

# THESE DE DOCTORAT DE

L'UNIVERSITE DE NANTES  
COMUE UNIVERSITE BRETAGNE LOIRE

ECOLE DOCTORALE N° 605  
*Biologie Santé*  
Spécialité : « *Cancérologie* »

Par

« **Judith RAIMBOURG** »

«**Effet du cisplatine sur la sensibilité des cancers bronchiques non à petites cellules EGFR sauvage aux inhibiteurs de tyrosine kinase anti EGFR**»

Thèse présentée et soutenue à Nantes, le 20/09/2018

Unité de recherche : U1232

Thèse N° :

**Rapporteurs avant soutenance :**      **Composition du Jury :**

**Annette K Larsen**                      Directrice de recherche  
Centre de recherche hôpital Saint-Antoine

**Francois Vallette**    Directeur de recherche Centre  
de recherche en cancérologie et immunologie  
Nantes-Angers

**Gilles Favre**                      PU-PH Institut de  
recherche en cancérologie de Toulouse

**Luc Friboulet**                      Chargé de recherche  
Institut Gustave Roussy

Directeur de thèse  
**Jaafar Bennouna**    PU-PH CHU de Nantes

Co-encadrant de thèse  
**Lisenn Lalier**                      Chargée de recherche  
Institut de cancérologie de l'Ouest centre René  
Gauducheau

## Remerciements

---

### Remerciements

Je remercie le Dr François Valette de m'avoir accueillie au sein de son équipe et de m'avoir permis de réaliser cette thèse.

Je remercie le Dr Lisenn Lalier qui m'a encadré tout au long de cette thèse et sans qui rien n'aurait abouti. Ton incroyable capacité de synthèse, à toujours trouver une solution, ta rigueur et ta maîtrise des techniques m'ont toujours impressionné. J'ai vraiment eu plaisir à travailler avec toi et rien que pour ça cette thèse valait le coup. J'espère que cette collaboration va se poursuivre.

Je remercie le Dr Annette Larsen et le Pr Gilles Favre d'avoir accepté d'être les rapporteurs de cette thèse. Je vous en suis très reconnaissante.

Je remercie le Dr Luc Friboulet d'avoir accepté d'être membre du jury.

Je remercie le Pr Jaafar Bennouna d'avoir dirigé cette thèse et plus généralement d'avoir accompagné mes débuts dans l'oncologie médicale. J'ai beaucoup appris à vos côtés toujours dans la bonne humeur.

Un grand merci à Marie-Pierre Joalland qui m'a formé et a participé à la réalisation de l'ensemble des expériences de ce travail de thèse et a permis à celui-ci d'aboutir. Merci aussi pour toutes les discussions extra professionnelles qui ont egayé tout le temps passé au labo. J'espère qu'on continuera à travailler ensemble.

Merci aussi à Didier Lanoë qui m'a aidé dans la réalisation de certaines expériences. Grâce à toi le western blot n'a plus de secret pour moi.

Merci à Mathilde Cabart qui a initié ce travail et à Marie et Valentine qui l'ont poursuivi. Je suis ravie de travailler avec vous. Courage Valentine c'est la dernière ligne droite.

Merci au Dr Amandine Hurbin, au Dr Marc Gregoire et au Pr Fabrice Barlesi pour le comité de suivi de thèse.

Merci à la fondation pour la recherche médicale et à l'ICO ainsi qu'Ariel Savina et Fanny Bouquet qui ont permis le financement de cette thèse.

Je souhaite remercier toutes les personnes de l'équipe 9 qui m'ont aidé dans ce travail par leurs précieux conseils en particulier PEF et Shankar. Merci à François Paris pour les

## Remerciements

---

rapprochements équipe 9-équipe 14 et qui devrait monter une agence matrimoniale. Ces années au labo ont permis de nouer des amitiés, un petit coucou à Omar, Quentin, Potiron, Carole, Julien, Cynthia et Mazene.

Un grand merci à mes parents et mon frère qui me soutiennent depuis toujours.

Enfin un remerciement tout particulier à Denis qui partage ma vie et fait mon bonheur au quotidien et qui me permet d'envisager l'avenir avec sérénité.

# Remerciements

---

A mon fils Alexis,

### Résumé

Les inhibiteurs de tyrosine kinase (ITK) anti EGFR ont très nettement amélioré la survie des patients atteints de cancers bronchiques non à petites cellules (CBNPC) métastatiques porteurs d'une mutation activatrice d'EGFR. En l'absence de mutation activatrice, le bénéfice de ces traitements est marginal et semble conditionné par l'utilisation préalable de la chimiothérapie. Dans cette étude, l'exposition préalable de cellules de CBNPC EGFR sauvage à des doses sub-léthales de cisplatine induit une augmentation de la phosphorylation d'EGFR augmentant la sensibilité de ces cellules à l'erlotinib, ITK anti-EGFR, in vitro et in vivo, contrairement à l'effet observé sur des cellules EGFR mutées. Cette activation d'EGFR est liée à la transactivation du récepteur par Src selon un mécanisme indépendant des ligands d'EGFR mais impliquant l'IL6. Cette activation d'EGFR ligand indépendante est corrélée à l'activation de la voie interféron de type 1 en particulier de TBK1, IRF3 et l'augmentation de l'expression de deux de leurs gènes cible IFIT1 et IFI27. L'augmentation de l'expression d'IFIT1 et d'IFI27 ainsi que de l'IL6 sont des marqueurs robustes de la sensibilisation aux ITK induite par le cisplatine in vitro et in vivo. Enfin les résultats de notre étude suggèrent un rôle important dans cette sensibilisation de la localisation mitochondriale d'EGFR possiblement induite par la phosphorylation de la tyrosine 845, cible privilégiée de Src. Cette sensibilisation pourrait être liée au rôle joué par l'EGFR mitochondrial dans la dynamique et la morphologie mitochondriale ainsi que dans le métabolisme cellulaire.

**Mots clés :** Cancer bronchique non à petite cellules, EGFR sauvage, cisplatine, sensibilisation, erlotinib.

### **Abstract:**

Anti-EGFR tyrosine kinase inhibitors (ITKs) have markedly improved the overall survival of patients with metastatic non-small cell lung cancer (NSCLC) with an EGFR activating mutation. In the absence of activating mutation, the benefit of these treatments is marginal and seems conditioned by the prior use of chemotherapy. In this study, prior exposure of wild-type EGFR NSCLC cells to sub-lethal doses of cisplatin induces an increase in EGFR phosphorylation increasing the sensitivity of these cells to erlotinib, anti-EGFR TKI, in vitro and in vivo, contrary to the effect observed on mutated EGFR cells. This activation of EGFR is related to the transactivation of the receptor by Src according to an independent mechanism of the EGFR ligands but involving IL6. This independent ligand activation of EGFR is correlated with the activation of the type 1 interferon pathway, in particular TBK1, IRF3, and the increase in the expression of two of their targeted genes IFIT1 and IFI27. Increasing expression of IFIT1 and IFI27 as well as IL6 are robust markers of cisplatin-induced ITK sensitization in vitro and in vivo. Finally the results of our study suggest an important role in this sensitization of the mitochondrial localization of EGFR, possibly induced by the phosphorylation of tyrosine 845, tyrosine target of Src. This sensitization could be related to the role played by the mitochondrial EGFR in the dynamics and the mitochondrial morphology as well as in the cellular metabolism.

**Key words:** non-small cell lung cancer, wild type EGFR, cisplatin, sensitization, erlotinib

## Tables des matières

INTRODUCTION .....	12
1. Le cancer bronchique .....	13
1.1 Classification histologique des carcinomes bronchiques non à petites cellules .....	13
1.2 Classification moléculaire des carcinomes bronchiques non à petites cellules.....	14
1.2.1 Anomalies moléculaires des adénocarcinomes. ....	16
1.3 Traitements des cancers bronchiques métastatiques .....	18
1.3.1 Traitements des cancers bronchiques avec mutations activatrices d'EGFR .....	18
1.3.1.1 L'Erlotinib.....	18
1.3.2 Traitements des cancers bronchiques avec translocation d'ALK.....	21
1.3.3 Traitements des cancers bronchiques sans anomalies moléculaires.....	22
1.3.3.1 La chimiothérapie.....	22
1.3.3.2 L'immunothérapie .....	22
1.3.3.3 Traitements anti EGFR.....	23
1.3.3.3.1 Anticorps monoclonaux anti-EGFR.....	24
1.3.3.3.2 ITK anti-EGFR : l'erlotinib.....	24
1.4 Marqueurs prédictifs de réponse aux ITK anti EGFR pour les patients EGFR sauvage. ....	26
2 EGFR et cancers .....	27
2.1 Structure de l'EGFR.....	28
2.2 Activation d'EGFR .....	28
2.2.1 Activation ligand dépendante .....	29
2.2.1.1 Ligands d'EGFR .....	30
2.2.1.2 Voies de signalisation induites par l'activation ligand dépendante .....	31
2.2.1.2.1 Voie Ras/Raf/MEK/Erk.....	31
2.2.1.2.2 Voie PI3K/Akt/mTOR .....	32
2.2.1.2.3 Voie JAK/STAT .....	33
2.2.1.2.4 Voie PLC-γ et PKC .....	34

# Table des matières

---

2.2.2	Activation d'EGFR indépendante des ligands.....	34
2.2.2.1	Autophosphorylation d'EGFR en présence d'une mutation activatrice.....	34
2.2.2.2	Autophosphorylation d'EGFR sauvage .....	37
2.2.2.3	Transactivation d'EGFR.....	37
2.2.2.3.1	Src et EGFR .....	38
2.2.2.4	Voies de signalisation activées par la voie ligand indépendante. ....	41
2.2.2.4.1	Activation des voies canoniques Erk et Akt.....	41
2.2.2.4.2	Activation de la voie IRF 3-TBK1.....	41
2.3	Régulation d'EGFR .....	42
2.4	EGFR nucléaire et mitochondrial.....	44
3	Le Cisplatine.....	45
3.1	Structure et mécanismes d'action.....	46
3.2	Interactions Cisplatine et EGFR .....	49
3.2.1	Activation d'EGFR par le cisplatine.....	49
3.2.2	Régulation de l'internalisation d'EGFR par le cisplatine .....	50
4	Objectif de la thèse.....	51
	MATERIELS ET METHODES .....	52
	Culture cellulaire .....	53
	Xénogreffes de tumeurs dérivées de patients (PDX) .....	53
	Réalisation des milieux conditionnés .....	55
	Dosage des molécules solubles par ELISA .....	55
	Test de viabilité cellulaire.....	55
	Mesure de l'IC 50 par MTT .....	56
	Immuno-cytochimie .....	56
	Cytométrie en flux.....	57
	Analyse des interactions protéine-protéine par ligation in situ (proximity ligation assay P-LISA) ...	57
	Mesure par qPCR et RT PCR .....	58

# Table des matières

Transfection des lignées cellulaires.....	59
Fractionnement cellulaire .....	59
Analyse des protéines totales par Western Blot.....	62
Mesure du taux de consommation d'oxygène et du taux d'acidification extracellulaire.....	63
Produits utilisés .....	65
Anticorps utilisés .....	65
Analyses statistiques .....	66
RESULTATS.....	68
1. Rôle du cisplatine sur la sensibilité aux ITK anti-EGFR des cellules de cancers bronchiques non à petites cellules EGFR sauvage.....	69
1.1 Le cisplatine sensibilise les cellules de cancers bronchiques non à petites cellules <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i> à l'erlotinib. ....	94
1.2 La sensibilisation des cellules à l'erlotinib induite par le cisplatine est bien EGFR dépendante. ....	96
1.3 Le cisplatine induit une localisation mitochondriale de l'EGFR dans les cellules sensibilisées	98
2 Rôle de l'EGFR mitochondrial dans la sensibilisation aux ITK anti EGFR induite par le cisplatine.	100
2.1 Rôle de l'EGFR mitochondrial sur l'activation de la voie IRF3/TBK1 .....	101
2.1.1 L'activation de la voie IRF3/TBK1 est indépendante d'EGFR mais EGFR permet le maintien de l'activation de cette voie dans le temps.....	101
2.1.2 Le cisplatine induit des modifications de la morphologie et de la dynamique mitochondriale indépendamment d'EGFR.....	102
2.2 Rôle d'EGFR mitochondrial sur le métabolisme cellulaire .....	104
DISCUSSION .....	106
1 Cisplatine et sensibilité aux ITK anti EGFR dans les cancers bronchiques non à petites cellules EGFR sauvage. ....	107
1.1 Cisplatine et activation d'EGFR. ....	107
1.2 Marqueurs de sensibilisation à l'erlotinib après cisplatine.....	110
2 Rôle de l'EGFR mitochondrial dans la sensibilisation.....	115
2.1 Implication d'EGFR mitochondrial dans le signal IFN de type 1.....	116

## Table des matières

---

2.2	Implication d'EGFR mitochondrial dans le métabolisme cellulaire.....	119
CONCLUSION .....		121
BIBLIOGRAPHIE.....		123

### Liste des illustrations

Figure 1 : fréquence des altérations génétiques A : adénocarcinomes B : carcinomes épidermoïdes	15
Figure 2 : Les mutations d'EGFR .....	16
Figure 3 : structure de l'erlotinib et du gefitinib .....	19
Figure 4 : Fixation de l'erlotinib sur le récepteur à l'EGF .....	20
Figure 5 : dimérisation du récepteur après fixation d'EGF.....	30
Figure 6 : voies de signalisation des récepteurs HER .....	31
Figure 7 : Voie PI3K/AKT/mTOR .....	33
Figure 8 : Modèle structural de la liaison des domaines juxta-membranaires permettant la formation du dimère actif d'EGFR.....	36
Figure 9 : Structure de Src .....	39
Figure 10 : Voies de signalisation de Src .....	40
Figure 11 : Trafic intra-cytoplasmique d'EGFR.....	44
Figure 12 : Structure du cisplatine .....	46
Figure 13 : Hydrolyse du cisplatine .....	46
Figure 14 : liaison cisplatine-ADN.....	47
Figure 15 : Régulation de l'action du cisplatine .....	48
Figure 16 : Site d'action des inhibiteurs de phosphorylations oxydatives dans la chaîne mitochondriale de transport des électrons (ETC) : .....	64
Figure 17 : phosphorylation de Src dans les lignées A549 et H358 après traitement par cisplatine, PP1 et cisplatine + PP1. ....	95
Figure 18 : Phosphorylation des tyrosines 845 et 1068 : .....	96
Figure 19 : Expression EGFR dans les cellules A549 et A549 3bC1 : .....	97
Figure 20 : Sensibilité des cellules A549 et A549BbC1 à l'erlotinib 15µM et 30 µM avec ou sans pré traitement par cisplatine 3µM. ....	98
Figure 21 : Etude immuno-cyto-chimique par immunofluorescence du cytochrome c (en vert) et de l'EGFR (en rouge) sur les lignées A549 et H1975 en conditions contrôle et après traitement par cisplatine 48h .....	99
Figure 22 : Localisation mitochondriale de l'EGFR dans les lignées A549 et H1975 avec ou sans traitement cisplatine. ....	100

## Table des matières

---

Figure 23 : Activation de la voie des IFN de type 1 dans les lignées A549 et A549 3bC1. ....	102
Figure 24 : Morphologie mitochondriale des cellules A549 et A549 3bC1. ....	103
Figure 25 : Courbe d'OCR (% après normalisation) des lignées A549 et A549 3bC1. ....	105
Tableau 1 : Caractéristiques des lignées cellulaires .....	53
Tableau 2 : PDX d'adénocarcinomes bronchiques avec leurs caractéristiques moléculaires.....	54
Tableau 3 : Tampons utilisés pour le fractionnement cellulaire .....	60
Tableau 4 : Liste des anticorps utilisés pour les différentes expériences. ....	66

# **INTRODUCTION**

## Contexte général

Le cancer bronchique est la première cause de décès par cancer en France représentant 20% des décès par cancer. Il est actuellement la quatrième cause de cancer en France après les cancers de la prostate, du sein et colorectaux. Le taux de mortalité élevé du cancer bronchique, 29000 décès pour 39945 nouveaux cas en 2012, rend compte du mauvais pronostic de ces cancers. Le taux estimé de survie à 5 ans est de 14% tous stades confondus bien qu'il existe une différence majeure entre les stades localisés et métastatiques. Les progrès dans la compréhension des altérations génétiques, épigénétiques et micro-environnementales à l'origine des cancers bronchiques ont permis des avancées thérapeutiques importantes dans leur prise en charge avec le développement des thérapies ciblées et de l'immunothérapie. Cependant l'apparition systématique de résistance aux traitements quels qu'ils soient et l'absence de facteurs prédictifs de réponse dans la majorité des cas rendent nécessaire d'approfondir nos connaissances sur les mécanismes impliqués dans la résistance aux traitements systémiques des cancers bronchiques afin d'améliorer la prise en charge de ces malades.

## 1. Le cancer bronchique

Il est classiquement scindé en deux grandes entités histologiques, les cancers bronchiques à petites cellules représentant 15 à 20% des cancers bronchiques et les cancers bronchiques non à petites cellules majoritaires. Nous n'aborderons ici que les cancers bronchiques non à petites cellules.

### ***1.1 Classification histologique des carcinomes bronchiques non à petites cellules***

Les carcinomes bronchiques non à petites cellules (CBNPC) comprennent les carcinomes épidermoïdes ou malpighiens qui représentent 30% des CBNPC, les adénocarcinomes qui comptent pour 50% des CBNPC et des sous types plus rares tels que les carcinomes à grandes cellules, les carcinomes sarcomatoïdes, carcinomes adénosquameux ou les tumeurs de type glandes salivaires.

Les adénocarcinomes sont devenus en 2010 le sous type histologique le plus fréquent passant de 52,8% à 64,6% chez la femme entre 2000 et 2010 et de 31,5 à 48,7% chez

## Introduction

---

l'homme. Ceci pourrait être en partie lié aux changements des modes de consommation du tabac, l'utilisation du tabac brun ayant été supplantée par l'utilisation du tabac blond à filtre déposant les particules cancérigènes plus en aval dans l'arbre bronchique, et à d'autres expositions professionnelles ou environnementales.

Les adénocarcinomes invasifs sont divisés en sous types en fonction de l'architecture tumorale. Ces sous types ont des pronostics différents. On identifie ainsi les adénocarcinomes à prédominance lépidique de bon pronostic, les adénocarcinomes à prédominance acineuse et papillaire de pronostic intermédiaire et les adénocarcinomes à prédominance micropapillaire et solide ainsi que les adénocarcinomes mucineux invasifs de mauvais pronostic.

Le diagnostic histologique repose sur l'analyse morphologique du tissu en coloration standard à l'hématoxyline éosine (HES) associée, en cas de morphologie non évocatrice, à un marquage immunohistochimique dirigé contre le Thyroid Transcription factor 1 (TTF1) et contre les protéines p63 ou p40 en première intention.

Les carcinomes épidermoïdes sont TTF1- p63/p40 + et les adénocarcinomes TTF1+ p63/p40-. Les autres situations nécessiteront des marquages complémentaires. En l'absence de classification possible les CBNPC seront dit NOS (not otherwise specified).

### ***1.2 Classification moléculaire des carcinomes bronchiques non à petites cellules***

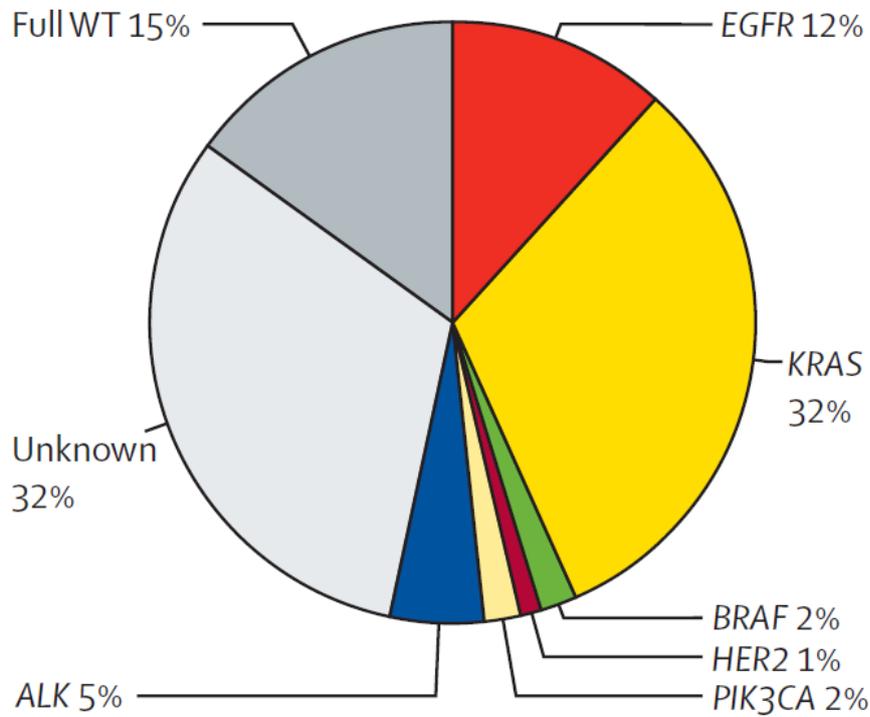
La prise en charge des cancers bronchiques non à petites cellules a été profondément modifiée par la découverte d'anomalies moléculaires ayant un rôle prépondérant dans le développement et la prolifération de ces tumeurs. Les altérations génétiques les plus fréquentes sont représentées dans la figure 1 (Barlesi et al., 2016; Sos and Thomas, 2012).

Ce sont les adénocarcinomes qui ont le plus bénéficié de ces progrès avec la mise en évidence de mutations activatrices du gène de l'Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) (Lynch et al., 2004) et des translocations du gène de la kinase des lymphomes anaplasiques (ALK) (Soda et al., 2007) entraînant l'activation aberrante de ces protéines et de leurs voies de signalisation. Ces protéines anormalement activées sont appelées drivers oncogéniques

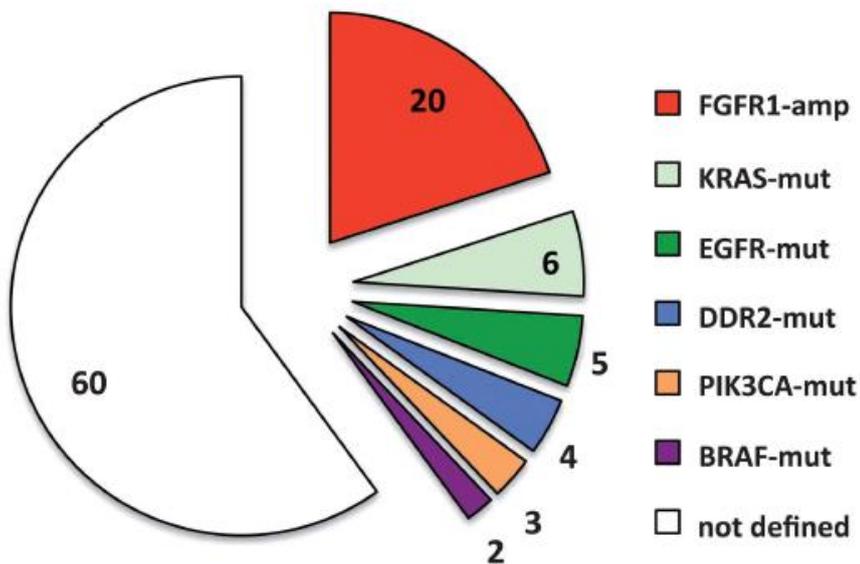
# Introduction

et correspondent à des oncogènes impliqués dans l'initiation ou la progression tumorale dont la cellule devient dépendante pour sa survie.

**A**



**B**



**Figure 1 : fréquence des altérations génétiques A : adénocarcinomes B : carcinomes épidermoïdes (Barlesi et al., 2016).**

# Introduction

## 1.2.1 Anomalies moléculaires des adénocarcinomes.

Ces anomalies sont présentes dans 50% des adénocarcinomes. Les plus fréquentes sont les mutations du gène Kirsten Rat Sarcoma (KRAS) représentant 32% des mutations des adénocarcinomes. Ces mutations surviennent sur les codons 12 et 13 dans 97% des cas. Elles sont plus fréquentes chez les fumeurs. La présence d'une mutation du gène KRAS est un facteur de mauvais pronostic.

Les mutations activatrices du gène de l'EGFR représentent 12% des mutations dans la population caucasienne. Cette fréquence augmente chez les non-fumeurs, les femmes et dans la population asiatique. Elles sont mutuellement exclusives des mutations KRAS. Les mutations les plus fréquentes sont des délétions autour des motifs Leucine-Arginine-Glutamine-Alanine (résidu LREA 746-750) de l'exon 19 et la substitution Leucine-858-Arginine (L858R) de l'exon 21 qui comptent pour 90% des mutations (figure 2) (Sharma et al., 2007). A l'inverse des mutations KRAS, la présence d'une mutation de l'EGFR est un facteur de bon pronostic.

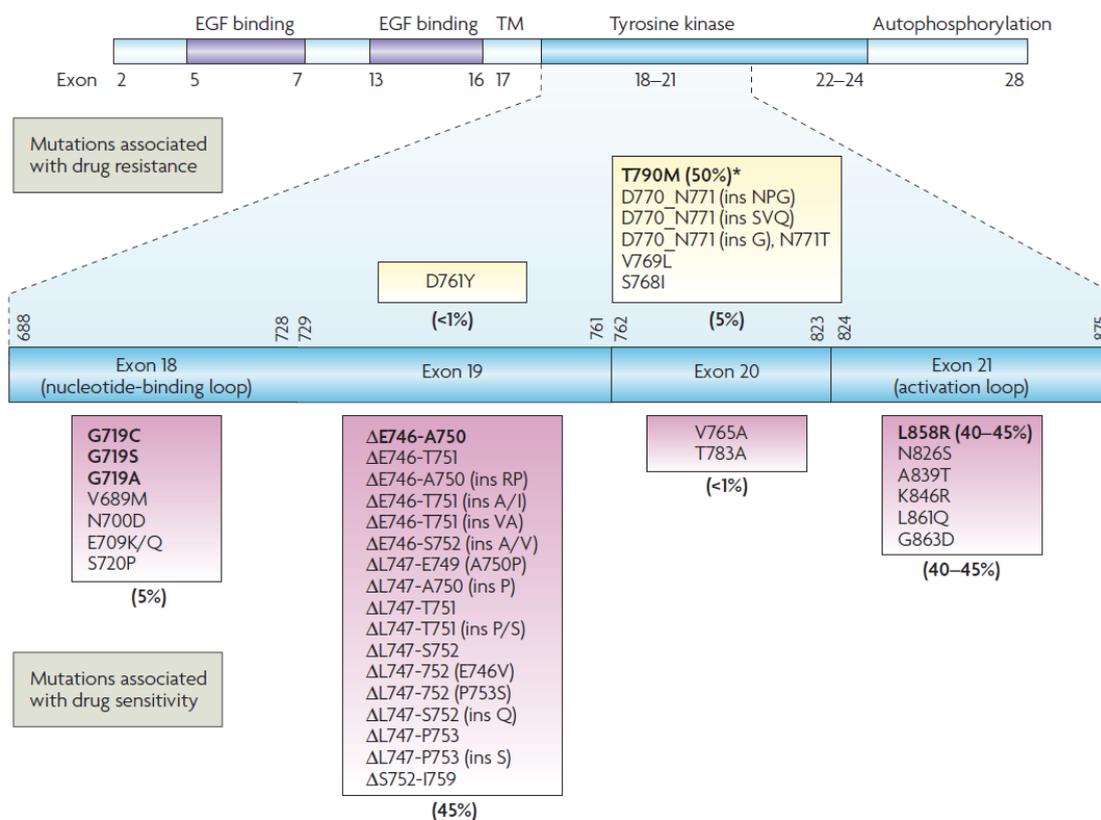


Figure 2 : Les mutations d'EGFR (Sharma et al., 2007)

## Introduction

---

Les réarrangements d'ALK concernent environ 4-5% des adénocarcinomes et sont retrouvés parmi les patients jeunes et souvent non-fumeurs. La protéine de fusion Echinoderm microtubule associated protein like 4-kinase des lymphomes anaplasiques (EML4-ALK) résulte d'une inversion au sein du chromosome 2p entre une portion du gène codant pour EML4 et du gène codant pour ALK. Il s'agit de la protéine de fusion ALK la plus fréquente bien que d'autres aient été découvertes (réarrangement ALK-TGF (Transforming growth factor), ALK-KIF5B (kinesin family member 5B)...)

Les autres mutations sont beaucoup plus rares. Les mutations du récepteur HER2, appartenant à la famille des récepteurs HER comprenant EGFR, représentent 1% des anomalies retrouvées dans les adénocarcinomes et concernent essentiellement les femmes non fumeuses. Les réarrangements de ROS proto oncogene 1 (ROS1) concernent environ 1% des adénocarcinomes avec les mêmes caractéristiques que les réarrangements d'ALK à savoir des femmes non fumeuses. La mutation du gène V-RAF sarcoma viral oncogene homolog B1 (BRAF) changeant une valine en une glutamine (V600E) compte pour la moitié des mutations de BRAF retrouvées dans les CBNPC et contrairement à la plupart des autres altérations génétiques, elles sont retrouvées fréquemment chez les fumeurs et concernent 1 à 2% des patients.

La connaissance de ces anomalies génétiques a permis le développement de thérapies dites ciblées, ciblant ces protéines anormalement activées. Cependant toutes ces protéines ne correspondent pas à des drivers oncogéniques et ceci explique en partie le manque d'efficacité de certaines de ces thérapies ciblées. La présence de mutations activatrices d'EGFR ou de réarrangements du gène ALK sont les deux cibles pour lesquelles le développement thérapeutique a été le plus efficace et est le plus abouti à l'heure actuelle, avec la mise sur le marché des inhibiteurs de tyrosine kinase (ITK) anti EGFR et anti ALK. Il n'y actuellement aucune thérapeutique spécifique validée en routine pour les patients porteurs d'autres mutations.

### **1.3 Traitements des cancers bronchiques métastatiques**

#### **1.3.1 Traitements des cancers bronchiques avec mutations activatrices d'EGFR**

Les inhibiteurs de tyrosine kinase anti-EGFR représentent le traitement de référence des patients ayant une tumeur avec une mutation activatrice du gène de l'EGFR.

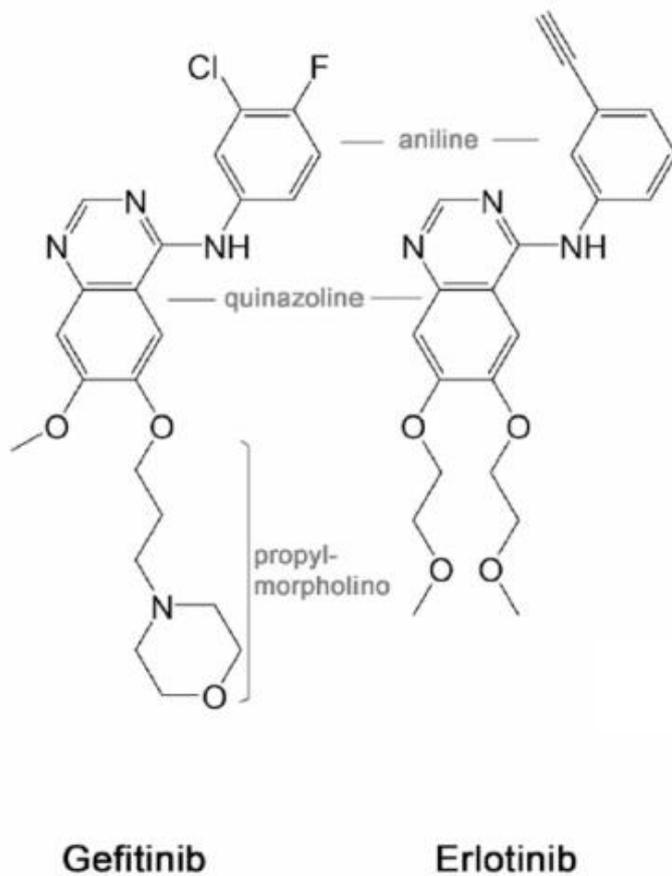
Les ITK anti-EGFR comprennent les ITK de première génération, l'erlotinib et le gefitinib, de deuxième génération, l'afatinib, et de troisième génération, l'osimertinib. Les ITK de 1<sup>ère</sup> génération sont des inhibiteurs réversibles d'EGFR. Les ITK de 2<sup>ème</sup> génération et 3<sup>ème</sup> génération sont des inhibiteurs irréversibles pan-HER, efficaces sur un panel plus large de mutations d'EGFR que les inhibiteurs de 1<sup>ère</sup> génération. Les ITK de 1<sup>ère</sup> et 2<sup>ème</sup> génération ont obtenu leur autorisation de mise sur le marché (AMM) pour le traitement en première ligne des cancers bronchiques métastatiques EGFR muté en démontrant un bénéfice en survie sans progression par rapport à la chimiothérapie. Il existe cependant un échappement quasi systématique à ces traitements. L'un des principaux mécanismes d'échappement qui survient dans près de 50% des cas est l'apparition d'une autre mutation du gène de l'EGFR qui substitue une thréonine par une méthionine à la position 790 de l'exon 20 du gène (T790M). Les ITK de troisième génération ont été développés pour être efficaces même en présence de cette mutation. L'osimertinib a permis d'améliorer la survie sans progression (10,1 mois vs 4,4 mois HR=0,30 IC95%=[0,23 ;0,41] p<0,001) par rapport à une chimiothérapie standard en deuxième ligne de traitement des CBNPC métastatiques après échec d'un ITK de 1<sup>ère</sup> ou 2<sup>ème</sup> génération en cas de résistance liée à l'apparition de la mutation T790M (Mok et al., 2017). L'osimertinib a obtenu son AMM dans cette indication mais va probablement détrôner les ITK de 1<sup>ère</sup> et 2<sup>ème</sup> génération en traitement de première ligne après avoir montré une nette amélioration de la SSP de l'ordre de 8 mois par rapport à ces derniers (Soria et al., 2018).

##### **1.3.1.1 L'Erlotinib**

l'erlotinib (OSI-774, CP-358,774, Tarceva) est un inhibiteur réversible de l'EGFR compétitif de l'ATP possédant un noyau anilino-quinazoline se fixant au niveau domaine catalytique de l'EGFR Figure 3 (Eck and Yun, 2010).

## Introduction

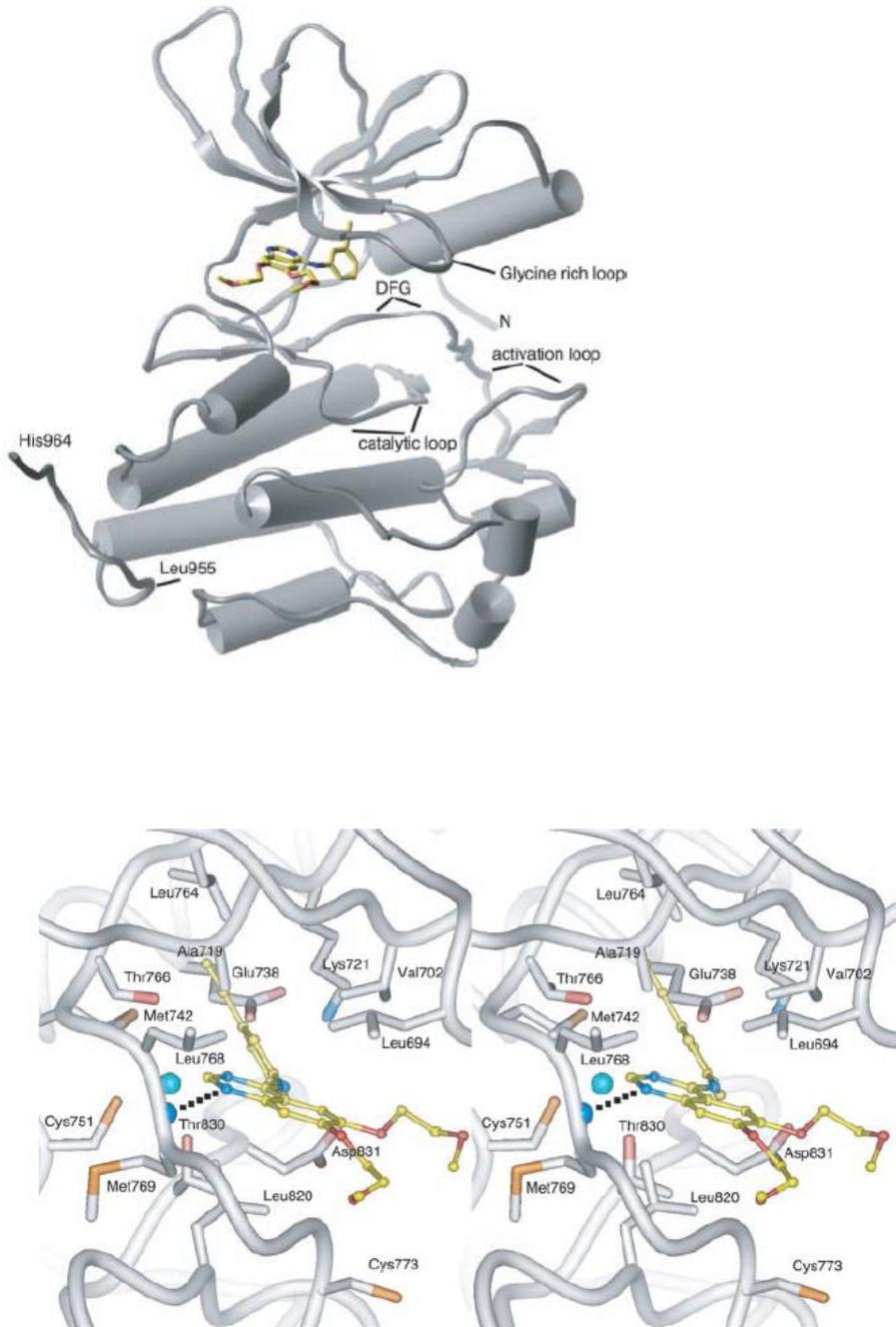
---



**Figure 3 : structure de l'erlotinib et du gefitinib (Eck and Yun, 2010)**

L'erlotinib se fixe par l'extrémité contenant les atomes N1 et C8 de la quinazoline sur le segment peptidique connectant les lobes NH<sub>2</sub> et COOH terminaux du domaine kinase de l'EGFR. Les principaux éléments de la machinerie catalytique du récepteur appartenant aux 2 lobes bordent ce segment où se fixe habituellement l'ATP Figure 4 (Stamos et al., 2002).

## Introduction



**Figure 4 : Fixation de l'erlotinib sur le récepteur à l'EGF (Stamos et al., 2002)**

L'erlotinib a une affinité de 10 à 100 fois supérieure pour le récepteur muté que pour l'EGFR sauvage en raison d'une activité catalytique plus élevée des récepteurs mutants qui découle des modifications de conformation induites par les mutations (Yun et al., 2007). Deux grandes études de phase III ont validé l'utilisation de l'erlotinib en première ligne des CBNPC EGFR muté en comparaison à une chimiothérapie de référence par doublets à base de sels de platine après avoir démontré une augmentation de la survie sans progression allant de

## Introduction

---

9,2 à 13,1 mois contre 4,6 à 5,2 mois pour la chimiothérapie.(Rosell et al., 2012; Zhou et al., 2011). Ces études n'ont pas démontré d'avantage en survie globale en raison des cross-over autorisés à progression. Cependant les médianes de survie globale des patients EGFR muté traités par ITK de première génération varient de 20 à 30 mois selon les études (Maemondo et al., 2010; Mok et al., 2009; Rosell et al., 2012) contre 9 à 12 mois pour des patients uniquement traités par chimiothérapie (Reck et al., 2009; Sandler et al., 2006; Scagliotti et al., 2008). Les ITK anti-EGFR ont complètement modifié le pronostic des patients EGFR muté. La présence d'une mutation est actuellement le seul facteur prédictif de réponse aux ITK.

### **1.3.2 Traitements des cancers bronchiques avec translocation d'ALK**

Les ITK anti ALK sont le traitement de référence des patients dont la tumeur bronchique est porteuse d'une translocation d'ALK. De manière identique aux ITK anti EGFR, plusieurs ITK anti ALK ont été développés au cours du temps depuis la mise en évidence du rôle oncogénique de la translocation d'ALK en 2007. Le premier d'entre eux est le crizotinib qui a permis d'améliorer la survie sans progression (10,9 vs 7 mois [HR 0,45, IC95% 0,35-0,6 p<0,001]) en comparaison d'une chimiothérapie de référence en première ligne de traitement des CBNPC métastatiques. Le crizotinib a été le premier ITK à obtenir son AMM. Il existe cependant un échappement systématique de la maladie sous crizotinib, se traduisant dans 50% des cas par une progression cérébrale. Les principaux mécanismes de résistance au crizotinib sont l'apparition de nouvelles mutations sur le gène ALK ou un gain en nombre de copie du gène. L'alectinib et le ceritinib sont des ITK de deuxième génération qui ont une concentration cérébrale supérieure au crizotinib et une efficacité même en présence de nouvelles mutations conférant une résistance au crizotinib. Le ceritinib a obtenu son AMM en deuxième ligne après échec du crizotinib et a montré également sa supériorité par rapport à la chimiothérapie en première ligne. L'alectinib va quant à lui probablement détrôner le crizotinib puisqu'il a permis d'améliorer la survie sans progression passant de 10,2 pour le crizotinib à 25,7 mois pour l'alectinib (HR0,50 [95% CI, 0,36-0,70]; P<0,001). Des ITK de troisième génération sont en cours de développement.

Ces traitements ont révolutionné la prise en charge de ces patients permettant d'atteindre des survies globales de plus de 36 mois ce qui n'aurait jamais été possible avec la chimiothérapie seule.

### 1.3.3 Traitements des cancers bronchiques sans anomalies moléculaires

#### 1.3.3.1 La chimiothérapie

La chimiothérapie est le traitement de référence des CBNPC métastatiques pour les patients dont la tumeur ne présente ni mutation activatrice de l'EGFR ni translocation de ALK. En première ligne de traitement, la chimiothérapie de référence est un doublet associant un sel de platine (carboplatine ou cisplatine) à une autre molécule de deuxième ou troisième génération. Cette association a été validée après la démonstration de la supériorité d'une chimiothérapie sur les soins palliatifs exclusifs, puis de la supériorité d'une bi-chimiothérapie par rapport à une mono-chimiothérapie (1995) et enfin de l'absence de bénéfice supplémentaire à l'ajout d'une troisième molécule (Delbaldo et al., 2004). En France, les molécules de troisième génération (vinorelbine, paclitaxel, docetaxel, gemcitabine et pemetrexed) sont les plus utilisées en raison d'une tolérance supérieure aux molécules de deuxième génération. Le choix entre ces molécules de troisième génération repose essentiellement sur le profil de toxicité et sur l'histologie, carcinome épidermoïde ou adénocarcinome, le pemetrexed étant réservé aux seuls adénocarcinomes. En effet les études de comparaison de doublets ont montré leur équivalence thérapeutique à l'exception du pemetrexed délétère pour les carcinomes épidermoïdes (Scagliotti et al., 2002, 2008).

Cependant le bénéfice obtenu par la chimiothérapie reste modeste reflétant l'échappement rapide des tumeurs à ces traitements. Ceci a rendu nécessaire le développement de nouvelles molécules et de nouvelles stratégies thérapeutiques.

#### 1.3.3.2 L'immunothérapie

L'intérêt croissant porté à l'étude du rôle du microenvironnement dans le développement tumoral a permis une avancée récente importante dans la prise en charge des cancers bronchiques non à petites cellules sans mutation EGFR ou ALK. Le rôle du Programme cell Death Protein 1 receptor (PD-1), exprimé à la surface des cellules T activées, est de limiter l'activité de ces cellules dans le tissu périphérique lors de la réponse inflammatoire à une infection afin de prévenir l'auto-immunité. PD-1 est activé par la fixation d'un de ses ligands PDL-1 ou PDL-2 et va inhiber par le biais de la phosphatase tyrosine-protein phosphatase non receptor type 11 (PTPN11 ou SHP2) l'activité de kinases impliquées dans l'activation de

## Introduction

---

la cellule T (Pardoll, 2012). L'expression tumorale de PDL-1 est importante dans les cancers bronchiques non à petites cellules et participe, par l'inhibition de l'activation des cellules T, à l'échappement tumoral au système immunitaire.

Les anticorps (Ac) monoclonaux anti PD-1 (nivolumab, pembrolizumab) ou anti PD-L1 (atezolizumab, durvalumab, avelumab) ont été développés avec succès dans le CBNPC. Le nivolumab a permis une augmentation de la survie globale en 2ème ligne par rapport à une des chimiothérapies de référence, le docétaxel, pour les carcinomes épidermoïdes, 9,2 vs 6 mois [HR 0,59, (IC95% 0,44-0,79)  $p < 0.0001$ ], et les adénocarcinomes, 12,2 vs 9 mois [HR 0,73, (IC 95% 0,59-0,89)  $p = 0.002$ ] (Borghaei et al., 2015; Brahmer et al., 2015). Les patients étaient inclus dans ces deux études quel que soit le niveau d'expression de PDL-1. Le pembrolizumab a obtenu des résultats similaires en deuxième ligne en comparaison du docétaxel pour des patients dont les cellules tumorales expriment PDL-1 à plus de 1% (Herbst et al., 2016). Plus récemment, cette même molécule a permis en première ligne, pour des patients avec un niveau d'expression de PDL-1  $> 50\%$ , d'améliorer la survie sans progression par rapport à un doublet de chimiothérapie 10,3 vs 6 mois [HR 0,5 (IC95% 0,37-0,68)  $p < 0,0001$ ] (Reck et al., 2016). A l'inverse le Nivolumab a échoué en première ligne à montrer sa supériorité par rapport aux doublets de sels de platine sur une population non sélectionnée.

