

Faculté de Pharmacie

Année 2020

Thèse N°

MÉMOIRE DU DIPLÔME D'ÉTUDES SPÉCIALISÉES
D'INNOVATION PHARMACEUTIQUE ET RECHERCHE

TENANT LIEU DE

THÈSE D'EXERCICE POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT DE
DOCTEUR EN PHARMACIE

Présentée et soutenue publiquement

le 24 septembre 2020 par

Sarah FIGAROL

Née le 19 septembre 1989 à Toulouse

**Etude des résistances adaptatives aux inhibiteurs de
tyrosine kinase de l'EGFR dans les cancers bronchiques**

Thèse dirigée par Gilles Favre

Examineurs :

M. Franck Saint-Marcoux, président du jury

M. Gilles Favre, directeur de thèse

M. Jean-Marie Canonge, juge

M. Julien Mazières, juge

M. Antonio Maraver, juge



Faculté de Pharmacie

Année 2020

Thèse N°

MÉMOIRE DU DIPLÔME D'ÉTUDES SPÉCIALISÉES
D'INNOVATION PHARMACEUTIQUE ET RECHERCHE

TENANT LIEU DE

THÈSE D'EXERCICE POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT DE
DOCTEUR EN PHARMACIE

Présentée et soutenue publiquement

le 24 septembre 2020 par

Sarah FIGAROL

Née le 19 septembre 1989 à Toulouse

**Etude des résistances adaptatives aux inhibiteurs de
tyrosine kinase de l'EGFR dans les cancers bronchiques**

Thèse dirigée par Gilles Favre

Examineurs :

M. Franck Saint-Marcoux, président du jury

M. Gilles Favre, directeur de thèse

M. Jean-Marie Canonge, juge

M. Julien Mazières, juge

M. Antonio Maraver, juge

Liste des enseignants

Le 1^{er} septembre 2019

PROFESSEURS :

BATTU Serge	CHIMIE ANALYTIQUE
CARDOT Philippe	CHIMIE ANALYTIQUE ET BROMATOLOGIE
DESMOULIERE Alexis	PHYSIOLOGIE
DUROUX Jean-Luc	BIOPHYSIQUE, BIOMATHEMATIQUES ET INFORMATIQUE
FAGNERE Catherine	CHIMIE THERAPEUTIQUE - CHIMIE ORGANIQUE
LIAGRE Bertrand	BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLECULAIRE
MAMBU Lengo	PHARMACOGNOSIE
ROUSSEAU Annick	BIOSTATISTIQUE
TROUILLAS Patrick	CHIMIE PHYSIQUE - PHYSIQUE
VIANA Marylène	PHARMACOTECHNIE

PROFESSEURS DES UNIVERSITES - PRATICIENS HOSPITALIERS DES DISCIPLINES PHARMACEUTIQUES :

PICARD Nicolas	PHARMACOLOGIE
ROGEZ Sylvie	BACTERIOLOGIE ET VIROLOGIE
SAINT-MARCOUX Franck	TOXICOLOGIE

ASSISTANT HOSPITALIER UNIVERSITAIRE DES DISCIPLINES PHARMACEUTIQUES :

CHAUZEIX Jasmine	HÉMATOLOGIE
JOST Jérémy	PHARMACIE CLINIQUE

MAITRES DE CONFERENCES :

BASLY Jean-Philippe	CHIMIE ANALYTIQUE ET BROMATOLOGIE
BEAUBRUN-GIRY Karine	PHARMACOTECHNIE
BÉGAUD Gaëlle	CHIMIE ANALYTIQUE ET CONTRÔLE DU MÉDICAMENT

BILLET Fabrice	PHYSIOLOGIE
CALLISTE Claude	BIOPHYSIQUE, BIOMATHEMATIQUES ET INFORMATIQUE
CHEMIN Guillaume	BIOCHIMIE
CLÉDAT Dominique	CHIMIE ANALYTIQUE ET BROMATOLOGIE
COMBY Francis	CHIMIE ORGANIQUE ET THERAPEUTIQUE
COURTIOUX Bertrand	PHARMACOLOGIE, PARASITOLOGIE
DELEBASSÉE Sylvie	MICROBIOLOGIE-PARASITOLOGIE-IMMUNOLOGIE
DEMIOT Claire-Elise	PHARMACOLOGIE
FABRE Gabin	SCIENCES PHYSICO-CHIMIQUES ET INGÉNIERIE APPLIQUÉE
FROISSARD Didier	BOTANIQUE ET CRYPTOLOGAMIE
JAMBUT Anne-Catherine	CHIMIE ORGANIQUE ET THERAPEUTIQUE
LABROUSSE Pascal	BOTANIQUE ET CRYPTOLOGAMIE
LAVERDET Betty	PHARMACIE GALÉNIQUE
LEGER David	BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLÉCULAIRE
MARRE-FOURNIER Françoise	BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLÉCULAIRE
MERCIER Aurélien	PARASITOLOGIE
MILLOT Marion	PHARMACOGNOSIE
MOREAU Jeanne	MICROBIOLOGIE-PARASITOLOGIE-IMMUNOLOGIE
PASCAUD-MATHIEU Patricia	PHARMACIE GALENIQUE – BIOMATÉRIAUX CERAMIQUES
POUGET Christelle	CHIMIE ORGANIQUE ET THÉRAPEUTIQUE
VIGNOLES Philippe	BIOPHYSIQUE, BIOMATHÉMATIQUES ET INFORMATIQUE

