



HAL
open science

Implication de la sortiline dans la sensibilité aux thérapies ciblées dans le cancer bronchique

Eric Lapeyronnie

► **To cite this version:**

Eric Lapeyronnie. Implication de la sortiline dans la sensibilité aux thérapies ciblées dans le cancer bronchique. Médecine humaine et pathologie. Université de Limoges, 2021. Français. NNT : 2021LIMO0051 . tel-03725401

HAL Id: tel-03725401

<https://theses.hal.science/tel-03725401>

Submitted on 17 Jul 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.

Université de Limoges

ED 615 - Sciences Biologiques et Santé (SBS)

EA3842 CAPTuR : Contrôle de l'Activation Cellulaire, Progression tumorale et Résistances Thérapeutiques – Chaire de pneumologie expérimentale

Thèse pour obtenir le grade de
Docteur de l'Université de Limoges
Oncologie

Présentée et soutenue par
Eric Lapeyronnie

Le 16 juillet 2021

Implication de la sortiline dans la sensibilité aux thérapies ciblées dans le cancer bronchique

Thèse dirigée par le **Professeur Fabrice Lalloué** et le **Professeur François Vincent**

JURY :

Président du jury

M. **Abdel-Majid Khatib**, Directeur de Recherche (DR), INSERM U1029, Université de Bordeaux, France

Rapporteurs

M. **Frederic Delom**, Maître de Conférence, Université de Bordeaux, INSERM U1218, institut Bergonié, Bordeaux, France

M. **Maxime Lehmann**, Professeur des Universités, Université de Strasbourg, CNRS UMR 7021, Faculté de Pharmacie, Illkirch, France

Examineurs

M. **Fabrice Lalloué**, Professeur des Universités, Université de Limoges, EA3842 - CAPTuR, Faculté de Médecine, Limoges, France

M. **François Vincent**, Professeur des Universités et Praticien Hospitalier, Université de Limoges, EA3842 – CAPTuR, Service de Pneumologie, CHU de Limoges, France

M. **Thomas Naves**, Chercheur Universitaire, EA3842, Chaire de Pneumologie Expérimentale, Faculté de Médecine de Limoges, France



À ma famille...

L'échec est seulement l'opportunité de recommencer d'une façon plus intelligente

Henry Ford

Remerciements

Je tiens à remercier l'ensemble des membres du jury qui ont accepté de juger mon travail. Je souhaite remercier M. **Majid Khatib**, directeur de recherche INSERM à l'Université de Bordeaux, d'avoir accepté de présider mon jury de thèse. Je tiens également à remercier mes rapporteurs, M. **Frederic Delom**, Maître de Conférence à l'Université de Bordeaux et M. **Maxime Lehmann**, Professeur à l'Université de Strasbourg, qui ont pris le temps de lire mon manuscrit et de juger mon travail.

Mes travaux de thèse ont été réalisés au sein du laboratoire EA3842 CAPTuR à la Faculté de Médecine de Limoges dirigé par le Professeur Marie-Odile Jauberteau. Ces travaux n'auraient pas pu être réalisés sans le financement apporté par l'Association Limousine d'Aide aux Insuffisants Respiratoires-Assistance Ventilatoire à Domicile (**ALAIR-AVD**) et l'Association du Développement Education Recherche-Limousin Poitou-Charentes (**ADER-LPC**) qui m'a permis d'obtenir ce financement. Je souhaite remercier le Dr François Bertin, le Dr Jeremy Tricard, l'ensemble du service de CTCV et du service d'immunologie du CHU de Limoges pour l'obtention des échantillons issus de patients.

Je souhaite remercier le Professeur **Marie-Odile Jauberteau** pour son accueil au sein du laboratoire et pour sa bienveillance. Je remercie mes directeurs de thèse, les Professeurs Fabrice Lalloué et François Vincent. **Fabrice** je vous remercie pour votre coup de téléphone un vendredi soir de juillet 2017, me demandant si « une thèse ça m'intéresse toujours ». Bien sûr que ça m'intéresse toujours, sans votre appel, la science n'aurait sûrement pas eu la même saveur. Je vous remercie pour l'attribution de cette thèse, pour votre implication, votre aide, votre soutien dans mon choix de poursuite d'étude. Je vous remercie pour les « brèves » et passionnantes conversations. **François**, je tiens à vous remercier pour tout ce que vous faites pour la Chaire de Pneumologie Expérimentale sans laquelle je ne serais pas là pour écrire ces remerciements. Je vous remercie également pour le temps que vous m'avez accordé et votre hospitalité au sein de votre service, me faisant découvrir la pneumologie. Merci pour votre soutien dans mon projet à venir. Que serait la Chaire de Pneumo sans **Thomas**, « mon pauvre » ? je te remercie pour ton aide, ta sympathie et tes expressions chantantes toujours avec l'accent du sud. **Camille**, je souhaite te remercier pour ton aide dans les manips et dans la découverte du labo, mes premiers pas à l'EA3842. Merci. **François (Gallet)**, merci pour ta rigueur scientifique et technique et tes blagues presque toujours très drôles.

Je tiens absolument à remercier les personnes sans qui je n'aurais ni fait de science ni de thèse. **Laure, Didier, Patrick et Alexis**, vous êtes la base de ma formation de scientifique. Je vous remercie d'avoir accepté le futur stagiaire que j'étais lorsque j'ai frappé à votre porte. Pendant ma thèse, peu de manips se sont faites sans que je ne repense à nos manips du bâtiment K et aux conseils pratiques et bienveillants dont vous m'abreuviez. Sans vos cours, vos TP, nos conversations je n'en serai pas là. **Alexis**, mes stages de Master n'auraient pas été aussi joués sans toi dans le labo. **Patrick**, la rigueur incarnée, vous m'avez appris la science telle qu'elle mérite et doit être faite. Les conversations pendant les incubations, les cinétiques enzymatiques, les mardis centrés en salle de TP, tout ça me rappelle de très bons souvenirs enrichissants qui me ramènent directement il y a cinq ans. **Didier**, plus qu'un enseignant, déjà en licence tu nous apportais ton expérience, tes conseils, tes leçons de vies, tes TDs qui pouvaient commencer par de la biochimie et finir par une longue discussion qui ne demandait qu'à éclipser le TD d'après. Merci pour les conversations blot. **Laure**, à la façon de Didier et de Patrick, tu as marqué ma licence dès la première année avec les séances de

biochimie du mardi à 17h30 stressantes et enrichissantes, un bon cocktail pour « obtenir minimum 16/20 sur cette partie ». La TAR a été déterminante pour ma poursuite en master, Merci pour cette semaine de TP qui m'a conduit à un stage de M1 puis de M2. Je te remercie pour tes encouragements, tes discours remotivant, merci pour ton accompagnement lors de mes premières manips. En BREF, je vous remercie énormément pour tout et notamment pour votre soutien inébranlable quand il y en eu le plus besoin. Je vous remercie pour l'excellence avec laquelle vous m'avez enseigné et encadré durant mes deux ans de master.

Je veux remercier les étudiants de M2 avec qui j'ai pu travailler ou tout du moins beaucoup parler. Je souhaite donc remercier **Tiffany** pour ta joie de vivre associée à un léger accent toulousain, **Dr Nina** dont les conversations ont permis de découvrir que les couloirs s'assombrissent passé 20h. Je te remercie Nina pour tes conseils de révision, ta patience et ta gentillesse et ta bienveillance quasi illimitée. Parmi nos stagiaires de M2, je veux remercier notre cheffe stagiaire bretonne, merci à toi **Anaëlle** (sans aucune peur de Dark Anaëlle du CHU). Merci pour toutes tes prévisions épidémiologistes, ton positivisme et bien sûr pour la planification des futures sorties sous le thème de la distillation, merci également pour ton soutien dans ma volonté de devenir médecin. Bien-sûr je serai très heureux d'être ton externe donc reviens vite à Limoges.

Barbara, je tiens à te remercier pour ton soutien au moment de la passerelle, pour ta sympathie, ta franchise et merci d'avoir supporté mon hyperactivité en salle de pause.

Sofiane, « **mon grand** », je te remercie pour toute ta bienveillance, tes questions et remarques toujours pertinentes et constructives lors de mes présentations, tes aides techniques, en manips et à la salle. Merci pour les longues conversations accompagnées de séries de soulevé de terre. Merci pour les conversations lunaires totalement incompréhensibles qu'on a pu avoir.

Je souhaite remercier l'ensemble des doctorants du laboratoire, **Aude** pour ta réceptivité à mes blagues, **Clément** pour les debriefs F1 et rugby du lundi, toujours sympa pour débiter la semaine. Je tiens également à remercier le binôme d'anciens doctorants quasi inséparable **Hugo** et **Sabrina**. Je remercie les nouvelles thésardes **May** et **Léa** (Poppy) je vous souhaite bon courage pour vos thèses qui ne font que commencer, enfin plus ou moins commencée (hein Poppy).

Difficile d'écrire mes remerciements sans te remercier **Axel** (que je suis ou qui me suit depuis le master). Merci pour toutes les infos et histoires insolites, parfois glauques dont tu as pu me faire part pendant ces six années. Merci pour ta participation et à l'établissement de ma beauferie.

Merci **Cécile**, **Céline**, **Cécé**... « Je sais plus c'est quoi son prénom ». Je te remercie pour ta patience malgré ma lourdeur, ta gentillesse, ton sérieux et ton exemplarité au sein du laboratoire. Céline, un concentré de sympathie Normande dans une si petite personne (Eh oui la lourdeur continue). Je termine ma thèse en ayant une grande fierté et un regret à ton propos, avoir embrouillé tout le labo par rapport à ton prénom et le regret que tu ne doutes pas encore de ton propre prénom. Je te remercie pour ta bonne humeur qui irradie dans les couloirs du labo.

Parmi les doctorants, je souhaite tout particulièrement te remercier **Jeremy**. Pas un simple doctorant, notre doctorant chirurgien, je veux te remercier pour ce que tu as apporté scientifiquement et médicalement à mes travaux, grâce à toi et au service de CTCV nous avons pu collecter les prélèvements de patients et produire une part importante des résultats

de notre article. Je souhaite bien évidemment te remercier pour ta personne avec qui j'ai pu travailler, discuter, boire des cafés, profiter de la cuisine de l'internat et découvrir ce magnifique métier de Chirurgien Thoracique que tu pratiques avec une très grande humanité. Grâce à toi, j'ai pu découvrir le monde de la médecine et de la chirurgie ce qui m'a fortement motivé pour finir cette thèse avant de repartir en médecine. Je te remercie pour ton soutien, ton aide, ta gentillesse, ta pédagogie hors stage et pendant les stages. Je te remercie aussi d'être un exemple de médecin que j'espère devenir. J'espère avoir, un jour, la chance de retravailler avec toi.

Impossible de ne pas te remercier **Bathout**. Un côté sombre et un côté clair. Difficile de savoir qui tu es vraiment, ne t'ayant jamais vu dans la même pièce que Batman, je persiste à penser que vous ne faites qu'une seule et même personne (ce qui t'arrangerait bien vis-à-vis de Superman). Hey Martinez ! Bien que tout le monde le pense tu es quelqu'un de très sympa, à la limite d'être brave. Presque plus ancienne que moi à l'EA 3842, tu as commencé en tant que PiouPiou capillairement instable, encore une difficulté pour t'identifier. Tu as survécu aux stages, à mon humour noir et à ma lourdeur et maintenant à la thèse. Merci **Elodie** (Eloooow !!!!!) pour ta bonne humeur (côté clair), ton coaching mental, ton aide et ton soutien sans faille en tant que public de mon humour parfois douteux. Je te remercie pour ta patience et ta bienveillance. Merci pour ta complicité plus que nécessaire pour la survie de tout doctorant à l'EA3842. Je te remercie de m'avoir permis de me resocialiser et de devenir le doctorant le plus lourd voire le plus gênant du labo. Je tiens également à te remercier pour le temps que tu as consacré à me relire, me rappelant que je suis « *un illetteré* » (« ça veut dire homme de lettre en italien »).

Je souhaite remercier mes amis anciens limougeaud expatriés. **Caro**, ma jeune Demartyyyy, ma colocataire intermittente, ma diététicienne à domicile, je te remercie pour tes conseils en nutrition que, bien-sûr, je n'applique que trop peu. Je te remercie pour ta patience, ta gentillesse, ton soutien, les soirées d'été sur le balcon à tenter d'apercevoir des étoiles filantes, à parler de nos vies et de mon désir de passerelle après la thèse. Je te remercie pour ta présence sans faille, toujours là quand j'ai besoin de toi, toujours présente pour me soutenir. Je remercie également le gala de 2014 qui m'a permis de rencontrer une magnifique personne dont les éclats de rire et la bonne humeur pourrait servir d'agent thérapeutique remplaçant bientôt la sortiline. Je souhaite bien-sûr remercier mes tourangeaux, **Marine (Mamar)** et mon **Thibault**. **Mamar**, comment imaginer que des blagues aux goûts douteux seraient le début de notre amitié ? Je te remercie pour ta franchise de polonaise, tes expressions, pas toujours évidentes à comprendre, provenant directement du Berry. Je souhaite bien-sûr te remercier pour le soutien que tu m'as apporté, pour les soirées, les après-midis, les matinées, enfin les week-ends qu'on a pu passer ensemble. Et enfin, je pense qu'il m'est nécessaire de te remercier pour avoir réussi à nous supporter Thibs et moi, deux génies très incompris dont l'EEG totalement plat a eu raison du Futuroscope. Mon **Thibault**, nos génies se sont rencontrés lors d'un magnifique TP de cartographie et de léchage de cailloux, le cocktail ne pouvant provoquer qu'une belle amitié et révéler notre meilleur potentiel. Je te remercie pour tout ce que tu as pu faire pour moi, pour ce que tu représentes, pour ta bonne humeur, ton humour, ton autodérision, ton côté tête en l'air provoquant de très bons souvenirs, les conversations sans fin. Je te remercie pour ces week-ends passés à se vider la tête, à refaire le monde, la science et aussi à profiter du dimanche pour découvrir de très bons films. Je te remercie pour toutes ces soirées qui auraient été dénuées de sens sans toi. Bien-sûr, je te remercie pour ton soutien incomparable tout au long de ma thèse. Je vous remercie tous les

trois pour votre présence, pour tous ces moments partagés et ceux à venir (kebab crevette is coming).

Je souhaite à présent remercier ma **famille** qui m'a toujours encouragé dans mes décisions et dans mes études. Je les remercie pour leur patience, leur confiance et leur soutien concernant les études que j'ai pu faire ou celles à venir. Je vous remercie pour toutes ces années à m'entendre raconter des choses devant un diapo, à me supporter et à m'encourager quand même. Je vous remercie d'avoir cru en moi, même si avant la fac c'était mal engagé. Je vous remercie pour les sacrifices que vous avez fait pour que je puisse en arriver là et aussi pour ceux à venir. Vous n'en avez pas encore fini avec mes diapos. Je vous remercie également pour le goût du travail que vous m'avez transmis. Je tiens, en plus, à remercier mes **grands-parents** qui m'ont **TOUJOURS** dit « dire bonjour et merci, ça ne coute rien et ça fait plaisir ». Plaisir partagé.

MERCI.

Droits d'auteurs

Cette création est mise à disposition selon le Contrat :

« **Attribution-Pas d'Utilisation Commerciale-Pas de modification 3.0 France** »

disponible en ligne : <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/fr/>



Table des matières

Liste des abréviations.....	19
Partie I. Le cancer du poumon.....	25
I.1. Anatomie du poumon.....	25
I.2. Epidémiologie du cancer bronchique.....	26
I.3. Facteurs de risques dans le cancer du poumon.....	26
I.4. Les symptômes et diagnostic.....	26
I.5. Classifications.....	27
I.5.1. La classification histologique selon l'OMS.....	27
I.5.2. La classification TNM selon l'UICC.....	29
I.6. Les cancers bronchiques non à petites cellules.....	30
I.6.1. La tumorigenèse.....	30
I.6.2. Les altérations moléculaires dans le CBNPC.....	31
I.6.2.1. Les proto-oncogènes.....	32
I.6.2.1.1. Les principales mutations retrouvées dans le CBNPC.....	32
I.6.2.1.2. Les réarrangements chromosomiques retrouvés dans le CBNPC.....	34
I.6.2.2. Les gènes suppresseurs de tumeurs.....	35
I.7. Les approches thérapeutiques du CBNPC.....	36
I.7.1. Les thérapies conventionnelles.....	37
I.7.2. Les thérapies ciblées.....	37
I.7.2.1. Thérapies ciblées basées sur des inhibiteurs pharmacologiques du site de fixation de l'ATP.....	37
I.7.2.2. Autres types de thérapies ciblées.....	39
I.7.3. L'immunothérapie.....	39
I.7.4. Les résistances thérapeutiques dans le CBNPC.....	39
I.7.4.1. La résistance primaire aux thérapies ciblées.....	40
I.7.4.2. L'échappement à l'apoptose.....	41
I.7.4.3. La résistance acquise aux inhibiteurs de tyrosine kinase ciblant l'EGFR.....	42
I.7.4.4. L'activation des voies alternatives.....	42
Partie II. Les récepteurs à domaine tyrosine kinase.....	45
II.1. Généralités.....	45
II.1.1. Historique et découverte de l'EGFR.....	45
II.1.2. Les membres de la famille ERBB.....	46
II.1.3. La structure de l'EGFR.....	47
II.1.4. L'influence de l'épissage alternatif de l'EGFR sur sa signalisation.....	49
II.1.5. L'expression de l'EGFR.....	50
II.1.6. Les rôles physiologiques de l'EGFR.....	50
II.1.7. Les mutations de l'EGFR.....	51
II.1.8. L'EGFR et les miARN dans le cancer.....	51
II.2. L'activation de l'EGFR.....	52
II.2.1. Les ligands de l'EGFR.....	52
II.2.2. La dimérisation de l'EGFR.....	53
II.2.3. La trans-autophosphorylation de l'EGFR.....	53
II.3. Les voies de signalisation canoniques.....	54
II.3.1. La voie de signalisation RAS-RAF-MEK-ERK MAPK.....	54
II.3.2. La voie de signalisation PI3K-AKT-mTOR.....	55

II.3.3. La voie de signalisation de la phospholipase Cy	55
II.3.4. La voie de la kinase SRC	56
II.3.5. La voie STAT (transducteurs du signal et activateurs transcriptionnels)	57
II.4. Les voies de signalisation non-canoniques de l'EGFR	57
II.4.1. Les fonctions nucléaires de l'EGFR	57
II.4.1.1. La translocation nucléaire de l'EGFR	57
II.4.1.2. La régulation transcriptionnelle par l'EGFR	59
II.4.1.3. Les interactions entre l'EGFR et les autres protéines nucléaires (non-facteurs de transcription ou co-activateurs transcriptionnels).....	61
II.4.1.4. La fonction kinase de l'EGFR	61
II.4.1.5. L'EGFR nucléaire en tant que facteur de mauvais pronostic dans le cancer .	62
II.4.1.6. L'EGFR nucléaire et résistances thérapeutiques.....	62
II.4.2. L'EGFR exosomal	63
II.4.2.1. L'EGFR exosomal en tant que biomarqueur.....	64
II.4.2.2. La signalisation exosomale dans la communication intercellulaire	64
II.5. La régulation de l'EGFR.....	65
II.5.1. Les signaux d'internalisation.....	65
II.5.2. L'endocytose médiée par la clathrine.....	65
II.5.3. L'endocytose indépendante de la clathrine	67
II.5.4. Le devenir de l'EGFR	67
II.5.4.1. L'ubiquitinylation et le tri vers les MVBs via le complexe ESCRT	68
II.5.4.2. Le recyclage de l'EGFR	68
II.5.4.3. Devenir alternatif de l'EGFR au niveau mitochondrial	69
II.5.5. Le trafic de l'EGFR dans le cancer	70
II.5.5.1. L'impact des mutations oncogéniques sur le trafic de l'EGFR	70
II.5.5.2. Influence des thérapies anti-cancéreuses sur le trafic de l'EGFR.....	70
II.5.5.3. L'impact des partenaires de l'EGFR sur sa régulation.....	72
Partie III. La sortiline.....	75
III.1. La découverte de la sortiline	75
III.2. Le domaine VPS10 de la sortiline	76
III.3. Les ligands de la sortiline	77
III.4. Structure et trafic de la sortiline	77
III.5. L'influence de la sortiline sur le métabolisme cellulaire	79
III.5.1. La régulation de Glut-4 par la sortiline	79
III.5.2. La sortiline module le trafic des lipoprotéines	80
III.6. Le rôle de la sortiline sur la signalisation des neurotrophines et de la neurotensine..	80
III.6.1. La sortiline et le trafic de la neurotensine.....	80
III.6.2. La sortiline et les pro-neurotrophines.....	81
III.7. L'implication de la sortiline dans le cancer	82
III.7.1. La sortiline dans le glioblastome.....	82
III.7.2. La sortiline dans le cancer du sein.....	82
III.7.3. La sortiline dans le cancer colorectal	83
III.7.4. La sortiline dans la leucémie	83
III.7.5. La sortiline dans le cancer de l'ovaire	83
III.7.6. La sortiline dans le cancer de la prostate.....	84
III.7.7. La sortiline dans le cancer bronchique.....	84
Partie IV. Objectifs.....	87

Partie V. Matériels et méthodes.....	89
Partie VI. Résultats.....	95
Partie VII. Discussion	135
Partie VIII. Conclusion / Perspectives.....	145
Références bibliographiques	147

Table des illustrations

Figure 1 : Anatomie du système respiratoire d'après « PDQ Cancer Information Summaries »

Figure 2 : Localisation de la tumeur et origine des cellules tumorales des différents types de cancer

Figure 3 : Schéma des propriétés des cellules cancéreuses (Hanahan et al., 2000)

Figure 4 : Les principales altérations génétiques observées dans les ADCs pulmonaires (Pao et al., 2012)

Figure 5 : Schéma récapitulatif des différents processus conduisant à la perte d'efficacité des gènes suppresseurs de tumeurs (Li-Hui Wang et al., 2018)

Figure 6 : Modélisation structurale de l'EGFR et de ses sites d'interaction aux ITKs (Kumar et al., 2008)

Figure 7 : Mutations de l'EGFR touchant le domaine tyrosine kinase induisant une sensibilité ou une résistance au ITKs d'après Sharma et al., 2007

Figure 8 : La superfamille de RTKs d'après Lemmon and Schlessinger, 2010

Figure 9 : Structure de l'EGFR d'après Siwak et al., 2009

Figure 10 : L'EGFR et ses différents variants d'après Abou-Fayçal et al., 2017

Figure 11 : Représentation schématique de la structure et de l'activation de l'EGFR d'après (Sigismund et al., 2018)

Figure 12 : Les voies de signalisation activées par l'EGFR d'après Scaltriti et Baselga, 2006

Figure 13 : La translocation nucléaire de l'EGFR d'après Brand, 2011

Figure 14 : Les différentes fonctions nucléaires de l'EGFR d'après Gazzeri, 2018

Figure 15 : Représentation schématique du mécanisme d'endocytose médiée par la clathrine d'après Madshus and Stang, 2009

Figure 16 : Trafic intracellulaire de l'EGFR induisant sa dégradation ou son recyclage d'après Madshus and Stang, 2009

Figure 17 : Le trafic intracellulaire de l'EGFR activé et ses différents devenir d'après Tomas et al., 2013

Figure 18 : Les membres de la famille des récepteurs à domaine VPS10 d'après Glerup et al., 2014

Figure 19 : Structure du domaine VPS10 de la sortiline obtenue par cristallographie d'après Leloup et al., 2017

Figure 20 : Les voies impliquées dans le trafic intracellulaire de la sortiline d'après Talbot et al., 2019

Figure 21 : Schéma de la régulation de l'EGFR par la sortiline (Al-Akhrass et al., 2017)

Table des tableaux

Tableau 1 : Liste des gènes ciblés par qPCR et les amorces correspondantes

Liste des abréviations

Aa	Amino acid
ADAM	Disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein
ADC	Adenocarcinoma
AKT	RAC-beta serine/threonine-protein kinase
ALK	Anaplastic Lymphoma Kinase
AP2	Adaptor Protein complex 2
APPL1	DCC-interacting protein 13-alpha
Areg	Amphiregulin
ARF	ADP Ribosylation Factor
ATM	Serine-protein kinase ATM
ATP	Adenosine triphosphate
ATRS	AT-rich sequence
BCL-2	B-cell lymphoma 2
BDNF	Brain-Derived Neurotrophic Factor
BIM	Bcl-2-like protein 11
BPCO	Broncho Pneumopathie Chronique Obstructive
BRCP	ABCG2 ATP Binding Cassette Subfamily G Member 2
BTC	Betacellulin
Cbl	E3 ubiquitin-protein ligase CBL
CBNPC	Cancer Bronchique Non à Petite Cellules
CBPC	Cancer Bronchique à Petites Cellules
CCR	Colorectal cancer
CDC2	Cyclin-dependent kinase 2
CE	Carcinome épidermoïde
ChIP	Chromatin immunoprecipitation
c-Jun	AP-1 transcription factor
COPI	Coat Protein Complex I
COX-2	Cyclooxygenase 2
CTLA-4	Cytotoxic T-lymphocyte protein 4
DAG	Diacylglycerol
DDR2	Discoidin domain-containing receptor 2
DLBCL	Diffuse large B-cell lymphoma
DNA-PK	DNA-dependent protein kinase
E1A	Episodic Ataxia Type 1
EGF	Epidermal Growth Factor
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor

EML4	Echinoderm Microtubule Like protein 4
EMT	Epithelial–Mesenchymal Transition
EPGN	Epigen
EPR	Epiregulin
Eps-15	Epidermal growth factor receptor substrate 15
Epsin-1	Clathrin interactor EPSIN 1
ERBB1	Tyrosine kinase-type cell surface receptor HER-1
ERBB2	Tyrosine kinase-type cell surface receptor HER-2
ERBB3	Tyrosine kinase-type cell surface receptor HER-3
ERC	Endocytic Recycling Compartment
ERK	Extracellular Regulated mitogen-activated Kinase
ESCRT	Endosomal Sorting Complex Required for Transport
FAK	Focal Adhesion Kinase
FGF	Fibroblast Growth Factor
FGFR1	Fibroblast Growth Factor Receptor 1
FHIT	Fragile Histidine Triad Gene
Gab-1	GRB2-associated-binding protein 1
GBM	Glioblastoma
GDP	Guanosine Diphosphate
Glut-4	Solute carrier family 2, facilitated glucose transporter member 4
Grb-2	Growth factor receptor-bound protein 2
GSK-3 β	Glycogene synthase kinase 3 beta
GTP	Guanosine Triphosphate
HB-EGF	Heparin-Binding EGF
HDM2	E3 Ubiquitin-Protein Ligase Mdm2
HER1	Receptor tyrosine-protein kinase erbB-1
HER2	Receptor tyrosine-protein kinase erbB-2
HER3	Receptor tyrosine-protein kinase erbB-3
HER4	Receptor tyrosine-protein kinase erbB-4
HMTase	Histone-methyltransferase
IGF-1	Insulin-like growth factor I
IGF-1R	Insulin-like growth factor I Receptor
IHC	Immunohistochimie
INTERNET	Integral trafficking from the ER to the Nuclear Envelope Transport
IP3	Inositol 1,4,5-triphosphate
ITK	Tyrosine Kinase Inhibitor
ITSN	Intersectine

JAK	Janus Kinase
kDA	Kilo Dalton
KO	Knockout
KRAS	KRAS Proto-Oncogene, GTPase
KRT-7	Keratin, type II cytoskeletal 7
LAMPTOR1	Late endosomal/lysosomal adaptor, MAPK and MTOR activator 1
LDL	Low-density lipoprotein
LKB1	Liver Kinase B1
LMP1	Lysosome-associated membrane glycoprotein
LpL	Lipoprotein Lipase
LRP	Low-density lipoprotein receptor-related protein
M6PR	Mannose-6-Phosphate Receptor
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MAPKK	Mitogen-activated protein kinase kinase
MEK	Dual specificity mitogen-activated protein kinase kinase 1
MET	Hepatocyte growth factor receptor
miARN	MicroARN
mTOR	Mechanistic Target Of Rapamycin Kinase
MUC1	Mucin-1
MVB	Multivesicular body
NGF	Nerve Growth Factor
NLS	Nuclear localization signal
NRG	Neureguline
NTRK1	Neurotrophic tyrosine kinase receptor type 1
NTS	Neurotensin
NTSR-1	Neurotensin receptor 1
NTSR-2	Neurotensin receptor 2
NTSR-3	Neurotensin receptor 3 = sortilin
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
P14ARF	Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 2A
P16INK4	Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 2A
P53	Tumor Protein P53
PCNA	Proliferating cell nuclear antigen
PD1	Programmed cell death protein 1
PDGF	Platelet-derived growth factor
PKD1	3-phosphoinositide-dependent protein kinase 1
PDL1	Programmed cell death protein ligand 1

PGRN	Progranulin
PI3K	Phosphoinositide-3-kinase
PI3KCA	Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphate 3-Kinase Catalytic Subunit Alpha
PIP2	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate
PIP3	Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate
PKC	Protein kinase C
PKC ϵ	Protein Kinase C Epsilon
PLC	Phospholipase C
PNPase	Polynucleotide phosphorylase
PTEN	Phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate 3-phosphatase and dual-specificity protein phosphatase PTEN
Rab	Ras-related protein Rab
RAF	RAF proto-oncogene serine/threonine-protein kinase, effector of Ras
RAP	Receptor associated protein
RAS	Resistance to audiogenic seizures GTPase Hras
RHA	RNA Helicase A
RNse	RNA nuclease
ROS1	Proto-oncogene tyrosine-protein kinase ROS
RTK	Tyrosine kinase receptor
SH2	Src homology 2
SH3	Src homology 3
SHC	Src homology 2 domain-containing-transforming protein C
siARN	Small interfering RNA
Sp1	Sp1 Transcription Factor
SRC	Proto-oncogene tyrosine-protein kinase Src
STAT	Signal transducer and activator of transcription
TEP	Tomographie par émission de positons
TES	Trk EGFR Sortilin complex
TGF α	Transforming Growth Factor alpha
TGF β	Transforming Growth Factor beta
TIF2	Transcriptional Intermediary Factor 2
TNM	Tumor Node Metastasis
TP53	Tumor Protein P53
Trk	Neurotrophic Receptor Tyrosine Kinase
TTF-1	Thyroid Transcription Factor 1
UICC	Union for International Cancer Control
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VEGF-A	Vascular Endothelial Growth Factor A

VEGF-R-2 Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-2
VLDL Very Low-Density Lipoprotein
Vps Vacuolar protein sorting

Partie I. Le cancer du poumon

I.1. Anatomie du poumon

Le poumon droit et le poumon gauche contenus dans la cavité thoracique sont chacun entourés d'une séreuse : la plèvre dont les deux feuillets forment la cavité pleurale. Les poumons ont la forme d'un demi-cône dont la base inférieure épouse la convexité du diaphragme. Cet organe ayant une couleur allant du rose au gris est élastique. Sa forme et son volume sont dus à la présence d'air dans ses alvéoles. Une fois vidé de son air, celui-ci se rétracte sur lui-même, atteignant un volume environ 30% plus faible (Parson, 2009). Le poumon est un organe segmenté en plusieurs lobes par la présence de scissures. Le poumon droit présente une scissure oblique et une scissure horizontale le divisant en trois lobes (supérieur, moyen et inférieur). Le poumon gauche ne possède qu'une seule scissure oblique le divisant en deux lobes (supérieur et inférieur). Chaque poumon est ventilé par une bronche principale qui se subdivise en bronches lobaires (une par lobe), se divisant à leur tour en bronches segmentaires, sous-segmentaires, donnant finalement naissance aux bronchioles ventilant les alvéoles. Les lobes sont constitués de lobules pulmonaires qui représentent l'unité fonctionnelle du poumon. Le lobule pulmonaire est pénétré par son sommet par la bronchiole qui, en se divisant successivement, donne les bronchioles terminales qui ventilent les alvéoles. Les alvéoles dont la surface totale approche les 90m² et les capillaires respiratoires constituent la barrière alvéolo-capillaire qui permet les échanges gazeux. Les poumons sont irrigués principalement par les artères et veines bronchiques (Figure 1).

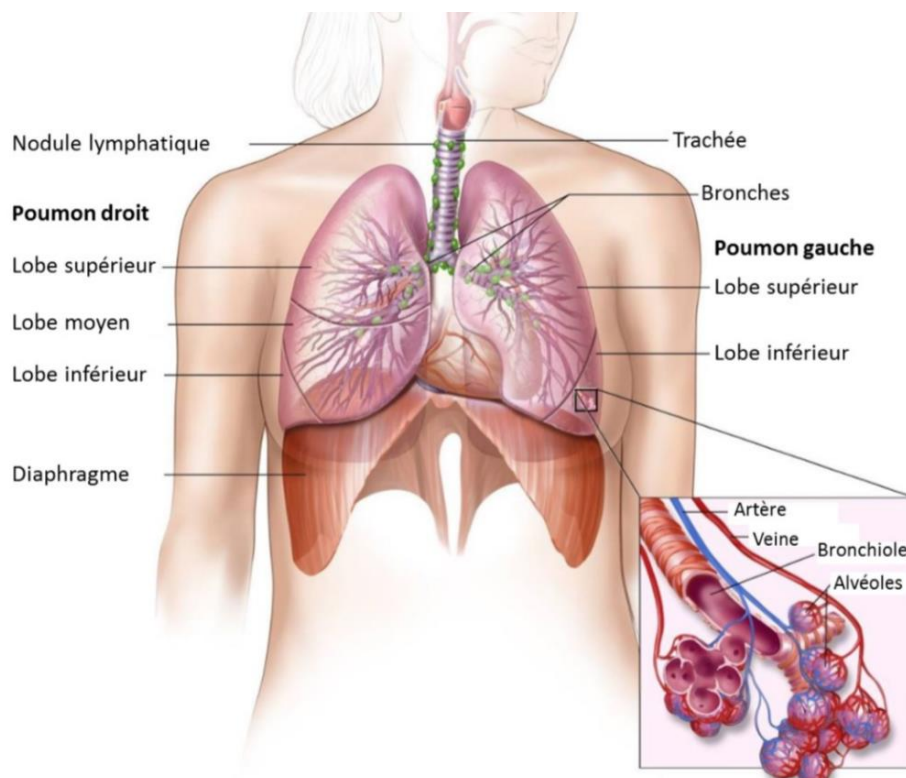


Figure 1 : Anatomie du système respiratoire d'après « PDQ Cancer Information Summaries »

Schéma représentant le système respiratoire, comprenant le diaphragme surmonté des deux poumons, eux-mêmes reliés aux voies aériennes par le biais des bronches et de la trachée. L'air inhalé passe par la trachée, les bronches, les bronchioles et atteint le réseau sanguin au travers des alvéoles pulmonaires

I.2. Épidémiologie du cancer bronchique

Le cancer bronchique est depuis plusieurs dizaines d'années le cancer le plus répandu à travers le monde selon l'International Agency for Research on Cancer (IARC) de 2017 avec une mortalité annuelle supérieure à 1 million (Herbst *et al.*, 2018). En France, en 2018, selon l'institut national du cancer, ce type de cancer a causé la mort de 33 117 personnes. Il est la première cause de mortalité par cancer. L'âge médian au diagnostic est de 67 ans chez l'homme et de 65 ans chez la femme. Le cancer bronchique présente un pronostic sombre avec une survie à 5 ans de 17%. La prévalence est de 46 363 nouveaux cas en 2018 : 31 231 chez l'homme et 15 132 chez la femme. L'incidence du cancer du poumon est plus importante chez l'homme (65%) que chez la femme (35%) et ce quel que soit l'âge du sujet. Malgré ces chiffres, le cancer bronchique ne cesse de progresser chez la femme.

I.3. Facteurs de risques dans le cancer du poumon

Le principal type de cancer bronchique rencontré en France est l'adénocarcinome qui représente 35 à 45% des cas, suivi du carcinome épidermoïde et le cancer bronchique à petites cellules (CBPC). L'une des principales causes de cancer est le tabagisme qui cause entre 80 et 90% des cas (American Cancer Society®, 2019). Les cas restants sont rencontrés chez des patients non-fumeurs, chez qui ce type de cancer représente la 7^{ème} cause de décès par cancer à travers le monde (Sun *et al.*, 2007 ; Thun *et al.*, 2008). Chez les fumeurs, le risque relatif de développer un cancer bronchique est 20 fois plus élevé que chez une personne non-fumeuse. Chez les patients non-fumeurs atteints de cancer bronchique, les principaux facteurs de risque démontrés sont : le tabagisme passif, l'exposition à des agents cancérigènes (radon, amiante...), la prédisposition génétique ou encore la contraction de maladies pulmonaires chroniques telles que la Broncho Pneumopathie Chronique Obstructive (BPCO) (Durham et Adcock, 2015). De nombreuses études ont pu mettre en évidence des différences histologiques et moléculaires entre les cancers du fumeur et du non-fumeur ; les fumeurs contractants plus couramment des cancers à petites cellules comme les carcinomes squameux (53%) et les non-fumeurs ayant majoritairement des adénocarcinomes (ADC) (62%) (McCarthy *et al.*, 2012 ; Samet *et al.*, 2009 ; Subramanian et Govindan, 2007 ; Sun *et al.*, 2007 ; Dela Cruz *et al.*, 2011).

I.4. Les symptômes et diagnostic

Les patients atteints de cancer bronchique présentent peu de symptômes spécifiques de cette pathologie. En effet, seuls des signes généraux peuvent être observés comme un amaigrissement ou une modification de l'état général, laissant alors la possibilité à la tumeur de se développer et de se disséminer sans pouvoir suspecter sa présence. Toutefois, des manifestations respiratoires apparaissent au fil du développement de la pathologie telles que la toux, la dyspnée, l'hémoptysie ou encore des douleurs thoraciques. L'apparition tardive des symptômes spécifiques du cancer bronchique provoque inévitablement un diagnostic à un

stade avancé de la pathologie, stade auquel la tumeur est inopérable dans 80% des cas. La difficulté de diagnostic et les stades de diagnostic tardifs sont en partie responsables de la faible survie à 5 ans (environ 17%) (Spiro *et al.*, 2007).

Malgré la connaissance des symptômes du cancer bronchique, aucun ne permet de déterminer le type et le stade de la tumeur. L'identification de celle-ci passe par des examens radiologiques comme la radiographie du thorax et le scanner thoracique. Les dernières décennies ont permis l'évolution et l'apparition de nouveaux outils d'imagerie permettant le diagnostic du cancer bronchique. Dans ces innovations nous retrouvons notamment la tomographie par émission de positons (TEP), la bronchoscopie confocale et la micro-endoscopie confocale (Sutedja, 2003). L'évolution des techniques d'imagerie médicale participent à l'amélioration de la médiane de survie des patients. En effet, la tomographie par émission de positons constitue une réelle avancée dans le diagnostic en se basant sur l'activité métabolique et pas uniquement sur l'anatomie des structures observées. Le diagnostic de la tumeur passe également par la réalisation d'une fibroscopie bronchique couplée à une biopsie de la tumeur ou de lésions suspectes. Les prélèvements réalisés permettent alors de dresser un diagnostic moléculaire de la tumeur en recherchant la présence de mutations oncogéniques telles que celles présentes au niveau du gène codant l'*Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR)*, *BRAF*, *KRAS*, *PI3K*, *HER2* ou encore la présence de réarrangements chromosomiques (*Anaplastic Lymphoma Kinase (ALK)* ou *ROS1*). Le diagnostic moléculaire s'ajoute à la classification TNM (Classification des tumeurs malignes) représentative du degré d'envahissement tumoral dressé grâce à l'imagerie médicale.

I.5. Classifications

Actuellement, deux systèmes formels sont utilisés pour caractériser les cancers bronchiques. Une première classification développée par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) qui est basée sur le type histologique des tumeurs et une seconde proposée par l'Union for International Cancer Control (UICC) reposant sur la taille de la tumeur primaire et sa capacité d'extension. Ces différentes classifications permettent à la suite du diagnostic de prévoir l'évolution de la maladie et de mettre en place la stratégie thérapeutique la plus adéquate.

I.5.1. La classification histologique selon l'OMS

La classification histologique de l'OMS permet de distinguer deux types principaux de cancer bronchique : le cancer bronchique non à petites cellules (**CBNPC**) représentant 85% des cas et le cancer bronchique à petites cellules (**CBPC**) représentant 15% des cas (Herbst *et al.*, 2008).

Les **CBPC** sont des tumeurs malignes de l'épithélium bronchique caractérisées par une croissance rapide et un haut potentiel métastatique précoce. Ces tumeurs, provenant de cellules neuroendocrines, sont dans 60 à 70% des cas diagnostiquées à un stade étendu (Veronesi *et al.*, 2015) et presque exclusivement chez des fumeurs (98% des cas) (Brambilla *et al.*, 2009) (Figure 2). Etant données l'agressivité, la croissance rapide et l'étendue de la

tumeur au diagnostic, le pronostic pour ce sous-type de cancer bronchique est très sombre avec une survie médiane sans traitement de 2 à 4 mois. En effet, le protocole thérapeutique dépendant du stade de la tumeur, il est difficile de mettre en place un traitement. La survie moyenne à 2 ans pour ce type de cancer est comprise entre 5 et 20% (Van Meerbeeck *et al.*, 2011).

Les **CBNPC** sont dus dans 85% des cas au tabagisme. Ils sont sous-divisés en trois sous-types ayant des caractéristiques histologiques différentes : les carcinomes à grandes cellules et plus majoritairement les carcinomes épidermoïdes (CEs) et les adénocarcinomes (ADCs) (Figure 2).

Les **adénocarcinomes (ADCs)** bronchiques sont les plus couramment observés, ils représentent environ 50% des cas de CBNPC. Ils proviennent des voies respiratoires distales et plus particulièrement des pneumocytes de type II, des cellules Clara ou des cellules souches bronchio-alvéolaires (Figure 2). Les ADCs sont principalement retrouvés chez les hommes et correspondent au sous-type de CBNPC le plus retrouvé chez les non-fumeurs (Brambilla *et al.*, 2010 ; Davidson *et al.*, 2013). Les ADCs étant originaires de la partie distale du poumon, ceux-ci expriment des marqueurs moléculaires spécifiques de cette partie du poumon, tels que le facteur de transcription de la thyroïde 1 (TTF-1) et la kératine 7 (KRT-7) (Brambilla *et al.*, 2010 ; Davidson *et al.*, 2013). Ce sous-type de CBNPC se divise en sous catégories d'ADCs (Travis *et al.*, 2015).

Les **carcinomes épidermoïdes (CEs)** (ou squameux ou malphigiens), représentant environ 40% des cas de CBNPC, concernent les voies respiratoires proximales (Figure 2). Ceux-ci sont fortement associés au tabagisme et à l'inflammation chronique (Brambilla *et al.*, 2010 ; Davidson *et al.*, 2013). Ces carcinomes sont caractérisés par une différenciation squameuse proche de l'épithélium pseudostratifié retrouvée sur les parois de la trachée et à la surface des voies respiratoires supérieures (Rock *et al.*, 2010). Les CEs présentent des marqueurs moléculaires tels que la cytokératine 5, la cytokératine 6, les facteurs de transcription SRY-box 2 (SOX-2) et p63 à l'inverse des ADCs (Brambilla *et al.*, 2010 ; Davidson *et al.*, 2013 ; Lu *et al.*, 2010).

Les **carcinomes à grandes cellules**, représentant 10% des cas de CBNPC, sont diagnostiqués par exclusion. Ce sous-type, caractérisé par un aspect indifférencié, ne possède pas les caractéristiques histologiques des ADCs ni des carcinomes épidermoïdes ou encore des CBPC. Ces tumeurs sont généralement situées dans le parenchyme pulmonaire.

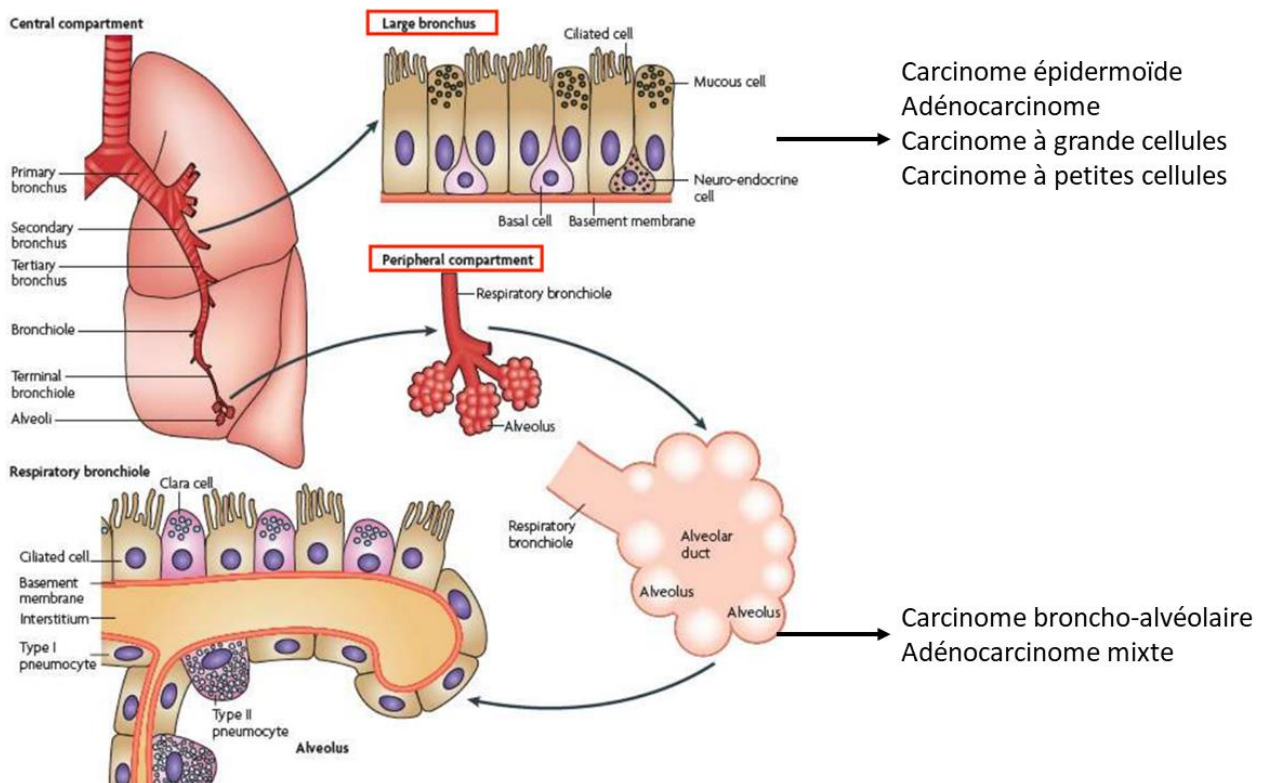


Figure 2 : Localisation de la tumeur et origine des cellules tumorales des différents types de cancer

Le système bronchique peut être subdivisé en deux parties ; une partie proximale correspondant aux bronches de large diamètre et une partie distale composée des bronchioles, des bronchioles terminales et des alvéoles. La partie proximale est le lieu d'initiation des carcinomes épidermoïdes, des adénocarcinomes, des carcinomes à grandes cellules et à petites cellules. La partie distale quant à elle, constitue le foyer de développement des carcinomes broncho-alvéolaire et des adénocarcinomes mixtes.

I.5.2. La classification TNM selon l'UICC

Une seconde classification établie par l'UICC prend en compte les critères anatomiques et l'étendue du cancer au sein de l'organe malade et de l'organisme entier. Elle se base sur la croissance et l'extension de la tumeur solide. Elle permet d'établir un pronostic pour le malade et de mettre en place une stratégie thérapeutique. Ce système de classification appelé TNM comprend trois caractéristiques anatomiques (Rami-Porta *et al.*, 2015) :

- **T** pour « **Tumor** » qui indique la taille et la localisation de la tumeur primaire dans l'organe atteint,
- **N** pour « **Node** » renseignant sur l'envahissement ou non des ganglions lymphatiques adjacents,
- **M** pour « **Metastasis** » indiquant la présence ou non de métastase(s) et leur(s) localisation(s).

Dans le cas du cancer bronchique, les sites métastatiques préférentiels sont le second poumon, le cerveau, le tissu osseux, le foie, les reins et les glandes surrénales (Popper *et al.*, 2016). A ces lettres, sont associés des chiffres apportant des détails concernant l'avancée du cancer.

A cette classification TNM, s'associent les stades de progression de la tumeur, allant du stade 0 au stade IV.

- Stade 0 : cancer non invasif dit *in situ*
- Stade I : invasion localisée, sans métastase
- Stade II : extension limitée localement et/ou atteinte ganglionnaire faible
- Stade III : atteinte locale importante et/ou atteinte ganglionnaire importante
- Stade IV : présence de métastase(s).

L'association de la classification TNM et des stades anatomiques permet de conclure quant au stade global du cancer. Dans le cas du cancer bronchique non à petites cellules (CBNPC), le diagnostic se fait souvent dans des stades avancés.

I.6. Les cancers bronchiques non à petites cellules

L'apparition du cancer bronchique non à petites cellules fait suite à la mise en place de mutations oncogéniques ou à l'altération de gènes suppresseurs de tumeurs. Ces processus sont retrouvés dans les différents types de cancers bronchiques non à petites cellules (adénocarcinomes, carcinomes épidermoïdes, carcinome bronchique à grandes cellules). Ces étapes seront abordées dans cette partie.

I.6.1. La tumorigenèse

La tumorigenèse du cancer bronchique est similaire à celle des autres cancers et reposent sur une multitude de processus altérant les caractéristiques génétiques et épigénétiques de la cellule et permettant ainsi sa transformation oncogénique. La tumorigenèse du CBNPC est similaire à celle retrouvée dans les autres types de cancer. Les principales caractéristiques et marques de la tumorigenèse sont celles décrites dans le cercle de Hanahan et Weinberg (Figure 3) (Hanahan et Weinberg., 2000).

Parmi ces caractéristiques on peut notamment citer la capacité des cellules à induire des signaux prolifératifs tels que l'activation constitutive de l'EGFR. Ces cellules peuvent également contourner les mécanismes visant à limiter la croissance tumorale comme on peut le voir dans le cas de mutations de gènes suppresseurs de tumeurs. Afin d'irriguer et de favoriser l'approvisionnement des cellules tumorales en nutriments, celles-ci parviennent par le biais de facteurs pro-angiogéniques tel que le facteur de croissance endothélial vasculaire (VEGF) à créer un nouveau réseau vasculaire entourant la tumeur. Les nouveaux vaisseaux ainsi obtenus vont, en plus de participer à l'irrigation de la tumeur, à l'exportation de cellules tumorales ayant résisté à la mort par anoïkose au travers de phénomènes métastatiques.

L'initiation du développement tumoral passe également par la résistance à la mort cellulaire programmée notamment en cas de dommages importants à l'ADN ou encore en devenant immortelle en résistant à la sénescence grâce à une forte activité de la télomérase (Mizukoshi et Kaneko, 2019). Plus récemment, de nouvelles propriétés ont été ajoutées telles que la capacité d'échappement au système immunitaire, les possibilités de reprogrammation du métabolisme, l'instabilité génomique ou l'induction de la réponse inflammatoire (Hanahan *et al.*, 2011 ; Zitvogel *et al.*, 2008).

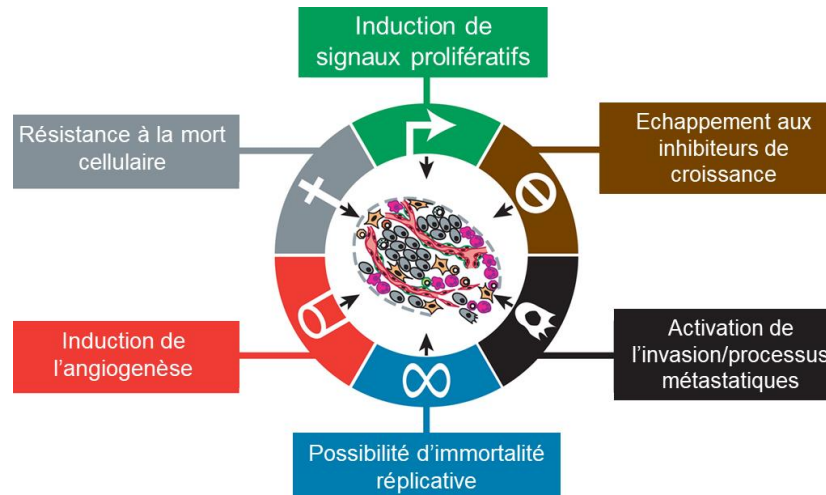


Figure 3 : Schéma des propriétés des cellules cancéreuses (Hanahan *et al.*, 2000)

I.6.2. Les altérations moléculaires dans le CBNPC

Les modifications des caractéristiques des cellules tumorales énoncées précédemment sont dues à l'apparition de multiples anomalies génétiques ou épigénétiques. Les modifications génétiques retrouvées vont alors toucher deux types de gènes :

- Les **gènes suppresseurs de tumeurs** dont le rôle est de limiter la prolifération cellulaire ou d'induire la mort programmée des cellules pour empêcher une expansion anarchique de cellules tumorales,
- Les **proto-oncogènes** sont des régulateurs positifs du développement cellulaire dont l'activation va induire la prolifération et la différenciation cellulaire.

La transformation des cellules « normales » en cellules tumorales passe par l'activation d'un oncogène et/ou l'inactivation d'un gène suppresseur de tumeur. Les cellules transformées sont alors dépendantes de l'oncogène activé, ces gènes sont donc de potentielles cibles thérapeutiques (Weinstein *et al.*, 2008). Les mécanismes responsables de ces modifications génétiques peuvent être, dans le cas des proto-oncogènes, l'apparition de mutations, leur amplification, le réarrangement chromosomique les conduisant à une hyperactivation constitutive. La modification d'un seul allèle est suffisante pour activer l'oncogène. A l'inverse de cette hyperactivation, les gènes suppresseurs de tumeurs perdent leur fonction par l'altération des deux allèles du gène, par la délétion d'une région chromosomique, par la mutation du gène ou encore par l'hyperméthylation du promoteur rendant le gène inactif (Kulis et Esteller, 2012).

I.6.2.1. Les proto-oncogènes

Les principaux proto-oncogènes retrouvés dans les CBNPC sont : *FGFR1* ; *KRAS*, *EGFR*, *DDR2*, *PI3KCA* ; *BRAF* ; *ROS1* ; *HER2* ; *ALK* ; *AKT* (Barlesi *et al.*, 2016). L'incidence de ces altérations est variable en fonction du type de CBNPC concerné (CEs ou ADCs) (Figure 4) (Pao *et al.*, 2012 ; Sos *et al.*, 2012).

I.6.2.1.1. Les principales mutations retrouvées dans le CBNPC

B-RAF est une sérine/thréonine kinase se trouvant en aval de la GTPase RAS (RAS/RAF/MEK/ERK). Les mutations de ce gène sont observées dans 2 à 4% des cas (Figure 4). La mutation la plus connue est la V600E observée dans le mélanome. En ce qui concerne le cancer bronchique non à petites cellules, les mutations récurrentes touchent la boucle G (G465V et G468A) et le domaine kinase (D594G et L596R). Ces mutations conduisent à l'activation constitutive de la protéine et ainsi de la voie des MAPKs (Johnson *et al.*, 2012).

La protéine **MET** (hepatocyte growth factor receptor) est un récepteur à domaine tyrosine kinase contrôlant de nombreux processus tels que l'invasion, l'angiogenèse et la transition épithélio-mésenchymateuse (EMT). Le gène codant MET, présent sur le chromosome 7, peut subir différents types de modifications comme l'apparition de mutations, l'amplification, la surexpression ou l'épissage alternatif (Luo *et al.*, 2013). Sa principale altération correspond à la mutation N375S qui est observée dans 5% des cas de CBNPC. Ces mutations sont mutuellement exclusives avec les mutations touchant l'EGFR ou KRAS (Luo *et al.*, 2013). Il a été montré que l'amplification de MET était responsable de certains phénomènes de résistance aux thérapies anti-EGFR (Turke *et al.*, 2010).

Le récepteur 2 du facteur de croissance épidermique (**HER2** ou **ErbB2**) est un récepteur à domaine tyrosine kinase (RTK) de la famille HER (Oxnard *et al.*, 2013). Celui-ci est muté dans 2% des cas de cancer bronchique non à petites cellules mais est retrouvé surexprimé dans 20% des cas (Shigematsu *et al.*, 2005) (Figure 4). Les mutations touchant HER2 sont également exclusives des altérations de l'EGFR et de KRAS (Luo *et al.*, 2013). Les modifications de cette protéine sont dues à des insertions ou des duplications au niveau de l'exon 20, causant alors une activation constitutive (Stephens *et al.*, 2004).

KRAS (Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog) fait partie de la famille des RAS GTPases impliquées notamment dans la croissance et la division cellulaire (Gerber *et al.*, 2014). Les mutations KRAS sont retrouvées dans 8 à 24% des cas de cancer bronchique non à petites cellules, majoritairement dans le cas d'ADCs chez les fumeurs ou anciens fumeurs (Dearden *et al.*, 2013) (Figure 4). Les mutations rencontrées sont principalement des substitutions dans les exons 12, 13 et 61 (Cardarella *et al.*, 2013). Ces mutations induisent une diminution de l'activité GTPase de la protéine qui conduit à une augmentation des effecteurs en aval comme ERK ou mTOR (Cardarella *et al.*, 2013). Les mutations de KRAS sont mutuellement exclusives avec celles de l'EGFR. Étant en aval de l'EGFR, les tumeurs mutées pour KRAS ne sont pas sensibles aux inhibiteurs de tyrosine kinase (ITKs) (Luo *et al.*, 2013 ; Wangari-Talbot *et al.*, 2013).

L'**EGFR** ou **erb1** (Epidermal Growth Factor Receptor) est un membre de la superfamille des récepteurs à domaine tyrosine kinase et plus précisément de la famille ErbB/HER. Il joue un rôle dans la survie, la prolifération et l'invasion cellulaire (Cardarella *et al.*, 2013). L'EGFR est fortement dérégulé dans 62% des cas de cancer bronchique non à petites cellules et muté dans 80% des ADCs. L'incidence des mutations de l'EGFR dans le CBNPC est variable en fonction de la population étudiée, 10 à 15% des cas dans les populations caucasiennes et jusqu'à 50% dans les populations asiatiques (Pao *et al.*, 2004) (Figure 4). L'apparition de mutations dans le domaine tyrosine kinase contribue à une activation du récepteur indépendante du ligand (Johnson *et al.*, 2012). Les mutations activatrices touchent principalement les quatre premiers exons du domaine kinase (18 à 21). Elles se situent au niveau du site de fixation de l'ATP qui est aussi le site de fixation des inhibiteurs des récepteurs à Tyrosine kinase (ITK) ciblant l'EGFR. Les mutations activatrices sont organisées en trois classes :

- Classe 1 : représente 44% des mutations activatrices du domaine tyrosine kinase incluant la délétion de l'exon 19.
- Classe 2 : représente 41% des mutations activatrices du domaine tyrosine kinase dont la principale, la mutation ponctuelle L858R située dans l'exon 21 (Mitsudomi *et al.*, 2007).
- Classe 3 : représente 5% des mutations activatrices du domaine tyrosine kinase, correspondant à des mutations dites « constitutives » telle que la duplication de l'exon 20.

Les classes 1 et 2 sont majoritairement observées chez la femme, les patients asiatiques et dans le cas d'adénocarcinomes chez les non-fumeurs (Johnson *et al.*, 2012). La surexpression de l'EGFR ou l'apparition de mutations constitutives activent de manière importante les voies en aval, comme la voie des MAPKs, la voie PI3K/Akt ou encore les facteurs de transcription STAT3 et 5 (Sharma *et al.*, 2007 ; Ono *et al.*, 2006). Dans 70% des cas, le type de mutation permet de prédire la réponse aux traitements par les inhibiteurs des récepteurs à tyrosine kinase (ITKs) (Jackman *et al.*, 2009 ; Lin *et al.*, 2012). Les mutations dans les exons 19 (del19) et 21 (L858R) confèrent une sensibilité accrue des tumeurs aux traitements par les ITKs spécifiques de l'EGFR. A l'inverse, chez les patients qui échappent aux traitements ITKs, l'apparition de la mutation T790M sur l'exon 20 permet à la tumeur de résister aux traitements

ITKs. Cette mutation T790M est donc une mutation de résistance aux traitements ITKs (Pao *et al.*, 2005 ; Kobayashi *et al.*, 2005).

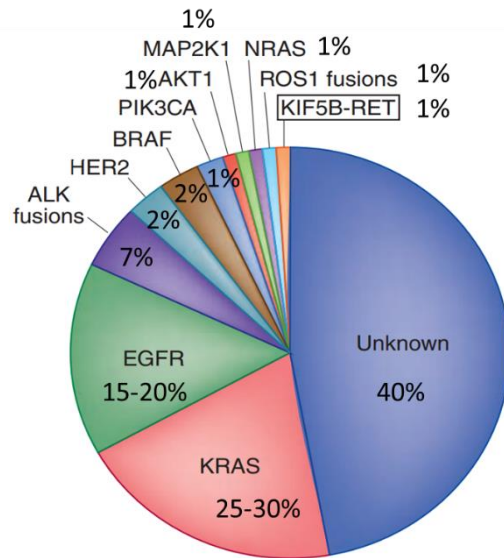


Figure 4 : Les principales altérations génétiques observées dans les ADCs pulmonaires (Pao *et al.*, 2012)

Dans les ADCs pulmonaires, les deux mutations majoritaires sont KRAS et l'EGFR dont ce dernier est la cible de thérapies bloquant son action. Cependant, 40% des altérations génétiques demeurent inconnues.

I.6.2.1.2. Les réarrangements chromosomiques retrouvés dans le CBNPC

La fusion du gène **ALK** (Anaplastic Lymphoma Kinase) est l'un des réarrangements chromosomiques observés dans le cancer bronchique et plus particulièrement dans les adénocarcinomes. On retrouve cette fusion dans 3 à 7% des ADCs (Lantuéjoul *et al.*, 2011). Ce réarrangement chromosomique survient par inversion du bras court du chromosome 2 et sa fusion avec le gène **EML4** (Echinoderm Microtubule Like protein 4) (Luo *et al.*, 2013). La fusion de ces deux gènes conduit à une activation constitutive du récepteur à domaine tyrosine kinase ALK (Luo *et al.*, 2013 ; Chan BA *et al.*, 2015), entraînant une activation accrue des voies de signalisation en aval (MAPK ; PI3K ; STAT3 ; JAK) responsables de la prolifération cellulaire. Ce type d'altération génomique est observée de manière générale chez des sujets ayant peu ou pas d'antécédant de tabagisme ou lors de diagnostics chez des personnes jeunes (Johnson *et al.*, 2012). La fusion **ALK-EML4** et les mutations de l'EGFR sont mutuellement exclusives (Luo *et al.*, 2013 ; Cardarella *et al.*, 2013).

ROS1 (Proto-oncogène tyrosine-protein kinase ROS) est le gène codant un proto-oncogène à domaine tyrosine kinase. Celui-ci possède une structure très similaire à la protéine ALK. L'incidence des réarrangements touchant ROS1 est d'environ 1% à 2% (Giustini *et al.*, 2020).

I.6.2.2. Les gènes suppresseurs de tumeurs

A l'inverse des proto-oncogènes hyperactifs, les gènes suppresseurs de tumeurs sont inactivés dans le cancer bronchique. Ces gènes jouent un rôle primordial dans la régulation de la prolifération, la réponse cellulaire aux dommages liés à l'ADN ou encore dans la mort cellulaire. Dans le cancer bronchique, la perte de fonction de ces gènes conduit à la transformation tumorale. L'inactivation des gènes suppresseurs de tumeurs peut être attribué à des processus génétiques ou épigénétiques comme la perte d'un allèle chromosomique (LOH) et l'apparition de mutations, ou une hyperméthylation du promoteur de l'autre allèle (Figure 5). Les principaux gènes inactivés dans le CBNPC sont FHIT ; p53 ; TGF β ; P14ARF / P16INK4 ; PTEN ; LKB1.

Le gène **FHIT** (fragile histidine triad gene) est un gène suppresseur de tumeur retrouvé inactif dans de nombreux cancers. Il code la protéine pFHIT et une perte de fonction de cette protéine conduit à un défaut de réplication ainsi qu'à des cassures de l'ADN. Cette protéine régule notamment les gènes codant les récepteurs de mort. Il a été montré que l'infection de cellules de cancer bronchique avec un gène **FHIT** sauvage permettait l'induction de la mort par apoptose (Zabarovsky *et al.*, 2002). La diminution d'expression de **FHIT** est observée dans 49% des cas de CBNPC (Sard *et al.*, 1999) et également dans les stades précoces.

La protéine **p53** est une protéine nucléaire ayant un rôle dans la liaison à l'ADN et dans l'activation de la transcription de gènes associés au cycle cellulaire. Elle agit sur des gènes jouant sur l'arrêt du cycle en phase G1 ou en induisant la mort cellulaire à la suite d'un stress génotoxique. Le rôle de cette protéine est de prévenir tout dommage à l'ADN en agissant en « gardien » de l'intégrité génomique lors de stress. La protéine p53 prévient également l'entrée en phase G2 des cellules ayant subi des dommages au niveau de leur génome en inhibant la cycline dépendant des kinases CDC2 qui est nécessaire à l'entrée en phase de mitose. Les fonctions de p53 peuvent être inhibées par la protéine HDM2 qui régule l'expression du gène **TP53** et augmente le clivage de p53 par le protéasome (Virmani *et al.*, 2000). L'augmentation de l'expression de HDM2 à la suite d'altérations génétiques conduit alors à une forte inhibition de p53. La mutation de **TP53** est la plus fréquente dans le génome humain et l'un des événements les plus significatifs dans l'apparition du cancer bronchique. La mutation de ce gène est directement liée à l'exposition chronique à des carcinogènes, particulièrement à la fumée de cigarette (Brambilla et Gazdar, 2009 ; Mills *et al.*, 1995). Les principales mutations abolissant les fonctions de p53 sont des substitutions G / T au niveau des codons 157, 245, 248 et 273. p53 se trouve inactivée dans 50% des cas de cancer bronchique non à petites cellules (Sibilia *et al.*, 2007). La plupart de ces mutations étant non-sens, elles conduisent à une diminution de l'efficacité de liaison de p53 à l'ADN (Brambilla et Gazdar, 2009).

PTEN (phosphatase and tensin homolog) code une phosphatase qui déphosphoryle le phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate (PIP3), est retrouvée mutée ou fortement méthylée dans un grand nombre de cancers bronchiques et notamment chez les fumeurs (Jin *et al.*, 2010).

Le **TGF β** (Transforming growth factor β) est une protéine multifonction inhibant la prolifération cellulaire en se liant à un grand nombre de récepteurs cellulaires. Il s'agit d'un inhibiteur du cycle cellulaire visant à stopper la prolifération des cellules en phase G1. L'expression du TGF β est fortement réduite dans les cas de CBNPC (Richardson and Johnson, 1993).

Les protéines **p16INK4** et **p14ARF**, issues du gène *P16INK4*, forment un lien entre la signalisation oncogénique et la protéine p53 afin de pouvoir induire l'apoptose des cellules ayant subi des dommages (Richardson and Johnson, 1993 ; Virmani *et al.*, 2000). La perte d'expression de p14ARF fait partie des plus observées avec celles touchant p53. L'expression du gène *P16INK4* se trouve altérée par perte d'homozygotie, d'hyperméthylation du promoteur ou par des mutations dans 40 à 50% des cas de CBNPC (Rom *et al.*, 2000).

