



HAL
open science

Analyse de l'intérêt pronostique du profil moléculaire dépendant de la sortiline nucléaire dans le cancer de **poumon**

May Yassine

► **To cite this version:**

May Yassine. Analyse de l'intérêt pronostique du profil moléculaire dépendant de la sortiline nucléaire dans le cancer de poumon. Médecine humaine et pathologie. Université de Limoges, 2023. Français. NNT : 2023LIMO0099 . tel-04404714

HAL Id: tel-04404714

<https://theses.hal.science/tel-04404714>

Submitted on 19 Jan 2024

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 652 - Biologie, Chimie, Santé (BCS)

UMR Inserm 1308 CAPTuR

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

Spécialité : Oncologie

Présentée et soutenue par

May Yassine

Le 19 décembre 2023

Analyse de l'intérêt pronostique du profil moléculaire dépendant de la sortiline nucléaire dans le cancer de poumon

Thèse dirigée par **Pr. Fabrice Lalloué & Dr. Thomas Naves**

JURY :

Président du jury

M. Frédéric André, Professeur des universités, Centre de Recherche en Cancérologie de Marseille (CRCM), Aix-Marseille Université U105 INSERM U1068 / CNRS UMR7258, Institut Paoli Calmettes

Rapporteurs

Mme. Stéphanie Cabantous, Chargée de recherche, CRCT INSERM U1037/ERL5294 CNRS, Toulouse

M. Frédéric Delom, Maître de conférences, Inserm U1312, équipe RyTHME, Université de Bordeaux

Examineurs

Mme. Marie-Odile Jauberteau, Professeur des universités, praticien hospitalier UMR Inserm 1308 CAPTuR, Faculté de Médecine de Limoges. Université de Limoges

Encadrants

M. Fabrice Lalloué, Professeur des Universités, UMR Inserm 1308 CAPTuR, Faculté de Médecine de Limoges. Université de Limoges

M. Thomas Naves, Docteur en Sciences, UMR Inserm 1308 CAPTuR, Faculté de Médecine de Limoges. Université de Limoges



A ma famille ...

Le succès n'est pas la clé du bonheur. Le bonheur est la clé du succès. Si vous aimez ce que vous faites, vous réussirez

Albert Schweitzer

Remerciements

J'exprime ma profonde gratitude aux membres du jury pour le temps et l'effort consacrés à l'évaluation de ma thèse. Un remerciement tout particulier à **M. Frédéric André**, professeur des universités au CRCM à l'université d'Aix-Marseille, pour avoir accepté la présidence de ce jury. Ma reconnaissance s'étend également à mes deux rapporteurs, **Mme Stéphanie Cabantous**, chargée de Recherche au CRCT à Toulouse, et à **M. Frédéric Delom**, maître de conférences à l'Université de Bordeaux. Vos expertises et vos disponibilités pour juger mon travail représentent pour moi un soutien précieux. Enfin, un merci chaleureux à Mme **Marie-Odile Jaubeteau**. Votre engagement à examiner ma thèse, ainsi que votre bienveillance et votre expertise, est non seulement un honneur mais aussi une véritable source d'inspiration.

Je tiens à exprimer ma profonde gratitude à mes directeurs de thèse, le Pr. Fabrice Lalloué et le Dr. Thomas Naves. **Fabrice**, ma reconnaissance commence par votre accueil chaleureux dans votre laboratoire. Votre bienveillance, votre gentillesse et votre engagement ont été pour moi une source constante de motivation. Plus que votre expertise, que je respecte énormément, c'est véritablement votre humanité qui m'a marqué. Chaque conseil, chaque échange, chaque moment passé à discuter et à débattre ont contribué à construire ce travail, à lui donner sa forme. **Thomas**, à fond les ballons ? Merci pour ton encadrement tout au long de cette thèse. Mais surtout, merci pour ta gentillesse, ton sens profond de l'humanité, ta disponibilité constante face à chaque obstacle et à chaque question. Les moments de doute ont été nombreux, mais tes mots d'encouragement m'ont toujours remis sur la bonne voie. Je me souviens particulièrement d'un vendredi soir où tu m'as rappelé de ne jamais laisser l'échec m'abattre ou me démotiver. Ces mots, empreints d'une profonde sincérité, ont été pour moi un guide qui m'a permis de relever des défis avec une vision renouvelée.

Je tiens à exprimer ma profonde gratitude envers toute l'équipe, y compris les membres statutaires et les doctorants, qu'ils soient actuels ou passés. **Clément**, nos échanges à midi dans la salle de pause, mêlant humour et découverte, m'ont fait voyager à travers les trésors géographiques de la France et de l'espace : p. Merci pour ces moments partagés. **Céline (Cécé)**, ta gentillesse, ton sérieux et ton exemplarité au laboratoire sont admirables. **Éric**, bien que tu aies terminé ta thèse, tu continues d'apporter joie et ambiance au bureau. Bon courage pour la suite de tes études en médecine et merci de m'avoir guidé au début de ma thèse. **Élodie**, ton

cœur et ta force sont sources d'inspiration. Je te souhaite tout le succès possible dans ta recherche d'emploi et dans la suite de ta carrière. **Axel**, ta gentillesse, ta bienveillance et ton soutien ont été essentiels au commencement de ma thèse. **Marine**, la plus souriante, celle qui apporte lumière et positivité partout où elle va, je tiens à te dire merci pour tous les bons moments passés ensemble. Alors que tu poursuis tes études de médecine, je n'ai aucun doute que tu seras une excellente médecin. **Maëlle et Amy**, Je vous souhaite également courage et bonne chance dans la poursuite de vos thèses. Restez motivées et fortes, car le chemin vers l'aboutissement de vos recherches est exigeant, mais je suis convaincu que vous pouviez le faire.

Charlotte, bien que notre amitié ne date pas de très longtemps, le peu de temps a suffi pour révéler à quel point tu es gentille et adorable. Une thèse est pleine de défis et d'obstacles, mais c'est avant tout une aventure riche d'apprentissage. Chaque échec nous rend plus fort et chaque obstacle surmonté nous fait progresser. Je suis convaincue que tu relèveras tous ces défis avec brio et que tu réaliseras une thèse remarquable. **COURAGE, TU PEUX LE FAIRE !!**

Anaëlle, notre chère bretonne, tu es la première personne que j'ai rencontrée lors de ma thèse et qui est rapidement devenue l'une de mes amies proches. Ta gentillesse, ta présence depuis le début de la thèse, ton soutien et ta compréhension m'ont été précieux dans les moments joyeux comme dans les plus difficiles. Merci pour ton optimisme contagieux, tes encouragements et tes talents d'organisatrice qui n'ont d'égal que ton sens de l'aventure. Qui d'autre aurait planifié des vacances à Cassis en pleine Covid ?! Et comment ne pas mentionner ta motivation sans fin, surtout quand il s'agit de sport et de randonnée ? Même si ta notion du temps « On arrive dans 5 min » m'a souvent fait sourire, enfin pas beaucoup quand -il s'agit de marcher au bord d'une falaise haha !!. Merci pour tous ces rires partagés, pour les conseils avisés et pour chaque moment passé ensemble et bien sûr pour les crêpes bretons.

Comment pourrais-je jamais oublier ma merveilleuse équipe du bureau ? Ma petite famille, **Tarek, Marie, Héloïse, Boutaina, et Léa**. Vous êtes tout simplement uniques et irremplaçables. Sincèrement, je doute de trouver un jour un groupe comparable ailleurs. Vous avez été les joyaux de cette aventure doctorale. Notre parcours académique touche à sa fin, avec quelques petits décalages, bien que Tarek, tu as déjà bouclé cette étape, mais l'amitié qui nous lie ne fait que se solidifier avec le temps. **Tarek**, on ne va pas se mentir, nos débuts étaient... disons, hésitants ? haha. Mais comme on dit, les premières impressions ne sont pas toujours les bonnes! Rapidement, tu t'es révélé être bien plus qu'un simple collègue de bureau. Tu es devenu

un ami précieux et vraiment génial. Ces moments passés dans le même bureau, les fous rires, les discussions, sans oublier les sorties et les soirées mémorables (et les bons desserts) resteront gravés. Merci pour tout Habibi !

Héloïse, la beauté qui cache derrière son petit regard coquin (avec l'accent du sud), et son fort caractère (qui fait peur aux stagiaires), un très grand cœur et une énorme gentillesse. Ta générosité n'est plus à prouver, elle s'illustre parfaitement dans la maman que tu es pour **Bacchus** et **Syra** (les plus beaux), débordante d'amour et de soins. Ton sourire, contagieux, apporte cette touche de joie à notre bureau, transformant les journées en moments privilégiés, plus courts et tellement plus agréables. Et que dire de ton soutien constant ? Toujours prête à épauler dans tous les circonstances, surtout quand-il s'agit de rédiger des rapports ou faire une bonne réclamation, haha ! Tu as cette force et cette capacité à encourager et à défendre, qui nous est tous si précieuse. Merci pour tous les souvenirs impérissables, pour ton écoute attentive, pour être là, tout simplement. La fin de ta thèse approche à grands pas, et je n'ai aucun doute que tu vas encore brillée, ramenant des prix de chaque congrès. Continue comme ça Héloïse, et merci encore !!

Boutaina, notre douceur au quotidien, tu es le cœur bienveillant de notre petit groupe, notre maman poule attentionnée qui veille sans relâche sur chacune d'entre nous. Ta gentillesse et ta capacité à apporter une énergie positive à nos journées, même les plus grises, est inestimable. Toujours prête à tendre la main, à écouter ou à rassurer, tu es ce soutien infailible, ce baume apaisant pour nos cœurs parfois mis à l'épreuve. On peut toujours compter sur toi, non seulement pour ton aide précieuse, mais aussi pour ton sourire réconfortant, tes petit câlins, tes mots encourageants et tes gestes apaisants. Merci pour tous les moments précieux que nous avons partagés, que ce soit entre les murs de notre bureau ou en dehors, pour ton aide indéfectible et cette sérénité que tu répands si naturellement autour de toi. Alors que nous approchons de la fin de nos thèses, je suis convaincu que ce n'est qu'un début pour la belle amitié qui nous unit. Reste comme tu es, Boutaina, car ta beauté intérieure et extérieure est une véritable source d'inspiration. Tu es magnifique, exactement telle que tu es.

Marie, mais ma puceeee ! Notre incroyable stagiaire qui s'est épanouie sous nos yeux. Ta gentillesse XXL, ton cœur énorme comme ça, et ton humour ont apporté des couleurs vives dans nos journées parfois trop monotones (c'est beau non, haha ?). Ces nuits passées à lutter avec les western blot se sont transformées, grâce à toi, en soirées pyjama mémorables. On a

tellement ri qu'on en a parfois oublié le sérieux de notre travail. Et nos enquêtes improbables ? On ferait mieux de les garder secrètes, sinon on pourrait bien décrocher un prix Nobel de n'importe quoi ! Merci, ma vie, pour tous ces moments inoubliables, les fous rires, les weekends au labo, les nuits blanches à travailler. Ta présence, ton aide et ton soutien ont été plus précieux que tu ne peux l'imaginer. Tu es une amie extraordinaire, et je me sens tellement chanceuse de t'avoir dans ma vie. Reste toujours aussi authentique, Marie. Parce que, franchement, tu es tout simplement exceptionnelle !

Léa (Lélé), ma belle, qui n'est rien de moins que la gardienne de nos droits et la voix de la raison, Je ne sais même pas par où commencer ! Peut-être par ta grande générosité qui n'a d'égal que ton humour, capable d'éclairer les instants les plus sombres avec une étincelle de joie et de bonne humeur. Dès notre première année, au milieu de tempêtes tant personnelles que professionnelles, c'est toi qui as su me tendre la main pour me faire sortir des moments les plus rudes. Grâce à toi, des pages sombres se sont transformées en souvenirs résilients, malgré ton sens d'orientation qui a failli nous amener dans la falaise à cassis. Notre amitié, qui a commencé par « Taè nechrab ahoué » dans la salle de pause ou autour d'un nuage de chicha, puis qui s'est épanouie dans le partage d'un bureau, puis les vacances et les soirées inoubliables, surtout à la Rochelle, et oui, nous n'oublierons jamais. Merci pour tout, pour tous ces moments partagés, pour tous tes conseils, ton soutien, ta bienveillance et ton présence toujours aussi remarquable. Je suis bien chanceuse de t'avoir dans ma vie. Aujourd'hui nous tournant tous les trois avec Boutaina une page de notre vie, mais nous resterons fidèles à cette amitié et peut être nous finirons toutes les deux à Lyon (La plus belle ville).

Au gang libanais de Limoges, **Mohamad El Masri (Momo)**, Abou couscous, Tu ne sais pas la chance que tu as d'avoir du couscous dans ta vie, une super ambiance, haha !!! Merci pour tout le monde, merci pour tous les moments partagés ensemble, merci d'être là quand j'ai besoin de toi, et merci pour moi d'être là pour m'occuper du couscous, haha. Je te souhaite bonne chance dans ta recherche d'emploi, tu en trouveras sûrement un, car tu le mérites. **Zeinab**, Merci pour ta gentillesse, ton sourire omniprésent et ton grand cœur. Je te souhaite bonne chance pour cette dernière année de thèse. **Nader, Jacquie, Hassan Awad, Souzan, Julia, Rayane**, pour ceux qui sont à la recherche d'un emploi ou pour ceux qui sont en fin de thèse, je vous souhaite bonne chance et je vous remercie pour les petites discussions que nous avons partagées. C'était toujours un plaisir de vous croiser, de vous parler et de partager un peu de temps avec vous.

Malak, ma coloc préférée : p, **Nourredine**, et **Nourhan**, maintenant que chacun d'entre nous est parti dans une nouvelle ville, je voudrais vous dire que cela ne changera pas les moments incroyables que nous avons partagés à Orléans. Lorsque nous sommes arrivés, tout était nouveau et inconnu, mais ensemble, nous avons créé des souvenirs et une amitié qui resteront gravés dans mon cœur. Je vous suis tellement reconnaissante pour tout, pour les rires et les petits moments quotidiens qui, au fil du temps, ont tissé un lien si fort entre nous. Et même si nos chemins nous mènent dans des directions différentes, je sais que notre amitié restera intacte. Après tout, ce n'est pas la distance qui définit une amitié, mais les moments partagés et les souvenirs créés. Et au Orléanais, **Sami**, **Dr Ali**, **Amo Hikmat**, **Hussein (Thomas)**, **Safa et Anouar**, Je tiens à vous remercier tous pour votre accueil chaleureux à notre arrivée à Orléans. Vous nous avez accueillis en tant qu'inconnus, mais dès le premier jour, vous nous avez tendu la main pour nous aider à traverser les moments les plus difficiles que peut rencontrer un étranger lors de ses premiers jours dans une nouvelle paye. Merci pour tous les moments précieux que nous avons partagés ensemble pendant mes deux à Orléans.

Diana (Mami), **Hikmat**, **Tristan**, **Mahmoud et Ayoub**, mes chers Toulousains, avez-vous déjà pensé à ce qui rend Toulouse si spéciale ? Comment cette ville aurait-elle pu être si rose sans vous ? Après tout, ce ne sont pas les bâtiments colorés ou les rues pittoresques qui font le charme d'une ville, mais les personnes qu'on y rencontre, les amis qu'on y fait, et tous ces moments inoubliables qu'on y partage. Je veux simplement vous dire merci. Merci pour tous ces moments magnifiques qu'on a vécus ensemble, les fous rires qui semblent ne jamais finir, les soirées mémorables et même les périodes difficiles que nous avons traversées côte à côte. Chaque instant partagé avec vous a ajouté une touche de couleur supplémentaire à ma vie. Merci d'être plus que des amis, d'être ma famille toulousaine. Vous resterez toujours une partie chère de mon cœur.

Ali, **Alouch**, chaque fois que j'essaie de mettre des mots sur ce que tu représentes pour moi, je me retrouve face à un océan de sentiments et de souvenirs. Dois-je commencer par exprimer ma profonde reconnaissance d'avoir un ami comme toi dans ma vie, ou dois-je plonger dans le flux des moments merveilleux que nous avons partagés depuis notre arrivée en France, il y a sept ans ? Depuis ce jour, tu as été une force constante dans ma vie, un ami inconditionnel. Tu as joué de nombreux rôles, ami fidèle, frère, soutien dans mes moments de doute, guide lorsque le chemin semblait incertain. Ta présence a été un cadeau, apportant joie même dans les

moments les plus durs. Lorsque j'ai eu besoin de soutien, tu as été là, non seulement avec des mots réconfortants, mais aussi avec des actes qui en disaient plus long que les mots. Et même dans tes propres moments de lutte, tu as trouvé la force de me relever, de partager ton énergie positive, en transformant tes défis en leçons pour nous deux. Ensemble, nous avons construit un véritable tableau de souvenirs, des éclats de rire qui brisaient le silence de la nuit, des discussions profondes et des rêves. Tout souvenir, petit ou grand, a tissé la fibre de notre amitié profonde. Merci encore et encore HABIBI.

À ma famille, alors que je me tiens ici aujourd'hui à de nouveaux débuts, mon cœur déborde de gratitude pour tout ce que vous avez fait pour moi. Ce n'est pas seulement votre amour inconditionnel ou votre soutien permanent qui m'ont marqué, mais aussi les sacrifices sans fin que vous avez consentis pour assurer mon bien-être et ma réussite. Dans les moments de doute, c'est votre foi sans faille en moi qui m'a donné de l'espoir et m'a poussé à surmonter les obstacles. Vous m'avez appris que la persévérance et le travail sont les clés du succès, et ces leçons sont devenues les fondations sur lesquelles j'ai construit mes rêves. Chaque succès que je célèbre aujourd'hui, je le dois en grande partie à votre amour et à votre engagement. Sans votre présence et vos encouragements constants, je n'aurais pas pu atteindre mes objectifs. Vous avez sacrifié vos propres rêves pour que je puisse réaliser les miens, et je vous en serai éternellement reconnaissant. Je vous remercie du fond du cœur pour tout. Votre amour et votre soutien sont les plus beaux cadeaux que j'ai jamais reçus, et je m'engage à vous rendre fiers à chaque étape de ma vie.

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

REMERCIEMENTS	5
DROITS D'AUTEURS	11
TABLE DES MATIERES	12
TABLE DES ILLUSTRATIONS	15
ABRÉVIATIONS	16
INTRODUCTION	22
CHAPITRE I. LES CANCERS DU POUMON	23
I.1. Épidémiologie et étiologie des cancers du poumon	23
I.1.1. Incidence et mortalité.....	23
I.1.2. Facteurs de risque.....	24
I.2. Les symptômes des cancers du poumon	25
I.3. La classification histologique	25
I.3.1. Le cancer bronchique à petites cellules (CBPC)	25
I.3.2. Le cancer bronchique non à petites cellules (CBNPC)	25
I.3.2.1. Les adénocarcinomes	26
I.3.2.2. Carcinome à Cellules Squameuses	26
I.3.2.3. Carcinome à Grandes Cellules	26
I.4. La classification TNM du cancer du poumon	27
I.5. Le diagnostic du cancer du poumon	30
I.6. Le Paysage moléculaire du cancer du poumon	31
I.7. Les avancées thérapeutiques	31
I.7.1. Les thérapies conventionnelles	31
I.7.2. L'immunothérapie.....	32
I.7.3. Thérapie ciblée et biomarqueurs moléculaires	34
I.8. Homologous to Kirsten murine sarcoma virus oncogene (KRAS)	35
I.9. Translocation chromosomique du gène ALK (anaplastic lymphoma kinase)	36
I.10. Proto-oncogene tyrosine-protein kinase ROS (ROS1)	38
I.11. Epidermal growth factor receptor (EGFR)	38
I.11.1. Ligands de l'EGFR	39
I.11.2. Activation de l'EGFR	40
I.11.3. Les mutations de l'EGFR dans le CBNPC.....	41
I.11.4. Les inhibiteurs de tyrosine kinase TKIs	42
I.11.4.1. Les inhibiteurs de première génération	42
I.11.4.2. Les inhibiteurs de deuxième génération	42
I.11.4.3. Les inhibiteurs de troisième génération.....	43

I.11.4.4. Les inhibiteurs de quatrième génération.....	45
I.11.5. La tolérance/persistances (DTP) dans le CBNPC aux EGFR-ITKs.....	47
I.11.5.1. Les altérations épigénétiques.....	47
I.11.5.2. Réactivation des voies de signalisation à la suite de l'inhibition par les ITKs-EGFR	49
I.11.5.3. L'altération du métabolisme cellulaire	50
I.11.6. Signalisation nucléaire de l'EGFR.....	51
I.11.6.1. Mécanisme de translocation nucléaire de l'EGFR	52
I.11.6.2. Le rôle de l'EGFR nucléaire dans la progression tumorale et la résistance thérapeutique	53
CHAPITRE II. SORTILINE OU NEUROTENSINE RECEPTOR 3 (NTR3)	56
II.1. Famille des protéines à domaine Vps10p	56
II.1.1. Caractéristiques structurales de la sortiline.....	57
II.2. Régulation de l'expression de la sortiline.....	59
II.2.1. Régulation au niveau de l'ADN :.....	59
II.2.2. Régulation au niveau de l'ARNm :.....	60
II.2.2.1. Niveaux transcriptionnels	60
II.2.2.2. Niveaux post-transcriptionnels.....	60
II.2.3. Régulation au niveau translationnel :.....	61
II.2.4. Régulation post traductionnelle de la sortiline et de son trafic cellulaire	62
II.3. Les ligands de la sortiline	64
II.4. La sortiline en tant que membre de la famille des récepteurs de la neurotensine	67
II.5. Localisation et expression de la sortiline.....	67
II.6. La forme soluble de la sortiline (sSortiline)	68
II.7. Rôle putatif de la sortiline dans les maladies humaines.....	68
II.7.1. Rôle de la sortiline dans le cancer.....	69
II.7.1.1. Glioblastome	69
II.7.1.2. Le cancer du sein	70
II.7.1.3. Cancer colorectal (CRC).....	72
II.7.1.4. Leucémie lymphoïde chronique (LLC).....	72
II.7.1.5. Cancer de l'ovaire	73
II.7.1.6. Cancer de la prostate	73
II.7.1.7. Cancer du poumon	74
OBJECTIFS.....	79
MATERIELS ET METHODES	81
1.Culture cellulaire et traitements :.....	82
2.Transfection et plasmides	82
3.Lignée cellulaire HEK293T CRISPR	82
4.Western Blot (WB).....	83
5.Purification nucléaire.....	83

6.Immunofluorescence / Immunomarquage (IF) :	84
7.Identification des interactions protéine-protéine / Essais d'immunoprécipitation (IP)	84
8.Transcription inverse et PCR en temps réel	85
9.Test de clonogénicité	85
10.Création de cellules Tet-On SORT1	86
11.Test de prolifération	86
12.Test de cytotoxicité	87
13.Analyse statistique	87
RESULTATS	88
DISCUSSION	125
CONCLUSION & PERSPECTIVES	135
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	138

Table des illustrations

Figure 1: Graphiques illustrant les statistiques mondiales des 10 cancers les plus fréquents en termes d'incidence et de mortalité en 2020. Source : GLOBOCAN 2020.....	23
Figure 2: Classification histologique du cancer du poumon. (A) Types histologiques de cancer du poumon. (B) Localisation des tumeurs et origine des cellules (Barros-Filho <i>et al.</i> , 2019).....	27
Figure 3: Classement TNM des Cancer bronchique non à petites cellules (Référentiel en oncologie Auvergne-Rhône-Alpes. 14e édition. Mise à jour en 2018).....	29
Figure 4: Paysage moléculaire du CBNPC (Wang, Herbst and Boshoff, 2021).....	35
Figure 5: Réarrangement ALK et activation des voies de signalisation en aval (Solomon, Wilner and Shaw, 2013).....	37
Figure 6: La famille des récepteurs ERBB et leurs ligands (Lacal, 2006).....	39
Figure 7: Vue d'ensemble de la transduction du signal de l'EGFR au niveau de la membrane (Cantor, Shah and Kuriyan, 2018).....	40
Figure 8: Fréquence des mutations de l'EGFR dans le CBNPC (Harrison, Vyse and Huang, 2020)....	42
Figure 9: Illustration des mutations C797S en position <i>cis</i> ou <i>trans</i> et stratégies thérapeutiques associées (Li <i>et al.</i> , 2023).....	44
Figure 10: Dégradation de l'EGFR médiée par les PROTACs (PROteolysis TArgeting Chimeras). ...	46
Figure 12: Translocation nucléaire de l'EGFR (Brand <i>et al.</i> , 2011).....	53
Figure 13: Réseau de signalisation nucléaire de l'EGFR.....	55
Figure 14: Représentation schématique de la famille des récepteurs au domaine VPS10 (Salasova <i>et al.</i> , 2022).....	58
Figure 15: Du gène <i>SORT1</i> à la structure de la protéine sortiline.....	59
Figure 16 : Régulation de l'expression et de la fonction de la sortiline au niveau de l'ADN, de l'ARNm, de la protéine et de la fonction de trafic (Ouyang <i>et al.</i> , 2020).....	62
Figure 17: l'itinéraire du trafic de la sortiline (Nykjaer and Willnow, 2012).....	64
Figure 18: Schéma de la régulation de l'EGFR par la sortiline (Al-Akhrass <i>et al.</i> , 2017a).....	76
Figure 19: Modèle de régulation de la transcription par la sortiline (Lapeyronnie <i>et al.</i> , 2021).....	78

Abréviations

4E-BP1: Eukaryotic Translation Initiation Factor 4E Binding Protein 1

Aa: Amino acid

ACS: American Cancer Society

ADAM: Disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein

AKT: RAC-beta serine/threonine-protein kinase

ALK: Anaplastic Lymphoma Kinase

AMM : Autorisation de mise sur le marché

AP-1: Adaptor Protein complex 1

AP-2: Adaptor Protein complex 2

AP-5: Adaptor Protein complex-5

APP: Amyloid precursor protein

ARF: ADP Ribosylation Factor

ATF3: Activating transcription factor 3

ATM: Ataxia Telangiectasia Mutated

ATP: Adenosine triphosphate

ATRS: AT-rich sequence

ATU: Autorisation temporaire d'utilisation

AURKA: Aurora kinase A

AURKB: Aurora kinase B

AXL: Receptor tyrosine kinase

BCL-2: B-cell lymphoma 2

BDNF: Brain-Derived Neurotrophic Factor

BIM: Bcl-2-like protein 11

BMF: Bcl-2 Modifying Factor

BRAF: Serine/threonine-protein kinase B-raf

BRCP: ABCG2 ATP Binding Cassette Subfamily G Member 2

CADA: Cyclotriazadisulfonamide

CBNPC: Cancer Bronchique Non à Petite Cellules

CBPC: Cancer Bronchique à Petites Cellules

CCR: Colorectal cancer

cGAMP: GMP-AMP cyclique

cGAS: MP-AMP cyclique synthase

ChIPSeq: Chromatin immunoprecipitation

CIRC: Centre international de recherche sur le cancer
C-Jun: AP-1 transcription factor
CSC: cellules souches cancéreuses
CRE: Cytosine-rich sequences
COPI: Coat Protein Complex I
COX-2: Cyclooxygenase 2
CTLA-4: Cytotoxic T-lymphocyte protein 4
CPY: Carboxypeptidase Y
DHHC-15: Aspartic acid–histidine–histidine–cysteine-15
DNA-PK: DNA-dependent protein kinase
DUSP6: Dual-specificity phosphatase 6
E2F1: E2F Transcription Factor 1
EIF4F: Eukaryotic Translation Initiation Factor 4E
eEF-2: Eukaryotic Translation Elongation Factor 2
EGF: Epidermal Growth Factor
EGFR: Epidermal Growth Factor Receptor
EML4: Echinoderm Microtubule Like protein 4
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
ERK: Extracellular Regulated mitogen-activated Kinase
ESCRT: Endosomal Sorting Complex Required for Transport
EZH2: Enhancer of zeste homologue 2
FAK: Focal Adhesion Kinase
FGF: Fibroblast Growth Factor
FGFR1: Fibroblast Growth Factor Receptor 1
GBM: Glioblastoma
GDP: Guanosine Diphosphate
GLUT1: Solute carrier family 2, facilitated glucose transporter member 1
GLUT: Solute carrier family 2, facilitated glucose transporter member 4
Gm2AP: Gm2 activator protein
Grb-2: Growth factor receptor-bound protein 2
GSK-3 β : Glycogene synthase kinase 3 beta
GSTM1: Glutathion s-transferase Mu 1
GTP: Guanosine Triphosphate
H3K27me3: Trimethylated histone H3 lysine 27

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
HGF: Hepatocyte Growth Factor
HP1: Heterochromatin Protein 1
IGF-1: Insulin-like growth factor I
IGF-1R: Insulin-like growth factor I Receptor
IHC: Immunohistochimie
IFN α : Interferons type I
INM: Inner nuclear membrane
INTERNET: Integral trafficking from the ER to the Nuclear Envelope Transport
IP3: Inositol 1,4,5-triphosphate
ITK: Tyrosine Kinase Inhibitor
JAK: Janus Kinase
JNK: c-Jun N-terminal kinase
KCl : Chlorure de potassium (KCl)
kDa: Kilo Dalton
KDM5A: Lysine demethylase 5A
KO: Knockout
KRAS: KRAS Proto-Oncogene, GTPase
LCLC: Large cell lung carcinoma
LDL: Low-density lipoprotein
LINE-1: Long Interspersed Nucleotidic Elements-1
LKB: Symbole officiel HUGO STK11; Sérine/thréonine kinase 11
LLC : Leucémie lymphoïde chronique
LPL: Lipoprotein Lipase
LT: Lymphocyte
LUAD: Lung adenocarcinoma
M6PR: Mannose-6-Phosphate Receptor
MAPK: Mitogen-activated protein kinase
MEK: Dual specificity mitogen-activated protein kinase 1
MET: Hepatocyte growth factor receptor
miARN: MicroARN
ML II: mucopolipidose II
MRM: Maladie résiduelle minimale

mTOR: Mechanistic Target Of Rapamycin Kinase
NGF: Nerve Growth Factor
NF-kB: Nuclear factor-kappa B
NLS: Nuclear localization signal
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
NRH2: Neurotrophin receptor homolog-2
NPC: Nuclear pore complex
Notch3: Neurogenic locus notch homolog protein 3
OMS: Organisation Mondiale de la Santé
ONM: Outer nuclear membrane
TP53: Tumor Protein P53
PCBP1: Poly-rC1 binding protein
RBP: Retinol Binding Protein 4
PCNA: Proliferating cell nuclear antigen
PCSK9: Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9
PD1: Programmed cell death protein 1
PDL1: Programmed cell death protein ligand 1
PGRN: Progranulin
PI3K: Phosphoinositide-3-kinase
PI3KCA: Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphate 3-Kinase Catalytic Subunit Alpha
PKB: Protein kinase B
PKC: Protein kinase C
PLC: Phospholipase C
PML: Promyelocytic Leukemia
PUMA: p53 Upregulated Modulator of Apoptosis
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
RCPG: Récepteurs couplés aux protéines G
RE: Reticulum endoplasmique
RET: Ret Proto-Oncogene

ROS1: Proto-oncogene tyrosine-protein kinase ROS
RTK: Tyrosine kinase receptor
SCC: Squamous cell carcinoma
SH3: Src homology 3
SHC: Src homology 2 domain-containing-transforming protein C
SG: Survie globale
Sec61 β : Nucleoporin 6
SiARN: Small interfering RNA
ShRNA: Short RNA
SNP: Single Nucleotide Polymorphisms
SRC: Proto-oncogene tyrosine-protein kinase Src
STAT: Signal transducer and activator of transcription
STING: Stimulator of interferon genes
SORCS1: Sortilin Related VPS10 Domain Containing Receptor 1
SORCS2: Sortilin Related VPS10 Domain Containing Receptor 2
SORCS3: Sortilin Related VPS10 Domain Containing Receptor 3
SORLA: Sortilin Related Receptor 1
SPRY4: Sprouty RTK signaling antagonist 4
TEA: Domain Transcription Factor
TEM: Epithelial–Mesenchymal Transition
TEP: Tomographie par émission de positons
TDM: Tomodensitométrie
TDP-43: Transactivation response (TAR) DNA-binding Protein 43
TES: Trk EGFR Sortilin complex
TGF α : Transforming Growth Factor alpha
TGF β : Transforming Growth Factor beta
TGN: Réseau trans-golgien
TNK: Natural Killer
TNM: Tumor Node Metastasis
TP53: Tumor Protein P53
TRK: Neurotrophic Receptor Tyrosine Kinase
TTF1: Thyroid Transcription Factor 1
VPS: Vacuolar protein sorting
VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor
VLDL: Very Low-Density Lipoprotein

YAP: Yes-Associated Protein

YKL40: Chitinase 3 Like 1

Introduction

Chapitre I. Les cancers du poumon

I.1. Épidémiologie et étiologie des cancers du poumon

I.1.1. Incidence et mortalité

Selon l'organisation mondiale de la santé (OMS), le cancer du poumon est la principale cause de décès par cancer dans le monde. En 2020, on estime que 1,8 million de décès sont attribués à ce type de cancer, soit 18% de l'ensemble des décès par cancer dans le monde (Sung *et al.*, 2021). Malgré des progrès thérapeutiques significatifs, le taux de survie à 5 ans est estimé à 28% pour les cancers non à petites cellules, et seulement 7% pour les cancers à petites cellules, selon l'American Cancer Society (mis à jour le 1^{er} mars 2023).

En France, le cancer du poumon occupe également la première place en termes de mortalité par cancer avec un bilan annuel de 33 000 décès. Pour l'année 2018, le nombre de nouveaux cas diagnostiqués de cancer du poumon s'élevait à 46 363 (soit 31 231 hommes et 15 132 femmes). Les projections pour 2023 suggèrent une hausse préoccupante, estimant le nombre de nouveaux cas à 52 777, répartis entre 33 438 hommes et 19 339 femmes. Le rapport «Global Cancer Statistics 2020» de l'American Cancer Society (ACS) en collaboration avec le Centre international de recherche sur le cancer (CIRC) projette que d'ici à 2040, près de 28,4 millions de nouveaux cas de cancer seront diagnostiqués, soit une augmentation considérable de 47% par rapport à 2020 (Sung *et al.*, 2021).

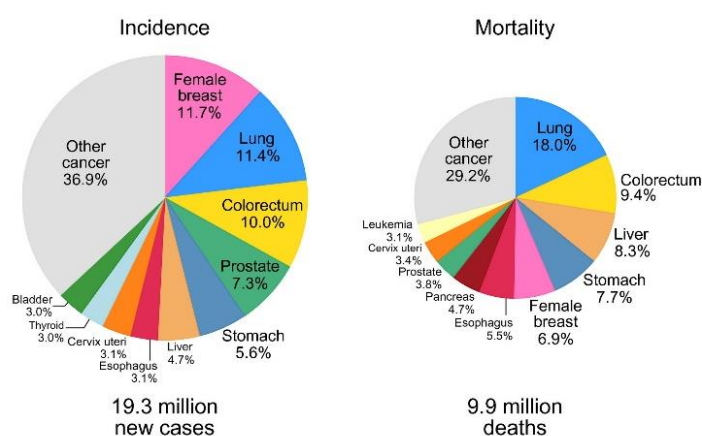


Figure 1: Graphiques illustrant les statistiques mondiales des 10 cancers les plus fréquents en termes d'incidence et de mortalité en 2020. Source : GLOBOCAN 2020

À gauche, le graphique montre la répartition de l'incidence des nouveaux cas de cancer en pourcentage par type de cancer. Les données indiquent qu'il y a eu 19,3 millions de nouveaux cas de cancer en 2020, seulement pour les types les plus communs. Le cancer du sein chez les femmes représente 11,7 %, le

cancer du poumon 11,4 % et le cancer colorectal 10,0 %. À droite, le graphique présente la mortalité en pourcentage de décès dus aux différents types de cancer. En 2020, un total de 9,9 millions de décès par cancer a été comptabilisé. Le cancer du poumon est responsable de la part la plus élevée de mortalité avec 29,2 % suivi par le cancer colorectal 9,4 % et le cancer de l'estomac 8,3 %.

I.1.2. Facteurs de risque

Malgré une hausse importante de l'incidence des cancers du poumon chez les non-fumeurs, le tabagisme demeure le facteur de risque majeur du développement de cette maladie à l'échelle mondiale. Près de 80% des décès annuels attribués à cette pathologie sont liés à la consommation de tabac (Jemal *et al.*, 2018). Des initiatives sanitaires majeures ont permis de réduire la prévalence du tabagisme à travers le monde, sensibilisant le public aux dangers du tabac vis-à-vis des cancers bronchiques, selon le programme national de lutte contre le tabac 2018-2022 (https://sante.gouv.fr/IMG/pdf/180702-pnlt_def.pdf).

Les données épidémiologiques suggèrent que chez les fumeurs, les hommes courent un risque légèrement supérieur de développer un cancer du poumon par rapport aux femmes (Marang-van de Mheen *et al.*, 2001; Thun *et al.*, 2008). Plusieurs études ont examiné la sensibilité de ces dernières aux agents cancérigènes du tabac et concluent qu'en tenant compte de la consommation et l'exposition, la vulnérabilité des femmes ne semble pas surpasser celle des hommes (Kligerman and White, 2011; Barrera-Rodriguez and Morales-Fuentes, 2012). En revanche, les analyses moléculaires démontrent l'existence de variations génétiques liée au genre chez les patients fumeurs atteints d'un cancer des poumons. Par exemple, les patientes fumeuses présentent davantage de mutations du gène suppresseur de tumeur *TP53* que leurs homologues non-fumeuses, une tendance non observée chez les hommes (Yim and Chung, 2011). De même, des altérations du gène de la glutathion s-transférase Mu 1 (*GSTM1*), sont plus courantes chez les femmes (Berardi *et al.*, 2009). Toutefois, ces études présentent des limites, notamment dans la détermination précise de l'exposition au tabac, en raison de difficultés à mesurer des aspects comme la profondeur d'inhalation ou la teneur en goudron des cigarettes (Bain *et al.*, 2004; Fidler-Benaoudia *et al.*, 2020).

Les autres facteurs de risque sont liés à des expositions individuelles, professionnelles, notamment l'amiante, le radon, la pollution atmosphérique croissante, des maladies pulmonaires d'origine infectieuse ou inflammatoire et des prédispositions génétiques (Bade and Cruz, 2020)

I.2. Les symptômes des cancers du poumon

La détection du cancer du poumon à un stade précoce est souvent très rare. Cela est dû au fait que dans la majorité des cas, les patients atteints ne présentent aucun symptôme jusqu'à atteindre un stade avancé, voire métastatique. Cette absence de symptômes est en effet due à la structure des poumons qui se caractérise par une absence de terminaisons nerveuses, permettant ainsi aux tumeurs de croître et de se propager discrètement, sans provoquer ni de douleur ni une gêne notable (cancer, 2020).

Les symptômes du cancer des poumons sont variés. Les signes respiratoires tels que la toux persistante, l'expectoration teintée de sang (hémoptysie), la dyspnée ou encore les douleurs thoraciques sont les plus courants. Cependant, d'autres symptômes plus généraux peuvent également survenir, comme la perte de poids inexplicée ou une fatigue intense (Houlihan *et al.*, 2004; Corner *et al.*, 2005; Bando and Date, 2012). Ces manifestations, bien que non spécifiques au cancer du poumon, doivent inciter à la vigilance et justifier une consultation médicale. Seule l'approche chirurgicale telle qu'une biopsie peut permettre de confirmer le type histologique de cancer bronchique car les symptômes ne suffisent pas. Ainsi une classification basée sur la structure des tissus a été mise en place.

I.3. La classification histologique

I.3.1. Le cancer bronchique à petites cellules (CBPC)

Le CBPC est un cancer des cellules neuroendocrines des bronches, dû principalement au tabagisme. Il représente la plus faible proportion de l'ensemble des cancers du poumon diagnostiqués, soit entre 15 et 20 %. Le CBPC est décrit comme agressif et caractérisé par un temps de doublement rapide et des métastases précoces, ce qui le rend plus difficile à détecter aux stades précoces et assombrit le pronostic du patient (Nanavaty, Alvarez and Alberts, 2014).

I.3.2. Le cancer bronchique non à petites cellules (CBNPC)

Le CBNPC est la forme la plus courante des cancers du poumon en représentant 80 à 85% de l'ensemble de ces derniers (CRUK, 2020). Les principaux sous-types de CBNPC sont ; l'adénocarcinome, le carcinome à cellules squameuses ou carcinome épidermoïde et le carcinome à grandes cellules (Rodriguez-Canales, Parra-Cuentas and Wistuba, 2016). Outre ces trois sous-types principaux, il existe un petit sous-ensemble de tumeurs à l'histologie mixte

(carcinomes sarcomatoïdes et adénosquameux) ou non spécifiée (NOS) et dont les caractéristiques cliniques sont indistinctes.

I.3.2.1. Les adénocarcinomes

L'adénocarcinome ou LUAD pour *lung adenocarcinoma*, est la forme la plus courante de CBNPC. Il compte pour près de 38,5% de tous les diagnostics du cancer du poumon (Dela Cruz, Tanoue and Matthay, 2011). Bien que caractérisés comme tumeurs épithéliales malignes, ces cancers se distinguent par une différenciation glandulaire. Ils peuvent manifester une production de mucines, identifiable grâce à des techniques de coloration, telle que la mucicarminé, ou l'expression de marqueurs pneumocytaires comme la napsine A ou le facteur de transcription thyroïdien 1 (TTF1). En général, le LUAD se développe typiquement à partir de l'épithélium glandulaire, des cellules souches broncho-alvéolaires, des cellules de Clara ou des pneumocytes de type II dans la périphérie du poumon (Barros-Filho *et al.*, 2019).

Bien qu'ils dérivent de différentes cellules pulmonaires, les LUAD sont classifiés non seulement en fonction de leurs caractéristiques histologiques, mais également selon la manière dont ils sont pris en charge, leurs pronostics et leurs profils génétiques (Travis *et al.*, 2013).

I.3.2.2. Carcinome à cellules squameuses

Le carcinome à cellules squameuses ou *squamous cell carcinoma* (SCC) occupe près de 20% des cas de cancers pulmonaires (Dela Cruz, Tanoue and Matthay, 2011). Il se trouve généralement dans une localisation centrale, dans une bronche principale ou lobaire. Selon l'OMS, le SCC est identifié comme une tumeur épithéliale maligne qui présente une kératinisation et/ou de ponts intercellulaires, ou encore une expression de marqueurs immunohistochimiques (IHC) typiques de la différenciation des cellules malpighiennes. Bien que la kératinisation soit souvent la signature du SCC, de nombreuses tumeurs peuvent ne pas montrer de signes morphologiques de kératinisation (Paech *et al.*, 2011).

I.3.2.3. Carcinome à grandes cellules

Le carcinome à grandes cellules ou *large cell lung carcinoma* (LCLC) représente 2,9 % de l'ensemble des cancers du poumon (Dela Cruz, Tanoue and Matthay, 2011). Selon l'OMS, ce sous-type de cancer est défini comme un carcinome CBNPC indifférencié, qui ne présente aucun signe histologique ou IHC de différenciation épidermoïde, glandulaire ou à petites cellules. Afin de diagnostiquer le LCLC, un échantillonnage extensif d'une pièce de résection

chirurgicale est réalisé après l'exclusion d'autres formes de cancers du poumon tels que le SCC et le LUAD ou encore le CBPC. Cela rend impossible le diagnostic sur des biopsies obtenues à l'aiguille ou sur des échantillons cytologiques (Karlsson *et al.*, 2017).

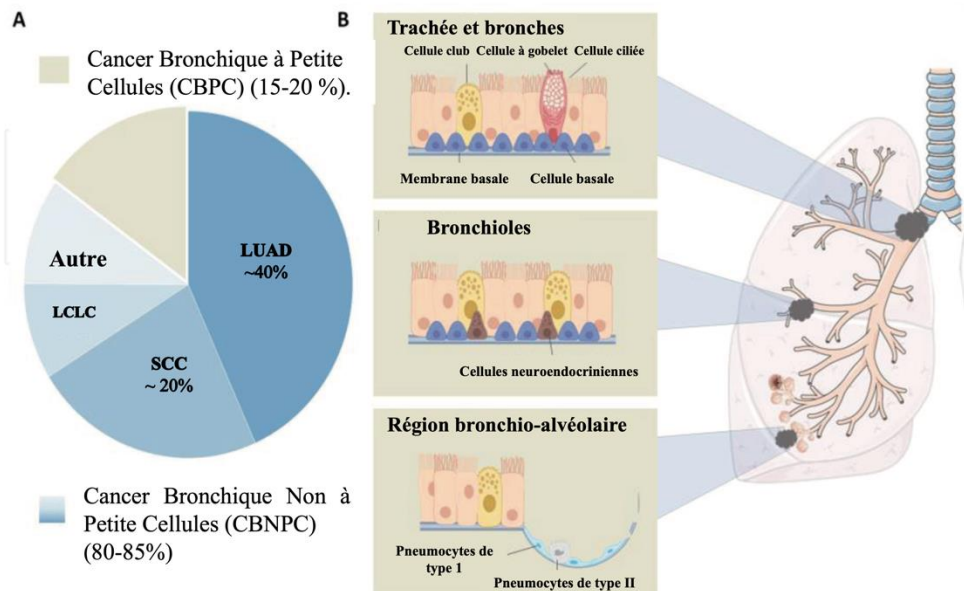


Figure 2: Classification histologique du cancer du poumon. (A) Types histologiques de cancer du poumon. (B) Localisation des tumeurs et origine des cellules (Barros-Filho *et al.*, 2019)

Le cancer du poumon est classé en fonction du type histologique. Il en existe deux principaux : le cancer du poumon à petites cellules (CBPC), qui représente 15 à 20 % des patients atteints de cancer du poumon et le cancer du poumon non à petites cellules (CBNPC) qui représente les 80 à 85 % restant. Le CBPC, qui provient principalement des voies respiratoires centrales, serait dérivé de cellules neuroendocrines. Le CBNPC se compose de trois sous-types histologiques principaux : l'adénocarcinome (LUAD), le carcinome à cellules squameuses ou carcinome épidermoïde (SCC) et le carcinome à grandes cellules (LCLC). Le LUAD est le plus fréquent représentant environ 40 % de tous les cancers pulmonaires. Le LUAD se développe typiquement à partir de l'épithélium glandulaire, des cellules souches broncho-alvéolaires, des cellules de Clara ou des pneumocytes de type II dans la périphérie du poumon. Le SCC se développe principalement dans les voies aériennes centrales et les bronches segmentaires. Il représente environ 20 % de tous les cas de cancer du poumon. Les carcinomes à grandes cellules (LCLC) peuvent apparaître n'importe où dans le poumon et sont classés comme des tumeurs sans caractéristiques générales associées au CBPC, LUAD ou SCC.

I.4. La classification TNM du cancer du poumon

Pour une prise en charge efficace du cancer du poumon, il est important d'avoir des informations précises sur son étendue et sa gravité. La classification TNM est un outil précieux pour évaluer de manière approfondie et systématique le cancer du poumon. Elle permet aux anatomopathologistes d'appréhender la complexité de la maladie et de guider les stratégies cliniques pour offrir une meilleure prise en charge des patients. Cette classification, basée sur

trois critères essentiels, **Tumeur (T)**, nodules lymphatiques ou *lymphatic Node* en anglais (N) et **Métastase (M)**, offre une image détaillée de l'extension anatomique de la maladie (Mirsadraee *et al.*, 2012; van Meerbeeck and Janssens, 2013) (Figure 2). La catégorie "T" évalue la taille et l'emplacement de la tumeur primaire. Elle est subdivisée en différentes sous-catégories, allant de T1 à T4, qui fournissent des informations sur l'étendue de la tumeur dans les tissus proches. La catégorie Nodule (N) fait référence à la propagation du cancer aux ganglions lymphatiques proches. La classification varie de N0 (pas d'envahissement ganglionnaire) à N3 (envahissement ganglionnaire avec plusieurs ganglions touchés). La catégorie Métastase (M) indique si le cancer s'est propagé à des parties éloignées du corps. Les sites métastatiques les plus connus pour le cancer du poumon sont principalement le cerveau, le foie, le tissu osseux, les glandes surrénales, le rein et le second poumon (Popper, 2016).

T - Tumeur

Tx	Tumeur primaire non connue ou tumeur prouvée par la présence de cellules malignes dans les sécrétions broncho-pulmonaires mais non visible aux examens radiologiques et endoscopiques.
T0	Absence de tumeur identifiable.
Tis	Carcinome in situ.
T1	Tumeur de 3 cm ou moins dans ses plus grandes dimensions, entourée par du poumon ou de la plèvre viscérale, sans évidence d'invasion plus proximale que les bronches lobaires à la bronchoscopie (c'est-à-dire pas dans les bronches souches) T1a(mi) Adénocarcinome minimalement-invasif T1a ≤ 1cm T1b > 1 cm et ≤ 2 cm T1c > 2 cm et ≤ 3 cm
T2	Tumeur de plus de 3 cm, mais moins de 5 cm ou moins , avec quelconque des éléments suivants : - envahissement d'une bronche souche quelle que soit sa distance par rapport à la carène mais sans envahissement de la carène, - envahissement de la plèvre viscérale, - existence d'une atélectasie ou pneumonie obstructive s'étendant à la région hilare ((sub)lobaire ou pulmonaire). T2a > 3 cm mais ≤ 4 cm T2b > 4 cm mais ≤ 5 cm
T3	Tumeur de plus de 5 cm et de 7 cm ou moins , ou associée à un(des) nodule(s) tumoral(aux) distinct(s) et dans le même lobe , ou ayant au moins l'un des caractères invasifs suivants : - atteinte de la paroi thoracique (incluant les tumeurs du sommet), - atteinte du nerf phrénique, - atteinte de la plèvre pariétale ou du péricarde.
T4	Tumeur de plus de 7 cm ou associée à un(des) nodule(s) pulmonaire(s) distinct(s) comportant un envahissement quelconque parmi les suivants : - médiastin, - coeur ou gros vaisseaux, - trachée, - diaphragme, - nerf récurrent, - oesophage, - corps vertébraux, - carène.

N - Adénopathies

Nx	Envahissement locorégional inconnu.
N0	Absence de métastase dans les ganglions lymphatiques régionaux.
N1	Métastases ganglionnaires péri-bronchiques homolatérales et/ou hilaires homolatérales incluant une extension directe.
N2	Métastases dans les ganglions médiastinaux homolatéraux ou dans les ganglions sous-carénaux
N3	Métastases ganglionnaires médiastinales controlatérales ou hilaires controlatérales ou scaléniques, sus-claviculaires homo- ou controlatérales.

M - Métastases

M0	Pas de métastase à distance.
M1	Existence de métastases : M1a Nodules tumoraux séparés dans un lobe controlatéral, ou nodules pleuraux ou pleurésie maligne ou péricardite maligne M1b 1 seule métastase dans un seul site métastatique M1c Plusieurs métastases dans un seul site ou plusieurs sites atteints

Figure 3: Classement TNM des cancer bronchique non à petites cellules (Référentiel en oncologie Auvergne-Rhône-Alpes. 14e édition. Mise à jour en 2018)

T (Taille de la tumeur) : Détaille la dimension et l'extension de la tumeur primaire, avec des catégories allant de T1 (tumeur plus petite et localisée) à T4 (tumeur plus grande ou avec une extension à des structures voisines). N (Atteinte des ganglions lymphatiques régionaux) : Évalue l'implication des

ganglions lymphatiques régionaux, de N0 (pas d'atteinte ganglionnaire) à N3 (atteinte ganglionnaire étendue). M (Métastase à distance) : Renseigne sur la présence de métastases dans d'autres organes, M0 signifiant aucune métastase détectée et M1 indiquant la présence de métastases.