L'immunothérapie a modifié récemment la stratégie de prise en charge des CBNPC sans anomalie moléculaire, soulignant l'importance du micro environnement immunitaire. Les réussites variables du développement du nivolumab et du pembrolizumab dans des indications similaires mais des populations différentes soulignent l'importance d'avoir des marqueurs prédictifs d'efficacité des traitements pour sélectionner au mieux les patients.

### **1.3.3.3 Traitements anti EGFR**

Outre les mutations, la surexpression d'EGFR est une anomalie fréquemment retrouvée dans les CBNPC. Elle est mesurée différemment selon les études, par l'expression de la protéine mesurée en immunohistochimie, par l'expression de l'ARN messager en PCR, ou le nombre de copie ou la polysomie du gène en hybridation in situ fluorescente (FISH). La surexpression d'EGFR est retrouvée dans près de 80% des carcinomes épidermoïdes et 60% des adénocarcinomes mais également dans les lésions précancéreuses et ce de manière

## Introduction

---

croissante selon le grade des lésions de dysplasie, soulignant le rôle majeur d'EGFR dans la progression des cancers bronchiques (Hirsch et al., 2003; Laurie and Goss, 2013) et faisant d'EGFR même en l'absence de mutation un cible thérapeutique de choix. Deux types de traitements ont été évalués pour ces patients :

- les anticorps monoclonaux inhibant la fixation des ligands d'EGFR sur le récepteur
- les ITK anti-EGFR en particulier l'erlotinib.

### **1.3.3.1 Anticorps monoclonaux anti-EGFR**

Il existe plusieurs anticorps monoclonaux anti-EGFR (cetuximab, necitimumab, panitumumab et matuzumab) (Sheng et al., 2015). Leur activité en monothérapie étant très limitée, leur efficacité a été testée en association à la chimiothérapie de première ligne. Les essais testant le cetuximab associé à la chimiothérapie, l'étude FLEX et l'étude BMS099 (Lynch et al., 2010; Pirker et al., 2009), donnent des résultats contradictoires. Seule l'étude FLEX est positive sur l'objectif principal, la survie globale, 9,69 vs 8,38 mois en faveur de l'association. La supériorité de la combinaison a été validée dans une méta-analyse (Pujol et al., 2014) avec un bénéfice supérieur pour les carcinomes épidermoïdes (9,9 vs. 9,0 mois, HR 0,77, 95% CI 0,64–0,93). Ces résultats ont été confirmés par les essais testant l'association necitimumab-chimiothérapie, l'un pour les carcinomes épidermoïdes (essai SQUIRE) et le second pour les adénocarcinomes (essai INSPIRE) (Paz-Ares et al., 2015; Thatcher et al., 2015). Seul l'essai SQUIRE réservé aux carcinomes épidermoïdes, a mis en évidence une amélioration de la survie globale 11,5 vs 9,9 mois par l'association chimiothérapie-anticorps anti-EGFR. Ceci peut s'expliquer par un niveau d'expression d'EGFR supérieur des carcinomes épidermoïdes par rapport aux adénocarcinomes (Goss and Spaans, 2016; Pirker et al., 2012). Cependant aucun de ces traitements n'a obtenu l'AMM, en raison d'un bénéfice modeste et d'une toxicité plus importante.

### **1.3.3.2 ITK anti-EGFR : l'erlotinib**

Initialement l'erlotinib était utilisé chez tous les patients après avoir démontré un bénéfice en survie globale (6,67 mois vs 4,7 mois (HR 0,73 [0,6-0,87]) en comparaison des meilleurs soins de support dans l'étude BR21 (Shepherd et al., 2005) puis en deuxième ligne en comparaison d'une chimiothérapie de référence (Ciuleanu et al., 2012; Karampeazis et al., 2013). Cependant l'ensemble de ces études ont inclus des patients non sélectionnés sur le

## Introduction

---

statut mutationnel EGFR qui n'était connu que pour moins de 50% des patients. Ces résultats sont donc difficilement extrapolables aux patients EGFR sauvage.

Les études plus récentes n'ayant inclus que des patients dont la tumeur ne présente pas de mutations activatrices de l'EGFR, ont clairement démontré que l'utilisation de l'erlotinib en monothérapie en première ligne est délétère par rapport à un doublet de chimiothérapie (Gridelli et al., 2012; Mok et al., 2009) avec une diminution de la survie sans progression et de la survie globale. De même l'association de l'erlotinib à la chimiothérapie n'a pas montré de supériorité par rapport à la chimiothérapie seule (Gatzemeier et al., 2007; Herbst et al., 2005).

C'est en traitement de maintenance après une première ligne de chimiothérapie à base de sels de platine qu'il a été mis en évidence un bénéfice à l'utilisation de l'erlotinib pour les patients EGFR non muté. L'étude SATURN, (Cappuzzo et al., 2010), et l'étude de Perol et al (Pérol et al., 2012) ont comparé l'erlotinib au placebo en maintenance pour les patients ne progressant pas après 4 cycles de chimiothérapie par sels de platine. L'étude SATURN a montré un bénéfice en survie sans progression et en survie globale pour l'ensemble des patients y compris les patients sans mutation de l'EGFR et en cas de maladie stable après 4 cures avec une réduction de 22% du risque de récurrence [HR 0,78, IC95% (0,63-0,96) p=0,0185]. Dans l'étude de Perol et al, il n'y avait pas de bénéfice en survie globale, probablement en raison d'une deuxième ligne de traitement pré-déterminée, mais une amélioration de la survie sans progression avec une diminution du risque de récurrence de 31% [HR0.69; IC95% (0.54 to 0.88) p=003]. En deuxième ligne, à progression, il semble exister un bénéfice modeste de l'erlotinib, puisque l'essai de stratégie TORCH montre une supériorité de la séquence chimiothérapie suivi d'erlotinib par rapport à la séquence inverse (Gridelli et al., 2012). De même dans l'étude IUNO, le bénéfice de l'erlotinib en maintenance ou à progression est identique, bien que dans cette étude il n'y ait pas de différence entre le placebo ou l'erlotinib en maintenance (Cicenas et al., 2016). Cependant en comparaison d'une chimiothérapie de deuxième ligne, la survie sans progression et les taux de réponses sont supérieurs pour la chimiothérapie, respectivement 2.9 vs 2.4 mois (HR 0.71, IC 95% [0.53-0.95]) et 15 vs 3% (p=0.003), mais il n'existe pas de différence en terme de survie globale (Garassino et al., 2013).

## Introduction

---

L'effet de l'erlotinib reste modeste car ne concerne sans doute qu'une partie des patients EGFR sauvage prétraités par chimiothérapie sans que l'on puisse les identifier faute de marqueurs prédictifs de réponse malgré une recherche intensive.

### ***1.4 Marqueurs prédictifs de réponse aux ITK anti EGFR pour les patients EGFR sauvage.***

La surexpression d'EGFR ou son amplification étant des anomalies fréquemment retrouvées dans les cancers bronchiques, leur caractère prédictif de réponse a été évalué dans les différentes études cliniques testant l'effet des ITK anti EGFR pour les patients sans mutation d'EGFR. Il faut souligner que la plupart de ces analyses ont été rétrospectives et ne concernaient que la portion des patients disposant de tissu analysable ce qui limite la puissance de ces résultats. Bien qu'il fût suggéré que les patients exprimant fortement EGFR (> 10% en immunohistochimie) ou avec une amplification ou polysomie d'EGFR mesurée en FISH bénéficiaient des ITK (Dahabreh et al., 2011; Douillard et al., 2010), aucun de ces marqueurs n'a pu montrer de manière répétée et reproductible de lien avec la réponse ou l'augmentation de la survie après traitement par ITK. La présence de résultats contradictoires (Brugger et al., 2011; Fukuoka et al., 2011) et l'absence de validation prospective de ces marqueurs ne les rend pas suffisamment robustes pour être utilisés pour sélectionner les patients répondeurs aux ITK anti EGFR.

Le rôle prédictif des ligands d'EGFR a également été évalué dans différentes études. Celles-ci se sont intéressées essentiellement à l'amphiréguline (AREG) et au transforming growth factor  $\alpha$  (TGF $\alpha$ ). Un niveau élevé d'expression sérique de TGF $\alpha$  et d'AREG semble plutôt être prédictif d'une faible réponse à l'erlotinib ou au gefitinib (Addison et al., 2010; Masago et al., 2008; Vollebergh et al., 2010). Cependant, il s'agit d'études rétrospectives avec des populations hétérogènes mélangeant des patients EGFR muté et sauvage, des patients prétraités par chimiothérapie ou non. De plus les méthodes de mesure du taux de ligand varient entre des mesures de taux sérique de ligand ou des analyses de niveau d'expression sur tissu en IHC (Chang et al., 2011; Ishikawa et al., 2005). De même que pour le niveau d'expression d'EGFR, la présence de résultats contradictoires et l'absence de validation prospective du rôle prédictif de l'amphiréguline et du TGF  $\alpha$  n'ont pas permis leur validation comme marqueurs prédictifs de réponse.

## Introduction

---

D'autres marqueurs de sensibilité aux ITK, la présence de phospho-Akt ou de phospho-EGFR, ou de résistance aux ITK, la présence d'une mutation KRAS, d'une amplification de MET ou l'expression d'IGF1R, n'ont pas non plus été validés en pratique clinique (Engelman et al., 2007; Laurie and Goss, 2013).

Malgré l'importance de la voie de l'EGFR dans la progression tumorale des cancers bronchiques, le bénéfice des ITK anti EGFR dans la population de patients EGFR sauvage est modeste et semble être conditionné par l'utilisation au préalable d'une chimiothérapie d'induction par sels de platine. Cependant faute de marqueurs prédictifs de réponse permettant de discriminer la population de patients tirant bénéfice de cette stratégie thérapeutique, cela a conduit à l'arrêt de l'AMM de l'erlotinib dans cette indication. La difficulté à déterminer des marqueurs de réponse reflètent probablement la complexité des mécanismes régissant l'activation d'EGFR après cisplatine et rend nécessaire une connaissance approfondie de ceux-ci.

## 2 EGFR et cancers

Les mutations, la surexpression ou l'amplification des gènes de la famille de l'EGFR sont fréquemment retrouvées dans les tumeurs solides en particulier les cancers du sein, de la tête et du cou, du colon, cérébraux et les cancers bronchiques non à petites cellules. Ces altérations jouent un rôle clé dans le développement des cancers favorisant la prolifération l'angiogenèse ainsi que l'invasion des cellules tumorales (Casalini et al., 2004; Herbst, 2004).

Les récepteurs HER font partie de la sous classe I de la superfamille des récepteurs à tyrosine kinase. Ces récepteurs possèdent une activité tyrosine kinase qui leur permet de catalyser le transfert du  $\gamma$  phosphate de l'ATP sur les groupes hydroxyles des tyrosines de protéines partenaires, constituant ainsi le point de départ de l'activation de nombreuses voies de signalisation intracellulaire (Schlessinger, 2000). Ces récepteurs sont présents dans la plupart

# Introduction

---

des tissus (cardiaque, neuronal, pulmonaire, hépatique, cutané, mammaire etc...) et participent à leur développement normal. L'absence d'expression d'un membre de la famille des récepteurs HER n'est pas compatible avec la survie des individus du fait de malformations létales dont le type dépend du gène éteint (Casalini et al., 2004; Olayioye et al., 2000). Une régulation fine de ces récepteurs et de leurs voies de signalisation est nécessaire au bon fonctionnement cellulaire. Ainsi la dérégulation de l'expression des récepteurs de la famille HER aboutit au développement d'un phénotype tumoral caractérisé par des altérations dans la différenciation, une survie et une prolifération accrues, une résistance aux signaux apoptotiques, une angiogénèse active et un caractère invasif (Casalini et al., 2004; Normanno et al., 2006; Olayioye et al., 2000).

## ***2.1 Structure de l'EGFR***

La famille de l'EGFR humain comprend 4 récepteurs :

- HER1 ou EGFR ou ErbB1
- HER2 ou Neu ou ErbB2
- HER3 ou ErbB3
- HER4 ou ErbB4

Le récepteur ErbB1 ou EGFR comprend une partie extracellulaire de liaison avec les ligands et un domaine intra-cytoplasmique connecté par une hélice  $\alpha$  unique transmembranaire.

La partie extracellulaire se compose de 4 domaines en tandem. Les domaines I et III forment le domaine de fixation du ligand et les domaines II et IV, riches en cystéines, permettent la dimérisation du récepteur (Schlessinger, 2002). La partie intracellulaire comprend un domaine juxta-membranaire suivi d'un domaine tyrosine kinase et le domaine carboxy-terminal contenant des séquences de régulation. Les autres récepteurs ont une structure similaire à l'exception d'HER3 qui n'a pas de domaine tyrosine kinase.

## ***2.2 Activation d'EGFR***

Le récepteur HER1 s'active classiquement après fixation d'un de ses ligands sur sa partie extracellulaire ce qui va entraîner l'autophosphorylation du récepteur et l'activation des voies de signalisation d'aval. Cependant l'étude des voies d'activation des cancers bronchiques avec mutations activatrices de l'EGFR a mis en évidence un mode d'activation du récepteur alternatif indépendant des ligands (Okabe et al., 2007). Cette voie d'activation ligand indépendante a également été décrite pour des récepteurs sans mutation.

# Introduction

---

Ces deux voies d'activation vont être développées ci-dessous.

## 2.2.1 Activation ligand dépendante

Chaque récepteur possède un domaine de fixation du ligand et un domaine de dimérisation. Les ligands d'EGFR sont de type monomérique c'est-à-dire qu'ils induisent des complexes avec une stœchiométrie ligand/récepteur 2:2 (Tzahar et al., 1997).

L'étude de la structure d'EGFR par cristallographie a révélé qu'il existe sous deux conformations distinctes (Ogiso et al., 2002). La conformation fermée est inactive car les domaines II et IV sont attachés entre eux et empêchent les domaines I et III de se rassembler pour former le site de liaison au ligand. Cette conformation est en équilibre avec une conformation ouverte active du récepteur où les domaines II et IV s'éloignent des domaines I et III ce qui d'une part forme la poche de liaison au ligand et d'autre part expose la boucle du domaine II nécessaire à la dimérisation du récepteur. Les interactions entre les domaines II et IV modulent l'orientation des deux autres domaines et ainsi l'affinité aux ligands (figure 5) (Schlessinger, 2002). La dimérisation dépend d'interactions récepteur-récepteur induites par la fixation du ligand. Cette dimérisation est dite asymétrique puisque l'un des domaines kinase va agir comme un activateur allostérique du second domaine kinase et entraîne l'autophosphorylation en trans des résidus tyrosine kinase de la boucle d'activation et le début de la signalisation.

L'EGFR peut s'homo ou s'hétéro-dimériser avec un autre membre de la famille HER, la boucle de dimérisation du domaine II étant une structure très conservée d'un récepteur à l'autre.

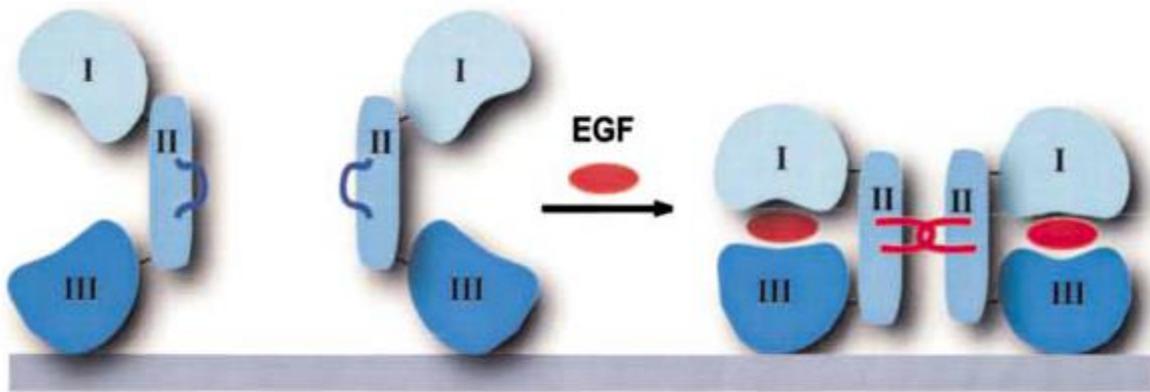


Figure 5 : dimérisation du récepteur après fixation d'EGF. (Schlessinger, 2002)

### 2.2.1.1 Ligands d'EGFR

Les ligands d'EGFR sont classés en 4 sous-groupes selon leur capacité à fixer chacun des membres de la famille Her (Citri and Yarden, 2006; Sweeney and Carraway, 2000) :

- Les ligands liant HER 1: Epidermal growth factor (EGF), Transforming growth factor  $\alpha$  (TGF $\alpha$ ) et amphiréguline (AREG)
- les ligands liant HER 1 et 4 : Heparin binding-EGF (HB-EGF), bétacelluline et épireguline
- les ligands liant HER 3 et 4 : Neuréguline 1 et 2 (Neu 1 et 2)
- Les ligands liant HER 4 : Neuréguline 3 et 4 (Neu 3 et 4)

Her2 ne possède pas de ligand connu. L'activation sous forme d'un dimère asymétrique explique comment HER2 peut être activé par HER3 qui peut lier un ligand mais possède un site catalytique non fonctionnel.

Chaque ligand d'EGFR possède un domaine commun appelé motif EGF composé de six cystéines formant trois ponts dissulfures intramoléculaires (Harris et al., 2003). Ce motif permet la liaison au récepteur. Le reste de la structure du ligand se compose d'un peptide signal, d'une pro-région, d'un domaine juxta membranaire, d'un domaine transmembranaire et de la partie intra-cytoplasmique. La pro forme du ligand fixée à la membrane, va être clivée par des protéases de surface spécifiques de chaque ligand libérant la forme mature du ligand qui va se fixer au récepteur.

## 2.2.1.2 Voies de signalisation induites par l'activation ligand dépendante

L'activation de 3 récepteurs HER, EGFR, HER3 et HER4, par 13 ligands différents rend compte d'un réseau de signalisation intracellulaire complexe et finement régulé, résumé de manière simplifiée sous forme d'un nœud papillon (Bow tie structure) figure 6 (Citri and Yarden, 2006). Les signaux interconnectés aboutissent, par l'intermédiaire de facteurs de transcription, à de multiples réponses cellulaires. La fiabilité de ce système repose sur sa modularité, sa redondance fonctionnelle limitant la perte d'activité en cas de perturbation et son strict système de contrôle.

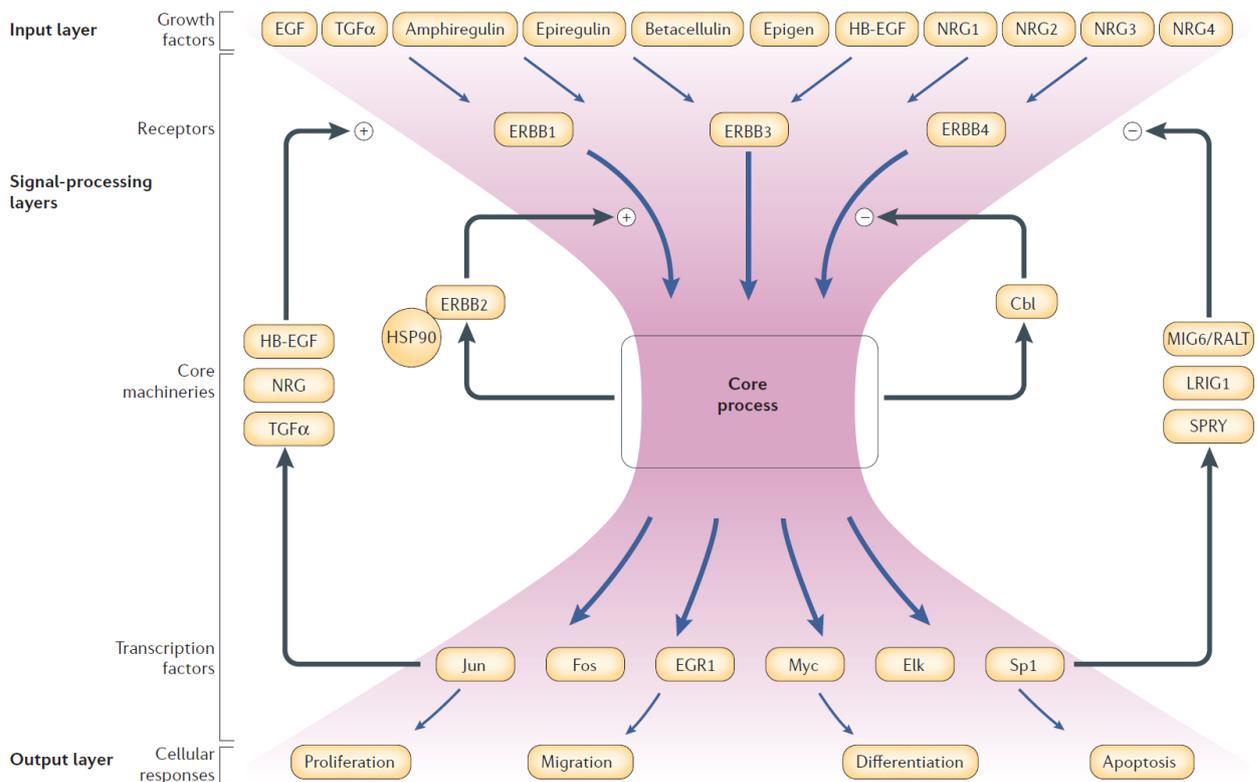


Figure 6 : voies de signalisation des récepteurs HER (Citri and Yarden, 2006)

### 2.2.1.2.1 Voie Ras/Raf/MEK/Erk

Les protéines adaptatrices Src homology 2 domain containing (Shc) et growth factor receptor-bound protein2 (Grb2) vont se fixer aux résidus tyrosines phosphorylés d'EGFR via leur domaine Src homologie 2 (Sh2). La fixation de Grb2 peut se faire directement sur EGFR ou par l'intermédiaire de la protéine Shc. Grb2 va former un complexe avec la protéine Son

## Introduction

---

of sevenless (SOS), un échangeur de guanine pour Ras, et ainsi activer Ras puis la cascade mitogène-activated protéine kinase (MAPK). La famille MAPK est composée de trois sous familles dont extra-cellular regulated kinase (Erk) effecteur final de la cascade MAPK activée par EGFR. Erk va ensuite activer les facteurs de transcription c-myc (c-Myc) et ETS domain-containing protein-1 (Elk1) et favoriser la prolifération et la différenciation cellulaire (Liebmann, 2001).

### **2.2.1.2.2 Voie PI3K/Akt/mTOR**

Phosphatidylinositol 3 kinase (PI3K) est une famille de kinases qui phosphorylent les groupes 3 hydroxyle des lipides inositol membranaires en phosphatidylinositol et en phosphoinositides. Il existe trois classes de PI3K (I-III) classées selon leurs structures et leurs substrats. La classe IA est celle activée par les récepteurs de la famille HER, via leur recrutement par leur domaine Sh2. Elle est composée d'une sous unité catalytique p110 et d'une sous unité régulatrice p85.

La protéine kinase B (PKB ou Akt) et la protéine mammalian target of rapamycin (mTOR) sont des sérine-thréonine kinases. Akt a de nombreux substrats régulant l'apoptose, la prolifération et la synthèse protéique. Les Phosphatidyl inositol 3,4 biphosphate (PIP2) et phosphatidyl inositol 3-5 triphosphate (PIP3) produits par PI3K activée vont recruter à la membrane les phosphoinositide dependant kinase 1 et 2 (PDK1/PDK2) et Akt grâce à leur domaine pleckstrin homology (PH). Cette co-localisation va permettre la phosphorylation d'Akt par PDK1. Akt va ensuite phosphoryler mTOR, qui une fois activée, favorise la synthèse protéique et l'angiogénèse. Figure 7 (Almhanna et al., 2011).

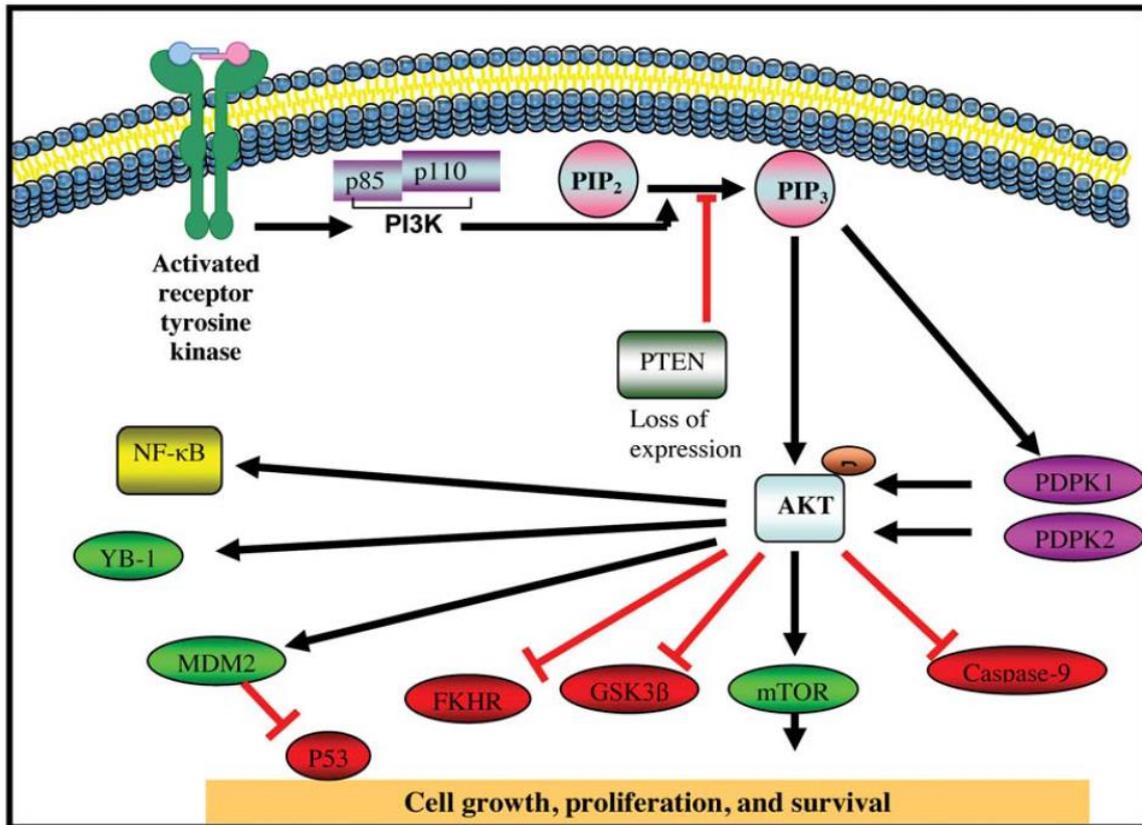


Figure 7 : Voie PI3K/AKT/mTOR (Almhanna et al., 2011)

Cette voie est inhibée par la phosphatase and Tensin homolog (PTEN) qui va inhiber la phosphorylation de PIP3.

### 2.2.1.2.3 Voie JAK/STAT

Le signal transducer and activator of transcription (STAT) est une famille de facteurs de transcription, comprenant 7 membres, présents dans le cytoplasme sous forme de monomères inactifs. Les protéines STAT interagissent avec les résidus phosphotyrosines de plusieurs récepteurs de surface dont EGFR via leur domaine SH2. La régulation des protéines STAT par EGFR peut se faire directement ou par l'intermédiaire des protéines Janus Kinase (JAK). Une fois activées, les protéines STAT vont s'homo ou s'hétéro-dimériser et se localiser au noyau pour réguler l'expression de gènes cibles, impliqués notamment dans la survie cellulaire. STAT3 et STAT5 sont des protéines clés dans la transformation et la progression tumorale lorsqu'elles sont constitutivement activées (Buettner et al., 2002).

### **2.2.1.2.4 Voie PLC- $\gamma$ et PKC**

De manière identique à PI3K, la phospho-lipase C  $\gamma$  se lie aux résidus phosphotyrosines d'EGFR par l'intermédiaire de son domaine SH2. La phosphorylation de la PLC  $\gamma$  entraîne l'hydrolyse du PIP2 en diglycéride et inositol 1, 4, 5 phosphate (IP3). Le diglycéride va activer la protéine Kinase C et entraîner la cascade des MAPK. (Rotin et al., 1992).

### **2.2.2 Activation d'EGFR indépendante des ligands.**

En parallèle de cette voie d'activation canonique résultant de la fixation des ligands, ont été découverts des modes d'activation d'EGFR alternatifs, indépendants des ligands. Cette activation d'EGFR indépendante des ligands a été surtout étudiée sur les formes mutées d'EGFR mais existe aussi pour l'EGFR sauvage.

#### **2.2.2.1 Autophosphorylation d'EGFR en présence d'une mutation activatrice**

Plusieurs mutations d'EGFR ont été retrouvées dans les cancers bronchiques, correspondant pour 90% d'entre elles à des délétions autour des motifs LeuArgGluAla (résidu LREA 746-750) de l'exon 19 et la substitution Leu858Arg (L858R) de l'exon 21. Dans le glioblastome, la mutation la plus fréquente du gène de l'EGFR correspond à la délétion des exons 2 à 7 et aboutit à une forme tronquée du récepteur appelée EGFR variant III ou EGFRvIII. Ce variant n'exprime plus la partie extracellulaire du récepteur et a donc perdu sa capacité à fixer les ligands. Cette forme humaine de variant d'EGFR a son pendant chez les virus, v-ErbB, responsable de l'érythroblastose chez les oiseaux. Ces formes tronquées, malgré leur incapacité à fixer les ligands, sont présentes constitutionnellement sous formes de dimères actifs capables de transformer les fibroblastes en cellules cancéreuses (Pines et al., 2010). Les mécanismes d'activation de ces mutants d'EGFR ont été longuement étudiés. Comme vu précédemment, il existe un équilibre à la membrane plasmique entre les formes monomériques inactives d'EGFR et les formes dimériques ou oligomériques actives d'EGFR. Il a été montré que la conformation active du dimère d'EGFR est liée aux interactions entre les leucines des chaînes latérales des domaines juxta membranaires de chacun des monomères qui rend le domaine kinase actif. Cette conformation active est stabilisée également par les interactions entre les deux domaines N terminal des hélices transmembranaires. A l'état monomérique, les leucines des chaînes latérales du domaine juxta membranaire forment des contacts étroits avec la membrane plasmique qui inhibent

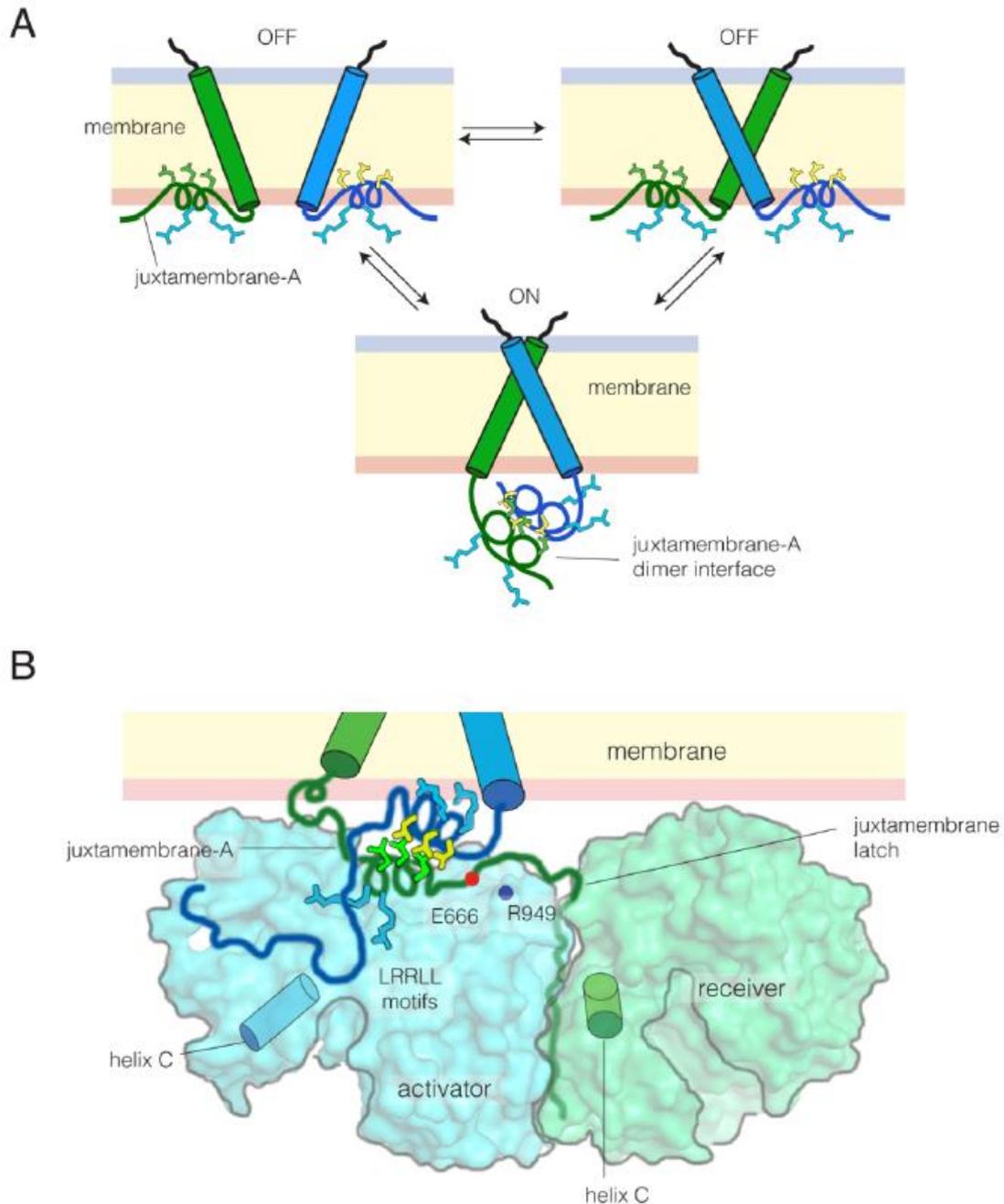
## Introduction

---

les contacts entre les domaines juxta membranaires de deux monomères. Cette conformation monomérique inactive est maintenue par la conformation du domaine extracellulaire qui va limiter le rapprochement des domaines juxta membranaires. La fixation du ligand et les modifications de conformation des domaines extracellulaires va lever cette auto inhibition et permettre la formation des dimères actifs.

De manière identique à ce qui se produit après la fixation du ligand, les modifications de conformation du récepteur induites par les différentes mutations vont permettre de lever les liaisons auto-inhibitrices du récepteur et vont permettre l'activation constitutive du récepteur. Dans le cas du variant EGFRVIII, c'est la perte de la partie extracellulaire qui va permettre un contact entre les domaines juxta membranaires des récepteurs et leur dimérisation. figure 8 (Endres et al., 2013)

## Introduction



**Figure 8 : Modèle structural de la liaison des domaines juxta-membranaires permettant la formation du dimère actif d'EGFR. (Endres et al., 2013)**

De manière identique, les mutations L858R et délétion de l'exon 19 de l'EGFR entraînent des modifications du domaine tyrosine kinase. Ceci va induire des changements de conformation qui vont permettre une activation permanente du récepteur. Pour exemple, la substitution d'une leucine pour une arginine (L858R) située au niveau de la partie N terminal de la boucle d'activation va lever les interactions qui bloquaient en position inactive l'hélice  $\alpha$ C de cette boucle d'activation. Ces mutations n'affectant pas le domaine extracellulaire du récepteur,

celui-ci va également garder sa capacité d'activation via la fixation des ligands (Yun et al., 2007; Zhang et al., 2006).

### **2.2.2.2 Autophosphorylation d'EGFR sauvage**

En l'absence de mutation d'EGFR, il a été également mis en évidence la présence de dimères actifs d'EGFR indépendamment de la fixation des ligands. Cette activation ligand indépendante n'est pas constitutive, contrairement aux mutants d'EGFR, mais dépendante de la concentration cellulaire du récepteur. Une haute densité cellulaire du récepteur (>500 000 récepteurs/cellule) va permettre la formation de dimères soit par des interactions indirectes stabilisées par le confinement des monomères d'EGFR par les radeaux lipidiques de la membrane ou le cytosquelette, soit par des interactions directes protéines-protéines identiques à celles obtenues après fixation du ligand (Chung et al., 2010; Endres et al., 2013; Nagy et al., 2010)). Ces dimères préformés vont faciliter la fixation du ligand mais également permettre l'autophosphorylation du récepteur sans ligand. Ainsi la surexpression d'EGFR sauvage retrouvée dans les cellules tumorales pulmonaires va favoriser son autophosphorylation spontanée.

### **2.2.2.3 Transactivation d'EGFR**

La transactivation d'EGFR correspond à son activation par divers stimuli sans interactions directes avec le récepteur. Ces stimuli peuvent correspondre à des stimuli chimiques ou physiques de stress comme les rayons ultra-violet, les rayonnements gamma, le choc thermique, l'hyperosmolarité ou les chimiothérapies. Ces facteurs de stress cellulaire sont responsables la plupart du temps d'une inhibition des phosphatases qui vont limiter l'inhibition d'EGFR (Carpenter, 1999). La transactivation d'EGFR peut être également liée à d'autres récepteurs membranaires comme les récepteurs couplés aux protéines G (RCPG,) les récepteurs d'adhésion, en particuliers les intégrines, et les récepteurs aux cytokines. Ceci a particulièrement été démontré avec les RCPG. Il s'agit de récepteurs transmembranaires de la membrane plasmique regroupés en trois grandes classes, A/ récepteur rhodopsin-like, B/recepteursecretine- like et C/récepteur à glutamate. Ces récepteurs n'ont pas d'activité enzymatique et fonctionnent de manière couplée à la protéine G. Il s'agit d'une protéine trimérique composée de 3 sous unités  $G\alpha$ ,  $G\beta$  et  $G\gamma$ . La fixation d'un ligand du RCPG, il en existe de nombreux (endothéline, angiotensine, acide lysophosphatidique etc.), va entraîner

## Introduction

---

la dissociation de la protéine G en une sous unité  $G\alpha$  liée au GTP et une sous unité  $G\beta\gamma$ . Ces sous unités dissociées contrôlent l'activité de nombreuses enzymes incluant les kinases.

La transactivation d'EGFR par les RCPG résulte de deux grands mécanismes. Le premier est appelé « the triple membrane passing signal » et implique les ligands d'EGFR. L'activation du RCPG va activer les metalloprotéases de la matrice liées à la membrane qui vont aller cliver les pro-formes membranaires de ligand d'EGFR, HB-EGF, neuréguline, TGF $\alpha$  et amphiréguline. Les ligands ainsi libérés vont activer EGFR selon le mécanisme décrit précédemment (Gschwind et al., 2001).

L'autre mécanisme est indépendant des ligands et implique Src, une protéine kinase non récepteur, dont l'activation va entraîner la phosphorylation d'EGFR via sa partie cytosolique. L'activation de Src par le RCPG revêt différents mécanismes soit indirects via la production de d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) par exemple ou directs par le domaine SH3 de Src et la partie intra-cytoplasmique riche en proline du récepteur. Son rôle dans l'oncogenèse pulmonaire a été bien décrite (Wang, 2016).

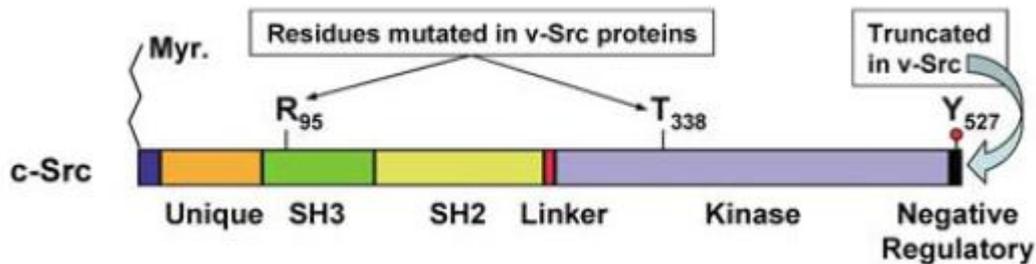
Src apparait comme un médiateur important de la transactivation d'EGFR car il est également impliqué dans la transactivation d'EGFR par les intégrines ainsi que lors des modifications de polarisation membranaire qui vont entraîner l'afflux intracellulaire de calcium (Carpenter, 1999; Wang, 2016).

### **2.2.2.3.1 Src et EGFR**

Les kinases de la famille Src (SFK) est une famille de protéines à activité tyrosine kinase non récepteur incluant plusieurs membres de structure identique. Cette famille de kinases est impliquée dans le développement de nombreux cancers dont le cancer bronchique. SFK comprend dix variants classés en trois sous-groupes selon le tissu dans lequel elles sont exprimées. Le premier sous-groupe est d'expression ubiquitaire et comprend Src, Fyn et Yes. Le second sous-groupe comprend Blk, Fgr, Hck, Lck, Yrk et Lyn et est exprimé essentiellement dans les cellules hématopoïétiques. Enfin le troisième sous-groupe est constitué de la kinase liée à Frk et est exprimé dans les tissus épithéliaux. La structure de Src (figure 9) comprend un domaine N terminal où se fait la myristoylation de la protéine qui permet sa fixation à la membrane, un domaine SH3 puis SH2, un domaine tyrosine kinase

## Introduction

(SH1) et une courte partie C terminale. Le domaine SH2 reconnaît les phosphotyrosines et le domaine SH3 les domaines riches en proline.



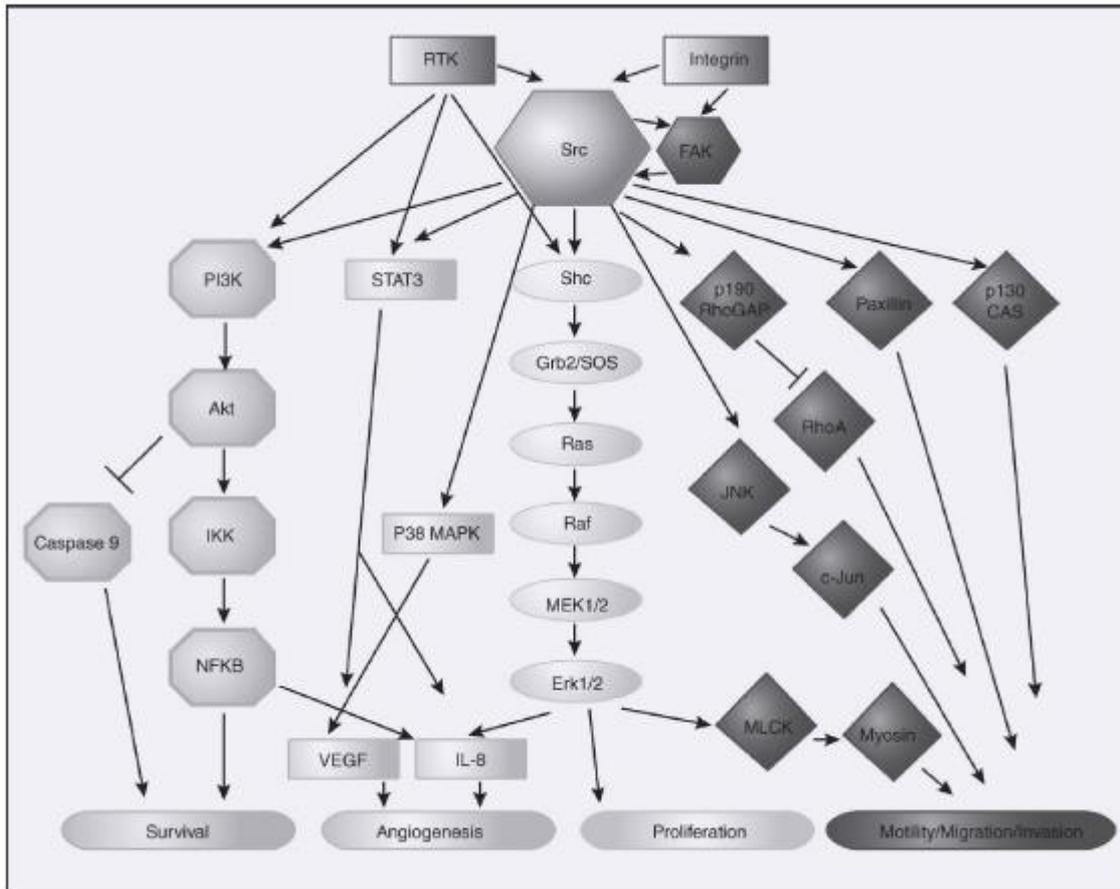
**Figure 9 : Structure de Src (Parsons and Parsons, 2004).**

La protéine Src est régulée finement par l'action de protéines kinases et de phosphatases. A l'état basal, la protéine Src est phosphorylée sur la tyrosine 527, située sur la partie C terminale, par la protéine kinase Src C terminal (CSK). Ceci résulte en une conformation inactive de la protéine. La protéine CSK est fréquemment sous exprimée dans les cancers favorisant l'activation de Src. A l'inverse la phosphorylation des tyrosines du domaine d'activation de Src va permettre son activation. Les phosphatases vont moduler l'activité de Src de manière opposée aux tyrosines kinases, en inhibant l'activité de Src par la déphosphorylation des tyrosines activatrices, ou en augmentant son activité par la déphosphorylation des tyrosines inhibitrices principalement la tyrosine 557 (Roskoski, 2005). L'activité de Src est également modulée par la phosphorylation de sérine ou de thréonine par des protéines sérines/thréonines kinases.