ATTACHE TEMPORAIRE D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE :

BOUDOT Clotilde

MICROBIOLOGIE
(du 01/09/2018 au 31/08/2020)

MARCHAND Guillaume

CHIMIE ORGANIQUE ET THÉRAPEUTIQUE
(du 01/09/2019 au 31/08/2020)

PROFESSEURS EMERITES :

DREYFUSS Gilles (jusqu'au 31/03/2020)

Remerciements

Aux membres de mon jury.

Je tiens à adresser mes remerciements au Pr Franck Saint-Marcoux pour avoir accepté de présider ma thèse ainsi qu'au Pr Jean-Marie Canonge, au Pr Julien Mazières et au Dr Antonio Maraver pour avoir accepté d'évaluer mon travail de thèse.

À mon directeur de thèse.

Merci au Pr Gilles Favre de m'avoir accueillie dans son équipe, de m'avoir donné les moyens de faire avancer mon projet de thèse dans des conditions idéales et d'avoir toujours su porter un regard d'ensemble sur le projet de thèse et les orientations à lui donner.

À Olivier et Anne.

Je remercie énormément le Dr Olivier Calvayrac, mon parrain de la Science, pour m'avoir tout appris et transmis, du western blot à la rédaction d'un papier. Merci de ton implication quotidienne dans le projet et ma thèse ainsi que pour ton grand optimisme qui m'a toujours donné du courage.

Merci au Dr Anne Pradines pour sa disponibilité sans faille et sa bienveillance, pour tous ses coups de pouce qui ont permis de débloquer, recentrer, faire avancer les choses, ainsi que pour la rigueur qu'elle m'a apportée.

À toutes les personnes qui ont participé à ce travail.

Merci Rémi, pour tout le travail que tu as fourni pour m'aider dans les manips et surtout pour les nombreuses mises au point techniques que tu as effectuées.

Merci Raghda pour la grande aide que tu m'as apportée pour la qPCR, tu es indéniablement devenue une spécialiste en la matière.

Merci Célia pour prendre mon relais pour la suite des manips et pour le travail que tu es en train d'effectuer pour générer les cellules KO avec Isa que je remercie également.

Je n'ai aucun doute sur le fait qu'avec vous je laisse la suite du projet entre de bonnes mains.

Merci Claudine pour les ELISA.

Merci Anne Casa pour ton aide pour les dd-PCR et la confection des librairies.

Merci Estelle pour le marquage Beta-Gal vivo.

Merci Sandra pour la génération des cellules GFP et des DTEC, ainsi que pour m'avoir aidée, remplacée dès que j'en ai eu besoin, je citerai en particulier mon épisode coronavirus-like et la fois où mon pouce avait malencontreusement trop trempé dans l'azote.

Merci également aux stagiaires, Ayman et Marie, pour leur contribution au projet.

Merci aux services supports et au pôle technologique du CRCT. Merci Laetitia pour l'incucyte, merci Manon pour le tri cellulaire, merci Karine et Marie pour les expérimentations de transcriptomique et leurs analyses.

Merci à nos collaborateurs à Montpellier, Antonio Maraver, Jacques Colinge et leurs équipes.

À tous les membres passés et présents de l'équipe 3.

Merci Sandra pour ton soutien inconditionnel et pour tous les moments qu'on a partagés. Evidemment, et tu le sais, je te souhaite beaucoup de réussite pour ta thèse et pour la suite, accroche-toi et n'oublie pas de garder en tête tes objectifs et d'avoir confiance en toi et en tes capacités.

Merci Rémi pour tes blagues pourries, j'ai essayé de prendre exemple mais tu es indétrônable à ce niveau. Plus sérieusement, j'ai énormément apprécié travailler avec toi et ne te souhaite que de bonnes choses pour ta vie personnelle et ta poursuite de carrière.

Merci Claire pour notre point quotidien trafic SNCF/vie à la campagne, nos discussions et ta bienveillance envers moi.

Merci Claudine, maman du labo et petite-routarde de la Crète, pour ta bonne humeur, c'est très agréable de travailler à tes côtés.

Merci Isa de m'avoir donné le goût de l'enseignement, tu es une super prof et la pédagogie que tu emploies avec tes étudiants est exemplaire.

Merci Faten, Laetitia, Magda et Simona pour m'avoir montré le chemin du doctorat, vous avez toutes été des exemples pour moi.