I.5. Le diagnostic du cancer du poumon

Le diagnostic du cancer du poumon a connu des avancées significatives au cours des dernières décennies, notamment avec l'avènement du scanner ou tomodensitométrie (TDM). La TDM permet de scanner la tumeur et de la reconstruire en 2D ou en 3D dans sa structure anatomique, fournissant des images détaillées qui permettent d'identifier des anomalies telles que des masses ou des nodules dans les poumons. Cependant, malgré ces avancées, seulement 10% à 15% des patients sont diagnostiqués à des stades précoces, et 75% des patients sont diagnostiqués à un stade avancé. La TDM est souvent utilisée en combinaison avec d'autres techniques d'imagerie, telles que la tomographie par émission de positons (TEP), pour obtenir des images fonctionnelles et anatomiques simultanément. Cette combinaison, appelée TEP-Scan, permet de superposer l'image fonctionnelle (image TEP) à sa localisation anatomique précise dans le corps. D'autres techniques d'imagerie, telles que la micro-endoscopie confocale et la bronchoscopie par auto-fluorescence, peuvent également être combinées avec la tomodensitométrie afin d'améliorer le diagnostic et les stratégies de traitements (Sutedja, 2003).

Toutefois, malgré ces progrès, certaines tumeurs demeurent inférieures au seuil de détection par ces outils de diagnostic, soulignant la nécessité de développer des outils encore plus précis et sensibles pour la détection et la prise en charge précoce des cancers du poumon. L'objectif actuel est notamment de développer des approches de biopsies liquides pour caractériser des biomarqueurs circulants. Ainsi, plusieurs biomarqueurs circulants sont actuellement analysés ou en cours d'études tels que les acides nucléiques (ADN tumoral circulant) (Sanfiorenzo *et al.*, 2013; Chen *et al.*, 2016; Underhill *et al.*, 2016), les protéines (Patz *et al.*, 2008; Farlow *et al.*, 2010), les microvésicules (Jakobsen *et al.*, 2015; Park *et al.*, 2017) ou encore les cellules tumorales circulantes (CTCs) (Parkinson *et al.*, 2012; Ilie *et al.*, 2014) et présentent un intérêt potentiel dans le diagnostic précoce. D'ores et déjà, le dépistage du cancer du poumon à partir des biopsies liquides a permis de détecter des mutations dans les gènes associés au cancer, tel que l'EGFR et à aider également à prédire la réponse aux thérapies ciblées (Roldan Ruiz *et al.*, 2023). Cependant, l'utilisation de la biopsie liquide comme outil de dépistage précoce représente un grand défi en raison de l'hétérogénéité des signatures tumorales dans la circulation sanguine et nécessite encore des recherches supplémentaires.

I.6. Le Paysage moléculaire du cancer du poumon

Au cours des dernières années, d'importantes avancées ont permis d'améliorer notre compréhension de la biologie des cancers du poumon. Ces progrès ont mis en lumière une hétérogénéité moléculaire notable au sein de ces derniers. La classification connue de cette maladie repartie principalement en CBPC et CBNPC, reposait principalement sur des distinctions histologiques. Cependant, face à la diversité moléculaire observée, cette classification s'est révélée restrictive. Grâce au développement des technologies de séquençage de l'ADN, nous percevons maintenant le cancer du poumon comme une mosaïque de différents sous-types tumoraux, uniquement liés par leur origine pulmonaire. Cette nouvelle classification histo-moléculaire prend en considération les spécificités génétiques de chaque tumeur permettant par conséquent de déterminer son évolution biologique et ainsi de prédire sa réponse aux thérapies.

La recherche en oncologie thoracique se penche désormais sur les mécanismes moléculaires au cœur de cette pathologie. La transition d'un tissu pulmonaire sain vers une tumeur maligne est le résultat de multiples altérations génétiques et épigénétiques. L'accumulation de ces altérations permettent aux cellules cancéreuses de proliférer rapidement, d'envahir les tissus voisins en formant des métastases et de développer une résistance aux thérapies. L'identification et la caractérisation de ces mutations s'avèrent donc essentiel pour améliorer le dépistage précoce et optimiser la prise en charge thérapeutique des patients atteints d'un cancer bronchique.

I.7. Les avancées thérapeutiques

I.7.1. Les thérapies conventionnelles

Au cours des vingt dernières années, le traitement du cancer du poumon a connu une transformation majeure. En effet, les traitements reposaient principalement sur l'application de thérapies cytotoxiques quel que soit le type de cancer bronchique. Désormais, les stratégies thérapeutiques compte parmi elles des traitements mieux tolérés et spécifiques aux sous-types moléculaires (Cancer Genome Atlas Research Network, 2012, 2014).

Historiquement, les thérapies combinées à base de platine, comme le cisplatine associé à un autre agent cytotoxique, ont été le traitement de choix pour les patients atteints de CBNPC à un stade avancé et en bon état de santé. De plus, une thérapie d'entretien est souvent envisagée

pour ceux ayant une forme non- SCC du cancer et qui permet de maîtriser la croissance tumorale après les quatre à six cycles de chimiothérapies (Hanna *et al.*, 2017). Il est à noter que parmi les nombreux traitements cytotoxiques utilisés chez les patients atteints de CBNPC à un stade avancés, aucune différence clinique significative n'a été observé (Schiller *et al.*, 2002), à l'exception du pemetrexed, un analogue de l'acide folique employé notamment dans le traitement de maintenance du CBNPC à la suite d'une chimiothérapie à base de sels de platine (Scagliotti *et al.*, 2008).

L'ablation chirurgicale reste la norme pour le CBNPC à un stade précoce (stades I et II, ainsi que certains cas de stade IIIA) (Hirsch *et al.*, 2017)). Cependant, un pourcentage significatif de patients, soit 15 à 20% d'entre eux, présente une récurrence (Goldstraw *et al.*, 2016). La thérapie adjuvante à base de doublet de cisplatine a montré des taux de survie améliorés pour ces patients, en particulier chez les patients aux stades II et IIIA ayant subi une résection complète (Kris *et al.*, 2017). Les avancées technologiques dans les domaines de la chirurgie et de la radiothérapie ont également amélioré les survies des patients atteints du cancer du poumon à un stade précoce (Lampridis *et al.*, 2023). Pour les patients atteints d'un CBNPC avancé inopérable, une combinaison de thérapie cytotoxique et de radiothérapie thoracique est recommandée (Dillman *et al.*, 1990; Chi *et al.*, 2017). Face aux difficultés de prise en charge avec les chimiothérapies conventionnelles, l'immunothérapie représente une avancée prometteuse pour les patients en échappement thérapeutique.

I.7.2. L'immunothérapie

L'objectif des immunothérapies est de contourner la capacité des tumeurs à développer des mécanismes d'échappement au système immunitaire. Elle cible précisément les interactions entre les cellules cancéreuses et le système immunitaire, notamment via des modulateurs de points de contrôle immunitaire tels que PD-1 (*Program Cell Death-1*), PD-L1 (*Programmed death-ligand 1*) et CTLA-4 (*Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4* ou "antigène 4 du lymphocyte T cytotoxique"). En effet, le récepteur PD-1, qui peut être exposé à la surface des lymphocytes T CD4 +, T CD8 +, T Natural Killer (TNK), les cellules B et les monocytes activés, se lie au ligand PD-L1 des cellules présentatrices d'antigènes pour moduler la réponse immunitaire et provoquer l'anergie du lymphocyte T (LTs) perdant à la fois sa capacité à proliférer et sa fonction effectrice. L'expression de PD-L1 par les cellules tumorales permet ainsi d'échapper à la surveillance exercée par les LTs.

Parmi les inhibiteurs de points de contrôle approuvés pour le cancer du poumon, on compte le nivolumab (Opdivo), le pembrolizumab (Keytruda) et l'atezolizumab (Li, Wang and Zhan, 2021). Dans le cas du LUAD, le pembrolizumab a montré une activité positive et a été approuvé en tant que thérapie de première intention pour les patients avec une expression élevée ($\geq 50\%$) de PD-L1 (Punekar *et al.*, 2022).

L'essai en phase 3 KEYNOTE-091 (PEARLS) a démontré qu'une utilisation du pembrolizumab (anticorps monoclonal anti-PD-1 en tant que traitement adjuvant pour les CBNPC de stade IB à IIIA après résection et chimiothérapie adjuvante, améliore la survie médiane sans progression chez les patients (Punekar *et al.*, 2022). Cependant, certains sous-types moléculaires de CBNPC peuvent développer une résistance à l'immunothérapie en raison de mutations génétiques spécifiques. Par exemple, les mutations du gène EGFR peuvent favoriser un microenvironnement non inflammatoire, tandis que les mutations du gène LKB (Symbole officiel HUGO STK11 ; Sérine/thréonine kinase 11) sont plutôt associées à la suppression de la voie cGAS-STING. Cette voie est généralement activée pour déclencher un système de défense en présence d'ADN double-brin exogène, notamment d'origine viral et bactérien, et qui peut être étendu à celui des cellules cancéreuses (Wolf *et al.*, 2016). Lorsque la GMP-AMP cyclique synthase (cGAS), reconnaît un ADN anormal dans le cytoplasme, son activation déclenche la production de GMP-AMP cyclique (cGAMP), qui active la protéine STING (*stimulator of interferon genes*). Cette dernière entraîne la production d'interférons de type I (IFN α) et d'autres cytokines inflammatoires. Il existe une dualité ou un antagonisme de la réponse tumorale reposant sur l'activation de la voie cGAS-STING en conduisant soit à la mise en place d'une réponse immunitaire anti-tumorale soit à une augmentation de l'instabilité génomique des cellules tumorales par inhibition des voies de réponses aux dommages à l'ADN (Chanut and Petrilli, 2019).

D'autres approches immunothérapeutiques, outre les inhibiteurs de points de contrôle, telles que la thérapie vaccinale, sont en cours d'étude dans le contexte du CBNPC. Cette stratégie vise à initier ou amplifier les réponses immunitaires adaptatives antitumorales en introduisant des antigènes tumoraux pour stimuler le système immunitaire. Cette approche permet de générer des réponses immunitaires contre les tumeurs via l'implication des lymphocytes T effecteurs et mémoire spécifiques à l'antigène tumoral (Lahiri *et al.*, 2023).

Les recherches et essais cliniques en cours continuent d'explorer de nouvelles stratégies et combinaisons immunothérapeutiques / thérapies pour améliorer la prise en charge des patients atteints de CBNPC (Lahiri *et al.*, 2023).

I.7.3. Thérapie ciblée et biomarqueurs moléculaires

L'avènement de la médecine personnalisée dans le domaine de l'oncologie avec l'émergence des thérapies ciblées représente une révolution majeure dans la prise en charge des CBNPC. La mise en place de ces thérapies ciblées repose sur l'association d'anomalies moléculaires et à l'existence de molécules ciblant ces dernières. Les mutations activatrices dans l'oncogène *KRAS* et dans le récepteur de facteur de croissance épidermique (*EGFR*) sont les plus fréquentes. Elles représentent respectivement entre 30% et 15% des patients. Ces deux mutations sont généralement considérées comme mutuellement exclusives dans le LUAD, signifiant qu'elles sont rarement, voire jamais présentes ensemble dans la même tumeur (Unni *et al.*, 2015, Riely *et al.*, 2008). Des études très récentes ont révélé que l'exposition à certains agents environnementaux pouvait contribuer à l'émergence de mutations *KRAS* et *EGFR*. Cette découverte provient principalement d'analyses de profils mutationnels à des couvertures de séquençage élevées sur les tissus bronchiques normaux de 247 individus dans le cadre de l'étude TRACER (Hill *et al.*, 2023). Cette étude a identifié des mutations oncogéniques dans les gènes *KRAS* et *EGFR* dans respectivement 33 % et 18 % des échantillons. Ces résultats suggèrent que les facteurs environnementaux pourraient jouer un rôle de promoteur tumoral, en activant des clones cellulaires portant des mutations préexistantes dans les tissus normaux. Cependant, ces cellules qui abritent ces mutations oncogéniques ne se transforment pas en cellules malignes. En effet, il semblerait qu'une réaction inflammatoire concomitante puisse stimuler l'éveil de cette population cellulaire rare ou cellules "dormantes" vers l'initiation de la tumorigenèse (Hill *et al.*, 2023).

D'autres mutations ou altérations ont été identifiées dans le CBNPC avec une fréquence plus faible. Parmi celles-ci, on trouve notamment des translocations de la kinase du lymphome anaplasique (*ALK*) ou le récepteur proto-oncogénique *ROS1* (*Proto-oncogene tyrosine-protein kinase*), ainsi que des amplifications ou mutations de *MET* (*Hepatocyte growth factor receptor*), *BRAF* (*Serine/threonine-protein kinase B-raf*), *FGFR* (*Fibroblast growth factor receptor 1 protein*), *NTRK* (*Neurotrophic tyrosine receptor kinase*), *RET* (*Ret Proto-Oncogene*), *HER2*, *HER3* et *HER4* (*Human epidermal growth factor Receptor 2, 3, et 4 respectivement*) et les

composants de la voie de signalisation RAS-RAF-MEK (Wang, Herbst and Boshoff, 2021) (Figure 4). Plusieurs thérapies ciblant spécifiquement ces voies ont déjà reçu une autorisation de mise sur le marché (AMM) et d'autres une autorisation temporaire d'utilisation (ATU) dans les CBNPC. Étant donné leur haute efficacité et leur spécificité, ces thérapies sont désormais privilégiées en première ligne pour certains sous-groupes de patients.

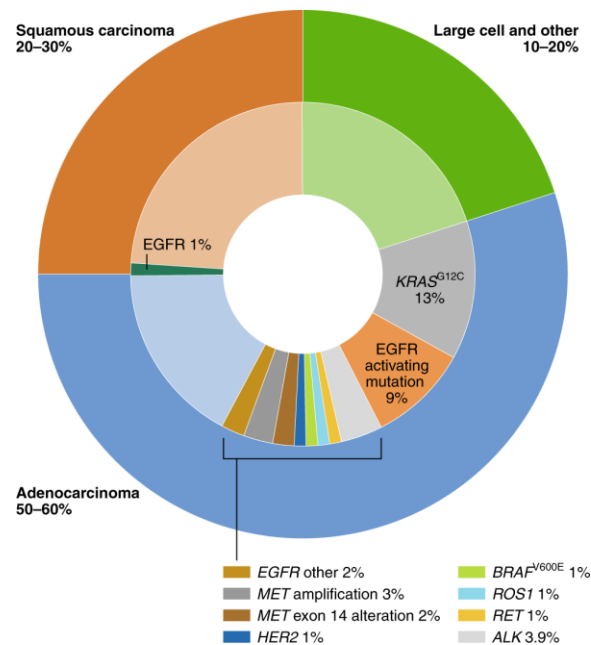


Figure 4: Paysage moléculaire du CBNPC (Wang, Herbst and Boshoff, 2021)

L'adénocarcinome représente 50 à 60% des cas de CBNPC, tandis que le carcinome à cellules squameuses représente 20 à 30%. Le carcinome à grandes cellules représente entre 10 et 20% des cas. Les mutations les plus fréquentes dans les adénocarcinomes comprennent *KRAS* au résidu G12C, l'*EGFR*, *ALK*, *RET*, *ROS1*, *BRAF* au résidu V600E, *HER2*, l'amplification de *MET* ou l'altération de son exon 14. Cependant, la plupart de ces mutations sont rares dans le carcinome à cellules squameuses.

I.8. Homologous to Kirsten murine sarcoma virus oncogene (*KRAS*)

Les mutations du gène *KRAS* sont couramment observées dans les CBNPC, spécifiquement dans les LUAD. Il a été démontré que ces mutations sont étroitement liées à la consommation de tabac et ont généralement un pronostic défavorable (Riely *et al.*, 2008). Le gène *KRAS* code pour une protéine de liaison guanosine triphosphate (GTP)/guanosine diphosphate (GDP) qui appartient à la famille RAS de la guanosine triphosphatase (GTPase). Cette dernière joue un rôle central dans la transduction des signaux des voies activées par les récepteurs des facteurs de croissance, tels que l'*EGFR*. Lorsque le gène est muté, en particulier au niveau du codon 12, sa protéine résultante devient constitutivement active, menant à l'activation continue de la voie

PI3K sous-jacente, impliquée dans la croissance cellulaire, la prolifération et la survie (Dubus, 2010). Cette activation constante de RAS mène à des signaux intracellulaires indépendants des récepteurs à activité tyrosine kinase (RTK), tels que l'EGFR. Cela confère une résistance chez les patients aux thérapies ciblant spécifiquement l'EGFR par un mécanisme de contournement ou *bypass* (Waters and Der, 2018).

Dans le CBNPC, les mutations $KRAS^{G12C}$ constituent entre 39% et 42% de toutes les mutations $KRAS$ et 11 à 13% des anomalies génétiques rencontrées dans ce type de cancer (Reita *et al.*, 2022). L'émergence des inhibiteurs ciblant directement cette mutation tels que le sotorasib et l'adagrasib, a redonné une once d'espoir face à la vision d'invincibilité de $KRAS$. En effet, ce dernier est dérégulé dans plusieurs cancers, et apparaissait difficile à inhiber. Le sotorasib (également connu sous le nom de Lumakras ou AMG 510) et l'adagrasib (ou MRTX849) établissent une liaison covalente avec la cystéine en position 12 de la protéine $KRAS-G12C$, neutralisant ainsi son activité et inhibant la prolifération tumorale (Liu, Kang and Tang, 2022). Les expériences précliniques ont révélé que ces deux inhibiteurs altèrent sélectivement la survie et la viabilité des cellules porteuses de la mutation $KRAS^{G12C}$, sans perturber celles possédant d'autres variants de $KRAS$ (Liu, Kang and Tang, 2022).

Avec le développement de ces deux molécules, les patients atteints d'un CBNPC avancé porteur de la mutation $KRAS^{G12C}$ ainsi que ceux présentant d'autres cancers avec la même mutation bénéficient désormais de nouvelles alternatives thérapeutiques (Kim, Xue and Lito, 2020; Liu, Kang and Tang, 2022). Toutefois, il convient de souligner que, comme pour tout traitement ciblé, une résistance aux inhibiteurs peut se développer avec le temps. Par conséquent, des études approfondies sont impératives pour décrypter les mécanismes sous-jacents à cette résistance et concevoir des approches innovantes afin de surmonter l'apparition de mutations « acquises » résistantes (Awad *et al.*, 2021). Des efforts sont également déployés pour élaborer des inhibiteurs ciblant d'autres mutations de $KRAS$ (Kim, Xue and Lito, 2020; Reita *et al.*, 2022).

I.9. Translocation chromosomique du gène ALK (anaplastic lymphoma kinase)

En 2007, Soda et son équipe ont mis en évidence une inversion sur le chromosome 2, engendrant une translocation génique entre l'extrémité 5' du gène associé aux microtubules de l'échinoderme ($EML4$) et l'extrémité 3' du gène de l'anaplastic lymphoma kinase (ALK). Toutefois, lors de réarrangements génétiques, le domaine kinase de la protéine de fusion $EML4-$

ALK est constitutivement activé, stimulant ainsi les voies de signalisation associées à la prolifération cellulaires, la migration et la survie (Soda *et al.*, 2007). On estime désormais que 3% à 7% des patients souffrant de CBNPC présentent un réarrangement du gène *ALK* (Arbour and Riely, 2017; Du *et al.*, 2018). Cette prévalence est particulièrement élevée chez les jeunes patients diagnostiqués avec un LUAD et ayant peu ou jamais fumé (Shaw *et al.*, 2009; Gainor *et al.*, 2013).

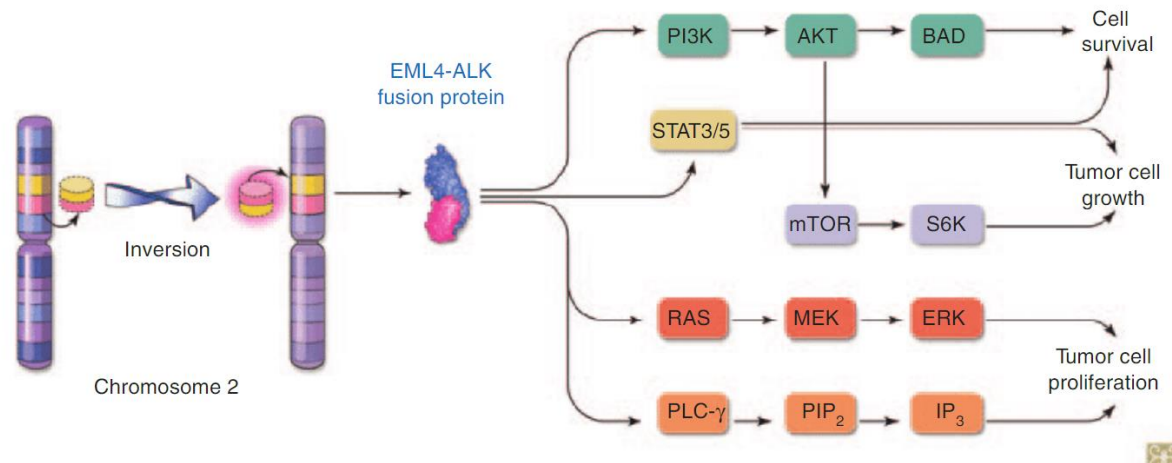


Figure 5: Réarrangement ALK et activation des voies de signalisation en aval (Solomon, Wilner and Shaw, 2013)

Les fusions EML4-ALK sont dues à une inversion au sein du chromosome 2p (à gauche). Ces fusions entraînent une surexpression d'ALK et une activation constitutive de l'activité tyrosine kinase de cette dernière et dès lors des voies de signalisation en aval (droite). Ce phénomène conduit à une prolifération incontrôlée et à une survie des cellules cancéreuses.

Le crizotinib (Xalkori®) est un inhibiteur multi-kinase qui cible les réarrangements ALK ou ROS et qui a également démontré une efficacité pour inhiber cMET dans un essai de phase I (Sahu *et al.*, 2013). Néanmoins, malgré son succès à prolonger et améliorer la survie des patients, des cas de résistance au crizotinib ont été signalés. En effet, des cas de résistance ont été observés chez des patients présentant des mutations spécifiques dans le domaine kinase d'ALK, notamment les mutations L1196M et C1156Y (Pan *et al.*, 2021). Pour contrer cette résistance, des inhibiteurs de deuxième génération, comme le ceritinib (Zykadia®) et l'alectinib (Alecensa®), ont été développés afin de cibler précisément ces mutations (Hoang *et al.*, 2020). Plus récemment, d'autres inhibiteurs de tyrosine kinase (ITKs) ciblant ALK ont été développés pour surmonter les résistances observées avec les ITKs de premières et deuxièmes générations. Le brigatinib (Alunbrig®) et le lorlatinib (Lorviqua®) (inhibiteurs ALK/ROS1 de troisième

génération), montrent des résultats encourageants dans les études cliniques avancées (Naito, Shiraishi and Fujiwara, 2021). Le lorlatinib, en particulier, a montré une activité importante contre les mutations courantes telles que L1196M et G1269A (Pan *et al.*, 2021).

I.10. Proto-oncogene tyrosine-protein kinase ROS (ROS1)

Les altérations géniques associées aux réarrangements chromosomiques du gène *ROS1* sont retrouvés dans 1 à 2% des cas de CBNPC (Rossi *et al.*, 2017). Ces altérations génétiques aboutissent à la fusion du domaine tyrosine kinase du récepteur ROS1 avec d'autres protéines partenaires. Cette fusion conduit à l'activation constitutive du domaine kinase de la protéine résultante, stimulant ainsi des voies de signalisation essentielles pour la croissance et la survie des cellules (Bergethon *et al.*, 2012). Le crizotinib, initialement développé pour traiter les CBNPC avec réarrangement *ALK*, s'est avéré significativement efficace dans le traitement des patients atteints de CBNPC avec réarrangement *ROS1* (Shaw *et al.*, 2014). Cependant, l'émergence des différentes mutations, dont la plus fréquente est la mutation G2032R, a conduit à des phénomènes de résistance au crizotinib. D'autres ITKs ont donc été développés pour surmonter ces résistances, comme décrit dans la partie ci-dessus sur la « Translocation chromosomique du gène *ALK* » (Lim *et al.*, 2017).

I.11. Epidermal growth factor receptor (EGFR)

L'EGFR, HER-1 (*Human epidermal growth factor receptor 1*) chez l'homme, également désigné sous le nom ErbB1 fait partie de la sous-famille ERBB (*Erythroblastic oncogene*) qui sont des récepteurs à activité tyrosine kinase (RTK) comprenant trois autres membres : ErbB2/HER2/Neu, ErbB3/HER3 et ErbB4/HER4. Tout comme les autres RTKs, l'EGFR et les autres membres de la sous famille sont des glycoprotéines transmembranaires qui se caractérisent par un domaine de liaison aux ligands dans leur partie extracellulaire, un domaine transmembranaire unique, une partie cytoplasmique contenant le domaine de régulation juxta-membranaire et un domaine intracellulaire kinase (ou pseudo-kinase) avec de multiples résidus tyrosine C-terminaux (à l'exception de d'ErbB3/HER3, qui nécessite une dimérisation avec d'autres membres pour l'activité de kinase). Lors de la fixation d'un ligand, les résidus tyrosine du domaine C-terminal sont phosphorylés (Lemmon, Schlessinger and Ferguson, 2014) (Figure 6).

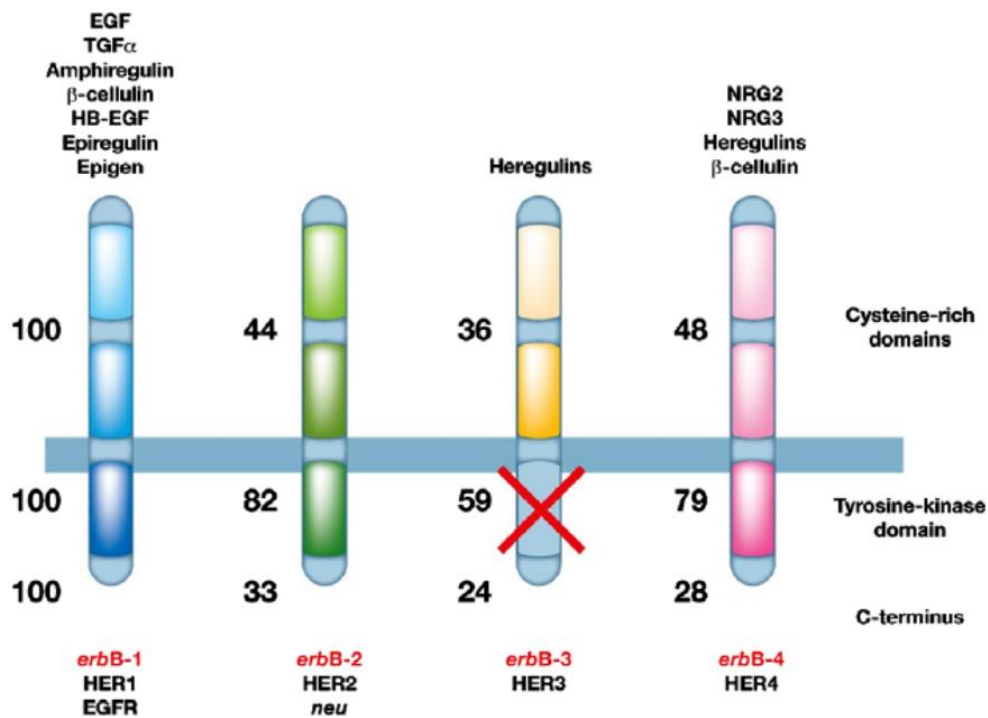


Figure 6: La famille des récepteurs ERBB et leurs ligands (Lacal, 2006)

Structure fonctionnelle des récepteurs à activité tyrosine kinase de la famille ERBB chez l'homme ; l'ErbB1/HER1/EGFR, ErbB2/HER2/Neu, ErbB3/HER3, et ErbB4/HER4. Chaque récepteur est représenté comme une glycoprotéine transmembranaire avec les éléments suivants : une région extracellulaire riche en cystéines pour la liaison aux ligands, une région transmembranaire unique, une région juxta-membranaire régulatrice et un domaine intracellulaire tyrosine kinase situé dans la région C-terminal (à l'exception d'ErbB3/HER3 qui possède un domaine pseudo-kinase).

I.11.1. Ligands de l'EGFR

L'EGFR peut déclencher des voies de signalisation distinctes et mutuellement exclusives en fonction du type de ligand et de sa présence. Plusieurs ligands sont connus pour l'EGFR, notamment l'EGF (*Epidermal growth factor*), le TGF- α (*Transforming growth factor- α*), l'amphiréguline, l' α -celluline, l'épiréguline (Singh, Carpenter and Coffey, 2016). Dans les CBNPC, l'EGF, le TGF α et l'amphiréguline sont surexprimés et entraînent une activation accrue de l'EGFR et de ses voies de signalisation (Yarden, 2001).

En plus d'être activé par ses ligands habituels, l'EGFR peut également interagir avec d'autres récepteurs en dehors de sa propre famille. Parmi ceux-ci, on trouve les agonistes des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) notamment l'acide lysophosphatidique, la thrombine et l'endothéline-1 dans les cellules Rat-1 (Wang, 2016), et d'autres stimuli extracellulaires tels que les récepteurs d'adhésion (intégrines), les cytokines (prolactine) et les agents dépolarisants de

la membrane (KCl) (Guo *et al.*, 2015). Dans de nombreux types de cellules, l'EGFR peut également être activé par des facteurs de stress environnementaux tels que les irradiations UV et γ , les oxydants, les chocs hyperosmotiques et les chocs thermiques (Guo *et al.*, 2015).

I.11.2. Activation de l'EGFR

La liaison des ligands entraîne le rapprochement d'un récepteur EGFR et d'un autre récepteur de la famille ERBB, sous forme d'homo- ou d'hétérodimère. Dans le modèle canonique, l'interaction avec le ligand rapproche les domaines kinases de deux RTKs, permettant l'autophosphorylation des domaines kinases respectifs et leur activation mutuelle (Guo *et al.*, 2015). Une fois activé par autophosphorylation, l'EGFR phosphoryle à son tour les voies de signalisation intracellulaire en aval, notamment la voie MAPK, la voie PI3K/AKT/mTOR, la voie des transducteurs et activateurs de la transcription (STAT 3/5) de NF- κ B et la voie de la phospholipase C γ (Guo *et al.*, 2015; Purba, Saita and Maruyama, 2017). Les protéines impliquées dans les voies de signalisation activées, notamment les facteurs de transcription, sont acheminées vers le noyau des cellules où elles orchestrent l'activation de diverses fonctions biologiques essentielles (Gazzeri, 2018).

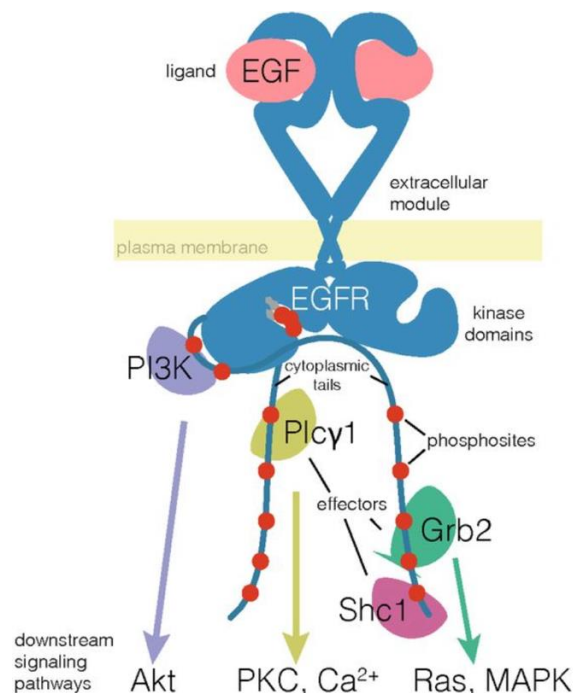


Figure 7: Vue d'ensemble de la transduction du signal de l'EGFR au niveau de la membrane (Cantor, Shah and Kuriyan, 2018)

Suite à son activation, l'EGFR procède à une autophosphorylation des sites tyrosine inclus dans sa queue cytoplasmique C-terminale ; (ces sites sont illustrés par des cercles rouges). Ces sites phosphorylés

deviennent des points d'ancrage pour plusieurs effecteurs en aval. Parmi eux, on retrouve Grb2 (protéine liée au récepteur de facteur de croissance), MAPK (protéine kinase activée par des agents mitogènes), PI3K (sous-unité régulatrice de la phosphoinositide 3-kinase), PKC (protéine kinase C), PLC γ 1 (phospholipase C-gamma-1), et Shc1 (protéine de transformation C1 dotée d'un domaine SH2). Ces effecteurs déclenchent par la suite les voies de transduction des seconds messagers.

I.11.3. Les mutations de l'EGFR dans le CBNPC

Des mutations dites «activatrices» de l'EGFR sont présentes dans 15% des tumeurs de patients souffrant de CBNPC en phase métastatique (Gazdar, 2009a). Ces mutations hétérozygotes se concentrent autour de la poche de liaison de l'ATP du domaine tyrosine kinase et peuvent entraîner une activation constitutive de l'EGFR de manière indépendante de la fixation de ligands (Gazdar, 2009b). Les mutations les plus courantes sont les délétions dans l'exon 19 (Del19) et les mutations L858R dans l'exon 21, constituant environ 85% de toutes les mutations *EGFR* (Xu *et al.*, 2020). Ces mutations sont associées à une sensibilité accrue aux ITKs de l'EGFR (Russo *et al.*, 2019) (Zhang *et al.*, 2014). Des études ont souligné leur potentiel oncogénique et leur réponse favorable aux ITKs-EGFR, bien que cette réponse puisse varier selon la mutation spécifique (Russo *et al.*, 2019). Ainsi, les patients atteints de CBNPC et porteurs de ces mutations sont éligibles à un traitement par ITKs-EGFR (Russo *et al.*, 2019 ; Zhang *et al.*, 2014). D'autres mutations moins courantes de l'EGFR sont également détectées. Notamment, les substitutions G719X, L861X, S768I et des insertions au sein de l'exon 19 de l'*EGFR* (Sharma *et al.*, 2007). Bien que moins étudiées, les insertions au sein de l'exon 19 se sont avérées sensibles aux ITKs-EGFR (He *et al.*, 2012). D'autres altérations, comme celles situées dans l'exon 20, tels que les mutations T790M ou les insertions, sont fréquemment associées à une résistance aux ITKs de première génération (Harrison, Vyse and Huang, 2020, Pacini *et al.*, 2021). De plus, la mutation ponctuelle C797S, également située dans l'exon 20, est reconnue pour conférer une résistance aux ITKs-EGFR de troisième génération, illustrant la complexité des adaptations tumorales face aux traitements ciblés (Wang *et al.*, 2016).

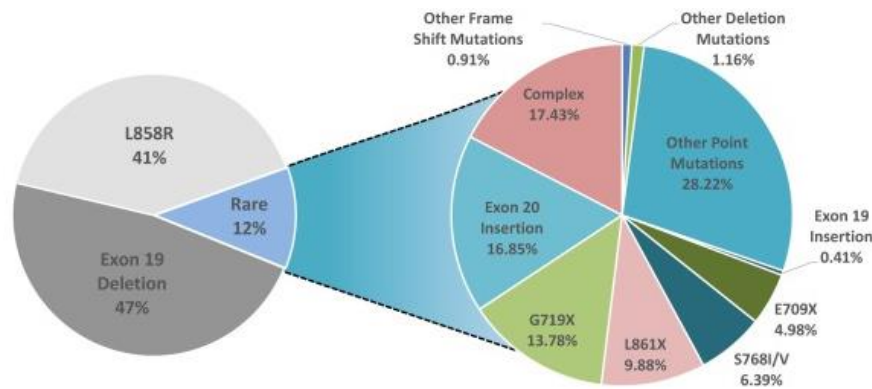


Figure 8: Fréquence des mutations de l'EGFR dans le CBNPC (Harrison, Vyse and Huang, 2020)
 Les données ont été obtenues à partir des bases de données COSMIC. Les données ont été filtrées pour ne présenter que les mutations dans l'adénocarcinome bronchique. Les mutations de résistance communes T790M et C797S ont été éliminées.

I.11.4. Les inhibiteurs de tyrosine kinase TKIs

I.11.4.1. Les inhibiteurs de première génération

Les inhibiteurs de l'EGFR de première génération, notamment le gefitinib (Iressa®) et l'erlotinib (Tarceva®), basés sur la 4-anilinoquinazoline, ont prouvé une efficacité accrue en termes de taux de réponse objective et de survie sans progression en comparaison aux thérapies cytotoxiques chez les patients présentant des mutations *EGFR* Del19 et L858R non préalablement traités (Eck and Yun, 2010; Huang *et al.*, 2021; Ng *et al.*, 2021). Cependant, malgré un taux de réponse positif de 60% à 80%, la plupart des patients développent une résistance aux traitements, souvent dans l'année qui suit le début de la thérapie (Karachaliou *et al.*, 2019; Huang *et al.*, 2021). Le principal mécanisme de résistance est dû à l'apparition de mutations supplémentaires dites « acquises », notamment la mutation T790M, trouvée chez environ 60% des patients. Cette mutation augmente l'affinité pour l'ATP et réduit l'affinité des ITKs de première génération (Ko, Paucar and Halmos, 2017). Un autre mécanisme de résistance fait appel à des voies de contournement. C'est le cas lors de l'amplification d'autres membres de la famille des RTKs comme MET provoquant une activation des voies en aval de l'EGFR.

I.11.4.2. Les inhibiteurs de deuxième génération

Pour contrer la résistance acquise à la suite de l'apparition de la mutation T790M, plusieurs analogues irréversibles de la 4-anilinoquinazoline ont été développés. Les ITKs-EGFR de deuxième génération tels que l'afatinib (Giotrif®) et le dacomitinib (Vizimpro®) qui ciblent

également les récepteurs HER2 et HER4 (Ng *et al.*, 2021), se lient de manière covalente à la Cystéine 797 (Cys797) appartenant au site de liaison à l'ATP de l'EGFR (Yu and Riely, 2013). Ces ITKs montrent une forte efficacité pour certaines mutations *EGFR* et sont moins sélectifs pour la forme sauvage du récepteur atténuant ainsi les effets indésirables (Lin, Wang and Jin, 2014).

I.11.4.3. Les inhibiteurs de troisième génération

Les inhibiteurs de l'EGFR de troisième génération, tels que l'osimertinib (Tagrisso®) et le lazertinib (Leclaza®), s'avèrent prometteurs contre les mutations de l'*EGFR*, en particulier chez les patients CBNPC résistants aux inhibiteurs de premières générations. Ils ciblent sélectivement certaines mutations de l'*EGFR*, y compris la mutation de résistance acquise T790M (Grabe, Lategahn and Rauh, 2018). L'osimertinib se distingue par son efficacité et ses effets secondaires réduits, ayant reçu l'AMM pour traiter les patients présentant une mutation T790M de l'*EGFR* à la suite d'un traitement par ITKs-EGFR de première ou deuxième génération (Wu *et al.*, 2020; Sun *et al.*, 2022; Shi *et al.*, 2022). De même, le lazertinib démontre une activité antitumorale notable pour ces mêmes patients avec une activité diminuée pour l'EGFR sauvage comparé à l'osimertinib. Ces données suggèrent que le Lazertinib présente un risque d'effets secondaires indésirables moins élevé. En effet, dans un modèle expérimental de métastase cérébrale, le lazertinib s'est révélé plus efficace que l'osimertinib pour inhiber la croissance tumorale. Les études précliniques suggèrent donc que le lazertinib serait plus adapté pour la prise en charge des CBNPC avancés avec métastases cérébrales (Lategahn *et al.*, 2019).

Néanmoins, la présence de la mutation C797S peut entraîner en fonction de sa localisation chromosomique par rapport aux autres mutations, en particulier la T790M soit une sensibilité soit une résistance au ITKs-EGFR de troisième génération (Lategahn *et al.*, 2019). Lorsque la mutation C797S se situe en "cis" de la mutation T790M, cela signifie qu'elles sont situées sur le même allèle du gène *EGFR*. Dans ce cas, la cellule tumorale devient résistante à l'osimertinib car la mutation C797S empêche l'ITK de se lier à l'EGFR. Cependant, si la mutation C797S se situe en "trans" de la mutation T790M, cela signifie qu'elles sont sur des allèles différents du gène *EGFR*. Dans cette situation, un allèle porte la mutation T790M et l'autre la mutation C797S. Cela signifie que la cellule tumorale peut toujours être sensible à une combinaison de ITKs de première et troisième génération. En effet, l'allèle avec la mutation T790M code pour

un EGFR qui reste sensible à l'osimertinib, tandis que l'allèle avec la mutation C797S code pour un récepteur sensible aux ITK de première génération (Figure 9).

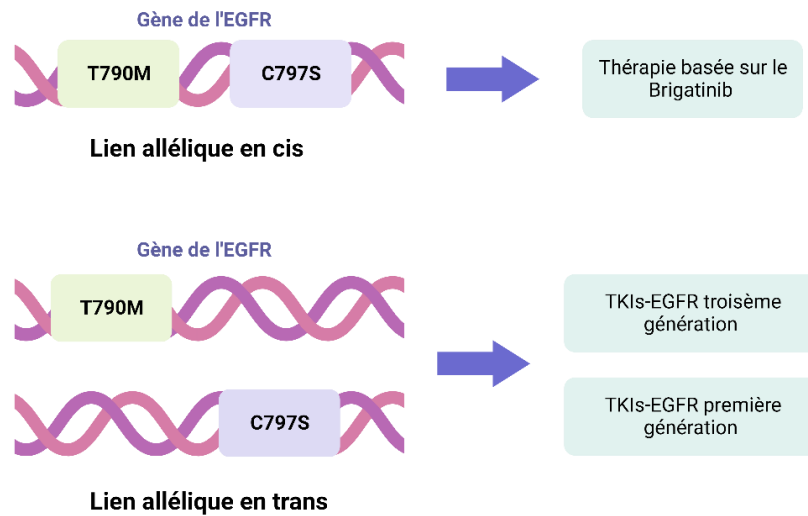


Figure 9: Illustration des mutations C797S en position *cis* ou *trans* et stratégies thérapeutiques associées (Li *et al.*, 2023)

Lorsque la mutation C797S est en position *cis* de la mutation T790M, elle induit une résistance à l'osimertinib. Dans ce cas, un traitement par brigatinib est envisagé. Lorsque la mutation C797S est en position *trans* de la mutation T790M, elle entraîne une sensibilité possible aux ITKs-EGFR de première et de troisième génération.

Des approches prometteuses sont en cours de développement pour ces triples mutants L858R/T790M/C797S, notamment avec les inhibiteurs EAI045 et brigatinib (Alunbrig®). L'EAI045 agit comme un inhibiteur allostérique, ciblant spécifiquement les mutations de l'EGFR, T790M et C797S, sans affecter le récepteur EGFR de type sauvage (To *et al.*, 2019). Toutefois, l'EAI045 n'est pas efficace en tant que monothérapie et nécessite l'administration concomitante d'une immunothérapie anti-EGFR, le cetuximab (Erbitux®) (To *et al.*, 2019). En effet, le cetuximab interfère avec les dimères d'EGFR, et permet à l'EAI045 de se lier à l'ensemble des sites allostérique entraînant ainsi une inhibition efficace de l'EGFR (To *et al.*, 2019). De son côté, le brigatinib agit comme un inhibiteur à la fois d'ALK et de l'EGFR. Des études ont suggéré que le brigatinib, lorsqu'il est associé à un anticorps anti-EGFR comme le cetuximab ou le panitumumab (Vectibix®), pourrait contrer la résistance induite par la mutation EGFR^{C797S} à l'osimertinib (Uchibori *et al.*, 2017).

I.11.4.4. Les inhibiteurs de quatrième génération

Récemment, le JBJ-09-063 apparaît comme un nouvel inhibiteur allostérique de l'EGFR efficace en tant que monothérapie dans les tumeurs présentant les mutations *EGFR*^{L858R/T790M/C797S} (To *et al.*, 2022). À côté des inhibiteurs allostériques, plusieurs ITKs-EGFR de quatrième génération pouvant se lier de manière covalente à l'EGFR ont été identifiés, comme l'UPR1444, qui inhibe fortement et irréversiblement l'EGFR^{L858R/T790M/C797S} grâce à la formation d'une liaison sulfonamide avec le résidu catalytique Lys745 (Ferlenghi *et al.*, 2021). Il convient également de noter que plusieurs essais cliniques sont actuellement en cours pour évaluer à la fois les efficacités et les effets secondaires des inhibiteurs d'EGFR de quatrième génération, notamment le BLU945 (Eno *et al.*, 2022), le BBT176 (Lim *et al.*, 2021), et le TQB3804 (Tian *et al.*, 2022).

Outre les ITKs, d'autres inhibiteurs ont été élaborés en vue d'améliorer le traitement des CBNPC exprimant un EGFR muté. Le développement de molécules permettant de cibler et dégrader sélectivement l'EGFR représente une avancée majeure. Cette approche est basée sur la construction de chimères ciblant la protéolyse appelé « PROTACs » pour *PROteolysis TArgeting Chimeras*. Ces molécules sont bimodales, avec une partie se fixant à la protéine cible et l'autre recrutant une ligase E3. Cela conduit à l'ubiquitinylation et la dégradation ciblée de la protéine par le protéasome (Burslem and Crews, 2020; Dale *et al.*, 2021). Plusieurs PROTACs ciblant spécifiquement l'EGFR ont été mis au point, bloquant efficacement la prolifération des cellules CBNPC mutées pour l'EGFR (Zhao *et al.*, 2020; Qu *et al.*, 2021). Récemment, une étude de Du *et al.* a présenté un PROTAC innovant, le HJM-561, efficace contre les cellules présentant la mutation *EGFR*^{C797S} (Du *et al.*, 2022).

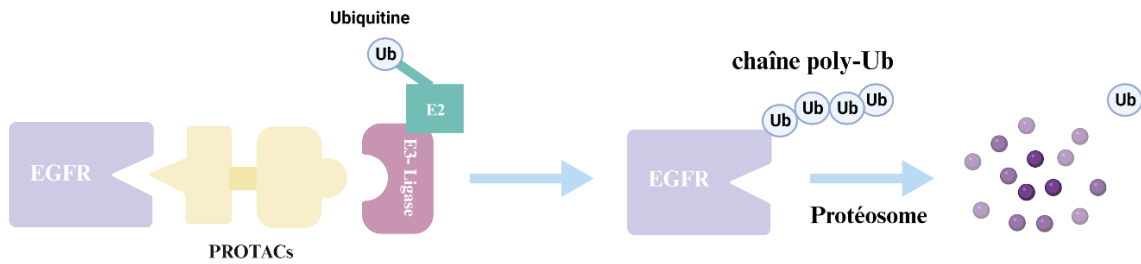


Figure 10: Dégradation de l'EGFR médiée par les PROTACs (PROteolysis TArgeting Chimeras). Les PROTACs sont des peptides hétérospécifiques en se liant à l'EGFR et en recrutant des ubiquitines ligases E3. Cette double liaison provoque l'ubiquitinylation de l'EGFR le rendant susceptible à sa dégradation par le protéasome.

Bien que les ITKs-EGFR affichent d'importants taux de réponse, des mécanismes de résistance finissent toujours par émerger chez les patients qui deviennent alors non répondeurs. Dans certains cas, cette résistance est due à l'existence de clones cellulaires avec des mutations génétiques préétablies de l'EGFR. Ainsi, une étude a montré la présence de la mutation T790M primaire de l'EGFR chez 61 patients (1,1%) sur 5685 patients n'ayant jamais reçu d'ITKs-EGFR. Dans cette étude, les auteurs ont évalué rétrospectivement la prévalence et les caractéristiques des mutations T790M primaires et acquises chez des patients atteints de CBNPC. Ils ont constaté que la mutation primaire T790M coexiste toujours avec l'EGFR^{L858R}, tandis que la mutation acquise T790M coexiste toujours avec la Del19. De plus, l'analyse de l'efficacité de l'osimertinib sur deux groupes de patients a démontré une bonne réponse au traitement pour les deux types de mutations. En outre, les patients ayant une mutation T790M primaire ont montré une meilleure réponse à l'osimertinib que ceux avec une mutation T790M acquise. Cependant, au cours du traitement, la survie globale des patients atteints de la mutation T790M primaire était inférieure à celle des patients atteints de la mutation T790M acquise dans le CBNPC (S. Wang *et al.*, 2019).

Toutefois, un autre mécanisme de résistance est dû à la sélection de sous-populations de cellules persistantes /tolérantes aux ITKs-EGFR, souvent référencées sous le terme de "maladie résiduelle minimale" (MRM). Ces cellules résistent aux traitements à l'inverse du reste des cellules tumorales. Elles présentent une prolifération lente, une altération de leur métabolisme et survivent aux traitements grâce à des modifications épigénétiques (Marine, Dawson and Dawson, 2020; Shen, Vagner and Robert, 2020).

I.11.5. La tolérance/persistance (DTP) aux ITKs-EGFR

Le concept de la tolérance/persistance aux médicaments tire ses origines de la microbiologie. Il a été démontré qu'une faible proportion de bactéries en état de dormance pouvait subsister malgré la présence d'antibiotiques, et ce, sans l'apparition de mutations génétiques conférant une quelconque résistance. Ces cellules peuvent reprendre leur croissance une fois la pression de l'antibiotique retirée, reflétant une résistance temporaire non-génétique (Fisher, Gollan and Helaine, 2017).

De manière analogue, une étude menée en 2010 par l'équipe de Jeffrey Settleman a démontré que les cellules cancéreuses peuvent adopter un état de tolérance aux médicaments lorsqu'elles sont exposées à des ITKs-EGFR dans le CBNPC. Dans cette étude, l'équipe a étudié la lignée cellulaire PC9, mutée pour l'EGFR, et a constaté qu'une petite fraction de cellules (0.3 à 5 %) survivait après neuf jours de traitement avec l'erlotinib. Ces cellules, définies comme des "cellules persistantes tolérantes" (DTP), ont montré une capacité remarquable à survivre en état de dormance ou de quiescence, avec 75 % d'entre elles bloquées dans la phase G1 du cycle cellulaire (Sharma *et al.*, 2010). Environ 20 % des DTP, même sous traitement, ont ensuite réussi à reprendre une prolifération normale, formant ainsi des clones appelés "Persistants Tolérants Élargis" (DTEP). Les recherches ultérieures de Ramirez et ses collègues ont montré que ces DTEP peuvent présenter une variété de mécanismes de résistance aux ITKs-EGFR, tels que la mutation $EGFR^{T790M}$, l'amplification de MET, et des modifications des voies MAP kinase et PI3K/AKT. Ces découvertes suggèrent que les DTP à cycle lent peuvent servir de réservoir pour des cellules développant progressivement des mécanismes de résistance aux médicaments (Hata *et al.*, 2016; Ramirez *et al.*, 2016). Des phénomènes similaires ont été observés dans d'autres cancers, tel que le cancer colique (Touil *et al.*, 2014), le mélanome (Sun *et al.*, 2014) et le glioblastome (Liau *et al.*, 2017).

Dans le cas du CBNPC, divers éléments peuvent expliquer l'apparition des cellules DTP face aux traitements par les ITKs-EGFR. Parmi ceux-ci, on retrouve les altérations de la chromatine, les voies de signalisations alternatives et les altérations métaboliques.