Les domaines SH2 et SH3 vont permettre à Src d'interagir avec de nombreuses protéines, les récepteurs à tyrosine kinase, les récepteurs couplés à la protéine G, les récepteurs aux stéroïdes, des protéines de transduction de signal, des facteurs de transcription ainsi que des protéines d'adhésion et participer à de multiples fonctions cellulaires (figure 10) ((Wheeler et al., 2009) :

- La survie via PI3K
- L'angiogenèse via VEGF
- La migration et l'invasion cellulaire via focal adhesion kinase (FAK), Paxiline et JUN
- La division cellulaire via les MAPK

## Introduction



**Figure 10 : Voies de signalisation de Src (Wheeler et al., 2009)**

Les relations entre EGFR et Src sont nombreuses. Src peut ainsi être activée par EGFR mais peut aussi transactiver EGFR par contact direct ou indirectement par l'intermédiaire des métalloprotéases et la libération des ligands d'EGFR (Bazzani et al., 2017). Src régule également l'internalisation et la dégradation d'EGFR. En effet Src activée entraîne l'inhibition de la protéine casitas B lineage Lymphoma (cbl), une kinase impliquée dans l'ubiquitination d'EGFR, et phosphoryle les clatrines permettant l'internalisation d'EGFR. Ces modifications d'internalisation et de dégradation d'EGFR contribuent à augmenter le signal lié à EGFR.

Src est surexprimée dans 30% des cancers bronchiques non à petites cellules. Les mutations sont très rares. La surexpression de Src est une des voies de résistance des cellules EGFR muté aux ITK anti EGFR. C'est le cas également de résistances aux ITK anti ALK. Des inhibiteurs de Src (dasatinib) ont été développés et utilisés seuls ou en combinaison avec l'erlotinib sans résultats probant.

### **2.2.2.4 Voies de signalisation activées par la voie ligand indépendante.**

Les conséquences fonctionnelles de l'activation EGFR ligand indépendante sont moins bien connues que lors de l'activation classique d'EGFR.

#### **2.2.2.4.1 Activation des voies canoniques Erk et Akt.**

L'activation de ces voies habituellement activées en présence de ligand a été décrite dans plusieurs modèles cellulaires, prostate, pancréas et poumon notamment. L'activation de ces voies d'aval a été particulièrement décrite *in vitro* pour les lignées cellulaires EGFR muté mais il faut souligner que les conditions expérimentales de ces différentes études ne permettent pas de s'affranchir de l'utilisation d'EGF ou de la présence de ligand pour activer EGFR et les voies d'aval (Kobayashi et al., 2005; Sordella et al., 2004). Certaines de ces études mettent cependant en évidence un effet différent sur la phosphorylation d'EGFR, d'Akt et d'Erk, des ITK anti-EGFR et des anticorps anti-EGFR sur des lignées cellulaires de CBNPC EGFR muté. Si les ITK anti-EGFR inhibent systématiquement la phosphorylation d'EGFR d'Akt et/ou Erk, l'effet du cetuximab, souvent inférieur aux ITK, est variable selon la lignée cellulaire (Mukohara et al., 2005; Smith et al., 2015). Ceci confirme l'activation ligand indépendante du récepteur muté et l'activation de ses voies classiques Akt et Erk sans que cela n'élimine totalement un rôle joué par les ligands.

#### **2.2.2.4.2 Activation de la voie IRF 3-TBK1.**

Une étude menée sur des cellules de glioblastome (GBM) surexprimant EGFR sauvage a mis en évidence l'activation de l'interferon regulatory factor 3 (IRF3) suite à l'activation d'EGFR indépendamment des ligands. L'activation de cette voie est mutuellement exclusive de celle classique activée par EGF (Chakraborty et al., 2014). IRF3 est un facteur de transcription appartenant à la famille des facteurs de régulation de l'interferon IRF. Ces protéines sont impliquées dans la régulation des gènes contrôlant la réponse immunitaire. IRF3 est une protéine cytosolique, constitutivement exprimée, responsable de l'expression des gènes IFN de type 1 induite par les infections virales. IRF3 est activée principalement par la protéine sérine/thréonine kinase TBK1 (TANK (tumour-necrosis factor (TNF)-receptor-associated factor (TRAF)-family member-associated NF- $\kappa$ B activator)-binding kinase 1) et dans une moindre mesure par IKK $\epsilon$  (inhibitor of NF- $\kappa$ B (I $\kappa$ B) kinase  $\epsilon$ ). Ces kinases phosphorylent les résidus sérines de la partie C-Terminal d'IRF3 (Honda and Taniguchi, 2006).

## Introduction

---

Dans les modèles *in vitro* de lignées cellulaires de glioblastome, EGFR activé recrute à la membrane TBK1 et IRF3 pour former un complexe qui va permettre l'activation d'IRF3. Cette activation disparaît en présence d'EGF et d'erlotinib, mais l'ajout de l'anticorps anti EGFR Cetuximab n'inhibe pas l'activation d'IRF3 et de TBK1. Ceci souligne l'absence d'implication des ligands dans cette activation et la nécessité d'une activation d'EGFR pour l'activation d'IRF3. En présence d'EGF, l'activation d'IRF3 et de TBK1 disparaît au profit de l'activation classique d'Erk et Akt.

L'activation d'IRF3 va entraîner sa localisation nucléaire et la transcription des gènes IFN de type I, à savoir IFN  $\beta$  et  $\alpha$ . L'activation d'IFN $\beta$  va stimuler l'activation de la voie JAK/STAT1 qui va ensuite induire la transcription de gènes IFN induits IFIT1 et IFI27. Ces données ont été vérifiées sur des tumeurs humaines de GBM. Les niveaux d'expression d'EGFR, de TGF- $\alpha$ , principal ligand d'EGFR exprimé dans les GBM, d'IFIT1 et IFI27 ont été mesurés en PCR quantitative. Dans les tumeurs sur-exprimant EGFR sauvage, il existe une corrélation négative entre les niveaux d'expression de TGF- $\alpha$  et d'IFIT1 et IFI27. Ceci suggère une balance entre les voies d'activation d'EGFR ligand dépendante et indépendante en fonction de la disponibilité des ligands. L'activation d'EGFR ligand indépendante et l'activation de la voie IRF3 confèreraient une résistance plus importante au témozolomide, chimiothérapie de référence du GBM. Cette voie d'activation IRF3-TBK1 n'a pas été décrite dans les cancers bronchiques.

### **2.3 Régulation d'EGFR**

L'activité d'EGFR est régulée à différents niveaux. Comme vu précédemment, au niveau de la membrane plasmique, il existe des interactions inhibitrices entre les chaînes latérales du domaine juxta membranaire du récepteur et la membrane plasmique stabilisant EGFR dans une forme monomérique inactive. Ces interactions peuvent être levées par la fixation du ligand, par les modifications de conformation de l'EGFR muté, par une très haute densité de récepteur à la membrane ou par l'action d'autres kinases intracytoplasmique aboutissant à la phosphorylation du récepteur.

Une fois activé et ce quel que soit le mécanisme, le récepteur va être internalisé selon un mécanisme clatrine dépendant. Une internalisation clatrine indépendante a été décrite en cas de saturation du premier mécanisme, comme c'est le cas en présence d'une très forte

## Introduction

---

concentration de ligand, ou après fixation d'HB-EGF et de beta-célluline (Tomas et al., 2014). Une fois internalisé, le récepteur peut connaître plusieurs destinées. Il peut être dégradé ce qui va limiter la force du signal. La dégradation du récepteur va nécessiter son ubiquitination sur les lysines du domaine kinase par l'ubiquitine ligase E3 cbl qui va être recruté auprès du récepteur par GRB2. Ceci va permettre au récepteur d'être reconnu pour être dégradé par le lysosome. A l'inverse EGFR peut être recyclé à la membrane ou transloqué au noyau ou à la mitochondrie pour poursuivre son action (figure 11). De plus, des sous populations d'endosome précoces ou tardifs, contenant certaines protéines effectrices comme l'effecteur rab5 APPL1, semblent favoriser les interactions intra-cytoplasmiques d'EGFR et d'Akt ou des MAPK augmentant ainsi l'intensité du signal. Les récepteurs EGF mutés présentent une altération de leur ubiquitination ce qui limite leur dégradation et contribue également à leur intense activité.

Plus généralement, le rôle fonctionnel d'EGFR et ses conséquences biologiques vont être régulés par la nature du ligand fixé, le type de dimère formé ou la protéine à l'origine de la phosphorylation d'EGFR. En fonction de ces paramètres, la ou les tyrosines phosphorylées seront différentes, n'interagissant pas avec les mêmes protéines d'aval, n'aboutissant pas aux mêmes adressages intra-cytoplasmiques d'EGFR ni au même niveau de dégradation du récepteur, régulant ainsi toute son activité et rendant compte des multiples réponses possibles à son activation (Schulze et al., 2005). Il a par exemple été montré que la fixation d'EGF entraîne une dégradation du récepteur via le lysosome alors que le TGF $\alpha$  permet plutôt le recyclage du récepteur à la membrane et que l'amphiréguline limite l'ubiquitination du récepteur (Roepstorff et al., 2009; Stern et al., 2008). La phosphorylation de sérine et de threonine va également réguler l'activité du récepteur.

# Introduction

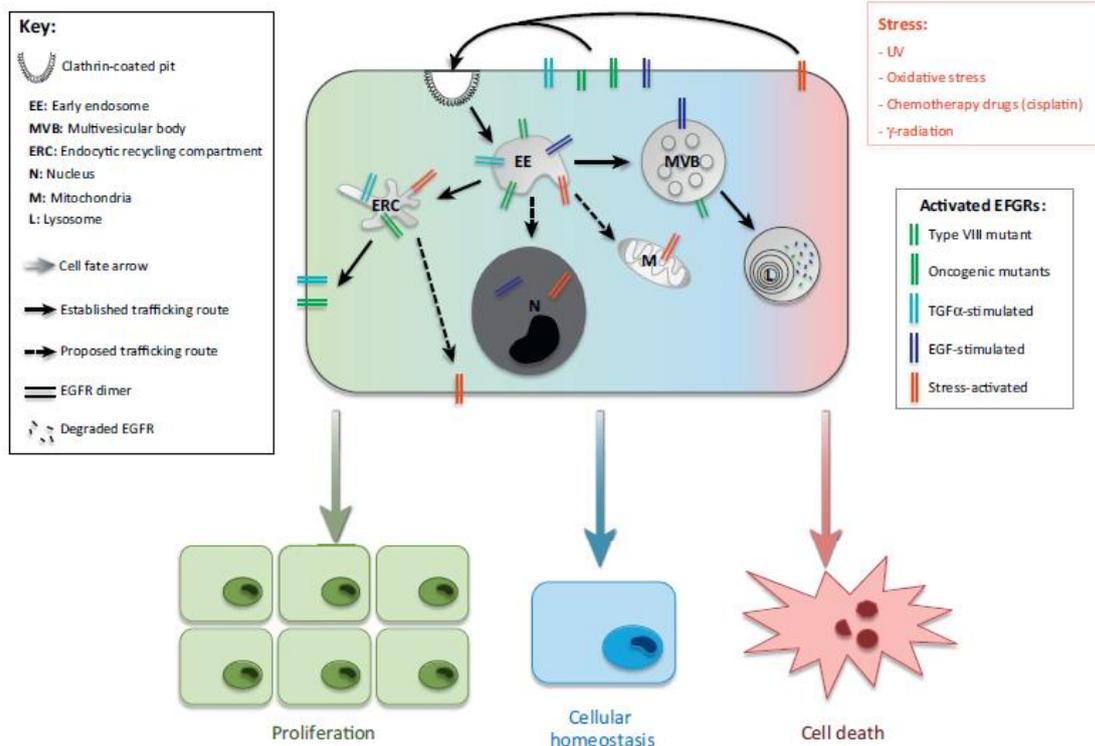


Figure 11 : Traffic intra-cytoplasmique d'EGFR (Tomas et al., 2014)

## 2.4 EGFR nucléaire et mitochondrial

En dehors de sa localisation classique membranaire, où se déroule nombre d'interactions, il est maintenant admis qu'EGFR peut être présent, sous une forme complète ou tronquée, dans différents compartiments intracellulaires dont le noyau et la mitochondrie où il exerce d'autres fonctions que son rôle classique de récepteur à tyrosine kinase.

L'EGFR nucléaire a été mis en évidence dans de nombreux types de cellules cancéreuses : hépatocarcinome, cancer du sein, du poumon, du pancréas, de la tête et du cou et de la peau. Il est impliqué dans la prolifération, la réponse inflammatoire, la réparation de l'ADN et sa présence est un facteur de mauvais pronostic (Han and Lo, 2012; Wang and Hung, 2012). Son effet s'exerce par le biais de son activité tyrosine kinase en phosphorylant certaines protéines nucléaires (proliferating cell nuclear antigen PCNA), ou de manière indépendante de celle-ci. EGFR agit alors comme facteur de transcription. N'ayant pas la capacité de fixation à l'ADN, il se lie à des co facteurs de transcription. Les principaux gènes transcrits par EGFR et ses partenaires sont cyclin D1, inductible nitric oxyde synthase iNOS, BMyb, cyclo oxygenase 2, aurora A, c-myc et breast cancer resistance protein (BCRP). Mais d'autres gènes cibles ont été décrits (Li et al., 2009; Lo, 2010; Lo et al., 2010). EGFR peut

## Introduction

---

aussi se lier à la protéine kinase dépendante de l'ADN DNA-PK pour faciliter la réparation des dommages à l'ADN (Dittmann et al., 2005).

L'EGFR mitochondrial a été décrit dans les cancers bronchiques bien que son rôle et les mécanismes de régulation de l'adressage d'EGFR à la mitochondrie soient mal connus. Src par l'intermédiaire de la phosphorylation d'EGFR sur la tyrosine 845 permettrait sa localisation à la mitochondrie et l'activation de protéines mitochondriales par son activité tyrosine kinase (Demory et al., 2009). D'autres protéines impliquées dans l'adressage d'EGFR ont été décrites (Wang et al., 2017). A l'instar de l'EGFR nucléaire, l'action de l'EGFR mitochondrial peut s'exercer de manière dépendante ou indépendante de son activité tyrosine kinase. L'EGFR mitochondrial pourrait ainsi réguler l'apoptose, le métabolisme ou la motilité cellulaire (Che et al., 2015).

EGFR se caractérise par ses multiples fonctions cellulaires et la complexité de son mode d'action et de régulation. Sa dérégulation, fréquente dans les cancers bronchiques, promeut une survie et une prolifération cellulaire accrues et une résistance aux signaux apoptotiques. Ceci fait d'EGFR une cible thérapeutique mais également un acteur important de la résistance aux chimiothérapies.

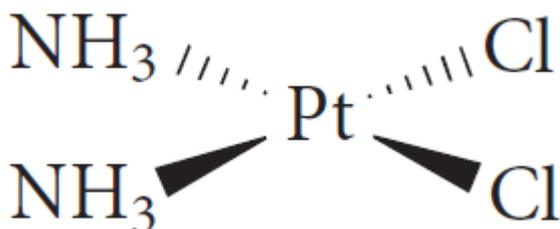
### **3 Le Cisplatine**

Le cisplatine ou cis-diammine-dichloro-platinum a été pour la première fois synthétisé par un chimiste italien Michele Peyrone en 1845. Ce n'est qu'en 1965 que le physicien Barnett Rosenberg met en évidence par hasard, en testant l'influence du champ électrique sur la croissance des bactéries, que les produits d'électrolyse d'électrodes en platine, produisant le cis-diammine-dichloro-platinum, peuvent inhiber la division cellulaire d'E Coli. Il redécouvre ainsi le cisplatine (Kelland, 2007).

Ses propriétés anticancéreuses vont être prouvées en 1968 après administration intrapéritonéale sur des souris porteuses de sarcome entraînant une régression tumorale importante. Le cisplatine va montrer une activité intéressante sur de nombreux cancers en particulier testiculaires et ovariens aboutissant à son approbation par la Food and Drug Administration (FDA) en 1978. Le cisplatine est la molécule de chimiothérapie de référence des cancers bronchiques métastatiques en première ligne.

## 3.1 Structure et mécanismes d'action

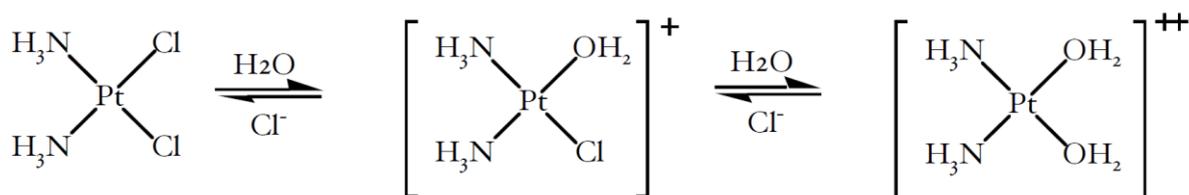
Le cisplatine ou cis-diammine-dichloro-platinum est un complexe carré plan à base de platine (figure 12).



**Figure 12 : Structure du cisplatine (Kelland, 2007).**

Dans le cis diamine-dichloroplatine, l'atome de platine est à l'état d'oxydation. Il possède deux ligands inertes NH<sub>3</sub> et deux ligands labiles Cl<sup>-</sup>. Il s'agit d'un complexe neutre nécessitant d'être activé par des réactions intracellulaires successives d'hydrolyse qui vont remplacer les complexes chlore en cis par des molécules d'eau. Dans la circulation sanguine, la concentration en ions chlorure relativement élevée, empêche l'hydrolyse du cisplatine. L'entrée du cisplatine dans la cellule se fait lentement, de manière passive, régulée par les concentrations en sodium, en potassium ainsi que le pH. Des transporteurs actifs prennent également part à l'entrée du cisplatine, en particulier le transporteur de cuivre 1 CTR1. Deux autres protéines impliquées dans le transport du cuivre, les ATPases 7 et 8, participent à l'efflux du cisplatine hors de la cellule.

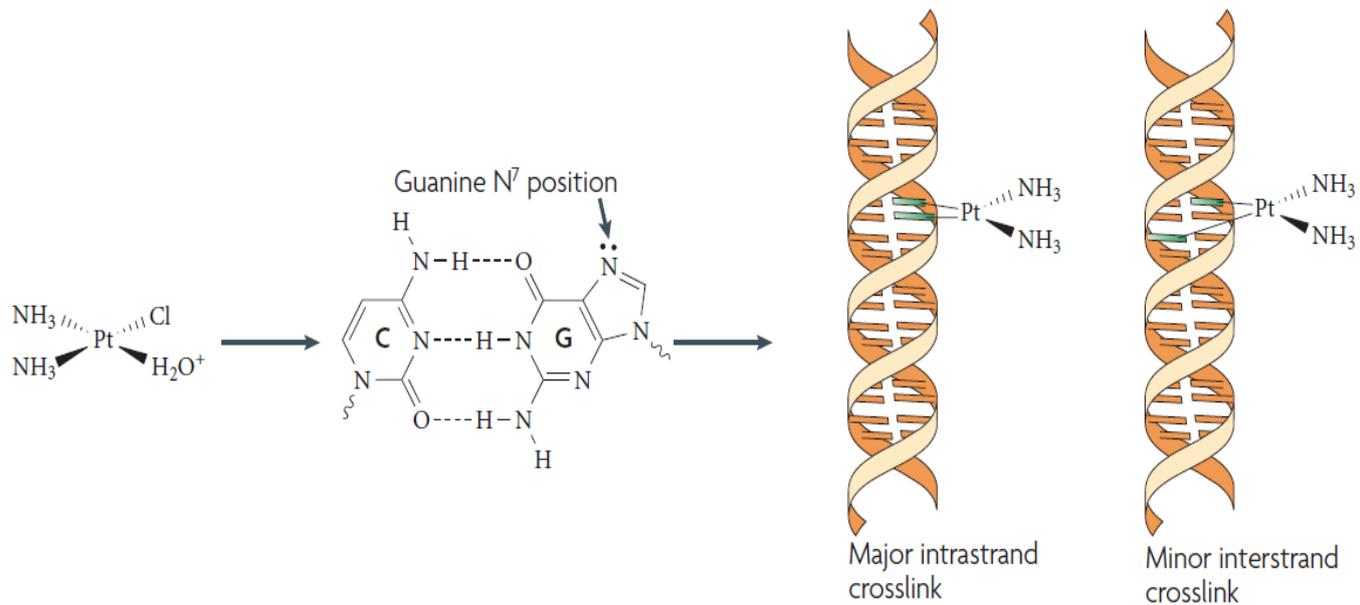
Une fois dans la cellule, la baisse de la concentration en ions chlorure facilite les réactions d'hydrolyse du cisplatine pour former des complexes très électrophiles. La forme avec une seule molécule d'eau est la plus active (figure 13).



**Figure 13 : Hydrolyse du cisplatine**

## Introduction

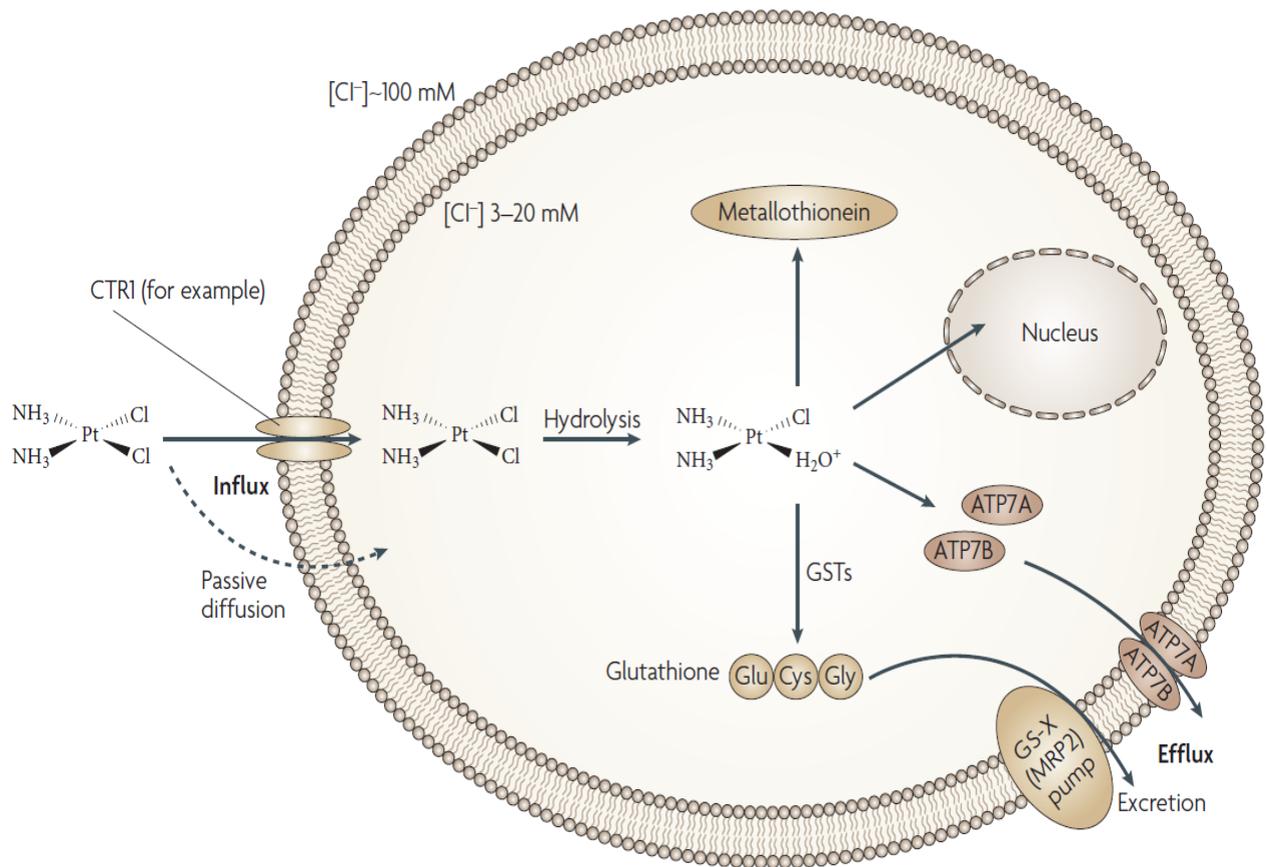
Ces complexes électrophiles peuvent interagir avec différents nucléophiles cellulaires, l'ADN, l'ARN, les protéines, le glutathion ou la méthionine. La cible principale est l'atome d'azote situé en N7 des bases puriques de l'ADN pour former des ponts ADN-protéine ou inter et intrabrans ADN-ADN. Les ponts intrabrans entre deux bases purines adjacentes ApG et GpG sont les plus fréquents et comptent pour 85% des lésions induites par le cisplatine (figure 14)



**Figure 14 : liaisons cisplatine-ADN (Kelland, 2007)**

Les interactions possibles entre le cisplatine et les thiols permettent à la cellule de se protéger des effets du cisplatine. Le glutathion (GSH), thiol le plus abondant des cellules, est un tri-peptide de séquence Glu-Cys-Gly possédant un atome de soufre sur lequel se fixe le cisplatine. Le complexe GSH-cisplatine va être exporté hors de la cellule par des pompes ATP dépendantes d'export des complexes glutathion conjugués (GS-X pompe) (figure 15).

# Introduction



**Figure 15 : Régulation de l'action du cisplatine (Kelland, 2007)**

La présence des adduits d'ADN provoqués par le cisplatine va entraîner des distorsions physiques de l'ADN empêchant sa réplication. Ces dommages vont être reconnus par les différents systèmes de réparation. Parmi les 4 systèmes de réparation de l'ADN, le système NER (nucléotide excision repair) est principalement impliqué dans la réparation des lésions de l'ADN liées au cisplatine. Ceci a été mis en évidence en étudiant la très forte sensibilité des cancers testiculaires au cisplatine. Ces tumeurs présentent des concentrations faibles de certaines protéines du système NER : XPA, XPF et ERCC1 et des capacités de réparation diminuées des lésions liées au cisplatine.

L'effet cytotoxique du cisplatine passe par l'activation de la protéine P53 qui découle des dommages à l'ADN du cisplatine. L'activation de la protéine P53 est liée à sa phosphorylation directe sur la sérine 15 par la protéine ATR (ATM and RAD3 related protein). ATR va également phosphoryler P53 via d'autres protéines : CHK1 et des membres des MAPK en particulier ERK. P53 une fois activée, va permettre la transcription de gènes impliqués à la

## Introduction

---

fois dans le contrôle du cycle cellulaire, la réparation des dommages à l'ADN, l'apoptose incluant P21, gadd45a (growth arrest and DNA damage inducible gene) et Bax. En cas de dommages dépassant les capacités de réparation, l'activation de l'apoptose via Bax sera privilégiée. L'induction de l'apoptose via le cisplatine peut aussi passer par la voie FAS/FASL.

Il est communément admis que l'effet cytotoxique du cisplatine est lié à l'importance des dommages à l'ADN et à leur pérennité. Tous les mécanismes qui vont limiter l'importance de ces dommages ou augmenter leur réparation vont limiter l'action du cisplatine. De même toutes les étapes aboutissant à l'effet cytotoxique du cisplatine peuvent être autant de limites à son effet. La résistance au cisplatine est souvent multifactorielle rendant compte de la difficulté de sensibiliser de nouveau des cellules devenues résistantes au cisplatine (Siddik, 2003). Cette résistance peut être innée ou acquise par la cellule tumorale suite aux modifications génétiques ou épigénétiques pouvant être induite par le cisplatine (Sharma et al., 2010)

### ***3.2 Interactions Cisplatine et EGFR***

#### **3.2.1 Activation d'EGFR par le cisplatine**

Plusieurs études ont mis en évidence une augmentation de la phosphorylation des tyrosines de la zone catalytique d'EGFR après cisplatine dans lignées cellulaires de cancers de l'ovaire, de glioblastome ou de cancer bronchique non à petites cellules (Kim et al., 2015). La phosphorylation d'EGFR après cisplatine est corrélée à une phosphorylation d'Erk et d'Akt. Cette augmentation de la phosphorylation d'EGFR et de ses voies d'aval est surtout présente dans les lignées cellulaires sur-exprimant EGFR.

Plusieurs mécanismes à l'origine de cette phosphorylation d'EGFR ont été décrits.

L'activation d'EGFR par le cisplatine peut être médiée par les ligands d'EGFR ou indépendante de ceux-ci probablement en fonction du type cellulaire et de la disponibilité des ligands.

Dans des lignées cellulaires de cancer du sein et de glioblastome exprimant soit le variant III d'EGFR ou le récepteur complet, il a été montré une augmentation de la phosphorylation d'EGFR après cisplatine médiée par Src et indépendante des ligands car présente dans les cellules contenant EGFRvIII et persistante malgré l'utilisation d'anticorps anti-EGFR.

L'activation de Src résulterait quant à elle de la production d'espèces réactives de l'oxygène induite par le cisplatine (Benhar et al., 2002). A l'inverse il a été décrit, dans des lignées

## Introduction

---

cellulaires de cancer bronchique non à petites cellules, une activation d'EGFR liée au clivage par le cisplatine de la pro forme du ligand HB-EGF. Le cisplatine va induire l'activation de metalloprotéases qui vont cliver la proforme d'HB-EGF et ainsi libérer la forme active du ligand qui va se fixer sur le récepteur (Yoshida et al., 2008).

Les conséquences biologiques de cette activation de la fonction tyrosine kinase d'EGFR, quel qu'en soit le mécanisme, sont variables. Elle peut être un mécanisme de résistance au cisplatine, par augmentation de l'effet promoteur sur la survie d'EGFR (Ohta et al., 2012; Persons et al., 1999). A l'inverse cette activation peut favoriser l'action cytotoxique du cisplatine par l'augmentation de l'internalisation d'EGFR favorisant sa dégradation et limitant sa disponibilité à la membrane (Ahsan et al., 2010). L'ajout d'un ITK anti-EGFR pourra alors avoir des effets opposés (Van Schaeybroeck et al., 2006).

### **3.2.2 Régulation de l'internalisation d'EGFR par le cisplatine**

L'action du cisplatine ne se limite pas à l'activation du domaine tyrosine kinase d'EGFR. La phosphorylation d'EGFR induite par le cisplatine peut se faire également sur des sérines ou des thréonines qui vont jouer un rôle régulateur sur l'internalisation et la dégradation du récepteur modulant ainsi son activité. Cette phosphorylation est médiée par p38, une serine thréonine kinase de la famille des MAPK activée lors de stress cellulaire. P38 va phosphoryler la serine-1046/1047 et la thréonine-669 d'EGFR ce qui va favoriser son endocytose mais pas son ubiquitination contrairement à l'activation d'EGFR sur son site catalytique (Winograd-Katz and Levitzki, 2006). Les effets biologiques de cette régulation alternative de l'endocytose d'EGFR par le cisplatine sont là encore variables. Cette endocytose peut favoriser les contacts intra-cytoplasmique d'EGFR et de ses partenaires ou entraîner sa localisation nucléaire et ainsi favoriser la réparation des dommages à l'ADN et la résistance au cisplatine (Liccardi et al., 2011; Winograd-Katz and Levitzki, 2006). A l'inverse cela peut limiter la disponibilité d'EGFR à la membrane et favoriser l'effet cytotoxique du cisplatine (Zwang and Yarden, 2006).

Ainsi le cisplatine peut activer de différentes manières EGFR, en particulier dans les cellules le surexprimant, comme c'est le cas dans les cancers bronchiques. Les effets biologiques qui en découlent vont varier probablement en fonction du mécanisme prédominant. Ceci

## Introduction

---

pouvant favoriser ou au contraire inhiber l'effet du cisplatine. Ceci peut expliquer pourquoi l'effet bénéfique de l'erlotinib pour des patients EGFR sauvage prétraités par cisplatine est limité à un certain nombre d'entre eux rendant nécessaire de bien connaître les mécanismes qui aboutissent à une sensibilisation aux ITK anti-EGFR après cisplatine et d'avoir des marqueurs biologiques de cette sensibilisation.

### **4 Objectif de la thèse**

A partir des constatations cliniques d'un effet potentiel des ITK anti EGFR, pour des tumeurs bronchiques non à petites cellules EGFR sauvage prétraitées par cisplatine, l'objectif de ce travail a été d'évaluer, sur des lignées de cellulaires de cancer bronchique non à petites cellules EGFR sauvage et muté, l'effet d'un traitement par cisplatine sur la sensibilité de ces cellules à un ITK anti EGFR, l'erlotinib, et de déterminer les mécanismes moléculaires régulant cette sensibilité . Des xénogreffes de tumeurs dérivées de patients (PDX) ont ensuite été utilisées pour pouvoir confirmer in vivo un potentiel effet sensibilisateur du cisplatine à l'erlotinib et d'en déterminer les marqueurs biologiques.

# **MATERIELS ET METHODES**

## Matériels et méthodes

### Culture cellulaire

Les caractéristiques des lignées cellulaires utilisées sont résumées dans le tableau 1 ci-dessous [COSMIC]. Les cellules ont été achetées à l'ATCC entre 2011 et 2012.

	<b>EGFR</b>	<b>KRAS</b>	<b>p53</b>	<b>autres</b>
<b>H358</b>	WT	G12C	0	
<b>A549</b>	WT	G12S	WT	p16INK4a, BRG1, STK11
<b>H522</b>	WT	WT	P191	
<b>H1650</b>	E746A750del	WT	Intronic mutation	p16INK4a
<b>H1975</b>	L858R-T790M	WT	R273H	p16INK4a, PIK3CA

**Tableau 1 : Caractéristiques des lignées cellulaires**

Les cellules sont cultivées à 37°C avec 5% de CO<sub>2</sub> en milieu Roswell Park Memorial Institute (RPMI) (RPMI1640, Gibco, Thermo Fischer Scientific) contenant 10% de sérum de veau fœtal (SVF). Un contrôle mensuel de la présence de mycoplasme par technique d'amplification en chaîne par polymérase (PCR) a été réalisé.

### **Xénogreffes de tumeurs dérivées de patients (PDX)**

Les caractéristiques des tumeurs pulmonaires utilisées pour la réalisation des PDX sont résumées dans le tableau 2 ci-dessous :

## Matériels et méthodes

Exp	tumeurs	CHARACTERISTIQUES					
		Histologie de la tumeur du patient	Histologie du PDX	Mutations génétiques			
				EGFR exons 18-19-20-21	KRAS codons 12-13	BRAF exon 15 sonde V600E	PI3K
1266	LC-F-04-ML p23	adénocarcinome	adénocarcinome	Non muté	Non muté	Non muté	Non muté
1272	LC-F-09-PC p5	adénocarcinome	adénocarcinome	Non muté	Non muté	Non muté	Non muté
1304	IC14-LC16 p9	adénocarcinome	adénocarcinome	Non muté	Non muté	Non muté	Non muté
1335	IC8-LC10-Ned p4	adénocarcinome	adénocarcinome	Non muté	Non muté	Non muté	Non muté

**Tableau 2 : PDX d'adénocarcinomes bronchiques avec leurs caractéristiques moléculaires.**

Les tests in vivo ont été réalisés par l'Institut Curie sur des souris nude âgées de 4 à 6 semaines en accord avec les recommandations nationales et internationales en vigueur. Le protocole expérimental et le soin des animaux étaient conformes aux lignes directrices institutionnelles énoncées par le comité éthique français (autorisation C75-05-18, France).

Les PDX ont été greffées en sous cutanée au niveau de la zone inter-scapulaire des souris. Lorsque le volume de la tumeur atteint 50 à 100 mm<sup>3</sup>, les souris sont divisées en 4 groupes de traitement de 8 à 10 souris chacun, un groupe contrôle, un groupe traité par erlotinib, un groupe traité par cisplatine et un groupe traité par cisplatine et erlotinib. Les souris sont sacrifiées lorsque le volume tumoral atteint 2500mm<sup>3</sup>. Le volume tumoral est mesuré deux fois par semaine en prenant deux diamètres perpendiculaires. Le volume tumoral correspond à  $a \times b^2/2$  où a=diamètre le plus grand et b=diamètre le plus petit. Le volume tumoral relatif (VTR) correspond au ratio entre le volume tumoral à un temps t et le volume initial multiplié par 100. Le taux d'inhibition de croissance tumorale correspond à  $ICT=100-[(VTR_t/VTR_c)*100]$  ou VTRc est le volume tumoral relatif du groupe contrôle et VTRt celui du groupe traité

## Matériels et méthodes

---

### **Réalisation des milieux conditionnés**

Les cellules sontensemencées en boîtes de 10 cm et traitées par cisplatine 3 $\mu$ M pendant 48h. Après lavage le milieu est remplacé par du milieu sans sérum pendant 48h. Le surnageant est ensuite centrifugé pour éliminer les débris cellulaires et utilisé pour les différentes expériences. Les cellules sont quant à elles décollées à la trypsine (Trypsine EDTA, Gibco) puis comptées pour obtenir la quantité de ligand par millions de cellules.

### **Dosage des molécules solubles par ELISA**

Les dosages des molécules solubles d'intérêt ont été réalisés soit dans les milieux conditionnés soit directement dans le milieu après traitement de 48h par cisplatine 3 $\mu$ M en RPMI 10% de SVF.

Les Kits DUOSET (R and D system) HB EGF, human IL6, human HGF, human amphiregulin, human betacellulin ainsi que les quantikine ELISA (R and D system) Human TGF  $\alpha$  et Human HGF ont été utilisés selon les recommandations du fabricant. Pour le dosage de la prostaglandin E2 nous avons utilisé le kit Amersham PGE2 enzyme immuno assay (EIA) system (GE Healthcare).

Le surnageant est incubé 2h avec l'anticorps de capture sur une plaque 96 puits. Après lavage par Phosphate Buffered Saline (PBS) tween 0.05%, le substrat est incubé 2h avec l'anticorps de détection à température ambiante. Après lavage au PBS tween 0,05%, la streptavidine couplée à la peroxydase de raifort (HRP), est ajoutée pendant 20min. Enfin l'activité de la peroxydase est révélée par l'ajout d'eau oxygénée et de tetramethylbenzidine. Après 20 minutes d'incubation la réaction est stoppée par l'ajout d'acide sulfurique. La colorimétrie est lue sur lecteur de plaque VICTORX3 (Perkin Elmer) à 450nm.

### **Test de viabilité cellulaire**

Les cellules sont implantées dans des plaques 6 puits et traitées par les différents traitements d'intérêt. A différents temps prédéfinis, les cellules sont décollées à la trypsine puis centrifugées avec leur surnageant à 1000 rpm pendant 5 minutes. Après lavage au PBS le culot cellulaire est re-suspendu dans 300  $\mu$ l de PBS. Après ajout de 4-[3-(3-methyl-2(3H)-benzothiazolylidene)-1-propenyl]-1-[3-(trimethylammonio) propyl] To-Pro3 au 1/4000ème, la viabilité des cellules est immédiatement lue au cytomètre en flux ACCURI C6 (BD biosciences). Les cellules mortes auront internalisées le To-Pro 3 détecté par le cytomètre.

## Matériels et méthodes

---

Les résultats représentent soit la moyenne de fluorescence de la population globale soit le pourcentage moyen des cellules To-Pro 3 positives.

### **Mesure de l'IC 50 par MTT**

Les mesures de l'IC50 ont été calculées selon la méthode décrite par CHOU et al (Chou, 2006). Les cellules sont implantées à la densité de 5000 cellules/puits pour chacune des lignées en plaque 96 puits puis traitées par cisplatine 48h ou erlotinib 72h selon une gamme de concentration croissante dans un milieu standard ou dans un milieu conditionné. La gamme de concentration varie de 0 à 100µM pour le cisplatine et pour l'erlotinib de 0 à 15µm pour la lignée H358 et de 0 à 100 µM pour les autres lignées.

La viabilité est obtenue par mesure colorimétrique d'activité enzymatique. Les cellules traitées après retrait du milieu sont incubées pendant 3h avec 10µM de sel de tetrazolium MTT (bromure de 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium) à 37°C. Le milieu est ensuite remplacé par 200µl de Diméthylsulfoxyde (DMSO) 10% pour solubiliser les cristaux de formazan et la plaque est lue à 570nm grâce à un spectrophotomètre VICTORX3 (Perkin Elmer). Le pourcentage de cytotoxicité est calculé par rapport au témoin non traité (%=100x(ctl-echantillon/ctl).

### **Immuno-cytochimie**

Les cellules sontensemencées sur lamelles en plaque 6, 12 ou 24 puits puis traitées par cisplatine 3µM pendant 48h. Les cellules sont ensuite fixées 15 minutes au paraformaldéhyde (PFA) 4% après lavage au PBS. Le marquage est réalisé après perméabilisation des cellules au PBS-Sodium dodécyl Sulfate (SDS) 0.1% 10 min à température ambiante puis saturation en PBS-albumine de serum bovin (BSA) à 5% pendant 1 heure à température ambiante.

Les cellules sont incubées avec les anticorps primaires d'intérêts dilués dans du PBS-BSA 1% une nuit à 4°C. Après lavage au PBS, les cellules sont incubées avec les anticorps secondaires dirigés contre la partie spécifique d'espèce de l'anticorps primaire couplés à un fluorochrome (alexa fluor 647 ou 488, Molecular probes) 1h à l'abri de la lumière à température ambiante. Les lamelles sont ensuite montées sur lame à l'abri de la lumière à l'aide du milieu de montage Prolong Gold Reagent (ref P-36931, Invitrogen) contenant du

## Matériels et méthodes

---

DAPI permettant la coloration des noyaux des cellules. La mesure de la fluorescence se fait à l'aide :

- D'un microscope Axiovert 200M (Zeiss, Lepecq, France) possédant un apotome (x63 et ouverture numérique 1.4). L'analyse de la fluorescence se fait grâce au plugin 3D Object counter sur le logiciel libre ImageJ 1.46r.
- D'un microscope confocal A1R spectral, utilisant le logiciel Nis Element software (Nikon Instruments, Champigny sur Marne, France). L'analyse de la fluorescence est effectuée grâce au logiciel d'analyse d'image Volocity (Perkin Elmer).

Toutes les images ont été effectuées sur la plateforme d'imagerie MicroPiCell (Université de Nantes, France).

### **Cytométrie en flux**

Pour les marquages de protéines membranaires, après les différents traitements, les cellules sont récupérées intactes en PBS-BSA 1% à 4°C puis distribuées en plaques 96 puits à 200 000 cellules/puits. Après lavage en PBS-BSA 1%, les cellules sont incubées avec les anticorps primaires dilués en PBS-BSA 1% 1 heure à 4°C puis 30 minutes à 4°C avec les anticorps secondaires correspondant couplés au fluorochrome (Alexa fluor 488).

Pour le marquage de protéines intracellulaires, les cellules sont fixées en paraformaldehyde 4%. Le marquage est réalisé après perméabilisation des cellules par PBS-saponine 0.5% puis saturation en PBS-BSA 5%. Les anticorps primaires sont dilués dans du PBS-saponine 0,1%-BSA 1% et couplés aux anticorps secondaires Alexa Fluor 488.

Toutes les mesures de cytométrie en flux ont été réalisées sur Accuri C6 (BD Biosciences). La fixation non spécifique de l'anticorps secondaire a été mesurée pour chaque expérience sur des cellules non marquées par l'anticorps primaire et la moyenne de fluorescence obtenue a été déduite de la fluorescence obtenue avec les anticorps primaires.

### **Analyse des interactions protéine-protéine par ligation in situ (proximity ligation assay P-LISA)**

Cette technique permet de quantifier les interactions entre deux protéines qui apparaissent sous forme de points dans les cellules. Les deux protéines doivent être marquées avec des anticorps primaires d'origine différente, puis des anticorps secondaires spéciaux couplés à

## Matériels et méthodes

---

une séquence nucléotidique sont ajoutés. Si les protéines d'intérêt sont assez proches l'une de l'autre, les séquences peuvent s'hybrider à une sonde, être amplifiées puis marquées par fluorescence.

Les cellules ont été ensemencées en plaques 24 puits sur des lamelles stériles en verre puis laissées une nuit pour qu'elles adhèrent au support. Après traitement, les cellules sont fixées avec du paraformaldéhyde 4% pendant 15 min à température ambiante. Après un rinçage au PBS, les cellules sont perméabilisées avec du PBS-SDS 0,1% pendant 10min à température ambiante. La saturation, l'immunomarquage, l'hybridation, la ligation, l'amplification et la détection sont réalisés suivant les recommandations du fabricant (Duolink, Sigma Aldrich). Pendant ces étapes, toutes les incubations sont réalisées en chambre humide. L'amplification et la détection se font à l'abri de la lumière. Les préparations sont ensuite montées sur lames en utilisant du Prolong Gold reagent (P36931 Invitrogen) contenant du DAPI. La fluorescence est visualisée sur le microscope Axiovert 200-M possédant un module ApoTome. L'analyse de la fluorescence est réalisée grâce au plugin 3D Object counter sur le logiciel libre ImageJ 1.46r.