Sébastien et Mathéa, tout comme Sandra, je vous souhaite beaucoup de réussite pour votre thèse.

Merci à tous les autres membres de l'équipe, Patrick, Olivier S., Stéphanie, Aurélien, Delphine, Célia, Nésibé, Raghda, Agnese et Anaïs, ainsi qu'aux stagiaires, passés et présents. Les discussions scientifiques et extra-scientifiques que nous avons pu avoir m'ont fait grandir et ont rendu ma vie au labo très agréable.

J'ai adoré ces années passées au labo avec vous, je sais bien qu'il faut partir vers d'autres horizons, couper le cordon, mais vous allez me manquer. Je souhaite le meilleur au niveau professionnel et personnel à chacun d'entre vous.

À mes amis du lycée et de la fac.

Merci cousine Laure pour avoir toujours été à mes côtés, m'avoir toujours conseillée et me connaître mieux que quiconque.

Merci mes potes du lycée, Laure, Julien, Joël, Finette, Théo, Romain, Paul et les autres, pour m'avoir forgé un caractère de « teigne », je pense que ça m'a bien aidée dans la réalisation de cette thèse. Je suis heureuse et chanceuse de continuer à vous voir régulièrement et d'être témoin de nos progressions respectives dans la vie depuis qu'on se connaît.

Merci mes copines de la fac, Julie, Mayka, Camille et aussi Emilie pour m'avoir accompagnée durant les années pharma et tous les moments qu'on a passés ensemble. On peut dire qu'enfin, et ce n'est pas trop tôt, avec cette thèse, je conclus nos années pharma. Je suis ravie de continuer à vous voir souvent et qu'on continue à partager des choses.

À ma famille.

Je remercie grandement mes parents pour m'avoir tout donné, pour m'avoir toujours soutenue et pour m'avoir transmis la valeur du travail.

Je remercie également mes frères et ma sœur, pour leur présence bienveillante dans ma vie et pour m'avoir supporté en tant que petite dernière.

Je vous dis un grand merci et suis consciente de la chance que j'ai de vous avoir dans ma vie.

J'adresse une pensée toute particulière à mes grands-parents, je leur dis que j'aurais aimé leur raconter tout ça et les remercie pour l'exemple qu'ils m'ont donné.

Je remercie également mes belles-familles. Merci Claudie et Jérôme, Bertrand et Angéline, Thibault et Anaïs, pour l'intérêt et le soutien que vous nous manifestez, à Clément et moi. Merci Claudie pour la relecture du manuscrit à la recherche des fautes passées entre les mailles du filet.

À Clément.

Merci de faire mon bonheur chaque jour et de contribuer à mon équilibre. Je ne te dirai jamais assez merci pour tout le soutien que tu m'apportes au quotidien et pour ta patience car c'est vrai que parfois avec moi rien n'est simple.

Droits d'auteurs

Cette création est mise à disposition selon le Contrat :

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

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



Table des matières

Liste des enseignants.....	4
Remerciements	7
Droits d’auteurs.....	9
LISTE DES ABREVIATIONS	15
LISTE DES TABLEAUX ET FIGURES.....	21
Tableaux	22
Figures	22
INTRODUCTION	25
I. Les cancers du poumon.....	26
I.A. Définition et épidémiologie.	26
I.A.1. Définition.....	26
I.A.2. Epidémiologie descriptive.	26
I.A.2.a. Epidémiologie en France.	26
I.A.2.b. Epidémiologie en Europe et dans le Monde.....	27
I.A.3. Epidémiologie étiologique : les facteurs de risque de cancer du poumon.....	28
I.A.3.a. Tabagisme.	28
I.A.3.b. Facteurs professionnels et environnementaux.	29
I.B. Classification anatomopathologique des cancers du poumon.	30
I.C. Caractérisation moléculaire des cancers du poumon.....	31
I.D. Diagnostic des cancers du poumon.	33
I.E. Thérapeutiques mises en œuvre dans la prise en charge des cancers bronchiques non à petites cellules.....	36
I.E.1. Chirurgie.	36
I.E.2. Radiothérapie.	37
I.E.3. Chimiothérapies.	37
I.E.2.a. Objectifs de la chimiothérapie.	38
I.E.2.b. Agents de chimiothérapie couramment utilisés.	38
I.E.4. Thérapies ciblées dirigées contre les mécanismes oncogéniques (hors inhibiteurs de l’activité tyrosine kinase de l’EGFR).	39
I.E.4.a. KRAS.....	40
I.E.4.b. ALK.....	41
I.E.4.c. MET.	42
I.E.4.d. BRAF.	43
I.E.4.e. Voie PI3K/AKT.....	44