I.11.5.1. Les altérations épigénétiques

Afin de comprendre les mécanismes moléculaires sous-jacents à la tolérance aux traitements, Sharma et ses collègues ont exploré les profils transcriptomiques des cellules DTP et DTEP. Leurs recherches ont mis en évidence d'importantes altérations de la chromatine, notamment

une expression importante d'une déméthylase d'histone, KDM5A (*lysine demethylase 5A*). Cette enzyme semble jouer un rôle crucial dans la capacité des cellules à survivre en présence d'ITKs-EGFR. De plus, leurs travaux ont souligné l'importance de l'IGF-1R (*Insulin-like growth factor 1*) dans la tolérance aux thérapies via la régulation de KDM5A (Sharma *et al.*, 2010). Il est important de noter que des études antérieures réalisées en 2008 par Casa *et al.*, ainsi que Pollak ont montré que l'activation de l'IGF-1R a été associée à une résistance accrue aux traitements et à un pronostic défavorable dans plusieurs contextes oncologiques (Casa *et al.*, 2008; Pollak, 2008). Cette association est également confirmée par d'autres recherches ayant démontré l'implication de l'IGF-1R dans la résistance aux ITKs-EGFR et aux chimiothérapies conventionnelles (Chakravarti, Loeffler and Dyson, 2002; Buck *et al.*, 2008; Dallas *et al.*, 2009; Eckstein *et al.*, 2009). La détection de cet état chromatinien distinct dans les cellules cancéreuses qui développent cette tolérance a ouvert la voie à de nouvelles possibilités thérapeutiques pour prévenir l'émergence d'une résistance durable. En effet, dans le cadre de leurs recherches, Sharma *et al.* ont lancé une étude clinique visant à évaluer l'efficacité de la combinaison d'une molécule capable de modifier la chromatine avec l'erlotinib chez des patients atteints de CBNPC. Les premières données cliniques de cette étude montrent que l'introduction de modifications de la chromatine pourrait significativement améliorer les résultats cliniques pour un sous-groupe de patients ayant développé une résistance clinique aux ITKs-EGFR (Shen, Vagner and Robert, 2020).

Une autre étude menée par Guler *et al.* a montré que les ITKs-EGFR induisent une augmentation de l'expression de LINE-1 (*Long Interspersed Nucleotidic Elements-1*), un élément rétrotransposable actif capable de se propager et de s'insérer de manière aléatoire dans le génome, entraînant ainsi une instabilité génomique. Les chercheurs ont constaté que les cellules DTP adoptent un état répressif de la chromatine, caractérisé par une augmentation de la méthylation des lysines 9 et 27 de l'histone H3 (H3K9 et H3K27), en particulier sur le locus LINE-1. Cette méthylation réduit les dommages à l'ADN dans cette sous-population cellulaire. En utilisant par conséquent des inhibiteurs de l'histone méthyltransférase, tels que le tazemetostat (Tazverik®), qui agissent spécifiquement pour réduire les niveaux globaux de H3K27me3 (*Trimethylated histone H3 lysine 27*) en inhibant l'activité de l'histone méthyltransférase EZH2 (*Enhancer of zeste homologue 2*), les auteurs ont pu accroître l'accessibilité à la chromatine. Cela a eu pour effet de supprimer les cellules tolérantes en levant

la répression des éléments LINE-1, contribuant ainsi à l'efficacité du traitement (Guler *et al.*, 2017).

I.11.5.2. Réactivation des voies de signalisation à la suite du traitement avec les ITKs-EGFR

La réactivation de ERK1/2 a été identifiée comme un mécanisme conduisant à l'émergence des cellules DTP dans le CBNPC. Ercan et ses collègues ont découvert que cette activation peut résulter de deux mécanismes distincts : soit une amplification d'une portion du chromosome 22 contenant le gène *MAPK1*, qui code pour la protéine ERK, soit une diminution de l'activité des régulateurs négatifs de la voie ERK1/2, comme DUSP6 (*Dual-specificity phosphatase 6*) (Ercan *et al.*, 2012). La combinaison d'inhibiteurs de l'EGFR et de MEK (*Mitogen-Activated Protein Kinase*) prévient efficacement la réactivation de ERK1/2 et retarde l'apparition de cellules DTP (Tricker *et al.*, 2015).

Kurppa *et al.* ont par la suite démontré que les cellules du CBNPC peuvent contourner la combinaison des inhibiteurs d'EGFR et de MEK en adoptant un état de sénescence (Kurppa *et al.*, 2020). Cet état est induit par l'activation simultanée de la voie YAP/TEAD (*Yes-Associated Protein/TEA Domain Transcription Factor*), des coactivateurs de transcription qui régulent la prolifération cellulaire et l'apoptose (Xie *et al.*, 2013). YAP/TEAD régule aussi la transcription du gène *Slug*, un facteur de transcription lié à la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM), un processus biologique permettant aux cellules épithéliales de se transformer en cellules mésenchymateuses (Yu *et al.*, 2018). Cette transformation augmente leur mobilité et réduit leur adhésion, contribuant ainsi à la progression du cancer (Puisieux, 2009). En présence de résistance aux ITKs-EGFR et de MEK, YAP/TEAD, en association avec *Slug*, inhibe le facteur pro-apoptotique BMF (*Bcl-2 Modifying Factor*) (Kurppa *et al.*, 2020).

Taniguchi *et al.* ont identifié le récepteur tyrosine kinase AXL comme un médiateur clé de la tolérance du CBNPC en réponse au traitement par l'osimertinib (Taniguchi *et al.*, 2019). Ils ont démontré que l'osimertinib stimule AXL en inhibant une boucle de rétroaction négative impliquant SPRY4, ce qui conduit à l'hétérodimérisation d'AXL avec l'EGFR ou HER3. Ce processus maintient la survie cellulaire et induit l'émergence de cellules tolérantes à l'osimertinib. Selon ces découvertes, l'inhibition d'AXL pourrait restaurer la sensibilité à l'osimertinib et prévenir l'émergence de cellules DTP (Taniguchi *et al.*, 2019). D'autres études ont montré qu'en présence d'ITKs-EGFR, AXL et son ligand GAS6 peuvent promouvoir la

mutagenèse dans les cellules DTP. Ils induisent l'expression de la polymérase à ADN sujette aux erreurs (*error-prone DNA polymerases*) et améliorent le métabolisme des purines, favorisant ainsi l'émergence de nouvelles mutations de résistance, telles que l'*EGFR*^{T790M} (Noronha *et al.*, 2022).

Shah *et al.* ont également démontré le rôle de la kinase Aurora A (AURKA) dans l'émergence et le maintien des cellules DTP. AURKA régule l'alignement des chromosomes, la formation du fuseau mitotique et la ségrégation des chromosomes pendant la phase G2/M du cycle cellulaire. Dans un modèle de cancer du poumon, son activation est suffisante pour causer une tolérance aux ITKs-EGFR, tandis que son inhibition chimique réduit la prolifération cellulaire sous ITKs-EGFR et augmente l'apoptose *in-vitro* et dans un modèle de xénogreffe dérivée de patient (Shah *et al.*, 2019). Parallèlement à AURKA, le rôle de AURKB a été également exploré. Les chercheurs ont déterminé que l'inhibition de AURKB pouvait contourner la tolérance à l'osimertinib en augmentant l'apoptose médiée par BIM (*Bcl-2-like protein 11*), une protéine pro-apoptotique de la famille des protéines BCL-2, et par PUMA (*p53 Upregulated Modulator of Apoptosis*) (Tanaka *et al.*, 2021)..

La signalisation dépendante de Wnt/ β -caténine a également été associée à ce phénomène de tolérance en réponse au traitement par ITKs-EGFR. L'inhibition de l'EGFR provoque une activation de la signalisation β -caténine de manière dépendante de Notch3 (*Neurogenic locus notch homolog protein 3*) qui contribue à la survie d'une sous-population de cellules tolérantes ayant des propriétés similaires à celles des cellules souches (Arasada *et al.*, 2018). En accord avec ces données, Maynard et ses collègues ont utilisé le séquençage de l'ARN d'une seule cellule (scRNA-Seq) pour analyser des biopsies de tumeurs de patients en état DTP issues de 14 patients traités par thérapies ciblées (11 après l'osimertinib et quatre après ITKs-ALK). Leurs résultats ont montré que les cellules DTP sont caractérisées par une signature de régénération alvéolaire, qui était liée à l'activation de la signalisation Wnt/ β -caténine. Cette signature regroupe un ensemble spécifique de gènes normalement associés à la réparation et au renouvellement des alvéoles pulmonaires (Maynard *et al.*, 2020).

I.11.5.3. L'altération du métabolisme cellulaire

Le remodelage du métabolisme cellulaire, y compris la capacité à maintenir l'équilibre redox même dans des conditions de restriction en nutriments et sous d'autres formes de stress, constitue une caractéristique distincte du cancer (Hanahan, 2022). Cette adaptation métabolique

se distingue nettement de celle des cellules normales, qui s'appuient essentiellement sur la phosphorylation oxydative mitochondriale (OXPHOS) pour la production de l'ATP. En revanche, les cellules cancéreuses dépendent souvent de la glycolyse aérobie, un phénomène connu sous le nom d'effet Warburg. Cet effet se caractérise par une consommation accrue de glucose via la glycolyse au lieu de l'OXPHOS, indépendamment de la disponibilité en oxygène ou de l'activité mitochondriale (Shen, Vagner and Robert, 2020).

Tandis que la glycolyse aérobie est typiquement exploitée par les cellules cancéreuses à croissance rapide, les recherches ont montré que les cellules DTP à cycle cellulaire lent dépendent davantage de la respiration mitochondriale pour leur production d'énergie (Shen, Vagner and Robert, 2020). Cependant, ce changement métabolique vers l'OXPHOS dans ces cellules entraîne une augmentation des niveaux des agents oxydants (ROS), des molécules qui peuvent causer des dommages importants dans les cellules (Mikubo *et al.*, 2021). Pour contrer ce stress oxydatif, les cellules DTP nécessitent des mécanismes antioxydants efficaces. Une étude menée par Raha *et al.* a mis en lumière l'importance de l'aldéhyde déshydrogénase (ALDH) dans le maintien de la viabilité des populations cellulaires persistantes dans le CBNPC (Raha *et al.*, 2014). Ils ont découvert que l'ALDH joue un rôle crucial dans la protection des cellules DTP contre la toxicité induite par les ROS. Plus spécifiquement, l'inhibition pharmacologique de l'ALDH entraîne une accumulation de ROS à des niveaux toxiques, provoquant des dommages à l'ADN et la mort cellulaire dans cette sous-population résistante aux médicaments.

Cette sensibilité accrue des cellules DTP aux perturbations de leur mécanisme de gestion des ROS, en particulier par l'intermédiaire de l'ALDH, suggère une voie potentielle pour cibler et éliminer ces cellules dans les traitements du CBNPC. En comprenant et en exploitant ces différences métaboliques subtiles entre les cellules cancéreuses à prolifération rapide et les cellules DTP, il pourrait être possible de développer des thérapies plus précises et efficaces contre le cancer.

I.11.6. Signalisation nucléaire de l'EGFR

La signalisation de l'EGFR se produit principalement à partir de la membrane plasmique. Pour limiter cette signalisation et protéger l'intégrité cellulaire, l'EGFR est rapidement dégradé après endocytose et transport au lysosome (Tomas, Futter and Eden, 2014). Néanmoins, l'internalisation de l'EGFR « activé » par les endosomes peut initier des voies de signalisation

spécifiques depuis différents sites intracellulaires. Des études ont démontré la capacité de l'EGFR à se déplacer dans les noyaux échappant dès lors à sa dégradation (Wang and Hung, 2009). La présence de l'EGFR dans les noyaux a été initialement observée dans des hépatocytes en régénération et dans des carcinomes corticosurrénaux primaires (Brand *et al.*, 2013). Par la suite, ce mécanisme a été détecté dans d'autres types cellulaires et tissus, tels que l'utérus de souris gestantes, des embryons de souris en développement, des foies de rat, des placentas, des thyroïdes, cellules épithéliales immortalisées d'origine ovarienne et rénale ainsi que dans de nombreux types de tumeurs (Brand *et al.*, 2011).

I.11.6.1. Mécanisme de translocation nucléaire de l'EGFR

La translocation de l'EGFR, sous sa forme protéique complète, vers le noyau peut être déclenchée par divers stimuli tels que la liaison d'un ligand, l'irradiation, le cetuximab, et le cisplatine (Lo, Xia, *et al.*, 2005; Psyri *et al.*, 2005; Brand *et al.*, 2011). Les premières étapes de la migration de l'EGFR de la membrane plasmique vers le noyau comprennent sa phosphorylation par les kinases de la famille SRC et AKT (Li *et al.*, 2009; Huang *et al.*, 2011). Suite à cette phosphorylation il est internalisé dans les endosomes, avant d'être transporté de la surface cellulaire vers divers compartiments intracellulaires, y compris le noyau (Lo and Hung, 2006; Brand *et al.*, 2011). Une séquence tripartite de signal de localisation nucléaire (NLS) a été identifiée dans la séquence de l'EGFR. Elle est conservée dans la région juxta-membranaire de ce dernier et est également présente chez tous les membres de la famille ERBB/HER. Ce NLS (645-RRRHIVRKRTLRR-657) permet à l'EGFR d'interagir avec l'importine β (Wang and Hung, 2012). Le complexe EGFR/importine β 1 est internalisé dans des vésicules endosomales précoces puis transporté vers l'appareil de Golgi par un transport rétrograde impliquant les microtubules et la dynéine. La fusion de ces vésicules endosomales avec l'appareil de Golgi est médiée par la syntaxine 6. Les vésicules sont ensuite acheminées vers le réticulum endoplasmique (RE) via le complexe COPI (*Coat Protein Complex I*) (Wang and Hung, 2012). Une fois dans le RE, le complexe EGFR/importine β 1 interagit avec la nucléoporeine 6 (Sec61 β). La Sec61 β , située sur la membrane interne du noyau, permet le passage du complexe de la membrane externe à la membrane interne du noyau par un mécanisme appelé INTERNET (transfert intégral du RE vers le transport de l'enveloppe nucléaire). Ce mécanisme permet le transfert de l'EGFR à travers les pores nucléaires et sa libération dans le nucléoplasme (Wang and Hung, 2012).

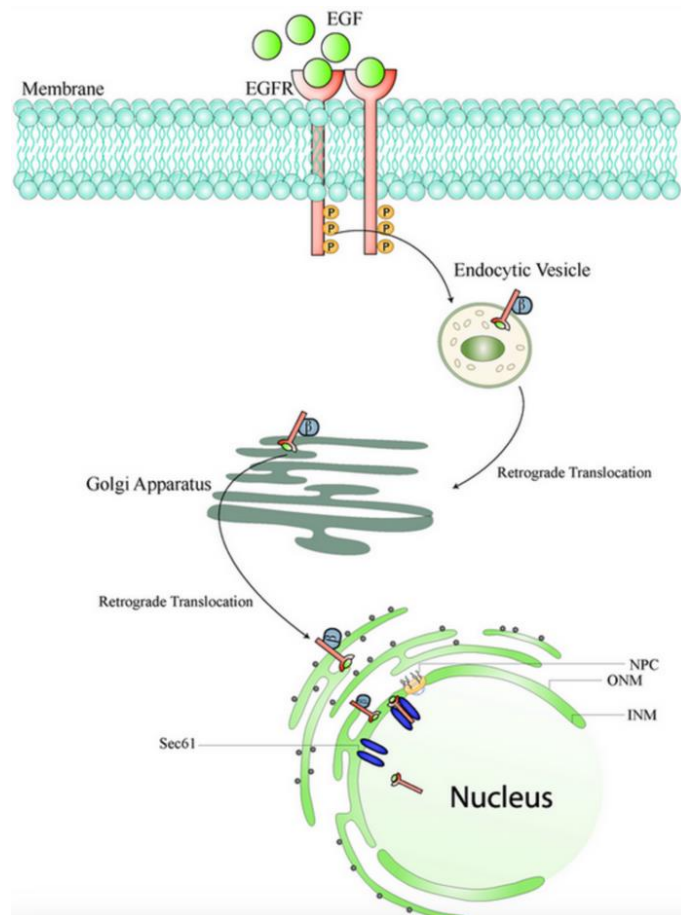


Figure 11: Translocation nucléaire de l'EGFR (Brand et al., 2011)

L'activation de l'EGFR à la surface cellulaire est déclenchée par la liaison avec son ligand, l'EGF. Cette liaison induit la dimérisation de l'EGFR, suivie de son internalisation dans des vésicules d'endocytose (EV). Ensuite, l'EGFR subit une translocation rétrograde médiée par COPI à travers l'appareil de Golgi jusqu'au réticulum endoplasmique (RE). Une fois dans le RE, l'EGFR est acheminé de la membrane nucléaire externe (ONM) vers la membrane nucléaire interne (INM) via l'interaction entre l'importine β (β) et le complexe du pore nucléaire (NPC). Dans la INM, l'EGFR interagit avec Sec61 contribuant à l'extraction de l'EGFR de la membrane nucléaire, lui permettant ainsi de se libérer dans le noyau où il peut exercer des fonctions de signalisation nucléaire.

I.11.6.2. Le rôle de l'EGFR nucléaire dans la progression tumorale et la résistance thérapeutique

Après sa translocation dans le noyau, l'EGFR joue un rôle significatif dans la régulation transcriptionnelle des gènes en raison de son activité kinase conservée et de son activité de transactivation intrinsèque située dans sa région C-terminale (Shiaw Yih Lin *et al.*, 2001). L'EGFR peut activer l'expression de certains gènes impliqués dans la progression tumorale et l'instabilité chromosomique en se liant près des promoteurs de ces gènes, à une séquence riche en résidus A/T (ATRS). Les gènes régulés par l'EGFR nucléaire incluent la cycline D1

(*CCND1*) (Shiaw Yih Lin *et al.*, 2001), *B-Myb* (Hanada *et al.*, 2006), *iNOS* (Lo, Hsu, *et al.*, 2005), *AURKA* (Wang and Hung, 2012), *COX-2* (Lo *et al.*, 2010), *cMYC* (Jaganathan *et al.*, 2011), et *BRCP* (Wang and Hung, 2009). De plus, Il a été démontré que l'EGFR réprime l'expression de certain gène, comme le suppresseur de tumeur *ARF*, conduisant à une meilleure survie cellulaire (Dayde *et al.*, 2016). En plus, récemment, il a été suggéré que l'EGFR nucléaire pouvait réguler la stabilité et la traduction d'ARN messagers (Wang and Hung, 2012; Dittmann *et al.*, 2017a).

Comme l'EGFR ne possède pas de domaine de liaison à l'ADN, sa liaison à l'ATRIS nécessite une interaction avec d'autres protéines nucléaires. Des études ont montré que l'EGFR nucléaire collabore avec d'autres protéines telles que STAT3, STAT5, E2F1, HER2 et c-Src en tant qu'activateur co-transcriptionnel. Cette interaction augmente l'expression de certains gènes associés à l'oncogénèse indépendamment de son activité kinase. En outre, l'EGFR peut se lier à l'antigène nucléaire prolifératif (PCNA). Suite à cette liaison, il provoque la phosphorylation et la stabilisation de PCNA qui grâce à son activité kinase favorise la réplication et la réparation de l'ADN en cas de dommages (Brand *et al.*, 2013).

Des travaux ont révélé que l'EGFR nucléaire avait la capacité de réguler l'accès à la chromatine et sa réparation. Il est en effet observé que l'EGFR pouvait interagir avec la protéine DNA-PK, jouant un rôle dans la réparation des cassures double-brin causées par des radiations ionisantes ou un traitement au cisplatine (Gazzeri, 2018). De surcroît, une étude menée par Dittmann et son équipe a mis en évidence une interaction de l'EGFR avec des protéines telles que l'ATM (*Ataxia Telangiectasia Mutated*), la PML (*Promyelocytic Leukemia*), l'histone H3K9 et l'HP1 (*Heterochromatin Protein 1*) (Dittmann *et al.*, 2011, 2017b). Ces dernières jouent un rôle crucial dans la décondensation et la réparation de l'ADN suite à une exposition aux radiations (S. Y. Lin *et al.*, 2001).

Dans le CBNPC, la localisation nucléaire de l'EGFR est associée à une durée de survie sans progression et globale plus courtes, un stade avancé de la maladie et à une histologie squameuse. Ces résultats sont en accord avec d'autres études réalisées sur différents types de cancers tels que le cancers du sein, de l'ovaire et de l'oropharynx (Traynor *et al.*, 2013).

L'étude a également révélé que l'EGFR nucléaire joue un rôle dans la résistance aux traitements tels que le cetuximab, le gefitinib et l'erlotinib. En effet, des cellules de CBNPC initialement sensibles au cetuximab sont devenues résistantes à cette thérapie, tant *in vitro* qu'*in*

in vivo. Cette résistance était associée à des niveaux accrus d'EGFR nucléaire. De même, les cellules présentant des mutations de l'EGFR empêchant son importation nucléaire montrent une capacité réduite à réparer l'ADN après irradiation et exposition au cisplatine (Traynor *et al.*, 2013).

La translocation nucléaire de l'EGFR s'est avérée dépendre d'événements spécifiques de phosphorylation par diverses kinases intracellulaires. Par exemple, la phosphorylation de l'EGFR à la Tyrosine 654 est nécessaire pour le transport nucléaire induit par les radiations et la réparation des dommages à l'ADN. Il a été démontré que l'irradiation ionisante provoque le transport nucléaire de l'EGFR à travers des mécanismes dépendant de la cavéoline et de la protéine kinase C (Brand *et al.*, 2013).

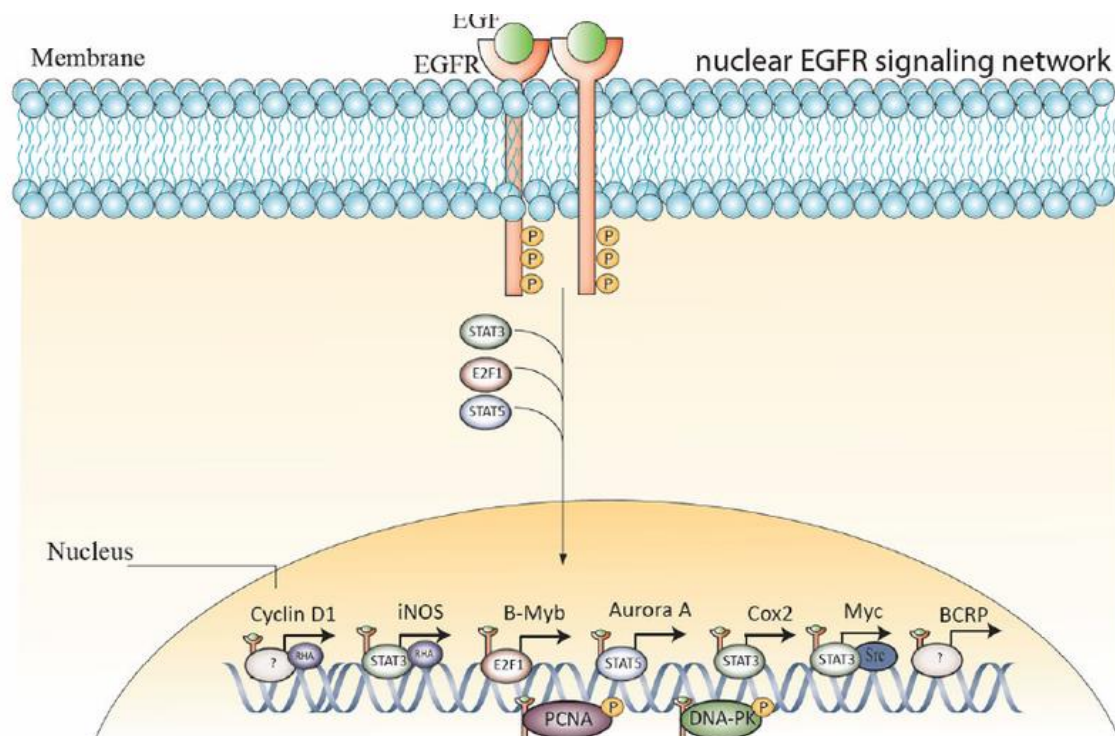


Figure 12: Réseau de signalisation nucléaire de l'EGFR

L'EGFR se lie à plusieurs facteurs de transcription tels que STAT3, STAT5 et E2F1 pour réguler la transcription génique de la cycline D1, de l'iNOS, de B-Myb, de l'Aurora Kinase A, de COX2, de Myc et de BCRP. En outre, il a été démontré que l'EGFR phosphorylait et activait à la fois la PCNA et la DNA-PK à l'intérieur du noyau.

Chapitre II. Sortiline ou Neurotensine Receptor 3 (NTR3)

La compréhension des mécanismes complexes régulant le trafic intracellulaire est une quête de longue date en biologie cellulaire. Chez les eucaryotes, ce processus de trafic, en particulier l'adressage des enzymes lysosomales *de novo* de l'appareil de Golgi vers les endosomes tardifs, dépend essentiellement de récepteurs de tri spécialisés dans le réseau trans-golgien (TGN). Dans les cellules de mammifères, cette fonction est menée principalement par les récepteurs du mannose 6-phosphate (MPR), indispensables à l'identification et à l'acheminement des hydrolases solubles nouvellement synthétisées dans le TGN. (Kornfeld and Mellman, 1989 ; Pearse and Robinson, 1990) Toutefois, cette régulation peut être altérée dans certaines circonstances pathologiques, telles que la mucopolidose II (ML II), également appelée maladie des cellules I, où un déficit dans la formation des résidus M6P sur les protéines lysosomales solubles empêche leur adressage aux lysosomes. Cela entraîne dès lors une sécrétion excessive de ces protéines dans le milieu extracellulaire et dans la circulation sanguine. Malgré ce déficit d'activité dans le transport protéique dans la ML II, une partie importante de cellules parvient à maintenir des niveaux quasi normaux d'enzymes lysosomales (Glickman and Kornfeld, 1993 ; Owada and Neufeld, 1982). Ainsi, une voie de trafic alternative, indépendante du M6P, guiderait ces enzymes. En 1996, Cooper et son collègue Stevens, ont identifié une voie alternative de tri chez la levure dépendante de la protéine « *Vacuolar protein sorting 10* » (VPS10) et d'une protéine étroitement apparentée codée par le gène *VTH2*. Ils ont démontré que la protéine VPS10 jouait un rôle important dans le recyclage des protéines entre le complexe de Golgi tardif et le compartiment prévacuolaire de la protéine Carboxypeptidase Y (CPY) (Cooper and Stevens, 1996). Ce processus, similaire au cheminement de la protéine M6P, a suscité des questions sur la présence éventuelle de voies analogues dans les cellules de mammifères et a ouvert la voie à la découverte de la sortiline à la fin des années 1990 par trois laboratoires différents utilisant trois approches biochimiques différentes (Lin et al., 1997 ; Petersen et al., 1997 ; Mazella et al., 1998).

II.1. Famille des protéines à domaine Vps10p

La sortiline, également connue sous le nom de récepteur 3 de la neurotensine (NTR3), est codée par le gène *SORT1* situé sur le chromosome humain 1p13.3 (Petersen et al., 1997). Elle constitue un élément essentiel de la famille des protéines à domaine Vps10 (Vps10), qui comprend également SorCS1, SorCS2, SorCS3 et SorLA. Ces protéines transmembranaires de

type I se distinguent par leur domaine Vps10 à l'extrémité N de leur section luminaire/extracellulaire (Lane *et al.*, 2012). Pour la sortiline, ce domaine représente la totalité de sa composante luminaire/extracellulaire, tandis que les autres membres de la famille ont des structures supplémentaires distinctes (Figure5) (Nykjaer *et al.*, 2004). Bien que la similarité des séquences d'acides aminés entre la sortiline et les autres membres de la famille soit modérée, deux caractéristiques structurelles sont conservées de la levure aux mammifères et caractérisent le domaine VPS10, à savoir le propeptide N-terminal et le segment C-terminal de 10 cystéines conservées (10CC) (Hermey, 2009).

II.1.1. Caractéristiques structurelles de la sortiline

La sortiline est initialement synthétisée sous forme d'un précurseur de 831 acides aminés (aa) avant d'être convertie dans le réseau trans-golgien en récepteur mature par le clivage d'un propeptide de 44 aa. Ce clivage est médié par la proprotéine convertase de type furine (Mazella *et al.*, 1998; Munck Petersen *et al.*, 1999). Le propeptide de la sortiline agit comme un chaperon endogène multifonctionnel, possédant une forte affinité pour la sortiline mature. Il inhibe la liaison de la sortiline à ses ligands lorsqu'ils sont co-synthétisés. L'élimination du propeptide est donc cruciale pour activer la capacité de la sortiline à se lier à ses ligands (Petersen *et al.*, 1997). De plus, le propeptide n'est pas une condition préalable au repliement normal de la sortiline ou à sa sortie du RE. Il facilite plutôt le transport du récepteur à travers les compartiments du Golgi précoce et/ou moyen avant l'ajout des sucres terminaux (Westergaard *et al.*, 2004).

Le segment 10CC constitue une structure distincte et est impératif pour la liaison au ligand. Il est remarquablement similaire pour tous les récepteurs VPS10 en termes de structure primaire, de nombre et de disposition des cystéines. Cette similarité structurelle permet aux nombreux ligands ciblant Vps10p d'interagir avec plusieurs récepteurs de cette famille. C'est notamment le cas de la neurotensine (NTS), RAP (*Récepteur-Associated Protein*) et l'apolipoprotéine qui peuvent se lier à la fois à la sortiline et à SorLA (Westergaard *et al.*, 2004). La particularité structurale du segment 10CC de la sortiline est que les cystéines sont reliées par des ponts disulfures et forment un motif en forme de boucle (Quistgaard *et al.*, 2009). Cette architecture, composée de 10 feuillets bêta, définit un tunnel contenant de nombreux sites de liaisons aux ligands (Quistgaard *et al.*, 2009, 2014a).

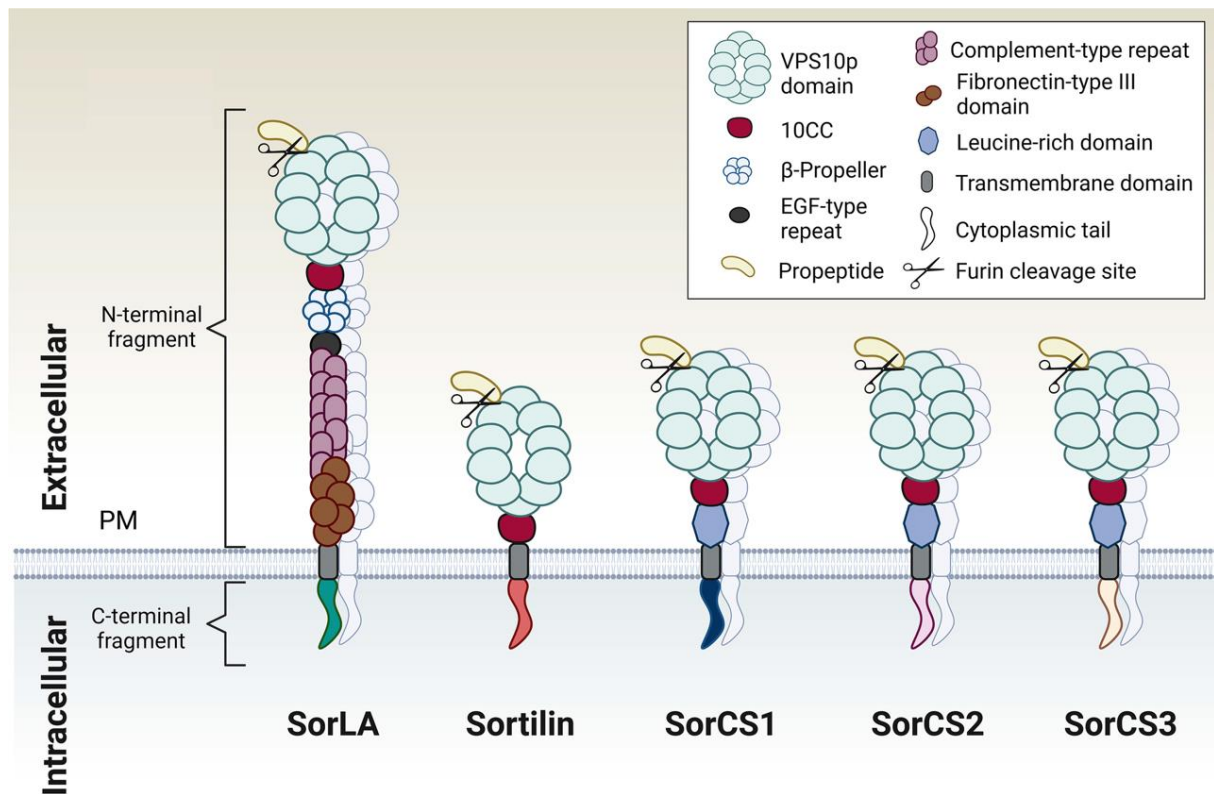


Figure 13: Représentation schématique de la famille des récepteurs au domaine VPS10 (Salasova *et al.*, 2022)

Les récepteurs VPS10 sont produits sous forme de proformes contenant un propeptide qui est clivé par la Furine. À l'exception de SorLA, les récepteurs présentent une structure similaire, différant principalement par la séquence de leurs queues cytoplasmiques intracellulaires.

En dehors des domaines extracellulaires et transmembranaires, chaque récepteur VPS10 comprend un domaine cytoplasmique intracellulaire concis, constitué de 40 à 80 acides aminés. Ce domaine contient des motifs distinctifs essentiels pour la liaison des protéines adaptatrices, cruciales à l'endocytose, le ciblage des compartiments et le tri des protéines. Ils dirigent le transport soit vers les endosomes en provenance du Golgi (transport antérograde), soit vers le Golgi depuis les endosomes (transport rétrograde) (Nielsen *et al.*, 2001). Le domaine intracellulaire de la sortiline contient trois motifs canoniques également présents dans le récepteur (M6PR) : un motif dileucine (HDDSDEDLLE), un motif tyrosine (YXXL ou YSVL) et un motif consensus d'internalisation hexapeptidique (F-XXX-Y) (Johnson and Kornfeld, 1992; Petersen *et al.*, 1997). L'homologie structurale entre la sortiline et le M6PR, ainsi que leur localisation commune, soutiennent l'idée que ces protéines opèrent par des voies analogues (Petersen *et al.*, 1997; Morris *et al.*, 1998). En outre, des études antérieures menées par Nielsen

et ses collègues ont montré que des constructions chimériques fusionnant le domaine luminal de la M6PR au domaine cytoplasmique de la sortiline permettaient de rétablir le trafic intracellulaire dans les cellules déficientes en M6PR (Nielsen *et al.*, 2001).

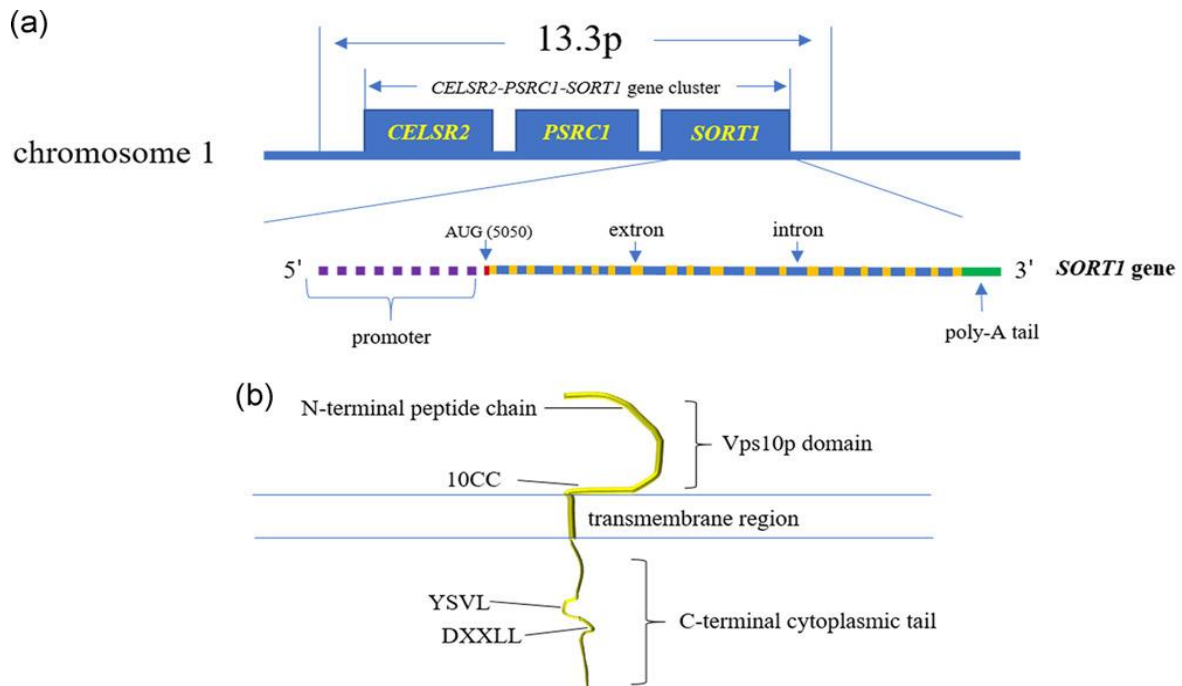


Figure 14: Du gène *SORT1* à la structure de la protéine sortiline

Le gène *SORT1* est situé sur le bras court du chromosome 1 (1p13.3). Cette région du bras court contient également deux autres gènes importants, *PSRC1* et *CELSR2*, qui forment un groupe de gènes *CELSR2-PSRC1-SORT1*. Le codon d'initiation du gène *SORT1* est situé en position 5050, et le gène *SORT1* contient 20 exons et 19 introns. (b) La protéine sortiline est composée d'un domaine Vps10p, d'un seul domaine transmembranaire et d'une queue cytoplasmique C-terminale. Le domaine Vps10p comprend toute la partie luminaire extracellulaire de la sortiline et contient deux caractéristiques structurales : un peptide N-terminal de 700 résidus avec une structure en feuillets 10 bêta et un segment C-terminal 10CC (Ouyang *et al.*, 2020).

II.2. Régulation de l'expression de la sortiline

Malgré les progrès réalisés dans la compréhension des rôles physiologiques de la sortiline, les mécanismes qui régulent son expression et sa fonction de trafic sont encore en cours d'élucidation. L'expression de la sortiline est régulée à trois niveaux : ADN, ARN messager (ARNm) et protéine (Figure 14).

II.2.1. Régulation au niveau de l'ADN :

L'expression de *SORT1* est régulée par une interaction complexe de mécanismes impliquant la méthylation de l'ADN et les SNP (*Single Nucleotide Polymorphisms*), tels que, les SNP

rs12740374, rs599839 et rs646776, qui peuvent soit augmenter, soit diminuer son expression (Carrasquillo *et al.*, 2010; Kleber *et al.*, 2010; Sung *et al.*, 2018). Certaines mutations de *SORT1* peuvent également avoir un impact sur son expression et altérer sa fonctionnalité. Par exemple, sur les 45 mutations identifiées dans le gène *SORT1*, les mutations G310E, D358Y, V407M, R411C et H822R sont associées à une régulation à la baisse de l'expression de la sortiline en modifiant l'épissage de l'ARN (Carrasquillo *et al.*, 2010). Dans la queue cytoplasmique, les mutations Y14A et L17A, introduites artificiellement par mutagenèse dirigée, modifient la structure du motif YSVL et la fonction de trafic de la sortiline (Nielsen *et al.*, 2001; Canuel, Korkidakis, *et al.*, 2008).

II.2.2. Régulation au niveau de l'ARNm :

II.2.2.1. Niveaux transcriptionnels

L'activation de la transcription implique la liaison de divers facteurs à la séquence promotrice du gène *SORT1*. Parmi ces facteurs figure c-Jun, un membre de la famille des facteurs de transcription AP-1. L'activation de c-Jun par la c-Jun N-terminal kinase (JNK) est associée à une augmentation significative des niveaux d'ARNm de la sortiline dans la lignée cellulaire neuronale dopaminergique immortalisée murine MN9D. A l'inverse, cette augmentation est perdue en présence de l'inhibiteur de c-Jun "SP600125" (Ouyang *et al.*, 2020). La voie Janus kinase (JAK)-signal transducers and activators of transcription 1 (STAT1) régule négativement la transcription de l'ARNm de la sortiline chez les souris invalidées par le récepteur des lipoprotéines de basse densité (LDLR) (Pirault *et al.*, 2017). De plus, des études ont montré que l'activation du facteur de transcription ATF3 (*Activating transcription factor 3*) réduit significativement les niveaux d'ARNm de la sortiline dans le foie. À l'inverse, chez les souris C57BL/6 invalidées pour l'expression d'ATF3, l'ARNm de la sortiline est augmenté (Ai *et al.*, 2012; Jadhav and Zhang, 2017).

II.2.2.2. Niveaux post-transcriptionnels

La régulation post-transcriptionnelle de l'ARNm de la sortiline implique une interaction entre divers facteurs. La protéine TDP-43 (*Trans activation response (TAR) DNA-binding Protein 43*) s'est révélée être un régulateur clé de l'épissage alternatif de l'ARNm de la sortiline. La déplétion ou la surexpression de TDP-43 mène respectivement à l'inclusion ou l'exclusion d'une séquence comprise dans l'intron 17, nommée exon 17b. L'épissage qui conserve l'exon

17b produit un variant de l'ARNm de la sortiline insérant un codon STOP prématuré. Cette variante prive la sortiline de l'exon 18 codant pour sa partie intracellulaire (Tann *et al.*, 2019).

La protéine de liaison Poly-rC1 (PCBP1), une protéine de liaison à l'ARN multifonctionnelle (RBP), contribue à la stabilité de l'ARNm de la sortiline. PCBP1 reconnaît les séquences riches en cytosine (CRE) dans la partie 3'-UTR de l'ARNm de sortiline pour former un complexe CRER-ARNP/PCBP1 limitant sa dégradation (Yabe-Wada *et al.*, 2016). De plus, de nombreuses études ont montré que la région 3'-UTR de l'ARNm de la sortiline est une cible de plusieurs micro ARN ou miR, tels que miARN-182 (Zhang *et al.*, 2018), miARN-155 (Chen *et al.*, 2019) ou miARN-125a (Ouyang *et al.*, 2020) bloquant ainsi leur traduction ou entraînant leur dégradation.

D'autres protéines, telles que le proBDNF, p75^{NTR} et Aβ42 augmentent les niveaux d'ARNm de la sortiline. Cependant, les mécanismes sous-jacents restent largement inexplorés et nécessitent des recherches supplémentaires (Kiss *et al.*, 2010; Tsuchiya *et al.*, 2010; Saadipour *et al.*, 2013).

II.2.3. Régulation au niveau translationnel :

La sortiline est régulée par l'interaction entre le facteur d'initiation de la traduction 4E-BP et eIF-4E, deux composants cruciaux du processus de synthèse des protéines. Le 4E-BP, ou protéine de liaison au facteur d'initiation eucaryote 4E, est une protéine inhibitrice qui régule la capacité de l'eIF4E à former le complexe de liaison à la coiffe (eIF4F) (Z. Wang *et al.*, 2019). Lorsque le 4E-BP est phosphorylé, cela entraîne une levée de l'inhibition, permettant ainsi à l'eIF4E de se lier à l'ARNm de la sortiline. Cette liaison est une étape essentielle pour permettre la traduction et la synthèse de la sortiline (Ariga *et al.*, 2017). D'autres études suggèrent l'implication du facteur eEF-2 (*Eukaryotic Translation Elongation Factor 2*) dans la régulation de la sortiline pendant l'élongation du polypeptide (Redpath and Proud, 1994; Klingenberg *et al.*, 2013).

Au-delà de l'ARNm, la sortiline est principalement régulée au niveau de la traduction et par des processus post-traductionnels. Dans les ribosomes, les aa libres sont assemblés en une chaîne polypeptidique de pré-sortiline. Ce précurseur protéique subit une série de modifications post-traductionnelles, de repliement, de trafic et de clivage pour devenir la sortiline mature. Certains facteurs ont un impact sur la traduction de la sortiline, tandis que d'autres affectent les processus post-traductionnels.

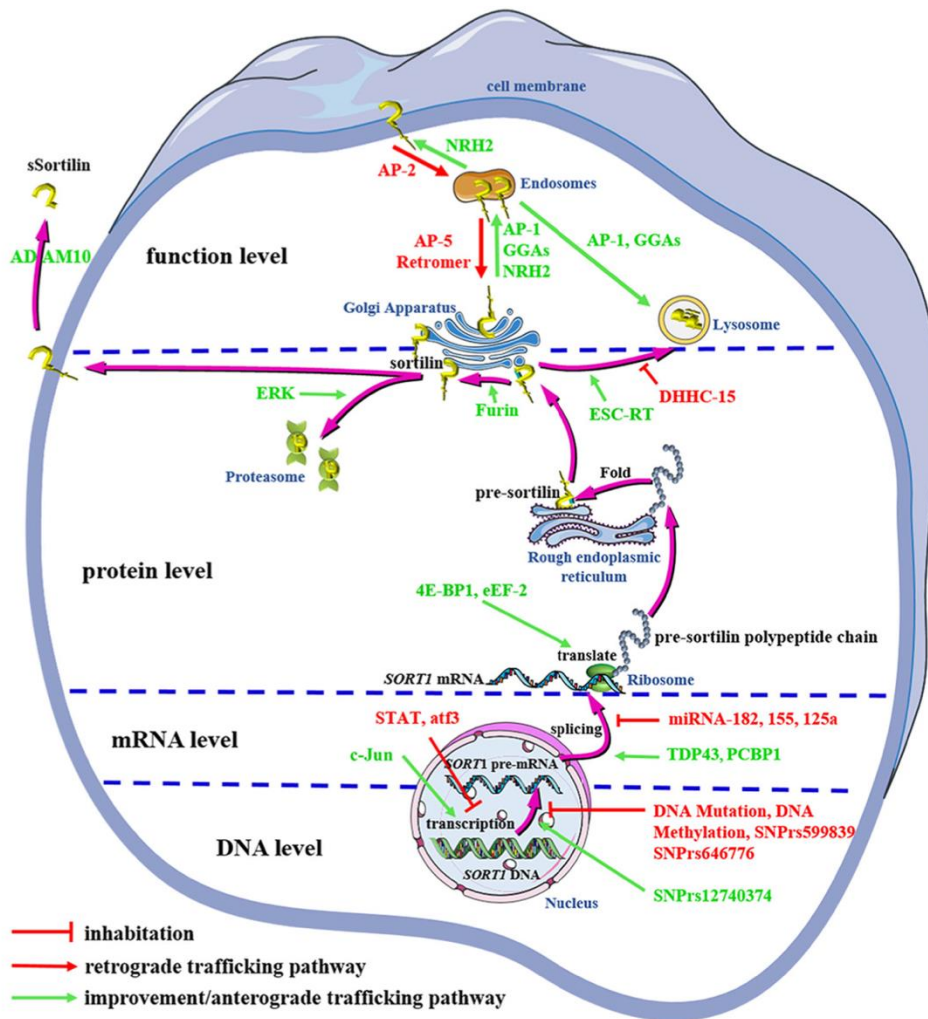


Figure 15 : Régulation de l'expression et de la fonction de la sortiline au niveau de l'ADN, de l'ARNm, de la protéine et de la fonction de trafic (Ouyang *et al.*, 2020).

Au niveau de l'ADN, la méthylation, les mutations et les polymorphismes d'un seul nucléotide (SNP) rs599839 et rs646776 répriment la transcription du gène SORT1, tandis que le SNP rs12740374 la stimule. Au niveau de l'ARNm, c-Jun augmente la transcription de l'ARNm, tandis que STAT et ATF3 l'inhibent. TDP-43 module l'épissage de l'ARNm SORT1 et PCBP1 améliore sa stabilité, tandis que divers miARN l'affaiblissent. Au niveau protéique, 4E-BP1 et eEF-2 favorisent l'efficacité de la traduction de la sortiline. La furine facilite la transformation de la pré-sortiline en sortiline mature. ADAM10 favorise le clivage de la sortiline à la surface des cellules. ERK accélère la dégradation protéasomale de la sortiline, tandis que la dégradation lysosomale de la sortiline est accélérée par ESCRT mais inhibée par DHHC-15. Sur le plan fonctionnel, AP-1, GGAs et NRH2 manipulent le trafic de sortiline dans la voie antérograde ; les protéines rétromériques, AP-5 et AP-2 sont impliquées dans la voie rétrograde du trafic de sortiline. Rouge : inhibition ; violet : trafic rétrograde ; vert : activation.

II.2.4. Régulation post traductionnelle de la sortiline et de son trafic cellulaire

Après son clivage protéolytique par la furine (Figure 7) la sortiline mature peut quitter le TGN (1) par au moins trois voies alternatives de trafic :

La première voie implique l'adressage de la sortiline vers la surface cellulaire par l'intermédiaire de vésicules sécrétoires constitutives (2). Une fraction subit un clivage enzymatique de l'ectodomaine en deux étapes impliquant d'abord ADAM10 ou ADAM17 puis la γ -sécrétase (3) (Nyborg *et al.*, 2006; Hermey, 2009; Evans *et al.*, 2011). Le clivage de la sortiline génère un domaine soluble de liaison au ligand capable de lier la neurotrophine (NT) (Evans *et al.*, 2011). La grande majorité de la sortiline résidant à la surface conserve son intégrité, engageant des ligands et des corécepteurs pour potentialiser la signalisation cellulaire. Parallèlement, la sortiline module l'endocytose dépendante de la clathrine en se liant à la protéine adaptatrice associée à la clathrine (AP2) (Nielsen *et al.*, 2001; Morinville *et al.*, 2004). Elle est impliquée dans le transport rétrograde du réseau endosomal tubulaire (TEN) des endosomes précoces vers le TGN via des interactions avec des complexes adaptateurs cytosoliques tels que la protéine adaptatrice AP1 et les protéines retromères (Mari *et al.*, 2008; Kim *et al.*, 2010).

La deuxième voie implique le transport antérograde de la sortiline vers les endosomes précoces via les adaptateurs monomériques de la clathrine ; GGA1, -2, -3 (*Golgi Associated, Gamma Adaptin Ear Containing, ARF Binding Protein 1*) (6) (Nielsen *et al.*, 2001; Takatsu *et al.*, 2001) et AP1 (Canuel, Lefrancois, *et al.*, 2008). Cette voie permet aux ligands de la sortiline de passer des endosomes précoces à la dégradation lysosomale (7).

Une troisième voie spécifique aux cellules sécrétoires, où les molécules de sortiline associées à des ligands, sont transportées du TGN vers des vésicules de sécrétogranine (8) (Yang *et al.*, 2011), ou vers les vésicules extracellulaires tels que les exosomes (Wilson *et al.*, 2014).

La régulation de la dégradation lysosomale de la sortiline dépend de plusieurs protéines. La protéine ERK (*extracellular signal-regulated kinases*), favorise l'ubiquitylation de la sortiline (Bi *et al.*, 2013), en amont des complexes de tri et de transport associés aux endosomes, ou ESCRT (*Endosomal sorting complexes required for transport*), identifiant la sortiline ubiquitylée en vue de sa dégradation lysosomale (Tu *et al.*, 2010; Dumaresq-Doiron, Jules and Lefrancois, 2013). A l'inverse, la protéine DHHC-15 (*Aspartic acid-histidine-histidine-cysteine-15*), membre de la famille des protéines palmitoyl-transférase DHHC, entraîne la palmitoylation de la sortiline dans sa partie C-terminale empêchant ainsi son ubiquitylation, et entravant dès lors sa dégradation (Dumaresq-Doiron, Jules and Lefrancois, 2013).