### Mesure par qPCR et RT PCR

Les ARN totaux sont extraits à partir des culots cellulaires ou à partir des PDX congelés à -80°C avec le kit d'extraction RNeasyMinikit (Qiagen) selon les recommandations du fabricant. Le protocole inclus un traitement à la DNase 1. La concentration en ARN est déterminée à l'aide d'un spectrophotomètre (Biospectrometer Eppendorf, France). La rétrotranscription des ARN totaux (1 µg) a été réalisée avec le kit QuantiscriptReverse Transcriptase (Qiagen). L'analyse en qPCR a été réalisée et contrôlée par duplicat technique avec le système Rotor-Gene Q PCR (Qiagen). Les gènes de référence utilisés sont GAPDH, actine et RPLP0. La quantification de l'expression relative se fait par rapport aux gènes de référence et par rapport aux conditions contrôles. Les primers IFIT1, IFI27, IL6, RPLP0, actine et GAPDH ont été achetés à Qiagen et validés par le fournisseur (QuantiTectprimers : IFIT1 QT00201012, IFI27 QT00099274, IL6 QT00083720, RPLP0 QT00075012, actine QT01680476, GAPDH QT 00079247). Les primers ciblant *Mycoplasma pneumoniae* proviennent de Sigma-Aldrich. Les primers EGFR, vimentine et cadherine ainsi que le mix d'amplification SYBR Green Rotor-Gene (kit #204076) proviennent de Qiagen.

## Matériels et méthodes

---

### **Transfection des lignées cellulaires**

L'extinction du gène EGFR dans les lignées parentales A549 et H358 est obtenue grâce à l'utilisation de la technologie CRISPR-Cas9. Lorsque les cellules atteignent 60% de confluence, elles sont co-transfectées avec deux plasmides contenant :

- Les différents ARN guides (p3Ba, p3Bb, p3Bc) et la séquence de la Cas 9 ;
- Le système de réparation (pDO1) ainsi qu'une double cassette exprimant : un gène de résistance à la puromycine et la protéine fluorescente GFP.

Les réactifs de transfection sont ajoutés selon un ratio 1 : 2 ADN/ réactif, suivant les instructions du fabricant (jetPRIME<sup>®</sup>Polyplus-transfection). Une amplification sélective par antibiotique, puromycine 0,5µg/ml (Gibco, Life technologies SAS, Courtaboeuf, France) pour la lignée H358 et 1 µg/ml pour la lignée A549, est effectuée à 48h de la transfection. Les cellules transfectées sont ensuite clonées, puis analysées par cytométrie en flux, par PCR et western blot afin de confirmer l'absence d'expression d'EGFR. Seuls les clones présentant une extinction complète et stable d'EGFR ont été sélectionnés.

### **Fractionnement cellulaire**

La méthode de fractionnement cellulaire a été adaptée du protocole de centrifugation différentielle de l'équipe de Wieckowski (Wieckowski et al., 2009). Un gradient de Percoll est utilisé pour séparer les membranes associées à la mitochondrie (MAM) des mitochondries pures. A partir de cette procédure, 5 fractions peuvent être identifiées :

- La fraction mitochondriale (FM) qui est composée de mitochondries toujours associées aux MAM.
- La fraction de mitochondries purifiées qui ne sont plus associées aux MAM.
- La fraction de MAM
- La fraction du réticulum endoplasmique (RE)
- La fraction du cytosol

Les fractionnements cellulaires ont été obtenus à partir de cellules en culture en boîtes 10 cm. Environ  $150 \times 10^6$  de cellules sont nécessaires pour ce fractionnement. La procédure d'extraction a lieu à J5 de l'ensemencement et le traitement par cisplatine si nécessaire réalisé à J3 de l'ensemencement (soit 48h de traitement avant extraction). Les

## Matériels et méthodes

tampons nécessaires au fractionnement sont réalisés la veille et résumés dans le tableau 3 ci-dessous. Ils sont tous à pH 7,4 et à 4°C.

Tampon	Composition
Starting Buffer	225mM Mannitol, 75mM sucrose, 30mM Tris-HCL
IB Cell Buffer	225mM Mannitol, 75mM sucrose, 30mM Tris-HCL, 0,1mM EGTA
Tampon MRB	250mM Mannitol, 5mM HEPES, 0,5mM EGTA
Milieu Percoll	250mM Mannitol, 25mM HEPES, 1mM EGTA, percoll 30%

**Tableau 3 : Tampons utilisés pour le fractionnement cellulaire**

### *Extraction de la fraction mitochondriale*

Les culots cellulaires obtenus après décollement des cellules à la trypsine et lavage sont re-suspendus dans 1,5ml de tampon IB Cell 1 et laissés 15 minutes sur glace. Les cellules sont ensuite broyées à l'aide d'un polybroyeur verre/verre (Potter-Elvehjem glass/glass) adapté sur moteur mécanique. Environ 200 cycles de broyage sont nécessaires pour ne plus obtenir que 10 à 20% de cellules viables mesurées en cytométrie en flux.

En fin de broyage l'homogénat est centrifugé à 600g à 4°C pendant 5 minutes. Le surnageant est récupéré puis centrifugé à son tour à plusieurs reprises (600g, 4°C, 5 minutes) pour éliminer les noyaux et les cellules intactes. Ensuite le surnageant est centrifugé à 7000g à 4°C pendant 10 minutes. A l'issue de cette centrifugation, le surnageant SN\*est conservé pour l'extraction du RE et du cytosol à une étape ultérieure. Le culot est récupéré puis re-suspendu dans 1mL de tampon IB Cell 2 et centrifugé une première fois à 7000g à 4°C pendant 10 minutes, puis une seconde fois dans le même

## Matériels et méthodes

---

tampon à 10000g. Le culot issu de cette dernière centrifugation correspond à la FM. Ce culot est re-suspendu dans 850µl de tampon MRB puis aliquoté et conservé à -20°C.

### *Purification de la fraction mitochondriale : extraction des mitochondries purifiées et des MAM*

La fraction mitochondriale est déposée à la surface de 6,7ml de milieu Percoll et recouverte de 500µl de tampon MRB puis ultracentrifugée à 95000g à 4°C pendant 30 minutes. Au terme de cette ultracentrifugation sont obtenus 2 anneaux : en haut, l'anneau correspondant au MAM et en bas, celui correspondant aux mitochondries pures. Ces 2 anneaux sont récupérés séparément à la pipette puis centrifugés à 6300g à 4°C pendant 10 minutes.

Le surnageant obtenu à partir de l'anneau de MAM est centrifugé à 100000g à 4°C pendant 1 heure à deux reprises. Le culot de MAM issu de ces 2 ultracentrifugations est aliquoté et congelé à -20°C.

Le culot obtenu à partir de l'anneau des mitochondries pures est suspendu dans 1ml de tampon MRB puis centrifugé à 6300g à 4°C pendant 10 minutes. Le culot issu de cette dernière centrifugation est repris dans du tampon MRB et congelé à -20°C.

### *Purification du RE et du cytosol*

Le volume de surnageant SN\* est complété par du tampon IB Cell1 pour obtenir un volume final de 8ml. Il est ensuite ultracentrifugé à 20000g à 4°C pendant 30 minutes. Le surnageant est récupéré et ultracentrifugé à 100000g à 4°C pendant 1 heure. Au terme de cette dernière ultracentrifugation, le surnageant représentant le cytosol est récupéré aliquoté et conservé à -20°C. Le culot correspondant au RE est resuspendu dans du tampon MRB puis aliquoté et conservé à -20°C.

### *Vérification de la pureté de chaque fraction*

Pour vérifier la pureté de chaque fraction, une analyse en western Blot est réalisée. Des marqueurs associés aux mitochondries (cytochrome c, TOM20, VDAC) ou au RE (calréticuline, FACL4) sont utilisés. Aucun contrôle interne de normalisation (tel que

## Matériels et méthodes

---

l'actine) n'étant disponible pour ces fractions, l'analyse est réalisée par comparaison de l'expression des marqueurs au sein de cette fraction.

- La FM contient des marqueurs associés aux mitochondries et au RE
- Les MP contiennent des marqueurs associés aux mitochondries
- Le RE contient les marqueurs associés au RE
- Les MAM contiennent les marqueurs associés au RE et une partie des marqueurs mitochondriaux.
- Le cytosol ne contient aucun de ces marqueurs

### **Analyse des protéines totales par Western Blot**

A partir de culots cellulaires, les protéines sont extraites par lyse de ces culots dans du tampon RIPA ou Phosphosafe (afin de conserver la phosphorylation des protéines) 30 minutes à température ambiante. Les culots sont centrifugés 15 minutes à 13000g afin de récupérer le surnageant. La quantité de protéines totales est ensuite déterminée par le kit BCA (BiCinchoninic Assay) (FT-UP40480 Uptima, Interchim). Les fractions subcellulaires ne subissent pas de lyse chimique.

Pour les électrophorèses en condition dénaturante, 30 à 50µg de protéines sont déposées par puit sur un gel SDS/polyacrylamide à 8, 10, 12% ou 15% en fonction du poids moléculaire des protéines d'intérêt et séparées par électrophorèse. Les protéines sont ensuite transférées sur une membrane PVDF (Polyvinylidènefluoride) par transfert liquide à 50V sur la nuit à 4°C. Les membranes sont saturées par du PBS-Tween- lait 5% ou BSA 5% (pour l'analyse des protéines phosphorylées), puis marquées par l'anticorps primaire dilué selon les conditions indiquées par le fabricant une nuit en chambre froide. Après marquage par un anticorps secondaire couplé à l'HRP dirigé contre la partie spécifique d'espèce de l'anticorps primaire, la présence du complexe anticorps primaire/secondaire est révélée après incubation de la membrane avec le substrat de l'HRP (Clarity™ Western ECL, Biorad) pendant 5min à l'obscurité puis par analyse numérique de la chimi-luminescence sur l'appareil Chemidoc™ Imaging System (Bio Rad) et l'analyse semi-quantitative par logiciel imageJ.

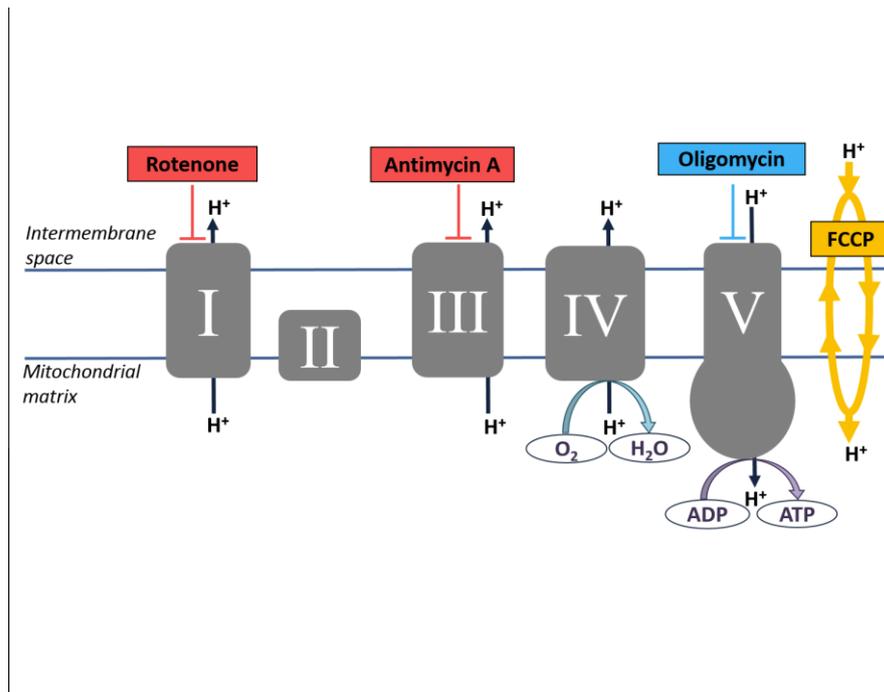
## Matériels et méthodes

---

### **Mesure du taux de consommation d'oxygène et du taux d'acidification extracellulaire**

Un analyseur de flux extracellulaire XFe24® (Seahorse Bioscience) est utilisé pour déterminer le phénotype métabolique des lignées A549 et A549 3bC1, en conditions contrôle et après traitement par cisplatine 48h, et de la lignée A549cis3. Il mesure en temps réel le taux de consommation d'oxygène (OCR) et le taux d'acidité extracellulaire (ECAR), indicateurs respectifs de la respiration mitochondriale et de la glycolyse aérobie (Wu et al., 2007). Pour cela, les cellules sont traitées par différents modulateurs de la respiration : des inhibiteurs mitochondriaux qui ciblent les complexes de la chaîne mitochondriale de transport d'électrons (ETC) - la roténone (inhibiteur du complexe I), l'antimycine A (inhibiteur du complexe III), l'oligomycine (inhibiteur de l'ATP Synthétase ou complexe V) - un perturbateur du potentiel de membrane mitochondrial (Chevrollier et al., 2005), le carbonylcyanidem-chlorophenylhydrazone (CCCP) et un inhibiteur de la glycolyse, le 2-deoxyglucose (2-DG). Le site d'action de ces inhibiteurs est visualisé sur la figure 16.

Après mesure du niveau basal d'OCR, les cellules sont traitées séquentiellement par oligomycine, CCCP, antimycine A/roténone et 2-DG, ce qui permet respectivement de mesurer la production d'ATP, la respiration mitochondriale maximale et enfin la respiration non mitochondriale. L'efficacité de couplage (coupling efficiency) – soit la fraction de consommation d'oxygène mitochondrial utilisée pour synthétiser l'ATP - et la capacité respiratoire de réserve (spare capacity) - soit la capacité d'approvisionnement en substrat et le transport d'électrons permettant de répondre à une augmentation de demande en énergie - sont calculées grâce à la courbe d'OCR



**Figure 16 : Site d'action des inhibiteurs de phosphorylations oxydatives dans la chaîne mitochondriale de transport des électrons (ETC) :**

Les inhibiteurs mitochondriaux ciblent les complexes de la chaîne respiratoire : la roténone cible le complexe I (NADH-ubiquinone oxydoréductase) ; l'antimycine A le complexe III (ubiquinol cytochrome c oxydoréductase) et l'oligomycine le complexe V (ATP Synthétase). Le CCCP perturbe quant à lui le potentiel de membrane mitochondrial.

Les cellules sont implantées la veille de l'analyse en plaque 24 puits (XF24, Seahorse Bioscience) à une densité de  $4.0 \times 10^4$  cellules/puit dans 500  $\mu$ L de milieu de culture, puis sont incubées à 37°C et 5% CO<sub>2</sub> pendant 20-24h. Le jour de la mesure, le milieu de culture est remplacé par le milieu de dosage (XF Base Medium) complété par 1 mM de pyruvate, 2 mM de glutamine, 11 mM de glucose (Sigma) et 0.1 N de NaOH (ajustement du pH à 7.2), selon les instructions du fabricant (XF Cell Mito Stress Test Kit, Agilent Technologies). Les cellules sont alors incubées 60 minutes à 37°C dans un incubateur sans CO<sub>2</sub>. La cartouche préalablement hydratée (XF Calibrant) 24h à 37°C dans un incubateur sans CO<sub>2</sub>, est alors chargée par 70  $\mu$ L de réactif/port d'injection puis mise à calibrer dans l'analyseur Seahorse XFe24® à 37°C avant l'acquisition. Les différents inhibiteurs décrits ci-dessus (Sigma) ont été préparés selon les concentrations suivantes : 1  $\mu$ M oligomycine (port A), 0.8 ou 1.2  $\mu$ M CCCP (port B), 1  $\mu$ M antimycine A / roténone (port C) et 100 mM 2-DG (port D), selon les instructions du fabricant (Seahorse XF cellmito stress guide).

## Matériels et méthodes

---

### Produits utilisés

*In vitro :*

Le cisplatine a été fourni par la pharmacie de l'institut de cancérologie de l'Ouest (Accord Healthcare, Lille, France 1mg/ml). L'erlotinib provient de Cayman Chemicals (#10483).

Les inhibiteurs pharmacologiques de Src ont été achetés à Sigma Aldrich (#P0040 et #P0042)

*In vivo :*

Le cisplatine et l'erlotinib ont été fournis par l'institut Curie.

Cisplatine 50mg/50ml solution (Mylan) conservé à température ambiante à l'abri de la lumière. Erlotinib : comprimés de 150mg (Roche) conservés à température ambiante avant solubilisation puis 4°C. La solution a été obtenue après dissolution des comprimés dans 30ml de glucose 5% pour une concentration finale de 5mg/ml.

### Anticorps utilisés

Anticorps	Espèces	Références	Utilisation
EGFR membranaire	souris	Santa Cruz Biotechnology #sc-120	Cytométrie
HER2 membranaire	souris	Santa Cruz Biotechnology #sc-23864	Cytométrie
HER3 membranaire	souris	Santa Cruz Biotechnology #sc-71068	Cytométrie
pEGFR (Y1068)	lapin	Cell Signaling Technology #3777	Cytométrie, WB
pEGFR (y845)	lapin	Cell Signaling Technology #6963	cytométrie
pAKT (S473)	lapin	CellSignalingTechnology #9271	Cytométrie
pERK1/2 (T202/Y204)	Lapin	Cell signaling Technology #9101	Cytométrie

## Matériels et méthodes

<b>EGFR total</b>	Lapin	Cell signaling Technology #4267	P-Lisa, WB
<b>GRB2</b>	souris	BD Biosciences #610112	P-Lisa
<b>Ac anti EGFR (225)</b>	souris	Invitrogen #MA5-12880	Ac bloquant
<b>Ac anti IL6 clone 6708</b>	souris	RnD Systems #MAB206	Ac Bloquant
<b>pTBK1</b>	lapin	Cell Signaling Technology #5483S	WB, cytométrie
<b>pIRF3</b>	lapin	Cell Signaling Technology #29047S	Cytométrie, WB
<b>Actine</b>	souris	Millipore MAB1501R	WB
<b>pSrc (Y419)</b>	souris	Santa Cruz Biotechnology #sc81	Cytometrie
<b>Mitofusine 1</b>	lapin	Cell Signaling technology #14739	P-Lisa IF
<b>Mitofusine 2</b>	lapin	Cell Signaling technology #11925	P-Lisa
<b>Cytochrome c</b>	souris	Santa cruz Biotechnology #sc13560	IF
<b>pTYR100</b>	souris	Cell Signaling Technology #9411S	WB, P-Lisa
<b>IgG1 control</b>	souris	RnD Systems #MAB002	Ac bloquant

**Tableau 4 : Liste des anticorps utilisés pour les différentes expériences.**

### Analyses statistiques

Les analyses statistiques des tests in vitro ont été réalisées grâce au programme GraphPadPrism 5QuickCalcs en utilisant des t-Tests de Student. Toutes les analyses ont été faites à partir de trois expériences indépendantes, sauf cas contraire indiqué dans le texte. Les barres d'erreurs représentent les moyennes +/- les déviations standard de ces 3 expériences. Les différences significatives sont indiquées comme suit :  $p < 0,05$  (\*),  $p < 0,01$  (\*\*) et  $p < 0,001$  (\*\*\*) .

## Matériels et méthodes

---

Les comparaisons par paires, pour l'analyse des volumes tumoraux des expériences in vivo, ont été analysées par t-test exact de Fischer.

L'analyse de corrélation de Pearson a été réalisée suivant les données du tableau 4 (cf résultats) grâce au logiciel XLSTAT v2016.03 (Addinsoft 2010).

# RESULTATS

### **1. Rôle du cisplatine sur la sensibilité aux ITK anti-EGFR des cellules de cancers bronchiques non à petites cellules EGFR sauvage**

**Sensitization of EGFR wild-type non-small cell lung cancer cells to EGFR-Tyrosine Kinase Inhibitor erlotinib. *Mol Cancer Ther*; 16(8); 1634–44.2017 AACR**

Judith Raimbourg<sup>1,2,3</sup>, Marie-Pierre Joalland<sup>1,2,3</sup>, Mathilde Cabart<sup>1,2,4</sup>, Ludmilla de Plater<sup>5</sup>, Fanny Bouquet<sup>6</sup>, Ariel Savina<sup>6</sup>, Didier Decaudin<sup>5,7</sup>, JaafarBennouna<sup>1,2,3</sup>, François M Vallette<sup>1,2,3\*</sup> and LisennLalier<sup>1,2,3\*</sup>

<sup>1</sup>UMR 1232 INSERM, Nantes, France; <sup>2</sup>Faculty of Medicine, Nantes University, Nantes, France; <sup>3</sup>Institut de Cancérologie de l'Ouest, Nantes-Saint Herblain, France; <sup>4</sup>Institut Bergonié, Bordeaux, France; <sup>5</sup>Laboratory of Preclinical Investigation, TranslationalResearchDepartment, Institut Curie, PSL University, Paris, France; <sup>6</sup>Institut Roche, Boulogne-Billancourt, France; <sup>7</sup>Department of MedicalOncology, Institut Curie, Paris, France.

Running title: wtEGFR non-small cell lung cancer sensitization to erlotinib

Keywords: cancer, non-small cell lung cancer, chemotherapy, EGFR,

Financial support: this work was supported by The LigueContre le Cancer (Committees 17 and 44), by Roche Laboratory and by INSERM recurrent fundings. JR was supported by the French Fondation pour la RechercheMédicale and by Roche Laboratories, MC was sponsored by the Association pour la Recherchesur le Cancer.

\* correspondance to: Lisenn Lalier, LaBCT INSERM U1232, Institut de Cancérologie de l'Ouest, bd Jacques Monod, 44800 Saint Herblain, lisenn.lalier@univ-nantes.fr; or to: François M Vallette, CRCINA INSERM U1232, IRSUN, 8 quai Moncoussu, 44007 Nantes Cedex 01, francois.vallette@univ-nantes.fr.

6 figures, 4946 words

# Résultats

---

## Abstract

The benefit of EGFR-TKI in non-small cell lung cancer has been demonstrated in mutant EGFR tumors as first-line treatment but the benefit in wild-type EGFR tumors is marginal as well as restricted to maintenance therapy in pretreated patients. This work aimed at questioning the effects of cisplatin initial treatment on the EGFR pathway in non-small cell lung cancer and the functional consequences in vitro and in vivo animal models of Patient-Derived Xenografts (PDX). We establish here that cisplatin pretreatment specifically sensitizes wild-type EGFR expressing cells to erlotinib, contrary to what happens in mutant-EGFR cells and with a blocking EGFR antibody, both in vitro and in vivo. The sensitization entails the activation of the kinase Src upstream of EGFR, thereafter transactivating

## Introduction

EGFR is the receptor for epidermal growth factor (EGF) and belongs to the tyrosine kinase receptors (RTK). This transmembrane receptor protein is involved in the fine regulation of epithelial cells proliferation through the extracellular binding of its ligands and the complex cross-talk with several membrane receptors, including the other members of the erbB/HER-family (1). The very subtle regulation is achieved by the multiplicity and redundancy of the ligands and dimerization partners of EGFR (1, 2). The broad field of its downstream signaling pathways also stands for the multiplicity of biological effects induced by EGFR activation (3). Several reports besides revealed a non-canonical, ligand-independent activation (trans-activation) of EGFR (4) in epithelial and non-epithelial cells (5, 6). This points out that the biological role of EGFR oversteps the sole regulation of cell proliferation in response to EGF-like ligands.

EGFR mutation is one of the major driver mutations in non-small cell lung cancer (NSCLC). EGFR tyrosine kinase inhibitors (EGFR-TKI) have constituted a significant advance in the care of patients which tumors harbour a mutated, activated form of EGFR (7). Conversely, the indication of EGFR-TKI in patients with wtEGFR tumor is more debated (8-10). If the absence of efficacy is demonstrated in first-line treatment, pretreated patients could benefit from EGFR-TKI. Aside from the newly arising immune-based therapies, targeted therapies are of high efficiency in the case of oncogenic mutation-driven tumors, even only a small percentage of tumors are concerned so far. Despite much effort was made in order to find out new therapeutic strategies in lung cancer, platinum-based chemotherapy (associated with pemetrexed) remains the backbone therapy in wild-type EGFR non-small cell lung cancer (NSCLC).

The first-line chemotherapy induces drastic modifications of cancer cells, at the non-genetic (11) or genetic levels (12). Such events are susceptible to alter the cell response to the subsequent treatments and underline the need for repeated biopsies along the treatment (13). This can account for the observations made in clinical trials that wild-type EGFR patients benefit from EGFR-TKI as a maintenance treatment following to platinum-based first-line therapy (8). High-dose cisplatin treatment was shown to induce EGFR activation in lung cancer cell lines (14). Given the fact that cisplatin is the usual first-line chemotherapy for wild-type EGFR NSCLC, we aimed at investigating the

# Résultats

---

consequences of a sublethal cisplatin treatment upon the surviving cells sensitivity to erlotinib, either in wild-type or mutated-EGFR cell lines. We also questioned the effect of long-term cisplatin exposure to sensitized cells and explored the molecular pathways involved. We finally used lung cancer patients derived xenografts (PDX) to challenge the sensitization observed in vitro and found out markers of the described sensitization, thereby bringing a new perspective to the use of EGFR-TKI in EGFR wild-type NSCLC.

## Materials and Methods

### Material used

wtEGFR (A549, H358 and H522) and mutant EGFR cell lines (H1650 and H1975) were purchased from the ATCC between 2011 and 2012. Cells from an individual frozen stock vial were grown for a maximum of four consecutive months and were monthly tested for Mycoplasma contamination. They were grown and treated by the indicated drugs in 10% fetal bovine serum-containing medium (RPMI 1640, Gibco, ThermoFischer Scientific) unless otherwise stated. The references of the antibodies used were following: membrane EGFR, Santa Cruz #sc-120; membrane Her2, Santa Cruz #sc-23864; membrane Her3, Santa Cruz #sc-71068; phospho-EGFR (Y1068), Cell Signaling Technology #3777; phospho-AKT (S473), Cell Signaling Technology #9271; phospho-ERK1/2 (T202/Y204), Cell Signaling Technology #9101; total EGFR, Cell Signaling Technology #4267; GRB2, BD Biosciences #610112; pTyr100, Cell Signaling Technology #9411; blocking EGFR antibody (225), Invitrogen #MA5-12880; blocking IL6 antibody, R&D Systems #MAB206; control IgG1, RnD Systems #MAB002. PP1 and PP2 inhibitors (15) were purchased from Sigma Aldrich (#P0040 and #P0042). ELISA kits were purchased from R&D Systems and used according to the manufacturer's instructions.

All experiments were repeated three times independently unless otherwise stated and analyzed by Student t-test.

### Flow cytometry

Flow cytometry was performed with BD Accuri C6 cytometer. The detection of membrane proteins was performed with intact cells at 4°C with the indicated antibodies diluted in 1% BSA coupled to fluorescent (FITC) secondary antibodies. For the detection of intracellular proteins, cells were fixed by 4% paraformaldehyde, permeabilised by 0.5% saponin and saturated by 5% BSA. Antibodies were diluted in PBS-0.1% saponin-1% BSA and coupled to fluorescent (FITC) secondary antibodies. Non-specific binding of secondary antibodies in every experiment was measured by omitting primary antibody and the corresponding mean fluorescence was subtracted from the signal measured with each primary antibody.

### Viability assay

Cells were plated in 6-well plates and treated by the indicated drugs. At the indicated time points, cells were harvested by trypsination and dead/dying cells were detected by To-Pro3 internalization measured by flow cell analysis (BD Accuri C6 cytometer). The results are presented as the mean

## Résultats

---

fluorescence of the overall population (+sd) or as the mean percentage of To-Pro3 positive cells (+sd).

### Conditioned medium preparation

Cells were plated in 100mm-dishes and treated by cisplatin (3 $\mu$ M, 48h). Cells were then rinsed and culture medium was replaced by fresh serum-free medium. After 48h, cell supernatant was centrifuged to remove cells fragments and used for the described experiments. Cells were trypsinised and counted to normalize ligand measurements by the cell number.

### Proximity Ligation Assay (PLA)

Cells were seeded in 24-well plates onto glass sterile coverslips and allowed to attach overnight. The indicated treatment was applied, then cells were fixed by 4% paraformaldehyde. The labeling with antibodies was realized according to the PLA manufacturer instructions (Duolink, Sigma-Aldrich). Image acquisition was performed with a Zeiss Apotome microscope (Zeiss Axiovert 200-M inverted microscope and AxioVision 4.6 program, Carl Zeiss Gbmh). Data were analyzed by the ImageJ 1.46r software and spots were quantified by the Object 3D Counter plugin.

### IC50 measurements

IC50 measurements were calculated according to Chou et al.(16) by the MTT method. Briefly, cells were plated in 96-well plates (5000 cells/well) and treated by the indicated drugs or conditioned media. Cells were incubated with MTT 3h at 37°C, formazan cristae were solubilized in DMSO and optical density (OD) was read at 570nm.

### Preclinical PDX models

Four to six week-old Nude mice, bred at Institut Curie, were used. Tumor fragments of 30-50mm<sup>3</sup> were grafted subcutaneously into the interscapular fat pad. When tumors reached a size of about 50-100mm<sup>3</sup>, mice were randomly assigned to control or treatment groups. Between 8 and 10 mice per group were included in each experiment. Mice were sacrificed when tumor reached a volume of 2500mm<sup>3</sup>. All treatments are detailed in the Results section. Tumor growth was evaluated by measuring with a caliper two perpendicular tumor diameters twice a week. Individual tumor volume, relative tumor volume (RTV) and tumor growth inhibition (TGI) were calculated according to a standard method. Studies have been performed in compliance with protocol and animal housing in accordance with national regulation and international guidelines and under the supervision of authorized investigators. The experimental protocol and animal housing were in accordance with institutional guidelines as put forth by the French Ethical Committee (Agreement C75-05 - 18, France). For all pairwise comparisons based on the proportions of tumors with a particular RTV, a two-tailed Fischer's exact t-test was used. All statistical tests were realized bilaterally calculating two-tailed p-values.

### RT and qPCR

Total RNA was isolated from cell pellets or from frozen PDX pieces using the RNeasyMiniKit (Qiagen) following the manufacturer's instructions with DNase I treatment. After RNA quantification by spectrophotometry (BioSpectrometer, Eppendorf, France), 1 $\mu$ g RNA was reverse-transcribed with

## Résultats

---

Quantiscript Reverse Transcriptase (Qiagen, France) for cDNA synthesis. Quantitative real-time PCR assays were performed and monitored in technical duplicate using a Rotor-Gene Q PCR system (Qiagen, France). Data were normalised by three housekeeping genes (RPLP0, Actin and GAPDH) and expressed as fold change versus control conditions (non-treated cells or control mice). Primers used were purchased from Qiagen and validated by the supplier (QuantiTect primers : IFIT1 QT00201012, IFI27 QT00099274, IL6 QT00083720, RPLP0 QT00075012, Actin QT01680476, GAPDH QT00079247).

### PCA analysis

PCA analysis (Pearson's correlation) was performed from the data described in Table S1 using XLSTAT v2016.03 software (Addinsoft 2010).

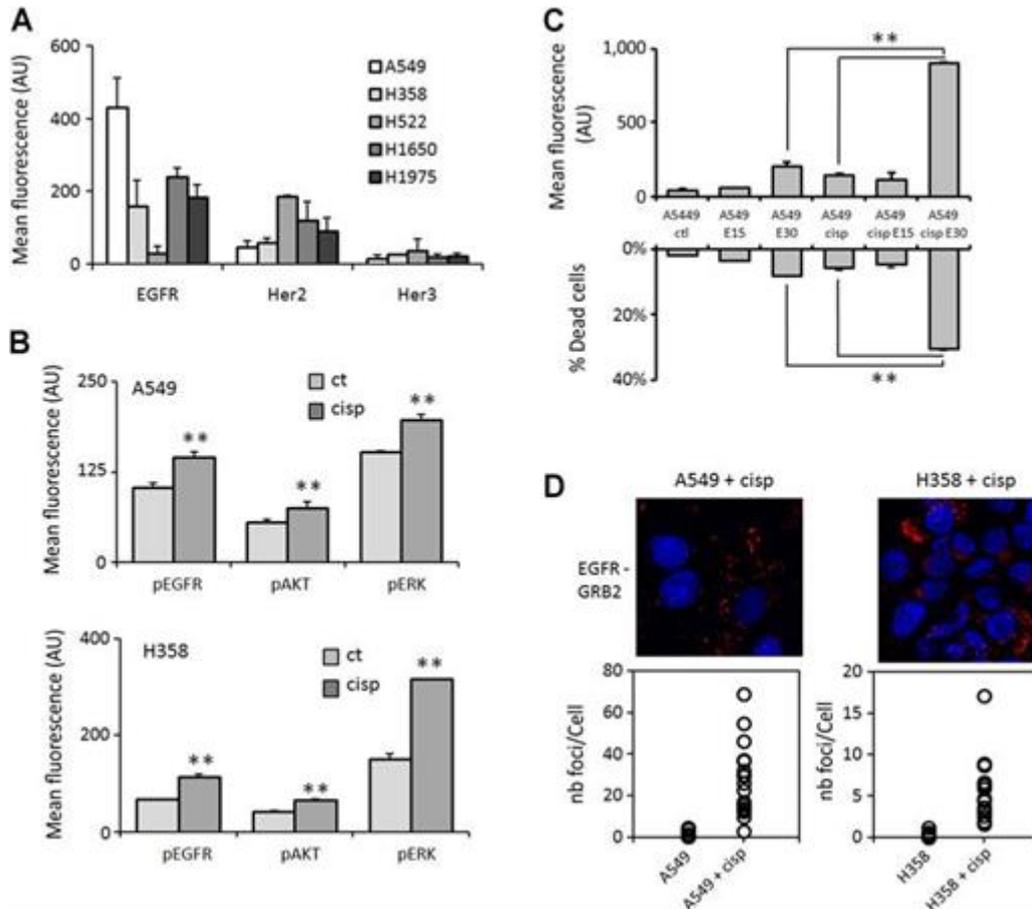
## Results

### Cisplatin primes EGFR wild-type cells to erlotinib through the activation of EGFR pathway

Cisplatin primes EGFR wild-type cells to erlotinib through the activation of EGFR pathway.

We worked with three EGFR wild-type (wtEGFR) cell lines (namely A549, H358 and H522) and with two mutant EGFR (mutEGFR) cell lines (H1650 and H1975, respectively exhibiting A746-A750 deletion and L858R-T790M mutations). We first measured the membrane expression of EGFR, Her2 and Her3 in the different cell lines (figure 1A). Most of the cell lines significantly expressed EGFR, except from H522 cells. H522 cells essentially expressed HER2; of note, total EGFR expression in H522 cells was very faint, either by cytometry or by western blot analyses, as reported by others (17). Her3 membrane expression was hardly detected in the cell lines used. Given the previously reported activation of EGFR pathway induced by cisplatin (18, 19), we measured EGFR phosphorylation following a non-lethal cisplatin treatment in wild type-EGFR cells and observed that the phosphorylation raised during the 48 hour-cisplatin treatment, together with the subsequent activation of EGFR downstream kinases ERK and AKT to a lesser extent (figure 1B). We wondered if the activation of EGFR pathway observed was associated to a change in the cells sensitivity to EGFR tyrosine kinase inhibition. We sequentially treated the cells with a sublethal amount of cisplatin for 48 hours, then with various erlotinib amounts for 72 hours, according to their respective IC50 (figure S1-A). In the cell lines expressing a significant amount of wtEGFR (namely A549 and H358 cells), cisplatin actually primed the cells to erlotinib-induced cell death (figure 1C and figure S1-B). Erlotinib actually reversed the phosphorylation of ERK kinase induced by cisplatin in wtEGFR-expressing cells (figure S2-A and B). By contrast, no decrease in the IC50 to erlotinib of mutEGFR-expressing cells was observed in cisplatin-treated cells versus naive cells, rather a significant raise in cisplatin-treated H1975 cells IC50 (figure S2-C). Of note, the treatment schedule came out as crucial, since concurrent cisplatin-erlotinib treatment did not enhance the wtEGFR cells response to erlotinib (figure S2-D). Cisplatin treatment thus induced a priming event to the subsequent erlotinib treatment. Smith et al.(20) established a correlation between EGFR-GRB2 complexes detection and the response to EGFR inhibitors. We actually confirmed that cisplatin pretreatment significantly up-regulated the amount of EGFR-GRB2 interactions detected by the PLA technique in wtEGFR cells (figure 1D and S2-E).

# Résultats



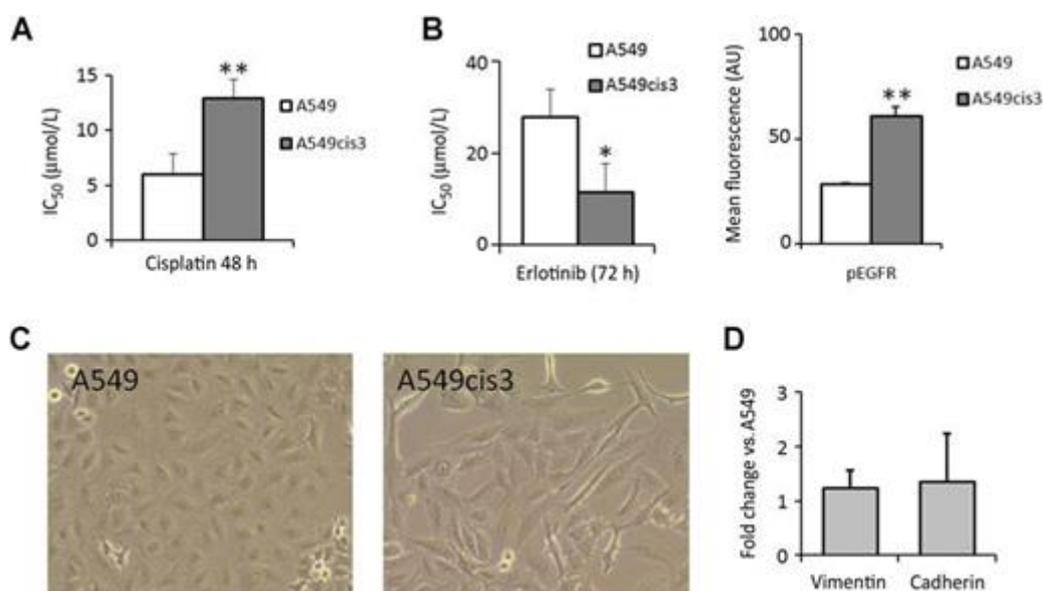
**Figure 1:** A, The membrane expression of EGFR, Her2 and Her3 was measured by flow cytometry in the five cell lines used in the study. Data shown are the mean + SD from 3 independent experiments. B, A549 (upper graph) and H358 (lower graph) cells were treated by cisplatin 3 $\mu$ M 48h (cisp). Cells were then fixed and incubated with pEGFR (pY1068), pAKT (pS473) or pERK (pT202-pY204) antibodies. Fluorescence was measured by flow cytometry. Data shown are the mean + SD from 3 independent experiments. \*\*: p<0.01 Student t-test. C, A549 cells were treated by cisplatin 3 $\mu$ M 48h then by erlotinib 15 or 30 $\mu$ M for 72h. Dead cells were stained by To-Pro3 and detected by flow cytometry. The upper graph shows the mean fluorescence (+SD) of the overall population and the lower graph indicates the percentage (+SD) of To-Pro3 positive cells. The graph shown is representative of 3 independent experiments. \*\*: p<0.01 Student t-test. D, Cells were treated by cisplatin 3 $\mu$ M 48h, fixed and incubated with EGFR and GRB2 antibodies. EGFR-GRB2 dimers were detected by PLA. Apotome images were analyzed by ImageJ and the number of foci per cell was represented on the graphs below. Each graph shown is representative of 3 independent experiments

## EGFR is activated in cisplatin-resistant cells

We generated a cisplatin-resistant cell line derived from A549 cells by constant exposure to 3 $\mu$ M cisplatin. After a few weeks, cells began to proliferate and could be passaged and subcultured in the

## Résultats

presence of cisplatin. We objectified the resistance to cisplatin of these cells, named A549cis3, by measuring their IC<sub>50</sub> to cisplatin (figure 2A). These A549cis3 cells revealed more sensitive to erlotinib than their parent cells (figure 2B, left) and exhibited a higher level of phosphorylated EGFR (figure 2B, right), similar to that measured in the cells treated by cisplatin for 48h. We noticed that A549cis3 cells grew more slowly than A549 parental cells and had a different morphology (figure 2C). These phenotypic modifications are sometimes reported when epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) occurs. We therefore challenged this hypothesis by measuring the expression of vimentin and E-cadherin in the cells, and we measured no significant change in A549cis3 cells versus the A549 parental cells (figure 2D) indicating no EMT in A549cis3 cells.



**Figure 2:** A, A549 and A549cis3 cells were treated by a range of increasing cisplatin concentrations for 48h and IC<sub>50</sub> was calculated as described by Chou et al. (16) by MTT assay. Data shown are the mean + SD from 3 independent experiments. \*\*: p<0.01 Student t-test. B, (left) IC<sub>50</sub> to erlotinib 72h was calculated for A549 and A549cis3 cells as in (A); (right) EGFR phosphorylation was measured in A549 and A549cis3 cells as described in figure 1(B). \*: p<0.05 \*\*: p<0.01 Student t-test. C, The morphology of subconfluent A549 and A549cis3 cells is shown; the fields shown are representative of the global population of each cell type. D, Vimentin and cadherin mRNA expression was measured by RT-PCR and expressed as fold change in A549cis3 cells versus A549 cells. The graph shows the mean + SD from 5 independent experiments.

### Cisplatin induces EGFR activation in wtEGFR cells through the secretion of an activator, distinct from EGFR ligands.

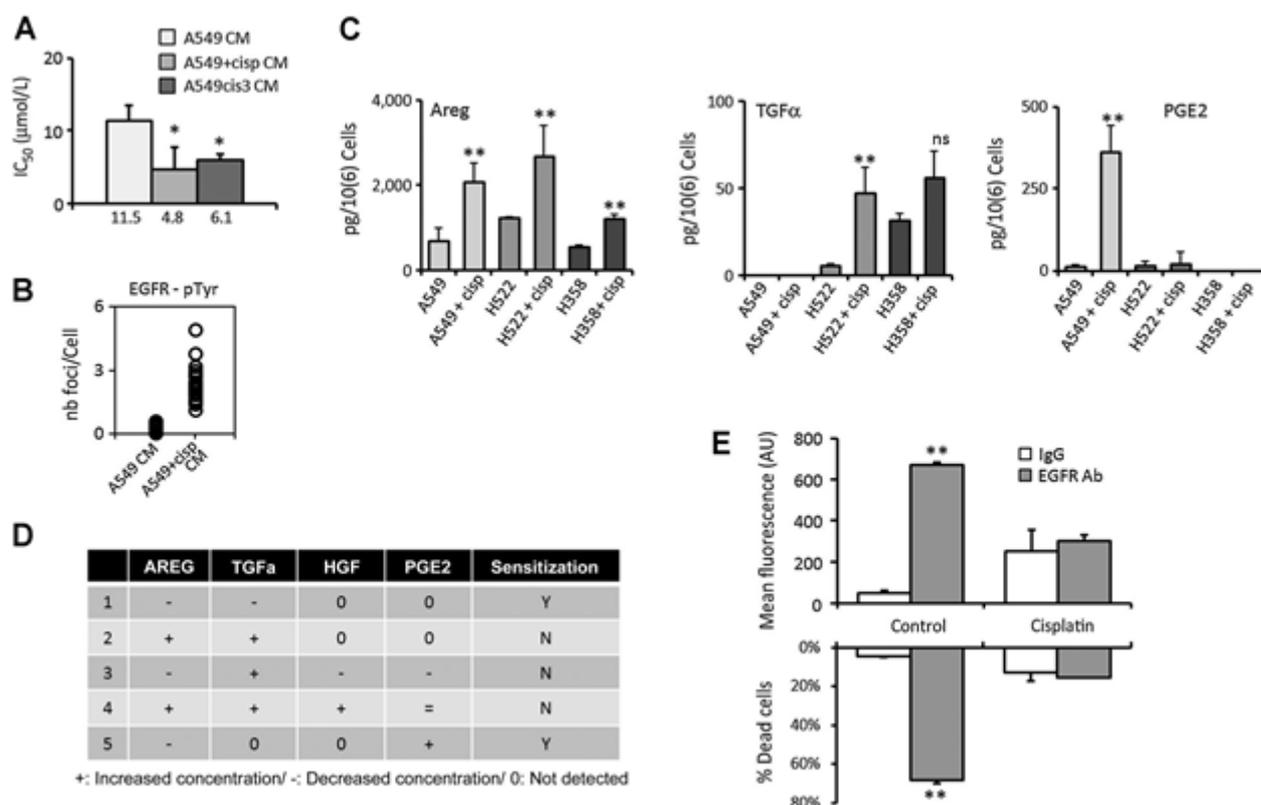
EGFR is classically activated through the binding of its ligands and consequent dimerization responsible for its autophosphorylation. We first challenged the ability of cisplatin-treated cells to increase the sensibility of wtEGFR naive cells to erlotinib. We prepared conditioned media (CM) from A549 cells either treated by cisplatin (3μM, 48h) or not and from the resistant A549cis3 cells. Naive A549 cells were incubated overnight with the conditioned media and then treated by erlotinib. The conditioned media from cisplatin-treated and cisplatin-resistant cells decreased the cells resistance

## Résultats

---

to erlotinib (figure 3A), indicating that a secreted factor is implicated in the cisplatin-induced sensitization to erlotinib. To objectify EGFR activation, we measured EGFR phosphorylation by the Duolink technique. We actually observed that cisplatin-treated cells secrete a soluble factor responsible for EGFR phosphorylation (figure 3B). We measured the secretion of EGFR ligands and of some known regulators of EGFR activation (namely PGE2 and HGF) by cisplatin-treated wtEGFR cells. Amphiregulin secretion was increased by cisplatin treatment in all the tested cell lines (figure 3C, left graph). TGF $\alpha$  secretion was induced in two cell lines except from the A549 cells (figure 3C, middle graph) while PGE2 secretion was only induced in A549 conditioned medium (figure 3C, right graph). We made several attempts to establish the role of these secreted molecules in the sensitization to erlotinib observed. As cisplatin-treated A549 CM could sensitize A549 cells to erlotinib, we treated naive A549 cells with recombinant amphiregulin, PGE2 or the combination of both, at the concentrations measured in the conditioned media, but the sensitivity of the treated cells to erlotinib was not modified (figure S3-A). We tested the ability of various CM obtained from control and cisplatin-treated cell lines to sensitize A549 cells to erlotinib related to the evolution of the same EGFR regulators concentrations as in figure 3C. As summarized in figure 3D, these experiments could not shed the light on any regulator or combination of regulators. In order to conclude on the direct activation of EGFR by a secreted molecule induced by cisplatin, we questioned the sensitivity of the naive and cisplatin-treated wtEGFR cells to a blocking EGFR antibody (analog to the anti-EGFR drug cetuximab). As indicated in figure 3E and supplementary figure S3-B, the blocking EGFR antibody induced an obvious cell death in wtEGFR cells and cisplatin pretreatment abrogated the cells sensitivity to EGFR antibody. This definitely ruled out the possibility that the observed activation of EGFR results from the binding of any ligand, suggesting a ligand-independent activation of EGFR, whilst related to a secreted factor.