LKB1 (Liver Kinase B1) est une protéine kinase impliquée dans la différenciation cellulaire au début de tumorigenèse et dans les processus métastatiques. Les mutations l'affectant sont principalement dues au tabagisme et sont retrouvées dans 34% des ADCs et 20% des carcinomes épidermoïdes (Herbst *et al.*, 2008).

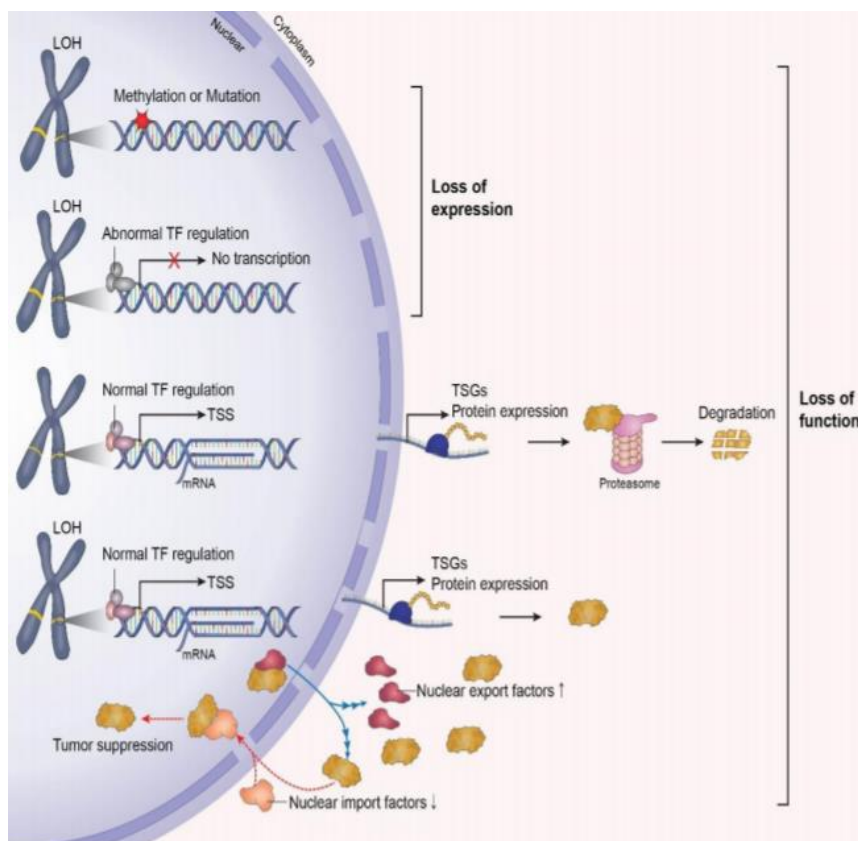


Figure 5 : Schéma récapitulatif des différents processus conduisant à la perte d'efficacité des gènes suppresseurs de tumeurs (Li-Hui Wang *et al.*, 2018)

Les gènes suppresseurs de tumeurs sont, dans le cancer, les cibles de différents mécanismes inhibant leur activité. Ces mécanismes peuvent conduire à une perte d'expression dans le cas de méthylation, de mutation ou de fixation de facteurs de transcription. De manière plus générale, l'ensemble de ces mécanismes induisent une perte d'hétérozygotie induisant le dysfonctionnement des gènes suppresseurs de tumeur.

I.7. Les approches thérapeutiques du CBNPC

Dans le cas du cancer CBNPC, on peut distinguer deux grands types d'approches thérapeutiques mises en place : les thérapies dites conventionnelles basées sur l'utilisation

d'agent cytotoxique peu spécifique et les thérapies dites ciblées visant directement les processus oncogéniques responsables du développement tumoral. Les thérapies conventionnelles n'étant pas suffisamment efficaces et conduisant rapidement à des phénomènes de résistance, cela a conduit au développement de thérapies spécifiques des altérations moléculaires retrouvées chez les patients à traiter. Ces deux types de thérapies seront abordés dans cette partie.

I.7.1. Les thérapies conventionnelles

Dans le CBNPC, la première ligne de défense consiste en une résection chirurgicale de la tumeur lorsque celle-ci est détectée de manière précoce, dans le cas d'un stade I ou stade II. La tumeur est alors retirée dans son intégralité par lobectomie qui correspond à l'ablation du lobe contenant la tumeur ou par pneumonectomie, c'est-à-dire le retrait du poumon portant la tumeur. Ce retrait de la tumeur s'accompagne d'un curage ganglionnaire afin d'enlever les ganglions lymphatiques situés à proximité de la tumeur. Dans le cas d'une ablation incomplète de la tumeur, il est alors prescrit des traitements par radiothérapie et/ou chimiothérapie. Si le résidu est macroscopique, il y a alors radiothérapie couplée à de la chimiothérapie. Si le résidu est microscopique, il y a uniquement mise en place de radiothérapie. Les chimiothérapies post-opératoires sont en général prescrites chez les patients atteints d'un cancer de stade II et si leur état physique le permet. Les stades plus avancés ne sont donc pas opérables étant donnée la dissémination de la tumeur dans l'organisme. Les traitements utilisés en chimiothérapie sont à base de sels de platines qui ont pour effet d'endommager de manière préférentielle les cellules tumorales et d'en induire la mort (Li *et al.*, 2016). Malgré la mise en place de ces thérapies, le taux de survie à 5 ans reste faible, notamment à cause de la forte toxicité de la chimiothérapie et l'apparition de résistances acquises au cours du traitement (Vanneman and Dranoff, 2012).

I.7.2. Les thérapies ciblées

I.7.2.1. Thérapies ciblées basées sur des inhibiteurs pharmacologiques du site de fixation de l'ATP

Au cours des vingt dernières années, l'essor des thérapies ciblées a permis de passer de thérapies basées sur des agents cytotoxiques non spécifiques à des traitements ciblant de manière sélective les voies de signalisation participant à la croissance et à la progression tumorale. Ce développement fait suite à la découverte de nombreuses cibles thérapeutiques au sein des voies de signalisations impliquées dans la croissance tumorale. Cette mise en évidence a permis d'améliorer le suivi clinique et la prise en charge thérapeutique des patients (Chen *et al.*, 2014). Les thérapies ciblées ont, de plus, l'avantage d'être moins toxiques que les chimiothérapies à base de sels de platine dans le cas d'ADCs. Leur utilisation reste néanmoins requise pour le traitement des carcinomes épidermoïdes (Liao *et al.*, 2012 ; Drilon *et al.*, 2012).

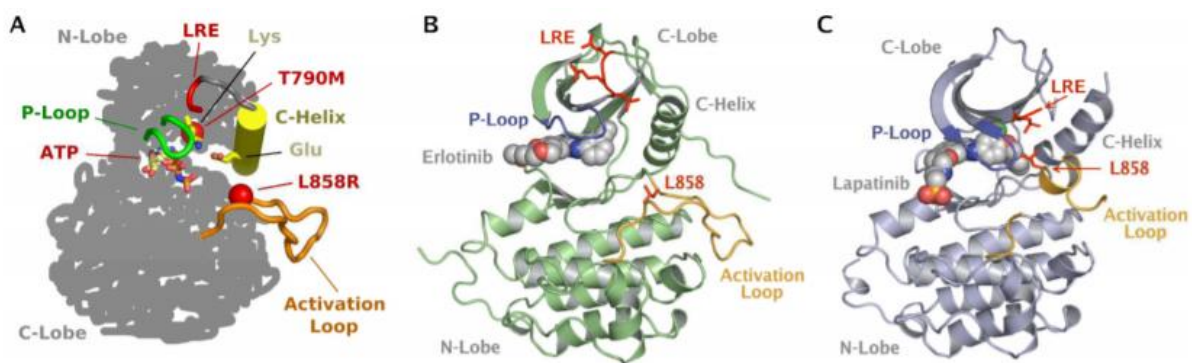


Figure 6 : Modélisation structurale de l'EGFR et de ses sites d'interaction aux ITKs (Kumar et al., 2008)

La figure A représente la position de l'ATP dans la fente catalytique de l'EGFR obtenu par cristallographie. Les panels B et C correspondent à la structure cristallisée de l'EGFR respectivement complexés avec l'erlotinib et le lapatinib. Les ITKs sont représentés sous forme de sphères occupant l'espace entre la boucle P et la boucle d'activation. De cette manière, les ITKs empêchant la fixation de l'ATP et l'activation de l'EGFR.

L'application des thérapies ciblées nécessite la mise en place d'un diagnostic moléculaire afin d'établir le profil moléculaire de la tumeur et ainsi d'adapter le traitement. Les principales thérapies ciblées ont été développées pour inhiber les mutations ou amplifications d'EGFR, les mutations KRAS, les mutations PIK3CA et les réarrangements ALK (Chan *et al.*, 2015 ; Wangari-Talbot *et al.*, 2013). L'EGFR fût l'une des premières cibles étudiées étant donnée sa forte implication dans le CBNPC (Johnson *et al.*, 2012). Le gefitinib et l'erlotinib furent ainsi les premiers ITKs développés (première génération) pour bloquer de manière compétitive et réversible la phosphorylation de l'EGFR. Le processus de blocage du domaine kinase passe par la fixation de l'inhibiteur sur le site de liaison de l'ATP dans ce même domaine (Morgillo *et al.*, 2016 ; Kumar *et al.*, 2008) (Figure 6). Ces anti-EGFR de première génération ont une activité démontrée principalement pour certaines mutations de type délétion de l'EGFR touchant le domaine tyrosine kinase (délétion de l'exon 19 ou la substitution L858R) (Jotte *et al.*, 2015 ; Lynch *et al.*, 2004). L'erlotinib a été montré comme étant un traitement de deuxième ou de troisième ligne donnant une meilleure survie globale (Shepherd *et al.*, 2005). Le gefitinib quant à lui a démontré une bonne efficacité dans les populations asiatiques et chez les non-fumeurs (Chang A *et al.*, 2006).

L'utilisation de ces traitements de première génération a tout de même conduit à l'apparition de mutations (voir I.7.4.3), induisant une résistance aux traitements. Cela a donc demandé le développement de traitements de seconde génération (Wangari-Talbot *et al.*, 2013). Les nouvelles générations d'ITKs ont une meilleure affinité pour les domaines kinases permettant d'inhiber d'autres membres de la famille de l'EGFR. L'afatinib et le docomitinib, deux inhibiteurs irréversibles de l'EGFR, sont utilisés pour traiter des stades avancés de CBNPC portant des mutations au niveau de l'EGFR, mais ne permet pas de contrer la mutation T790M. Les ITKs de troisième génération ont été développés pour contourner l'apparition de la mutation résistante T790M. Ainsi, l'osimertinib, distinguent les récepteurs à l'EGF (Epidermal Growth Factor) sauvage des récepteurs mutés. En effet, l'osimertinib peut

reconnaitre et se lier aux récepteurs portant les mutations de résistance (Remon *et al.*, 2018). D'autres inhibiteurs de troisième génération ciblant les mutations de résistance (Rociletinib, HM61713, PF-06747775, EGF816, ASP8237) sont en cours d'essais cliniques. L'osimertinib est pour l'instant le seul traitement anti-EGFR de 3^{ème} génération prescrit actuellement dans les cas de CBNPC métastatiques présentant la mutation EGFR T790M (Wang *et al.*, 2016).

I.7.2.2. Autres types de thérapies ciblées

D'autres thérapies ciblées spécifiques de l'EGFR ont été développées, notamment des anticorps monoclonaux bloquant l'EGFR (cetuximab). Il a été montré que le cetuximab apportait une amélioration de la survie globale des patients atteints de CBNPC surexprimant l'EGFR (Pirker *et al.*, 2012 ; Rosell *et al.*, 2008). Malgré l'amélioration de la survie des patients traités au cetuximab, cette molécule provoque l'apparition d'effets secondaires comme des diarrhées ou des rashes cutanés (Sgambato *et al.*, 2014).

D'autres voies de signalisations sont également ciblées de manière spécifique pour traiter le cancer bronchique non à petites cellules. Les voies pro-angiogéniques faisant intervenir les couples VEGF-A / VEGFR-2 et FGF (Fibroblaste Growth Factor) / PDGF (platelet-derived growth factor) font partie des cibles thérapeutiques (Raica *et al.*, 2010 ; Amini *et al.*, 2014 ; Saylor *et al.*, 2012). Seul un traitement anti-VEGF, le bevacizumab, est utilisé en complément d'une thérapie aux sels de platines (Corrales *et al.*, 2017).

I.7.3. L'immunothérapie

Ces dernières années, d'autres molécules ciblant les voies de signalisation impliquées dans le contrôle de la réponse immunitaire ont été mises au point pour lutter contre le CBNPC. En effet, deux points de contrôle du système immunitaire ont été identifiés comme étant des cibles thérapeutiques intéressantes pour favoriser la réponse immunitaire. Ces deux points de contrôle sont l'antigène cytotoxique associé aux lymphocytes T4 (CTLA-4) (Callahan *et al.*, 2010) et la voie PD1 / PDL1 (Zitvogel and Kromer, 2012). Les premières études concernant la mise au point d'un inhibiteur du ligand PDL-1 ont permis de montrer une activité anti-tumorale prometteuse (Duruiseaux *et al.*, 2017). Depuis, deux inhibiteurs anti-PD1, le nivolumab et le pembrolizumab ont obtenu une approbation quant à leur utilisation pour traiter le CBNPC (Herzberg *et al.*, 2017). Ces inhibiteurs de PD1 ont permis de voir des améliorations dans la survie globale des patients. Les traitements anti-PD-1 sont maintenant mis en place en combinaison avec des traitements à base de sels de platines (Lazzari *et al.*, 2018). Des inhibiteurs anti-PDL1 sont actuellement à l'étude tels que l'Atézolizumab ou le Durvalumab, pour l'instant peu de données ont pu être récoltées mais les premiers résultats montrent une augmentation de la survie globale (Duruiseaux *et al.*, 2017).

I.7.4. Les résistances thérapeutiques dans le CBNPC

Les thérapies ciblées anti-EGFR constituent la meilleure option de traitement contre le CBNPC présentant des altérations de l'EGFR. Néanmoins, de nombreux cas de patients traités à l'aide des ITKs montrent une absence de réponse aux thérapies après 9 à 14 mois de traitement (Morgillo *et al.*, 2016).

I.7.4.1. La résistance primaire aux thérapies ciblées

La résistance primaire correspond à une inefficacité immédiate du traitement anti-tyrosine kinase. Comme nous avons pu le voir précédemment certaines mutations de l'EGFR peuvent provoquer une inefficacité des traitements anti-EGFR. Ces phénomènes de résistances aux traitements sont dus à l'apparition de mutations *de novo* rendant inopérantes les thérapies. Ces mutations agissent sur l'état d'activation de l'EGFR (Eck *et al.*, 2010). Les mutations les plus importantes et les plus fréquemment impliquées dans la résistance primaire aux traitements concerne l'exon 20 qui subit notamment la mutation T790M (Morgillo *et al.*, 2016) (Figure 7). Ces insertions au niveau de l'exon 20 conduisent généralement à une diminution de l'affinité de l'EGFR pour son ITK, donc à une absence d'efficacité du traitement. Dans certains cas, les mutations peuvent induire une sensibilité intermédiaire ne rendant pas totalement inefficace le traitement. La mutation T790M, la plus connue pour son implication dans la résistance secondaire, a été identifiée comme étant responsable de la non-réponse aux traitements de façon primaire (Su *et al.*, 2012). En effet, des études ont montré l'existence de clones exprimant la mutation T790M avant tout traitement ITK. Cette mutation accroît l'affinité de l'EGFR pour l'ATP et permet de lever l'inhibition induite par les ITKs dans les cellules mutées EGFR L858R, initialement sensibles aux ITKs en empêchant la fixation des ITKs de première génération au domaine kinase.

D'autres mécanismes peuvent participer à l'échappement thérapeutique. En effet, la diminution d'activation de l'EGFR et par conséquent sa signalisation en aval, dans les cellules traitées aux ITKs, conduit à une forte dépendance des cellules à la signalisation médiée par HER2 / HER3 et PI3K / AKT (Tabara *et al.*, 2012). La résistance primaire est également due à des altérations génétiques touchant d'autres acteurs moléculaires tels que MET qui est généralement amplifié ou les membres de la famille des activateurs de l'apoptose comme Bcl-2 qui sont inhibés.

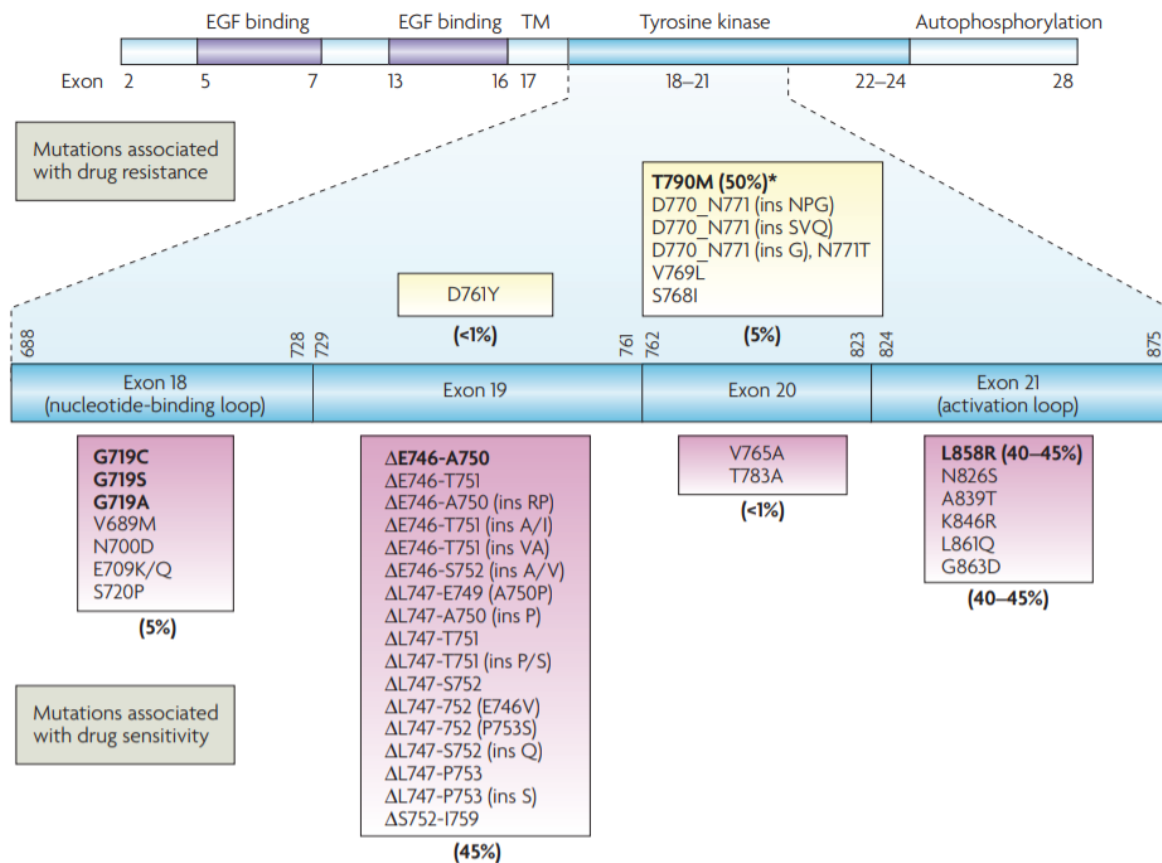


Figure 7 : Mutations de l'EGFR touchant le domaine tyrosine kinase induisant une sensibilité ou une résistance aux ITKs d'après Sharma et al., 2007

Le gène codant l'EGFR est composé de 30 exons donnant les différents domaines de l'EGFR (domaines de liaison à l'EGF, domaine tyrosine kinase, domaine d'autophosphorylation). Le domaine tyrosine kinase se trouve être le plus exposé aux mutations, notamment au niveau des exons 18 à 21. Les mutations présentes dans ces exons peuvent être associées à une résistance thérapeutique telle que la mutation T790M ou à une sensibilité aux thérapies comme la mutation L858R.

I.7.4.2. L'échappement à l'apoptose

Une part de la résistance thérapeutique passe par l'échappement des cellules à la mort cellulaire programmée. En effet, l'inhibition, les mutations ou les délétions de gènes pro-apoptotiques conduisent au contournement de l'apoptose. Des acteurs moléculaires de la famille BCL-2, tel que BIM, agissant normalement dans l'induction de l'apoptose lors de traitements anti-EGFR dans le CBNPC sont retrouvés inactivés. La tumeur peut alors échapper à la mort cellulaire à cause de la délétion de BIM ou d'un niveau faible d'expression de cette protéine (Faber et al., 2011). Les patients atteints de CBNPC traités aux ITKs anti-EGFR étant mutés pour BIM montrent notamment une réponse au traitement significativement inférieure aux patients non mutés (Nakagawa et al., 2013).

I.7.4.3. La résistance acquise aux inhibiteurs de tyrosine kinase ciblant l'EGFR

La résistance secondaire aux thérapies apparaît généralement après un traitement prolongé. Ces mécanismes peuvent être considérés comme des processus participant à l'évolution des cellules cancéreuses. Les cellules mises sous traitement anti-EGFR sont soumises à une pression de sélection provoquant le maintien des cellules cancéreuses résistantes. L'identification des mécanismes et des acteurs moléculaires de cette résistance est primordiale pour l'adaptation des traitements et son contournement.

L'une des principales mutations secondaires de l'EGFR responsable de la résistance aux ITKs est la substitution de la thréonine en position 790 par une méthionine (mutation T790M) (Suda *et al.*, 2009). Cette mutation au niveau de l'exon 20 de l'EGFR est présente dans plus de 50% des récidives. La moitié des patients présentant la délétion de l'exon 19 ou la mutation L858R portent également la mutation T790M. Celle-ci est présente dans le domaine kinase de l'EGFR au niveau de la poche de fixation de l'ATP. Cela induit une augmentation de l'affinité de l'EGFR pour l'ATP qui est alors son substrat préférentiel par rapport aux ITKs de première et deuxième génération (Yun *et al.*, 2008). D'autres mutations ponctuelles de l'EGFR conférant une résistance aux traitements, telles que la D761Y, la T854A, la L747S ont pu être mises en évidence (Morgillo *et al.*, 2016). Néanmoins, leurs mécanismes demeurent inconnus. Récemment, la substitution C797S du site de liaison à l'ATP a été découverte, celle-ci confère une résistance à tous les inhibiteurs de tyrosines kinases de troisième génération (Morgillo *et al.*, 2016).

D'autres mutations secondaires ne touchant pas l'EGFR ont été découvertes telle que la mutation *ALK-1196M*, le réarrangement et les mutations du récepteur tyrosine kinase des neurotrophines type 1 (*NTRK1*) (Choi *et al.*, 2010 ; Vaishnavi *et al.*, 2013).

Outre les mutations affectant l'EGFR et les autres acteurs moléculaires, l'augmentation du nombre de récepteurs à l'EGF à la membrane prend une grande part dans la résistance acquise aux ITKs. En effet, l'amplification de l'EGFR est responsable de la résistance à l'erlotinib ou au gefitinib (Sequist *et al.*, 2011). Ces altérations génétiques ne constituent pas les seuls mécanismes de résistance aux ITKs. En effet, l'activation de voies alternatives ou de cross-talk entre récepteurs à tyrosine kinase peuvent également contribuer à altérer la réponse aux thérapies ciblées.

I.7.4.4. L'activation des voies alternatives

Lors de l'inhibition d'une voie majoritaire liée à un RTK par les ITKs, les cellules cancéreuses parviennent à activer des voies de signalisation alternatives (par amplification ou surexpression) afin de permettre leur survie. De cette manière, les cellules peuvent activer des effecteurs en aval de la cible thérapeutique, permettant la croissance et la survie cellulaire. A titre d'exemple, l'amplification de l'oncogène MET représente 5 à 20% des résistances acquises (Engelman *et al.*, 2007). La surexpression de MET et de son ligand, l'HGF (Hepatocyte growth factor), induisent, malgré le blocage de l'EGFR par le Gefitinib, la phosphorylation de HER-3 (ERBB3) conduisant à l'activation de la voie PI3K/AKT. D'autres voies de contournement telle que celles de l'IGF-1R (insulin-like growth factor receptor 1) ont été mises en évidence. L'activation de IGF-1R induit l'hétérodimérisation de ce dernier avec

l'EGFR et conduit à l'activation des voies MAPK et AKT (Morgillo *et al.*, 2016). La multitude de mécanismes de résistance aux ITKs montre l'importance de s'interroger sur des stratégies thérapeutiques permettant de contourner ces mécanismes de résistance.

Partie II. Les récepteurs à domaine tyrosine kinase

II.1. Généralités

Les récepteurs tyrosine kinase (RTK) jouent un rôle primordial dans l'homéostasie cellulaire, pour la croissance, la mobilité, la différenciation ou encore la survie cellulaire. Ces récepteurs à un seul passage membranaire regroupés en une superfamille participent à la physiologie mais sont fortement rencontrés dans des phénomènes physiopathologiques comme le cancer. En effet, des récepteurs tels que les VEGFR, les Trk ou l'EGFR sont couramment impliqués dans le développement tumoral lorsqu'ils sont dérégulés.

Cette partie concernera le récepteur à l'EGF. Ce récepteur portant également les noms ErbB1/HER1, fait partie de la famille ErbB comportant également les protéines ErbB2/HER2, ErbB3/HER3, ErbB4/HER4 (Pines *et al.*, 2010). L'EGFR est un proto-oncogène principalement connu pour sa fonction sur les processus de prolifération cellulaire s'opposant à la mort cellulaire. Les connaissances actuelles, en constante évolution, permettent de placer l'EGFR comme l'une des principales cibles thérapeutiques dans le cas du cancer bronchique. Cette partie concernera donc les effets de l'activation de l'EGFR par son ligand (EGF), les différentes voies de signalisation activées, sa régulation et son rôle oncogénique.

II.1.1. Historique et découverte de l'EGFR

L'EGFR est une protéine de 170 kDa découverte en 1986, par les docteurs Stanley Cohen et Rita Levi-Montalcini. L'étude aboutissant à sa découverte leur a notamment permis de remporter le prix Nobel de médecine. Leurs travaux initialement orientés sur le facteur de croissance nerveux (NGF) sur des souris nouveau-nées ont permis de mettre en évidence un facteur de croissance proche du NGF, l'EGF dont les effets avaient été démontrés comme étant secondaires dans leurs expériences visant le NGF. L'EGF a alors été montré comme étant responsable de l'augmentation de la croissance de l'épiderme de l'animal de manière *in vivo* et *in vitro* (Cohen and Elliott, 1963 ; Cohen *et al.*, 1965). L'EGF humain fut ensuite découvert dans des cultures de fibroblastes humains (Cohen *et al.*, 2004). Le mécanisme responsable de la réponse à l'EGF fut par la suite identifié. Il a alors été mis en évidence l'existence d'un récepteur à l'EGF, l'EGFR (Cohen *et al.*, 1980 ; Carpenter *et al.*, 1975). L'équipe du Dr Cohen a également pu montrer que la fixation de l'EGF à l'EGFR induisait une phosphorylation, mettant en évidence l'activité kinase de cette protéine. En 1984, l'EGFR a été la première protéine à domaine tyrosine kinase identifiée (Ullrich *et al.*, 1984). Cette même année, le premier lien entre l'EGFR et le cancer a été démontré en observant l'oncogène v-ErbB responsable du virus érythroblastique aviaire, un homologue mutant de l'EGFR (Downward *et al.*, 1984). Les mutations et la surexpression de l'EGFR ont été observées comme étant impliquées dans la promotion de carcinomes (Cowley *et al.*, 1986), de sarcomes (Gusterson *et al.*, 1985), de CBNPC (Veale *et al.*, 1987) puis dans le gliome (Wong *et al.*, 1987).

Il est clairement établi que les membres de la famille des protéines ErbB participent à une multitude de processus pro-oncogéniques comme la prolifération cellulaire, l'angiogenèse, l'inhibition de l'apoptose, la mobilité cellulaire, l'adhésion cellulaire, le métabolisme, le cycle cellulaire ou les métastases. Ces protéines sont donc des cibles thérapeutiques de choix. De nombreux agents thérapeutiques ciblant ces protéines sont déjà utilisés. Malgré ceux-ci, les cellules parviennent toujours à muter et à contourner les voies de signalisations inhibées afin de survivre aux traitements.

II.1.2. Les membres de la famille ERBB

Actuellement, 58 RTKs différents sont connus chez l'Homme, ceux-ci sont regroupés en 20 sous-familles. La majorité des RTKs a une structure similaire comprenant un domaine extracellulaire de liaison au ligand, un domaine transmembranaire, une région juxta membranaire, un domaine tyrosine kinase cytosolique et une queue C-terminale (Lemmon and Schlessinger *et al.*, 2010). Les domaines extracellulaires des RTKs varient en fonction des sous-familles pour fixer les différents ligands avec une forte spécificité (Figure 8).

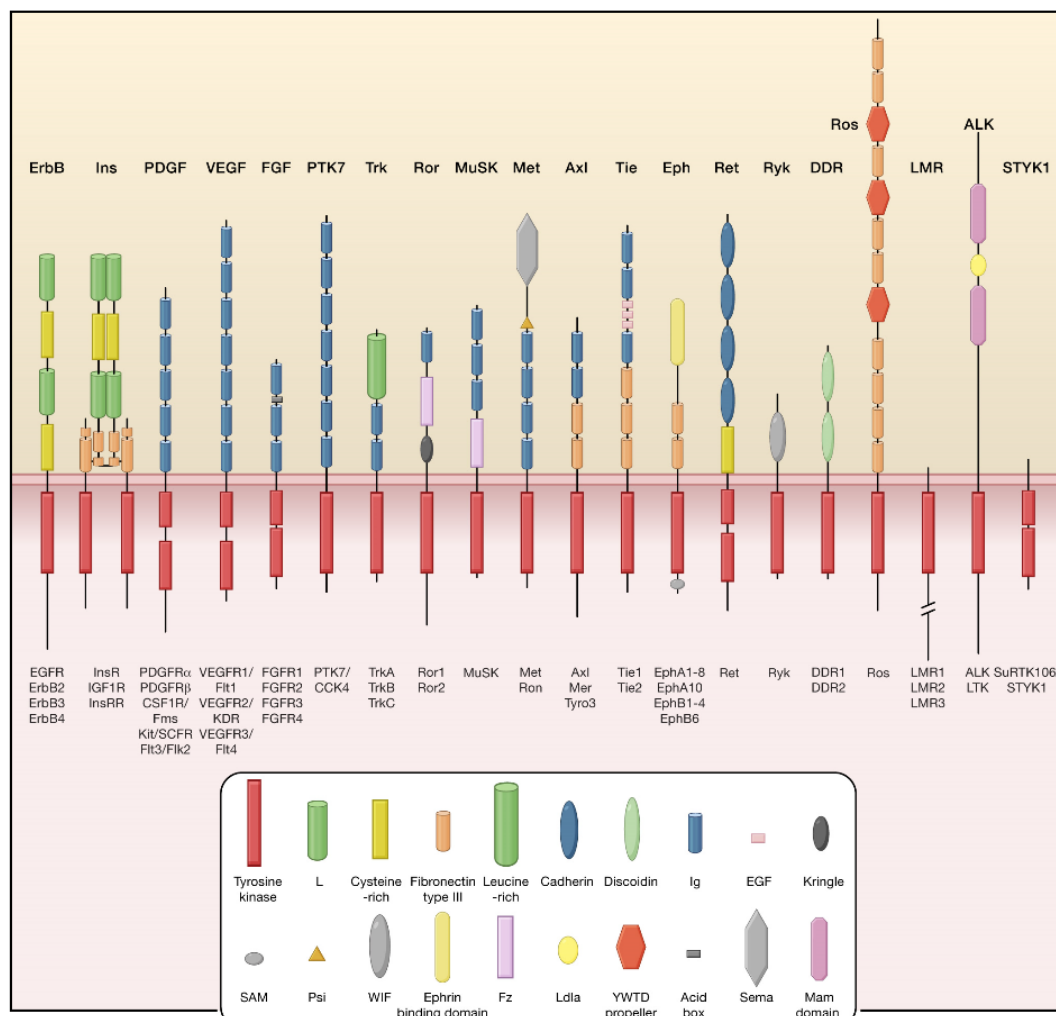


Figure 8 : La superfamille de RTKs d'après Lemmon and Schlessinger, 2010

La superfamille des RTKs regroupe 20 sous-familles de récepteurs ayant un domaine transmembranaire et un domaine tyrosine kinase intracellulaire représentés en rouge. La majorité de ces récepteurs comportent des domaines extracellulaires.

La famille de ErbB comprend les protéines EGFR / HER1 / ErbB1, Neu / HER2 / ErbB2, HER3 / ErbB3 et HER4 / ErbB4. Ces différents récepteurs ont la capacité de s'homo- et s'hétérodimériser donnant ainsi de nombreuses combinaisons de dimères (Lemmon and Schlessinger, 2010). Certains membres possèdent des caractéristiques ou spécificités structurales et/ou fonctionnels. Ainsi, ErbB2 est un récepteur ne portant pas de domaine de liaison au ligand et aucun ligand ne lui a été décrit. Le domaine de dimérisation de ce récepteur étant constitutivement exposé (Burgess *et al.*, 2003), ErbB2 est le partenaire préférentiel des autres membres de cette superfamille (Tzahar *et al.*, 1996 ; Holbro *et al.*, 2003). Une autre spécificité concernant ErbB3 est l'absence de domaine kinase, de ce fait, les homodimères ErbB3 ne possèdent qu'une faible activité d'autophosphorylation (Tomas *et al.*, 2014). Malgré cette particularité, ErbB3 peut être phosphorylé par ses partenaires et induire une cascade de signalisation puissante en aval (Holbro *et al.*, 2003). Bien que l'ensemble des membres de la famille ErbB puisse être impliqué dans le développement tumoral, la principale protéine observée dans le CBNPC demeure l'EGFR.

II.1.3. La structure de l'EGFR

L'EGFR est synthétisé sous forme d'un précurseur de 1210 résidus qui est clivé au niveau de sa partie N-terminale donnant une protéine mature de 1186 acides aminés. De la partie N-terminale à la partie C-terminale, l'EGFR est constitué d'une partie extracellulaire comptant une zone de liaison au ligand et d'un bras de dimérisation, d'un domaine transmembranaire hydrophobe et d'une queue intracellulaire portant le domaine tyrosine kinase. Ces parties correspondent respectivement aux exons 1 à 16 ; 17 et 18 à 28 (Roskoski *et al.*, 2014).

La région **extracellulaire**, composée de 621 acides aminés, est divisée en différents domaines (I à IV) (Figure 9). Les domaines I et III sont des domaines portant des zones riches en leucines participant à la liaison du ligand. Le domaine II porte le bras de dimérisation permettant de se lier aux domaines de dimérisation des autres membres de la famille ErbB. Les domaines II et IV sont riches en cystéines leur permettant de former des ponts disulfures entre eux. Le domaine IV permet également de relier la région extracellulaire à la partie transmembranaire.

La région **transmembranaire** est composée de 23 acides aminés hydrophobes (Ile622 à Met644) permettant l'ancrage dans la membrane (Carpenter *et al.*, 1991) (Figure 9). La région transmembranaire n'est pas uniquement impliquée dans l'ancrage du récepteur. En effet, ce domaine participe notamment à la dimérisation du récepteur (Tanner and Kyte, 1999) et dans l'alignement des domaines intracellulaires (Bell *et al.*, 2000).

Le domaine **intracellulaire** est composé de la partie juxta-membranaire d'environ 40 acides aminés, du domaine tyrosine kinase de 263 acides aminés et de la queue C-terminale de 182 acides aminés. Le domaine tyrosine kinase comporte un site de liaison à l'ATP

permettant l'activation du récepteur (Figure 9). Ce site de liaison est situé entre les deux lobes composant le domaine kinase, un lobe N et un lobe C (Stamos *et al.*, 2002). Les lobes N et C ont respectivement une structure en feuillets β et en hélices α . La trans-autophosphorylation correspond à l'interaction du lobe N d'un récepteur avec le lobe C du second récepteur (Zhang *et al.*, 2006). Ce domaine comporte également des résidus permettant son ubiquitinylation. L'extrémité C-terminale comporte de nombreux résidus tyrosines qui, lorsqu'ils sont phosphorylés, permettent l'ancrage de diverses protéines relayant la transduction du signal.

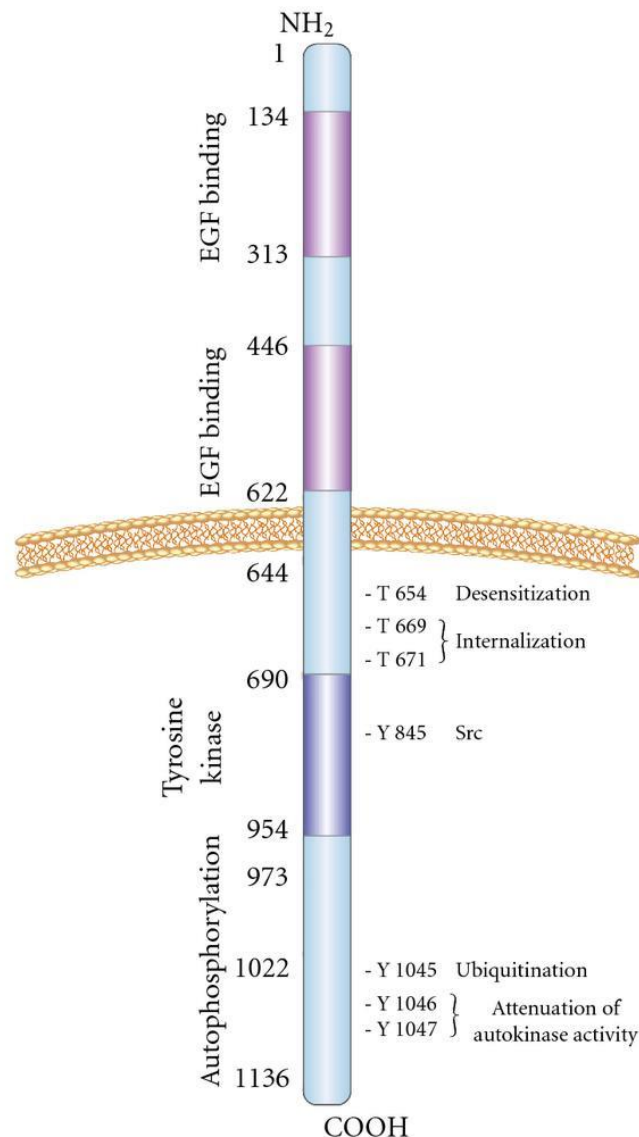


Figure 9 : Structure de l'EGFR d'après Siwak *et al.*, 2009

L'EGFR est constitué de domaines extracellulaires, transmembranaire et intracellulaires. La partie extracellulaire de l'EGFR comporte deux domaines de fixation aux ligands (en violet) et deux domaines de dimérisation (en bleu clair). La partie transmembranaire est constituée de résidus hydrophobes. La portion intracellulaire fortement conservée dans la famille de l'EGFR contient le domaine tyrosine kinase. L'autophosphorylation de l'EGFR conduit à l'activation de ce domaine qui est alors un site de fixation pour les protéines ayant un domaine de fixation aux phosphotyrosines, ayant pour conséquence l'activation de voies en aval du récepteur.

II.1.4. L'influence de l'épissage alternatif de l'EGFR sur sa signalisation

Le transcrite de l'EGFR comporte 30 exons pouvant être épissés de différentes manières générant 8 variants (Abou-Fayçal *et al.*, 2017) (Figure 10). Les différents variants codent des formes non-solubles (EGFRvA, EGFRvIII, EGFRvIVa, EGFRvIVb, mLEEK) et des isoformes solubles (sEGFRv2, sEGFRv3, sEGFRv4). Le variant le plus représenté est l'EGFRvIII dont les exons 2 à 7 ont été excisés. Cette forme d'EGFR ne permet pas la fixation de son ligand étant donné l'absence de sa partie extracellulaire (Nagane *et al.*, 1996). Ce récepteur possède malgré tout un fort potentiel oncogénique dû à sa phosphorylation constitutive (Nagane *et al.*, 1996 ; Huang *et al.*, 2009). Ce variant est retrouvé dans le cancer bronchique, le cancer du sein et le glioblastome (GBM) (Moscatello *et al.*, 1995 ; Ekstrand *et al.*, 1991 ; Abou-Fayçal *et al.*, 2017). Celui-ci est considéré comme un marqueur de mauvais pronostic. Les variants EGFRvIVa et EGFRvIVb délétés d'une portion en aval du domaine kinase induisent une stabilité et une dimérisation accrues activant les différentes voies de signalisation de l'EGFR (Ekstrand *et al.*, 1992). Le variant EGFRvA est modifié au niveau de sa partie C-terminale, permettant au récepteur d'échapper à l'ubiquitinylation causée par un défaut d'interaction avec la protéine Cbl (Zhou *et al.*, 2013 ; Song *et al.*, 2016). Ce variant a pour effet d'induire la migration et l'invasion par le biais de STAT3 (Zhou *et al.*, 2013).

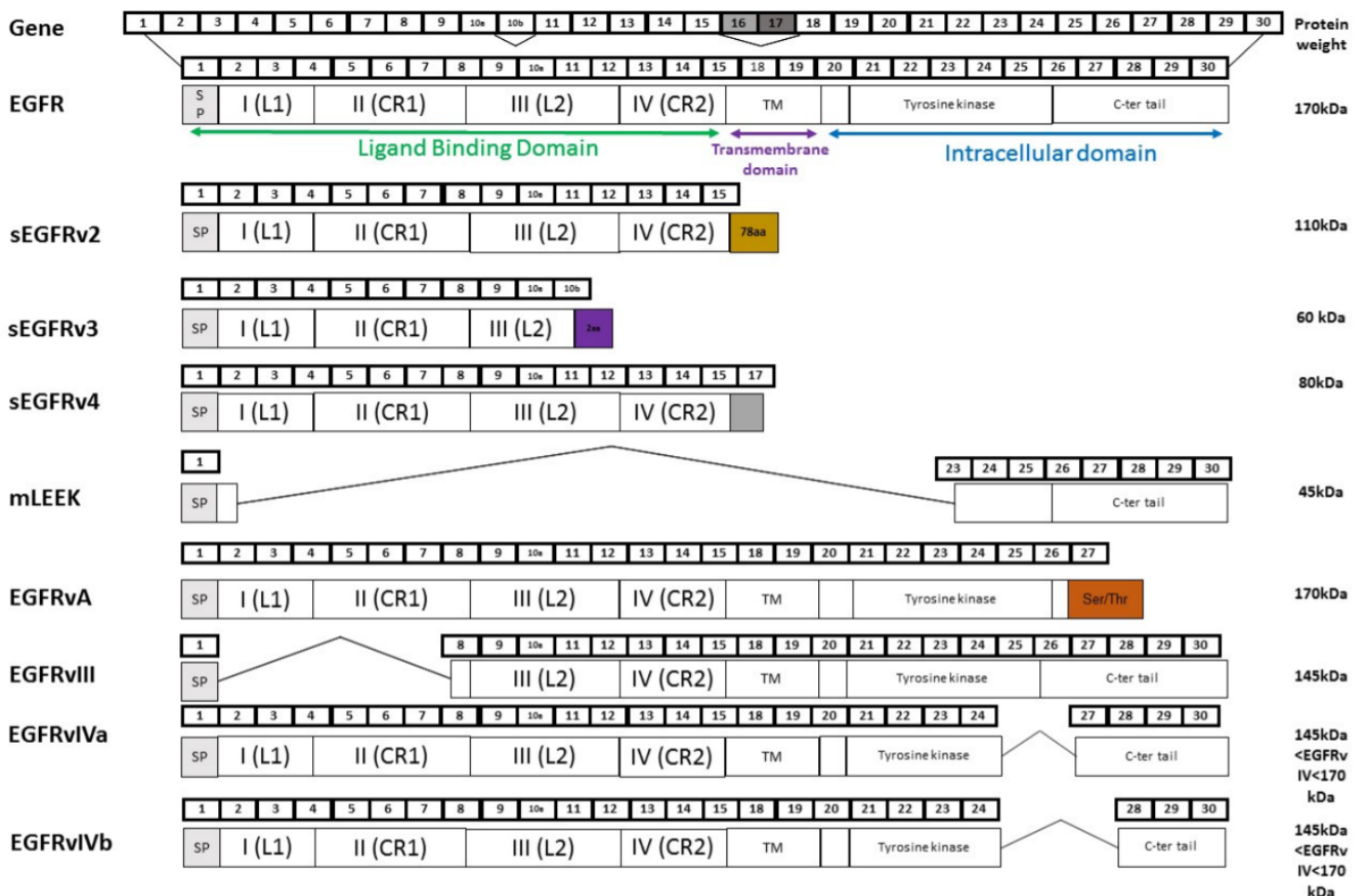


Figure 10 : L'EGFR et ses différents variants d'après Abou-Fayçal et al., 2017

L'EGFR constitué de 30 exons peut subir différents types d'épissage conduisant à l'apparition de nombreux variants de taille différente, ayant des activités différentes. L'ensemble des variants sont représentés dans la figure ci-dessus.

Des formes solubles d'EGFR sont générées par épissage alternatif et par clivage enzymatique de la forme sauvage (Perez-Torres *et al.*, 2008 ; Sanderson *et al.*, 2008). Ces formes sont retrouvées dans les tissus sains et les tissus cancéreux. Dans le cas du cancer bronchique, de l'ovaire ou du sein, les formes solubles sont observées dans la tumeur et dans le sérum des patients (Abou-Fayçal *et al.*, 2017 ; Lemos-González *et al.*, 2007 ; Maramotti *et al.*, 2016). Ces récepteurs ne possédant pas de domaine tyrosine kinase ni d'ancrage membranaire, peuvent capter les ligands, ayant pour effet de ralentir la croissance cellulaire et la progression tumorale dans le méningiome (Guillaudeau *et al.*, 2012). Au contraire, ces formes solubles sont retrouvées inhibées dans le cancer bronchique (Lemos-González *et al.*, 2007).

II.1.5. L'expression de l'EGFR

Le gène de l'EGFR de 110 kb, porté par le bras court du chromosome 7, est divisé en 28 exons. Ce gène exprimé de façon relativement importante dans les cellules normales (environ 40 000 à 100 000 récepteurs par cellule) est retrouvé très fortement surexprimé dans les cellules cancéreuses (Carpenter and Cohen, 1979 ; Gullick *et al.*, 1986). L'expression de l'EGFR est régulée par plusieurs protéines et notamment par son ligand, l'EGF. Les autres protéines régulatrices sont E1A (Haley *et al.*, 1987), Sp1 (Johnson *et al.*, 1988), AP2 (Johnson *et al.*, 1996), la topoisomérase I et c-JUN (Mialon *et al.*, 2005). Ces protéines agissent au niveau du promoteur du gène *EGFR*.

II.1.6. Les rôles physiologiques de l'EGFR

L'EGFR et les membres de la famille ErbB ont un rôle physiologique dans l'ensemble des organes. L'EGFR joue notamment un rôle dans l'embryogenèse des vertébrés. En effet, un défaut d'expression ou des mutations de ErbB cause chez la souris une mort au stade embryonnaire ou périnatale. Il a été montré que la mort des souris déficientes en EGFR provenait de défauts dans différents organes, tels que le cerveau, la peau, le poumon et le tractus gastro-intestinal (Threadgill *et al.*, 1995). Des travaux réalisés chez le rat ont démontré que l'EGFR jouait un rôle au stade embryonnaire dans la maturation de la peau, le développement des follicules pileux et le développement de la cornée (Zieske and Wasson, 1993). L'EGFR, et notamment son activité kinase, a également été montrée durant l'adolescence du rat comme participant au développement des glandes mammaires (Wiesen *et al.*, 1999). A l'âge adulte, l'activité de l'EGFR reste élevée au niveau du système nerveux central (Yamada *et al.*, 1997). L'EGFR est également impliqué de manière physiologique dans des phénomènes métaboliques comme l'activation de la glycolyse, l'inhibition de la synthèse

d'acide gastrique, la stimulation de la synthèse de protéines, d'ADN et d'ARN (Carpenter *et al.*, 1979).

II.1.7. Les mutations de l'EGFR

L'EGFR est une protéine sujette à de nombreuses mutations. En effet, cette protéine peut présenter des mutations au niveau de la partie extracellulaire du domaine kinase et dans sa partie C-terminale. La localisation et le type de mutation sont variables en fonction du type de cancer étudié. Dans le cas du cancer bronchique non à petites cellules, la plupart des mutations touchent le domaine kinase (Pines *et al.*, 2010). D'autres types de cancers sont sujet à des amplifications de l'EGFR et non à des mutations d'un domaine spécifique de la protéine. La majorité des mutations touchant l'EGFR conduisent à l'activation du récepteur de manière indépendante du ligand, à un défaut de recyclage et d'arrêt de sa signalisation (Red Brewer *et al.*, 2013 ; Endres *et al.*, 2014). Peu de mutations touchant la région transmembranaire de l'EGFR ont été identifiées jusqu'alors. Les mutations présentes sur l'EGFR provoquent une perte des éléments régulateurs de la dimérisation des récepteurs. Les variants de l'EGFR les plus connus sont v-ErbB (Downward *et al.*, 1984) et EGFRvIII (Gan *et al.*, 2013), l'un étant l'homologue viral de l'EGFR et l'autre un variant résultant de la délétion des exons 2 à 7. Le variant EGFRvIII est notamment retrouvé dans 50% des glioblastomes, ce type de variant est constitutivement actif (Felsberg *et al.*, 2017). Néanmoins, cette activité constitutive demeure faible, bien qu'elle soit soutenue par un défaut de régulation négative par endocytose (Schmidt *et al.*, 2003).

L'une des mutations les plus fréquente dans le domaine kinase correspond à la substitution de la leucine en position 858 par une arginine, qui induit une augmentation d'un facteur 50 de l'activité de l'EGFR (Yun *et al.*, 2007) (Figure 7). Néanmoins, cette mutation confère à l'EGFR une diminution d'affinité pour l'ATP par rapport à l'EGFR sauvage (Carey *et al.*, 2006). Cette augmentation d'activité kinase n'est donc pas due à une augmentation de la fixation de l'ATP par son site de liaison. Des études cristallographiques ont démontré que l'arginine provoquait le basculement de la boucle d'activation, conduisant à la déstabilisation de la conformation d'auto-inhibition du domaine retrouvé normalement en absence de liaison au ligand. Ce changement de conformation induit donc un état actif stable du récepteur (Zhang *et al.*, 2006 ; Kumar *et al.*, 2008). D'autres mutations telles que la délétion de l'exon 19 ou la substitution T790M conduisent à un état hyper-phosphorylé (Zhang *et al.*, 2010). La mutation T790M augmente l'affinité de l'EGFR pour l'ATP et constitue une des mutations responsables de résistance secondaire aux ITKs, comme nous avons pu le voir dans la partie précédente (Yun *et al.*, 2008). D'autres mutations présentes dans l'exon 20 (domaine kinase) ont été décrites comme participant à la résistance aux ITKs (Yasuda *et al.*, 2013) (Figure 7).

II.1.8. L'EGFR et les miARN dans le cancer

Dans le développement de pathologies telles que le cancer, plusieurs miARNs ont pu être mis en évidence dans la régulation de l'expression de l'EGFR. Les miARNs sont de courts acides ribonucléiques non codant de 20 à 25 nucléotides. Ils sont présents dans les régions

intra- et intergéniques (Bartel *et al.*, 2009). Ceux-ci sont transcrits par l'ARN polymérase II avant d'être maturés dans le noyau par la RNse III Drosha pour donner le brin final (Saj and Lai, 2011). Les miARNs matures induisent une répression post-transcriptionnelle des gènes cibles tels que l'EGFR.

Dans le cancer bronchique, une grande quantité de miRNAs ont déjà pu être identifiés et testés par xénogreffe. Une étude a notamment permis de montrer que l'augmentation de l'expression du miARN-7 induit une sensibilisation des cellules d'adénocarcinome bronchique au paclitaxel en supprimant la prolifération cellulaire et favorisant l'apoptose (Liu *et al.*, 2014). Ce miARN était déjà connu pour limiter la prolifération, la migration et augmenter l'apoptose (Xiong *et al.*, 2011). Ce miARN est également connu pour agir sur la régulation de l'EGFR (Webster *et al.*, 2009). En effet, le miARN-7 induit une diminution de l'expression de l'EGFR et agit également dans la radiosensibilité médiée par la suppression de l'activation de la voie EGFR-PI3K-AKT (Lee *et al.*, 2011).

La dérégulation de l'expression des miARNs peut conduire à des processus oncogéniques, notamment à cause d'une perte de répression des gènes cibles (Mishra *et al.*, 2008). De manière intéressante, il semblerait que l'expression de certains miARNs soit corrélée avec une augmentation de l'activité oncogénique, alors que d'autres miARNs agiraient comme suppresseurs de cette activité. A titre d'exemple, les miARN-26a et miARN-29 seraient impliqués dans la régulation de la formation de métastases dans le cancer bronchique (Gebeshuber *et al.*, 2009 ; Liu *et al.*, 2012). La compréhension de la régulation et de la fonction des miARNs pourrait permettre la mise en place de nouveaux outils moléculaires dans le diagnostic et le traitement du cancer.

II.2. L'activation de l'EGFR

L'activation de l'EGFR par ses différents ligands induit de nombreuses modifications cellulaires. En effet, la stimulation du récepteur, par exemple par l'EGF, provoque la prolifération, la différenciation, la migration et inhibe également l'apoptose. Il a également été démontré que l'ajout d'EGF induit la phosphorylation de plus de 2200 protéines dans des cellules HeLa (Olsen *et al.*, 2006). De plus, ce ligand préférentiel de l'EGFR agit sur l'expression de 3172 gènes et 596 protéines dans des cellules épithéliales mammaires (Waters *et al.*, 2012). L'activation de l'EGFR débute par la fixation d'un de ses ligands à sa surface ou par l'apparition de mutations activatrices, suivie par l'activation de différentes cascades de signalisations.

II.2.1. Les ligands de l'EGFR

L'EGFR et les membres de la famille ErbB possèdent différents ligands ayant des affinités variables en fonction du récepteur. La famille ErbB compte onze ligands différents : l'EGF, le TGF α (Transforming growth factor α), l'Areg (Amphiréguline), l'EPGN (Epigène), la BTC (Bétacelluline), l'EPR (Epiréguline), les neurégulines (NRG-1 / 2 / 3 / 4) et l'HB-EGF (Heparin-binding EGF). Tous ces ligands ne sont pas reconnus par tous les membres de la famille ErbB. L'EGFR reconnaît spécifiquement l'EGF, EPGN, TGF α et l'amphiréguline. La

BTC, l'HB-EGF et l'EPR sont reconnus par l'EGFR et HER4. Les neurégulines sont reconnues par HER3 et HER4. HER2 ne reconnaît pas de ligand étant donné l'absence de partie C-terminale extracellulaire.

Les ligands de l'EGFR sont synthétisés sous forme de précurseurs transmembranaires contenant une courte partie intracellulaire, un domaine transmembranaire et une partie extracellulaire correspondant au ligand après son clivage. Ce processus de maturation passe par le clivage du précurseur par une métalloprotéase de type ADAM (disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein). Les ligands ainsi libérés à l'extérieur des cellules permettront de stimuler les cellules avoisinantes et la cellule émettrice elle-même en fixant les récepteurs de la famille ErbB.

II.2.2. La dimérisation de l'EGFR

L'activation de l'EGFR se fait par la fixation de son ligand sur chaque monomère et la dimérisation de ceux-ci, passant d'un état inactif « fermé » à actif « ouvert ». La liaison du ligand se fait sur les domaines I et III du récepteur ce qui provoque un changement de conformation du monomère, exposant son bras de dimérisation porté par le domaine II. Le récepteur est alors dans un état ouvert stable, de manière à accueillir un second monomère de la famille ErbB identique ou différent (Ferguson *et al.*, 2003). Ce changement de conformation au niveau extracellulaire est propagé dans la partie transmembranaire et juxta-membranaire qui est en lien avec le domaine kinase (Jura *et al.*, 2009). Le dimère de récepteur est alors activé. Le mode de dimérisation de l'EGFR est dit « médié par le récepteur », cela signifie que le ligand n'intervient pas directement dans la dimérisation de l'EGFR. En effet, la dimérisation se fait par le biais du domaine II du récepteur et non par le site de liaison au ligand, comme cela peut être vu pour le NGF et TrkA. De cette manière, le ligand permet un changement de conformation du domaine II de l'EGFR afin de favoriser l'activation du récepteur sans que le site de liaison au ligand ne soit impliqué dans la phosphorylation. Ce changement de conformation permet de stabiliser le dimère néoformé et d'induire en intracellulaire la trans-autophosphorylation des deux monomères (Zhang *et al.*, 2006). La trans-autophosphorylation de l'EGFR est l'étape indispensable pour déclencher différentes voies de signalisation (canoniques et secondaires).

II.2.3. La trans-autophosphorylation de l'EGFR

La liaison de l'EGF à l'EGFR conduit donc à la transphosphorylation de nombreux résidus tyrosines (Y703, Y920, Y992, Y1045, Y1068, Y1086, Y1148, et Y1173) dans la partie intracellulaire (Figure 11). En plus de ces résidus autophosphorylés, d'autres acides aminés sont phosphorylés par d'autres kinases présentes en aval de l'EGFR telles que c-SRC et PKC (protein kinase C) qui agissent respectivement sur la tyrosine Y845 et la thréonine T644 (Sato *et al.*, 2013 ; Hunter *et al.*, 1984). Ces sites de phosphorylation servent alors d'ancrage aux protéines telles que Grb2 (growth factor binding protein 2), Sos (son of sevenless), PI3K, PLC portant des domaines de liaison aux tyrosines et thréonines phosphorylées, les domaines SH2

(Src homologue 2) et SH3. Une fois les protéines portant ces domaines recrutés, celles-ci enclenchent l'activation des différentes cascades de signalisation.

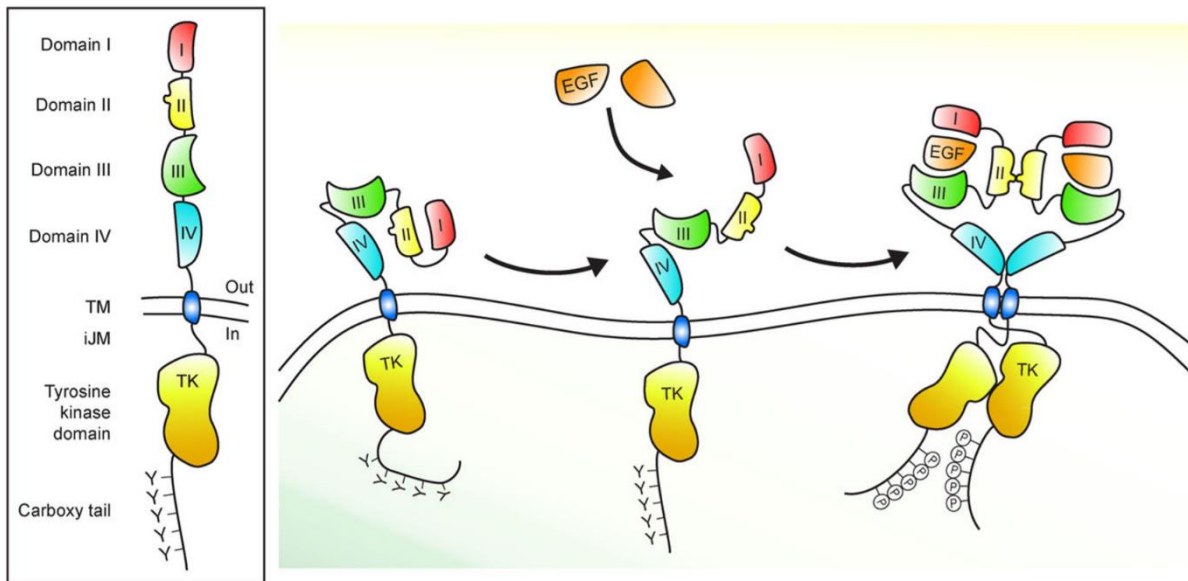


Figure 11 : Représentation schématique de la structure et de l'activation de l'EGFR d'après (Sigismund et al., 2018)

II.3. Les voies de signalisation canoniques

L'activation de l'EGFR par ses différents ligands conduit à une cascade de signalisation intracellulaire (Figure 12). Celles-ci induisent une réponse médiée par différentes voies de signalisation. On note alors deux grands types de voies de signalisation, les voies canoniques dont l'activité passe par le biais de divers acteurs moléculaires et les voies non canoniques où l'EGFR va agir directement au niveau de la chromatine pour réguler la transcription dans le noyau (Tomas *et al.*, 2014).

II.3.1. La voie de signalisation RAS-RAF-MEK-ERK MAPK

La voie RAS-RAF-MEK-ERK MAPK est la voie la plus importante à la suite de l'activation de l'EGFR pour réguler la prolifération cellulaire, la différenciation, la migration et l'inhibition de l'apoptose (Figure 12). Après l'activation de l'EGFR par trans-autophosphorylation, les protéines Grb2 et Sos se lient directement par le domaine SH2 aux tyrosines phosphorylées (Lowenstein *et al.*, 1992) ou indirectement via la protéine SHC (Batzer *et al.*, 1994). La protéine Sos ainsi fixée est alors activée provoquant son changement de conformation, lui permettant le recrutement de Ras-GDP. Le recrutement de Ras-GDP induit l'échange du GDP en GTP et l'activation de Ras. Ras-GTP se lie alors directement avec RAF-1 qui est à son tour phosphorylée (Brtva *et al.*, 1995). RAF-1 est une protéine cruciale dans l'activation de cette voie de signalisation. Une fois activé, RAF-1 active MEK1/2 (mitogen-activated protein kinase kinase-MAPKK) (Xiang *et al.*, 2002) qui recrute et active ERK1/2

(extracellular signal regulated kinase 1/2) (Dhanasekaran *et al.*, 1998) qui fait partie des MAPKs. Une fois activées, ces MAPKs sont transloquées dans le noyau où elles activent par phosphorylation des facteurs de transcription associés à la prolifération cellulaire (Gaestel *et al.*, 2006 ; Hill and Treisman, 1995).

II.3.2. La voie de signalisation PI3K-AKT-mTOR

La voie de signalisation PI3K-AKT-mTOR contrôle plusieurs mécanismes cellulaires : le métabolisme, la prolifération, la taille des cellules, la survie et la mobilité (Shaw *et al.*, 2006 ; Vivanco and Sawyers, 2002). Dans le cancer, cette voie est couramment hyperactivée à cause des mutations touchant l'EGFR et la suppression de PTEN qui est un régulateur négatif de PI3K. PI3K est composée d'une sous-unité régulatrice p85 qui assure la liaison entre l'EGFR et le domaine catalytique p110 responsable de la phosphorylation du phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (PIP2) en phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate (PIP3). Le passage du PIP2 au PIP3 permet le recrutement de la PDK1 (3-phosphoinositide-dependent protein kinase 1) et de AKT (RAC-beta serine / thréonine kinase) au niveau de la membrane. A ce niveau, PDK1 phosphoryle et active AKT (Vivanco and Sawyers, 2002). La liaison de la sous-unité p85 de la PI3K est dépendante de la protéine adaptatrice Gab-1 étant donné l'absence de site de liaison sur l'EGFR (Mattoon *et al.*, 2004). Du fait de la présence de nombreux sites de liaison à la sous-unité p85 sur HER3, les hétérodimères EGFR / HER3 sont préférentiellement impliqués dans l'activation de cette voie (Yarden and Sliwkowski, 2001). L'activation de AKT conduit à des phosphorylations inhibitrices et des phosphorylations activatrices selon les acteurs moléculaires en aval. Ainsi, AKT peut inhiber par phosphorylation la GSK-3 β bloquant ainsi la dégradation de la cycline D1 induite par cette dernière. La cycline D1 étant toujours active elle peut donc favoriser une stimulation mitogénique permettant aux cellules d'entrer dans le cycle cellulaire. AKT inhibe également FOXO, un inhibiteur de la transcription de la cycline D1. De plus, AKT permet d'inhiber diverses protéines pro-apoptotiques telles que BIM, BAD et la Caspase-9. A l'inverse, elle participe à l'activation de mTOR jouant un rôle dans l'activation du cycle cellulaire.

II.3.3. La voie de signalisation de la phospholipase C γ

La phospholipase C γ (PLC γ) se lie directement à l'EGFR activé par le biais de son domaine SH2 ce qui conduit à son activation (Ji *et al.*, 2001) (Figure 12). Après activation, la PLC γ peut catalyser l'hydrolyse du phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP2) en inositol 1,4,5-triphosphate (IP3) et en diacylglycérol (DAG). L'IP3 libre dans le cytosol se lie ensuite aux récepteurs à l'IP3 au niveau du réticulum endoplasmique permettant la libération de calcium (Patterson *et al.*, 2005). Le calcium et le DAG présents dans la cellule activent la PKC qui active alors la voie des MAPKs et c-Jun (McClellan *et al.*, 1999 ; Schönwasser *et al.*, 1998).

II.3.4. La voie de la kinase SRC

La protéine kinase SRC a été la première protéine à activité tyrosine kinase découverte (Levinson *et al.*, 1980). A ce jour, 11 protéines kinases non réceptrices sont connues. Celles-ci sont exprimées dans la plupart des tissus et ont un rôle majeur dans la régulation des processus cancéreux (Sen et Johnson, 2011). SRC peut activer divers acteurs de la signalisation cellulaire (Figure 12). Par exemple, elle peut activer la phosphorylation de l'EGFR et HER4. Bien que ces mécanismes soient méconnus, l'EGFR et HER4 possèdent des sites de liaison pour SRC, il semblerait que cette activation passe par l'intermédiaire de RAS et RAL (Goi *et al.*, 2000). L'EGFR et SRC sembleraient avoir une activité synergique conduisant à l'apparition de cancers très agressifs (Tice *et al.*, 1999 ; Poole *et al.*, 2011). SRC présente également la capacité d'activer STAT (signal transducer and activator of transcription) indépendamment de l'activation de JAK pour induire la transcription (Olayioye *et al.*, 1999). Dans le cancer bronchique, SRC induit la phosphorylation de la tyrosine Y845 de l'EGFR conduisant à son activation indépendamment de la fixation d'un ligand (Sato *et al.*, 1995). De ce fait, cette phosphorylation a été suggérée comme marqueur de diagnostic pour le traitement de divers cancers dont le CBNPC (Endoh *et al.*, 2009 ; Chung *et al.*, 2009).