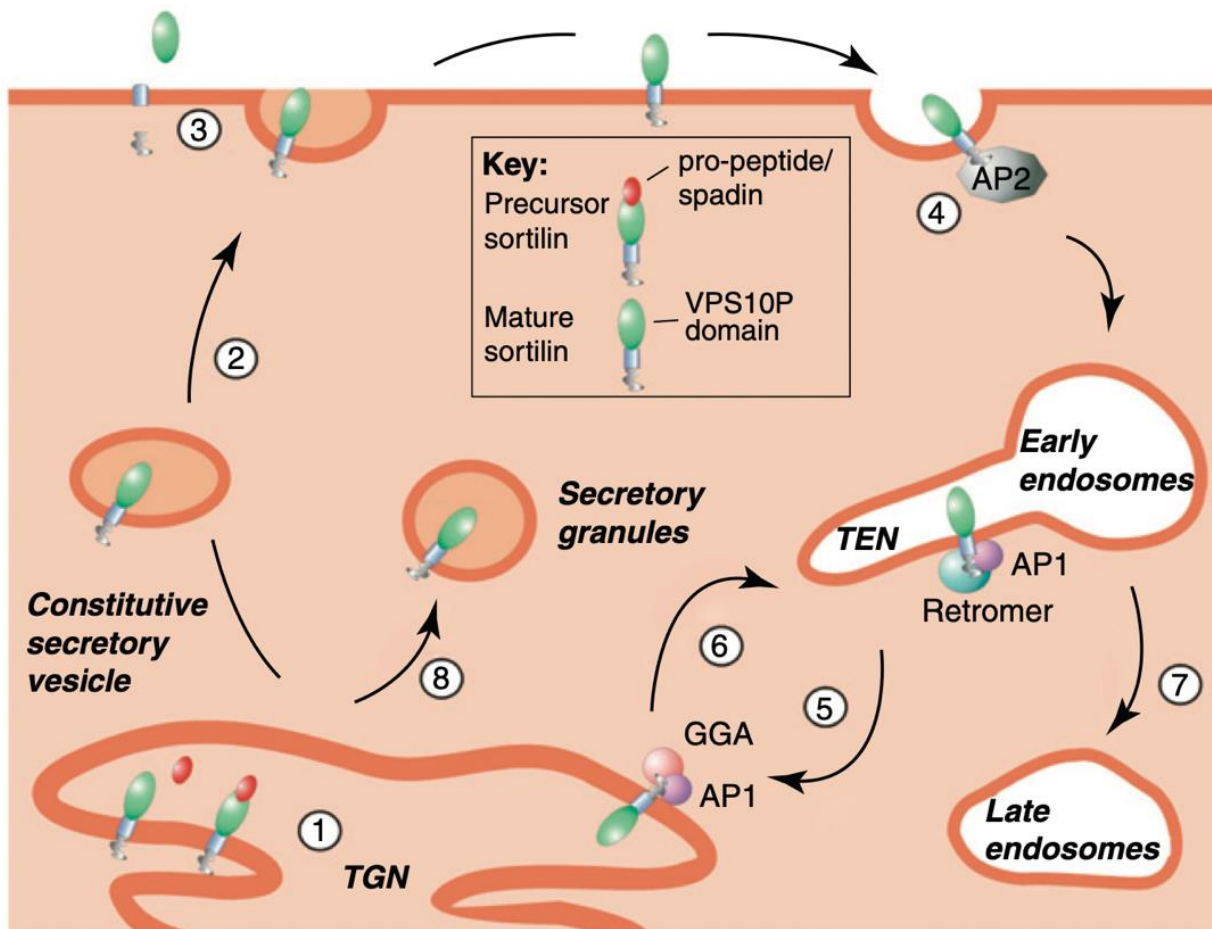


Figure 16: l'itinéraire du trafic de la sortiline (Nykjaer and Willnow, 2012)

II.3. Les ligands de la sortiline

La sortiline est une protéine multifonctionnelle interagissant avec une variété de ligands (Tableau 1). Des interactions directes ont été documentées avec; la NTS (Mazella *et al.*, 1998), les précurseurs des facteurs de croissance nerveux β (proNGF β) et neurotrophiques dérivés du cerveau (proBDNF) (Nykjaer *et al.*, 2004; Teng *et al.*, 2005), les récepteurs tyrosine kinases (récepteurs Trk) (Vaegter *et al.*, 2011), la protéine précurseur de l'amyloïde (APP) (Yang *et al.*, 2013a), la progranuline (Hu *et al.*, 2010; Zheng *et al.*, 2011), la prosaposine et la protéine activatrice Gm2 (Gm2AP) (Lefrancois *et al.*, 2003), la lipoprotéine lipase (LPL) (Nielsen *et al.*, 1999), l'apolipoprotéine E (apoE) (Asaro *et al.*, 2021), l'apolipoprotéine A-V (Nilsson *et al.*, 2008), l'apolipoprotéine B-100 (Kjolby *et al.*, 2010), la proprotéine convertase subtilisine/kexine de type 9 (PCSK9) (Gustafsen *et al.*, 2014), la protéine associée aux

récepteurs (RAP) (Petersen *et al.*, 1997), le récepteur de la neurotrophine p75 (Skeldal *et al.*, 2012) et l'EGFR (Al-Akhrass *et al.*, 2017a).

Il est également intéressant de noter que le propeptide généré par le clivage de la furine, entre en compétition avec les autres ligands connus de la sortiline (Munck Petersen *et al.*, 1999; Quistgaard *et al.*, 2009). Ceci a été spécifiquement démontré entre la neurotensine, la RAP et le propeptide (Munck Petersen *et al.*, 1999). Cette liaison compétitive est attribuée à un encombrement stérique au sein du domaine structural de la sortiline, composé de 10 feuillets bêta (Quistgaard *et al.*, 2009).

Tableau 1 : Les ligands de la sortiline et leurs implications dans les voies de signalisation (Mitok, Keller and Attie, 2022) (modifié)

Pathway	Ligand of Sortilin
Lipid related	Apolipoprotein B-100 (apoB-100)
	Apolipoprotein E (apoE)
	Apolipoprotein J/clusterin (apoJ)
	ATP-binding cassette subfamily A member 1 (ABCA1)
	Delta like non-canonical Notch ligand 1 (DLK1)
	Lipoprotein lipase (LPL)
	Carboxylesterase 1 (CES1)
	Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9)
	p75 neurotrophin receptor (p75NTR)
	pro-brain-derived neurotrophic factor (proBDNF)
Neurotrophin related	pro-nerve growth factor (proNGF)
	Proneurotrophin-3 (proNT-3)
	Tropomyosin receptor kinase A (TRKA)
	Tropomyosin receptor kinase B (TRKB)
	Tropomyosin receptor kinase C (TRKC)
Neurotensin related	Neurotensin
	Neurotensin receptor 1 (NTR1)
	Neurotensin receptor 2 (NTR2)
APP related	Amyloid-precursor-like protein 2 (APLP2)
	Amyloid precursor protein (APP)
Cytokine related	β -site amyloid precursor protein cleaving enzyme 1 (BACE1)
	Cardiolipin-like cytokine/cytokine-like factor-1 (CLC/CLF-1)
	Ciliary neurotrophic factor (CNTF)
	Glycoprotein 130/leukemia inhibitory factor receptor β (gp130/LIFR β)
	Interferon- α (IFN- α)
	Interferon- γ (IFN- γ)
	Interleukin-6 (IL-6)
	Interleukin-10 (IL-10)
	Interleukin-12 (IL-12)
	Interleukin-17A (IL-17A)
Lysosomal proteins	Neuropoietin
	Acid sphingomyelinase (ASM)
	Cathepsin D
	Cathepsin H
	Prosaposin (PSAP)
Other	Activin
	Adiponectin
	α -galactosidase A (α -Gal A)
	α -synuclein
	Bone morphogenic protein 4 (BMP4)
	Epidermal growth factor receptor (EGFR)
	Gelsolin
	Glucose transporter 4 (GLUT4) storage vesicles
	GM2 ganglioside activator pseudogene (GM2AP)
	Golgi phosphoprotein 4 (GPP130)
	Na ⁺ /Cl ⁻ cotransporter (NCC)
	Phosphatidylinositol (3,4,5)-triphosphate (PIP3)
	Prion (PrPC and PrPSc)
	Progranulin (PGRN)
	Prorenin receptor (PRR)
	Receptor-associated protein (RAP)
	Sonic hedgehog (SHH)
	Thyroglobulin
	TWIK-related potassium channel 1 (TREK-1)

II.4. La sortiline en tant que membre de la famille des récepteurs de la neurotensine

La NTS est un peptide composé de 13 acides aminés (Glu-Leu-Tyr-Glu-Asn-Lys-Pro-Arg-Arg-Pro-Tyr-Ile-Leu). Elle est essentielle pour la croissance, le développement, la survie et l'homéostasie des neurones (Magafa *et al.*, 2019). De plus, des études suggèrent un rôle crucial de la NTS dans la plasticité neuronale outre ses fonctions de régulation de la survie et de la différenciation (Thoenen, 1995). Plusieurs recherches ont également souligné son implication dans des processus oncogéniques, notamment la croissance tumorale, la prolifération et les métastases (Vincent, Mazella and Kitabgi, 1999; Qiu *et al.*, 2019).

Au niveau moléculaire, la NTS agit en interagissant avec trois récepteurs spécifiques. Deux d'entre eux, NTSR1 et NTSR2 (*Neurotensin Receptor-1, -2*), appartiennent à la famille des récepteurs couplés aux protéines G, avec des affinités différentes vis-à-vis de la NTS. Par ailleurs, le troisième récepteur identifié est la sortiline, aussi nommée NTSR3 ou NTR3 (Mazella *et al.*, 1998). Il est à noter que NTSR1 et NTSR3 forment des complexes hétérodimériques à la surface des cellules, facilitant ainsi l'internalisation de la NTS vers les compartiments intracellulaires (Ouyang *et al.*, 2017).

D'une manière intéressante, la sortiline semble avoir une affinité concurrentielle avec NTSR2 pour lier la NTS. Cette interaction modifie l'effet nocicepteur de NTSR2, notamment dans la prévention de la douleur neuropathique (Richner *et al.*, 2019). Des études centrées sur les cellules microgliales ont suggéré que la sortiline pouvait potentiellement s'associer à la NTS indépendamment des autres NTSR (Martin, Vincent and Mazella, 2003). Cette interaction mène à une activation de la voie AKT-ERK1/2. La dérégulation de cette même voie semble affecter la migration cellulaire (Martin, Vincent and Mazella, 2003).

II.5. Localisation et expression de la sortiline

La sortiline est une protéine ubiquitaire, principalement exprimée dans le système nerveux où elle joue un rôle crucial dans la survie des cellules neuronales en développement ou dans l'induction de la mort post-traumatique (Nykjaer and Willnow, 2012). Elle est également présente dans des tissus non neuronaux tels que les lymphocytes B (Fauchais *et al.*, 2008); le foie (Li *et al.*, 2018); les glandes thyroïdiennes (Boggild *et al.*, 2016), les muscles squelettiques et cardiaques (Goettsch, Kjolby and Aikawa, 2018), les kératinocytes et les adipocytes (Kiss *et al.*, 2010; Baltes *et al.*, 2014).

Concernant sa localisation subcellulaire, la sortiline se localise principalement dans les compartiments du Golgi, les organites vésiculaires et les saccules du réticulum endoplasmique (Geisler *et al.*, 2006), et en moindre proportion à la surface des cellules (Nielsen *et al.*, 2001; Vaegter *et al.*, 2011; Yang *et al.*, 2013; Quistgaard *et al.*, 2014). Plus récemment, notre équipe a décrit la sortiline au niveau nucléaire (Lapeyronnie *et al.*, 2021).

II.6. La forme soluble de la sortiline (sSortiline)

De nombreuses protéines transmembranaires associées à la croissance tumorale et à la formation de niches métastatiques sont clivées par des protéases, libérant des ligands actifs dans le milieu extracellulaire. La sortiline quant à elle est clivée par des métalloprotéinases matricielles et des protéases solubles extracellulaires (Navarro, Vincent and Mazella, 2002). La sortiline clivée est ensuite libérée dans le plasma ou la matrice extracellulaire. Ce mécanisme génère une forme soluble de sortiline, dénommée sSortiline, identifiée comme un ligand actif capable de se lier à des récepteurs membranaires, notamment le TrkB (Christou *et al.*, 2020), et d'être par la suite internalisée par les cellules tumorales (Massa *et al.*, 2014; Béraud-Dufour *et al.*, 2016). Les premières études suggèrent un rôle de la sSortiline dans le détachement et la propagation des cellules tumorales (Christou *et al.*, 2020).

Par ailleurs, un taux plasmatique élevé de sSortiline constitue un facteur de risque dans diverses pathologies humaines, dont l'athérombose (Ogawa *et al.*, 2016), la dépression (Buttenschøn *et al.*, 2015) et la dégénérescence lobaire frontotemporale (Molgaard *et al.*, 2016).

II.7. Rôle putatif de la sortiline dans les maladies humaines

Découverte à l'origine dans le système nerveux, la sortiline a révélé son importance dans une multitude de contextes physiologiques et pathologies diverses. Elle est associée aux pathologies neurodégénératives liées à l'âge telles que la démence de type d'Alzheimer (Xu *et al.*, 2018). Elle est également impliquée dans les maladies cardiovasculaires et métaboliques telles que l'athérosclérose à travers des mécanismes impliquant l'inflammation et la calcification de la paroi artérielle (Goettsch, Kjolby and Aikawa, 2018), le diabète de type II via la régulation de la résistance à l'insuline (Blondeau *et al.*, 2019) et les anomalies du métabolisme des lipoprotéines (Conlon, 2019).

II.7.1. Rôle de la sortiline dans le cancer

Une relation a été établie entre expression de la sortiline et signification clinico-pathologique dans divers types de cancers tels que : le glioblastome (Yang, P. Wu, *et al.*, 2019), le cancer du sein (Roselli *et al.*, 2015a; Rhost *et al.*, 2018), le cancer colorectal (Akil *et al.*, 2011b), le cancer ovarien (Ghaemimanesh *et al.*, 2014), le cancer de la prostate (Tanimoto *et al.*, 2015a), le cancer du poumon (Al-Akhrass *et al.*, 2017a) et les hémopathies malignes telle que, la leucémie lymphoïde chronique (Farahi *et al.*, 2019). Cependant, le rôle de la sortiline dans l'oncogénèse est relativement peu exploré.

II.7.1.1. Glioblastome

La sortiline émerge comme un acteur clé dans la progression du glioblastome (GBM) qui demeure la plus agressive des tumeurs cérébrales. Selon des études récentes, la sortiline est surexprimée dans les tissus de patients atteints de GBM comparativement aux tissus cérébraux sains. Cette surexpression est associée à un mauvais pronostic chez les patients. De plus, *in vitro*, la sortiline est fortement exprimée dans 11 lignées cellulaires issues de GBM renforçant sa pertinence en tant que biomarqueur potentiel dans ce type de cancer (Marsland *et al.*, 2023). Des études antérieures avaient déjà démontré la prévalence de la sortiline, particulièrement dans les GBM appartenant au sous-type mésoenchymateux qui sont les plus agressifs et sont associés à un très mauvais pronostic (Yang, P.-F. Wu, *et al.*, 2019). Cette expression de la sortiline s'intensifie avec le grade pathologique de la tumeur et est en corrélation directe avec son niveau d'agressivité (Yang, P.-F. Wu, *et al.*, 2019). Par ailleurs, des travaux ont révélé le rôle actif de la sortiline dans l'invasion cellulaire, notamment à travers la voie GSK-3 β / β -caténine/Twist. Cette dernière est associée à la régulation de la TEM, processus clé dans l'évolution de nombreux cancers (Yang, P.-F. Wu, *et al.*, 2019; Marsland *et al.*, 2023). Par conséquent, l'utilisation d'un inhibiteur oral de la sortiline (AF38469), réduit significativement la migration et l'invasion des cellules de GBM en entravant la TEM (Yang, P.-F. Wu, *et al.*, 2019; Marsland *et al.*, 2023).

En 2021, un autre mécanisme a été exploré dans le GBM. Il met en lumière la relation entre la sortiline et la presenilin-1 qui est une sous-unité de la γ -sécrétase responsable du clivage de l'APP conduisant à la production du peptide β -Amyloïde. Ces travaux ont révélé que l'axe presenilin-1/sortiline/ β -caténine joue un rôle significatif dans la régulation de la TEM et l'invasion tumorale dans le contexte du GBM. Plus précisément, les auteurs ont démontré que

la sortiline sous sa forme complète (non-clivée) est essentielle à l'activation de la β -caténine, un acteur central dans la TEM. Par ailleurs, ils ont observé que le clivage de la sortiline par la préséniline-1, qui entraîne la libération d'un fragment carboxy-terminal de 16 kDa, induit la phosphorylation de la β -caténine, conduisant à sa dégradation et inhibant par conséquent la migration, l'invasion et la capacité TEM des cellules (Yang *et al.*, 2021). Bien que la fonction de la sortiline exacte dans la modulation de l'activité de la β -caténine ne soit pas claire, les auteurs supposent une interaction entre la sortiline et le récepteur Frizzled, éléments de la signalisation WNT/ β -caténine. De plus, le mécanisme de clivage de la sortiline par la préséniline-1 n'a pas été clairement élucidé (Yang *et al.*, 2021). Par conséquent, le site spécifique de clivage et son importance fonctionnelle reste encore à explorer.

D'autres études ont mis en évidence le rôle de la sortiline dans la progression du GBM, notamment en lien avec l'expression de TrkB, p75^{NTR}. En 2013, Xiong et ses collègues ont constaté que les expressions du proBDNF, du p75^{NTR} et de la sortiline augmentaient avec les grades pathologiques, et que ces expressions étaient en corrélation directe avec l'agressivité de la tumeur chez les patients atteints de GBM (Xiong *et al.*, 2013). En 2016, une étude menée au sein de notre laboratoire a révélé que l'inhibition de l'expression du marqueur mésenchymateux YKL-40 dans les lignées cellulaires de GBM conduisait à une baisse significative de l'expression de TrkB, p75^{NTR}, et de la sortiline. Cela se traduisait *in vitro* par une atténuation de l'agressivité cellulaire, de la prolifération, de la capacité à former des gliomasphères ainsi qu'à induire la migration des cellules endothéliales (Pinet *et al.*, 2016). Ces résultats mettent en évidence le rôle crucial de l'expression de TrkB, p75^{NTR} et de la sortiline dans la progression et l'agressivité du GBM. La modulation de ces marqueurs pourrait donc représenter une cible thérapeutique prometteuse pour la prise en charge du GBM.

II.7.1.2. Le cancer du sein

La sortiline joue un rôle significatif dans la progression et l'agressivité du cancer du sein où elle est fortement exprimée, en particulier dans les carcinomes ductaux invasifs (79%), les carcinomes lobulaires invasifs (54%) et est associée à l'invasion des ganglions lymphatiques (Roselli *et al.*, 2015b).

Le complexe FAK-Src est fréquemment activé dans les cellules cancéreuses et régule des voies de signalisation essentielles conduisant à la prolifération tumorale et aux métastases. Des études récentes indiquent que l'inhibition de la voie FAK-Src peut entraver la migration

cellulaire et les métastases pulmonaires dans le cancer du sein. La sortiline, en particulier sa fraction soluble (sSortiline), est un acteur important de cette voie. La modulation de l'expression de la sortiline semble provoquer des perturbations significatives dans l'adhésion cellulaire et une diminution de l'activation des kinases SRC et FAK, renforçant l'hypothèse de son rôle central dans l'agressivité tumorale (Roselli *et al.*, 2015b). Ces données, combinant des informations moléculaires et cliniques, offrent des perspectives prometteuses pour le développement de stratégies thérapeutiques innovantes ciblant le complexe FAK-Src et la sortiline afin de lutter contre le cancer de sein.

La progranuline (PGRN) joue un rôle important dans la progression du cancer du sein où elle favorise l'invasion et la migration des cellules via l'activation de la voie ERK1/2 et de la TEM (Yue *et al.*, 2021). L'inhibition de la PGRN par des ShRNA limite la croissance des cellules cancéreuses et sensibilise ces dernières au cisplatine (Arechavaleta-Velasco *et al.*, 2017). De manière intéressante, l'inhibition de la sortiline entrave la progression tumorale induite par la PGRN, un mécanisme intrinsèquement lié à l'augmentation des cellules souches cancéreuses (CSC) (Berger, Rhost, *et al.*, 2021). Ces CSC, présentent en minorité au sein des tumeurs, possèdent des capacités uniques d'auto-renouvellement et de production de diverses cellules tumorales. Leur rôle est déterminant dans l'évolution de la tumeur, la résistance thérapeutique et la dissémination métastatique (Ginestier *et al.*, 2007). L'interaction de la sortiline avec la PGRN stimule l'activité des CSC, amplifiant ainsi le potentiel métastatique et la croissance tumorale et entraînant dès lors une diminution de la survie des patientes atteintes du cancer du sein. L'inhibition de cette interaction entre la PGRN et la sortiline a été accompagné d'une diminution de la croissance tumorale dans un modèle *in vivo* de xénogreffe de cancer du sein métastatique triple négatif (Berger, Pauwels, *et al.*, 2021). En outre, l'utilisation des sept composés dérivés du Cyclootriazadisulfonamide (CADA) pour limiter l'expression cellulaire de la sortiline et la propagation du cancer par les CSC en présence de PGRN a été explorée. Parmi ces composés, quatre (TL020, TL023, VGD071 et LAL014) ont montré une capacité significative à inhiber la formation de mammosphères induite par la PGRN. Les composés CADA ciblant la sortiline pourraient par conséquent constituer une approche thérapeutique potentielle pour le traitement du cancer du sein (Berger, Pauwels, *et al.*, 2021).

II.7.1.3. Cancer colorectal (CRC)

Dans le cancer colorectal (CCR), la sortiline, et plus particulièrement la sSortiline, joue un rôle essentiel dans la progression de la maladie et la résistance aux traitements. L'internalisation de la sSortiline par les cellules tumorales entraîne une augmentation de la concentration de calcium intracellulaire, menant à l'activation de la cascade de signalisation PI3K/AKT/mTOR via la phosphorylation de FAK et Src (Massa *et al.*, 2014). La cascade PI3K/AKT/mTOR est un mécanisme de signalisation essentiel qui influence de nombreux processus cellulaires, notamment la régulation du métabolisme, l'autophagie, le cycle cellulaire, la prolifération, l'apoptose et l'invasion (Johnson *et al.*, 2010). En tant que tel, cette voie joue un rôle important dans l'oncogenèse et l'évolution du CRC. La sSortiline influence également l'expression de certaines intégrines, menant à des altérations dans la structure des desmosomes et l'adhérence cellulaire. Ces changements dans l'expression et la fonctionnalité des intégrines sont orchestrés par divers mécanismes, parmi lesquels l'activation de la voie PI3K se distingue (Massa *et al.*, 2014).

Un autre mécanisme impliquant la sortiline dans la progression du CCR est son interaction avec le BDNF. En effet, la sortiline favorise la survie des tumeurs en facilitant le trafic et la sécrétion de BDNF mature. Cependant elle peut également exercer un effet pro-apoptotique en interagissant avec le proBDNF externe. Ceci illustre la dualité fonctionnelle de la sortiline entre mort et survie cellulaire (Akil *et al.*, 2011b).

En plus de son rôle dans la régulation de la migration et de l'invasion, des travaux de notre équipe ont montré que la surexpression de la sortiline est liée à la résistance à la chimiothérapie par le 5-FU et est corrélée à un pronostic défavorable (Blondy *et al.*, 2021). La surexpression de la sortiline semble être une conséquence transcriptionnelle de la diminution d'expression d'ATF-3. L'inhibition génétique par shRNA ou pharmacologique (CADA) de la sortiline potentialise la cytotoxicité induite par le 5-FU, entraînant une augmentation significative de la mort cellulaire (Blondy *et al.*, 2021).

II.7.1.4. Leucémie lymphoïde chronique (LLC)

L'expression de la sortiline est observée à des niveaux élevés dans les cellules B leucémiques chez les patients atteints de Leucémie Lymphoïde Chronique (LLC) comparativement aux individus sains. Une étude de 2008 a établi un lien entre cette surexpression de la sortiline et la progression de la LLC, en particulier par la régulation positive par la sortiline des voies anti-

apoptotiques médiées par le BDNF (Fauchais *et al.*, 2008). Le BDNF ne favorise pas seulement la maturation, la prolifération et l'activation des lymphocytes B, mais joue également un rôle protecteur contre l'apoptose en régulant l'expression des protéines de la famille Bcl2, qui sont des facteurs clés dans la survie cellulaire (Pérez-Navarro *et al.*, 2005).

D'autres études mettent en lumière le rôle potentiel de la sortiline dans l'échappement thérapeutique des cancers. Notamment, une recherche de 2015 a révélé une corrélation positive entre le niveau d'expression de *SORT1* et l'échappement thérapeutique observé chez des patients souffrant de leucémie aiguë. Ces résultats suggèrent que la sortiline pourrait aussi jouer un rôle dans la résistance des cellules leucémiques à certaines thérapies (Garza-Veloz *et al.*, 2015).

II.7.1.5. Cancer de l'ovaire

La sortiline joue un rôle crucial dans l'évolution du cancer de l'ovaire où une surexpression de cette protéine est observée chez les patientes atteintes de ce cancer (Ghaemimanesh *et al.*, 2014). De même, l'expression de la sortiline demeure forte dans les lignées cellulaires dérivées de cancer ovarien à l'inverse de cellules non malignes présentant des niveaux nettement inférieurs. Cette expression de la sortiline limitée aux cellules tumorales ovariennes suggère qu'elle favorise la survie de ces cellules. De plus, une diminution de l'expression du gène *SORT1* dans une lignée de cellules tumorales ovariennes s'accompagne d'une augmentation de l'apoptose et d'une diminution de la prolifération. Ces résultats suggèrent que la sortiline représente un biomarqueur tumoral prometteur pour le diagnostic du carcinome ovarien, et souligne également son intérêt thérapeutique (Ghaemimanesh *et al.*, 2014)

II.7.1.6. Cancer de la prostate

Le développement et la progression du cancer de la prostate sont étroitement liés à la modulation du métabolisme du glucose et des lipides. Cette dynamique implique des changements dans l'expression et la signalisation du récepteur aux androgènes. Dans les cellules LNCaP sensibles aux androgènes, l'exposition à ces hormones augmente significativement l'expression de la sortiline, ce qui a pour effet d'accroître le métabolisme du glucose. Ce processus est médiatisé par une régulation à la hausse des transporteurs de glucose, notamment GLUT1 et GLUT4. En parallèle, la sortiline interagit avec la PGRN et la lipoprotéine lipase (LPL), jouant un rôle dans la régulation à la baisse du métabolisme des lipides. À l'inverse, en situation de carence en androgène, comme observée dans les cellules LNCaP non stimulées ou dans les lignées cellulaires PC3 résistantes aux androgènes, une réduction de l'expression de la

sortiline est observée, ce qui se traduit par un ralentissement du métabolisme de glucose. Pour s'adapter à cette déficience en glucose, les cellules reconfigurent leur métabolisme vers une utilisation accrue des lipides. Cette réorientation métabolique est associée à une surexpression du syndécan-1, qui favorise l'interaction avec la LPL et potentiellement avec l'intégrine $\alpha V\beta 3$, favorisant ainsi le métabolisme lipidique et améliorant la croissance tumorale (Lazniewska *et al.*, 2023). En d'autres termes, pour s'adapter à une pénurie de glucose, les cellules entraînent une diminution de la sortiline, qui agit comme un frein au métabolisme lipidique, et augmentant l'expression de la syndécan-1, un catalyseur de ce métabolisme. Cette dynamique suggère qu'un renforcement de la présence de la sortiline pourrait contrarier cette adaptation et tempérer le métabolisme lipidique. Cette hypothèse est corroborée par une étude de Tanimoto *et al.* en 2015, montrant que la surexpression de la sortiline dans les lignées cellulaires PC3 et DU145, résistantes aux androgènes, inhibe l'invasion, la prolifération et la croissance tumorale, alors qu'une diminution d'expression de la sortiline par siRNA intensifie ces processus (Tanimoto *et al.*, 2015b). Ces résultats mettent en évidence la nature dualiste de la fonction de la sortiline, soulignant son rôle variable en fonction des contextes cellulaires et des différents types de cancer.

II.7.1.7. Cancer du poumon

Dans le contexte des cancers bronchiques caractérisés par l'activation de l'oncogène EGFR, il a été établi que toute altération du trafic de l'EGFR a un impact significatif sur le développement tumoral. Nos recherches ont révélé un rôle déterminant de la sortiline dans ce processus par le biais de multiples mécanismes.

La sortiline se révèle cruciale dans la formation d'un complexe tyrosine kinase et la libération subséquente d'exosomes dans le CBNPC (Wilson *et al.*, 2014, 2016). Ces exosomes, de petites vésicules extracellulaires portant des molécules messagères telles que des protéines, de l'ADN, de l'ARN et des lipides, sont des moyens de communication entre les cellules du microenvironnement tumoral et les cellules cancéreuses (Jouida *et al.*, 2021). Ils sont reconnus comme des biomarqueurs diagnostiques clés et jouent un rôle central dans une multitude de processus pathologiques, y compris la prolifération, l'invasion, l'angiogenèse, le remodelage immunitaire et la survie cellulaire.

Dans le cancer du CBNPC, il a été démontré que l'EGFR est un acteur majeur du trafic exosomal, influençant leur biogenèse et leur capture par les cellules réceptrices. En outre,

l'EGFR et ses mutants oncogéniques, ainsi que les protéines associées à son réseau de signalisation, sont fréquemment présents dans les exosomes issus du cancer du poumon (Zanetti-Domingues *et al.*, 2020). Notre équipe a découvert que les exosomes dérivés de cellules de LUAD A549 interagissant avec des cellules endothéliales veineuses ombilicales humaines (HUVEC), contiennent de la sortiline (Wilson *et al.*, 2014, 2016). Cette dernière, en association avec les récepteurs tyrosine kinases EGFR et TrkB, forme un complexe appelé TES (TrkB-EGFR-sortiline). L'intégration de ce complexe dans les exosomes absorbés par les cellules HUVEC favorise l'expression de protéines angiogéniques, suggérant ainsi que le complexe TES, en synergie avec la sortiline, stimule la tumorigenèse par l'activation des voies de signalisation angiogéniques.

Une autre étude plus récente dans notre équipe a également mis en évidence le rôle de la sortiline dans la régulation du trafic intracellulaire de l'EGFR dans le LUAD. Cette étude a montré que la sortiline régulait l'activité de l'EGFR en participant à son internalisation depuis la membrane plasmique, limitant ainsi la durée et l'intensité de sa signalisation proliférative (Al-Akhrass *et al.*, 2017a). La sortiline inhibe l'EGFR par un mécanisme distinct, qui ne dépend pas des ligands habituels de l'EGFR et ne nécessite donc pas la phosphorylation typiquement induite par l'EGF. Ce processus contribue à l'internalisation de l'EGFR via l'endocytose. La perte d'expression de la sortiline participe au maintien de la signalisation proliférative de l'EGFR à la surface des cellules (Al-Akhrass *et al.*, 2017a). De même, les cellules tumorales dépourvues de sortiline présentent une croissance tumorale plus rapide *in vivo* notamment dans des modèles de xénogreffes chez des souris immunodéficientes. Des approches immunohistologiques menées sur une cohorte de patients atteints d'un LUAD ont montré que la diminution de l'expression de la sortiline était significativement corrélée avec l'augmentation du grade tumoral. Ces résultats étaient renforcés par une analyse *in silico* révélant une corrélation positive entre expression élevée de *SORT1* et une meilleure survie globale des patients. Dans ce même travail, notre équipe a également démontré que les lignées de LUAD, telles que la lignée NCI-H1975, présentent de manière générale une faible expression de sortiline. Par conséquent, une surexpression de la sortiline dans ces mêmes cellules permet de lever la résistance aux ITKs et entraîne une diminution de la signalisation proliférative de l'EGFR marquée par la diminution de la phosphorylation d'AKT et ERK. L'ensemble de ces observations suggère que la sortiline peut agir comme un suppresseur de tumeur en inhibant les processus oncogéniques induits par l'EGFR dans les LUAD (Al-Akhrass *et al.*, 2017a).

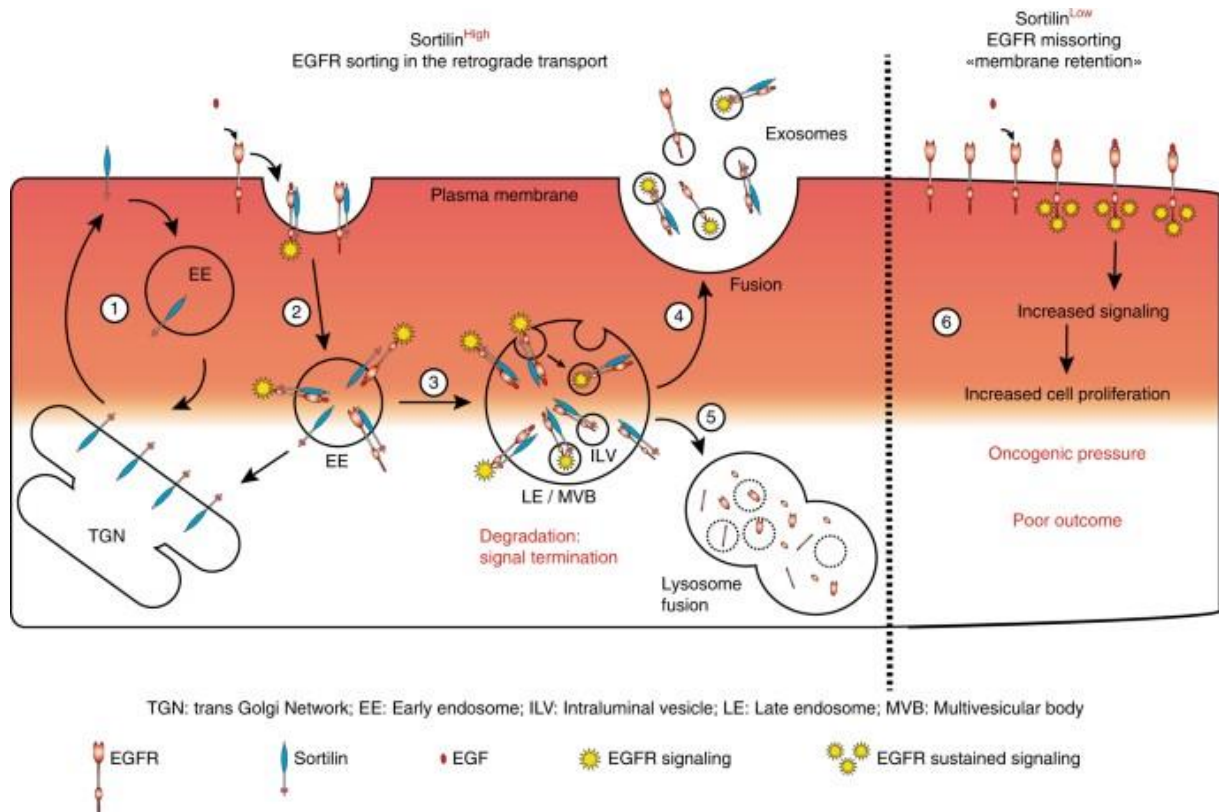


Figure 17: Schéma de la régulation de l'EGFR par la sortiline (Al-Akhrass *et al.*, 2017a)

La sortiline joue un rôle essentiel dans la régulation du transport rétrograde de l'EGFR en servant de médiateur dans son acheminement à travers les compartiments cellulaires. Principalement localisée au niveau du réseau trans-Golgien (TGN) et de la membrane plasmique, elle fonctionne comme une sorte de "navette", transportant des protéines partenaires vers les destinations appropriées. La dynamique cellulaire montre que la sortiline circule continuellement entre la membrane plasmique et le TGN, via les endosomes comme intermédiaires de transport. Parmi les protéines partenaires de la sortiline, l'EGFR occupe une place de choix. Qu'il soit à l'état activé ou inactif, l'EGFR peut se lier à la sortiline, déclenchant ainsi son processus d'internalisation. Une fois internalisé, l'EGFR suit un itinéraire bien défini. Il est tout d'abord acheminé vers les endosomes précoces, puis vers les endosomes tardifs. De là, il peut suivre plusieurs voies : être dégradé par le lysosome, recyclé vers la membrane ou encore être dirigé vers les exosomes. La dégradation lysosomale de l'EGFR est particulièrement cruciale, car elle permet de mettre fin à sa signalisation, assurant ainsi un contrôle strict de ses fonctions. Toutefois, en présence d'une faible concentration de sortiline dans la cellule, le mécanisme d'internalisation de l'EGFR est perturbé. Ce dernier reste alors ancré à la membrane plasmique, conservant ainsi son activité signalétique. Cette signalisation prolongée, à caractère pro-oncogénique, peut favoriser des processus pathologiques, soulignant l'importance cruciale de la sortiline dans la régulation de l'activité de l'EGFR.

Dans la suite de l'étude, des résultats obtenus par microscopie confocale et fractionnements subcellulaires ont permis de mettre en évidence l'importance de l'EGF dans la translocation de l'EGFR et de la sortiline. En effet, une augmentation notable de l'EGFR et de la sortiline a été détectée dans le noyau après stimulation par l'EGF dans les cellules A549. De plus, une comparaison des niveaux d'EGFR nucléaire dans des cellules A549, avec ou sans expression

de sortiline, a révélé une réduction marquée de l'EGFR dans les cellules déficientes en sortiline, même en présence d'EGF. Ces découvertes suggèrent fortement que la sortiline pourrait jouer un rôle clé dans le transport de l'EGFR vers le noyau (Al-Akhrass *et al.*, 2017a).

L'expression atypique du complexe EGFR-sortiline dans le noyau a attiré notre attention, incitant une investigation plus approfondie sur le rôle de la sortiline. Ce complexe, au-delà du fait qu'il participe à limiter la signalisation proliférative de l'EGFR, démontre une capacité surprenante à interagir directement avec la chromatine (Lapeyronnie *et al.*, 2021). En effet, l'équipe a montré une interaction de l'EGFR et de la sortiline au niveau génomique, à proximité des sites promoteurs, en particulier des éléments régulateurs de la transcription TSS (*Transcription Starting Site*). Ces sites sont cruciaux pour la transcription de gènes qui jouent un rôle actif dans l'agressivité et la progression tumorale. Cette étude a également démontré une interaction préférentielle de la sortiline avec le site TSS de *cMYC*. Cette interaction perturbe la fixation de l'ARN Pol II, limitant ainsi l'expression du gène. De façon intéressante, en présence de l'osimertinib, une internalisation remarquable de l'EGFR et de la sortiline a été observée, conduisant à une translocation nucléaire du complexe EGFR/Sortiline qui régule négativement l'expression des gènes. Globalement, ces résultats soulignent un rôle inhibiteur de la sortiline sur l'expression de plusieurs gènes, y compris *cMYC* et *CCND1* (Lapeyronnie *et al.*, 2021).

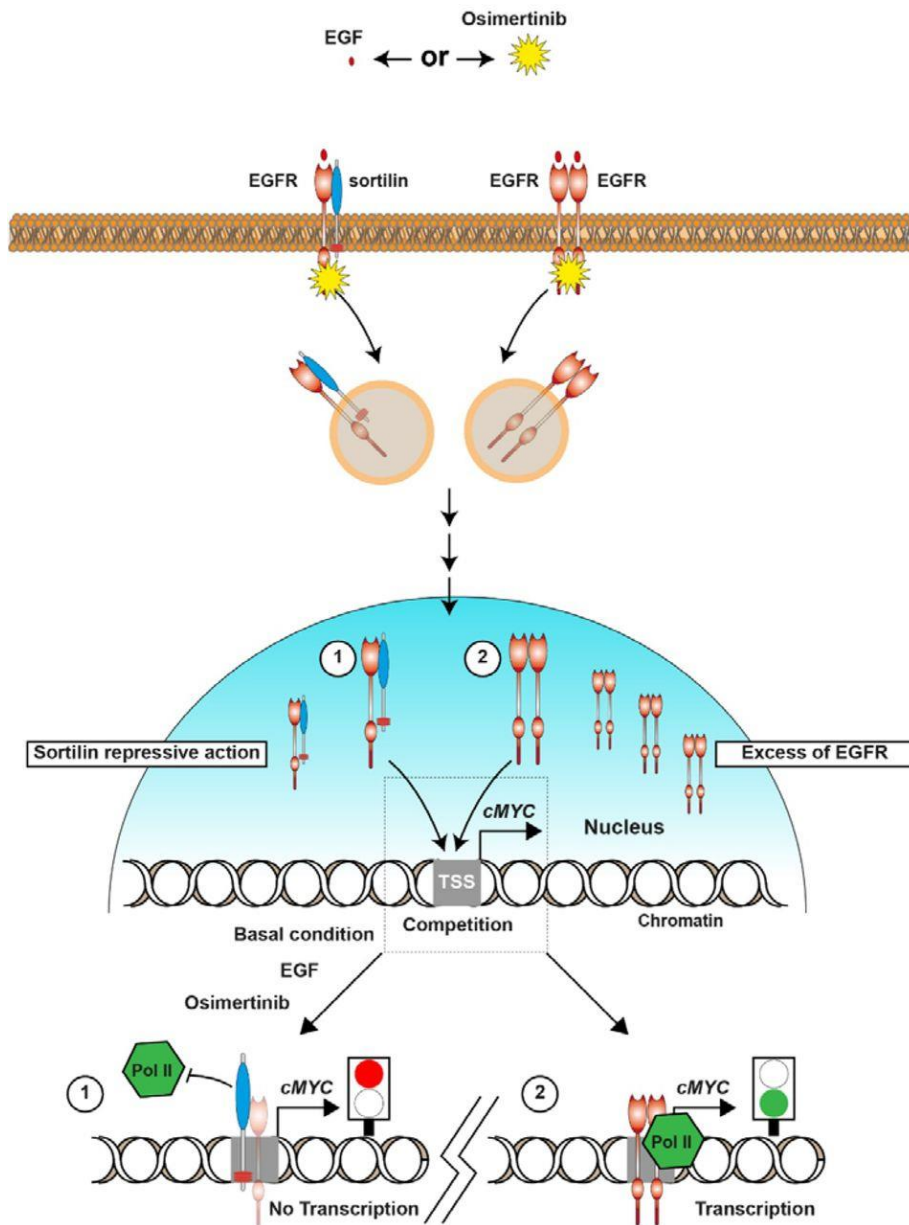


Figure 18: Modèle de régulation de la transcription par la sortiline (Lapeyronnie *et al.*, 2021)

Objectifs

Les recherches antérieures menées par notre équipe ont suggéré que la sortiline pourrait jouer un rôle essentiel en tant que suppresseur de tumeur, une fonction qui serait potentiellement liée à sa présence dans le noyau des cellules. Cependant, bien que des progrès significatifs aient été réalisés dans ce contexte, notre compréhension de la fonction précise de la sortiline au niveau nucléaire reste incomplète. Actuellement, nos recherches se concentrent sur l'exploration des mécanismes sous-jacents à ce rôle et l'analyse approfondie des profils moléculaires qui sont influencés par l'expression de la sortiline dans le noyau.

Évaluation de mécanismes oncogéniques lors d'une induction de la sortiline en présence de mutations de l'EGFR dans le LUAD

Nous avons suivi l'effet suppresseur de tumeur de la sortiline dans deux modèles de LUAD, à savoir les lignées cellulaires NCI-H1975 et NCI-H3255. Ces lignées se distinguent par des mutations différentes de l'EGFR, tel que l'*EGFR*^{L858R/T790M} et l'*EGFR*^{L858R} respectivement. Notre but était de déterminer l'impact de l'expression de la sortiline sur la réduction de la prolifération cellulaire et sur l'inhibition de la croissance tumorale, en présence de ces mutations EGFR, dans des conditions de culture en deux dimensions (2D) et en trois dimensions (3D) sur des sphéroïdes issus de ces deux lignées.

Evaluation d'une perte de fonction de la sortiline sur le potentiel oncogénique des mutants EGFR dans un modèle mimant le LUAD

Nous envisageons de mimer un modèle de LUAD en utilisant des cellules HEK293T modifiées génétiquement par CRISPR/Cas9 pour supprimer l'expression de *SORT1*, et en exprimant respectivement des mutants de l'EGFR propres à des cas cliniques. Cette méthode permettra de déterminer si l'absence génétique de l'expression de la sortiline confère un avantage aux mutants EGFR en termes de stimulation de la prolifération cellulaire.

Caractérisation d'une signature moléculaire dépendante de l'expression de la sortiline dans les lignées LUAD

Après avoir constaté qu'une perte d'expression de la sortiline favorisait la dominance des mutants EGFR, nous avons, à l'inverse de la méthode CRISPR/Cas9, induit l'expression de la sortiline dans les deux lignées LUAD NCI-H1975 et NCI-H3255. L'objectif est de déterminer

si la sortiline, via sa fonction de régulation de l'expression génique, peut exercer un contrôle direct sur les mécanismes d'oncogenèse, indépendamment de son rôle initial dans la dégradation de l'EGFR. Par la suite, une analyse RNA-seq a été réalisée pour identifier les gènes exprimés de manière différentielle en réponse à l'expression de la sortiline.

Screening des protéines interagissant avec la sortiline lors de son transport et de ses interactions avec ses cibles génomiques

Comme l'accès au noyau cellulaire nécessite une séquence de localisation nucléaire (NLS) et que la sortiline n'en possède pas, nos recherches se sont d'abord orientées vers l'identification de partenaires potentiels pouvant faciliter le transport de la sortiline dans le noyau. Pour cela, nous avons utilisé la technique BirA-AviTag, suivie d'une analyse approfondie par spectrométrie de masse, pour caractériser l'ensemble des interactions protéiques de la sortiline. L'objectif est d'identifier les partenaires qui facilitent l'entrée de la sortiline dans le noyau et de mieux comprendre son interactome nucléaire impliqué dans la régulation transcriptionnelle et le remodelage de l'ADN.

Matériels et méthodes

1. Culture cellulaire et traitements :

Les lignées cellulaires HEK293T (CRL-3216) et NCI-H1975 (CRL-5908) ont été obtenues à l'American Type Culture Collection (ATCC, États-Unis). La lignée cellulaire NCI-H3255 nous a été gracieusement fournie par Sylvie Gazzeri de l'Institut Albert Bonniot (France). Toutes les lignées cellulaires ont été cultivées dans le milieu DMEM GlutaMAX de Dulbecco (Gibco, ThermoFisher, France) supplémenté de 10% de sérum de veau foetal (FBS) (IDbio, France), de 1% d'acides aminés non essentiels (Gibco) et d'1% d'antibiotiques (pénicilline et streptomycine, respectivement à 100 Unités/mL et 100 µg/mL) (IDbio). Toutes les cellules ont été cultivées dans un incubateur humidifié à 5% de CO₂ et à 37°C.

2. Transfection et plasmides

Pour les transfections transitoires, les cellules ont été transfectées en utilisant le réactif de transfection JetPei (Polyplus transfection, Ozyme, France) conformément aux instructions du fabricant. Les plasmides CRISPR ont été achetés chez Horizon (New England). Les plasmides ont été conçus pour inclure respectivement chaque séquence cible de sgRNA, (SgRNA#1 5'-TCATAATTACCAGTGGTACA-3', SgRNA#2 5'-ATCTCACCTGATAGCT-3', SgRNA#3 5'-TTCCCATAATCCTCACTGAG-3', SgRNA#4 5'-TCATCAACACCTTTATT-3', SgRNA#5 5'-ACTGAATTTGGCATGGCTAT-3'), la nucléase Cas9 et la protéine fluorescente dasher GFP permettant de trier les cellules transfectées par cytométrie de flux. Les plasmides avec EGFR de type sauvage (Addgene plasmid #11011) ; EGFR^{G719S} mutant (Addgene plasmid #11013) ; EGFR^{L858R} mutant (Addgene plasmid #11012) ; EGFR^{G861Q} mutant (Addgene plasmid #32068) ; EGFR^{L858R/T790M} mutant (Addgene plasmid #32073) ; ont été générés par Matthew Meyerson et al. achetés à la société ADD gene (Yuza *et al.*, 2007). La sortiline complète (Full-Length, FL) a été gracieusement fournie par Gina Finan et al. (Finan, Okada and Kim, 2011). Tous les plasmides codant pour *SORT1*, fusionnés à l'enzyme biotine ligase BirA pour l'interaction protéine-protéine ont été produits par la société VectorBuilder (USA) ; BirA (VB201022-1029), SORT1-Avitag (VB220523-1246).

3. Lignée cellulaire HEK293T CRISPR

Pour créer des clones cellulaires édités par la nucléase Cas9 et obtenir des cellules déplétées en sortiline (*SORT1*-KO), nous avons transfecté les cellules à l'aide du JetPEI et des plasmides CRISPR comme décrit ci-dessus. Après 72 heures de transfection, des analyses par western blot ont été utilisées pour cribler et sélectionner les SgRNA les plus performants. Une fois

sélectionnés (SgRNA#1 et #3), la transfection avec les plasmides a été répétée avant de trier les cellules à l'aide du FACS Aria (BD Biosciences, France), sur la base de la fluorescence de la Dasher-GFP (une cellule par puits) dans une plaque de 96 puits afin d'obtenir des clones isogéniques. Les cellules triées ont été maintenues jusqu'à atteindre une quantité suffisante pour cribler l'expression de la sortiline avant de cryo-préserver les clones *SORT1*-KO dans du FBS avec 10% de DMSO.

4. Western Blot (WB)

Les tapis cellulaires sont d'abord rincés avec du PBS 1x (Gibco), puis solubilisés dans un tampon de lyse cellulaire (4% SDS, 10% 2-mercaptoéthanol, 20% glycérol, 0,125 M Tris-HCl à pH 6,8) complété par 1% de cocktail d'inhibiteurs de protéase (PIC) (#7012, Cell Signaling, France). Ensuite, les lysats cellulaires sont soumis à une sonication en trois phases (2 secondes par phase, à 50% d'amplitude sur un sonicator Vibra-Cell, chaque phase étant séparée par un refroidissement d'une minute sur glace). Ensuite, les lysats cellulaires sont clarifiés par une centrifugation à 18 000×g. Après cette étape, les protéines sont quantifiées selon la méthode de Bradford. 30 µg de protéines solubilisées sont utilisées pour la séparation de ces dernières par SDS-PAGE et immuno-déTECTées à l'aide d'anticorps spécifiques ; Sortiline (#Ab16640, dilution 1 :1000, Abcam, France), Lamine B1 (#Ab16048, dilution 1:1000, Abcam, France) et actine (#A2066, dilution 1:10000, Sigma, France). Les anticorps primaires sont ensuite immuno-révélés à l'aide d'anticorps secondaires (Dako, Agilent, France ; dilution 1:1000) conjugués à la peroxydase de raifort (HRP). Les membranes sont révélées avec l'imageur Azure (Azure, Biosystems, USA) en utilisant le substrat HRP de chimiluminescence (MERCK, Allemagne).

5. Purification nucléaire

Pour séparer les protéines nucléaires et cytoplasmiques, le kit d'extraction des protéines nucléaires d'Abcam (#ab113474, Abcam) a été utilisé selon les instructions du fabricant. En résumé, après avoir récolté les cellules avec de la trypsine/EDTA et les avoir lavées deux fois avec du PBS 1x froid, 1×10^6 cellules sont transférées dans un tube avant d'être centrifugées à 500 g pendant 5 minutes. Les cellules ont ensuite solubilisé dans 100 µL de tampon de pré-extraction 1X contenant respectivement 0,1% de DTT et de PIC, vortexées vigoureusement pendant 10 s, et incubées sur glace pendant 10 min. Les lysats cellulaires ont ensuite été centrifugés pendant 1 min à 12 000 g. Les surnageants correspondant aux protéines

cytoplasmiques ont été délicatement transférés et les culots insolubles contenant des noyaux ont été lavés trois fois avec du PBS 1x froid pour limiter une contamination cytoplasmique. Ensuite, les culots sont lysés avec 10 µL de tampon d'extraction contenant respectivement 0,1% de DTT et de PIC. Les lysats nucléaires ont été incubés sur glace pendant 15 minutes puis vortexés 5 s toutes les 3 min avant d'être soniqués pendant 3 x 10 s. Cette étape permet d'augmenter le rendement d'extraction des protéines nucléaires avant d'être centrifugées pendant 10 minutes à 14 000 g à 4°C. Les lysats nucléaires sont transférés dans un nouveau tube. Les protéines nucléaires et cytoplasmiques sont quantifiées et déposées sur un gel SDS-PAGE comme décrit précédemment.