## Résultats



**Figure 3:** A, Conditioned medium (CM) was prepared from A549 cells treated by cisplatin 3μM 48h or not, or from A549cis3 cells. These media were used to dilute erlotinib for the calculation of A549 naïve cells IC<sub>50</sub> to erlotinib 72h in CM as described in figure 2(A). \*\*: p<0.01 Student t-test. B, Naïve A549 cells were incubated overnight in the conditioned medium from A549 cells treated by cisplatin 3μM 48h or not. Cells were fixed and incubated with EGFR and pTyr100 antibodies. Phospho-EGFR was detected by PLA and quantified as in figure 1(D). The graph shown is representative of 5 independent experiments. C, CM was prepared from the three wtEGFR cell lines treated by cisplatin 3μM 48h or not and the indicated compounds were measured by ELISA. Data shown are the mean + SD from 3 independent experiments. \*\*: p<0.01 Student t-test. D, CM were prepared as in C (see material and methods for details); the table summarizes the variation of the indicated compounds concentration in CM and their ability to induce naïve A549 cells sensitization to erlotinib. E, A549 cells were treated by cisplatin 3μM 48h or not and then by EGFR blocking antibody 13nM 72h. Cell death was measured by To-Pro3 staining and detected by flow cytometry as in figure 1C. The graph shown is representative of 3 independent experiments. \*\*: p<0.01 Student t-test.

### The sensitization to erlotinib induced by cisplatin pretreatment implies the activation of the Src kinase

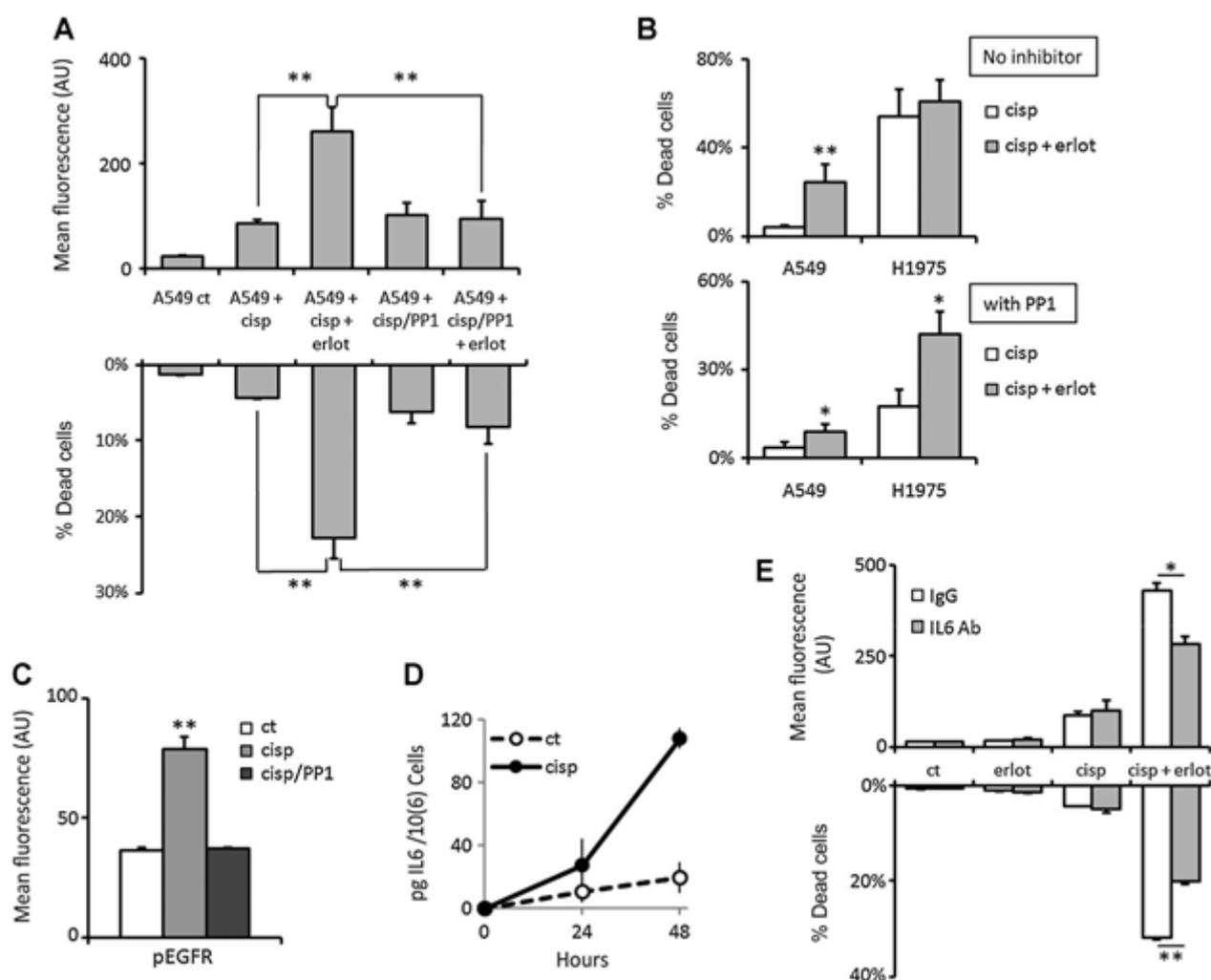
Considering the transactivating role played by the Src-family kinases in EGFR pathway (21), we questioned the role played by Src (or SFKs) in the activation of EGFR induced by cisplatin. We first induced Src pharmacological inhibition during the cisplatin pretreatment step. The addition of PP1 (Src inhibitor-1, figure S4-A) to wtEGFR cells during the cisplatin pretreatment significantly inhibited the subsequent erlotinib-induced cell death (figure 4A). Of note, similar results were observed with another Src inhibitor (PP2, figure S4-B). We have previously shown that cisplatin induced no sensitization to erlotinib in the EGFR-mutated H1975 cell line (figure S2-C). We thus compared the effect of Src inhibition during cisplatin pretreatment in both cell lines. No significant cell death was induced by erlotinib in cisplatin-pretreated H1975 cells, contrary to A549 cells (figure 4B, upper graph). Additionally and contrary to what happened in wtEGFR cells, Src inhibition during the initial

## Résultats

---

cisplatin treatment revealed a significant cell death induced by erlotinib in H1975 cells (figure 4B, lower graph). This further substantiates the different responses of wtEGFR and mutEGFR cells to the sequential treatment cisplatin-erlotinib (figure 1C and figure S2-C). We next measured EGFR phosphorylation in wtEGFR cells either treated by cisplatin or by the combination cisplatin+PP1. We observed that Src inhibition counteracted the phosphorylation of EGFR induced by cisplatin (figure 4C and figure S4-C). Given the role played by IL6 in the ligand-independent activation of EGFR (22), we measured the secretion of IL6 induced by cisplatin in wtEGFR A549 cells. As shown on figure 4D, IL6 secretion was significantly increased after a 48 hour cisplatin treatment. We therefore added neutralizing IL6 antibody in the culture medium of A549 cells treated by the sequential treatment cisplatin / erlotinib. IL6 counteraction significantly reduced the priming of wtEGFR cells to erlotinib by cisplatin (figure 4E), demonstrating that IL6 is involved in this sensitization.

## Résultats



**Figure 4:** A, A549 cells were treated by the cisplatin - erlotinib (30 $\mu$ M) sequence as described before; when indicated, PP1 (10 $\mu$ M) was added during cisplatin treatment. Cell death was measured by ToPro3 staining and detected by flow cytometry as in figure 1C. The graph shown is representative of 3 independent experiments. \*\*: p<0.01 Student t-test. B, A549 and H1975 cells were treated as in (A) (respectively by erlotinib 30 and 10 $\mu$ M), without (upper graph) or with PP1 (lower graph) added during cisplatin treatment. The graph shown is representative of 3 independent experiments. \*: p<0.05 \*\*: p<0.01 Student t-test. C, A549 cells were treated by cisplatin 3 $\mu$ M 48h with PP1 (10 $\mu$ M) added or not. Cells were fixed and stained by pEGFR (pY1068) antibody coupled to a fluorescent secondary antibody and EGFR phosphorylation was detected by flow cytometry. The graph shown is representative of 3 independent experiments. \*\*: p<0.01 Student t-test. D, A549 cells were treated by cisplatin 3 $\mu$ M 48h and IL6 secretion was measured by ELISA in cell supernatants. E, A549 cells were treated as in (A) with IgG or IL6 neutralizing antibody (1 $\mu$ g/ml) added when cisplatin and erlotinib are applied. Cell death was measured by To-Pro3 staining and detected by flow cytometry as in figure 1C. Data shown are the mean + SD from 5 independent experiments. \*: p<0.05 \*\*: p<0.01 Student t-test.

### Cisplatin injection can sensitize wtEGFR patients-derived xenografts to erlotinib in vivo

We next investigated the capacity of cisplatin initial treatment to enhance the response of wtEGFR tumors to erlotinib in vivo. We used a set of four PDXs (patient-derived xenografts) (LCF-04, LCF-09, IC14-LC16 and IC8-LC10), obtained from human non-small cell lung cancer (NSCLC) pieces xenografted to Swiss Nude mice. The use of PDXs for preclinical studies was shown to better reflect the phenotype and heterogeneity of human lung cancer tumors than cell lines xenografts (23-25). The histological type of PDX was confirmed and compared to the initial tumors. Tumors were

## Résultats

classified as adenocarcinomas and expressed wild-type EGFR, KRAS, BRAF and PI3K. Mice were randomly assigned to four groups since tumors reached an initial volume ranged between 50 and 100mm<sup>3</sup>. The “control” group received no treatment; the “cisplatin” group received an intraperitoneal injection of cisplatin at day 1 (6mg/kg); the “erlotinib” group was orally treated by erlotinib (50mg/kg) 5 days out of 7 from day 7 to the mice sacrifice; the “cisplatin/erlotinib” group was treated by both drugs as described above. Tumor growth was measured twice a week and represented on the graphs in figure 5 as mean relative tumor volume in each group +/- SD. In comparison to each monotherapy, i.e. cisplatin or erlotinib, tumor growth was significantly inhibited by the sequential treatment in three out of four models with variable efficiency, whereas no benefit was observed in tumor D (IC8-LC10) either at early or late time points. Of note, when tumors were allowed to grow for a longer time (figure S5), the initial sensitization to erlotinib tended to disappear in two PDX models. Differences are observed in tumor growth rates and response to each drug or drug combination, which is consistent with the heterogeneity of lung tumors phenotype. These results suggest that cisplatin may actually enhance the response of some human NSCLC tumors to erlotinib in vivo and require the identification of these tumors by the definition of a predictive marker.

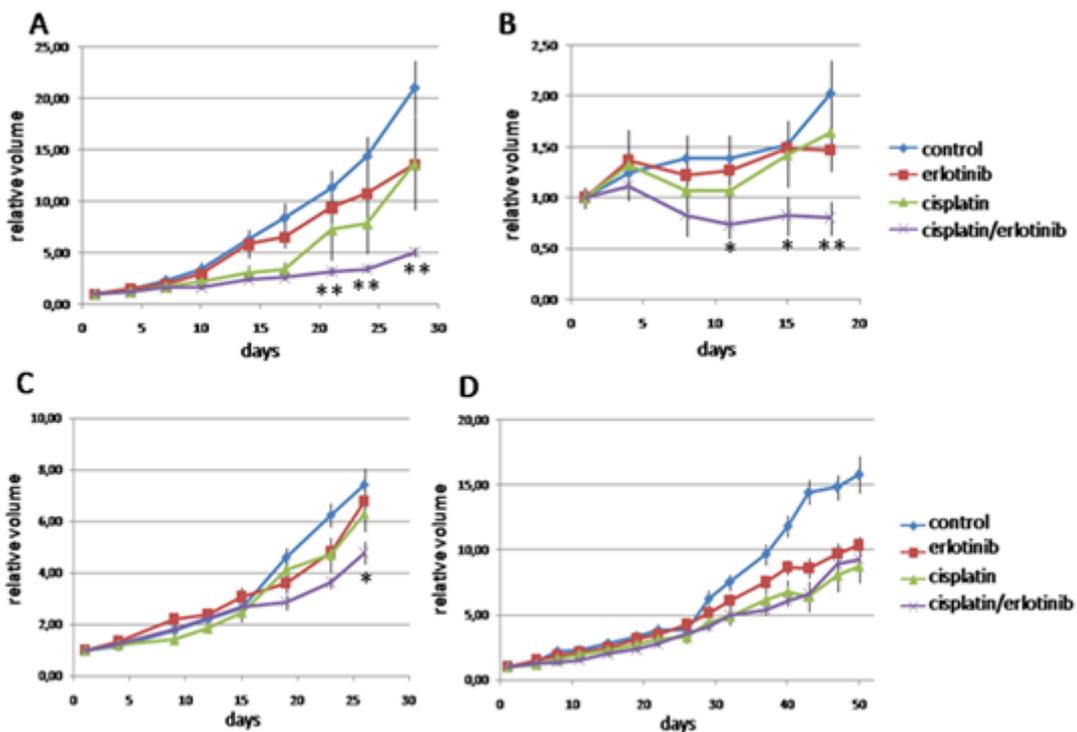


Figure 5

**Figure 5:** PDXs were grafted to Swiss Nude mice randomly assigned to four groups (PDX A: LCF-04; PDX B: IC14-LC16; PDX C: LCF-09; PDX D: IC8-LC10). Tumor volume was measured twice a week and normalized to the initial volume. Mean relative volume was calculated for each group and represented on the graphs (+/- SD). Student t-test was realized and significant p values between erlotinib and cisplatin/erlotinib groups were indicated on the graphs, provided that no statistical difference exists between control and cisplatin groups at the same time point. (\*:  $p < 0.05$  \*\*:  $p < 0.01$  Student t-test.)

## Résultats

---

### **IL6, IFIT1, and IFI27 measurement can discriminate between responding and nonresponding wtEGFR tumors**

We have demonstrated the role played by IL6 in the ligand-independent activation of EGFR induced by cisplatin. Ligand-independent activation of EGFR is correlated to IFIT1 and IFI27 transcription in glioma (26). We therefore measured the expression induction of IL6, IFIT1 and IFI27 in cisplatin-treated (A549 + cisp) and cisplatin-resistant (A549cis3) A549 cells. The transcription of all three markers was increased in cisplatin-treated and cisplatin-resistant cells (figure 6A), in a time-dependent manner for the short-term treatment (figure S6-A). These three potential markers were challenged for their fitting to the sensitization of wtEGFR tumors to erlotinib in vivo by the use of the PDX models described above. PDXs A, B and D (figure 5) were grafted to Swiss Nude mice. Mice were treated by cisplatin at day 1 after randomization. Mice were sacrificed at day 4, 8 and 18 and tumors were excised and frozen. A group of control, non-treated mice was sacrificed at day 4. mRNA were extracted from the tumors and analyzed for the expression of IL6, IFIT1 and IFI27. Figure 6B shows the cumulative expression of the three markers for each PDX in the four groups of mice. As indicated on the graphs, the cumulative expression exceeds the value of 5 for the PDXs A and B (which were sensitized by cisplatin to erlotinib) whereas the cumulative value remains below in the PDX D, resistant to the sequential treatment. A principal component analysis (PCA, Pearson's correlation) was performed with the three quantitative variables (IL6, IFIT1 and IFI27) and two qualitative variables added, namely the time post-cisplatin treatment and the sensitization to erlotinib of the tumor (tumors A and B: responding, tumor D: non responding) (see table S1 for details). As represented in figure 6C and figure S6, these markers could discriminate between responding and non-responding PDXs. The time point day-8 seems to divert from the other time points. We therefore repeated the same PCA with the measurement made from the PDXs at day-8 and the analysis efficiently discriminated between responding and non-responding PDXs (figure S6-B) (98.37%). As described in figure S7, at day 8, only tumors from the PDX D group can be found in the Treatment-NT confidence ellipse, whereas responding tumors significantly diverge from this ellipse at day 8.

## Résultats

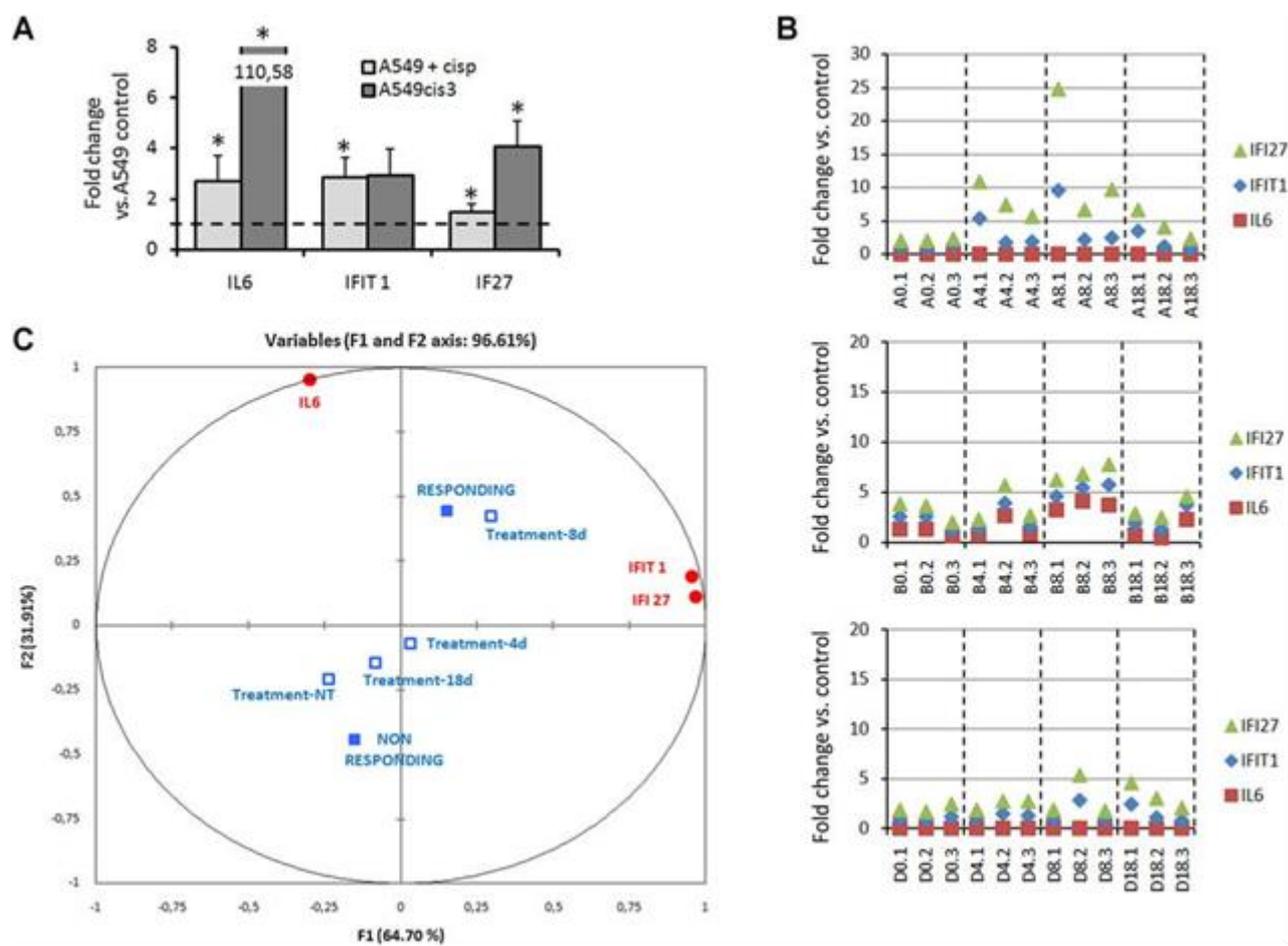


Figure 6: A, IL6, IFIT1 and IFI27 mRNA expression was measured by RT-PCR in A549 cells treated by cisplatin (3 $\mu$ M, 48h) and in A549cis3 cells and expressed as fold change versus control A549 cells. The graph shows the mean + SD from 3 independent experiments. \*: p<0.05 (Student t-test). B: The same mRNA measurements were made in PDX A, B and D at day 4 (A4.1 to 3, B4.1 to 3, D4.1 to 3), 8 (A8.1 to 3, B8.1 to 3, D8.1 to 3) and 18 (A18.1 to 3, B18.1 to 3, D18.1 to 3) post-cisplatin injection and expressed as cumulative fold change versus non-treated PDX (A0.1 to 3, B0.1 to 3, D0.1 to 3). C: A principal component analysis was performed with the mRNA as quantitative variables and with response and time categories as qualitative variables.

## Discussion

The aim of our study was to increase understanding of the modifications induced in NSCLC cells by a cisplatin sublethal treatment towards EGFR pathway. We provide here evidence of a ligand-independent, Src-mediated activation of EGFR induced by cisplatin treatment in NSCLC cells expressing wild-type EGFR. This activation results in a sensitization of wtEGFR cells to erlotinib, an EGFR-TKI. This increase in erlotinib efficiency is reproduced in vivo in PDX models, which is reported for the first time to our knowledge. Some previous reports have shown the ability of chemotherapy, including cisplatin, to induce EGFR activation, in several cell types (14, 27-29) but the functional consequences regarding the cells sensitivity to EGFR inhibition are less clear. Surprisingly, depending on the model considered, EGFR activation either promoted cell survival and tumor growth (14) or sometimes cell death (27). This activation sometimes functionally came out as an increased sensitivity to EGFR inhibitors, either EGFR-TKI or EGFR blocking antibody (29), sometimes not (19). The signaling pathways leading to EGFR activation as well as pathways activated by EGFR phosphorylation are extremely various. These many signaling options could explain the discrepancies

## Résultats

---

between in vitro or clinical reports studying the interplay between chemotherapy and EGFR inhibition. The sequence of events we describe here, leading to the increase in erlotinib efficiency, may be specific from platinum-based priming. This will be the subject of further investigation.

The observations we report here are in agreement with the conclusions of the clinical study SATURN that established the benefit of erlotinib as maintenance therapy in patients with EGFR-positive NSCLC after four cycles of platinum-doublet chemotherapy (8). A more recent study reevaluated the results of the SATURN and BR.21 trials with a focus on wtEGFR patients and confirmed the benefit of erlotinib after initial platinum doublet therapy in these patients (30). Recently, the IUNO clinical trial comparing the benefit of erlotinib as maintenance treatment versus as second line therapy in wtEGFR patients failed at demonstrating any benefit of erlotinib in the cohort with either therapeutic schedule (31). Clinical studies suggest that erlotinib maintenance could be more efficient in tumor controlled by the initial platinum-based therapy (32). We have established that cisplatin-resistant cells, arisen from constant exposure of sensible cells to cisplatin, exhibited the same pattern of EGFR activation and erlotinib sensitivity as short-term treated cells. This suggests that some patients could benefit from erlotinib maintenance even if tumor escapes from platinum-based chemotherapy, providing the markers of sensitization are expressed. The increased sensitivity of chemotherapy-resistant cells to EGFR inhibition has also been observed in other cell types, suggesting that this sensitization may not solely interest lung cancer cells and cisplatin (28). Of note, Rho et al. observed that the generation of cisplatin-resistant cells by discontinued exposure of cells to increasing concentration followed by drug vacancy did not alter the cells sensitivity to EGFR-TKIs (33). This is consistent with our findings that erlotinib must be given short after cisplatin treatment, whatever the duration of cisplatin exposure. The observations made in our PDX models also suggest that erlotinib benefit is maximal at early time after cisplatin treatment. Repeated cisplatin injections may be of interest to restore erlotinib sensitization when tumor escape happens and could be assayed. This hypothesis is substantiated by a very recent meta-analysis of randomized clinical trials suggesting that the addition of intercalated EGFR-TKI to chemotherapy could be of interest in NSCLC (34). An in vitro study demonstrated however that EGFR-TKI tolerance results from reversible, epigenetic cell phenotype modifications (11). These modifications also result in a decreased sensitivity to cisplatin, suggesting that erlotinib-resistant tumors should be either submitted to a transient drug vacancy or to an HDAC inhibitor before cisplatin should be repeated. All together, these studies further reinforce the need of markers to identify the tumors susceptible to respond to EGFR-TKI and the optimal moment when they should be introduced in the therapeutic schedule.

This point, namely the utmost importance of the kinetics of the therapeutic schedule, underlines the major difference between the epigenetic, inheritable mechanism of EGFR-TKI tolerance described by Sharma et al. (11) and the mechanism of cisplatin resistance observed in our model, the former rendering the cells resistant to cisplatin and the latter rendering the cells sensitive to EGFR-TKI by the activation of a specific pathway. The results we report here compared to those reported by Sharma et al. (11) point out the importance of the sequence of cisplatin and erlotinib therapies. The initial cisplatin treatment is required for EGFR activation prior to erlotinib introduction, whereas initial EGFR-TKI treatment might favor the resistance of surviving cells to cisplatin. The observation that erlotinib combination with concurrent cisplatin showed no clinical benefit (9) also corroborates our in vitro data and the requirement of the sequential treatment. It also became quite clear, both in vitro and in vivo, that EGFR inhibition impairs the efficiency of chemotherapy when administrated first (35). Tumor cells drastically evolve from the initial biopsy-based analyses to the therapy-

## Résultats

---

modified phenotype at the time of maintenance, underlining the need for phenotypic reevaluation after the first-line therapy to optimize the therapeutic strategy (13). What we show here is that the initial cisplatin treatment induces a cell phenotype modification, linked to Src-dependent and ligand-independent EGFR activation. In this modified cells, EGFR tyrosine kinase function is required to cell survival, since erlotinib then induces cell death.

The activation of EGFR by cisplatin pretreatment we describe here is ligand-independent. This might explain the poor predictive value (even the inverse correlation) of serum EGFR ligands measurements towards EGFR-TKI efficiency sometimes reported (36, 37). Chakraborty et al. (26) have demonstrated in glioblastoma that ligand-induced and ligand-independent activation of EGFR are distinct and even compete with each other. They report that ligand-independent activation of EGFR signals through the activation of interferon regulatory factor 3 (IRF3) and the up-regulation of its targets IFIT1 and IFI27. Of note, we also observed IFIT1 upregulation in short-term and long-term treated cells, with sublethal amounts of cisplatin for A549 cells (3 $\mu$ M), consistent with patients serum concentration; as for death-inducing cisplatin treatment (100 $\mu$ M), Galluzzi et al (38) reported the upregulation of two related interferon regulatory factors (IRF7 and IRF5), suggesting that type I interferon pathway may be implicated in cisplatin-induced cell modifications. Our data suggest that IFIT1 and IFI27 induction assessment, together with that of IL6, may enable the discrimination between the tumors sensitized to erlotinib by cisplatin pretreatment or not. The correlation between these markers and the efficiency of erlotinib maintenance should be addressed in wtEGFR lung cancer patients after a first-line cisplatin treatment.

Similar to what was demonstrated in glioblastoma (26), we show here that cisplatin pretreatment in NSCLC simultaneously renders the cells more sensitive to EGFR-TKI and more resistant to EGFR blocking antibody. It is thus of high importance to consider that EGFR-TKI and EGFR blocking antibody are not redundant and substitutable therapeutic strategies. The former should predominantly target ligand-independent EGFR signaling whereas the latter should only inhibit the ligand-induced signaling. Combining both EGFR targeting strategies may thus enhance tumor response in some models. Some fruitful attempts were reported *in vitro* in several models (39-41) or in clinical trials in lung cancer (42) or in colorectal cancer (43).

Finally, it is noteworthy that both cell lines sensitized to erlotinib by cisplatin we used in this study express mutated KRAS, whereas all the PDX models we worked with express wild-type KRAS. In the SATURN cohort of patients, KRAS mutation was a significant prognostic factor for poor response to erlotinib (44). KRAS nevertheless does not appear as a major determinant for the mechanism we describe. This KRAS-independent signaling induced by cisplatin pretreatment is consistent with the activation of ligand-independent EGFR pathway, rather implicating TBK1-IRF3 complex (4). A549 cells express G12S-KRAS and H358 cells express G12C-KRAS. Singh et al. (45) have established that A549 cells were independent from KRAS for their survival, since KRAS knock-down had no impact on cell growth or on downstream kinases (ERK and AKT) phosphorylation. Besides, the constitutive activation of downstream effectors ERK and AKT by G12C-KRAS was the same as wild-type KRAS (46). The regulation of ERK and AKT phosphorylation in our KRAS mutated cell lines would thus not involve KRAS. The activation induced by cisplatin might rather be the consequence of Src activation. KRAS mutation should therefore not be an absolute exclusion criterion for EGFR-TKI therapy, in case of ligand-independent activation of EGFR. This suggestion is supported by the observation made in metastatic colon cancer: whereas anti-EGFR antibodies proved to be effective in colorectal cancer

## Résultats

---

excluding the KRAS mutated tumors, the GERCOR DREAM study shows the benefit of erlotinib in maintenance therapy in KRAS mutated colon cancer in combination with angiogenesis inhibition after induction chemotherapy (47).

In conclusion, this work highlights the occurrence of ligand-independent EGFR activation in cisplatin-treated wtEGFR NSCLC. Similar to what happens in glioblastoma, this pathway competes with ligand-induced EGFR signaling (4, 26), involving plasma membrane EGFR. This could support the fact that some wtEGFR patients may benefit from EGFR-TKI as maintenance therapy when given immediately following to platinum-based therapy. The balance between both activation pathways can account for the reported additive effect of EGFR-TKI and EGFR antibody strategies in some tumors. To achieve this optimization of EGFR-TKI, the validation of ligand-independent EGFR activation markers in NSCLC cohorts is required and will be the subject of further development.

### Acknowledgements

We thank Philippe Hulin and Steven Nedellec from the Cellular and Tissular Imaging Core Facility of Nantes University (MicroPICell) for expert technical assistance in the acquisition of imaging data. We also thank the animal Platform of the Institut Curie (Isabelle Grandjean). We are grateful to the Ligue Régionale contre le Cancer (Comités 44 and 17) for their financial support. JR was supported by the French Fondation pour la Recherche Médicale and by Roche Laboratories, MC was sponsored by the Association pour la Recherche sur le Cancer.

### References

1. Ciardiello F, Tortora G. EGFR antagonists in cancer treatment. *N Engl J Med.* 2008;358(11):1160-74.
2. Roepstorff K, Grandal MV, Henriksen L, Knudsen SL, Lerdrup M, Grovdal L, et al. Differential effects of EGFR ligands on endocytic sorting of the receptor. *Traffic.* 2009;10(8):1115-27.
3. Huang PH, Xu AM, White FM. Oncogenic EGFR signaling networks in glioma. *Sci Signal.* 2009;2(87):re6.
4. Guo G, Gong K, Wohlfeld B, Hatanpaa KJ, Zhao D, Habib AA. Ligand-Independent EGFR Signaling. *Cancer Res.* 2015;75(17):3436-41.

## Résultats

---

5. Hardbower DM, Singh K, Asim M, Verriere TG, Olivares-Villagomez D, Barry DP, et al. EGFR regulates macrophage activation and function in bacterial infection. *The Journal of clinical investigation*. 2016;126(9):3296-312.
6. Lu N, Wang L, Cao H, Liu L, Van Kaer L, Washington MK, et al. Activation of the epidermal growth factor receptor in macrophages regulates cytokine production and experimental colitis. *Journal of immunology*. 2014;192(3):1013-23.
7. Lynch TJ. Predictive tests for EGFR inhibitors. *ClinAdvHematolOncol*. 2005;3(9):678-9.
8. Cappuzzo F, Ciuleanu T, Stelmakh L, Cicens S, Szczesna A, Juhasz E, et al. Erlotinib as maintenance treatment in advanced non-small-cell lung cancer: a multicentre, randomised, placebo-controlled phase 3 study. *Lancet Oncol*. 2010;11(6):521-9.
9. Gatzemeier U, Pluzanska A, Szczesna A, Kaukel E, Roubec J, De Rosa F, et al. Phase III study of erlotinib in combination with cisplatin and gemcitabine in advanced non-small-cell lung cancer: the Tarceva Lung Cancer Investigation Trial. *J ClinOncol*. 2007;25(12):1545-52.
10. Zhao N, Zhang XC, Yan HH, Yang JJ, Wu YL. Efficacy of epidermal growth factor receptor inhibitors versus chemotherapy as second-line treatment in advanced non-small-cell lung cancer with wild-type EGFR: a meta-analysis of randomized controlled clinical trials. *Lung Cancer*. 2014;85(1):66-73.
11. Sharma SV, Lee DY, Li B, Quinlan MP, Takahashi F, Maheswaran S, et al. A chromatin-mediated reversible drug-tolerant state in cancer cell subpopulations. *Cell*. 2010;141(1):69-80.
12. Engelman JA, Zejnullahu K, Mitsudomi T, Song Y, Hyland C, Park JO, et al. MET amplification leads to gefitinib resistance in lung cancer by activating ERBB3 signaling. *Science*. 2007;316(5827):1039-43.
13. Politi K, Herbst RS. Lung cancer in the era of precision medicine. *Clin Cancer Res*. 2015;21(10):2213-20.
14. Yoshida T, Okamoto I, Iwasa T, Fukuoka M, Nakagawa K. The anti-EGFR monoclonal antibody blocks cisplatin-induced activation of EGFR signaling mediated by HB-EGF. *FEBS letters*. 2008;582(30):4125-30.
15. Hanke JH, Gardner JP, Dow RL, Changelian PS, Brissette WH, Weringer EJ, et al. Discovery of a novel, potent, and Src family-selective tyrosine kinase inhibitor. Study of Lck- and FynT-dependent T cell activation. *The Journal of biological chemistry*. 1996;271(2):695-701.
16. Chou TC. Theoretical basis, experimental design, and computerized simulation of synergism and antagonism in drug combination studies. *Pharmacologicalreviews*. 2006;58(3):621-81.
17. Engelman JA, Janne PA, Mermel C, Pearlberg J, Mukohara T, Fleet C, et al. ErbB-3 mediates phosphoinositide 3-kinase activity in gefitinib-sensitive non-small cell lung cancer cell lines. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2005;102(10):3788-93.

## Résultats

---

18. Ametller E, Garcia-Recio S, Pastor-Arroyo EM, Callejo G, Carbo N, Gascon P, et al. Differential regulation of MMP7 in colon cancer cells resistant and sensitive to oxaliplatin-induced cell death. *Cancer Biol Ther*. 2011;11(1):4-13.
19. Van Schaeybroeck S, Kyula J, Kelly DM, Karaiskou-McCaul A, Stokesberry SA, Van Cutsem E, et al. Chemotherapy-induced epidermal growth factor receptor activation determines response to combined gefitinib/chemotherapy treatment in non-small cell lung cancer cells. *Molecular cancer therapeutics*. 2006;5(5):1154-65.
20. Smith MA, Hall R, Fisher K, Haake SM, Khalil F, Schabath MB, et al. Annotation of human cancers with EGFR signaling-associated protein complexes using proximity ligation assays. *Sci Signal*. 2015;8(359):ra4.
21. Kopetz S. Targeting SRC and epidermal growth factor receptor in colorectal cancer: rationale and progress into the clinic. *Gastrointest Cancer Res*. 2007;1(4 Suppl 2):S37-41.
22. Inda MM, Bonavia R, Mukasa A, Narita Y, Sah DW, Vandenberg S, et al. Tumor heterogeneity is an active process maintained by a mutant EGFR-induced cytokine circuit in glioblastoma. *Genes & development*. 2010;24(16):1731-45.
23. Decaudin D. Primary human tumor xenografted models ('tumorgrafts') for good management of patients with cancer. *Anti-cancer drugs*. 2011;22(9):827-41.
24. Stewart EL, Mascaux C, Pham NA, Sakashita S, Sykes J, Kim L, et al. Clinical Utility of Patient-Derived Xenografts to Determine Biomarkers of Prognosis and Map Resistance Pathways in EGFR-Mutant Lung Adenocarcinoma. *J Clin Oncol*. 2015;33(22):2472-80.
25. Gao H, Korn JM, Ferretti S, Monahan JE, Wang Y, Singh M, et al. High-throughput screening using patient-derived tumor xenografts to predict clinical trial drug response. *Nature medicine*. 2015;21(11):1318-25.
26. Chakraborty S, Li L, Puliappadamba VT, Guo G, Hatanpaa KJ, Mickey B, et al. Constitutive and ligand-induced EGFR signalling triggers distinct and mutually exclusive downstream signalling networks. *Nature communications*. 2014;5:5811.
27. Arany I, Megyesi JK, Kaneto H, Price PM, Safirstein RL. Cisplatin-induced cell death is EGFR/src/ERK signaling dependent in mouse proximal tubule cells. *American journal of physiology Renal physiology*. 2004;287(3):F543-9.
28. Dai Q, Ling YH, Lia M, Zou YY, Kroog G, Iwata KK, et al. Enhanced sensitivity to the HER1/epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor erlotinib hydrochloride in chemotherapy-resistant tumor cell lines. *Clin Cancer Res*. 2005;11(4):1572-8.
29. Kwon J, Yoon HJ, Kim JH, Lee TS, Song IH, Lee HW, et al. Cetuximab inhibits cisplatin-induced activation of EGFR signaling in esophageal squamous cell carcinoma. *Oncology reports*. 2014;32(3):1188-92.
30. Osarogiagbon RU, Cappuzzo F, Ciuleanu T, Leon L, Klughammer B. Erlotinib therapy after initial platinum doublet therapy in patients with EGFR wild type non-small cell lung cancer: results of

## Résultats

---

a combined patient-level analysis of the NCIC CTG BR.21 and SATURN trials. *Translational lung cancer research*. 2015;4(4):465-74.

31. Cicenas S, Geater SL, Petrov P, Hotko Y, Hooper G, Xia F, et al. Maintenance erlotinib versus erlotinib at disease progression in patients with advanced non-small-cell lung cancer who have not progressed following platinum-based chemotherapy (IUNO study). *Lung Cancer*. 2016;102:30-7.

32. Coudert B, Ciuleanu T, Park K, Wu YL, Giaccone G, Brugger W, et al. Survival benefit with erlotinib maintenance therapy in patients with advanced non-small-cell lung cancer (NSCLC) according to response to first-line chemotherapy. *Ann Oncol*. 2012;23(2):388-94.

33. Rho JK, Choi YJ, Choi YR, Kim SY, Choi SJ, Choi CM, et al. The effect of acquired cisplatin resistance on sensitivity to EGFR tyrosine kinase inhibitors in EGFR mutant lung cancer cells. *Oncology research*. 2011;19(10-11):471-8.

34. La Salvia A, Rossi A, Galetta D, Gobbin E, De Luca E, Novello S, et al. Intercalated Chemotherapy and Epidermal Growth Factor Receptor Inhibitors for Patients With Advanced Non-Small-cell Lung Cancer: A Systematic Review and Meta-analysis. *Clinical lung cancer*. 2017;18(1):23-33 e1.

35. Janku F, Stewart DJ, Kurzrock R. Targeted therapy in non-small-cell lung cancer--is it becoming a reality? *Nature reviews Clinical oncology*. 2010;7(7):401-14.

36. Addison CL, Ding K, Zhao H, Le Maitre A, Goss GD, Seymour L, et al. Plasma transforming growth factor alpha and amphiregulin protein levels in NCIC Clinical Trials Group BR.21. *J Clin Oncol*. 2010;28(36):5247-56.

37. Ishikawa N, Daigo Y, Takano A, Taniwaki M, Kato T, Hayama S, et al. Increases of amphiregulin and transforming growth factor-alpha in serum as predictors of poor response to gefitinib among patients with advanced non-small cell lung cancers. *Cancer Res*. 2005;65(20):9176-84.

38. Galluzzi L, Vitale I, Senovilla L, Eisenberg T, Carmona-Gutierrez D, Vacchelli E, et al. Independent transcriptional reprogramming and apoptosis induction by cisplatin. *Cell cycle*. 2012;11(18):3472-80.

39. Huang S, Armstrong EA, Benavente S, Chinnaiyan P, Harari PM. Dual-agent molecular targeting of the epidermal growth factor receptor (EGFR): combining anti-EGFR antibody with tyrosine kinase inhibitor. *Cancer Res*. 2004;64(15):5355-62.

40. Matar P, Rojo F, Cassia R, Moreno-Bueno G, Di Cosimo S, Tabernero J, et al. Combined epidermal growth factor receptor targeting with the tyrosine kinase inhibitor gefitinib (ZD1839) and the monoclonal antibody cetuximab (IMC-C225): superiority over single-agent receptor targeting. *Clin Cancer Res*. 2004;10(19):6487-501.

41. Regales L, Gong Y, Shen R, de Stanchina E, Vivanco I, Goel A, et al. Dual targeting of EGFR can overcome a major drug resistance mutation in mouse models of EGFR mutant lung cancer. *The Journal of clinical investigation*. 2009;119(10):3000-10.

## Résultats

---

42. Janjigian YY, Smit EF, Groen HJ, Horn L, Gettinger S, Camidge DR, et al. Dual inhibition of EGFR with afatinib and cetuximab in kinase inhibitor-resistant EGFR-mutant lung cancer with and without T790M mutations. *Cancer discovery*. 2014;4(9):1036-45.
43. Weickhardt AJ, Price TJ, Chong G, GebSKI V, PavlakIS N, Johns TG, et al. Dual targeting of the epidermal growth factor receptor using the combination of cetuximab and erlotinib: preclinical evaluation and results of the phase II DUX study in chemotherapy-refractory, advanced colorectal cancer. *J ClinOncol*. 2012;30(13):1505-12.
44. Brugger W, Triller N, Blasinska-Morawiec M, Curescu S, Sakalauskas R, Manikhas GM, et al. Prospective molecular marker analyses of EGFR and KRAS from a randomized, placebo-controlled study of erlotinib maintenance therapy in advanced non-small-cell lung cancer. *J ClinOncol*. 2011;29(31):4113-20.
45. Singh A, Greninger P, Rhodes D, Koopman L, Violette S, Bardeesy N, et al. A gene expression signature associated with "K-Ras addiction" reveals regulators of EMT and tumor cell survival. *Cancer Cell*. 2009;15(6):489-500.
46. Ihle NT, Byers LA, Kim ES, Saintigny P, Lee JJ, Blumenschein GR, et al. Effect of KRAS oncogene substitutions on protein behavior: implications for signaling and clinical outcome. *Journal of the National Cancer Institute*. 2012;104(3):228-39.
47. Tournigand C, Chibaudel B, Samson B, Scheithauer W, Vernerey D, Mesange P, et al. Bevacizumab with or without erlotinib as maintenance therapy in patients with metastatic colorectal cancer (GERCOR DREAM; OPTIMOX3): a randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2015;16(15):1493-505.