I.E.4.f. RET.....	45
I.E.4.g. ROS1.	46
I.E.4.h. HER2.	46
I.E.5. Thérapies ciblées dirigées vers le microenvironnement tumoral.	47
I.E.5.a. Inhibiteurs du VEGF.	47
I.E.5.b. Immunothérapie.....	48
I.F. Stratégies de prise en charge des patients atteints de cancers bronchiques non à petites cellules.....	52
I.F.1. Prise en charge des cancers bronchiques non à petites cellules de stade I et II.....	52
I.F.2. Prise en charge des cancers bronchiques non à petites cellules de stade III.....	53
I.F.3. Prise en charge des cancers bronchiques non à petites cellules de stade IV.....	56
I.F.3.a. Prise en charge des cancers bronchiques non à petites cellules de stade IV sans altération ciblable.....	56
I.F.3.b. Prise en charge des cancers bronchiques non à petites cellules de stade IV avec altération ciblable.....	58
II. Les inhibiteurs de l'activité tyrosine kinase de l'EGFR : EGFR-TKI.....	60
II.A. L'EGFR et ses altérations dans les cancers du poumon.	60
II.B. EGFR-TKIs : Mécanisme d'action et molécules utilisées dans le traitement des cancers bronchiques présentant des altérations de l'EGFR.	62
II.B.1. Mécanisme d'action des EGFR-TKIs.	62
II.B.2. Les différentes générations d'inhibiteurs : propriétés pharmacologiques et historique.	62
II.B.2.a. Propriétés pharmacologiques des différentes générations d'EGFR-TKIs.....	62
II.B.2.b. Historique du développement des EGFR-TKIs dans le traitement des cancers du poumon.	63
II.B.3. Efficacité et Sécurité des EGFR-TKIs dans le traitement des cancers du poumon.....	65
II.B.3.a. Efficacité des EGFR-TKIs selon les altérations géniques de l'EGFR.	65
II.B.3.b. Efficacité et Sécurité des EGFR-TKIs de première génération.	66
II.B.3.c. Efficacité et Sécurité des EGFR-TKIs de deuxième génération.....	68
II.B.3.d. Efficacité et Sécurité des EGFR-TKIs de troisième génération.	70
II.C. Les résistances aux EGFR-TKIs dans les cancers bronchiques possédant des altérations géniques de l'EGFR.	72
II.C.1. Résistances primaires ou acquises.	72
II.C.1.a Résistances primaires.	72
II.C.1.a Résistances acquises.	73
II.C.2. Les différents types de mécanismes de résistances acquises et leurs distributions.	73

II.C.2.a. Mécanismes de résistance aux EGFR-TKIs de première et deuxième générations..	74
II.C.2.b. Mécanismes de résistance aux EGFR-TKIs de troisième génération.....	75
II.C.3. Description des différents mécanismes de résistances acquises aux EGFR-TKIs.....	76
II.C.3.a. Altérations de la cible.....	76
II.C.3.b. Activation de voies de signalisation compensatoires.	78
II.C.3.c. Modification du phénotype cellulaire : transformation histologique et transition épithélio-mésenchymateuse.....	81
II.C.3.d. Autres mécanismes émergents.....	85
II.C.4 L'hétérogénéité tumorale : un autre niveau de complexité dans la compréhension des mécanismes de résistance aux EGFR-TKIs.....	85
II.C.5. Origine des résistances adaptatives : l'hypothèse des « Drug Tolerant Cells ».	87
II.C.6. La sénescence induite par les thérapies (ou Therapy-Induced Senescence (TIS)) : un nouveau mécanisme de résistance ?	91
II.C.6.a. La sénescence cellulaire : définition, marqueurs et différents types.	91
II.C.6.b. La sénescence induite par les thérapies anticancéreuses.	94
II.C.6.c. L'échappement de la sénescence induite par les thérapies.....	95
II.C.7. Conclusion sur les résistances aux EGFR-TKIs.	96
III. La GTPase RhoB et son implication dans les résistances aux thérapies ciblées.....	97
III.A. La GTPase RhoB.....	97
III.A.1. Organisation phylogénétique et fonctions générales des protéines Rho.....	97
III.A.2. Cycle d'activation de la GTPase RhoB.	98
III.A.3. Structure de RhoB.	98
III.A.4. Mécanismes de régulation de RhoB.	99
III.A.4.a. Modulation de l'état d'activation de RhoB.	99
III.A.4.b. Modifications post-traductionnelles de RhoB.	100
III.A.4.c. Régulation transcriptionnelle et post-transcriptionnelle de RhoB	102
III.A.4.d. Régulation de la dégradation de RhoB.	102
III.A.5. Localisation subcellulaire de RhoB.....	103
III.A.6. Fonctions biologiques de RhoB.	104
III.A.6.a. Régulation du cytosquelette d'actine.	104
III.A.6.b. Régulation du trafic intracellulaire.	104
III.A.6.c. Régulation de l'adhésion et de la migration.	106
III.A.6.d. Régulation de l'expression génique.	107
III.A.6.e. Régulation de l'angiogenèse et de la lymphangiogenèse.....	108
III.B. Implication de RhoB dans les cancers et les résistances aux thérapies ciblées.....	108

