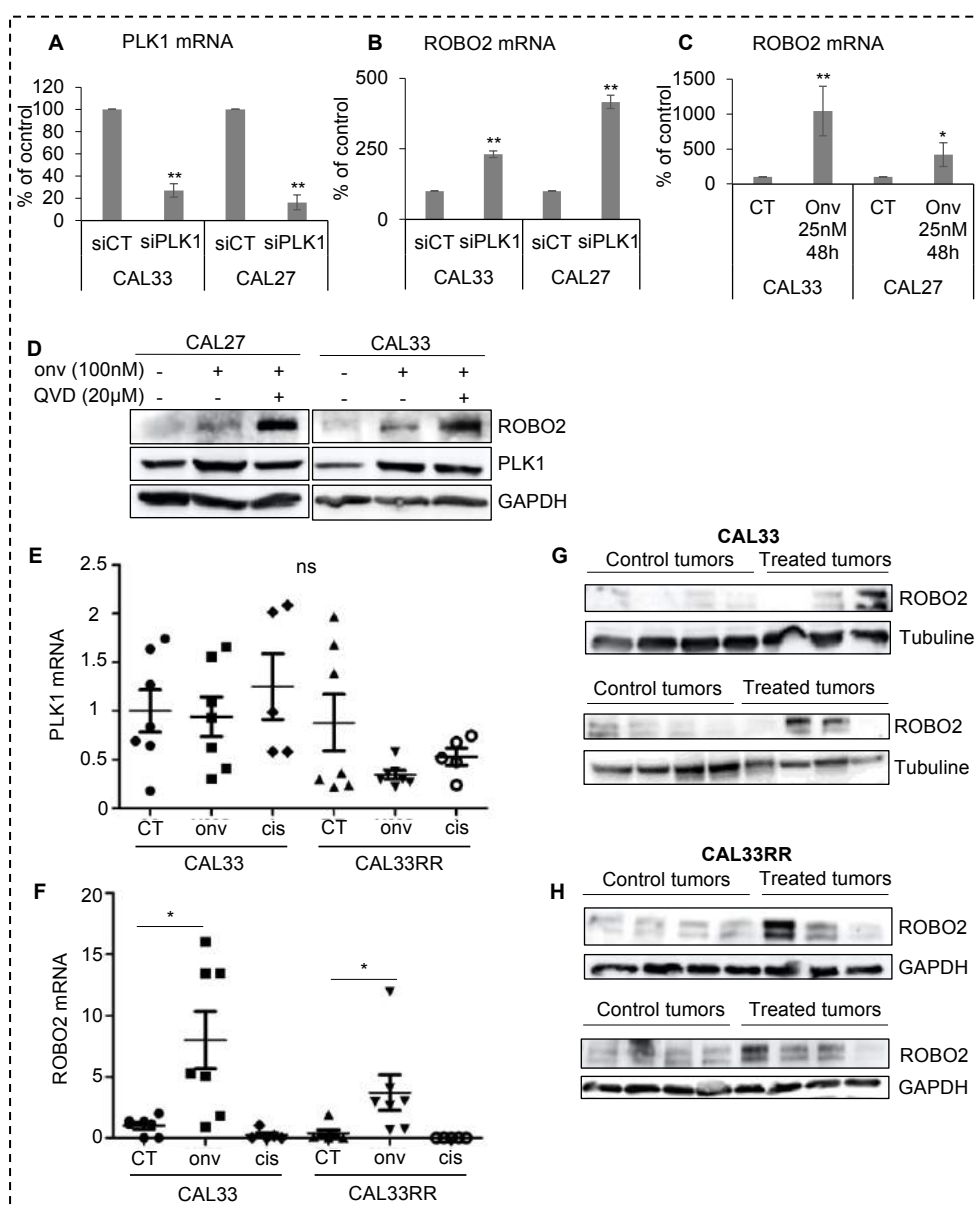


Figure 4 : L'inhibition de PLK1 favorise la réexpression de ROBO2

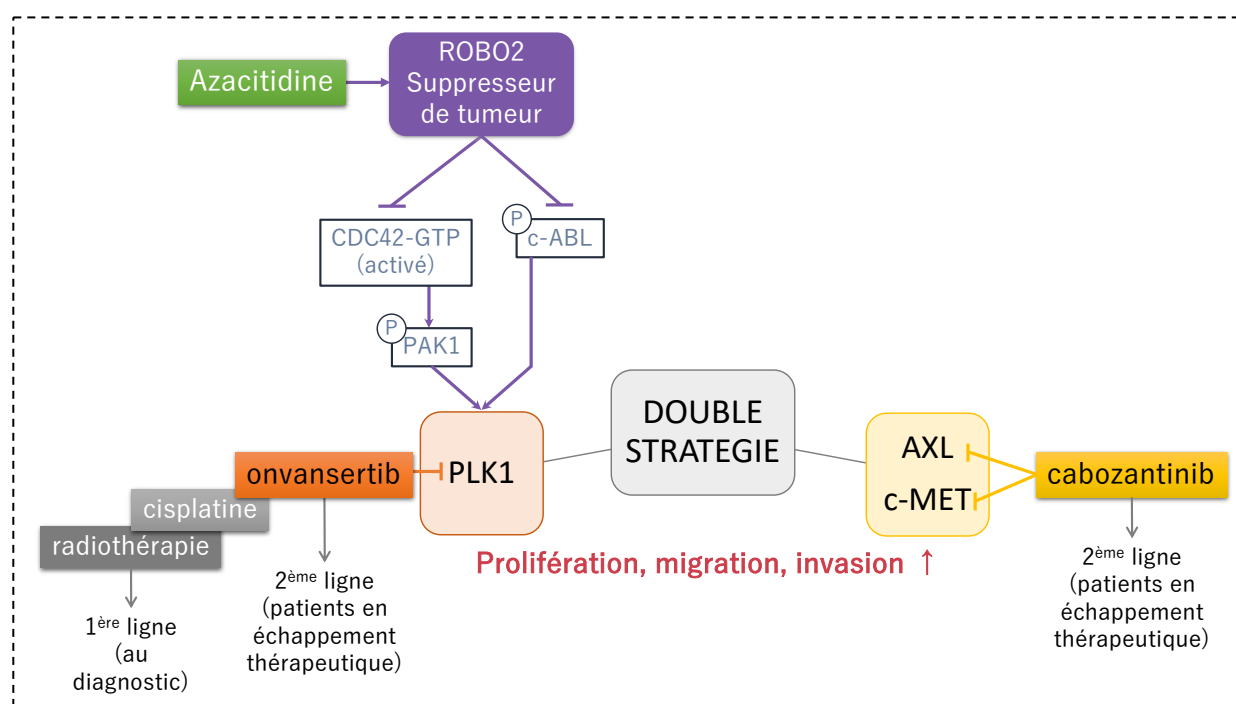
(A) Mesure de l'expression du gène PLK1 par RT-qPCR dans les cellules CAL27 et CAL33 après inhibition du gène PLK1 par ARN interférent pendant 48h. (B) Mesure de l'expression du gène ROBO2 par RT-qPCR dans les cellules CAL27 et CAL33 après inhibition du gène PLK1 par ARN interférent pendant 48h. (C) Mesure de l'expression du gène ROBO2 par RT-qPCR dans les cellules CAL27 et CAL33 après traitement par l'onvansertib (25nM) pendant 48h. (D) Mesure de l'expression protéique de ROBO2 et PLK1 par immunoblot dans les cellules CAL27 et CAL33 après traitement au QVD (10μM) et à l'onvansertib (25nM) pendant 48h. (E et F) Mesure de l'expression de ROBO2 et PLK1 par RT-qPCR, dans des tumeurs, générées avec les cellules CAL33 et CAL33RR de souris immunodéprimées et traitées avec l'onvansertib ou avec du cisplatine. (G et H) Mesure de l'expression protéique de ROBO2 dans les tumeurs traitées ou non à l'onvansertib. GAPDH et la Tubuline sont utilisés comme contrôle de charge. Les statistiques ont été réalisées à l'aide du test ANOVA et du test t de Student : * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

Ma thèse consistait à l'élaboration de plusieurs stratégies thérapeutiques pour les patients atteints d'un carcinome épidermoïdes des VADS (voir schéma ci-contre) :

- Le ciblage de PLK1 par l'onvansertib utilisé 1) en combinaison avec la radiothérapie et la chimiothérapie par cisplatine chez les patients au diagnostic ou 2) seul, chez les patients lors de rechutes.
- Le ciblage d'AXL et c-MET par le cabozantinib utilisé seulement chez les patients lors des rechutes.

Ces deux inhibiteurs bloquent les paramètres d'agressivité tumorale notamment les capacités de prolifération, de migration et d'invasion des cellules cancéreuses.

- L'hyper-méthylation du promoteur du gène *ROBO2* chez près de 70% des patients est l'un des mécanismes conduisant à la surexpression de PLK1. Ce mécanisme révèle la pertinence d'utilisation de l'azacitidine chez ces patients.



BIBLIOGRAPHIE

- 1 Squier, C. A. The permeability of oral mucosa. *Crit Rev Oral Biol Med* **2**, 13-32, doi:10.1177/10454411910020010301 (1991).
- 2 Jones, K. B. & Klein, O. D. Oral epithelial stem cells in tissue maintenance and disease: the first steps in a long journey. *International Journal of Oral Science* **5**, 121-129, doi:10.1038/ijos.2013.46 (2013).
- 3 Senel, S. An Overview of Physical, Microbiological and Immune Barriers of Oral Mucosa. *Int J Mol Sci* **22**, doi:10.3390/ijms22157821 (2021).
- 4 Winning, T. A. & Townsend, G. C. Oral mucosal embryology and histology. *Clinics in dermatology* **18**, 499-511 (2000).
- 5 Squier, C. & Brogden, K. *Human Oral Mucosa: Development, Structure and Function*. (Wiley, 2010).
- 6 Bray, F. *et al.* Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin* **68**, 394-424, doi:10.3322/caac.21492 (2018).
- 7 Perie, S. *et al.* Epidemiology and anatomy of head and neck cancers. *Bull Cancer* **101**, 404-410, doi:10.1684/bdc.2014.1962 (2014).
- 8 Neville, B. W. & Day, T. A. Oral cancer and precancerous lesions. *CA Cancer J Clin* **52**, 195-215, doi:10.3322/canjclin.52.4.195 (2002).
- 9 INCa. Cancers des voies aérodigestives supérieures - du diagnostic au suivi. *institut national du cancer* (2018).
- 10 Johnson, N. Tobacco use and oral cancer: a global perspective. *J Dent Educ* **65**, 328-339 (2001).
- 11 Hecht, S. S. Tobacco carcinogens, their biomarkers and tobacco-induced cancer. *Nat Rev Cancer* **3**, 733-744, doi:10.1038/nrc1190 (2003).
- 12 Mirbod, S. M. & Ahing, S. I. Tobacco-associated lesions of the oral cavity: Part II. Malignant lesions. *J Can Dent Assoc* **66**, 308-311 (2000).
- 13 Pfeifer, G. P. *et al.* Tobacco smoke carcinogens, DNA damage and p53 mutations in smoking-associated cancers. *Oncogene* **21**, 7435-7451, doi:10.1038/sj.onc.1205803 (2002).
- 14 Osada, H. & Takahashi, T. Genetic alterations of multiple tumor suppressors and oncogenes in the carcinogenesis and progression of lung cancer. *Oncogene* **21**, 7421-7434, doi:10.1038/sj.onc.1205802 (2002).
- 15 Hecht, S. S. *et al.* Induction of oral cavity tumors in F344 rats by tobacco-specific nitrosamines and snuff. *Cancer Res* **46**, 4162-4166 (1986).
- 16 Wynder, E. L. & Bross, I. J. Aetiological factors in mouth cancer; an approach to its prevention. *Br Med J* **1**, 1137-1143, doi:10.1136/bmj.1.5028.1137 (1957).
- 17 Bagnardi, V. *et al.* Light alcohol drinking and cancer: a meta-analysis. *Ann Oncol* **24**, 301-308, doi:10.1093/annonc/mds337 (2013).
- 18 Brennan, P. *et al.* Pooled analysis of alcohol dehydrogenase genotypes and head and neck cancer: a HuGE review. *Am J Epidemiol* **159**, 1-16, doi:10.1093/aje/kwh003 (2004).
- 19 Chang, J. S., Hsiao, J. R. & Chen, C. H. ALDH2 polymorphism and alcohol-related cancers in Asians: a public health perspective. *J Biomed Sci* **24**, 19, doi:10.1186/s12929-017-0327-y (2017).
- 20 Brennan, P. & Boffetta, P. Mechanistic considerations in the molecular epidemiology of head and neck cancer. *IARC Sci Publ*, 393-414 (2004).
- 21 Boffetta, P. & Hashibe, M. Alcohol and cancer. *Lancet Oncol* **7**, 149-156, doi:10.1016/s1470-2045(06)70577-0 (2006).
- 22 Donà, S. *et al.* Association between hepatitis C and B viruses and head and neck squamous cell carcinoma. *J Clin Virol* **121**, 104209, doi:10.1016/j.jcv.2019.104209 (2019).
- 23 Schistosomes, liver flukes and Helicobacter pylori. IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Lyon, 7-14 June 1994. *IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum* **61**, 1-241 (1994).
- 24 Giarre, M. *et al.* Induction of pRb degradation by the human papillomavirus type 16 E7 protein is essential to efficiently overcome p16INK4a-imposed G1 cell cycle Arrest. *J Virol* **75**, 4705-4712, doi:10.1128/JVI.75.10.4705-4712.2001 (2001).
- 25 Havre, P. A., Yuan, J., Hedrick, L., Cho, K. R. & Glazer, P. M. p53 Inactivation by HPV16 E6 Results in Increased Mutagenesis in Human Cells. **6** (1995).
- 26 Chen, P.-M. & Lee, H. FOXM1 induced by E6 oncoprotein promotes tumor invasion and chemoresistance in HPV-infected lung cancer. *Cancer Cell & Microenvironment* **2** (2015).

- 27 Menges, C. W., Baglia, L. A., Lapoint, R. & McCance, D. J. Human papillomavirus type 16 E7 up-regulates AKT activity through the retinoblastoma protein. *Cancer Res* **66**, 5555-5559, doi:10.1158/0008-5472.Can-06-0499 (2006).
- 28 Ang, K. K. *et al.* Human papillomavirus and survival of patients with oropharyngeal cancer. *N Engl J Med* **363**, 24-35, doi:10.1056/NEJMoa0912217 (2010).
- 29 Guidry, J. T., Birdwell, C. E. & Scott, R. S. Epstein-Barr virus in the pathogenesis of oral cancers. *Oral Dis* **24**, 497-508, doi:10.1111/odi.12656 (2018).
- 30 Hadinoto, V., Shapiro, M., Sun, C. C. & Thorley-Lawson, D. A. The dynamics of EBV shedding implicate a central role for epithelial cells in amplifying viral output. *PLoS Pathog* **5**, e1000496, doi:10.1371/journal.ppat.1000496 (2009).
- 31 Tsai, C. N., Tsai, C. L., Tse, K. P., Chang, H. Y. & Chang, Y. S. The Epstein-Barr virus oncogene product, latent membrane protein 1, induces the downregulation of E-cadherin gene expression via activation of DNA methyltransferases. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 10084-10089, doi:10.1073/pnas.152059399 (2002).
- 32 Skalska, L., White, R. E., Franz, M., Ruhmann, M. & Allday, M. J. Epigenetic repression of p16(INK4A) by latent Epstein-Barr virus requires the interaction of EBNA3A and EBNA3C with CtBP. *PLoS Pathog* **6**, e1000951, doi:10.1371/journal.ppat.1000951 (2010).
- 33 Brugère, J. S., G. les cancers des voies aéro-digestives supérieures. *Ligue contre le cancer* (2009).
- 34 Califano, J. *et al.* Genetic progression model for head and neck cancer: implications for field cancerization. *Cancer Res* **56**, 2488-2492 (1996).
- 35 Poh, C. F. *et al.* Biopsy and histopathologic diagnosis of oral premalignant and malignant lesions. *J Can Dent Assoc* **74**, 283-288 (2008).
- 36 Johnson, D. E. *et al.* Head and neck squamous cell carcinoma. *Nat Rev Dis Primers* **6**, 92, doi:10.1038/s41572-020-00224-3 (2020).
- 37 Squarize, C. H. *et al.* PTEN deficiency contributes to the development and progression of head and neck cancer. *Neoplasia* **15**, 461-471, doi:10.1593/neo.121024 (2013).
- 38 Polanska, H. H. *et al.* Clinical significance of head and neck squamous cell cancer biomarkers. *Oral oncology* **50** **3**, 168-177 (2014).
- 39 Cancer Genome Atlas, N. Comprehensive genomic characterization of head and neck squamous cell carcinomas. *Nature* **517**, 576-582, doi:10.1038/nature14129 (2015).
- 40 Stransky, N. *et al.* The mutational landscape of head and neck squamous cell carcinoma. *Science* **333**, 1157-1160, doi:10.1126/science.1208130 (2011).
- 41 Agrawal, N. *et al.* Exome sequencing of head and neck squamous cell carcinoma reveals inactivating mutations in NOTCH1. *Science* **333**, 1154-1157, doi:10.1126/science.1206923 (2011).
- 42 Suzuki, H., Sugimura, H. & Hashimoto, K. p16INK4A in oral squamous cell carcinomas—a correlation with biological behaviors: immunohistochemical and FISH analysis. *Journal of oral and maxillofacial surgery* **64**, 1617-1623 (2006).
- 43 Hanken, H. *et al.* CCND1 amplification and cyclin D1 immunohistochemical expression in head and neck squamous cell carcinomas. *Clin Oral Investig* **18**, 269-276, doi:10.1007/s00784-013-0967-6 (2014).
- 44 Ramos-Garcia, P. *et al.* Clinicopathological significance of tumor cyclin D1 expression in oral cancer. *Arch Oral Biol* **99**, 177-182, doi:10.1016/j.archoralbio.2019.01.018 (2019).
- 45 Soni, S. *et al.* Alterations of rb pathway components are frequent events in patients with oral epithelial dysplasia and predict clinical outcome in patients with squamous cell carcinoma. *Oncology* **68**, 314-325, doi:10.1159/000086970 (2005).
- 46 Yang, X. H. *et al.* p53-positive expression in dysplastic surgical margins is a predictor of tumor recurrence in patients with early oral squamous cell carcinoma. *Cancer Manag Res* **11**, 1465-1472, doi:10.2147/cmar.S192500 (2019).
- 47 Izumi, H. *et al.* Pathway-Specific Genome Editing of PI3K/mTOR Tumor Suppressor Genes Reveals that PTEN Loss Contributes to Cetuximab Resistance in Head and Neck Cancer. *Mol Cancer Ther* **19**, 1562-1571, doi:10.1158/1535-7163.Mct-19-1036 (2020).
- 48 Toulany, M. *et al.* Akt promotes post-irradiation survival of human tumor cells through initiation, progression, and termination of DNA-PKcs-dependent DNA double-strand break repair. *Mol Cancer Res* **10**, 945-957, doi:10.1158/1541-7786.Mcr-11-0592 (2012).
- 49 Fiúza, U. M. & Arias, A. M. Cell and molecular biology of Notch. *J Endocrinol* **194**, 459-474, doi:10.1677/joe-07-0242 (2007).