# Résultats

## Supplementary data

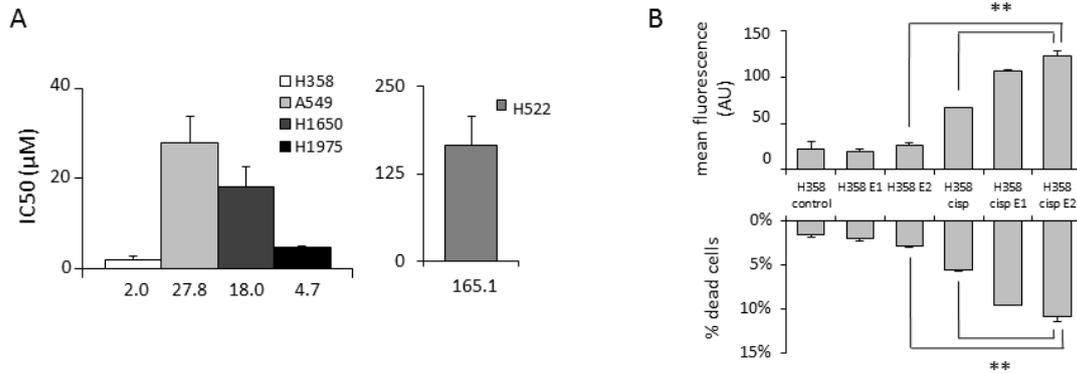


Figure S1 : A) Cells were treated by a range of erlotinib for 72 hours and IC50 was calculated by the MTT assay according to Chou (2006). B) H358 cells were treated by erlotinib 1 (E1) or 2µM (E2) for 48h following cisplatin pretreatment when indicated (3µM, 48h); cell death was assessed by To-Pro3 staining by flow cytometry as described in material and methods. The graph shown is representative of four independent experiments

# Résultats

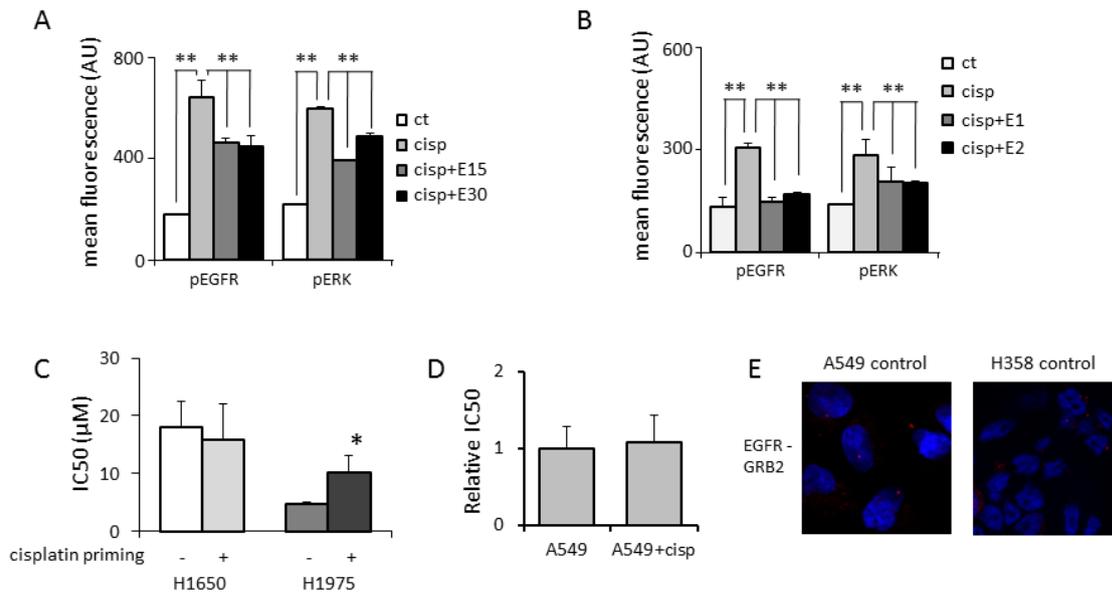


Figure S2 : A549 (A) and H358 (B) cells were treated by cisplatin 3µM 48h (cisp) followed by erlotinib for 72h for the indicated dose (15 or 30µM for A549 cells, 1 or 2µM for H358 cells). Cells were then fixed and incubated with anti-pEGFR (pY1068) or anti-pERK (pT202-pY204). Fluorescence was measured by flow cytometry. C) The IC50 of mutated-EGFR cell lines to erlotinib (72h) was calculated according to Chou et al.(2006) with or without cisplatin priming (3µM, 48h) before erlotinib treatment. D) the IC50 of A549 cells to erlotinib was calculated in the absence or presence of cisplatin 3µM for 72h. E) Representative images of EGFR-GRB2 dimerization in control A549 and H358 cells observed by the PLA technique (Blue: DAPI nuclear staining; Red: PLA spots).

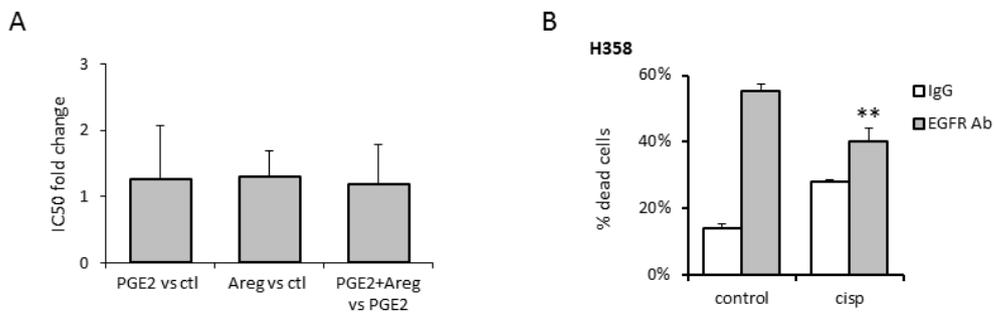


Figure S3 : A) A549 cells were treated by PGE2, amphiregulin or both and the cells IC50 to erlotinib was calculated as described in materials and methods. The mean IC50 fold change (+sd) versus control conditions is represented on the graph. No significant change was observed. B) H358 cells were treated by cisplatin 3µM 48h (cisp) followed by a blocking EGFR antibody for 72h. Cell death was measured by Topro3 staining and detected by flow cytometry.

# Résultats

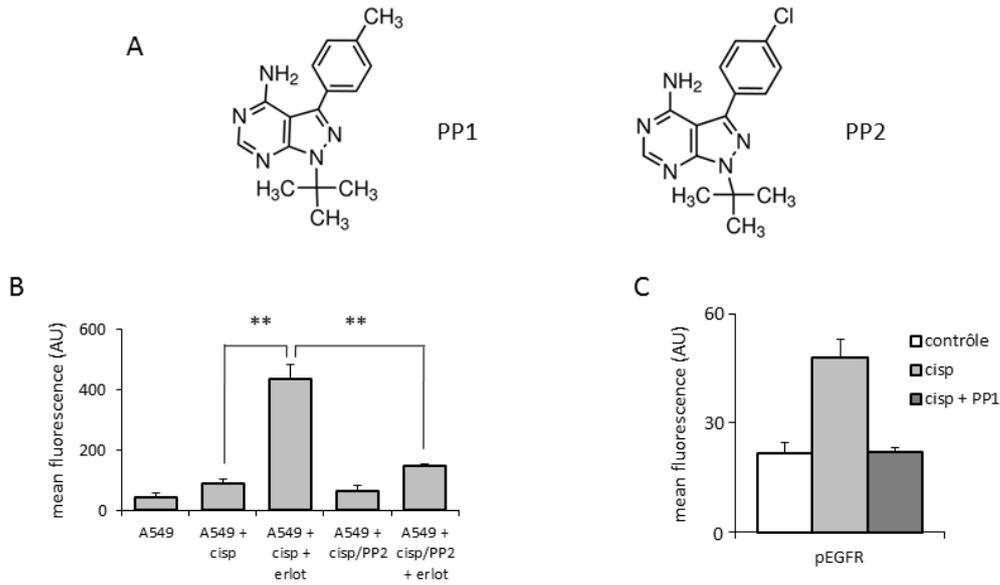


Figure S4 : A) Chemical structure of Src inhibitors PP1 and PP2. B) A549 cells were treated by the sequential treatment cisplatin + erlotinib with or without PP2 added during to cisplatin as described in the manuscript with PP1. Cell death was measured by To-Pro3 staining as described in the main text. C) H358 cells were treated by cisplatin 3 $\mu$ M 48h (cisp) +/- PP1 10 $\mu$ M. Cells were fixed and stained with anti pEGFR (Cell Signaling # 3777) coupled to a FITC-labelled secondary antibody as described in material and methods. Fluorescence was detected by flow cytometry.

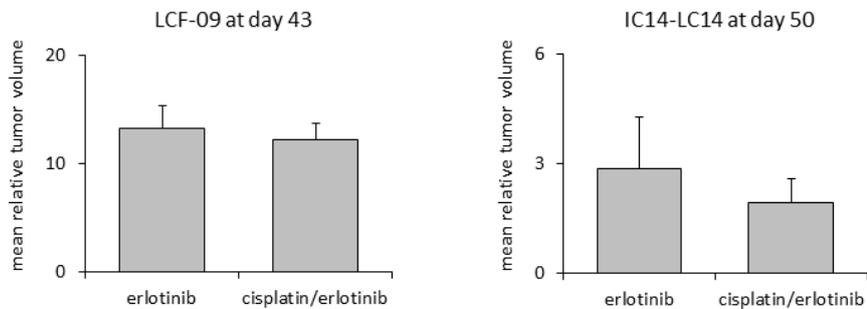


Figure S5: PDX experiments with the indicated tumors were allowed to grow until the benefit from the cisplatin-erlotinib sequential treatment disappeared, providing the tumors did not reach the volume of 2500mm<sup>3</sup>. The mean (+sd) relative tumor volume in the corresponding mice group is indicated in the graphs. As represented on the graphs, at the indicated time, no significant difference between both groups is observed anymore.

# Résultats

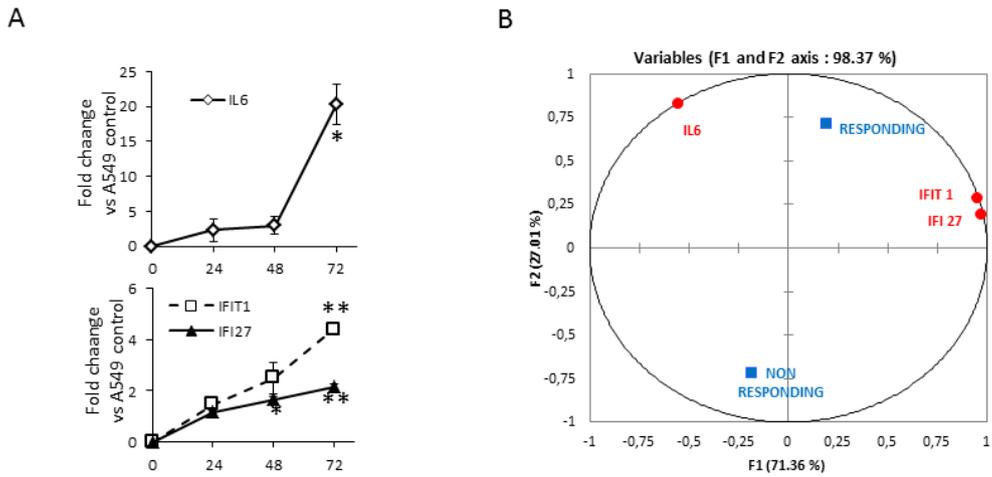


Figure S6 : A) IL6, IFIT1 and IFI27 mRNA were measured from A549 cells treated by cisplatin 3 $\mu$ M at indicated time points and normalized to the corresponding mRNA levels in control A549 cells at the same time points. The measurements were made in duplicate from three independent experiments, the graphs represent mean fold change +/-sd. \*: p<0.05; \*\*: p<0.01 (Student t-test). B) Pearson's principal component analysis (PCA) was made with the Q-PCR analyses from PDXs mRNA at day 8 post-cisplatin treatment. PDX were subclasses into responding (PDX A and B) or non-responding (PDX D) tumors

Variables	IFIT1	IFI 27	IL6	Treatment-NT	Treatment-4D	Treatment-8D	Treatment-18D	Responding	Non responding
IFIT1	<b>1</b>	<b>0.895</b>	-0,111	-0,243	0,008	0,325	-0,091	0,170	-0,170
IFI 27	<b>0.895</b>	<b>1</b>	-0,182	-0,280	0,030	<b>0.369</b>	-0,119	0,256	-0,256
IL6	-0,111	-0,182	<b>1</b>	-0,130	-0,074	0,318	-0,114	<b>0.381</b>	<b>-0.381</b>
Treatment-NT	-0,243	-0,280	-0,130	<b>1</b>	-0,333	-0,333	-0,333	0,000	0,000
Treatment-4D	0,008	0,030	-0,074	-0,333	<b>1</b>	-0,333	-0,333	0,000	0,000
Treatment-8D	0,325	0,369	0,318	-0,333	-0,333	<b>1</b>	-0,333	0,000	0,000
Treatment-18D	-0,091	-0,119	-0,114	-0,333	-0,333	-0,333	<b>1</b>	0,000	0,000
Responding	0,170	0,256	<b>0.381</b>	0,000	0,000	0,000	0,000	<b>1</b>	-1,000
Non responding	-0,170	-0,256	<b>-0.381</b>	0,000	0,000	0,000	0,000	-1,000	<b>1</b>

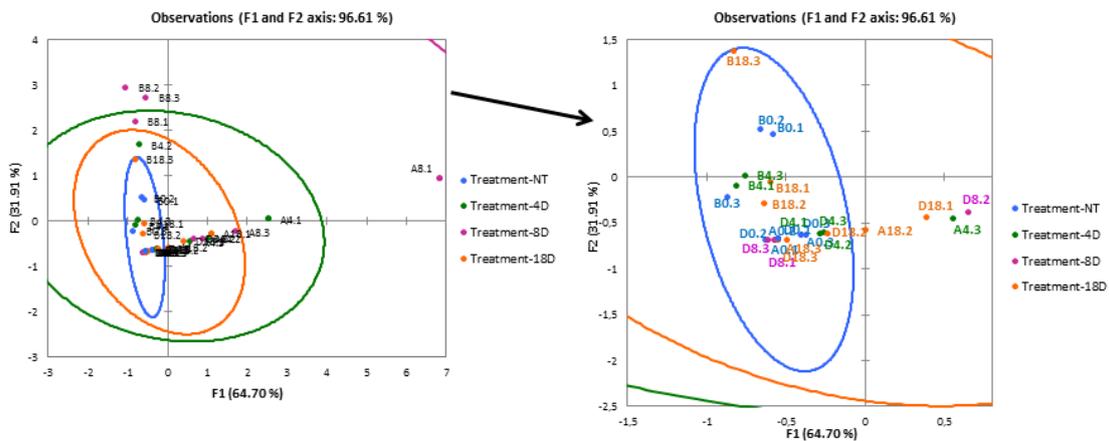


Figure S7 : A) Pearson's correlation matrix attached to the principal component analysis is shown above. Values in bold represent the significant correlation (p<0.05). B) Individual data points are represented on the graph (left) featuring confidence ellipses. The magnification panel on the right indicates that Treatment-8D data points divert from the control ellipse (Treatment-NT ellipse, blue) except from the 8-day PDX D data (D8.1, D8.2 and D8.3).

## Résultats

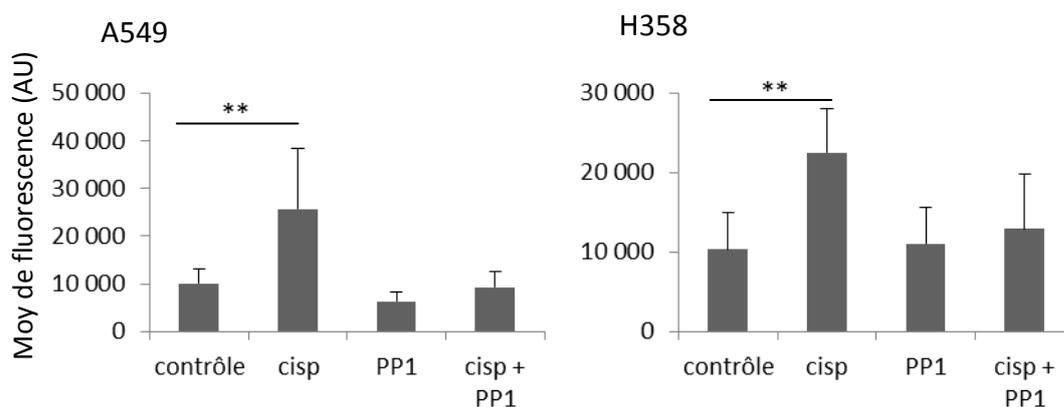
PDX name	treatment	IFIT1	IL6	IFI 27	response
A	NT-1	0,97	0	0,95	y
	NT-2	0,77	0	1,23	y
	NT-3	1,36	0	0,86	y
	4J-1	5,39	0	5,46	y
	4J-2	1,73	0	5,62	y
	4J-3	1,8	0	3,84	y
	8J-1	9,45	0	15,35	y
	8J-2	2,2	0	4,38	y
	8J-3	2,45	0	7,21	y
	18J-1	3,43	0	3,23	y
	18J-2	1,11	0	2,85	y
	18J-3	0,67	0	1,67	y
B	NT-1	1,29	1,26	1,23	y
	NT-2	1,22	1,34	1,09	y
	NT-3	0,62	0,59	0,74	y
	4J-1	0,73	0,71	0,86	y
	4J-2	1,3	2,64	1,67	y
	4J-3	0,8	0,82	1,04	y
	8J-1	1,33	3,23	1,65	y
	8J-2	1,35	4,11	1,37	y
	8J-3	2	3,73	2	y
	18J-1	1,16	0,69	0,95	y
	18J-2	0,84	0,46	1,16	y
	18J-3	1,41	2,31	0,85	y
D	NT-1	1	0	0,91	n
	NT-2	0,85	0	0,84	n
	NT-3	1,16	0	1,3	n
	4J-1	1,02	0	0,86	n
	4J-2	1,45	0	1,27	n
	4J-3	1,27	0	1,48	n
	8J-1	0,91	0	0,95	n
	8J-2	2,85	0	2,46	n
	8J-3	0,85	0	0,91	n
	18J-1	2,48	0	2,07	n
	18J-2	1,11	0	1,91	n
	18J-3	0,81	0	1,2	n

Tableau 4

### 1.1 Le cisplatine sensibilise les cellules de cancers bronchiques non à petites cellules *in vitro* et *in vivo* à l'erlotinib.

Nous avons mis en évidence sur des lignées cellulaires (A549 et H358) et des PDX d'adénocarcinomes bronchiques EGFR sauvage une sensibilisation à l'erlotinib, un ITK anti EGFR, après un traitement court ou prolongé par cisplatine à dose sub-léthale (**Raimbourg et al figure.1c, S1b, 2b**). Cette sensibilisation n'est pas retrouvée dans les lignées cellulaires EGFR muté H1975, H1650 (**Raimbourg et al figure S2c**). Cette sensibilisation est corrélée à une activation d'EGFR ligand indépendante (**Raimbourg et al figure 3d, 3e et S3b**) induite par Src (**Raimbourg et al figure 4a, 4b,4c et S4**). Nous avons confirmé l'augmentation de la phosphorylation de Src après cisplatine, inhibée par le PP1, inhibiteur pharmacologique de Src dans nos lignées H358 et A549 (**figure 17**).

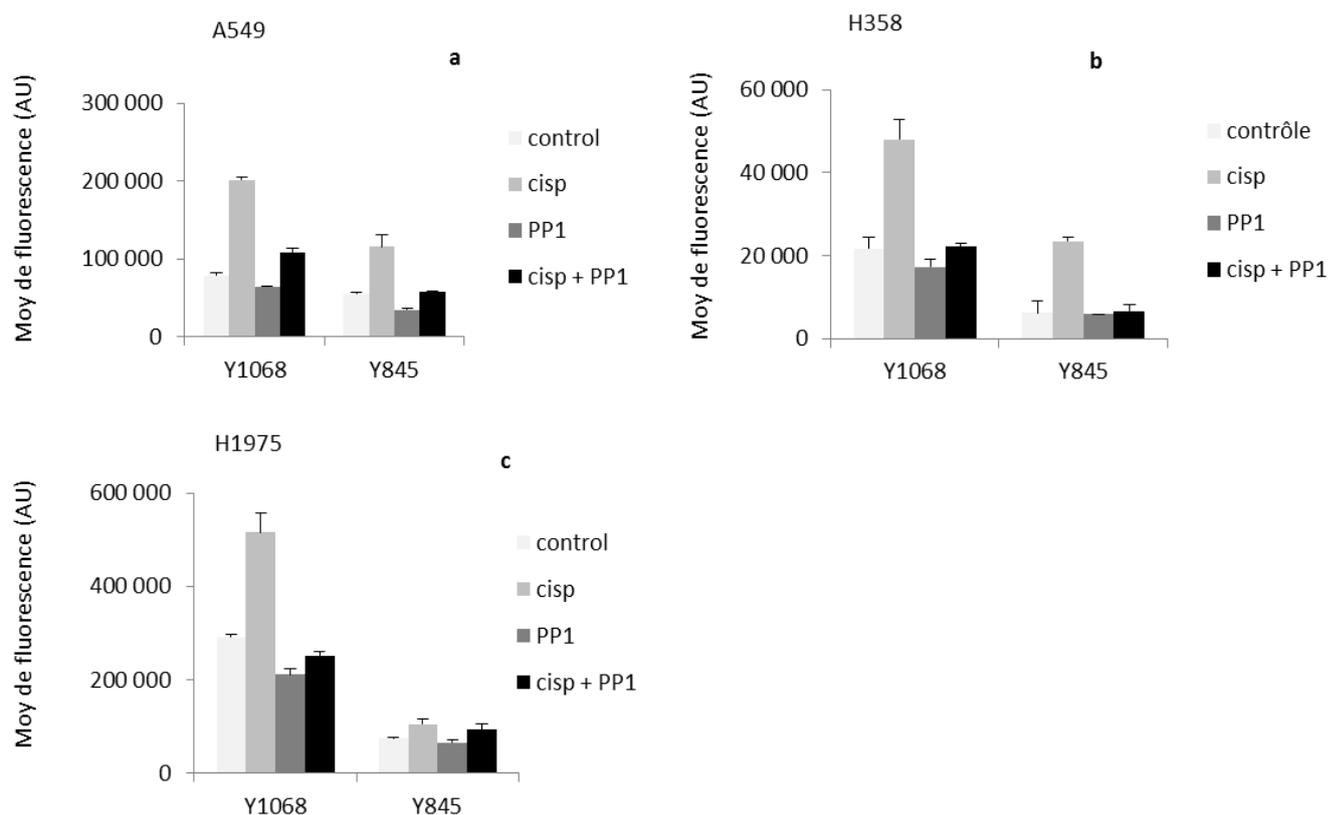
## Résultats



**Figure 17 : phosphorylation de Src (Y419) dans les lignées A549 et H358 après traitement par cisplatine, PP1 et cisplatine + PP1. \*\* :p<0.01**

L'une des tyrosines cibles de la phosphorylation d'EGFR par Src est la tyrosine 845. Nous avons confirmé une augmentation de la phosphorylation des tyrosines 1068 (comme précédemment montré **figures 1b,2b et S2a et b**) et 845 dans les lignées A549 et H358 après 48h de cisplatine à dose sub-léthale. L'utilisation de PP1 diminue la phosphorylation de ces deux tyrosines (**figure 18a et 18b**). Dans la lignée H1975, le cisplatine entraîne une phosphorylation de la tyrosine 1068 mais peu de la tyrosine 845. L'utilisation du PP1 entraîne une diminution de la phosphorylation de la Y1068 mais modifie peu celle de la Y845 (**figure 18c**). Ces résultats vont dans le sens d'un rôle joué par Src dans l'activation d'EGFR induite par le cisplatine des lignées EGFR sauvage A549 et H358.

## Résultats



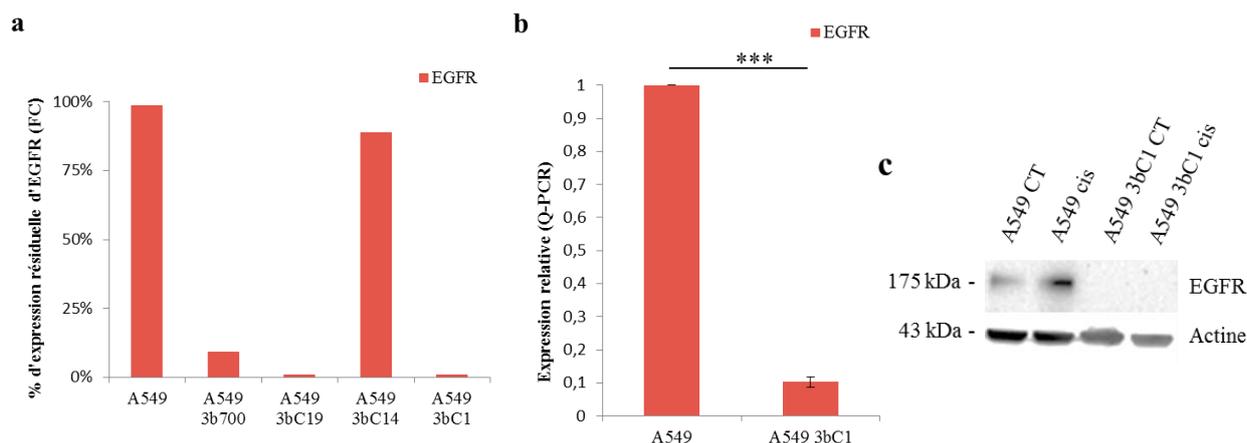
**Figure 18 : Phosphorylation des tyrosines 845 et 1068 :**

**(a)** quantification de l'expression de la phosphorylation d'EGFR sur les tyrosines 1068 et 845 en conditions contrôle, après cisplatine seul ou avec PP1 et après PP1 seul dans la lignée A549, **(b)** dans la lignée H358 et **(c)** dans la lignée H1975.

### 1.2 La sensibilisation des cellules à l'erlotinib induite par le cisplatine est bien EGFR dépendante.

Nous avons réalisé l'extinction du gène EGFR dans la lignée A549 par la technique CRISPR-Cas 9 décrit dans matériels et méthodes. Nous avons obtenu après transfection et sélection des clones à la puromycine plusieurs clones efficacement transfectés exprimant <1% d'EGFR en cytométrie en flux (A549 3bC19 et 3bC1) (**figure 19a**). Le clone A549 3bC1 a été utilisé par la suite. Le niveau d'expression d'EGFR de ce clone a été contrôlé au niveau de l'expression ARN par PCR et au niveau protéique par western blot (**figure 19b et 19c**). Les résultats confirment la perte d'expression d'EGFR dans le clone A549 3bC1 par rapport à la lignée parentale.

## Résultats



**Figure 19 : Expression EGFR dans les cellules A549 et A549 3bC1 :**

**(a)** % de cellules marquées EGFR en cytométrie en flux dans la lignée parentale A549, transfectée non clonée A549 3b700 et les clones 3bC19, 3bC14 et 3bC1. **(b)** quantification de l'expression d'EGFR en q-PCR dans les lignées A549 et 3bC1. \*\*\* : $p < 0.001$  **(c)** Détection de l'expression d'EGFR en western blot en condition contrôle et après 48h de cisplatine dans ces deux lignées.

Nous avons ensuite comparé la sensibilité de la lignée A549 3bC1 et de la lignée parentale A549 à l'erlotinib aux doses définies de 15 et 30 $\mu$ M pendant 72h avec ou sans traitement de 48h par cisplatine 3 $\mu$ M. Dans la lignée A549, on retrouve la sensibilisation pour les cellules traitées à l'IC50 d'erlotinib (cis+30 $\mu$ M), comme précédemment décrit (**Raimbourg et al figure.1c, S1b, 2b**). Cette sensibilisation est retrouvée également dans les cellules A549 3bC1 exposées à la plus forte concentration d'erlotinib (cis+30 $\mu$ M) comparée aux cellules non prétraitées (**figure 20**). Cependant, on constate une diminution significative de la sensibilisation dans la lignée A549 3bC1 par rapport à la lignée A549 confirmant que cette sensibilisation dépend bien de la présence d'EGFR (**figure 20**). La persistance d'une toxicité plus importante de la combinaison des deux traitements dans la lignée A549 3bC1 est plutôt le reflet de l'effet de l'erlotinib sur d'autres cibles à ces doses élevées.

## Résultats

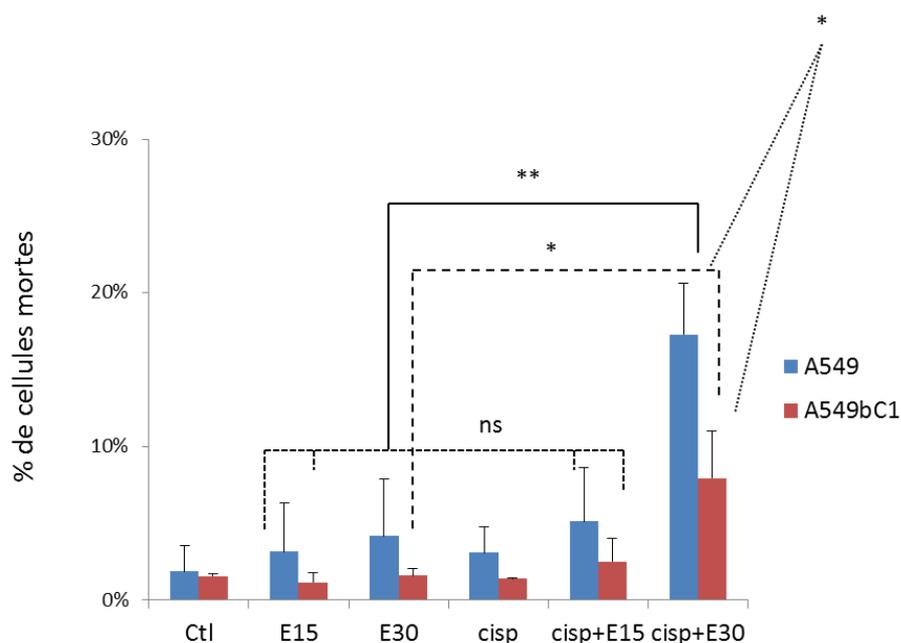
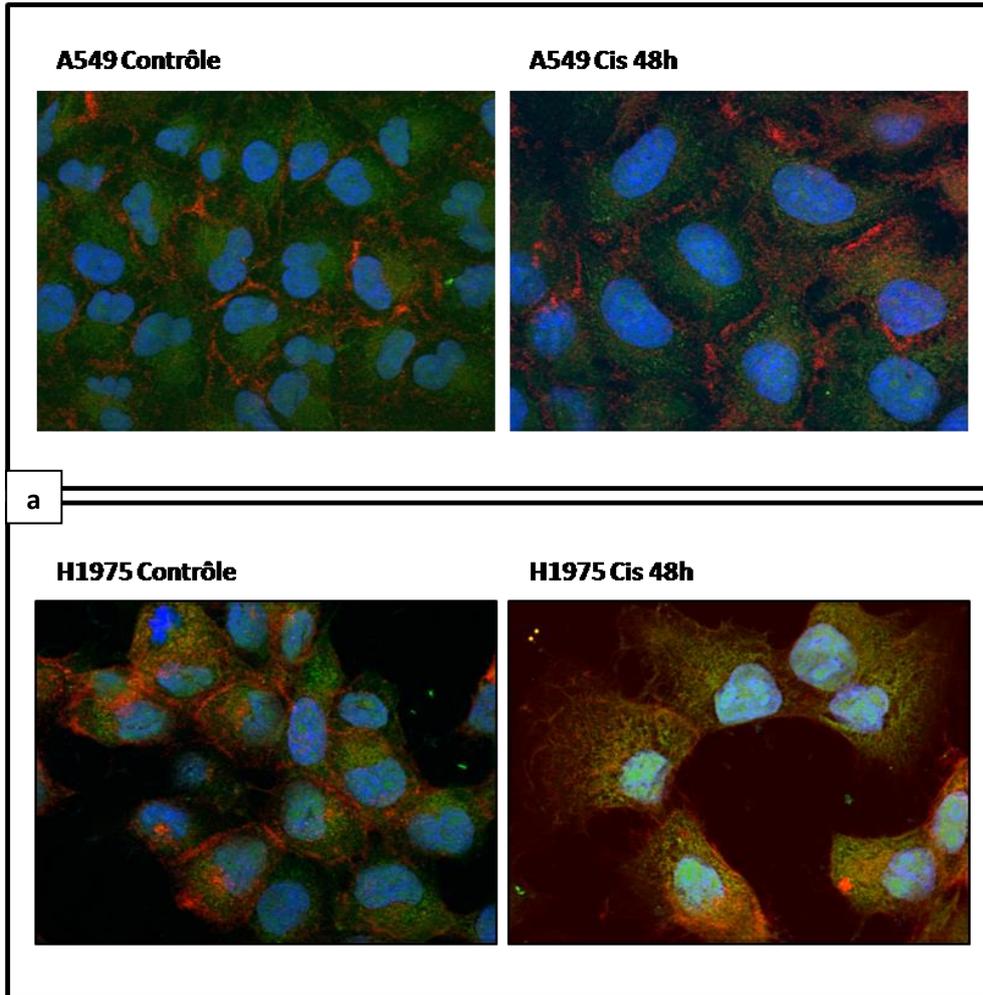


Figure 20 : Sensibilité des cellules A549 et A549BbC1 à l'erlotinib 15 $\mu$ M et 30  $\mu$ M avec ou sans pré traitement par cisplatine 3 $\mu$ M. \* :  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ .

### 1.3 Le cisplatine induit une localisation mitochondriale de l'EGFR dans les cellules sensibilisées

Pour mieux définir le rôle d'EGFR dans cette sensibilisation à l'erlotinib induite par le cisplatine, nous nous sommes intéressés à la localisation intracellulaire d'EGFR, en particulier mitochondriale, puisque Src est connu pour permettre l'adressage mitochondrial d'EGFR par le biais de la phosphorylation de la tyrosine 845. Nous avons comparé la lignée A549, EGFR sauvage et sensibilisée, à la lignée H1975, EGFR muté et non sensibilisée. Des expériences préliminaires ont été réalisées par immunocytochimie en fluorescence avec double marquage EGFR et cytochrome c (marqueur mitochondrial). A l'état basal, EGFR est essentiellement localisé à la membrane plasmique et dans le réticulum endoplasmique (marquage intra-cytoplasmique péri-nucléaire) dans ces deux lignées. Il existe un marquage membranaire plus intense dans la lignée A549, ce que nous avons déjà mis en évidence en cytométrie en flux (**Raimbourg et al figure 1a**). Après cisplatine, il semblait exister une co-localisation EGFR-cytochrome c plus importante dans la lignée A549 que dans la lignée H1975, bien que le marquage soit de qualité moyenne (**figure 21**). Ceci suggérait une localisation mitochondriale d'EGFR après cisplatine dans la lignée A549.

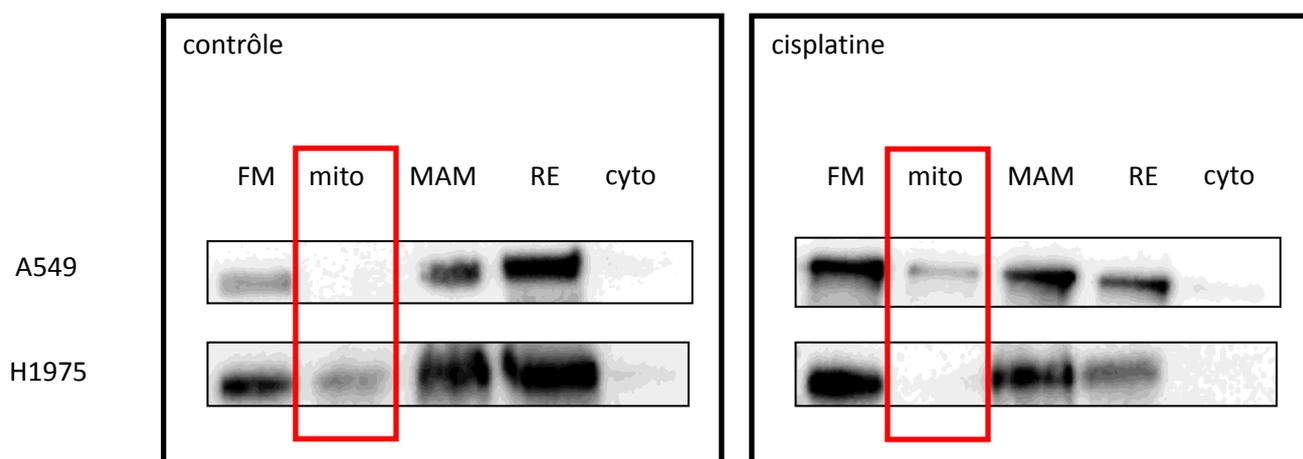


**Figure 21 : Etude immuno-cyto-chimique par immunofluorescence du cytochrome c (en vert) et de l'EGFR (en rouge) sur les lignées A549 et H1975 en conditions contrôle et après traitement par cisplatine 48h**

Ces données ont été confirmées par fractionnement subcellulaire. A l'état basal on note une localisation d'EGFR essentiellement dans le réticulum endoplasmique dans les deux lignées. EGFR est également présent dans la fraction mitochondriale et dans les MAM. Il existe par contre une petite fraction d'EGFR dans les mitochondries pures dans la lignée H1975 non présente dans la lignée A549. Après 48h de traitement par cisplatine 3 $\mu$ M, EGFR apparaît dans les mitochondries pures dans les A549 et disparaît de cette fraction dans la lignée H1975 (**figure 22**). La lignée H1975 à l'état basal, c'est-à-dire sensible à l'erlotinib, présente

## Résultats

un profil de localisation d'EGFR identique à la lignée A549 après cisplatine qui se sensibilise à l'erlotinib. Ces résultats suggèrent un rôle de l'EGFR mitochondrial dans la sensibilisation induite par le cisplatine.



**Figure 22 : Localisation mitochondriale de l'EGFR dans les lignées A549 et H1975 avec ou sans traitement cisplatine.**

Analyses en western blot réalisées après fractionnement cellulaire. FM correspond à la fraction mitochondriale qui est composée de mitochondries toujours associées aux MAM. Mito correspond à la fraction de mitochondries purifiées qui ne sont plus associées aux MAM. MAM correspond à la fraction des membranes associées aux mitochondries. RE correspond à la fraction du réticulum endoplasmique. Cyto correspond à la fraction du cytosol.

## 2 Rôle de l'EGFR mitochondrial dans la sensibilisation aux ITK anti EGFR induite par le cisplatine.

L'EGFR mitochondrial, décrit dans les cancers bronchiques, exerce son activité de manière dépendante ou non de sa fonction tyrosine kinase, en interagissant avec différentes protéines qui participent à la régulation de la dynamique mitochondriale (Che et al., 2015), du métabolisme (Boerner et al., 2004) ou de la mort cellulaire (Li et al., 2017). Après avoir démontré que la présence d'EGFR mitochondrial semblait liée à la sensibilité à l'erlotinib dans nos lignées, nous avons tenté de comprendre par quels mécanismes s'exerçait ce rôle.

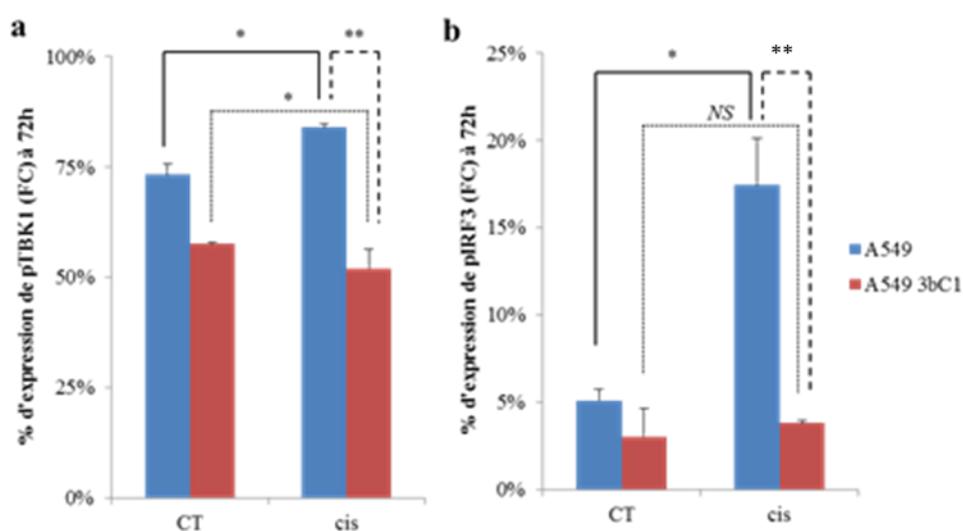
### **2.1 Rôle de l'EGFR mitochondrial sur l'activation de la voie IRF3/TBK1**

L'activation d'EGFR ligand indépendante dans nos lignées et nos PDX est corrélée à une augmentation de l'expression d'IFI27 et IFI202, gènes cibles de la protéine IRF3 impliquée dans la réponse IFN de type 1. La mitochondrie a un rôle clé dans la régulation du signal IFN par le biais de la protéine MAVS (mitochondrial antiviral signaling protein) située au niveau de la mitochondrie et qui va coordonner les signaux reçus des récepteurs cytosoliques reconnaissant les pathogènes (PRRs). L'activation du signal antiviral médié par MAVS va aboutir à la phosphorylation de TBK1 puis d'IRF3. Les principaux mécanismes de régulation du signal induit par MAVS résultent d'interactions protéines-protéines ou de modifications de la dynamique et de la morphologie mitochondriale (Jacobs and Coyne, 2013).

#### **2.1.1 L'activation de la voie IRF3/TBK1 est indépendante d'EGFR mais EGFR permet le maintien de l'activation de cette voie dans le temps.**

Pour vérifier si EGFR mitochondrial est impliqué dans l'activation d'IRF3 nous avons comparé les lignées A549 et A549 3bC1 après 48h de cisplatine et après traitement séquentiel par 48h de cisplatine +/- 72h d'erlotinib. On constate une augmentation significative de la phosphorylation de TBK1 (pTBK1) et d'IRF3 (pIRF3) dans les deux lignées traitées par cisplatine pendant 48h. En revanche, ce signal est maintenu dans le temps dans la lignée A549, puisqu'il persiste une augmentation significative de l'expression de pIRF3 et pTBK1 72h après le traitement par cisplatine, alors qu'il existe une diminution significative de cette phosphorylation dans la lignée A549 3bC1 en comparaison de la lignée A549 (**figure 23a et 23b**). Des résultats similaires sont retrouvés pour les cellules exposées à l'erlotinib qui ne semble pas influencer le signal.

## Résultats



**Figure 23 : Activation de la voie des IFN de type 1 dans les lignées A549 et A549 3bC1.**

Mesure de l'expression de (a) pTBK1 et (b) pIRF3 après 48h de cisplatine versus contrôle, analyse à 72h de l'exposition ou non au cisplatine sans exposition à l'erlotinib. \* :  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$

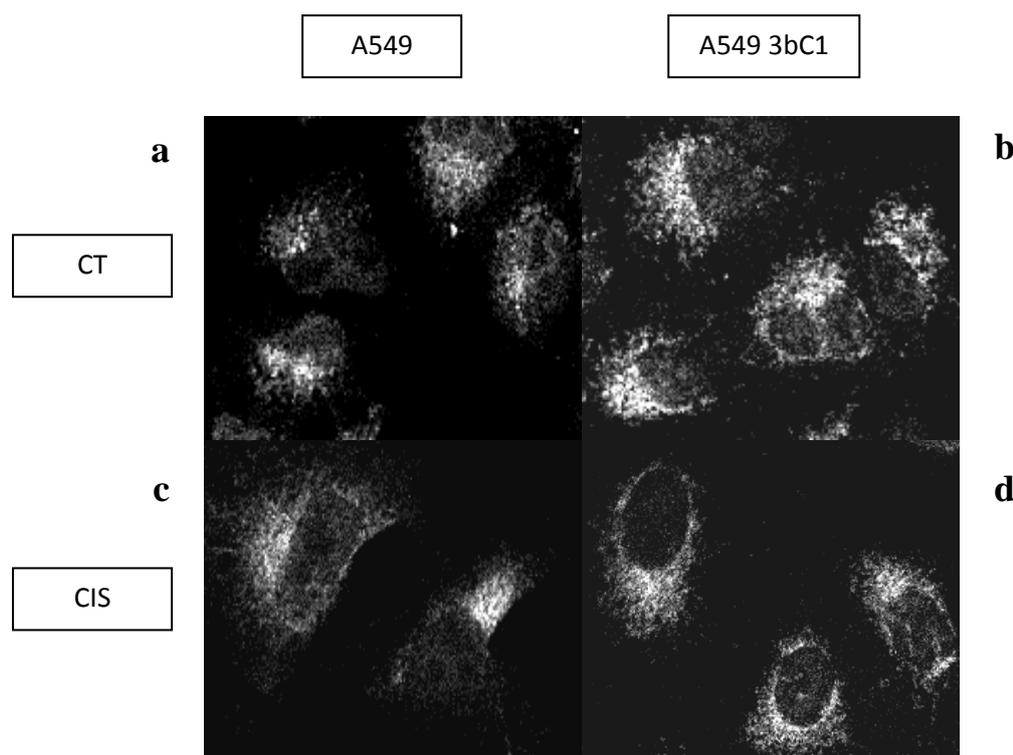
La perte d'EGFR semble être sans conséquence sur l'activation de TBK1 et d'IRF3, mais entraîne une perte de la phosphorylation de ces deux protéines à 72h après le traitement par cisplatine. Par ailleurs on ne note aucune influence de l'erlotinib sur cette activation. L'ensemble de ces résultats suggère un rôle d'EGFR dans la stabilité du signal indépendant de sa fonction tyrosine kinase.

### 2.1.2 Le cisplatine induit des modifications de la morphologie et de la dynamique mitochondriale indépendamment d'EGFR.

Les modifications de la morphologie mitochondriale peuvent réguler le signal induit par MAVS et l'activation d'IRF3 et TBK1. En effet la fusion et l'élongation mitochondriale semblent favoriser l'agrégation des MAVS et augmenter l'intensité du signal (Castanier et al., 2010). Les protéines mitofusine 1 et 2 (MFN1 et MFN2) sont des protéines mitochondriales impliquées dans la fusion mitochondriale et qui pourraient interagir avec MAVS. Nous avons

## Résultats

réalisé un marquage des lignées A549 et A549 3bC1 en condition contrôle ou traitées 48h par cisplatine par la mitofusine 1. On observe en condition contrôle un aspect fragmenté des mitochondries dans les deux lignées (**figure 24a et 24b**). Après cisplatine, on observe un aspect de fusion mitochondriale en réseau également dans les deux lignées (**figure 24c et 24d**). Ceci laisse supposer l'absence de rôle majeur d'EGFR mitochondrial dans les modifications de la morphologie mitochondriale.