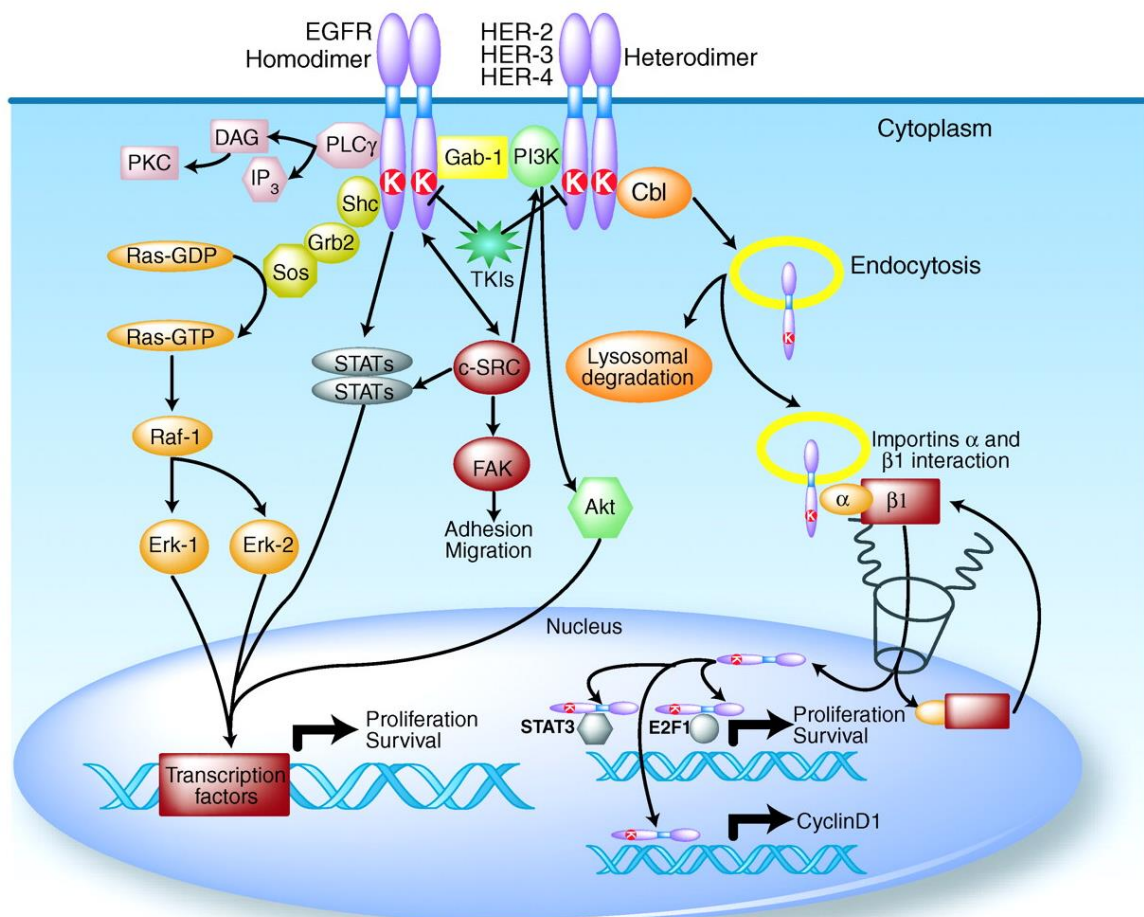


Figure 12 : Les voies de signalisation activées par l'EGFR d'après Scaltriti et Baselga, 2006

Lors de l'activation de l'EGFR, celui-ci s'homodimérise ou s'hétérodimérise avec des membres de sa famille. Son activation induit la phosphorylation de résidus tyrosine dans sa partie intracellulaire ce qui promeut le recrutement de protéines intracellulaires. Les récepteurs activés peuvent induire l'activation

des voies de signalisation Ras/Raf/MAPK et PI3K par le biais de protéines adaptatrices. A l'inverse, les voies de la phospholipase C γ (PLC γ) et des facteurs de transcription STAT sont activées directement par interaction avec l'EGFR activé. En parallèle, l'activation de l'EGFR conduit à l'endocytose des récepteurs qui peuvent être dégradés par le lysosome ou transloqué au noyau par le biais de l'importine β 1. L'EGFR nucléaire peut alors agir en cofacteur de transcription. De manière générale, l'EGFR entraîne l'activation de gènes participant à la prolifération, à la survie cellulaire et l'apparition de métastases.

II.3.5. La voie STAT (transducteurs du signal et activateurs transcriptionnels)

Les protéines STAT (signal transducers and activators of transcription) sont à la fois des transmetteurs du signal et des activateurs transcriptionnels. L'activation de l'EGFR permet l'activation de la voie STAT et notamment de STAT-3 qui interagit avec l'EGFR par son domaine SH2. Les protéines STAT sont alors phosphorylées par l'EGFR, les conduisant à se dimériser. Une fois dimérisées, celles-ci sont transloquées au niveau nucléaire où elles agissent en tant que facteurs de transcription. Dans le cas de cancers, les RTKs sont fortement activés, contribuant alors à une forte activation des STATs et ainsi à l'activation accrue de leurs gènes cibles impliqués dans l'oncogenèse et la progression tumorale (Bromberg *et al.*, 2002).

II.4. Les voies de signalisation non-canoniques de l'EGFR

De plus en plus de publications attribuent des fonctions à l'EGFR ne dépendant pas des voies de signalisations canoniques habituelles, mais de fonctions nucléaires ou exosomales permettant son action à distance du foyer tumoral. L'identification de ces modes de signalisation alternatifs de l'EGFR, et notamment de ceux nucléaires, ouvre de nombreuses perspectives quant au fonctionnement des RTKs et au contournement des thérapies mises en œuvre.

II.4.1. Les fonctions nucléaires de l'EGFR

Au niveau nucléaire, l'EGFR peut induire différentes actions en agissant sur la chromatine de différentes manières. Il peut intervenir dans la régulation génique, la réparation et la réplication de l'ADN et dans l'état de condensation de la chromatine.

II.4.1.1. La translocation nucléaire de l'EGFR

L'une des voies de signalisation non canonique de l'EGFR passe par l'internalisation du récepteur par endocytose. Bien que peu connue, la signalisation nucléaire de l'EGFR semble passer par le transport rétrograde des protéines membranaires, jalonné par l'appareil

de Golgi et le réticulum endoplasmique pour finir au niveau nucléaire. Ce transport nécessite divers complexes protéiques pour son endocytose ainsi que son transport jusqu'au noyau (Figure 13).

A la suite de la stimulation des cellules par l'EGF, l'EGFR peut être observé au niveau nucléaire. Pour cela, l'EGFR activé et internalisé interagit avec l'importine $\beta 1$ par le biais des séquences NLS (Nuclear Localization Signal) portées par l'EGFR dans sa partie juxta-membranaire (Lo *et al.*, 2006). Les endosomes contenant les complexes EGFR /importine $\beta 1$ sont orientés vers l'appareil de Golgi grâce au transport rétrograde médié par la dynéine et les microtubules. A ce stade, les vésicules d'endocytose peuvent fusionner avec le Golgi grâce à la syntaxine 6 (Du *et al.*, 2014). Le complexe protéique COPI (Coat Protein Complex I) prend alors en charge le transport entre le Golgi et le réticulum endoplasmique (Wang *et al.*, 2010a). L'entrée dans le noyau se fait ensuite par l'interaction du complexe EGFR / importine $\beta 1$ avec la nucléoporine Sec61 β qui induit le passage de l'EGFR de la membrane nucléaire externe à la membrane interne. Ce mécanisme de transport entre la membrane externe et l'intérieur du noyau est appelé « INTERNET » (Integral trafficking from the ER to the Nuclear Envelope Transport) (Wang *et al.*, 2010a ; Wang *et al.*, 2010b ; Wang *et al.*, 2010c). Celui-ci permet le transfert de l'EGFR au travers des pores nucléaires et sa libération dans le nucléoplasme. De nombreux travaux suggèrent que le transport de l'EGFR vers le noyau serait influencé par sa phosphorylation par différentes protéines telles que AKT, Src et PKC ϵ (Lida *et al.*, 2013 ; Wanner *et al.*, 2008 ; Huang *et al.*, 2011). Plus récemment, des études réalisées sur des cellules de cancer bronchique ont montré l'implication de protéines à domaines Vps participant au transport nucléaire de l'EGFR. En effet, la protéine Vps34 (vacuolar protein sorting 34) participerait à la formation des endosomes précoces nécessaires à l'endocytose de l'EGFR (Dayde *et al.*, 2016). Une étude réalisée dans notre laboratoire a également montré l'impact de la sortiline, une protéine à domaine Vps10, dans l'internalisation et la modulation de l'EGFR nucléaire (Al-Akhrass *et al.*, 2017).

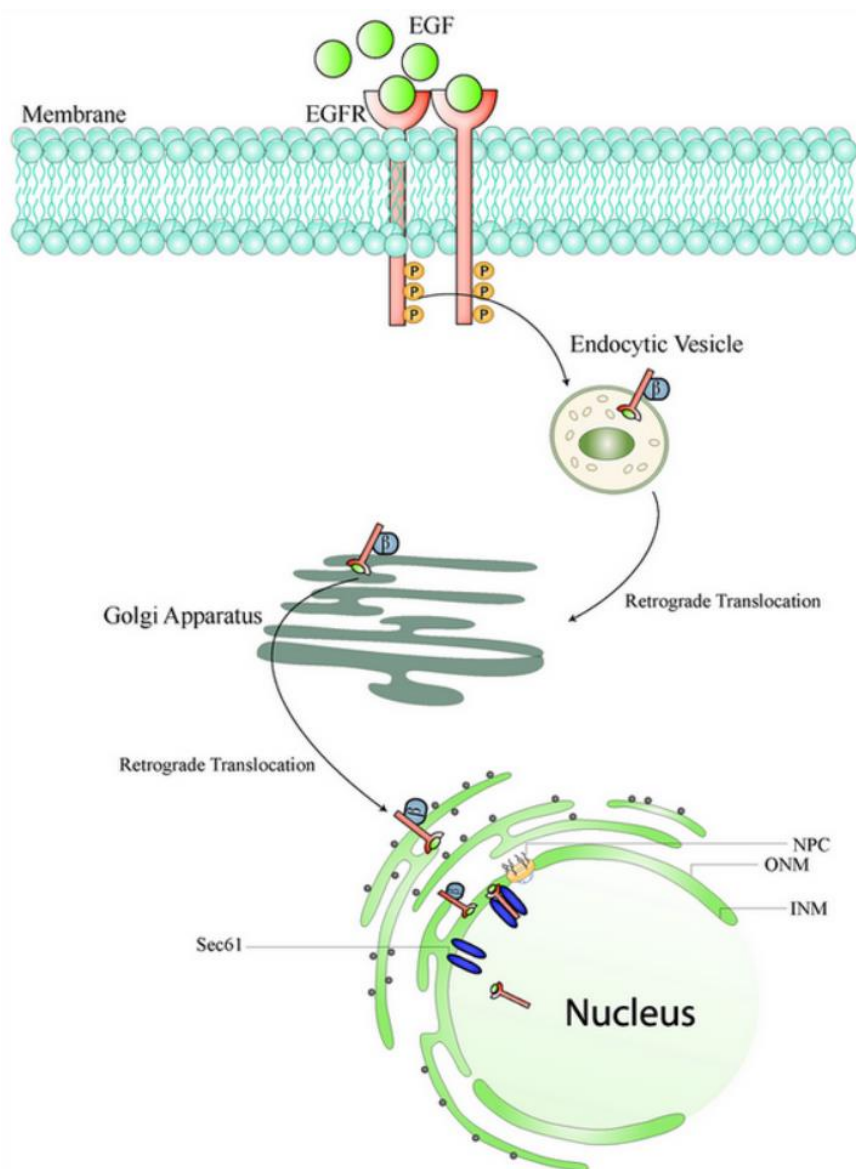


Figure 13 : La translocation nucléaire de l'EGFR d'après Brand, 2011

Lors de l'activation de l'EGFR, le récepteur est endocyté puis subit un transport rétrograde passant par l'appareil de Golgi avant d'être acheminé dans le réticulum endoplasmique. Une fois dans le réticulum endoplasmique, l'EGFR est pris en charge par l'importine β 1 pour passer l'enveloppe nucléaire au niveau des nucléoporines Sec61.

II.4.1.2. La régulation transcriptionnelle par l'EGFR

L'EGFR possède une activité trans-activatrice intrinsèque dans sa partie C-terminale (Lin *et al.*, 2001). Néanmoins, il ne possède pas de domaine de liaison à l'ADN ce qui nécessite qu'il soit associé à d'autres protéines pour établir son activité de régulateur transcriptionnel. La première cible transcriptionnelle identifiée a été la cycline D1 (Figure 14). Lors de la

stimulation des cellules à l'EGF, l'EGFR se fixe par le biais de partenaires protéiques au niveau du promoteur de cette cible dans des régions ATRS (riche en A/T), ce qui augmente la transcription de la cycline D1 (Lin *et al.*, 2001). En 2010, une étude a montré que l'EGFR ne fixait pas le promoteur de la cycline D1 seul. En effet, la fixation se fait par l'intermédiaire de la RHA (RNA Hélicase A) (Huo *et al.*, 2010) (Figure 14). La régulation de la cycline D1 a également été montrée comme étant influencée par d'autres partenaires protéiques de l'EGFR, tels que Muc1 (mucin-1), LMP1 (lysosome-associated membrane glycoprotein) et TIF2 (Transcriptional Intermediary Factor 2) (Bitler *et al.*, 2010 ; Shi *et al.*, 2012). Par la suite, d'autres gènes cibles de l'EGFR ont été identifiés tels que iNOS (Lo *et al.*, 2005a), B-Myb (Hanada *et al.*, 2006), COX-2 (Lo *et al.*, 2010), Aurora-A (Hung *et al.*, 2011), la thymidylate synthase (Kim *et al.*, 2009), BCRP (ABCG2) (Huang *et al.*, 2011), c-myc (Jaganathan *et al.*, 2011). Ces promoteurs sont également porteurs de séquences ATRS qui permettent la fixation de différents cofacteurs de transcription comme STAT3, STAT5 et E2F1 (Figure 14). Dans le cas de c-myc, l'EGFR active la transcription via SRC et STAT3. L'EGFR en interagissant avec les régions promotrices peut donc stimuler des gènes impliqués dans la croissance tumorale, l'instabilité chromosomique, la résistance thérapeutique.

Il semblerait que les cofacteurs transcriptionnels ne soient pas les seuls facteurs influençant l'activité transcriptionnelle de l'EGFR nucléaire. En effet, des travaux ont mis en évidence que la sumoylation de l'EGFR stimulerait sa capacité à activer la transcription de ses gènes cibles (Packham *et al.*, 2009). De récents travaux ont permis de montrer que l'EGFR n'a pas uniquement un rôle d'activateur transcriptionnel mais qu'il peut également réprimer l'expression d'autres gènes comme le suppresseur de tumeur ARF (ADP Ribosylation Factor) (Dayde *et al.*, 2016) et peut également agir sur la stabilité des ARN messagers (Dittmann *et al.*, 2017). Cependant, tous les partenaires et les rôles nucléaires de l'EGFR ne sont pas encore connus.

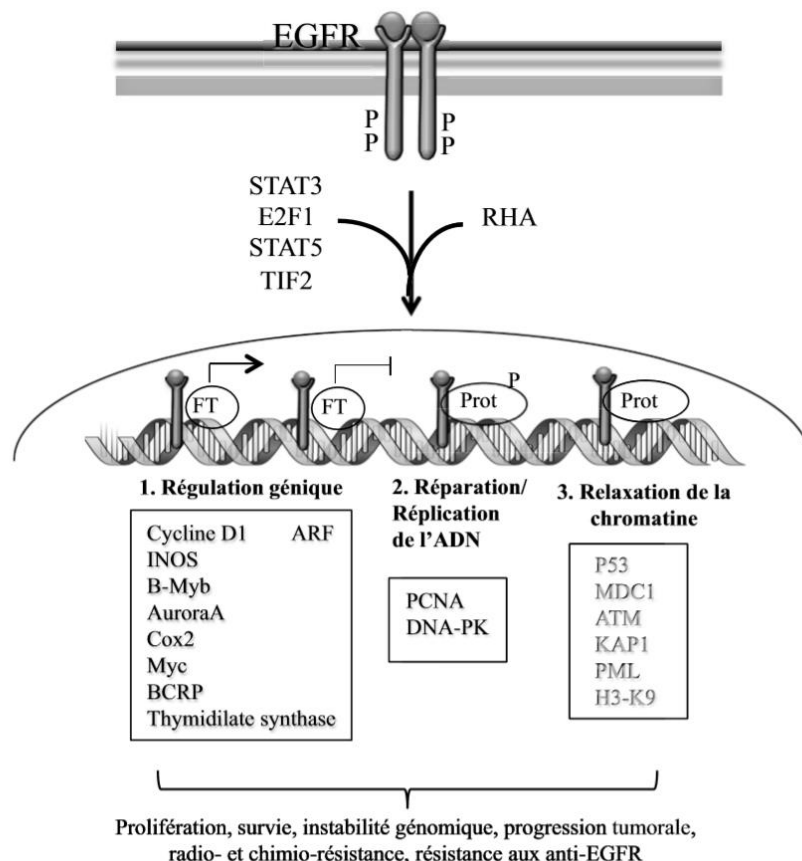


Figure 14 : Les différentes fonctions nucléaires de l'EGFR d'après Gazzeri, 2018

L'EGFR nucléaire agit en tant que cofacteur transcriptionnel de gènes cibles. Il peut agir comme activateur ou inhibiteur de la transcription de ses cibles. L'EGFR peut interagir avec des facteurs de transcriptions tels que STAT3/5, E2F1, TIF2 ou avec des protéines telle que la RNA Hélicase A (RHA). Au niveau nucléaire il peut favoriser la réplication et la réparation de l'ADN en stabilisant PCNA et DNA-PK. Le niveau de compaction de la chromatine pourrait également être régulé par l'EGFR par le biais de protéines nucléaires. L'EGFR nucléaire, au travers de ses différentes fonctions, permet de stimuler la prolifération et la survie cellulaire ainsi que la résistance aux thérapies anti-EGFR.

II.4.1.3. Les interactions entre l'EGFR et les autres protéines nucléaires (non-facteurs de transcription ou co-activateurs transcriptionnels)

De la même façon que pour son rôle dans la régulation transcriptionnelle, l'EGFR interagit avec de nombreuses protéines au niveau nucléaire. En effet, lors de traitements antitumoraux comme les sels de platine ou à la suite d'une irradiation des cellules, l'EGFR se trouve transloqué dans le noyau où il agit en faveur de la réparation des dommages à l'ADN. Il interagit avec la protéine kinase dépendante de l'ADN (DNA-PK), qui a un rôle prépondérant dans la réparation des cassures doubles brins de l'ADN (Dittmann *et al.*, 2005a ; Hsu *et al.*, 2009 ; Liccardi *et al.*, 2011). L'interaction EGFR / DNA-PK conduit à une surexpression de cMYC induisant une survie cellulaire accrue. D'autres travaux ont permis de montrer que l'EGFR est également partenaire de la polynucléotide phosphorylase (PNPase). La PNPase est une protéine à activité exoribonucléasique induisant la dégradation de l'ARN messager de cMYC. L'EGFR interagissant avec la DNA-PK permet la phosphorylation inactivatrice de la PNPase et ainsi la non-dégradation des ARN messagers de cMYC (Yu *et al.*, 2012).

II.4.1.4. La fonction kinase de l'EGFR

Lors de sa translocation nucléaire, l'EGFR ne perd pas son activité tyrosine kinase. En effet, l'EGFR nucléaire lie l'antigène nucléaire prolifératif (PCNA), lui-même lié à la chromatine, et provoque sa stabilisation par phosphorylation. L'augmentation de la stabilité de PCNA assure le bon fonctionnement de celle-ci et conduit à une augmentation de la capacité de la cellule à réparer les dommages à l'ADN (Wang *et al.*, 2006).

Des études menées sur le glioblastome ont permis de montrer que le variant EGFR-vIII était l'un des substrats de phosphorylation de l'EGFR nucléaire. Une fois dans le noyau, l'EGFR-vIII se lie et active par phosphorylation STAT3 qui participe à la progression du glioblastome (Fan *et al.*, 2013).

En 2014, des travaux ont mis en évidence l'action de l'EGFR sur les modifications post-traductionnelles des histones. Ces dernières sont des protéines dont le rôle dans la régulation de la dynamique chromatinienne n'est plus à démontrer. Néanmoins, les stimuli responsables des modifications post-traductionnelles des histones ne sont pas encore totalement élucidés. Les travaux antérieurs ont montré que l'EGFR nucléaire phosphoryle l'histone H4, induisant le recrutement d'histone-méthyltransférases (HMTases). Ces HMTases induisent la méthylation des histones au niveau du résidu Lysine K20. L'augmentation de la méthylation de ce résidu

permet une augmentation de la synthèse d'ADN et de la réparation des cassures doubles brins (Chou *et al.*, 2014).

II.4.1.5. L'EGFR nucléaire en tant que facteur de mauvais pronostic dans le cancer

L'EGFR a été localisé pour la première fois au niveau nucléaire par immunohistochimie (IHC) en 1994 dans le cancer de la vessie et le cancer du col de l'utérus. Il a été observé dans le noyau dans 31% des cancers de la vessie (Lipponen & Eskelinen, 1994) et 37% des cancers utérins (Tervahauta *et al.*, 1994). L'EGFR nucléaire est associé à une forte prolifération cellulaire et à un mauvais pronostic. Son expression nucléaire est corrélée positivement avec des marqueurs d'agressivité comme le Ki-67 et la cycline D1 dans le cancer du sein (Lo *et al.*, 2005b ; Hadzisejdic *et al.*, 2010). De plus, la forte présence d'EGFR nucléaire a été associée à une invasion vasculaire et un stade avancé (Li *et al.*, 2012). Il a été montré dans le cancer bronchique comme étant un marqueur de mauvais pronostic dès les stades précoces (Traynor *et al.*, 2013). Ces travaux sont étayés par une étude récente qui démontre que l'EGFR nucléaire pourrait contrôler des processus pro-oncogéniques favorisant l'agressivité tumorale (Bazzani *et al.*, 2018).

II.4.1.6. L'EGFR nucléaire et résistances thérapeutiques

La principale cause d'échappement thérapeutique est l'apparition de résistances en lien avec l'EGFR. Son expression nucléaire semble être, en plus des mutations primaires et secondaires, l'une des causes principales de résistances thérapeutiques. En effet, l'EGFR nucléaire contribue à la résistance à la chimiothérapie, à la radiothérapie et aux thérapies ciblées (Brand *et al.*, 2011).

Lorsque les cellules tumorales sont soumises à des traitements du type sels de platine, celles-ci induisent la translocation nucléaire de l'EGFR et l'interaction avec diverses protéines conduisant à la survie cellulaire (Cf II.4.1.1.).

L'utilisation de la radiothérapie conduit également à l'adressage de l'EGFR au noyau qui se lie à la DNA-PK participant à la réparation de l'ADN. L'EGFR interagit avec des protéines impliquées dans la condensation et la réparation de l'ADN comme KAP1, ATM, PML et H3-K9. De cette façon, il agit sur le niveau de condensation de la chromatine facilitant ainsi l'accessibilité de la machinerie transcriptionnelle à l'ADN (Dittmann *et al.*, 2011). L'ATM est une protéine régulant la réponse aux dommages à l'ADN, comme les cassures doubles brins. Lors de ce type de cassure, ATM induit l'arrêt du cycle cellulaire et l'activation des points de contrôle ce qui conduit à l'apoptose des cellules lésées (Shiloh and Ziv, 2013). L'interaction EGFR / ATM au niveau des cassures doubles brins de l'ADN à la suite d'une irradiation déclenche une phosphorylation d'ATM aboutissant à son inhibition (Lee *et al.*, 2015). Ces événements en cascade mènent à la résistance des cellules aux irradiations.

L'utilisation de thérapies ciblées est également contrée par la présence de l'EGFR nucléaire. A titre d'exemple, le cetuximab (Anticorps anti-EGFR) induit la translocation nucléaire de l'EGFR dans le cancer bronchique permettant aux tumeurs de résister au

traitement (Li *et al.*, 2009). L'utilisation du dasatinib (un inhibiteur des kinases Src) sur ces cellules induit une diminution de l'EGFR nucléaire et sa relocalisation membranaire qui permet de restaurer la sensibilité des cellules au cetuximab (Wheeler *et al.*, 2009). Cette observation démontre que la résistance au cetuximab, due à la localisation nucléaire de l'EGFR dépend des kinases Src. Le traitement des cellules tumorales bronchiques à l'aide de cetuximab a permis de voir que l'EGFR active la transcription des gènes *B-Myb* et *iNOS* participant à la tumorigénicité (Lida *et al.*, 2013). L'EGFR a également été localisé aux niveaux nucléaire et périnucléaire dans des cellules tumorales pulmonaires résistantes au gefitinib (Nishimura *et al.*, 2008 ; Kwak *et al.*, 2005). Dans des cellules résistantes au gefitinib issues de cancers mammaires, l'utilisation d'inhibiteurs d'AKT ont permis de resensibiliser les cellules et de relocaliser l'EGFR à la membrane plasmique. Dans ces mêmes tumeurs, l'EGFR nucléaire induit une augmentation de la transcription du gène *ABCG2*, permettant le relargage du gefitinib à l'extérieur de la cellule (Huang *et al.*, 2011) et la résistance thérapeutique.

Une des isoformes connue de l'EGFR est mLEEK qui ne possède pas de partie extracellulaire, ni de domaine transmembranaire ou de site de liaison à l'ATP. Ce variant est surexprimé dans le cancer des ovaires et le cancer du poumon. Il est principalement retrouvé dans le noyau où il module l'expression de gènes impliqués dans la réponse aux stress cellulaires (Piccione *et al.*, 2012). L'ensemble de ces données laissent entrevoir les rôles potentiels de l'EGFR au niveau nucléaire dans le cancer.

II.4.2. L'EGFR exosomal

Les exosomes sont des nano-vésicules dérivées des corps multivésiculaires ayant un diamètre allant de 40 à 120 nm. Lors de la fusion des corps multivésiculaires avec la membrane plasmique, les exosomes sont sécrétés à l'extérieur de la cellule (Mathivanan and Simpson, 2010 ; Raposo and Stoorvogel, 2013). Les exosomes possèdent diverses fonctions biologiques. Ils sont retrouvés en conditions normale et pathologique dans le sang, l'urine, le Liquide céphalo-rachidien, les ascites, le lait et la salive (Van der Pol *et al.*, 2012 ; Simons and Raposo, 2009). Ils permettent la communication intercellulaire en acheminant une grande diversité de molécules tels que les ARN, les microARN, l'ADN et les protéines (Valadi *et al.*, 2007 ; Cha *et al.*, 2015 ; Record *et al.*, 2014 ; Hannafon and Ding, 2013). Les exosomes empêchent la dégradation de leur contenu et transportent ce contenu vers des cellules réceptrices à proximité ou à distance de la cellule émettrice. Dans des conditions pathologiques comme le cancer, les exosomes induisent la progression tumorale, l'apparition de métastases, l'angiogenèse, la modification du microenvironnement tumoral et la suppression immunitaire (Kahlert and Kalluri, 2013 ; EL Andaloussi *et al.*, 2013 ; They *et al.*, 2009 ; Wilson *et al.*, 2014). L'EGFR présent dans les exosomes peut être sous forme de fragments C-terminaux associés à la membrane ou sous sa forme totale. Sa sécrétion se trouve augmentée à la suite de la stimulation des kératinocytes humains par de l'EGF (Sanderson *et al.*, 2008). L'EGFR sous sa forme totale est également retrouvé dans les cellules de cancer pancréatique et sa forme tronquée a pu être observée dans le surnageant de culture cellulaire (Adamczyk *et al.*, 2011 ; Perez-Torres *et al.*, 2008 ; Sanderson *et al.*, 2008). La forme exosomale de l'EGFR apporte de nouvelles fonctions à ce récepteur en dehors de ses voies de signalisations classiques.

II.4.2.1. L'EGFR exosomal en tant que biomarqueur

L'EGFR présent dans les exosomes a pu être étudié dans différents types de cancers comme le cancer de la vessie (Welton *et al.*, 2010), le cancer du pancréas (Adamczyk *et al.*, 2011 ; Arscott and Camphausen, 2011), le cancer colorectal (Choi *et al.*, 2011 ; Demory Beckler *et al.*, 2013) et le cancer du poumon (Yamashita *et al.*, 2013 ; Park *et al.*, 2013). Des analyses de sécrétome couplées à de la spectrométrie de masse ont permis de montrer la présence d'EGFR exosomal couplé à la membrane dans cinq lignées cellulaires de cancer pancréatique (Adamczyk *et al.*, 2011). De plus, le taux d'EGFR exosomal est plus élevé dans le plasma des patients atteints de cancers bronchiques que chez les sujets contrôles (Yamashita *et al.*, 2013). Il a également été observé que l'EGFR était présent de manière très importante dans les exosomes dérivés d'effusions pleurales du cancer bronchique (Park *et al.*, 2013). En plus de la présence d'EGFR dans les exosomes, ses ligands comme le TGF- α , l'amphiréguline et l'HB-EGF sont retrouvés dans les exosomes tumoraux. Ceux-ci peuvent alors être transportés à distance de la cellule émettrice pour induire l'activation de l'EGFR et l'emballement de la machinerie proliférative d'autres cellules. Le contenu de ces exosomes est également corrélé avec une invasion accrue des cellules tumorales (Higginbotham *et al.*, 2011). Cela suggère la possibilité d'utiliser l'EGFR exosomal comme biomarqueur de cancer bronchique.

En effet, l'étude des exosomes dans les gliomes a permis d'identifier la présence du variant constitutivement actif EGFRvIII (Al-Nedawi *et al.*, 2008). Le relargage de ces exosomes induit le transfert de ce variant de l'EGFR aux cellules voisines elles-mêmes dépourvues d'EGFRvIII. L'analyse des exosomes issus de sérum de patients atteints de glioblastome a permis de détecter les ARN messagers de l'EGFRvIII. Ainsi, la présence d'EGFRvIII ou de son ARNm dans les exosomes dérivés du sérum de patients peut être utilisée comme biomarqueur sérique pour diagnostiquer le glioblastome de manière non invasive (Skog *et al.*, 2008). L'étude du contenu exosomal dans le cancer bronchique pourrait ainsi être une piste intéressante dans le développement de diagnostics précoces non invasifs.

II.4.2.2. La signalisation exosomale dans la communication intercellulaire

Les exosomes portant l'EGFR provenant des cellules tumorales sont sécrétés dans l'espace extracellulaire puis intégrés par les cellules endothéliales avoisinantes ayant pour effet d'induire l'angiogenèse (Al-Nedawi *et al.*, 2009). Le transfert de l'EGFR médié par les exosomes induit l'activation des voies de signalisation MAPKs et AKT provoquant une augmentation de l'expression du VEGF et sa signalisation autocrine dans les cellules endothéliales (Al-Nedawi *et al.*, 2009). Une étude réalisée sur des cellules A549 de cancer bronchique a permis de montrer l'importance de la sortiline, une protéine de tri, dans la libération des exosomes (Wilson *et al.*, 2014). Ces travaux apportent la preuve que la formation d'un complexe TES associant TrkB, sortiline et EGFR transporté par les exosomes agit sur les cellules endothéliales afin d'activer l'angiogenèse tumorale.

II.5. La régulation de l'EGFR

En absence de ligand, l'EGFR est très peu internalisé. De ce fait, il est majoritairement membranaire dans ce cas (Dunn *et al.*, 1986 ; Carpenter and Cohen, 1976 ; Stoscheck and Carpenter, 1984). La liaison du ligand et l'activation de l'EGFR induit une augmentation de la vitesse d'endocytose (Sorkin and Goh, 2008). L'endocytose peut passer par deux voies, une médiée par la clathrine et une indépendante de la clathrine. Le type de voie emprunté dépend de la nature du dimère, de la concentration en ligand, des signaux d'endocytose et du contexte cellulaire.

II.5.1. Les signaux d'internalisation

L'EGFR possède dans sa partie intracellulaire de nombreux signaux permettant son internalisation. Lors de la liaison de l'EGF dans sa partie extracellulaire, ces signaux sont découverts. Deux motifs responsables de la reconnaissance de la protéine AP2 (adaptor protein 2) sont découverts par la liaison de l'EGF. Ces deux motifs sont : le motif YRAL responsable du recrutement de la sous unité AP2 μ et le motif dileucine (LL), importants pour la phosphorylation de la sous unité AP2 β 2 (Goh et Sorkin 2013). La protéine AP2 relie les protéines à endocyter à la clathrine et à la machinerie d'endocytose. Néanmoins, il a été montré que des mutations ou une perte de fonction d'AP2 n'inhibe pas totalement l'internalisation de l'EGFR médiée par la clathrine. Cela sous-entend qu'un autre mécanisme indépendant d'AP2 est responsable de cette endocytose clathrine dépendante (Hinrichsen *et al.*, 2003 ; Motley *et al.*, 2003). La queue cytoplasmique de l'EGFR présente également des motifs d'endocytose. En effet, la phosphorylation de résidus tyrosines Y1068 et Y1086 permettent le recrutement de l'adaptateur Grb2 (Roskoski *et al.*, 2014). Grb2 établit un lien entre l'EGFR phosphorylé et Cbl et la machinerie d'endocytose, ainsi qu'avec la voie de signalisation RAS / MAPK (Goh et Sorkin, 2013 ; Sorkin et Goh, 2008). Cbl peut également interagir directement avec le résidu Y1045 phosphorylé de l'EGFR (Waterman *et al.*, 1999b). La double interaction de Cbl avec l'EGFR (directe et indirecte) permet d'assurer un recrutement stable de Cbl et une ubiquitinylation efficace du récepteur (Capuani *et al.*, 2015 ; Sigismund *et al.*, 2013). La coopération entre les deux modes de liaison se fait en réponse à l'ubiquitinylation à mesure que la concentration en EGF augmente (Sigismund *et al.*, 2013). Lorsque la concentration en EGF augmente, la quantité d'EGFR phosphorylé augmente également. A celle-ci est couplée l'augmentation de la quantité d'EGFR ubiquitinylé de manière à limiter la signalisation de l'EGFR. Ainsi, Cbl complexé avec Grb2 agit tel un interrupteur de la signalisation de l'EGFR, le seuil d'ubiquitinylation est un signal important induisant l'internalisation de l'EGFR. Le rôle de l'ubiquitinylation dans l'internalisation de l'EGFR demeure complexe du fait que l'EGFR peut être ubiquitinylé de différentes manières.

II.5.2. L'endocytose médiée par la clathrine

Lors de l'endocytose médiée par la clathrine, le récepteur actif ubiquitinylé par Cbl est reconnu par la protéine AP2 (Figure 15). Celle-ci crée un lien entre la protéine cargo et la

clathrine menant à son internalisation grâce à la formation du manteau de clathrine (McMahon and Boucrot, 2011). La dernière étape dans la formation des vésicules d'endocytose passe par l'action d'une dynamine GTPase (Antonny *et al.*, 2016). La dynamine participe également aux mécanismes d'endocytose indépendants de la clathrine. De nombreuses protéines accessoires participent à la reconnaissance du cargo telles que esp15, epsin, Grb2, Cbl et les intersectines (ITSNs) (McMahon and Boucrot, 2011).

Grb2 se lie à l'EGFR activé par son domaine SH2 (Batzer *et al.*, 1994). La liaison EGFR / Grb2 conduit à deux effets opposés : l'un conduit à la régulation négative de l'EGFR par dégradation via le recrutement de l'ubiquitine ligase E3 (Cbl) qui induit une mono- ou poly-ubiquitinylation des résidus lysine de l'EGFR (Huang *et al.*, 2006). L'autre effet de Grb2 conduit à l'activation de la cascade de signalisation Ras et Sos via son domaine SH3 (Chardin *et al.*, 1993). L'activation de Ras provoque l'activation de la voie des MAPKs et PI3K.

L'ubiquitinylation de l'EGFR permet sa reconnaissance par les protéines de liaison aux ubiquitines appartenant aux protéines du manteau de clathrine. Ces protéines incluent les protéines interagissant avec AP2 telles que espin1 et Eps15. L'ubiquitinylation de l'EGFR a été montrée comme facilitant le recrutement de l'EGFR activé dans les puits recouverts de clathrine et l'activation de l'endocytose médiée par la clathrine (Bertelsen *et al.*, 2011 ; Madshus and Stang, 2009). Malgré cela, un EGFR dépourvu de 15 résidus lysine au niveau du domaine kinase (normalement ubiquitinylé) peut être normalement internalisé (Huang *et al.*, 2007). À la suite de la stimulation par l'EGF, il a pu être observé qu'une extinction d'espin1 ou d'Eps15 n'affecte par l'internalisation de l'EGFR (Chen and Zhuang, 2008 ; Huang *et al.*, 2004). Il semblerait que le rôle de l'ubiquitinylation et des effecteurs en dépendant soit encore méconnus. De la même façon, les conditions physiologiques sembleraient être importantes dans l'induction de l'endocytose de l'EGFR.

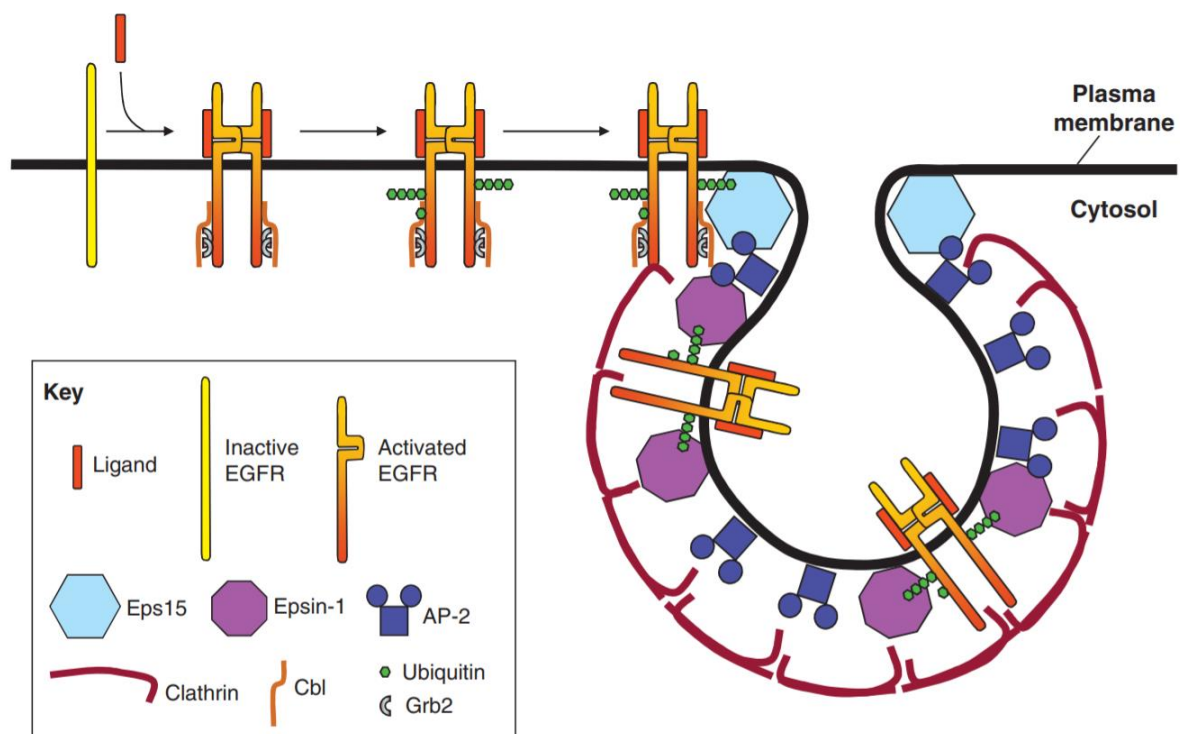


Figure 15 : Représentation schématique du mécanisme d'endocytose médiée par la clathrine d'après Madshus and Stang, 2009

L'activation de l'EGFR par son ligand permet à la protéine Cbl de se lier indirectement par le biais de Grb-2 ou directement à l'EGFR. La liaison avec la protéine Cbl induit l'ubiquitinylation de la partie C-terminale de l'EGFR. Cette ubiquitinylation permet l'interaction avec les protéines Eps15 et Espine-1 qui sont alors liées à la membrane plasmique et au manteau de clathrine qui invagine la membrane plasmique. L'invagination de la membrane conduit à la libération de la vésicule dans le milieu intracellulaire.

II.5.3. L'endocytose indépendante de la clathrine

L'endocytose dépendante de la clathrine est une voie d'internalisation rapide, une voie d'internalisation plus lente a été mise en évidence. Il s'agit de celle indépendante de la clathrine. Dans cette voie, la concentration en ligand est très importante pour induire l'endocytose. En effet, il a été démontré qu'une concentration élevée en EGF (20 ng/mL) induisait l'endocytose indépendante de la clathrine (Sigismund *et al.*, 2008). Celle-ci est tout de même dépendante d'Esp1 et d'Eps15 (Sigismund *et al.*, 2005). Étonnamment, l'endocytose clathrine dépendante induisait majoritairement pour un recyclage de l'EGFR prolongeant son action. Bien que le mécanisme concernant l'endocytose de l'EGFR indépendamment de la clathrine reste méconnu, une corrélation a pu être établie entre le niveau d'ubiquitinylation de l'EGFR par Grb2 et Cbl et le taux d'endocytose clathrine indépendante (Sigismund *et al.*, 2013). Il semblerait que la quantité de clathrine et le type de ligand activant le récepteur influencent la voie endocyttaire empruntée. Ainsi, l'activation de l'EGFR par l'EGF ou le TGF α conduisent seulement à l'endocytose clathrine dépendante alors que, HG-EGF ou la BTC conduisent à l'activation des deux types d'endocytose (Henriksen *et al.*, 2013). Plusieurs voies alternatives ont pu être observées comme la macropinocytose à la suite de la stimulation à l'EGF de cellules A431 (West *et al.*, 1989) ou encore la capture du récepteur par la cavéoline (Anderson *et al.*, 1998). L'ensemble des facteurs entrant dans l'induction d'une voie ou d'une autre tend à supposer que les voies d'internalisation alternatives sont un moyen d'éviter la saturation de la voie clathrine dépendante. L'endocytose indépendante de la clathrine permettrait de contrôler l'intensité du signal émis par l'EGFR en induisant sa dégradation (Mayor *et al.*, 2014 ; West *et al.*, 1989).

II.5.4. Le devenir de l'EGFR

À la suite de l'endocytose de l'EGFR, deux destinations principales existent pour les endosomes précoces. Ils peuvent être dirigés vers la surface cellulaire pour un recyclage des récepteurs ou dirigés vers le lysosome pour induire la dégradation de leur contenu. L'existence de ces deux voies permet un équilibre entre le maintien de la signalisation et l'atténuation de celle-ci par la dégradation de l'EGFR. La voie endocyttaire empruntée par l'EGFR permet de sous-compartimenter la signalisation. Une population d'endosomes précoces exprime la protéine adaptatrice APPL1 participant au soutien de la voie de signalisation AKT en interagissant avec ce dernier (Schenck *et al.*, 2008). De plus, le complexe régulateur comportant LAMTOR1 / 2 / 3 interagit avec MEK1 / ERK1 de manière à préserver une signalisation continue des MAPKs dépendantes de l'EGF à partir des endosomes tardifs. Cela a pour effet d'induire la prolifération cellulaire (De Araújo *et al.*, 2013).

II.5.4.1. L'ubiquitinylation et le tri vers les MVBs via le complexe ESCRT

Dans le phénomène d'endocytose, l'ubiquitinylation est une marque importante pour la reconnaissance des récepteurs à endocyter. Celle-ci est un phénomène crucial dans le tri de l'EGFR activé (Clague *et al.*, 2012). L'ubiquitinylation est primordiale pour la prise en charge des récepteurs par le complexe ESCRT (complexe de tri endosomal requis pour le transport). Ce complexe de tri permet d'orienter les protéines ubiquitinylées vers la dégradation lysosomale. Les protéines ubiquitinylées sont reconnues par des protéines ayant un domaine d'interaction avec l'ubiquitine et les protéines composant le complexe ESCRT. L'ubiquitine présente sur l'EGFR est décrochée de celui-ci par des enzymes déubiquitinylantes avant d'être intégrée aux vésicules intraluminales. L'ubiquitine retirée de l'EGFR est recyclée pour conserver un pool d'ubiquitine intracellulaire. Ces vésicules fusionnent alors avec le lysosome ayant pour conséquence la dégradation des récepteurs contenus à l'intérieur (Vanlandingham and Ceresa, 2009 ; Ganley *et al.*, 2011). Les vésicules intraluminales peuvent aussi fusionner avec la membrane plasmique, participant à la libération de vésicules extracellulaires (Colombo *et al.*, 2014). Le tri intracellulaire de l'EGFR activé via le complexe ESCRT conduit majoritairement à la dégradation et à l'atténuation de la signalisation de l'EGFR.

II.5.4.2. Le recyclage de l'EGFR

Bien que l'importance de l'ubiquitinylation dans la dégradation de l'EGFR activé soit avérée, dans certains cas, l'EGFR ne peut pas être ubiquitinylé ce qui conduit à un défaut de dégradation et un recyclage vers la membrane plasmique (Eden *et al.*, 2012) (Figure 16). Ce recyclage pourrait être assimilé à une voie par défaut, pourtant il s'agit en fait d'un processus actif et très régulé par de nombreuses protéines telles que des Rab GTPases (Pylypenko and Goud, 2012). Le recyclage de l'EGFR peut avoir deux origines, une provenant des endosomes précoces et régulée par Rab-4 et Rab-35 et une à partir du compartiment de recyclage endocytaire (ERC), régulée par Rab-11. Le compartiment de recyclage endocytaire correspond à un réseau vésiculaire périnucléaire participant au recyclage vers la membrane plasmique (Xie *et al.*, 2016). La réintégration de l'EGFR à la membrane peut être influencée par différents facteurs comme la nature du ligand ou le partenaire de dimérisation de l'EGFR. En effet, les différents ligands de l'EGFR apportent une stabilité différente au complexe EGFR / ligand en fonction du pH. Cette stabilité influe fortement sur le devenir de l'EGFR (French *et al.*, 1995). A titre d'exemple, le complexe EGFR / EGF est stable à un pH faible comme dans les endosomes ce qui conduit à la dégradation du récepteur. A l'inverse, le complexe EGFR / TGF α se dissocie à ce même pH, la dissociation du ligand et du récepteur permet la déubiquitinylation de l'EGFR et l'échappement à la dégradation lysosomale permettant son recyclage (Roepstorff *et al.*, 2009). Les différents dimères d'EGFR peuvent induire différents devenirs pour l'EGFR endocyté. Les homodimères d'EGFR induisent un tri dirigé vers la dégradation alors que l'hétérodimérisation telle que HER1 / HER2 ne permet pas le recrutement de Cbl et évite la dégradation. De cette manière, l'association HER1 / HER2 dans

les tumeurs malignes induit une internalisation ralentie et une augmentation du recyclage à la membrane plasmique (Peschard and Park, 2003).

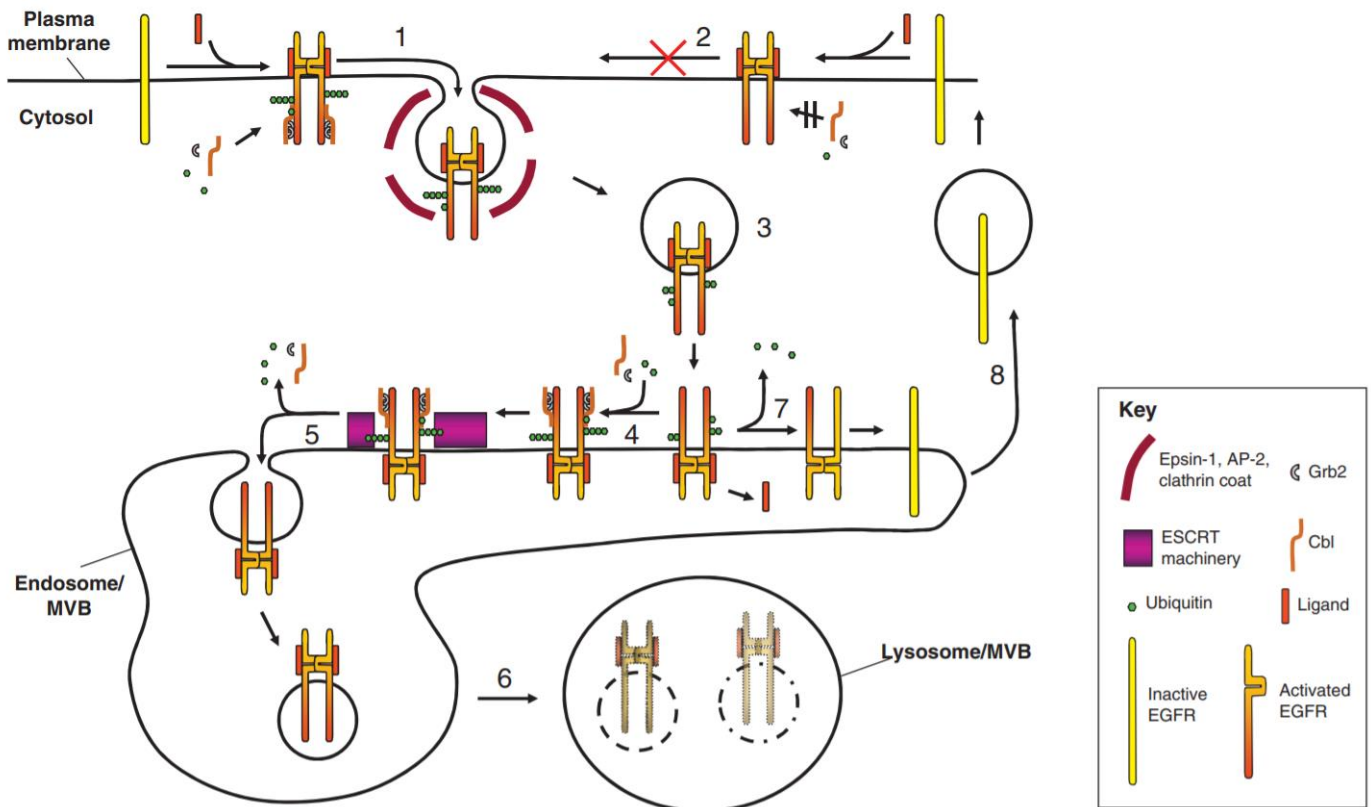


Figure 16 : Trafic intracellulaire de l'EGFR induisant sa dégradation ou son recyclage d'après Madhus and Stang, 2009

Lorsque l'EGFR est activé et ubiquitinyllé, il est pris en charge par des puits recouverts de clathrine. Après son internalisation, l'EGFR lié à son ligand est partiellement déubiquitinyllé jusqu'à son interaction avec le complexe ESCRT au niveau de la membrane endosomale où il y a ré-ubiquitinyllation. Grâce au complexe ESCRT et à l'ubiquitinyllation, le récepteur est dirigé vers les vésicules interne des endosomes pour induire sa dégradation. Lorsque le récepteur lié à son ligand est internalisé, ceux-ci peuvent se détacher en présence d'un faible pH, ayant pour conséquence le recyclage du récepteur inactif à la membrane plasmique.

II.5.4.3. Devenir alternatif de l'EGFR au niveau mitochondrial

Outre la dégradation et le recyclage de l'EGFR internalisé, un fois activé celui-ci connaît des voies d'adressage intracellulaires alternatives. En effet, il peut être acheminé vers le noyau (Cf II.4.1.1. La translocation nucléaire de l'EGFR) ou vers la mitochondrie. Le transfert de l'EGFR au niveau mitochondrial est un événement constitutif et également induit par la stimulation dépendante du ligand. Une fois dans la mitochondrie, l'EGFR activé conduit à la phosphorylation de la cytochrome c oxydase contribuant normalement à l'apoptose. Sous sa forme phosphorylée, cette enzyme mitochondriale présente une activité réduite, limitant l'initiation de l'apoptose (Demory *et al.*, 2009). Bien que restant à élucider, la piste de l'EGFR

mitochondrial semble intéressante pour la compréhension de l'échappement thérapeutique (Cao *et al.*, 2011).

II.5.5. Le trafic de l'EGFR dans le cancer

La régulation spatiale de l'EGFR par son trafic intracellulaire joue un rôle crucial dans la tumorigenèse. Les défauts de localisation dus à une absence de dégradation ou à un recyclage important du récepteur à la membrane conduisent à la progression tumorale.

II.5.5.1. L'impact des mutations oncogéniques sur le trafic de l'EGFR

Dans de nombreux cancers, l'EGFR est retrouvé muté ou surexprimé conduisant à une signalisation exacerbée. Les différentes mutations observées induisent l'apparition de protéines tronquées ou l'apparition d'un domaine tyrosine kinase constitutivement actif. Ces mutations peuvent, comme dans le cas du cancer bronchique non à petites cellules, conduire à un défaut de dégradation de l'EGFR dû à une ubiquitinylation défectueuse par Cbl (Shtiegman *et al.*, 2007). D'autre part, l'activation constitutive de l'EGFR permet d'orienter son trafic intracellulaire vers l'ERC en partenariat avec la kinase Src. Ces deux protéines peuvent interagir grâce à leur trafic intracellulaire commun et provoquer une signalisation pro-oncogénique soutenue (Chung *et al.*, 2009 ; Donepudi et Resh, 2008).

II.5.5.2. Influence des thérapies anti-cancéreuses sur le trafic de l'EGFR

Dans le traitement du cancer, l'utilisation d'agents thérapeutiques induisant des dommages à l'ADN comme des rayonnements ionisants ou des sels de platine est courante. De nos jours, les molécules ciblant l'EGFR tels que les anticorps monoclonaux et les inhibiteurs des récepteurs à tyrosine kinase sont couramment employés pour limiter la progression tumorale. Leur utilisation a des conséquences directes sur le trafic de l'EGFR. Le gefitinib se comporte notamment comme un suppresseur de l'endocytose de l'EGFR activé. Cependant, cette action n'a pu être observée que dans certains types cellulaires (Nishimura *et al.*, 2007). Concernant le cetuximab dont le rôle est de bloquer la fixation des ligands à la surface de l'EGFR, celui-ci est internalisé lié à l'EGFR. Il empêche l'activation du récepteur et permet une diminution de l'expression de l'EGFR (Harding et Burtness, 2005). Les effets et les mécanismes mis en jeu vis-à-vis du trafic intracellulaire de l'EGFR sont encore mal connus et nécessitent d'être élucidés.

L'utilisation des thérapies anti-cancéreuses induit également des effets secondaires sur le trafic intracellulaire de l'EGFR (Figure 17). A titre d'exemple, la chimiothérapie couplée aux rayons X peut causer la production d'espèces réactives oxygénées menant à l'inactivation de cystéine-protéines tyrosine phosphatases (Salmeen et Barford, 2005). Cette inactivation crée un déséquilibre entre kinase et phosphatase induisant une stimulation indépendante du ligand. L'EGFR peut également être activé par la modification directe des résidus cystéine

compris dans son site actif (Truong et Carroll, 2012). Son activation est suivie de l'internalisation du récepteur et de son trafic dépendant de p38 (Winograd-Katz et Levitzki, 2006 ; Zwang et Yarden, 2006) ou de la kinase Src (Benhar *et al.*, 2002 ; Raju *et al.*, 2012) et de la clathrine et de AP-2 (Grandal *et al.*, 2012). Des études contradictoires ont démontré les effets de l'internalisation dépendante de p38 dans la sensibilité et la résistance aux thérapies. En effet, certaines études montrent que l'inactivation de la voie d'internalisation par p38 confère une sensibilité aux thérapies (Zwang et Yarden, 2006) alors que d'autres montrent une augmentation de la résistance (Winograd-Katz et Levitzki, 2006). Les effets biologiques de cette internalisation n'ont pas été clairement identifiés.

L'utilisation d'agents thérapeutiques peuvent aussi conduire à l'adressage de l'EGFR vers le noyau et la mitochondrie pour activer des gènes de résistance ou inhiber l'apoptose.

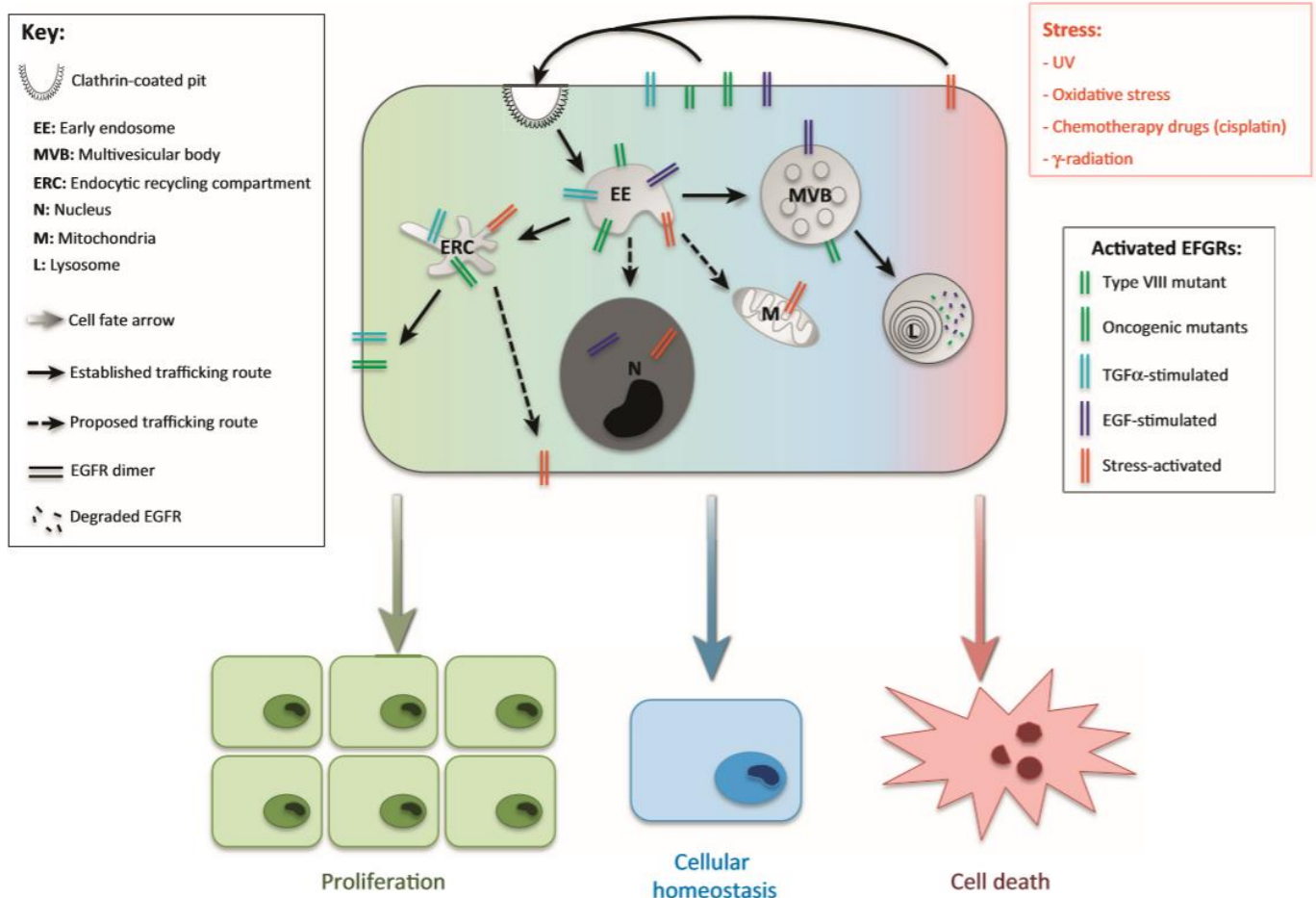


Figure 17 : Le trafic intracellulaire de l'EGFR activé et ses différents devenir d'après Tomas et al., 2013.

Les récepteurs activés au niveau de la membrane plasmique sont internalisés et triés dans les endosomes précoces. Ce tri est un point crucial dans le devenir des cellules. La voie de recyclage (en vert) favorise notamment la prolifération cellulaire. De manière opposée, la voie de dégradation (en bleu) passant par le système ESCRT, les corps multivésiculaires (MVB) et le lysosome est associée à une homéostasie cellulaire normale. Les voies nucléaires et mitochondriales quant à elles sont majoritairement associées à la survie cellulaire. De plus, le stress cellulaire conduirait à l'élimination des récepteurs membranaires et à la mort cellulaire (en rouge). Inversement, les récepteurs activés par le stress pourraient être recyclés et promouvoir la survie et la prolifération cellulaire.

II.5.5.3. L'impact des partenaires de l'EGFR sur sa régulation

Comme nous avons pu le voir au cours de cette partie, l'EGFR est une protéine fortement impliquée dans la prolifération cellulaire et la transformation des cellules saines en cellules tumorales. Néanmoins, sa signalisation et son devenir sont particulièrement dépendants de ses partenaires protéiques. En effet, ceux-ci peuvent intervenir dans le maintien de sa signalisation comme dans son atténuation. Les protéines de tri peuvent notamment intervenir dans la signalisation et la localisation de l'EGFR. De récents travaux réalisés au sein de notre laboratoire ont permis de montrer l'implication d'une protéine de tri cellulaire à domaine VPS10 dans le trafic de l'EGFR. Cette protéine, la sortiline, a été montrée comme étant indispensable dans l'internalisation et la dégradation de l'EGFR (Al-Akhrass *et al.*, 2017). Nos premiers résultats indiquent que la sortiline pourrait moduler les fonctions nucléaires de l'EGFR dans les cellules issues de tumeurs bronchiques. C'est la raison qui nous a conduits à étudier la fonction de la sortiline en lien avec l'EGFR au niveau nucléaire.

Partie III. La sortiline

III.1. La découverte de la sortiline

Les enzymes lysosomales synthétisées au niveau de l'appareil de Golgi nécessitent un mécanisme permettant leur acheminement aux lysosomes. Le tri de ces enzymes est rendu possible par un processus faisant intervenir les récepteurs au manose-6-phosphate (M6PRs) (46 et 275 kDa). Ces récepteurs reconnaissent les mannoses phosphorylés des hydrolases lysosomales et induisent leur adressage vers les endosomes tardifs qui fusionnent ensuite avec le lysosome (Kornfeld et Mellman, 1989 ; Pearse et Robinson, 1990). Les enzymes lysosomales acheminées par ce biais sont primordiales pour la conservation des conditions homéostatiques. En effet, le défaut d'adressage de ces enzymes provoque une maladie rare, la mucopolysaccharidose II qui est une insuffisance enzymatique (Paik *et al.*, 2005). Néanmoins, certains patients atteints par ce défaut d'adressage présentent un taux normal d'enzymes lysosomales dans certains tissus. Cela suppose la présence de mécanismes alternatifs permettant leur adressage (Glickman *et al.*, 1993 ; Owada et Neufeld, 1982 ; Waheed *et al.*, 1982). Chez la levure, une voie d'adressage alternative indépendante des M6PRs (Mannose-6-Phosphate Receptor) a pu être mise en évidence en identifiant la protéine VPS10, une protéine ciblant la carboxypeptidase Y à proximité de la vacuole de la levure (Cooper et Stevens, 1996 ; Marcusson *et al.*, 1994). En 1994, l'étude de la maturation des LRP (récepteurs aux lipoprotéines de basse densité) a permis de mettre en évidence une protéine de 100 kDa environ se liant à la protéine RAP (receptor associated-protein) (Gliemann *et al.*, 1994). Par la suite, l'utilisation de la chromatographie d'affinité sur lysats de cerveaux humains a permis d'identifier une protéine de 95 kDa se liant à la RAP, cette protéine est la gp95 / sortiline (Petersen *et al.*, 1997). Grâce à cette même technique, un récepteur à la neurotensine (NTS) d'environ 100 kDa a pu être découvert (Zsürger *et al.*, 1994). Ce troisième récepteur à la NTS composé d'un seul domaine transmembranaire n'appartient donc pas à la famille des RCPG comme NTSR1 et NTSR2, il a été observé comme étant identique à la sortiline (Mazella *et al.*, 1998). La famille des récepteurs à domaine VPS10 compte à présent 5 membres : la sortiline, SorLA, sorCS1, sorCS2 et sorCS3 (Hermey *et al.*, 2009) (figure 18). Ces cinq protéines partagent un domaine commun qui est le domaine VPS10. La sortiline est le prototype de cette famille avec un seul domaine VPS10 constituant la totalité de son domaine extracellulaire, suivi d'un domaine transmembranaire et d'une courte queue cytoplasmique. Dans la famille de la sortiline, SorLA possède les mêmes domaines que la sortiline, mais comporte entre le domaine Vps10 et le domaine transmembranaire, un domaine d'homologie au précurseur d'EGF, de répétitions de type complément et de répétitions de fibronectines de type III (figure 18). Ses homologues SorCS comprennent dans leur partie extracellulaire un domaine riche en leucines juxtamembranaire relié au domaine Vps10 par un domaine PKD. Ces différents domaines permettent les interactions protéine-protéine et la régulation de la fixation du ligand (Mazella et Vincent, 2006 ; Willnow *et al.*, 2008).

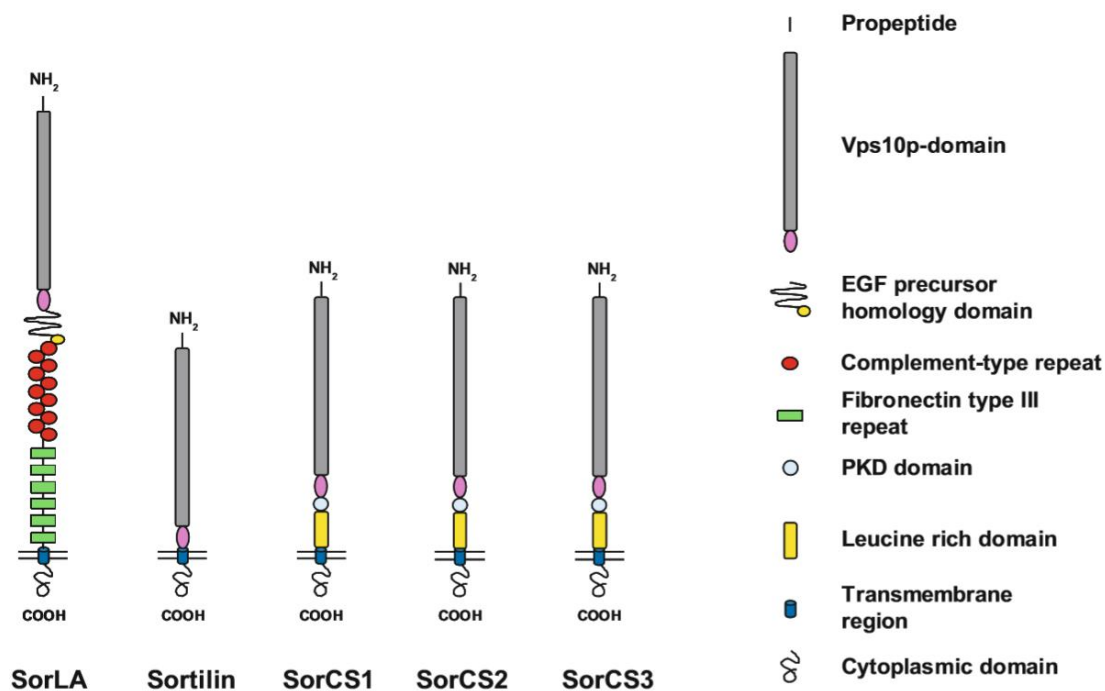


Figure 18 : Les membres de la famille des récepteurs à domaine VPS10 d'après Glerup et al., 2014

III.2. Le domaine VPS10 de la sortiline

Le domaine extracellulaire de la sortiline permettant la fixation de son ligand est constitué exclusivement d'un domaine VPS10. Ce domaine a pu être déterminé par cristallographie. Il est composé de trois parties, la partie N-terminale (résidus 45 à 576) est composée de 10 feuillets β formant une hélice β . Cette hélice est prolongée par deux domaines 10CC-a (résidus 577 à 633) et 10CC-b (résidus 634 à 716) (figure 19). Ceux-ci ont peu de structures secondaires mais interagissent fortement avec l'hélice de la partie N-terminale. La fixation du ligand de la sortiline, la neurotensine (NTS), passe par une liaison autour de la lumière de l'hélice β (Quistgaard *et al.*, 2009). De récentes études ont permis de montrer que la conformation de la sortiline évolue en fonction du pH environnant. La diminution du pH induit un changement de conformation de la sortiline permettant sa dimérisation. Or, la liaison de ses ligands se fait préférentiellement sur le monomère de sortiline. Cela indique que la dimérisation et le changement de conformation de l'hélice β provoque la libération du ligand et déclenche le recyclage du récepteur (Leloup *et al.*, 2017).