- 50 Sakamoto, K. *et al.* Reduction of NOTCH1 expression pertains to maturation abnormalities of keratinocytes in squamous neoplasms. *Lab Invest* **92**, 688-702, doi:10.1038/labinvest.2012.9 (2012).
- 51 Alamoud, K. A. & Kukuruzinska, M. A. Emerging Insights into Wnt/beta-catenin Signaling in Head and Neck Cancer. *J Dent Res* **97**, 665-673, doi:10.1177/0022034518771923 (2018).
- 52 Haraguchi, K. *et al.* Ajuba negatively regulates the Wnt signaling pathway by promoting GSK-3beta-mediated phosphorylation of beta-catenin. *Oncogene* **27**, 274-284, doi:10.1038/sj.onc.1210644 (2008).
- 53 Morris, L. G. *et al.* Recurrent somatic mutation of FAT1 in multiple human cancers leads to aberrant Wnt activation. *Nat Genet* **45**, 253-261, doi:10.1038/ng.2538 (2013).
- 54 Akimoto, T. *et al.* Inverse relationship between epidermal growth factor receptor expression and radiocurability of murine carcinomas. *Clin Cancer Res* **5**, 2884-2890 (1999).
- 55 Ang, K. K. *et al.* Impact of epidermal growth factor receptor expression on survival and pattern of relapse in patients with advanced head and neck carcinoma. *Cancer Res* **62**, 7350-7356 (2002).
- 56 Huang, S. F. *et al.* Relationship between epidermal growth factor receptor gene copy number and protein expression in oral cavity squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* **48**, 67-72, doi:10.1016/j.oraloncology.2011.06.511 (2012).
- 57 Rogers, S. J., Harrington, K. J., Rhys-Evans, P., P, O. C. & Eccles, S. A. Biological significance of c-erbB family oncogenes in head and neck cancer. *Cancer Metastasis Rev* **24**, 47-69, doi:10.1007/s10555-005-5047-1 (2005).
- 58 Petit, A. M. *et al.* Neutralizing antibodies against epidermal growth factor and ErbB-2/neu receptor tyrosine kinases down-regulate vascular endothelial growth factor production by tumor cells in vitro and in vivo: angiogenic implications for signal transduction therapy of solid tumors. *Am J Pathol* **151**, 1523-1530 (1997).
- 59 Laughner, E., Taghavi, P., Chiles, K., Mahon, P. C. & Semenza, G. L. HER2 (neu) signaling increases the rate of hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) synthesis: novel mechanism for HIF-1-mediated vascular endothelial growth factor expression. *Mol Cell Biol* **21**, 3995-4004, doi:10.1128/mcb.21.12.3995-4004.2001 (2001).
- 60 Zhou, Y. J. *et al.* Inactivation of PTEN is associated with increased angiogenesis and VEGF overexpression in gastric cancer. *World J Gastroenterol* **10**, 3225-3229, doi:10.3748/wjg.v10.i21.3225 (2004).
- 61 Kyzas, P. A., Cunha, I. W. & Ioannidis, J. P. Prognostic significance of vascular endothelial growth factor immunohistochemical expression in head and neck squamous cell carcinoma: a meta-analysis. *Clinical cancer research* **11**, 1434-1440 (2005).
- 62 Zhao, S. F. *et al.* Prognostic significance of VEGF immunohistochemical expression in oral cancer: a meta-analysis of the literature. *Tumour Biol* **34**, 3165-3171, doi:10.1007/s13277-013-0886-9 (2013).
- 63 Freier, K. *et al.* Recurrent FGFR1 amplification and high FGFR1 protein expression in oral squamous cell carcinoma (OSCC). *Oral Oncol* **43**, 60-66, doi:10.1016/j.oraloncology.2006.01.005 (2007).
- 64 Hase, T. *et al.* Correlation of basic fibroblast growth factor expression with the invasion and the prognosis of oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med* **35**, 136-139, doi:10.1111/j.1600-0714.2006.00397.x (2006).
- 65 Wakulich, C., Jackson-Boeters, L., Daley, T. D. & Wysocki, G. P. Immunohistochemical localization of growth factors fibroblast growth factor-1 and fibroblast growth factor-2 and receptors fibroblast growth factor receptor-2 and fibroblast growth factor receptor-3 in normal oral epithelium, epithelial dysplasias, and squamous cell carcinoma. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* **93**, 573-579, doi:10.1067/moe.2002.124461 (2002).
- 66 Chaw, S. Y. *et al.* Epithelial to mesenchymal transition (EMT) biomarkers--E-cadherin, beta-catenin, APC and Vimentin--in oral squamous cell carcinogenesis and transformation. *Oral Oncol* **48**, 997-1006, doi:10.1016/j.oraloncology.2012.05.011 (2012).
- 67 Angadi, P. V. *et al.* Immunoexpression of Epithelial Mesenchymal Transition Proteins E-Cadherin, beta-Catenin, and N-Cadherin in Oral Squamous Cell Carcinoma. *Int J Surg Pathol* **24**, 696-703, doi:10.1177/1066896916654763 (2016).
- 68 Bu, J. Q. & Chen, F. TGF-beta1 promotes cells invasion and migration by inducing epithelial mesenchymal transformation in oral squamous cell carcinoma. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* **21**, 2137-2144 (2017).
- 69 Tam, S. Y., Wu, V. W. C. & Law, H. K. W. Hypoxia-Induced Epithelial-Mesenchymal Transition in Cancers: HIF-1 α and Beyond. *Front Oncol* **10**, 486, doi:10.3389/fonc.2020.00486 (2020).

- 70 Viswanathan, M., Tsuchida, N. & Shanmugam, G. Promoter hypermethylation profile of tumor-associated genes p16, p15, hMLH1, MGMT and E-cadherin in oral squamous cell carcinoma. *Int J Cancer* **105**, 41-46, doi:10.1002/ijc.11028 (2003).
- 71 Brennan, K. *et al.* NSD1 inactivation defines an immune cold, DNA hypomethylated subtype in squamous cell carcinoma. *Sci Rep* **7**, 17064, doi:10.1038/s41598-017-17298-x (2017).
- 72 Callahan, S. C. *et al.* KMT2D Loss Promotes Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Through Enhancer Reprogramming and Modulation of Immune Microenvironment. *bioRxiv* (2021).
- 73 Hsu, P. J., Yan, K., Shi, H., Izumchenko, E. & Agrawal, N. Molecular biology of oral cavity squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* **102**, 104552, doi:10.1016/j.oraloncology.2019.104552 (2020).
- 74 Huang, S. H. & O'Sullivan, B. Overview of the 8th Edition TNM Classification for Head and Neck Cancer. *Curr Treat Options Oncol* **18**, 40, doi:10.1007/s11864-017-0484-y (2017).
- 75 Chow, L. Q. M. Head and Neck Cancer. *N Engl J Med* **382**, 60-72, doi:10.1056/NEJMra1715715 (2020).
- 76 Bozec, A., Culie, D., Poissonnet, G. & Dassonville, O. Current role of primary surgical treatment in patients with head and neck squamous cell carcinoma. *Curr Opin Oncol* **31**, 138-145, doi:10.1097/CCO.0000000000000531 (2019).
- 77 Weiss, B. G. *et al.* Transoral laser microsurgery for treatment for hypopharyngeal cancer in 211 patients. *Head Neck* **39**, 1631-1638, doi:10.1002/hed.24814 (2017).
- 78 Moore, E. J., Janus, J. & Kasperbauer, J. Transoral robotic surgery of the oropharynx: Clinical and anatomic considerations. *Clin Anat* **25**, 135-141, doi:10.1002/ca.22008 (2012).
- 79 Hutchinson, M. N. D., Mierzwa, M. & D'Silva, N. J. Radiation resistance in head and neck squamous cell carcinoma: dire need for an appropriate sensitizer. *Oncogene* **39**, 3638-3649, doi:10.1038/s41388-020-1250-3 (2020).
- 80 Lomax, M. E., Folkes, L. K. & O'Neill, P. Biological consequences of radiation-induced DNA damage: relevance to radiotherapy. *Clin Oncol (R Coll Radiol)* **25**, 578-585, doi:10.1016/j.clon.2013.06.007 (2013).
- 81 Dagan, R. *et al.* A prospective evaluation of acute toxicity from proton therapy for targets of the parotid region. *International journal of particle therapy* **3**, 285-290 (2016).
- 82 Lupu-Plesu, M. *et al.* Effects of proton versus photon irradiation on (lymph)angiogenic, inflammatory, proliferative and anti-tumor immune responses in head and neck squamous cell carcinoma. *Oncogenesis* **6**, e354, doi:10.1038/oncsis.2017.56 (2017).
- 83 Doyen, J. *et al.* [Current situation and perspectives of proton therapy]. *Cancer Radiother* **19**, 211-219; quiz 231-212, 235, doi:10.1016/j.canrad.2014.12.010 (2015).
- 84 Calais, G. *et al.* Randomized trial of radiation therapy versus concomitant chemotherapy and radiation therapy for advanced-stage oropharynx carcinoma. *J Natl Cancer Inst* **91**, 2081-2086, doi:10.1093/jnci/91.24.2081 (1999).
- 85 Ellis, L. M. Epidermal growth factor receptor in tumor angiogenesis. *Hematol Oncol Clin North Am* **18**, 1007-1021, viii, doi:10.1016/j.hoc.2004.06.002 (2004).
- 86 Cetuximab approved by FDA for treatment of head and neck squamous cell cancer. *Cancer Biol Ther* **5**, 340-342 (2006).
- 87 Vermorcken, J. B. *et al.* Platinum-based chemotherapy plus cetuximab in head and neck cancer. *N Engl J Med* **359**, 1116-1127, doi:10.1056/NEJMoa0802656 (2008).
- 88 Pfister, D. G. *et al.* Head and Neck Cancers, Version 2.2020, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. *J Natl Compr Canc Netw* **18**, 873-898, doi:10.6004/jnccn.2020.0031 (2020).
- 89 Brøndum, L. *et al.* Associations between skin rash, treatment outcome, and single nucleotide polymorphisms in head and neck cancer patients receiving the EGFR-inhibitor zalutumumab: results from the DAHANCA 19 trial. *Acta Oncol* **57**, 1159-1164, doi:10.1080/0284186x.2018.1464664 (2018).
- 90 Machiels, J. P. *et al.* Zalutumumab plus best supportive care versus best supportive care alone in patients with recurrent or metastatic squamous-cell carcinoma of the head and neck after failure of platinum-based chemotherapy: an open-label, randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol* **12**, 333-343, doi:10.1016/s1470-2045(11)70034-1 (2011).
- 91 Vermorcken, J. B. *et al.* Cisplatin and fluorouracil with or without panitumumab in patients with recurrent or metastatic squamous-cell carcinoma of the head and neck (SPECTRUM): an open-label phase 3 randomised trial. *Lancet Oncol* **14**, 697-710, doi:10.1016/S1470-2045(13)70181-5 (2013).
- 92 Wirth, L. J. *et al.* PARTNER: An open-label, randomized, phase 2 study of docetaxel/cisplatin chemotherapy with or without panitumumab as first-line treatment for recurrent or metastatic

- squamous cell carcinoma of the head and neck. *Oral Oncol* **61**, 31-40, doi:10.1016/j.oraloncology.2016.07.005 (2016).
- 93 Argiris, A. *et al.* Phase III Randomized Trial of Chemotherapy With or Without Bevacizumab in Patients With Recurrent or Metastatic Head and Neck Cancer. *J Clin Oncol* **37**, 3266-3274, doi:10.1200/jco.19.00555 (2019).
- 94 Argiris, A. *et al.* Cetuximab and bevacizumab: preclinical data and phase II trial in recurrent or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck. *Ann Oncol* **24**, 220-225, doi:10.1093/annonc/mds245 (2013).
- 95 Martins, R. G. *et al.* Cisplatin and radiotherapy with or without erlotinib in locally advanced squamous cell carcinoma of the head and neck: a randomized phase II trial. *J Clin Oncol* **31**, 1415-1421, doi:10.1200/jco.2012.46.3299 (2013).
- 96 Cohen, E. E. *et al.* Erlotinib and bevacizumab in patients with recurrent or metastatic squamous-cell carcinoma of the head and neck: a phase I/II study. *Lancet Oncol* **10**, 247-257, doi:10.1016/s1470-2045(09)70002-6 (2009).
- 97 Argiris, A. *et al.* Phase III randomized, placebo-controlled trial of docetaxel with or without gefitinib in recurrent or metastatic head and neck cancer: an eastern cooperative oncology group trial. *J Clin Oncol* **31**, 1405-1414, doi:10.1200/JCO.2012.45.4272 (2013).
- 98 Tang, X. *et al.* Efficacy and Safety of Gefitinib in Patients with Advanced Head and Neck Squamous Cell Carcinoma: A Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. *J Oncol* **2019**, 6273438, doi:10.1155/2019/6273438 (2019).
- 99 Harrington, K. *et al.* Postoperative Adjuvant Lapatinib and Concurrent Chemoradiotherapy Followed by Maintenance Lapatinib Monotherapy in High-Risk Patients With Resected Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck: A Phase III, Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Study. *J Clin Oncol* **33**, 4202-4209, doi:10.1200/JCO.2015.61.4370 (2015).
- 100 Kim, H. S. *et al.* Phase II clinical and exploratory biomarker study of dacomitinib in patients with recurrent and/or metastatic squamous cell carcinoma of head and neck. *Clin Cancer Res* **21**, 544-552, doi:10.1158/1078-0432.Ccr-14-1756 (2015).
- 101 Abdul Razak, A. R. *et al.* A phase II trial of dacomitinib, an oral pan-human EGF receptor (HER) inhibitor, as first-line treatment in recurrent and/or metastatic squamous-cell carcinoma of the head and neck. *Ann Oncol* **24**, 761-769, doi:10.1093/annonc/mds503 (2013).
- 102 Fountzilias, G. *et al.* A phase II study of sunitinib in patients with recurrent and/or metastatic non-nasopharyngeal head and neck cancer. *Cancer Chemother Pharmacol* **65**, 649-660, doi:10.1007/s00280-009-1070-1 (2010).
- 103 Swiecicki, P. L. *et al.* A phase II study evaluating axitinib in patients with unresectable, recurrent or metastatic head and neck cancer. *Invest New Drugs* **33**, 1248-1256, doi:10.1007/s10637-015-0293-8 (2015).
- 104 Elser, C. *et al.* Phase II trial of sorafenib in patients with recurrent or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck or nasopharyngeal carcinoma. *J Clin Oncol* **25**, 3766-3773, doi:10.1200/JCO.2006.10.2871 (2007).
- 105 Chen, D. S. & Mellman, I. Oncology meets immunology: the cancer-immunity cycle. *Immunity* **39**, 1-10, doi:10.1016/j.immuni.2013.07.012 (2013).
- 106 Martin-Orozco, N. *et al.* T helper 17 cells promote cytotoxic T cell activation in tumor immunity. *Immunity* **31**, 787-798, doi:10.1016/j.immuni.2009.09.014 (2009).
- 107 Schreiber, R. D., Old, L. J. & Smyth, M. J. Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. *Science* **331**, 1565-1570, doi:10.1126/science.1203486 (2011).
- 108 Pollack, B. P., Sapkota, B. & Cartee, T. V. Epidermal growth factor receptor inhibition augments the expression of MHC class I and II genes. *Clinical Cancer Research* **17**, 4400-4413 (2011).
- 109 Leibowitz, M. S., Andrade Filho, P. A., Ferrone, S. & Ferris, R. L. Deficiency of activated STAT1 in head and neck cancer cells mediates TAP1-dependent escape from cytotoxic T lymphocytes. *Cancer immunology, immunotherapy* **60**, 525-535 (2011).
- 110 Hoffmann, T. K. *et al.* Alterations in the frequency of dendritic cell subsets in the peripheral circulation of patients with squamous cell carcinomas of the head and neck. *Clin Cancer Res* **8**, 1787-1793 (2002).
- 111 Gabrilovich, D. I. *et al.* Production of vascular endothelial growth factor by human tumors inhibits the functional maturation of dendritic cells. *Nat Med* **2**, 1096-1103, doi:10.1038/nm1096-1096 (1996).
- 112 Menetrier-Caux, C. *et al.* Inhibition of the differentiation of dendritic cells from CD34(+) progenitors by tumor cells: role of interleukin-6 and macrophage colony-stimulating factor. *Blood* **92**, 4778-4791 (1998).

- 113 Steinbrink, K., Graulich, E., Kubsch, S., Knop, J. & Enk, A. H. CD4(+) and CD8(+) anergic T cells induced by interleukin-10-treated human dendritic cells display antigen-specific suppressor activity. *Blood* **99**, 2468-2476, doi:10.1182/blood.v99.7.2468 (2002).
- 114 Krummel, M. F. & Allison, J. P. CD28 and CTLA-4 have opposing effects on the response of T cells to stimulation. *J Exp Med* **182**, 459-465, doi:10.1084/jem.182.2.459 (1995).
- 115 Parry, R. V. *et al.* CTLA-4 and PD-1 receptors inhibit T-cell activation by distinct mechanisms. *Mol Cell Biol* **25**, 9543-9553, doi:10.1128/mcb.25.21.9543-9553.2005 (2005).
- 116 Theodoraki, M. N., Yerneni, S. S., Hoffmann, T. K., Gooding, W. E. & Whiteside, T. L. Clinical Significance of PD-L1(+) Exosomes in Plasma of Head and Neck Cancer Patients. *Clin Cancer Res* **24**, 896-905, doi:10.1158/1078-0432.CCR-17-2664 (2018).
- 117 Buchbinder, E. I. & Desai, A. CTLA-4 and PD-1 Pathways: Similarities, Differences, and Implications of Their Inhibition. *Am J Clin Oncol* **39**, 98-106, doi:10.1097/coc.000000000000239 (2016).
- 118 Burtneß, B. *et al.* Pembrolizumab alone or with chemotherapy versus cetuximab with chemotherapy for recurrent or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck (KEYNOTE-048): a randomised, open-label, phase 3 study. *Lancet* **394**, 1915-1928, doi:10.1016/s0140-6736(19)32591-7 (2019).
- 119 Cohen, E. E. W. *et al.* Pembrolizumab versus methotrexate, docetaxel, or cetuximab for recurrent or metastatic head-and-neck squamous cell carcinoma (KEYNOTE-040): a randomised, open-label, phase 3 study. *The Lancet* **393**, 156-167, doi:10.1016/S0140-6736(18)31999-8 (2019).
- 120 Ferris, R. L. *et al.* Nivolumab for Recurrent Squamous-Cell Carcinoma of the Head and Neck. *New England Journal of Medicine* **375**, 1856-1867, doi:10.1056/NEJMoa1602252 (2016).
- 121 Ferris, R. L. *et al.* Nivolumab vs investigator's choice in recurrent or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck: 2-year long-term survival update of CheckMate 141 with analyses by tumor PD-L1 expression. *Oral Oncol* **81**, 45-51, doi:10.1016/j.oraloncology.2018.04.008 (2018).
- 122 Cristina, V., Herrera-Gómez, R. G., Szturz, P., Espeli, V. & Siano, M. Immunotherapies and Future Combination Strategies for Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Int J Mol Sci* **20**, doi:10.3390/ijms20215399 (2019).
- 123 Ferris, R. L. *et al.* Durvalumab with or without tremelimumab in patients with recurrent or metastatic head and neck squamous cell carcinoma: EAGLE, a randomized, open-label phase III study. *Ann Oncol* **31**, 942-950, doi:10.1016/j.annonc.2020.04.001 (2020).
- 124 Siu, L. L. *et al.* Safety and Efficacy of Durvalumab With or Without Tremelimumab in Patients With PD-L1-Low/Negative Recurrent or Metastatic HNSCC: The Phase 2 CONDOR Randomized Clinical Trial. *JAMA Oncol* **5**, 195-203, doi:10.1001/jamaoncol.2018.4628 (2019).
- 125 Hartwell, L. H., Mortimer, R. K., Culotti, J. & Culotti, M. Genetic Control of the Cell Division Cycle in Yeast: V. Genetic Analysis of cdc Mutants. *Genetics* **74**, 267-286, doi:10.1093/genetics/74.2.267 (1973).
- 126 Llamazares, S. *et al.* polo encodes a protein kinase homolog required for mitosis in Drosophila. *Genes & Development* **5**, 2153-2165, doi:10.1101/gad.5.12a.2153 (1991).
- 127 Sunkel, C. E. & Glover, D. M. polo, a mitotic mutant of Drosophila displaying abnormal spindle poles. *14* (1988).
- 128 Ohkura, H., Hagan, I. M. & Glover, D. M. The conserved Schizosaccharomyces pombe kinase plo1, required to form a bipolar spindle, the actin ring, and septum, can drive septum formation in G1 and G2 cells. *Genes Dev* **9**, 1059-1073, doi:10.1101/gad.9.9.1059 (1995).
- 129 Ouyang, B., Wang, Y. & Wei, D. Caenorhabditis elegans contains structural homologs of human prk and plk. *DNA Seq* **10**, 109-113, doi:10.3109/10425179909008427 (1999).
- 130 Kumagai, A. & Dunphy, W. G. Purification and molecular cloning of Plx1, a Cdc25-regulatory kinase from Xenopus egg extracts. *Science* **273**, 1377-1380, doi:10.1126/science.273.5280.1377 (1996).
- 131 Lu, L.-Y. *et al.* Polo-Like Kinase 1 Is Essential for Early Embryonic Development and Tumor Suppression. *Molecular and Cellular Biology* **28**, 6870-6876, doi:10.1128/MCB.00392-08 (2008).
- 132 Archambault, V. & Glover, D. M. Polo-like kinases: conservation and divergence in their functions and regulation. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **10**, 265-275, doi:10.1038/nrm2653 (2009).
- 133 Cheng, K. Y., Lowe, E. D., Sinclair, J., Nigg, E. A. & Johnson, L. N. The crystal structure of the human polo-like kinase-1 polo box domain and its phospho-peptide complex. *EMBO J* **22**, 5757-5768, doi:10.1093/emboj/cdg558 (2003).