III.B.1. Dérégulation de RhoB dans les cancers.	108
III.B.1.a. Modifications de l'expression de RhoB dans les cancers.	108
III.B.1.b. Mutations de RhoB dans les cancers.	109
III.B.2. Implication de RhoB dans la cancérogenèse et la progression tumorale.	109
III.B.2.a. Rôle suppresseur de tumeurs de RhoB.	110
III.B.2.a. Rôle oncogénique de RhoB.	112
III.B.3. Influence des modifications post-traductionnelles de RhoB sur son rôle dans les cancers.	113
III.B.4. Implication de RhoB dans la réponse à des stress cellulaires radio- ou chimio-induits.	114
III.B.3.a. Fonction pro-apoptotique de RhoB en réponse à des stress cellulaires radio- ou chimio-induits.	114
III.B.3.a. Fonction anti-apoptotique de RhoB en réponse à des stress cellulaires radio- ou chimio-induits.	115
III.B.5. Implication de RhoB dans les résistances aux thérapies ciblées.	115
III.B.6.a. Implication de RhoB dans les résistances aux thérapies ciblées dans les mélanomes.	115
III.B.6.b. Implication de RhoB dans les résistances aux thérapies ciblées dans les cancers bronchiques.	116
III.B.7. Utilisation des inhibiteurs de la farnésyltransférase (FTIs) dans le traitement des cancers.	117
III.B.7.a. Utilisation des inhibiteurs de la farnésyltransférase (FTIs) en monothérapie dans le traitement des cancers.	118
III.B.7.b. Utilisation des inhibiteurs de la farnésyltransférase (FTIs) en association à d'autres thérapeutiques anti-tumorales dans le traitement des cancers.	120
III.B.7.c. L'utilisation d'inhibiteurs de la farnésyltransférase (FTIs) dans le traitement des cancers : pourquoi une efficacité limitée ?	122
OBJECTIFS	125
RESULTATS.....	127
DISCUSSION et PERSPECTIVES.....	175
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	181
Serment De Galien	227

LISTE DES ABREVIATIONS

3D 3 Dimensions

ADN *Acide Désoxyribo Nucléique*
ALK *Anaplastic Lymphoma Kinase*
AMM *Autorisation de Mise sur le Marché*
Arf *ADP-ribosylation factor*
ARN *Acide Ribo Nucléique*
ASCO *American Society of Clinical Oncology*
ATP *Adénosine triphosphate*
ATUn *Autorisation Temporaire d'Utilisation nominative*

BRAF *V-Raf Murine Sarcoma Viral Oncogene Homolog B*
BrdU *Bromodeoxyuridine*

CAR-T *Chimeric Antigen Receptor T*
CBNPC *Cancer Bronchique Non à Petites Cellules*
CBPC *Cancer Bronchique à Petites Cellules*
CDK *Cyclin-Dependant Kinase*
CDKI *Cyclin-Dependant Kinase Inhibitor*
CK1 *Casein Kinase 1*
CMH *Complexe Majeur d'Histocompatibilité*
CPA *Cellule Présentatrice d'Antigène*
ctDNA *circulating tumoral DNA*
CTLA4 *Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4*
CTVA *Chirurgie Thoracique Vidéo-Assistée*

DTC *Drug Toleant Cells*
DTEC *Drug Tolerant Expanded Cells*
DTP *Drug Tolerant Persisters*

EdU *Ethynyl-deoxyuridine*
EGFR *Epidermal Growth Factor Receptor*
EGFR-TKI *Inhibiteurs de tyrosine kinase de l'EGFR*
ERK *Extracellular signal-Regulated Kinase*

FAK *Focal Adhesion Kinase*
FDA *Food and Drug Administration*
FGF *Fibroblast Growth Factor, Fibroblast growth factor*
FGFR *Fibroblast Growth Factor Receptor*
FGTI *Farnesyl- and Geranylgeranyl-transferase inhibitor*
FISH *Fluorescence In Situ Hybridization*
FTase *Farnésyltransferase*
FTI *Farnesyl Transferase Inhibitor*

GAP *GTPase-activating protein*

GDI *Guanine nucleotide Dissociation Inhibitor*
GEF *Guanine nucleotide Exchange Factor*
GGTase *GéranylGéranyltransférase*
GGTI *GéranylGéranyl Transférase Inhibitor*
GDNF *Glial cell line-Derived Neurotrophic Factor*
GPX4 *Gluthation Peroxydase 4*
GTP *Guanosine Triphosphate*
GTPase *Guanosine TriPhosphatase*

HDAC *Histone désacétylase*
HER2 *Human Epidermal Growth Factor 2*
HES1 *Hairy and Enhancer of Split 1*
Hh *Hedgehog*
HGF *Hepatocyte Growth Factor*
HGFR *Hepatocyte Growth Factor Receptor*
HTA *Hypertension artérielle*