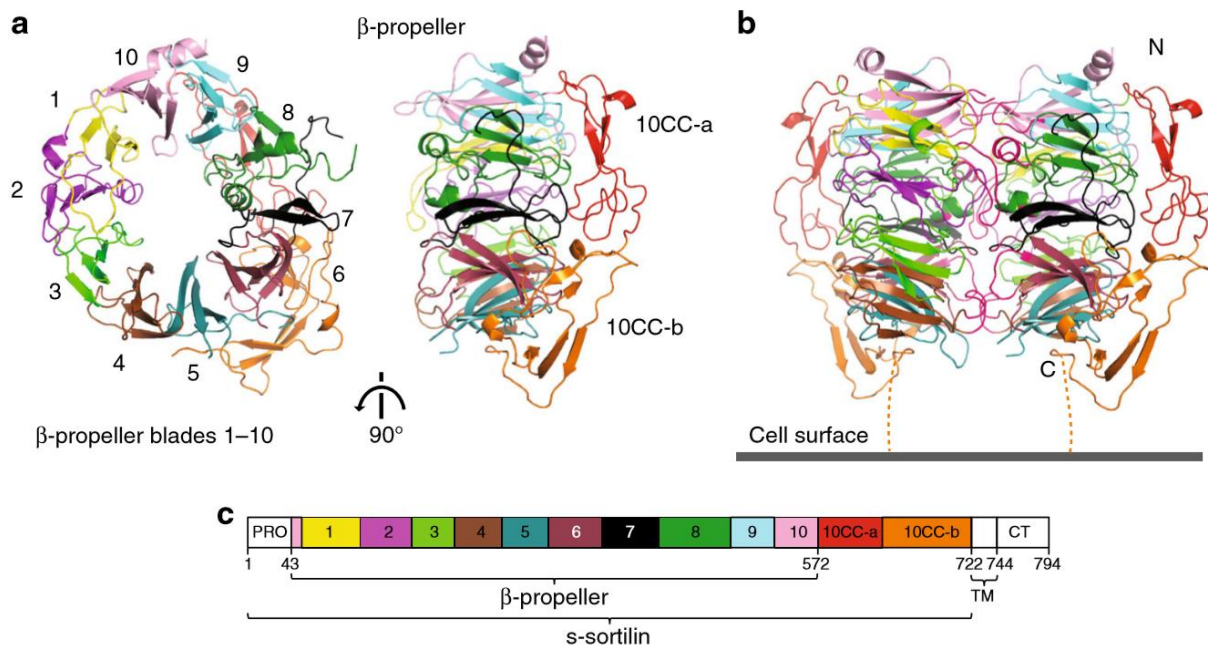


Figure 19 : Structure du domaine VPS10 de la sortiline obtenue par cristallographie d'après Leloup et al., 2017

III.3. Les ligands de la sortiline

La sortiline, sous sa forme mature, peut lier différents ligands comme la neurotensine, son ligand préférentiel, (Mazella *et al.*, 1998) ou son propre pro-peptide (Munck Petersen *et al.*, 1999). Elle fixe également certaines pro-formes de facteurs de croissance, tels que le pro-NGF β (Nykjaer *et al.*, 2004), le pro-BDNF (Teng *et al.*, 2005), la pro-granuline (Tanimoto *et al.*, 2017) ou des protéines partenaires comme l'apo-lipoprotéine AV-14 (Nilsson *et al.*, 2008), la protéine RAP (Petersen *et al.*, 1997), la lipoprotéine lipase (LpL) (Nielsen *et al.*, 1999) et le transporteur de glucose GLUT-4 (Shi et Kandror, 2005). La sortiline permet également la fixation de protéines telle que p75^{NTR} ayant pour action l'induction de la mort cellulaire (Nykjaer *et al.*, 2004). La sortiline a également été montrée comme interagissant avec les récepteurs Trk A/B/C, ces interactions ayant pour conséquence d'induire leur transport antérograde au niveau axonal, renforçant la signalisation des neurotrophines (Nykjaer *et al.*, 2011). Ce récepteur à la neurotensine peut également se lier à l'EGFR pour favoriser son internalisation et sa dégradation (Al-akhrass *et al.*, 2017). Le rôle de la sortiline en lien avec l'EGFR dans les différents compartiments cellulaires reste tout de même à élucider.

III.4. Structure et trafic de la sortiline

La sortiline est exprimée dans de nombreux tissus, tels que le cerveau, la moelle épinière, les testicules et les muscles squelettiques (Hermans-Borgmeyer *et al.*, 1999 ; Hermeijer *et al.*, 2009 ; Mazella *et al.*, 1985 ; Petersen *et al.*, 1997). La maturation de la sortiline se déroule dans le réseau trans-golgien qui participe également au trafic des protéines (Petersen *et al.*, 1997). La sortiline est synthétisée sous forme de pro-sortiline de 831 acides aminés.

Elle est ensuite maturée par une protéase de type furine dans l'appareil de Golgi par un clivage de 44 acides aminés dans son domaine N-terminal (Petersen *et al.*, 1997). La maturation par la furine permet de dégager l'extrémité N-terminale de la sortiline de son peptide qui, initialement, empêchait la fixation du ligand (Petersen *et al.*, 1999). Ce peptide permet son adressage à la membrane en empêchant le mauvais repliement du récepteur qui limiterait son transport (Westergaard *et al.*, 2004). La sortiline alors mature est acheminée vers la membrane plasmique ou sécrétée par le biais de granules de sécrétion (Figure 20). Une fois à la membrane, la sortiline interagit avec d'autres récepteurs membranaires et des ligands (Nykjaer et Willnow, 2012). La sortiline, en lien avec ses partenaires protéiques, peut être internalisée par endocytose médiée par la clathrine permettant le transport des protéines entre les endosomes et le Golgi de manières antérograde et rétrograde.

Le transport **antérograde**, c'est-à-dire entre le réseau trans-Golgien et les endosomes, est rendu possible grâce à certaines séquences d'homologie entre la sortiline et la protéine M6PR de 275 kDa au niveau de sa partie intracellulaire. En effet, ces deux protéines partagent au niveau de l'extrémité C-terminale un motif HDDSDEDLL contenant un site de phosphorylation par la caséine II, permettant le recrutement de AP-1 et la formation des vésicules golgiennes. Cette séquence présente également un motif dileucine permettant les mécanismes de tri ultérieurs (Petersen *et al.*, 1997). Le transport **rétrograde** est également médié par la protéine AP-1 couplée au complexe rétromer GGA (Kim *et al.*, 2010 ; Nielsen *et al.*, 2001). La sortiline et ses partenaires, intégrés aux endosomes précoces, peuvent être orientés vers le lysosome pour être dégradés (Tanimoto *et al.*, 2017). La sortiline peut également participer à la biogenèse des exosomes en permettant leur sécrétion (Yang *et al.*, 2011 ; Wilson *et al.*, 2014).

Au niveau de la membrane plasmique, la sortiline peut être clivée par des protéases libérant différents fragments. La partie N-terminale peut être clivée par les métalloprotéases ADAM-17 ou ADAM-10 (A desintegrin and metalloproteinase) (Evans *et al.*, 2011 ; Hermey *et al.*, 2006). L'action de γ -sécrétases au niveau du segment transmembranaire provoque également la libération de la partie intracellulaire de la sortiline (Nyborg *et al.*, 2006). Le clivage et la libération de la partie N-terminale conduit à une forme soluble de sortiline dépourvue de domaines transmembranaire et intracellulaire, empêchant l'adressage de ses ligands à la dégradation lysosomale (Evans *et al.*, 2011). Concernant la partie C-terminale libérée dans la cellule, son rôle reste à déterminer, elle pourrait permettre la régulation de voies de signalisation et de l'expression de certains gènes.

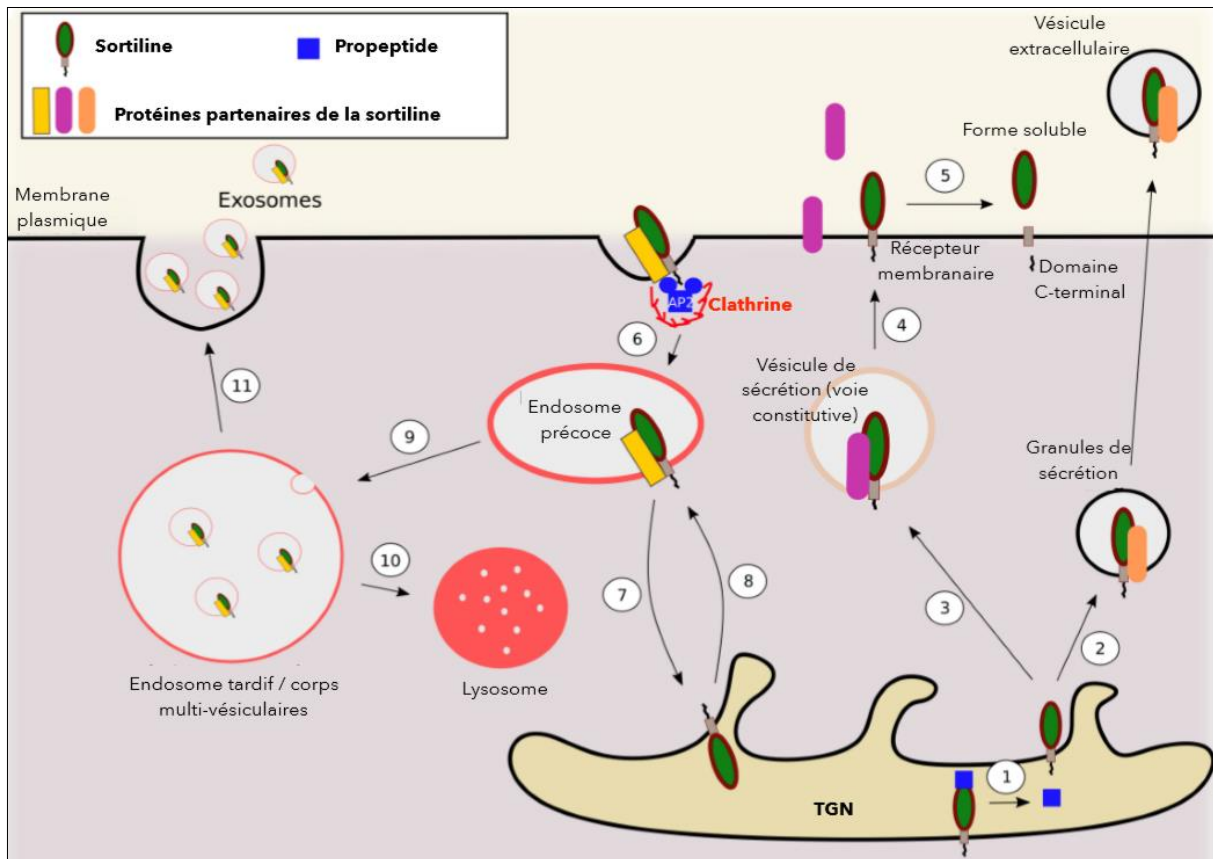


Figure 20 : Les voies impliquées dans le trafic intracellulaire de la sortiline d'après Talbot et al., 2019

Lors de la maturation de la sortiline, le propeptide est clivé par des convertases dans le réseau trans Golgien. La sortiline associée à un partenaire protéique peut être sécrétée sous forme de granule de sécrétion à partir de l'appareil de Golgi ou être adressée à la membrane plasmique par le biais de vésicules sécrétoires constitutives. Les partenaires protéiques de la sortiline peuvent être ancrés à la membrane plasmique ou sécrétés de manière soluble. Une fois à la membrane plasmique, la sortiline peut persister à ce niveau ou être clivée par des métalloprotéases (ADAM) et des γ -sécrétases pour être libérée sous forme soluble. La sortiline membranaire est également un médiateur permettant l'internalisation de protéine par endocytose clathrine dépendante. Une fois endocytées les protéines peuvent connaître différents devenir ; être dégradées par le lysosome, recyclé à la membrane ou exportées sous forme d'exosomes.

III.5. L'influence de la sortiline sur le métabolisme cellulaire

III.5.1. La régulation de Glut-4 par la sortiline

La protéine Glut-4 est un transporteur de glucose présent à la membrane plasmique des adipocytes et myocytes squelettiques à la suite de l'induction de sa translocation par l'insuline depuis le Golgi. En effet, Glut-4 est localisé initialement dans des vésicules de stockage spécialisées (VSS) au niveau de l'appareil de Golgi (Kupriyanova et Kandror, 2000

; Lin *et al.*, 1997). L'action de l'insuline conduit à la diminution du nombre de VSS et à l'augmentation du nombre de transporteurs Glut-4 à la membrane (Bryant *et al.*, 2002). La sortiline est essentielle à la biogenèse des VSS et augmente l'absorption du glucose stimulée par l'insuline dans les adipocytes. En effet, la co-transfection de Glut-4 et de la sortiline dans des adipocytes indifférenciés induit la formation de VSS (Shi et Kandror, 2005). De même, la surexpression de *SORT1* induit donc une augmentation du nombre de VSS formés mais également une meilleure absorption du glucose (Shi et Kandror, 2005). Bien qu'impliquée dans le transport antérograde des VSS, la sortiline participe également au transport rétrograde de Glut-4. Pour cela, la sortiline interagit grâce à son domaine VSP10 avec le transporteur de glucose au niveau du domaine luminal extracellulaire (Pan *et al.*, 2017). Cette interaction a pour effet de protéger Glut-4 de la dégradation lysosomale. En effet, les endosomes contenant Glut-4 sont adressés vers l'appareil de Golgi et non vers la dégradation lysosomale.

III.5.2. La sortiline module le trafic des lipoprotéines

Une étude datant de 2010 a permis de montrer l'influence d'un polymorphisme de type SNP du gène *SORT1* (rs12740374) (Musunuru *et al.*, 2010). L'apparition de ce polymorphisme induit la création d'un site de liaison au facteur de transcription C / EBP conduisant à sa surexpression hépatique (Musunuru *et al.*, 2010). Cette surexpression est corrélée avec une diminution du taux de LDL (low-density lipoprotein) et de VLDL (very low-density lipoprotein) plasmatiques. Bien que cette étude ne présente pas la régulation du taux de LDL plasmatique du point de vue mécanistique, elle propose que la sortiline régule négativement la sécrétion hépatique de ceux-ci. Une autre étude, basée sur l'augmentation de l'absorption des LDL par les HEK-293 surexprimant la sortiline, a proposé un rôle de la sortiline dans la diminution du taux de LDL sanguin, limitant les maladies coronariennes (Linsel-Nitschke *et al.*, 2010). Néanmoins, une étude réalisée sur des souris KO sortiline a montré une corrélation entre l'absence de sortiline et la diminution du taux de LDL sanguin (Kjolby *et al.*, 2010). De plus, l'interaction directe entre la sortiline et l'apolipoprotéine B a pu être démontrée dans des cultures primaires d'hépatocytes. L'ensemble de ces résultats bien que contradictoires suppose l'implication de la sortiline dans le métabolisme des lipoprotéines bien que sa fonction ne soit pas clairement identifiée.

III.6. Le rôle de la sortiline sur la signalisation des neurotrophines et de la neurotensine

III.6.1. La sortiline et le trafic de la neurotensine

La neurotensine, le ligand préférentiel de la sortiline (NTSR3) est un neuropeptide de 13 acides aminés fortement exprimé dans les systèmes nerveux central et périphérique ainsi que dans le système digestif. Elle joue un rôle au niveau du SN en agissant notamment sur l'analgésie, la thermorégulation mais également au niveau cardiovasculaire, digestif et endocrine (Rostène et Alexander, 1997). La plupart des effets de la neurotensine sont médiés

par NTSR1 (Neurotensin receptor 1) mais les effets médiés par la sortiline sont quant à eux moins connus. La sortiline représente, en effet, le troisième récepteur à la neurotensine. Cette protéine est différente des 2 autres récepteurs. En effet, NTSR-1 et NTSR-2 sont des récepteurs à la neurotensine appartenant à la famille des RCPG (Vincent *et al.*, 1999). La sortiline, quant à elle, ne fait pas partie de cette famille (Mazella *et al.*, 1998). La fixation de la neurotensine sur la sortiline limiterait l'accessibilité au domaine VPS10 de la sortiline et agirait en inhibiteur compétitif (Quistgaard *et al.*, 2009). En l'absence de stimulation par la neurotensine dans la lignée de carcinome colique HT29, la sortiline est majoritairement localisée au niveau de l'appareil de Golgi (65%), seul 10% de la sortiline est membranaire et 25% nucléaire (Morinville *et al.*, 2004). La stimulation des cellules par la neurotensine conduit à la formation du complexe sortiline / neurotensine. Celui-ci est ensuite internalisé et adressé au réseau trans-Golgien par le biais de la voie endosomale, changeant la localisation et la répartition de la sortiline au sein de la cellule. Lors de ce trafic, la sortiline peut être présente sous deux formes ayant des poids moléculaires différents. Au niveau trans-Golgien, elle possède un poids moléculaire inférieur à celui observé dans les endosomes précoces et à la membrane (Morinville *et al.*, 2004). Ces deux formes de sortiline suggèrent des fonctions différentes. La forme totale ayant le plus haut poids moléculaire permet de réguler l'endocytose de la neurotensine au niveau de la membrane plasmique, et la forme de plus faible poids moléculaire participe au tri au niveau trans-Golgien. L'existence des différentes formes de sortiline à ce niveau, comme au niveau membranaire, suggère la présence d'enzyme(s) induisant ses différents clivages.

III.6.2. La sortiline et les pro-neurotrophines

Les neurotrophines sont des facteurs de croissance ayant de multiples fonctions. Elles sont impliquées dans la survie cellulaire, la plasticité neuronale et également dans des phénomènes non physiologiques dans le cas du cancer. Ces facteurs de croissance sont synthétisés sous forme de pré-pro-neurotrophines. Ces précurseurs sont clivés par des protéases et des convertases donnant les formes immatures : les pro-neurotrophines puis les formes matures : les neurotrophines. Ces pro-neurotrophines et neurotrophines ont différentes fonctions selon la nature des récepteurs sur lesquels elles se fixent et selon le degré de maturité du facteur de croissance (pré-pro, pro ou mature). Cette caractéristique permet d'expliquer l'ambivalence des neurotrophines et de leurs récepteurs. En effet, la fixation du pro-NGF sur p75^{NTR} induit la mort cellulaire tandis que la fixation du NGF mature peut provoquer la mort cellulaire médiée par p75^{NTR} ou la survie cellulaire via TrkA (Lee *et al.*, 2001 ; Soilu-Hänninen *et al.*, 1999 ; Zhang *et al.*, 2000). Toutes les cellules exprimant p75^{NTR} ne subissent pas forcément de réponse au pro-NGF ce qui suppose qu'un autre acteur moléculaire est impliqué dans l'induction de l'apoptose via cette pro-neurotrophine. En 2004, la sortiline a été montrée comme participant à la modulation de la réponse cellulaire au pro-NGF (Nykjaer *et al.*, 2004). En effet, le pro-NGF interagit avec la sortiline et le récepteur de mort p75^{NTR} favorisant la voie apoptotique des cellules neurales (Nykjaer *et al.*, 2004). En absence de sortiline, les pro-neurotrophines fixent le récepteur TrkA et induisent la survie cellulaire. La sortiline joue donc un rôle de commutateur moléculaire dans la signalisation induite par les pro-neurotrophines et neurotrophines, modulant alors la réponse cellulaire.

III.7. L'implication de la sortiline dans le cancer

Etant donné les fonctions de la sortiline vis-à-vis de ses ligands, de ses partenaires moléculaires et dans le trafic intracellulaire, celle-ci montre une forte implication dans différents modèles de cancer (Wilson *et al.*, 2016). En effet, la sortiline semble présenter un double rôle en fonction du type de cancer étudié, jouant le rôle d'oncogène dans certains modèles et de suppresseur de tumeur dans d'autres tels que les cancers de la prostate (Tanimoto *et al.*, 2015, 2017) ou du poumon (Al-akhrass *et al.*, 2017).

III.7.1. Le sortiline dans le glioblastome

En 2013, une étude a montré, sur une cohorte de patients atteints de glioblastome, que l'expression du pro-BDNF, de p75^{NTR} et de la sortiline augmentent avec le grade pathologique et est corrélée avec l'agressivité tumorale (Xiong *et al.*, 2013). Plus récemment au sein de notre équipe, l'extinction du marqueur mésenchymateux YKL-40 dans des lignées de glioblastome a permis d'observer la diminution de l'expression de TrkB, de p75^{NTR} et de la sortiline provoquant une diminution de l'agressivité des cellules (Pinet *et al.*, 2016). En 2019, le rôle de la sortiline dans la progression de cette tumeur cérébrale a pu être mis en évidence. En effet, il a pu être démontré *in vitro* et *ex vivo* que la sortiline induisait la transition épithéliale mésenchymateuse (EMT) favorisant ainsi l'invasion tumorale (Yang *et al.*, 2019). Cette étude a permis de montrer que l'inhibition ou l'extinction de la sortiline limitent la migration cellulaire et le mécanisme d'EMT en empêchant l'activation de la voie GSK-3 β / β -catenin/Twist (Yang *et al.*, 2019).

III.7.2. La sortiline dans le cancer du sein

Dans le cancer du sein, le pro-NGF est fortement exprimé et sécrété par les lignées cellulaires et les tumeurs. Ce précurseur du facteur de croissance stimule la migration des cellules cancéreuses (Demont *et al.*, 2012). La sécrétion du pro-NGF et sa fixation sur son récepteur TrkA, associées à la sortiline, forme une boucle autocrine conduisant à l'activation de AKT et Src (Lévêque *et al.*, 2019). Des données *in vitro* ont permis d'observer que l'inhibition de la sortiline induisait une diminution de la migration, de la prolifération cellulaire et une inhibition de FAK (focal adhesion kinase) et de Src (Roselli *et al.*, 2015). Au contraire, dans les tissus tumoraux, la forte expression de la sortiline est corrélée avec la présence de carcinomes canaux et lobulaires invasifs. Une autre étude réalisée en 2018 a montré l'implication de la sortiline dans la réponse des cellules tumorales mammaires à la progranuline (PGRN) (Rhost *et al.*, 2018). En effet, le traitement des cellules tumorales à la PGRN stimule la différenciation cellulaire et la prolifération des cellules souches cancéreuses de manière dépendante de la sortiline. Ces résultats identifient la sortiline comme étant un acteur dans la progression du cancer du sein et sa dissémination par le biais des métastases. Elle semble également être impliquée dans la prolifération des cellules souches cancéreuses. Dans le cancer du sein la sortiline semble agir en tant que promoteur du développement et de la progression tumorale.

III.7.3. Le sortiline dans le cancer colorectal

Dans le cancer colorectal (CCR) et plus particulièrement dans les lignées de CCR, il a été montré que la sortiline pouvait être clivée et perdre son domaine extracellulaire (Navarro *et al.*, 2002). Le domaine clivé reste tout de même actif et peut alors être intégré par les cellules cancéreuses, provoquant une augmentation de la concentration en calcium intracellulaire. Cette augmentation a pour conséquence l'activation de la voie PI3K médiée par phosphorylation de FAK et Src (Massa *et al.*, 2013). L'activation de la voie PI3K conduit à la survie des cellules cancéreuses. Il a également été montré que le fragment soluble de la sortiline agissait sur l'expression de certaines intégrines, modifiait la structure des desmosomes et réduisait la capacité des cellules à adhérer (Massa *et al.*, 2014). L'ensemble de ces résultats suggère un rôle de cette forme soluble de sortiline dans les processus métastatiques (van Zijl *et al.*, 2011). Dans ce type de cancer, la sortiline interagit avec NTSR-1 qui pourrait participer à son internalisation (Martin *et al.*, 2002). De récents travaux réalisés au sein de notre laboratoire ont permis de montrer, dans le CCR, l'implication de la sortiline dans l'apparition de résistance au 5-fluorouracil et jouant un rôle de potentiel biomarqueur de mauvais pronostic (Blondy *et al.*, 2020).

III.7.4. La sortiline dans la leucémie

En 2008, notre laboratoire a montré que les lymphocytes B placés en privation sérique étaient soumis à l'effet autocrine du BDNF, ayant pour conséquence d'inhiber l'apoptose. Cet effet a été montré comme dépendant de la sortiline (Fauchais *et al.*, 2008). La sortiline permet la régulation de l'expression des neurotrophines et de leurs récepteurs dans le lymphome diffus à grande cellule B (DLBCL) (Bellanger *et al.*, 2011). Par conséquent, l'absence de sortiline à la surface cellulaire conduit à la survie en présence du complexe TrkB/p75^{NTR}. A l'inverse, le traitement des cellules avec du pro-BDNF entraîne l'augmentation du complexe p75^{NTR}/sortiline et favorise la mort cellulaire (Dubanet *et al.*, 2015). Il a également été montré par analyse transcriptomique de l'expression de la sortiline, une corrélation positive entre le niveau d'expression de *SORT1* et l'échappement thérapeutique chez des patients atteints de leucémie aigüe (Garza-Veloz *et al.*, 2015). Dans le lymphome, le rôle de la sortiline reste très ambiguë, alors qu'elle semble impliquée dans la résistance thérapeutique dans le cas de la leucémie aigüe.

III.7.5. La sortiline dans le cancer de l'ovaire

La comparaison du niveau d'expression de la sortiline entre des échantillons contrôles et des échantillons tumoraux a montré une surexpression de la sortiline dans les tissus tumoraux (Hemmati *et al.*, 2009). L'extinction de la sortiline *in vitro* par siARN favorise l'induction d'apoptose et permet une diminution de la prolifération cellulaire (Ghaemimanesh *et al.*, 2014). Ces données suggèrent un rôle de la sortiline dans la survie des cellules cancéreuses ovariennes.

III.7.6. La sortiline dans le cancer de la prostate

Dans le cancer de la prostate, la PGRN se trouve surexprimée, ayant pour effet de stimuler la prolifération, la croissance, la migration et l'invasion des cellules tumorales. Ces effets sur les cellules tumorales passent par l'activation de la voie AKT et la voie des MAPKs. La PGRN semble donc fortement impliquée dans l'agressivité tumorale et les phénomènes pro-tumoraux (Monami *et al.*, 2009). Il a été montré que la surexpression *in vitro* de la sortiline inhibe fortement l'expression de la PGRN et limite ses effets oncogéniques (Tanimoto *et al.*, 2015, 2017). La sortiline, fortement exprimée, stimule l'endocytose de la PGRN et conduit à sa dégradation lysosomale. A l'inverse, la PGRN provoque l'endocytose de la sortiline et sa dégradation lysosomale. Les deux protéines s'autorégulent donc. Ces données suggèrent un rôle suppresseur de tumeur de la sortiline. De manière contradictoire, le niveau d'expression de la sortiline et d'autres gènes impliqués dans la biogenèse des endosomes ont pu être corrélés avec un mauvais pronostic et une forte agressivité de ce type de cancer (Johnson *et al.*, 2015).

III.7.7. La sortiline dans le cancer bronchique

Les recherches menées au sein de notre laboratoire ont montré l'implication de la sortiline dans le cancer bronchique non à petites cellules. En effet, un complexe nommé « TES » pour TrkB, EGFR, sortiline (sortiline sous forme tronquée) a été identifié dans les exosomes issus de lignées de cancer bronchique non à petites cellules. Ce complexe est transféré au microenvironnement par le biais des exosomes pour moduler celui-ci et induire l'angiogenèse tumorale (Wilson *et al.*, 2014). La diminution d'expression de la sortiline par shARN a permis de réduire la quantité de TrkB et d'EGFR chargée dans les exosomes. Ces données montrent le rôle de la sortiline dans le trafic de l'EGFR et de TrkB dans le cancer bronchique non à petites cellules.

En 2017, notre équipe a mis en évidence les fonctions de la sortiline dans la prise en charge du récepteur à l'EGF au niveau membranaire et dans la régulation de sa signalisation (Al Akhrass *et al.*, 2017). En effet, la sortiline est impliquée dans l'internalisation de l'EGFR par endocytose ce qui permet de limiter la signalisation exacerbée de ce récepteur. Au contraire, une perte de fonction de *SORT1* conduit à une rétention membranaire de l'EGFR hyper-phosphorylé empêchant l'arrêt de sa signalisation et favorisant ainsi la prolifération cellulaire et la croissance tumorale (Figure 21). Il a pu être démontré que l'EGFR et la sortiline interagissaient de manière indépendante du statut mutationnel de l'EGFR et de son ligand bien que l'interaction soit stimulée par l'ajout d'EGF. Des résultats d'immunohistochimie obtenus à partir de prélèvements de patients ont permis de déterminer une corrélation inverse entre le niveau d'expression de *SORT1* et le grade tumorale ainsi qu'avec l'augmentation d'expression du marqueur de prolifération Ki67. Une corrélation entre le niveau d'expression de *SORT1* et la survie globale des patients atteints d'ADC bronchiques a également été mise

en évidence. L'ensemble de ces résultats suggère que la sortiline est un régulateur négatif de l'EGFR et constitue un marqueur de bon pronostic.

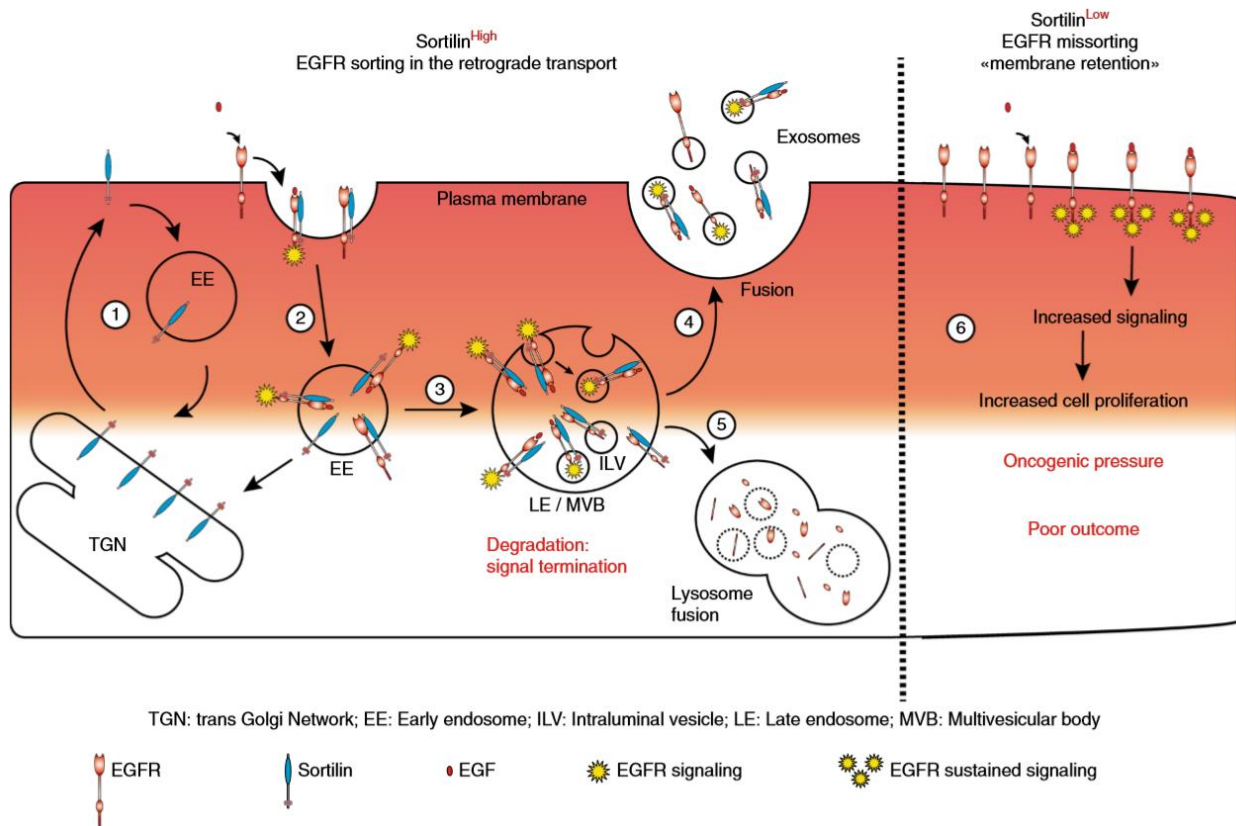


Figure 21 : Schéma de la régulation de l'EGFR par la sortiline (Al-Akhrass et al., 2017)

La sortiline est un régulateur du transport rétrograde de l'EGFR. Celle-ci est majoritairement présente dans le réseau trans-Golgien (TGN) et un niveau de la membrane plasmique où elle achemine des protéines qui lui sont partenaires. De cette manière, la sortiline circule en continu entre la membrane plasmique et le TGN par le biais des endosomes. La sortiline a pour partenaire l'EGFR qui peut être fixé sous forme activé ou non et induire son internalisation. Ainsi, l'EGFR internalisé est retrouvé dans les endosomes précoces, puis tardif afin d'être dégradé par le lysosome, recyclé à la membrane ou exporté dans les exosomes. De cette manière la dégradation permet de limiter la signalisation de l'EGFR. Dans le cas d'une faible concentration en sortiline cellulaire, il y a une absence d'internalisation de l'EGFR, cela conduit à une rétention membranaire du récepteur et un maintien de sa signalisation pro-oncogénique.

La suite de ces travaux a permis d'observer le rôle de la stimulation à l'EGF et l'implication de la sortiline dans le transport nucléaire de l'EGFR. En effet, des résultats préliminaires obtenus par microscopie confocale et par fractionnements subcellulaires ont permis de mettre en évidence l'importance de l'EGF dans la translocation de l'EGFR et de la sortiline. Nous avons pu observer dans des cellules A549wt une augmentation très significative de la quantité d'EGFR et de sortiline au niveau nucléaire suite à la stimulation des cellules à l'EGF. Ces résultats préliminaires suggéraient l'implication de l'EGF dans l'adressage nucléaire de l'EGFR et de la sortiline. En comparant la quantité d'EGFR au niveau nucléaire dans des cellules A549 pLKO et des cellules A549 shSORT1 à la suite de la stimulation par l'EGF, une diminution significative de la quantité d'EGFR a pu être constaté

dans les cellules dépourvues de sortiline suggérant ainsi que cette dernière pourrait être impliquée dans le transport de l'EGFR nucléaire.

Finalement, une première étude visant à analyser le niveau d'expression de quelques gènes cibles de l'EGFR au niveau nucléaire (*c-myc*, *CCND1* et *ABCG2*) a montré une augmentation significative de leur expression en absence de sortiline. Ces résultats suggèrent un rôle de la sortiline au niveau nucléaire, en tant que régulateur transcriptionnel.

Partie IV. Objectifs

L'EGFR joue un rôle majeur dans la progression tumorale des CBNPC. Bien que la signalisation dépendante de l'EGFR occupe une place prépondérante dans cette progression. Son mécanisme d'action ne se limite pas à sa fonction au niveau membranaire. Ainsi, dans de nombreux cancers, la présence de l'EGFR dans le noyau est corrélée à une augmentation significative de la récurrence locale et à une diminution de la survie sans maladie après la radiothérapie seule ou la radiothérapie adjuvante (Pyrri *et al.*, 2005). Les travaux récents de l'équipe sont en lien direct avec le transport de l'EGFR au sein de la cellule. Ils ont en effet mis en évidence l'implication de la sortiline dans le trafic intracellulaire de l'EGFR et démontrent son implication dans l'internalisation de l'EGFR membranaire et l'atténuation de sa signalisation (Al-Akhrass *et al.*, 2017). Plus récemment, une étude préliminaire concernant la fonction de la sortiline en lien avec le transport de l'EGFR a permis de mettre en évidence un nouveau rôle potentiel de cette dernière au niveau nucléaire. Ces résultats attirent l'attention sur la signification de la sortiline et de la sortiline nucléaire chez les patients ainsi que sur l'implication de cette dernière dans la sensibilité aux thérapies ciblées, dans le CBNPC. Les objectifs de cette thèse ont donc été les suivants :

- quantifier le niveau d'expression de la sortiline dans les tissus tumoraux (ADC) en comparaison des tissus sains afin de confirmer la corrélation entre la quantité de sortiline et l'agressivité tumorale et confronter ces résultats aux bases de données en ligne (TCGA).
- déterminer l'existence d'une interaction physique entre l'EGFR et la sortiline au niveau nucléaire comparable à celle préalablement observée au niveau cytoplasmique.
- analyser l'impact des variations d'expression de la sortiline sur l'expression des gènes cibles de l'EGFR (*CCND1*, *c-myc*...) sur des lignées cellulaires et sur les prélèvements issus de patients.
- déterminer par immunoprécipitation de la chromatine (ChIP) si, comme l'EGFR, la sortiline peut se lier à la chromatine afin d'activer ou de réprimer l'expression de gènes.
- mettre en évidence, par ChIP-seq, les cibles génomiques de la sortiline et les comparer aux cibles de l'EGFR existante.
- déterminer les motifs d'ADN récurrents ciblés par l'EGFR et la sortiline.
- identifier l'impact des variations d'expression de la sortiline sur la fixation de la chromatine par l'EGFR et la sortiline et corrélérer ces profils de fixations avec le niveau d'expression des gènes cibles.
- mettre en évidence l'effet d'un traitement aux ITKs (osimertinib) sur la fixation de la chromatine et sur le niveau d'expression des cibles nucléaires.

Partie V. Matériels et méthodes

Culture cellulaire et traitements

Les lignées cellulaires, A549, H1975 ont été obtenues auprès de l'American Type Culture Collection (ATCC), et la lignée cellulaire PC9 a été obtenue auprès d'ECACC, tandis que la lignée cellulaire H3255 a été généreusement fournie par Sylvie Gazzeri de l'institut Albert Bonniot (Grenoble, France). Les modèles cellulaires A549 sous exprimant la sortiline ou l'EGFR par le biais de ShARN et les modèles surexprimant la sortiline déjà présent au laboratoire ont également été utilisés. Les cultures cellulaires ont été maintenues en culture dans un milieu modifié de Dulbecco Eagle GlutaMAX (Gibco) supplémenté avec 10% de sérum veaux fœtal (IDbio), 1% d'antibiotiques (Pénicilline / Streptomycine) (Gibco) et 1% d'acides aminés non essentiels (Gibco). Les lignées cellulaires ont été cultivées à 37°C sous atmosphère humide en présence de 5% de CO₂. Des stimulations EGF ont été réalisées avec 50 ng/mL pendant 30 min. Pour les traitements avec des inhibiteurs de la tyrosine kinase, les cellules ont été traitées pendant 24 heures avec 1 µM d'Osimertinib (AZD9291, Tagrisso®).

Les transfections cellulaires

Pour les transfections transitoires et stables, les cellules ont été transfectées en utilisant le réactif de transfection JetPei (transfection Polyplus, Ozyme). L'utilisation de lentivirus a permis de générer des lignées cellulaires sur-exprimant la sortiline de manière inductible. Brièvement, les cellules H1975 ont été infectées deux fois avec un lentivirus contenant l'ADN codant le système Tet-On, puis avec un lentivirus codant la surexpression de la sortiline. Environ 5×10^5 cellules ont été infectées dans un milieu complet contenant 8 µg de polybrène (Sigma) par millilitre de milieu en présence de lentivirus dilués à raison de 5 particules lentivirales par cellule pour une durée de 48 heures avant d'être sélectionnées par la blasticidine (1 µg/ml, Sigma). Ensuite, les cellules ont été réinfectées avec le second type de lentivirus permettant la surexpression de la sortiline avant d'être sélectionnées par la puromycine (1 µg/mL, Sigma).

ARN interférents

L'extinction transitoire de l'EGFR a été réalisée par l'utilisation de siARN (100 nM) (SignalSilencer® EGF Receptor siRNA I, Ozyme) en présence d'INTERFERin (Polyplus transfection, Illkrich, France).

Fractionnement subcellulaire

Les fractions nucléaires et cytoplasmiques ont été extraites des cellules en utilisant le kit « NE-PER™ Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents » (Thermo Scientific™). Environ 1.10^6 cellules ont été décollées et centrifugées à 500 x g pendant 5 minutes. Les culots cellulaires ont ensuite été rincés avec du PBS 1X glacé (PBS, Gibco) et centrifugés à nouveau à 500 x g pendant 5 minutes. Les cellules ont été remises en suspension avec le réactif d'extraction cytoplasmique I (CER I) et agitées avant incubation sur glace pendant 10 minutes. Le réactif d'extraction cytoplasmique II (CER II) a été ajouté à la suspension cellulaire et incubé pendant 1 minute sur glace. Le mélange a été centrifugé à 16 000 x g / 4°C pendant 5 minutes puis la fraction cytoplasmique a été récoltée. Le culot nucléaire a été lavé au PBS et recentrifugé. Le culot nucléaire a ensuite été remis en suspension dans le réactif d'extraction nucléaire (NER) et incubé sur glace pendant 40 minutes et vortexé toutes les 10 minutes pendant 15 secondes. Les lysats nucléaires ont été centrifugés à 16 000 x g / 4°C pendant 10 minutes. La fraction nucléaire a été récoltée immédiatement. Les fractionnements subcellulaires ont été analysés par western blot. Pour ces extractions, le rapport volumique des réactifs CER I: CER II: NER de 200: 11: 100 μ L a été respecté.

Western Blot

Pour l'analyse par western blot, les cellules ont été lavées avec du PBS (PBS, Gibco) puis lysées avec un tampon de lyse cellulaire (4% SDS 10%, 20% glycérol, 0,125 M Tris-HCl pH 6,8) contenant 1% de cocktail d'inhibiteurs de protéases (# 7012, Cell Signaling). Les lysats cellulaires ont ensuite été soniqués (Vibra-Cell Sonifier, avec une amplitude de 60%) trois fois (5 secondes chacun, avec au moins 1 minute de repos sur glace entre les impulsions). Ensuite, les lysats ont été centrifugés à 16 000 x g / 4°C pendant 20 minutes. La concentration en protéine des lysats a été évaluée par dosage de Bradford. Le western blot a été réalisé sur 40 μ g de protéines totales. Les protéines ont été soumises à une migration sur gel d'acrylamide SDS-PAGE avant d'être transférées sur membrane PVDF et incubées en présence d'anticorps spécifiques pour la sortiline (# Ab16640, Abcam®), P-EGFR (Tyr 1068, # 3777, 1/1000; Cell Signaling), EGFR (# 4267, 1/1000, Cell Signaling, ou clone H11 # MA5-13070, 1/500, Fischer Scientific), pERK1 / 2 (Thr202 / Thr204, # 4370, 1/1000, Cell Signaling), ERK1 / 2 (, # 9102, Cell Signaling 1/1000), pAKT (Ser 473, # 4060 1/1000, Cell Signaling) AKT (# 4691, 1/1000, Cell Signaling), lamin b1 (# HPA050524, 1/1000, Anticorps Atlas®), tubuline (# sc-53646, Santa Cruz) et l'actine (# A2066, 1/10000, Sigma). L'immunoblot a été révélé avec des anticorps secondaires conjugués à la peroxydase de raifort (HRP) (Dako, 1/1000, Agilent, France) en présence d'un substrat d'ECL, un substrat de chimioluminescence. Les membranes ainsi incubées ont été révélées à l'aide d'une G-Box (Ozyme, France).

Immunoprécipitation nucléaire

Les immunoprécipitations nucléaires ont été réalisées après l'extraction de la fraction nucléaire en utilisant le kit « NE-PER™ Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents » (Thermo Scientific™). Seuls les extraits nucléaires ont été conservés et dilués avec du tampon

de radio-immunoprécipitation (tampon RIPA) (50 mM Tris-HCl pH 8,0, 150 mM NaCl, 1% Nonidet P-40 (NP-40), 5% sodium désoxycholate, 0,1% sodium dodecyl sulfate (SDS), 1 mM d'orthovanadate de sodium, 1 mM NaF, 1% d'inhibiteurs de protéases). Les immunoprécipitations ont été réalisées avec les billes magnétiques Dynabeads™ Protein G (# 10003D, Invitrogen™). Les anticorps d'immunoprécipitation ont été incubés avec les billes Dynabeads™ pendant 10 minutes à température ambiante (RT) afin de les conjuguer avant d'ajouter les lysats nucléaires. Les anticorps couplés aux Dynabeads™ ont été incubés pendant 2 heures sous agitation à température ambiante avec les lysats nucléaires. Les billes ont ensuite été lavées 3 fois avec du PBS (PBS, Gibco) et éluées avec du tampon de charge SDS-PAGE 2X Laemmli (4% SDS, 10% 2-mercaptoéthanol, 20% glycérol, 0,004% bleu de bromophénol, 0,125 M Tris-HCl) à 95°C pendant 10 minutes. La co-immunoprécipitation a ensuite été révélée par western blot.

Immunoprécipitation de la chromatine

L'immunoprécipitation de la chromatine a été réalisée en utilisant le kit « SimpleChIP® Enzymatic Chromatin IP Kit (Magnetic Beads) (#9003, Cell Signaling) ». Environ $2 \cdot 10^7$ cellules ont été fixées avec 1% de formaldéhyde pendant 10 minutes à température ambiante. La fixation au formaldéhyde a été stoppée en ajoutant une solution de glycine (#7005, Cell Signaling) pendant 5 minutes à température ambiante. Les cellules fixées ont été centrifugées à 2000 x g pendant 5 minutes puis lavées deux fois avec 20 mL de PBS glacé (PBS, Gibco) et centrifugées à nouveau. Les culots cellulaires ont été remis en suspension et incubés pendant 10 minutes sur glace dans 4 mL de tampon d'isolement de noyau A (#7006, Cell Signaling) contenant 1 M de dithiothréitol (DTT) (#7016, Cell Signaling) et un cocktail d'inhibiteurs de protéases (PIC) (# 7012, Cell Signaling). Les suspensions cellulaires ont été centrifugées à 2000 x g / 4°C pendant 5 minutes. Les culots ont ensuite été remis en suspension dans 4 mL de tampon d'isolement de noyaux B (#7007, Cell Signaling) supplémenté avec du DTT 1 M, re-centrifugés à 2000 x g / 4 ° C pendant 5 minutes. Les culots nucléaires ont été remis en suspension dans 400 µL de tampon B contenant 2 µL de nucléase micrococciale (#10011, Cell Signaling) et incubés pendant 20 minutes à 37°C sous agitation régulière pour fragmenter l'ADN. La digestion a été arrêtée en ajoutant 0,5 M d'EDTA (#7011, Cell Signaling) et en incubant sur glace pendant 2 minutes. Les noyaux ont été centrifugés à 16 000 x g / 4°C pendant 1 minute puis lysés par sonication dans un tampon ChIP 1X (#7008, Cell Signaling) contenant du PIC. Les noyaux lysés ont été centrifugés à 9 400 x g / 4°C pendant 10 minutes. La taille et la concentration des fragments d'ADN ont été vérifiées par électrophorèse à 2% d'agarose et quantification au Nanodrop™ (NanoDrop™ ND2000C, Thermo Scientific™) après purification à partir du surnageant. Les immunoprécipitations ont été réalisées à partir de 50 µg d'ADN avec 500 µL de tampon ChIP 1X contenant du PIC et 2 µg d'anticorps (anti-EGFR H11, #MA5-13070, ThermoFisher Scientific ; anti-sortilin, #ANT-009, Alomone; IgG de lapin), #2729, Cell Signaling ; Mouse (G3A1) mAb IgG1 Isotype Control, #5415S, Cell Signaling) et incubées pendant une nuit à 4°C sous agitation. Après une nuit d'incubation, 30 µL de billes magnétiques couplées à des protéines G (# 9006, signalisation cellulaire) ont été ajoutées au mélange d'immunoprécipitation et ont été incubées pendant 3 heures à 4°C sous agitation. Les billes ont ensuite été lavées 3 fois avec un tampon de lavage à faible teneur en sel (tampon ChIP 1X), puis une fois avec un tampon à haute teneur en sel (tampon ChIP 1X ; NaCl 1 M). L'ADN et les protéines ont été élués des billes en ajoutant 150

μL de tampon d'éluion 1X (# 7009, Cell Signaling) et chauffés à 65°C pendant 30 minutes. Le surnageant a ensuite été récolté et digéré par ajout de 2 μL de protéinase K (#10012, Cell Signaling) et incubé pendant une nuit à 65°C. L'ADN a ensuite été purifié en utilisant des colonnes de purification (#10010, Cell Signaling) et élué dans 40 μL de tampon d'éluion d'ADN (#10009, Cell Signaling). Les tests ChIP ont ensuite été révélés par PCR quantitative.

Extraction D'ARN et PCR quantitative

Les ARNs totaux ont été extraits à partir de 50 mg de tissu ou d'environ 1.10⁶ cellules par la méthode du trizol (#79306, QIAzol, QIAGEN). Les tissus ou les cellules ont été lysés dans le réactif QIAzol avant d'ajouter du chloroforme et de centrifuger 12 000 x g / 4°C pendant 10 minutes. La phase aqueuse a été transférée dans un nouveau tube avant d'ajouter de l'isopropanol et d'incuber à -80°C pendant 1 heure pour précipiter les ARNs. Le mélange a ensuite été centrifugé à 16 000 x g / 4°C pendant 10 minutes. Les culots d'ARN précipité ont été lavés à l'éthanol 75% avant d'être centrifugés de nouveau à 16 000 x g / 4°C pendant 10 minutes. Les ARNs totaux ont ensuite été remis en suspension dans de l'eau qualité biologie moléculaire. La réaction de rétrotranscription a été effectuée en utilisant la Superscript III (Invitrogen™) à partir de 2 μg d'ARN totaux selon le protocole du fournisseur. Les PCR quantitatives ont été réalisées sur 50 ng d'ADNc avec le Premix Ex Taq™ (#RR39WR, TaKaRa®) sur un thermocycleur QuantStudio 3 (Applied Biosystems™) avec les sondes TaqMan™ adaptées aux cibles. Les résultats de RT-qPCR ont été normalisés par rapport au gène de ménage *ACTB* en utilisant la méthode des ΔΔCt. Les sondes utilisées sont fournies dans le tableau suivant. Les sondes employées pour les réactions de ChIP qPCR ont été conçues à partir des séquences de promoteurs d'ADN génomique de chaque gène ciblé. Pour cela, le service « custom » TaqMan™ ThermoFisher Scientific™ a permis de déterminer les sondes nécessaires.

Targeted Gene	TaqMan™ probes references
ACTB	Hs01060665_g1
CCND1	Hs00765553_m1
DHODH	Hs00361406_m1
DUSP12	Hs00170898_m1
EGFR	Hs01076090_m1
MYC	Hs00153408_m1
SNAPC1	Hs00608182_m1
SORT1	Hs00361760_m1
STX6	Hs01057343_m1

Tableau 1 : Liste des gènes ciblés par qPCR et les amorces correspondantes

Immunofluorescence

Les cellules ont été cultivées à la surface de lamelles de verre et lavées deux fois dans du PBS glacé avant la fixation par du méthanol pendant 10 minutes sur glace. Après fixation, les cellules ont été lavées avec du PBS puis incubées dans du PBS contenant 1% (p / v) de BSA (IDbio). Les cellules ont été immunomarquées à 4°C pendant la nuit avec l'anticorps primaire indiqué, anti-EGFR (Cell Signaling, Ozyme, #4267, 1/100), anti-sortiline (Abcam,

#ab16640, 1/100, France) dans une solution de saturation. Les cellules ont ensuite été lavées trois fois (PBS) et les anticorps primaires ont été marqués soit avec des anticorps anti-lapin conjugué Alexa Fluor 594, soit avec des anticorps anti-souris-IgG conjugués Alexa Fluor 488 (1 : 1000 ; Life Technologies) pendant 2h à température ambiante. Les cellules ont été lavées trois fois (PBS). Les cellules ont été montées sur lame de verre en utilisant un milieu de montage Fluoroshield (Sigma) contenant du 4', 6-diamidino-2-phénylindole (DAPI) pour colorer les noyaux. Les images de fluorescence ont été obtenues en utilisant des microscopes à fluorescence (Zeiss Axiovert) équipés d'un système d'imagerie confocale à balayage laser (Zeiss LSM 510 META ou LSM800). Les coefficients de Mander ont été calculés en utilisant le logiciel Zeiss LSM 510 META ou ZEN (Zeiss) sur des images non saturées avec une tranche optique de 0,8 µm. Au moins 30 cellules ont été acquises pour chaque condition. L'expression de l'EGFR ou de la sortiline à la surface des cellules a été analysée à l'aide du logiciel ImageJ (ImageJ).

« Proximity ligation assay »

Pour la réaction de « proximity ligation assay », les cellules ont été fixées avec du paraformaldéhyde (PFA) à 4% pendant 10 minutes, puis perméabilisées pendant 30 minutes sur glace dans 0,1% de Triton X-100 (Sigma) dans du PBS. Les cellules ont ensuite été lavées avec du PBS puis saturées avec une solution de PBS 2% de BSA pendant 30 minutes à 37°C dans une chambre humide. Les anticorps primaires contre l'EGFR (monoclonal de souris, 1: 100, Life Technologies) et la sortiline (polyclonal de lapin, 1: 100, Abcam) ont été dilués dans une solution de saturation avant d'incuber les échantillons pendant 30 minutes à 37°C. Les cellules ont ensuite été lavées avec le tampon A du kit de test de ligature de proximité Duolink II (Olink Bioscience, Sigma). La sonde Duolink II PLA anti-souris Minus et la sonde Duolink II PLA anti-lapin Plus ont ensuite été ajoutées aux cellules. Les cellules ont ensuite été incubées pendant 60 minutes à 37°C. Pour lier les deux sondes, les cellules ont été incubées pendant 30 minutes à 37°C dans du tampon de ligature Duolink II en présence de ligase. Après la ligature, les cellules ont été lavées dans le tampon A. L'amplification a été réalisée pendant 100 minutes à 37°C avec le tampon d'amplification Duolink II contenant la polymérase. Les cellules ont ensuite été lavées trois fois dans du tampon B et montées sur lame de verre avec un milieu de montage contenant du DAPI. Des analyses ont été effectuées en utilisant le logiciel ImageJ (NIH, Bethesda) en mesurant les valeurs moyennes de fluorescence. Au moins 30 cellules ont été acquises pour chaque condition.

Greffe de cellules tumorales *in vivo*

Les souris femelles NOD-SCID ont été obtenues auprès de Janvier Labs (France). Les souris ont été hébergées dans une atmosphère non pathogène. Les expériences ont été réalisées en accord avec le Département vétérinaire français. Environ 1.10^6 cellules H1975 sur-exprimant la sortiline en présence de doxycycline ont été greffées sur la cuisse gauche de souris. Le volume tumoral (= Longueur x Largeur x ((Longueur + Largeur) / 2)) a été mesuré deux fois par semaine. Les souris ont été traitées ou non avec de la doxycycline dans l'eau de boisson (2 mg/mL). Après le développement de la tumeur, les souris ont été sacrifiées 34 jours

après l'injection des cellules et les tumeurs ont été collectées. Une partie de la tumeur a été fixée au formaldéhyde, incorporée dans des blocs de paraffine pour réaliser des analyses par IHC et la deuxième partie a été utilisée pour vérifier la surexpression par qPCR et western blot.

Analyses statistiques

Les analyses statistiques concernant les intensités relatives de fluorescence, les résultats de western blot et les expériences de CHIP ont été réalisées avec le logiciel PAST (version 2.17). Les données présentées ont été réalisées au minimum trois fois de manière indépendante. Les barres d'erreurs représentent les erreurs standard à la moyenne. Les résultats ont été analysés par un test ANOVA et les $p \leq 0.05$ ont été considérés comme statistiquement significatifs. Les corrélations entre les niveaux d'expression en ARNm de *cMYC* et de *SORT1* ont été faites à partir des bases de données du TCGA et du CCLE et évaluées par régression linéaires en utilisant le logiciel R (version 3.6.1).

Partie VI. Résultats

Le cancer du poumon non à petites cellules (CBNPC) est le principal type de cancer bronchique. Parmi ceux-ci le sous type dominant est l'adénocarcinome (ADC) qui représente environ 80% des CBNPC. Ce type de cancer demeure la principale cause de décès par cancer dans le monde (Herbst *et al.*, 2008). Environ 15% des CBNPC de type ADC comportent des mutations somatiques dans le domaine tyrosine kinase (TK) du récepteur du facteur de croissance épidermique (EGFR). Ces mutations conduisent à des formes actives de ce récepteur indépendamment de sa stimulation par ses ligands. En conséquence, la signalisation proliférative soutenue par cette activation constitutive fait de ces mutants les principaux moteurs oncogènes (Sharma *et al.*, 2007 ; Di Fiore *et al.*, 1987). Etant donné l'importance de l'EGFR et son état d'activation dans le cancer bronchique, les inhibiteurs de tyrosine kinase (ITK) sont couramment utilisés en clinique (McDermott *et al.*, 2007). Leur utilisation limite l'intensité et la durée de la signalisation proliférative de l'EGFR, diminuant ainsi l'agressivité de la tumeur et le risque évolutif (Rosell *et al.*, 2012). Bien qu'aucune différence dans la fréquence ou dans le type de mutations de l'EGFR n'ait été observée entre le stade précoce et le stade avancé des cancers bronchiques (Pi *et al.*, 2018), les avantages cliniques déclinent au fil des traitements suite à l'apparition de mutations conférant des résistances (Rosell *et al.*, 2012 ; Chong et Jänne, 2013).

De manière indépendante des stades de la maladie, l'expression de facteurs co-oncogéniques comme *cMYC* coopère avec les principales mutations de l'EGFR dans le maintien de la malignité des cellules et participent à la mise en place des résistances thérapeutiques. L'EGFR par le biais de sa voie canonique et de sa voie non-canonique participent à l'établissement des tumeurs et à leur résistance thérapeutique. En effet, plusieurs publications ont permis de montrer l'action de l'EGFR en tant que facteur de transcription (Liccardi *et al.*, 2011 ; Li *et al.*, 2009 ; Hsu et Hung, 2007) induisant directement l'expression de plusieurs co-oncogènes (*ABCG2*, *B-MYB*, *iNOS*, *COX-2*, *Aurora A*, *STAT1*), parmi lesquels *cMYC* et *CCND1* sont respectivement impliqués dans la reprogrammation épigénétique (Poli, V. *et al.*, 2018) et la prolifération cellulaire. L'une des hypothèses serait que les traitements via des ITKs limitent les différentes signalisations canoniques de l'EGFR dépendante de sa forme phosphorylée exacerbant sa voie non canonique. Les fonctions de l'EGFR pourraient ainsi être réorientées vers sa signalisation nucléaire et sa fonction en tant que facteur de transcription. Par conséquent, le contrôle de la distribution et du trafic intracellulaire de l'EGFR reste une étape cruciale pour limiter l'intensité de sa signalisation. Dans ce contexte, nos travaux antérieurs nous ont permis de montrer que la sortiline, un récepteur de tri appartenant à la famille VPS10 (Vacuolar Protein Sorting 10), agit comme un régulateur crucial de l'endocytose de l'EGFR pour limiter sa signalisation proliférative. En effet, la sortiline permet l'internalisation de l'EGFR ayant pour conséquence de limiter sa signalisation membranaire. A l'inverse, l'absence de sortiline conduit à une rétention membranaire de celui-ci. Etant donné l'implication de la sortiline dans le trafic de l'EGFR, il était légitime de s'interroger sur sa fonction en lien direct avec l'action non canonique de l'EGFR et avec son mécanisme d'action au niveau nucléaire.

Nos travaux récents ont mis en évidence la présence d'un complexe EGFR-sortiline dans les noyaux de cellules de cancer bronchique stimulées par de l'EGF. Par la suite, nous avons pu découvrir une fonction nucléaire inédite de la sortiline visant à lier la chromatine. Les

résultats concernant ce rôle ont permis de dévoiler, à l'échelle du génome, une distribution de l'EGFR et de la sortiline sur des cibles génomiques correspondants aux promoteurs et à des éléments régulateurs de la transcription de gènes impliqués dans l'agressivité et la progression tumorale (Strippoli *et al.*, 2020 ; Blakely *et al.*, 2017 ; Santoni-Rugiu *et al.*, 2019). La sortiline se lie de manière préférentielle au site de début de transcription (TSS) de *cMYC*, ce qui a pour effet de diminuer la fixation de l'ARN Pol II limitant, par conséquent, l'expression génique. Les tests effectués en présence d'ITK de dernière génération comme l'osimertinib ont déclenché une internalisation de l'EGFR et de la sortiline. La translocation nucléaire de ce complexe et son action sur différentes cibles génomiques permettent notamment à la sortiline d'exercer une fonction répressive sur l'expression de *cMYC* et de *CCND1*. Sachant que l'expression de la sortiline reste significativement réduite par rapport à celle de l'EGFR dans les lignées cellulaires de cancer bronchique, la sortiline représenterait un facteur restrictif afin de limiter les fonctions transcriptionnelles de l'EGFR. N'étant que peu présente dans le cancer bronchique, la sortiline ne permet pas d'inhiber totalement l'action de l'EGFR.

Nos travaux nous permettent de conclure en proposant un modèle hypothétique dans lequel la sortiline se lie simultanément aux éléments régulateurs de transcription des gènes ciblés habituellement par l'EGFR et présente une activité potentielle de suppresseur de tumeurs en limitant l'activité de transduction de l'EGFR. De cette manière, la sortiline tend à endiguer le rôle membranaire de l'EGFR en induisant son internalisation et le rôle nucléaire de celui-ci, en inhibant l'expression des cibles nucléaire de l'EGFR. En effet, la sortiline, lorsqu'elle est sur-exprimée limite le recrutement de l'ARN polymérase II, indispensable à la transcription des gènes, tels que *cMYC*. Cette étude permet de mieux comprendre la signification et la valeur pronostique de l'expression de la sortiline dans le cancer bronchique non à petites cellules ainsi que son intérêt potentiel au niveau thérapeutique, plus spécifiquement dans les tumeurs possédant comme principal driver oncogénique l'EGFR. La sortiline pourrait représenter à la fois un marqueur prédictif de l'efficacité des ITK et un nouveau candidat thérapeutique dans la resensibilisation des cellules tumorales aux traitements.

Sortilin exhibits tumor suppressor-like activity by limiting EGFR transducing function

Lapeyronnie E.*¹, Granet C.*¹, Tricard J.*^{1,3}, Gallet F.¹, Yassine M.¹, Chermat A.^{1,3}, Jauberteau MO¹, Bertin F.^{1,3}, Melloni B.^{1,2}, Vincent F.^{1,2,#}, Naves T.^{1,§,#} and Lalloué F.^{1,§,#}

¹EA3842 CAPTuR, Contrôle de l'Activation cellulaire, Progression Tumorale et Résistance thérapeutique and Chaire de Pneumologie Expérimentale, Université de Limoges, Faculté de Médecine, 2 Rue du Dr. Raymond Marcland, 87025 Limoges CEDEX-France.

²Service de Pathologie Respiratoire, Centre Hospitalier et Universitaire de Limoges, 87042 Limoges CEDEX-France.

³Service de Chirurgie Thoracique et Cardio-vasculaire, Centre Hospitalier et Universitaire de Limoges, 87042 Limoges CEDEX-France.

*These authors contributed equally to this work.

§Equal contribution.

corresponding authors

Please address correspondence to:

Thomas Naves

Chaire de Pneumologie Expérimentale

EA3842 CAPTuR, Contrôle de l'Activation cellulaire, Progression Tumorale et Résistance thérapeutique

Faculté de Médecine

2, Rue du Docteur Marcland

87025, Limoges CEDEX

FRANCE

Tel: +33 5 55 45 59 70

Mail: thomas.naves@unilim.fr

Fabrice Lalloué

EA3842 CAPTuR, Contrôle de l'Activation cellulaire, Progression Tumorale et Résistance thérapeutique

Faculté de Médecine

2, Rue du Docteur Marcland

87025, Limoges CEDEX

FRANCE

Tel: +33 5 55 45 59 29

Mail: fabrice.lalloue@unilim.fr

SUMMARY (148 / 150 words)

Lung cancer is the leading cause of cancer deaths worldwide and remains one of the most incurable. Tyrosine kinase receptors, such as the epidermal growth factor receptor (EGFR), are often aberrantly activated and drive tumor growth. Monotherapy with tyrosine kinase inhibitors to deactivate EGFR has shown initial efficacy, but their benefits tend to decline over time. EGFR acts as a transcriptional factor promoting the expression of co-oncogenic drivers, which, in turn, interact with canonical EGFR mutations to induce therapeutic relapse. This study reports that sortilin, a crucial regulator of cytoplasmic EGFR, attenuates its transducing function. Genome-wide chromatin binding revealed that sortilin interacts with gene regulatory elements occupied by EGFR. These results suggest a model, in which sortilin exhibits potential tumor suppressor-like activity by concurrently binding to regulatory elements of *cMYC*. Sortilin expression in lung adenocarcinoma may be predictive of the efficacy of anti-EGFR strategies.

KEYWORDS (up to 10)

EGFR, sortilin, *MYC*, TKI, lung adenocarcinoma

INTRODUCTION

Lung adenocarcinoma (LUAD), which is present in about ~80% of patients with non-small cell lung cancer (NSCLC), remains the leading cause of cancer deaths worldwide¹. About 15% of these tumors contain somatic mutations in the gene encoding epidermal growth factor receptor (EGFR), constitutively activating the tyrosine kinase (TK) domain of EGFR, even in the absence of ligand stimulation. This sustained proliferative signaling² creates cells in which EGFR mutants act as principal oncogenic drivers³. Clinically, tyrosine kinase inhibitors (TKI)⁴ limit the intensity and duration of EGFR proliferative signaling, thereby decreasing tumor aggressiveness and the course of disease⁵. However, although early and advanced LUAD do not differ in EGFR mutation frequency or type⁶, the clinical benefits of TKIs decline over time^{5,7}.

Irrespective of disease stage, co-oncogenic drivers cooperate with canonical EGFR mutations in maintaining tumor malignancy and enhancing relapse. EGFR can act as a transcriptional factor⁸⁻¹⁰, directly promoting the expression of these co-drivers, such as *MYC* and *CCND1*, which have been implicated in epigenic reprogramming¹¹ and cell proliferation, respectively. These findings suggest that exclusive of its TK activity, EGFR function may be reoriented to its nuclear signaling network. Thus, controlling the spatiotemporal distribution of EGFR remains crucial in limiting its oncogenic driving force. We have reported that sortilin, a sorting receptor belonging to the vacuolar protein sorting 10 (VSP10) family, acts as a crucial regulator of EGFR endocytosis, limiting its proliferative signaling. To better determine the possible clinical role of sortilin in the treatment of tumors with constitutively activated EGFR, this study investigated whether sortilin could also act on the nuclear EGFR signaling network.

We recently observed that EGFR–sortilin complexes were present in the nuclei of EGF-stimulated cells concomitant with genome-wide chromatin binding, with these complexes binding to transcription regulatory elements of genes associated with relapse from TKI treatment and progressive disease¹²⁻¹⁴. Interestingly, sortilin was found to preferentially bind to the transcription-starting site (TSS) of *cMYC*, reducing the activity of this gene. The TKI osimertinib was shown to trigger massive EGFR internalization and importation into cell nuclei of EGFR–sortilin complexes, with sortilin expression in the nuclei repressing *cMYC* expression. Because sortilin expression is significantly lower than EGFR expression in LUAD cell lines, sortilin may act as a restrictive factor, limiting EGFR transcriptional functions.