- 134 Elia, A. E., Cantley, L. C. & Yaffe, M. B. Proteomic screen finds pSer/pThr-binding domain localizing Plk1 to mitotic substrates. *Science* **299**, 1228-1231, doi:10.1126/science.1079079 (2003).
- 135 Papadopoulos, J. S. & Agarwala, R. COBALT: constraint-based alignment tool for multiple protein sequences. *Bioinformatics* **23**, 1073-1079, doi:10.1093/bioinformatics/btm076 (2007).
- 136 de Carcer, G. *et al.* Plk5, a polo box domain-only protein with specific roles in neuron differentiation and glioblastoma suppression. *Mol Cell Biol* **31**, 1225-1239, doi:10.1128/MCB.00607-10 (2011).
- 137 de Cárcer, G., Manning, G. & Malumbres, M. From Plk1 to Plk5: Functional evolution of polo-like kinases. *Cell Cycle* **10**, 2255-2262, doi:10.4161/cc.10.14.16494 (2011).
- 138 Yuan, J. *et al.* Polo-like kinase, a novel marker for cellular proliferation. *Am J Pathol* **150**, 1165-1172 (1997).
- 139 Casenghi, M. *et al.* Polo-like Kinase 1 Regulates Nlp, a Centrosome Protein Involved in Microtubule Nucleation. *Developmental Cell* **5**, 113-125, doi:10.1016/S1534-5807(03)00193-X (2003).
- 140 Cizmecioglu, O., Warnke, S., Arnold, M., Duensing, S. & Hoffmann, I. Plk2 regulated centriole duplication is dependent on its localization to the centrioles and a functional polo-box domain. *Cell Cycle* **7**, 3548-3555, doi:10.4161/cc.7.22.7071 (2008).
- 141 Warnke, S. *et al.* Polo-like kinase-2 is required for centriole duplication in mammalian cells. *Curr Biol* **14**, 1200-1207, doi:10.1016/j.cub.2004.06.059 (2004).
- 142 Zimmerman, W. C. & Erikson, R. L. Finding Plk3. *Cell Cycle* **6**, 1314-1318, doi:10.4161/cc.6.11.4275 (2007).
- 143 Bahassi el, M., Hennigan, R. F., Myer, D. L. & Stambrook, P. J. Cdc25C phosphorylation on serine 191 by Plk3 promotes its nuclear translocation. *Oncogene* **23**, 2658-2663, doi:10.1038/sj.onc.1207425 (2004).
- 144 Burns, T. F., Fei, P., Scata, K. A., Dicker, D. T. & El-Deiry, W. S. Silencing of the novel p53 target gene Snk/Plk2 leads to mitotic catastrophe in paclitaxel (taxol)-exposed cells. *Mol Cell Biol* **23**, 5556-5571, doi:10.1128/mcb.23.16.5556-5571.2003 (2003).
- 145 Bahassi el, M., Myer, D. L., McKenney, R. J., Hennigan, R. F. & Stambrook, P. J. Priming phosphorylation of Chk2 by polo-like kinase 3 (Plk3) mediates its full activation by ATM and a downstream checkpoint in response to DNA damage. *Mutat Res* **596**, 166-176, doi:10.1016/j.mrfmmm.2005.12.002 (2006).
- 146 Ma, S., Charron, J. & Erikson, R. L. Role of Plk2 (Snk) in mouse development and cell proliferation. *Mol Cell Biol* **23**, 6936-6943, doi:10.1128/MCB.23.19.6936-6943.2003 (2003).
- 147 Yang, Y. *et al.* Polo-like kinase 3 functions as a tumor suppressor and is a negative regulator of hypoxia-inducible factor-1 alpha under hypoxic conditions. *Cancer Res* **68**, 4077-4085, doi:10.1158/0008-5472.Can-07-6182 (2008).
- 148 Li, Z. *et al.* Distinct microRNA expression profiles in acute myeloid leukemia with common translocations. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 15535-15540, doi:10.1073/pnas.0808266105 (2008).
- 149 Matthew, E. M. *et al.* The p53 target Plk2 interacts with TSC proteins impacting mTOR signaling, tumor growth and chemosensitivity under hypoxic conditions. *Cell Cycle* **8**, 4168-4175, doi:10.4161/cc.8.24.10800 (2009).
- 150 Syed, N. *et al.* Transcriptional silencing of Polo-like kinase 2 (SNK/PLK2) is a frequent event in B-cell malignancies. *Blood* **107**, 250-256, doi:10.1182/blood-2005-03-1194 (2006).
- 151 Xu, D., Yao, Y., Lu, L., Costa, M. & Dai, W. Plk3 functions as an essential component of the hypoxia regulatory pathway by direct phosphorylation of HIF-1alpha. *J Biol Chem* **285**, 38944-38950, doi:10.1074/jbc.M110.160325 (2010).
- 152 Dai, W. *et al.* PRK, a cell cycle gene localized to 8p21, is downregulated in head and neck cancer. *Genes Chromosomes Cancer* **27**, 332-336, doi:10.1002/(sici)1098-2264(200003)27:3<332::aid-gcc15>3.0.co;2-k (2000).
- 153 Ward, A. *et al.* The deregulated promoter methylation of the Polo-like kinases as a potential biomarker in hematological malignancies. *Leuk Lymphoma* **56**, 2123-2133, doi:10.3109/10428194.2014.971407 (2015).
- 154 Pellegrino, R. *et al.* Oncogenic and tumor suppressive roles of polo-like kinases in human hepatocellular carcinoma. *Hepatology* **51**, 857-868, doi:10.1002/hep.23467 (2010).
- 155 Karn, T. *et al.* Human SAK related to the PLK/polo family of cell cycle kinases shows high mRNA expression in testis. *Oncol Rep* **4**, 505-510, doi:10.3892/or.4.3.505 (1997).
- 156 Kleylein-Sohn, J. *et al.* Plk4-induced centriole biogenesis in human cells. *Dev Cell* **13**, 190-202, doi:10.1016/j.devcel.2007.07.002 (2007).

- 157 Ko, M. A. *et al.* Plk4 haploinsufficiency causes mitotic infidelity and carcinogenesis. *Nat Genet* **37**, 883-888, doi:10.1038/ng1605 (2005).
- 158 Korzeniewski, N., Hohenfellner, M. & Duensing, S. CAND1 promotes PLK4-mediated centriole overduplication and is frequently disrupted in prostate cancer. *Neoplasia* **14**, 799-806, doi:10.1593/neo.12580 (2012).
- 159 Kazazian, K. *et al.* Plk4 Promotes Cancer Invasion and Metastasis through Arp2/3 Complex Regulation of the Actin Cytoskeleton. *Cancer Res* **77**, 434-447, doi:10.1158/0008-5472.Can-16-2060 (2017).
- 160 Liao, Z. *et al.* High PLK4 expression promotes tumor progression and induces epithelial-mesenchymal transition by regulating the Wnt/ β -catenin signaling pathway in colorectal cancer. *Int J Oncol* **54**, 479-490, doi:10.3892/ijo.2018.4659 (2019).
- 161 Tian, X. *et al.* Polo-like kinase 4 mediates epithelial-mesenchymal transition in neuroblastoma via PI3K/Akt signaling pathway. *Cell Death Dis* **9**, 54, doi:10.1038/s41419-017-0088-2 (2018).
- 162 Kawakami, M. *et al.* Polo-like kinase 4 inhibition produces polyploidy and apoptotic death of lung cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A* **115**, 1913-1918, doi:10.1073/pnas.1719760115 (2018).
- 163 Lei, Q. *et al.* YLT-11, a novel PLK4 inhibitor, inhibits human breast cancer growth via inducing maladjusted centriole duplication and mitotic defect. *Cell Death Dis* **9**, 1066, doi:10.1038/s41419-018-1071-2 (2018).
- 164 Andrysiak, Z. *et al.* The novel mouse Polo-like kinase 5 responds to DNA damage and localizes in the nucleolus. *Nucleic Acids Res* **38**, 2931-2943, doi:10.1093/nar/gkq011 (2010).
- 165 Li, Z. *et al.* Genetic mutations associated with metastatic clear cell renal cell carcinoma. *Oncotarget* **7**, 16172-16179, doi:10.18632/oncotarget.7473 (2016).
- 166 Lee, S.-Y., Jang, C. & Lee, K.-A. Polo-Like Kinases (Plks), a Key Regulator of Cell Cycle and New Potential Target for Cancer Therapy. *Development & Reproduction* **18**, 65-71, doi:10.12717/DR.2014.18.1.065 (2014).
- 167 Schafer, K. A. The cell cycle: a review. *Vet Pathol* **35**, 461-478, doi:10.1177/030098589803500601 (1998).
- 168 Golsteyn, R. M., Mundt, K. E., Fry, A. M. & Nigg, E. A. Cell cycle regulation of the activity and subcellular localization of Plk1, a human protein kinase implicated in mitotic spindle function. *The Journal of Cell Biology* **129**, 1617-1628, doi:10.1083/jcb.129.6.1617 (1995).
- 169 Lane, H. A. & Nigg, E. A. Antibody microinjection reveals an essential role for human polo-like kinase 1 (Plk1) in the functional maturation of mitotic centrosomes. *J Cell Biol* **135**, 1701-1713, doi:10.1083/jcb.135.6.1701 (1996).
- 170 Descombes, P. & Nigg, E. A. The polo-like kinase Plx1 is required for M phase exit and destruction of mitotic regulators in *Xenopus* egg extracts. *Embo j* **17**, 1328-1335, doi:10.1093/emboj/17.5.1328 (1998).
- 171 Liu, X. & Erikson, R. L. Activation of Cdc2/cyclin B and inhibition of centrosome amplification in cells depleted of Plk1 by siRNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 8672-8676, doi:10.1073/pnas.132269599 (2002).
- 172 Liu, X. & Erikson, R. L. Polo-like kinase (Plk)1 depletion induces apoptosis in cancer cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **100**, 5789-5794, doi:10.1073/pnas.1031523100 (2003).
- 173 Lénárt, P. *et al.* The small-molecule inhibitor BI 2536 reveals novel insights into mitotic roles of polo-like kinase 1. *Curr Biol* **17**, 304-315, doi:10.1016/j.cub.2006.12.046 (2007).
- 174 Archambault, V., Lépine, G. & Kachaner, D. Understanding the Polo Kinase machine. *Oncogene* **34**, 4799-4807, doi:10.1038/onc.2014.451 (2015).
- 175 Palazzo, R. E., Vogel, J. M., Schnackenberg, B. J., Hull, D. R. & Wu, X. Centrosome maturation. *Curr Top Dev Biol* **49**, 449-470, doi:10.1016/s0070-2153(99)49021-0 (2000).
- 176 Joukov, V., Walter, Johannes C. & De Nicolo, A. The Cep192-Organized Aurora A-Plk1 Cascade Is Essential for Centrosome Cycle and Bipolar Spindle Assembly. *Molecular Cell* **55**, 578-591, doi:10.1016/j.molcel.2014.06.016 (2014).
- 177 Colicino, E. G. *et al.* Gravin regulates centrosome function through PLK1. *Molecular Biology of the Cell* **29**, 532-541, doi:10.1091/mbc.E17-08-0524 (2018).
- 178 Seki, A., Coppinger, J. A., Jang, C.-Y., Yates, J. R. & Fang, G. Bora and the Kinase Aurora A Cooperatively Activate the Kinase Plk1 and Control Mitotic Entry. *Science* **320**, 1655-1658, doi:10.1126/science.1157425 (2008).
- 179 Schockel, L., Mockel, M., Mayer, B., Boos, D. & Stemmann, O. Cleavage of cohesin rings coordinates the separation of centrioles and chromatids. *Nat Cell Biol* **13**, 966-972, doi:10.1038/ncb2280 (2011).

- 180 Agircan, F. G. & Schiebel, E. Sensors at centrosomes reveal determinants of local separase activity. *PLoS Genet* **10**, e1004672, doi:10.1371/journal.pgen.1004672 (2014).
- 181 Lee, K. & Rhee, K. PLK1 phosphorylation of pericentrin initiates centrosome maturation at the onset of mitosis. *J Cell Biol* **195**, 1093-1101, doi:10.1083/jcb.201106093 (2011).
- 182 Meng, L. *et al.* Bimodal Interaction of Mammalian Polo-Like Kinase 1 and a Centrosomal Scaffold, Cep192, in the Regulation of Bipolar Spindle Formation. *Mol Cell Biol* **35**, 2626-2640, doi:10.1128/MCB.00068-15 (2015).
- 183 Zhang, X. *et al.* Sequential phosphorylation of Nedd1 by Cdk1 and Plk1 is required for targeting of the gammaTuRC to the centrosome. *J Cell Sci* **122**, 2240-2251, doi:10.1242/jcs.042747 (2009).
- 184 Sdelci, S. *et al.* Nek9 phosphorylation of NEDD1/GCP-WD contributes to Plk1 control of γ -tubulin recruitment to the mitotic centrosome. *Curr Biol* **22**, 1516-1523, doi:10.1016/j.cub.2012.06.027 (2012).
- 185 Chen, C. *et al.* Cep85 Relays Plk1 Activity to Phosphorylated Nek2A for Its Timely Activation in Centrosome Disjunction. *iScience* **11**, 114-133, doi:10.1016/j.isci.2018.12.013 (2019).
- 186 Hardy, T. *et al.* Multisite phosphorylation of C-Nap1 releases it from Cep135 to trigger centrosome disjunction. *J Cell Sci* **127**, 2493-2506, doi:10.1242/jcs.142331 (2014).
- 187 Rapley, J. *et al.* The NIMA-family kinase Nek6 phosphorylates the kinesin Eg5 at a novel site necessary for mitotic spindle formation. *J Cell Sci* **121**, 3912-3921, doi:10.1242/jcs.035360 (2008).
- 188 Bertran, M. T. *et al.* Nek9 is a Plk1-activated kinase that controls early centrosome separation through Nek6/7 and Eg5. *Embo j* **30**, 2634-2647, doi:10.1038/emboj.2011.179 (2011).
- 189 Tanenbaum, M. E. & Medema, R. H. Mechanisms of centrosome separation and bipolar spindle assembly. *Dev Cell* **19**, 797-806, doi:10.1016/j.devcel.2010.11.011 (2010).
- 190 Sumara, I. *et al.* Roles of polo-like kinase 1 in the assembly of functional mitotic spindles. *Curr Biol* **14**, 1712-1722, doi:10.1016/j.cub.2004.09.049 (2004).
- 191 Jackman, M., Lindon, C., Nigg, E. A. & Pines, J. Active cyclin B1-Cdk1 first appears on centrosomes in prophase. *Nat Cell Biol* **5**, 143-148, doi:10.1038/ncb918 (2003).
- 192 Parker, L. L. & Piwnicka-Worms, H. Inactivation of the p34cdc2-cyclin B complex by the human WEE1 tyrosine kinase. *Science* **257**, 1955-1957, doi:10.1126/science.1384126 (1992).
- 193 Booher, R. N., Holman, P. S. & Fattaey, A. Human Myt1 is a cell cycle-regulated kinase that inhibits Cdc2 but not Cdk2 activity. *J Biol Chem* **272**, 22300-22306, doi:10.1074/jbc.272.35.22300 (1997).
- 194 Thomas, Y. *et al.* Cdk1 Phosphorylates SPAT-1/Bora to Promote Plk1 Activation in *C. elegans* and Human Cells. *Cell Rep* **15**, 510-518, doi:10.1016/j.celrep.2016.03.049 (2016).
- 195 Roshak, A. K. *et al.* The human polo-like kinase, PLK, regulates cdc2/cyclin B through phosphorylation and activation of the cdc25C phosphatase. *Cell Signal* **12**, 405-411, doi:10.1016/s0898-6568(00)00080-2 (2000).
- 196 Watanabe, N. *et al.* M-phase kinases induce phospho-dependent ubiquitination of somatic Wee1 by SCFbeta-TrCP. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 4419-4424, doi:10.1073/pnas.0307700101 (2004).
- 197 Nakajima, H., Toyoshima-Morimoto, F., Taniguchi, E. & Nishida, E. Identification of a Consensus Motif for Plk (Polo-like Kinase) Phosphorylation Reveals Myt1 as a Plk1 Substrate*. *Journal of Biological Chemistry* **278**, 25277-25280, doi:10.1074/jbc.C300126200 (2003).
- 198 Toyoshima-Morimoto, F., Taniguchi, E., Shinya, N., Iwamatsu, A. & Nishida, E. Polo-like kinase 1 phosphorylates cyclin B1 and targets it to the nucleus during prophase. *Nature* **410**, 215-220, doi:10.1038/35065617 (2001).
- 199 Nasmyth, K. & Haering, C. H. Cohesin: its roles and mechanisms. *Annu Rev Genet* **43**, 525-558, doi:10.1146/annurev-genet-102108-134233 (2009).
- 200 von Schubert, C. *et al.* Plk1 and Mps1 Cooperatively Regulate the Spindle Assembly Checkpoint in Human Cells. *Cell Reports* **12**, 66-78, doi:10.1016/j.celrep.2015.06.007 (2015).
- 201 Shepperd, L. A. *et al.* Phosphodependent recruitment of Bub1 and Bub3 to Spc7/KNL1 by Mph1 kinase maintains the spindle checkpoint. *Curr Biol* **22**, 891-899, doi:10.1016/j.cub.2012.03.051 (2012).
- 202 Primorac, I. *et al.* Bub3 reads phosphorylated MELT repeats to promote spindle assembly checkpoint signaling. *Elife* **2**, e01030, doi:10.7554/eLife.01030 (2013).
- 203 Lara-Gonzalez, P., Westhorpe, Frederick G. & Taylor, Stephen S. The Spindle Assembly Checkpoint. *Current Biology* **22**, R966-R980, doi:10.1016/j.cub.2012.10.006 (2012).

- 204 Liu, D., Vader, G., Vromans, M. J., Lampson, M. A. & Lens, S. M. Sensing chromosome bi-orientation by spatial separation of aurora B kinase from kinetochore substrates. *Science* **323**, 1350-1353, doi:10.1126/science.1167000 (2009).
- 205 Lee, M. *et al.* Mitosis-specific phosphorylation of Mis18alpha by Aurora B kinase enhances kinetochore recruitment of polo-like kinase 1. *Oncotarget* **9**, 1563-1576, doi:10.18632/oncotarget.22707 (2018).
- 206 Goto, H. *et al.* Complex formation of Plk1 and INCENP required for metaphase-anaphase transition. *Nat Cell Biol* **8**, 180-187, doi:10.1038/ncb1350 (2006).
- 207 Qi, W., Tang, Z. & Yu, H. Phosphorylation- and polo-box-dependent binding of Plk1 to Bub1 is required for the kinetochore localization of Plk1. *Mol Biol Cell* **17**, 3705-3716, doi:10.1091/mbc.e06-03-0240 (2006).
- 208 Singh, P. *et al.* BUB1 and CENP-U, Primed by CDK1, Are the Main PLK1 Kinetochore Receptors in Mitosis. *Mol Cell* **81**, 67-87 e69, doi:10.1016/j.molcel.2020.10.040 (2021).
- 209 Lee, H.-S. *et al.* Spatiotemporal coordination of the RSF1-PLK1-Aurora B cascade establishes mitotic signaling platforms. *Nature Communications* **12**, 5931, doi:10.1038/s41467-021-26220-z (2021).
- 210 Suijkerbuijk, S. J., Vleugel, M., Teixeira, A. & Kops, G. J. Integration of kinase and phosphatase activities by BUBR1 ensures formation of stable kinetochore-microtubule attachments. *Dev Cell* **23**, 745-755, doi:10.1016/j.devcel.2012.09.005 (2012).
- 211 Matsumura, S., Toyoshima, F. & Nishida, E. Polo-like kinase 1 facilitates chromosome alignment during prometaphase through BubR1. *J Biol Chem* **282**, 15217-15227, doi:10.1074/jbc.M611053200 (2007).
- 212 Kruse, T. *et al.* Direct binding between BubR1 and B56-PP2A phosphatase complexes regulate mitotic progression. *J Cell Sci* **126**, 1086-1092, doi:10.1242/jcs.122481 (2013).
- 213 Duan, H. *et al.* Phosphorylation of PP1 Regulator Sds22 by PLK1 Ensures Accurate Chromosome Segregation. *J Biol Chem* **291**, 21123-21136, doi:10.1074/jbc.M116.745372 (2016).
- 214 Espert, A. *et al.* PP2A-B56 opposes Mps1 phosphorylation of Knl1 and thereby promotes spindle assembly checkpoint silencing. *J Cell Biol* **206**, 833-842, doi:10.1083/jcb.201406109 (2014).
- 215 Moura, M. *et al.* Protein Phosphatase 1 inactivates Mps1 to ensure efficient Spindle Assembly Checkpoint silencing. *Elife* **6**, doi:10.7554/eLife.25366 (2017).
- 216 Kaisari, S. *et al.* Role of Polo-like kinase 1 in the regulation of the action of p31^{comet} in the disassembly of mitotic checkpoint complexes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 201902970, doi:10.1073/pnas.1902970116 (2019).
- 217 Hansen, D. V., Loktev, A. V., Ban, K. H. & Jackson, P. K. Plk1 regulates activation of the anaphase promoting complex by phosphorylating and triggering SCFbetaTrCP-dependent destruction of the APC Inhibitor Emi1. *Mol Biol Cell* **15**, 5623-5634, doi:10.1091/mbc.e04-07-0598 (2004).
- 218 Elowe, S., Hümmer, S., Uldschmid, A., Li, X. & Nigg, E. A. Tension-sensitive Plk1 phosphorylation on BubR1 regulates the stability of kinetochore microtubule interactions. *Genes Dev* **21**, 2205-2219, doi:10.1101/gad.436007 (2007).
- 219 Ehlén, Å. *et al.* Proper chromosome alignment depends on BRCA2 phosphorylation by PLK1. *Nat Commun* **11**, 1819, doi:10.1038/s41467-020-15689-9 (2020).
- 220 Glotzer, M. The molecular requirements for cytokinesis. *Science* **307**, 1735-1739, doi:10.1126/science.1096896 (2005).
- 221 Neef, R. *et al.* Phosphorylation of mitotic kinesin-like protein 2 by polo-like kinase 1 is required for cytokinesis. *J Cell Biol* **162**, 863-875, doi:10.1083/jcb.200306009 (2003).
- 222 Neef, R. *et al.* Choice of Plk1 docking partners during mitosis and cytokinesis is controlled by the activation state of Cdk1. *Nat Cell Biol* **9**, 436-444, doi:10.1038/ncb1557 (2007).
- 223 Wolfe, B. A., Takaki, T., Petronczki, M. & Glotzer, M. Polo-Like Kinase 1 Directs Assembly of the HsCyk-4 RhoGAP/Ect2 RhoGEF Complex to Initiate Cleavage Furrow Formation. *PLoS Biology* **7**, e1000110, doi:10.1371/journal.pbio.1000110 (2009).
- 224 Chang, Y. C., Wu, C. H., Yen, T. C. & Ouyang, P. Centrosomal protein 55 (Cep55) stability is negatively regulated by p53 protein through Polo-like kinase 1 (Plk1). *J Biol Chem* **287**, 4376-4385, doi:10.1074/jbc.M111.289108 (2012).
- 225 Bastos, R. N. & Barr, F. A. Plk1 negatively regulates Cep55 recruitment to the midbody to ensure orderly abscission. *J Cell Biol* **191**, 751-760, doi:10.1083/jcb.201008108 (2010).
- 226 de Jager, M. *et al.* Human Rad50/Mre11 is a flexible complex that can tether DNA ends. *Mol Cell* **8**, 1129-1135, doi:10.1016/s1097-2765(01)00381-1 (2001).