IARC *International Agency for Research on Cancer*
IASLC *International Association for the Study of Lung Cancer*
ICAM *Intracellular adhesion molécule*
IGF *Insulin Growth Factor*
IGFR1 *Insulin Growth Factor Receptor 1*
IgG *Immunoglobuline G*
INCa *Institut National du Cancer*
Inserm *Institut national de la santé et de la recherche médicale*
INVS *Institut National de Veille Sanitaire*
IRM *Imagerie à Résonance Magnétique*
IV *Intraveineuse*

JAK *Janus Kinase*

KRAS *V-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog*

MAPK *Mitogen-Activated Protein Kinase*
MCAM *Melanoma Cell Adhesion Molecule*
miARN *MicroARN*
mTOR *mammalian target of rapamycine*

NAC *N-Acetyl Cystéine*
NF1 *Neurofibromine 1*
NGS *Next Generation Sequencing*
NSCLC *Non Small Cells Lung Cancer*

OIS *Oncogene-Induced Senescence*
OMS *Organisme Mondial de la Santé*

PARP *Poly-ADP Ribose Polymerase*
PCR *Polymerase Chain Reaction*
PDGF *Platelet Derived Growth Factor*
PDGFR *Platelet Derived Growth Factor Receptor*

PDL *Programmed death-ligand*
PDX *Patient Derived Xenograft*
PI3K *Phosphoinositide 3-kinase*
PIP2 *Phosphatidyl-inositol biphosphate*
PIP3 *Phosphatidyl-inositol triphosphate*
PS *Performance Score*
PTEN *Phosphatase and tensin homolog*

Rab *Ras-like protein in brain*
RAF *Rapidly Activated Fibrosarcoma*
Ran *Ras-like nuclear*
RAS *Rat Sarcoma*
RB *Retinoblastome*
RCP *Réunion de Concertation Pluridisciplinaire*
RECIST *Response Evaluation Criteria In Solid Tumors*
RET *REarranged during Transfection*
Rho *Ras homologous*
RHOB *Ras homolog family member B*
ROS *Reactive Oxygen Species*
ROS1 *V-Ros Avian UR2 Sarcoma Virus Oncogene Homolog 1*
RTU *Recommandation Temporaire d'Utilisation*

SAHF *Senescence-Associated Heterochromatin Foci*
SASP *Senescence-Associated Secretory Phenotype*
SA-βGal *Senescence-Associated Beta-Galactosidase*
SCLC *Small Cells Lung Cancer*
siARN *Small interfering ARN*
SIPS *Stress-Induced Premature Senescence*
SRE *Serum Response Element*
STAT *Signal transducer and activator of transcription*

TCGA *The Cancer Genome Atlas*
TCR *T-cell receptor*
T-DM1 *Trastuzumab - Emtansine*
T-DXd *Trastuzumab - Deruxtecan*
TEAD *TEA domain transcription factor*
TEM *Transition épithélio-mésenchymateuse*
TEP-TDM *Tomographie à Emission de Positions - Tomodensitométrie*
TGF *Tumor Growth Factor*
TIS *Therapy-Induced Senescence*
TNM *Tumor Nodes Metastasis*
TSC *Tuberous Sclerosis Complex*

UV *Ultra-Violets*

VEGF *Vascular Endothelial Growth Factor*
VEGFR *Vascular Endothelial Growth Factor Receptor*

WHO *World Health Organization*
^{WT} *Wild-type*

YAP *Yes-associated protein*

ZEB *Zinc finger E-box-binding homebox*

LISTE DES TABLEAUX ET FIGURES

Tableaux

Tableau 1 : Données d'incidence, de mortalité et de survie des cancers du poumon en France, en Europe et dans le Monde. En bleu figurent les données observées chez les hommes et en rose les données observées chez les femmes. (D'après les données de l'INCa et (1-6)).....	28
Tableau 2 : Classification TNM des cancers du poumon - 8ème édition– (d'après (33)).....	35
Tableau 3 : Correspondance entre la classification TNM et le stade pour les cancers du poumon – 8ème édition (d'après (33)). Entre parenthèses figurent les pourcentages de survie globale à 5 ans pour chaque stade clinique, * la survie globale à 1 an des stades IV-B est de 10%.	36
Tableau 4 : Différents médicaments de chimiothérapie utilisés dans le traitement des cancers du poumon.	39
Tableau 5 : Les altérations moléculaires des CBNPC, leur incidence et leurs thérapeutiques. RTU : Recommandation temporaire d'utilisation.	40
Tableau 6 : Propriétés pharmacologiques des trois générations d'EGFR-TKIs. Adapté de (175).	63
Tableau 7 : Les différents mécanismes de résistances acquises identifiés chez les patients traités par osimertinib en première ou deuxième ligne de traitement. D'après (277,278) et les travaux sur les résistances à l'osimertinib dans l'essai FLAURA (non publiés mais présentés au congrès de l'ESMO 2019).	76
Tableau 8 : Liste des différentes études rapportant un rôle anti-migratoire ou un rôle pro-migratoire de la protéine RhoB et modèles utilisés dans ces études.	106
Tableau 9 : Liste des différentes études scientifiques rapportant un rôle oncogénique ou un rôle suppresseur de tumeur de la protéine RhoB (les références écrites en orange incluent des études portant sur des échantillons de patients, celles écrites en bleu incluent des études in vivo effectuées sur des modèles murins).	110
Tableau 10 : Essais cliniques de phase II et III évaluant le tipifarnib et le lornatinib en monothérapie dans le traitement des cancers solides et hématologiques. ND = non déterminé.	119
Tableau 11 : Essais cliniques de phase II et III évaluant le tipifarnib et le lornatinib en association avec d'autres thérapeutiques anti-tumorales cytotoxiques dans le traitement des cancers. ND = non déterminé.	121