We have therefore proposed a model, in which sortilin exhibits a potential tumor-suppressor-like activity by concurrently binding to the transcription regulatory elements of EGFR-targeted genes, thereby limiting the EGFR transducing activity. The present study provides insight into the therapeutic importance of sortilin expression in LUAD, especially in EGFR-positive tumors. Sortilin may both predict the efficacy of TKIs and be a new candidate for the treatment of LUADs.

RESULTS

Sortilin interacts with EGFR in the nucleus

Based on findings showing that sortilin limits EGFR proliferative signaling^{15,16}, we tested whether sortilin exhibits a tumor suppressor-like activity by acting on its nuclear signaling network. Although sortilin interacts physically with EGFR in A549 cells at or near the plasma membrane, as shown by red spots indicating sites of proximity ligation amplification (PLA), their interaction within the nuclei of cancer cells following EGF stimulation was not evaluated^{15,16} (Figure 1a, insets 1-1 to 2-2). Z-stack confocal images and three-dimensional projections at 90° and 155° showed that EGFR–sortilin complexes were present in the nuclei of both EGF-stimulated and non-stimulated cells (Figure 1b, insets showing z axis #2 to #26). After incubation for 5 min, both the numbers of EGFR–sortilin clusters and their total volume in the nuclei of EGF-stimulated cells increased significantly ($p < 0.05$, Figure 1c–e), suggesting that the translocation of EGFR–sortilin complexes started at early stages of EGFR endocytosis. Indeed, both immunoprecipitation (Figure 1f) and western blotting of isolated nuclei showed significant increases in EGFR–sortilin complexes ($p < 0.001$, 30 min), with EGF kinetics suggesting specific sub-nuclear localizations¹⁷ (Figure 1g–h). Because EGFR silencing significantly reduced ($p < 0.05$) the amount of sortilin in nuclear extracts despite EGF stimulation, sortilin translocation was likely not mediated by another member of the EGF family (Figure 1h and 1j).

These results suggest that sortilin is imported into the nuclei of cancer cells only in the presence of EGFR, and that nuclear EGFR importation requires EGFR endocytosis. Likewise, agglomeration of EGFR–sortilin complexes in the nuclei of EGF-stimulated cells suggests a specific sub-nuclear localization that might address transcriptional functions.

Figure_1_Lapeyronnie_Granet_et_al.

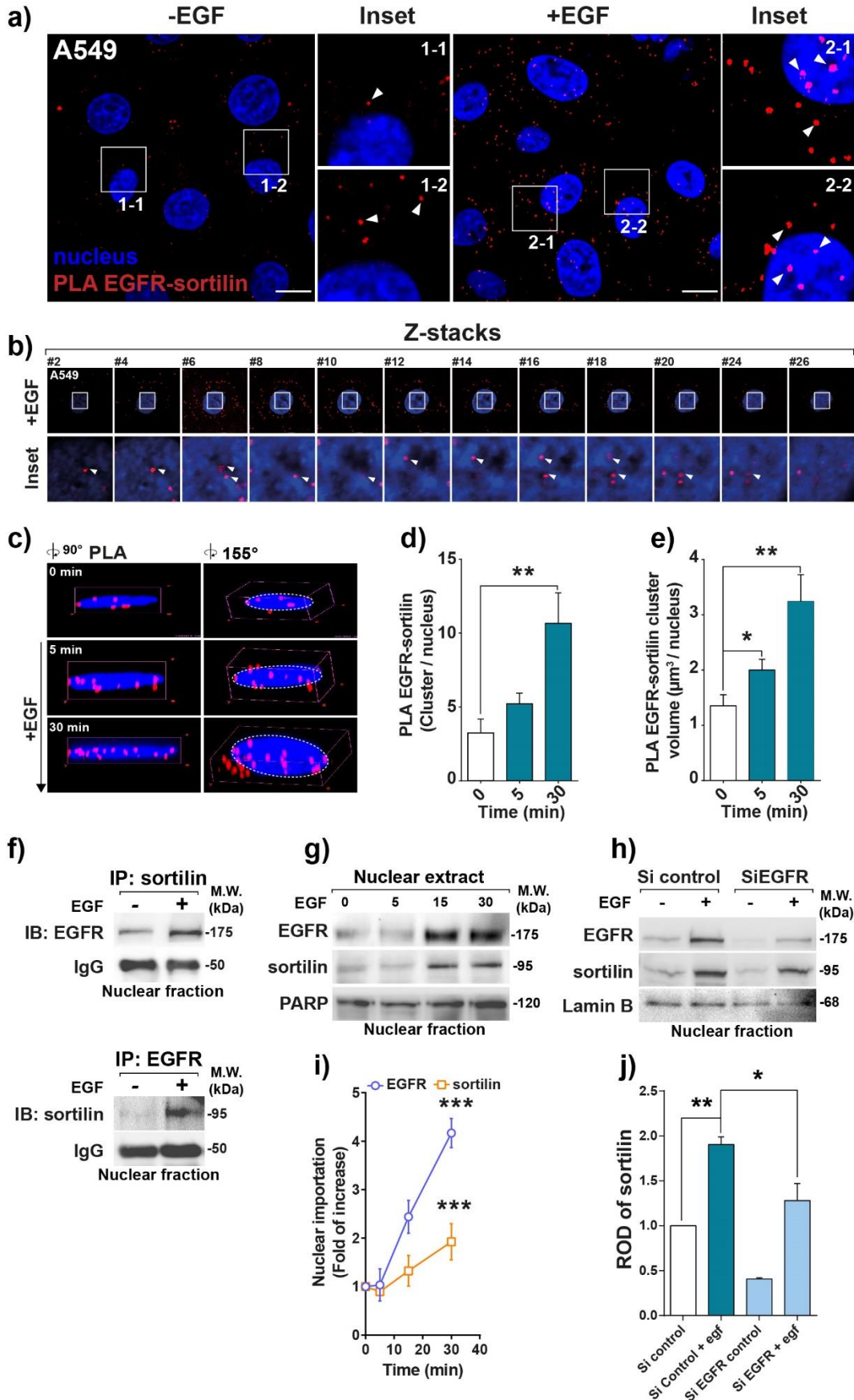


Figure 1: Sortilin and EGFR interact together in the nuclei of cancer cells. (a) Proximity ligation assay (PLA) showing the interaction between sortilin and EGFR in the lung adenocarcinoma cell line A549 in the absence or presence of EGF (50 ng/mL) for 30 min. Red spots indicate sites of PLA amplification, reflecting interactions between sortilin and EGFR. Scale bar, 10 μm ; white arrows show EGFR–sortilin clusters. (b) Z-stack sections of confocal microscopy images showing sortilin and EGFR interactions in z axis (insets #2–26). White arrows show EGFR–sortilin clusters. (c) 3D confocal microscopy images showing EGFR–sortilin interactions at angles of 90° and 155°. (d) Quantification of EGFR–sortilin spots per nucleus, in the absence or presence of EGF for 5 or 30 min. (e) Estimated volumes of EGFR–sortilin clusters per nucleus ($\mu\text{m}^3/\text{nucleus}$) in the absence or presence of EGF for 5 or 30 min. (f) Confirmation of EGFR–sortilin interactions by nuclear co-immunoprecipitation of A549 cell lysates in the absence or presence of EGF (50 ng/mL) for 30 min and immunoblotted (IB) with anti-EGFR antibodies. (g) Immunoblots showing kinetics of EGFR and sortilin nuclear importation following EGF stimulation of A549 cells. Nuclear fractions were obtained 0, 5, 15, and 30 min after stimulation with 50 ng/mL EGF. (h) EGFR silencing by specific siRNA transfection for 72 h before assessment of sortilin importation into the nucleus by western blotting. (i) Quantification of nuclear importation of EGFR and sortilin following EGF stimulation. Molecular weights (MW) are shown in kilo Daltons (kDa). (j) Relative optical density (ROD) of sortilin expression in isolated nuclei following EGFR depletion by siRNA. All values represent means \pm SD. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.001$ by Student's t-test. Each experiment was repeated at least three times.

EGFR–sortilin complexes co-immunoprecipitate with chromatin

To gain insight into the role of EGFR–sortilin complexes in the nuclei of EGF-stimulated cells, we investigated whether these complexes exhibited chromatin binding properties. Chromatin immunoprecipitation assays (ChIP) were performed using micrococcal nucleases (Mnase), with the quality of enzymatic digestion validated by assessing the ability to release mono-nucleosomes (Supplementary Materials 1a-d). Because sortilin was never shown to act as a transcriptional co-factor with genomic binding sequences, and because its nuclear importation would depend on EGFR (Figure 1h and 1j), we analyzed specific DNA sequences located within the promoter regions of genes belonging to the EGF transcriptional response pathway¹⁸. Thus, we selected the epigenetic reprogramming gene *cMYC*¹¹ and the cell cycling gene Cyclin D1 (*CCND1*)¹⁹. ChIP with anti-EGFR or anti-sortilin antibodies showed that EGF stimulation resulted in the amplification of *cMYC* and *CCND1* chromatin sequences (Figure 2a). Because amplification was not observed following immunoprecipitation with their respective isotype controls (IgG1 ChIP EGFR and IgG ChIP sortilin), these results suggest that both EGFR and sortilin interact specifically with chromatin and could participate in the activity of EGF-regulated genes (Figure 2a, IgG).

To identify the DNA regions immunoprecipitated by anti-EGFR and anti-sortilin antibodies, the ChIP products were sequenced (ChIP-Seq). All libraries bound by these antibodies met all ChIP-Seq quality control criteria (Supplementary Materials 1b and c). ChIP-Seq experiments were performed on biological replicates following stimulation with 50ng/mL EGF for 30 min, with reads averaging 50 million. The percentage frequencies of peaks enriched in stimulated A549 cells were predominantly distributed within intergenic and intronic regions, as well as toward transcriptional regulating elements, including the TSS and the transcription termination site (TTS) (Figure 2b). Analysis of the segmentation of TSS sequences revealed a preferential distribution for EGFR and sortilin. ChIP-Seq peak distributions within 5 kb of TSS with aggregation plots showed that the TSS/TTS ratios for EGFR and sortilin were 2.44 and 1.78, respectively (Supplementary Figure 1). Not surprisingly, we observed an abundance of TSS peaks co-occurring with the highest expression of EGFR (Figure 2c and Supplementary Figure 1). Likewise, their overlap positions in close proximity to the TSS region suggested that EGFR–sortilin complexes affected gene activity (Supplementary Figure 1). The PLA and co-immunoprecipitation assays showing the physical interactions between EGFR and sortilin in the nuclei of A549 cells (Figure 1a–e) suggested that EGFR and sortilin have common binding sites on target loci. Significant correlations between EGFR and sortilin profiles were shown on ChIP-Seq overview using the IGV genome browser, which found EGFR and sortilin binding sites on the *CCND1* and *cMYC* TSS, as well as by Pearson's correlation coefficients among samples (Figure 2d and 2e). Similarly, *in silico* analysis suggested that both EGFR and sortilin bound to an AT-rich minimal consensus sequence (ATRS), consisting of TNTTT or TTTNT, with N being any nucleotide (Figure 2f). These genomic sequences were previously associated with the EGFR chromatin binding site^{18,19}, suggesting that EGFR–sortilin complexes potentially bind chromatin through EGFR.

Taken together with our previous results, the binding patterns of EGFR and sortilin were close to gene-proximal regulatory elements, suggesting that EGFR–sortilin complexes are involved in EGF-induced molecular processes.

Figure_2_Lapeyronnie_Granet_et_al.

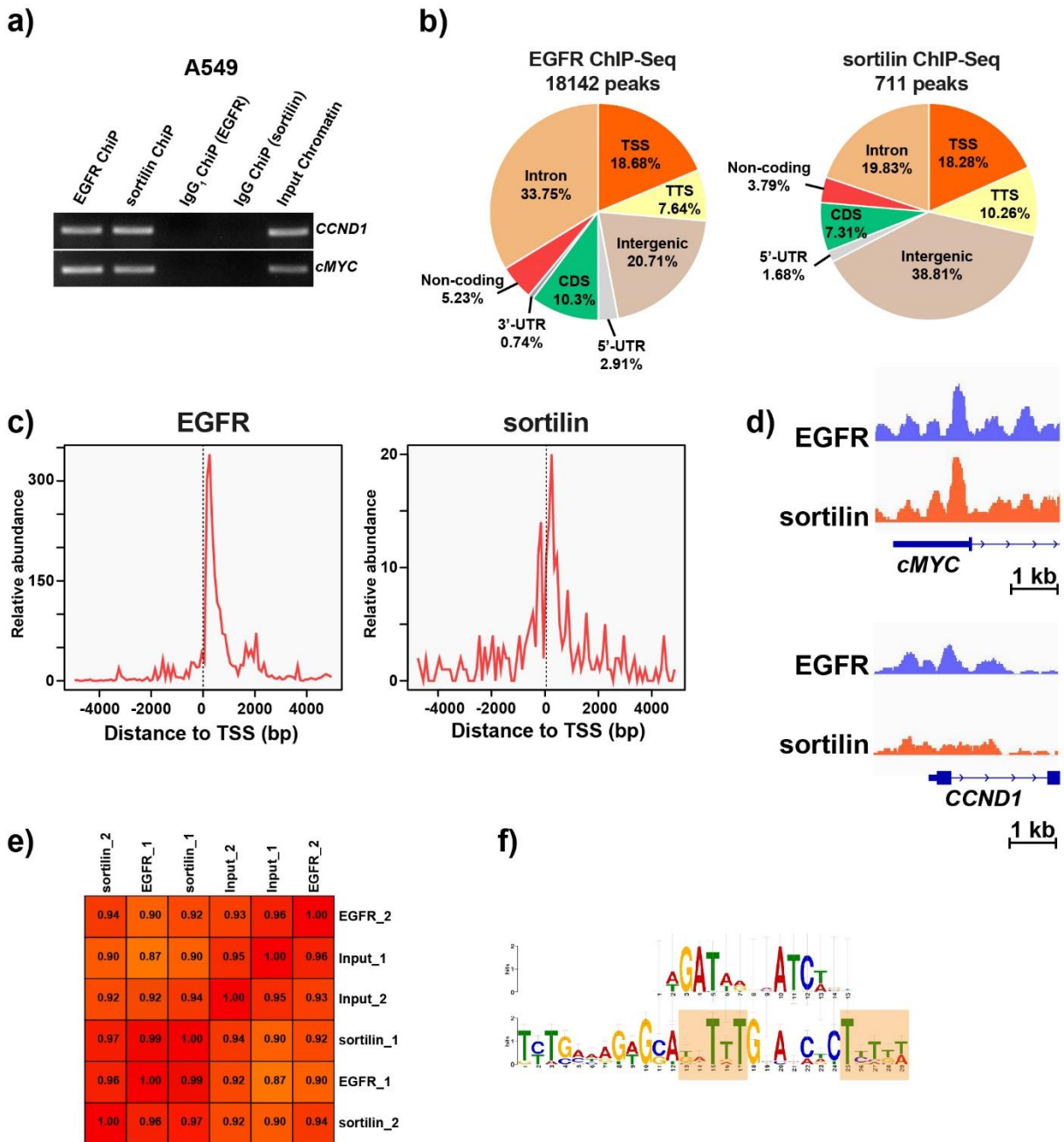


Figure 2: EGFR and sortilin interact with chromatin. (a) PCR amplification of *CCND1* and *cMYC* promoter sequences in A549 cells stimulated with EGF (50 ng/mL) for 30 min following chromatin immunoprecipitation (ChIP) with either anti-EGFR or anti-sortilin antibodies. Respective isotype IgGs, IgG1 ChIP (EGFR) and IgG ChIP (sortilin), were used as controls and compared with input samples (input chromatin) corresponding to non-ChIP DNA as internal control. (b) Peaks enriched for EGFR and sortilin in A549 cells stimulated with EGF (50 ng/mL) for 30 min. (c) Distribution of EGFR and sortilin ChIP-Seq reads near 5 kb upstream/downstream of TSS. (d) ChiP-Seq overview shown with the IGV genome browser representing EGFR and sortilin binding sites on *CCND1* and *cMYC* TSS. (e) Table showing

Pearson correlation coefficients between each pair of ChIP conditions. Color intensity was representative of the magnitude of the correlation coefficient. **(f)** Common consensus sequences of EGFR and sortilin binding sites on chromatin.

EGF stimulation enhances DNA occupancy by sortilin

To further assess whether EGF promotes EGFR and sortilin DNA binding to transcriptional regulatory elements, we designed primers corresponding to the TSS regions of genes derived from gene ontology (GO) analysis (Supplementary Table 1), followed by the use of immunoprecipitated chromatin as a qPCR template. Each immunoprecipitation met ChIP quality control (data not shown), with non-specific DNA binding ruled out by using non-relevant immunoglobulins of the same class as the respective antibodies (data not shown). A549 cells were depleted of *EGFR* and *SORT1* mRNAs^{15,16} using specific shRNAs and incubated with antibodies to specifically immunoprecipitate chromatin. No significant differences were observed between A549 cells transfected with empty vector (pLKO cells) and wild-type A549 cells (data not shown). EGF stimulation triggered significant ($p < 0.001$) chromatin binding of EGFR onto the TSS regions derived from *CCND1*, *cMYC*, and several genes selected by GO analysis (Figure 3a and Supplementary Figure 2a). Although EGF stimulation significantly enhanced ($p < 0.001$ and $p < 0.001$) sortilin binding to the TSS of selected genes (Figure 3b and Supplementary Figure 2b), amplification of the *cMYC* TSS was of especial interest. Indeed, EGF stimulation triggered a significant ($p < 0.001$) reduction of sortilin chromatin binding to *cMYC* transcriptional regulatory elements when compared with control cells (Figure 3b). Because chromatin was not amplified in these mRNA-depleted cell lines (shRNA, $p < 0.0001$) (Figure 3a and 3b), the differences between EGFR and sortilin binding profiles for *cMYC* TSS in basal condition may have specifically involved in *cMYC* gene activity. Likewise, because EGFR expression remains higher than that of sortilin, aggregation of free uncomplexed EGFR to sortilin could unbalance sortilin action toward gene activity. Indeed, EGFR depletion significantly ($p < 0.001$) reduced the expression of *cMYC* mRNA but had no effect on *CCND1* mRNA expression (Figure 3c). By contrast, the levels of *CCND1* and *cMYC* mRNAs were significantly higher ($p < 0.001$) in A549 *SORT1* mRNA-depleted than in control A549 cells (Figure 3d).

Taken together, these results suggest that sortilin impairs expression of EGF response genes and could compete with EGFR at *cMYC* regulatory elements, thus limiting the expression of EGFR oncogenic co-drivers.

Figure_3_Lapeyronnie_Granet_et_al.

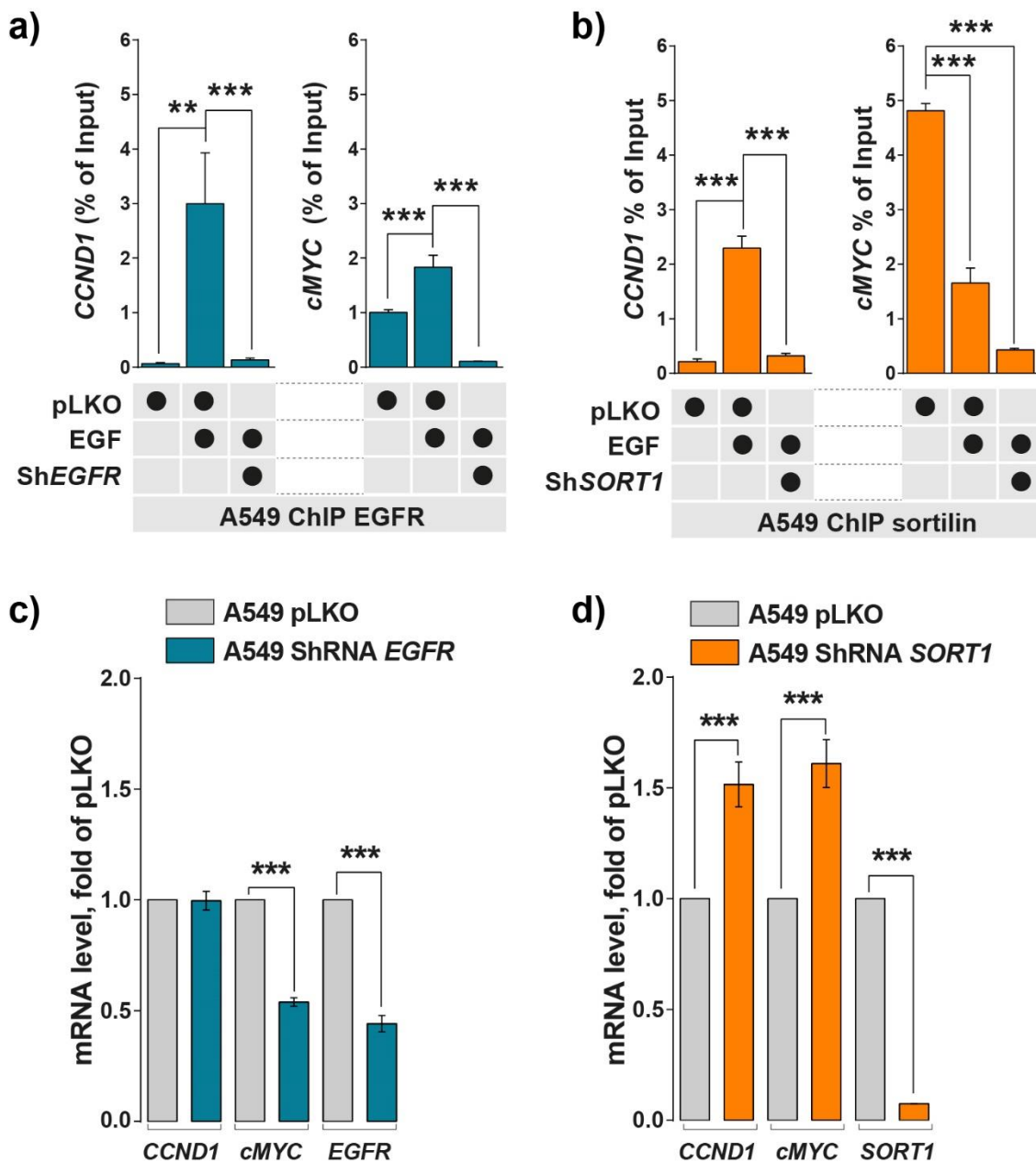


Figure 3: EGF stimulation increases EGFR and sortilin binding to chromatin. (a-b) Quantitative PCR (qPCR) of chromatin immunoprecipitated (ChIP) by anti-EGFR (blue bars) and anti-sortilin (orange bars) antibodies in control cells (pLKO) and cells depleted of *EGFR* or *SORT1* mRNA by incubation with shRNAs, and incubated in the absence or presence of EGF (50 ng/mL) for 30 min. Histograms represented the percentages of input following normalization. *CCND1* and *cMYC* promoters were amplified by qPCR. (c-d) RT-qPCR measurements of *CCND1* and *cMYC* mRNAs in A549 cells depleted of *EGFR* or *SORT1* mRNA with shRNAs and in control cells (pLKO). All values represent means \pm SD, *** p <0.001 by Student's t-test. Each experiment was repeated at least three times.

Sortilin overexpression limits polymerase II recruitment to TSS

Because EGFR protein levels are decreased in H1975 cells overexpressing *SORT1* (*OE-SORT1*)¹⁵, we performed ChIP experiments using these cells and H1975 cells or transfected with empty vector (EV). As expected, EGF stimulation of control (EV) cells triggered significant ($p < 0.001$) chromatin binding by both EGFR and endogenous sortilin (Figure 4a and Supplementary Figure 3a). By contrast, because sortilin overexpression reduced EGFR stability, EGFR chromatin binding decreased significantly despite EGF stimulation (Figure 4a and Supplementary Figure 3b). Under such experimental conditions, sortilin binding to chromatin was reduced when compared with control cells, whereas sortilin binding to the *cMYC* TSS was not altered by EGF stimulation (Figure 4b). Thus, sortilin continued to occupy the *cMYC* TSS when compared with non-stimulated *OE-SORT1* cells (Figure 4b and Supplementary Figure 3b). Using this model, we assessed the recruitment of polymerase II (Pol II), belonging to the initiating transcription complex, toward the TSS surface occupied by EGFR and sortilin (Figure 4c). Interestingly, the chromatin binding of Pol II to *cMYC* and *CCND1* TSS was significantly lower in cells overexpressing sortilin than in control cells, as was the binding of Pol II to selected genes from GO analysis (Figure 4c and Supplementary Figure 3c). Sortilin binding was higher in cells overexpressing *SORT1* than in EV cells, suggesting that sortilin impairs recruitment of Pol II and the gene activity of *CCND1* and *cMYC*. To further evaluate the consequences of increased sortilin chromatin binding, we assessed the levels in these cells of *CCND1* and *cMYC* mRNAs. Surprisingly, sortilin overexpression significantly reduced ($p < 0.001$) the mRNA levels of the EGFR co-drivers *CCND1* and *cMYC* (Figure 4d).

Taken together, these results suggest that the amount of sortilin would represent a limiting factor to impair EGFR binding and Pol II recruitment at the TSS of EGF response genes. Moreover, in the presence of TKIs, the inhibition of EGFR kinase activity may result in an imbalance in sortilin chromatin binding.

Figure_4_Lapeyronnie_Granet_et_al.

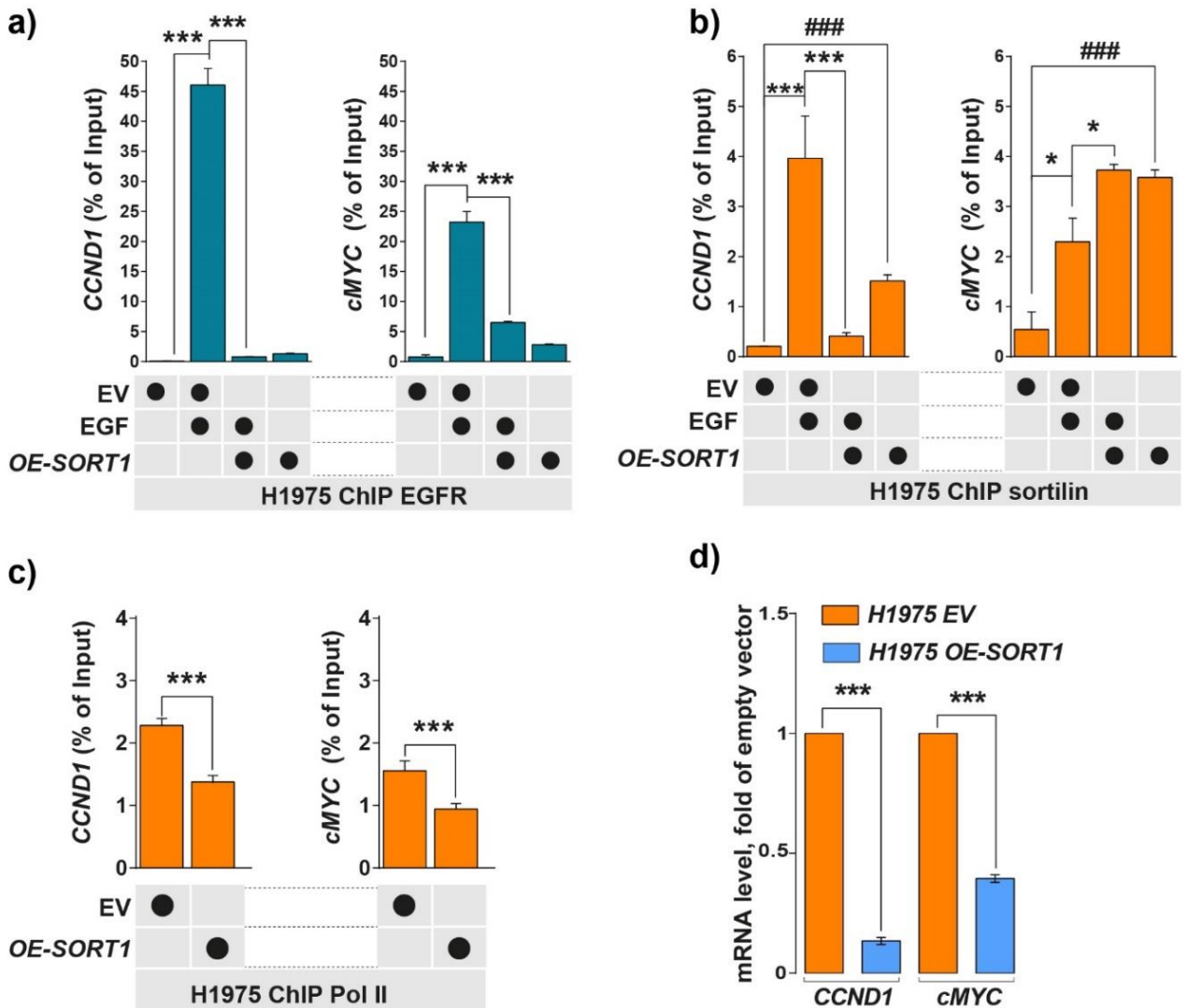


Figure 4: Sortilin overexpression increases sortilin chromatin binding on *cMYC* and limits polymerase II recruitment. (a-b) EGFR and sortilin ChIP-qPCR were performed on H1975 control cells transfected with empty vector (EV) or on H1975 sortilin overexpressing cells (*OE-SORT1*) in the absence or presence of EGF (50 ng/mL) for 30 min. *CCND1* and *cMYC* promoters were amplified by qPCR. (c) Pol II ChIP-qPCR performed on EV and *OE-SORT1* cells. (d) Levels of *CCND1* and *cMYC* mRNAs in control (EV) and *OE-SORT1* cells by qPCR. All values represent means \pm SD, * p <0.05, ** p <0.01, *** p <0.001, and ### p <0.001 by Student's t-tests. Each experiment was repeated at least three times.

Osimertinib triggers nuclear importation of EGFR

The spatiotemporal distribution of EGFR remains critical in the treatment of patients with lung cancer, with patients relapsing due to sustained proliferative signaling in the endosome platform or enhanced nuclear importation²⁰. The subcellular distribution of EGFR, however, is dependent on EGFR mutational status²¹. For example, EGFR with a T790M mutation in H1975 cells is constitutively active, being internalized^{15,21}, whereas wild-type EGFR in A549 cells remains at the plasma membrane in the absence of ligand stimulation^{15,21}. Because EGFR-targeted agents have been found to trigger EGFR endocytosis^{9,22}, we investigated EGFR distribution following TKI exposure; whether inhibition of its kinase activity by osimertinib, a TKI designed to inhibit the activity of EGFR containing the T790M mutation²³, impairs EGFR chromatin binding; and whether competition with sortilin for chromatin binding would limit the activity of this TKI. Strikingly, we found that treatment of A549 cells with 1 μ M osimertinib for 24 h triggered massive EGFR endocytosis, similar to that observed by ligand stimulation with 50 ng/mL for 30 min (Figure 5a, insets 1-1 to 6-2). Cell fractionation and isolation of nuclei resulted in massive importation of EGFR in the nuclei of both cell lines, irrespective of its initial subcellular distribution (Figure 5b). Treatment with osimertinib did not inhibit EGFR importation into the nucleus, although it reduced EGFR phosphorylation. Similar to EGF stimulation (Figure 1a–f), treatment with osimertinib also resulted in the nuclear importation of sortilin, suggesting that irrespective of stimuli, sortilin could be co-imported with EGFR in a manner independent of the phosphorylation status of the latter.

Figure_5_Lapeyronnie_Granet_et_al.

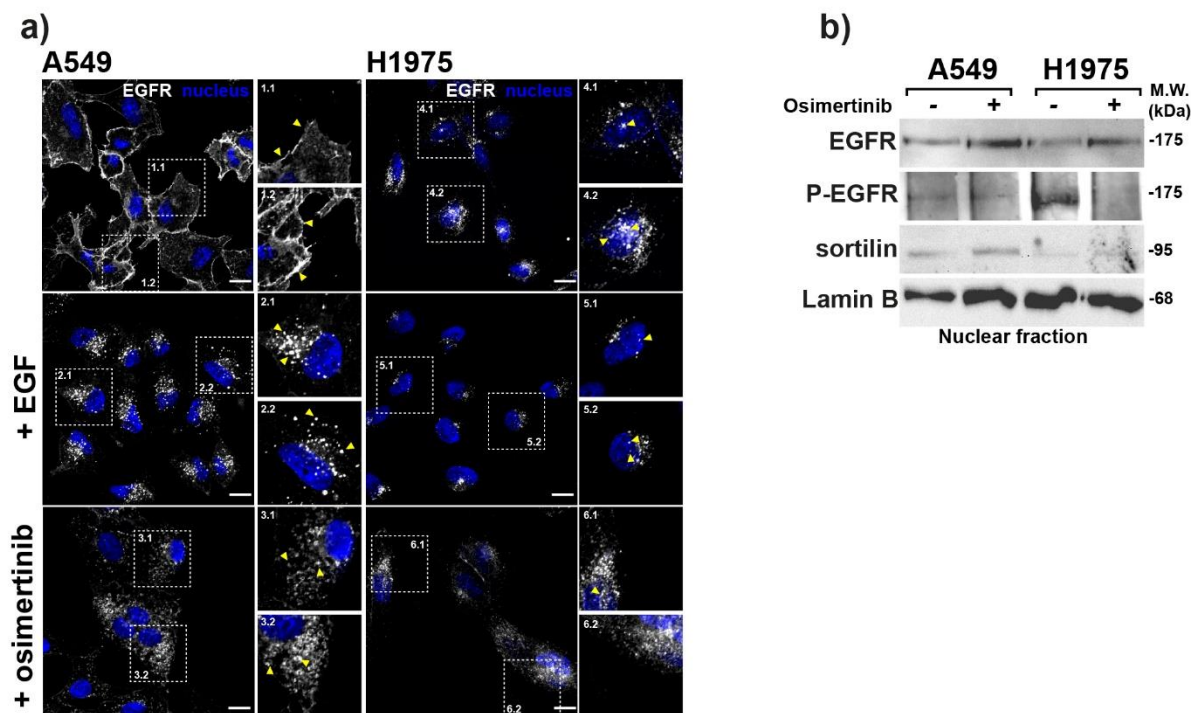


Figure 5: Osimertinib enhances nuclear importation of EGFR. (a) EGFR localization was analyzed by confocal microscopy in A549 and H1975 cells, in the absence or presence of EGF stimulation (50 ng/mL for 30 min) or osimertinib treatment (1 μ M for 24 h). Scale bar, 10 μ m, yellow arrows show EGFR location. **(b)** Western blotting showing that treatment of A549 and

H1975 cells with osimertinib (1 μ M for 24 h) controlled EGFR and sortilin importation into isolated cell nuclei following cell fractionation. Molecular weight (MW) in kilo Daltons (kDa).

Osimertinib increases sortilin chromatin binding to cMYC TSS

We subsequently assessed whether EGFR and sortilin binding to chromatin increases following the enrichment of these proteins in the nuclear compartment. Osimertinib treatment of A549 cells carrying wild-type EGFR significantly increased EGFR binding to chromatin for each selected TSS sequence (Figure 6a and Supplementary Figure 4a). Similarly, osimertinib significantly increased sortilin binding to all chromatin sequences, except for *cMYC* TSS, where its binding remained unchanged when compared with control of A549 cells (Figure 6b and Supplementary Figure 4b). Strikingly, only *cMYC* TSS binding was significantly increased following osimertinib treatment of the EGFR-mutated H1975 cell line, whereas sortilin binding to both *CCND1* and *cMYC*, as well as to selected genes from GO analysis, increased significantly (Figure 6c and 6d, and Supplementary Figure 5a and 5b). To further analyze gene activity following chromatin binding by EGFR and sortilin, we assessed the levels of *CCND1* and *cMYC* mRNAs in these cells (Figure 6e–g). Osimertinib treatment of H1975 cells did not significantly reduce the level of *cMYC* mRNA relative to that of *CCND1* mRNA and to the level of *cMYC* mRNA in A549 cells, suggesting that EGFR and sortilin compete in binding to the *cMYC* TSS (Figure 6f). Indeed, unbalancing the proportion of sortilin in the *SORT-OE* model significantly reduced the level of *cMYC* mRNA relative to that in EV cells (Figure 6g).

Taken together, these results suggest that sortilin competes for binding to the regulatory elements of the *cMYC* gene, and that its expression would remain a limiting factor in the EGFR transcriptional program, irrespective of stimuli triggering its nuclear importation.

Figure_6_Lapeyronnie_Granet_et_al.

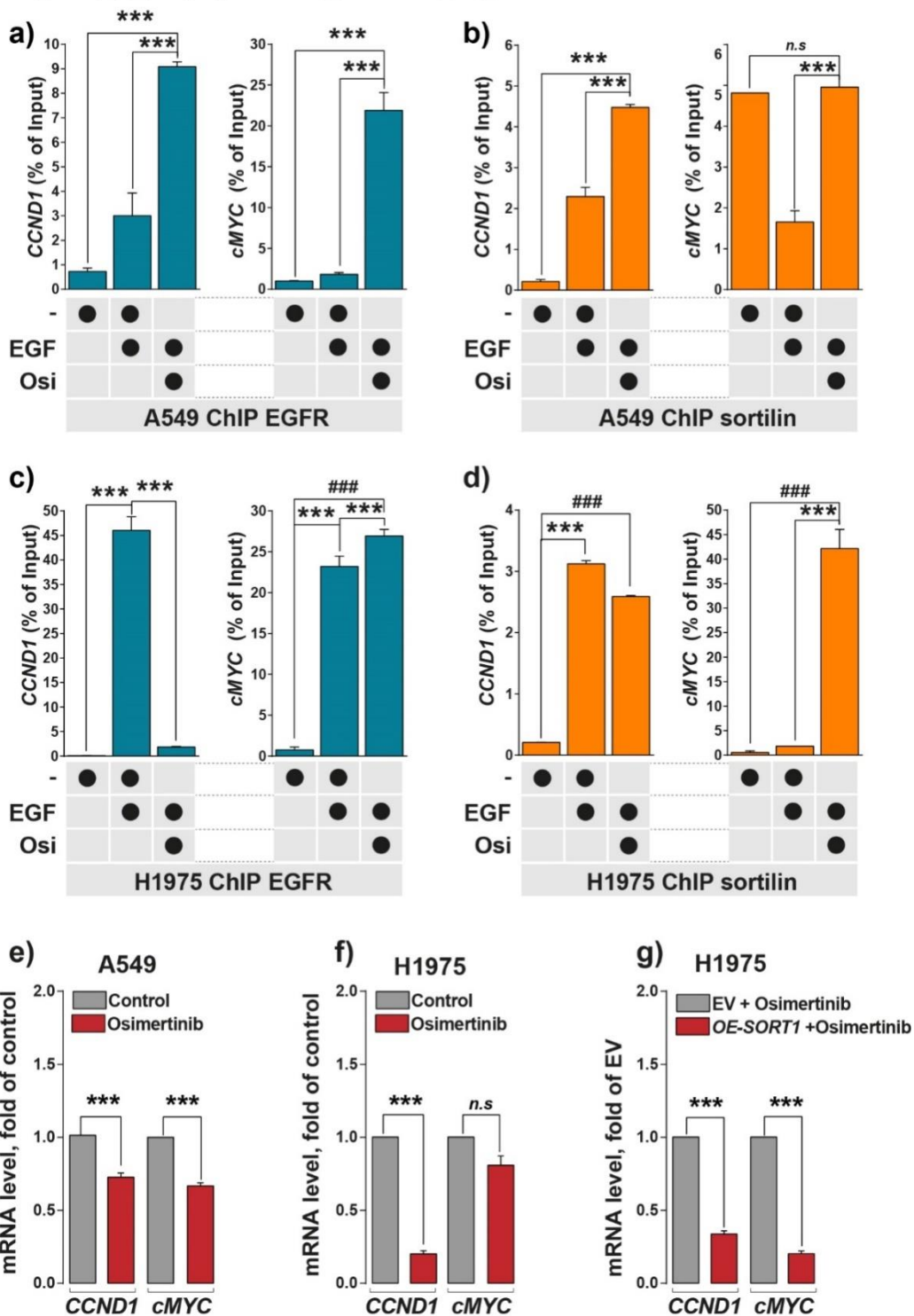


Figure 6: Osimertinib increases EGFR and sortilin binding to chromatin. (a-d) Results of EGFR and sortilin ChIP-qPCR of A549 and H1975 cells incubated in the absence or presence of EGF (50 ng/mL for 30 min) or osimertinib (1 μ M for 24 h). *CCND1* and *cMYC* promoter sequences were amplified by qPCR. **(e-f)** Levels of *CCND1* and *cMYC* mRNAs determined by RT-qPCR in A549 and H1975 cells in the absence or presence of osimertinib. **(g)** *CCND1* and *cMYC* mRNAs were quantified by RT-qPCR in control H1975 cells carrying empty vector (EV) and H1975 cells overexpressing (OE-SORT1) in the presence of osimertinib. All values

represent means \pm SD, *** $p < 0.001$ and ### $p < 0.001$ by Student's t-tests, n.s.: not significant. Each experiment was repeated at least three times.

Inverse correlation between cMYC and sortilin expression

Because uncontrolled EGFR proliferative signaling leads to cell transformation^{3,24} and ADC initiation²⁵⁻²⁷, and because malignant behavior is enhanced by mutation of the EGFR TK domain, we generated an inducible model (Tet-ON), in which sortilin expression was triggered in H1975 cells. Using this model, we found that treatment with doxycycline triggered sortilin expression, thereby unbalancing EGFR stability (Figure 7a). Although EGFR–sortilin complexes were increased in the nuclei of H1975^{Tet-ON-SORT1}-induced cells, as evidenced by immunoprecipitation in the presence or absence of EGF stimulation (Figure 7b), levels of *CCND1* and *cMYC* mRNAs decreased significantly ($p < 0.001$, orange histograms, Figure 7c). *In vivo*, sortilin expression triggered a significant global slowdown of tumor progression ($p < 0.001$, orange curve, Figure 7d) when compared with non-induced cells (blue curve, Figure 7d). Strikingly, we also observed significant reductions in the levels of *CCND1* ($p < 0.01$) and *cMYC* ($p < 0.05$) mRNAs (orange histograms, Figure 7e), further suggesting that sortilin has a tumor suppressor-like activity on the expression of EGFR co-drivers associated with EGF transcriptional responses. Because these results suggested that sortilin expression would unbalance EGF transcriptional response, we assessed their clinical relevance by analyzing *SORT1* mRNA expression in 54 patients with LUAD. We found that *SORT1* mRNA levels were significantly lower ($p < 0.001$) in tumor than in adjacent normal tissue samples (blue boxes, Figure 7f), findings confirmed in data sets from two other studies^{28 29} (blue boxes, Figure 7g and 7h), irrespective of disease stages ($p < 0.001$) (Figure 7i).

We therefore categorized these patients by quartiles of *SORT1* mRNA expression and compared their levels of expression of other mRNAs. Interestingly, we found that only *cMYC* mRNA expression was affected by the level of *SORT1* mRNA expression, with *cMYC* mRNA expression being significantly lower ($p < 0.001$, blue box, Figure 7k) in patients with high sortilin expression (Upper). We also evaluated the effects of sortilin expression on *cMYC* expression in several publicly available data sets from the MSKCC cBioPortal^{30,31}, including 240 patients in The Cancer Genome Atlas (TCGA)³² and 665 solid cancer cell lines in the Cancer Cell Line Encyclopedia (CCLE)³³. Strikingly, *cMYC* expression was inversely correlated with *SORT1* expression in both patient tissue samples ($r = -0.24$, $p = 8.7 \cdot 10^{-8}$) and cancer cell lines ($r = -0.2$, $p = 1.6 \cdot 10^{-8}$).

Taken together, these findings suggest that sortilin alters the activity of the epigenetic reprogramming gene, *cMYC*. Because sortilin remains dysregulated in malignant tissues, enabling an imbalance in the EGF transcriptional response, the malignant behavior of tumors with mutant EGFR would be increased by the expression of co-oncogenic drivers despite the presence of a TKI.

Figure 7_Lapeyronnie_Granet_et_al.

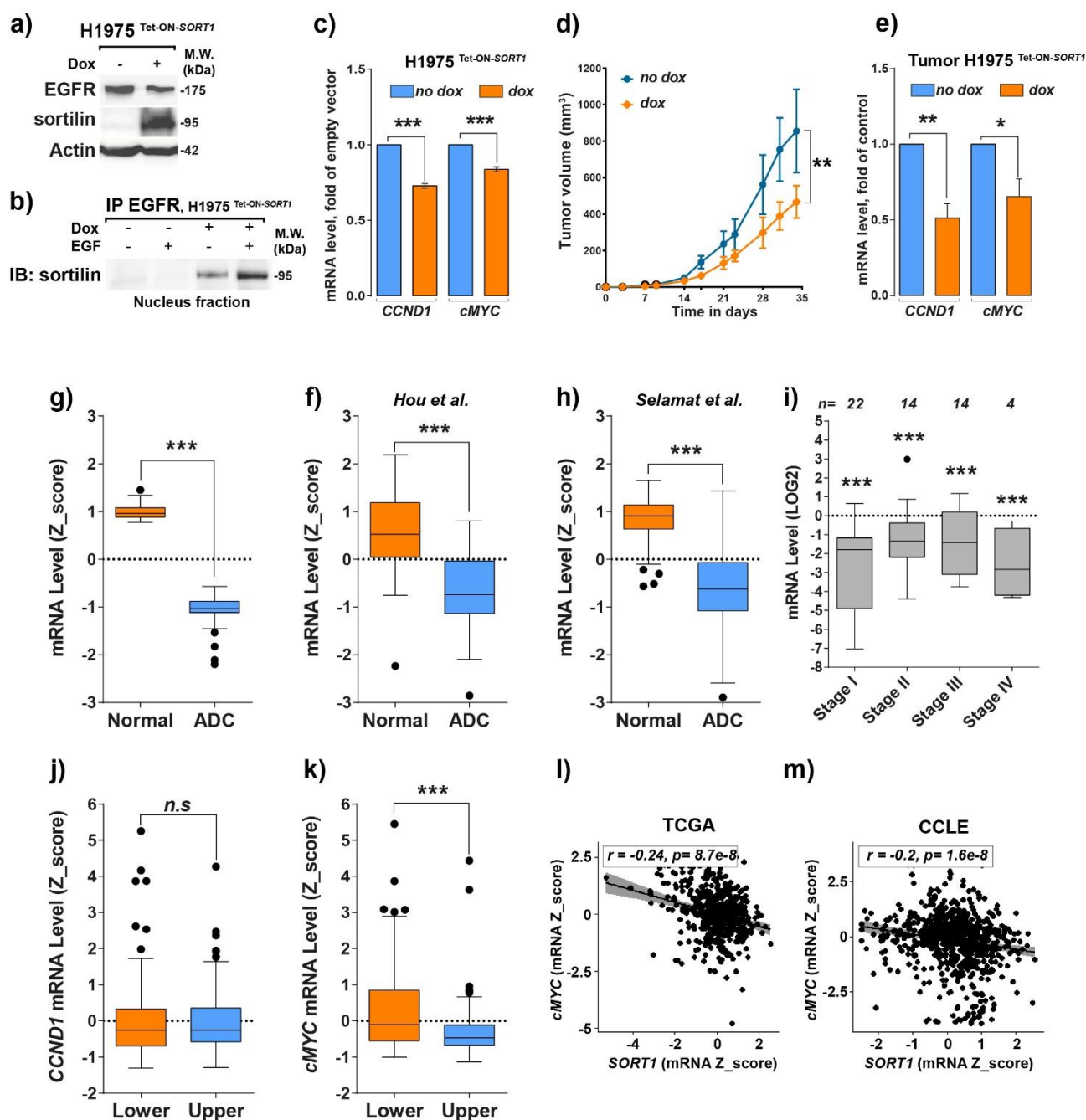


Figure 7: cMYC expression correlates inversely with SORT1 expression in vitro and in tumor samples. (a) Western blotting showing EGFR and sortilin expression in lysates of H1975^{Tet-ON-SORT1} cells following incubation in the absence or presence of 100 nM doxycycline (dox) for 24 h. (b) Anti-EGFR immunoprecipitation (IP) of isolated nuclei from H1975^{Tet-ON-SORT1} cells following incubation in the absence or presence of 100 nM doxycycline for 24 h and stimulation with 50 ng/mL EGF for 30 min and immunoblotting (IB) with anti-sortilin. (c) Comparison of CCND1 and cMYC mRNA levels in H1975^{Tet-ON-SORT1} cells following incubation in the absence or presence of 100 nM doxycycline for 24 h. (d) Effects of doxycycline on tumor induction by H1975^{Tet-ON-SORT1} cells in NOD-SCID mice. H1975^{Tet-ON-SORT1} cells were subcutaneously engrafted (3x10⁶ cells/mouse) onto NOD-SCID mice. Fifteen days later, corresponding to the beginning of tumor development, mice were treated with 2 mg/mL

doxycyclin in drinking water or drinking water alone, and tumor volumes were measured. Tumor growth curves are shown for mice treated with dox (orange curve) and for control mice (blue curve). **(e)** qPCR measurements of expression of *CCND1* and *cMYC* mRNAs in tumors of mice treated with (blue bar) and without (orange bar) dox. **(f-h)** Measurements of *SORT1* mRNA levels (Z-score) in normal and lung adenocarcinoma (ADC) tissue samples obtained from the **(f)** Limoges University Hospital cohort and data sets from references **(g)** 28 and **(h)** 29. **(i)** qPCR measurements of *SORT1* mRNA levels in tumor samples from the Limoges University Hospital cohort at different stages. **(j, k)** Quantification of **(j)** *CCND1* and **(k)** *cMYC* mRNA levels in tumor samples from the Limoges University Hospital cohort expressing the lowest and highest quartiles of sortilin expression. **(l)** Correlation between levels of *cMYC* and *SORT1* mRNA levels in NSCLC patients in the TCGA database ($r=-0.24$; $p=8.7.10^{-8}$) and **(m)** in solid cancer cell lines from the Cancer Cell Line Encyclopedia (CCLE) database ($r=-0.2$; $p=1.6.10^{-8}$). Diagrams represent the correlation between *SORT1* expression and *cMYC* expression. All values are expressed as means \pm SD, ** $p<0.01$ and *** $p<0.001$ by Student's t-test, n.s.: not significant. Each experiment was repeated at least three times.

Figure_8_Lapeyronnie_Granet_et_al.

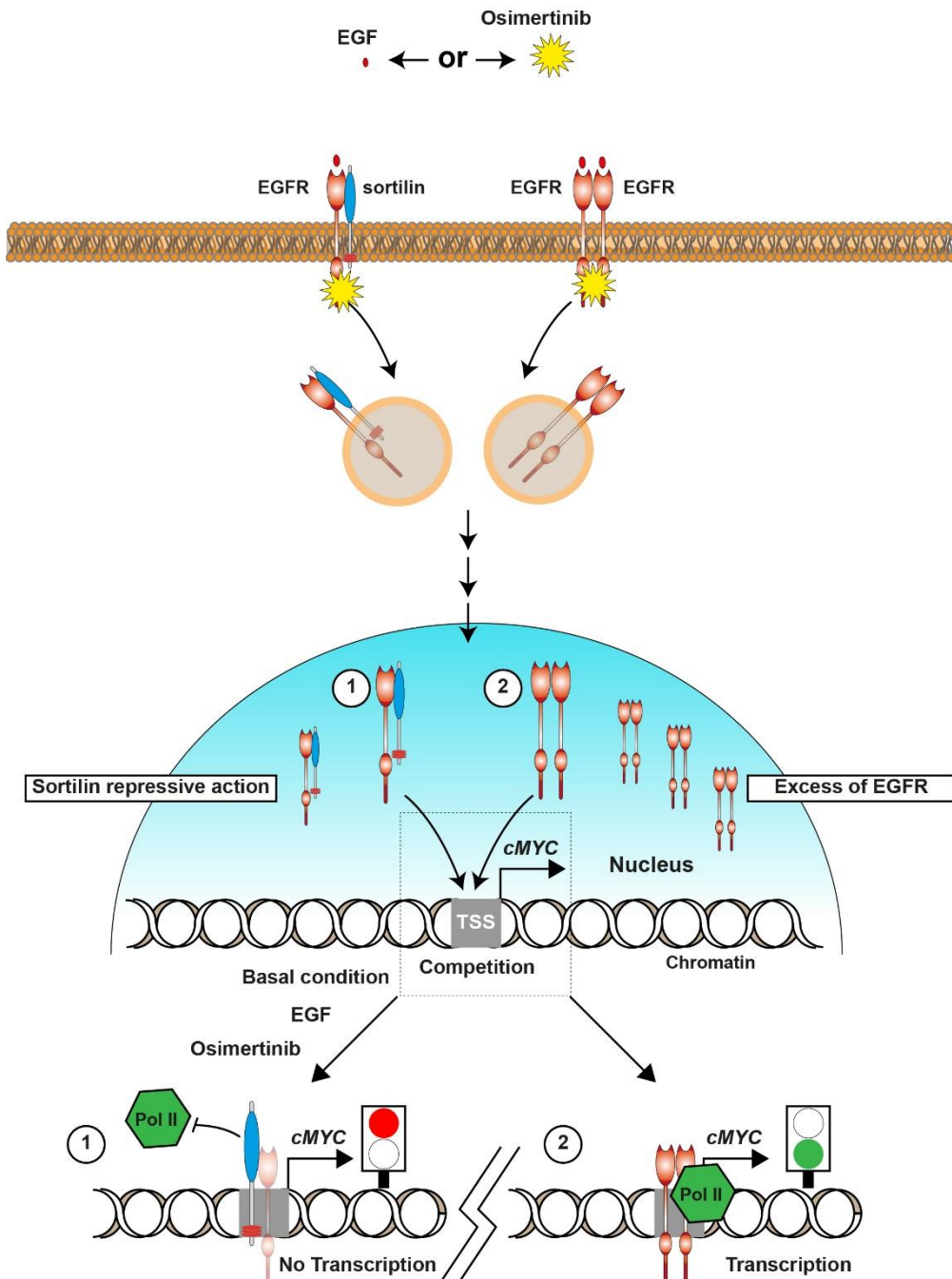


Figure 8: Model of sortilin regulation of transcription. Schematic diagram showing that sortilin has tumor suppressor-like activity, reducing co-oncogene transcription. EGF activates EGFR and induces its internalization as a homodimer or as a hetero dimer with sortilin. Osimertinib treatment promotes EGFR internalization and nuclear translocation. (1) Endocytosis of EGFR with sortilin can result in translocation of the complex into the nucleus, where it binds to chromatin at the TSS, thereby repressing RNA Pol II binding and cMyc co-oncogene transcription. (2) Excess EGFR homodimers imported into the nucleus bind to a specific chromatin area and trigger the recruitment of RNA Pol II, activating transcription.

DISCUSSION

The present study showed that sortilin is a key regulator of nuclear EGFR and that it limits EGFR transducing activity. These findings suggest a mechanism for the biological activity of sortilin. In this model, sortilin interacts with EGFR at the chromatin regulatory elements of EGF response genes, such as those involved in cell reprogramming (*cMYC*) and proliferation (*CCND1*), both of which are hallmarks of cancer, with sortilin limiting their expression³⁴. Figure 8 summarizes the role of sortilin in nuclear EGFR networking and its putative underlying mechanism. We had previously shown that sortilin plays an important striking role in directing EGFR toward rapid internalization and degradation following EGF stimulation¹⁵. PLA and nuclear IP immunoprecipitation experiments in the present study showed the spatiotemporal distribution of EGFR–sortilin complexes in the nuclei of EGF-stimulated cells. Chromatin immunoprecipitation and genome-wide analysis revealed that EGFR and sortilin were coordinately organized in complexes directed toward the regulatory elements of EGF response genes^{35,36}. Indeed, the loci co-occupied by EGFR–sortilin were similar to those revealed by transcriptomic gene expression and genome-wide analysis^{35,36}. The preferential accumulation of these complexes at TSS containing the EGFR binding chromatin sequence ATRS^{18,37} suggest that they bind to chromatin through EGFR.

Because the expression of sortilin in NSCLC cell lines is low¹⁵, the role of sortilin in the EGFR transcriptional program was delineated using both constitutive and inducible models of *SORT1* expression in the highly aggressive cell line H1975, which expresses EGFR carrying the mutation T790M. Although sortilin affected EGFR stability, their interaction in the nucleus increased, as did sortilin chromatin binding. In this model, both EGFR and Pol II binding to the TSS surface of *cMYC* and *CCND1* decreased significantly, as did the levels of their respective mRNAs. Likewise, *SORT1* expression *in vivo* triggered a global slowdown of tumor progression, along with significant reductions in the levels of *cMYC* and *CCND1* mRNAs. These results suggest that sortilin was able to bind TSS sequences irrespective of stimuli, and that sortilin expression remains also crucial to limit EGFR nuclear networking.

These observations raised questions concerning whether neo-endocytosed EGFR could result in imbalances in nuclear EGFR–sortilin complexes. We therefore treated cells with the TKI osimertinib, which inhibits the kinase activity of EGFR, thereby limiting its phosphorylation and endocytosis, the first step in its nuclear importation. Although EGFR phosphorylation decreased, both EGFR and sortilin were imported into cell nuclei, increasing their binding to chromatin in A549 cells bearing wild-type EGFR, and markedly increasing *cMYC* mRNA in H1975 cells. Because, *cMYC* expression in osimertinib-treated H1975 cells decreased significantly only when sortilin was overexpressed, the amount of sortilin may be insufficient to alleviate the EGFR transcriptional program, particularly regarding *cMYC* gene activity. Sortilin expression was found to decrease with the pathologic grade of tumors¹⁵, consistent with findings in this study showing that sortilin is downregulated in most malignant tissues. An assay of tissue samples from 54 patients with LUAD showed that only *cMYC* mRNA level was significantly decreased in malignant tissues with high levels of *SORT1* mRNA. A similar inverse correlation in *cMYC* and *SORT1* expression was observed in tumor tissues and solid cancer cell lines in publicly available datasets. Taken together, these results provide new insights into the tumor suppressor-like activity of sortilin, showing that it alters *cMYC* gene activity. Interestingly, *cMYC* belongs to the panel of genes co-occurring with the EGFR T790M mutation¹³. Because *cMYC* expression reprograms cells, resulting in the formation and maintenance of tumor-initiating cells endowed with metastatic capacities¹¹, these cells become resistant to both anti-EGFR therapy¹² and radiotherapy³⁸.

In summary, our findings provide insight into the role of sortilin in LUAD. Sortilin binds to the chromatin elements of EGF response genes, thereby repressing *cMYC* transcription. This potential mechanism of regulation suggests that sortilin expression may be predictive of tumor responses to anti-EGFR treatment and patient outcomes.

MATERIALS & METHODS

Chromatin immunoprecipitation (ChIP) assay:

Chromatin immunoprecipitation assays were performed using SimpleChIP® Enzymatic Chromatin IP Kits (Magnetic Beads) (#9003, Cell Signaling, Ozyme, France). Briefly, about 2.10^7 cells were crosslinked with 1% formaldehyde for 10 min at room temperature. The formaldehyde reaction was quenched by adding glycine solution (#7005, Cell Signaling), followed by incubation for 5 min at room temperature. Crosslinked cells were harvested by centrifugation at 2000 x g for 5 min, washed twice with 20 mL ice-cold phosphate buffered saline (PBS, Gibco, France), and again centrifuged. Each cell pellet was resuspended in 4 mL of 1X Nuclei isolation buffer A (#7006, Cell Signaling) containing 1 M dithiothreitol (DTT) (#7016, Cell Signaling) and protease inhibitor cocktail (PIC) (#7012, Cell Signaling), followed by incubation for 10 min on ice and centrifugation at 2000 x g for 6 min at 4°C. Each pellet was resuspended in 4 mL of 1X Nuclei isolation buffer B (#7007, Cell Signaling) supplemented with 1 M DTT, centrifuged at 2000 x g for 5 min at 4°C, resuspended in 400 µL buffer B containing 2 µL Micrococcal Nuclease (#10011, Cell Signaling), and incubated for 20 min at 37°C with frequent mixing. DNA digestion was stopped by adding 0,5 M EDTA (#7011, Cell Signaling) and incubating on ice for 2 min. Nuclei were harvested by centrifugation at 16,000 x g for 1 min at 4°C, resuspended in 1X ChIP buffer (#7008, Cell Signaling) containing PIC, and lysed by sonification, and the lysates were centrifuged at 9 400 x g for 10 min at 4°C. Following purification from the supernatant, the sizes and concentrations of DNA fragments were evaluated by 2% agarose electrophoresis and NanoDrop™ quantification (NanoDrop™ ND2000C, Thermo Scientific™, France). Immunoprecipitation assays were performed by mixing 50 µg DNA, 500 µL of 1X ChIP buffer with PIC, and 2 µg antibody to EGFR H11 (anti-EGFR H11, #MA5-13070, ThermoFisher Scientific™, France), sortilin (#ANT-009, Alomone, Israël), normal Rabbit IgG (#2729, Cell Signaling), or mouse (G3A1) mAb IgG1 isotype control (#5415S, Cell Signaling). The mixtures were incubated overnight at 4°C with rotation, and 30 µL ChIP-Grade Protein G Magnetic Beads (#9006, Cell Signaling) were added, followed by incubation for 3 h at 4°C with rotation. The beads were washed three times with low salt wash buffer (1X ChIP buffer) and once with high salt buffer (1X ChIP buffer; 1M NaCl). DNA and proteins were eluted from beads by adding 150 µL of 1X elution buffer (#7009, Cell Signaling) and heating at 65°C for 30 min. Supernatants were harvested and digested by adding 2 µL proteinase K (#10012, Cell Signaling) and incubating overnight at 65°C. DNA was purified by loading onto Purification Columns (#10010, Cell Signaling) and eluting in 40 µL DNA elution buffer (#10009, Cell Signaling). ChIP assays were performed by qPCR using the fold enrichment method, which was based on differences in DNA quantity between specific antibody conditions and isotopic conditions of immunoprecipitation.

Subcellular fractionation:

Nuclear and cytoplasmic fractions were extracted from cells using NE-PER™ Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagent kits (Thermo Scientific™). Briefly, about 1.10^6 cells were

harvested with trypsin-EDTA and centrifuged at 500 x g for 5 min. The cell pellets were washed with ice-cold PBS (Gibco) and harvested by centrifugation at 500 x g for 5 min. The cells were resuspended in Cytoplasmic Extraction Reagent I (CER I), mixed, and incubated on ice for 10 min. Cytoplasmic Extraction Reagent II (CER II) was added to the cell suspensions, which were incubated for 1 min on ice and centrifuged at 16 000 x g for 5 min at 4°C. The cytoplasmic fractions were harvested, and the pellets were washed with PBS and re-centrifuged. These nuclear pellets were resuspended in Nuclear Extraction Reagent (NER) and incubated on ice for 40 min, with mixing every 10 min. These nuclear lysates were centrifuged at 16 000 x g for 10 min at 4°C, and the nuclear fractions were harvested immediately. Subcellular fractionation was evaluated by western blotting. During these extractions, the CER I: CER II: NER volume ratios were maintained at 200: 11: 100 µL.

Nuclear immunoprecipitation:

Following the extraction of nuclear fractions, nuclear immunoprecipitations were performed using NE-PER™ Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagent kits (Thermo Scientific™). Briefly, nuclear extracts were diluted with radioimmunoprecipitation assay (RIPA) buffer (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl, 1% Nonidet P-40 (NP-40), 5% sodium deoxycholate, 0.1% sodium dodecyl sulphate (SDS), 1 mM sodium orthovanadate, 1 mM NaF, 1% protease inhibitors). Antibodies for immunoprecipitation were incubated with Dynabeads™ linked to Protein G (#10003D, Invitrogen™) for 10 min at room temperature. Nuclear lysates were added, followed by incubation for 2 h at room temperature with agitation. The beads were washed three times with PBS (Gibco), and bound proteins were eluted by incubation with 2X Laemmli loading buffer (4% SDS, 10% 2-mercaptoethanol, 20% glycerol, 0.004% bromophenol blue, 0.125 M Tris-HCl) at 95°C for 10 min. SDS-PAGE and western blotting analysis were subsequently performed.

Immunoblotting:

Cells were washed with ice-cold PBS (Gibco) and lysed with cell lysis buffer (4% SDS, 10% 2-mercaptoethanol, 20% glycerol, 0.125 M Tris-HCl pH 6.8) containing 1% PIC (#7012, Cell Signaling). The cell lysates were sonicated on a Vibra-Cell Sonifier, set at 60% amplitude, three times for 5 sec each, with at least 1 min on ice between pulses. The lysates were centrifuged at 16 000 x g for 20 min at 4°C, and their protein concentrations were measured by Bradford protein assays. Aliquots containing 40 µg protein were loaded onto SDS-PAGE gels, with western blot analysis performed using specific antibodies against sortilin (#Ab16640, Abcam, France), P-EGFR (Tyr 1068, #3777, 1:1000 dilution; Cell Signaling), EGFR (#4267, 1:1000 dilution, Cell Signaling; clone H11 #MA5-13070, 1:500 dilution, Fisher Scientific, France), pERK1/2 (Thr202/Thr204, #4370, 1:1000 dilution, Cell Signaling), ERK1/2 (#9102, 1:1000 dilution, Cell Signaling), pAKT (Ser 473, #4060, 1:1000 dilution, Cell Signaling), AKT (#4691, 1:1000 dilution, Cell Signaling), lamin b1 (#HPA050524, 1:1000 dilution, Atlas Antibodies), tubulin (#sc-53646, Santa Cruz Biotechnology, Tebu, France), and actin (#A2066, 1:10000 dilution, Sigma, France), with the latter used as a loading control. The blots were subsequently incubated with horseradish peroxidase (HRP)-conjugated secondary antibodies (Dako, 1:1000 dilution, Agilent, France) and enhanced chemiluminescence substrate.

Cell culture:

The A549 and H1975 cell lines were obtained from the American Type Culture Collection (ATCC) and cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium GlutaMAX (Gibco) supplemented with 10% fetal bovine serum (IDbio, France), 1% antibiotics (Gibco), and 1% non-essential amino acids (Gibco) at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂. Where indicated, cells were stimulated with 50 ng/mL EGF for 30 min or treated with 1 μM of the TKI Osimertinib (AZD9291, Tagrisso, Cliniscience, France) for 24 h.

Mice and *in vivo* tumor growth:

Female NOD-SCID mice obtained from Janvier Labs (France) were housed in a control non-pathogen atmosphere. All experiments were performed in accordance with the French Veterinary Department. About 1.10⁶ H1975 cells overexpressing sortilin in the presence of doxycycline were engrafted onto the left thigh of each mouse. Tumor volume, calculated as $\text{length} \times \text{width} \times (\text{length} + \text{width}) / 2$, was measured twice weekly. Following tumor development, mice were or were not administered 2 mg/mL doxycycline in drinking water. The mice were sacrificed 34 days after cell engraftment, and their tumors were collected. One part of each tumor was fixed in formaldehyde and embedded in paraffin for immunohistochemistry, whereas a second part was used to assess mRNA and protein overexpression by qPCR and western blotting, respectively.