- 227 Falck, J., Mailand, N., Syljuasen, R. G., Bartek, J. & Lukas, J. The ATM-Chk2-Cdc25A checkpoint pathway guards against radioresistant DNA synthesis. *Nature* **410**, 842-847, doi:10.1038/35071124 (2001).
- 228 Mailand, N. *et al.* Rapid destruction of human Cdc25A in response to DNA damage. *Science* **288**, 1425-1429, doi:10.1126/science.288.5470.1425 (2000).
- 229 Qin, B., Gao, B., Yu, J., Yuan, J. & Lou, Z. Ataxia Telangiectasia-mutated- and Rad3-related Protein Regulates the DNA Damage-induced G₂/M Checkpoint through the Aurora A Cofactor Bora Protein. *Journal of Biological Chemistry* **288**, 16139-16144, doi:10.1074/jbc.M113.456780 (2013).
- 230 Wang, L., Guo, Q., Fisher, L. A., Liu, D. & Peng, A. Regulation of polo-like kinase 1 by DNA damage and PP2A/B55 α . *Cell Cycle* **14**, 157-166, doi:10.4161/15384101.2014.986392 (2015).
- 231 Sanchez, Y. *et al.* Conservation of the Chk1 checkpoint pathway in mammals: linkage of DNA damage to Cdk regulation through Cdc25. *Science* **277**, 1497-1501, doi:10.1126/science.277.5331.1497 (1997).
- 232 Matsuoka, S., Huang, M. & Elledge, S. J. Linkage of ATM to cell cycle regulation by the Chk2 protein kinase. *Science* **282**, 1893-1897, doi:10.1126/science.282.5395.1893 (1998).
- 233 Mamely, I. *et al.* Polo-like kinase-1 controls proteasome-dependent degradation of Claspin during checkpoint recovery. *Curr Biol* **16**, 1950-1955, doi:10.1016/j.cub.2006.08.026 (2006).
- 234 Jang, Y. J., Ji, J. H., Choi, Y. C., Ryu, C. J. & Ko, S. Y. Regulation of Polo-like kinase 1 by DNA damage in mitosis. Inhibition of mitotic PLK-1 by protein phosphatase 2A. *J Biol Chem* **282**, 2473-2482, doi:10.1074/jbc.M605480200 (2007).
- 235 Lee, H. J., Hwang, H. I. & Jang, Y. J. Mitotic DNA damage response: Polo-like kinase-1 is dephosphorylated through ATM-Chk1 pathway. *Cell Cycle* **9**, 2389-2398, doi:10.4161/cc.9.12.11904 (2010).
- 236 Kim, S. Y., Hyun, S. Y. & Jang, Y. J. Dephosphorylation of Plk1 occurs through PP2A-B55/ENSA/Greatwall pathway during mitotic DNA damage recovery. *Cell Cycle* **18**, 1154-1167, doi:10.1080/15384101.2019.1617003 (2019).
- 237 Bunz, F. *et al.* Requirement for p53 and p21 to sustain G2 arrest after DNA damage. *Science* **282**, 1497-1501, doi:10.1126/science.282.5393.1497 (1998).
- 238 Zhou, Z. *et al.* p53 Suppresses E2F1-dependent PLK1 expression upon DNA damage by forming p53-E2F1-DNA complex. *Exp Cell Res* **319**, 3104-3115, doi:10.1016/j.yexcr.2013.09.012 (2013).
- 239 Pandit, B., Halasi, M. & Gartel, A. L. p53 negatively regulates expression of FoxM1. *Cell Cycle* **8**, 3425-3427, doi:10.4161/cc.8.20.9628 (2009).
- 240 Lin, Y. C., Sun, S. H. & Wang, F. F. Suppression of Polo like kinase 1 (PLK1) by p21(Waf1) mediates the p53-dependent prevention of caspase-independent mitotic death. *Cell Signal* **23**, 1816-1823, doi:10.1016/j.cellsig.2011.06.016 (2011).
- 241 Yang, X. *et al.* Plk1-mediated phosphorylation of Topors regulates p53 stability. *J Biol Chem* **284**, 18588-18592, doi:10.1074/jbc.C109.001560 (2009).
- 242 Smith, M. R. *et al.* Malignant Transformation of Mammalian Cells Initiated by Constitutive Expression of thePolo-like Kinase1. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **234**, 397-405, doi:10.1006/bbrc.1997.6633 (1997).
- 243 Laoukili, J. *et al.* FoxM1 is required for execution of the mitotic programme and chromosome stability. *Nature Cell Biology* **7**, 126-136, doi:10.1038/ncb1217 (2005).
- 244 Fu, Z. *et al.* Plk1-dependent phosphorylation of FoxM1 regulates a transcriptional programme required for mitotic progression. *Nature Cell Biology* **10**, 1076-1082, doi:10.1038/ncb1767 (2008).
- 245 Dibb, M. *et al.* The FOXM1-PLK1 axis is commonly upregulated in oesophageal adenocarcinoma. *Br J Cancer* **107**, 1766-1775, doi:10.1038/bjc.2012.424 (2012).
- 246 Zhang, Z., Zhang, G. & Kong, C. FOXM1 participates in PLK1-regulated cell cycle progression in renal cell cancer cells. *Oncol Lett* **11**, 2685-2691, doi:10.3892/ol.2016.4228 (2016).
- 247 Tategu, M. *et al.* Transcriptional regulation of human polo-like kinases and early mitotic inhibitor. *J Genet Genomics* **35**, 215-224, doi:10.1016/s1673-8527(08)60030-2 (2008).
- 248 Olsson, A. Y. *et al.* Role of E2F3 expression in modulating cellular proliferation rate in human bladder and prostate cancer cells. *Oncogene* **26**, 1028-1037, doi:10.1038/sj.onc.1209854 (2007).
- 249 Chen, J. The Cell-Cycle Arrest and Apoptotic Functions of p53 in Tumor Initiation and Progression. *Cold Spring Harb Perspect Med* **6**, a026104, doi:10.1101/cshperspect.a026104 (2016).

- 250 Kandoth, C. *et al.* Mutational landscape and significance across 12 major cancer types. *Nature* **502**, 333-339, doi:10.1038/nature12634 (2013).
- 251 Dias, S. S., Hogan, C., Ochocka, A. M. & Meek, D. W. Polo-like kinase-1 phosphorylates MDM2 at Ser260 and stimulates MDM2-mediated p53 turnover. *FEBS Lett* **583**, 3543-3548, doi:10.1016/j.febslet.2009.09.057 (2009).
- 252 Liu, X. S., Li, H., Song, B. & Liu, X. Polo-like kinase 1 phosphorylation of G2 and S-phase-expressed 1 protein is essential for p53 inactivation during G2 checkpoint recovery. *EMBO Rep* **11**, 626-632, doi:10.1038/embor.2010.90 (2010).
- 253 Ando, K. *et al.* Polo-like kinase 1 (Plk1) inhibits p53 function by physical interaction and phosphorylation. *J Biol Chem* **279**, 25549-25561, doi:10.1074/jbc.M314182200 (2004).
- 254 Karlin, K. L. *et al.* The oncogenic STP axis promotes triple-negative breast cancer via degradation of the REST tumor suppressor. *Cell Rep* **9**, 1318-1332, doi:10.1016/j.celrep.2014.10.011 (2014).
- 255 Zhang, H. *et al.* PLK1 and HOTAIR Accelerate Proteasomal Degradation of SUZ12 and ZNF198 during Hepatitis B Virus-Induced Liver Carcinogenesis. *Cancer Res* **75**, 2363-2374, doi:10.1158/0008-5472.CAN-14-2928 (2015).
- 256 Studach, L. *et al.* Polo-like Kinase 1 Activated by the Hepatitis B Virus X Protein Attenuates Both the DNA Damage Checkpoint and DNA Repair Resulting in Partial Polyploidy. *Journal of Biological Chemistry* **285**, 30282-30293, doi:10.1074/jbc.M109.093963 (2010).
- 257 Gheghiani, L., Shang, S. & Fu, Z. Targeting the PLK1-FOXO1 pathway as a novel therapeutic approach for treating advanced prostate cancer. *Sci Rep* **10**, 12327, doi:10.1038/s41598-020-69338-8 (2020).
- 258 Chang, C. J. *et al.* PTEN nuclear localization is regulated by oxidative stress and mediates p53-dependent tumor suppression. *Mol Cell Biol* **28**, 3281-3289, doi:10.1128/mcb.00310-08 (2008).
- 259 Zhang, Z. *et al.* PTEN regulates PLK1 and controls chromosomal stability during cell division. *Cell Cycle* **15**, 2476-2485, doi:10.1080/15384101.2016.1203493 (2016).
- 260 Puc, J. *et al.* Lack of PTEN sequesters CHK1 and initiates genetic instability. *Cancer Cell* **7**, 193-204, doi:10.1016/j.ccr.2005.01.009 (2005).
- 261 Puc, J. & Parsons, R. PTEN loss inhibits CHK1 to cause double stranded-DNA breaks in cells. *Cell Cycle* **4**, 927-929, doi:10.4161/cc.4.7.1795 (2005).
- 262 Li, Z. *et al.* Plk1 phosphorylation of PTEN causes a tumor-promoting metabolic state. *Mol Cell Biol* **34**, 3642-3661, doi:10.1128/MCB.00814-14 (2014).
- 263 Mao, Y. *et al.* Regulation of cell apoptosis and proliferation in pancreatic cancer through PI3K/Akt pathway via Polo-like kinase 1. *Oncol Rep* **36**, 49-56, doi:10.3892/or.2016.4820 (2016).
- 264 Shin, S. B., Jang, H. R., Xu, R., Won, J. Y. & Yim, H. Correction: Active PLK1-driven metastasis is amplified by TGF-beta signaling that forms a positive feedback loop in non-small cell lung cancer. *Oncogene* **39**, 951, doi:10.1038/s41388-019-1049-2 (2020).
- 265 Cai, X. P. *et al.* PLK1 promotes epithelial-mesenchymal transition and metastasis of gastric carcinoma cells. **12** (2016).
- 266 Wu, J., Ivanov, A. I., Fisher, P. B. & Fu, Z. Polo-like kinase 1 induces epithelial-to-mesenchymal transition and promotes epithelial cell motility by activating CRAF/ERK signaling. *Elife* **5**, doi:10.7554/eLife.10734 (2016).
- 267 Jin, B., Jin, D., Zhuo, Z., Zhang, B. & Chen, K. MiR-1224-5p Activates Autophagy, Cell Invasion and Inhibits Epithelial-to-Mesenchymal Transition in Osteosarcoma Cells by Directly Targeting PLK1 Through PI3K/AKT/mTOR Signaling Pathway. *Onco Targets Ther* **13**, 11807-11818, doi:10.2147/ott.S274451 (2020).
- 268 Shin, S. B., Jang, H. R., Xu, R., Won, J. Y. & Yim, H. Active PLK1-driven metastasis is amplified by TGF-beta signaling that forms a positive feedback loop in non-small cell lung cancer. *Oncogene* **39**, 951, doi:10.1038/s41388-019-1049-2 (2020).
- 269 Ren, Y. *et al.* PLK1 stabilizes a MYC-dependent kinase network in aggressive B cell lymphomas. *J Clin Invest* **128**, 5517-5530, doi:10.1172/jci.122533 (2018).
- 270 Xiao, D. *et al.* Polo-like Kinase-1 Regulates Myc Stabilization and Activates a Feedforward Circuit Promoting Tumor Cell Survival. *Mol Cell* **64**, 493-506, doi:10.1016/j.molcel.2016.09.016 (2016).
- 271 Takahashi, T. *et al.* Polo-like kinase 1 (PLK1) is overexpressed in primary colorectal cancers. *Cancer Sci* **94**, 148-152, doi:10.1111/j.1349-7006.2003.tb01411.x (2003).
- 272 Li, H. *et al.* The clinical and prognostic value of polo-like kinase 1 in lung squamous cell carcinoma patients: immunohistochemical analysis. *Biosci Rep* **37**, doi:10.1042/bsr20170852 (2017).

- 273 Weichert, W. *et al.* Polo-like kinase 1 is overexpressed in prostate cancer and linked to higher tumor grades. *Prostate* **60**, 240-245, doi:10.1002/pros.20050 (2004).
- 274 Otsu, H. *et al.* Gastric Cancer Patients with High PLK1 Expression and DNA Aneuploidy Correlate with Poor Prognosis. *Oncology* **91**, 31-40, doi:10.1159/000445952 (2016).
- 275 Affatato, R. *et al.* Identification of PLK1 as a New Therapeutic Target in Mucinous Ovarian Carcinoma. *Cancers (Basel)* **12**, doi:10.3390/cancers12030672 (2020).
- 276 Kneisel, L. *et al.* Expression of polo-like kinase (PLK1) in thin melanomas: a novel marker of metastatic disease. *J Cutan Pathol* **29**, 354-358, doi:10.1034/j.1600-0560.2002.290605.x (2002).
- 277 de Cárcer, G. *et al.* Plk1 overexpression induces chromosomal instability and suppresses tumor development. *Nat Commun* **9**, 3012, doi:10.1038/s41467-018-05429-5 (2018).
- 278 Raab, M. *et al.* PLK1 has tumor-suppressive potential in APC-truncated colon cancer cells. *Nat Commun* **9**, 1106, doi:10.1038/s41467-018-03494-4 (2018).
- 279 de Cárcer, G. The Mitotic Cancer Target Polo-Like Kinase 1: Oncogene or Tumor Suppressor? *Genes (Basel)* **10**, doi:10.3390/genes10030208 (2019).
- 280 de Boer, D. V. *et al.* Targeting PLK1 as a novel chemopreventive approach to eradicate preneoplastic mucosal changes in the head and neck. *Oncotarget* **8**, 97928-97940, doi:10.18632/oncotarget.17880 (2017).
- 281 Pansini, P. F. *et al.* Differential Expression of Potential Biomarkers of Oral Squamous Cell Carcinoma Development. *Head Neck Pathol*, doi:10.1007/s12105-021-01322-8 (2021).
- 282 Knecht, R. *et al.* Prognostic significance of polo-like kinase (PLK) expression in squamous cell carcinomas of the head and neck. *Cancer Res* **59**, 2794-2797 (1999).
- 283 Monte, M. *et al.* hGTSE-1 expression stimulates cytoplasmic localization of p53. *J Biol Chem* **279**, 11744-11752, doi:10.1074/jbc.M311123200 (2004).
- 284 Shao, C. *et al.* Inhibition of polo-like kinase 1 (Plk1) enhances the antineoplastic activity of metformin in prostate cancer. *J Biol Chem* **290**, 2024-2033, doi:10.1074/jbc.M114.596817 (2015).
- 285 Song, B. *et al.* Plk1 phosphorylation of orc2 and hbo1 contributes to gemcitabine resistance in pancreatic cancer. *Mol Cancer Ther* **12**, 58-68, doi:10.1158/1535-7163.MCT-12-0632 (2013).
- 286 Lian, G. *et al.* BI2536, a potent and selective inhibitor of polo-like kinase 1, in combination with cisplatin exerts synergistic effects on gastric cancer cells. *Int J Oncol* **52**, 804-814, doi:10.3892/ijo.2018.4255 (2018).
- 287 Chen, Z. *et al.* Effect of PLK1 inhibition on cisplatin-resistant gastric cancer cells. *J Cell Physiol* **234**, 5904-5914, doi:10.1002/jcp.26777 (2019).
- 288 Zhang, Y. *et al.* The expression of PLK-1 in cervical carcinoma: a possible target for enhancing chemosensitivity. *J Exp Clin Cancer Res* **28**, 130, doi:10.1186/1756-9966-28-130 (2009).
- 289 Belur Nagaraj, A. *et al.* Mitotic Exit Dysfunction through the Deregulation of APC/C Characterizes Cisplatin-Resistant State in Epithelial Ovarian Cancer. *Clin Cancer Res* **24**, 4588-4601, doi:10.1158/1078-0432.Ccr-17-2885 (2018).
- 290 Lund-Andersen, C., Patzke, S., Nähse-Kumpf, V. & Syljuåsen, R. G. PLK1-inhibition can cause radiosensitization or radioresistance dependent on the treatment schedule. *Radiotherapy and Oncology* **110**, 355-361, doi:10.1016/j.radonc.2013.12.014 (2014).
- 291 Gerster, K. *et al.* Targeting polo-like kinase 1 enhances radiation efficacy for head-and-neck squamous cell carcinoma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **77**, 253-260, doi:10.1016/j.ijrobp.2009.11.027 (2010).
- 292 Harris, P. S. *et al.* Polo-like kinase 1 (PLK1) inhibition suppresses cell growth and enhances radiation sensitivity in medulloblastoma cells. *BMC Cancer* **12**, 80, doi:10.1186/1471-2407-12-80 (2012).
- 293 Wang, B. *et al.* PLK1 Inhibition Sensitizes Breast Cancer Cells to Radiation via Suppressing Autophagy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **110**, 1234-1247, doi:10.1016/j.ijrobp.2021.02.025 (2021).
- 294 Sun, Q. *et al.* MiR-200c inhibits autophagy and enhances radiosensitivity in breast cancer cells by targeting UBQLN1. *Int J Cancer* **136**, 1003-1012, doi:10.1002/ijc.29065 (2015).
- 295 Steegmaier, M. *et al.* BI 2536, a potent and selective inhibitor of polo-like kinase 1, inhibits tumor growth in vivo. *Curr Biol* **17**, 316-322, doi:10.1016/j.cub.2006.12.037 (2007).
- 296 Müller-Tidow, C. *et al.* A randomized, open-label, phase I/II trial to investigate the maximum tolerated dose of the Polo-like kinase inhibitor BI 2536 in elderly patients with refractory/relapsed acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol* **163**, 214-222, doi:10.1111/bjh.12518 (2013).