6. Immunofluorescence / Immunomarquage (IF)

Les cellules sont ensemencées sur des lames de verre de 14 mm de diamètre. A 50% de confluence, ces dernières sont lavées avec du PBS 1x froid (Gibco). La fixation est effectuée avec du méthanol froid pendant 20 minutes. Après fixation, les cellules sont lavées avec une solution tampon contenant 1% de PBS et 1% d'albumine de sérum bovin (BSA) (IDbio). Une étape de blocage de 30 minutes est réalisée avec une solution de blocage contenant 3% de BSA diluée dans du PBS. Un anticorps anti-sortiline (Abcam, #ab16640, France, dilution : 1/100), est ajouté à la solution de blocage, puis les cellules sont incubées pendant une nuit à 4°C. Le lendemain, les cellules sont soigneusement rincées avec du PBS 1x contenant 1% de BSA. Des anticorps secondaires conjugués à l'Alexa Fluor 488 (Life Technologies, France, dilution : 1/1000) sont ensuite incubés pendant 2 heures à température ambiante dans la même solution de blocage. Après trois lavages supplémentaires avec du PBS 1x contenant 1% de BSA, les cellules sont montées avec du milieu de montage Fluor-shield (Sigma) contenant du 4',6-diamidino-2-phénylindole (DAPI). L'imagerie par microscopie confocale a été réalisée à l'aide d'un microscope confocale à balayage laser avancés (Zeiss LSM800), et l'analyse des images est effectuée avec le logiciel ImageJ (NIH, USA).

7. Identification des interactions protéine-protéine / Essais d'immunoprécipitation (IP)

Pour étudier les interactions protéine-protéine, nous avons utilisé la technologie par biotinylation de proximité via des peptides AviTag en conjonction avec le système enzymatique BirA (Fairhead and Howarth, 2015; Liu *et al.*, 2017). Nous avons conçu des plasmides codant pour une protéine de fusion, intégrant la sortiline et le peptide AviTag en position N-terminale. En tant que contrôle, un vecteur vide contenant uniquement le peptide AviTag a été utilisé. Les

constructions *SORT1*-AviTag ou EV-AviTag ont été respectivement transfectées avec le vecteur BirA dans la lignée cellulaire HEK 293T CRISPR *SORT1*, clone #3. La biotine (#Y0001978, MERCK, France) a été ajoutée simultanément à la transfection à une concentration de 40µM. Après un intervalle de 24 heures suivant la transfection, nous avons isolé les protéines cytoplasmiques et nucléaires par fractionnement cellulaire comme décrit ci-dessus. Les protéines extraites ont ensuite été incubées pendant deux heures à une température de 4°C, sous agitation continue, en présence de billes magnétiques recouvertes de Streptavidine (Dynabeads™ M-280 Streptavidine, Invitrogen, France). Après quatre à cinq cycles de lavage avec du PBS 1x froid, nous avons élué les protéines à l'aide du tampon Laemmli 4X contenant 10% de β-mercaptoéthanol et avons procédé à une dénaturation à 95°C pendant 5 minutes. La détection de la présence de sortiline biotinyllée a été réalisée à l'aide d'un anticorps spécifiquement dirigé contre la sortiline (#Ab16640, Abcam, France) et d'une Streptavidine-HRP (#DY998, R&D Systems, USA). La purification ultérieure des protéines, ainsi que leur analyse par spectrométrie de masse et l'analyse bio-informatique qui s'ensuit, ont été rigoureusement menées à l'Institut de génétique et de biologie moléculaire et cellulaire (IGBMC, Strasbourg, France).

8. Transcription inverse et PCR en temps réel

L'extraction de l'ARN total a été réalisée avec le kit Qiagen RNeasy, en suivant le protocole du fabricant. La synthèse de l'ADNc a été réalisée avec le High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (#4368813, Applied Biosystems, USA). Pour l'analyse PCR quantitative, chaque réaction qPCR contenait 100ng d'ADNc, des sondes TaqMan pour ACTB (Hs01060665_g1), *SORT1* (Hs00361760_m1), *EGFR* (Hs01076090_m1), *AKT* (Hs00178289_m1), *MTOR* (Hs00234508_m1), *SOX2* (Hs0423836_s1) et *UBC* (Hs0082473_m1), provenaient d'Applied Biosystems (France) et du kit SensiFAST Probe Hi-ROX (#BIO-82020, Meridian Bioscience, France). L'étape d'amplification a été réalisée à l'aide du système PCR en temps réel QuantStudio5 de ThermoFisher Scientific.

9. Test de clonogénicité

Les sphéroïdes ont été générés à l'aide de plaques 96 puits Nunc Sphera 96U Low-binding (#174925, Thermo Fisher Scientific, USA). Les cellules sont maintenues dans le milieu DMEM GlutaMAX de Dulbecco. Pour la densité cellulaire, 100 cellules ont été ensemencées par puits dans 200 µl de milieu DMEM GlutaMAX. Après l'ensemencement, 100 nM de doxycycline ont

été ajoutés dans les puits, conformément aux exigences expérimentales. Les plaques ont été incubées à 37°C et 5% de CO₂. La formation des sphéroïdes a été suivie de 24 heures à 15 jours après l'ensemencement. Les dimensions des sphéroïdes ont été déterminées par microscopie à un grossissement de 5X (LEICA DMI8), et l'analyse des images a été réalisée avec le logiciel ImageJ (NIH, USA). Le diamètre maximal (h) et minimal (s) de chaque sphéroïde a été mesuré ainsi que le volume des sphéroïdes (V) à l'aide de la formule de l'ellipsoïde modifié : $V = h \times s^2 \times \pi/6$, à partir d'une approche dérivée de la méthode décrite par D. Braunholz et al. (2016) (Braunholz *et al.*, 2016a).

10. Création de cellules Tet-On SORT1

Les lignées cellulaires NCI-H1975 et NCI-H3255 surexprimant la sortiline inductible ont été générées par transduction d'un ensemble de lentivirus médiés par l'expression de *SORT1*. Brièvement, 5×10^4 cellules ont étéensemencées dans une plaque 12 puits dans un milieu complet contenant 8 µg/mL de polybrène (Sigma Aldrich, France) avant d'être infectées par un premier lentivirus contenant la construction de rtTA codant pour le système Tet-On avec une multiplicité d'infection de 5 (MOI). Les cellules sont ensuite soumises à une sélection initiale avec de la blasticidine (10 µg/mL, Sigma Aldrich, France) pendant 1 semaine. Ensuite, les clones sont exposés à une seconde transduction avec des particules lentivirales codant pour un promoteur dépendant de la tétracycline en amont du gène de la sortiline. Les clones ont ensuite été sélectionnés avec la combinaison de puromycine (1 µg/mL, Sigma Aldrich, France) et de blasticidine (Sigma Aldrich, France).

11. Test de prolifération

Dans cette étude, la prolifération cellulaire a été étudiée à l'aide du test de prolifération IncuCyte® Cell Count (Sartorius). Les cellules non transfectées ont étéensemencées à une densité de 1×10^3 cellules par puits dans une plaque 96 puits, tandis que pour la transfection, les cellules sontensemencées à une densité plus élevée de 5×10^3 cellules par puits. Le système IncuCyte® a permis de réaliser une imagerie time-lapse à intervalles réguliers d'une heure sur une période de 72 heures, en utilisant un grossissement de 10X. Les images acquises sont ensuite soumises à une analyse méticuleuse à l'aide du logiciel IncuCyte®, permettant une évaluation complète de la dynamique de prolifération cellulaire. Les paramètres d'analyse comprenaient à la fois l'analyse de confluence et l'analyse cellule par cellule, garantissant une quantification précise de la croissance cellulaire au fil du temps. Pour calculer le taux de

prolifération, nous normalisons les données par rapport aux cellules des conditions contrôles : 100 % de la prolifération.

12. Test de cytotoxicité

Nous avons utilisé le test de cytotoxicité IncuCyte (Sartorius) conçu pour les lignées cellulaires adhérentes. Les cellules non transfectées ont étéensemencées à une densité de 5×10^3 cellules par puits dans une plaque 96 puits, suivie d'une période d'incubation de 24 heures pour permettre l'adhésion et la croissance des cellules avant la transfection. 24 heures après la transfection, le milieu de culture a été remplacé par 100 μ l de milieu frais contenant le réactif IncuCyte Cytotox Green (#4633, Sartorius) à une concentration finale de 250 nM. Grâce à la capacité d'imagerie en temps réel du système IncuCyte, des images de cellules ont été capturées à intervalles réguliers pendant 72 heures, à un grossissement de 10X. Les images acquises ont été soumises à l'analyse à l'aide du logiciel IncuCyte, où la quantification de la fluorescence a été utilisée comme indicateur pour estimer le taux de mort cellulaire par mm^2 . Ensuite, la toxicité cellulaire a été évaluée après normalisation avec des cellules de contrôle.

13. Analyse statistique

Les données ont été analysées à l'aide du logiciel Graph Pad Prism (v.9) (Dotmatics, US) ou R-Studio (R version 4.3.1 (2023-06-16)). Pour les comparaisons entre deux groupes, le test *t* de Student a été effectué, tandis que l'ANOVA à une ou deux voies a été réalisée pour les comparaisons entre au moins trois groupes. Les données sont exprimées en moyennes \pm écart-type (ET) ou erreur-type de la moyenne (ETM) comme indiqué, et les différences ont été considérées comme statistiquement significatives à $p < 0,05$ (* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$). Chaque expérience a été réalisée au moins trois fois de manière indépendante afin de garantir la reproductibilité des résultats.

Résultats

Malgré les avancées réalisées dans la lutte contre le cancer du poumon, ce dernier demeure la première cause de mortalité liée au cancer dans le monde. Ces cancers résistent aux diverses stratégies thérapeutiques. Toutefois, la dernière décennie a été marquée par l'émergence de modalités thérapeutiques novatrices qui ont favorisé de nouvelles avancées en matière de prises en charge des patients. En particulier, les thérapies ciblées qui font appel notamment aux inhibiteurs spécifiques des protéines à activité tyrosine kinase et qui sont considérés comme des piliers incontournables dans cet arsenal thérapeutique. Cependant, les bénéfices cliniques sont entravés par le développement de mécanismes de résistance. De ce fait, un pronostic défavorable persiste avec une survie relative à 5 ans qui demeure réduite indépendamment du stade de la maladie.

Nos travaux antérieurs ont ouvert une piste importante dans ce domaine, soulignant le rôle crucial de la sortiline, une protéine à domaine VPS10, en tant que potentiel suppresseur de tumeur (Al-Akhrass *et al.*, 2017a). Ayant identifié cette protéine comme une clef possible à l'énigme oncologique, nous avons exploré de manière plus approfondie ses mécanismes d'action et ses implications dans le domaine de la recherche sur le cancer. Les travaux de l'équipe ont montré que la sortiline, dans son interaction avec l'EGFR, favorise son internalisation, inhibant ainsi sa signalisation proliférative à partir de la membrane plasmique. De plus, des expériences de ChIPSeq ont révélé une interaction de la sortiline avec la chromatine. Ces résultats suggèrent une compétition entre la sortiline et l'EGFR sur les sites d'initiation de la transcription (TSS) des gènes cibles associés à la réponse transcriptionnelle de l'EGF, comme *cMYC* et *CCND1*. Nos données suggèrent que la sortiline inhibe le recrutement de l'ARN polymérase II, un acteur central de la machinerie transcriptionnelle des gènes (Lapeyronnie *et al.*, 2021).

Ces résultats soulignent le potentiel de la sortiline à agir en tant que régulateur de l'expression génique en établissant un profil moléculaire préliminaire basé sur l'expression de gènes cibles régulés par la sortiline nucléaire. Cependant, afin de confirmer ces découvertes, il est impératif de déterminer si les variations d'expression de la sortiline au niveau tumoral sont corrélées au profil moléculaire établi, et au pronostic des patients.

Dans cette étude, nous avons exploré l'impact de la surexpression de la sortiline sur l'expression génique. Dans un premier temps, nous avons modifié génétiquement des lignées cellulaires d'adénocarcinome bronchique, notamment les NCI-H1975 et NCI-H3255, qui

présentent respectivement les mutations *EGFR*^{L858R/T790M} et *EGFR*^{L858R}, responsables d'une signalisation proliférative soutenue. Cette surexpression de la sortiline entraîne une réduction significative de deux caractéristiques fondamentales du cancer : la prolifération cellulaire et la tumorigénèse.

Afin d'approfondir le rôle central de la sortiline dans les caractéristiques cancéreuses observées précédemment, nous avons utilisé la technologie d'édition du génome CRISPR/Cas9 pour supprimer son expression dans des lignées de HEK293T. De manière surprenante, la suppression de l'expression de *SORT1* dans les trois clones de CRISPR/Cas9 favorise la prolifération cellulaire, tandis que la restauration de *SORT1* abroge ce processus. De plus, nous avons cherché à créer un modèle mimant les cellules LUAD présentant des mutations de l'*EGFR*. Nous avons alors arbitrairement restauré l'expression de la sortiline dans ce modèle en présence soit de l'*EGFR* de type sauvage, soit de diverses mutations de l'*EGFR*, notamment L858R, G719X, L861Q, ou la double mutation L858R/T790M. Nos résultats révèlent que dans le contexte des cellules génétiquement appauvries en sortiline (*SORT1*) nous observons une augmentation significative du taux de prolifération cellulaire dans les cellules porteuses de mutations de l'*EGFR* (L858R, G719X, L861Q, ou L858R/T790M) par rapport aux cellules contrôles. De manière frappante, lorsque nous avons restauré la sortiline, une diminution significative de la prolifération a été observée. Ces résultats suggèrent que la sortiline a surmonté la dominance des mutants de l'*EGFR* et soulignent le rôle essentiel de la sortiline dans régulation de la prolifération cellulaire, indépendamment du statut de l'*EGFR*.

Une analyse RNAseq a ensuite révélé un impact significatif de l'expression de la sortiline sur la régulation transcriptionnelle des gènes. Il apparaît que la sortiline est susceptible d'influencer l'expression d'un vaste éventail de gènes, principalement impliqués dans la régulation des voies oncogéniques, l'organisation de la chromatine, et les mécanismes de réparation de l'ADN. Ces observations mettent en lumière une nouvelle facette des fonctions nucléaires complexes de la sortiline.

De plus, grâce à des analyses par spectrométrie de masse de l'interactome de la sortiline, de nouveaux partenaires nucléaires ont été identifiés. Ces partenaires sont impliqués dans le transport de la sortiline vers le noyau, ainsi que dans la régulation des mécanismes de réparation de l'ADN et le transfert des ARNs entre le noyau et le cytoplasme.

Nuclear sortilin controls genes involved in oncogenic pathways in lung adenocarcinoma

May Yassine¹, Léa Ikhlef¹, Boutaina Chandouri-Faize¹, Heloise Daverat¹, Luc Negroni³, Paul-François Gallet¹, Fabrice Lalloué^{1,2,§} & Thomas Naves^{1,2,§,*}

¹UMR INSERM 1308 CAPTuR, Faculty of Medicine, University of Limoges, 2 street of Dr. Raymond Marcland, 87025 Limoges CEDEX-France

²Chair of Experimental Pneumology, Faculty of Medicine, University of Limoges, 2 street of Dr. Raymond Marcland, 87025 Limoges CEDEX-France

³IGBMC-Proteomic platform, 1 street of Laurent Fries, BP 10142, 67404 Illkirch CEDEX-France

*Corresponding authors

§These authors contributed equally to this work

Please address correspondence to:

Thomas Naves

Chair of Experimental Pneumology

UMR INSERM 1308 CAPTuR, Faculty of Medicine, University of Limoges, 2 street of Dr. Raymond Marcland, 87025 Limoges CEDEX-France Faculty of Medicine, 2 street of Docteur Marcland

87025, Limoges CEDEX

FRANCE

Tel : +33 5 55 45 59 70

Fax : +33 5 55 43 59 16

Mail: thomas.naves@unilim.fr

Competing interests

The authors declare no competing financial interests.

Abstract

Sortilin, a glycoprotein belonging to the Vps10 family, is mainly recognized for its contribution to protein sorting. Its dichotomous role in oncology, between tumor promotion and suppression, remains highly controversial. Our present study reveals a novel mechanism relying on the nuclear localization of sortilin, acting on transcription, chromatin reorganization and DNA repair. Its role in limiting tumor progression of lung adenocarcinoma cell lines was confirmed with sustained EGFR proliferative signaling. Furthermore, we report that sortilin overexpression limits the growth of NCI-H1975 and NCI-H3255 cell lines, regulating gene expression but also indirectly altering oncogenic pathways such as *MTOR* and *AKT*. Through its transcriptional action, sortilin interacts directly with proteins central to DNA repair mechanisms and chromatin reorganization. Finally, our findings reshape the traditional view of sortilin, suggesting implications not restricted to its simple protein transport, which contributes to explain its heterogeneous roles in different tumors. These insights also position sortilin as a promising candidate to engineer innovative therapeutics in lung adenocarcinoma.

Keywords: lung cancer, sortilin, nuclear role, transcription mechanism, oncogenic pathways

Sortilin, a 95-kDa transmembrane glycoprotein, belongs to the vacuolar protein sorting 10 (Vps10) family of sorting receptors and orchestrates crucial intracellular functions. As a multifaceted receptor, sortilin takes on pleiotropic roles, acting both as cargo and as a cell surface co-receptor. Its involvement in pathophysiology is widespread, encompassing on a myriad of diseases ranging from neurodegenerative and metabolic disorders to cancer^{1,2,3,4,5}. Notably, the significance of sortilin's role in cancer is a subject of intense debate and controversy. It can act as a promoter of cancer hallmarks or as a tumor suppressor. These disparities may be attributed to various environmental or intrinsic factors, such as cell types, ligands, partners, or unforeseen functions. On this latter point, we identified sortilin as a major player in limiting the proliferative signaling of the epidermal growth factor receptor (EGFR), the archetype of tyrosine kinase receptors in lung adenocarcinoma (LUAD). Recognizing its potential as a tumor suppressor-like factor⁶, we delved into this field of research. We found that sortilin interacts with chromatin and competes with EGFR at the transcription initiation sites (TSS) of target genes linked to the EGF transcriptional response, notably *cMYC* and *CCND1*. Significantly, our data suggests that sortilin impairs the recruitment of RNA polymerase II, a pivotal element of the gene transcriptional machinery⁷.

Nevertheless, several aspects still require further investigation, including the possibility of sortilin using the classical nuclear translocation pathway and its potential interaction with chromatin, independently of EGFR. To deepen the dichotomous role of sortilin in cancer, we developed several cell models to analyze the impact of sortilin expression on transcriptomic regulation. In addition, we carried out an analysis of the sortilin "interactome" at the nuclear level. These results led us to explore the relatively unknown role of sortilin in gene activity.

In this study, we reinforce the role of sortilin as a tumor suppressor in LUAD cell lines harboring EGFR mutations that lead to sustained proliferative signaling. Indeed, overexpression of sortilin resulted in a marked decrease in two central hallmarks of cancer; cell proliferation and tumorigenesis. Strikingly, deletion of the *SORT1* expression by CRISPR/Cas9 editing in the non-malignant HEK293T cell line unlocks cell proliferation, while restoration of *SORT1* disrupts this process. In this *SORT1* deletion genetic background, cell proliferation under dominance of EGFR mutations phenocopy that observed in LUAD cell lines.

In addition, by performing high throughput experiment, RNA sequencing and mass spectrometry analyses, we unveil new partners of sortilin, which correlate with its nuclear

localization and its influence on the regulation of oncogenic pathways. These putative mechanisms are based on the ability of sortilin to influence the expression of a wide panel of genes, either directly by regulating transcription, or indirectly by controlling chromatin organization and DNA repair.

Our results introduce an additional dimension to its various complex intracellular functions and pave the way for future in-depth research.

Materials and Methods

Transfection

For transient transfection, cells were transfected using JetPei transfection reagent (Polyplus transfection, Ozyme, France) according to the manufacturer's instructions. For plasmids see supplementary Materials & Methods.

HEK293T CRISPR Knockout cell line

To create *SORT1*-KO cell clones, transfection using JetPEI and CRISPR plasmids were used and performed as described above. After 72 h, western blot analysis was used to screen and select best-performing SgRNAs. Once selected (SgRNA#1 and #3), transfection with plasmids were repeated before to sort cells using FACS-Aria (BD Biosciences, France), based on Dasher-GFP fluorescence (one cell per well) in 96 wells plate to obtain isogenic clones. Sorted cells were maintained until they reached a sufficient quantity to screen for sortilin expression before cryopreserving *SORT1*-KO clones in FBS (Fetal Bovine Serum) with 10% DMSO.

Creation of Tet-On *SORT1* cells

NCI-H1975 and NCI-H3255 cell lines overexpressing inducible sortilin were generated by transducing a set of lentivirus-mediated *SORT1* expression. $5 \cdot 10^4$ cells were seeded in a 12-well plate in complete medium containing 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ polybrene (Sigma Aldrich, France) and then infected with a first lentivirus containing a concentrated rtTA plasmid encoding the Tet-On system with a multiplicity of infection of 5. The cells were then submitted to blasticidin pressure (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, Sigma Aldrich, France) for 1 week. Then, clones were exposed to a second transduction with lentiviral particles encoding for a tetracycline-dependent promoter upstream of the sortilin gene. Clones were then selected with the combination of puromycin (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, Sigma Aldrich, France) and blasticidin (Sigma Aldrich, France).

RNA-sequencing

RNA samples were sequenced by Novogene (Cambridge, UK) using Illumina's Sequencing by Synthesis (SBS) technology on the Illumina platform. The sequencing process, from library construction to data analysis, was carried out according to Novogene's established methods.

Proliferation test

Cell proliferation was investigated using the highly advanced IncuCyte® Cell Count proliferation assay (Sartorius) in this study. Untransfected cells were seeded at a density of 1.10^3 cells per well in a 96-well plate, while for transfection, cells were seeded at a higher density of 5.10^3 cells per well. The IncuCyte® system allowed for time-lapse imaging at regular 2-hour intervals over a 72-hour period, employing a 10X magnification to capture detailed cellular dynamics. The acquired images were then subjected to analysis using the IncuCyte® software, facilitating a comprehensive assessment of cell proliferation dynamics. The analysis parameters included both confluence analysis and cell-by-cell analysis, ensuring precise quantification of cell growth over time. To calculate proliferation rate, we normalize data in comparison to control cells as 100% of proliferation.

Cytotoxic assay

We used the IncuCyte cytotoxicity assay designed for adherent cell lines. Untransfected cells were seeded at a density of 5.10^3 cells per well, followed by a 24-hour incubation. At 24 hours post-transfection, the culture medium was replaced with fresh medium containing IncuCyte Cytotox Green reagent (#4633, Sartorius). Using the imaging capability of the IncuCyte system, cell images were captured at regular 2-hour intervals over 72 hours, at 10X magnification. Acquired images were subjected to the analysis using IncuCyte software, where fluorescence quantification was used as an indicator to estimate cell death rate per mm^2 . Then, cell toxicity was assessed after normalization with control cells.

Statistical analysis

Data were analyzed using GraphPad Prism software (v.9) (Dotmatics, US) or R-Studio (R version 4.3.1 (2023-06-16)). For comparisons of two groups, Student's t-test was performed, while one-way or two-way ANOVA for comparisons of at least two groups. Data are expressed as means \pm standard deviation (SD) or standard error of mean (SEM) as stated, and differences were considered statistically significant at $p < 0.05$ (* $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$). Each experiment was performed at least three times independently to ensure the reproducibility of the results.

Results

Unlocking the tumor suppressor-like function of *SORT1* expression: Inhibiting cell proliferation and tumor progression

In light of our previous studies, where we observed in LUAD cell lines a significant down-regulation of the *SORT1* gene, encoding sortilin, we employed a Tet-On induction system to enable the reversible control of *SORT1* expression. This strategy allowed us to further compare how the loss of sortilin expression unlocks oncogenic pathways in LUAD. For these experiments, we used the NCI-H3255 and NCI-H1975 LUAD cell lines, which exhibit sustained-EGFR proliferative signaling due to acquired mutations (L858R and L858R/T790M, respectively). As shown with western blot (**Figures 1a to 1c**) and qPCR analysis (**Figures 1d to 1e**), sortilin expression remained weak in the control group (Tet-EV) while, induction with doxycycline (*dox*) resulted in a progressive and significant ($p < 0.001$) increase in sortilin expression. Because the extent of sortilin induction depends on the *dox* concentration (ranging from 0 to 100 nM, indicated by gray to black bars in the histogram), and that control (Tet-EV) did not exhibit sortilin expression despite *dox* induction, these results underscore the robustness of our cell models to control sortilin expression. Then, to investigate the phenotypic and functional effects of restoring sortilin expression, we employed a *dox* concentration of 100nM for subsequent analyses. Subsequently, we assessed two critical cancer hallmarks, cell proliferation and tumorigenesis, in the presence or absence of sortilin. In both Tet-*SORT1* models using the NCI-H1975 and NCI-H3255 cell lines, we observed a significant ($p < 0.001$) reduction of approximately 20-25% in cell proliferation upon *SORT1* induction compared to control Tet-EV cells (blue bars vs black and white bars, **Figures 2a and 2b**). To rule out cytotoxic effects triggered by *dox* exposure or sortilin expression, we performed viability tests. No significant effects attributable to the administration of *dox* itself or the induced-expression of sortilin were observed on cell viability. Altogether, we assert that the decrease of cell proliferation rates remains independent of cell toxicity (blue bars vs black and white bars, **Figures. 2c and 2d**) but governed by sortilin expression induction. Remarkably, beyond its impact on cell proliferation, *SORT1* induction also had a negative effect on tumorigenesis, as evidenced by monitoring spheroid growth (**Figures 2e and 2f**). When we triggered sortilin expression in Tet-*SORT1* spheroids derived from NCI-H1975 and NCI-H3255 cell lines, a significant reduction in tumor growth and progression was observed between days 5 and 10

compared to control Tet-EV cells ($p < 0.001$ at day 5 and 10 for NCI-H1975; $p = 0.06$ at day 5 and $p < 0.001$ at day 10 for NCI-H3255). In contrast, Tet-EV cell-derived spheroids showed no significant change in tumor progression (full line). Therefore, the reduction in spheroid volume in the Tet-On system can be attributed to sortilin expression (Figures 2e to 2h).

In summary, these findings establish that when sortilin remains expressed both cell proliferation and tumorigenesis are significantly limited in LUAD cell lines.

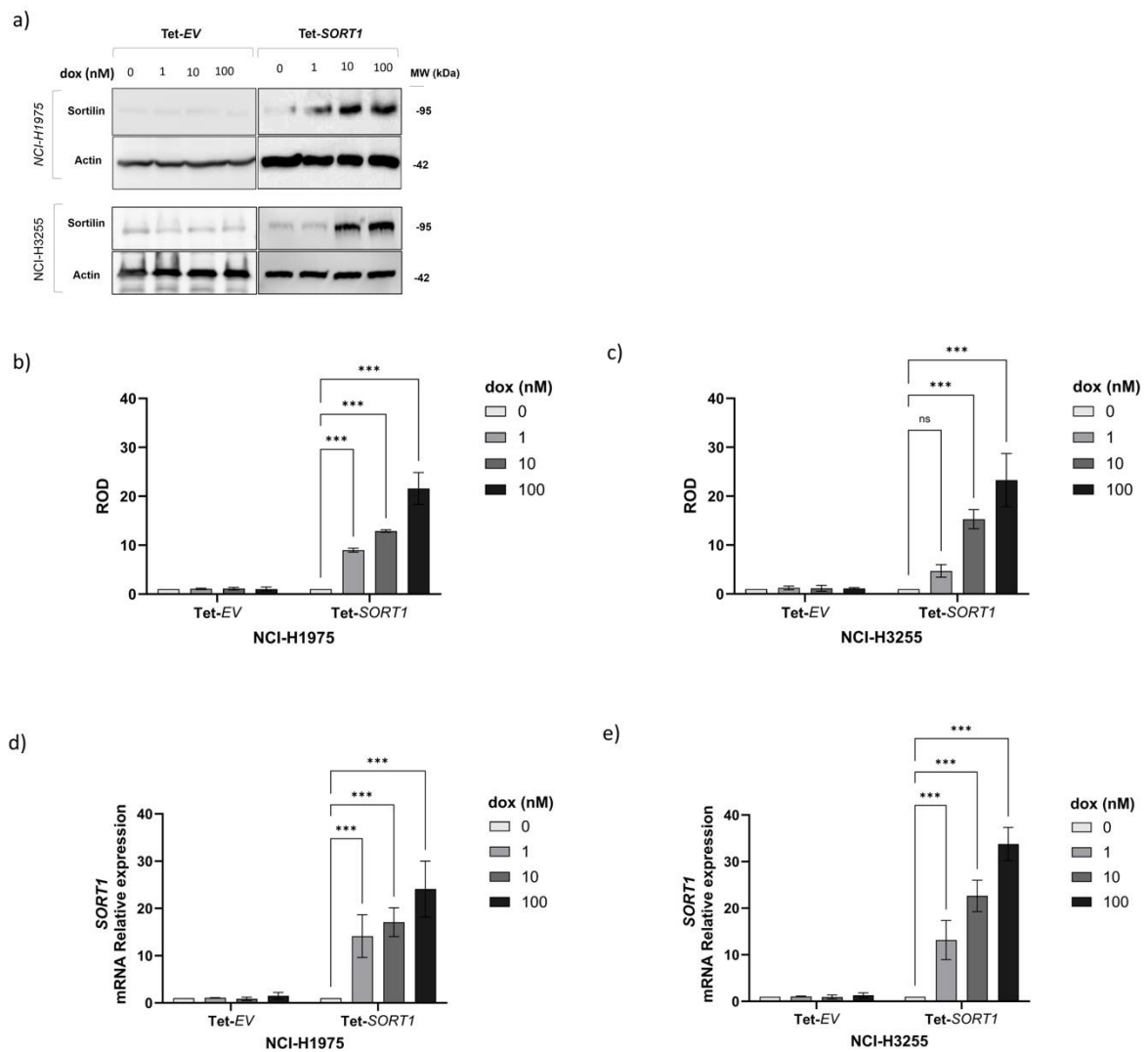


Figure 1. Creation and validation of Tet-On models on adenocarcinoma cell lines NCI-H1975 and NCI-H3255.

a. Western blot illustrating sortilin induction in Tet-SORT1 cell lines versus empty vector (EV) control cells (Tet-EV), following treatment with increasing concentrations of doxycycline (dox), ranging from 0 to 100nM. **b.c.** Relative optical density (ROD) obtained after normalization of the expression of sortilin to actin expression for NCI-H1975 and NCI-H3255

lines. *d.e. mRNA Relative expression of SORT1, normalized to ACTB mRNA Relative expression. Error bars represent standard deviation (SD) based on three biological replicates. Comparisons between samples were analyzed using a one-way ANOVA test. Differences are considered significant at $p \leq 0.05$. (* $p \leq 0.05$, ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.001$).*

The loss of sortilin increases cell proliferation in HEK KO *SORT1* models

To deepen the pivotal role of sortilin in the previous observed cancer hallmarks, we employed CRISPR/Cas9 genome-editing technology to shut down its expression. We selected the HEK293T transformed cell line as our experimental model due to its capacity for precise genetic modifications. This cell model provides an ideal platform for in-depth research into the molecular mechanisms underlying tumor development.

We achieved *SORT1* depletion through CRISPR/Cas9, followed by the selection of clonal populations from individual cells. This approach allowed us to isolate three *SORT1* knockout (KO) clones (*CRISPR SORT1 clones*; #1, #2 and #3), as demonstrated through western blot and immunofluorescence analyses (rectangle with dotted line, **Figures 3a to 3c**). Strikingly, the depletion of sortilin led to a significant increase ($p < 0.001$) in cell proliferation across all three *SORT1* KO clones (**Figure 3d**, dark blue bars) when compared to the parental cells (light blue bars, **Figure 3d**). Inversely, when we transiently restore sortilin expression (pcDNA-*SORT1*) (**Figure 3e and 3f**), we observe a significant ($p < 0.001$) and overall decrease in cell proliferation in all three CRISPR *SORT1* clones. In parental cells (P1), where we performed no gene manipulation, these cells exhibit a similar decrease of cell proliferation.

In summary, our results highly suggest that loss of *SORT1* induces significant phenotypic changes in HEK293T cells, by triggering cell proliferation. These results highlight the substantial impact of *SORT1* on cell behavior and its potential relevance in limiting proliferative signaling beyond oncogene-related pathways in LUAD.

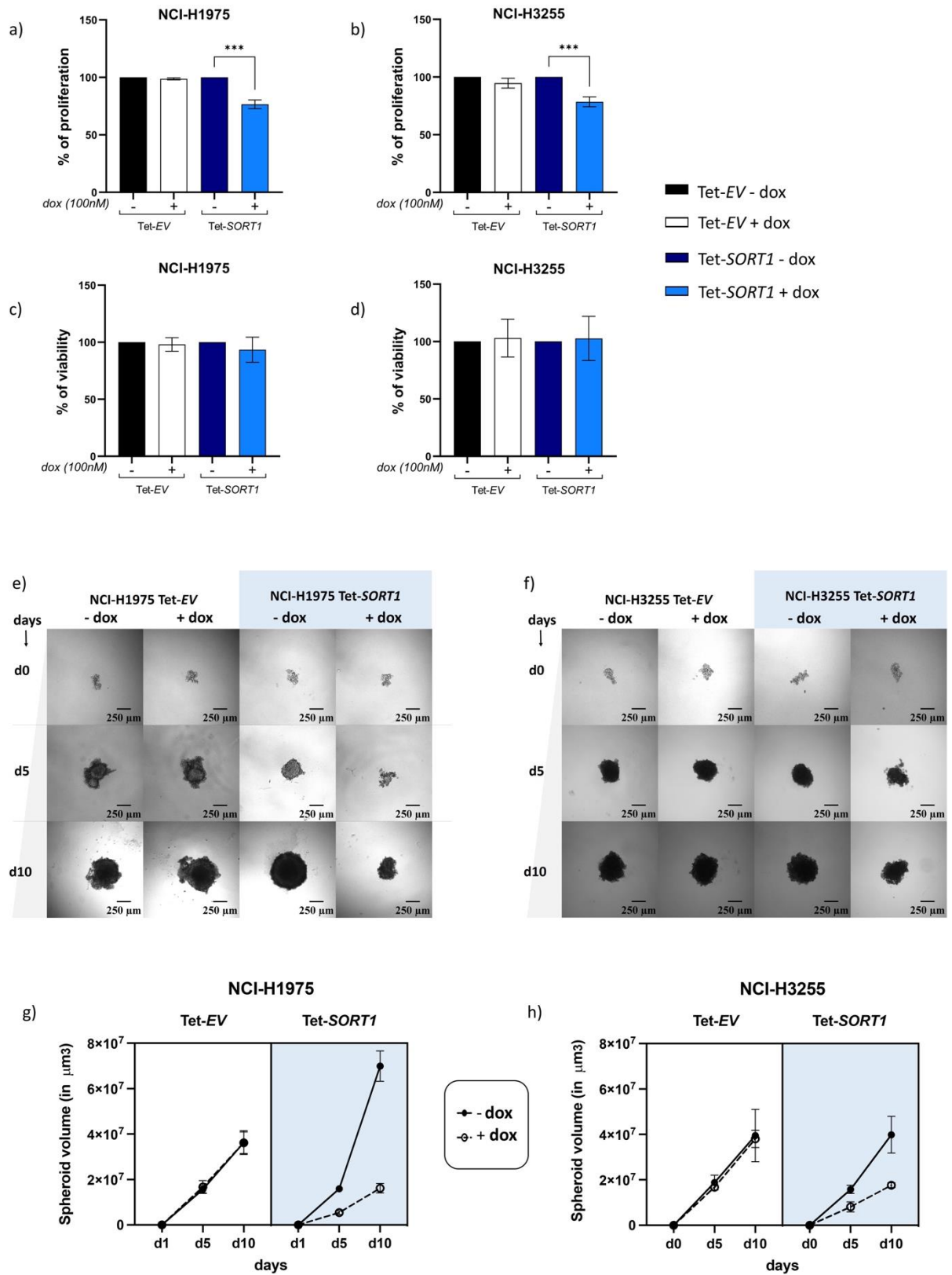


Figure 2: Assessment of the impact of sortilin overexpression on cell proliferation and tumor progression.

a.b. Percentage of proliferation of NCI-H1975 and NCI-H3255 Tet-SORT1 and Tet-EV cell lines, treated with 100nM doxycycline (dox) respectively and normalized to untreated cells, assessed using the IncuCyte® system. **c.d.** Percentage of viability of NCI-H1975 and NCI-H3255 Tet-SORT1 and Tet-EV cell lines treated with 100nM doxycycline (dox) respectively and normalized to untreated cells and measured with the IncuCyte Cytotox Green reagent via the IncuCyte® system. **e.f.** Images of spheroids obtained from NCI- H1975 and NCI-H3255 Tet-SORT1 and Tet-Ev cell lines seeded with 100 cells on day 0 and monitored for at least 10 days. **g.h.** Growth curves of spheroids derived from NCI-H1975 and NCI-H3255 Tet-SORT1 and Tet-EV lines. Comparisons between conditions have been analyzed by one-way ANOVA for proliferation and cytotoxicity assay (for viability measurement) and two-way ANOVA for spheroid growth curves. Data are presented as mean \pm standard deviation (SD). Differences with p -values ≤ 0.05 are considered significant. Experiments were conducted in triplicate. (* $p \leq 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

Restoring sortilin expression attenuates EGFR mutant dominance in HEK293T cells

Since HEK293T cells exhibit weak endogenous expression of wild-type *EGFR*, we aimed to create a model mimicking LUAD cells upon the oncogenic driving force of EGFR mutations. Consequently, we arbitrary restored sortilin expression in one of the three *SORT1* KO clones, clone #3 in the presence of either wild-type EGFR or various EGFR mutations; including L858R, G719X, L861Q, or the L858R/T790M double mutation.

Our results unveiled that in the genetic *SORT1*-depleted cells background (dark blue bars) we observe a significant increase ($p < 0.01$) of cell proliferation rate in cells carrying EGFR mutations (L858R, G719X, L861Q, or L858R/T790M) in comparison to control cells (#3 Ctrl - dark blue bars) (**Figure 3g**). Strikingly, when we restored sortilin, a significant decrease ($p < 0.001$) in proliferation was observed (light blue bars, **Figure 3g**). Because cell toxicity induced by successive transfections would comprise results, we performed in parallel viability tests. No critical cell toxicity between cells co-transfected either with empty vector (control, pcDNA-EV), pcDNA-*SORT1* or various EGFR mutations (pBabe-*EGFR*) was observed attesting thereby that the decrease in cell proliferation was not linked to cell death (**Figure 3h**).

These results suggest that sortilin overcame the dominance of EGFR mutants, and further underline the essential role of sortilin as a key regulator of cell proliferation, independent of EGFR status. The knowledge gained from these results reinforces sortilin's role as a tumor suppressor.

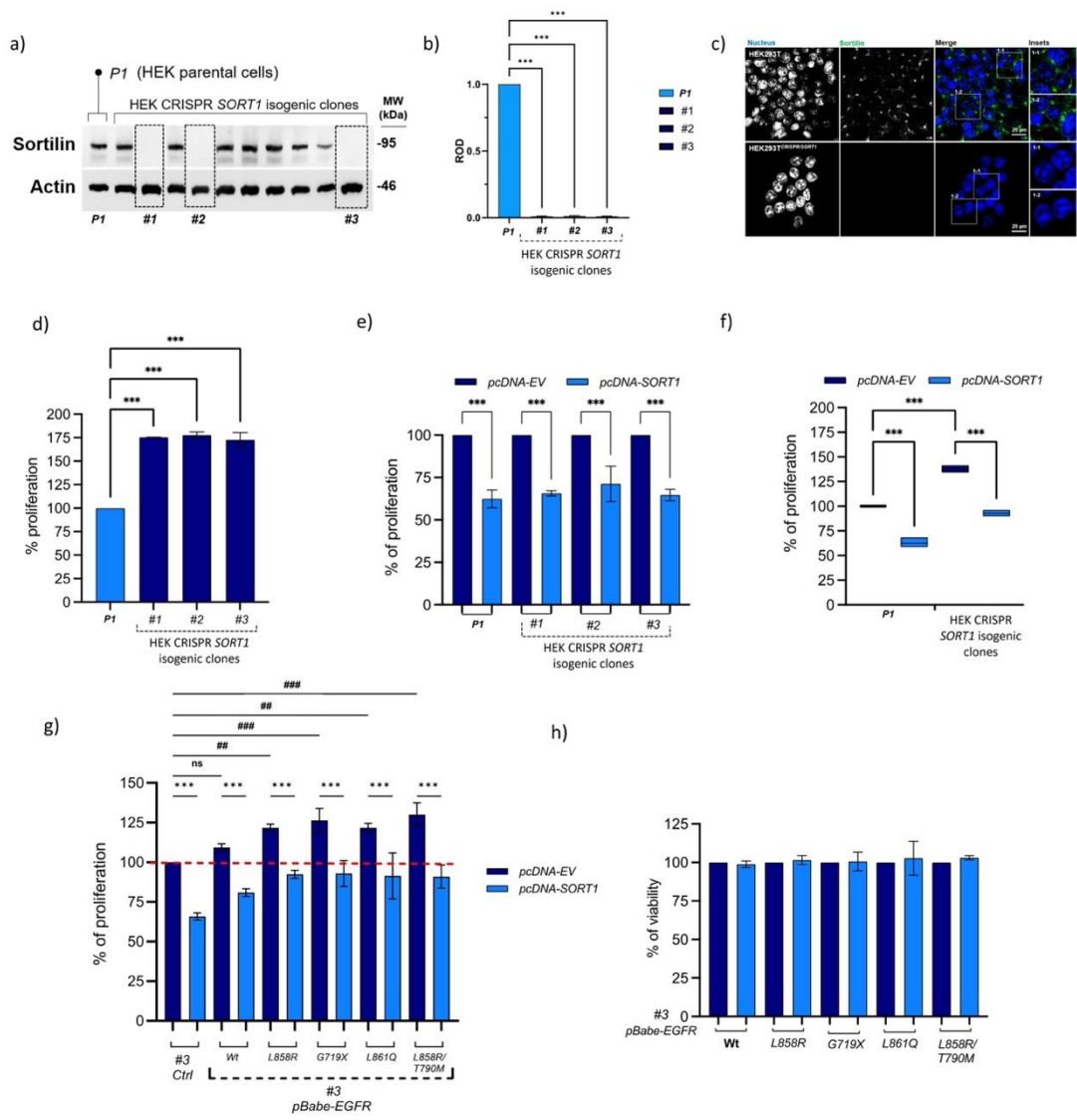


Figure 3: Role of sortilin in regulating cell proliferation independently of EGFR status.

a. Western blotting showing sortilin expression in CRISPR-Cas9-derived isogenic clones and parental HEK293T cells (P1). **b.** Relative optical density (ROD) showing normalized sortilin expression against actin for parental HEK293T (P1) and CRISPR SORT1 isogenic clones. **c.** Immunolabeling of sortilin (in green) observed in parental HEK293T cells (P1) and CRISPR SORT1 clones. Visualized using confocal microscopy. Scale bar represents 20 μ m. **d.** Percentage of proliferation of CRISPR SORT1 clones normalized to parental HEK293T cells (P1). **e.f.** Percentage of proliferation of CRISPR SORT1 clones and parental HEK293T cells (P1) post-transfection with pcDNA-SORT1, normalized against cells transfected with pcDNA-EV. **g.** Percentage of proliferation of clone #3 CRISPR SORT1 post-transfection with pBabe-EGFR variants such as: EGFRWT or EGFR mutants (EGFR^{L858R}, EGFR^{G719X}, EGFR^{L861Q} or EGFR^{L858R/T790M}) in the combined with pcDNA-SORT1 or empty vector (EV) pcDNA-EV normalized against cells treated alone with pcDNA-EV. **h.** Percentage of viability post-IncuCyte Cytotox Green reagent application in CRISPR SORT1 clone #3 after transfection with

pBabe-EGFR variants (EGFRWT or the aforementioned mutants) in combination with pcDNA-SORT1, normalized to pcDNA-EV. Statistical analysis was conducted using one-way ANOVA, with data represented as mean ± standard deviation (SD). A significance threshold was set at $p < 0.05$. Each experimental condition was tested in at least three independent trials. Significance is marked by ($p \leq 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$). The "#" symbol highlights significance between cells co-transfected with both pBabe-EGFR and pcDNA-EV when normalized to solely pcDNA-EV-transfected cells (dark blue bars) (# $p \leq 0.05$, ## $p < 0.01$ and ### $p < 0.001$).*

Sortilin plays a key role in transcriptional regulation of several oncogenic genes

Our previous research revealed the nuclear role of sortilin in the regulation of EGFR nuclear target genes. This first discovery led us to further investigate its potential involvement in genome-wide transcriptional regulation. To support this hypothesis, we investigated the nuclear translocation of sortilin after *dox* induction in the NCI-H1975 and NCI-H3255 cell lines, using cell fractionation and western blotting techniques (red rectangle, **figure 4a**). Surprisingly, our results showed that nuclear translocation of sortilin was directly proportional to its total concentration, whatever the cell line studied.

To further investigate the transcriptional role of sortilin in this doxycycline-induced model, we decided to study the expression profiles of various genes involved in other major oncogenic pathways in LUAD, such as *MTOR*, *AKT*, *SOX2*, and *UBC* in addition to the *EGFR* and *CCND1* previously studied (see **Figures 4b to 4h**). Our observations revealed a significant decrease ($p < 0.001$) of *EGFR*, *MTOR* and *AKT* gene expression upon sortilin overexpression in both cell lines (as shown in **Figures 4c to 4f**). In contrast, *CCND1* and *SOX2* expression was significantly reduced only in the NCI-H1975 cell line (as shown in **figure 4d and 4g**), which could be explained by the higher decrease in *EGFR* mRNA levels in this cell line. Notably, among these genes, *UBC* mRNA is the only one to show a significant increase in expression levels in both cell lines (as shown in **Figure 4h**). Importantly, no significant impact of *dox* on the expression of selected genes was observed in Tet-EV cells.

Overall, these results highlight the distinctive role of sortilin in transcriptional regulation, revealing its diverse influence on key genes involved in cancer-related pathways, a phenomenon not observed in control cells (Tet-EV) with low sortilin expression. These results

also support the hypothesis that sortilin may control cell proliferation and tumor growth upstream of the signaling pathway by directly regulating oncogene expression.

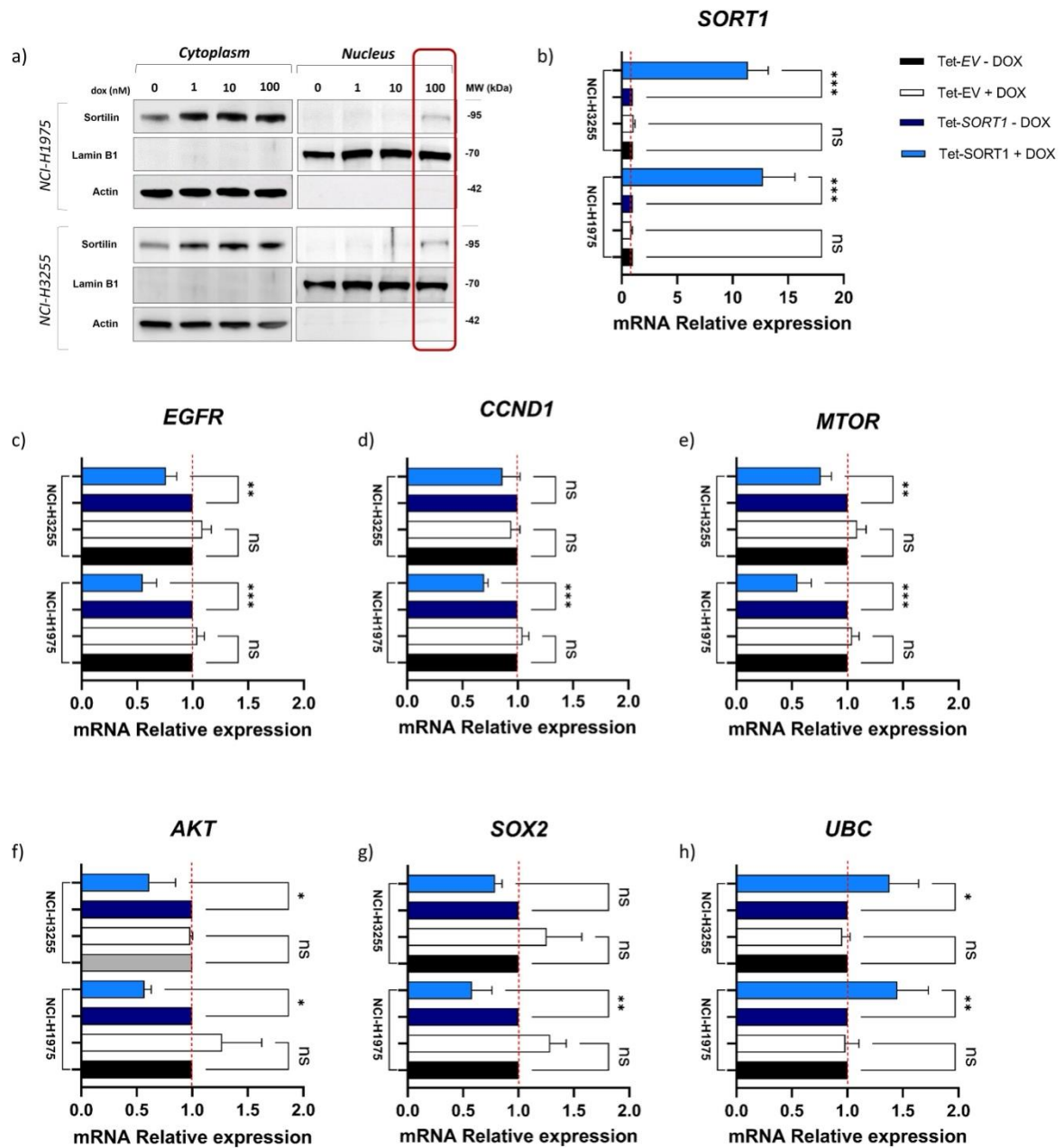


Figure 4: Role of sortilin in transcriptional regulation.

a. Western blotting showing sortilin enrichment in the nucleus after treatment with increasing concentrations of doxycycline (dox), ranging from 0 to 100nM in NCI-H1975 and NCI-H3255 cell lines. **[b- h]** mRNA Relative expression of SORT1, EGFR, CCND1, MTOR, AKT, SOX2 and UBC transcripts respectively normalized to ACTB mRNA Relative expression. The 2^{DDCT} method was employed to evaluate mRNA Relative expression for each gene.