Immunofluorescence and confocal microscopy:

Cells grown on glass coverslips were washed twice in ice-cold PBS before fixation in methanol or 4% paraformaldehyde for 10 min on ice. The cells were washed with PBS containing 1% (w/v) BSA (IDbio) and incubated for 30 min with PBS containing 3% BSA. The cells were immunolabeled at 4°C overnight with primary antibody to EGFR (Cell Signaling, Ozyme, #4267) or sortilin (Abcam, #ab16640, France), each diluted 1:100 in blocking solution. The cells were subsequently washed three times with PBS containing 1% BSA, incubated with Alexa Fluor 594-conjugated anti-rabbit IgG or Alexa Fluor 488-conjugated anti-mouse IgG antibodies (1:1000; Life Technologies, France) for 2 h at room temperature, and again washed three times with PBS containing 1% BSA. The cells were mounted using Fluoroshield mounting medium (Sigma), containing 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) to stain the nuclei. Endocytic assays were performed using biotinylated EGF complexed to Alexa Fluor 647, according to the manufacturer's instructions (Life Technologies, #E35351). Fluorescent images were obtained using epifluorescence microscopes (Zeiss Axiovert), equipped with a laser-scanning confocal imaging system (Zeiss LSM 510 META or LSM800). Mander's coefficients were calculated using the Zeiss LSM 510 META or ZEN software (Zeiss) on non-saturated pictures with optical slices of 0.8 μm. At least 30 cells were acquired for each condition. Cell surface expression of EGFR and sortilin, each calculated from the difference between the whole-cell and intracellular means of fluorescence, were analyzed using ImageJ software (NIH). For PLA, the cells were fixed with 4% paraformaldehyde for 10 min, permeabilized in PBS containing 0.1% Triton X-100 (Sigma) for 30 min on ice and washed with PBS. The cells were subsequently incubated in blocking solution (2% BSA in PBS) for 30 min at 37°C in a humidified chamber, followed by incubation with primary antibodies against EGFR (mouse monoclonal, Life Technologies) and sortilin (rabbit polyclonal, Abcam), each diluted 1:100 in blocking solution, for 30 min at 37°C. The cells were washed with buffer A from the Duolink II proximity ligation assay kit (Olink Bioscience, Sigma), followed by the addition of Duolink II PLA probe anti-mouse Minus and Duolink II PLA probe anti-rabbit Plus, and

incubation for 60 min at 37°C. To link the two probes, the cells were washed in buffer A and incubated for 30 min at 37°C in Duolink II ligation buffer diluted in filtered distilled water containing ligase. Following ligation, the cells were washed in buffer A and incubated for 100 min at 37°C with the Duolink II orange amplification buffer containing polymerase. The cells were then washed three times in buffer B and mounted with in-situ mounting medium containing DAPI. Quantitative analyses of each independent sample were performed using ImageJ software (NIH, Bethesda, Maryland, USA), based on the mean fluorescence values. At least 50 cells were acquired for each condition, with the results presented as ratios relative to control cells.

Plasmids and lentivirus-mediated RNA interference:

The JetPei transfection reagent (Polyplus Transfection, Ozyme, France) was utilized for both transient and stable transfection of cells. Inducible sortilin overexpressing cell lines were generated by lentivirus-mediated RNA interference. Briefly, H1975 cells were infected twice, once with lentivirus containing DNA encoding a Tet-On system and then with lentivirus encoding sortilin overexpression. About 5×10^5 cells were infected in complete medium containing 8 µg/mL polybrene (Sigma) and concentrated lentivirus (five lentiviral particles/cell) for 48 h, followed by selection with blasticidine (1 µg/mL, Sigma). The cells were subsequently re-infected with the second type of lentivirus before selection with puromycin (1 µg/mL, Sigma).

Total RNA extraction and quantitative (q-)PCR analysis :

Total RNA was extracted from 50 mg tissue or about 1.10^6 cells using QIAzol Lysis Reagent (#79306, QIAGEN, France). Briefly, tissues or cells were lysed in QIAzol reagent before the addition of chloroform and centrifugation. The aqueous phase of each sample was decanted, followed by precipitation with isopropanol at -80°C for 1 h and centrifugation at 16 000 x g for 10 min at 4°C. The RNA pellets were washed with 75% ethanol, again centrifuged at 16 000 x g for 10 min at 4°C and resuspended in water. Aliquots containing 2 µg total RNA were reverse transcribed to cDNA using Superscript III (Invitrogen), according to the manufacturer's protocol. Each qPCR reaction contained 50 ng cDNA, TaqMan probes specific to each mRNA (Table), and Premix Ex Taq (#RR39WR, TaKaRa, France), with amplifications performed on a QuantStudio 3 real-time thermal cycler (Applied Biosystems, France). The results of RT-qPCR for each gene were normalized to those of ACTB mRNA expression in the same samples using the $\Delta\Delta C_t$ method. ChIP-qPCR probes were designed to be complementary to the genomic DNA promoter sequence of each targeted gene and were synthesized by the custom TaqMan service from ThermoFisher Scientific.

Table: Probes synthesized for RT-qPCR

Targeted gene	TaqMan™ probes references
ACTB	Hs01060665_g1
CCND1	Hs00765553_m1
DHODH	Hs00361406_m1
DUSP12	Hs00170898_m1
EGFR	Hs01076090_m1
MYC	Hs00153408_m1
SNAPC1	Hs00608182_m1
SORT1	Hs00361760_m1
STX6	Hs01057343_m1

Statistical analysis

Relative fluorescence intensities and the results of western blotting and ChIP experiments were compared with controls using PAST software (version 2.17). Data shown are representative of at least three independent experiments. Error bars represent the standard error of the mean. Results were analyzed for statistical significance by ANOVA, with $p \leq 0.05$ considered statistically significant. Correlations between levels of *cMYC* and *SORT1* mRNAs in the TCGA and CCLE databases were evaluated by linear regression analysis using R software (version 3.6.1).

Acknowledgements

This study was generously supported by Chaire de Pneumologie Expérimentale from Association Limousine d'Aide aux Insuffisants Respiratoires-Assistance Ventilatoire à Domicile (ALAIR-AVD; Limoges, France), the Foundation of the University of Limoges, the Comité d'Orientation de la Recherche sur le Cancer en Limousin, and the Ligue Contre le Cancer. E.L. was supported by a doctoral fellowship from the Association du Développement Education Recherche-Limousin Poitou-Charentes (ADER-LPC). The authors thank all their colleagues who contributed their time and materials to this study and thank Nicolas Vedrenne for his assistance with experiments on mice and human tissue samples. The authors are especially grateful to Alain Chaunavel from the "Centre de Ressources Biologiques Biolim," Department of Pathology, University Hospital Limoges, and Claire Carrion from the Imaging Cytometry Platform of the University of Limoges, for technical support.

Competing interests

The authors declare no competing interests.

Author contributions

L.E. and G.C. performed the experiments and analyzed the data. T.J. and C.A. participated in the collection of patient samples and clinical data. G.F., J. M-O., B.F., M.B., V.F., N.T. and L.F. participated in the study design. G.F., J.M-O., F.V., N.T. and L.F. coordinated the study. All authors have read and approved the final manuscript.

Data availability

All relevant data are available from the corresponding authors on request.

References

1. Herbst, R. S., Heymach, J. V. & Lippman, S. M. Lung cancer. *N. Engl. J. Med.* **359**, 1367–1380 (2008).
2. Sharma, S. V., Bell, D. W., Settleman, J. & Haber, D. A. Epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer. *Nat. Rev. Cancer* **7**, 169 (2007).
3. Di Fiore, P. P. *et al.* Overexpression of the human EGF receptor confers an EGF-dependent transformed phenotype to NIH 3T3 cells. *Cell* **51**, 1063–1070 (1987).
4. McDermott, U. *et al.* Identification of genotype-correlated sensitivity to selective kinase inhibitors by using high-throughput tumor cell line profiling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**, 19936–19941 (2007).
5. Rosell, R. *et al.* Erlotinib versus standard chemotherapy as first-line treatment for European patients with advanced EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer (EURTAC): a multicentre, open-label, randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol.* **13**, 239–246 (2012).
6. Pi, C. *et al.* EGFR mutations in early-stage and advanced-stage lung adenocarcinoma: Analysis based on large-scale data from China. *Thorac. Cancer* **9**, 814–819 (2018).
7. Chong, C. R. & Jänne, P. A. The quest to overcome resistance to EGFR-targeted therapies in cancer. *Nat. Med.* **19**, 1389–1400 (2013).
8. Liccardi, G., Hartley, J. A. & Hochhauser, D. EGFR nuclear translocation modulates DNA repair following cisplatin and ionizing radiation treatment. *Cancer Res.* **71**, 1103–1114 (2011).
9. Li, C., Iida, M., Dunn, E. F., Ghia, A. J. & Wheeler, D. L. Nuclear EGFR contributes to acquired resistance to cetuximab. *Oncogene* **28**, 3801–3813 (2009).
10. Hsu, S.-C. & Hung, M.-C. Characterization of a novel tripartite nuclear localization sequence in the EGFR family. *J. Biol. Chem.* **282**, 10432–10440 (2007).
11. Poli, V. *et al.* MYC-driven epigenetic reprogramming favors the onset of tumorigenesis by inducing a stem cell-like state. *Nat. Commun.* **9**, 1024 (2018).
12. Strippoli, A. *et al.* c-MYC Expression Is a Possible Keystone in the Colorectal Cancer Resistance to EGFR Inhibitors. *Cancers* **12**, (2020).
13. Blakely, C. M. *et al.* Evolution and clinical impact of co-occurring genetic alterations in advanced-stage EGFR-mutant lung cancers. *Nat. Genet.* **49**, 1693–1704 (2017).
14. Santoni-Rugiu, E. *et al.* Intrinsic resistance to EGFR-Tyrosine Kinase Inhibitors in EGFR-Mutant Non-Small Cell Lung Cancer: Differences and Similarities with Acquired Resistance. *Cancers* **11**, (2019).
15. Al-Akhrass, H. *et al.* Sortilin limits EGFR signaling by promoting its internalization in lung cancer. *Nat. Commun.* **8**, 1182 (2017).
16. Wilson, C. M. *et al.* Sortilin mediates the release and transfer of exosomes in concert with two tyrosine kinase receptors. *J. Cell Sci.* **127**, 3983–3997 (2014).
17. Faraco, C. C. F. *et al.* Translocation of Epidermal Growth Factor (EGF) to the nucleus has distinct kinetics between adipose tissue-derived mesenchymal stem cells and a mesenchymal cancer cell lineage. *J. Struct. Biol.* **202**, 61–69 (2018).

18. Lin, S. Y. *et al.* Nuclear localization of EGF receptor and its potential new role as a transcription factor. *Nat. Cell Biol.* **3**, 802–808 (2001).
19. Brand, T. M., Iida, M., Li, C. & Wheeler, D. L. The Nuclear Epidermal Growth Factor Receptor Signaling Network and its Role in Cancer. *Discov. Med.* **12**, 419–432 (2011).
20. Tomas, A., Futter, C. E. & Eden, E. R. EGF receptor trafficking: consequences for signaling and cancer. *Trends Cell Biol.* **24**, 26–34 (2014).
21. Chung, B. M. *et al.* Aberrant trafficking of NSCLC-associated EGFR mutants through the endocytic recycling pathway promotes interaction with Src. *BMC Cell Biol.* **10**, 84 (2009).
22. Huang, W.-C. *et al.* Nuclear translocation of epidermal growth factor receptor by Akt-dependent phosphorylation enhances breast cancer-resistant protein expression in gefitinib-resistant cells. *J. Biol. Chem.* **286**, 20558–20568 (2011).
23. Ramalingam, S. S. *et al.* Overall Survival with Osimertinib in Untreated, EGFR-Mutated Advanced NSCLC. *N. Engl. J. Med.* **382**, 41–50 (2020).
24. Kawamata, H., Kameyama, S. & Oyasu, R. In vitro and in vivo acceleration of the neoplastic phenotype of a low-tumorigenicity rat bladder carcinoma cell line by transfected transforming growth factor- α . *Mol. Carcinog.* **9**, 210–219 (1994).
25. Ohsaki, Y. *et al.* Epidermal growth factor receptor expression correlates with poor prognosis in non-small cell lung cancer patients with p53 overexpression. *Oncol. Rep.* **7**, 603–607 (2000).
26. Bethune, G., Bethune, D., Ridgway, N. & Xu, Z. Epidermal growth factor receptor (EGFR) in lung cancer: an overview and update. *J. Thorac. Dis.* **2**, 48–51 (2010).
27. Nicholson, R. I., Gee, J. M. & Harper, M. E. EGFR and cancer prognosis. *Eur. J. Cancer Oxf. Engl.* **1990** **37 Suppl 4**, S9-15 (2001).
28. Hou, J. *et al.* Gene expression-based classification of non-small cell lung carcinomas and survival prediction. *PLoS One* **5**, e10312 (2010).
29. Selamat, S. A. *et al.* Genome-scale analysis of DNA methylation in lung adenocarcinoma and integration with mRNA expression. *Genome Res.* **22**, 1197–1211 (2012).
30. Gao, J. *et al.* Integrative analysis of complex cancer genomics and clinical profiles using the cBioPortal. *Sci. Signal.* **6**, p11 (2013).
31. Cerami, E. *et al.* The cBio cancer genomics portal: an open platform for exploring multidimensional cancer genomics data. *Cancer Discov.* **2**, 401–404 (2012).
32. Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive molecular profiling of lung adenocarcinoma. *Nature* **511**, 543–550 (2014).
33. Barretina, J. *et al.* The Cancer Cell Line Encyclopedia enables predictive modelling of anticancer drug sensitivity. *Nature* **483**, 603–607 (2012).
34. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. The hallmarks of cancer. *Cell* **100**, 57–70 (2000).
35. Amit, I. *et al.* A module of negative feedback regulators defines growth factor signaling. *Nat. Genet.* **39**, 503–512 (2007).

36. Mikula, M. *et al.* Genome-wide co-localization of active EGFR and downstream ERK pathway kinases mirrors mitogen-inducible RNA polymerase 2 genomic occupancy. *Nucleic Acids Res.* **44**, 10150–10164 (2016).
37. Brand, T. M., Iida, M., Li, C. & Wheeler, D. L. The nuclear epidermal growth factor receptor signaling network and its role in cancer. *Discov. Med.* **12**, 419–432 (2011).
38. Yu, Y.-L. *et al.* Nuclear EGFR suppresses ribonuclease activity of polynucleotide phosphorylase through DNAPK-mediated phosphorylation at serine 776. *J. Biol. Chem.* **287**, 31015–31026 (2012).

Supplementary Figures

Sortilin exhibits tumor suppressor-like activity by limiting EGFR transducing function

Lapeyronnie E.^{*,1}, Granet C.^{*,1}, Tricard J.^{*,1,3}, Gallet F.¹, Yassine M.¹, Chermat A.^{1,3}, Jauberteau MO¹, Bertin F.^{1,3}, Melloni B.^{1,2}, Vincent F.^{1,2,#}, Naves T.^{1,§,#} and Lalloué F.^{1,§,#}

¹EA3842 CAPTuR, Contrôle de l'Activation cellulaire, Progression Tumorale et Résistance thérapeutique and Chaire de Pneumologie Expérimentale, Université de Limoges, Faculté de Médecine, 2 Rue du Dr. Raymond Marcland, 87025 Limoges CEDEX-France.

²Service de Pathologie Respiratoire, Centre Hospitalier et Universitaire de Limoges, 87042 Limoges CEDEX-France.

³Service de Chirurgie Thoracique et Cardio-vasculaire, Centre Hospitalier et Universitaire de Limoges, 87042 Limoges CEDEX-France.

*These authors contributed equally to this work.

§Equal contribution.

corresponding authors

Please address correspondence to:

Thomas Naves

Chaire de Pneumologie Expérimentale

EA3842 CAPTuR, Contrôle de l'Activation cellulaire, Progression Tumorale et Résistance thérapeutique

Faculté de Médecine

2, Rue du Docteur Marcland

87025, Limoges CEDEX

FRANCE

Tel: +33 5 55 45 59 70

Mail: thomas.naves@unilim.fr

Fabrice Lalloué

EA3842 CAPTuR, Contrôle de l'Activation cellulaire, Progression Tumorale et Résistance thérapeutique

Faculté de Médecine

2, Rue du Docteur Marcland

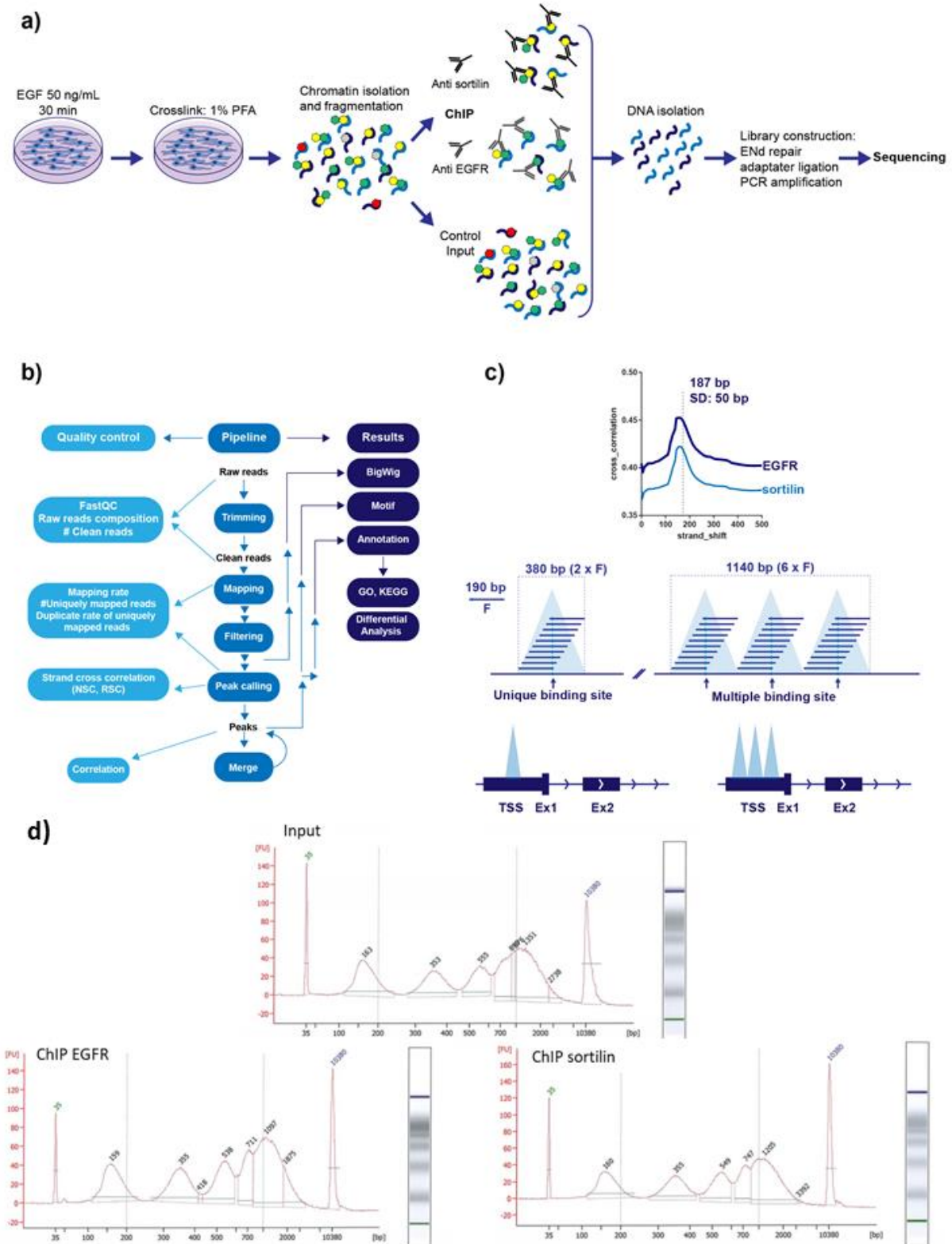
87025, Limoges CEDEX

FRANCE

Tel: +33 5 55 45 59 29

Mail: fabrice.lalloue@unilim.fr

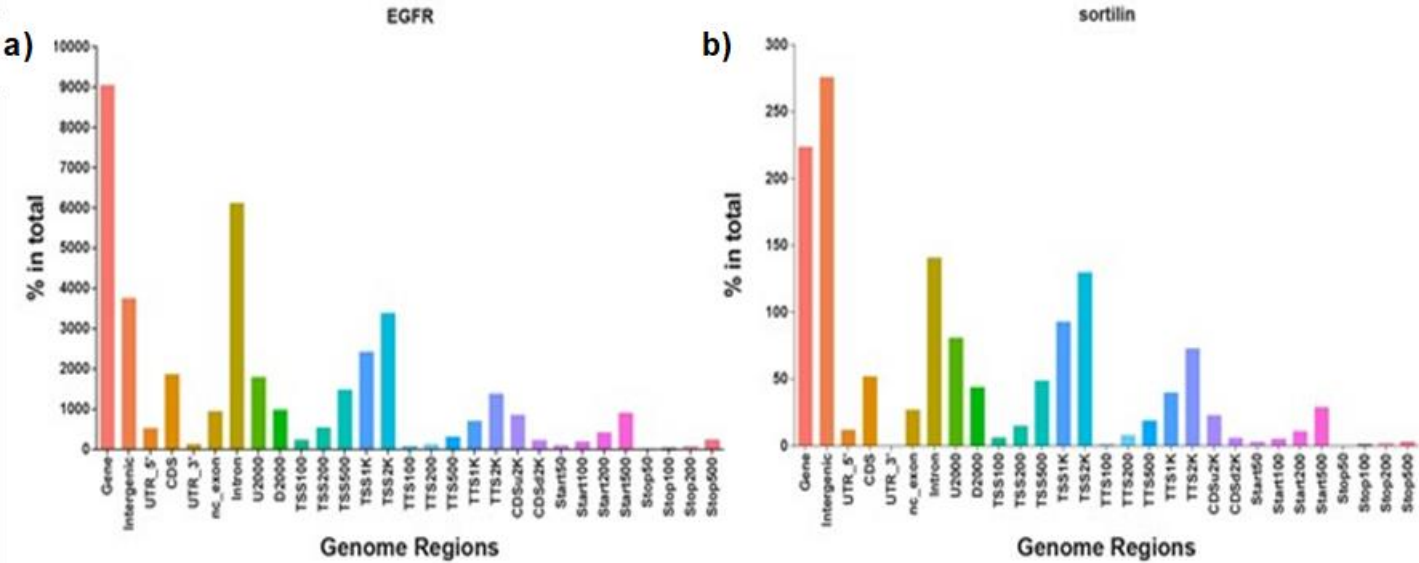
Supplementary_Materials_1_Lapeyronnie et al.



Supplementary material 1: ChIP workflow and bioinformatic pipeline analysis. **(a)** Schematic showing the ChIP protocol from cells to DNA before sequencing. **(b)** Pipeline of bioinformatic analysis. Chromatin immunoprecipitation sequencing (IP-seq) allows identification of the genome regions that interact efficiently with transcription factors and chromatin-associated proteins. Mapping the sequencing results onto the genome can provide genome-wide

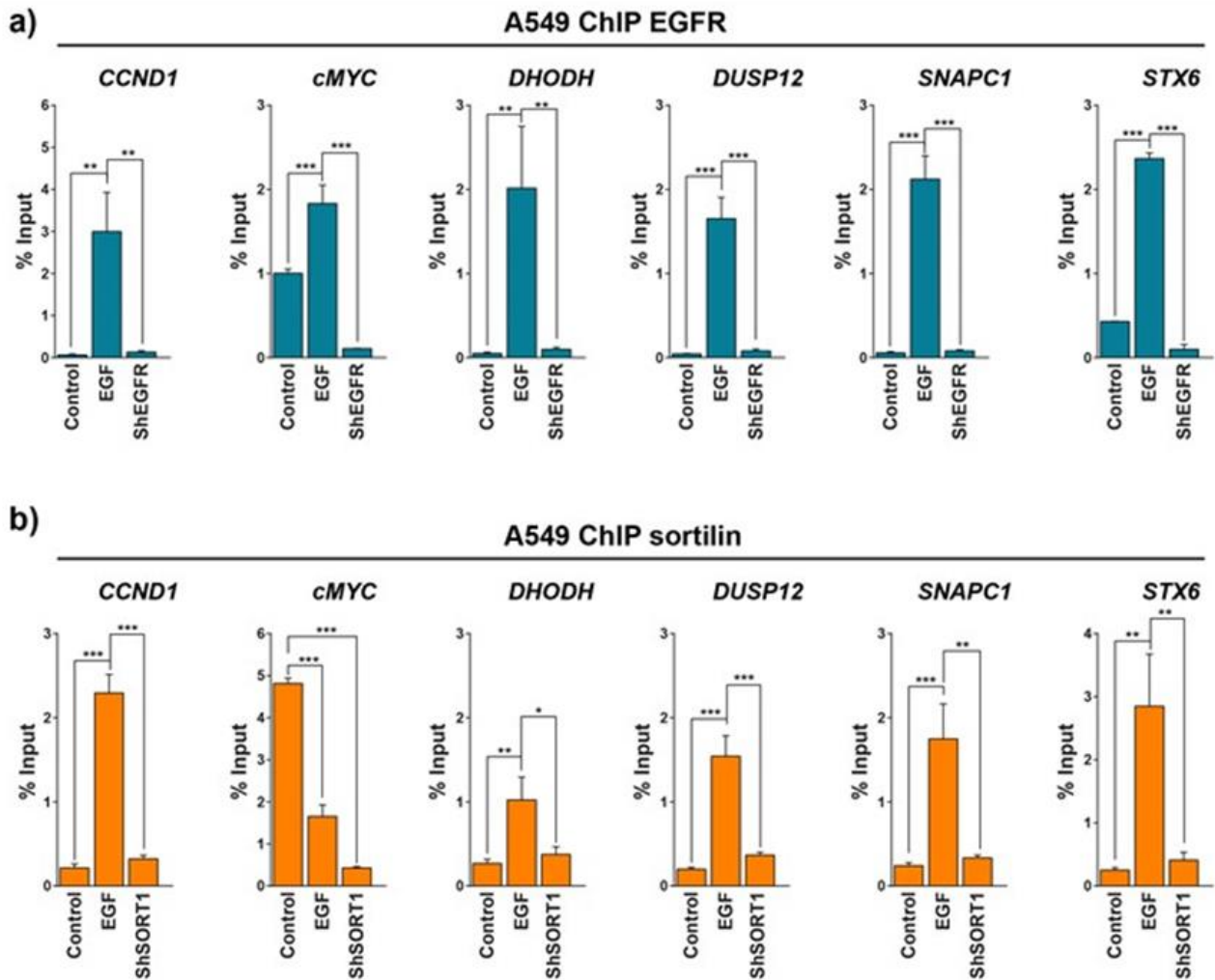
information about the DNA regions interacting with histones and transcription factors. **(c)** Determination of unique or multiple DNA binding sites on targeted promoter genes. **(d)** Chromatin digestion by micrococcal nuclease after CHIP with an Agilent bioanalyzer to verify the presence of mono-nucleosomes in different sample (Input, CHIP EGFR, and CHIP sortilin).

Supplementary_Figure_1_Lapeyronnie et al.



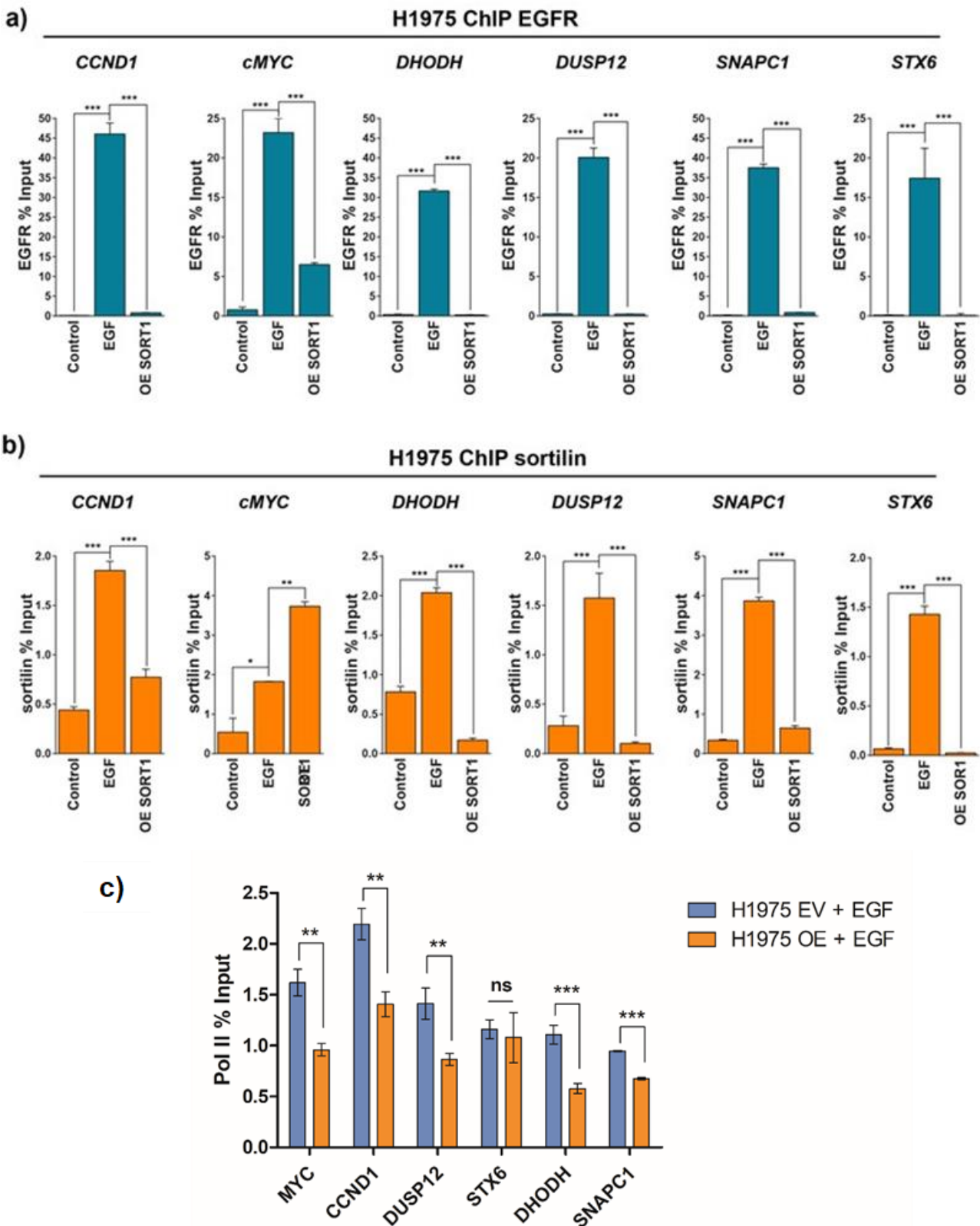
Supplementary Figure 1: Pathways and genome regions targeted by EGFR and sortilin. (a-b) Representations of genome regions targeted by (a) EGFR and (b) sortilin. Distribution of peaks in different functional areas. The horizontal axis represents different functional areas, and the vertical axis represents the ratio of the peak in the functional region to the total peaks. The number at the top of each functional region represents the peak number. U2000 and D2000 indicate 2000 bp in the upstream and downstream regions, respectively; CDSu2K and CDSd2K indicate 2 kb upstream and downstream of the CDS, respectively; and TSS100, TTS100, Start100, and Stop100 indicate the 100 bp regions centered on the TSS, TTS, Start-codon, and Stop-codon, respectively.

Supplementary_Figure_2_Lapeyronnie et al.



Supplementary Figure 2: EGF-associated increases in sortilin binding to DNA in A549 cells. EGFR or sortilin was immunoprecipitated, and qPCR targeting *CCND1*, *cMYC*, *DHODH*, *DUSP12*, *SNAC1*, and *STX6* sequences was performed. **(a)** ChIP-qPCR assays of A549 cells in the absence of EGF (control) or in the presence of 50 ng/mL EGF (EGF) and of shEGFR cells (ShEGFR) in the presence of 50 ng/mL EGF. qPCR results were normalized relative to non-relevant antibodies and input. **(b)** ChIP-qPCR assays after sortilin ChIP of A549 cells without EGF (control) or in the presence of 50 ng/mL EGF (EGF), and of ShSORT1 cells (ShSORT1) in the presence of 50 ng/mL EGF. All values represent means \pm SD; * p <0.05, ** p <0.01, and *** p <0.001.

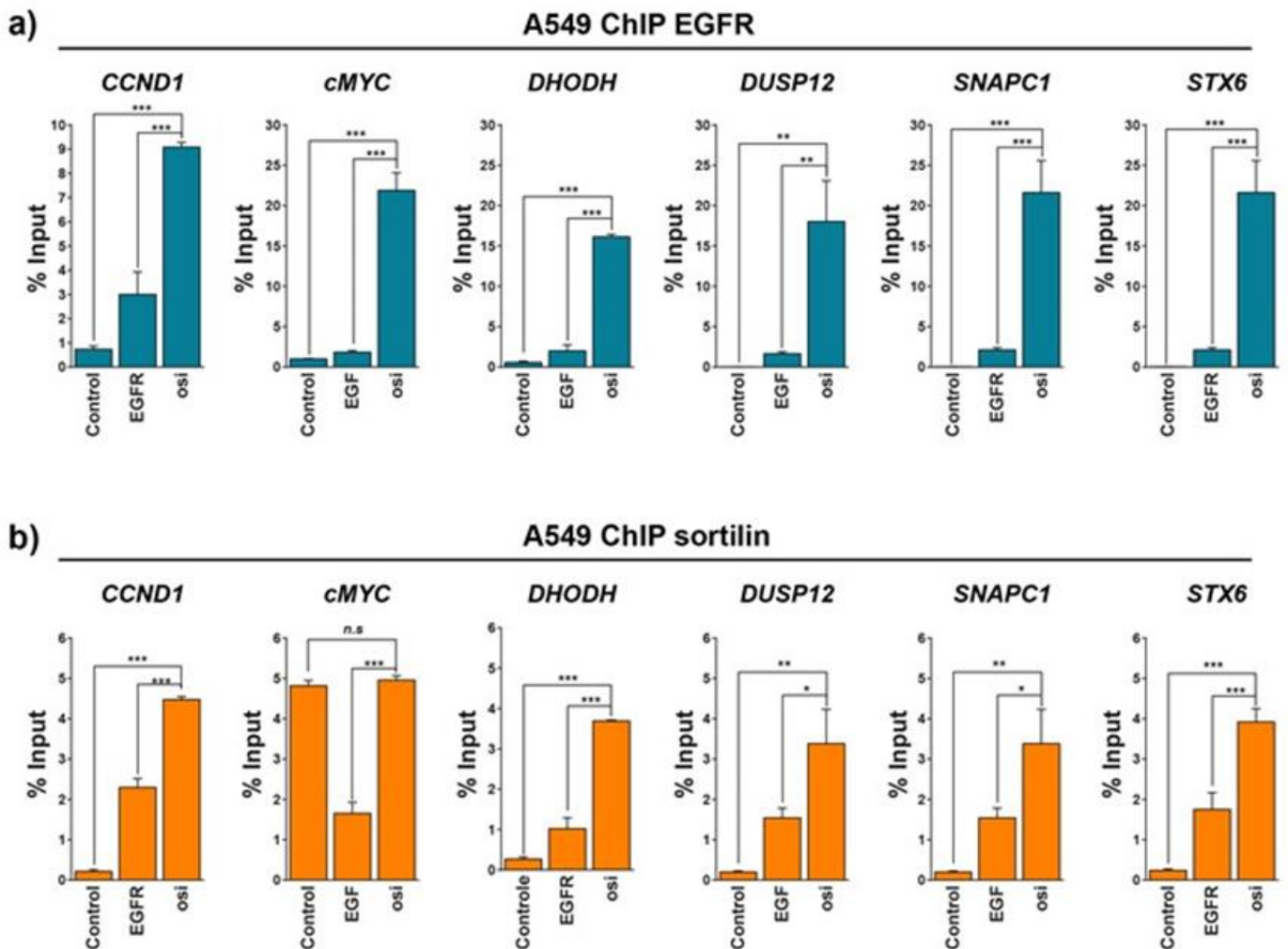
Supplementary_Figure_3_Lapeyronnie et al.



Supplementary Figure 3: Increase of sortilin binding to DNA in the presence of EGF in H1975 cells and sortilin limits Pol II binding. qPCR targeting *CCND1*, *cMYC*, *DHODH*,

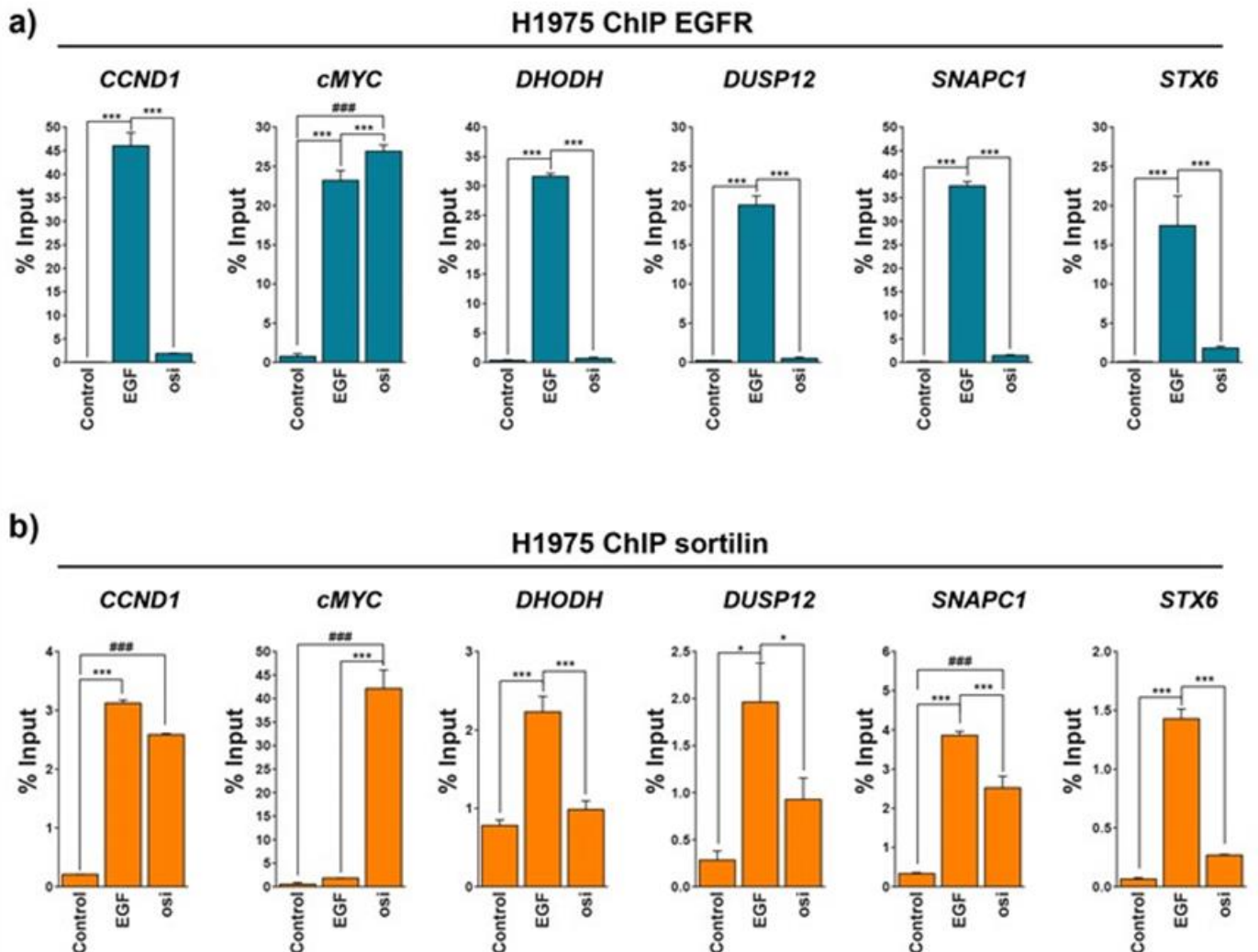
DUSP12, *SNPAC1*, and *STX6* sequences was performed after **(a)** EGFR or **(b)** sortilin ChIP. **(a-b)** ChIP-qPCR assays of H1975 cells in the absence (control) or presence of 50 ng/mL EGF (EGF) or *SORT1* overexpressing cells (OE *SORT1*) in the presence of 50 ng/mL EGF. qPCR results were normalized relative to non-relevant antibodies and input. **(c)** RNA POLII ChIP assays of H1975 cells expressing empty vector (EV) and overexpressing *SORT1* (OE). All values represent means \pm SD; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.001$.

Supplementary_Figure_4_Lapeyronnie et al.



Supplementary Figure 4: Osimertinib increases EGFR and sortilin binding to DNA in A549 cells. qPCR amplifications targeting *CCND1*, *cMYC*, *DHODH*, *DUSP12*, *SNAPC1*, and *STX6* sequences performed after (a) EGFR or (b) sortilin ChIP. (a-b) ChIP-qPCR assays of A549 cells in the absence (control) or presence (EGF) of 50 ng/mL EGF or in the presence of 1 μ M Osimertinib (osi). qPCR results were normalized relative to non-relevant antibodies and input. All values represent means \pm SD; * p <0.05, ** p <0.01, and *** p <0.001.

Supplementary_Figure_5_Lapeyronnie et al.



Supplementary Figure 5: Osimertinib increases EGFR and sortilin binding to DNA in H1975 cells. qPCRs amplifications targeting *CCND1*, *cMYC*, *DHODH*, *DUSP12*, *SNAPC1*, and *STX6* sequences after (a) EGFR or (b) sortilin ChIP. (a-b) ChIP-qPCR assays of H1975 cells in the absence (control) or presence (EGF) of 50 ng/mL EGF, or in the presence of 1 μ M osimertinib (osi). qPCR results were normalized relative to non-relevant antibodies and input. All values represent means \pm SD; * p <0.05, ** p <0.01, and *** p <0.001.

Supplementary Table 1. Gene ontology (GO) analysis of loci shared by EGFR and sortilin pathway components

GO	Description	Term Type	EGFR <i>p</i>-value	sortilin <i>p</i>-value
GO:0007156	Homophilic cell adhesion via plasma membrane adhesion molecule	Biological process	2.21 10 ⁻¹¹	0.03
GO:0098742	Cell-cell adhesion via plasma membrane adhesion molecules	Biological process	3.67 10 ⁻¹¹	0.04
GO:0098609	Cell-cell adhesion	Biological process	6.70 10 ⁻¹¹	0.04
GO:0043169	Cation binding	Molecular function	2.36 10 ⁻⁸	0.03
GO:0046872	Metal ion binding	Molecular function	2.87 10 ⁻⁸	0.04
GO:0016020	Membrane	Cellular component	1 10 ⁻⁴	0.04
GO:0038023	Signaling receptor activity	Molecular function	4 10 ⁻³	0.04
GO:0004888	Transmembrane signaling	Molecular function	5 10 ⁻³	0.02
GO:0016021	Integral component of membrane receptor activity	Cellular component	9 10 ⁻³	0.04
GO:0043565	Sequence-specific DNA binding	Molecular function	0.017	0.01

Partie VII. Discussion

Le cancer bronchique demeure le cancer ayant la plus forte mortalité en raison notamment de difficultés de détection et de traitement. En effet, le cancer bronchique a pour caractéristique d'être une pathologie dont le diagnostic initial reste toujours très complexe à établir, sa découverte chez le patient se fait souvent de manière fortuite. La plupart du temps, le diagnostic est tardif, diminuant les chances de survie du patient. De plus, la principale thérapie menant à la guérison réside dans la résection chirurgicale couplé ou non à de la chimiothérapie chez les patients diagnostiqués à des stades précoces. Dans le cas de diagnostics tardifs et non opérables les patients entrent dans des protocoles cliniques basés sur des traitements systémiques. Ces traitements sont, maintenant, adaptés aux altérations génétiques rencontrées chez les patients. Parmi les gènes retrouvés mutés, l'*EGFR*, de la même manière que d'autres membres de la superfamille des RTKs, sont fortement impliqués dans l'initiation et la progression de nombreux cancers dont le cancer bronchique. Ce récepteur transmembranaire est, en effet, observé dans plus de 15% des cas de CBNPC. Bien que les thérapies ciblées évoluent au fil des années, les cellules cancéreuses et les mécanismes de résistances secondaires parviennent à contourner les stratégies thérapeutiques mises en jeu. Il semble donc primordial de s'intéresser à des mécanismes régulant son expression et/ou les actions en aval de l'*EGFR*. Les précédents travaux réalisés au sein de notre équipe avait permis de montrer l'implication d'une protéine de tri, la sortiline, dans la régulation spatio-temporelle de l'*EGFR* (Al-Akhrass *et al.*, 2017). Ces travaux ont permis de mettre en évidence le rôle de régulateur négatif de la sortiline sur le potentiel oncogénique de l'*EGFR* en limitant sa localisation membranaire. Ces résultats ont également ouvert la voie à une nouvelle fonction de la sortiline et de l'*EGFR* dans la cellule et plus précisément dans le noyau.

La sortiline : un régulateur de l'*EGFR* nucléaire

Les résultats de notre étude sont les premiers à démontrer une localisation commune de l'*EGFR* et de la sortiline sous la forme de complexe dans les noyaux des cellules. Ces résultats ont été le point de départ de nos investigations concernant le rôle et les fonctions nucléaires de ces derniers. Bien que l'*EGFR* ait déjà été observé dans ce compartiment, aucune donnée ne permettait de relier le rôle des complexes préalablement observé au niveau cytoplasmique à des fonctions nucléaires. De manière surprenante, nous observons que l'activation de l'*EGFR* par son ligand EGF jouait sur la quantité de complexes formés ainsi que sur leur localisation. En effet, l'ajout d'EGF permet de stimuler la formation des complexes et stimule l'adressage nucléaire de ces derniers.

Le transfert de l'*EGFR* au niveau nucléaire est un phénomène déjà connu, néanmoins, aucun élément incluant la sortiline n'a pour l'instant été identifié dans ce mécanisme. Le transport de l'*EGFR* à la suite de son activation par l'EGF se fait par interaction de l'*EGFR* par le biais de sa séquence de localisation nucléaire (NLS) avec l'importine $\beta 1$ qui conduit alors la protéine jusqu'à l'appareil de Golgi où il est pris en charge par la syntaxine 6. Les vésicules Golgiennes peuvent ensuite parvenir au niveau du noyau où le complexe *EGFR* / importine

peut être transloqué au travers des pores nucléaires (Lo *et al.*, 2006 ; Du *et al.*, 2014 ; Wang *et al.*, 2010a ; Wang *et al.*, 2010b ; Wang *et al.*, 2010c). La sortiline est une protéine de tri majoritairement présente dans l'appareil de Golgi, cette localisation pourrait participer au transport rétrograde de l'EGFR. Etant donné que la quantité de sortiline nucléaire se trouve diminuée en présence de siEGFR, nous pouvons également supposer que le NLS présent sur l'EGFR permettrait l'entrée de la sortiline, qui est dépourvue de NLS, dans le noyau. La fonction exacte de la sortiline et son rôle au sein du complexe lors de la translocation nucléaire de l'EGFR reste encore incertains étant donné que dans les lignées possédant un EGFR muté où la sortiline n'est quasiment pas exprimée, l'EGFR rentre dans le noyau. Ce mécanisme étant complexe, il serait nécessaire de déterminer l'ensemble des acteurs participant à l'internalisation de l'EGFR et de la sortiline, et leurs fonctions respectives dans de futures expériences.

Sortiline / EGFR : un complexe nucléaire multifonction ?

L'EGFR, dans sa fonction nucléaire, est connu comme participant à la réparation, à la décondensation de la chromatine et à la régulation de l'expression génique par le biais de différentes protéines. En effet, l'EGFR peut agir sur la réparation de la chromatine par le biais de PCNA ou encore de la DNA-PK, il agit aussi sur la décondensation de celle-ci notamment au niveau des histones H3 qui permettent de relâcher ou de condenser la chromatine afin de permettre ou non l'accès de la machinerie de transcription à cette dernière. La fonction nucléaire de l'EGFR qui nous a le plus intéressé au cours de cette thèse est le rôle de régulateur de l'expression génique passant principalement par le recrutement de facteurs de transcription tels que STAT3/STAT5 ou encore RHA. De cette manière, ce RTK peut promouvoir l'expression de certains gènes comme *CCND1*, *cMYC*, *ABCG2*, *b-MYB*, *iNOS* (Brand *et al.*, 2011). L'étude que nous avons réalisée par ChIP-seq nous a permis de confirmer la fixation de l'EGFR sur la chromatine au niveau de séquence ATRS comme précédemment décrit dans la littérature (Brand *et al.*, 2011). De la même façon, l'immunoprécipitation de la chromatine en lien avec la sortiline a permis d'obtenir des séquences similaires à celles obtenues pour l'EGFR, c'est à dire des séquences de type ATRS. L'EGFR et la sortiline ne présentant pas de domaine de liaison à l'ADN, ces deux protéines ont pour obligation de se lier à la chromatine par le biais de partenaires protéiques. Les résultats obtenus par immunoprécipitation de la chromatine ont permis de nous indiquer la localisation de l'EGFR et de la sortiline sur la chromatine, nous avons alors pu observer une fixation préférentielle de ces deux protéines sur des séquences positionnées à proximité immédiate du site de début de transcription (TSS). Plusieurs hypothèses découlent de ces observations : (i) l'EGFR et la sortiline se fixent sur des sites très proches voire identiques, ces deux protéines se fixent ensemble sur la chromatine. Néanmoins, l'immunoprécipitation de la chromatine liée à l'EGFR a mis en évidence des cibles lui étant uniques suggérant une fonction de l'EGFR indépendante de la sortiline. La zone d'interaction préférentielle de l'EGFR et de la sortiline, à proximité des sites d'initiation de la transcription (TSS), suggère que ces 2 protéines ont un impact important sur la régulation de la transcription, de manière à l'activer ou à la réprimer. Les résultats obtenus par ChIP-seq ouvrent des perspectives très larges. En effet, l'utilisation de cette technique a révélé de nombreuses cibles initialement inconnues pour l'EGFR. Concernant la sortiline, nous avons pu déterminer que cette protéine se fixait sur la chromatine, sur des cibles

communes à l'EGFR mais aussi sur des cibles lui étant exclusives. Il serait à présent intéressant de déterminer si la sortiline fixe la chromatine en partenariat avec l'EGFR ou avec d'autres protéines nucléaires. En effet, nous pourrions vérifier si la sortiline peut interagir avec les partenaires de l'EGFR comme les facteurs de transcription STAT3 et STAT5. La compréhension des mécanismes d'action nucléaires de ces 2 protéines passerait également par l'étude de l'impact de l'EGFR et de la sortiline sur les cibles identifiées. Cela nous permettrait de préciser le caractère répresseur ou activateur de la transcription de chacune de ces protéines. Enfin, il serait également judicieux de déterminer le rôle et l'implication des nouvelles cibles de l'EGFR et de la sortiline dans le cancer.

Nouvelles cibles transcriptomiques : un choix difficile

Les analyses réalisées par ChIP ont permis d'identifier de nombreuses cibles chromatinienne, 923 pour l'EGFR et 27 pour la sortiline. Comme cela a déjà été mentionné, nous avons pu retrouver 3 types de cibles distinctes : (i) des cibles déjà publiées pour l'EGFR, des cibles uniques à la sortiline et communes aux deux protéines. Pour pouvoir déterminer le rôle de la sortiline au niveau de la chromatine, nous avons fait le choix d'étudier des cibles communes à l'EGFR dont le rôle dans le cancer été déjà connu comme *CCND1* ou *cMYC* (Poli *et al.*, 2018 ; Strippoli *et al.*, 2020). En effet, la *CCND1* constitue un initiateur oncogénique puissant dans le cancer bronchique (Gautschi *et al.*, 2007). Sa dérégulation conduit à une progression anarchique des dans le cycle cellulaire provoquant la prolifération, la migration et l'angiogenèse. De plus, cette cycline a été démontrée comme contribuant au phénomène d'immunosuppression et associée à un mauvais pronostic dans les tumeurs solides (Chen *et al.*, 2020). *cMYC* est reconnu comme étant un puissant oncogène conduisant à la reprogrammation épigénétique des cellules tumorales, ayant pour conséquence d'induire la formation de métastases et le développement tumoral (Poli *et al.*, 2018). Il est directement impliqué dans la résistance aux inhibiteurs de l'EGFR dans le cancer colorectal (Strippoli *et al.*, 2020). Au niveau du cancer bronchique, *cMYC* agit sur la formation de métastases et sur l'établissement du caractère malin des tissus tumoraux (Rapp *et al.*, 2009 ; Chanvorachote *et al.*, 2020). Dans ce cancer, il a été mis en évidence qu'une forte corrélation entre le niveau d'expression de *cMYC* et de *PD-L1* était prédictive de la réponse aux thérapies (Kim *et al.*, 2017). L'ensemble de ces données nous a conduits à sélectionner *cMYC* et *CCND1* afin de déterminer l'impact de la sortiline sur ces gènes. Par la suite il semblerait important de s'intéresser aux autres cibles, à leurs fonctions et à leur régulation par la sortiline et l'EGFR. Parmi ces nouvelles cibles, le gène codant la syntaxine 6 serait une piste de recherche importante dans l'étude de la régulation du transport nucléaire de l'EGFR. En effet, la syntaxine 6 participe activement au transport de l'EGFR dans le noyau. L'EGFR et la sortiline pourraient jouer un rôle important dans sa régulation de façon à favoriser ou à limiter son expression et son action dans le trafic de ce dernier. Certaines des cibles découvertes en ChIP-seq ne sont pas affiliées au cancer mais à des maladies métaboliques ou neurodégénératives. De ce fait, l'étude de celles-ci paraît très importante dans différents axes de recherche. La sortiline est, en effet, fortement impliquée dans certaines maladies cardiovasculaires et métaboliques comme le diabète de type II, l'hypercholestérolémie, l'athérosclérose, la calcification vasculaire ou encore dans des maladies neurodégénératives comme la maladie d'Alzheimer (Goettsch *et al.*, 2017 ; Xu *et al.*, 2018). Les publications portant sur le rôle de la sortiline dans ces

pathologies montrent les effets de la sortiline au niveau cytoplasmique et au travers de sa fonction de protéine de tri intracellulaire. Aucune donnée ne fait part du potentiel rôle nucléaire de la sortiline ni des facteurs influençant son transport à ce niveau

L'Osimertinib : promoteur du transport nucléaire

Les thérapies ciblées font partie intégrante de l'arsenal thérapeutique mis en jeu dans la lutte contre le cancer bronchique. De précédentes études menées sur les résistances aux thérapies ciblées ont permis de mettre en évidence la relocalisation cytoplasmique, périnucléaire et nucléaire de l'EGFR, limitant l'effet des agents thérapeutiques (Li *et al.*, 2009). Notre étude nous a mené à analyser l'effet de la dernière génération d'ITK (osimertinib) sur la localisation de l'EGFR. Nous avons pu mettre en évidence l'impact du traitement à l'osimertinib sur la relocalisation cellulaire de l'EGFR et les conséquences indirectes au niveau transcriptionnel. En effet, lors du traitement des cellules à l'osimertinib, nous avons pu constater une augmentation de la quantité d'EGFR au niveau cytoplasmique, périnucléaire et nucléaire. Des études portant sur la résistance au cetuximab ont déjà démontré que cette thérapie induisait une localisation nucléaire de l'EGFR le rendant inaccessible à l'anticorps. Cette translocation nucléaire à la suite du traitement par le cetuximab s'accompagne d'une tumorigénicité accrue en raison de l'activation de la transcription de gènes tels que *B-Myb* ou *iNOS* par l'EGFR (Lida *et al.*, 2013). Des effets similaires sur la localisation nucléaire de l'EGFR ont également été constatés lors de l'apparition de résistance au gefitinib (Nishimura *et al.*, 2008 ; Kwak *et al.*, 2005). L'utilisation de la ChIP-qPCR nous a également permis de tester l'effet du traitement sur deux des cibles communes à l'EGFR et à la sortiline, *CCND1* et *cMYC*. Nous avons alors pu observer une augmentation significative de la fixation de la sortiline et de l'EGFR sur la chromatine. Ce traitement a également permis de voir une tendance à la baisse de l'expression de ces cibles, tendance accentuée par l'augmentation du niveau d'expression de *SORT1* dans un modèle cellulaire de surexpression de sortiline. La sortiline et l'osimertinib semble avoir une action synergique conduisant à une diminution de l'expression des gènes cibles sélectionnés. Dans la même dynamique, il serait important de compléter ces données par des analyses en RNA-seq pour déterminer, de manière plus exhaustive, les niveaux d'expression de nombreux gènes.

La sortiline nucléaire : répresseur transcriptomique *in vitro* / *in vivo*

Dans le cadre de notre étude, nous nous sommes basés sur le programme transcriptomique de l'EGFR étant connu pour se lier sur certains promoteurs comme ceux de *cMYC* ou *CCND1* (Brand *et al.*, 2011). La réalisation de l'immunoprécipitation de la chromatine liée à la sortiline a également permis de déterminer des cibles génomiques. L'étude de cibles communes à la sortiline et l'EGFR (*cMYC* et *CCND1*) nous a permis d'explorer le potentiel antagoniste de la sortiline vis-à-vis de l'EGFR. De ce fait, l'utilisation de la ChIP-qPCR a démontré l'aspect limitant et répresseur de la sortiline sur l'expression des gènes cibles. En effet, la surexpression de *SORT1* dans la lignée H1975 a mis en évidence une répression des

gènes cibles (*cMYC* et *CCND1*), ayant un effet antagoniste à l'EGFR seul. Ces résultats ont été confirmés en quantifiant la fixation de l'ARN Pol II sur ces mêmes promoteurs en faisant varier l'expression de la sortiline où nous constatons un effet inhibiteur de la sortiline sur la fixation de l'ARN Pol II. Les résultats obtenus en PCR quantitative sur la lignée H1975 surexprimant la sortiline ont permis d'observer une diminution de l'expression des gènes fixés par la sortiline. Ces résultats ont été complétés par l'étude de ces mêmes gènes sur plusieurs cohortes de patients, dont les prélèvements obtenus grâce à notre collaboration avec le service de Chirurgie Thoracique et Vasculaire du CHU de Limoges. L'étude de ces cohortes a permis de mettre en évidence une expression mutuellement exclusive de *SORT1* et de *cMYC*. Ces données nous laissent supposer le caractère suppresseur de tumeur de la sortiline. Ces résultats encourageants demandent de plus amples investigations notamment concernant le rôle de la sortiline sur le remaniement et le réarrangement de la chromatine. Elle pourrait, par exemple, agir sur la formation et l'organisation des nucléosomes afin de permettre ou non l'accès de la chromatine à la machinerie transcriptionnelle ou encore moduler les modifications post-traductionnelles des histones présentes.

Sortiline et réarrangement de la chromatine

L'étude de la sortiline nucléaire ouvre de nombreuses perspectives quant aux rôles de cette protéine vis-à-vis de la chromatine. En effet, celle-ci pourrait jouer un rôle de facteur de transcription ou de répresseur transcriptionnel de différentes manières. Une façon d'étudier l'implication de la sortiline dans cette fonction de régulateur transcriptionnel serait l'étude de la dynamique chromatinienne. L'étude de la sortiline dans ce contexte tend à s'intéresser aux modifications d'histone et plus précisément au code épigénétique des histones. En effet, les modifications d'histones sont associées à des profils induisant l'expression ou la répression des gènes en fonction de la compaction produite par ces modifications de type méthylation ou acétylation. La réalisation de ChIP ciblant des histones acétylées ou méthylées permettrait de comparer les profils de fixation de la sortiline et de ces histones sur la chromatine et de son niveau de compaction. Le nombre grandissant d'études s'intéressant à la cartographie de nucléosome et aux modifications épigénétiques nous permettrait de déterminer le rôle de la sortiline dans le réarrangement de la chromatine en lien avec la dynamique et la localisation des nucléosomes (Brzezińska *et al.*, 2013 ; Druliner *et al.*, 2013). La position des nucléosomes participant à l'établissement de la structure de la chromatine est un indicateur important de l'expression des gènes. En effet, nous pourrions utiliser comme référence des lignées dont la cartographie des nucléosomes est déjà établie, telles que les lignées HeLa ou HEK. Ainsi, nous comparerons ces cartographies avec celles que nous obtiendrons dans ces mêmes lignées surexprimant la sortiline. Cela, nous permettrait de savoir si la sortiline joue bien un rôle dans le réarrangement de la chromatine par modulation de l'agencement des nucléosomes. L'étude de la fonction nucléaire de la sortiline sur les réarrangements chromatiniens devrait apporter un nouvel éclairage sur le mode d'action de la sortiline. Néanmoins, la caractérisation de sa présence au niveau nucléaire ne pourra se faire que par des approches immunohistochimiques menées sur la tumeur qui resteront difficiles à mettre en œuvre dans les services de pathologie et ne permettront pas un suivi des patients. Il sera donc nécessaire à l'avenir d'élaborer de nouvelles stratégies afin de monitorer les taux de sortiline chez ces patients. Le devenir de l'EGFR et de la sortiline, nucléaire ou exosomal,

s'établit au niveau des endosomes précoces, il sera donc nécessaire d'établir un parallèle entre nucléaire et exosomal. Nos travaux antérieurs nous ont permis de montrer la présence de sortiline dans les vésicules extracellulaires (exosomes) (Wilson *et al.*, 2014) ouvrant ainsi la voie vers un nouveau mode de détection de la sortiline au niveau de la circulation systémique.

L'absence de sortiline dans le sang périphérique peut-elle permettre de prédire la présence de CBNPC ?

Les résultats que nous avons obtenus dans cette étude, associés à ceux obtenus précédemment (Al-Akhrass *et al.*, 2017) nous confortent dans l'hypothèse d'un rôle suppresseur de tumeur de la sortiline. Nous avons pu voir une diminution de l'expression de *SORT1* dans les tumeurs bronchiques. Il serait, à présent, intéressant de déterminer si l'expression de la sortiline dans les vésicules extracellulaires dans le système sanguin périphérique ou dans les vaisseaux drainant la tumeur est corrélée avec le diagnostic du CBNPC ou avec les risques de non-réponse aux traitements, mais également d'autres pathologies comme les maladies cardiovasculaires (Goettsch *et al.*, 2018). L'analyse de la présence de la sortiline dans les exosomes circulants dans le sang périphérique des patients pourrait permettre d'améliorer la prise en charge des cancers bronchiques. Des travaux récents suggèrent la valeur pronostique des exosomes dans le cancer bronchique en démontrant que la taille des vésicules (petites ou grandes) permettrait de prédire le risque de récurrence (Navarro *et al.*, 2019). Ceci permettrait, à terme, un diagnostic précoce du CBNPC et améliorerait ainsi la prise en charge des patients tout en permettant de prédire d'éventuels risques de résistance thérapeutique. Les tumeurs que nous avons collectées sont accompagnées d'échantillons sanguins qui nous permettront par la suite d'étudier la correspondance entre le sang périphérique et le contenu tumoral. Un PHRC portant sur la sortiline nucléaire et ces profils moléculaires associés dans des échantillons de sang périphérique est en cours afin de mettre en évidence des marqueurs du CBNPC dans les vésicules extracellulaires sécrétés par la tumeur. Les exosomes constituent une véritable source de biomarqueurs circulants ADN, ARN ou protéines qui pourrait être déterminante dans la découverte de marqueurs pronostiques ou de récurrence face aux thérapies appliquées (exérèse, radiothérapie, chimiothérapie). Bien qu'elle soit considérée comme un facteur de bon pronostic dans le cancer bronchique la sortiline demeure une protéine controversée dans différents modèles de cancer.

La sortiline au travers des différents modèles de cancer : des rôles ambigus

Nos résultats obtenus dans le cancer bronchique montrent un effet suppresseur de tumeur de la sortiline. Des résultats sensiblement similaires ont également pu être observés dans le cancer de la prostate (Tanimoto *et al.*, 2015). Ce rôle concernant la sortiline ne semble tout de même pas identique dans tous les types de cancer. En effet, dans certains modèles cancéreux comme le CCR, le cancer du sein ou de l'ovaire, la sortiline présenterait un rôle

pro-oncogénique favorisant la migration et la formation de métastases (Ghaemimanesh *et al.*, 2014 ; Massa *et al.*, 2013, 2014 ; Roselli *et al.*, 2015). Les différents effets de la sortiline reposent sur ses différentes formes et sur ses niveaux d'expressions variables en fonction des types de cancer étudiés et leurs stades. Néanmoins, les modes de régulation de la sortiline demeurent toujours non élucidés dans ces cancers. Les études menées sur le cancer de l'ovaire, ont permis de montrer une surexpression de *SORT1* dans les tumeurs par rapport aux tissus non tumoraux (Ghaemimanesh *et al.*, 2014). Cette étude bénéficiait d'une la cohorte restreinte à 7 patientes. L'étude nécessiterait d'être étendue à un nombre de patients plus importants. Dans le cancer du sein, la sortiline participerait à la migration cellulaire, notamment en lien avec le pro-NGF et le récepteur TrkA (Demont *et al.*, 2012). Mais ces résultats semblent montrer une corrélation positive entre le niveau d'expression du pro-NGF et le grade de la pathologie, mais ne montrent pas l'effet de l'expression de la sortiline. En effet, des analyses de type Kaplan-Meier dans le cancer du sein ont permis de prédire une meilleure survie en cas de forte expression de *SORT1*. De récentes études tendent à montrer l'effet délétère de la sortiline dans le cancer du sein en lien avec la progranuline (Berger *et al.*, 2021). Dans le cancer colorectal, il a été démontré que la forme soluble de la sortiline, due au clivage de la partie extracellulaire du récepteur, mimait un ligand extracellulaire (Massa *et al.*, 2014). Ce ligand induit un effet pro-métastatique par le biais de l'activation de la voie PI3K dépendante de FAK et Src à partir d'un récepteur pour le moment inconnu (Massa *et al.*, 2013). De cette manière, nous pouvons voir que les différentes formes de la sortiline conduisent à des effets différents. Il semble très important de déterminer quelles sont les formes de la sortiline et les fonctions qui leurs sont associées. Il sera ensuite nécessaire d'identifier les mécanismes régulant la sortiline et ses différentes formes.

La régulation de la sortiline dans le CBNPC

De manière générale, la sortiline est régulée par différents mécanismes, à plusieurs niveaux. En effet, sa régulation peut se faire selon trois niveaux. Au niveau génomique, cette régulation peut se faire, par le biais de la méthylation (Yu *et al.*, 2016) mais également de nombreux SNPs (Kathiresan *et al.*, 2008 ; Musunuru *et al.*, 2010). Ces mécanismes de régulations permettent de moduler l'expression de la sortiline de façon réversible. De plus, la présence de mutations sur le gène *SORT1* peut conduire, non pas à une modification de l'expression de la sortiline, mais à une altération des fonctions de la protéine (Sanchez *et al.*, 2015). Au niveau transcriptionnel, la régulation de l'ARNm de la sortiline permet de moduler l'expression de *SORT1*. En effet, de nombreux facteurs de transcriptions peuvent s'associer au promoteur du gène codant la protéine affectant ainsi son niveau d'expression. Sa régulation peut alors se faire au moment de la transcription ou de manière post-transcriptionnelle. Plusieurs facteurs de transcriptions tels que c-Jun, STATs, ATF3 sont susceptibles d'activer ou réprimer la transcription de la sortiline (Lv *et al.*, 2019 ; Pirault *et al.*, 2017 ; Ai *et al.*, 2012 ; Jadhav & Zhang, 2017). Au niveau post-transcriptionnel, sa régulation dépendrait de la protéine TDP-43 permettant notamment d'agir sur l'épissage de l'ARNm et d'introduire un codon stop prématuré menant à la synthèse d'une sortiline amputée de ses domaines transmembranaires et intracellulaires, soit une forme soluble de cette dernière. Une étude a permis de montrer une diminution de la stabilité de l'ARNm de *SORT1* (Arnold *et al.*, 2013) et une augmentation de l'exclusion de l'exon 17b en présence d'une surexpression de *TDP-43*

(Tann *et al.*, 2019). La présence d'un grand nombre de miRNA est également un facteur important dans la régulation de l'expression de la sortiline et de l'EGFR (Zhang *et al.*, 2018 ; Alanazi *et al.*, 2015). Des résultats préliminaires réalisés au laboratoire sur des prélèvements issus de patients ont permis d'explorer l'hypothèse d'une régulation de la sortiline par le biais des SNPs dans le cancer bronchique. Ces premiers résultats semblent écarter l'implication des SNPs dans la régulation de la sortiline dans le cadre du cancer bronchique. Le gène codant la sortiline étant sur le chromosome 1, le plus long, les risques de perte d'hétérozygotie (LOH) se trouvent accrus, inhibant son expression chez les sujets atteints de cancer bronchique.