- 297 Schöffski, P. *et al.* Multicentric parallel phase II trial of the polo-like kinase 1 inhibitor BI 2536 in patients with advanced head and neck cancer, breast cancer, ovarian cancer, soft tissue sarcoma and melanoma. The first protocol of the European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC) Network Of Core Institutes (NOCI). *Eur J Cancer* **46**, 2206-2215, doi:10.1016/j.ejca.2010.03.039 (2010).
- 298 Sebastian, M. *et al.* The efficacy and safety of BI 2536, a novel Plk-1 inhibitor, in patients with stage IIIB/IV non-small cell lung cancer who had relapsed after, or failed, chemotherapy: results from an open-label, randomized phase II clinical trial. *J Thorac Oncol* **5**, 1060-1067, doi:10.1097/JTO.0b013e3181d95dd4 (2010).
- 299 Wang, H. *et al.* Dual PLK1 and STAT3 inhibition promotes glioblastoma cells apoptosis through MYC. *Biochem Biophys Res Commun* **533**, 368-375, doi:10.1016/j.bbrc.2020.09.008 (2020).
- 300 Czaplinski, S., Hugle, M., Stiehl, V. & Fulda, S. Polo-like kinase 1 inhibition sensitizes neuroblastoma cells for vinca alkaloid-induced apoptosis. *Oncotarget* **7**, 8700-8711, doi:10.18632/oncotarget.3901 (2016).
- 301 Döhner, H. *et al.* Randomized, phase 2 trial of low-dose cytarabine with or without volasertib in AML patients not suitable for induction therapy. *Blood* **124**, 1426-1433, doi:10.1182/blood-2014-03-560557 (2014).
- 302 Cortes, J. *et al.* Phase 1 dose escalation trial of volasertib in combination with decitabine in patients with acute myeloid leukemia. *Int J Hematol* **113**, 92-99, doi:10.1007/s12185-020-02994-8 (2021).
- 303 Stadler, W. M. *et al.* An open-label, single-arm, phase 2 trial of the Polo-like kinase inhibitor volasertib (BI 6727) in patients with locally advanced or metastatic urothelial cancer. *Cancer* **120**, 976-982, doi:10.1002/cncr.28519 (2014).
- 304 Ellis, P. M. *et al.* A Randomized, Open-Label Phase II Trial of Volasertib as Monotherapy and in Combination With Standard-Dose Pemetrexed Compared With Pemetrexed Monotherapy in Second-Line Treatment for Non-Small-Cell Lung Cancer. *Clin Lung Cancer* **16**, 457-465, doi:10.1016/j.clc.2015.05.010 (2015).
- 305 Pujade-Lauraine, E. *et al.* Volasertib Versus Chemotherapy in Platinum-Resistant or -Refractory Ovarian Cancer: A Randomized Phase II Groupe des Investigateurs Nationaux pour l'Etude des Cancers de l'Ovaire Study. *J Clin Oncol* **34**, 706-713, doi:10.1200/jco.2015.62.1474 (2016).
- 306 Wang, Y. *et al.* Polo-like kinase 1 inhibition diminishes acquired resistance to epidermal growth factor receptor inhibition in non-small cell lung cancer with T790M mutations. *Oncotarget* **7**, 47998-48010, doi:10.18632/oncotarget.10332 (2016).
- 307 Zhang, M. *et al.* Mutations of the LIM protein AJUBA mediate sensitivity of head and neck squamous cell carcinoma to treatment with cell-cycle inhibitors. *Cancer Lett* **392**, 71-82, doi:10.1016/j.canlet.2017.01.024 (2017).
- 308 Zeidan, A. M. *et al.* A Phase Ib Study of Onvansertib, a Novel Oral PLK1 Inhibitor, in Combination Therapy for Patients with Relapsed or Refractory Acute Myeloid Leukemia. *Clin Cancer Res* **26**, 6132-6140, doi:10.1158/1078-0432.Ccr-20-2586 (2020).
- 309 Weiss, G. J. *et al.* Phase I dose escalation study of NMS-1286937, an orally available Polo-Like Kinase 1 inhibitor, in patients with advanced or metastatic solid tumors. *Invest New Drugs* **36**, 85-95, doi:10.1007/s10637-017-0491-7 (2018).
- 310 Sero, V. *et al.* Targeting polo-like kinase 1 by NMS-P937 in osteosarcoma cell lines inhibits tumor cell growth and partially overcomes drug resistance. *Investigational New Drugs* **32**, 1167-1180, doi:10.1007/s10637-014-0158-6 (2014).
- 311 Hartsink-Segers, S. A. *et al.* Inhibiting Polo-like kinase 1 causes growth reduction and apoptosis in pediatric acute lymphoblastic leukemia cells. *Haematologica* **98**, 1539-1546, doi:10.3324/haematol.2013.084434 (2013).
- 312 Wang, D. *et al.* A novel PLK1 inhibitor onvansertib effectively sensitizes MYC-driven medulloblastoma to radiotherapy. *Neuro Oncol*, doi:10.1093/neuonc/noab207 (2021).
- 313 Giordano, A. *et al.* Polo-like kinase 1 (Plk1) inhibition synergizes with taxanes in triple negative breast cancer. *PLoS One* **14**, e0224420, doi:10.1371/journal.pone.0224420 (2019).
- 314 Valsasina, B. *et al.* NMS-P937, an Orally Available, Specific Small-Molecule Polo-like Kinase 1 Inhibitor with Antitumor Activity in Solid and Hematologic Malignancies. *Molecular Cancer Therapeutics* **11**, 1006-1016, doi:10.1158/1535-7163.MCT-11-0765 (2012).
- 315 Nair, J. S. & Schwartz, G. K. Inhibition of polo like kinase 1 in sarcomas induces apoptosis that is dependent on Mcl-1 suppression. *Cell Cycle* **14**, 3101-3111, doi:10.1080/15384101.2015.1078033 (2015).

- 316 Hikichi, Y. *et al.* TAK-960, a novel, orally available, selective inhibitor of polo-like kinase 1, shows broad-spectrum preclinical antitumor activity in multiple dosing regimens. *Mol Cancer Ther* **11**, 700-709, doi:10.1158/1535-7163.Mct-11-0762 (2012).
- 317 Gilmartin, A. G. *et al.* Distinct concentration-dependent effects of the polo-like kinase 1-specific inhibitor GSK461364A, including differential effect on apoptosis. *Cancer Res* **69**, 6969-6977, doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-0945 (2009).
- 318 Pajtler, K. W. *et al.* The GSK461364 PLK1 inhibitor exhibits strong antitumoral activity in preclinical neuroblastoma models. *Oncotarget* **8**, 6730-6741, doi:10.18632/oncotarget.14268 (2017).
- 319 Chou, Y. S. *et al.* Cytotoxic mechanism of PLK1 inhibitor GSK461364 against osteosarcoma: Mitotic arrest, apoptosis, cellular senescence, and synergistic effect with paclitaxel. *Int J Oncol* **48**, 1187-1194, doi:10.3892/ijo.2016.3352 (2016).
- 320 Olmos, D. *et al.* Phase I study of GSK461364, a specific and competitive Polo-like kinase 1 inhibitor, in patients with advanced solid malignancies. *Clin Cancer Res* **17**, 3420-3430, doi:10.1158/1078-0432.Ccr-10-2946 (2011).
- 321 Reindl, W., Yuan, J., Krämer, A., Strebhardt, K. & Berg, T. Inhibition of polo-like kinase 1 by blocking polo-box domain-dependent protein-protein interactions. *Chem Biol* **15**, 459-466, doi:10.1016/j.chembiol.2008.03.013 (2008).
- 322 Scharow, A. *et al.* Optimized Plk1 PBD Inhibitors Based on Poloxin Induce Mitotic Arrest and Apoptosis in Tumor Cells. *ACS Chem Biol* **10**, 2570-2579, doi:10.1021/acscchembio.5b00565 (2015).
- 323 Yuan, J. *et al.* Polo-box domain inhibitor poloxin activates the spindle assembly checkpoint and inhibits tumor growth in vivo. *Am J Pathol* **179**, 2091-2099, doi:10.1016/j.ajpath.2011.06.031 (2011).
- 324 Gumireddy, K. *et al.* ON01910, a non-ATP-competitive small molecule inhibitor of Plk1, is a potent anticancer agent. *Cancer Cell* **7**, 275-286, doi:10.1016/j.ccr.2005.02.009 (2005).
- 325 Prasad, A., Khudaynazar, N., Tantravahi, R. V., Gillum, A. M. & Hoffman, B. S. ON 01910.Na (rigosertib) inhibits PI3K/Akt pathway and activates oxidative stress signals in head and neck cancer cell lines. *Oncotarget* **7**, doi:10.18632/oncotarget.12692 (2016).
- 326 Athuluri-Divakar, S. K. *et al.* A Small Molecule RAS-Mimetic Disrupts RAS Association with Effector Proteins to Block Signaling. *Cell* **165**, 643-655, doi:10.1016/j.cell.2016.03.045 (2016).
- 327 Jost, M. *et al.* Pharmaceutical-Grade Rigosertib Is a Microtubule-Destabilizing Agent. *Mol Cell* **79**, 191-198.e193, doi:10.1016/j.molcel.2020.06.008 (2020).
- 328 Garcia-Manero, G. *et al.* Rigosertib versus best supportive care for patients with high-risk myelodysplastic syndromes after failure of hypomethylating drugs (ONTIME): a randomised, controlled, phase 3 trial. *The Lancet Oncology* **17**, 496-508, doi:[https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(16\)00009-7](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(16)00009-7) (2016).
- 329 O'Neil, B. H. *et al.* A phase II/III randomized study to compare the efficacy and safety of rigosertib plus gemcitabine versus gemcitabine alone in patients with previously untreated metastatic pancreatic cancer. *Annals of Oncology* **26**, 1923-1929, doi:10.1093/annonc/mdv264 (2015).
- 330 Bowles, D. W. *et al.* Phase I study of oral rigosertib (ON 01910.Na), a dual inhibitor of the PI3K and Plk1 pathways, in adult patients with advanced solid malignancies. *Clin Cancer Res* **20**, 1656-1665, doi:10.1158/1078-0432.Ccr-13-2506 (2014).
- 331 Anderson, R. T. *et al.* The dual pathway inhibitor rigosertib is effective in direct patient tumor xenografts of head and neck squamous cell carcinomas. *Mol Cancer Ther* **12**, 1994-2005, doi:10.1158/1535-7163.Mct-13-0206 (2013).
- 332 Schenk, P. W. & Snaar-Jagalska, B. E. Signal perception and transduction: the role of protein kinases. *Biochim Biophys Acta* **1449**, 1-24, doi:10.1016/s0167-4889(98)00178-5 (1999).
- 333 Liu, E., Hjelle, B. & Bishop, J. M. Transforming genes in chronic myelogenous leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**, 1952-1956, doi:10.1073/pnas.85.6.1952 (1988).
- 334 Stitt, T. N. *et al.* The anticoagulation factor protein S and its relative, Gas6, are ligands for the Tyro 3/Axl family of receptor tyrosine kinases. *Cell* **80**, 661-670, doi:10.1016/0092-8674(95)90520-0 (1995).
- 335 Sadahiro, H. *et al.* Activation of the Receptor Tyrosine Kinase AXL Regulates the Immune Microenvironment in Glioblastoma. *Cancer Res* **78**, 3002-3013, doi:10.1158/0008-5472.CAN-17-2433 (2018).
- 336 Abboud-Jarrous, G. *et al.* Protein S drives oral squamous cell carcinoma tumorigenicity through regulation of AXL. *Oncotarget* **8**, 13986-14002, doi:10.18632/oncotarget.14753 (2017).

- 337 Zhu, C., Wei, Y. & Wei, X. AXL receptor tyrosine kinase as a promising anti-cancer approach: functions, molecular mechanisms and clinical applications. *Mol Cancer* **18**, 153, doi:10.1186/s12943-019-1090-3 (2019).
- 338 Carrera Silva, E. A. *et al.* T cell-derived protein S engages TAM receptor signaling in dendritic cells to control the magnitude of the immune response. *Immunity* **39**, 160-170, doi:10.1016/j.immuni.2013.06.010 (2013).
- 339 Rothlin, C. V., Ghosh, S., Zuniga, E. I., Oldstone, M. B. & Lemke, G. TAM receptors are pleiotropic inhibitors of the innate immune response. *Cell* **131**, 1124-1136, doi:10.1016/j.cell.2007.10.034 (2007).
- 340 Camenisch, T. D., Koller, B. H., Earp, H. S. & Matsushima, G. K. A novel receptor tyrosine kinase, Mer, inhibits TNF-alpha production and lipopolysaccharide-induced endotoxic shock. *J Immunol* **162**, 3498-3503 (1999).
- 341 Lu, Q. & Lemke, G. Homeostatic regulation of the immune system by receptor tyrosine kinases of the Tyro 3 family. *Science* **293**, 306-311, doi:10.1126/science.1061663 (2001).
- 342 Gilchrist, S. E., Goudarzi, S. & Hafizi, S. Gas6 Inhibits Toll-Like Receptor-Mediated Inflammatory Pathways in Mouse Microglia via Axl and Mer. *Frontiers in Cellular Neuroscience* **14**, doi:10.3389/fncel.2020.576650 (2020).
- 343 Scutera, S. *et al.* Survival and migration of human dendritic cells are regulated by an IFN-alpha-inducible Axl/Gas6 pathway. *J Immunol* **183**, 3004-3013, doi:10.4049/jimmunol.0804384 (2009).
- 344 Ogata, H. *et al.* Loss of SOCS3 in the liver promotes fibrosis by enhancing STAT3-mediated TGF-beta1 production. *Oncogene* **25**, 2520-2530, doi:10.1038/sj.onc.1209281 (2006).
- 345 Wium, M., Paccetz, J. & Zerbini, L. The Dual Role of TAM Receptors in Autoimmune Diseases and Cancer: An Overview. *Cells* **7**, doi:10.3390/cells7100166 (2018).
- 346 Hanada, T. *et al.* Induction of hyper Th1 cell-type immune responses by dendritic cells lacking the suppressor of cytokine signaling-1 gene. *J Immunol* **174**, 4325-4332, doi:10.4049/jimmunol.174.7.4325 (2005).
- 347 Zhu, H. *et al.* The expression and clinical significance of different forms of Mer receptor tyrosine kinase in systemic lupus erythematosus. *J Immunol Res* **2014**, 431896, doi:10.1155/2014/431896 (2014).
- 348 Xu, L. *et al.* Soluble TAM receptor tyrosine kinases in rheumatoid arthritis: correlation with disease activity and bone destruction. *Clin Exp Immunol* **192**, 95-103, doi:10.1111/cei.13082 (2018).
- 349 Seitz, H. M., Camenisch, T. D., Lemke, G., Earp, H. S. & Matsushima, G. K. Macrophages and dendritic cells use different Axl/Mertk/Tyro3 receptors in clearance of apoptotic cells. *J Immunol* **178**, 5635-5642, doi:10.4049/jimmunol.178.9.5635 (2007).
- 350 Scott, R. S. *et al.* Phagocytosis and clearance of apoptotic cells is mediated by MER. *Nature* **411**, 207-211, doi:10.1038/35075603 (2001).
- 351 Lemke, G. Phosphatidylserine Is the Signal for TAM Receptors and Their Ligands. *Trends in Biochemical Sciences* **42**, 738-748, doi:<https://doi.org/10.1016/j.tibs.2017.06.004> (2017).
- 352 Lew, E. D. *et al.* Differential TAM receptor-ligand-phospholipid interactions delimit differential TAM bioactivities. *Elife* **3**, doi:10.7554/eLife.03385 (2014).
- 353 Chen, Y. *et al.* Functions of TAM RTKs in regulating spermatogenesis and male fertility in mice. *Reproduction* **138**, 655-666, doi:10.1530/rep-09-0101 (2009).
- 354 Prasad, D. *et al.* TAM receptor function in the retinal pigment epithelium. *Mol Cell Neurosci* **33**, 96-108, doi:10.1016/j.mcn.2006.06.011 (2006).
- 355 Brosius Lutz, A. *et al.* Schwann cells use TAM receptor-mediated phagocytosis in addition to autophagy to clear myelin in a mouse model of nerve injury. *Proc Natl Acad Sci U S A* **114**, E8072-e8080, doi:10.1073/pnas.1710566114 (2017).
- 356 Chung, W. S. *et al.* Astrocytes mediate synapse elimination through MEGF10 and MERTK pathways. *Nature* **504**, 394-400, doi:10.1038/nature12776 (2013).
- 357 Angelillo-Scherrer, A. *et al.* Role of Gas6 receptors in platelet signaling during thrombus stabilization and implications for antithrombotic therapy. *J Clin Invest* **115**, 237-246, doi:10.1172/JCI22079 (2005).
- 358 Cosemans, J. M. *et al.* Potentiating role of Gas6 and Tyro3, Axl and Mer (TAM) receptors in human and murine platelet activation and thrombus stabilization. *J Thromb Haemost* **8**, 1797-1808, doi:10.1111/j.1538-7836.2010.03935.x (2010).
- 359 Burstyn-Cohen, T., Heeb, M. J. & Lemke, G. Lack of protein S in mice causes embryonic lethal coagulopathy and vascular dysgenesis. *J Clin Invest* **119**, 2942-2953, doi:10.1172/JCI39325 (2009).

- 360 Ruan, G. X. & Kazlauskas, A. Axl is essential for VEGF-A-dependent activation of PI3K/Akt. *Embo j* **31**, 1692-1703, doi:10.1038/emboj.2012.21 (2012).
- 361 Ruan, G. X. & Kazlauskas, A. Lactate engages receptor tyrosine kinases Axl, Tie2, and vascular endothelial growth factor receptor 2 to activate phosphoinositide 3-kinase/Akt and promote angiogenesis. *J Biol Chem* **288**, 21161-21172, doi:10.1074/jbc.M113.474619 (2013).
- 362 Park, M. *et al.* Mechanism of met oncogene activation. *Cell* **45**, 895-904, doi:10.1016/0092-8674(86)90564-7 (1986).
- 363 Komada, M. *et al.* Proteolytic processing of the hepatocyte growth factor/scatter factor receptor by furin. *FEBS Lett* **328**, 25-29, doi:10.1016/0014-5793(93)80958-w (1993).
- 364 Gherardi, E. *et al.* Functional map and domain structure of MET, the product of the c-met protooncogene and receptor for hepatocyte growth factor/scatter factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 12039-12044, doi:10.1073/pnas.2034936100 (2003).
- 365 Weidner, K. M. *et al.* Evidence for the identity of human scatter factor and human hepatocyte growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 7001-7005, doi:10.1073/pnas.88.16.7001 (1991).
- 366 Naldini, L. *et al.* Extracellular proteolytic cleavage by urokinase is required for activation of hepatocyte growth factor/scatter factor. *Embo j* **11**, 4825-4833 (1992).
- 367 Longati, P., Bardelli, A., Ponzetto, C., Naldini, L. & Comoglio, P. M. Tyrosines1234-1235 are critical for activation of the tyrosine kinase encoded by the MET proto-oncogene (HGF receptor). *Oncogene* **9**, 49-57 (1994).
- 368 Ponzetto, C. *et al.* A novel recognition motif for phosphatidylinositol 3-kinase binding mediates its association with the hepatocyte growth factor/scatter factor receptor. *Mol Cell Biol* **13**, 4600-4608, doi:10.1128/mcb.13.8.4600-4608.1993 (1993).
- 369 Gandino, L., Longati, P., Medico, E., Prat, M. & Comoglio, P. M. Phosphorylation of serine 985 negatively regulates the hepatocyte growth factor receptor kinase. *J Biol Chem* **269**, 1815-1820 (1994).
- 370 Hammond, D. E., Urbe, S., Vande Woude, G. F. & Clague, M. J. Down-regulation of MET, the receptor for hepatocyte growth factor. *Oncogene* **20**, 2761-2770, doi:10.1038/sj.onc.1204475 (2001).
- 371 Schaeper, U. *et al.* Coupling of Gab1 to c-Met, Grb2, and Shp2 mediates biological responses. *J Cell Biol* **149**, 1419-1432, doi:10.1083/jcb.149.7.1419 (2000).
- 372 Boccaccio, C. *et al.* Induction of epithelial tubules by growth factor HGF depends on the STAT pathway. *Nature* **391**, 285-288, doi:10.1038/34657 (1998).
- 373 Potempa, S. & Ridley, A. J. Activation of both MAP kinase and phosphatidylinositide 3-kinase by Ras is required for hepatocyte growth factor/scatter factor-induced adherens junction disassembly. *Mol Biol Cell* **9**, 2185-2200, doi:10.1091/mbc.9.8.2185 (1998).
- 374 Liu, Z. X., Yu, C. F., Nickel, C., Thomas, S. & Cantley, L. G. Hepatocyte growth factor induces ERK-dependent paxillin phosphorylation and regulates paxillin-focal adhesion kinase association. *J Biol Chem* **277**, 10452-10458, doi:10.1074/jbc.M107551200 (2002).
- 375 Lu, S. *et al.* Tivantinib (ARQ 197) affects the apoptotic and proliferative machinery downstream of c-MET: role of Mcl-1, Bcl-xl and Cyclin B1. *Oncotarget* **6**, 22167-22178, doi:10.18632/oncotarget.4240 (2015).
- 376 Moumen, A., Patane, S., Porras, A., Dono, R. & Maina, F. Met acts on Mdm2 via mTOR to signal cell survival during development. *Development* **134**, 1443-1451, doi:10.1242/dev.02820 (2007).
- 377 Schmidt, C. *et al.* Scatter factor/hepatocyte growth factor is essential for liver development. *Nature* **373**, 699-702, doi:10.1038/373699a0 (1995).
- 378 Uehara, Y. *et al.* Placental defect and embryonic lethality in mice lacking hepatocyte growth factor/scatter factor. *Nature* **373**, 702-705, doi:10.1038/373702a0 (1995).
- 379 Bladt, F., Riethmacher, D., Isenmann, S., Aguzzi, A. & Birchmeier, C. Essential role for the c-met receptor in the migration of myogenic precursor cells into the limb bud. *Nature* **376**, 768-771, doi:10.1038/376768a0 (1995).
- 380 Ishibe, S. *et al.* Met and the epidermal growth factor receptor act cooperatively to regulate final nephron number and maintain collecting duct morphology. *Development* **136**, 337-345, doi:10.1242/dev.024463 (2009).
- 381 Yamamoto, H. *et al.* Epithelial-vascular cross talk mediated by VEGF-A and HGF signaling directs primary septae formation during distal lung morphogenesis. *Dev Biol* **308**, 44-53, doi:10.1016/j.ydbio.2007.04.042 (2007).
- 382 Peng, Y., Huentelman, M., Smith, C. & Qiu, S. MET receptor tyrosine kinase as an autism genetic risk factor. *Int Rev Neurobiol* **113**, 135-165, doi:10.1016/b978-0-12-418700-9.00005-8 (2013).