Figures

Figure 1 : Biomarqueurs génétiques des cancers bronchiques non à petites cellules (d'après Calvayrac et al., 2017).	33
Figure 2 : Mode d'action des anti- PD-1/PD-L1 (adapté d'après "Immunothérapies anti-checkpoints : aspects fondamentaux" Perrine Vuagnat, Stéphane Champiat, MCED n°95, décembre 2018).	51
Figure 3 : Arbre décisionnel de prise en charge des CBNPC aux stades I et II (D'après le référentiel Auvergne Rhône-Alpes en oncologie thoracique, cancer bronchique non à petites cellules, 2020).	53
Figure 4 : Arbre décisionnel de prise en charge des CBNPC au stade IIIA (D'après le référentiel Auvergne Rhône-Alpes en oncologie thoracique, cancer bronchique non à petites cellules, 2020).	55
Figure 5 : Arbre décisionnel de prise en charge des CBNPC au stade IIIB-C (D'après le référentiel Auvergne Rhône-Alpes en oncologie thoracique, cancer bronchique non à petites cellules, 2020).	56
Figure 6 : Arbre décisionnel de prise en charge des CBNPC au stade IV non épidermoïdes ne présentant pas d'altération génique ciblable (D'après le référentiel Auvergne Rhône-Alpes en oncologie thoracique, cancer bronchique non à petites cellules, 2020).	57
Figure 7 : Arbre décisionnel de prise en charge des CBNPC au stade IV épidermoïdes ne présentant pas d'altération génique ciblable (D'après le référentiel Auvergne Rhône-Alpes en oncologie thoracique, cancer bronchique non à petites cellules, 2020).	58
Figure 8 : Les différentes altérations de l'EGFR dans les cancers du poumon – modifié à partir de (172). La fréquence de détection de la mutation EGFR790M au niveau de l'exon 20 chez les patients atteints de CBNPC et naïfs de tout traitement est très variable selon les études (cf. partie II.C.1.a).	60
Figure 9 : Représentation schématique de la voie de l'EGFR dans des conditions physiologiques puis lorsque l'EGFR est génétiquement altéré au cours de l'oncogenèse pulmonaire.	61
Figure 10 : Représentation schématique du mécanisme d'action des EGFR-TKIs.	62