Enfin, l'expression de la sortiline peut être altérée par l'effet de protéines régulant directement la quantité de sortiline dans la cellule. En effet, l'association de la sortiline avec diverses protéines peut conduire à une dégradation de celle-ci, une modification de sa fonction ou à une altération de sa structure. La protéase ADAM10, par exemple, permet d'assurer un clivage de la partie extracellulaire de la sortiline, libérant une forme soluble de la sortiline (Evans *et al.*, 2011). Un autre clivage réalisé par des γ -sécrétases en position intracellulaire, juxta-membranaire permet de produire un fragment intracellulaire dont la fonction demeure inconnue. Des résultats préliminaires semblent montrer une interaction de cette sortiline tronquée dans sa partie intracellulaire avec l'EGFR dans le noyau. Cela nous permet de nous questionner sur le rôle de ce fragment généré par clivage. La compréhension de la régulation de la sortiline dans le cancer bronchique reste totalement à établir.

La sortiline précurseur de molécules thérapeutiques ?

L'étude de la sortiline et de sa fonction de répresseur de tumeur, soulève la question de l'utilisation de dérivés de la sortiline afin de limiter les fonctions nucléaires de l'EGFR ainsi que sa signalisation membranaire et cytoplasmique. Actuellement, même si les propriétés anti-tumorales de la sortiline sont avérées, nous ne savons pas si la totalité ou seule une partie de la protéine sont impliqués dans ce processus et participent à cet effet. Il est établi que la sortiline peut être retrouvée sous différentes formes, la forme totale de 95 kDa ainsi que des formes tronquées suite à l'action de métalloprotéases et de γ -sécrétases (Evans *et al.*, 2011 ; Hermey *et al.*, 2006 ; Nyborg *et al.*, 2006). Ces différents clivages conduisent, respectivement, à la libération de sortiline soluble ou à la libération d'un fragment intracellulaire. Lors des expériences de co-immunoprécipitations nucléaires de la sortiline et de l'EGFR, nous avons utilisé un anticorps reconnaissant la sortiline dans sa partie C-terminale pour l'étape d'immunorévélation en western-blot conduisant à observer la présence de sortiline dans sa forme totale et dans une forme tronquée. Cela nous permet de prétendre que différentes formes de sortiline pourraient potentiellement se lier à l'EGFR. La sortiline pourrait donc se fixer par sa partie C-terminale à l'EGFR ce qui correspond à son domaine tyrosine kinase. Ces résultats ne sont que préliminaires et devront être confirmés. Il serait néanmoins intéressant de déterminer l'effet de la sortiline sous sa forme totale et sous sa forme tronquée en C-terminale. De la même manière, nous pourrions définir si ces effets sont identiques. L'utilisation de cellules exprimant la forme tronquée dans une lignée cellulaire exprimant de manière très faible la sortiline comme la lignée H1975 nous permettrait de déterminer le rôle de ce fragment. Si ce fragment possède un réel intérêt thérapeutique en ayant des effets

suppresseurs de tumeurs, il pourrait faire l'objet d'études plus approfondies. La sortiline dans sa forme totale ou dans sa forme clivée intracellulaire pourrait en se complexant à l'EGFR agir au niveau nucléaire afin de limiter l'effet de l'EGFR dans le cadre des thérapies ciblées. De cette manière un traitement à base de sortiline associé aux thérapies ciblées permettrait de limiter l'échappement thérapeutique lié à l'activation nucléaire de l'EGFR seul.

Partie VIII. Conclusion / Perspectives

Pour conclure, nous avons pu montrer que la fonction de la sortiline ne se limitait pas à son action sur l'EGFR membranaire dans le cancer bronchique non à petites cellules. En effet, Nos travaux ont permis de mettre en évidence pour la première fois l'interaction de la sortiline et de l'EGFR au niveau nucléaire. La sortiline joue un rôle clé à ce niveau en contrôlant l'expression de plusieurs oncogènes habituellement activés par l'EGFR nucléaire lui-même ce qui a pour effet d'inhiber son activité dans ce compartiment. Grâce à notre modèle d'étude nous avons mis en lumière l'interaction de l'EGFR et de la sortiline avec la chromatine en réponse à la stimulation à l'EGF. Lors de cette interaction, la sortiline contrôle l'expression de 2 gènes cibles de l'EGFR, *cMYC* et *CCND1* impliqué respectivement dans la reprogrammation et la progression tumorale. En effet, la sortiline, par sa fixation à la chromatine, permettrait de limiter le recrutement de l'ARN Pol II empêchant l'activation de la transcription de ces 2 gènes et réprimant ainsi leur expression. Ces résultats permettent un nouvel éclairage sur la fonction de la sortiline dans le cancer bronchique et le trafic de l'EGFR en complétant les travaux antérieurs de notre équipe. Le recrutement de l'EGFR et de la sortiline sur la chromatine semblent indiquer une organisation coordonnée sous forme de complexe au niveau de séquence ATRS, ce qui sous entendrait une liaison par le biais de l'EGFR et/ou de partenaire protéiques reconnaissant ces mêmes séquences. Nos travaux ont également pu mettre en évidence l'induction de la relocalisation cytoplasmique et nucléaire de l'EGFR sous l'effet d'une thérapie ciblée, l'osimertinib. Ainsi, nous avons pu observer une stimulation de la liaison de la sortiline à la chromatine par l'osimertinib. L'étude réalisée sur notre cohorte de patients ainsi que sur d'autres études a permis d'établir une corrélation inverse entre l'expression de la sortiline et de *cMYC*. Ces résultats très encourageants permettent une meilleure compréhension de la fonction de la sortiline et ouvrent de nombreuses perspectives :

- L'étude du rôle de l'EGFR et de la sortiline vis-à-vis de la chromatine nécessitera de développer des lignées KO pour l'EGFR et pour la sortiline. Ces lignées nous permettront de vérifier l'importation de l'EGFR et de la sortiline dans le noyau en l'absence de l'une ou l'autre protéine. Ainsi, nous pourrions déterminer le niveau d'implication de la sortiline dans le transport nucléaire de l'EGFR. De plus, cela nous permettra de vérifier si la fixation de la chromatine par la sortiline passe par l'EGFR ou si elle peut se lier de manière indépendante.
- L'étude de l'EGFR et de la chromatine pourra être complétée par l'effet de la sortiline sur la dynamique des nucléosomes. Nous pourrions alors déterminer, par l'étude des modifications des histones, l'effet de la sortiline sur la compaction de l'ADN et sur le réarrangement des nucléosomes facilitant ou limitant l'accès à la chromatine. De plus, nous pourrions déterminer les motifs exacts de fixation de la sortiline sur la chromatine en développant et en améliorant nos analyses génomiques.
- L'étude la sortiline nucléaire nous permettrait également de déterminer la présence ou non d'autres partenaires de la sortiline dans ce compartiment.
- La régulation de l'expression de la sortiline dans le cancer bronchique est un point clé pour favoriser ses effets anti-oncogéniques. La régulation de la sortiline passe

aussi par l'étude de ses différentes formes. En effet, l'activité de la sortiline dépend également de sa forme, clivée ou non.

- Le séquençage des différentes formes de la sortiline pourra nous permettre de déterminer l'ensemble des formes de cette protéine de tri puis d'en identifier les fonctions. Il pourrait être intéressant de déterminer si la sortiline pourrait permettre de développer des molécules thérapeutiques.

Références bibliographiques

- Abou-Fayçal, C., Hatat, A. S., Gazzeri, S., & Eymin, B. (2017). Splice Variants of the RTK Family: Their Role in Tumour Progression and Response to Targeted Therapy. *International journal of molecular sciences*, 18(2), 383.
- Adamczyk, K. A., Klein-Scory, S., Tehrani, M. M., Warnken, U., Schmiegel, W., Schnölzer, M., & Schwarte-Waldhoff, I. (2011). Characterization of soluble and exosomal forms of the EGFR released from pancreatic cancer cells. *Life sciences*, 89(9-10), 304–312.
- Ai, D., Baez, J. M., Jiang, H., Conlon, D. M., Hernandez-Ono, A., Frank-Kamenetsky, M., Milstein, S., Fitzgerald, K., Murphy, A. J., Woo, C. W., Strong, A., Ginsberg, H. N., Tabas, I., Rader, D. J., & Tall, A. R. (2012). Activation of ER stress and mTORC1 suppresses hepatic sortilin-1 levels in obese mice. *The Journal of clinical investigation*, 122(5), 1677–1687.
- Al-Akhrass, H., Naves, T., Vincent, F., Magnaudeix, A., Durand, K., Bertin, F., Melloni, B., Jauberteau, M. O., & Lalloué, F. (2017). Sortilin limits EGFR signaling by promoting its internalization in lung cancer. *Nature communications*, 8(1), 1182.
- Alanazi, I., Hoffmann, P., & Adelson, D. L. (2015). MicroRNAs are part of the regulatory network that controls EGF induced apoptosis, including elements of the JAK/STAT pathway, in A431 cells. *PloS one*, 10(3), e0120337.
- Al-Nedawi, K., Meehan, B., Kerbel, R. S., Allison, A. C., & Rak, J. (2009). Endothelial expression of autocrine VEGF upon the uptake of tumor-derived microvesicles containing oncogenic EGFR. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(10), 3794–3799.
- Al-Nedawi, K., Meehan, B., Micallef, J., Lhotak, V., May, L., Guha, A., & Rak, J. (2008). Intercellular transfer of the oncogenic receptor EGFRvIII by microvesicles derived from tumour cells. *Nature cell biology*, 10(5), 619–624.
- Amini, A., Byers, L. A., Welsh, J. W., & Komaki, R. U. (2014). Progress in the management of limited-stage small cell lung cancer. *Cancer*, 120(6), 790–798.
- Anderson R. G. (1998). The caveolae membrane system. *Annual review of biochemistry*, 67, 199–225.
- Antonny, B., Burd, C., De Camilli, P., Chen, E., Daumke, O., Faelber, K., Ford, M., Frolov, V. A., Frost, A., Hinshaw, J. E., Kirchhausen, T., Kozlov, M. M., Lenz, M., Low, H. H., McMahon, H., Merrifield, C., Pollard, T. D., Robinson, P. J., Roux, A., & Schmid, S. (2016). Membrane fission by dynamin: what we know and what we need to know. *The EMBO journal*, 35(21), 2270–2284.
- Antuéjoul S., Salameire D., Brambilla E. (2011) Evolution de la classification histologique des cancers broncho-pulmonaires non à petites cellules. *La letter du Cancérologue*, XX (6), 376-381.
- Arnold, E. S., Huelga, S. C., Lagier-Tourenne, C., Polymenidou, M., Ditsworth, D., Kordasiewicz, H. B., Cleveland, D. W. (2013). ALS- linked TDP-43 mutations produce aberrant RNA splicing and adult- onset motor neuron disease without aggregation or loss of nuclear TDP-43. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(8), E736–E745.
- Arscott, W. T., & Camphausen, K. A. (2011). EGFR isoforms in exosomes as a novel method for biomarker discovery in pancreatic cancer. *Biomarkers in medicine*, 5(6), 821.

- Azmi, A. S., Bao, B., & Sarkar, F. H. (2013). Exosomes in cancer development, metastasis, and drug resistance: a comprehensive review. *Cancer metastasis reviews*, 32(3-4), 623–642.
- Barlesi, F., Mazieres, J., Merlio, J. P., Debieuvre, D., Mosser, J., Lena, H., Ouafik, L., Besse, B., Rouquette, I., Westeel, V., Escande, F., Monnet, I., Lemoine, A., Veillon, R., Blons, H., Audigier-Valette, C., Bringuier, P. P., Lamy, R., Beau-Faller, M., Pujol, J. L., ... Biomarkers France contributors (2016). Routine molecular profiling of patients with advanced non-small-cell lung cancer: results of a 1-year nationwide programme of the French Cooperative Thoracic Intergroup (IFCT). *Lancet (London, England)*, 387(10026), 1415–1426.
- Bartel D. P. (2009). MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell*, 136(2), 215–233. h
- Batzer, A. G., Rotin, D., Ureña, J. M., Skolnik, E. Y., & Schlessinger, J. (1994). Hierarchy of binding sites for Grb2 and Shc on the epidermal growth factor receptor. *Molecular and cellular biology*, 14(8), 5192–5201.
- Bazzani, L., Donnini, S., Giachetti, A., Christofori, G., & Ziche, M. (2018). PGE2 mediates EGFR internalization and nuclear translocation via caveolin endocytosis promoting its transcriptional activity and proliferation in human NSCLC cells. *Oncotarget*, 9(19), 14939–14958.
- Bell, C. A., Tynan, J. A., Hart, K. C., Meyer, A. N., Robertson, S. C., & Donoghue, D. J. (2000). Rotational coupling of the transmembrane and kinase domains of the Neu receptor tyrosine kinase. *Molecular biology of the cell*, 11(10), 3589–3599.
- Bellanger, C., Dubanet, L., Lise, M. C., Fauchais, A. L., Bordessoule, D., Jauberteau, M. O., & Troutaud, D. (2011). Endogenous neurotrophins and Trk signaling in diffuse large B cell lymphoma cell lines are involved in sensitivity to rituximab-induced apoptosis. *PLoS one*, 6(11), e27213.
- Benhar, M., Engelberg, D., & Levitzki, A. (2002). Cisplatin-induced activation of the EGF receptor. *Oncogene*, 21(57), 8723–8731.
- Berger, K., Rhost, S., Rafnsdóttir, S., Hughes, É., Magnusson, Y., Ekholm, M., Stål, O., Rydén, L., & Landberg, G. (2021). Tumor co-expression of progranulin and sortilin as a prognostic biomarker in breast cancer. *BMC cancer*, 21(1), 185.
- Bertelsen, V., Sak, M. M., Breen, K., Rødland, M. S., Johannessen, L. E., Traub, L. M., Stang, E., & Madshus, I. H. (2011). A chimeric pre-ubiquitinated EGF receptor is constitutively endocytosed in a clathrin-dependent, but kinase-independent manner. *Traffic (Copenhagen, Denmark)*, 12(4), 507–520.
- Bitler, B. G., Goverdhan, A., & Schroeder, J. A. (2010). MUC1 regulates nuclear localization and function of the epidermal growth factor receptor. *Journal of cell science*, 123(Pt 10), 1716–1723.
- Blakely, C. M., Watkins, T., Wu, W., Gini, B., Chabon, J. J., McCoach, C. E., McGranahan, N., Wilson, G. A., Birkbak, N. J., Olivas, V. R., Rotow, J., Maynard, A., Wang, V., Gubens, M. A., Banks, K. C., Lanman, R. B., Caulin, A. F., St John, J., Cordero, A. R., Giannikopoulos, P., ... Bivona, T. G. (2017). Evolution and clinical impact of co-occurring genetic alterations in advanced-stage EGFR-mutant lung cancers. *Nature genetics*, 49(12), 1693–1704.
- Blondy, S., Talbot, H., Saada, S., Christou, N., Battu, S., Pannequin, J., Jauberteau, M. O., Lalloué, F., Verdier, M., Mathonnet, M., & Perraud, A. (2021). Overexpression of sortilin is

associated with 5-FU resistance and poor prognosis in colorectal cancer. *Journal of cellular and molecular medicine*, 25(1), 47–60.

Brambilla E. (2010). Lung cancer: multidisciplinary approach for management: cell and molecular biology assembly contribution to the celebration of 20 years of the ERS. *The European respiratory journal*, 35(4), 717–720.

Brambilla, E., & Gazdar, A. (2009). Pathogenesis of lung cancer signalling pathways: roadmap for therapies. *The European respiratory journal*, 33(6), 1485–1497.

Brand, T. M., Iida, M., Li, C., & Wheeler, D. L. (2011). The nuclear epidermal growth factor receptor signaling network and its role in cancer. *Discovery medicine*, 12(66), 419–432.

Brand, T. M., Iida, M., Luthar, N., Starr, M. M., Huppert, E. J., & Wheeler, D. L. (2013). Nuclear EGFR as a molecular target in cancer. *Radiotherapy and oncology : journal of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology*, 108(3), 370–377.

Bromberg J. (2002). Stat proteins and oncogenesis. *The Journal of clinical investigation*, 109(9), 1139–1142.

Brtva, T. R., Drugan, J. K., Ghosh, S., Terrell, R. S., Campbell-Burk, S., Bell, R. M., & Der, C. J. (1995). Two distinct Raf domains mediate interaction with Ras. *The Journal of biological chemistry*, 270(17), 9809–9812.

Bryant, N. J., Govers, R., & James, D. E. (2002). Regulated transport of the glucose transporter GLUT4. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 3(4), 267–277.

Brzezińska, E., Dutkowska, A., & Antczak, A. (2013). The significance of epigenetic alterations in lung carcinogenesis. *Molecular biology reports*, 40(1), 309–325.

Burgess, A. W., Cho, H. S., Eigenbrot, C., Ferguson, K. M., Garrett, T. P., Leahy, D. J., Lemmon, M. A., Sliwkowski, M. X., Ward, C. W., & Yokoyama, S. (2003). An open-and-shut case? Recent insights into the activation of EGF/ErbB receptors. *Molecular cell*, 12(3), 541–552.

Callahan, M. K., Wolchok, J. D., & Allison, J. P. (2010). Anti-CTLA-4 antibody therapy: immune monitoring during clinical development of a novel immunotherapy. *Seminars in oncology*, 37(5), 473–484.

Camargo Barros-Filho, M., Guisier, F., D. Rock, L., D. Becker-Santos, D., P. Sage, A., A. Marshall, E., & L. Lam, W. (2019). Tumour Suppressor Genes with Oncogenic Roles in Lung Cancer. *Genes and Cancer*. doi:10.5772/intechopen.85017

Cao, X., Zhu, H., Ali-Osman, F., & Lo, H. W. (2011). EGFR and EGFRvIII undergo stress- and EGFR kinase inhibitor-induced mitochondrial translocation: a potential mechanism of EGFR-driven antagonism of apoptosis. *Molecular cancer*, 10, 26.

Capuani, F., Conte, A., Argenzio, E., Marchetti, L., Priami, C., Polo, S., Di Fiore, P. P., Sigismund, S., & Ciliberto, A. (2015). Quantitative analysis reveals how EGFR activation and downregulation are coupled in normal but not in cancer cells. *Nature communications*, 6, 7999.

Cardarella, S., & Johnson, B. E. (2013). The impact of genomic changes on treatment of lung cancer. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 188(7), 770–775.

Carey, K. D., Garton, A. J., Romero, M. S., Kahler, J., Thomson, S., Ross, S., Park, F., Haley, J. D., Gibson, N., & Sliwkowski, M. X. (2006). Kinetic analysis of epidermal growth factor

receptor somatic mutant proteins shows increased sensitivity to the epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor, erlotinib. *Cancer research*, 66(16), 8163–8171.

Carpenter, C. D., Ingraham, H. A., Cochet, C., Walton, G. M., Lazar, C. S., Sowadski, J. M., Rosenfeld, M. G., & Gill, G. N. (1991). Structural analysis of the transmembrane domain of the epidermal growth factor receptor. *The Journal of biological chemistry*, 266(9), 5750–5755.

Carpenter, G., & Cohen, S. (1976). 125I-labeled human epidermal growth factor. Binding, internalization, and degradation in human fibroblasts. *The Journal of cell biology*, 71(1), 159–171.

Carpenter, G., & Cohen, S. (1979). Epidermal growth factor. *Annual review of biochemistry*, 48, 193–216.

Carpenter, G., Lembach, K. J., Morrison, M. M., & Cohen, S. (1975). Characterization of the binding of 125-I-labeled epidermal growth factor to human fibroblasts. *The Journal of biological chemistry*, 250(11), 4297–4304.

Cha, D. J., Franklin, J. L., Dou, Y., Liu, Q., Higginbotham, J. N., Demory Beckler, M., Weaver, A. M., Vickers, K., Prasad, N., Levy, S., Zhang, B., Coffey, R. J., & Patton, J. G. (2015). KRAS-dependent sorting of miRNA to exosomes. *eLife*, 4, e07197.

Chan, B. A., & Hughes, B. G. (2015). Targeted therapy for non-small cell lung cancer: current standards and the promise of the future. *Translational lung cancer research*, 4(1), 36–54.

Chang, A., Parikh, P., Thongprasert, S., Tan, E. H., Perng, R. P., Ganzon, D., Yang, C. H., Tsao, C. J., Watkins, C., Botwood, N., & Thatcher, N. (2006). Gefitinib (IRESSA) in patients of Asian origin with refractory advanced non-small cell lung cancer: subset analysis from the ISEL study. *Journal of thoracic oncology : official publication of the International Association for the Study of Lung Cancer*, 1(8), 847–855.

Chanvorachote, P., Sriratanasak, N., & Nonpanya, N. (2020). C-myc Contributes to Malignancy of Lung Cancer: A Potential Anticancer Drug Target. *Anticancer research*, 40(2), 609–618.

Chardin, P., Camonis, J. H., Gale, N. W., van Aelst, L., Schlessinger, J., Wigler, M. H., & Bar-Sagi, D. (1993). Human Sos1: a guanine nucleotide exchange factor for Ras that binds to GRB2. *Science (New York, N.Y.)*, 260(5112), 1338–1343.

Chen, C., & Zhuang, X. (2008). Epsin 1 is a cargo-specific adaptor for the clathrin-mediated endocytosis of the influenza virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(33), 11790–11795.

Chen, Y., Huang, Y., Gao, X., Li, Y., Lin, J., Chen, L., Chang, L., Chen, G., Guan, Y., Pan, L. K., Xia, X., Guo, Z., Pan, J., Xu, Y., Yi, X., & Chen, C. (2020). CCND1 Amplification Contributes to Immunosuppression and Is Associated with a Poor Prognosis to Immune Checkpoint Inhibitors in Solid Tumors. *Frontiers in immunology*, 11, 1620.

Chen, Z., Fillmore, C. M., Hammerman, P. S., Kim, C. F., & Wong, K. K. (2014). Non-small-cell lung cancers: a heterogeneous set of diseases. *Nature reviews. Cancer*, 14(8), 535–546.

Choi, D. S., Park, J. O., Jang, S. C., Yoon, Y. J., Jung, J. W., Choi, D. Y., Kim, J. W., Kang, J. S., Park, J., Hwang, D., Lee, K. H., Park, S. H., Kim, Y. K., Desiderio, D. M., Kim, K. P., & Gho, Y. S. (2011). Proteomic analysis of microvesicles derived from human colorectal cancer ascites. *Proteomics*, 11(13), 2745–2751.

Choi, Y. L., Soda, M., Yamashita, Y., Ueno, T., Takashima, J., Nakajima, T., Yatabe, Y., Takeuchi, K., Hamada, T., Haruta, H., Ishikawa, Y., Kimura, H., Mitsudomi, T., Tanio, Y., Mano, H., & ALK Lung Cancer Study Group (2010). EML4-ALK mutations in lung cancer that confer resistance to ALK inhibitors. *The New England journal of medicine*, 363(18), 1734–1739.

Chong, C. R., & Jänne, P. A. (2013). The quest to overcome resistance to EGFR-targeted therapies in cancer. *Nature medicine*, 19(11), 1389–1400.

Chou, R. H., Wang, Y. N., Hsieh, Y. H., Li, L. Y., Xia, W., Chang, W. C., Chang, L. C., Cheng, C. C., Lai, C. C., Hsu, J. L., Chang, W. J., Chiang, S. Y., Lee, H. J., Liao, H. W., Chuang, P. H., Chen, H. Y., Wang, H. L., Kuo, S. C., Chen, C. H., Yu, Y. L., ... Hung, M. C. (2014). EGFR modulates DNA synthesis and repair through Tyr phosphorylation of histone H4. *Developmental cell*, 30(2), 224–237.

Chung, B. M., Dimri, M., George, M., Reddi, A. L., Chen, G., Band, V., & Band, H. (2009). The role of cooperativity with Src in oncogenic transformation mediated by non-small cell lung cancer-associated EGF receptor mutants. *Oncogene*, 28(16), 1821–1832.

Chung, B. M., Raja, S. M., Clubb, R. J., Tu, C., George, M., Band, V., & Band, H. (2009). Aberrant trafficking of NSCLC-associated EGFR mutants through the endocytic recycling pathway promotes interaction with Src. *BMC cell biology*, 10, 84.

Clague, M. J., Liu, H., & Urbé, S. (2012). Governance of endocytic trafficking and signaling by reversible ubiquitylation. *Developmental cell*, 23(3), 457–467.

Clague, M. J., Liu, H., & Urbé, S. (2012). Governance of endocytic trafficking and signaling by reversible ubiquitylation. *Developmental cell*, 23(3), 457–467.

Cohen S. (1965). The stimulation of epidermal proliferation by a specific protein (EGF). *Developmental biology*, 12(3), 394–407.

Cohen S. (2004). Origins of growth factors: NGF and EGF. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1038, 98–102.

COHEN, S., & ELLIOTT, G. A. (1963). The stimulation of epidermal keratinization by a protein isolated from the submaxillary gland of the mouse. *The Journal of investigative dermatology*, 40, 1–5.

Cohen, S., Carpenter, G., & King, L., Jr (1980). Epidermal growth factor-receptor-protein kinase interactions. Co-purification of receptor and epidermal growth factor-enhanced phosphorylation activity. *The Journal of biological chemistry*, 255(10), 4834–4842.

Colombo, M., Raposo, G., & Théry, C. (2014). Biogenesis, secretion, and intercellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles. *Annual review of cell and developmental biology*, 30, 255–289.

Cooper, A. A., & Stevens, T. H. (1996). Vps10p cycles between the late-Golgi and prevacuolar compartments in its function as the sorting receptor for multiple yeast vacuolar hydrolases. *The Journal of cell biology*, 133(3), 529–541.

Corrales, L., Nogueira, A., Passiglia, F., Listi, A., Caglevic, C., Giallombardo, M., Raez, L., Santos, E., & Rolfo, C. (2017). Second-Line Treatment of Non-Small Cell Lung Cancer: Clinical, Pathological, and Molecular Aspects of Nintedanib. *Frontiers in medicine*, 4, 13.

Cowley, G. P., Smith, J. A., & Gusterson, B. A. (1986). Increased EGF receptors on human squamous carcinoma cell lines. *British journal of cancer*, 53(2), 223–229.

- Davidson, M. R., Gazdar, A. F., & Clarke, B. E. (2013). The pivotal role of pathology in the management of lung cancer. *Journal of thoracic disease*, 5 Suppl 5(Suppl 5), S463–S478. h
- Dayde, D., Guerard, M., Perron, P., Hatat, A. S., Barrial, C., Eymin, B., & Gazzeri, S. (2016). Nuclear trafficking of EGFR by Vps34 represses Arf expression to promote lung tumor cell survival. *Oncogene*, 35(30), 3986–3994.
- de Araújo, M. E., Stasyk, T., Taub, N., Ebner, H. L., Fürst, B., Filipek, P., Weys, S. R., Hess, M. W., Lindner, H., Kremser, L., & Huber, L. A. (2013). Stability of the endosomal scaffold protein LAMTOR3 depends on heterodimer assembly and proteasomal degradation. *The Journal of biological chemistry*, 288(25), 18228–18242.
- Dearden, S., Stevens, J., Wu, Y. L., & Blowers, D. (2013). Mutation incidence and coincidence in non small-cell lung cancer: meta-analyses by ethnicity and histology (mutMap). *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology*, 24(9), 2371–2376.
- Debieuvre, D., Locher, C., Neidhardt, A. C., Goupil, F., Lemaire, B., Blanchet-Legens, A. S., Renault, D., Tavernier, J. Y., Tagu, P., Mahmoud, H., Figueredo, M., & Grivaux, M. (2014). Évolution en 10ans du cancer bronchique non à petites cellules en fonction du sexe. Résultats de l'étude KBP-2010-CPHG du Collège des pneumologues des hôpitaux généraux [Ten-year evolution in non-small-cell lung cancer according to sex. Results of the KBP-2010-CPHG study by the College of General Hospital Respiratory Physicians]. *Revue des maladies respiratoires*, 31(9), 805–816.
- Dela Cruz, C. S., Tanoue, L. T., & Matthay, R. A. (2011). Lung cancer: epidemiology, etiology, and prevention. *Clinics in chest medicine*, 32(4), 605–644.
- Demont, Y., Corbet, C., Page, A., Ataman-Önal, Y., Choquet-Kastylevsky, G., Fliniaux, I., Le Bourhis, X., Toillon, R. A., Bradshaw, R. A., & Hondermarck, H. (2012). Pro-nerve growth factor induces autocrine stimulation of breast cancer cell invasion through tropomyosin-related kinase A (TrkA) and sortilin protein. *The Journal of biological chemistry*, 287(3), 1923–1931.
- Demory Beckler, M., Higginbotham, J. N., Franklin, J. L., Ham, A. J., Halvey, P. J., Imasuen, I. E., Whitwell, C., Li, M., Liebler, D. C., & Coffey, R. J. (2013). Proteomic analysis of exosomes from mutant KRAS colon cancer cells identifies intercellular transfer of mutant KRAS. *Molecular & cellular proteomics : MCP*, 12(2), 343–355.
- Demory, M. L., Boerner, J. L., Davidson, R., Faust, W., Miyake, T., Lee, I., Hüttemann, M., Douglas, R., Haddad, G., & Parsons, S. J. (2009). Epidermal growth factor receptor translocation to the mitochondria: regulation and effect. *The Journal of biological chemistry*, 284(52), 36592–36604.
- Dhanasekaran, N., & Premkumar Reddy, E. (1998). Signaling by dual specificity kinases. *Oncogene*, 17(11 Reviews), 1447–1455.
- Di Fiore, P. P., Pierce, J. H., Fleming, T. P., Hazan, R., Ullrich, A., King, C. R., Schlessinger, J., & Aaronson, S. A. (1987). Overexpression of the human EGF receptor confers an EGF-dependent transformed phenotype to NIH 3T3 cells. *Cell*, 51(6), 1063–1070.
- Dittmann, K., Mayer, C., Czernmel, S., Huber, S. M., & Rodemann, H. P. (2017). New roles for nuclear EGFR in regulating the stability and translation of mRNAs associated with VEGF signaling. *PloS one*, 12(12), e0189087.
- Dittmann, K., Mayer, C., Fehrenbacher, B., Schaller, M., Kehlbach, R., & Rodemann, H. P. (2011). Nuclear epidermal growth factor receptor modulates cellular radio-sensitivity by

regulation of chromatin access. *Radiotherapy and oncology : journal of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology*, 99(3), 317–322.

Dittmann, K., Mayer, C., Fehrenbacher, B., Schaller, M., Raju, U., Milas, L., Chen, D. J., Kehlback, R., & Rodemann, H. P. (2005). Radiation-induced epidermal growth factor receptor nuclear import is linked to activation of DNA-dependent protein kinase. *The Journal of biological chemistry*, 280(35), 31182–31189.

Donepudi, M., & Resh, M. D. (2008). c-Src trafficking and co-localization with the EGF receptor promotes EGF ligand-independent EGF receptor activation and signaling. *Cellular signalling*, 20(7), 1359–1367.

Downward, J., Yarden, Y., Mayes, E., Scrace, G., Totty, N., Stockwell, P., Ullrich, A., Schlessinger, J., & Waterfield, M. D. (1984). Close similarity of epidermal growth factor receptor and v-erb-B oncogene protein sequences. *Nature*, 307(5951), 521–527.

Drilon, A., Rekhtman, N., Ladanyi, M., & Paik, P. (2012). Squamous-cell carcinomas of the lung: emerging biology, controversies, and the promise of targeted therapy. *The Lancet. Oncology*, 13(10), e418–e426.

Druliner, B. R., Fincher, J. A., Sexton, B. S., Vera, D. L., Roche, M., Lyle, S., & Dennis, J. H. (2013). Chromatin patterns associated with lung adenocarcinoma progression. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)*, 12(10), 1536–1543.

Du, Y., Shen, J., Hsu, J. L., Han, Z., Hsu, M. C., Yang, C. C., Kuo, H. P., Wang, Y. N., Yamaguchi, H., Miller, S. A., & Hung, M. C. (2014). Syntaxin 6-mediated Golgi translocation plays an important role in nuclear functions of EGFR through microtubule-dependent trafficking. *Oncogene*, 33(6), 756–770.

Dubonet, L., Bentayeb, H., Petit, B., Olivrie, A., Saada, S., de la Cruz-Morcillo, M. A., Lalloué, F., Gourin, M. P., Bordessoule, D., Faumont, N., Delage-Corre, M., Fauchais, A. L., Jauberteau, M. O., & Troutaud, D. (2015). Anti-apoptotic role and clinical relevance of neurotrophins in diffuse large B-cell lymphomas. *British journal of cancer*, 113(6), 934–944.

Dunn, W. A., Connolly, T. P., & Hubbard, A. L. (1986). Receptor-mediated endocytosis of epidermal growth factor by rat hepatocytes: receptor pathway. *The Journal of cell biology*, 102(1), 24–36.

Durham, A. L., & Adcock, I. M. (2015). The relationship between COPD and lung cancer. *Lung cancer (Amsterdam, Netherlands)*, 90(2), 121–127.

Duruiseaux, M., Rouquette, I., Adam, J., Cortot, A., Cazes, A., Gibault, L., Damotte, D., & Lantuejoul, S. (2017). Efficacité des inhibiteurs du checkpoint immunitaire PD-1/PD-L1 et testing PD-L1 dans les cancers thoraciques [Efficacy of PD-1/PD-L1 immune checkpoint inhibitors and PD-L1 testing in thoracic cancers]. *Annales de pathologie*, 37(1), 61–78.

Eck, M. J., & Yun, C. H. (2010). Structural and mechanistic underpinnings of the differential drug sensitivity of EGFR mutations in non-small cell lung cancer. *Biochimica et biophysica acta*, 1804(3), 559–566.

Eden, E. R., Huang, F., Sorkin, A., & Futter, C. E. (2012). The role of EGF receptor ubiquitination in regulating its intracellular traffic. *Traffic (Copenhagen, Denmark)*, 13(2), 329–337.

Ekstrand, A. J., James, C. D., Cavenee, W. K., Seliger, B., Pettersson, R. F., & Collins, V. P. (1991). Genes for epidermal growth factor receptor, transforming growth factor alpha, and

epidermal growth factor and their expression in human gliomas in vivo. *Cancer research*, 51(8), 2164–2172.

Ekstrand, A. J., Sugawa, N., James, C. D., & Collins, V. P. (1992). Amplified and rearranged epidermal growth factor receptor genes in human glioblastomas reveal deletions of sequences encoding portions of the N- and/or C-terminal tails. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89(10), 4309–4313.

EL Andaloussi, S., Mäger, I., Breakefield, X. O., & Wood, M. J. (2013). Extracellular vesicles: biology and emerging therapeutic opportunities. *Nature reviews. Drug discovery*, 12(5), 347–357.

Endoh, H., Ishibashi, Y., Yamaki, E., Yoshida, T., Yajima, T., Kimura, H., Kosaka, T., Onozato, R., Tanaka, S., Mitsudomi, T., & Kuwano, H. (2009). Immunohistochemical analysis of phosphorylated epidermal growth factor receptor might provide a surrogate marker of EGFR mutation. *Lung cancer (Amsterdam, Netherlands)*, 63(2), 241–246.

Endres, N. F., Barros, T., Cantor, A. J., & Kuriyan, J. (2014). Emerging concepts in the regulation of the EGF receptor and other receptor tyrosine kinases. *Trends in biochemical sciences*, 39(10), 437–446.

Engelman, J. A., Zejnullahu, K., Gale, C. M., Lifshits, E., Gonzales, A. J., Shimamura, T., Zhao, F., Vincent, P. W., Naumov, G. N., Bradner, J. E., Althaus, I. W., Gandhi, L., Shapiro, G. I., Nelson, J. M., Heymach, J. V., Meyerson, M., Wong, K. K., & Jänne, P. A. (2007). PF00299804, an irreversible pan-ERBB inhibitor, is effective in lung cancer models with EGFR and ERBB2 mutations that are resistant to gefitinib. *Cancer research*, 67(24), 11924–11932.

Evans, S. F., Irmady, K., Ostrow, K., Kim, T., Nykjaer, A., Saftig, P., Blobel, C., & Hempstead, B. L. (2011). Neuronal brain-derived neurotrophic factor is synthesized in excess, with levels regulated by sortilin-mediated trafficking and lysosomal degradation. *The Journal of biological chemistry*, 286(34), 29556–29567.

Faber, A. C., Corcoran, R. B., Ebi, H., Sequist, L. V., Waltman, B. A., Chung, E., Incio, J., Digumarthy, S. R., Pollack, S. F., Song, Y., Muzikansky, A., Lifshits, E., Roberge, S., Coffman, E. J., Benes, C. H., Gómez, H. L., Baselga, J., Arteaga, C. L., Rivera, M. N., Dias-Santagata, D., ... Engelman, J. A. (2011). BIM expression in treatment-naive cancers predicts responsiveness to kinase inhibitors. *Cancer discovery*, 1(4), 352–365.

Fan, Q. W., Cheng, C. K., Gustafson, W. C., Charron, E., Zipper, P., Wong, R. A., Chen, J., Lau, J., Knobbe-Thomsen, C., Weller, M., Jura, N., Reifenberger, G., Shokat, K. M., & Weiss, W. A. (2013). EGFR phosphorylates tumor-derived EGFRvIII driving STAT3/5 and progression in glioblastoma. *Cancer cell*, 24(4), 438–449.

Fauchais, A. L., Lalloué, F., Lise, M. C., Boumediene, A., Preud'homme, J. L., Vidal, E., & Jauberteau, M. O. (2008). Role of endogenous brain-derived neurotrophic factor and sortilin in B cell survival. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 181(5), 3027–3038.

Felsberg, J., Hentschel, B., Kaulich, K., Gramatzki, D., Zacher, A., Malzkorn, B., Kamp, M., Sabel, M., Simon, M., Westphal, M., Schackert, G., Tonn, J. C., Pietsch, T., von Deimling, A., Loeffler, M., Reifenberger, G., Weller, M., & German Glioma Network (2017). Epidermal Growth Factor Receptor Variant III (EGFRvIII) Positivity in EGFR-Amplified Glioblastomas: Prognostic Role and Comparison between Primary and Recurrent Tumors. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 23(22), 6846–6855.

- Ferguson, K. M., Berger, M. B., Mendrola, J. M., Cho, H. S., Leahy, D. J., & Lemmon, M. A. (2003). EGF activates its receptor by removing interactions that autoinhibit ectodomain dimerization. *Molecular cell*, 11(2), 507–517.
- French, A. R., Tadaki, D. K., Niyogi, S. K., & Lauffenburger, D. A. (1995). Intracellular trafficking of epidermal growth factor family ligands is directly influenced by the pH sensitivity of the receptor/ligand interaction. *The Journal of biological chemistry*, 270(9), 4334–4340.
- Gaestel M. (2006). MAPKAP kinases - MKs - two's company, three's a crowd. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 7(2), 120–130.
- Gan, H. K., Cvrljevic, A. N., & Johns, T. G. (2013). The epidermal growth factor receptor variant III (EGFRvIII): where wild things are altered. *The FEBS journal*, 280(21), 5350–5370.
- Ganley, I. G., Wong, P. M., Gammoh, N., & Jiang, X. (2011). Distinct autophagosomal-lysosomal fusion mechanism revealed by thapsigargin-induced autophagy arrest. *Molecular cell*, 42(6), 731–743.
- Garza-Veloz, I., Martinez-Fierro, M. L., Jaime-Perez, J. C., Carrillo-Sanchez, K., Ramos-Del Hoyo, M. G., Lugo-Trampe, A., Rojas-Martinez, A., Gutierrez-Aguirre, C. H., Gonzalez-Llano, O., Salazar-Riojas, R., Hidalgo-Miranda, A., Gomez-Almaguer, D., & Ortiz-Lopez, R. (2015). Identification of differentially expressed genes associated with prognosis of B acute lymphoblastic leukemia. *Disease markers*, 2015, 828145.
- Gautschi, O., Ratschiller, D., Gugger, M., Betticher, D. C., & Heighway, J. (2007). Cyclin D1 in non-small cell lung cancer: a key driver of malignant transformation. *Lung cancer (Amsterdam, Netherlands)*, 55(1), 1–14.
- Gazzeri S. (2018). L'EGFR nucléaire : un nouveau mode de signalisation dans les cancers [Nuclear EGFR: a new mode of oncogenic signalling in cancer]. *Biologie aujourd'hui*, 212(1-2), 27–33.
- Gebeshuber, C. A., Zatloukal, K., & Martinez, J. (2009). miR-29a suppresses tristetrapirolin, which is a regulator of epithelial polarity and metastasis. *EMBO reports*, 10(4), 400–405.
- Gerber, D. E., Gandhi, L., & Costa, D. B. (2014). Management and future directions in non-small cell lung cancer with known activating mutations. *American Society of Clinical Oncology educational book. American Society of Clinical Oncology. Annual Meeting*, e353–e365.
- Ghaemimanesh, F., Ahmadian, G., Talebi, S., Zarnani, A. H., Behmanesh, M., Hemmati, S., Hadavi, R., Jeddi-Tehrani, M., Farzi, M., Akhondi, M. M., & Rabbani, H. (2014). The effect of sortilin silencing on ovarian carcinoma cells. *Avicenna journal of medical biotechnology*, 6(3), 169–177.
- Giustini, N. P., & Bazhenova, L. (2020). ROS1-rearranged Non-small Cell Lung Cancer. *Thoracic surgery clinics*, 30(2), 147–156.
- Glerup, S., Nykjaer, A., & Vaegter, C. B. (2014). Sortilins in neurotrophic factor signaling. *Handbook of experimental pharmacology*, 220, 165–189.
- Glickman, J. N., & Kornfeld, S. (1993). Mannose 6-phosphate-independent targeting of lysosomal enzymes in I-cell disease B lymphoblasts. *The Journal of cell biology*, 123(1), 99–108.
- Gliemann, J., Nykjaer, A., Petersen, C. M., Jørgensen, K. E., Nielsen, M., Andreasen, P. A., Christensen, E. I., Lookene, A., Olivecrona, G., & Moestrup, S. K. (1994). The multiligand alpha

2-macroglobulin receptor/low density lipoprotein receptor-related protein (alpha 2MR/LRP). Binding and endocytosis of fluid phase and membrane-associated ligands. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 737, 20–38.

Goettsch, C., Kjolby, M., & Aikawa, E. (2018). Sortilin and Its Multiple Roles in Cardiovascular and Metabolic Diseases. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 38(1), 19–25.

Goh, L. K., & Sorkin, A. (2013). Endocytosis of receptor tyrosine kinases. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 5(5), a017459.

Goi, T., Shipitsin, M., Lu, Z., Foster, D. A., Klinz, S. G., & Feig, L. A. (2000). An EGF receptor/Ral-GTPase signaling cascade regulates c-Src activity and substrate specificity. *The EMBO journal*, 19(4), 623–630.

Grandal, M. V., Grøvdal, L. M., Henriksen, L., Andersen, M. H., Holst, M. R., Madhus, I. H., & van Deurs, B. (2012). Differential roles of Grb2 and AP-2 in p38 MAPK- and EGF-induced EGFR internalization. *Traffic (Copenhagen, Denmark)*, 13(4), 576–585.

Guillaudeau, A., Durand, K., Bessette, B., Chaunavel, A., Pommepuy, I., Progetti, F., Robert, S., Caire, F., Rabinovitch-Chable, H., & Labrousse, F. (2012). EGFR soluble isoforms and their transcripts are expressed in meningiomas. *PLoS one*, 7(5), e37204.

Gullick, W. J., Marsden, J. J., Whittle, N., Ward, B., Bobrow, L., & Waterfield, M. D. (1986). Expression of epidermal growth factor receptors on human cervical, ovarian, and vulval carcinomas. *Cancer research*, 46(1), 285–292.

Gusterson, B., Cowley, G., McIlhinney, J., Ozanne, B., Fisher, C., & Reeves, B. (1985). Evidence for increased epidermal growth factor receptors in human sarcomas. *International journal of cancer*, 36(6), 689–693.

Hadzisejdić, I., Mustać, E., Jonjić, N., Petković, M., & Grahovac, B. (2010). Nuclear EGFR in ductal invasive breast cancer: correlation with cyclin-D1 and prognosis. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*, 23(3), 392–403.

Haley, J., Whittle, N., Bennet, P., Kinchington, D., Ullrich, A., & Waterfield, M. (1987). The human EGF receptor gene: structure of the 110 kb locus and identification of sequences regulating its transcription. *Oncogene research*, 1(4), 375–396.

Hampe, W., Riedel, I. B., Lintzel, J., Bader, C. O., Franke, I., & Schaller, H. C. (2000). Ectodomain shedding, translocation and synthesis of SorLA are stimulated by its ligand head activator. *Journal of cell science*, 113 Pt 24, 4475–4485.

Hanada, N., Lo, H. W., Day, C. P., Pan, Y., Nakajima, Y., & Hung, M. C. (2006). Co-regulation of B-Myb expression by E2F1 and EGF receptor. *Molecular carcinogenesis*, 45(1), 10–17.

Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell*, 100(1), 57–70.

Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144(5), 646–674.

Hannafon, B. N., & Ding, W. Q. (2013). Intercellular communication by exosome-derived microRNAs in cancer. *International journal of molecular sciences*, 14(7), 14240–14269.

Harding, J., & Burtneß, B. (2005). Cetuximab: an epidermal growth factor receptor chimeric human-murine monoclonal antibody. *Drugs of today (Barcelona, Spain : 1998)*, 41(2), 107–127.

- Hemmati, S., Zarnani, A. H., Mahmoudi, A. R., Sadeghi, M. R., Soltanghoraee, H., Akhondi, M. M., Tarahomi, M., Jeddi-Tehrani, M., & Rabbani, H. (2009). Ectopic Expression of Sortilin 1 (NTR-3) in Patients with Ovarian Carcinoma. *Avicenna journal of medical biotechnology*, 1(2), 125–131.
- Henriksen, L., Grandal, M. V., Knudsen, S. L., van Deurs, B., & Grøvdal, L. M. (2013). Internalization mechanisms of the epidermal growth factor receptor after activation with different ligands. *PloS one*, 8(3), e58148.
- Herbst, R. S., Heymach, J. V., & Lippman, S. M. (2008). Lung cancer. *The New England journal of medicine*, 359(13), 1367–1380.
- Herbst, R. S., Morgensztern, D., & Boshoff, C. (2018). The biology and management of non-small cell lung cancer. *Nature*, 553(7689), 446–454.
- Hermans-Borgmeyer, I., Hermey, G., Nykjaer, A., & Schaller, C. (1999). Expression of the 100-kDa neurotensin receptor sortilin during mouse embryonal development. *Brain research. Molecular brain research*, 65(2), 216–219.
- Hermey G. (2009). The Vps10p-domain receptor family. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 66(16), 2677–2689.
- Hermey, G., Sjøgaard, S. S., Petersen, C. M., Nykjaer, A., & Gliemann, J. (2006). Tumour necrosis factor alpha-converting enzyme mediates ectodomain shedding of Vps10p-domain receptor family members. *The Biochemical journal*, 395(2), 285–293.
- Herzberg, B., Campo, M. J., & Gainor, J. F. (2017). Immune Checkpoint Inhibitors in Non-Small Cell Lung Cancer. *The oncologist*, 22(1), 81–88.
- Higginbotham, J. N., Demory Beckler, M., Gephart, J. D., Franklin, J. L., Bogatcheva, G., Kremers, G. J., Piston, D. W., Ayers, G. D., McConnell, R. E., Tyska, M. J., & Coffey, R. J. (2011). Amphiregulin exosomes increase cancer cell invasion. *Current biology : CB*, 21(9), 779–786.
- Hill, C. S., & Treisman, R. (1995). Transcriptional regulation by extracellular signals: mechanisms and specificity. *Cell*, 80(2), 199–211.
- Hinrichsen, L., Harborth, J., Andrees, L., Weber, K., & Ungewickell, E. J. (2003). Effect of clathrin heavy chain- and alpha-adaptin-specific small inhibitory RNAs on endocytic accessory proteins and receptor trafficking in HeLa cells. *The Journal of biological chemistry*, 278(46), 45160–45170.
- Holbro, T., Beerli, R. R., Maurer, F., Koziczak, M., Barbas, C. F., 3rd, & Hynes, N. E. (2003). The ErbB2/ErbB3 heterodimer functions as an oncogenic unit: ErbB2 requires ErbB3 to drive breast tumor cell proliferation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(15), 8933–8938.
- Hsu, S. C., & Hung, M. C. (2007). Characterization of a novel tripartite nuclear localization sequence in the EGFR family. *The Journal of biological chemistry*, 282(14), 10432–10440.
- Hsu, S. C., Miller, S. A., Wang, Y., & Hung, M. C. (2009). Nuclear EGFR is required for cisplatin resistance and DNA repair. *American journal of translational research*, 1(3), 249–258.
- Huang, F., Goh, L. K., & Sorkin, A. (2007). EGF receptor ubiquitination is not necessary for its internalization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(43), 16904–16909.

Huang, F., Khvorova, A., Marshall, W., & Sorkin, A. (2004). Analysis of clathrin-mediated endocytosis of epidermal growth factor receptor by RNA interference. *The Journal of biological chemistry*, 279(16), 16657–16661.

Huang, F., Kirkpatrick, D., Jiang, X., Gygi, S., & Sorkin, A. (2006). Differential regulation of EGF receptor internalization and degradation by multiubiquitination within the kinase domain. *Molecular cell*, 21(6), 737–748.

Huang, P. H., Xu, A. M., & White, F. M. (2009). Oncogenic EGFR signaling networks in glioma. *Science signaling*, 2(87), re6.

Huang, W. C., Chen, Y. J., Li, L. Y., Wei, Y. L., Hsu, S. C., Tsai, S. L., Chiu, P. C., Huang, W. P., Wang, Y. N., Chen, C. H., Chang, W. C., Chang, W. C., Chen, A. J., Tsai, C. H., & Hung, M. C. (2011). Nuclear translocation of epidermal growth factor receptor by Akt-dependent phosphorylation enhances breast cancer-resistant protein expression in gefitinib-resistant cells. *The Journal of biological chemistry*, 286(23), 20558–20568.

Hung, L. Y., Tseng, J. T., Lee, Y. C., Xia, W., Wang, Y. N., Wu, M. L., Chuang, Y. H., Lai, C. H., & Chang, W. C. (2008). Nuclear epidermal growth factor receptor (EGFR) interacts with signal transducer and activator of transcription 5 (STAT5) in activating Aurora-A gene expression. *Nucleic acids research*, 36(13), 4337–4351.

Hunter, T., Ling, N., & Cooper, J. A. (1984). Protein kinase C phosphorylation of the EGF receptor at a threonine residue close to the cytoplasmic face of the plasma membrane. *Nature*, 311(5985), 480–483.

Huo, L., Wang, Y. N., Xia, W., Hsu, S. C., Lai, C. C., Li, L. Y., Chang, W. C., Wang, Y., Hsu, M. C., Yu, Y. L., Huang, T. H., Ding, Q., Chen, C. H., Tsai, C. H., & Hung, M. C. (2010). RNA helicase A is a DNA-binding partner for EGFR-mediated transcriptional activation in the nucleus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(37), 16125–16130.

Iida, M., Brand, T. M., Campbell, D. A., Li, C., & Wheeler, D. L. (2013). Yes and Lyn play a role in nuclear translocation of the epidermal growth factor receptor. *Oncogene*, 32(6), 759–767.

Jackman, D. M., Miller, V. A., Cioffredi, L. A., Yeap, B. Y., Jänne, P. A., Riely, G. J., Ruiz, M. G., Giaccone, G., Sequist, L. V., & Johnson, B. E. (2009). Impact of epidermal growth factor receptor and KRAS mutations on clinical outcomes in previously untreated non-small cell lung cancer patients: results of an online tumor registry of clinical trials. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 15(16), 5267–5273.

Jacobsen, L., Madsen, P., Moestrup, S. K., Lund, A. H., Tommerup, N., Nykjaer, A., Sottrup-Jensen, L., Gliemann, J., & Petersen, C. M. (1996). Molecular characterization of a novel human hybrid-type receptor that binds the alpha2-macroglobulin receptor-associated protein. *The Journal of biological chemistry*, 271(49), 31379–31383.

Jadhav, K., & Zhang, Y. (2017). Activating transcription factor 3 in immune response and metabolic regulation. *Liver research*, 1(2), 96–102.

Jaganathan, S., Yue, P., Paladino, D. C., Bogdanovic, J., Huo, Q., & Turkson, J. (2011). A functional nuclear epidermal growth factor receptor, SRC and Stat3 heteromeric complex in pancreatic cancer cells. *PloS one*, 6(5), e19605. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0019605> (Retraction published PLoS One. 2019 Feb 20;14(2):e0212884)

- Ji, Q. S., Chattopadhyay, A., Vecchi, M., & Carpenter, G. (1999). Physiological requirement for both SH2 domains for phospholipase C-gamma1 function and interaction with platelet-derived growth factor receptors. *Molecular and cellular biology*, 19(7), 4961–4970.
- Jin, G., Kim, M. J., Jeon, H. S., Choi, J. E., Kim, D. S., Lee, E. B., Cha, S. I., Yoon, G. S., Kim, C. H., Jung, T. H., & Park, J. Y. (2010). PTEN mutations and relationship to EGFR, ERBB2, KRAS, and TP53 mutations in non-small cell lung cancers. *Lung cancer (Amsterdam, Netherlands)*, 69(3), 279–283.
- Johnson A. C. (1996). Activation of epidermal growth factor receptor gene transcription by phorbol 12-myristate 13-acetate is mediated by activator protein 2. *The Journal of biological chemistry*, 271(6), 3033–3038.
- Johnson, A. C., Ishii, S., Jinno, Y., Pastan, I., & Merlino, G. T. (1988). Epidermal growth factor receptor gene promoter. Deletion analysis and identification of nuclear protein binding sites. *The Journal of biological chemistry*, 263(12), 5693–5699.
- Johnson, I. R., Parkinson-Lawrence, E. J., Keegan, H., Spillane, C. D., Barry-O'Crowley, J., Watson, W. R., Selemidis, S., Butler, L. M., O'Leary, J. J., & Brooks, D. A. (2015). Endosomal gene expression: a new indicator for prostate cancer patient prognosis?. *Oncotarget*, 6(35), 37919–37929.
- Johnson, J. L., Pillai, S., & Chellappan, S. P. (2012). Genetic and biochemical alterations in non-small cell lung cancer. *Biochemistry research international*, 2012, 940405.
- Jotte, R. M., & Spigel, D. R. (2015). Advances in molecular-based personalized non-small-cell lung cancer therapy: targeting epidermal growth factor receptor and mechanisms of resistance. *Cancer medicine*, 4(11), 1621–1632.
- Jura, N., Endres, N. F., Engel, K., Deindl, S., Das, R., Lamers, M. H., Wemmer, D. E., Zhang, X., & Kuriyan, J. (2009). Mechanism for activation of the EGF receptor catalytic domain by the juxtamembrane segment. *Cell*, 137(7), 1293–1307.
- Kahlert, C., & Kalluri, R. (2013). Exosomes in tumor microenvironment influence cancer progression and metastasis. *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)*, 91(4), 431–437.
- Kathiresan, S., Melander, O., Guiducci, C., Surti, A., Burt, N. P., Rieder, M. J., ... Orho-Melander, M. (2008). Six new loci associated with blood low-density lipoprotein cholesterol, high-density lipoprotein cholesterol or triglycerides in humans. *Nature Genetics*, 40(2), 189–197.
- Kim, E. Y., Kim, A., Kim, S. K., & Chang, Y. S. (2017). MYC expression correlates with PD-L1 expression in non-small cell lung cancer. *Lung cancer (Amsterdam, Netherlands)*, 110, 63–67.
- Kim, E., Lee, Y., Lee, H. J., Kim, J. S., Song, B. S., Huh, J. W., Lee, S. R., Kim, S. U., Kim, S. H., Hong, Y., Shim, I., & Chang, K. T. (2010). Implication of mouse Vps26b-Vps29-Vps35 retromer complex in sortilin trafficking. *Biochemical and biophysical research communications*, 403(2), 167–171.
- Kim, H. P., Yoon, Y. K., Kim, J. W., Han, S. W., Hur, H. S., Park, J., Lee, J. H., Oh, D. Y., Im, S. A., Bang, Y. J., & Kim, T. Y. (2009). Lapatinib, a dual EGFR and HER2 tyrosine kinase inhibitor, downregulates thymidylate synthase by inhibiting the nuclear translocation of EGFR and HER2. *PloS one*, 4(6), e5933.

Kjolby, M., Andersen, O. M., Breiderhoff, T., Fjorback, A. W., Pedersen, K. M., Madsen, P., Jansen, P., Heeren, J., Willnow, T. E., & Nykjaer, A. (2010). Sort1, encoded by the cardiovascular risk locus 1p13.3, is a regulator of hepatic lipoprotein export. *Cell metabolism*, 12(3), 213–223.

Kobayashi, S., Boggon, T. J., Dayaram, T., Jänne, P. A., Kocher, O., Meyerson, M., Johnson, B. E., Eck, M. J., Tenen, D. G., & Halmos, B. (2005). EGFR mutation and resistance of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *The New England journal of medicine*, 352(8), 786–792.

Kornfeld, S., & Mellman, I. (1989). The biogenesis of lysosomes. *Annual review of cell biology*, 5, 483–525.

Kulis, M., & Esteller, M. (2010). DNA methylation and cancer. *Advances in genetics*, 70, 27–56.

Kumar, A., Petri, E. T., Halmos, B., & Boggon, T. J. (2008). Structure and clinical relevance of the epidermal growth factor receptor in human cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 26(10), 1742–1751.

Kupriyanova, T. A., & Kandror, K. V. (2000). Cellugyrin is a marker for a distinct population of intracellular Glut4-containing vesicles. *The Journal of biological chemistry*, 275(46), 36263–36268.

Kwak, E. L., Sordella, R., Bell, D. W., Godin-Heymann, N., Okimoto, R. A., Brannigan, B. W., Harris, P. L., Driscoll, D. R., Fidias, P., Lynch, T. J., Rabindran, S. K., McGinnis, J. P., Wissner, A., Sharma, S. V., Isselbacher, K. J., Settleman, J., & Haber, D. A. (2005). Irreversible inhibitors of the EGF receptor may circumvent acquired resistance to gefitinib. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(21), 7665–7670.

Lazzari, C., Karachaliou, N., Bulotta, A., Viganó, M., Mirabile, A., Brioschi, E., Santarpia, M., Gianni, L., Rosell, R., & Gregorc, V. (2018). Combination of immunotherapy with chemotherapy and radiotherapy in lung cancer: is this the beginning of the end for cancer?. *Therapeutic advances in medical oncology*, 10, 1758835918762094.

Lee, H. J., Lan, L., Peng, G., Chang, W. C., Hsu, M. C., Wang, Y. N., Cheng, C. C., Wei, L., Nakajima, S., Chang, S. S., Liao, H. W., Chen, C. H., Lavin, M., Ang, K. K., Lin, S. Y., & Hung, M. C. (2015). Tyrosine 370 phosphorylation of ATM positively regulates DNA damage response. *Cell research*, 25(2), 225–236.

Lee, K. M., Choi, E. J., & Kim, I. A. (2011). microRNA-7 increases radiosensitivity of human cancer cells with activated EGFR-associated signaling. *Radiotherapy and oncology : journal of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology*, 101(1), 171–176.

Lee, R., Kermani, P., Teng, K. K., & Hempstead, B. L. (2001). Regulation of cell survival by secreted proneurotrophins. *Science (New York, N.Y.)*, 294(5548), 1945–1948.

Leloup, N., Lössl, P., Meijer, D. H., Brennich, M., Heck, A., Thies-Weesie, D., & Janssen, B. (2017). Low pH-induced conformational change and dimerization of sortilin triggers endocytosed ligand release. *Nature communications*, 8(1), 1708.

Lemmon, M. A., & Schlessinger, J. (2010). Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell*, 141(7), 1117–1134.

Lemos-González, Y., Rodríguez-Berrocal, F. J., Cordero, O. J., Gómez, C., & Páez de la Cadena, M. (2007). Alteration of the serum levels of the epidermal growth factor receptor and

its ligands in patients with non-small cell lung cancer and head and neck carcinoma. *British journal of cancer*, 96(10), 1569–1578.

Lévêque, R., Corbet, C., Aubert, L., Guilbert, M., Lagadec, C., Adriaenssens, E., Duval, J., Finetti, P., Birnbaum, D., Magné, N., Chopin, V., Bertucci, F., Le Bourhis, X., & Toillon, R. A. (2019). ProNGF increases breast tumor aggressiveness through functional association of TrkA with EphA2. *Cancer letters*, 449, 196–206.

Levinson, A. D., Oppermann, H., Varmus, H. E., & Bishop, J. M. (1980). The purified product of the transforming gene of avian sarcoma virus phosphorylates tyrosine. *The Journal of biological chemistry*, 255(24), 11973–11980.

Li, C. F., Fang, F. M., Wang, J. M., Tzeng, C. C., Tai, H. C., Wei, Y. C., Li, S. H., Lee, Y. T., Wang, Y. H., Yu, S. C., Shiue, Y. L., Chu, P. Y., Wang, W. L., Chen, L. T., & Huang, H. Y. (2012). EGFR nuclear import in gallbladder carcinoma: nuclear phosphorylated EGFR upregulates iNOS expression and confers independent prognostic impact. *Annals of surgical oncology*, 19(2), 443–454.

Li, C., Iida, M., Dunn, E. F., Ghia, A. J., & Wheeler, D. L. (2009). Nuclear EGFR contributes to acquired resistance to cetuximab. *Oncogene*, 28(43), 3801–3813.

Li, L., Zhu, T., Gao, Y. F., Zheng, W., Wang, C. J., Xiao, L., Huang, M. S., Yin, J. Y., Zhou, H. H., & Liu, Z. Q. (2016). Targeting DNA Damage Response in the Radio(Chemo)therapy of Non-Small Cell Lung Cancer. *International journal of molecular sciences*, 17(6), 839.

Liao, R. G., Watanabe, H., Meyerson, M., & Hammerman, P. S. (2012). Targeted therapy for squamous cell lung cancer. *Lung cancer management*, 1(4), 293–300.

Liccardi, G., Hartley, J. A., & Hochhauser, D. (2011). EGFR nuclear translocation modulates DNA repair following cisplatin and ionizing radiation treatment. *Cancer research*, 71(3), 1103–1114.

Lin, B. Z., Pilch, P. F., & Kandror, K. V. (1997). Sortilin is a major protein component of Glut4-containing vesicles. *The Journal of biological chemistry*, 272(39), 24145–24147.

Lin, L., & Bivona, T. G. (2012). Mechanisms of Resistance to Epidermal Growth Factor Receptor Inhibitors and Novel Therapeutic Strategies to Overcome Resistance in NSCLC Patients. *Chemotherapy research and practice*, 2012, 817297.

Lin, S. Y., Makino, K., Xia, W., Matin, A., Wen, Y., Kwong, K. Y., Bourguignon, L., & Hung, M. C. (2001). Nuclear localization of EGF receptor and its potential new role as a transcription factor. *Nature cell biology*, 3(9), 802–808.

Linsel-Nitschke, P., Heeren, J., Aherrahrou, Z., Bruse, P., Gieger, C., Illig, T., Prokisch, H., Heim, K., Doering, A., Peters, A., Meitinger, T., Wichmann, H. E., Hinney, A., Reinehr, T., Roth, C., Ortlepp, J. R., Soufi, M., Sattler, A. M., Schaefer, J., Stark, K., ... Erdmann, J. (2010). Genetic variation at chromosome 1p13.3 affects sortilin mRNA expression, cellular LDL-uptake and serum LDL levels which translates to the risk of coronary artery disease. *Atherosclerosis*, 208(1), 183–189.

Lipponen, P., & Eskelinen, M. (1994). Expression of epidermal growth factor receptor in bladder cancer as related to established prognostic factors, oncoprotein (c-erbB-2, p53) expression and long-term prognosis. *British journal of cancer*, 69(6), 1120–1125.

Liu, B., Wu, X., Liu, B., Wang, C., Liu, Y., Zhou, Q., & Xu, K. (2012). MiR-26a enhances metastasis potential of lung cancer cells via AKT pathway by targeting PTEN. *Biochimica et biophysica acta*, 1822(11), 1692–1704.

Liu, R., Liu, X., Zheng, Y., Gu, J., Xiong, S., Jiang, P., Jiang, X., Huang, E., Yang, Y., Ge, D., & Chu, Y. (2014). MicroRNA-7 sensitizes non-small cell lung cancer cells to paclitaxel. *Oncology letters*, 8(5), 2193–2200.

Lo, H. W., Ali-Seyed, M., Wu, Y., Bartholomeusz, G., Hsu, S. C., & Hung, M. C. (2006). Nuclear-cytoplasmic transport of EGFR involves receptor endocytosis, importin beta1 and CRM1. *Journal of cellular biochemistry*, 98(6), 1570–1583.

Lo, H. W., Cao, X., Zhu, H., & Ali-Osman, F. (2010). Cyclooxygenase-2 is a novel transcriptional target of the nuclear EGFR-STAT3 and EGFRvIII-STAT3 signaling axes. *Molecular cancer research : MCR*, 8(2), 232–245.

Lo, H. W., Hsu, S. C., Ali-Seyed, M., Gunduz, M., Xia, W., Wei, Y., Bartholomeusz, G., Shih, J. Y., & Hung, M. C. (2005). Nuclear interaction of EGFR and STAT3 in the activation of the iNOS/NO pathway. *Cancer cell*, 7(6), 575–589.

Lo, H. W., Xia, W., Wei, Y., Ali-Seyed, M., Huang, S. F., & Hung, M. C. (2005). Novel prognostic value of nuclear epidermal growth factor receptor in breast cancer. *Cancer research*, 65(1), 338–348.

Locatelli-Sanchez M, Couraud S, Souquet PJ. Épidémiologie du cancer bronchique : Données actuelles. *Rev des Mal Respir Actual* 2015;7(4):285–9.

Lowenstein, E. J., Daly, R. J., Batzer, A. G., Li, W., Margolis, B., Lammers, R., Ullrich, A., Skolnik, E. Y., Bar-Sagi, D., & Schlessinger, J. (1992). The SH2 and SH3 domain-containing protein GRB2 links receptor tyrosine kinases to ras signaling. *Cell*, 70(3), 431–442.

Lu, Y., Futtner, C., Rock, J. R., Xu, X., Whitworth, W., Hogan, B. L., & Onaitis, M. W. (2010). Evidence that SOX2 overexpression is oncogenic in the lung. *PloS one*, 5(6), e11022.

Luo, S. Y., & Lam, D. C. (2013). Oncogenic driver mutations in lung cancer. *Translational respiratory medicine*, 1(1), 6.