- 383 Martins, G. J., Shahrokh, M. & Powell, E. M. Genetic disruption of Met signaling impairs GABAergic striatal development and cognition. *Neuroscience* **176**, 199-209, doi:10.1016/j.neuroscience.2010.12.058 (2011).
- 384 Chmielowiec, J. *et al.* c-Met is essential for wound healing in the skin. *J Cell Biol* **177**, 151-162, doi:10.1083/jcb.200701086 (2007).
- 385 Mizuno, S., Matsumoto, K. & Nakamura, T. HGF as a renoprotective and anti-fibrotic regulator in chronic renal disease. *Front Biosci* **13**, 7072-7086, doi:10.2741/3211 (2008).
- 386 Cao, Z. *et al.* Targeting the vascular and perivascular niches as a regenerative therapy for lung and liver fibrosis. *Sci Transl Med* **9**, doi:10.1126/scitranslmed.aai8710 (2017).
- 387 Huh, C.-G. *et al.* Hepatocyte growth factor/c-met signaling pathway is required for efficient liver regeneration and repair. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **101**, 4477-4482 (2004).
- 388 Kitamura, K. *et al.* Human hepatocyte growth factor promotes functional recovery in primates after spinal cord injury. *PLoS One* **6**, e27706, doi:10.1371/journal.pone.0027706 (2011).
- 389 Robinson, D. R., Wu, Y. M. & Lin, S. F. The protein tyrosine kinase family of the human genome. *Oncogene* **19**, 5548-5557, doi:10.1038/sj.onc.1203957 (2000).
- 390 Hafizi, S. & Dahlbäck, B. Signalling and functional diversity within the Axl subfamily of receptor tyrosine kinases. *Cytokine Growth Factor Rev* **17**, 295-304, doi:10.1016/j.cytogfr.2006.04.004 (2006).
- 391 Hua, W. *et al.* METTL3 promotes ovarian carcinoma growth and invasion through the regulation of AXL translation and epithelial to mesenchymal transition. *Gynecol Oncol* **151**, 356-365, doi:10.1016/j.ygyno.2018.09.015 (2018).
- 392 Li, M. *et al.* Yes-associated protein 1 (YAP1) promotes human gallbladder tumor growth via activation of the AXL/MAPK pathway. *Cancer Letters* **355**, 201-209 (2014).
- 393 Mudduluru, G., Vajkoczy, P. & Allgayer, H. Myeloid zinc finger 1 induces migration, invasion, and in vivo metastasis through Axl gene expression in solid cancer. *Molecular Cancer Research* **8**, 159-169 (2010).
- 394 Bdarny, M. *et al.* The AP-1 complex regulates AXL expression and determines sensitivity to PI3K α inhibition in esophagus and head and neck squamous cell carcinoma. *bioRxiv*, 415752 (2018).
- 395 Mudduluru, G. & Allgayer, H. The human receptor tyrosine kinase Axl gene—promoter characterization and regulation of constitutive expression by Sp1, Sp3 and CpG methylation. *Bioscience reports* **28**, 161-176 (2008).
- 396 Brand, T. M. *et al.* AXL mediates resistance to cetuximab therapy. *Cancer research* **74**, 5152-5164 (2014).
- 397 Vaughan, C. A. *et al.* Gain-of-function activity of mutant p53 in lung cancer through up-regulation of receptor protein tyrosine kinase Axl. *Genes & cancer* **3**, 491-502 (2012).
- 398 Paccez, J. D., Vogelsang, M., Parker, M. I. & Zerbini, L. F. The receptor tyrosine kinase Axl in cancer: biological functions and therapeutic implications. *Int J Cancer* **134**, 1024-1033, doi:10.1002/ijc.28246 (2014).
- 399 Bellosita, P., Costa, M., Lin, D. A. & Basilico, C. The receptor tyrosine kinase ARK mediates cell aggregation by homophilic binding. *Mol Cell Biol* **15**, 614-625, doi:10.1128/MCB.15.2.614 (1995).
- 400 Vouri, M. *et al.* Axl-EGFR receptor tyrosine kinase hetero-interaction provides EGFR with access to pro-invasive signalling in cancer cells. *Oncogenesis* **5**, e266, doi:10.1038/oncsis.2016.66 (2016).
- 401 Awad, M. M. *et al.* MET Exon 14 Mutations in Non-Small-Cell Lung Cancer Are Associated With Advanced Age and Stage-Dependent MET Genomic Amplification and c-Met Overexpression. *J Clin Oncol* **34**, 721-730, doi:10.1200/jco.2015.63.4600 (2016).
- 402 Ma, P. C. *et al.* Expression and mutational analysis of MET in human solid cancers. *Genes Chromosomes Cancer* **47**, 1025-1037, doi:10.1002/gcc.20604 (2008).
- 403 Tong, C. Y. *et al.* Detection of oncogene amplifications in medulloblastomas by comparative genomic hybridization and array-based comparative genomic hybridization. *J Neurosurg* **100**, 187-193, doi:10.3171/ped.2004.100.2.0187 (2004).
- 404 Soman, N. R., Correa, P., Ruiz, B. A. & Wogan, G. N. The TPR-MET oncogenic rearrangement is present and expressed in human gastric carcinoma and precursor lesions. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 4892-4896, doi:10.1073/pnas.88.11.4892 (1991).
- 405 Kong, L. R. *et al.* A common MET polymorphism harnesses HER2 signaling to drive aggressive squamous cell carcinoma. *Nat Commun* **11**, 1556, doi:10.1038/s41467-020-15318-5 (2020).

- 406 Zou, J. N. *et al.* Knockdown of SMYD3 by RNA interference down-regulates c-Met expression and inhibits cells migration and invasion induced by HGF. *Cancer Lett* **280**, 78-85, doi:10.1016/j.canlet.2009.02.015 (2009).
- 407 Yan, J., Zhao, X., Liu, B., Yuan, Y. & Guan, Y. An intramolecular G-quadruplex structure formed in the human MET promoter region and its biological relevance. *Mol Carcinog* **55**, 897-909, doi:10.1002/mc.22330 (2016).
- 408 Liu, Z. *et al.* BATF2 Deficiency Promotes Progression in Human Colorectal Cancer via Activation of HGF/MET Signaling: A Potential Rationale for Combining MET Inhibitors with IFNs. *Clin Cancer Res* **21**, 1752-1763, doi:10.1158/1078-0432.CCR-14-1564 (2015).
- 409 Xu, L. *et al.* Epidermal growth factor receptor regulates MET levels and invasiveness through hypoxia-inducible factor-1alpha in non-small cell lung cancer cells. *Oncogene* **29**, 2616-2627, doi:10.1038/onc.2010.16 (2010).
- 410 Furlan, A., Vercamer, C., Desbiens, X. & Pournier, A. Ets-1 triggers and orchestrates the malignant phenotype of mammary cancer cells within their matrix environment. *J Cell Physiol* **215**, 782-793, doi:10.1002/jcp.21360 (2008).
- 411 Kanteti, R. *et al.* Role of PAX8 in the regulation of MET and RON receptor tyrosine kinases in non-small cell lung cancer. *BMC Cancer* **14**, 185, doi:10.1186/1471-2407-14-185 (2014).
- 412 Hwang, C. I. *et al.* Wild-type p53 controls cell motility and invasion by dual regulation of MET expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**, 14240-14245, doi:10.1073/pnas.1017536108 (2011).
- 413 Yamamura, S. *et al.* MicroRNA-34a modulates c-Myc transcriptional complexes to suppress malignancy in human prostate cancer cells. *PLoS One* **7**, e29722, doi:10.1371/journal.pone.0029722 (2012).
- 414 Migliore, C. *et al.* MiR-1 downregulation cooperates with MACC1 in promoting MET overexpression in human colon cancer. *Clin Cancer Res* **18**, 737-747, doi:10.1158/1078-0432.CCR-11-1699 (2012).
- 415 Han, C. *et al.* MicroRNA-1 (miR-1) inhibits gastric cancer cell proliferation and migration by targeting MET. *Tumour Biol* **36**, 6715-6723, doi:10.1007/s13277-015-3358-6 (2015).
- 416 Sun, C. *et al.* Hsa-miR-139-5p inhibits proliferation and causes apoptosis associated with down-regulation of c-Met. *Oncotarget* **6**, 39756-39792, doi:10.18632/oncotarget.5476 (2015).
- 417 Karagonlar, Z. F., Korhan, P. & Atabey, N. Targeting c-Met in Cancer by MicroRNAs: Potential Therapeutic Applications in Hepatocellular Carcinoma. *Drug Dev Res* **76**, 357-367, doi:10.1002/ddr.21274 (2015).
- 418 Hui, A. Y. *et al.* Src and FAK mediate cell-matrix adhesion-dependent activation of Met during transformation of breast epithelial cells. *J Cell Biochem* **107**, 1168-1181, doi:10.1002/jcb.22219 (2009).
- 419 Shida, D. *et al.* Sphingosine 1-phosphate transactivates c-Met as well as epidermal growth factor receptor (EGFR) in human gastric cancer cells. *FEBS Lett* **577**, 333-338, doi:10.1016/j.febslet.2004.10.024 (2004).
- 420 Zhang, L. *et al.* Fisetin, a dietary phytochemical, overcomes Erlotinib-resistance of lung adenocarcinoma cells through inhibition of MAPK and AKT pathways. *Am J Transl Res* **8**, 4857-4868 (2016).
- 421 Paccetz, J. D. *et al.* The receptor tyrosine kinase Axl is an essential regulator of prostate cancer proliferation and tumor growth and represents a new therapeutic target. *Oncogene* **32**, 689-698, doi:10.1038/onc.2012.89 (2013).
- 422 Sainaghi, P. P. *et al.* Gas6 induces proliferation in prostate carcinoma cell lines expressing the Axl receptor. *J Cell Physiol* **204**, 36-44, doi:10.1002/jcp.20265 (2005).
- 423 Ben-Batalla, I. *et al.* Axl, a prognostic and therapeutic target in acute myeloid leukemia mediates paracrine crosstalk of leukemia cells with bone marrow stroma. *Blood* **122**, 2443-2452, doi:10.1182/blood-2013-03-491431 (2013).
- 424 Furge, K. A. *et al.* Suppression of Ras-mediated tumorigenicity and metastasis through inhibition of the Met receptor tyrosine kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 10722-10727, doi:10.1073/pnas.191067898 (2001).
- 425 Zhang, X. *et al.* c-Met inhibition reduces constitutive NF-kB transcriptional activity in esophageal adenocarcinoma. *Cancer Research* **66**, 996-996 (2006).
- 426 Zhang, Y. *et al.* Inhibition of Bcl-2/Bcl-xL and c-MET causes synthetic lethality in model systems of glioblastoma. *Scientific Reports* **8**, 7373, doi:10.1038/s41598-018-25802-0 (2018).
- 427 Crees, Z. D. *et al.* EGFR/c-Met and mTOR signaling are predictors of survival in non-small cell lung cancer. *Ther Adv Med Oncol* **12**, 1758835920953731, doi:10.1177/1758835920953731 (2020).

- 428 Nielsen-Preiss, S. M. *et al.* Adhesion-Related Kinase Induction of Migration Requires Phosphatidylinositol-3-Kinase and Ras Stimulation of Rac Activity in Immortalized Gonadotropin-Releasing Hormone Neuronal Cells. *Endocrinology* **148**, 2806-2814, doi:10.1210/en.2007-0039 (2007).
- 429 Rankin, E. B. *et al.* AXL is an essential factor and therapeutic target for metastatic ovarian cancer. *Cancer Res* **70**, 7570-7579, doi:10.1158/0008-5472.Can-10-1267 (2010).
- 430 Cui, Z. L. *et al.* YES-associated protein 1 promotes adenocarcinoma growth and metastasis through activation of the receptor tyrosine kinase Axl. *Int J Immunopathol Pharmacol* **25**, 989-1001, doi:10.1177/039463201202500416 (2012).
- 431 Asiedu, M. K. *et al.* AXL induces epithelial-to-mesenchymal transition and regulates the function of breast cancer stem cells. *Oncogene* **33**, 1316-1324, doi:10.1038/onc.2013.57 (2014).
- 432 Paccetz, J. D. *et al.* Inactivation of GSK3 β and activation of NF- κ B pathway via Axl represents an important mediator of tumorigenesis in esophageal squamous cell carcinoma. *Mol Biol Cell* **26**, 821-831, doi:10.1091/mbc.E14-04-0868 (2015).
- 433 Kim, K. H. *et al.* Wnt/ β -catenin signaling is a key downstream mediator of MET signaling in glioblastoma stem cells. *Neuro Oncol* **15**, 161-171, doi:10.1093/neuonc/nos299 (2013).
- 434 Suárez-Causado, A. *et al.* HGF/c-Met signaling promotes liver progenitor cell migration and invasion by an epithelial-mesenchymal transition-independent, phosphatidylinositol-3 kinase-dependent pathway in an in vitro model. *Biochim Biophys Acta* **1853**, 2453-2463, doi:10.1016/j.bbamcr.2015.05.017 (2015).
- 435 He, Q. *et al.* SIX4 promotes hepatocellular carcinoma metastasis through upregulating YAP1 and c-MET. *Oncogene* **39**, 7279-7295, doi:10.1038/s41388-020-01500-y (2020).
- 436 Li, W. *et al.* HGF-induced formation of the MET-AXL-ELMO2-DOCK180 complex promotes RAC1 activation, receptor clustering, and cancer cell migration and invasion. *J Biol Chem* **293**, 15397-15418, doi:10.1074/jbc.RA118.003063 (2018).
- 437 Rankin, E. B. *et al.* Direct regulation of GAS6/AXL signaling by HIF promotes renal metastasis through SRC and MET. *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**, 13373-13378, doi:10.1073/pnas.1404848111 (2014).
- 438 Li, Y. *et al.* Axl as a potential therapeutic target in cancer: role of Axl in tumor growth, metastasis and angiogenesis. *Oncogene* **28**, 3442-3455, doi:10.1038/onc.2009.212 (2009).
- 439 Matsumura, A. *et al.* HGF regulates VEGF expression via the c-Met receptor downstream pathways, PI3K/Akt, MAPK and STAT3, in CT26 murine cells. *Int J Oncol* **42**, 535-542, doi:10.3892/ijo.2012.1728 (2013).
- 440 Zhang, Y. *et al.* The dual blockade of MET and VEGFR2 signaling demonstrates pronounced inhibition on tumor growth and metastasis of hepatocellular carcinoma. *J Exp Clin Cancer Res* **37**, 93, doi:10.1186/s13046-018-0750-2 (2018).
- 441 Zhang, Y. W., Su, Y., Volpert, O. V. & Vande Woude, G. F. Hepatocyte growth factor/scatter factor mediates angiogenesis through positive VEGF and negative thrombospondin 1 regulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 12718-12723, doi:10.1073/pnas.2135113100 (2003).
- 442 Aguilera, T. A. *et al.* Reprogramming the immunological microenvironment through radiation and targeting Axl. *Nat Commun* **7**, 13898, doi:10.1038/ncomms13898 (2016).
- 443 Guo, Z., Li, Y., Zhang, D. & Ma, J. Axl inhibition induces the antitumor immune response which can be further potentiated by PD-1 blockade in the mouse cancer models. *Oncotarget* **8**, 89761-89774, doi:10.18632/oncotarget.21125 (2017).
- 444 Hugo, W. *et al.* Genomic and Transcriptomic Features of Response to Anti-PD-1 Therapy in Metastatic Melanoma. *Cell* **165**, 35-44, doi:10.1016/j.cell.2016.02.065 (2016).
- 445 Peng, S. *et al.* EGFR-TKI resistance promotes immune escape in lung cancer via increased PD-L1 expression. *Mol Cancer* **18**, 165, doi:10.1186/s12943-019-1073-4 (2019).
- 446 Balan, M. *et al.* Novel roles of c-Met in the survival of renal cancer cells through the regulation of HO-1 and PD-L1 expression. *J Biol Chem* **290**, 8110-8120, doi:10.1074/jbc.M114.612689 (2015).
- 447 Liu, H. *et al.* Tyrosine Kinase Inhibitor Cabozantinib Inhibits Murine Renal Cancer by Activating Innate and Adaptive Immunity. *Frontiers in Oncology* **11**, doi:10.3389/fonc.2021.663517 (2021).
- 448 Madoz-Gúrpide, J. *et al.* Activation of MET pathway predicts poor outcome to cetuximab in patients with recurrent or metastatic head and neck cancer. *Journal of translational medicine* **13**, 1-13 (2015).
- 449 Ghadjar, P. *et al.* MET Y1253D-activating point mutation and development of distant metastasis in advanced head and neck cancers. *Clin Exp Metastasis* **26**, 809-815, doi:10.1007/s10585-009-9280-9 (2009).

- 450 Di Renzo, M. F. *et al.* Somatic mutations of the MET oncogene are selected during metastatic spread of human HNSC carcinomas. *Oncogene* **19**, 1547-1555, doi:10.1038/sj.onc.1203455 (2000).
- 451 Tao, X. *et al.* Silencing Met receptor tyrosine kinase signaling decreased oral tumor growth and increased survival of nude mice. *Oral Oncol* **50**, 104-112, doi:10.1016/j.oraloncology.2013.10.014 (2014).
- 452 Sun, S. *et al.* Targeting the c-Met/FZD8 signaling axis eliminates patient-derived cancer stem-like cells in head and neck squamous carcinomas. *Cancer Res* **74**, 7546-7559, doi:10.1158/0008-5472.Can-14-0826 (2014).
- 453 Stabile, L. P. *et al.* c-Src activation mediates erlotinib resistance in head and neck cancer by stimulating c-Met. *Clin Cancer Res* **19**, 380-392, doi:10.1158/1078-0432.CCR-12-1555 (2013).
- 454 Sen, B., Peng, S., Saigal, B., Williams, M. D. & Johnson, F. M. Distinct interactions between c-Src and c-Met in mediating resistance to c-Src inhibition in head and neck cancer. *Clin Cancer Res* **17**, 514-524, doi:10.1158/1078-0432.Ccr-10-1617 (2011).
- 455 Hoot, K. E. *et al.* HGF upregulation contributes to angiogenesis in mice with keratinocyte-specific Smad2 deletion. *J Clin Invest* **120**, 3606-3616, doi:10.1172/jci43304 (2010).
- 456 Cheng, H. *et al.* Abstract 1889: Smad4 inactivation correlates with EMT and cetuximab resistance in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Research* **72**, 1889-1889, doi:10.1158/1538-7445.Am2012-1889 (2012).
- 457 Xu, H. *et al.* Dual blockade of EGFR and c-Met abrogates redundant signaling and proliferation in head and neck carcinoma cells. *Clin Cancer Res* **17**, 4425-4438, doi:10.1158/1078-0432.Ccr-10-3339 (2011).
- 458 Brand, T. M. *et al.* AXL Is a Logical Molecular Target in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Clin Cancer Res* **21**, 2601-2612, doi:10.1158/1078-0432.Ccr-14-2648 (2015).
- 459 von Massenhausen, A. *et al.* Implication of the Receptor Tyrosine Kinase AXL in Head and Neck Cancer Progression. *Int J Mol Sci* **18**, doi:10.3390/ijms18010007 (2016).
- 460 Li, J. *et al.* The crosstalk between AXL and YAP promotes tumor progression through STAT3 activation in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Sci* **111**, 3222-3235, doi:10.1111/cas.14546 (2020).
- 461 Wang, D. *et al.* HER3 Targeting Sensitizes HNSCC to Cetuximab by Reducing HER3 Activity and HER2/HER3 Dimerization: Evidence from Cell Line and Patient-Derived Xenograft Models. *Clin Cancer Res* **23**, 677-686, doi:10.1158/1078-0432.CCR-16-0558 (2017).
- 462 Novoplansky, O. *et al.* MET activation confers resistance to cetuximab, and prevents HER2 and HER3 upregulation in head and neck cancer. *Int J Cancer* **145**, 748-762, doi:10.1002/ijc.32170 (2019).
- 463 Krumbach, R. *et al.* Primary resistance to cetuximab in a panel of patient-derived tumour xenograft models: Activation of MET as one mechanism for drug resistance. *European Journal of Cancer* **47**, 1231-1243, doi:<https://doi.org/10.1016/j.ejca.2010.12.019> (2011).
- 464 Wang, D. *et al.* Combinatorial approaches targeting the EGFR family and c-Met in SCCHN. *Oral Oncol* **112**, 105074, doi:10.1016/j.oraloncology.2020.105074 (2021).
- 465 McDaniel, N. K. *et al.* AXL Mediates Cetuximab and Radiation Resistance Through Tyrosine 821 and the c-ABL Kinase Pathway in Head and Neck Cancer. *Clin Cancer Res* **26**, 4349-4359, doi:10.1158/1078-0432.Ccr-19-3142 (2020).
- 466 Leonard, B. *et al.* BET Inhibition Overcomes Receptor Tyrosine Kinase-Mediated Cetuximab Resistance in HNSCC. *Cancer Res* **78**, 4331-4343, doi:10.1158/0008-5472.Can-18-0459 (2018).
- 467 Bouhaddou, M. *et al.* Caveolin-1 and Sox-2 are predictive biomarkers of cetuximab response in head and neck cancer. *JCI Insight* **6**, doi:10.1172/jci.insight.151982 (2021).
- 468 Cao, F. *et al.* [Effect of c-Met inhibitor AMG-102 on radiosensitivity in laryngeal squamous carcinoma cells]. *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi* **41**, 909-917, doi:10.3760/cma.j.issn.0253-3766.2019.12.006 (2019).
- 469 Sun, S. & Wang, Z. Head neck squamous cell carcinoma c-Met⁺ cells display cancer stem cell properties and are responsible for cisplatin-resistance and metastasis. *Int J Cancer* **129**, 2337-2348, doi:10.1002/ijc.25927 (2011).
- 470 Hong, J., Peng, D., Chen, Z., Sehdev, V. & Belkhiri, A. ABL regulation by AXL promotes cisplatin resistance in esophageal cancer. *Cancer Res* **73**, 331-340, doi:10.1158/0008-5472.CAN-12-3151 (2013).
- 471 Badarni, M. *et al.* Repression of AXL expression by AP-1/JNK blockage overcomes resistance to PI3Ka therapy. *JCI Insight* **5**, doi:10.1172/jci.insight.125341 (2019).