**Figure 24 : Morphologie mitochondriale des cellules A549 et A549 3bC1.** Marquage MFN1 observé en microscopie confocale **(a)** et **(b)** en condition contrôle, **(c)** et **(d)** après 48h de cisplatine 3 $\mu$ M.

Nous avons ensuite regardé dans ces deux lignées, le rôle éventuel d'EGFR mitochondrial dans le rapprochement des compartiments mitochondriaux et du RE par mesure en P-Lisa des interactions mitofusine1-mitofusine 2, complexe stabilisateur des MAM. De nouveau on constate une augmentation des interactions MFN1/MFN2 après cisplatine dans les deux lignées : les ratios moyens sont respectivement calculés à 3,687 (A549) et 2,646 (A549 3Bc1), sans différence significative ( $p=0,26$ ). Ces résultats confirment qu'EGFR mitochondrial n'a pas de rôle dans l'augmentation de la fusion et dans l'accroissement des MAM.

## Résultats

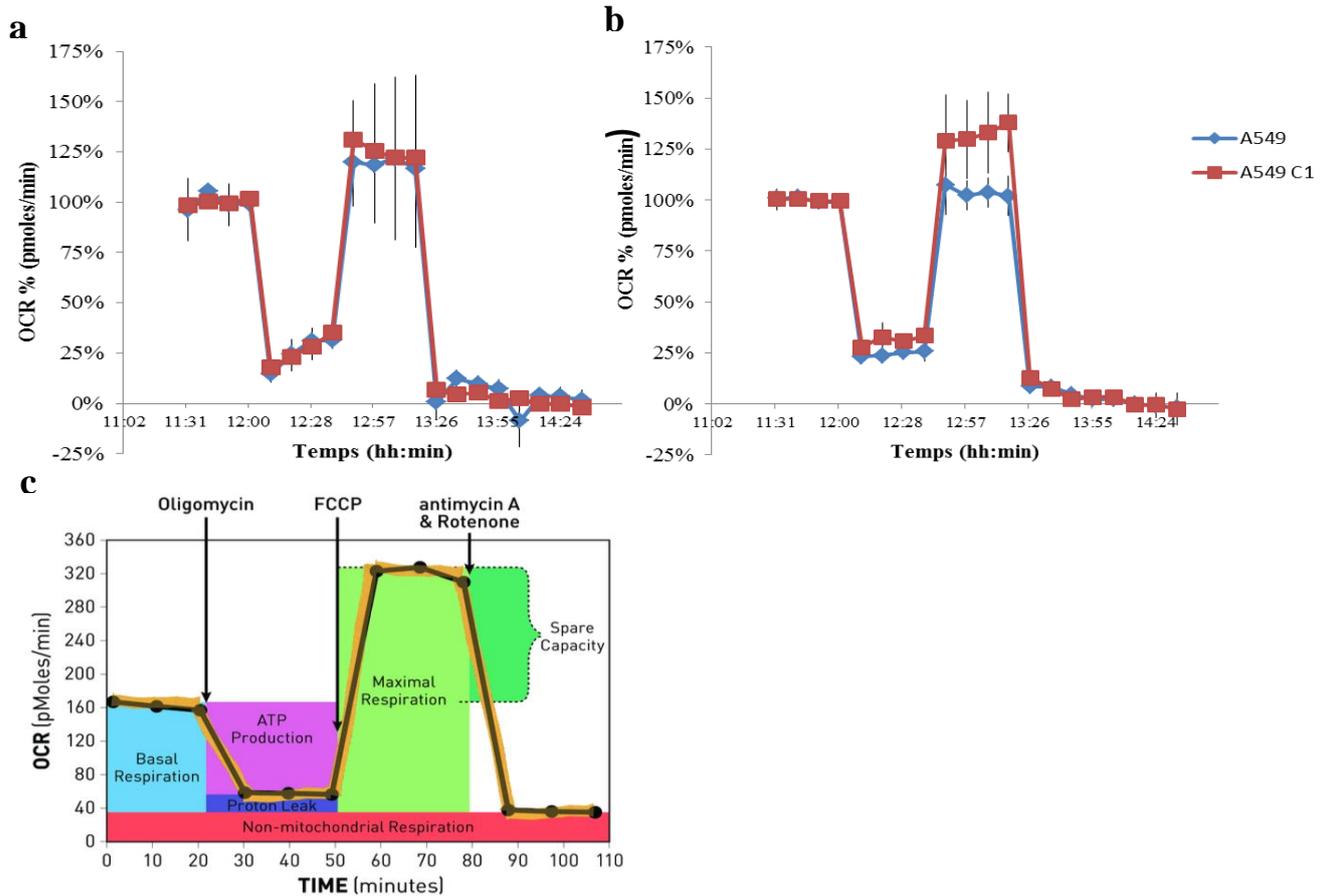
---

Les modifications de morphologie et de dynamique mitochondriale reflètent plutôt un stress induit par le cisplatine sans doute à l'origine de l'activation de la voie IFN1 et ce indépendamment d'EGFR. Par contre l'EGFR mitochondrial permet de maintenir l'activation de la voie IFN1. L'absence de modification du signal par l'erlotinib rend peu probable un rôle direct de la voie IFN dans la sensibilisation mais pourrait être un marqueur indirect de cette sensibilisation et de la présence d'EGFR à la mitochondrie.

### 2.2 Rôle d'EGFR mitochondrial sur le métabolisme cellulaire

L'un des partenaires d'interaction d'EGFR mitochondrial est CoxII (Boerner et al., 2004), protéine insérée dans la membrane interne mitochondriale, responsable de la régénération du cytochrome c oxydé au sein du complexe IV (cytochrome c oxydase) de la chaîne mitochondriale de transport d'électrons. Nous avons évalué le rôle potentiel d'EGFR mitochondrial sur le métabolisme des cellules A549 et A549 3bC1 avec ou sans traitement par cisplatine 48h 3 $\mu$ M. En condition contrôle, il n'y a pas de différence de métabolisme entre les deux lignées (**figure 25a**). En revanche, après cisplatine, on observe dans la lignée A549 une nette diminution de la capacité respiratoire de réserve (spare capacity) par rapport aux cellules 3bC1 (**figure 25b**) : la capacité respiratoire de réserve est calculée à 4% pour les A549 contre 32% pour les 3bC1. Le coupling efficiency est comparable dans les deux lignées. Ceci suggère un rôle fonctionnel d'EGFR mitochondrial dans le métabolisme des A549 dont l'analyse nécessite d'être approfondie.

# Résultats



**Figure 25 : Courbe d'OCR (% après normalisation) des lignées A549 et A549 3bC1.**

Expériences réalisées en conditions contrôle **(a)** et après cisplatine **(b)** ; et **(c)** courbe théorique d'OCR. **(a)(b)** Après mesure du niveau basal d'OCR, on mesure la production d'ATP après traitement des cellules par oligomycine ( $1 \mu\text{M}$ ), puis la respiration mitochondriale maximale après traitement par CCCP ( $0.8 \mu\text{M}$  en conditions contrôle,  $1,2 \mu\text{M}$  après cisplatine) et enfin la respiration non mitochondriale après injection d'antimycine A / roténone ( $1 \mu\text{M}$ ). L'adjonction du 2-DG ( $100\text{mM}$ ) permet d'inhiber la glycolyse anaérobie. **(c)** Courbe théorique d'OCR avec mesure des différents paramètres mitochondriaux.

# **DISCUSSION**

# **1 Cisplatine et sensibilité aux ITK anti EGFR dans les cancers bronchiques non à petites cellules EGFR sauvage.**

## **1.1 Cisplatine et activation d'EGFR.**

Les ITK anti EGFR de première, deuxième ou troisième génération ont amélioré la survie des patients dont la tumeur présente une mutation activatrice du gène de l'EGFR. En l'absence de ces mutations, le bénéfice des ITK anti EGFR est modeste. Par ailleurs, les données cliniques d'efficacité de ces traitements chez les patients sans mutations activatrices d'EGFR suggéraient un bénéfice uniquement après l'utilisation d'une chimiothérapie première.

C'est à partir de ces constatations que nous avons cherché à évaluer l'effet du cisplatine sur la voie de l'EGFR dans les CBNPC sans mutation de l'EGFR et son impact sur la sensibilité à l'erlotinib, ITK anti EGFR. Les données de nos travaux ont mis en évidence une augmentation de la sensibilité à l'erlotinib après cisplatine en rapport avec une activation d'EGFR ligand indépendante, médiée par Src à la fois dans les lignées cellulaires mais également in vivo sur PDX d'adénocarcinomes bronchiques. Cette sensibilisation est induite par un traitement préalable par cisplatine puisqu'un traitement concomitant n'a aucun effet dans nos lignées sur la sensibilité aux ITK. Ces données corroborent les résultats des études cliniques d'efficacité de l'erlotinib. En effet, l'erlotinib a démontré dans le sous-groupe des patients EGFR sauvage une amélioration de la survie sans progression et de la survie globale en traitement de maintenance après 4 cycles de chimiothérapie par sels de platine dans l'étude SATURN (Cappuzzo et al., 2010). Les études de stratégie TORCH et GFPC 0504 (Gridelli et al., 2012; LeCaer et al., 2011) comparant la séquence erlotinib suivi d'une chimiothérapie à base de sels de platine à la séquence thérapeutique inverse confirment quant à elles une nette supériorité de la séquence chimiothérapie puis erlotinib. De même l'ajout de l'erlotinib à la chimiothérapie n'apporte aucun bénéfice par rapport à la chimiothérapie seule (Gatzemeier et al., 2007). La chimiothérapie semble donc indispensable pour induire l'activation d'EGFR en l'absence d'activation constitutionnelle d'EGFR induite par certaines mutations du gène. L'absence d'effet d'un traitement concomitant suggère qu'un temps est nécessaire pour que se mettent en place les mécanismes de sensibilisation induit par le cisplatine. Ces résultats corroborent ceux de Wang Mc et al qui ont testé trois séquences thérapeutiques différentes sur des lignées cellulaires de CBNPC EGFR muté et EGFR sauvage, dont les A549, et qui

## Discussion

---

montrent que la séquence cisplatine suivi d'icotinib permet d'obtenir un effet synergique contrairement à la séquence inverse ou à un traitement concomitant (Wang et al., 2015).

Cependant, le bénéfice des ITK anti EGFR pour les patients EGFR sauvage est faible, augmentant par exemple la survie sans progression de 0,3 mois en comparaison du placebo dans l'étude SATURN. Il se peut, par ailleurs, que la supériorité de la séquence chimiothérapie-erlotinib soit liée au fait qu'une moindre proportion de patients traités par erlotinib en première intention aient pu bénéficier d'une chimiothérapie à progression ou que l'erlotinib ait pu entraîner une résistance au cisplatine plutôt qu'à un effet de l'erlotinib lui-même en deuxième ligne. Les études plus récentes, n'incluant que des patients EGFR sauvage, ne retrouvent pas de supériorité de l'erlotinib que ce soit en maintenance par rapport au placebo ou en deuxième ligne par rapport à la chimiothérapie. L'étude IUNO comparant l'utilisation de l'erlotinib en maintenance après 4 cycles de chimiothérapie à base de sels de platine versus placebo ne montre aucune différence entre les deux (Cicenas et al., 2016). A progression, l'étude TAILOR, comparant l'erlotinib à une chimiothérapie de deuxième ligne, montre que la survie sans progression et les taux de réponses sont supérieurs pour la chimiothérapie, bien qu'il n'existe pas de différence en terme de survie globale (Garassino et al., 2013).

Pour autant, les résultats que nous avons obtenu montrent une augmentation de l'efficacité de l'erlotinib après cisplatine dans l'ensemble de nos lignées cellulaires EGFR sauvage, hormis la lignée H522 mais qui n'exprime pas EGFR, et sur 3 PDX sur 4. Comment expliquer l'absence de corrélation d'efficacité entre nos résultats et ceux de la littérature.

La sensibilité spontanée des cellules au cisplatine ne semble pas avoir d'impact sur l'apparition d'une phosphorylation d'EGFR et sur la sensibilisation induite par le cisplatine. Cette sensibilisation survient aussi bien sur les lignées A549 et H358, dont l'IC50 au cisplatine est le double de celle des A549, que sur la lignée A549 cis3 devenue résistante au cisplatine. On retrouve dans ces trois lignées une augmentation de la phosphorylation d'EGFR. Ces données se retrouvent également sur nos PDX puisque la sensibilisation la plus nette se trouve sur le modèle LCF-04, le plus sensible au cisplatine des quatre (inhibition de croissance tumorale (ICT) moyenne à 27%), mais se retrouve aussi sur le modèle LCF-09, le plus résistant des quatre au cisplatine (ICT moyenne 4%). Rho et al ont mis en évidence que

## Discussion

---

la génération de cellules résistantes au cisplatine par des expositions intermittentes à des doses croissantes suivies de temps sans traitement n'altère pas la sensibilité des cellules aux ITK anti EGFR (Rho et al., 2011). De la même manière, la sensibilité spontanée des lignées ou des PDX à l'erlotinib ne préjuge pas de la survenue ou non de la sensibilisation. Nos données in vitro et in vivo suggèrent l'apparition précoce de cette sensibilisation après exposition à la chimiothérapie et ce quel que soit le temps d'exposition au cisplatine, mais sur deux de nos modèles de PDX cette sensibilisation disparaît dans le temps. Il aurait été intéressant de voir dans ces deux modèles de PDX l'effet d'injections répétées de cisplatine sur la sensibilité à l'erlotinib. Celles-ci pourraient permettre de maintenir cette activation d'EGFR et cette sensibilisation à l'erlotinib dans le temps. Cependant les données de l'étude FASTACT 2, testant l'effet d'un traitement par erlotinib intercalé entre chaque cycle de chimiothérapie, n'apporte aucun bénéfice par rapport à la chimiothérapie seule pour les patients EGFR sauvage (Wu et al., 2013).

Comme nous l'avons décrit précédemment, l'activation d'EGFR par le cisplatine a été déjà décrite dans divers modèles cellulaires de cancers de l'ovaire, de glioblastome ou de CBNPC (Kim et al., 2015). Les conséquences biologiques de cette activation de la fonction tyrosine kinase d'EGFR, quel qu'en soit le mécanisme, sont variables. Elle peut être un mécanisme de résistance au cisplatine, par augmentation de l'effet promoteur sur la survie d'EGFR par exemple (Ohta et al., 2012; Persons et al., 1999). A l'inverse cette activation peut favoriser l'action cytotoxique du cisplatine par l'augmentation de l'internalisation d'EGFR favorisant sa dégradation et limitant sa disponibilité à la membrane (Ahsan et al., 2010). L'ajout d'un ITK anti-EGFR pourra alors avoir des effets opposés. Van Schaeybroeck a décrit l'effet du cisplatine sur la phosphorylation d'EGFR et la réponse au gefitinib dans plusieurs lignées cellulaires de CBNPC EGFR sauvage (Van Schaeybroeck et al., 2006). Dans certaines lignées cellulaires, il est mis en évidence une augmentation de la phosphorylation d'EGFR induite par le cisplatine permettant une sensibilisation au gefitinib. A l'inverse, dans d'autres lignées EGFR sauvage, le cisplatine entraîne une diminution de la phosphorylation d'EGFR et un effet antagoniste des deux traitements. Le cisplatine peut donc avoir des effets variables sur l'activation EGFR, de même que lorsque le cisplatine augmente la phosphorylation d'EGFR, cette activation peut aboutir à des effets thérapeutiques opposés en raison de la multitude des voies de signalisation d'aval activées par la suite et des partenaires d'interaction.

## Discussion

---

Outre les effets biologiques variables induits par l'activation d'EGFR par le cisplatine, la chimiothérapie peut également favoriser l'apparition de mécanismes de résistances aux ITK anti EGFR. Les mécanismes de résistance primaire ou secondaire aux ITK anti EGFR ont été bien décrits pour les patients EGFR muté et relèvent de mécanismes génétiques ou épigénétiques. Il peut s'agir de la présence ou de l'apparition de mutations ne permettant plus la fixation de l'ITK sur le récepteur, de mutations de protéines d'aval comme PI3K ou de l'activation de voies de signalisation alternatives. La voie de signalisation induite par l'activation d'IGF1R est un mécanisme connu de résistance secondaire aux ITK anti EGFR pour les patients EGFR muté (Nguyen et al., 2009). Il a été montré que cette voie peut être activée en réponse aux dommages de l'ADN induits par les chimiothérapies comme les sels de platine (Davaadelger et al., 2016) et est capable d'interagir avec EGFR. Cortes-Sempere M et al ont décrit une hyperméthylation d'IGFBP3 induite par un traitement par cisplatine entraînant une activation de la voie IGF1R par augmentation de la disponibilité en IGF1 (Cortés-Sempere et al., 2013). De même Sharma et al ont décrit l'apparition de populations cellulaires devenues résistantes aux ITK anti EGFR après leur exposition à ces traitements, par des modifications épigénétiques réversibles du phénotype des cellules (Sharma et al., 2010). L'effet sensibilisateur pourrait donc s'estomper au cours du temps en raison de phénomènes de résistances aux ITK induits par ces mêmes traitements. Ceci pourrait être une des raisons de la perte de la sensibilisation des PDX dans le temps

Il est donc tout à fait possible qu'au sein d'une population tumorale hétérogène, la sensibilité aux ITK après chimiothérapie varie dans le temps pour un même patient et d'un patient à l'autre selon l'ensemble des modifications génétiques et épigénétiques induite par la chimiothérapie ou par les ITK, et que cette sensibilisation EGFR médiée n'apparaisse qu'à un temps donné et ne soit prépondérante au sein de l'ensemble de la population tumorale que pour un nombre limité de patient expliquant un effet thérapeutique modeste. Tout ceci rend compte de la nécessité d'avoir des marqueurs fiables de cette sensibilisation pour détecter le moment optimal d'introduction de l'ITK et les patients susceptibles d'y répondre.

### **1.2 Marqueurs de sensibilisation à l'erlotinib après cisplatine**

Nos travaux ont mis en évidence une activation ligand indépendante d'EGFR médiée par Src. Cette activation ligand indépendante a surtout été décrite dans les glioblastomes en présence du variant tronqué d'EGFR, EGFR VIII, qui ne fixe aucun ligand. A notre

## Discussion

---

connaissance, cette activation ligand indépendante n'avait jamais été décrite dans les cancers bronchiques. Dans la publication de Chakraborty et al. mettant en évidence l'activation ligand indépendant d'EGFR dans le glioblastome, la survenue de ce mécanisme d'activation est dépendant de la quantité de ligands présents dans le milieu cellulaire ou le sérum des patients ainsi que de la quantité d'EGFR exprimée par les cellules (Chakraborty et al., 2014). En effet l'activation ligand indépendante d'EGFR n'est décrite que pour des lignées ou des tumeurs surexprimant EGFR. Celle-ci va être inhibée par la présence de ligand, in vitro par l'EGF ou par le TGF $\alpha$  présent dans le sérum des patients. La phosphorylation d'EGFR par les ligands aboutit à l'activation de la voie canonique d'EGFR. Ces deux modes d'activation rentrent donc en compétition et dépendent de la concentration en ligand et influencent la réponse au temozolomide ainsi qu'au traitement anti EGFR. Dans le CBNPC, plusieurs études ont évalué le rôle prédictif de réponse aux ITK anti EGFR des taux sériques de TGF $\alpha$  et de l'amphiréguline (Chang et al., 2011; Ishikawa et al., 2005). Ces études bien qu'hétérogènes dans les populations étudiées (patients prétraités ou non, EGFR muté et/ou sauvage) montrent qu'un taux élevé de TGF $\alpha$  ou d'AREG est plutôt prédictif d'une mauvaise réponse au ITK. Ceci pourrait suggérer que l'activation ligand indépendante mise en évidence dans nos cellules est liée à la diminution de la concentration en ligand suite à la diminution du nombre de cellules après traitement cisplatine. Cependant, la sensibilisation est médiée par le milieu conditionné des A549 cis3 résistante au cisplatine avec une augmentation de la concentration des ligands et survient dans les PDX quel que soit la sensibilité au cisplatine. De plus l'appauvrissement du milieu des ligands sécrétés par les lignées H358 et A549 par des anticorps bloquant ne permettait pas de reproduire cette sensibilisation. De même que l'enrichissement du milieu en ligand n'avait pas non plus d'impact sur la sensibilisation. Il s'agit bien d'un mécanisme ligand indépendant, non lié à leur concentration qui n'en font pas des marqueurs de sensibilisation et donc d'efficacité des ITK. Cela a également une implication thérapeutique importante puisque le cetuximab, anticorps anti EGFR, perd son efficacité dans nos lignées après cisplatine alors que celles-ci présentent une sensibilité spontanée au cetuximab. A l'état basal on constate une activation liée aux ligands qui disparaît après cisplatine. Les ITK et les anticorps anti EGFR ne sont pas des traitements interchangeables et leur efficacité va varier selon le mécanisme mis en œuvre pour l'activation d'EGFR. Ces constatations suggèrent une possible utilisation combinée de ces traitements encore une fois au sein d'une population tumorale hétérogène

## Discussion

---

et dont l'activation de la voie d'EGFR peut relever de mécanismes différents. Une synergie d'action des ITK et des anticorps anti EGFR a déjà été démontrée pour des tumeurs EGFR mutées. En effet *in vivo*, il a été montré, sur des xénogreffes de tumeurs EGFR doublement mutées L858R/T790M+ ou T790M+ seule, une régression tumorale dans plus de 90% des cas par double blocage par afatinib et cetuximab alors que l'utilisation de ces traitements en monothérapie ne montrait aucune efficacité. Cette combinaison permet à la fois une dégradation de l'EGFR total liée à l'anticorps et sa déphosphorylation liée à l'ITK expliquant l'effet synergique sur des cellules toujours dépendantes de la voie de l'EGFR et dont le récepteur peut être activé à la fois de manière ligand dépendante et indépendante. D'ailleurs le niveau d'expression des ligands mesuré dans cette étude est bien supérieur pour ces cellules mutées que le tissu normal (Regales et al., 2009). Cette efficacité du double blocage par afatinib et cetuximab a été confirmée sur des patients EGFR muté résistants aux ITK de première génération sur une étude de phase précoce (Horn et al., 2017; Janjigian et al., 2014) et semble également présente avec les ITK de 3<sup>ème</sup> génération (Della Corte et al., 2018). Des études de phase III sont actuellement en cours. Pour les patients EGFR sauvage, les données sont moins nombreuses. Kim et al ont évalué sur 160 patients l'effet de l'association du gefitinib au nimotuzumab, un autre anticorps anti EGFR, par rapport au gefitinib seul pour des patients EGFR sauvage ou muté vierges de tout traitement par ITK mais prétraités par sels de platine (Kim et al., 2017). Il n'a pas été montré de bénéfice à l'association que ce soit pour les patients EGFR sauvage ou muté. Cependant, le type d'ITK et d'Ac ainsi que le type de mutation ont une importance car les mécanismes de fixation de ces différents traitements ne sont pas identiques même au sein d'une même classe et la conformation du récepteur différente selon la ou les mutations présentes. D'ailleurs dans l'étude de Regales et al, la combinaison erlotinib cetuximab n'avait aucun effet contrairement à la combinaison afatinib cetuximab probablement en raison de la présence de la mutation T790M. L'absence de résultats dans cette étude n'exclut pas tout effet combiné des deux types de traitements anti EGFR sur des patients EGFR sauvage mais nécessite encore une fois de bien sélectionner les patients.

Nous avons pu constater que l'expression d'EGFR, bien que nécessaire (pas d'expression d'EGFR dans les H522), n'est pas corrélée à la sensibilité à l'erlotinib et n'est pas un marqueur suffisant de sensibilisation. Ceci corrobore les résultats des analyses de

## Discussion

---

biomarqueurs de plusieurs essais cliniques ayant testé l'erlotinib pour le traitement des CBNPC (INTEREST, BR21, SATURN et TITAN) (Laurie and Goss, 2013). De même la mesure de la phosphorylation globale d'EGFR seule est un marqueur nécessaire mais pas suffisant car ne préjuge pas du mécanisme à l'origine de cette activation ni des voies qu'EGFR va activer par la suite. Wu et al ont mis en évidence une signature de phosphoprotéines, dont EGFR, des cancers bronchiques avec une différence dans les tyrosines phosphorylées d'EGFR selon le type histologique ou le statut mutationnel d'EGFR (Wu et al., 2009). La famille des récepteurs à l'EGF est connue pour ses nombreuses possibilités fonctionnelles selon le type de dimère formé, la nature du ligand fixé ou la protéine à l'origine de son activation. Le site de phosphorylation va ainsi varier selon ces différents paramètres et va permettre à EGFR d'interagir avec différents partenaires aboutissant à des réponses biologiques variées (Schulze et al., 2005). Certaines tyrosines d'EGFR sont ainsi préférentiellement phosphorylées, par exemple la tyrosine 1148 lors de l'activation par EGF, en fonction de la protéine à l'origine de l'activation d'EGFR. La tyrosine 845 est le site d'activation préférentiel de Src. Nos données confirment le rôle de Src dans la sensibilisation et l'augmentation de la phosphorylation de la tyrosine 845 après cisplatine. Nous avons également mis en évidence une augmentation de la phosphorylation de la tyrosine 1068. Ces deux tyrosines ont été décrites comme des marqueurs de réponses aux ITK anti EGFR. Sette G et al et Okabe T et al ont montré que la phosphorylation respectivement des tyrosines 1068 et 845 d'EGFR était préférentiellement présente sur les cellules EGFR muté et signait un état d'activation lié à la présence de la mutation et une forte sensibilité aux ITK (Okabe et al., 2007; Sette et al., 2015). Sette G et al ont mis en évidence que la présence constitutive de la phosphorylation Y1068 de cellules souches issues de CBNPC EGFR sauvage était corrélée également à une très forte sensibilité aux ITK mimant un état proche de cellules EGFR muté. De plus Wang Fen et al ont mis en évidence une meilleure réponse aux ITK anti EGFR parmi des patients EGFR sauvage traités par ITK lorsqu'il existait une forte expression de la tyrosine 1068 en IHC sur la tumeur avant traitement (Wang et al., 2012). Le cisplatine permettrait donc par l'activation ligand indépendante induite par Src d'activer fortement la voie d'EGFR et d'augmenter sa sensibilité à l'erlotinib. La tyrosine 1068 n'est pas une cible classique de Src et nous n'avons déterminé le mécanisme par lequel cette tyrosine était activée. Moro L et al a décrit un complexe macromoléculaire impliquant EGFR, Src et les intégrines, responsable d'une activation plus large d'EGFR sur les tyrosines 1068, 845, 1086 et 1163 et qui est

## Discussion

---

inhibée par le PP1 (Moro et al., 2002). Même si nos travaux ne permettent de déterminer si Src et EGFR pourraient être regroupés dans un complexe protéique plus large après traitement par cisplatine ou si Src active directement EGFR, la présence de ces deux tyrosines pourrait être un marqueur de sensibilisation. Il est néanmoins nécessaire de vérifier le rôle de chacune de ces tyrosines dans la sensibilisation. Des travaux de mutagenèse dirigée sont en cours dans notre laboratoire pour explorer cette question.

A l'instar de la phosphorylation de certaines tyrosines d'EGFR, nos travaux ont mis en évidence un autre marqueur de sensibilisation qu'est l'augmentation de l'expression en PCR d'IFI1, IFI27 et d'IL6 et qui permet de discriminer à un temps précoce de manière robuste les tumeurs sensibilisées par le cisplatine à l'erlotinib dans nos PDX. IL6 est impliquée directement dans ce mécanisme de sensibilisation dans nos lignées cellulaires. A l'inverse, IFI1 et IFI27, gènes cible d'IRF3, ne sont probablement pas directement impliqués dans la sensibilisation mais plutôt le reflet de ce mécanisme spécifique d'activation d'EGFR ligand indépendant. Cependant, il est indispensable pour confirmer leur rôle prédictif de réponse aux ITK de valider ces résultats en clinique, en corrélant leur niveau d'expression à l'efficacité de l'erlotinib chez des patients traités par cisplatine en maintenance et/ou à progression. Il en est de même de la phosphorylation des tyrosines 1068 et 845. Or la sensibilisation est un phénomène dynamique liée aux modifications phénotypiques induites par le cisplatine. La présence de ces marqueurs peut donc varier au cours du temps et nécessite un suivi tout au long des traitements afin de détecter l'apparition de cette sensibilisation et le moment opportun d'introduction des ITK. L'utilisation de marqueurs cellulaires nécessite du tissu tumoral et dans notre situation rend obligatoire des biopsies itératives, difficilement applicable. Les dosages sériques ont l'avantage d'être simples à recueillir de manière répétée. La sécrétion d'IL6 est le seul marqueur sérique corrélé à cette sensibilisation. Inda M et al décrit l'implication de l'IL6 dans l'activation du récepteur à l'EGF sauvage et ses voies d'aval Akt et Erk dans le glioblastome. Ils ont mis en évidence qu'une population de cellules EGFR<sup>viii</sup> minoritaire activait la population de cellules EGFR<sup>w</sup>t majoritaire par la sécrétion d'IL6 qui permettait l'activation d'EGFR via gp130 de manière indépendante des ligands d'EGFR. Cette activation était inhibée par l'erlotinib alors que les anticorps anti EGFR n'avaient aucun effet. Cette coopération entre les deux populations aboutissant à favoriser la prolifération tumorale (Inda et al., 2010). Dans les CBNPC, il a été

## Discussion

---

montré à plusieurs reprises que l'IL6 est un facteur de résistance au cisplatine selon un mécanisme auto, paracrine ou par la présence d'IL6 intracellulaire. Chang et al et Nilsson et al ont confirmé le mauvais pronostic du taux d'IL6 circulant des patients traités par chimiothérapie pour un CBNPC (Chang et al., 2013; Nilsson et al., 2017). Seulement les mécanismes par lesquels l'IL6 va entraîner la résistance au cisplatine sont variables et impliquent de multiples autres voies que celles de l'EGFR. L'IL6 peut ainsi limiter l'apoptose induite par le cisplatine en augmentant le niveau d'expression des protéines anti apoptotique et des protéines de réparation des dommages à l'ADN (Duan et al., 2015). Cette cytokine, impliquée dans la régulation de l'inflammation aigue ou chronique, est impliquée dans la régulation de multiples fonctions cellulaires touchant aussi bien les cellules tumorales que les cellules du micro-environnement. Son dosage sérique seul, sans la présence d'IFI1 et d'IFI27, semble insuffisant pour permettre de discriminer la survenue d'une activation d'EGFR ligand indépendante d'une sécrétion plus globale liée au contexte inflammatoire de la tumeur.

Bien que nous ayons mis en évidence de potentiels marqueurs de sensibilisation qui permettraient de sélectionner les patients répondeurs aux ITK anti EGFR après cisplatine ces marqueurs sont difficilement applicables en pratique clinique. Le développement des biopsies liquides permettra peut-être de les tester chez les patients.

## **2 Rôle de l'EGFR mitochondrial dans la sensibilisation**

Après avoir constaté cette activation d'EGFR ligand indépendante impliquée dans la sensibilisation à l'erlotinib induite par le cisplatine, nous avons exploré les mécanismes par lesquels EGFR aboutit à cette sensibilisation. Nous nous sommes intéressés à l'EGFR mitochondrial puisque la phosphorylation Y845 d'EGFR par Src, augmentée dans les lignées sensibilisées est connue pour permettre l'adressage d'EGFR à la mitochondrie. Nous avons pu mettre en évidence l'apparition d'EGFR à la mitochondrie de la lignée A549 après cisplatine et le phénomène inverse dans la lignée H1975 où le cisplatine entraîne une nette diminution de l'effet de l'erlotinib suggérant l'implication de l'EGFR mitochondrial dans la sensibilisation.

### **2.1 Implication d'EGFR mitochondrial dans le signal IFN de type 1**

L'activation ligand indépendante d'EGFR induite par le cisplatine est corrélée à l'activation de la réponse interféron de type 1 se traduisant par l'augmentation de la phosphorylation d'IRF3 et de TBK1 ainsi que l'augmentation de la transcription de gènes cible d'IRF3, IFIT1 et IFI27. TBK1 et IRF3 sont des acteurs importants de l'activation de la réponse immunitaire innée anti virale et anti bactérienne. TBK1 puis IRF3 sont activés après détection par des récepteurs transmembranaires ou cytosoliques d'acides nucléiques viraux ou de liposaccharides bactériens. Ces récepteurs vont entraîner la phosphorylation de TBK1 qui va à son tour phosphoryler IRF3 permettant la transcription des gènes IFN de type I. Cette réponse IFN de type I, outre l'activation de facteurs antiviraux comme les protéines Mx et la régulation de la réponse immunitaire innée et adaptative par modulation de l'action des lymphocytes B et T, des cellules NK et des macrophages, régule les grandes fonctions cellulaires telles que l'apoptose, l'autophagie et l'angiogenèse (Honda and Taniguchi, 2006; Trinchieri, 2010). La voie IFN de type 1 est également impliquée dans la réponse immunitaire anti-tumorale par les lymphocytes T infiltrant la tumeur en favorisant l'apoptose et en inhibant la prolifération cellulaire (Corrales et al., 2016). Le facteur de transcription IRF3 est présent de manière ubiquitaire dans les cellules et son expression est fréquemment réprimée dans les cancers en raison d'une hyperméthylation de son gène. Ceci a été décrit dans plusieurs types de cancers dont le CBNPC permettant l'initiation et la progression des cancers en favorisant l'échappement des cellules tumorales au système immunitaire. L'activation de la voie IFN de type 1 induite par l'activation ligand indépendante d'EGFR a été décrite dans le glioblastome par Chakraborty et al. Contrairement à ce qu'ils ont rapporté, l'activation initiale de cette voie IFN 1 semble être liée à l'effet du cisplatine de manière indépendante d'EGFR dans notre modèle. L'augmentation de l'expression de certains de ces facteurs de transcription impliqués dans la réponse interféron après cisplatine a déjà été démontrée. Galluzzi et al ont constaté la surexpression, après traitement des cellules A549 par cisplatine, de deux facteurs de transcription activant la réponse IFN, IRF5 et IRF7 (Galluzzi et al., 2012). L'action immunomodulatrice du cisplatine est de mieux en mieux connue et il est maintenant admis que l'effet cytotoxique du cisplatine est lié d'une part à sa fixation sur l'ADN tumoral inhibant sa réplication et conduisant à l'apoptose, mais également lié à la stimulation du système immunitaire. Cette action immunomodulatrice relève de plusieurs mécanismes (de Biasi et al., 2014; Hato et al., 2014) dont l'un est l'activation des

## Discussion

---

protéines de la famille STAT, protéines impliquées dans l'activation du signal IFN de type 1 pour STAT1 et 2, et l'autre l'induction d'un stress du réticulum endoplasmique qui permet l'exposition de certaines molécules des membranes plasmiques et leur reconnaissance par les cellules dendritiques qui vont ensuite activer les lymphocytes cytotoxiques. Le stress du réticulum endoplasmique peut modifier l'expression de protéines mitochondriales comme COXII ou la mitofusine 2 ainsi que la dynamique mitochondriale. Nous avons pu constater une augmentation de la fusion mitochondriale et de l'accroissement des MAM observés à 48 heures de cisplatine probablement induite par ce stress. Ces modifications de la morphologie et de la dynamique mitochondriale peuvent avoir activé la voie INF de type 1 via le système de régulation MAVS situé au niveau de la mitochondrie (Jacobs and Coyne, 2013).

L'EGFR mitochondrial quant à lui, s'il n'est pas impliqué dans l'activation initiale de la voie INF de type 1, permet un maintien du signal dans le temps non lié à sa fonction tyrosine kinase. Nous n'avons pas élucidé le mécanisme par lequel il exerce son action. Nous avons constaté une augmentation des interactions MFN1/MAVS sous cisplatine de façon EGFR dépendante et une augmentation des interactions EGFR/MFN2. MFN1, protéine mitochondriale se complexant avec MFN2 présent sur les MAM (Filadi et al., 2015), a un rôle activateur de MAVS, alors que MFN2 a plutôt un rôle inhibiteur. L'un des rôles d'EGFR mitochondrial pourrait être de piéger MFN2 au sein des MAM et permettre l'interaction MFN1/MAVS. Une autre possibilité est un effet stabilisateur des MAM permettant le maintien dans le temps des modifications de la morphologie mitochondriale induite par le cisplatine prolongeant ainsi le signal. Il a été décrit après activation d'EGFR par EGF une augmentation de la fission mitochondriale par interaction kinase indépendante EGFR/MFN1 limitant sa polymérisation (Che et al., 2015). L'augmentation de la fusion mitochondriale et l'augmentation des interactions EGFR/MFN2 pourraient suggérer un rôle différent lors de l'activation ligand indépendante d'EGFR. Ces hypothèses nécessitent des travaux complémentaires pour être validées notamment d'évaluer dans le temps les modifications de morphologie des mitochondries et les interactions EGFR/MFN1.

Quelles est la fonction biologique du maintien du signal INF de type 1 dans le temps et du maintien des modifications de la morphologie mitochondriale ? Si l'impact du cisplatine sur le système immunitaire favorise plutôt l'induction d'une mort cellulaire immunogénique et si

## Discussion

---

le signal INF de type 1 favorise également l'action immunitaire anti tumorale, cette réponse INF de type 1 peut aussi devenir délétère pour le système immunitaire. Par exemple dans certaines infections bactériennes, la réponse INF de type 1 augmente la sensibilité des lymphocytes aux stimuli pro apoptotiques et régule négativement l'action des cellules NK (Trinchieri, 2010). De même la régulation de la viabilité cellulaire ou de l'angiogenèse par la réponse INF de type 1 pourrait devenir favorable à la cellule tumorale. Celles-ci pourraient ainsi modifier le microenvironnement immunitaire à leur avantage ou limiter l'effet cytotoxique direct de la chimiothérapie ce qui expliquerait l'intérêt du maintien de ce signal dans le temps.

La prolongation du signal interféron de type 1 dans le temps pourrait n'être que le reflet du maintien des modifications morphologiques mitochondriales par EGFR qui pourraient ainsi influencer sur des échanges d'ions, de lipides ou de protéines entre les compartiments subcellulaires (Filadi et al., 2017), la fonction de certaines protéines étant étroitement liée à leurs localisations dans les différents organites comme l'ont montré des travaux antérieurs de l'équipe (Lalier et al., 2007; Mignard et al., 2014) . Cette régulation de la dynamique et de la morphologie mitochondriale a un impact important sur la production d'ATP et de ROS. Ces ROS peuvent avoir un rôle activateur sur Src et pourraient ainsi entretenir la boucle d'activation d'EGFR et sa localisation mitochondriale. D'autre part ces ROS sont connus pour leur rôle dans les phénomènes d'autophagie et d'apoptose. EGFR dans sa fraction mitochondriale en stabilisant les modifications morphologiques mitochondriales induites par le cisplatine pourrait limiter la sensibilité des cellules au cisplatine. Les dommages mitochondriaux induits par le cisplatine peuvent entraîner leur destruction par phénomène de mitophagie. La mitophagie qui correspond à la dégradation des mitochondries par autophagie est impliquée dans la toxicité rénale et neurologique du cisplatine (Ichinomiya et al., 2018) mais serait aussi responsable de la résistance cellulaire aux cisplatine en limitant l'apoptose chimio-induite (Abdrakhmanov et al., 2018; Fan et al., 2015). La mitophagie régule aussi l'autophagie dont l'impact sur la survie ou la mort cellulaire va dépendre du contexte de celle-ci. De manière exploratoire nous avons constaté dans les cellules A549 et les cellules H358 une augmentation de l'autophagie induite par le cisplatine. L'utilisation du 3 methyladenine (3-MA), inhibiteur de la formation des autophagosomes, entraîne une diminution de la sensibilisation de la lignée A549 mais n'a pas cet effet sur les cellules H358

(plutôt l'inverse). La sensibilisation entraîne essentiellement une mort par apoptose dans les lignées H358. En réponse aux traitements que nous avons utilisés, l'autophagie serait donc plutôt un mécanisme de survie dans les cellules H358 et un mécanisme de mort cellulaire pour les cellules A549. Nous avons constaté des différences dans l'expression des protéines de la famille Bcl2, protéines impliquées dans l'apoptose mais également l'autophagie, entre ces deux lignées qui pourraient expliquer un devenir différent de ces cellules après traitement par cisplatine. Cela pourrait s'expliquer aussi par des interactions d'EGFR directes avec les protéines de la famille Bcl2 qui peuvent varier en fonction de la disponibilité de chacune de ces protéines. Les données sur le rôle d'EGFR mitochondrial dans la régulation de l'apoptose et de l'autophagie doivent être approfondies.

### **2.2 Implication d'EGFR mitochondrial dans le métabolisme cellulaire**

L'implication d'EGFR dans la glycolyse aérobie a déjà été bien décrite et procède de différents mécanismes dont l'augmentation de la glycolyse Akt dépendante, la stabilisation de transporteur de glucose ou l'augmentation de l'activité de la pyruvate kinase M2 (Sobhakumari et al., 2016). Cette activité glycolytique est très importante dans les cellules EGFR muté et l'utilisation des ITK inhibe la consommation de glucose ainsi que le taux d'acidification extra cellulaire induite par le glucose (ECAR) (Makinoshima et al., 2015).

La localisation subcellulaire d'EGFR pourrait être déterminante dans la capacité d'EGFR à réguler le métabolisme glucidique. Nous avons constaté une diminution de la capacité respiratoire de réserve des cellules A549 par rapport aux cellules A549 3bC1, dépourvues d'EGFR, après 48h de cisplatine, sans modification du métabolisme de base entre ces deux lignées. Nous avons également mis en évidence une diminution de la consommation basale en oxygène ainsi que de la capacité respiratoire mitochondriale maximale des cellules résistantes au cisplatine A549 cis3 par rapport aux A549. Ceci pourrait traduire une modification des capacités d'adaptation métabolique des cellules exprimant EGFR induite par le cisplatine qui pourrait être liée à l'interaction entre EGFR mitochondrial et COXII. Cette protéine est l'un des partenaires décrit d'EGFR mitochondrial (Boerner et al., 2004). EGFR mitochondrial phosphoryle Cox II inhibant le complexe IV entraînant ainsi la baisse de la production d'ATP et la production de ROS.

## Discussion

---

Ces modifications du métabolisme glucidique, observées dans des conditions de sensibilisation à l'erlotinib (dans des cellules exprimant EGFR sauvage après traitement au cisplatine), pourraient donc être liées à la translocation mitochondriale d'EGFR. Comme vu précédemment nous avons observé dans la lignée H1975, exprimant EGFR muté, la translocation inverse d'EGFR lors du traitement par le cisplatine. Cette perte d'EGFR mitochondrial est corrélée dans cette lignée à une perte de sensibilité à l'erlotinib. Il serait donc intéressant de mesurer la capacité des cellules H1975 à utiliser le glucose, en conditions basales et après traitement par le cisplatine, afin de vérifier si la sensibilité à l'erlotinib est corrélée à la capacité des cellules à utiliser le glucose.

Ces modifications du métabolisme de la glycolyse en fonction de l'activité d'EGFR ont pu être discernées par tomographie par émission de positon (TEP) au fluoro-desoxy-glucose (FDG). La captation de glucose étant plus faible pour les cellules EGFR muté, il a pu être possible de différencier les tumeurs mutées de celles sauvages selon leur valeur de fixation normalisée ou standardized uptake value (SUV) en TEP au FDG (Takamochi et al., 2017). On peut envisager que l'influence du cisplatine sur l'activité d'EGFR se traduise par des modifications de la captation du FDG permettant de discriminer les patients sensibilisés après cisplatine et le moment optimal d'introduction des ITK.

# **CONCLUSION**

## Conclusion

---

Nos travaux ont mis en évidence un mode d'activation d'EGFR ligand indépendant, médié par Src, induit par le cisplatine dans les CBNPC EGFR sauvage, qui augmente la sensibilité à l'erlotinib. Il s'agit d'un des modes d'activation d'EGFR parmi d'autres, également décrit dans le glioblastome, qui rend compte de la capacité d'adaptation des cellules tumorales à la pression thérapeutique et des multiples voies d'échappement possibles. Ceci a un impact thérapeutique puisque les anticorps anti EGFR contrairement aux ITK n'ont pas d'effet sur cette activation d'EGFR. Si les mécanismes à l'origine de cette sensibilisation ne sont pas encore complètement élucidés, L'EGFR mitochondrial semble avoir un rôle central et des travaux complémentaires sont en cours pour mieux le comprendre. Cependant cette sensibilisation mise en évidence in vitro et in vivo ne se traduit pas par un fort impact thérapeutique en pratique clinique ce qui souligne la nécessité de bien connaître les mécanismes à l'origine de la réponse ou de la résistance aux traitements et d'avoir des marqueurs fiables reflétant ces mécanismes pour sélectionner au mieux les patients et déterminer le moment où introduire l'inhibiteur. La présence de la phosphorylation des tyrosines 845 et 1068 ainsi que l'augmentation de l'expression d'IL6, d'IFI27 et de d'IFIT1 pourraient être des biomarqueurs compagnons de cette sensibilisation mais nécessite d'être validés en clinique. La mesure des modifications du métabolisme induites par l'activation d'EGFR est également une piste future facilitée par l'accès à des techniques de détection non invasives comme la TEP FDG.