Statistical analysis of the mRNA Relative expression was performed using a one-way ANOVA test. Error bars depict the standard deviation (SD) based on three biological replicates. Significance levels are denoted by ($p \leq 0.05$; ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$);*

Unveiling transcriptional changes in NCI-H1975 and NCI-H3255 upon sortilin overexpression

To further characterize the genes influenced by the restoration of sortilin expression and elucidate its role in modulating their expression, we conducted a comparison study through RNA-seq analysis between Tet-EV and Tet-*SORT1* cell lines derived from both NCI-H1975 and NCI-H3255. Subsequently, we inspected the alterations in gene expression levels induced by *SORT1* restoration in each model. An initial screening was carried out to exclude genes whose differential expression (DEG) could be attributed to the impact of *dox* rather than a leak of sortilin expression in Tet-On models (**Refer to Supplementary Data, Figure 1**).

As anticipated, the restoration of sortilin resulted in significant shifts in the DEG profiles where we observed in NCI-H1975, the repression of 2218 genes and the induction of 1783 genes (**Figure 5a & Supplementary Data, Figure 1a & 1c**). Similarly, in NCI-H3255, 1322 genes were repressed, and 1887 genes were induced upon sortilin overexpression (**Figure 5a & Supplementary Data, Figures 1b & 1d**). We further investigated the genes that were commonly regulated in both cell lines, identifying 318 under-expressed genes (**Figure 5c**) and 312 over-expressed genes (**Figure 5d**).

Interestingly, Reactome enrichment analysis of these gene sets revealed that sortilin-regulated genes were predominantly associated with functions related to cell sorting and retrograde transport, which is consistent with the well-known role of sortilin in these processes. This analysis also revealed that sortilin expression deregulates genes involved in essential signaling pathways, in particular the EGFR pathway (**Figure 5e**), as well as the PI3K/mTOR/AKT pathway involved in processes such as epithelial-mesenchymal transition, proliferation and differentiation (**Figure 5g & supplementary data, Table 1**). These results would correlate with our previous qPCR analyses (**Figure 4**).

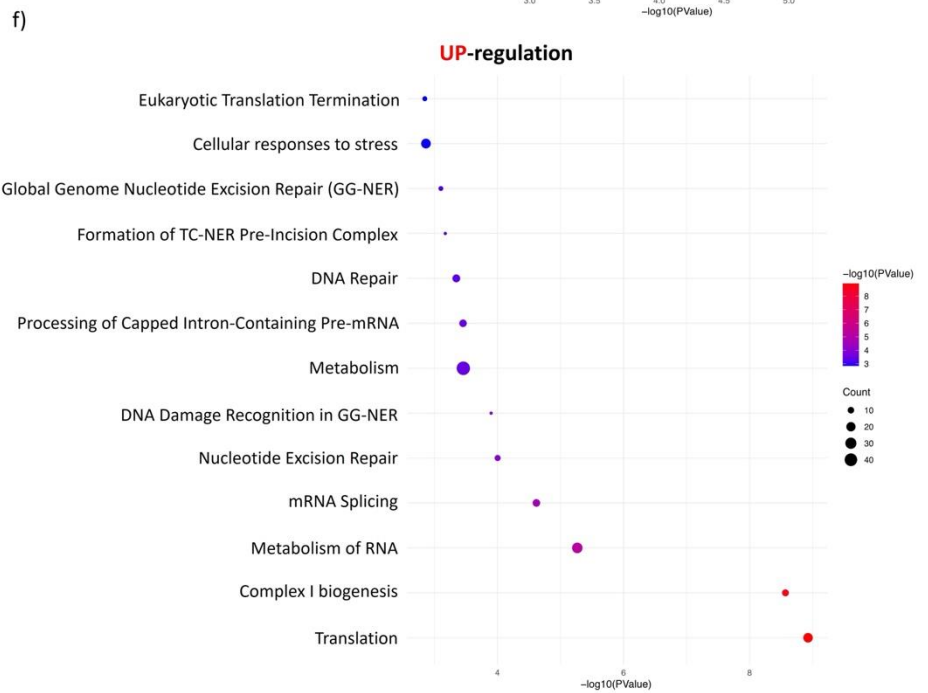
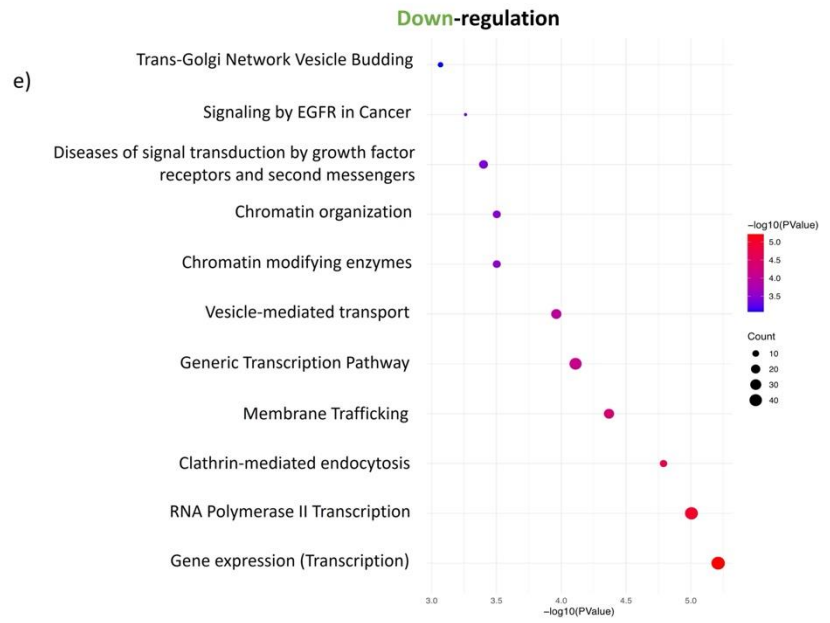
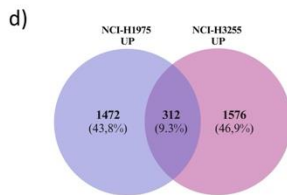
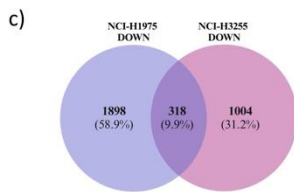
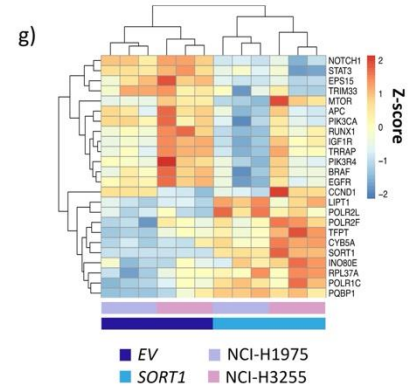
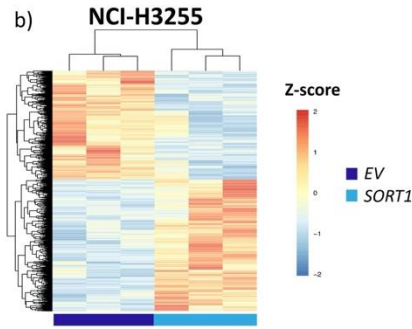
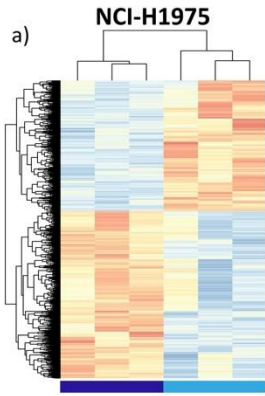


Figure 5: Transcriptomic analysis of modified adenocarcinoma cell lines following SORT1 induction

a. Heatmap showing 4,001 differentially expressed genes in the NCI-H1975 cell line follows sortilin expression (Tet-SORT1) compared with its absence (Tet-EV) upon doxycycline (dox) exposure at 100nM ($p \leq 0.05$). **b.** Heatmap showing 3209 differentially expressed genes in the NCI-H3255 cell line follows sortilin expression (Tet-SORT1) compared with its absence (Tet-EV) upon dox (100nM) exposure ($p \leq 0.05$). In both the NCI-H1975 and NCI-H3255 cell lines, the lists of differentially expressed genes (DEGs) were carefully curated. Genes whose differential expression might have been a result of doxycycline (dox) exposure, rather than unintended sortilin expression in the Tet-On system, were systematically excluded from the final lists. For both heatmaps, the Z-score scale ranges from -2 (blue) to 2 (orange). **c.d.** Venn diagrams illustrating genes that are differentially expressed in both the NCI-H1975 and NCI-H3255 Tet-On cell lines upon dox (100nM) exposure ($p \leq 0.05$). The diagrams highlight 318 down-regulated genes and 312 up-regulated genes. **e.f.** Pathway analysis of the genes that are differentially expressed in both cell lines under dox (100nM) exposure. The analysis is segmented into (e) down-regulated gene pathways, where $-\text{Log}_{10}$ (p value) spans from 3.5 (blue) to 5 (red), and (f) up-regulated gene pathways, where $-\text{Log}_{10}$ (p value) spans from 3 (blue) to 8 (red). **g.** A heatmap representation of a subset of genes that are differentially expressed across both the NCI-H1975 and NCI-H3255 Tet-On cell lines ($p \leq 0.05$).

Moreover, these observations highlight sortilin's pivotal role in transcriptional regulation. It can either repress genes related to chromatin organization (e.g., *PBRM1* and *ATF7IP*), transcription (e.g., *NCOA2*) (**Figure 5e & supplementary data, Tables 1**), or induce the expression of genes associated with DNA repair and transcription (e.g., *INO80E*, *PQBP1*, *POLR2F*, *POLR2L*, and *POLRIC* encoding specific RNA polymerases) (**Figure 5f & supplementary data, Tables 2**).

To deepen its putative nuclear mode of action and nuclear partners, we analyzed sortilin's interactome in the nuclear compartment.

Elucidation of the sortilin nuclear interactome: Implications for oncogenic processes

To further investigate the hypothesis concerning the role of nuclear sortilin, identified by RNA seq, we used mass spectrometry (MS) to map the sortilin nuclear interactome. To this end, we used the BirA-Biotin system in CRISPR *SORT1* clone #3 cells avoiding thereby its endogenous expression, as described in the supplemental methods and in the (**figure 6a and 6b**)^{8,9}.

After purification and validation of the presence of biotinylated sortilin by western blot (**Figure 6c**), MS analysis revealed 99 candidate proteins in the SORT1 condition at the nuclear level (**Figure 6d & Supplementary Data, Table 4**). The STRING analysis tool, combined with the gene enrichment study, enabled us to deduce the protein-protein interaction networks and functions of the proteins identified by MS in the presence of sortilin (SORT1 condition). The identification of the retromer complex, associated with the protein-sorting functions of sortilin, is consistent with previous data demonstrating that sortilin is involved in the transport and internalization of proteins, including *EGFR* in LUAD^{10,6}. These results validate our experimental approach. Our analyses also highlight a predominant role for the proteins detected in RNA transport from the nucleus to the cytoplasm, DNA replication, DNA repair and the cell cycle (**Figure 6e and 6f**). These results are consistent with the enrichment pathways identified by RNA-seq analysis in both adenocarcinoma cell lines. Furthermore, the identification of an interaction between sortilin and 10 proteins of the nuclear pore-associated complex suggests that sortilin translocation may depend on the nuclear pore complex to reach the nucleus.

Overall, our observations point to a potential function for sortilin in the nucleus, particularly in DNA repair, gene regulation and by extension, RNA regulation.

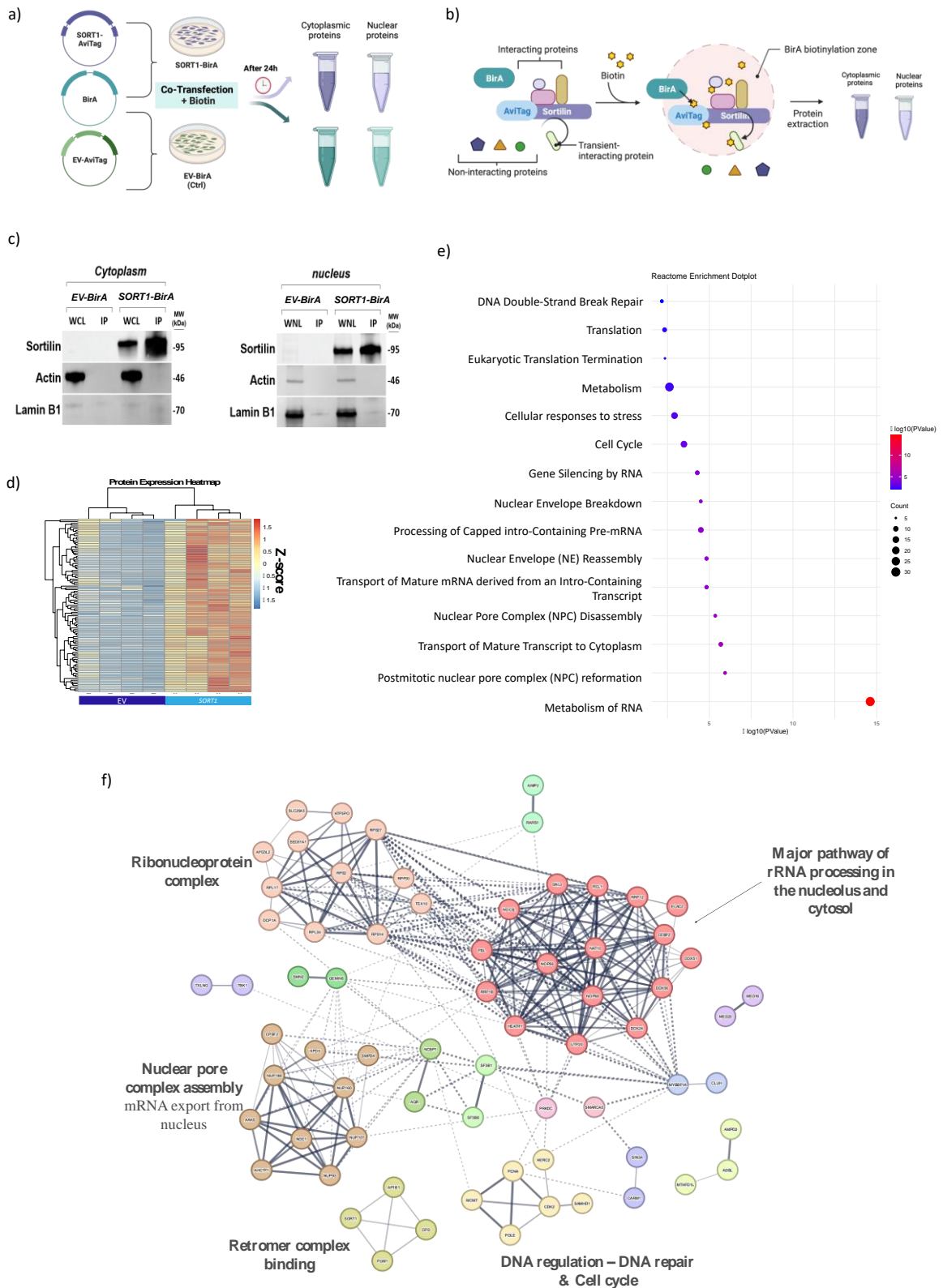


Figure 6: Elucidation of the sortilin nuclear interactome: implications for oncogenic processes

a. Vector constructs for sortilin expression SORT1-AviTag or empty vector (EV) EV-AviTag were introduced via co-expression with the BirA vector in the CRISPR SORT1 clone #3. Biotin was added simultaneously to the transfection at a concentration of 40 μ M. Cell fractionation was performed 24 hours later to isolate cytoplasmic and nuclear proteins. These proteins were then immunoprecipitated (IP) with streptavidin-coated magnetic beads. Mass spectrometry was performed on the proteins from the nuclear fraction. **b.** Mechanism of biotinylation of the AviTag peptide by the BirA enzyme. The AviTag peptide is used as a specific target for biotinylation by the BirA enzyme, which is a biotin ligase. When fused to sortilin, the AviTag serves as a marker for the BirA enzyme, ensuring precise sortilin biotinylation. In fact, in the presence of biotin, BirA covalently attaches a biotin group to a specific lysine residue of the AviTag peptide. In our system, BirA is introduced by co-expression of a separate vector with the vector constructs SORT1-AviTag or EV-AviTag. Proximity biotinylation with BirA can potentially affect neighboring proteins within a 10-20 nm radius. **c.** Western blot results displaying biotinylated sortilin after immunoprecipitation (IP) using streptavidin beads. Sortilin is detected in both the cytoplasmic and nuclear compartments, as indicated by the total cell lysate (WCL) samples following cell fractionation and post-immunoprecipitation (IP) samples. **d.** Heatmap depicting the 99 nuclear proteins identified by mass spectrometry in the presence of SORT1 (*t*-test, $p < 0.05$). Z-scores range from -1.5 (blue) to 1.5 (orange). **e.** Reactome pathway analysis of the genes associated with proteins identified in the nucleus in the SORT1 condition by mass spectrometry. The Log₁₀ (*p* value) scale ranges from 5 (blue) to 10 (red). **f.** Protein-protein interaction network obtained from STRING, showing the proteins identified by mass spectrometry among the 99 proteins and their associated roles in signaling pathways.

Discussion

In the present study, we unveil a novel mechanism arising from the nuclear localization of sortilin associated with its tumor suppressor-like role in LUAD. This mechanism involves fine transcriptional regulation of specific genes involved in various oncogenic pathways and suggests a decisive role for sortilin in chromatin organization, transcription and DNA repair.

Non-small cell lung cancer represents a complex mosaic of molecular subtypes¹¹, often characterized by activating mutations in the EGFR gene^{12,13}, which is a notorious constant, requiring the development of innovative therapeutic modalities imperative. While several studies demonstrated the putative role of sortilin in oncogenesis and cancer progression^{1,2,3,4,5}, few have highlighted its inhibitory function in EGFR dependent proliferation and in resistance mechanisms^{6,14}. Thus, our previous findings revealed a significant correlation between sortilin expression and overall survival in a cohort of LUAD patients, particularly in cases with high EGFR expression⁶. These observations prompted further exploration of the function of sortilin as a potential tumor suppressor in LUAD subtypes harboring EGFR mutations. The pursuit of this work led us to demonstrate that sortilin could have a nuclear function by binding simultaneously to the regulatory elements of *cMYC* and *CCND1*⁷. This mechanism might rely on the sortilin-mediated inhibition of RNA polymerase II recruitment, a central component of the transcriptional machinery of these genes¹⁵.

In the present work, our *in vitro* assays led on LUAD cell lines NCI-H1975 and NCI-H3255 with EGFR mutations, reveal a significant inhibition of cell proliferation and tumorigenic spheroid growth upon induction of sortilin overexpression. In parallel, our data suggests that restoration of sortilin in HEK293T KO *SORTI* cells results in a significant decrease in cell proliferation. This phenomenon is observed despite the dominance of various activating mutations in the *EGFR* gene, including *EGFR*^{L858R}, *EGFR*^{G719X}, *EGFR*^{L861Q}, or a combination of *EGFR*^{L858R/T790M} mutations. In contrast, loss of sortilin in these cells resulted in a significant increase in cell proliferation. These results highlight the major role of sortilin in regulating cell proliferation, independently of EGFR mutational status in NSCLC.

Our initial findings disclosed a surprising function of sortilin in the nucleus, where it acts as a key regulator of certain oncogenes typically modulated by nuclear EGFR, such as *cMYC* and *CCND1*. Following this work, we analyzed the ability of sortilin to regulate the expression of various genes involved in other major oncogenic pathways in LUAD, such as *MTOR*¹⁶, *AKT*¹⁶,

*SOX2*¹⁷, in addition to the *EGFR* and *CCND1* previously studied. Our transcriptomic analysis shows that sortilin overexpression induces a significant decrease in *EGFR* expression in NCI-H1975 and NCI-H3255 cell lines. This result is consistent with our previous observations concerning the inhibitory effect of sortilin on the EGFR pathway. Surprisingly, specific and significant changes in *CCND1* and *SOX2* gene expression were limited to the NCI-H1975 cell line. This role on gene activity, such as those associated with cell cycle; suggest a complex and sophisticated transcriptional regulatory mechanism potentially specific to certain cancer subtypes or to the presence of oncogenic drivers^{17,18}. This could also be explained by the higher decrease in *EGFR* mRNA levels in this cell line. Such nuances could elucidate the more pronounced effect of sortilin overexpression on tumor growth reduction *in vitro* in spheroids derived from the NCI-H1975 cell line, suggesting that sortilin potentially regulates tumor proliferation via direct gene expression regulation at the nuclear level.

Our results also show that overexpression of sortilin in LUAD cell lines results in reduced expression of the *MTOR* and *AKT* genes, which are key players in the PI3K/mTOR/AKT oncogenic pathway. This mechanism differs from that observed in other cancer types, such as colorectal and liver cancer^{12,19}, where sortilin appears to act primarily as a promoter of tumor progression by stimulating the PI3K/AKT/mTOR pathway. These results suggest a new function of sortilin in the nucleus based on the regulation of distinct genes involved in the proliferation and death pathways. In the context of LUAD cancer, these results confirm the dichotomy in its mode of action compared to other cancers^{20,19}. Moreover, these observations support the putative function of sortilin as a tumor suppressor and help to explain in part the impaired resistance to gefitinib due to the presence of sortilin in LUAD⁶. Indeed, previous studies have examined the relationship between *EGFR* mutations and the PI3K/AKT/mTOR signaling pathway in advanced LUAD. Although activating mutations in the *EGFR* gene are common in LUAD patients, it is important to note that activation of the PI3K/AKT/mTOR pathway occurs largely independently of EGFR activation, as demonstrated in several studies^{21,22,16,23,24}. However, while *EGFR* is mutated, it's often accompanied by persistent activation of the AKT/mTOR/S6K/4E-BP1 pathway^{24,22}. Indeed, clinical investigations have also revealed that patients with *EGFR* mutations associated with activation of the PI3K pathway tend to have a reduced progression-free survival and a poorer overall survival. Conversely, the use of dual inhibition targeting both EGFR and the PI3K/AKT/mTOR pathway has demonstrated its ability to overcome resistance to EGFR tyrosine kinase inhibitors (TKI) in

LUAD, improving thereby patient treatment management^{21,25}. Since sortilin overexpression exerts a direct inhibitory effect on the *EGFR*, *MTOR* and *AKT* genes, it could indirectly prevent the activity of respective signaling pathways. This new function of sortilin could potentially offer a significant advantage to non-responder patients to EGFR-TKIs, paving the way for new therapeutic perspectives in LUAD based on sortilin expression.

These preliminary observations concerning the selected genes aroused our interest, prompting us to further explore the role of sortilin in gene regulation on a large scale. Following our RNA Seq analyses, it appears that sortilin plays an even more complex and nuanced role than we had initially thought, significantly influencing the regulation of gene expression. Our analyses showed that sortilin appears to be involved directly in transcription by regulating genes such as *POLR2F*, *POLR2L*, *POLR1C* or *NCOA2*, or indirectly by controlling genes linked to chromatin organization and remodeling, such as *PBRM1* and *ATF7IP*. While more intensive studies are required, this novel nuclear function of sortilin, as a transcriptional regulator has never been demonstrated before. Although other authors had previously hypothesized, in the context of Alzheimer's disease, that sortilin might influence the transcriptional regulation of ApoE3 or ApoE4 in the brain, before rejecting it²⁶. Their findings, however, revealed that sortilin inhibition had no impact on the transcriptional regulation of *ApoE3* or *ApoE4* in the brain and in primary astrocytes, suggesting that sortilin inhibition is likely to alter neuronal clearance rather than control of the transcriptional machinery²⁶. Our current results therefore provide the first evidence that sortilin might play a key role in the regulation of transcripts level due to its modulation or action on nuclear targets.

Moreover, pathway analysis reveals a second function of sortilin as a player in DNA repair mechanisms. This assertion is supported both by transcriptomic analyses in both LUAD cell lines, NCI-H1975 and NCI-H3255, and by the study of sortilin's nuclear interactome in the HEK 293T cell line. Sortilin-interacting proteins in the nuclear compartment are involved in crucial biological functions such as cell cycle regulation, DNA replication and repair. The involvement of sortilin in these pathways suggests that it might play a protective role in maintaining DNA integrity. This hypothesis is reinforced by observations showing an association between increased sortilin expression and 5-FU resistance in colorectal cancer²⁷. Indeed, previous work has shown that the increase in DNA double-strand breaks in tumor cells treated with 5-FU was accompanied by an inhibition of ATF-3 expression, a *SORTI*

transcriptional inhibitor. Thus, sortilin expression is indirectly increased in 5-FU treated cells that could contribute to DNA repair and consequently lead to tumor cells resistance upon chemotherapy. These findings highlight the need to deepen the sortilin mechanism of action in order to adapt or develop more effective therapeutic approaches according to distinct cancer subtypes. For instance, inhibiting sortilin could potentially increase tumor cell sensitivity to 5-FU, thus optimizing treatment of colorectal cancer. Nevertheless, in LUAD, high expression of sortilin in combination with TKIs might be beneficial.

Taken together, these advances reveal the complexity of sortilin's role at the cellular level, going beyond its presumed function linked to protein transport. Its pleiotropic function could explain its dichotomous role in different cancers. In short, our work places sortilin at the heart of potential advances in oncology. These discoveries not only enrich our knowledge, but also pave the way for new sortilin-based therapeutic management, particularly in the context of LUAD. Further explorations are required to validate and further investigate these new hypotheses regarding sortilin's nuclear function.

Acknowledgements

This study was supported by the Ligue Contre le Cancer Limousin. MY PhD. was supported by the Région Nouvelle Aquitaine.

Author contributions

TN, FL and MY contributed to the conception and design of the study and the study protocol. MY performed the experimental work and performed data analysis. LI, BCF and HD performed research. LN performed mass spectrometry analyses. PG proof-read. TN, FL and MY helped with data interpretation. MY wrote this manuscript with contributions from all co-authors. All authors read and approved the final version of the manuscript.

Data availability statement

Data will be made available upon reasonable request to the corresponding author.

Reference

1. Berger, K. *et al.* Tumor co-expression of progranulin and sortilin as a prognostic biomarker in breast cancer. *BMC Cancer* **21**, 185 (2021).
2. Sortilin May Be a Potential Therapeutic Target in Pancreatic Cancer - The ASCO Post. <https://ascopost.com/news/august-2020/sortilin-may-be-a-potential-therapeutic-target-in-pancreatic-cancer/>.
3. Roselli, S. *et al.* Sortilin is associated with breast cancer aggressiveness and contributes to tumor cell adhesion and invasion. *Oncotarget* **6**, 10473–10486 (2015).
4. Akil, H., Perraud, A., Mélin, C., Jauberteau, M.-O. & Mathonnet, M. Fine-tuning roles of endogenous brain-derived neurotrophic factor, TrkB and sortilin in colorectal cancer cell survival. *PLoS One* **6**, e25097 (2011).
5. Farahi, L. *et al.* Sortilin as a Novel Diagnostic and Therapeutic Biomarker in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Avicenna J. Med. Biotechnol.* **11**, 270–276 (2019).
6. Al-Akhrass, H. *et al.* Sortilin limits EGFR signaling by promoting its internalization in lung cancer. *Nat. Commun.* **8**, 1182 (2017).
7. Lapeyronnie, E. *et al.* Sortilin Exhibits Tumor Suppressor-Like Activity by Limiting EGFR Transducing Function. SSRN Scholarly Paper at <https://doi.org/10.2139/ssrn.3895926> (2021).
8. Site-Specific Biotinylation of Purified Proteins Using BirA | Springer Nature Experiments. https://experiments.springernature.com/articles/10.1007/978-1-4939-2272-7_12.
9. Liu, Q., Rimmelzwaal, S., Heck, A. J. R., Akhmanova, A. & Liu, F. Facilitating identification of minimal protein binding domains by cross-linking mass spectrometry. *Sci. Rep.* **7**, 13453 (2017).
10. 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).
11. Niemira, M. *et al.* Molecular Signature of Subtypes of Non-Small-Cell Lung Cancer by Large-Scale Transcriptional Profiling: Identification of Key Modules and Genes by Weighted Gene Co-Expression Network Analysis (WGCNA). *Cancers* **12**, 37 (2019).
12. Association, A. L. EGFR and Lung Cancer. <https://www.lung.org/lung-health->

diseases/lung-disease-lookup/lung-cancer/symptoms-diagnosis/biomarker-testing/egfr.

13. 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).
14. Tanimoto, R. *et al.* Sortilin regulates progranulin action in castration-resistant prostate cancer cells. *Endocrinology* **156**, 58–70 (2015).
15. Xia, Y. *et al.* RNF8 mediates histone H3 ubiquitylation and promotes glycolysis and tumorigenesis. *J. Exp. Med.* **214**, 1843–1855 (2017).
16. Tan, A. C. Targeting the PI3K/Akt/mTOR pathway in non-small cell lung cancer (NSCLC). *Thorac. Cancer* **11**, 511–518 (2020).
17. Karachaliou, N., Rosell, R. & Viteri, S. The role of SOX2 in small cell lung cancer, lung adenocarcinoma and squamous cell carcinoma of the lung. *Transl. Lung Cancer Res.* **2**, 172–179 (2013).
18. Rothenberg, S. M. *et al.* Inhibition of mutant EGFR in lung cancer cells triggers SOX2-FOXO6-dependent survival pathways. *eLife* **4**, e06132.
19. Sortilin 1 regulates hepatocellular carcinoma progression by activating the PI3K/AKT signaling - S Ye, B Wang, Y Zhou, Q Sun, X Yang, 2022. <https://journals.sagepub.com/doi/full/10.1177/09603271221140111>.
20. Kim, J. T. *et al.* Neurotensin Receptor 3/Sortilin Contributes to Tumorigenesis of Neuroendocrine Tumors Through Augmentation of Cell Adhesion and Migration. *Neoplasia N. Y. N* **20**, 175–181 (2018).
21. Donev, I. S. *et al.* Transient PI3K inhibition induces apoptosis and overcomes HGF-mediated resistance to EGFR-TKIs in EGFR mutant lung cancer. *Clin. Cancer Res.* **17**, 2260–2269 (2011).
22. Papadimitrakopoulou, V. Development of PI3K/AKT/mTOR Pathway Inhibitors and Their Application in Personalized Therapy for Non–Small-Cell Lung Cancer. *J. Thorac. Oncol.* **7**, 1315–1326 (2012).
23. Gazdar, A. Activating and resistance mutations of EGFR in non-small-cell lung cancer: role in clinical response to EGFR tyrosine kinase inhibitors. *Oncogene* **28**, S24–S31 (2009).
24. Dobashi, Y. *et al.* EGFR-dependent and independent activation of Akt/mTOR cascade

in bone and soft tissue tumors. *Mod. Pathol. Off. J. U. S. Can. Acad. Pathol. Inc* **22**, 1328–40 (2009).

25. Treating non-small cell lung cancer by targeting the PI3K signaling pathway | Chinese Medical Journal. <https://mednexus.org/doi/full/10.1097/CM9.0000000000002195>.

26. Asaro, A. *et al.* ApoE4 disrupts interaction of sortilin with fatty acid-binding protein 7 essential to promote lipid signaling. *J. Cell Sci.* **134**, jcs258894 (2021).

27. Blondy, S. *et al.* Overexpression of sortilin is associated with 5-FU resistance and poor prognosis in colorectal cancer. *J. Cell. Mol. Med.* **25**, 47–60 (2021).

Supplementary Methods

Cell culture and treatments

HEK293T (CRL-3216) and NCI-H1975 (CRL-5908) cell lines were obtained from the American Type Culture Collection (ATCC, US). Sylvie Gazzeri kindly provided us the NCI-H3255 cell line from the Albert Bonniot Institute (France). All cell lines were grown in Dulbecco's DMEM GlutaMAX medium (Gibco, ThermoFisher, France) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) (IDbio, France), 1% non-essential amino acids (Gibco), and 1% antibiotics (penicillin and streptomycin, at 100 Units/mL and 100 µg/mL, respectively) (IDbio). All cells were cultured in a humidified incubator set at 5% CO₂ and 37°C.

Plasmids

CRISPR plasmids were purchased from Horizon (New England). Plasmids were designed to include respectively each sgRNA target sequence (SgRNA#1 5'-TCATAATTACCAGTGGTACA-3', SgRNA#2 5'-ATCTCACCTTCGATATAGCT-3', SgRNA#3 5'-TTCCCATAATCCTCACTGAG-3', SgRNA#4 5'-TCATCAATAACACCTTTATT-3', SgRNA#5 5'-ACTGAATTTGGCATGGCTAT-3'), the Cas9 and the dasher GFP to sort transfected-cells by flow cytometry. Wild type *EGFR* (Addgene plasmid #11011); Mutant *EGFR*^{G719S} (Addgene plasmid #11013), Mutant *EGFR*^{L858R} (Addgene plasmid #11012); Mutant *EGFR*^{L861Q} (Addgene plasmid #32068); Mutant *EGFR*^{L858R/T790M} (Addgene plasmid #32073); were a gift from Matthew Meyerson et al. (Yuza *et al.*, 2007); and sortilin Full-Length was gift from Gina Finan et al. (Finan, Okada and Kim, 2011). All plasmids encoding *SORT1* fused to the BirA enzyme biotin ligase for protein-protein interaction were produced by VectorBuilder (USA); BirA (VB201022-1029), *SORT1*-Avitag (VB220523-1246).

Immunoblotting / Western Blot (WB)

Following cell culture, cells were first washed with PBS (Gibco) and then solubilized in cell lysis buffer (4% SDS, 10% 2-mercaptoethanol, 20% glycerol, 0.125 M Tris-HCl at pH 6.8) supplemented with 1% protease inhibitor cocktail (PIC, #7012, Cell Signaling, France). Subsequently, cell lysates underwent three-phase sonication (2 seconds per phase, at 50% amplitude on a Vibra-Cell sonicator, each phase separated by one-minute cooling on ice). Then cell lysates were clear following centrifugation at 18 000×g. Then, 30 µg of solubilized proteins

were isolated, separated by SDS-PAGE and immunodetected by using specific antibodies; Sortilin (#Ab16640, 1:1000 dilution, Abcam, France), Lamin B1 (#Ab16048, 1:1000 dilution, Abcam, France) and actin (#A2066, 1:10000 dilution, Sigma, France). Primary antibodies are then immunorevealed by using secondary antibodies (Dako, Agilent, France; 1:1000 dilution) conjugated to horseradish peroxidase (HRP). Membranes are revealed with Azure imager (Azure, Biosystems, USA) using chemiluminescence HRP substrate (MERCK, Germany).

Nuclear purification

To separate nuclear and cytoplasmic proteins, the nuclear protein extraction kit from Abcam (#ab113474, Abcam) was used according to the manufacturer's instructions. In summary, after harvesting cells with trypsin/EDTA and washing twice cold PBS, 10^6 cells were transferred to a microcentrifuge tube and then centrifuged at 500 g for 5 min. Cells were then solubilized in 100 μ L of 1X pre-extraction buffer containing respectively 0,1% DTT and PIC, vortexed vigorously for 10 s, and incubated on ice for 10 min. Cell lysates were then centrifuged for 1 min at 12000 g. Supernatants corresponding to the cytoplasmic proteins were gently transferred and insoluble pellets containing nuclei were washed three times with cold PBS to remove intracytoplasmic contamination. Then pellets were lysed with 10 μ L of extraction buffer also containing respectively 0,1% of DTT and PIC. Nuclear lysates were incubated on ice for 15 minutes then vortexed 5 s every 3 min before to be sonicated for 3 x 10 s increasing solubilization of nuclear proteins then centrifuged for 10 minutes at 14 000 g at 4°C. Nuclear lysates were transferred to a new microcentrifuge tube. Nuclear and cytoplasmic proteins were titrated and loaded onto SDS-PAGE gel as described previously.

Immunofluorescence / Immunolabeling (IF):

Cells were harvested on glass slides and washed with cold PBS (Gibco). Fixation was carried out with cold methanol for 20 minutes. After fixation, cells were washed with a buffer solution containing 1% PBS and 1% bovine serum albumin (BSA) (IDbio). A 30-minute blocking step was performed with a blocking solution containing 3% of BSA diluted in PBS. Anti-sortilin (Abcam, #ab16640, France, dilution: 1/100), was added to the blocking solution and cells were incubated overnight at 4°C. The next day, cells were thoroughly washed with PBS containing 1% BSA. Alexa Fluor 488-conjugated secondary antibodies (Life Technologies, France) were then applied. Cells were incubated with the secondary antibodies for 2 h at room temperature in blocking solution. After three additional washes with PBS containing 1% BSA, cells were

mounted with Fluor-shield mounting medium (Sigma) containing 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI). Confocal microscopy imaging was performed using advanced confocal laser scanning microscopes (Zeiss LSM800), and image analysis was performed with ImageJ software (NIH, USA).

Identification of protein-protein interactions / Immunoprecipitation assays (IP)

To probe protein-protein interactions via proximity biotinylation, we employed AviTag peptide technology in conjunction with the BirA enzyme system (*Site-Specific Biotinylation of Purified Proteins Using BirA* / Springer Nature Experiments, no date) (Liu *et al.*, 2017). We engineered plasmid constructs encoding an N-terminal fusion of sortilin with the AviTag peptide, as well as an empty control vector also tagged with AviTag. Vector constructs SORT1-AviTag or EV-AviTag were introduced via co-expression with the BirA vector in the #3 CRISPR SORT1 cell line. Biotin was added simultaneously to the transfection at a concentration of 40µM. Following a 24-hour post-transfection interval, we isolated the cytoplasmic and nuclear proteins via cell fractionation as described above. The extracted proteins were then incubated for two hours at a temperature of 4°C, under continuous agitation, in the presence of streptavidin-coated magnetic beads (Dynabeads™ M-280 Streptavidin, Invitrogen, France). After four to five wash cycles with cold PBS, we eluted the proteins using Laemmli 4X buffer containing 10% β-mercaptoethanol and proceeded with denaturation at 95°C for 5 minutes. Detection of biotinylated sortilin presence was performed using an antibody specifically directed against sortilin (#Ab16640, Abcam, France) and a streptavidin-HRP (#DY998, R&D Systems, USA). Subsequent protein purification, as well as their analysis via mass spectrometry and the ensuing bioinformatics analysis, were rigorously conducted at the Institute of Genetics and Molecular and Cellular Biology (IGBMC, Strasbourg, France).

Reverse transcription and real-time PCR

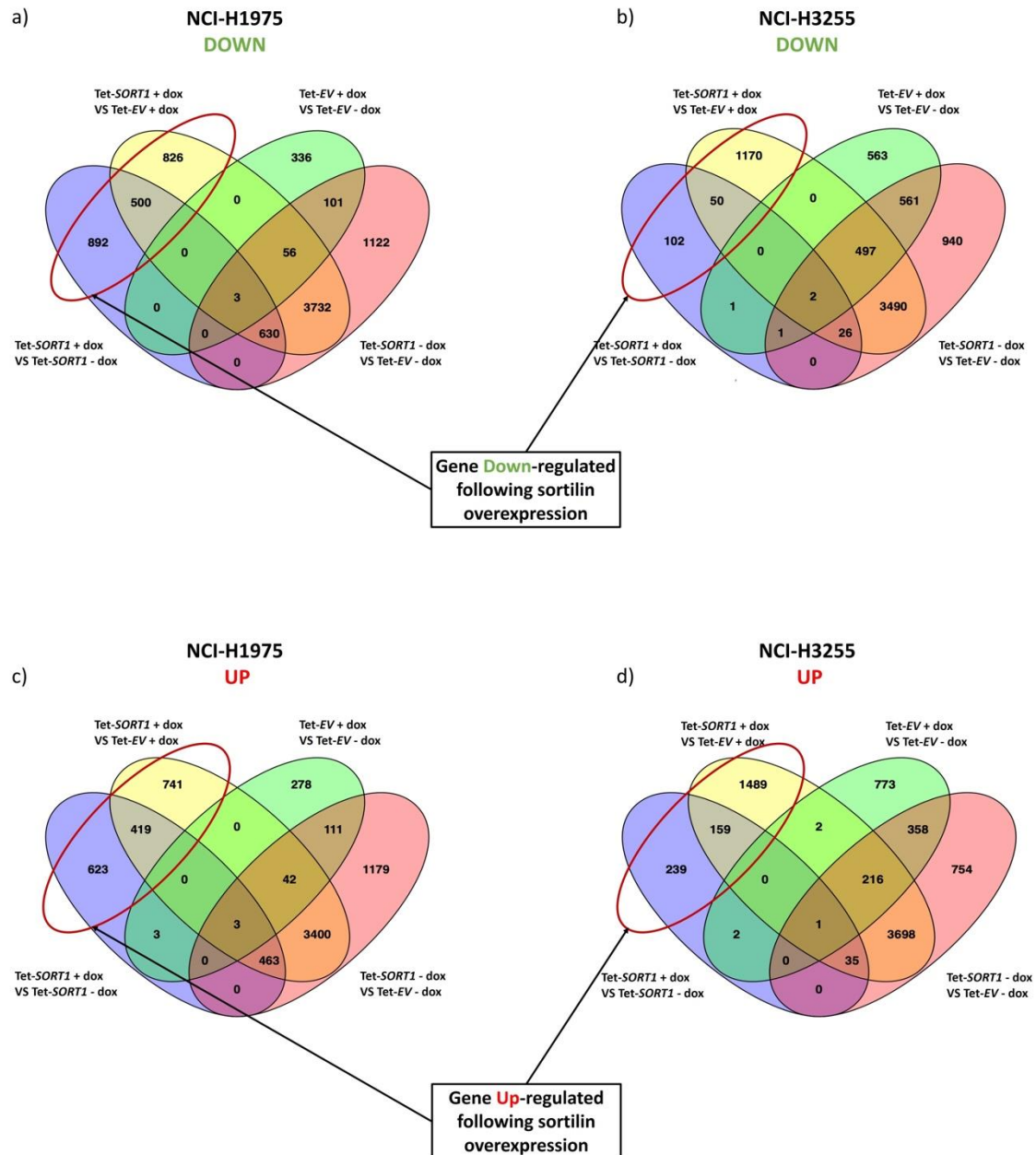
The total RNA extraction was carried out with the Qiagen RNeasy kit, following the manufacturer's protocol. The synthesis of cDNA was performed with the High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (#4368813, Applied Biosystems, USA). For quantitative PCR analysis, each qPCR reaction contained 100 ng of cDNA, TaqMan probes for *ACTB* (Hs01060665_g1), *SORT1* (Hs00361760_m1), *EGFR* (Hs01076090_m1), *AKT* (Hs00178289_m1), *MTOR* (Hs00234508_m1), *SOX2* (Hs0423836_s1) and *UBC* (Hs0082473_m1), were from Applied Biosystems (France) and the SensiFAST Probe Hi-ROX

kit (#BIO-82020, Meridian Bioscience, France). The amplification step was performed using the QuantStudio5 real-time PCR system from ThermoFisher Scientific.

Clonogenic assay

Spheroids were generated using ultra-low-fixation Nunc Sphera 96U 96-well plates (#174925, Thermo Fisher Scientific, USA). Cells were maintained in Dulbecco's DMEM GlutaMAX medium. For cell density, 100 cells were seeded per well in 200 μ l of DMEM GlutaMAX medium. After seeding, 100 nM doxycycline was added to the wells, as per experimental requirements. Plates were incubated at 37°C and 5% CO₂. Spheroid formation was monitored from 24 h to 15 days after seeding. Spheroid dimensions were determined by bright-field microscopy at 5X magnification (LEICA DMI8), and image analysis was performed with ImageJ software (NIH, USA). The maximum (h) and minimum (s) diameters of each spheroid were measured, and the spheroid volume (V) was estimated using the modified ellipsoid formula: $V = h \times s^2 \times \pi/6$, an approach derived from the method described by D. Braunholz et al. (2016)(Braunholz *et al.*, 2016b).

Supplementary Data. Figure. 1



Data supplementary, Figure 1. Venn diagrams illustrating the distribution of upregulated and downregulated genes between the Tet-EV and Tet-SORT1 conditions for both NCI-H1975 and NCI-H3255 lines. Diagrams were generated using Venny software version 2.1.0.

Discussion

La sortiline est une glycoprotéine transmembranaire de 95 kDa appartenant à la famille des récepteurs de tri de la famille Vps10 (*Vacuolar Protein Sorting 10*). Elle joue un rôle crucial dans l'organisation de diverses fonctions intracellulaires en agissant à la fois comme protéine cargo et comme corécepteur. Elle est impliquée notamment dans le trafic de protéines, l'endocytose et l'initiation de cascades de signalisation. La sortiline agit comme un récepteur de tri de protéines dans diverses structures, telles que le réseau trans-golgien, les endosomes, les vésicules sécrétoires, les corps multivésiculaires, et la membrane plasmique des cellules (Nielsen *et al.*, 2001; Geisler *et al.*, 2006; Vaegter *et al.*, 2011; Yang *et al.*, 2013b; Quistgaard *et al.*, 2014b). Nos travaux antérieurs ont permis de montrer que la sortiline interagissait avec le récepteur EGFR dans des lignées cellulaires de CBNPC. Son action favorise l'internalisation et la dégradation de l'EGFR et mène dès lors à une diminution de la croissance tumorale. Plus récemment, nos travaux ont démontré que la sortiline possédait une localisation nucléaire dans ces mêmes cellules (Lapeyronnie *et al.*, 2021). Cependant, bien que notre équipe ait réalisé des avancées, le rôle précis de la sortiline dans les noyaux reste encore énigmatique.

Dans la présente étude, nous suggérons que la sortiline nucléaire s'écarte de ses rôles conventionnels associés au tri cellulaire ou au transport de protéines. Selon nos résultats, la sortiline semble jouer un rôle actif dans la régulation transcriptionnelle d'une série de gènes, principalement associés aux voies oncogéniques et aux processus de transcription et d'organisation de la chromatine. Cette nouvelle fonction, ajoutée à ses nombreuses autres, pourrait expliquer la controverse en oncologie sur l'implication de la sortiline en tant que promoteur ou suppresseur de l'oncogénèse.

Rôle de la sortiline comme un suppresseur de tumeur dans le LUAD

La sortiline fait l'objet de nombreux débats quant à son rôle précis dans l'initiation et la progression du cancer. De nombreuses études ont mis en évidence son implication dans la progression tumorale, notamment dans le sein, le côlon, le cerveau, le pancréas et le foie (Akil *et al.*, 2011a; Roselli *et al.*, 2015b; Farahi *et al.*, 2019; Yang, P.-F. Wu, *et al.*, 2019; Ye *et al.*, 2022). Cependant, peu ont identifié son rôle potentiel en tant que suppresseur de tumeur, en dehors des cancers de la prostate et du poumon (Tanimoto *et al.*, 2015b; Al-Akhrass *et al.*, 2017b; Lapeyronnie *et al.*, 2021; Lazniewska *et al.*, 2023).

Notre équipe a précédemment montré que l'expression de la sortiline est significativement diminuée avec l'avancement des grades pathologiques chez les patients atteints de LUAD. Des

analyses *in-silico* menées via les données publiques TCGA (The Cancer Genome Atlas) (<https://www.cancer.gov/ccg/research/genome-sequencing/tcga>) accessibles via le portail cBioportal (<https://www.cbioportal.org/>) démontrent une corrélation significativement positive entre l'expression de *SORT1* et l'augmentation de la survie globale chez les patients atteints de LUAD (Al-Akhrass *et al.*, 2017a). Bien que cela n'ait pas encore été démontré, il semblerait que l'expression des mutations de l'EGFR contribue à la diminution significative de l'expression de la sortiline dans les LUAD. Ces mutations conduiraient à des signalisations oncogéniques soutenues, comprenant des régulateurs négatifs de la sortiline tels que STAT1 et ATF3 (Ouyang *et al.*, 2020). Ces derniers sont en effet positivement régulés par *cMYC*, qui est lui-même un gène cible de l'EGFR.

Dans le cadre de ce même travail, notre équipe a montré un rôle suppresseur de tumeur de la sortiline associé à un mécanisme de dérégulation des signalisations prolifératives de l'EGFR (Al-Akhrass *et al.*, 2017a). Ces travaux révèlent que l'interaction de la sortiline avec l'EGFR favorise l'internalisation et la dégradation de ce dernier. La sortiline limite ainsi l'activation des voies de signalisation prolifératives induites par l'EGFR au niveau de la membrane plasmique. La perte d'expression de la sortiline augmente la croissance tumorale de la lignée cellulaire d'adénocarcinome bronchique A549 dans les modèles de xénogreffes de souris immunodéficientes. Ces résultats suggèrent que la sortiline joue un rôle de suppression des tumeurs dans la LUAD.

De manière intéressante, la quasi-totalité des lignées cellulaires issues d'adénocarcinome bronchique présente une faible expression de sortiline voire quasi inexistante. Dans ce contexte, nous avons choisi de développer des modèles inductibles par Tet-On basés sur les lignées cellulaires NCI-H1975 et NCI-H3255, sélectionnées pour leur faible expression de sortiline et la présence de mutations dans le gène *EGFR*. Ces modèles offrent un avantage significatif en permettant une modulation contrôlée de l'expression de la sortiline. Cette stratégie est cruciale pour les études visant à étudier le rôle de la sortiline sur des caractéristiques clés du cancer telles que la prolifération cellulaire et la croissance tumorale. En utilisant ces modèles, nous avons observé qu'une augmentation de l'expression de la sortiline est corrélée à une réduction significative de la prolifération cellulaire et de la croissance des sphéroïdes des lignées NCI-H1975 et NCI-H3255.

A l'inverse, pour étudier les effets de la perte de fonction de la sortiline sur la croissance cellulaire, nous avons opté pour la mise en place de modèle CRISPR/Cas9 permettant d'éliminer une expression résiduelle de cette dernière comme obtenue avec des stratégies ShRNA ou SiRNA. Comme modèle cellulaire, nous avons choisi d'utiliser la lignée HEK293T présentant l'avantage d'avoir une expression relativement élevée de sortiline. Bien que ces cellules ne soient pas d'origine tumorale ou bronchique, elles représentent un modèle pour approfondir les mécanismes moléculaires. Par analogie, les mécanismes dévoilés peuvent être transposés aux lignées LUAD (Le *et al.*, 2014). Dans 3 clones HEK KO *SORT1* obtenus nous avons constaté que la prolifération a quasiment doublé (175%) par rapport à la lignée parentale présentant une expression endogène de la sortiline. Dans ces mêmes clones, nous avons été capable de rétablir une prolifération cellulaire normale par transfection transitoire de la sortiline.

Nous avons ensuite exploité les cellules HEK KO *SORT1* pour évaluer le potentiel oncogénique de l'EGFR à l'état sauvage ainsi que celui de ses différents mutants fréquemment décelés en clinique, tels que l'EGFR respectivement muté aux résidus ; L858R, G719X, L861Q ou encore la double mutation acquise L858R/T790M. L'objectif de cette démarche expérimentale était de reproduire un phénotype cellulaire de LUAD muté pour l'EGFR dans un contexte cellulaire non tumorale. De manière intéressante, en l'absence de sortiline, les cellules possédant les différentes constructions d'EGFR présentent des taux de prolifération supérieurs aux cellules transfectées uniquement avec le vecteur vide. A l'inverse, la restitution transitoire de sortiline par transfection, en présence de différents mutants d'EGFR et de sa forme sauvage, réduit le caractère de dominance de ces derniers et limite la prolifération cellulaire induite. En effet, une baisse significative de la prolifération est observée par rapport aux cellules dépourvues de sortiline. Ces résultats suggèrent que la fonction régulatrice de la croissance cellulaire par la sortiline soit indépendante du statut de l'EGFR. Cependant, ces données soulèvent de nouvelles questions concernant la fonction de la sortiline qui serait indépendante de l'EGFR en complexifiant davantage notre compréhension de cette dernière dans la régulation de la croissance tumorale.