Lv, Y. C., Gao, A. B., Yang, J., Zhong, L. Y., Jia, B., Ouyang, S. H., Gui, L., Peng, T. H., Sun, S., & Cayabyab, F. S. (2020). Long-term adenosine A1 receptor activation-induced sortilin expression promotes α -synuclein upregulation in dopaminergic neurons. *Neural regeneration research*, 15(4), 712–723.

Lynch, T. J., Bell, D. W., Sordella, R., Gurubhagavatula, S., Okimoto, R. A., Brannigan, B. W., Harris, P. L., Haserlat, S. M., Supko, J. G., Haluska, F. G., Louis, D. N., Christiani, D. C., Settleman, J., & Haber, D. A. (2004). Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *The New England journal of medicine*, 350(21), 2129–2139.

Madshus, I. H., & Stang, E. (2009). Internalization and intracellular sorting of the EGF receptor: a model for understanding the mechanisms of receptor trafficking. *Journal of cell science*, 122(Pt 19), 3433–3439.

Maramotti, S., Paci, M., Manzotti, G., Rapicetta, C., Gugnoni, M., Galeone, C., Cesario, A., & Lococo, F. (2016). Soluble Epidermal Growth Factor Receptors (sEGFRs) in Cancer: Biological Aspects and Clinical Relevance. *International journal of molecular sciences*, 17(4), 593.

- Marcusson, E. G., Horazdovsky, B. F., Cereghino, J. L., Gharakhanian, E., & Emr, S. D. (1994). The sorting receptor for yeast vacuolar carboxypeptidase Y is encoded by the VPS10 gene. *Cell*, 77(4), 579–586.
- Martin, S., Navarro, V., Vincent, J. P., & Mazella, J. (2002). Neurotensin receptor-1 and -3 complex modulates the cellular signaling of neurotensin in the HT29 cell line. *Gastroenterology*, 123(4), 1135–1143.
- Massa, F., Devader, C., Béraud-Dufour, S., Brau, F., Coppola, T., & Mazella, J. (2013). Focal adhesion kinase dependent activation of the PI3 kinase pathway by the functional soluble form of neurotensin receptor-3 in HT29 cells. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 45(5), 952–959.
- Massa, F., Devader, C., Lacas-Gervais, S., Béraud-Dufour, S., Coppola, T., & Mazella, J. (2014). Impairment of HT29 Cancer Cells Cohesion by the Soluble Form of Neurotensin Receptor-3. *Genes & cancer*, 5(7-8), 240–249.
- Mathivanan, S., Ji, H., & Simpson, R. J. (2010). Exosomes: extracellular organelles important in intercellular communication. *Journal of proteomics*, 73(10), 1907–1920.
- Mattoon, D. R., Lamothe, B., Lax, I., & Schlessinger, J. (2004). The docking protein Gab1 is the primary mediator of EGF-stimulated activation of the PI-3K/Akt cell survival pathway. *BMC biology*, 2, 24.
- Mayor, S., Parton, R. G., & Donaldson, J. G. (2014). Clathrin-independent pathways of endocytosis. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 6(6), a016758.
- Mazella, J., & Vincent, J. P. (2006). Functional roles of the NTS2 and NTS3 receptors. *Peptides*, 27(10), 2469–2475.
- Mazella, J., Kitabgi, P., and Vincent, J.P. (1985). Molecular properties of neurotensin receptors in rat brain. Identification of subunits by covalent labeling. *J. Biol. Chem.* 260, 508–514.
- Mazella, J., Zsürger, N., Navarro, V., Chabry, J., Kaghad, M., Caput, D., Ferrara, P., Vita
- Mazella, J., Zsürger, N., Navarro, V., Chabry, J., Kaghad, M., Caput, D., Ferrara, P., Vita, N., Gully, D., Maffrand, J. P., & Vincent, J. P. (1998). The 100-kDa neurotensin receptor is gp95/sortilin, a non-G-protein-coupled receptor. *The Journal of biological chemistry*, 273(41), 26273–26276.
- McCarthy, W. J., Meza, R., Jeon, J., & Moolgavkar, S. H. (2012). Chapter 6: Lung cancer in never smokers: epidemiology and risk prediction models. *Risk analysis : an official publication of the Society for Risk Analysis*, 32 Suppl 1(Suppl 1), S69–S84.
- McClellan, M., Kievit, P., Auersperg, N., & Rodland, K. (1999). Regulation of proliferation and apoptosis by epidermal growth factor and protein kinase C in human ovarian surface epithelial cells. *Experimental cell research*, 246(2), 471–479.
- McDermott, U., Sharma, S. V., Dowell, L., Greninger, P., Montagut, C., Lamb, J., Archibald, H., Raudales, R., Tam, A., Lee, D., Rothenberg, S. M., Supko, J. G., Sordella, R., Ulkus, L. E., Iafrate, A. J., Maheswaran, S., Njauw, C. N., Tsao, H., Drew, L., Hanke, J. H., ... Settleman, J. (2007). Identification of genotype-correlated sensitivity to selective kinase inhibitors by using high-throughput tumor cell line profiling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(50), 19936–19941.
- McMahon, H. T., & Boucrot, E. (2011). Molecular mechanism and physiological functions of clathrin-mediated endocytosis. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 12(8), 517–533.

Mialon, A., Sankinen, M., Söderström, H., Junttila, T. T., Holmström, T., Koivusalo, R., Papageorgiou, A. C., Johnson, R. S., Hietanen, S., Elenius, K., & Westermarck, J. (2005). DNA topoisomerase I is a cofactor for c-Jun in the regulation of epidermal growth factor receptor expression and cancer cell proliferation. *Molecular and cellular biology*, 25(12), 5040–5051.

Mills, N. E., Fishman, C. L., Rom, W. N., Dubin, N., & Jacobson, D. R. (1995). Increased prevalence of K-ras oncogene mutations in lung adenocarcinoma. *Cancer research*, 55(7), 1444–1447.

Mishra PJ, Mishra PJ, Banerjee D, Bertino JR, MiRSNPs or MiRpolymorphisms, new players in microRNA mediated regulation of the cell: introducing microRNA pharmacogenomics, *Cell Cycle*. 7(7): (2008) 853-8

Mitsudomi, T., & Yatabe, Y. (2007). Mutations of the epidermal growth factor receptor gene and related genes as determinants of epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors sensitivity in lung cancer. *Cancer science*, 98(12), 1817–1824.

Mizukoshi, E., & Kaneko, S. (2019). Telomerase-Targeted Cancer Immunotherapy. *International journal of molecular sciences*, 20(8), 1823.

Monami, G., Emiliozzi, V., Bitto, A., Lovat, F., Xu, S. Q., Goldoni, S., Fassan, M., Serrero, G., Gomella, L. G., Baffa, R., Iozzo, R. V., & Morrione, A. (2009). Proepithelin regulates prostate cancer cell biology by promoting cell growth, migration, and anchorage-independent growth. *The American journal of pathology*, 174(3), 1037–1047.

Morgillo, F., Della Corte, C. M., Fasano, M., & Ciardiello, F. (2016). Mechanisms of resistance to EGFR-targeted drugs: lung cancer. *ESMO open*, 1(3), e000060.

Morinville, A., Martin, S., Lavallée, M., Vincent, J. P., Beaudet, A., & Mazella, J. (2004). Internalization and trafficking of neurotensin via NTS3 receptors in HT29 cells. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 36(11), 2153–2168.

Moscato, D. K., Holgado-Madruga, M., Godwin, A. K., Ramirez, G., Gunn, G., Zoltick, P. W., Biegel, J. A., Hayes, R. L., & Wong, A. J. (1995). Frequent expression of a mutant epidermal growth factor receptor in multiple human tumors. *Cancer research*, 55(23), 5536–5539.

Motley, A., Bright, N. A., Seaman, M. N., & Robinson, M. S. (2003). Clathrin-mediated endocytosis in AP-2-depleted cells. *The Journal of cell biology*, 162(5), 909–918.

Munck Petersen, C., Nielsen, M. S., Jacobsen, C., Tauris, J., Jacobsen, L., Gliemann, J., Moestrup, S. K., & Madsen, P. (1999). Propeptide cleavage conditions sortilin/neurotensin receptor-3 for ligand binding. *The EMBO journal*, 18(3), 595–604.

Musunuru, K., Strong, A., Frank-Kamenetsky, M., Lee, N. E., Ahfeldt, T., Sachs, K. V., Li, X., Li, H., Kuperwasser, N., Ruda, V. M., Pirruccello, J. P., Muchmore, B., Prokunina-Olsson, L., Hall, J. L., Schadt, E. E., Morales, C. R., Lund-Katz, S., Phillips, M. C., Wong, J., Cantley, W., ... Rader, D. J. (2010). From noncoding variant to phenotype via SORT1 at the 1p13 cholesterol locus. *Nature*, 466(7307), 714–719.

Nagane, M., Coufal, F., Lin, H., Bögl, O., Cavenee, W. K., & Huang, H. J. (1996). A common mutant epidermal growth factor receptor confers enhanced tumorigenicity on human glioblastoma cells by increasing proliferation and reducing apoptosis. *Cancer research*, 56(21), 5079–5086.

Nakagawa, T., Takeuchi, S., Yamada, T., Ebi, H., Sano, T., Nanjo, S., Ishikawa, D., Sato, M., Hasegawa, Y., Sekido, Y., & Yano, S. (2013). EGFR-TKI resistance due to BIM polymorphism can be circumvented in combination with HDAC inhibition. *Cancer research*, 73(8), 2428–2434.

Navarro, V., Vincent, J. P., & Mazella, J. (2002). Shedding of the luminal domain of the neurotensin receptor-3/sortilin in the HT29 cell line. *Biochemical and biophysical research communications*, 298(5), 760–764.

Navarro, A., Molins, L., Marrades, R. M., Moises, J., Viñolas, N., Morales, S., Canals, J., Castellano, J. J., Ramírez, J., & Monzo, M. (2019). Exosome Analysis in Tumor-Draining Pulmonary Vein Identifies NSCLC Patients with Higher Risk of Relapse after Curative Surgery. *Cancers*, 11(2), 249.

Nielsen, M. S., Jacobsen, C., Olivecrona, G., Gliemann, J., & Petersen, C. M. (1999). Sortilin/neurotensin receptor-3 binds and mediates degradation of lipoprotein lipase. *The Journal of biological chemistry*, 274(13), 8832–8836.

Nielsen, M. S., Madsen, P., Christensen, E. I., Nykjaer, A., Gliemann, J., Kasper, D., Pohlmann, R., & Petersen, C. M. (2001). The sortilin cytoplasmic tail conveys Golgi-endosome transport and binds the VHS domain of the GGA2 sorting protein. *The EMBO journal*, 20(9), 2180–2190.

Nilsson, S. K., Christensen, S., Raarup, M. K., Ryan, R. O., Nielsen, M. S., & Olivecrona, G. (2008). Endocytosis of apolipoprotein A-V by members of the low density lipoprotein receptor and the VPS10p domain receptor families. *The Journal of biological chemistry*, 283(38), 25920–25927.

Nishimura, Y., Bereczky, B., & Ono, M. (2007). The EGFR inhibitor gefitinib suppresses ligand-stimulated endocytosis of EGFR via the early/late endocytic pathway in non-small cell lung cancer cell lines. *Histochemistry and cell biology*, 127(5), 541–553.

Nishimura, Y., Yoshioka, K., Bereczky, B., & Itoh, K. (2008). Evidence for efficient phosphorylation of EGFR and rapid endocytosis of phosphorylated EGFR via the early/late endocytic pathway in a gefitinib-sensitive non-small cell lung cancer cell line. *Molecular cancer*, 7, 42.

Nyborg, A. C., Ladd, T. B., Zwizinski, C. W., Lah, J. J., & Golde, T. E. (2006). Sortilin, SorCS1b, and SorLA Vps10p sorting receptors, are novel gamma-secretase substrates. *Molecular neurodegeneration*, 1, 3.

Nykjaer, A., & Willnow, T. E. (2012). Sortilin: a receptor to regulate neuronal viability and function. *Trends in neurosciences*, 35(4), 261–270.

Nykjaer, A., Lee, R., Teng, K. K., Jansen, P., Madsen, P., Nielsen, M. S., Jacobsen, C., Kliemann, M., Schwarz, E., Willnow, T. E., Hempstead, B. L., & Petersen, C. M. (2004). Sortilin is essential for proNGF-induced neuronal cell death. *Nature*, 427(6977), 843–848.

Olayioye, M. A., Beuvink, I., Horsch, K., Daly, J. M., & Hynes, N. E. (1999). ErbB receptor-induced activation of stat transcription factors is mediated by Src tyrosine kinases. *The Journal of biological chemistry*, 274(24), 17209–17218.

Olsen, J. V., Blagoev, B., Gnäd, F., Macek, B., Kumar, C., Mortensen, P., & Mann, M. (2006). Global, in vivo, and site-specific phosphorylation dynamics in signaling networks. *Cell*, 127(3), 635–648.

- Ono, M., & Kuwano, M. (2006). Molecular mechanisms of epidermal growth factor receptor (EGFR) activation and response to gefitinib and other EGFR-targeting drugs. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 12(24), 7242–7251.
- Owada, M., & Neufeld, E. F. (1982). Is there a mechanism for introducing acid hydrolases into liver lysosomes that is independent of mannose 6-phosphate recognition? Evidence from I-cell disease. *Biochemical and biophysical research communications*, 105(3), 814–820.
- Oxnard, G. R., Binder, A., & Jänne, P. A. (2013). New targetable oncogenes in non-small-cell lung cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 31(8), 1097–1104.
- Packham, S., Lin, Y., Zhao, Z., Warsito, D., Rutishauser, D., & Larsson, O. (2015). The Nucleus-Localized Epidermal Growth Factor Receptor Is SUMOylated. *Biochemistry*, 54(33), 5157–5166.
- Paik, K. H., Song, S. M., Ki, C. S., Yu, H. W., Kim, J. S., Min, K. H., Chang, S. H., Yoo, E. J., Lee, I. J., Kwan, E. K., Han, S. J., & Jin, D. K. (2005). Identification of mutations in the GNPTA (MGC4170) gene coding for GlcNAc-phosphotransferase alpha/beta subunits in Korean patients with mucopolidosis type II or type IIIA. *Human mutation*, 26(4), 308–314.
- Pan, X., Zaarur, N., Singh, M., Morin, P., & Kandror, K. V. (2017). Sortilin and retromer mediate retrograde transport of Glut4 in 3T3-L1 adipocytes. *Molecular biology of the cell*, 28(12), 1667–1675.
- Pao, W., & Hutchinson, K. E. (2012). Chipping away at the lung cancer genome. *Nature medicine*, 18(3), 349–351.
- Pao, W., Miller, V. A., Politi, K. A., Riely, G. J., Somwar, R., Zakowski, M. F., Kris, M. G., & Varmus, H. (2005). Acquired resistance of lung adenocarcinomas to gefitinib or erlotinib is associated with a second mutation in the EGFR kinase domain. *PLoS medicine*, 2(3), e73.
- Pao, W., Miller, V., Zakowski, M., Doherty, J., Politi, K., Sarkaria, I., Singh, B., Heelan, R., Rusch, V., Fulton, L., Mardis, E., Kupfer, D., Wilson, R., Kris, M., & Varmus, H. (2004). EGF receptor gene mutations are common in lung cancers from "never smokers" and are associated with sensitivity of tumors to gefitinib and erlotinib. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(36), 13306–13311.
- Park, J. O., Choi, D. Y., Choi, D. S., Kim, H. J., Kang, J. W., Jung, J. H., Lee, J. H., Kim, J., Freeman, M. R., Lee, K. Y., Gho, Y. S., & Kim, K. P. (2013). Identification and characterization of proteins isolated from microvesicles derived from human lung cancer pleural effusions. *Proteomics*, 13(14), 2125–2134.
- Parson, S.H. (2009). *Clinically Oriented Anatomy*, 6th edn. J. Anat. 215, 474
- Patterson, R. L., van Rossum, D. B., Nikolaidis, N., Gill, D. L., & Snyder, S. H. (2005). Phospholipase C-gamma: diverse roles in receptor-mediated calcium signaling. *Trends in biochemical sciences*, 30(12), 688–697.
- Pearse, B. M., & Robinson, M. S. (1990). Clathrin, adaptors, and sorting. *Annual review of cell biology*, 6, 151–171.
- Perez-Torres, M., Valle, B. L., Maihle, N. J., Negron-Vega, L., Nieves-Alicea, R., & Cora, E. M. (2008). Shedding of epidermal growth factor receptor is a regulated process that occurs with overexpression in malignant cells. *Experimental cell research*, 314(16), 2907–2918.

Peschard, P., & Park, M. (2003). Escape from Cbl-mediated downregulation: a recurrent theme for oncogenic deregulation of receptor tyrosine kinases. *Cancer cell*, 3(6), 519–523.

Petersen, C. M., Nielsen, M. S., Nykjaer, A., Jacobsen, L., Tommerup, N., Rasmussen, H. H., Roigaard, H., Gliemann, J., Madsen, P., & Moestrup, S. K. (1997). Molecular identification of a novel candidate sorting receptor purified from human brain by receptor-associated protein affinity chromatography. *The Journal of biological chemistry*, 272(6), 3599–3605.

Pi, C., Xu, C. R., Zhang, M. F., Peng, X. X., Wei, X. W., Gao, X., Yan, H. H., & Zhou, Q. (2018). EGFR mutations in early-stage and advanced-stage lung adenocarcinoma: Analysis based on large-scale data from China. *Thoracic cancer*, 9(7), 814–819.

Piccione, E. C., Lieu, T. J., Gentile, C. F., Williams, T. R., Connolly, A. J., Godwin, A. K., Koong, A. C., & Wong, A. J. (2012). A novel epidermal growth factor receptor variant lacking multiple domains directly activates transcription and is overexpressed in tumors. *Oncogene*, 31(24), 2953–2967.

Pines, G., Köstler, W. J., & Yarden, Y. (2010). Oncogenic mutant forms of EGFR: lessons in signal transduction and targets for cancer therapy. *FEBS letters*, 584(12), 2699–2706.

Pinet, S., Bessette, B., Vedrenne, N., Lacroix, A., Richard, L., Jauberteau, M. O., Battu, S., & Lalloué, F. (2016). TrkB-containing exosomes promote the transfer of glioblastoma aggressiveness to YKL-40-inactivated glioblastoma cells. *Oncotarget*, 7(31), 50349–50364.

Pirault, J., Polyzos, K. A., Petri, M. H., Ketelhuth, D., Bäck, M., & Hansson, G. K. (2017). The inflammatory cytokine interferon-gamma inhibits sortilin-1 expression in hepatocytes via the JAK/STAT pathway. *European journal of immunology*, 47(11), 1918–1924.

Pirker, R., Pereira, J. R., von Pawel, J., Krzakowski, M., Ramlau, R., Park, K., de Marinis, F., Eberhardt, W. E., Paz-Ares, L., Störkel, S., Schumacher, K. M., von Heydebreck, A., Celik, I., & O'Byrne, K. J. (2012). EGFR expression as a predictor of survival for first-line chemotherapy plus cetuximab in patients with advanced non-small-cell lung cancer: analysis of data from the phase 3 FLEX study. *The Lancet. Oncology*, 13(1), 33–42.

Poli, V., Fagnocchi, L., Fasciani, A., Cherubini, A., Mazzoleni, S., Ferrillo, S., Miluzio, A., Gaudio, G., Vaira, V., Turdo, A., Gaggianesi, M., Chinnici, A., Lipari, E., Biciato, S., Bosari, S., Todaro, M., & Zippo, A. (2018). MYC-driven epigenetic reprogramming favors the onset of tumorigenesis by inducing a stem cell-like state. *Nature communications*, 9(1), 1024.

Poole, E. M., Curtin, K., Hsu, L., Kulmacz, R. J., Duggan, D. J., Makar, K. W., Xiao, L., Carlson, C. S., Slattery, M. L., Caan, B. J., Potter, J. D., & Ulrich, C. M. (2011). Genetic variability in EGFR, Src and HER2 and risk of colorectal adenoma and cancer. *International journal of molecular epidemiology and genetics*, 2(4), 300–315.

Popper H. H. (2016). Progression and metastasis of lung cancer. *Cancer metastasis reviews*, 35(1), 75–91.

Psyrrri, A., Yu, Z., Weinberger, P. M., Sasaki, C., Haffty, B., Camp, R., Rimm, D., & Burtneß, B. A. (2005). Quantitative determination of nuclear and cytoplasmic epidermal growth factor receptor expression in oropharyngeal squamous cell cancer by using automated quantitative analysis. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 11(16), 5856–5862.

Pylypenko, O., & Goud, B. (2012). Posttranslational modifications of Rab GTPases help their insertion into membranes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(15), 5555–5556.

Quistgaard, E. M., Madsen, P., Grøftehaug, M. K., Nissen, P., Petersen, C. M., & Thirup, S. S. (2009). Ligands bind to Sortilin in the tunnel of a ten-bladed beta-propeller domain. *Nature structural & molecular biology*, 16(1), 96–98.

Raica, M., & Cimpean, A. M. (2010). Platelet-Derived Growth Factor (PDGF)/PDGF Receptors (PDGFR) Axis as Target for Antitumor and Antiangiogenic Therapy. *Pharmaceuticals (Basel, Switzerland)*, 3(3), 572–599.

Raju, U., Riesterer, O., Wang, Z. Q., Molkentine, D. P., Molkentine, J. M., Johnson, F. M., Glisson, B., Milas, L., & Ang, K. K. (2012). Dasatinib, a multi-kinase inhibitor increased radiation sensitivity by interfering with nuclear localization of epidermal growth factor receptor and by blocking DNA repair pathways. *Radiotherapy and oncology : journal of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology*, 105(2), 241–249.

Rami-Porta, R., Asamura, H., & Goldstraw, P. (2015). Predicting the prognosis of lung cancer: the evolution of tumor, node and metastasis in the molecular age-challenges and opportunities. *Translational lung cancer research*, 4(4), 415–423.

Raposo, G., & Stoorvogel, W. (2013). Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends. *The Journal of cell biology*, 200(4), 373–383.

Rapp, U. R., Korn, C., Ceteci, F., Karreman, C., Luetkenhaus, K., Serafin, V., Zanucco, E., Castro, I., & Potapenko, T. (2009). MYC is a metastasis gene for non-small-cell lung cancer. *PLoS one*, 4(6), e6029.

Record, M., Carayon, K., Poirot, M., & Silvente-Poirot, S. (2014). Exosomes as new vesicular lipid transporters involved in cell-cell communication and various pathophysiological processes. *Biochimica et biophysica acta*, 1841(1), 108–120.

Red Brewer, M., Yun, C. H., Lai, D., Lemmon, M. A., Eck, M. J., & Pao, W. (2013). Mechanism for activation of mutated epidermal growth factor receptors in lung cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(38), E3595–E3604.

Reimon, J., Steuer, C. E., Ramalingam, S. S., & Felip, E. (2018). Osimertinib and other third-generation EGFR TKI in EGFR-mutant NSCLC patients. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology*, 29(suppl_1), i20–i27.

Rezgouli, M., Hermey, G., Riedel, I. B., Hampe, W., Schaller, H. C., & Hermans-Borgmeyer, I. (2001). Identification of SorCS2, a novel member of the VPS10 domain containing receptor family, prominently expressed in the developing mouse brain. *Mechanisms of development*, 100(2), 335–338.

Rhost, S., Hughes, É., Harrison, H., Rafnsdottir, S., Jacobsson, H., Gregersson, P., Magnusson, Y., Fitzpatrick, P., Andersson, D., Berger, K., Ståhlberg, A., & Landberg, G. (2018). Sortilin inhibition limits secretion-induced progranulin-dependent breast cancer progression and cancer stem cell expansion. *Breast cancer research : BCR*, 20(1), 137.

Richardson, G. E., & Johnson, B. E. (1993). The biology of lung cancer. *Seminars in oncology*, 20(2), 105–127.

Rock, J. R., Randell, S. H., & Hogan, B. L. (2010). Airway basal stem cells: a perspective on their roles in epithelial homeostasis and remodeling. *Disease models & mechanisms*, 3(9-10), 545–556.

Roepstorff, K., Grandal, M. V., Henriksen, L., Knudsen, S. L., Lerdrup, M., Grøvdal, L., Willumsen, B. M., & van Deurs, B. (2009). Differential effects of EGFR ligands on endocytic sorting of the receptor. *Traffic (Copenhagen, Denmark)*, 10(8), 1115–1127.

Rosell, R., Carcereny, E., Gervais, R., Vergnenegre, A., Massuti, B., Felip, E., Palmero, R., Garcia-Gomez, R., Pallares, C., Sanchez, J. M., Porta, R., Cobo, M., Garrido, P., Longo, F., Moran, T., Insa, A., De Marinis, F., Corre, R., Bover, I., Illiano, A., ... Spanish Lung Cancer Group in collaboration with Groupe Français de Pneumo-Cancérologie and Associazione Italiana Oncologia Toracica (2012). Erlotinib versus standard chemotherapy as first-line treatment for European patients with advanced EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer (EURTAC): a multicentre, open-label, randomised phase 3 trial. *The Lancet. Oncology*, 13(3), 239–246.

Rosell, R., Robinet, G., Szczesna, A., Ramlau, R., Constenla, M., Mennezier, B. C., Pfeifer, W., O'Byrne, K. J., Welte, T., Kolb, R., Pirker, R., Chemaissani, A., Perol, M., Ranson, M. R., Ellis, P. A., Pilz, K., & Reck, M. (2008). Randomized phase II study of cetuximab plus cisplatin/vinorelbine compared with cisplatin/vinorelbine alone as first-line therapy in EGFR-expressing advanced non-small-cell lung cancer. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology*, 19(2), 362–369.

Roselli, S., Pundavela, J., Demont, Y., Faulkner, S., Keene, S., Attia, J., Jiang, C. C., Zhang, X. D., Walker, M. M., & Hondermarck, H. (2015). Sortilin is associated with breast cancer aggressiveness and contributes to tumor cell adhesion and invasion. *Oncotarget*, 6(12), 10473–10486.

Roskoski R., Jr (2014). The ErbB/HER family of protein-tyrosine kinases and cancer. *Pharmacological research*, 79, 34–74.

Rostène, W. H., & Alexander, M. J. (1997). Neurotensin and neuroendocrine regulation. *Frontiers in neuroendocrinology*, 18(2), 115–173.

Saj, A., & Lai, E. C. (2011). Control of microRNA biogenesis and transcription by cell signaling pathways. *Current opinion in genetics & development*, 21(4), 504–510.

Salmeen, A., & Barford, D. (2005). Functions and mechanisms of redox regulation of cysteine-based phosphatases. *Antioxidants & redox signaling*, 7(5-6), 560–577.

Samet, J. M., Avila-Tang, E., Boffetta, P., Hannan, L. M., Olivo-Marston, S., Thun, M. J., & Rudin, C. M. (2009). Lung cancer in never smokers: clinical epidemiology and environmental risk factors. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 15(18), 5626–5645.

Sánchez, E., Bergareche, A., Krebs, C. E., Gorostidi, A., Makarov, V., Ruiz-Martinez, J., Chorny, A., Lopez de Munain, A., Marti-Masso, J. F., & Paisán-Ruiz, C. (2015). SORT1 Mutation Resulting in Sortilin Deficiency and p75(NTR) Upregulation in a Family With Essential Tremor. *ASN neuro*, 7(4), 1759091415598290.

Sanderson, M. P., Keller, S., Alonso, A., Riedle, S., Dempsey, P. J., & Altevogt, P. (2008). Generation of novel, secreted epidermal growth factor receptor (EGFR/ErbB1) isoforms via metalloprotease-dependent ectodomain shedding and exosome secretion. *Journal of cellular biochemistry*, 103(6), 1783–1797.

Santoni-Rugiu, E., Melchior, L. C., Urbanska, E. M., Jakobsen, J. N., Stricker, K., Grauslund, M., & Sørensen, J. B. (2019). Intrinsic resistance to EGFR-Tyrosine Kinase Inhibitors in EGFR-Mutant Non-Small Cell Lung Cancer: Differences and Similarities with Acquired Resistance. *Cancers*, 11(7), 923.

Sard, L., Accornero, P., Tornielli, S., Delia, D., Bunone, G., Campiglio, M., Colombo, M. P., Gramegna, M., Croce, C. M., Pierotti, M. A., & Sozzi, G. (1999). The tumor-suppressor gene FHIT is involved in the regulation of apoptosis and in cell cycle control. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(15), 8489–8492.

Sato K. (2013). Cellular functions regulated by phosphorylation of EGFR on Tyr845. *International journal of molecular sciences*, 14(6), 10761–10790.

Sato, K., Sato, A., Aoto, M., & Fukami, Y. (1995). c-Src phosphorylates epidermal growth factor receptor on tyrosine 845. *Biochemical and biophysical research communications*, 215(3), 1078–1087.

Saylor, P. J., Escudier, B., & Michaelson, M. D. (2012). Importance of fibroblast growth factor receptor in neovascularization and tumor escape from antiangiogenic therapy. *Clinical genitourinary cancer*, 10(2), 77–83.

Scaltriti, M., & Baselga, J. (2006). The epidermal growth factor receptor pathway: a model for targeted therapy. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 12(18), 5268–5272.

Schenck, A., Goto-Silva, L., Collinet, C., Rhinn, M., Giner, A., Habermann, B., Brand, M., & Zerial, M. (2008). The endosomal protein Appl1 mediates Akt substrate specificity and cell survival in vertebrate development. *Cell*, 133(3), 486–497.

Schmidt, M., Furnari, F. B., Cavenee, W. K., & Bögl, O. (2003). Epidermal growth factor receptor signaling intensity determines intracellular protein interactions, ubiquitination, and internalization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(11), 6505–6510.

Schönwasser, D. C., Marais, R. M., Marshall, C. J., & Parker, P. J. (1998). Activation of the mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase pathway by conventional, novel, and atypical protein kinase C isoforms. *Molecular and cellular biology*, 18(2), 790–798.

Sen, B., & Johnson, F. M. (2011). Regulation of SRC family kinases in human cancers. *Journal of signal transduction*, 2011, 865819.

Sequist, L. V., Waltman, B. A., Dias-Santagata, D., Digumarthy, S., Turke, A. B., Fidias, P., Bergethon, K., Shaw, A. T., Gettinger, S., Cospoer, A. K., Akhavanfard, S., Heist, R. S., Temel, J., Christensen, J. G., Wain, J. C., Lynch, T. J., Vernovsky, K., Mark, E. J., Lanuti, M., Iafrate, A. J., ... Engelman, J. A. (2011). Genotypic and histological evolution of lung cancers acquiring resistance to EGFR inhibitors. *Science translational medicine*, 3(75), 75ra26.

Sgambato, A., Casaluca, F., Maione, P., Rossi, A., Ciardiello, F., & Gridelli, C. (2014). Cetuximab in advanced non-small cell lung cancer (NSCLC): the showdown?. *Journal of thoracic disease*, 6(6), 578–580.

Sharma, S. V., Bell, D. W., Settleman, J., & Haber, D. A. (2007). Epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer. *Nature reviews. Cancer*, 7(3), 169–181.

Shaw, R. J., & Cantley, L. C. (2006). Ras, PI(3)K and mTOR signalling controls tumour cell growth. *Nature*, 441(7092), 424–430.

Shepherd, F. A., Rodrigues Pereira, J., Ciuleanu, T., Tan, E. H., Hirsh, V., Thongprasert, S., Campos, D., Maoleekoonpiroj, S., Smylie, M., Martins, R., van Kooten, M., Dediu, M., Findlay, B., Tu, D., Johnston, D., Bezjak, A., Clark, G., Santabárbara, P., Seymour, L., & National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group (2005). Erlotinib in previously treated non-small-cell lung cancer. *The New England journal of medicine*, 353(2), 123–132.

Shi, J., & Kandror, K. V. (2005). Sortilin is essential and sufficient for the formation of Glut4 storage vesicles in 3T3-L1 adipocytes. *Developmental cell*, 9(1), 99–108.

Shi, Y., Tao, Y., Jiang, Y., Xu, Y., Yan, B., Chen, X., Xiao, L., & Cao, Y. (2012). Nuclear epidermal growth factor receptor interacts with transcriptional intermediary factor 2 to activate cyclin D1 gene expression triggered by the oncoprotein latent membrane protein 1. *Carcinogenesis*, 33(8), 1468–1478.

Shigematsu, H., Takahashi, T., Nomura, M., Majmudar, K., Suzuki, M., Lee, H., Wistuba, I. I., Fong, K. M., Toyooka, S., Shimizu, N., Fujisawa, T., Minna, J. D., & Gazdar, A. F. (2005). Somatic mutations of the HER2 kinase domain in lung adenocarcinomas. *Cancer research*, 65(5), 1642–1646.

Shiloh, Y., & Ziv, Y. (2013). The ATM protein kinase: regulating the cellular response to genotoxic stress, and more. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 14(4), 197–210.

Shtiegman, K., Kochupurakkal, B. S., Zwang, Y., Pines, G., Starr, A., Vexler, A., Citri, A., Katz, M., Lavi, S., Ben-Basat, Y., Benjamin, S., Corso, S., Gan, J., Yosef, R. B., Giordano, S., & Yarden, Y. (2007). Defective ubiquitinylation of EGFR mutants of lung cancer confers prolonged signaling. *Oncogene*, 26(49), 6968–6978.

Sibilia, M., Kroismayr, R., Lichtenberger, B. M., Natarajan, A., Hecking, M., & Holcman, M. (2007). The epidermal growth factor receptor: from development to tumorigenesis. *Differentiation; research in biological diversity*, 75(9), 770–787.

Sigismund, S., Algisi, V., Nappo, G., Conte, A., Pascolutti, R., Cuomo, A., Bonaldi, T., Argenzio, E., Verhoef, L. G., Maspero, E., Bianchi, F., Capuani, F., Ciliberto, A., Polo, S., & Di Fiore, P. P. (2013). Threshold-controlled ubiquitination of the EGFR directs receptor fate. *The EMBO journal*, 32(15), 2140–2157.

Sigismund, S., Argenzio, E., Tosoni, D., Cavallaro, E., Polo, S., & Di Fiore, P. P. (2008). Clathrin-mediated internalization is essential for sustained EGFR signaling but dispensable for degradation. *Developmental cell*, 15(2), 209–219.

Sigismund, S., Avanzato, D., & Lanzetti, L. (2018). Emerging functions of the EGFR in cancer. *Molecular oncology*, 12(1), 3–20.

Sigismund, S., Woelk, T., Puri, C., Maspero, E., Tacchetti, C., Transidico, P., Di Fiore, P. P., & Polo, S. (2005). Clathrin-independent endocytosis of ubiquitinated cargos. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(8), 2760–2765.

Simons, M., & Raposo, G. (2009). Exosomes--vesicular carriers for intercellular communication. *Current opinion in cell biology*, 21(4), 575–581.

Siwak, D. R., Carey, M., Hennessy, B. T., Nguyen, C. T., McGahren Murray, M. J., Nolden, L., & Mills, G. B. (2010). Targeting the epidermal growth factor receptor in epithelial ovarian cancer: current knowledge and future challenges. *Journal of oncology*, 2010, 568938.

Skog, J., Würdinger, T., van Rijn, S., Meijer, D. H., Gainche, L., Sena-Esteves, M., Curry, W. T., Jr, Carter, B. S., Krichevsky, A. M., & Breakefield, X. O. (2008). Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers. *Nature cell biology*, 10(12), 1470–1476.

Soilu-Hänninen, M., Ekert, P., Bucci, T., Syroid, D., Bartlett, P. F., & Kilpatrick, T. J. (1999). Nerve growth factor signaling through p75 induces apoptosis in Schwann cells via a Bcl-2-independent pathway. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 19(12), 4828–4838.

Song, F., Zhou, M., Wang, B., Shi, B., Jiang, H., Zhang, J., & Li, Z. (2016). Weak binding to E3 ubiquitin ligase c-Cbl increases EGFRvA protein stability. *FEBS letters*, 590(9), 1345–1353.

Sorkin, A., & Goh, L. K. (2008). Endocytosis and intracellular trafficking of ErbBs. *Experimental cell research*, 314(17), 3093–3106.

Sos, M. L., & Thomas, R. K. (2012). Genetic insight and therapeutic targets in squamous-cell lung cancer. *Oncogene*, 31(46), 4811–4814.

Spiro, S. G., Gould, M. K., Colice, G. L., & American College of Chest Physicians (2007). Initial evaluation of the patient with lung cancer: symptoms, signs, laboratory tests, and paraneoplastic syndromes: ACCP evidenced-based clinical practice guidelines (2nd edition). *Chest*, 132(3 Suppl), 149S–160S.

Stamos, J., Sliwkowski, M. X., & Eigenbrot, C. (2002). Structure of the epidermal growth factor receptor kinase domain alone and in complex with a 4-anilinoquinazoline inhibitor. *The Journal of biological chemistry*, 277(48), 46265–46272.

Stephens, P., Hunter, C., Bignell, G., Edkins, S., Davies, H., Teague, J., Stevens, C., O'Meara, S., Smith, R., Parker, A., Barthorpe, A., Blow, M., Brackenbury, L., Butler, A., Clarke, O., Cole, J., Dicks, E., Dike, A., Drozd, A., Edwards, K., ... Stratton, M. R. (2004). Lung cancer: intragenic ERBB2 kinase mutations in tumours. *Nature*, 431(7008), 525–526.

Stoscheck, C. M., & Carpenter, G. (1984). Characterization of the metabolic turnover of epidermal growth factor receptor protein in A-431 cells. *Journal of cellular physiology*, 120(3), 296–302.

Strippoli, A., Cocomazzi, A., Basso, M., Cenci, T., Ricci, R., Pierconti, F., Cassano, A., Fiorentino, V., Barone, C., Bria, E., Ricci-Vitiani, L., Tortora, G., Larocca, L. M., & Martini, M. (2020). c-MYC Expression Is a Possible Keystone in the Colorectal Cancer Resistance to EGFR Inhibitors. *Cancers*, 12(3), 638.

Su, K. Y., Chen, H. Y., Li, K. C., Kuo, M. L., Yang, J. C., Chan, W. K., Ho, B. C., Chang, G. C., Shih, J. Y., Yu, S. L., & Yang, P. C. (2012). Pretreatment epidermal growth factor receptor (EGFR) T790M mutation predicts shorter EGFR tyrosine kinase inhibitor response duration in patients with non-small-cell lung cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 30(4), 433–440.

Subramanian, J., & Govindan, R. (2007). Lung cancer in never smokers: a review. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 25(5), 561–570.

Suda, K., Onozato, R., Yatabe, Y., & Mitsudomi, T. (2009). EGFR T790M mutation: a double role in lung cancer cell survival?. *Journal of thoracic oncology : official publication of the International Association for the Study of Lung Cancer*, 4(1), 1–4.

Sun, S., Schiller, J. H., & Gazdar, A. F. (2007). Lung cancer in never smokers--a different disease. *Nature reviews. Cancer*, 7(10), 778–790.

Sutedja G. (2003). New techniques for early detection of lung cancer. *The European respiratory journal. Supplement*, 39, 57s–66s.

Tabara, K., Kanda, R., Sonoda, K., Kubo, T., Murakami, Y., Kawahara, A., Azuma, K., Abe, H., Kage, M., Yoshinaga, A., Tahira, T., Hayashi, K., Arao, T., Nishio, K., Rosell, R., Kuwano, M., & Ono, M. (2012). Loss of activating EGFR mutant gene contributes to acquired resistance to EGFR tyrosine kinase inhibitors in lung cancer cells. *PLoS one*, 7(7), e41017.

Talbot, H., Saada, S., Naves, T., Gallet, P. F., Fauchais, A. L., & Jauberteau, M. O. (2019). Regulatory Roles of Sortilin and SorLA in Immune-Related Processes. *Frontiers in pharmacology*, 9, 1507.

Tanimoto, R., Morcavallo, A., Terracciano, M., Xu, S. Q., Stefanello, M., Buraschi, S., Lu, K. G., Bagley, D. H., Gomella, L. G., Scotlandi, K., Belfiore, A., Iozzo, R. V., & Morrione, A. (2015). Sortilin regulates progranulin action in castration-resistant prostate cancer cells. *Endocrinology*, 156(1), 58–70.

Tanimoto, R., Palladino, C., Xu, S. Q., Buraschi, S., Neill, T., Gomella, L. G., Peiper, S. C., Belfiore, A., Iozzo, R. V., & Morrione, A. (2017). The perlecan-interacting growth factor progranulin regulates ubiquitination, sorting, and lysosomal degradation of sortilin. *Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology*, 64, 27–39.

Tann, J. Y., Wong, L. W., Sajikumar, S., & Ibáñez, C. F. (2019). Abnormal TDP-43 function impairs activity-dependent BDNF secretion, synaptic plasticity, and cognitive behavior through altered Sortilin splicing. *The EMBO journal*, 38(5), e100989.

Tanner, K. G., & Kyte, J. (1999). Dimerization of the extracellular domain of the receptor for epidermal growth factor containing the membrane-spanning segment in response to treatment with epidermal growth factor. *The Journal of biological chemistry*, 274(50), 35985–35990.

Teng, H. K., Teng, K. K., Lee, R., Wright, S., Tevar, S., Almeida, R. D., Kermani, P., Torkin, R., Chen, Z. Y., Lee, F. S., Kraemer, R. T., Nykjaer, A., & Hempstead, B. L. (2005). ProBDNF induces neuronal apoptosis via activation of a receptor complex of p75NTR and sortilin. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 25(22), 5455–5463.

Tervahauta, A., Syrjänen, S., & Syrjänen, K. (1994). Epidermal growth factor receptor, c-erbB-2 proto-oncogene and estrogen receptor expression in human papillomavirus lesions of the uterine cervix. *International journal of gynecological pathology : official journal of the International Society of Gynecological Pathologists*, 13(3), 234–240.

Théry, C., Ostrowski, M., & Segura, E. (2009). Membrane vesicles as conveyors of immune responses. *Nature reviews. Immunology*, 9(8), 581–593.

Threadgill, D. W., Dlugosz, A. A., Hansen, L. A., Tennenbaum, T., Lichti, U., Yee, D., LaMantia, C., Mourton, T., Herrup, K., & Harris, R. C. (1995). Targeted disruption of mouse EGF receptor: effect of genetic background on mutant phenotype. *Science (New York, N.Y.)*, 269(5221), 230–234.

Thun, M. J., Hannan, L. M., Adams-Campbell, L. L., Boffetta, P., Buring, J. E., Feskanich, D., Flanders, W. D., Jee, S. H., Katanoda, K., Kolonel, L. N., Lee, I. M., Marugame, T., Palmer, J. R., Riboli, E., Sobue, T., Avila-Tang, E., Wilkens, L. R., & Samet, J. M. (2008). Lung cancer

occurrence in never-smokers: an analysis of 13 cohorts and 22 cancer registry studies. *PLoS medicine*, 5(9), e185.

Tice, D. A., Biscardi, J. S., Nickles, A. L., & Parsons, S. J. (1999). Mechanism of biological synergy between cellular Src and epidermal growth factor receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(4), 1415–1420.

Tkach, M., & Théry, C. (2016). Communication by Extracellular Vesicles: Where We Are and Where We Need to Go. *Cell*, 164(6), 1226–1232.

Tomas, A., Futter, C. E., & Eden, E. R. (2013). EGF receptor trafficking: consequences for signaling and cancer. *Trends in cell biology*, 24(1), 26–34.

Tomas, A., Futter, C. E., & Eden, E. R. (2014). EGF receptor trafficking: consequences for signaling and cancer. *Trends in cell biology*, 24(1), 26–34.

Travis, W. D., Brambilla, E., Nicholson, A. G., Yatabe, Y., Austin, J., Beasley, M. B., Chirieac, L. R., Dacic, S., Duhig, E., Flieder, D. B., Geisinger, K., Hirsch, F. R., Ishikawa, Y., Kerr, K. M., Noguchi, M., Pelosi, G., Powell, C. A., Tsao, M. S., Wistuba, I., & WHO Panel (2015). The 2015 World Health Organization Classification of Lung Tumors: Impact of Genetic, Clinical and Radiologic Advances Since the 2004 Classification. *Journal of thoracic oncology : official publication of the International Association for the Study of Lung Cancer*, 10(9), 1243–1260.

Traynor, A. M., Weigel, T. L., Oettel, K. R., Yang, D. T., Zhang, C., Kim, K., Salgia, R., Iida, M., Brand, T. M., Hoang, T., Campbell, T. C., Hernan, H. R., & Wheeler, D. L. (2013). Nuclear EGFR protein expression predicts poor survival in early stage non-small cell lung cancer. *Lung cancer (Amsterdam, Netherlands)*, 81(1), 138–141.

Truong, T. H., & Carroll, K. S. (2012). Redox regulation of epidermal growth factor receptor signaling through cysteine oxidation. *Biochemistry*, 51(50), 9954–9965.

Turke, A. B., Zejnullahu, K., Wu, Y. L., Song, Y., Dias-Santagata, D., Lifshits, E., Toschi, L., Rogers, A., Mok, T., Sequist, L., Lindeman, N. I., Murphy, C., Akhavanfard, S., Yeap, B. Y., Xiao, Y., Capelletti, M., Iafrate, A. J., Lee, C., Christensen, J. G., Engelman, J. A., ... Jänne, P. A. (2010). Preexistence and clonal selection of MET amplification in EGFR mutant NSCLC. *Cancer cell*, 17(1), 77–88.

Tzahar, E., Waterman, H., Chen, X., Levkowitz, G., Karunakaran, D., Lavi, S., Ratzkin, B. J., & Yarden, Y. (1996). A hierarchical network of interreceptor interactions determines signal transduction by Neu differentiation factor/neuregulin and epidermal growth factor. *Molecular and cellular biology*, 16(10), 5276–5287.

Ullrich, A., Coussens, L., Hayflick, J. S., Dull, T. J., Gray, A., Tam, A. W., Lee, J., Yarden, Y., Libermann, T. A., & Schlessinger, J. (1984). Human epidermal growth factor receptor cDNA sequence and aberrant expression of the amplified gene in A431 epidermoid carcinoma cells. *Nature*, 309(5967), 418–425.

Vaegter, C. B., Jansen, P., Fjorback, A. W., Glerup, S., Skeldal, S., Kjolby, M., Richner, M., Erdmann, B., Nyengaard, J. R., Tessarollo, L., Lewin, G. R., Willnow, T. E., Chao, M. V., & Nykjaer, A. (2011). Sortilin associates with Trk receptors to enhance anterograde transport and neurotrophin signaling. *Nature neuroscience*, 14(1), 54–61.

Vaishnavi, A., Capelletti, M., Le, A. T., Kako, S., Butaney, M., Ercan, D., Mahale, S., Davies, K. D., Aisner, D. L., Pilling, A. B., Berge, E. M., Kim, J., Sasaki, H., Park, S., Kryukov, G., Garraway, L. A., Hammerman, P. S., Haas, J., Andrews, S. W., Lipson, D., ... Doebele, R. C.

(2013). Oncogenic and drug-sensitive NTRK1 rearrangements in lung cancer. *Nature medicine*, 19(11), 1469–1472.

Valadi, H., Ekström, K., Bossios, A., Sjöstrand, M., Lee, J. J., & Lötvall, J. O. (2007). Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nature cell biology*, 9(6), 654–659.

van der Pol, E., Böing, A. N., Harrison, P., Sturk, A., & Nieuwland, R. (2012). Classification, functions, and clinical relevance of extracellular vesicles. *Pharmacological reviews*, 64(3), 676–705.

van Meerbeeck, J. P., Fennell, D. A., & De Ruyscher, D. K. (2011). Small-cell lung cancer. *Lancet (London, England)*, 378(9804), 1741–1755.

van Zijl, F., Krupitza, G., & Mikulits, W. (2011). Initial steps of metastasis: cell invasion and endothelial transmigration. *Mutation research*, 728(1-2), 23–34.

Vanlandingham, P. A., & Ceresa, B. P. (2009). Rab7 regulates late endocytic trafficking downstream of multivesicular body biogenesis and cargo sequestration. *The Journal of biological chemistry*, 284(18), 12110–12124.

Vanneman, M., & Dranoff, G. (2012). Combining immunotherapy and targeted therapies in cancer treatment. *Nature reviews. Cancer*, 12(4), 237–251.

Veale, D., Ashcroft, T., Marsh, C., Gibson, G. J., & Harris, A. L. (1987). Epidermal growth factor receptors in non-small cell lung cancer. *British journal of cancer*, 55(5), 513–516.

Veronesi, G., Bottoni, E., Finocchiaro, G., & Alloisio, M. (2015). When is surgery indicated for small-cell lung cancer?. *Lung cancer (Amsterdam, Netherlands)*, 90(3), 582–589.

Vincent, J. P., Mazella, J., & Kitabgi, P. (1999). Neurotensin and neurotensin receptors. *Trends in pharmacological sciences*, 20(7), 302–309.

Virmani, A. K., Rathi, A., Zöchbauer-Müller, S., Sacchi, N., Fukuyama, Y., Bryant, D., Maitra, A., Heda, S., Fong, K. M., Thunnissen, F., Minna, J. D., & Gazdar, A. F. (2000). Promoter methylation and silencing of the retinoic acid receptor-beta gene in lung carcinomas. *Journal of the National Cancer Institute*, 92(16), 1303–1307.

Vivanco, I., & Sawyers, C. L. (2002). The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer. *Nature reviews. Cancer*, 2(7), 489–501.

Waheed, A., Hasilik, A., & von Figura, K. (1982). UDP-N-acetylglucosamine:lysosomal enzyme precursor N-acetylglucosamine-1-phosphotransferase. Partial purification and characterization of the rat liver Golgi enzyme. *The Journal of biological chemistry*, 257(20), 12322–12331.

Walters, S., Maringe, C., Coleman, M. P., Peake, M. D., Butler, J., Young, N., Bergström, S., Hanna, L., Jakobsen, E., Kölbeck, K., Sundstrøm, S., Engholm, G., Gavin, A., Gjerstorff, M. L., Hatcher, J., Johannesen, T. B., Linklater, K. M., McGahan, C. E., Steward, J., Tracey, E., ... ICBP Module 1 Working Group (2013). Lung cancer survival and stage at diagnosis in Australia, Canada, Denmark, Norway, Sweden and the UK: a population-based study, 2004-2007. *Thorax*, 68(6), 551–564.

Wang, L. H., Wu, C. F., Rajasekaran, N., & Shin, Y. K. (2018). Loss of Tumor Suppressor Gene Function in Human Cancer: An Overview. *Cellular physiology and biochemistry* :

international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology, 51(6), 2647–2693.

Wang, S. C., Nakajima, Y., Yu, Y. L., Xia, W., Chen, C. T., Yang, C. C., McIntush, E. W., Li, L. Y., Hawke, D. H., Kobayashi, R., & Hung, M. C. (2006). Tyrosine phosphorylation controls PCNA function through protein stability. *Nature cell biology*, 8(12), 1359–1368.

Wang, S., Cang, S., & Liu, D. (2016). Third-generation inhibitors targeting EGFR T790M mutation in advanced non-small cell lung cancer. *Journal of hematology & oncology*, 9, 34.

Wang, Y. N., Wang, H., Yamaguchi, H., Lee, H. J., Lee, H. H., & Hung, M. C. (2010). COPI-mediated retrograde trafficking from the Golgi to the ER regulates EGFR nuclear transport. *Biochemical and biophysical research communications*, 399(4), 498–504.

Wang, Y. N., Yamaguchi, H., Hsu, J. M., & Hung, M. C. (2010). Nuclear trafficking of the epidermal growth factor receptor family membrane proteins. *Oncogene*, 29(28), 3997–4006.

Wang, Y. N., Yamaguchi, H., Huo, L., Du, Y., Lee, H. J., Lee, H. H., Wang, H., Hsu, J. M., & Hung, M. C. (2010). The translocon Sec61beta localized in the inner nuclear membrane transports membrane-embedded EGF receptor to the nucleus. *The Journal of biological chemistry*, 285(49), 38720–38729.

Wangari-Talbot, J., & Hopper-Borge, E. (2013). Drug Resistance Mechanisms in Non-Small Cell Lung Carcinoma. *Journal of cancer research updates*, 2(4), 265–282.

Wanner, G., Mayer, C., Kehlbach, R., Rodemann, H. P., & Dittmann, K. (2008). Activation of protein kinase Cepsilon stimulates DNA-repair via epidermal growth factor receptor nuclear accumulation. *Radiotherapy and oncology : journal of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology*, 86(3), 383–390.

Waterman, H., Levkowitz, G., Alroy, I., & Yarden, Y. (1999). The RING finger of c-Cbl mediates desensitization of the epidermal growth factor receptor. *The Journal of biological chemistry*, 274(32), 22151–22154.

Waters, K. M., Liu, T., Quesenberry, R. D., Willse, A. R., Bandyopadhyay, S., Kathmann, L. E., Weber, T. J., Smith, R. D., Wiley, H. S., & Thrall, B. D. (2012). Network analysis of epidermal growth factor signaling using integrated genomic, proteomic and phosphorylation data. *PloS one*, 7(3), e34515.

Webster, R. J., Giles, K. M., Price, K. J., Zhang, P. M., Mattick, J. S., & Leedman, P. J. (2009). Regulation of epidermal growth factor receptor signaling in human cancer cells by microRNA-7. *The Journal of biological chemistry*, 284(9), 5731–5741.

Wee, P., & Wang, Z. (2017). Epidermal Growth Factor Receptor Cell Proliferation Signaling Pathways. *Cancers*, 9(5), 52.

Weinstein, I. B., & Joe, A. (2008). Oncogene addiction. *Cancer research*, 68(9), 3077–3080.

Welton, J. L., Khanna, S., Giles, P. J., Brennan, P., Brewis, I. A., Staffurth, J., Mason, M. D., & Clayton, A. (2010). Proteomics analysis of bladder cancer exosomes. *Molecular & cellular proteomics : MCP*, 9(6), 1324–1338.

West, M. A., Bretscher, M. S., & Watts, C. (1989). Distinct endocytotic pathways in epidermal growth factor-stimulated human carcinoma A431 cells. *The Journal of cell biology*, 109(6 Pt 1), 2731–2739.

- Westergaard, U. B., Sørensen, E. S., Hermey, G., Nielsen, M. S., Nykjaer, A., Kirkegaard, K., Jacobsen, C., Gliemann, J., Madsen, P., & Petersen, C. M. (2004). Functional organization of the sortilin Vps10p domain. *The Journal of biological chemistry*, 279(48), 50221–50229.
- Wheeler, D. L., Iida, M., Kruser, T. J., Nechrebecki, M. M., Dunn, E. F., Armstrong, E. A., Huang, S., & Harari, P. M. (2009). Epidermal growth factor receptor cooperates with Src family kinases in acquired resistance to cetuximab. *Cancer biology & therapy*, 8(8), 696–703.
- Wiesen, J. F., Young, P., Werb, Z., & Cunha, G. R. (1999). Signaling through the stromal epidermal growth factor receptor is necessary for mammary ductal development. *Development (Cambridge, England)*, 126(2), 335–344.
- Willnow, T. E., Petersen, C. M., & Nykjaer, A. (2008). VPS10P-domain receptors - regulators of neuronal viability and function. *Nature reviews. Neuroscience*, 9(12), 899–909.
- Wilson, C. M., Naves, T., Al Akhrass, H., Vincent, F., Melloni, B., Bonnaud, F., Lalloué, F., & Jauberteau, M. O. (2016). A new role under sortilin's belt in cancer. *Communicative & integrative biology*, 9(1), e1130192.
- Wilson, C. M., Naves, T., Vincent, F., Melloni, B., Bonnaud, F., Lalloué, F., & Jauberteau, M. O. (2014). Sortilin mediates the release and transfer of exosomes in concert with two tyrosine kinase receptors. *Journal of cell science*, 127(Pt 18), 3983–3997.
- Winograd-Katz, S. E., & Levitzki, A. (2006). Cisplatin induces PKB/Akt activation and p38(MAPK) phosphorylation of the EGF receptor. *Oncogene*, 25(56), 7381–7390.
- Wong, A. J., Bigner, S. H., Bigner, D. D., Kinzler, K. W., Hamilton, S. R., & Vogelstein, B. (1987). Increased expression of the epidermal growth factor receptor gene in malignant gliomas is invariably associated with gene amplification. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 84(19), 6899–6903.
- Xiang, X., Zang, M., Waelde, C. A., Wen, R., & Luo, Z. (2002). Phosphorylation of 338SSYY341 regulates specific interaction between Raf-1 and MEK1. *The Journal of biological chemistry*, 277(47), 44996–45003.
- Xie, S., Bahl, K., Reinecke, J. B., Hammond, G. R., Naslavsky, N., & Caplan, S. (2016). The endocytic recycling compartment maintains cargo segregation acquired upon exit from the sorting endosome. *Molecular biology of the cell*, 27(1), 108–126.
- Xiong, J., Zhou, L., Yang, M., Lim, Y., Zhu, Y. H., Fu, D. L., Li, Z. W., Zhong, J. H., Xiao, Z. C., & Zhou, X. F. (2013). ProBDNF and its receptors are upregulated in glioma and inhibit the growth of glioma cells in vitro. *Neuro-oncology*, 15(8), 990–1007.
- Xiong, S., Zheng, Y., Jiang, P., Liu, R., Liu, X., & Chu, Y. (2011). MicroRNA-7 inhibits the growth of human non-small cell lung cancer A549 cells through targeting BCL-2. *International journal of biological sciences*, 7(6), 805–814.
- Xu, S. Y., Jiang, J., Pan, A., Yan, C., & Yan, X. X. (2018). Sortilin: a new player in dementia and Alzheimer-type neuropathology. *Biochemistry and cell biology = Biochimie et biologie cellulaire*, 96(5), 491–497.
- Yamada, M., Ikeuchi, T., & Hatanaka, H. (1997). The neurotrophic action and signalling of epidermal growth factor. *Progress in neurobiology*, 51(1), 19–37.
- Yamashita, T., Kamada, H., Kanasaki, S., Maeda, Y., Nagano, K., Abe, Y., Inoue, M., Yoshioka, Y., Tsutsumi, Y., Katayama, S., Inoue, M., & Tsunoda, S. (2013). Epidermal growth

factor receptor localized to exosome membranes as a possible biomarker for lung cancer diagnosis. *Die Pharmazie*, 68(12), 969–973.

Yang, M., Lim, Y., Li, X., Zhong, J. H., & Zhou, X. F. (2011). Precursor of brain-derived neurotrophic factor (proBDNF) forms a complex with Huntingtin-associated protein-1 (HAP1) and sortilin that modulates proBDNF trafficking, degradation, and processing. *The Journal of biological chemistry*, 286(18), 16272–16284.

Yang, W., Wu, P. F., Ma, J. X., Liao, M. J., Wang, X. H., Xu, L. S., Xu, M. H., & Yi, L. (2019). Sortilin promotes glioblastoma invasion and mesenchymal transition through GSK-3 β / β -catenin/twist pathway. *Cell death & disease*, 10(3), 208.

Yarden, Y., & Sliwkowski, M. X. (2001). Untangling the ErbB signalling network. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 2(2), 127–137.

Yasuda, H., Park, E., Yun, C. H., Sng, N. J., Lucena-Araujo, A. R., Yeo, W. L., Huberman, M. S., Cohen, D. W., Nakayama, S., Ishioka, K., Yamaguchi, N., Hanna, M., Oxnard, G. R., Lathan, C. S., Moran, T., Sequist, L. V., Chaft, J. E., Riely, G. J., Arcila, M. E., Soo, R. A., ... Costa, D. B. (2013). Structural, biochemical, and clinical characterization of epidermal growth factor receptor (EGFR) exon 20 insertion mutations in lung cancer. *Science translational medicine*, 5(216), 216ra177.

Yu, Y. L., Chou, R. H., Wu, C. H., Wang, Y. N., Chang, W. J., Tseng, Y. J., Chang, W. C., Lai, C. C., Lee, H. J., Huo, L., Chen, C. H., & Hung, M. C. (2012). Nuclear EGFR suppresses ribonuclease activity of polynucleotide phosphorylase through DNAPK-mediated phosphorylation at serine 776. *The Journal of biological chemistry*, 287(37), 31015–31026.

Yu, Y., Mingjiao, W., Yang, X., Sui, M., Zhang, T., Liang, J., Gu, X., & Wang, X. (2016). Association between DNA methylation of SORL1 5'-flanking region and mild cognitive impairment in type 2 diabetes mellitus. *Annales d'endocrinologie*, 77(6), 625–632.

Yun, C. H., Boggon, T. J., Li, Y., Woo, M. S., Greulich, H., Meyerson, M., & Eck, M. J. (2007). Structures of lung cancer-derived EGFR mutants and inhibitor complexes: mechanism of activation and insights into differential inhibitor sensitivity. *Cancer cell*, 11(3), 217–227.

Yun, C. H., Mengwasser, K. E., Toms, A. V., Woo, M. S., Greulich, H., Wong, K. K., Meyerson, M., & Eck, M. J. (2008). The T790M mutation in EGFR kinase causes drug resistance by increasing the affinity for ATP. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(6), 2070–2075.

Zabarovsky, E. R., Lerman, M. I., & Minna, J. D. (2002). Tumor suppressor genes on chromosome 3p involved in the pathogenesis of lung and other cancers. *Oncogene*, 21(45), 6915–6935.

Zhang, X., Gureasko, J., Shen, K., Cole, P. A., & Kuriyan, J. (2006). An allosteric mechanism for activation of the kinase domain of epidermal growth factor receptor. *Cell*, 125(6), 1137–1149.

Zhang, Y., Moheban, D. B., Conway, B. R., Bhattacharyya, A., & Segal, R. A. (2000). Cell surface Trk receptors mediate NGF-induced survival while internalized receptors regulate NGF-induced differentiation. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 20(15), 5671–5678.

Zhang, Z., Jiang, W., Yang, H., Lin, Q., & Qin, X. (2018). The miR-182/ SORT1 axis regulates vascular smooth muscle cell calcification in vitro

- Zhang, Z., Stiegler, A. L., Boggon, T. J., Kobayashi, S., & Halmos, B. (2010). EGFR-mutated lung cancer: a paradigm of molecular oncology. *Oncotarget*, 1(7), 497–514.
- Zhou, M., Wang, H., Zhou, K., Luo, X., Pan, X., Shi, B., Jiang, H., Zhang, J., Li, K., Wang, H. M., Gao, H., Lu, S., Yao, M., Mao, Y., Wang, H. Y., Yang, S., Gu, J., Li, C., & Li, Z. (2013). A novel EGFR isoform confers increased invasiveness to cancer cells. *Cancer research*, 73(23), 7056–7067.
- Zieske, J. D., & Wasson, M. (1993). Regional variation in distribution of EGF receptor in developing and adult corneal epithelium. *Journal of cell science*, 106 (Pt 1), 145–152.
- Zitvogel, L., & Kroemer, G. (2012). Targeting PD-1/PD-L1 interactions for cancer immunotherapy. *Oncoimmunology*, 1(8), 1223–1225.
- Zitvogel, L., Apetoh, L., Ghiringhelli, F., & Kroemer, G. (2008). Immunological aspects of cancer chemotherapy. *Nature reviews. Immunology*, 8(1), 59–73.
- Zsürger, N., Mazella, J., & Vincent, J. P. (1994). Solubilization and purification of a high affinity neurotensin receptor from newborn human brain. *Brain research*, 639(2), 245–252.
- Zwang, Y., & Yarden, Y. (2006). p38 MAP kinase mediates stress-induced internalization of EGFR: implications for cancer chemotherapy. *The EMBO journal*, 25(18), 4195–4206.

Implication de la sortiline dans la sensibilité aux thérapies ciblées dans le cancer bronchique.

Le cancer bronchique reste la principale cause de décès par cancer dans le monde en raison de l'absence de diagnostic précoce et de sa difficulté de prise en charge. Cet échec des stratégies thérapeutiques est principalement dû à la présence de mutations et d'activations aberrantes de l'EGFR conduisant à une croissance tumorale exacerbée. Malgré une évolution et une diversification des thérapies ciblées visant à inactiver ces récepteurs, l'utilisation des inhibiteurs de tyrosine kinase ciblant l'EGFR montre toujours une efficacité initiale dont les bénéfices diminuent avec le temps. L'un des mécanismes de résistance permettant d'expliquer ce phénomène pourrait dépendre du switch entre la signalisation membranaire de l'EGFR et sa signalisation nucléaire. En effet, la relocalisation nucléaire de l'EGFR favoriserait l'expression de cibles génomiques responsable de l'échappement thérapeutique et de la récurrence. Nos travaux antérieurs ont déjà permis d'identifier la fonction originale d'une protéine de transport, la sortiline dans l'inhibition de la signalisation membranaire de l'EGFR. Néanmoins, la découverte de la sortiline au niveau nucléaire met en évidence un nouveau rôle de la sortiline en tant que régulateur crucial des oncogènes contrôlés habituellement par l'EGFR nucléaire. Un large panel de gènes cibles de l'EGFR contrôlés par la sortiline a pu être caractérisé. Nos travaux nous ont conduit à analyser plus spécifiquement l'action de la sortiline sur l'expression de *cMYC* et *CCND1*. Cette dernière induirait en effet une diminution du recrutement de l'ARN pol II qui est cruciale pour leur transcription. Lors du traitement à l'osimertinib, la fixation de la sortiline sur la chromatine est augmentée ce qui conduit à une répression des gènes cibles tels que *cMYC*. Ceci suggère que la sortiline puisse être susceptible de réprimer l'expression de gènes cibles comme *cMYC*. Nos analyses transcriptomiques menées sur une cohorte de patients ont confirmé l'effet répresseur de la sortiline sur le gène *cMYC*. Ces résultats ouvrent des perspectives intéressantes quant au diagnostic du CBNPC, à la prédiction de récurrence. A l'avenir la sortiline pourrait constituer un agent thérapeutique permettant la resensibilisation des tumeurs aux traitements.

Mots-clés : Cancer bronchique, EGFR, sortiline, MYC, ITK, Nucléaire

Involvement of sortilin in sensitivity to targeted therapies in bronchial cancer.

Bronchial cancer remains the leading cause of cancer death worldwide due to lack of early diagnosis and difficulties of treatment. This failure of therapeutic strategies is mainly due to the presence of aberrant EGFR mutations and activations leading to exacerbated tumor growth. Despite the evolution and diversification of targeted therapies aimed at inactivating these receptors, the use of tyrosine kinase inhibitors targeting EGFR still shows an initial efficacy whose benefits decrease with time. One of the mechanisms of resistance explaining this phenomenon may depend on the switch between EGFR membrane and nuclear signaling. Indeed, the nuclear relocation of EGFR would induce the expression of genomic targets responsible for therapeutic escape and recurrence. Our previous work has already identified the original function of a transport protein, sortilin, in the inhibition of EGFR membrane signaling. However, the discovery of sortilin at the nuclear level highlights a new role for sortilin as a crucial regulator of nuclear EGFR-controlled oncogenes. A large panel of EGFR target genes controlled by sortilin could be characterized. Our work led us to analyze more specifically the action of sortilin on the expression of *cMYC* and *CCND1*. The latter would indeed induce a decrease in the recruitment of RNA pol II which is crucial for their transcription. During treatment with osimertinib, sortilin binding to chromatin is increased, leading to a repression of target genes such as *cMYC*. This suggests that sortilin may be a protein that represses the expression of target genes such as *cMYC*. Our transcriptomic analyses conducted on a cohort of patients confirmed the repressive effect of sortilin on the *cMYC* gene. These results open interesting perspectives for the diagnosis of NSCLC and the prediction of recurrence. In the future, sortilin could be a therapeutic agent allowing the resensitisation of tumors to treatment.

Keywords : Lung cancer, EGFR, sortilin, MYC, TKI, Nuclear