# **BIBLIOGRAPHIE**

## Bibliographie

---

- Abdrakhmanov, A., Kulikov, A.V., Luchkina, E.A., Zhivotovsky, B., and Gogvadze, V. (2018). Involvement of mitophagy in cisplatin-induced cell death regulation. *Biol. Chem.*
- Ahsan, A., Hiniker, S.M., Ramanand, S.G., Nyati, S., Hegde, A., Helman, A., Menawat, R., Bhojani, M.S., Lawrence, T.S., and Nyati, M.K. (2010). Role of epidermal growth factor receptor degradation in cisplatin-induced cytotoxicity in head and neck cancer. *Cancer Res.* *70*, 2862–2869.
- Almhanna, K., Strosberg, J., and Malafa, M. (2011). Targeting AKT protein kinase in gastric cancer. *Anticancer Res.* *31*, 4387–4392.
- Barlesi, F., Mazieres, J., Merlio, J.-P., Debieuvre, D., Mosser, J., Lena, H., Ouafik, L., Besse, B., Rouquette, I., Westeel, V., et al. (2016). Routine molecular profiling of patients with advanced non-small-cell lung cancer: results of a 1-year nationwide programme of the French Cooperative Thoracic Intergroup (IFCT). *Lancet Lond. Engl.* *387*, 1415–1426.
- Bazzani, L., Donnini, S., Finetti, F., Christofori, G., and Ziche, M. (2017). PGE2/EP3/SRC signaling induces EGFR nuclear translocation and growth through EGFR ligands release in lung adenocarcinoma cells. *Oncotarget* *8*, 31270–31287.
- Benhar, M., Engelberg, D., and Levitzki, A. (2002). Cisplatin-induced activation of the EGF receptor. *Oncogene* *21*, 8723–8731.
- de Biasi, A.R., Villena-Vargas, J., and Adusumilli, P.S. (2014). Cisplatin-induced antitumor immunomodulation: a review of preclinical and clinical evidence. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* *20*, 5384–5391.
- Boerner, J.L., Demory, M.L., Silva, C., and Parsons, S.J. (2004). Phosphorylation of Y845 on the epidermal growth factor receptor mediates binding to the mitochondrial protein cytochrome c oxidase subunit II. *Mol. Cell. Biol.* *24*, 7059–7071.
- Borghaei, H., Paz-Ares, L., Horn, L., Spigel, D.R., Steins, M., Ready, N.E., Chow, L.Q., Vokes, E.E., Felip, E., Holgado, E., et al. (2015). Nivolumab versus Docetaxel in Advanced Nonsquamous Non-Small-Cell Lung Cancer. *N. Engl. J. Med.* *373*, 1627–1639.
- Brahmer, J., Reckamp, K.L., Baas, P., Crinò, L., Eberhardt, W.E.E., Poddubskaya, E., Antonia, S., Pluzanski, A., Vokes, E.E., Holgado, E., et al. (2015). Nivolumab versus Docetaxel in Advanced Squamous-Cell Non-Small-Cell Lung Cancer. *N. Engl. J. Med.* *373*, 123–135.
- Brugger, W., Triller, N., Blasinska-Morawiec, M., Curescu, S., Sakalauskas, R., Manikhas, G.M., Mazieres, J., Whittom, R., Ward, C., Mayne, K., et al. (2011). Prospective molecular marker analyses of EGFR and KRAS from a randomized, placebo-controlled study of erlotinib maintenance therapy in advanced non-small-cell lung cancer. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* *29*, 4113–4120.
- Buettner, R., Mora, L.B., and Jove, R. (2002). Activated STAT signaling in human tumors provides novel molecular targets for therapeutic intervention. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* *8*, 945–954.

## Bibliographie

---

- Cappuzzo, F., Ciuleanu, T., Stelmakh, L., Cicens, S., Szczésna, A., Juhász, E., Esteban, E., Molinier, O., Bruggen, W., Melezínek, I., et al. (2010). Erlotinib as maintenance treatment in advanced non-small-cell lung cancer: a multicentre, randomised, placebo-controlled phase 3 study. *Lancet Oncol.* *11*, 521–529.
- Carpenter, G. (1999). Employment of the epidermal growth factor receptor in growth factor-independent signaling pathways. *J. Cell Biol.* *146*, 697–702.
- Casalini, P., Iorio, M.V., Galmozzi, E., and Ménard, S. (2004). Role of HER receptors family in development and differentiation. *J. Cell. Physiol.* *200*, 343–350.
- Castanier, C., Garcin, D., Vazquez, A., and Arnoult, D. (2010). Mitochondrial dynamics regulate the RIG-I-like receptor antiviral pathway. *EMBO Rep.* *11*, 133–138.
- Chakraborty, S., Li, L., Puliyappadamba, V.T., Guo, G., Hatanpaa, K.J., Mickey, B., Souza, R.F., Vo, P., Herz, J., Chen, M.-R., et al. (2014). Constitutive and ligand-induced EGFR signalling triggers distinct and mutually exclusive downstream signalling networks. *Nat. Commun.* *5*, 5811.
- Chang, C.H., Hsiao, C.F., Yeh, Y.M., Chang, G.C., Tsai, Y.H., Chen, Y.M., Huang, M.S., Chen, H.L., Li, Y.J., Yang, P.C., et al. (2013). Circulating interleukin-6 level is a prognostic marker for survival in advanced nonsmall cell lung cancer patients treated with chemotherapy. *Int. J. Cancer* *132*, 1977–1985.
- Chang, M.H., Ahn, H.K., Lee, J., Jung, C.-K., Choi, Y.-L., Park, Y.H., Ahn, J.S., Park, K., and Ahn, M.-J. (2011). Clinical impact of amphiregulin expression in patients with epidermal growth factor receptor (EGFR) wild-type nonsmall cell lung cancer treated with EGFR-tyrosine kinase inhibitors. *Cancer* *117*, 143–151.
- Che, T.-F., Lin, C.-W., Wu, Y.-Y., Chen, Y.-J., Han, C.-L., Chang, Y., Wu, C.-T., Hsiao, T.-H., Hong, T.-M., and Yang, P.-C. (2015). Mitochondrial translocation of EGFR regulates mitochondria dynamics and promotes metastasis in NSCLC. *Oncotarget* *6*, 37349–37366.
- Chevrollier, A., Loiseau, D., and Stepien, G. (2005). [What is the specific role of ANT2 in cancer cells?]. *Med. Sci. MS* *21*, 156–161.
- Chou, T.-C. (2006). Theoretical basis, experimental design, and computerized simulation of synergism and antagonism in drug combination studies. *Pharmacol. Rev.* *58*, 621–681.
- Chung, I., Akita, R., Vandlen, R., Toomre, D., Schlessinger, J., and Mellman, I. (2010). Spatial control of EGF receptor activation by reversible dimerization on living cells. *Nature* *464*, 783–787.
- Cicenas, S., Geater, S.L., Petrov, P., Hotko, Y., Hooper, G., Xia, F., Mudie, N., and Wu, Y.-L. (2016). Maintenance erlotinib versus erlotinib at disease progression in patients with advanced non-small-cell lung cancer who have not progressed following platinum-based chemotherapy (IUNO study). *Lung Cancer Amst. Neth.* *102*, 30–37.
- Citri, A., and Yarden, Y. (2006). EGF-ERBB signalling: towards the systems level. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *7*, 505–516.

## Bibliographie

---

- Ciuleanu, T., Stelmakh, L., Cicenias, S., Miliauskas, S., Grigorescu, A.C., Hillenbach, C., Johannsdottir, H.K., Klughammer, B., and Gonzalez, E.E. (2012). Efficacy and safety of erlotinib versus chemotherapy in second-line treatment of patients with advanced, non-small-cell lung cancer with poor prognosis (TITAN): a randomised multicentre, open-label, phase 3 study. *Lancet Oncol.* *13*, 300–308.
- Corrales, L., McWhirter, S.M., Dubensky, T.W., and Gajewski, T.F. (2016). The host STING pathway at the interface of cancer and immunity. *J. Clin. Invest.* *126*, 2404–2411.
- Cortés-Sempere, M., de Miguel, M.P., Pernía, O., Rodriguez, C., de Castro Carpeño, J., Nistal, M., Conde, E., López-Ríos, F., Belda-Iniesta, C., Perona, R., et al. (2013). IGFBP-3 methylation-derived deficiency mediates the resistance to cisplatin through the activation of the IGFIR/Akt pathway in non-small cell lung cancer. *Oncogene* *32*, 1274–1283.
- Dahabreh, I.J., Linardou, H., Kosmidis, P., Bafaloukos, D., and Murray, S. (2011). EGFR gene copy number as a predictive biomarker for patients receiving tyrosine kinase inhibitor treatment: a systematic review and meta-analysis in non-small-cell lung cancer. *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol.* *22*, 545–552.
- Davaadelger, B., Duan, L., Perez, R.E., Gitelis, S., and Maki, C.G. (2016). Crosstalk between the IGF-1R/AKT/mTORC1 pathway and the tumor suppressors p53 and p27 determines cisplatin sensitivity and limits the effectiveness of an IGF-1R pathway inhibitor. *Oncotarget* *7*, 27511–27526.
- Delbaldo, C., Michiels, S., Syz, N., Soria, J.-C., Le Chevalier, T., and Pignon, J.-P. (2004). Benefits of adding a drug to a single-agent or a 2-agent chemotherapy regimen in advanced non-small-cell lung cancer: a meta-analysis. *JAMA* *292*, 470–484.
- Della Corte, C.M., Ciaramella, V., Cardone, C., La Monica, S., Alfieri, R., Petronini, P.G., Malapelle, U., Vigliar, E., Pepe, F., Troncone, G., et al. (2018). Antitumor efficacy of dual blockade of EGFR signaling by osimertinib in combination with selumetinib or cetuximab in activated EGFR human NSCLC tumor models. *J. Thorac. Oncol. Off. Publ. Int. Assoc. Study Lung Cancer.*
- Demory, M.L., Boerner, J.L., Davidson, R., Faust, W., Miyake, T., Lee, I., Hüttemann, M., Douglas, R., Haddad, G., and Parsons, S.J. (2009). Epidermal growth factor receptor translocation to the mitochondria: regulation and effect. *J. Biol. Chem.* *284*, 36592–36604.
- Dittmann, K., Mayer, C., Fehrenbacher, B., Schaller, M., Raju, U., Milas, L., Chen, D.J., Kehlbach, R., and Rodemann, H.P. (2005). Radiation-induced epidermal growth factor receptor nuclear import is linked to activation of DNA-dependent protein kinase. *J. Biol. Chem.* *280*, 31182–31189.
- Douillard, J.-Y., Shepherd, F.A., Hirsh, V., Mok, T., Socinski, M.A., Gervais, R., Liao, M.-L., Bischoff, H., Reck, M., Sellers, M.V., et al. (2010). Molecular predictors of outcome with gefitinib and docetaxel in previously treated non-small-cell lung cancer: data from the randomized phase III INTEREST trial. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* *28*, 744–752.
- Duan, S., Tsai, Y., Keng, P., Chen, Y., Lee, S.O., and Chen, Y. (2015). IL-6 signaling contributes to cisplatin resistance in non-small cell lung cancer via the up-regulation of anti-apoptotic and DNA repair associated molecules. *Oncotarget* *6*, 27651–27660.

## Bibliographie

---

- 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. *Biochim. Biophys. Acta* *1804*, 559–566.
- Endres, N.F., Das, R., Smith, A.W., Arkhipov, A., Kovacs, E., Huang, Y., Pelton, J.G., Shan, Y., Shaw, D.E., Wemmer, D.E., et al. (2013). Conformational coupling across the plasma membrane in activation of the EGF receptor. *Cell* *152*, 543–556.
- Engelman, J.A., Zejnullahu, K., Mitsudomi, T., Song, Y., Hyland, C., Park, J.O., Lindeman, N., Gale, C.-M., Zhao, X., Christensen, J., et al. (2007). MET amplification leads to gefitinib resistance in lung cancer by activating ERBB3 signaling. *Science* *316*, 1039–1043.
- Fan, Z., Yu, H., Cui, N., Kong, X., Liu, X., Chang, Y., Wu, Y., Sun, L., and Wang, G. (2015). ABT737 enhances cholangiocarcinoma sensitivity to cisplatin through regulation of mitochondrial dynamics. *Exp. Cell Res.* *335*, 68–81.
- Filadi, R., Greotti, E., Turacchio, G., Luini, A., Pozzan, T., and Pizzo, P. (2015). Mitofusin 2 ablation increases endoplasmic reticulum-mitochondria coupling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *112*, E2174-2181.
- Filadi, R., Theurey, P., and Pizzo, P. (2017). The endoplasmic reticulum-mitochondria coupling in health and disease: Molecules, functions and significance. *Cell Calcium* *62*, 1–15.
- Fukuoka, M., Wu, Y.-L., Thongprasert, S., Sunpaweravong, P., Leong, S.-S., Sriuranpong, V., Chao, T.-Y., Nakagawa, K., Chu, D.-T., Saijo, N., et al. (2011). Biomarker analyses and final overall survival results from a phase III, randomized, open-label, first-line study of gefitinib versus carboplatin/paclitaxel in clinically selected patients with advanced non-small-cell lung cancer in Asia (IPASS). *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* *29*, 2866–2874.
- Galluzzi, L., Vitale, I., Senovilla, L., Eisenberg, T., Carmona-Gutierrez, D., Vacchelli, E., Robert, T., Ripoche, H., Jägemann, N., Paccard, C., et al. (2012). Independent transcriptional reprogramming and apoptosis induction by cisplatin. *Cell Cycle Georget. Tex* *11*, 3472–3480.
- Garassino, M.C., Martelli, O., Broggin, M., Farina, G., Veronese, S., Rulli, E., Bianchi, F., Bettini, A., Longo, F., Moscetti, L., et al. (2013). Erlotinib versus docetaxel as second-line treatment of patients with advanced non-small-cell lung cancer and wild-type EGFR tumours (TAILOR): a randomised controlled trial. *Lancet Oncol.* *14*, 981–988.
- Gatzemeier, U., Pluzanska, A., Szczesna, A., Kaukel, E., Roubec, J., De Rosa, F., Milanowski, J., Karnicka-Mlodkowski, H., Pesek, M., Serwatowski, P., et al. (2007). Phase III study of erlotinib in combination with cisplatin and gemcitabine in advanced non-small-cell lung cancer: the Tarceva Lung Cancer Investigation Trial. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* *25*, 1545–1552.
- Goss, G.D., and Spaans, J.N. (2016). Epidermal Growth Factor Receptor Inhibition in the Management of Squamous Cell Carcinoma of the Lung. *The Oncologist* *21*, 205–213.
- Gridelli, C., Ciardiello, F., Gallo, C., Feld, R., Butts, C., Gebbia, V., Maione, P., Morgillo, F., Genestreti, G., Favaretto, A., et al. (2012). First-line erlotinib followed by second-line cisplatin-gemcitabine chemotherapy in advanced non-small-cell lung cancer: the TORCH randomized trial. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* *30*, 3002–3011.

## Bibliographie

---

- Gschwind, A., Zwick, E., Prenzel, N., Leserer, M., and Ullrich, A. (2001). Cell communication networks: epidermal growth factor receptor transactivation as the paradigm for interreceptor signal transmission. *Oncogene* 20, 1594–1600.
- Han, W., and Lo, H.-W. (2012). Landscape of EGFR signaling network in human cancers: biology and therapeutic response in relation to receptor subcellular locations. *Cancer Lett.* 318, 124–134.
- Harris, R.C., Chung, E., and Coffey, R.J. (2003). EGF receptor ligands. *Exp. Cell Res.* 284, 2–13.
- Hato, S.V., Khong, A., de Vries, I.J.M., and Lesterhuis, W.J. (2014). Molecular pathways: the immunogenic effects of platinum-based chemotherapeutics. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 20, 2831–2837.
- Herbst, R.S. (2004). Review of epidermal growth factor receptor biology. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 59, 21–26.
- Herbst, R.S., Prager, D., Hermann, R., Fehrenbacher, L., Johnson, B.E., Sandler, A., Kris, M.G., Tran, H.T., Klein, P., Li, X., et al. (2005). TRIBUTE: a phase III trial of erlotinib hydrochloride (OSI-774) combined with carboplatin and paclitaxel chemotherapy in advanced non-small-cell lung cancer. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 23, 5892–5899.
- Herbst, R.S., Baas, P., Kim, D.-W., Felip, E., Pérez-Gracia, J.L., Han, J.-Y., Molina, J., Kim, J.-H., Arvis, C.D., Ahn, M.-J., et al. (2016). Pembrolizumab versus docetaxel for previously treated, PD-L1-positive, advanced non-small-cell lung cancer (KEYNOTE-010): a randomised controlled trial. *Lancet Lond. Engl.* 387, 1540–1550.
- Hirsch, F.R., Scagliotti, G.V., Langer, C.J., Varella-Garcia, M., and Franklin, W.A. (2003). Epidermal growth factor family of receptors in preneoplasia and lung cancer: perspectives for targeted therapies. *Lung Cancer Amst. Neth.* 41 Suppl 1, S29-42.
- Honda, K., and Taniguchi, T. (2006). IRFs: master regulators of signalling by Toll-like receptors and cytosolic pattern-recognition receptors. *Nat. Rev. Immunol.* 6, 644–658.
- Horn, L., Gettinger, S., Camidge, D.R., Smit, E.F., Janjigian, Y.Y., Miller, V.A., Pao, W., Freiwald, M., Fan, J., Wang, B., et al. (2017). Continued use of afatinib with the addition of cetuximab after progression on afatinib in patients with EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer and acquired resistance to gefitinib or erlotinib. *Lung Cancer Amst. Neth.* 113, 51–58.
- Ichinomiya, M., Shimada, A., Ohta, N., Inouchi, E., Ogihara, K., Naya, Y., Nagane, M., Morita, T., and Satoh, M. (2018). Demonstration of Mitochondrial Damage and Mitophagy in Cisplatin-Mediated Nephrotoxicity. *Tohoku J. Exp. Med.* 246, 1–8.
- Inda, M.-M., Bonavia, R., Mukasa, A., Narita, Y., Sah, D.W.Y., Vandenberg, S., Brennan, C., Johns, T.G., Bachoo, R., Hadwiger, P., et al. (2010). Tumor heterogeneity is an active process maintained by a mutant EGFR-induced cytokine circuit in glioblastoma. *Genes Dev.* 24, 1731–1745.
- Ishikawa, N., Daigo, Y., Takano, A., Taniwaki, M., Kato, T., Hayama, S., Murakami, H., Takeshima, Y., Inai, K., Nishimura, H., et al. (2005). Increases of amphiregulin and transforming growth factor-alpha

## Bibliographie

---

in serum as predictors of poor response to gefitinib among patients with advanced non-small cell lung cancers. *Cancer Res.* 65, 9176–9184.

Jacobs, J.L., and Coyne, C.B. (2013). Mechanisms of MAVS regulation at the mitochondrial membrane. *J. Mol. Biol.* 425, 5009–5019.

Janjigian, Y.Y., Smit, E.F., Groen, H.J.M., Horn, L., Gettinger, S., Camidge, D.R., Riely, G.J., Wang, B., Fu, Y., Chand, V.K., et al. (2014). Dual inhibition of EGFR with afatinib and cetuximab in kinase inhibitor-resistant EGFR-mutant lung cancer with and without T790M mutations. *Cancer Discov.* 4, 1036–1045.

Karampeazis, A., Voutsina, A., Souglakos, J., Kentepozidis, N., Giassas, S., Christofillakis, C., Kotsakis, A., Papakotoulas, P., Rapti, A., Agelidou, M., et al. (2013). Pemetrexed versus erlotinib in pretreated patients with advanced non-small cell lung cancer: a Hellenic Oncology Research Group (HORG) randomized phase 3 study. *Cancer* 119, 2754–2764.

Kelland, L. (2007). The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy. *Nat. Rev. Cancer* 7, 573–584.

Kim, H.R., Jang, J.S., Sun, J.-M., Ahn, M.-J., Kim, D.-W., Jung, I., Lee, K.H., Kim, J.-H., Lee, D.H., Kim, S.-W., et al. (2017). A randomized, phase II study of gefitinib alone versus nimotuzumab plus gefitinib after platinum-based chemotherapy in advanced non-small cell lung cancer (KCSG LU12-01). *Oncotarget* 8, 15943–15951.

Kim, K.K., Han, A., Yano, N., Ribeiro, J.R., Lokich, E., Singh, R.K., and Moore, R.G. (2015). Tetrathiomolybdate mediates cisplatin-induced p38 signaling and EGFR degradation and enhances response to cisplatin therapy in gynecologic cancers. *Sci. Rep.* 5, 15911.

Kobayashi, S., Ji, H., Yuza, Y., Meyerson, M., Wong, K.-K., Tenen, D.G., and Halmos, B. (2005). An alternative inhibitor overcomes resistance caused by a mutation of the epidermal growth factor receptor. *Cancer Res.* 65, 7096–7101.

Lalier, L., Cartron, P.-F., Juin, P., Nedelkina, S., Manon, S., Bechinger, B., and Vallette, F.M. (2007). Bax activation and mitochondrial insertion during apoptosis. *Apoptosis Int. J. Program. Cell Death* 12, 887–896.

Laurie, S.A., and Goss, G.D. (2013). Role of epidermal growth factor receptor inhibitors in epidermal growth factor receptor wild-type non-small-cell lung cancer. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 31, 1061–1069.

LeCaer, H., Barlesi, F., Corre, R., Jullian, H., Bota, S., Falchero, L., Vergnenegre, A., Dujon, C., Delhoume, J.Y., Chouaid, C., et al. (2011). A multicentre phase II randomised trial of weekly docetaxel/gemcitabine followed by erlotinib on progression, vs the reverse sequence, in elderly patients with advanced non small-cell lung cancer selected with a comprehensive geriatric assessment (the GFPC 0504 study). *Br. J. Cancer* 105, 1123–1130.

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

## Bibliographie

---

- Li, H., You, L., Xie, J., Pan, H., and Han, W. (2017). The roles of subcellularly located EGFR in autophagy. *Cell. Signal.* *35*, 223–230.
- Liccardi, G., Hartley, J.A., and Hochhauser, D. (2011). EGFR nuclear translocation modulates DNA repair following cisplatin and ionizing radiation treatment. *Cancer Res.* *71*, 1103–1114.
- Liebmann, C. (2001). Regulation of MAP kinase activity by peptide receptor signalling pathway: paradigms of multiplicity. *Cell. Signal.* *13*, 777–785.
- Lo, H.-W. (2010). Nuclear mode of the EGFR signaling network: biology, prognostic value, and therapeutic implications. *Discov. Med.* *10*, 44–51.
- Lo, H.-W., Cao, X., Zhu, H., and Ali-Osman, F. (2010). Cyclooxygenase-2 is a novel transcriptional target of the nuclear EGFR-STAT3 and EGFRvIII-STAT3 signaling axes. *Mol. Cancer Res. MCR* *8*, 232–245.
- Lynch, T.J., Bell, D.W., Sordella, R., Gurubhagavatula, S., Okimoto, R.A., Brannigan, B.W., Harris, P.L., Haserlat, S.M., Supko, J.G., Haluska, F.G., et al. (2004). Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *N. Engl. J. Med.* *350*, 2129–2139.
- Lynch, T.J., Patel, T., Dreisbach, L., McCleod, M., Heim, W.J., Hermann, R.C., Paschold, E., Iannotti, N.O., Dakhil, S., Gorton, S., et al. (2010). Cetuximab and first-line taxane/carboplatin chemotherapy in advanced non-small-cell lung cancer: results of the randomized multicenter phase III trial BMS099. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* *28*, 911–917.
- Maemondo, M., Inoue, A., Kobayashi, K., Sugawara, S., Oizumi, S., Isobe, H., Gemma, A., Harada, M., Yoshizawa, H., Kinoshita, I., et al. (2010). Gefitinib or chemotherapy for non-small-cell lung cancer with mutated EGFR. *N. Engl. J. Med.* *362*, 2380–2388.
- Makinoshima, H., Takita, M., Saruwatari, K., Umemura, S., Obata, Y., Ishii, G., Matsumoto, S., Sugiyama, E., Ochiai, A., Abe, R., et al. (2015). Signaling through the Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K)/Mammalian Target of Rapamycin (mTOR) Axis Is Responsible for Aerobic Glycolysis mediated by Glucose Transporter in Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR)-mutated Lung Adenocarcinoma. *J. Biol. Chem.* *290*, 17495–17504.
- Mignard, V., Lalier, L., Paris, F., and Vallette, F.M. (2014). Bioactive lipids and the control of Bax pro-apoptotic activity. *Cell Death Dis.* *5*, e1266.
- Mok, T.S., Wu, Y.-L., Thongprasert, S., Yang, C.-H., Chu, D.-T., Saijo, N., Sunpaweravong, P., Han, B., Margono, B., Ichinose, Y., et al. (2009). Gefitinib or carboplatin-paclitaxel in pulmonary adenocarcinoma. *N. Engl. J. Med.* *361*, 947–957.
- Mok, T.S., Wu, Y.-L., Ahn, M.-J., Garassino, M.C., Kim, H.R., Ramalingam, S.S., Shepherd, F.A., He, Y., Akamatsu, H., Theelen, W.S.M.E., et al. (2017). Osimertinib or Platinum-Pemetrexed in EGFR T790M-Positive Lung Cancer. *N. Engl. J. Med.* *376*, 629–640.
- Moro, L., Dolce, L., Cabodi, S., Bergatto, E., Boeri Erba, E., Smeriglio, M., Turco, E., Retta, S.F., Giuffrida, M.G., Venturino, M., et al. (2002). Integrin-induced epidermal growth factor (EGF) receptor

## Bibliographie

---

activation requires c-Src and p130Cas and leads to phosphorylation of specific EGF receptor tyrosines. *J. Biol. Chem.* **277**, 9405–9414.

Mukohara, T., Engelman, J.A., Hanna, N.H., Yeap, B.Y., Kobayashi, S., Lindeman, N., Halmos, B., Pearlberg, J., Tsuchihashi, Z., Cantley, L.C., et al. (2005). Differential effects of gefitinib and cetuximab on non-small-cell lung cancers bearing epidermal growth factor receptor mutations. *J. Natl. Cancer Inst.* **97**, 1185–1194.

Nagy, P., Claus, J., Jovin, T.M., and Arndt-Jovin, D.J. (2010). Distribution of resting and ligand-bound ErbB1 and ErbB2 receptor tyrosine kinases in living cells using number and brightness analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 16524–16529.

Nguyen, K.-S.H., Kobayashi, S., and Costa, D.B. (2009). Acquired resistance to epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors in non-small-cell lung cancers dependent on the epidermal growth factor receptor pathway. *Clin. Lung Cancer* **10**, 281–289.

Nilsson, M.B., Sun, H., Diao, L., Tong, P., Liu, D., Li, L., Fan, Y., Poteete, A., Lim, S.-O., Howells, K., et al. (2017). Stress hormones promote EGFR inhibitor resistance in NSCLC: Implications for combinations with  $\beta$ -blockers. *Sci. Transl. Med.* **9**.

Normanno, N., De Luca, A., Bianco, C., Strizzi, L., Mancino, M., Maiello, M.R., Carotenuto, A., De Feo, G., Caponigro, F., and Salomon, D.S. (2006). Epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling in cancer. *Gene* **366**, 2–16.

Ogiso, H., Ishitani, R., Nureki, O., Fukai, S., Yamanaka, M., Kim, J.-H., Saito, K., Sakamoto, A., Inoue, M., Shirouzu, M., et al. (2002). Crystal structure of the complex of human epidermal growth factor and receptor extracellular domains. *Cell* **110**, 775–787.

Ohta, T., Ohmichi, M., Shibuya, T., Takahashi, T., Tsutsumi, S., Takahashi, K., and Kurachi, H. (2012). Gefitinib (ZD1839) increases the efficacy of cisplatin in ovarian cancer cells. *Cancer Biol. Ther.* **13**, 408–416.

Okabe, T., Okamoto, I., Tamura, K., Terashima, M., Yoshida, T., Satoh, T., Takada, M., Fukuoka, M., and Nakagawa, K. (2007). Differential constitutive activation of the epidermal growth factor receptor in non-small cell lung cancer cells bearing EGFR gene mutation and amplification. *Cancer Res.* **67**, 2046–2053.

Olayioye, M.A., Neve, R.M., Lane, H.A., and Hynes, N.E. (2000). The ErbB signaling network: receptor heterodimerization in development and cancer. *EMBO J.* **19**, 3159–3167.

Pardoll, D.M. (2012). The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat. Rev. Cancer* **12**, 252–264.

Parsons, S.J., and Parsons, J.T. (2004). Src family kinases, key regulators of signal transduction. *Oncogene* **23**, 7906–7909.

Paz-Ares, L., Mezger, J., Ciuleanu, T.E., Fischer, J.R., von Pawel, J., Provencio, M., Kazarnowicz, A., Losonczy, G., de Castro, G., Szczesna, A., et al. (2015). Necitumumab plus pemetrexed and cisplatin as

## Bibliographie

---

first-line therapy in patients with stage IV non-squamous non-small-cell lung cancer (INSPIRE): an open-label, randomised, controlled phase 3 study. *Lancet Oncol.* *16*, 328–337.

Pérol, M., Chouaid, C., Pérol, D., Barlési, F., Gervais, R., Westeel, V., Crequit, J., Léna, H., Vergnenègre, A., Zalcman, G., et al. (2012). Randomized, phase III study of gemcitabine or erlotinib maintenance therapy versus observation, with predefined second-line treatment, after cisplatin-gemcitabine induction chemotherapy in advanced non-small-cell lung cancer. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* *30*, 3516–3524.

Persons, D.L., Yazlovitskaya, E.M., Cui, W., and Pelling, J.C. (1999). Cisplatin-induced activation of mitogen-activated protein kinases in ovarian carcinoma cells: inhibition of extracellular signal-regulated kinase activity increases sensitivity to cisplatin. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* *5*, 1007–1014.

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

Pirker, R., Pereira, J.R., Szczesna, A., von Pawel, J., Krzakowski, M., Ramlau, R., Vynnychenko, I., Park, K., Yu, C.-T., Ganul, V., et al. (2009). Cetuximab plus chemotherapy in patients with advanced non-small-cell lung cancer (FLEX): an open-label randomised phase III trial. *Lancet Lond. Engl.* *373*, 1525–1531.

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

Pujol, J.-L., Pirker, R., Lynch, T.J., Butts, C.A., Rosell, R., Shepherd, F.A., Vansteenkiste, J., O’Byrne, K.J., de Blas, B., Heighway, J., et al. (2014). Meta-analysis of individual patient data from randomized trials of chemotherapy plus cetuximab as first-line treatment for advanced non-small cell lung cancer. *Lung Cancer Amst. Neth.* *83*, 211–218.

Reck, M., von Pawel, J., Zatloukal, P., Ramlau, R., Gorbounova, V., Hirsh, V., Leighl, N., Mezger, J., Archer, V., Moore, N., et al. (2009). Phase III trial of cisplatin plus gemcitabine with either placebo or bevacizumab as first-line therapy for nonsquamous non-small-cell lung cancer: AVAIL. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* *27*, 1227–1234.

Reck, M., Rodríguez-Abreu, D., Robinson, A.G., Hui, R., Csőszi, T., Fülöp, A., Gottfried, M., Peled, N., Tafreshi, A., Cuffe, S., et al. (2016). Pembrolizumab versus Chemotherapy for PD-L1-Positive Non-Small-Cell Lung Cancer. *N. Engl. J. Med.* *375*, 1823–1833.

Regales, L., Gong, Y., Shen, R., de Stanchina, E., Vivanco, I., Goel, A., Koutcher, J.A., Spassova, M., Ouerfelli, O., Mellinshoff, I.K., et al. (2009). Dual targeting of EGFR can overcome a major drug resistance mutation in mouse models of EGFR mutant lung cancer. *J. Clin. Invest.* *119*, 3000–3010.

Rho, J.K., Choi, Y.J., Choi, Y.R., Kim, S.Y., Choi, S.J., Choi, C.-M., Na, I.I., and Lee, J.C. (2011). The effect of acquired cisplatin resistance on sensitivity to EGFR tyrosine kinase inhibitors in EGFR mutant lung cancer cells. *Oncol. Res.* *19*, 471–478.

## Bibliographie

---

- Roepstorff, K., Grandal, M.V., Henriksen, L., Knudsen, S.L.J., Lerdrup, M., Grøvdal, L., Willumsen, B.M., and van Deurs, B. (2009). Differential effects of EGFR ligands on endocytic sorting of the receptor. *Traffic Cph. Den.* *10*, 1115–1127.
- Rosell, R., Carcereny, E., Gervais, R., Vergnenegre, A., Massuti, B., Felip, E., Palmero, R., Garcia-Gomez, R., Pallares, C., Sanchez, J.M., et al. (2012). Erlotinib versus standard chemotherapy as first-line treatment for European patients with advanced EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer (EURTAC): a multicentre, open-label, randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol.* *13*, 239–246.
- Roskoski, R. (2005). Src kinase regulation by phosphorylation and dephosphorylation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *331*, 1–14.
- Rotin, D., Honegger, A.M., Margolis, B.L., Ullrich, A., and Schlessinger, J. (1992). Presence of SH2 domains of phospholipase C gamma 1 enhances substrate phosphorylation by increasing the affinity toward the epidermal growth factor receptor. *J. Biol. Chem.* *267*, 9678–9683.
- Sandler, A., Gray, R., Perry, M.C., Brahmer, J., Schiller, J.H., Dowlati, A., Lilenbaum, R., and Johnson, D.H. (2006). Paclitaxel-carboplatin alone or with bevacizumab for non-small-cell lung cancer. *N. Engl. J. Med.* *355*, 2542–2550.
- Scagliotti, G.V., De Marinis, F., Rinaldi, M., Crinò, L., Gridelli, C., Ricci, S., Matano, E., Boni, C., Marangolo, M., Failla, G., et al. (2002). Phase III randomized trial comparing three platinum-based doublets in advanced non-small-cell lung cancer. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* *20*, 4285–4291.
- Scagliotti, G.V., Parikh, P., von Pawel, J., Biesma, B., Vansteenkiste, J., Manegold, C., Serwatowski, P., Gatzemeier, U., Digumarti, R., Zukin, M., et al. (2008). Phase III study comparing cisplatin plus gemcitabine with cisplatin plus pemetrexed in chemotherapy-naive patients with advanced-stage non-small-cell lung cancer. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* *26*, 3543–3551.
- Schlessinger, J. (2000). Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell* *103*, 211–225.
- Schlessinger, J. (2002). Ligand-induced, receptor-mediated dimerization and activation of EGF receptor. *Cell* *110*, 669–672.
- Schulze, W.X., Deng, L., and Mann, M. (2005). Phosphotyrosine interactome of the ErbB-receptor kinase family. *Mol. Syst. Biol.* *1*, 2005.0008.
- Sette, G., Salvati, V., Mottolese, M., Visca, P., Gallo, E., Fecchi, K., Pilozi, E., Duranti, E., Policicchio, E., Tartaglia, M., et al. (2015). Tyr1068-phosphorylated epidermal growth factor receptor (EGFR) predicts cancer stem cell targeting by erlotinib in preclinical models of wild-type EGFR lung cancer. *Cell Death Dis.* *6*, e1850.
- Sharma, S.V., Bell, D.W., Settleman, J., and Haber, D.A. (2007). Epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer. *Nat. Rev. Cancer* *7*, 169–181.
- Sharma, S.V., Lee, D.Y., Li, B., Quinlan, M.P., Takahashi, F., Maheswaran, S., McDermott, U., Azizian, N., Zou, L., Fischbach, M.A., et al. (2010). A chromatin-mediated reversible drug-tolerant state in cancer cell subpopulations. *Cell* *141*, 69–80.

## Bibliographie

---

- Sheng, J., Yang, Y.-P., Zhao, Y.-Y., Qin, T., Hu, Z.-H., Zhou, T., Zhang, Y.-X., Hong, S.-D., Ma, Y.-X., Zhao, H.-Y., et al. (2015). The Efficacy of Combining EGFR Monoclonal Antibody With Chemotherapy for Patients With Advanced Nonsmall Cell Lung Cancer: A Meta-Analysis From 9 Randomized Controlled Trials. *Medicine (Baltimore)* *94*, e1400.
- Shepherd, F.A., Rodrigues Pereira, J., Ciuleanu, T., Tan, E.H., Hirsh, V., Thongprasert, S., Campos, D., Maoleekoonpiroj, S., Smylie, M., Martins, R., et al. (2005). Erlotinib in previously treated non-small-cell lung cancer. *N. Engl. J. Med.* *353*, 123–132.
- Siddik, Z.H. (2003). Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance. *Oncogene* *22*, 7265–7279.
- Smith, M.A., Hall, R., Fisher, K., Haake, S.M., Khalil, F., Schabath, M.B., Vuaroqueaux, V., Fiebig, H.-H., Altioik, S., Chen, Y.A., et al. (2015). Annotation of human cancers with EGFR signaling-associated protein complexes using proximity ligation assays. *Sci. Signal.* *8*, ra4.
- Sobhakumari, A., Orcutt, K.P., Love-Homan, L., Kowalski, C.E., Parsons, A.D., Knudson, C.M., and Simons, A.L. (2016). 2-Deoxy-d-glucose Suppresses the In Vivo Antitumor Efficacy of Erlotinib in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Cells. *Oncol. Res.* *24*, 55–64.
- Soda, M., Choi, Y.L., Enomoto, M., Takada, S., Yamashita, Y., Ishikawa, S., Fujiwara, S., Watanabe, H., Kurashina, K., Hatanaka, H., et al. (2007). Identification of the transforming EML4-ALK fusion gene in non-small-cell lung cancer. *Nature* *448*, 561–566.
- Sordella, R., Bell, D.W., Haber, D.A., and Settleman, J. (2004). Gefitinib-sensitizing EGFR mutations in lung cancer activate anti-apoptotic pathways. *Science* *305*, 1163–1167.
- Soria, J.-C., Ohe, Y., Vansteenkiste, J., Reungwetwattana, T., Chewaskulyong, B., Lee, K.H., Dechaphunkul, A., Imamura, F., Nogami, N., Kurata, T., et al. (2018). Osimertinib in Untreated EGFR-Mutated Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer. *N. Engl. J. Med.* *378*, 113–125.
- Sos, M.L., and Thomas, R.K. (2012). Genetic insight and therapeutic targets in squamous-cell lung cancer. *Oncogene* *31*, 4811–4814.
- Stamos, J., Sliwkowski, M.X., and Eigenbrot, C. (2002). Structure of the epidermal growth factor receptor kinase domain alone and in complex with a 4-anilinoquinazoline inhibitor. *J. Biol. Chem.* *277*, 46265–46272.
- Stern, K.A., Place, T.L., and Lill, N.L. (2008). EGF and amphiregulin differentially regulate Cbl recruitment to endosomes and EGF receptor fate. *Biochem. J.* *410*, 585–594.
- Sweeney, C., and Carraway, K.L. (2000). Ligand discrimination by ErbB receptors: differential signaling through differential phosphorylation site usage. *Oncogene* *19*, 5568–5573.
- Takamochi, K., Mogushi, K., Kawaji, H., Imashimizu, K., Fukui, M., Oh, S., Itoh, M., Hayashizaki, Y., Ko, W., Akeboshi, M., et al. (2017). Correlation of EGFR or KRAS mutation status with 18F-FDG uptake on PET-CT scan in lung adenocarcinoma. *PloS One* *12*, e0175622.

## Bibliographie

---

- Thatcher, N., Hirsch, F.R., Luft, A.V., Szczesna, A., Ciuleanu, T.E., Dediu, M., Ramlau, R., Galiulin, R.K., Bálint, B., Losonczy, G., et al. (2015). Necitumumab plus gemcitabine and cisplatin versus gemcitabine and cisplatin alone as first-line therapy in patients with stage IV squamous non-small-cell lung cancer (SQUIRE): an open-label, randomised, controlled phase 3 trial. *Lancet Oncol.* *16*, 763–774.
- Tomas, A., Futter, C.E., and Eden, E.R. (2014). EGF receptor trafficking: consequences for signaling and cancer. *Trends Cell Biol.* *24*, 26–34.
- Trinchieri, G. (2010). Type I interferon: friend or foe? *J. Exp. Med.* *207*, 2053–2063.
- Tzahar, E., Pinkas-Kramarski, R., Moyer, J.D., Klapper, L.N., Alroy, I., Levkowitz, G., Shelly, M., Henis, S., Eisenstein, M., Ratzkin, B.J., et al. (1997). Bivalence of EGF-like ligands drives the ErbB signaling network. *EMBO J.* *16*, 4938–4950.
- Van Schaeybroeck, S., Kyula, J., Kelly, D.M., Karaïskou-McCaul, A., Stokesberry, S.A., Van Cutsem, E., Longley, D.B., and Johnston, P.G. (2006). Chemotherapy-induced epidermal growth factor receptor activation determines response to combined gefitinib/chemotherapy treatment in non-small cell lung cancer cells. *Mol. Cancer Ther.* *5*, 1154–1165.
- Wang, Z. (2016). Transactivation of Epidermal Growth Factor Receptor by G Protein-Coupled Receptors: Recent Progress, Challenges and Future Research. *Int. J. Mol. Sci.* *17*.
- Wang, Y.-N., and Hung, M.-C. (2012). Nuclear functions and subcellular trafficking mechanisms of the epidermal growth factor receptor family. *Cell Biosci.* *2*, 13.
- Wang, F., Wang, S., Wang, Z., Duan, J., An, T., Zhao, J., Bai, H., Wang, J., and Key Laboratory of Carcinogenesis and Translational Research (Ministry of Education) (2012). Phosphorylated EGFR expression may predict outcome of EGFR-TKIs therapy for the advanced NSCLC patients with wild-type EGFR. *J. Exp. Clin. Cancer Res. CR* *31*, 65.
- Wang, M.-C., Liang, X., Liu, Z.-Y., Cui, J., Liu, Y., Jing, L., Jiang, L.-L., Ma, J.-Q., Han, L.-L., Guo, Q.-Q., et al. (2015). In vitro synergistic antitumor efficacy of sequentially combined chemotherapy/icotinib in non-small cell lung cancer cell lines. *Oncol. Rep.* *33*, 239–249.
- Wang, T.-H., Lin, Y.-H., Yang, S.-C., Chang, P.-C., Wang, T.-C., and Chen, C.-Y. (2017). Tid1-S regulates the mitochondrial localization of EGFR in non-small cell lung carcinoma. *Oncogenesis* *6*, e361.
- Wheeler, D.L., Iida, M., and Dunn, E.F. (2009). The role of Src in solid tumors. *The Oncologist* *14*, 667–678.
- Wieckowski, M.R., Giorgi, C., Lebedzinska, M., Duszyński, J., and Pinton, P. (2009). Isolation of mitochondria-associated membranes and mitochondria from animal tissues and cells. *Nat. Protoc.* *4*, 1582–1590.
- Winograd-Katz, S.E., and Levitzki, A. (2006). Cisplatin induces PKB/Akt activation and p38(MAPK) phosphorylation of the EGF receptor. *Oncogene* *25*, 7381–7390.

## Bibliographie

---

- Wu, C.-J., Cai, T., Rikova, K., Merberg, D., Kasif, S., and Steffen, M. (2009). A predictive phosphorylation signature of lung cancer. *PLoS One* 4, e7994.
- Wu, M., Neilson, A., Swift, A.L., Moran, R., Tamagnine, J., Parslow, D., Armistead, S., Lemire, K., Orrell, J., Teich, J., et al. (2007). Multiparameter metabolic analysis reveals a close link between attenuated mitochondrial bioenergetic function and enhanced glycolysis dependency in human tumor cells. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 292, C125-136.
- Wu, Y.-L., Lee, J.S., Thongprasert, S., Yu, C.-J., Zhang, L., Ladrera, G., Srimuninnimit, V., Sriuranpong, V., Sandoval-Tan, J., Zhu, Y., et al. (2013). Intercalated combination of chemotherapy and erlotinib for patients with advanced stage non-small-cell lung cancer (FASTACT-2): a randomised, double-blind trial. *Lancet Oncol.* 14, 777–786.
- Yoshida, T., Okamoto, I., Iwasa, T., Fukuoka, M., and Nakagawa, K. (2008). The anti-EGFR monoclonal antibody blocks cisplatin-induced activation of EGFR signaling mediated by HB-EGF. *FEBS Lett.* 582, 4125–4130.
- Yun, C.-H., Boggon, T.J., Li, Y., Woo, M.S., Greulich, H., Meyerson, M., and Eck, M.J. (2007). Structures of lung cancer-derived EGFR mutants and inhibitor complexes: Mechanism of activation and insights into differential inhibitor sensitivity. *Cancer Cell* 11, 217–227.
- Zhang, X., Gureasko, J., Shen, K., Cole, P.A., and Kuriyan, J. (2006). An allosteric mechanism for activation of the kinase domain of epidermal growth factor receptor. *Cell* 125, 1137–1149.
- Zhou, C., Wu, Y.-L., Chen, G., Feng, J., Liu, X.-Q., Wang, C., Zhang, S., Wang, J., Zhou, S., Ren, S., et al. (2011). Erlotinib versus chemotherapy as first-line treatment for patients with advanced EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer (OPTIMAL, CTONG-0802): a multicentre, open-label, randomised, phase 3 study. *Lancet Oncol.* 12, 735–742.
- Zwang, Y., and Yarden, Y. (2006). p38 MAP kinase mediates stress-induced internalization of EGFR: implications for cancer chemotherapy. *EMBO J.* 25, 4195–4206.
- (1995). Chemotherapy in non-small cell lung cancer: a meta-analysis using updated data on individual patients from 52 randomised clinical trials. Non-small Cell Lung Cancer Collaborative Group. *BMJ* 311, 899–909.

## Bibliographie

---