Une dynamique assez particulière a été observé dans le glioblastome où l'EGFR reconnu pour son rôle oncogénique, révèle une fonction inattendue de suppresseur de tumeur. Lorsqu'il est surexprimé en présence de son ligand, l'EGFR induit une diminution de l'invasion cellulaire,

défiant ainsi les perceptions traditionnelles. Cette découverte souligne que la fonction d'une protéine peut varier considérablement en fonction du type de tumeur et des voies de signalisation activées (Guo *et al.*, 2022).

Plus spécifiquement, dans le glioblastome, la surexpression de l'EGFR et sa stimulation par l'EGF entraînent une augmentation significative de l'expression de la protéine BIN3. Lorsqu'elle est exprimée, BIN3 induit la phosphorylation de DOCK7, menant à une association entre BIN3 et DOCK7. DOCK7, membre de la famille des protéines DOCK dotées d'un domaine Rho GEF, agit comme un facteur d'échange guanine nucléotide (GEF) pour la famille des Rho GTPase. Cette interaction BIN3-DOCK7 inhibe l'activité constitutive de DOCK7 et des Rho GTPases en aval, conduisant ainsi à une diminution de l'invasion cellulaire (Guo *et al.*, 2022). Il est donc envisageable que, même en présence d'un EGFR surexprimé et activé, l'inhibition de DOCK7 puisse réduire l'invasion et la croissance tumorale.

Nos données expérimentales sur les HEK293T et les deux lignées LUAD montrent également que, même en présence de formes mutées et constitutivement actives de l'EGFR, la sortiline parvient à atténuer la prolifération cellulaire, limitant ainsi la signalisation oncogénique de l'EGFR. En complément, nos analyses transcriptomiques sur les lignées cellulaires NCI-H1975 et NCI-H3255 Tet-On révèlent qu'une surexpression de la sortiline entraîne une réduction significative de l'expression de *DOCK7*. Il est donc possible que cette diminution puisse s'accompagner d'une réduction de l'activité des Rho GTPases, comme observé dans le glioblastome. Bien que cette observation de diminution de *DOCK7* soit observée dans le contexte de LUAD, il sera intéressant d'évaluer si, dans les cellules HEK293T, l'expression de la sortiline avec différentes mutations de l'EGFR entraîne également une baisse de *DOCK7*. Ainsi, des expérimentations supplémentaires s'avèrent nécessaires pour confirmer et élargir cette hypothèse.

Les mécanismes de régulation dépendant de la localisation nucléaire de la sortiline

Face aux multiples fonctions de la sortiline et de ses différentes localisations intracellulaires, nous nous sommes interrogés sur le rôle spécifique de cette dernière dans les noyaux des cellules en lien avec les mécanismes oncogéniques.

Notre équipe a mis en évidence par ChIPSeq une interaction entre la sortiline et la chromatine. Nos résultats montrent que la sortiline semble concurrencer l'EGFR au niveau des sites d'initiation de la transcription (TSS) pour des gènes clés impliqués dans la réponse

transcriptionnelle à l'EGF, tels que *cMYC* et *CCND1*. De manière significative, ces résultats indiquent que la sortiline pourrait entraver le recrutement de l'ARN polymérase II, élément central de la machinerie transcriptionnelle (Lapeyronnie *et al.*, 2021). À la lumière de cette observation, nous avons approfondi notre analyse pour évaluer l'ampleur du rôle régulateur de la sortiline sur la transcription génique. Nos études transcriptomiques ont révélé une baisse conséquente de l'expression d'un éventail de gènes ayant une implication dans la régulation de multiples voies oncogéniques. Notamment, la surexpression de la sortiline a entraîné une réduction significative de l'expression de l'EGFR dans les cellules NCI-H1975 et NCI-H3255. Ces résultats corroborent nos observations antérieures concernant l'effet inhibiteur de la sortiline sur la signalisation de l'EGFR, tout en proposant un nouveau mode d'action au niveau génétique. Il est également intéressant de noter que des altérations significatives dans l'expression des gènes *CCND1* et *SOX2* ont été observées spécifiquement dans la lignée NCI-H1975. Ces variations dans les profils d'expression génique entre les NCI-H1975 et les NCI-H3255 suggèrent un mécanisme de régulation transcriptionnelle complexe, qui pourrait être spécifique à certains sous-types de cancer ou influencé par la présence d'autres drivers oncogéniques.

Nos analyses transcriptomiques révèlent également que la surexpression de la sortiline dans les cellules NCI-H1975 et NCI-H3255 conduit à une diminution de l'expression des gènes codants pour des acteurs clés de la voie mTOR/PI3K/AKT tels que les gènes *MTOR* et *AKT* et *PIK3CA*. D'une manière intéressante, des travaux menés dans d'autres types de cancers, notamment colorectal et hépatique, montrent que la sortiline agit plutôt comme un activateur de cette même voie, favorisant ainsi la progression tumorale (Blondy *et al.*, 2021; Ye *et al.*, 2022). Cette contradiction apparente entre nos observations sur les LUAD et les autres cancers pourrait s'expliquer par la mise en jeu des fonctions cytoplasmiques ou nucléaires de la sortiline selon le contexte tumoral. Les caractéristiques moléculaires propres à chaque type de cancer pourraient influencer la manière dont la sortiline interagit avec la machinerie transcriptionnelle, conduisant ainsi à des résultats divergents. Les travaux antérieurs du laboratoire sur la lignée NCI-H1975 montraient qu'une restauration d'expression de la sortiline par transfection transitoire, sensibilisait ces dernières à l'ITK Géfitinib (Al-Akhrass *et al.*, 2017a). Ce phénomène s'accompagnait d'une diminution de la phosphorylation des protéines AKT et ERK en parallèle d'une baisse de la prolifération cellulaire (Al-Akhrass *et al.*, 2017a). Il est intéressant de noter ici que d'autres travaux menés sur le LUAD ont mis en avant les bénéfices

d'une double inhibition en ciblant à la fois l'EGFR et la voie PI3K/AKT/mTOR, pour contrer la résistance aux ITKs-EGFR (Donev *et al.*, 2011; Jiang *et al.*, 2022). Cette double approche offre une stratégie thérapeutique prometteuse pour les patients. En modulant l'expression des gènes *EGFR*, *MTOR*, *AKT* et *PIK3CA*, la surexpression de la sortiline pourrait interférer avec leurs voies de signalisation associées, expliquant ainsi une sensibilité renforcée au Gécitinib. Ces découvertes concernant la sortiline pourraient potentiellement élargir le spectre des innovations thérapeutiques pour les patients présentant une résistance aux ITKs-EGFR.

Régulation de la transcription, de la réparation de l'ADN et l'organisation de la chromatine par la sortiline

Nos analyses transcriptomiques ont également révélé que la sortiline pouvait directement réguler la transcription en influençant des gènes tels que *POLR2F* (*RNA Polymerase II, I And III Subunit F*), *POLR2L* (*RNA Polymerase II, I And III Subunit L*) et *POLR1C* (*RNA Polymerase I And III Subunit C*), gènes codants principalement pour des ARNs polymérase et le gène *NCOA2* (*Nuclear Receptor Coactivator 2*). De plus, elle pourrait avoir un impact sur des gènes associés à l'organisation et au remodelage de la chromatine, tels que *PBRM1* (*Polybromo 1*) et *ATF7IP* (*Activating Transcription Factor 7 Interacting Protein*).

Bien que le rôle supposé de la sortiline en tant que régulateur transcriptionnel soit surprenant, il avait été suggéré par d'autres chercheurs dans le contexte de la maladie d'Alzheimer (Asaro *et al.*, 2021). Au cours de leur étude, les auteurs ont observé que l'absence de la sortiline altère l'expression de *FABP7*, une protéine chaperonne essentielle dans le transport des lipides. En se basant sur cette observation, ils ont exploré la possibilité que la sortiline puisse réguler la transcription de *FABP7*. Toutefois, l'analyse des niveaux d'ARNm de *FABP7* a révélé que la sortiline n'affectait pas directement son expression, mais semble plutôt influencer les mécanismes post-traductionnels régulant l'expression de la protéine *FABP7*. Au contraire, nos résultats suggèrent que la sortiline pourrait contrôler un programme transcriptionnel et réguler l'expression de plusieurs gènes.

En outre, les analyses d'enrichissement fonctionnel effectuées à partir de nos études transcriptomiques révèlent un rôle potentiel de la sortiline dans les mécanismes de réparation de l'ADN. Ce rôle est également soutenu par l'analyse de l'interactome nucléaire de la sortiline, qui souligne son implication dans ces processus.

Identification de l'interactome nucléaire de la sortiline dans les modèles de HEK 293T

Dans le cadre de notre étude visant à élucider l'interactome de la sortiline au sein du noyau cellulaire, nous avons adopté une approche combinant le fractionnement cellulaire et le système de biotinylation par BirA. Cette méthodologie a été choisie pour ses capacités uniques à isoler et identifier les protéines en interaction directe ou en proximité étroite avec la sortiline, de manière restreinte au compartiment nucléaire, permettant ainsi une analyse plus précise et ciblée (Fairhead and Howarth, 2015; Liu *et al.*, 2017).

Selon notre analyse, les interactions nucléaires de la sortiline sont associées à des fonctions biologiques essentielles telles que la réplication, la réparation de l'ADN et la régulation du cycle cellulaire. Sa participation à ces processus pourrait être de jouer un rôle protecteur dans le maintien de l'intégrité de l'ADN et par conséquent de l'intégrité des cellules. Cette hypothèse est renforcée par des études menées dans le laboratoire dans le contexte du cancer colorectal, où il a été établi un lien entre l'expression de la sortiline et la résistance au 5-FU (Blondy *et al.*, 2021). Cet agent alkylant agit en bloquant la conversion de l'uracile en thymine, perturbant ainsi la synthèse de l'ADN et est associé à des cassures simples et doubles brins (Kunz *et al.*, 2009). Ces travaux montrent que des cellules traitées au 5-FU présentent une diminution d'expression d'ATF3, l'inhibiteur transcriptionnel de *SORT1*. Ce mécanisme pourrait augmenter indirectement les niveaux de sortiline dans les cellules, favorisant potentiellement la réparation de l'ADN et conduisant ainsi à une résistance des cellules tumorales au 5-FU. Ces découvertes soulignent l'importance d'approfondir les mécanismes d'action de la sortiline pour élaborer des stratégies thérapeutiques efficaces pour des sous-types de cancer spécifiques. Par exemple, dans le cancer colorectal, inhiber la sortiline pourrait renforcer la sensibilité des cellules tumorales au 5-FU, améliorant ainsi l'efficacité du traitement. À l'inverse, dans les adénocarcinomes bronchiques, une expression élevée de la sortiline combinée à des ITKs-EGFR pourrait être avantageuse.

Pour une exploration en profondeur des interactions entre la sortiline et l'ADN, nous avons adopté la technique de CUT&RUN. Par rapport aux méthodes traditionnelles comme la ChIPSeq, cette technique offre une plus grande précision et diminue considérablement l'aspécificité. L'avantage du CUT&RUN repose sur l'utilisation d'une micrococcale nucléase (MNase) que l'on fusionne à l'anticorps ciblant notre protéine d'intérêt. Ainsi, la MNase clive la chromatine à proximité du site de liaison immédiat de notre protéine cible. Bien que les

résultats soient en attente, cette approche permettra de localiser les régions d'interaction de la sortiline avec la chromatine de manière plus spécifique. De tels sites peuvent nous donner des indices sur les gènes qui sont directement régulés par la sortiline. De plus, en séquençant ces fragments d'ADN, nous pourrions peut-être identifier les motifs consensus spécifiques auxquels la sortiline se lie. Ces données nous apporteront des informations précieuses sur ses fonctions régulatrices et potentiellement sur son rôle dans la réparation de l'ADN. L'utilisation du CUT&RUN ouvre ainsi une fenêtre unique sur le paysage moléculaire des interactions protéine-ADN de la sortiline.

Translocation nucléaire de la sortiline à travers le pore nucléaire

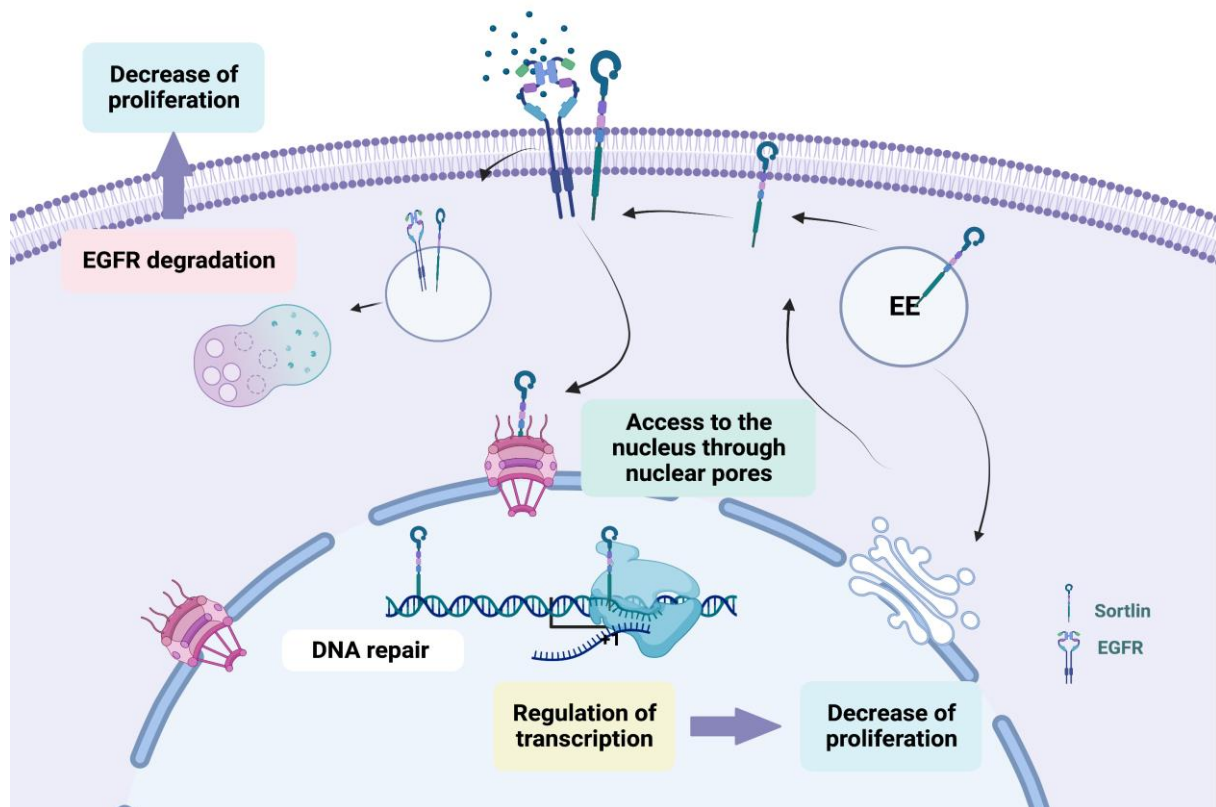
L'analyse par spectrométrie de masse a révélé l'association entre la sortiline et certaines protéines du complexe du pore nucléaire. Ces observations apportent une contribution essentielle à notre compréhension de la dynamique de la sortiline. Généralement, le transport nucléaire des protéines est guidé par des séquences spécifiques de localisation nucléaire (NLS). Cependant, la sortiline, qui ne possède pas de NLS identifiable, semble exploiter des voies alternatives pour accéder au noyau (Marfori *et al.*, 2011). Bien que les protéines de petit poids moléculaire, inférieures à 40 kDa, puissent diffuser passivement à travers les pores nucléaires, la détection de la sortiline sous sa forme intégrale de 95 kDa dans le noyau, démontrée par nos analyses de Western blot, suggère un mécanisme de transport actif. Ce mécanisme peut impliquer l'interaction de la sortiline avec des protéines qui possèdent des NLS et qui faciliteraient ainsi son transport vers le noyau. Il est également possible que la sortiline utilise d'autres moyens telles que des modifications post-traductionnelles comme la phosphorylation, l'acétylation, ou la sumoylation. Ces changements pourraient altérer sa structure, sa charge, ou son affinité pour le complexe dynéine/dynactine, facilitant ainsi son importation nucléaire. Un mécanisme similaire est observé avec NF- κ B qui joue un rôle crucial dans l'inflammation, la prolifération cellulaire et l'apoptose. Ce facteur est généralement retenu dans les cellules non stimulées au niveau cytoplasmique par une famille de protéines inhibitrices connues sous le nom d'I κ B (Wan and Lenardo, 2010; Olivera *et al.*, 2012). Cette inhibition en présence d'I κ B empêche la translocation de NF- κ B dans le noyau. Lors d'une stimulation cellulaire par des cytokines ou des antigènes, une cascade de signalisation est déclenchée conduisant à la phosphorylation et à la dégradation des I κ B. Ce processus libère NF- κ B, ce qui lui permet de migrer vers le noyau. La libération de NF- κ B est facilitée par des changements de conformation

et des interactions avec d'autres protéines, comme le complexe dynéine/dynactine, plutôt que par une interaction directe avec les importines basée sur un NLS (Matthews *et al.*, 1995; Mikenberg *et al.*, 2007). Toutefois, la région de NF- κ B libérée n'est pas un NLS classique, car il ne s'agit pas d'une séquence linéaire d'acides aminés exclusivement destinée à la localisation nucléaire.

Il est également envisageable que la présence de la sortiline à proximité des protéines du pore nucléaire soit liée à sa fonction de tri. De même, le transport des protéines et des ARN entre le noyau et le cytoplasme pourrait supposer un rôle régulateur de la sortiline dans ce processus (Rodriguez, Dargemont and Stutz, 2004). Cette hypothèse semble possible étant donné que nos analyses protéomiques révèlent une interaction entre la sortiline et des partenaires impliqués dans le transport des ARN entre le noyau et le cytoplasme. Une telle fonction régulatrice de la sortiline aurait des implications significatives dans la transcription, la traduction, la réparation de l'ADN, ou encore la régulation du cycle cellulaire. Une exploration plus poussée de ces interactions et de leurs conséquences fonctionnelles pourrait améliorer nos connaissances et notre compréhension sur cette fonction spécifique.

Conclusion & Perspectives

L'ensemble des avancées révélées dans ce travail illustre la complexité du rôle de la sortiline au niveau cellulaire, au-delà de ses fonctions présumées liées au transport et au tri des protéines. Sa fonction pléiotropique pourrait expliquer son rôle dichotomique dans différents cancers. En bref, nos travaux placent la sortiline au cœur d'avancées potentielles en oncologie. Ces découvertes permettent non seulement d'enrichir nos connaissances, mais aussi d'apporter un regard différent sur la sortiline et les pistes thérapeutiques basées sur cette dernière, notamment dans le contexte de LUAD.



Dans la continuité de nos recherches, l'objectif serait d'élargir notre compréhension concernant le rôle nucléaire de la sortiline impliquant l'adoption de stratégies multiples et rigoureuses.

La première étape consisterait à déterminer la séquence consensus de liaison de la sortiline à la chromatine, à l'aide de la technique CUT&RUN et d'analyses *in silico*. Bien que les résultats soient toujours en cours d'analyse, nous envisageons de nous diriger par la suite vers la synthèse des leurres moléculaires ADN, dénommées « decoys ». Ces derniers sont des fragments oligonucléotides d'ADN, qui peuvent varier de quelques nucléotides à plusieurs dizaines de bases en longueur, conçus pour imiter des séquences spécifiques auxquelles une

protéine ou un facteur de transcription se lie. En mimant ces séquences, les decoys peuvent se lier de manière compétitive à la sortiline, et ainsi empêcher cette dernière de se lier à ses sites spécifiques sur l'ADN. L'intérêt même de cette stratégie est de nous éclairer sur les rôles spécifiques de la sortiline au sein du noyau cellulaire tout en préservant ses fonctions cytoplasmiques intactes ou toute action qui ne nécessite pas de liaison directe à la chromatine.

Ensuite, il est essentiel d'approfondir le rôle précis de la sortiline dans la réparation de l'ADN et la régulation transcriptionnelle. Cette démarche implique en premier temps l'enrichissement de la sortiline dans le noyau. Ensuite, générer des mutations aléatoires dans le génome des cellules à l'aide d'UV. Une approche développée par Zhu et al., le Protein-Associated DNA Damage Sequencing (PADD-seq) pourrait par la suite être utilisée. Grâce à cette technique, qui combine Damage-seq avec une immunoprécipitation de la chromatine, il est possible de détecter la distribution de lésions dans des fragments d'ADN associés spécifiquement à la sortiline (Zhu *et al.*, 2023). Cette méthode pourrait ainsi fournir des informations cruciales sur la manière dont la sortiline interagit avec les lésions de l'ADN à l'échelle du génome. De plus, cette technique pourrait enrichir notre connaissance des processus moléculaires qui orchestrent la réaction cellulaire face aux atteintes génétiques.

Nous souhaitons, à travers ces démarches, répondre à nos hypothèses et renforcer la crédibilité de nos découvertes. Dans un contexte plus global, ces démarches pourraient conduire à l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques. L'utilisation de la sortiline comme « peptide thérapeutique » dans certaines formes de cancer, notamment le LUAD, pourrait ouvrir des voies novatrices pour des traitements ciblés et plus efficaces contre cette maladie.

Références bibliographiques

Ai, D. *et al.* (2012) ‘Activation of ER stress and mTORC1 suppresses hepatic sortilin-1 levels in obese mice’, *The Journal of Clinical Investigation*, 122(5), pp. 1677–1687. Available at: <https://doi.org/10.1172/JCI61248>.

Akil, H. *et al.* (2011a) ‘Fine-tuning roles of endogenous brain-derived neurotrophic factor, TrkB and sortilin in colorectal cancer cell survival’, *PloS One*, 6(9), p. e25097. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0025097>.

Akil, H. *et al.* (2011b) ‘Fine-tuning roles of endogenous brain-derived neurotrophic factor, TrkB and sortilin in colorectal cancer cell survival’, *PloS One*, 6(9), p. e25097. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0025097>.

Al-Akhrass, H. *et al.* (2017a) ‘Sortilin limits EGFR signaling by promoting its internalization in lung cancer’, *Nature Communications*, 8(1), p. 1182. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41467-017-01172-5>.

Al-Akhrass, H. *et al.* (2017b) ‘Sortilin limits EGFR signaling by promoting its internalization in lung cancer’, *Nature Communications*, 8(1), p. 1182. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41467-017-01172-5>.

Arasada, R.R. *et al.* (2018) ‘Notch3-dependent β -catenin signaling mediates EGFR TKI drug persistence in EGFR mutant NSCLC’, *Nature Communications*, 9(1), p. 3198. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41467-018-05626-2>.

Arbour, K.C. and Riely, G.J. (2017) ‘Diagnosis and Treatment of ALK Positive NSCLC’, *Hematology/oncology clinics of North America*, 31(1), pp. 101–111. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.hoc.2016.08.012>.

Arechavaleta-Velasco, F. *et al.* (2017) ‘Progranulin and Its Biological Effects in Cancer’, *Medical oncology (Northwood, London, England)*, 34(12), p. 194. Available at: <https://doi.org/10.1007/s12032-017-1054-7>.

Ariga, M. *et al.* (2017) ‘Glucose deprivation attenuates sortilin levels in skeletal muscle cells’, *Endocrine Journal*, 64(3), pp. 255–268. Available at: <https://doi.org/10.1507/endocrj.EJ16-0319>.

Asaro, A. *et al.* (2021) ‘ApoE4 disrupts interaction of sortilin with fatty acid-binding protein 7 essential to promote lipid signaling’, *Journal of Cell Science*, 134(20), p. jcs258894. Available at: <https://doi.org/10.1242/jcs.258894>.

Awad, M.M. *et al.* (2021) ‘Acquired Resistance to KRASG12C Inhibition in Cancer’, *The New England journal of medicine*, 384(25), pp. 2382–2393. Available at: <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2105281>.

Bade, B.C. and Cruz, C.S.D. (2020) 'Lung Cancer 2020: Epidemiology, Etiology, and Prevention', *Clinics in Chest Medicine*, 41(1), pp. 1–24. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ccm.2019.10.001>.

Bain, C. *et al.* (2004) 'Lung Cancer Rates in Men and Women With Comparable Histories of Smoking', *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, 96(11), pp. 826–834. Available at: <https://doi.org/10.1093/jnci/djh143>.

Baltes, J. *et al.* (2014) 'σ1B adaptin regulates adipogenesis by mediating the sorting of sortilin in adipose tissue', *Journal of Cell Science*, 127(Pt 16), pp. 3477–3487. Available at: <https://doi.org/10.1242/jcs.146886>.

Bando, T. and Date, H. (2012) '[Surgical treatment of lung cancer in patients with pulmonary fibrosis]', *Kyobu Geka. The Japanese Journal of Thoracic Surgery*, 65(8), pp. 714–719.

Barrera-Rodriguez, R. and Morales-Fuentes, J. (2012) 'Lung cancer in women', *Lung Cancer: Targets and Therapy*, 3, pp. 79–89. Available at: <https://doi.org/10.2147/LCTT.S37319>.

Barros-Filho, M.C. *et al.* (2019) 'Tumour Suppressor Genes with Oncogenic Roles in Lung Cancer', in *Genes and Cancer*. IntechOpen. Available at: <https://doi.org/10.5772/intechopen.85017>.

Berardi, R. *et al.* (2009) 'Women and lung cancer: Clinical and molecular profiling as a determinate for treatment decisions: A literature review', *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 69(3), pp. 223–236. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2008.06.008>.

Béraud-Dufour, S. *et al.* (2016) 'Focal Adhesion Kinase-Dependent Role of the Soluble Form of Neurotensin Receptor-3/Sortilin in Colorectal Cancer Cell Dissociation', *International Journal of Molecular Sciences*, 17(11), p. 1860. Available at: <https://doi.org/10.3390/ijms17111860>.

Berger, K., Pauwels, E., *et al.* (2021) 'Reduction of Progranulin-Induced Breast Cancer Stem Cell Propagation by Sortilin-Targeting Cyclotriazadisulfonamide (CADA) Compounds', *Journal of Medicinal Chemistry*, 64(17), pp. 12865–12876. Available at: <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.1c00943>.

Berger, K., Rhost, S., *et al.* (2021) 'Tumor co-expression of progranulin and sortilin as a prognostic biomarker in breast cancer', *BMC Cancer*, 21(1), p. 185. Available at: <https://doi.org/10.1186/s12885-021-07854-0>.

Bergethon, K. *et al.* (2012) 'ROS1 Rearrangements Define a Unique Molecular Class of Lung Cancers', *Journal of Clinical Oncology*, 30(8), pp. 863–870. Available at: <https://doi.org/10.1200/JCO.2011.35.6345>.

Bi, L. *et al.* (2013) 'Saturated fatty acids activate ERK signaling to downregulate hepatic sortilin 1 in obese and diabetic mice [S]', *Journal of Lipid Research*, 54(10), pp. 2754–2762. Available at: <https://doi.org/10.1194/jlr.M039347>.

Blondeau, N. *et al.* (2019) ‘Sortilin in Glucose Homeostasis: From Accessory Protein to Key Player?’, *Frontiers in Pharmacology*, 9. Available at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphar.2018.01561> (Accessed: 7 October 2023).

Blondy, S. *et al.* (2021) ‘Overexpression of sortilin is associated with 5-FU resistance and poor prognosis in colorectal cancer’, *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 25(1), pp. 47–60. Available at: <https://doi.org/10.1111/jcmm.15752>.

Boggild, S. *et al.* (2016) ‘Spatiotemporal patterns of sortilin and SorCS2 localization during organ development’, *BMC Cell Biology*, 17(1), p. 8. Available at: <https://doi.org/10.1186/s12860-016-0085-9>.

Brand, T.M. *et al.* (2011) ‘The Nuclear Epidermal Growth Factor Receptor Signaling Network and its Role in Cancer’, *Discovery Medicine*, 12(66), pp. 419–432.

Brand, T.M. *et al.* (2013) ‘Nuclear EGFR as a Molecular Target in Cancer’, *Radiotherapy and oncology : journal of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology*, 108(3), p. 10.1016/j.radonc.2013.06.010. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.radonc.2013.06.010>.

Braunholz, D. *et al.* (2016a) ‘Spheroid Culture of Head and Neck Cancer Cells Reveals an Important Role of EGFR Signalling in Anchorage Independent Survival’, *PLoS One*, 11(9), p. e0163149. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0163149>.

Braunholz, D. *et al.* (2016b) ‘Spheroid Culture of Head and Neck Cancer Cells Reveals an Important Role of EGFR Signalling in Anchorage Independent Survival’, *PLoS ONE*, 11(9), p. e0163149. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0163149>.

Buck, E. *et al.* (2008) ‘Feedback Mechanisms Promote Cooperativity for Small Molecule Inhibitors of Epidermal and Insulin-Like Growth Factor Receptors’, *Cancer Research*, 68(20), pp. 8322–8332. Available at: <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-6720>.

Burslem, G.M. and Crews, C.M. (2020) ‘Proteolysis-Targeting Chimeras as Therapeutics and Tools for Biological Discovery’, *Cell*, 181(1), pp. 102–114. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.11.031>.

Buttenschøn, H.N. *et al.* (2015) ‘Increased serum levels of sortilin are associated with depression and correlated with BDNF and VEGF’, *Translational Psychiatry*, 5(11), p. e677. Available at: <https://doi.org/10.1038/tp.2015.167>.

cancer, C.C.S./ S. canadienne du (2020) *Trouver le cancer du poumon à ses débuts*, *Société canadienne du cancer*. Available at: <https://cancer.ca/fr/cancer-information/cancer-types/lung/finding-cancer-early> (Accessed: 20 November 2023).

Cancer Genome Atlas Research Network (2012) ‘Comprehensive genomic characterization of squamous cell lung cancers’, *Nature*, 489(7417), pp. 519–525. Available at: <https://doi.org/10.1038/nature11404>.

Cancer Genome Atlas Research Network (2014) ‘Comprehensive molecular profiling of lung adenocarcinoma’, *Nature*, 511(7511), pp. 543–550. Available at: <https://doi.org/10.1038/nature13385>.

Cantor, A.J., Shah, N.H. and Kuriyan, J. (2018) ‘Deep mutational analysis reveals functional trade-offs in the sequences of EGFR autophosphorylation sites’, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115(31), pp. E7303–E7312. Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.1803598115>.

Canuel, M., Lefrancois, S., *et al.* (2008) ‘AP-1 and retromer play opposite roles in the trafficking of sortilin between the Golgi apparatus and the lysosomes’, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 366(3), pp. 724–730. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2007.12.015>.

Canuel, M., Korkidakis, A., *et al.* (2008) ‘Canuel M, Korkidakis A, Konnyu K, Morales CR. Sortilin mediates the lysosomal targeting of cathepsins D and H’, *Biochemical and biophysical research communications*, 373, pp. 292–7. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2008.06.021>.

Carrasquillo, M.M. *et al.* (2010) ‘Genome-wide screen identifies rs646776 near sortilin as a regulator of progranulin levels in human plasma’, *American Journal of Human Genetics*, 87(6), pp. 890–897. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2010.11.002>.

Casa, A.J. *et al.* (2008) ‘The type I insulin-like growth factor receptor pathway: a key player in cancer therapeutic resistance’, *Frontiers in Bioscience-Landmark*, 13(9), pp. 3273–3287. Available at: <https://doi.org/10.2741/2925>.

Chakravarti, A., Loeffler, J.S. and Dyson, N.J. (2002) ‘Insulin-like Growth Factor Receptor I Mediates Resistance to Anti-Epidermal Growth Factor Receptor Therapy in Primary Human Glioblastoma Cells through Continued Activation of Phosphoinositide 3-Kinase Signaling1’, *Cancer Research*, 62(1), pp. 200–207.

Chanut, R. and Petrilli, V. (2019) ‘Détection de l’ADN cytosolique par la voie cGAS-STING - De l’immunité innée vers le contrôle de la tumorigenèse’, *médecine/sciences*, 35(6–7), pp. 527–534. Available at: <https://doi.org/10.1051/medsci/2019095>.

Chen, J. *et al.* (2019) ‘MicroRNA-155 mimics ameliorates nerve conduction velocities and suppresses hyperglycemia-induced pro-inflammatory genes in diabetic peripheral neuropathic mice’, *American Journal of Translational Research*, 11(6), pp. 3905–3918.

Chen, K.-Z. *et al.* (2016) ‘Circulating Tumor DNA Detection in Early-Stage Non-Small Cell Lung Cancer Patients by Targeted Sequencing’, *Scientific Reports*, 6(1), p. 31985. Available at: <https://doi.org/10.1038/srep31985>.

Chi, A. *et al.* (2017) ‘Comparison of particle beam therapy and stereotactic body radiotherapy for early stage non-small cell lung cancer: A systematic review and hypothesis-generating meta-analysis’, *Radiotherapy and Oncology: Journal of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology*, 123(3), pp. 346–354. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.radonc.2017.05.007>.

Christou, N. *et al.* (2020) ‘Neurotensin pathway in digestive cancers and clinical applications: an overview’, *Cell Death & Disease*, 11(12), pp. 1–12. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41419-020-03245-8>.

Conlon, D.M. (2019) ‘Role of sortilin in lipid metabolism’, *Current Opinion in Lipidology*, 30(3), pp. 198–204. Available at: <https://doi.org/10.1097/MOL.0000000000000598>.

Corner, J. *et al.* (2005) ‘Is late diagnosis of lung cancer inevitable? Interview study of patients’ recollections of symptoms before diagnosis’, *Thorax*, 60(4), pp. 314–319. Available at: <https://doi.org/10.1136/thx.2004.029264>.

Dale, B. *et al.* (2021) ‘Advancing targeted protein degradation for cancer therapy’, *Nature Reviews Cancer*, 21(10), pp. 638–654. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41568-021-00365-x>.

Dallas, N.A. *et al.* (2009) ‘Chemoresistant Colorectal Cancer Cells, the Cancer Stem Cell Phenotype, and Increased Sensitivity to Insulin-like Growth Factor-I Receptor Inhibition’, *Cancer Research*, 69(5), pp. 1951–1957. Available at: <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-2023>.

Dayde, D. *et al.* (2016) ‘Nuclear trafficking of EGFR by Vps34 represses Arf expression to promote lung tumor cell survival’, *Oncogene*, 35(30), pp. 3986–3994. Available at: <https://doi.org/10.1038/onc.2015.480>.

Dela Cruz, C.S., Tanoue, L.T. and Matthay, R.A. (2011) ‘Lung cancer: epidemiology, etiology, and prevention’, *Clinics in Chest Medicine*, 32(4), pp. 605–644. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ccm.2011.09.001>.

Dillman, R.O. *et al.* (1990) ‘A randomized trial of induction chemotherapy plus high-dose radiation versus radiation alone in stage III non-small-cell lung cancer’, *The New England Journal of Medicine*, 323(14), pp. 940–945. Available at: <https://doi.org/10.1056/NEJM199010043231403>.

Dittmann, K. *et al.* (2011) ‘Nuclear epidermal growth factor receptor modulates cellular radiosensitivity by regulation of chromatin access’, *Radiotherapy and Oncology: Journal of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology*, 99(3), pp. 317–322. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.radonc.2011.06.001>.

Dittmann, K. *et al.* (2017a) ‘New roles for nuclear EGFR in regulating the stability and translation of mRNAs associated with VEGF signaling’, *PLoS ONE*, 12(12), p. e0189087. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0189087>.

Dittmann, K. *et al.* (2017b) ‘New roles for nuclear EGFR in regulating the stability and translation of mRNAs associated with VEGF signaling’, *PLoS One*, 12(12), p. e0189087. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0189087>.

Donev, I.S. *et al.* (2011) ‘Transient PI3K inhibition induces apoptosis and overcomes HGF-mediated resistance to EGFR-TKIs in EGFR mutant lung cancer’, *Clinical Cancer Research*, 17(8), pp. 2260–2269. Available at: <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-10-1993>.

Du, X. *et al.* (2018) ‘ALK-rearrangement in non-small-cell lung cancer (NSCLC)’, *Thoracic Cancer*, 9(4), pp. 423–430. Available at: <https://doi.org/10.1111/1759-7714.12613>.

Du, Y. *et al.* (2022) ‘HJM-561, a Potent, Selective, and Orally Bioavailable EGFR PROTAC that Overcomes Osimertinib-Resistant EGFR Triple Mutations’, *Molecular Cancer Therapeutics*, 21(7), pp. 1060–1066. Available at: <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-21-0835>.

Dubus, P. (2010) ‘CDK4, cible thérapeutique des adénocarcinomes pulmonaires porteurs d’une mutation de l’oncogène KRAS’, *médecine/sciences*, 26(12), pp. 1023–1025. Available at: <https://doi.org/10.1051/medsci/201026121023>.

Dumaresq-Doiron, K., Jules, F. and Lefrancois, S. (2013) ‘Sortilin turnover is mediated by ubiquitination’, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 433(1), pp. 90–95. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2013.02.059>.

Eck, M.J. and 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), pp. 559–566. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2009.12.010>.

Eckstein, N. *et al.* (2009) ‘Hyperactivation of the Insulin-like Growth Factor Receptor I Signaling Pathway Is an Essential Event for Cisplatin Resistance of Ovarian Cancer Cells’, *Cancer Research*, 69(7), pp. 2996–3003. Available at: <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-3153>.

Eno, M.S. *et al.* (2022) ‘Discovery of BLU-945, a Reversible, Potent, and Wild-Type-Sparing Next-Generation EGFR Mutant Inhibitor for Treatment-Resistant Non-Small-Cell Lung Cancer’, *Journal of Medicinal Chemistry*, 65(14), pp. 9662–9677. Available at: <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.2c00704>.

Ercan, D. *et al.* (2012) ‘Reactivation of ERK Signaling Causes Resistance to EGFR Kinase Inhibitors’, *Cancer Discovery*, 2(10), pp. 934–947. Available at: <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-12-0103>.

Evans, S.F. *et al.* (2011) ‘Neuronal Brain-derived Neurotrophic Factor Is Synthesized in Excess, with Levels Regulated by Sortilin-mediated Trafficking and Lysosomal Degradation’, *Journal of Biological Chemistry*, 286(34), pp. 29556–29567. Available at: <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.219675>.

Fairhead, M. and Howarth, M. (2015) ‘Site-Specific Biotinylation of Purified Proteins Using BirA’, in A. Gautier and M.J. Hinner (eds) *Site-Specific Protein Labeling: Methods and Protocols*. New York, NY: Springer (Methods in Molecular Biology), pp. 171–184. Available at: https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2272-7_12.

Farahi, L. *et al.* (2019) ‘Sortilin as a Novel Diagnostic and Therapeutic Biomarker in Chronic Lymphocytic Leukemia’, *Avicenna Journal of Medical Biotechnology*, 11(4), pp. 270–276.

Farlow, E.C. *et al.* (2010) ‘Development of a Multiplexed Tumor-Associated Autoantibody-Based Blood Test for the Detection of Non-Small Cell Lung Cancer’, *Clinical Cancer*

Research, 16(13), pp. 3452–3462. Available at: <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-09-3192>.

Fauchais, A.-L. *et al.* (2008) ‘Role of endogenous brain-derived neurotrophic factor and sortilin in B cell survival’, *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 181(5), pp. 3027–3038. Available at: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.181.5.3027>.

Ferlenghi, F. *et al.* (2021) ‘A sulfonyl fluoride derivative inhibits EGFR L858R/T790M/C797S by covalent modification of the catalytic lysine’, *European Journal of Medicinal Chemistry*, 225, p. 113786. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2021.113786>.

Fidler-Benaoudia, M.M. *et al.* (2020) ‘Lung cancer incidence in young women vs. young men: A systematic analysis in 40 countries’, *International Journal of Cancer*, 147(3), pp. 811–819. Available at: <https://doi.org/10.1002/ijc.32809>.

Finan, G.M., Okada, H. and Kim, T.-W. (2011) ‘BACE1 retrograde trafficking is uniquely regulated by the cytoplasmic domain of sortilin’, *The Journal of Biological Chemistry*, 286(14), pp. 12602–12616. Available at: <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.170217>.

Fisher, R.A., Gollan, B. and Helaine, S. (2017) ‘Persistent bacterial infections and persister cells’, *Nature Reviews Microbiology*, 15(8), pp. 453–464. Available at: <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.42>.

Gainor, J.F. *et al.* (2013) ‘ALK rearrangements are mutually exclusive with mutations in EGFR or KRAS: an analysis of 1,683 patients with non-small cell lung cancer’, *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 19(15), pp. 4273–4281. Available at: <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-13-0318>.

Garza-Veloz, I. *et al.* (2015) ‘Identification of differentially expressed genes associated with prognosis of B acute lymphoblastic leukemia’, *Disease Markers*, 2015, p. 828145. Available at: <https://doi.org/10.1155/2015/828145>.

Gazdar, A. (2009a) ‘Activating and resistance mutations of EGFR in non-small-cell lung cancer: role in clinical response to EGFR tyrosine kinase inhibitors’, *Oncogene*, 28(Suppl 1), pp. S24–S31. Available at: <https://doi.org/10.1038/onc.2009.198>.

Gazdar, A. (2009b) ‘Activating and resistance mutations of EGFR in non-small-cell lung cancer: role in clinical response to EGFR tyrosine kinase inhibitors’, *Oncogene*, 28(Suppl 1), pp. S24–S31. Available at: <https://doi.org/10.1038/onc.2009.198>.

Gazzeri, S. (2018) ‘L’EGFR nucléaire : un nouveau mode de signalisation dans les cancers’, *Biologie Aujourd’hui*, 212(1–2), pp. 27–33. Available at: <https://doi.org/10.1051/jbio/2018016>.

Geisler, S. *et al.* (2006) ‘Brain neurotensin, psychostimulants, and stress – emphasis on neuroanatomical substrates’, *Peptides*, 27(10), pp. 2364–2384. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2006.03.037>.

Ghaemimanesh, F. *et al.* (2014) ‘The effect of sortilin silencing on ovarian carcinoma cells’, *Avicenna J Med Biotechnol*, 6(3), pp. 169–177.

Ginestier, C. *et al.* (2007) 'La cellule souche cancéreuse - Un pilote aux commandes du cancer du sein', *médecine/sciences*, 23(12), pp. 1133–1140. Available at: <https://doi.org/10.1051/medsci/200723121133>.

Goettsch, C., Kjolby, M. and Aikawa, E. (2018) 'Sortilin and Its Multiple Roles in Cardiovascular and Metabolic Diseases', *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 38(1), pp. 19–25. Available at: <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.117.310292>.

Goldstraw, P. *et al.* (2016) 'The IASLC Lung Cancer Staging Project: Proposals for Revision of the TNM Stage Groupings in the Forthcoming (Eighth) Edition of the TNM Classification for Lung Cancer', *Journal of Thoracic Oncology: Official Publication of the International Association for the Study of Lung Cancer*, 11(1), pp. 39–51. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jtho.2015.09.009>.

Grabe, T., Lategahn, J. and Rauh, D. (2018) 'C797S Resistance: The Undruggable EGFR Mutation in Non-Small Cell Lung Cancer?', *ACS medicinal chemistry letters*, 9(8), pp. 779–782. Available at: <https://doi.org/10.1021/acsmchemlett.8b00314>.

Guler, G.D. *et al.* (2017) 'Repression of Stress-Induced LINE-1 Expression Protects Cancer Cell Subpopulations from Lethal Drug Exposure', *Cancer Cell*, 32(2), pp. 221–237.e13. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2017.07.002>.

Guo, G. *et al.* (2015) 'Ligand-independent EGFR signaling', *Cancer research*, 75(17), pp. 3436–3441. Available at: <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-15-0989>.

Guo, G. *et al.* (2022) 'EGFR ligand shifts the role of EGFR from oncogene to tumour suppressor in EGFR-amplified glioblastoma by suppressing invasion through BIN3 upregulation', *Nature Cell Biology*, 24(8), pp. 1291–1305. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41556-022-00962-4>.

Gustafsen, C. *et al.* (2014) 'The hypercholesterolemia-risk gene SORT1 facilitates PCSK9 secretion', *Cell Metabolism*, 19(2), pp. 310–318. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2013.12.006>.

Hanada, N. *et al.* (2006) 'Co-regulation of B-Myb expression by E2F1 and EGF receptor', *Molecular Carcinogenesis*, 45(1), pp. 10–17. Available at: <https://doi.org/10.1002/mc.20147>.

Hanahan, D. (2022) 'Hallmarks of Cancer: New Dimensions', *Cancer Discovery*, 12(1), pp. 31–46. Available at: <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-21-1059>.

Hanna, N. *et al.* (2017) 'Systemic Therapy for Stage IV Non-Small-Cell Lung Cancer: American Society of Clinical Oncology Clinical Practice Guideline Update', *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 35(30), pp. 3484–3515. Available at: <https://doi.org/10.1200/JCO.2017.74.6065>.

Harrison, P.T., Vyse, S. and Huang, P.H. (2020) 'Rare epidermal growth factor receptor (EGFR) mutations in non-small cell lung cancer', *Seminars in Cancer Biology*, 61, pp. 167–179. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2019.09.015>.

Hata, A.N. *et al.* (2016) ‘Tumor cells can follow distinct evolutionary paths to become resistant to epidermal growth factor receptor inhibition’, *Nature Medicine*, 22(3), pp. 262–269. Available at: <https://doi.org/10.1038/nm.4040>.

He, M. *et al.* (2012) ‘EGFR Exon 19 Insertions: A New Family of Sensitizing EGFR Mutations in Lung Adenocarcinoma’, *Clinical Cancer Research*, 18(6), pp. 1790–1797. Available at: <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-11-2361>.

Hermey, G. (2009) ‘The Vps10p-domain receptor family’, *Cellular and molecular life sciences: CMLS*, 66(16), pp. 2677–2689. Available at: <https://doi.org/10.1007/s00018-009-0043-1>.

Hill, W. *et al.* (2023) ‘Lung adenocarcinoma promotion by air pollutants’, *Nature*, 616(7955), pp. 159–167. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41586-023-05874-3>.

Hirsch, F.R. *et al.* (2017) ‘Lung cancer: current therapies and new targeted treatments’, *Lancet (London, England)*, 389(10066), pp. 299–311. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)30958-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)30958-8).

Hoang, T. *et al.* (2020) ‘Efficacy of Crizotinib, Ceritinib, and Alectinib in ALK-Positive Non-Small Cell Lung Cancer Treatment: A Meta-Analysis of Clinical Trials’, *Cancers*, 12(3), p. 526. Available at: <https://doi.org/10.3390/cancers12030526>.

Houlihan, N.G. *et al.* (2004) ‘Symptom Management of Lung Cancer’, *Clinical Journal of Oncology Nursing*, 8(6), pp. 645–652. Available at: <https://doi.org/10.1188/04.CJON.645-652>.

Hu, F. *et al.* (2010) ‘Sortilin-Mediated Endocytosis Determines Levels of the Fronto-Temporal Dementia Protein, Progranulin’, *Neuron*, 68, pp. 654–67. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2010.09.034>.

Huang, A.C.-C. *et al.* (2021) ‘First- or second-generation epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors in a large, real-world cohort of patients with non-small cell lung cancer’, *Therapeutic Advances in Medical Oncology*, 13, p. 17588359211035710. Available at: <https://doi.org/10.1177/17588359211035710>.

Huang, W.-C. *et al.* (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), pp. 20558–20568. Available at: <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.240796>.

Ilie, M. *et al.* (2014) ‘Current challenges for detection of circulating tumor cells and cell-free circulating nucleic acids, and their characterization in non-small cell lung carcinoma patients. What is the best blood substrate for personalized medicine?’, *Annals of Translational Medicine*, 2(11), p. 107. Available at: <https://doi.org/10.3978/j.issn.2305-5839.2014.08.11>.

Jadhav, K. and Zhang, Y. (2017) ‘Activating transcription factor 3 in immune response and metabolic regulation’, *Liver Research*, 1(2), pp. 96–102. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.livres.2017.08.001>.

Jaganathan, S. *et al.* (2011) ‘A functional nuclear epidermal growth factor receptor, SRC and Stat3 heteromeric complex in pancreatic cancer cells’, *PloS One*, 6(5), p. e19605. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0019605>.

Jakobsen, K.R. *et al.* (2015) ‘Exosomal proteins as potential diagnostic markers in advanced non-small cell lung carcinoma’, *Journal of Extracellular Vesicles*, 4, p. 26659. Available at: <https://doi.org/10.3402/jev.v4.26659>.

Jemal, A. *et al.* (2018) ‘Higher Lung Cancer Incidence in Young Women Than Young Men in the United States’, *New England Journal of Medicine*, 378(21), pp. 1999–2009. Available at: <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1715907>.

Jiang, L. *et al.* (2022) ‘Treating non-small cell lung cancer by targeting the PI3K signaling pathway’, *Chinese Medical Journal*, 135(11), pp. 1272–1284. Available at: <https://doi.org/10.1097/CM9.0000000000002195>.

Johnson, K.F. and Kornfeld, S. (1992) ‘A His-Leu-Leu sequence near the carboxyl terminus of the cytoplasmic domain of the cation-dependent mannose 6-phosphate receptor is necessary for the lysosomal enzyme sorting function.’, *Journal of Biological Chemistry*, 267(24), pp. 17110–17115. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)41900-X](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)41900-X).

Johnson, S.M. *et al.* (2010) ‘Novel Expression Patterns of PI3K/AKT/mTOR Signaling Pathway Components in Colorectal Cancer’, *Journal of the American College of Surgeons*, 210(5), pp. 767–778. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jamcollsurg.2009.12.008>.

Jouida, A. *et al.* (2021) ‘Exosomes: a new perspective in EGFR-mutated lung cancer’, *Cancer Metastasis Reviews*, 40(2), pp. 589–601. Available at: <https://doi.org/10.1007/s10555-021-09962-6>.

Karachaliou, N. *et al.* (2019) ‘EGFR first- and second-generation TKIs—there is still place for them in EGFR-mutant NSCLC patients’, *Translational Cancer Research*, 8(Suppl 1), pp. S23–S47. Available at: <https://doi.org/10.21037/tcr.2018.10.06>.

Karlsson, A. *et al.* (2017) ‘Gene Expression Profiling of Large Cell Lung Cancer Links Transcriptional Phenotypes to the New Histological WHO 2015 Classification’, *Journal of Thoracic Oncology*, 12(8), pp. 1257–1267. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jtho.2017.05.008>.

Kim, D., Xue, J. and Lito, P. (2020) ‘Targeting KRAS G12C: from inhibitory mechanism to modulation of antitumor effect in patients’, *Cell*, 183(4), pp. 850–859. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.09.044>.

Kim, E. *et al.* (2010) ‘Implication of mouse Vps26b-Vps29-Vps35 retromer complex in sortilin trafficking’, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 403(2), pp. 167–171. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2010.10.121>.

Kiss, M. *et al.* (2010) ‘Sortilin is expressed in cultured human keratinocytes and is regulated by cutaneous neuropeptides’, *The Journal of Investigative Dermatology*, 130(11), pp. 2553–2560. Available at: <https://doi.org/10.1038/jid.2010.187>.

Kjolby, M. *et al.* (2010) 'Sort1, Encoded by the Cardiovascular Risk Locus 1p13.3, Is a Regulator of Hepatic Lipoprotein Export', *Cell Metabolism*, 12(3), pp. 213–223. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2010.08.006>.

Kleber, M.E. *et al.* (2010) 'Association of the single nucleotide polymorphism rs599839 in the vicinity of the sortilin 1 gene with LDL and triglyceride metabolism, coronary heart disease and myocardial infarction: The Ludwigshafen Risk and Cardiovascular Health Study', *Atherosclerosis*, 209(2), pp. 492–497. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2009.09.068>.

Kligerman, S. and White, C. (2011) 'Epidemiology of Lung Cancer in Women: Risk Factors, Survival, and Screening', *American Journal of Roentgenology*, 196(2), pp. 287–295. Available at: <https://doi.org/10.2214/AJR.10.5412>.