- 472 Giles, K. M. *et al.* Axl mediates acquired resistance of head and neck cancer cells to the epidermal growth factor receptor inhibitor erlotinib. *Mol Cancer Ther* **12**, 2541-2558, doi:10.1158/1535-7163.MCT-13-0170 (2013).
- 473 Bauman, J. E. *et al.* Phase I Study of Ficlatazumab and Cetuximab in Cetuximab-Resistant, Recurrent/Metastatic Head and Neck Cancer. *Cancers (Basel)* **12**, doi:10.3390/cancers12061537 (2020).
- 474 Agwa, E. S. & Ma, P. C. Targeting the MET receptor tyrosine kinase in non-small cell lung cancer: emerging role of tivantinib. *Cancer management and research* **6**, 397 (2014).
- 475 Rimassa, L. *et al.* Tivantinib for second-line treatment of MET-high, advanced hepatocellular carcinoma (METIV-HCC): a final analysis of a phase 3, randomised, placebo-controlled study. *Lancet Oncol* **19**, 682-693, doi:10.1016/s1470-2045(18)30146-3 (2018).
- 476 Liu, L. *et al.* Synergistic effects of foretinib with HER-targeted agents in MET and HER1- or HER2-coactivated tumor cells. *Mol Cancer Ther* **10**, 518-530, doi:10.1158/1535-7163.Mct-10-0698 (2011).
- 477 Chen, G. Z. *et al.* Foretinib Enhances the Radiosensitivity in Esophageal Squamous Cell Carcinoma by Inhibiting Phosphorylation of c-Met. *J Cancer* **8**, 983-992, doi:10.7150/jca.18135 (2017).
- 478 Lüttich, L. *et al.* Tyrosine Kinase c-MET as Therapeutic Target for Radiosensitization of Head and Neck Squamous Cell Carcinomas. *Cancers (Basel)* **13**, doi:10.3390/cancers13081865 (2021).
- 479 Seiwert, T. *et al.* Phase II trial of single-agent foretinib (GSK1363089) in patients with recurrent or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck. *Invest New Drugs* **31**, 417-424, doi:10.1007/s10637-012-9861-3 (2013).
- 480 Nakagawa, T. *et al.* E7050: a dual c-Met and VEGFR-2 tyrosine kinase inhibitor promotes tumor regression and prolongs survival in mouse xenograft models. *Cancer Sci* **101**, 210-215, doi:10.1111/j.1349-7006.2009.01343.x (2010).
- 481 Liu, X. *et al.* A novel kinase inhibitor, INCB28060, blocks c-MET-dependent signaling, neoplastic activities, and cross-talk with EGFR and HER-3. *Clin Cancer Res* **17**, 7127-7138, doi:10.1158/1078-0432.CCR-11-1157 (2011).
- 482 Baschnagel, A. M. *et al.* Crizotinib Fails to Enhance the Effect of Radiation in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Xenografts. *Anticancer Res* **35**, 5973-5982 (2015).
- 483 Patwardhan, P. P., Ivy, K. S., Musi, E., de Stanchina, E. & Schwartz, G. K. Significant blockade of multiple receptor tyrosine kinases by MGCD516 (Sitravatinib), a novel small molecule inhibitor, shows potent anti-tumor activity in preclinical models of sarcoma. *Oncotarget* **7**, 4093-4109, doi:10.18632/oncotarget.6547 (2016).
- 484 Dolan, M. *et al.* Enhanced efficacy of sitravatinib in metastatic models of antiangiogenic therapy resistance. *PLoS One* **14**, e0220101, doi:10.1371/journal.pone.0220101 (2019).
- 485 Du, W., Huang, H., Sorrelle, N. & Brekken, R. A. Sitravatinib potentiates immune checkpoint blockade in refractory cancer models. *JCI Insight* **3**, doi:10.1172/jci.insight.124184 (2018).
- 486 Leal, T. *et al.* MA 02.01 Evidence of clinical activity of sitravatinib in combination with nivolumab in NSCLC patients progressing on prior checkpoint inhibitors. *Journal of Thoracic Oncology* **12**, S1803 (2017).
- 487 Oliva, M. *et al.* Antitumor immune effects of preoperative sitravatinib and nivolumab in oral cavity cancer: SNOW window-of-opportunity study. *J Immunother Cancer* **9**, doi:10.1136/jitc-2021-003476 (2021).
- 488 Lacy, S. A., Miles, D. R. & Nguyen, L. T. Clinical Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Cabozantinib. *Clin Pharmacokinet* **56**, 477-491, doi:10.1007/s40262-016-0461-9 (2017).
- 489 Yakes, F. M. *et al.* Cabozantinib (XL184), a novel MET and VEGFR2 inhibitor, simultaneously suppresses metastasis, angiogenesis, and tumor growth. *Mol Cancer Ther* **10**, 2298-2308, doi:10.1158/1535-7163.Mct-11-0264 (2011).
- 490 Choueiri, T. K. *et al.* Cabozantinib versus everolimus in advanced renal cell carcinoma (METEOR): final results from a randomised, open-label, phase 3 trial. *The Lancet Oncology* **17**, 917-927 (2016).
- 491 Choueiri, T. K. *et al.* Cabozantinib versus sunitinib as initial therapy for metastatic renal cell carcinoma of intermediate or poor risk (Alliance A031203 CABOSUN randomised trial): Progression-free survival by independent review and overall survival update. *European journal of cancer* **94**, 115-125 (2018).
- 492 Strickler, J. H. *et al.* Cabozantinib and Panitumumab for RAS Wild-Type Metastatic Colorectal Cancer. *Oncologist* **26**, 465-e917, doi:10.1002/onco.13678 (2021).

- 493 Wakelee, H. A. *et al.* A phase Ib/II study of cabozantinib (XL184) with or without erlotinib in patients with non-small cell lung cancer. *Cancer Chemother Pharmacol* **79**, 923-932, doi:10.1007/s00280-017-3283-z (2017).
- 494 Choueiri, T. K. *et al.* Nivolumab plus Cabozantinib versus Sunitinib for Advanced Renal-Cell Carcinoma. *N Engl J Med* **384**, 829-841, doi:10.1056/NEJMoa2026982 (2021).
- 495 Marandino, L. *et al.* Cabozantinib Plus Durvalumab in Patients With Advanced Urothelial Carcinoma After Platinum Chemotherapy: Safety and Preliminary Activity of the Open-Label, Single-Arm, Phase 2 ARCADIA Trial. *Clin Genitourin Cancer* **19**, 457-465, doi:10.1016/j.clgc.2021.04.001 (2021).
- 496 Apolo, A. B. *et al.* Phase I Study of Cabozantinib and Nivolumab Alone or With Ipilimumab for Advanced or Metastatic Urothelial Carcinoma and Other Genitourinary Tumors. *J Clin Oncol* **38**, 3672-3684, doi:10.1200/jco.20.01652 (2020).
- 497 Zallen, J. A., Yi, B. A. & Bargmann, C. I. The conserved immunoglobulin superfamily member SAX-3/Robo directs multiple aspects of axon guidance in *C. elegans*. *Cell* **92**, 217-227, doi:10.1016/s0092-8674(00)80916-2 (1998).
- 498 Connor, R. M. & Key, B. Expression and role of Roundabout-1 in embryonic *Xenopus* forebrain. *Dev Dyn* **225**, 22-34, doi:10.1002/dvdy.10130 (2002).
- 499 Brose, K. *et al.* Slit proteins bind Robo receptors and have an evolutionarily conserved role in repulsive axon guidance. *Cell* **96**, 795-806, doi:10.1016/s0092-8674(00)80590-5 (1999).
- 500 Park, K. W. *et al.* Robo4 is a vascular-specific receptor that inhibits endothelial migration. *Dev Biol* **261**, 251-267, doi:10.1016/s0012-1606(03)00258-6 (2003).
- 501 Yom-Tov, G. *et al.* Robo Ig4 Is a Dimerization Domain. *Journal of Molecular Biology* **429**, 3606-3616, doi:<https://doi.org/10.1016/j.jmb.2017.10.002> (2017).
- 502 Katoh, Y. & Katoh, M. Comparative genomics on SLIT1, SLIT2, and SLIT3 orthologs. *Oncol Rep* **14**, 1351-1355 (2005).
- 503 Morlot, C. *et al.* Structural insights into the Slit-Robo complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **104**, 14923-14928, doi:10.1073/pnas.0705310104 (2007).
- 504 Zelina, P. *et al.* Signaling switch of the axon guidance receptor Robo3 during vertebrate evolution. *Neuron* **84**, 1258-1272, doi:10.1016/j.neuron.2014.11.004 (2014).
- 505 Stein, E. & Tessier-Lavigne, M. Hierarchical organization of guidance receptors: silencing of netrin attraction by slit through a Robo/DCC receptor complex. *Science* **291**, 1928-1938, doi:10.1126/science.1058445 (2001).
- 506 Seiradake, E. *et al.* Structure and functional relevance of the Slit2 homodimerization domain. *EMBO Rep* **10**, 736-741, doi:10.1038/embor.2009.95 (2009).
- 507 Jones, C. A. *et al.* Robo4 stabilizes the vascular network by inhibiting pathologic angiogenesis and endothelial hyperpermeability. *Nat Med* **14**, 448-453, doi:10.1038/nm1742 (2008).
- 508 Koch, A. W. *et al.* Robo4 maintains vessel integrity and inhibits angiogenesis by interacting with UNC5B. *Dev Cell* **20**, 33-46, doi:10.1016/j.devcel.2010.12.001 (2011).
- 509 Steigemann, P., Molitor, A., Fellert, S., Jäckle, H. & Vorbrüggen, G. Heparan sulfate proteoglycan syndecan promotes axonal and myotube guidance by slit/robo signaling. *Curr Biol* **14**, 225-230, doi:10.1016/j.cub.2004.01.006 (2004).
- 510 Tong, M., Jun, T., Nie, Y., Hao, J. & Fan, D. The Role of the Slit/Robo Signaling Pathway. *Journal of Cancer* **10**, 2694-2705, doi:10.7150/jca.31877 (2019).
- 511 Coleman, H. A., Labrador, J. P., Chance, R. K. & Bashaw, G. J. The Adam family metalloprotease Kuzbanian regulates the cleavage of the roundabout receptor to control axon repulsion at the midline. *Development* **137**, 2417-2426, doi:10.1242/dev.047993 (2010).
- 512 Seki, M. *et al.* Human ROBO1 is cleaved by metalloproteinases and gamma-secretase and migrates to the nucleus in cancer cells. *FEBS Lett* **584**, 2909-2915, doi:10.1016/j.febslet.2010.05.009 (2010).
- 513 Nguyen Ba-Charvet, K. T. *et al.* Diversity and specificity of actions of Slit2 proteolytic fragments in axon guidance. *J Neurosci* **21**, 4281-4289, doi:10.1523/jneurosci.21-12-04281.2001 (2001).
- 514 Svensson, K. J. *et al.* A Secreted Slit2 Fragment Regulates Adipose Tissue Thermogenesis and Metabolic Function. *Cell Metab* **23**, 454-466, doi:10.1016/j.cmet.2016.01.008 (2016).
- 515 Delloye-Bourgeois, C. *et al.* PlexinA1 is a new Slit receptor and mediates axon guidance function of Slit C-terminal fragments. *Nat Neurosci* **18**, 36-45, doi:10.1038/nn.3893 (2015).
- 516 Xiao, T. *et al.* Assembly of lamina-specific neuronal connections by slit bound to type IV collagen. *Cell* **146**, 164-176, doi:10.1016/j.cell.2011.06.016 (2011).
- 517 Wright, K. M. *et al.* Dystroglycan organizes axon guidance cue localization and axonal pathfinding. *Neuron* **76**, 931-944, doi:10.1016/j.neuron.2012.10.009 (2012).

- 518 Dascenco, D. *et al.* Slit and Receptor Tyrosine Phosphatase 69D Confer Spatial Specificity to
Axon Branching via Dscam1. *Cell* **162**, 1140-1154, doi:10.1016/j.cell.2015.08.003 (2015).
- 519 Li, H. S. *et al.* Vertebrate slit, a secreted ligand for the transmembrane protein roundabout, is a
repellent for olfactory bulb axons. *Cell* **96**, 807-818, doi:10.1016/s0092-8674(00)80591-7
(1999).
- 520 Carr, L., Parkinson, D. B. & Dun, X. P. Expression patterns of Slit and Robo family members in
adult mouse spinal cord and peripheral nervous system. *PLoS One* **12**, e0172736,
doi:10.1371/journal.pone.0172736 (2017).
- 521 Mastick, G. S. *et al.* Longitudinal axons are guided by Slit/Robo signals from the floor plate. *Cell*
Adh Migr **4**, 337-341, doi:10.4161/cam.4.3.11219 (2010).
- 522 Bisiak, F. & McCarthy, A. A. Structure and Function of Roundabout Receptors. *Subcell Biochem*
93, 291-319, doi:10.1007/978-3-030-28151-9_9 (2019).
- 523 Long, H. *et al.* Conserved Roles for Slit and Robo Proteins in Midline Commissural Axon
Guidance. *Neuron* **42**, 213-223, doi:[https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(04\)00179-5](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(04)00179-5) (2004).
- 524 Brown, H. E., Reichert, M. C. & Evans, T. A. In Vivo Functional Analysis of Drosophila Robo1
Fibronectin Type-III Repeats. *G3 (Bethesda)* **8**, 621-630, doi:10.1534/g3.117.300418 (2018).
- 525 Ma, L. & Tessier-Lavigne, M. Dual branch-promoting and branch-repelling actions of Slit/Robo
signaling on peripheral and central branches of developing sensory axons. *J Neurosci* **27**, 6843-
6851, doi:10.1523/JNEUROSCI.1479-07.2007 (2007).
- 526 Zheng, W., Geng, A. Q., Li, P. F., Wang, Y. & Yuan, X. B. Robo4 regulates the radial migration
of newborn neurons in developing neocortex. *Cereb Cortex* **22**, 2587-2601,
doi:10.1093/cercor/bhr330 (2012).
- 527 Camurri, L. *et al.* Evidence for the existence of two Robo3 isoforms with divergent biochemical
properties. *Mol Cell Neurosci* **30**, 485-493, doi:10.1016/j.mcn.2005.07.014 (2005).
- 528 Chen, Z., Gore, B. B., Long, H., Ma, L. & Tessier-Lavigne, M. Alternative splicing of the Robo3
axon guidance receptor governs the midline switch from attraction to repulsion. *Neuron* **58**, 325-
332, doi:10.1016/j.neuron.2008.02.016 (2008).
- 529 Leyva-Díaz, E. *et al.* FLRT3 is a Robo1-interacting protein that determines Netrin-1 attraction
in developing axons. *Curr Biol* **24**, 494-508, doi:10.1016/j.cub.2014.01.042 (2014).
- 530 Bashaw, G. J., Kidd, T., Murray, D., Pawson, T. & Goodman, C. S. Repulsive axon guidance:
Abelson and Enabled play opposing roles downstream of the roundabout receptor. *Cell* **101**,
703-715, doi:10.1016/s0092-8674(00)80883-1 (2000).
- 531 Wong, K. *et al.* Signal transduction in neuronal migration: roles of GTPase activating proteins
and the small GTPase Cdc42 in the Slit-Robo pathway. *Cell* **107**, 209-221, doi:10.1016/s0092-
8674(01)00530-x (2001).
- 532 Guerrier, S. *et al.* The F-BAR Domain of srGAP2 Induces Membrane Protrusions Required for
Neuronal Migration and Morphogenesis. *Cell* **138**, 990-1004, doi:10.1016/j.cell.2009.06.047
(2009).
- 533 Yang, Y. *et al.* MEGAP impedes cell migration via regulating actin and microtubule dynamics
and focal complex formation. *Exp Cell Res* **312**, 2379-2393, doi:10.1016/j.yexcr.2006.04.001
(2006).
- 534 Hu, H. *et al.* Cross GTPase-activating protein (CrossGAP)/Vilse links the Roundabout receptor
to Rac to regulate midline repulsion. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 4613-4618,
doi:10.1073/pnas.0409325102 (2005).
- 535 Fritz, J. L. & VanBerkum, M. F. A. Regulation of Rho Family GTPases Is Required to Prevent
Axons from Crossing the Midline. *Developmental Biology* **252**, 46-58,
doi:<https://doi.org/10.1006/dbio.2002.0842> (2002).
- 536 Fan, X., Labrador, J. P., Hing, H. & Bashaw, G. J. Slit stimulation recruits Dock and Pak to the
roundabout receptor and increases Rac activity to regulate axon repulsion at the CNS midline.
Neuron **40**, 113-127, doi:10.1016/s0896-6273(03)00591-9 (2003).
- 537 Yang, L. & Bashaw, G. J. Son of sevenless directly links the Robo receptor to rac activation to
control axon repulsion at the midline. *Neuron* **52**, 595-607, doi:10.1016/j.neuron.2006.09.039
(2006).
- 538 Ballard, M. S. & Hinck, L. A roundabout way to cancer. *Adv Cancer Res* **114**, 187-235,
doi:10.1016/B978-0-12-386503-8.00005-3 (2012).
- 539 Garrett, T. A., Van Buul, J. D. & Burridge, K. VEGF-induced Rac1 activation in endothelial cells
is regulated by the guanine nucleotide exchange factor Vav2. *Exp Cell Res* **313**, 3285-3297,
doi:10.1016/j.yexcr.2007.05.027 (2007).
- 540 Jones, C. A. *et al.* Slit2-Robo4 signalling promotes vascular stability by blocking Arf6 activity.
Nat Cell Biol **11**, 1325-1331, doi:10.1038/ncb1976 (2009).