Klingenberg, R. *et al.* (2013) 'Depletion of FOXP3+ regulatory T cells promotes hypercholesterolemia and atherosclerosis', *The Journal of Clinical Investigation*, 123(3), pp. 1323–1334. Available at: <https://doi.org/10.1172/JCI63891>.

Ko, B., Paucar, D. and Halmos, B. (2017) 'EGFR T790M: revealing the secrets of a gatekeeper', *Lung Cancer (Auckland, N.Z.)*, 8, pp. 147–159. Available at: <https://doi.org/10.2147/LCTT.S117944>.

Kris, M.G. *et al.* (2017) 'Adjuvant Systemic Therapy and Adjuvant Radiation Therapy for Stage I to IIIA Completely Resected Non-Small-Cell Lung Cancers: American Society of Clinical Oncology/Cancer Care Ontario Clinical Practice Guideline Update', *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 35(25), pp. 2960–2974. Available at: <https://doi.org/10.1200/JCO.2017.72.4401>.

Kunz, C. *et al.* (2009) 'Base Excision by Thymine DNA Glycosylase Mediates DNA-Directed Cytotoxicity of 5-Fluorouracil', *PLoS biology*, 7, p. e91. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000091>.

Kurppa, K.J. *et al.* (2020) 'Treatment-Induced Tumor Dormancy through YAP-Mediated Transcriptional Reprogramming of the Apoptotic Pathway', *Cancer Cell*, 37(1), pp. 104–122.e12. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2019.12.006>.

Lacal, J. (2006) 'Changing the course of oncogenesis: The development of tyrosine kinase inhibitors', *Ejc Supplements - EJC SUPPL*, 4, pp. 14–20. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ejcsup.2006.03.002>.

Lahiri, A. *et al.* (2023) 'Lung cancer immunotherapy: progress, pitfalls, and promises', *Molecular Cancer*, 22, p. 40. Available at: <https://doi.org/10.1186/s12943-023-01740-y>.

Lampridis, S. *et al.* (2023) 'Robotic versus Video-Assisted Thoracic Surgery for Lung Cancer: Short-Term Outcomes of a Propensity Matched Analysis', *Cancers*, 15(8), p. 2391. Available at: <https://doi.org/10.3390/cancers15082391>.

Lane, R.F. *et al.* (2012) ‘Vps10 Family Proteins and the Retromer Complex in Aging-Related Neurodegeneration and Diabetes’, *The Journal of Neuroscience*, 32(41), pp. 14080–14086. Available at: <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3359-12.2012>.

Lapeyronnie, E. *et al.* (2021) ‘Sortilin Exhibits Tumor Suppressor-Like Activity by Limiting EGFR Transducing Function’. Rochester, NY. Available at: <https://doi.org/10.2139/ssrn.3895926>.

Lategahn, J. *et al.* (2019) ‘Inhibition of osimertinib-resistant epidermal growth factor receptor EGFR-T790M/C797S’, *Chemical Science*, 10(46), pp. 10789–10801. Available at: <https://doi.org/10.1039/c9sc03445e>.

Lazniewska, J. *et al.* (2023) ‘Dynamic interplay between sortilin and syndecan-1 contributes to prostate cancer progression’, *Scientific Reports*, 13(1), p. 13489. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41598-023-40347-7>.

Le, A. *et al.* (2014) ‘Tumorigenicity of hypoxic respiring cancer cells revealed by a hypoxia–cell cycle dual reporter’, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(34), pp. 12486–12491. Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.1402012111>.

Lefrancois, S. *et al.* (2003) ‘The lysosomal trafficking of sphingolipid activator proteins (SAPs) is mediated by sortilin’, *The EMBO journal*, 22(24), pp. 6430–6437. Available at: <https://doi.org/10.1093/emboj/cdg629>.

Lemmon, M.A., Schlessinger, J. and Ferguson, K.M. (2014) ‘The EGFR Family: Not So Prototypical Receptor Tyrosine Kinases’, *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 6(4), p. a020768. Available at: <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a020768>.

Li, C. *et al.* (2009) ‘Nuclear EGFR contributes to acquired resistance to cetuximab’, *Oncogene*, 28(43), pp. 3801–3813. Available at: <https://doi.org/10.1038/onc.2009.234>.

Li, D. *et al.* (2023) ‘Making the Best Use of Available Weapons for the Inevitable Rivalry-Resistance to EGFR-TKIs’, *Biomedicines*, 11, p. 1141. Available at: <https://doi.org/10.3390/biomedicines11041141>.

Li, J. *et al.* (2018) ‘Sortilin 1 Loss-of-Function Protects Against Cholestatic Liver Injury by Attenuating Hepatic Bile Acid Accumulation in Bile Duct Ligated Mice’, *Toxicological Sciences*, 161(1), pp. 34–47. Available at: <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfx078>.

Li, N., Wang, J. and Zhan, X. (2021) ‘Identification of Immune-Related Gene Signatures in Lung Adenocarcinoma and Lung Squamous Cell Carcinoma’, *Frontiers in Immunology*, 12, p. 752643. Available at: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.752643>.

Liau, B.B. *et al.* (2017) ‘Adaptive Chromatin Remodeling Drives Glioblastoma Stem Cell Plasticity and Drug Tolerance’, *Cell Stem Cell*, 20(2), pp. 233–246.e7. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.stem.2016.11.003>.

- Lim, S.M. *et al.* (2017) ‘Open-Label, Multicenter, Phase II Study of Ceritinib in Patients With Non-Small-Cell Lung Cancer Harboring ROS1 Rearrangement’, *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 35(23), pp. 2613–2618. Available at: <https://doi.org/10.1200/JCO.2016.71.3701>.
- Lim, S.M. *et al.* (2021) ‘1365TiP A phase I/II, open-label study of BBT-176, a triple mutation targeting EGFR TKI, in patients with NSCLC who progressed after prior EGFR TKI therapy’, *Annals of Oncology*, 32, p. S1035. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.annonc.2021.08.1966>.
- Lin, Shiaw Yih *et al.* (2001) ‘Nuclear localization of EGF receptor and its potential new role as a transcription factor’, *Nature cell biology*, 3(9), pp. 802–808. Available at: <https://doi.org/10.1038/ncb0901-802>.
- Lin, S. Y. *et al.* (2001) ‘Nuclear localization of EGF receptor and its potential new role as a transcription factor’, *Nature Cell Biology*, 3(9), pp. 802–808. Available at: <https://doi.org/10.1038/ncb0901-802>.
- Lin, Y., Wang, X. and Jin, H. (2014) ‘EGFR-TKI resistance in NSCLC patients: mechanisms and strategies’, *American Journal of Cancer Research*, 4(5), pp. 411–435.
- Liu, J., Kang, R. and Tang, D. (2022) ‘The KRAS-G12C inhibitor: activity and resistance’, *Cancer Gene Therapy*, 29(7), pp. 875–878. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41417-021-00383-9>.
- Liu, Q. *et al.* (2017) ‘Facilitating identification of minimal protein binding domains by cross-linking mass spectrometry’, *Scientific Reports*, 7(1), p. 13453. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41598-017-13663-y>.
- Lo, H.-W., Xia, W., *et al.* (2005) ‘Novel prognostic value of nuclear epidermal growth factor receptor in breast cancer’, *Cancer Research*, 65(1), pp. 338–348.
- Lo, H.-W., Hsu, S.-C., *et al.* (2005) ‘Nuclear interaction of EGFR and STAT3 in the activation of the iNOS/NO pathway’, *Cancer Cell*, 7(6), pp. 575–589. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2005.05.007>.
- Lo, H.-W. *et al.* (2010) ‘Cyclooxygenase-2 Is a Novel Transcriptional Target of the Nuclear EGFR-STAT3 and EGFRvIII-STAT3 Signaling Axes’, *Molecular Cancer Research*, 8(2), pp. 232–245. Available at: <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-09-0391>.
- Lo, H.-W. and Hung, M.-C. (2006) ‘Nuclear EGFR signalling network in cancers: linking EGFR pathway to cell cycle progression, nitric oxide pathway and patient survival’, *British Journal of Cancer*, 94(2), pp. 184–188. Available at: <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6602941>.
- Magafa, V. *et al.* (2019) ‘Novel stable analogues of the neurotensin C-terminal hexapeptide containing unnatural amino acids’, *Amino acids*, 51(7), pp. 1009–1022. Available at: <https://doi.org/10.1007/s00726-019-02741-2>.

- Marang-van de Mheen, P.J. *et al.* (2001) 'Are women more sensitive to smoking than men? Findings from the Renfrew and Paisley study', *International Journal of Epidemiology*, 30(4), pp. 787–792. Available at: <https://doi.org/10.1093/ije/30.4.787>.
- Marfori, M. *et al.* (2011) 'Molecular basis for specificity of nuclear import and prediction of nuclear localization', *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1813(9), pp. 1562–1577. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2010.10.013>.
- Mari, M. *et al.* (2008) 'SNX1 defines an early endosomal recycling exit for sortilin and mannose 6-phosphate receptors', *Traffic (Copenhagen, Denmark)*, 9(3), pp. 380–393. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2007.00686.x>.
- Marine, J.-C., Dawson, S.-J. and Dawson, M.A. (2020) 'Non-genetic mechanisms of therapeutic resistance in cancer', *Nature Reviews Cancer*, 20(12), pp. 743–756. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41568-020-00302-4>.
- Marsland, M. *et al.* (2023) 'The Membrane Protein Sortilin Is a Potential Biomarker and Target for Glioblastoma', *Cancers*, 15(9), p. 2514. Available at: <https://doi.org/10.3390/cancers15092514>.
- Martin, S., Vincent, J.-P. and Mazella, J. (2003) 'Involvement of the Neurotensin Receptor-3 in the Neurotensin-Induced Migration of Human Microglia', *Journal of Neuroscience*, 23(4), pp. 1198–1205. Available at: <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.23-04-01198.2003>.
- Massa, F. *et al.* (2014) 'Impairment of HT29 Cancer Cells Cohesion by the Soluble Form of Neurotensin Receptor-3', *Genes & Cancer*, 5(7–8), pp. 240–249. Available at: <https://doi.org/10.18632/genesandcancer.22>.
- Matthews, J.R. *et al.* (1995) 'Conformational changes induced by DNA binding of NF-kappa B.', *Nucleic Acids Research*, 23(17), pp. 3393–3402.
- Maynard, A. *et al.* (2020) 'Therapy-Induced Evolution of Human Lung Cancer Revealed by Single-Cell RNA Sequencing', *Cell*, 182(5), pp. 1232–1251.e22. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.07.017>.
- Mazella, J. *et al.* (1998) 'The 100-kDa Neurotensin Receptor Is gp95/Sortilin, A Non-G-Protein-coupled Receptor *', *Journal of Biological Chemistry*, 273(41), pp. 26273–26276. Available at: <https://doi.org/10.1074/jbc.273.41.26273>.
- van Meerbeeck, J.P. and Janssens, A. (2013) 'The seventh tumour–node–metastasis staging system for lung cancer: Sequel or prequel?', *European Journal of Cancer Supplements*, 11(2), pp. 150–158. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ejcsup.2013.07.025>.
- Mikenberg, I. *et al.* (2007) 'Transcription Factor NF-κB Is Transported to the Nucleus via Cytoplasmic Dynein/Dynactin Motor Complex in Hippocampal Neurons', *PLoS ONE*, 2(7), p. e589. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0000589>.

- Mikubo, M. *et al.* (2021) ‘Mechanism of Drug Tolerant Persister Cancer Cells: The Landscape and Clinical Implication for Therapy’, *Journal of Thoracic Oncology*, 16(11), pp. 1798–1809. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jtho.2021.07.017>.
- Mirsadraee, S. *et al.* (2012) ‘The 7th lung cancer TNM classification and staging system: Review of the changes and implications’, *World Journal of Radiology*, 4(4), pp. 128–134. Available at: <https://doi.org/10.4329/wjr.v4.i4.128>.
- Molgaard, S. *et al.* (2016) ‘Soluble sortilin is present in excess and positively correlates with progranulin in CSF of aging individuals’, *Experimental Gerontology*, 84, pp. 96–100. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.exger.2016.09.002>.
- Morinville, A. *et al.* (2004) ‘Internalization and trafficking of neurotensin via NTS3 receptors in HT29 cells’, *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 36(11), pp. 2153–2168. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2004.04.013>.
- Morris, N.J. *et al.* (1998) ‘Sortilin Is the Major 110-kDa Protein in GLUT4 Vesicles from Adipocytes *’, *Journal of Biological Chemistry*, 273(6), pp. 3582–3587. Available at: <https://doi.org/10.1074/jbc.273.6.3582>.
- Munck Petersen, C. *et al.* (1999) ‘Propeptide cleavage conditions sortilin/neurotensin receptor-3 for ligand binding’, *The EMBO journal*, 18(3), pp. 595–604. Available at: <https://doi.org/10.1093/emboj/18.3.595>.
- Naito, T., Shiraishi, H. and Fujiwara, Y. (2021) ‘Brigatinib and lorlatinib: their effect on ALK inhibitors in NSCLC focusing on resistant mutations and central nervous system metastases’, *Japanese Journal of Clinical Oncology*, 51(1), pp. 37–44. Available at: <https://doi.org/10.1093/jjco/hyaa192>.
- Nanavaty, P., Alvarez, M.S. and Alberts, W.M. (2014) ‘Lung cancer screening: advantages, controversies, and applications’, *Cancer Control: Journal of the Moffitt Cancer Center*, 21(1), pp. 9–14. Available at: <https://doi.org/10.1177/107327481402100102>.
- Navarro, V., Vincent, J.-P. and 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), pp. 760–764. Available at: [https://doi.org/10.1016/s0006-291x\(02\)02564-0](https://doi.org/10.1016/s0006-291x(02)02564-0).
- Ng, W.-W. *et al.* (2021) ‘Real-world outcomes of first- and second-generation tyrosine kinase inhibitors first-line in patients with epidermal growth factor receptor mutation-positive non-small cell lung cancer: A retrospective observational cohort study’, *PLoS ONE*, 16(6), p. e0253335. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0253335>.
- Nielsen, M.S. *et al.* (1999) ‘Sortilin/Neurotensin Receptor-3 Binds and Mediates Degradation of Lipoprotein Lipase *’, *Journal of Biological Chemistry*, 274(13), pp. 8832–8836. Available at: <https://doi.org/10.1074/jbc.274.13.8832>.

- Nielsen, M.S. *et al.* (2001) 'The sortilin cytoplasmic tail conveys Golgi–endosome transport and binds the VHS domain of the GGA2 sorting protein', *The EMBO Journal*, 20(9), pp. 2180–2190. Available at: <https://doi.org/10.1093/emboj/20.9.2180>.
- Nilsson, S.K. *et al.* (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), pp. 25920–25927. Available at: <https://doi.org/10.1074/jbc.M802721200>.
- Noronha, A. *et al.* (2022) 'AXL and Error-Prone DNA Replication Confer Drug Resistance and Offer Strategies to Treat EGFR-Mutant Lung Cancer', *Cancer Discovery*, 12(11), pp. 2666–2683. Available at: <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-22-0111>.
- Nyborg, A.C. *et al.* (2006) 'Sortilin, SorCS1b, and SorLA Vps10p sorting receptors, are novel gamma-secretase substrates', *Mol Neurodegener*, 1, p. 3. Available at: <https://doi.org/10.1186/1750-1326-1-3>.
- Nykjaer, A. *et al.* (2004) 'Sortilin is essential for proNGF-induced neuronal cell death', *Nature*, 427(6977), pp. 843–848. Available at: <https://doi.org/10.1038/nature02319>.
- Nykjaer, A. and Willnow, T.E. (2012) 'Sortilin: a receptor to regulate neuronal viability and function', *Trends in Neurosciences*, 35(4), pp. 261–270. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.tins.2012.01.003>.
- Ogawa, K. *et al.* (2016) 'Soluble sortilin is released by activated platelets and its circulating levels are associated with cardiovascular risk factors', *Atherosclerosis*, 249, pp. 110–115. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2016.03.041>.
- Olivera, A. *et al.* (2012) 'Inhibition of the NF- κ B signaling pathway by the curcumin analog, 3,5-Bis(2-pyridinylmethylidene)-4-piperidone (EF31): anti-inflammatory and anti-cancer properties', *International Immunopharmacology*, 12(2), pp. 368–377. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2011.12.009>.
- Ouyang, Q. *et al.* (2017) 'Oncogenic role of neurotensin and neurotensin receptors in various cancers', *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 44(8), pp. 841–846. Available at: <https://doi.org/10.1111/1440-1681.12787>.
- Ouyang, S. *et al.* (2020) 'Mechanism underlying the regulation of sortilin expression and its trafficking function', *Journal of Cellular Physiology*, 235(12), pp. 8958–8971. Available at: <https://doi.org/10.1002/jcp.29818>.
- Pacini, L. *et al.* (2021) 'Tackling Drug Resistance in EGFR Exon 20 Insertion Mutant Lung Cancer', *Pharmacogenomics and Personalized Medicine*, 14, pp. 301–317. Available at: <https://doi.org/10.2147/PGPM.S242045>.
- Paech, D.C. *et al.* (2011) 'A Systematic Review of the Interobserver Variability for Histology in the Differentiation between Squamous and Nonsquamous Non-small Cell Lung Cancer', *Journal of Thoracic Oncology*, 6(1), pp. 55–63. Available at: <https://doi.org/10.1097/JTO.0b013e3181fc0878>.

Pan, Y. *et al.* (2021) ‘The Resistance Mechanisms and Treatment Strategies for ALK-Rearranged Non-Small Cell Lung Cancer’, *Frontiers in Oncology*, 11, p. 713530. Available at: <https://doi.org/10.3389/fonc.2021.713530>.

Park, Jaena *et al.* (2017) ‘Exosome Classification by Pattern Analysis of Surface-Enhanced Raman Spectroscopy Data for Lung Cancer Diagnosis’, *Analytical Chemistry*, 89(12), pp. 6695–6701. Available at: <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.7b00911>.

Parkinson, D.R. *et al.* (2012) ‘Considerations in the development of circulating tumor cell technology for clinical use’, *Journal of Translational Medicine*, 10, p. 138. Available at: <https://doi.org/10.1186/1479-5876-10-138>.

Patz, E. *et al.* (2008) ‘Panel of Serum Biomarkers for the Diagnosis of Lung Cancer’, *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 25, pp. 5578–83. Available at: <https://doi.org/10.1200/JCO.2007.13.5392>.

Pérez-Navarro, E. *et al.* (2005) ‘Brain-derived neurotrophic factor prevents changes in Bcl-2 family members and caspase-3 activation induced by excitotoxicity in the striatum’, *Journal of Neurochemistry*, 92(3), pp. 678–691. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2004.02904.x>.

Petersen, C.M. *et al.* (1997) ‘Molecular Identification of a Novel Candidate Sorting Receptor Purified from Human Brain by Receptor-associated Protein Affinity Chromatography *’, *Journal of Biological Chemistry*, 272(6), pp. 3599–3605. Available at: <https://doi.org/10.1074/jbc.272.6.3599>.

Pinet, S. *et al.* (2016) ‘TrkB-containing exosomes promote the transfer of glioblastoma aggressiveness to YKL-40-inactivated glioblastoma cells’, *Oncotarget*, 7(31), pp. 50349–50364. Available at: <https://doi.org/10.18632/oncotarget.10387>.

Pirault, J. *et al.* (2017) ‘The inflammatory cytokine interferon-gamma inhibits sortilin-1 expression in hepatocytes via the JAK/STAT pathway’, *European Journal of Immunology*, 47(11), pp. 1918–1924. Available at: <https://doi.org/10.1002/eji.201646768>.

Pollak, M. (2008) ‘Insulin and insulin-like growth factor signalling in neoplasia’, *Nature Reviews Cancer*, 8(12), pp. 915–928. Available at: <https://doi.org/10.1038/nrc2536>.

Popper, H.H. (2016) ‘Progression and metastasis of lung cancer’, *Cancer and Metastasis Reviews*, 35(1), pp. 75–91. Available at: <https://doi.org/10.1007/s10555-016-9618-0>.

Psyrrri, A. *et al.* (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), pp. 5856–5862. Available at: <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-05-0420>.

Puisieux, A. (2009) ‘Rôle de la transition épithélio-mésenchymateuse au cours de la progression tumorale’, (9).

Punekar, S.R. *et al.* (2022) ‘Immunotherapy in non-small cell lung cancer: Past, present, and future directions’, *Frontiers in Oncology*, 12, p. 877594. Available at: <https://doi.org/10.3389/fonc.2022.877594>.

Purba, E.R., Saita, E. and Maruyama, I.N. (2017) ‘Activation of the EGF Receptor by Ligand Binding and Oncogenic Mutations: The “Rotation Model”’, *Cells*, 6(2), p. 13. Available at: <https://doi.org/10.3390/cells6020013>.

Qiu, S. *et al.* (2019) ‘Exploratory Analysis of Plasma Neurotensin as a Novel Biomarker for Early Detection of Colorectal Polyp and Cancer’, *Hormones and Cancer*, 10(2), pp. 128–135. Available at: <https://doi.org/10.1007/s12672-019-00364-3>.

Qu, X. *et al.* (2021) ‘Effective degradation of EGFRL858R+T790M mutant proteins by CRBN-based PROTACs through both proteasome and autophagy/lysosome degradation systems’, *European Journal of Medicinal Chemistry*, 218, p. 113328. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2021.113328>.

Quistgaard, E.M. *et al.* (2009) ‘Ligands bind to Sortilin in the tunnel of a ten-bladed beta-propeller domain’, *Nature Structural & Molecular Biology*, 16(1), pp. 96–98. Available at: <https://doi.org/10.1038/nsmb.1543>.

Quistgaard, E.M. *et al.* (2014a) ‘Revisiting the structure of the Vps10 domain of human sortilin and its interaction with neurotensin’, *Protein Science: A Publication of the Protein Society*, 23(9), pp. 1291–1300. Available at: <https://doi.org/10.1002/pro.2512>.

Quistgaard, E.M. *et al.* (2014b) ‘Revisiting the structure of the Vps10 domain of human sortilin and its interaction with neurotensin’, *Protein Sci*, 23(9), pp. 1291–1300. Available at: <https://doi.org/10.1002/pro.2512>.

Raha, D. *et al.* (2014) ‘The Cancer Stem Cell Marker Aldehyde Dehydrogenase Is Required to Maintain a Drug-Tolerant Tumor Cell Subpopulation’, *Cancer Research*, 74(13), pp. 3579–3590. Available at: <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-13-3456>.

Ramirez, M. *et al.* (2016) ‘Diverse drug-resistance mechanisms can emerge from drug-tolerant cancer persister cells’, *Nature Communications*, 7(1), p. 10690. Available at: <https://doi.org/10.1038/ncomms10690>.

Redpath, N.T. and Proud, C.G. (1994) ‘Molecular mechanisms in the control of translation by hormones and growth factors’, *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1220(2), pp. 147–162. Available at: [https://doi.org/10.1016/0167-4889\(94\)90130-9](https://doi.org/10.1016/0167-4889(94)90130-9).

Reita, D. *et al.* (2022) ‘Direct Targeting KRAS Mutation in Non-Small Cell Lung Cancer: Focus on Resistance’, *Cancers*, 14(5), p. 1321. Available at: <https://doi.org/10.3390/cancers14051321>.

Rhost, S. *et al.* (2018) ‘Sortilin inhibition limits secretion-induced progranulin-dependent breast cancer progression and cancer stem cell expansion’, *Breast Cancer Res*, 20(1), p. 137. Available at: <https://doi.org/10.1186/s13058-018-1060-5>.

Richner, M. *et al.* (2019) ‘Sortilin gates neurotensin and BDNF signaling to control peripheral neuropathic pain’, *Science Advances*, 5(6), p. eaav9946. Available at: <https://doi.org/10.1126/sciadv.aav9946>.

Riely, G.J. *et al.* (2008) ‘Frequency and Distinctive Spectrum of KRAS Mutations in Never Smokers with Lung Adenocarcinoma’, *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 14(18), pp. 5731–5734. Available at: <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-08-0646>.

Rodriguez, M.S., Dargemont, C. and Stutz, F. (2004) ‘Nuclear export of RNA’, *Biology of the Cell*, 96(8), pp. 639–655. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.biolcel.2004.04.014>.

Rodriguez-Canales, J., Parra-Cuentas, E. and Wistuba, I.I. (2016) ‘Diagnosis and Molecular Classification of Lung Cancer’, in K.L. Reckamp (ed.) *Lung Cancer*. Cham: Springer International Publishing (Cancer Treatment and Research), pp. 25–46. Available at: https://doi.org/10.1007/978-3-319-40389-2_2.

Roldan Ruiz, J. *et al.* (2023) ‘The Impact of Liquid Biopsies Positive for EGFR Mutations on Overall Survival in Non-Small Cell Lung Cancer Patients’, *Diagnostics*, 13(14), p. 2347. Available at: <https://doi.org/10.3390/diagnostics13142347>.

Roselli, S. *et al.* (2015a) ‘Sortilin is associated with breast cancer aggressiveness and contributes to tumor cell adhesion and invasion’, *Oncotarget*, 6(12), pp. 10473–10486.

Roselli, S. *et al.* (2015b) ‘Sortilin is associated with breast cancer aggressiveness and contributes to tumor cell adhesion and invasion’, *Oncotarget*, 6(12), pp. 10473–10486.

Rossi, G. *et al.* (2017) ‘Detection of ROS1 rearrangement in non-small cell lung cancer: current and future perspectives’, *Lung Cancer: Targets and Therapy*, 8, pp. 45–55. Available at: <https://doi.org/10.2147/LCTT.S120172>.

Russo, A. *et al.* (2019) ‘Heterogeneous Responses to Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) Tyrosine Kinase Inhibitors (TKIs) in Patients with Uncommon EGFR Mutations: New Insights and Future Perspectives in this Complex Clinical Scenario’, *International Journal of Molecular Sciences*, 20(6), p. 1431. Available at: <https://doi.org/10.3390/ijms20061431>.

Saadipour, K. *et al.* (2013) ‘Amyloid beta_{1–42} (Aβ₄₂) up-regulates the expression of sortilin via the p75(NTR)/RhoA signaling pathway’, *Journal of Neurochemistry*, 127(2), pp. 152–162. Available at: <https://doi.org/10.1111/jnc.12383>.

Sahu, A. *et al.* (2013) ‘Crizotinib: A comprehensive review’, *South Asian Journal of Cancer*, 2(2), pp. 91–97. Available at: <https://doi.org/10.4103/2278-330X.110506>.

Salasova, A. *et al.* (2022) ‘Finding memo: versatile interactions of the VPS10p-Domain receptors in Alzheimer’s disease’, *Molecular Neurodegeneration*, 17(1), p. 74. Available at: <https://doi.org/10.1186/s13024-022-00576-2>.

Sanfiorenzo, C. *et al.* (2013) ‘Two Panels of Plasma MicroRNAs as Non-Invasive Biomarkers for Prediction of Recurrence in Resectable NSCLC’, *PLOS ONE*, 8(1), p. e54596. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0054596>.

Scagliotti, G.V. *et al.* (2008) ‘Phase III study comparing cisplatin plus gemcitabine with cisplatin plus pemetrexed in chemotherapy-naïve patients with advanced-stage non-small-cell lung cancer’, *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 26(21), pp. 3543–3551. Available at: <https://doi.org/10.1200/JCO.2007.15.0375>.

Schiller, J.H. *et al.* (2002) ‘Comparison of four chemotherapy regimens for advanced non-small-cell lung cancer’, *The New England Journal of Medicine*, 346(2), pp. 92–98. Available at: <https://doi.org/10.1056/NEJMoa011954>.

Shah, K.N. *et al.* (2019) ‘Aurora kinase A drives the evolution of resistance to third-generation EGFR inhibitors in lung cancer’, *Nature Medicine*, 25(1), pp. 111–118. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41591-018-0264-7>.

Sharma, S.V. *et al.* (2007) ‘Epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer’, *Nat Rev Cancer*, 7(3), pp. 169–181. Available at: <https://doi.org/10.1038/nrc2088>.

Sharma, S.V. *et al.* (2010) ‘A Chromatin-Mediated Reversible Drug-Tolerant State in Cancer Cell Subpopulations’, *Cell*, 141(1), pp. 69–80. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.02.027>.

Shaw, A.T. *et al.* (2009) ‘Clinical features and outcome of patients with non-small-cell lung cancer who harbor EML4-ALK’, *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 27(26), pp. 4247–4253. Available at: <https://doi.org/10.1200/JCO.2009.22.6993>.

Shaw, A.T. *et al.* (2014) ‘Crizotinib in ROS1-rearranged non-small-cell lung cancer’, *The New England Journal of Medicine*, 371(21), pp. 1963–1971. Available at: <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1406766>.

Shen, S., Vagner, S. and Robert, C. (2020) ‘Persistent Cancer Cells: The Deadly Survivors’, *Cell*, 183(4), pp. 860–874. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.10.027>.

Shi, K. *et al.* (2022) ‘Emerging strategies to overcome resistance to third-generation EGFR inhibitors’, *Journal of Hematology & Oncology*, 15, p. 94. Available at: <https://doi.org/10.1186/s13045-022-01311-6>.

Singh, B., Carpenter, G. and Coffey, R.J. (2016) ‘EGF receptor ligands: recent advances’, *F1000Research*, 5, p. F1000 Faculty Rev-2270. Available at: <https://doi.org/10.12688/f1000research.9025.1>.

Site-Specific Biotinylation of Purified Proteins Using BirA | Springer Nature Experiments (no date). Available at: https://experiments.springernature.com/articles/10.1007/978-1-4939-2272-7_12 (Accessed: 13 September 2023).

- Skeldal, S. *et al.* (2012) ‘Mapping of the interaction site between sortilin and the p75 neurotrophin receptor reveals a regulatory role for the sortilin intracellular domain in p75 neurotrophin receptor shedding and apoptosis’, *The Journal of Biological Chemistry*, 287(52), pp. 43798–43809. Available at: <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.374710>.
- Soda, M. *et al.* (2007) ‘Identification of the transforming EML4-ALK fusion gene in non-small-cell lung cancer’, *Nature*, 448(7153), pp. 561–566. Available at: <https://doi.org/10.1038/nature05945>.
- Solomon, B., Wilner, K. and Shaw, A. (2013) ‘Current Status of Targeted Therapy for Anaplastic Lymphoma Kinase–Rearranged Non–Small Cell Lung Cancer’, *Clinical pharmacology and therapeutics*, 95. Available at: <https://doi.org/10.1038/clpt.2013.200>.
- Sun, C. *et al.* (2014) ‘Reversible and adaptive resistance to BRAF(V600E) inhibition in melanoma’, *Nature*, 508(7494), pp. 118–122. Available at: <https://doi.org/10.1038/nature13121>.
- Sun, R. *et al.* (2022) ‘Drug resistance mechanisms and progress in the treatment of EGFR-mutated lung adenocarcinoma (Review)’, *Oncology Letters*, 24(5), pp. 1–16. Available at: <https://doi.org/10.3892/ol.2022.13528>.
- Sung, H. *et al.* (2021) ‘Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries’, *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 71(3), pp. 209–249. Available at: <https://doi.org/10.3322/caac.21660>.
- Sung, H.Y. *et al.* (2018) ‘Aberrant Promoter Hypomethylation of Sortilin 1: A Moyamoya Disease Biomarker’, *Journal of Stroke*, 20(3), pp. 350–361. Available at: <https://doi.org/10.5853/jos.2018.00962>.
- Sutedja, G. (2003) ‘New techniques for early detection of lung cancer’, *European Respiratory Journal*, 21(39 suppl), pp. 57s–66s. Available at: <https://doi.org/10.1183/09031936.03.00405303>.
- Takatsu, H. *et al.* (2001) ‘Golgi-localizing, γ -Adaptin Ear Homology Domain, ADP-ribosylation Factor-binding (GGA) Proteins Interact with Acidic Dileucine Sequences within the Cytoplasmic Domains of Sorting Receptors through Their Vps27p/Hrs/STAM (VHS) Domains *’, *Journal of Biological Chemistry*, 276(30), pp. 28541–28545. Available at: <https://doi.org/10.1074/jbc.C100218200>.
- Tanaka, K. *et al.* (2021) ‘Targeting Aurora B kinase prevents and overcomes resistance to EGFR inhibitors in lung cancer by enhancing BIM- and PUMA-mediated apoptosis’, *Cancer Cell*, 39(9), pp. 1245–1261.e6. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2021.07.006>.
- Taniguchi, H. *et al.* (2019) ‘AXL confers intrinsic resistance to osimertinib and advances the emergence of tolerant cells’, *Nat Commun*, 10(1), p. 259. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41467-018-08074-0>.

Tanimoto, R. *et al.* (2015a) ‘Sortilin regulates progranulin action in castration-resistant prostate cancer cells’, *Endocrinology*, 156(1), pp. 58–70. Available at: <https://doi.org/10.1210/en.2014-1590>.

Tanimoto, R. *et al.* (2015b) ‘Sortilin regulates progranulin action in castration-resistant prostate cancer cells’, *Endocrinology*, 156(1), pp. 58–70. Available at: <https://doi.org/10.1210/en.2014-1590>.

Tann, J.Y. *et al.* (2019) ‘Abnormal TDP-43 function impairs activity-dependent BDNF secretion, synaptic plasticity, and cognitive behavior through altered Sortilin splicing’, *The EMBO journal*, 38(5), p. e100989. Available at: <https://doi.org/10.15252/emj.2018100989>.

Teng, H.K. *et al.* (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), pp. 5455–5463. Available at: <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5123-04.2005>.

Thoenen, H. (1995) ‘Neurotrophins and neuronal plasticity’, *Science (New York, N.Y.)*, 270(5236), pp. 593–598. Available at: <https://doi.org/10.1126/science.270.5236.593>.

Thun, M.J. *et al.* (2008) ‘Lung Cancer Occurrence in Never-Smokers: An Analysis of 13 Cohorts and 22 Cancer Registry Studies’, *PLOS Medicine*, 5(9), p. e185. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.0050185>.

Tian, X. *et al.* (2022) ‘Challenge and countermeasures for EGFR targeted therapy in non-small cell lung cancer’, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*, 1877(1), p. 188645. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2021.188645>.

To, C. *et al.* (2019) ‘Single and Dual Targeting of Mutant EGFR with an Allosteric Inhibitor’, *Cancer Discovery*, 9(7), pp. 926–943. Available at: <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-18-0903>.

To, C. *et al.* (2022) ‘An allosteric inhibitor against the therapy-resistant mutant forms of EGFR in non-small cell lung cancer’, *Nature Cancer*, 3(4), pp. 402–417. Available at: <https://doi.org/10.1038/s43018-022-00351-8>.

Tomas, A., Futter, C.E. and Eden, E.R. (2014) ‘EGF receptor trafficking: consequences for signaling and cancer’, *Trends in Cell Biology*, 24(1), pp. 26–34. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2013.11.002>.

Touil, Y. *et al.* (2014) ‘Colon Cancer Cells Escape 5FU Chemotherapy-Induced Cell Death by Entering Stemness and Quiescence Associated with the c-Yes/YAP Axis’, *Clinical Cancer Research*, 20(4), pp. 837–846. Available at: <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-13-1854>.

Travis, W.D. *et al.* (2013) ‘Diagnosis of lung adenocarcinoma in resected specimens: implications of the 2011 International Association for the Study of Lung Cancer/American Thoracic Society/European Respiratory Society classification’, *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, 137(5), pp. 685–705. Available at: <https://doi.org/10.5858/arpa.2012-0264-RA>.

- Traynor, A.M. *et al.* (2013) ‘Nuclear EGFR protein expression predicts poor survival in early stage non-small cell lung cancer’, *Lung Cancer (Amsterdam, Netherlands)*, 81(1), pp. 138–141. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.lungcan.2013.03.020>.
- Tricker, E.M. *et al.* (2015) ‘Combined EGFR/MEK Inhibition Prevents the Emergence of Resistance in EGFR-Mutant Lung Cancer’, *Cancer Discovery*, 5(9), pp. 960–971. Available at: <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-15-0063>.
- Tsuchiya, Y. *et al.* (2010) ‘Palmitate-induced Down-regulation of Sortilin and Impaired GLUT4 Trafficking in C2C12 Myotubes *’, *Journal of Biological Chemistry*, 285(45), pp. 34371–34381. Available at: <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.128520>.
- Tu, C. *et al.* (2010) ‘Endosomal-sorting complexes required for transport (ESCRT) pathway-dependent endosomal traffic regulates the localization of active Src at focal adhesions’, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(37), pp. 16107–16112. Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.1009471107>.
- Uchibori, K. *et al.* (2017) ‘Brigatinib combined with anti-EGFR antibody overcomes osimertinib resistance in EGFR-mutated non-small-cell lung cancer’, *Nature Communications*, 8, p. 14768. Available at: <https://doi.org/10.1038/ncomms14768>.
- Underhill, H.R. *et al.* (2016) ‘Fragment Length of Circulating Tumor DNA’, *PLOS Genetics*, 12(7), p. e1006162. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1006162>.
- Unni, A.M. *et al.* (2015) ‘Evidence that synthetic lethality underlies the mutual exclusivity of oncogenic KRAS and EGFR mutations in lung adenocarcinoma’, *eLife*. Edited by C.V. Dang, 4, p. e06907. Available at: <https://doi.org/10.7554/eLife.06907>.
- Vaegter, C.B. *et al.* (2011) ‘Sortilin associates with Trk receptors to enhance anterograde transport and neurotrophin signaling’, *Nature Neuroscience*, 14(1), pp. 54–61. Available at: <https://doi.org/10.1038/nn.2689>.
- Vincent, J.P., Mazella, J. and Kitabgi, P. (1999) ‘Neurotensin and neurotensin receptors’, *Trends in Pharmacological Sciences*, 20(7), pp. 302–309. Available at: [https://doi.org/10.1016/s0165-6147\(99\)01357-7](https://doi.org/10.1016/s0165-6147(99)01357-7).
- Wan, F. and Lenardo, M.J. (2010) ‘The Nuclear Signaling of NF- κ B – Current Knowledge, New Insights, and Future Perspectives’, *Cell research*, 20(1), pp. 24–33. Available at: <https://doi.org/10.1038/cr.2009.137>.
- Wang, M., Herbst, R.S. and Boshoff, C. (2021) ‘Toward personalized treatment approaches for non-small-cell lung cancer’, *Nature Medicine*, 27(8), pp. 1345–1356. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41591-021-01450-2>.
- Wang, S. *et al.* (2016) ‘EGFR C797S mutation mediates resistance to third-generation inhibitors in T790M-positive non-small cell lung cancer’, *Journal of Hematology & Oncology*, 9(1), p. 59. Available at: <https://doi.org/10.1186/s13045-016-0290-1>.

- Wang, S. *et al.* (2019) 'Different characteristics and survival in non-small cell lung cancer patients with primary and acquired EGFR T790M mutation', *International Journal of Cancer*, 144(11), pp. 2880–2886. Available at: <https://doi.org/10.1002/ijc.32015>.
- Wang, S.-C. and Hung, M.-C. (2009) 'Nuclear Translocation of the EGFR family Membrane Tyrosine Kinase Receptors', *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*, 15(21), pp. 6484–6489. Available at: <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-08-2813>.
- Wang, Y.-N. and Hung, M.-C. (2012) 'Nuclear functions and subcellular trafficking mechanisms of the epidermal growth factor receptor family', *Cell & Bioscience*, 2(1), p. 13. Available at: <https://doi.org/10.1186/2045-3701-2-13>.
- Wang, Z. (2016) 'Transactivation of Epidermal Growth Factor Receptor by G Protein-Coupled Receptors: Recent Progress, Challenges and Future Research', *International Journal of Molecular Sciences*, 17(1), p. 95. Available at: <https://doi.org/10.3390/ijms17010095>.
- Wang, Z. *et al.* (2019) '4E-BP1 Is a Tumor Suppressor Protein Reactivated by mTOR Inhibition in Head and Neck Cancer', *Cancer Res*, 79(7), pp. 1438–1450. Available at: <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-18-1220>.
- Waters, A.M. and Der, C.J. (2018) 'KRAS: The Critical Driver and Therapeutic Target for Pancreatic Cancer', *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 8(9), p. a031435. Available at: <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a031435>.
- Westergaard, U.B. *et al.* (2004) 'Functional Organization of the Sortilin Vps10p Domain *', *Journal of Biological Chemistry*, 279(48), pp. 50221–50229. Available at: <https://doi.org/10.1074/jbc.M408873200>.
- Wilson, C.M. *et al.* (2014) 'Sortilin mediates the release and transfer of exosomes in concert with two tyrosine kinase receptors', *Journal of Cell Science*, 127(Pt 18), pp. 3983–3997. Available at: <https://doi.org/10.1242/jcs.149336>.
- Wilson, C.M. *et al.* (2016) 'A new role under sortilin's belt in cancer', *Communicative & Integrative Biology*, 9(1), p. e1130192. Available at: <https://doi.org/10.1080/19420889.2015.1130192>.
- Wolf, C. *et al.* (2016) 'RPA and Rad51 constitute a cell intrinsic mechanism to protect the cytosol from self DNA', *Nature Communications*, 7(1), p. 11752. Available at: <https://doi.org/10.1038/ncomms11752>.
- Wu, L. *et al.* (2020) 'Development of EGFR TKIs and Options to Manage Resistance of Third-Generation EGFR TKI Osimertinib: Conventional Ways and Immune Checkpoint Inhibitors', *Frontiers in Oncology*, 10. Available at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fonc.2020.602762> (Accessed: 29 September 2023).

Xie, Q. *et al.* (2013) ‘YAP/TEAD-mediated transcription controls cellular senescence’, *Cancer Research*, 73(12), pp. 3615–3624. Available at: <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-12-3793>.

Xiong, J. *et al.* (2013) ‘ProBDNF and its receptors are upregulated in glioma and inhibit the growth of glioma cells in vitro’, *Neuro-Oncology*, 15(8), pp. 990–1007. Available at: <https://doi.org/10.1093/neuonc/not039>.

Xu, C.-W. *et al.* (2020) ‘Molecular Characteristics and Clinical Outcomes of EGFR Exon 19 C-Helix Deletion in Non-Small Cell Lung Cancer and Response to EGFR TKIs’, *Translational Oncology*, 13(9), p. 100791. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.tranon.2020.100791>.

Xu, S.-Y. *et al.* (2018) ‘Sortilin: a new player in dementia and Alzheimer-type neuropathology’, *Biochemistry and Cell Biology*, 96(5), pp. 491–497. Available at: <https://doi.org/10.1139/bcb-2018-0023>.

Yabe-Wada, T. *et al.* (2016) ‘TLR signals posttranscriptionally regulate the cytokine trafficking mediator sortilin’, *Scientific Reports*, 6(1), p. 26566. Available at: <https://doi.org/10.1038/srep26566>.

Yang, M. *et al.* (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 *’, *Journal of Biological Chemistry*, 286(18), pp. 16272–16284. Available at: <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.195347>.

Yang, M. *et al.* (2013a) ‘The Intracellular Domain of Sortilin Interacts with Amyloid Precursor Protein and Regulates Its Lysosomal and Lipid Raft Trafficking’, *PLOS ONE*, 8(5), p. e63049. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0063049>.

Yang, M. *et al.* (2013b) ‘The Intracellular Domain of Sortilin Interacts with Amyloid Precursor Protein and Regulates Its Lysosomal and Lipid Raft Trafficking’, *PLOS ONE*, 8(5), p. e63049. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0063049>.

Yang, W., Wu, P., *et al.* (2019) ‘Sortilin promotes glioblastoma invasion and mesenchymal transition through GSK-3 β / β -catenin/twist pathway’, *Cell Death Dis*, 10(3), pp. 1–15. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41419-019-1449-9>.

Yang, W., Wu, P.-F., *et al.* (2019) ‘Sortilin promotes glioblastoma invasion and mesenchymal transition through GSK-3 β / β -catenin/twist pathway’, *Cell Death & Disease*, 10(3), p. 208. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41419-019-1449-9>.

Yang, W. *et al.* (2021) ‘Presenilin1 inhibits glioblastoma cell invasiveness via promoting Sortilin cleavage’, *Cell communication and signaling*, 19(1), p. 112. Available at: <https://doi.org/10.1186/s12964-021-00780-5>.

Yarden, Y. (2001) ‘The EGFR family and its ligands in human cancer: signalling mechanisms and therapeutic opportunities’, *European Journal of Cancer*, 37, pp. 3–8. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0959-8049\(01\)00230-1](https://doi.org/10.1016/S0959-8049(01)00230-1).

- Ye, S. *et al.* (2022) ‘Sortilin 1 regulates hepatocellular carcinoma progression by activating the PI3K/AKT signaling’, *Human & Experimental Toxicology*, 41, p. 09603271221140111. Available at: <https://doi.org/10.1177/09603271221140111>.
- Yim, S.-H. and Chung, Y.-J. (2011) ‘Molecular Epidemiology of Female Lung Cancer’, *Cancers*, 3(2), pp. 1861–1876. Available at: <https://doi.org/10.3390/cancers3021861>.
- Yu, H.A. and Riely, G.J. (2013) ‘Second-generation epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors in lung cancers’, *Journal of the National Comprehensive Cancer Network: JNCCN*, 11(2), pp. 161–169. Available at: <https://doi.org/10.6004/jnccn.2013.0024>.
- Yu, M. *et al.* (2018) ‘YAP1 contributes to NSCLC invasion and migration by promoting Slug transcription via the transcription co-factor TEAD’, *Cell Death & Disease*, 9(5), pp. 1–13. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41419-018-0515-z>.
- Yue, S. *et al.* (2021) ‘PGRN^{-/-} TAMs-derived exosomes inhibit breast cancer cell invasion and migration and its mechanism exploration’, *Life Sciences*, 264, p. 118687. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2020.118687>.
- Yuza, Y. *et al.* (2007) ‘Allele-dependent variation in the relative cellular potency of distinct EGFR inhibitors’, *Cancer Biology & Therapy*, 6(5), pp. 661–667. Available at: <https://doi.org/10.4161/cbt.6.5.4003>.
- Zanetti-Domingues, L.C. *et al.* (2020) ‘Cooperation and Interplay between EGFR Signalling and Extracellular Vesicle Biogenesis in Cancer’, *Cells*, 9(12), p. 2639. Available at: <https://doi.org/10.3390/cells9122639>.
- Zhang, Y. *et al.* (2014) ‘Patients with Exon 19 Deletion Were Associated with Longer Progression-Free Survival Compared to Those with L858R Mutation after First-Line EGFR-TKIs for Advanced Non-Small Cell Lung Cancer: A Meta-Analysis’, *PLOS ONE*, 9(9), p. e107161. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0107161>.
- Zhang, Z. *et al.* (2018) ‘The miR-182/SORT1 axis regulates vascular smooth muscle cell calcification in vitro and in vivo’, *Experimental Cell Research*, 362(2), pp. 324–331. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2017.11.033>.
- Zhao, H.-Y. *et al.* (2020) ‘Discovery of potent small molecule PROTACs targeting mutant EGFR’, *European Journal of Medicinal Chemistry*, 208, p. 112781. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2020.112781>.
- Zheng, Y. *et al.* (2011) ‘C-terminus of progranulin interacts with the beta-propeller region of sortilin to regulate progranulin trafficking’, *PloS One*, 6(6), p. e21023. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0021023>.
- Zhu, Y. *et al.* (2023) ‘Genome-wide mapping of protein-DNA damage interaction by PADD-seq’, *Nucleic Acids Research*, 51(6), p. e32. Available at: <https://doi.org/10.1093/nar/gkad008>.

Résumé

La sortiline, une glycoprotéine de la famille Vps10, est largement reconnue pour son rôle déterminant dans le tri des protéines. Son double rôle en oncologie, tantôt en tant que promoteur, tantôt en tant que suppresseur de tumeurs, a suscité de nombreux débats. Dans le cancer bronchique non à petites cellules (CBNPC), une corrélation inverse a été observée entre l'expression de la sortiline et la croissance tumorale, ainsi que la gravité de la tumeur. Identifiée comme un nouvel inhibiteur membranaire, la sortiline pourrait remodeler le trafic de l'EGFR. Elle offre une voie prometteuse pour limiter la signalisation proliférative et contrecarrer la résistance aux inhibiteurs de l'EGFR, spécialement dans les CBNPC porteurs de mutations de l'EGFR. Devant l'absence de données concernant la localisation nucléaire et le rôle de la sortiline à ce niveau, notre équipe a mis en lumière une colocalisation de celle-ci avec l'EGFR dans le noyau. De plus, une interaction avec la chromatine et une compétition de la sortiline avec l'EGFR ont été observées sur les sites d'initiation de la transcription (TSS) des gènes ciblés par l'EGFR. Ceci pointe vers une influence potentielle de la sortiline sur la transcription génique, notamment par son intervention dans le recrutement de l'ARN polymérase II. Dans la présente étude, nous montrons que la sortiline joue un rôle nucléaire bien plus prépondérant que ce qui était précédemment admis, ce qui complète son rôle connu de suppresseur de tumeurs. Nos analyses transcriptomiques, menées sur des lignées de LUAD, ont révélé que la sortiline régule à la baisse un vaste ensemble de gènes impliqués dans des voies oncogéniques, outre les gènes cibles de l'EGFR. Ce rôle semble être intrinsèquement lié à la régulation de la transcription de l'ADN et à l'organisation chromatiniennne orchestrée par la sortiline. La sortiline serait aussi capable de s'associer à des protéines clés impliquées dans ces mécanismes au niveau du noyau. Ces résultats remettent en question la vision traditionnelle de la sortiline, qui dépasse désormais le simple cadre du tri protéique. Ils mettent en lumière ses fonctions variées dans diverses tumeurs. Plus encore, la sortiline se profile comme une cible thérapeutique d'intérêt pour élaborer des stratégies innovantes contre le LUAD.

Mots-clés : Sortiline, Rôle nucléaire, Cancer du poumon, Mécanisme de transcription, Voies oncogéniques

Summary

Sortilin, a glycoprotein from the Vps10 family, is widely recognized for its crucial role in protein sorting. Its dual role in oncology, sometimes as a promoter and sometimes as a tumor suppressor, has sparked numerous debates. In non-small cell lung cancer (NSCLC), an inverse correlation has been observed between sortilin expression and tumor growth, as well as tumor severity. Identified as a novel membranous inhibitor, sortilin could reshape the trafficking of the epidermal growth factor receptor (EGFR). It offers a promising avenue to limit proliferative signaling and counteract resistance to EGFR inhibitors, especially in NSCLC with EGFR mutations. Facing the lack of data regarding sortilin's nuclear localization and role at this level, our team has highlighted its colocalization with EGFR in the nucleus. Additionally, an interaction with chromatin and a competition of sortilin with EGFR have been observed at the transcription start sites (TSS) of EGFR-targeted genes. This points to a potential influence of sortilin on gene transcription, particularly through its involvement in recruiting RNA polymerase II. In the present study, we show that sortilin plays a more significant nuclear role than previously admitted, complementing its known role as a tumor suppressor. Our transcriptomic analyses, conducted on LUAD cell lines, revealed that sortilin downregulates a vast array of genes involved in oncogenic pathways, besides EGFR target genes. This role seems to be inherently linked to the regulation of DNA transcription and chromatin organization orchestrated by sortilin. Sortilin may also associate with key proteins involved in these mechanisms at the nuclear level. These results challenge the traditional view of sortilin, which now goes beyond the mere framework of protein sorting. They shed light on its varied functions in different tumors. Furthermore, sortilin is emerging as a therapeutic target of interest for developing innovative strategies against LUAD.

Keywords: Sortilin, Nuclear role, Lung cancer, Transcription mechanism, Oncogenic pathways