- 541 Kaur, S. *et al.* Robo4 signaling in endothelial cells implies attraction guidance mechanisms. *J Biol Chem* **281**, 11347-11356, doi:10.1074/jbc.M508853200 (2006).
- 542 Chen, C. Y., Tsai, C. H., Chen, C. Y., Wu, Y. H. & Chen, C. P. Human placental multipotent mesenchymal stromal cells modulate placenta angiogenesis through Slit2-Robo signaling. *Cell Adh Migr* **10**, 66-76, doi:10.1080/19336918.2015.1108510 (2016).
- 543 Sheldon, H. *et al.* Active involvement of Robo1 and Robo4 in filopodia formation and endothelial cell motility mediated via WASP and other actin nucleation-promoting factors. *The FASEB Journal* **23**, 513-522, doi:<https://doi.org/10.1096/fj.07-098269> (2009).
- 544 Rama, N. *et al.* Slit2 signaling through Robo1 and Robo2 is required for retinal neovascularization. *Nature Medicine* **21**, 483-491, doi:10.1038/nm.3849 (2015).
- 545 Dubrac, A. *et al.* Targeting NCK-Mediated Endothelial Cell Front-Rear Polarity Inhibits Neovascularization. *Circulation* **133**, 409-421, doi:10.1161/circulationaha.115.017537 (2016).
- 546 Piper, M., Georgas, K., Yamada, T. & Little, M. Expression of the vertebrate Slit Gene family and their putative receptors, the Robo genes, in the developing murine kidney. *Mechanisms of Development* **94**, 213-217, doi:[https://doi.org/10.1016/S0925-4773\(00\)00313-0](https://doi.org/10.1016/S0925-4773(00)00313-0) (2000).
- 547 Grieshammer, U. *et al.* SLIT2-mediated ROBO2 signaling restricts kidney induction to a single site. *Dev Cell* **6**, 709-717, doi:10.1016/s1534-5807(04)00108-x (2004).
- 548 Fan, X. *et al.* Inhibitory effects of Robo2 on nephrin: a crosstalk between positive and negative signals regulating podocyte structure. *Cell Rep* **2**, 52-61, doi:10.1016/j.celrep.2012.06.002 (2012).
- 549 Hwang, D. Y. *et al.* Mutations of the SLIT2-ROBO2 pathway genes SLIT2 and SRGAP1 confer risk for congenital anomalies of the kidney and urinary tract. *Hum Genet* **134**, 905-916, doi:10.1007/s00439-015-1570-5 (2015).
- 550 Mommersteeg, M. T. M., Yeh, M. L., Parnavelas, J. G. & Andrews, W. D. Disrupted Slit-Robo signalling results in membranous ventricular septum defects and bicuspid aortic valves. *Cardiovascular Research* **106**, 55-66, doi:10.1093/cvr/cvv040 (2015).
- 551 Macias, H. *et al.* SLIT/ROBO1 signaling suppresses mammary branching morphogenesis by limiting basal cell number. *Dev Cell* **20**, 827-840, doi:10.1016/j.devcel.2011.05.012 (2011).
- 552 Domyan, E. T. *et al.* Roundabout receptors are critical for foregut separation from the body wall. *Dev Cell* **24**, 52-63, doi:10.1016/j.devcel.2012.11.018 (2013).
- 553 Ordan, E. & Volk, T. Cleaved Slit directs embryonic muscles. *Fly (Austin)* **9**, 82-85, doi:10.1080/19336934.2015.1102808 (2015).
- 554 Adams, M. T., Gilbert, J. M., Hinojosa Paiz, J., Bowman, F. M. & Blum, B. Endocrine cell type sorting and mature architecture in the islets of Langerhans require expression of Roundabout receptors in β cells. *Scientific Reports* **8**, 10876, doi:10.1038/s41598-018-29118-x (2018).
- 555 Gilbert, J. M., Adams, M. T., Sharon, N., Jayaraaman, H. & Blum, B. Morphogenesis of the Islets of Langerhans Is Guided by Extraendocrine Slit2 and Slit3 Signals. *Molecular and Cellular Biology* **41**, e00451-00420, doi:doi:10.1128/MCB.00451-20 (2021).
- 556 Borrell, V. *et al.* Slit/Robo signaling modulates the proliferation of central nervous system progenitors. *Neuron* **76**, 338-352, doi:10.1016/j.neuron.2012.08.003 (2012).
- 557 Ballard, M. S. *et al.* Mammary Stem Cell Self-Renewal Is Regulated by Slit2/Robo1 Signaling through SNAI1 and mINSC. *Cell Rep* **13**, 290-301, doi:10.1016/j.celrep.2015.09.006 (2015).
- 558 Smith-Berdan, S. *et al.* Robo4 cooperates with CXCR4 to specify hematopoietic stem cell localization to bone marrow niches. *Cell Stem Cell* **8**, 72-83, doi:10.1016/j.stem.2010.11.030 (2011).
- 559 Singh, R. K. *et al.* Deletions in chromosome 4 differentially associated with the development of cervical cancer: evidence of slit2 as a candidate tumor suppressor gene. *Hum Genet* **122**, 71-81, doi:10.1007/s00439-007-0375-6 (2007).
- 560 Shivapurkar, N. *et al.* Deletions of chromosome 4 at multiple sites are frequent in malignant mesothelioma and small cell lung carcinoma. *Clin Cancer Res* **5**, 17-23 (1999).
- 561 Shivapurkar, N. *et al.* Multiple regions of chromosome 4 demonstrating allelic losses in breast carcinomas. *Cancer Res* **59**, 3576-3580 (1999).
- 562 Qiu, H., Zhu, J., Yu, J., Pu, H. & Dong, R. SLIT2 is epigenetically silenced in ovarian cancers and suppresses growth when activated. *Asian Pac J Cancer Prev* **12**, 791-795 (2011).
- 563 Dickinson, R. E. *et al.* Epigenetic inactivation of SLIT3 and SLIT1 genes in human cancers. *Br J Cancer* **91**, 2071-2078, doi:10.1038/sj.bjc.6602222 (2004).
- 564 Yu, J. *et al.* The neuronal repellent SLIT2 is a target for repression by EZH2 in prostate cancer. *Oncogene* **29**, 5370-5380, doi:10.1038/onc.2010.269 (2010).

- 565 Angeloni, D. *et al.* Analysis of a new homozygous deletion in the tumor suppressor region at 3p12.3 reveals two novel intronic noncoding RNA genes. *Genes Chromosomes Cancer* **45**, 676-691, doi:10.1002/gcc.20332 (2006).
- 566 Alajez, N. M. *et al.* MiR-218 suppresses nasopharyngeal cancer progression through downregulation of survivin and the SLIT2-ROBO1 pathway. *Cancer Res* **71**, 2381-2391, doi:10.1158/0008-5472.Can-10-2754 (2011).
- 567 Tie, J. *et al.* MiR-218 inhibits invasion and metastasis of gastric cancer by targeting the Robo1 receptor. *PLoS Genet* **6**, e1000879, doi:10.1371/journal.pgen.1000879 (2010).
- 568 Mitra, S. *et al.* Inactivation of SLIT2-ROBO1/2 pathway in premalignant lesions of uterine cervix: clinical and prognostic significances. *PLoS One* **7**, e38342, doi:10.1371/journal.pone.0038342 (2012).
- 569 Xian, J. *et al.* Inadequate lung development and bronchial hyperplasia in mice with a targeted deletion in the Dutt1/Robo1 gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 15062-15066, doi:10.1073/pnas.251407098 (2001).
- 570 Dallol, A. *et al.* Tumour specific promoter region methylation of the human homologue of the Drosophila Roundabout gene DUTT1 (ROBO1) in human cancers. *Oncogene* **21**, 3020-3028, doi:10.1038/sj.onc.1205421 (2002).
- 571 Narayan, G. *et al.* Promoter hypermethylation-mediated inactivation of multiple Slit-Robo pathway genes in cervical cancer progression. *Mol Cancer* **5**, 16, doi:10.1186/1476-4598-5-16 (2006).
- 572 Han, S. *et al.* ROBO3 promotes growth and metastasis of pancreatic carcinoma. *Cancer Lett* **366**, 61-70, doi:10.1016/j.canlet.2015.06.004 (2015).
- 573 Yang, T. *et al.* miR-92 Suppresses Robo1 Translation to Modulate Slit Sensitivity in Commissural Axon Guidance. *Cell Rep* **24**, 2694-2708 e2696, doi:10.1016/j.celrep.2018.08.021 (2018).
- 574 Okada, Y. *et al.* Expression of the Robo4 receptor in endothelial cells is regulated by two AP-1 protein complexes. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **467**, 987-991, doi:<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.10.029> (2015).
- 575 Latil, A. *et al.* Quantification of expression of netrins, slits and their receptors in human prostate tumors. *Int J Cancer* **103**, 306-315, doi:10.1002/ijc.10821 (2003).
- 576 Yin, K. *et al.* Netrin-1 induces the proliferation of gastric cancer cells via the ERK/MAPK signaling pathway and FAK activation. *Oncol Rep* **40**, 2325-2333, doi:10.3892/or.2018.6614 (2018).
- 577 Huang, Q., Hua, H.-w., Jiang, F., Liu, D.-h. & Ding, G. Netrin-1 promoted pancreatic cancer cell proliferation by upregulation of Mdm2. *Tumor Biology* **35**, 9927-9934 (2014).
- 578 Stein, E. & Tessier-Lavigne, M. Hierarchical Organization of Guidance Receptors: Silencing of Netrin Attraction by Slit Through a Robo/DCC Receptor Complex. *Science* **291**, 1928-1938, doi:doi:10.1126/science.1058445 (2001).
- 579 Tseng, R. C. *et al.* SLIT2 attenuation during lung cancer progression deregulates beta-catenin and E-cadherin and associates with poor prognosis. *Cancer Res* **70**, 543-551, doi:10.1158/0008-5472.Can-09-2084 (2010).
- 580 Prasad, A., Paruchuri, V., Preet, A., Latif, F. & Ganju, R. K. Slit-2 induces a tumor-suppressive effect by regulating beta-catenin in breast cancer cells. *J Biol Chem* **283**, 26624-26633, doi:10.1074/jbc.M800679200 (2008).
- 581 Kim, H. K. *et al.* Slit2 inhibits growth and metastasis of fibrosarcoma and squamous cell carcinoma. *Neoplasia* **10**, 1411-1420, doi:10.1593/neo.08804 (2008).
- 582 Dickinson, R. E., Fegan, K. S., Ren, X., Hillier, S. G. & Duncan, W. C. Glucocorticoid Regulation of SLIT/ROBO Tumour Suppressor Genes in the Ovarian Surface Epithelium and Ovarian Cancer Cells. *PLoS ONE* **6**, e27792, doi:10.1371/journal.pone.0027792 (2011).
- 583 Ding, C. *et al.* ROBO2 hampers malignant biological behavior and predicts a better prognosis in pancreatic adenocarcinoma. *Scand J Gastroenterol* **56**, 955-964, doi:10.1080/00365521.2021.1930144 (2021).
- 584 Ma, Y. G., Wang, L. J., Han, B. & Zhang, J. Effect of Slit-Robo signal on apoptosis of oral cancer cell line Tb. *Zhonghua Kou Qiang Yi Xue Za Zhi* **41**, 232-235 (2006).
- 585 Cai, H. *et al.* Roundabout4 suppresses glioma-induced endothelial cell proliferation, migration and tube formation in vitro by inhibiting VEGFR2-mediated PI3K/AKT and FAK signaling pathways. *Cell Physiol Biochem* **35**, 1689-1705, doi:10.1159/000373982 (2015).
- 586 Avci, M. E., Konu, O. & Yagci, T. Quantification of SLIT-ROBO transcripts in hepatocellular carcinoma reveals two groups of genes with coordinate expression. *BMC Cancer* **8**, 392, doi:10.1186/1471-2407-8-392 (2008).

- 587 Werbowetski-Ogilvie, T. E. *et al.* Inhibition of medulloblastoma cell invasion by Slit. *Oncogene* **25**, 5103-5112, doi:10.1038/sj.onc.1209524 (2006).
- 588 Yiin, J. J. *et al.* Slit2 inhibits glioma cell invasion in the brain by suppression of Cdc42 activity. *Neuro Oncol* **11**, 779-789, doi:10.1215/15228517-2008-017 (2009).
- 589 Stella, M. C., Trusolino, L. & Comoglio, P. M. The Slit/Robo system suppresses hepatocyte growth factor-dependent invasion and morphogenesis. *Mol Biol Cell* **20**, 642-657, doi:10.1091/mbc.E08-03-0321 (2009).
- 590 Wong, K. *et al.* Signal Transduction in Neuronal Migration: Roles of GTPase Activating Proteins and the Small GTPase Cdc42 in the Slit-Robo Pathway. *Cell*, 13 (2001).
- 591 Feng, Y., Feng, L., Yu, D., Zou, J. & Huang, Z. srGAP1 mediates the migration inhibition effect of Slit2-Robo1 in colorectal cancer. *J Exp Clin Cancer Res* **35**, 191, doi:10.1186/s13046-016-0469-x (2016).
- 592 Marko, T. A. *et al.* Slit-Robo GTPase-Activating Protein 2 as a metastasis suppressor in osteosarcoma. *Scientific Reports* **6**, doi:10.1038/srep39059 (2016).
- 593 Bauer, K., Dowejko, A., Bosserhoff, A. K., Reichert, T. E. & Bauer, R. Slit-2 facilitates interaction of P-cadherin with Robo-3 and inhibits cell migration in an oral squamous cell carcinoma cell line. *Carcinogenesis* **32**, 935-943, doi:10.1093/carcin/bgr059 (2011).
- 594 Zhang, C. *et al.* Effects of Slit3 silencing on the invasive ability of lung carcinoma A549 cells. *Oncol Rep* **34**, 952-960, doi:10.3892/or.2015.4031 (2015).
- 595 Denk, A. E., Braig, S., Schubert, T. & Bosserhoff, A. K. Slit3 inhibits activator protein 1-mediated migration of malignant melanoma cells. *Int J Mol Med* **28**, 721-726, doi:10.3892/ijmm.2011.742 (2011).
- 596 Gohrig, A. *et al.* Axon guidance factor SLIT2 inhibits neural invasion and metastasis in pancreatic cancer. *Cancer Res* **74**, 1529-1540, doi:10.1158/0008-5472.CAN-13-1012 (2014).
- 597 Marlow, R. *et al.* SLITs suppress tumor growth in vivo by silencing Sdf1/Cxcr4 within breast epithelium. *Cancer Res* **68**, 7819-7827, doi:10.1158/0008-5472.Can-08-1357 (2008).
- 598 Prasad, A., Fernandis, A. Z., Rao, Y. & Ganju, R. K. Slit protein-mediated inhibition of CXCR4-induced chemotactic and chemoinvasive signaling pathways in breast cancer cells. *J Biol Chem* **279**, 9115-9124, doi:10.1074/jbc.M308083200 (2004).
- 599 Pircher, A. *et al.* Favorable prognosis of operable non-small cell lung cancer (NSCLC) patients harboring an increased expression of tumor endothelial markers (TEMs). *Lung Cancer* **81**, 252-258, doi:10.1016/j.lungcan.2013.04.014 (2013).
- 600 Pircher, A. *et al.* Robo 4 - the double-edged sword in prostate cancer: impact on cancer cell aggressiveness and tumor vasculature. *International Journal of Medical Sciences* **16**, 115-124, doi:10.7150/ijms.28735 (2019).
- 601 Zhao, H. *et al.* Endothelial Robo4 suppresses breast cancer growth and metastasis through regulation of tumor angiogenesis. *Mol Oncol* **10**, 272-281, doi:10.1016/j.molonc.2015.10.007 (2016).
- 602 Dickinson, R. E. & Duncan, W. C. The SLIT-ROBO pathway: a regulator of cell function with implications for the reproductive system. *Reproduction* **139**, 697-704, doi:10.1530/REP-10-0017 (2010).
- 603 Grone, J. *et al.* Robo1/Robo4: differential expression of angiogenic markers in colorectal cancer. *Oncol Rep* **15**, 1437-1443 (2006).
- 604 Zhou, W. J. *et al.* Slit-Robo signaling induces malignant transformation through Hakai-mediated E-cadherin degradation during colorectal epithelial cell carcinogenesis. *Cell Res* **21**, 609-626, doi:10.1038/cr.2011.17 (2011).
- 605 Schmid, B. C. *et al.* The neuronal guidance cue Slit2 induces targeted migration and may play a role in brain metastasis of breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat* **106**, 333-342, doi:10.1007/s10549-007-9504-0 (2007).
- 606 Han, B. *et al.* Role of Slit-Robo signaling in the proliferation of human mucoepidermoid carcinoma Mc3 cells. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao* **32**, 37-39 (2012).
- 607 Rhee, J., Buchan, T., Zukerberg, L., Lilien, J. & Balsamo, J. Cables links Robo-bound Abl kinase to N-cadherin-bound β -catenin to mediate Slit-induced modulation of adhesion and transcription. *Nature Cell Biology* **9**, 883-892, doi:10.1038/ncb1614 (2007).
- 608 Qi, C. *et al.* Slit2 promotes tumor growth and invasion in chemically induced skin carcinogenesis. *Lab Invest* **94**, 766-776, doi:10.1038/labinvest.2014.70 (2014).
- 609 Khushial, P. R. *et al.* Src activates Abl to augment Robo1 expression in order to promote tumor cell migration. *Oncotarget* **1**, 198-209, doi:10.18632/oncotarget.100710 (2010).

- 610 Li, Y. *et al.* Identification of SRGAP2 as a potential oncogene and a prognostic biomarker in hepatocellular carcinoma. *Life Sciences* **277**, 119592, doi:<https://doi.org/10.1016/j.lfs.2021.119592> (2021).
- 611 Castosa, R. *et al.* Hakai overexpression effectively induces tumour progression and metastasis in vivo. *Sci Rep* **8**, 3466, doi:10.1038/s41598-018-21808-w (2018).
- 612 Liu, Z., Wu, Y., Tao, Z. & Ma, L. E3 ubiquitin ligase Hakai regulates cell growth and invasion, and increases the chemosensitivity to cisplatin in non-small-cell lung cancer cells. *Int J Mol Med* **42**, 1145-1151, doi:10.3892/ijmm.2018.3683 (2018).
- 613 Su, X., Ren, Y., Yu, N., Kong, L. & Kang, J. Thymoquinone inhibits inflammation, neoangiogenesis and vascular remodeling in asthma mice. *Int Immunopharmacol* **38**, 70-80, doi:10.1016/j.intimp.2016.05.018 (2016).
- 614 Wang, L. J. *et al.* Targeting Slit-Roundabout signaling inhibits tumor angiogenesis in chemical-induced squamous cell carcinogenesis. *Cancer Sci* **99**, 510-517, doi:10.1111/j.1349-7006.2007.00721.x (2008).
- 615 Zhang, X. *et al.* miR-218 inhibited tumor angiogenesis by targeting ROBO1 in gastric cancer. *Gene* **615**, 42-49, doi:10.1016/j.gene.2017.03.022 (2017).
- 616 Sheldon, H. *et al.* Active involvement of Robo1 and Robo4 in filopodia formation and endothelial cell motility mediated via WASP and other actin nucleation-promoting factors. *Faseb j* **23**, 513-522, doi:10.1096/fj.07-098269 (2009).
- 617 Chen, Y. K. *et al.* Clinical and prognostic implications of Roundabout 4 (robo4) in adult patients with acute myeloid leukemia. *PLoS One* **10**, e0119831, doi:10.1371/journal.pone.0119831 (2015).
- 618 Golos, A. *et al.* The Expression of the SLIT-ROBO Family in Adult Patients with Acute Myeloid Leukemia. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis* **67**, 109-123, doi:10.1007/s00005-019-00535-8 (2019).
- 619 Zhuang, X. *et al.* Robo4 vaccines induce antibodies that retard tumor growth. *Angiogenesis* **18**, 83-95, doi:10.1007/s10456-014-9448-z (2015).
- 620 Cheng, C. Y. *et al.* BI2536 induces mitotic catastrophe and radiosensitization in human oral cancer cells. *Oncotarget* **9**, 21231-21243, doi:10.18632/oncotarget.25035 (2018).
- 621 Lee, Y. *et al.* Pharmacogenomic Analysis Reveals CCNA2 as a Predictive Biomarker of Sensitivity to Polo-Like Kinase I Inhibitor in Gastric Cancer. *Cancers (Basel)* **12**, doi:10.3390/cancers12061418 (2020).
- 622 Li, M., Liu, Z. & Wang, X. Exploration of the Combination of PLK1 Inhibition with Immunotherapy in Cancer Treatment. *J Oncol* **2018**, 3979527, doi:10.1155/2018/3979527 (2018).
- 623 Mercier, I. *et al.* Human breast cancer-associated fibroblasts (CAFs) show caveolin-1 downregulation and RB tumor suppressor functional inactivation: Implications for the response to hormonal therapy. *Cancer Biol Ther* **7**, 1212-1225, doi:10.4161/cbt.7.8.6220 (2008).
- 624 Dufies, M. *et al.* Mechanism of action of the multikinase inhibitor Foretinib. *Cell Cycle* **10**, 4138-4148, doi:10.4161/cc.10.23.18323 (2011).
- 625 Hong, J., Maacha, S. & Belkhir, A. Transcriptional upregulation of c-MYC by AXL confers epirubicin resistance in esophageal adenocarcinoma. *Mol Oncol* **12**, 2191-2208, doi:10.1002/1878-0261.12395 (2018).
- 626 Lalla, R. V., Boisoneau, D. S., Spiro, J. D. & Kreutzer, D. L. Expression of vascular endothelial growth factor receptors on tumor cells in head and neck squamous cell carcinoma. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* **129**, 882-888, doi:10.1001/archotol.129.8.882 (2003).
- 627 Ge, W., Han, C., Wang, J. & Zhang, Y. MiR-300 suppresses laryngeal squamous cell carcinoma proliferation and metastasis by targeting ROS1. *Am J Transl Res* **8**, 3903-3911 (2016).
- 628 Ongkeko, W. M., Altuna, X., Weisman, R. A. & Wang-Rodriguez, J. Expression of protein tyrosine kinases in head and neck squamous cell carcinomas. *Am J Clin Pathol* **124**, 71-76, doi:10.1309/btln5wtmj3pcnrrc (2005).
- 629 Lee, Y. Y. *et al.* Phosphoproteomic analysis identifies activated MET-axis PI3K/AKT and MAPK/ERK in lapatinib-resistant cancer cell line. *Exp Mol Med* **45**, e64, doi:10.1038/emm.2013.115 (2013).
- 630 Yang, X. *et al.* Cervical Cancer Growth Is Regulated by a c-ABL-PLK1 Signaling Axis. *Cancer Res* **77**, 1142-1154, doi:10.1158/0008-5472.Can-16-1378 (2017).
- 631 Bae, C. A. *et al.* Inhibiting the GAS6/AXL axis suppresses tumor progression by blocking the interaction between cancer-associated fibroblasts and cancer cells in gastric carcinoma. *Gastric Cancer* **23**, 824-836, doi:10.1007/s10120-020-01066-4 (2020).

- 632 Srivastava, S. *et al.* Activation of EPHA2-ROBO1 Heterodimer by SLIT2 Attenuates Non-canonical Signaling and Proliferation in Squamous Cell Carcinomas. *iScience* **23**, 101692, doi:10.1016/j.isci.2020.101692 (2020).
- 633 Song, W. *et al.* Targeting EphA2 impairs cell cycle progression and growth of basal-like/triple-negative breast cancers. *Oncogene* **36**, 5620-5630, doi:10.1038/onc.2017.170 (2017).