<i>Figure 11 : Historique du développement des EGFR-TKIs dans le traitement des cancers du poumon. Adapté de (175).</i>	64
<i>Figure 12 : Schéma récapitulatif du degré de sensibilité des patients atteints de cancers bronchiques aux EGFR-TKIs en fonction de l'altération génique de l'EGFR qu'ils portent.</i>	66
<i>Figure 13 : Les trois grands types de mécanismes de résistances acquises aux EGFR-TKIs.</i>	74
<i>Figure 14 : Les différents mécanismes de résistances acquises identifiés chez les patients traités par EGFR-TKIs de première et deuxième générations. D'après (274).</i>	75
<i>Figure 15 : Hétérogénéité spatiale et temporelle des mécanismes de résistance aux EGFR-TKIs. Adapté d'après (445).</i>	86
<i>Figure 16 : La résistance aux EGFR-TKIs est multifactorielle et hétérogène : un réel défi pour traiter les cancers bronchiques porteurs de mutations activatrices de l'EGFR. Adapté de (248).</i>	87
<i>Figure 17 : Schéma explicatif des deux modèles pouvant expliquer l'acquisition de mécanismes de résistance aux EGFR-TKIs.</i>	88
<i>Figure 18 : Schéma montrant le parallèle qui peut être fait entre le modèle des « Drug Tolerant Cells » établi in vitro et l'évolution des patients traités par EGFR-TKIs. La partie basse de cette figure représente les scanners d'un patient atteint d'un adénocarcinome bronchique porteur de mutation de l'EGFR et traités par EGFR-TKI, obtenus à partir de (453) : à gauche le scanner avant l'induction du traitement par EGFR-TKI, au milieu le scanner obtenu six semaines après le début du traitement par EGFR-TKI et montrant une rémission totale de la lésion d'origine, à droite le scanner réalisé plusieurs mois après le début du traitement par EGFR-TKI montrant une rechute de la tumeur d'origine.</i>	89
<i>Figure 19 : Les caractéristiques de la sénescence cellulaire. Modifié à partir de (498).</i>	93
<i>Figure 20 : Les différents types de résistances aux EGFR-TKIs : examen diagnostique, mécanismes et thérapeutiques proposées pour les contrer. Les images de scanner sont extraites de (453).</i>	96
<i>Figure 21 : Arbre phylogénétique de la famille des GTPases Rho. En orange sont représentées les sous-familles typiques et en violet figurent les sous-familles qualifiées d'atypiques. Adapté de (555).</i>	97
<i>Figure 22 : Cycle d'activation/inactivation de la GTPase RhoB. Modifié à partir de (559).</i>	98
<i>Figure 23: Alignement des séquences en acides aminés et organisation structurale des GTPases de la sous-famille Rho. Les résidus qui diffèrent entre RhoA et RhoB sont en vert et ceux qui diffèrent entre RhoA et RhoC sont en rouge. Modifié à partir de (562).</i>	99
<i>Figure 24 : Principales modifications post-traductionnelles de la région hypervariable de RhoB.</i>	101
<i>Figure 25 : Une forte expression tumorale de RhoB dans les cancers bronchiques porteurs de mutations activatrices de l'EGFR est un marqueur prédictif de résistance au traitement par EGFR-TKI. L'association thérapeutique d'un EGFR-TKI avec un inhibiteur d'AKT pourrait rétablir la sensibilité aux EGFR-TKIs chez les patients possédant une forte expression de RhoB avant traitement – Tiré de (266).</i>	117
<i>Figure 26 : Les inhibiteurs de farnésyltransférases (FTIs). Modifié à partir de (693).</i>	118

INTRODUCTION

I. Les cancers du poumon.

I.A. Définition et épidémiologie.

I.A.1. Définition.

Les cancers bronchiques, aussi couramment appelés cancers du poumon ou cancers broncho-pulmonaires, se développent à partir des cellules des bronches ou, de façon plus rare, des cellules tapissant les alvéoles pulmonaires.

Il existe deux grands types de cancers bronchiques : les cancers bronchiques non à petites cellules (CBNPC) qui représentent 85 % des cancers bronchiques et les cancers bronchiques à petites cellules (CBPC) qui représentent 15 %.

Au départ localisés aux niveaux de l'arbre bronchique, les cancers du poumon ont la capacité de pouvoir se propager à d'autres zones du poumon atteint puis aux structures avoisinant la tumeur (plèvre, péricarde, etc...). A terme, les cellules tumorales vont pouvoir disséminer par voie sanguine ou lymphatique pour atteindre les ganglions lymphatiques situés à proximité puis pour former des foyers métastatiques à distance au niveau de différents organes (cerveau, os, foie, glandes surrénales, peau etc...).

I.A.2. Epidémiologie descriptive.

I.A.2.a. Epidémiologie en France.

Le cancer du poumon est le 4^{ème} cancer le plus fréquent en France mais c'est le plus mortel car même si les taux de survie augmentent, ils restent mauvais. Depuis les années 1990, chez l'homme, nous observons une stagnation globale voire une diminution du taux d'incidence des cancers bronchiques ainsi qu'une diminution du taux de mortalité. Mais ce n'est pas le cas chez la femme où les taux d'incidence et de mortalité sont en forte hausse depuis les années 1990. Ce phénomène inquiétant chez les femmes est essentiellement lié à l'augmentation de leur consommation tabagique.

Incidence :

Selon l'INCa (Institut National du Cancer), en 2018, 46 363 nouveaux cas de cancer du poumon ont été diagnostiqués en France (67 % sont des hommes). Le cancer du poumon est donc le 4^{ème} cancer le plus fréquent (2^{ème} chez les hommes et 3^{ème} chez les femmes). L'âge médian des patients au moment du diagnostic est de 67 ans chez l'homme et 65 ans chez la femme.

Entre 1990 et 2018, le taux d'incidence chez l'homme a sensiblement diminué (avec une variation annuelle moyenne de -0,1 %) alors que chez la femme il a fortement augmenté (avec une variation annuelle moyenne de +5,3 %).

Mortalité et Survie :

Selon l'INCa, en 2018, 33 117 patients sont décédés des suites d'un cancer du poumon (69 % sont des hommes). Le cancer du poumon est donc au 1^{er} rang des décès par cancer (1^{er} rang chez les hommes et 2^{ème} rang chez les femmes). L'âge médian des patients au moment du décès est de 69 ans chez l'homme et 68 ans chez la femme.

Entre 1990 et 2018, le taux de mortalité chez l'homme a diminué (variation annuelle moyenne de - 1,2 %) alors que chez la femme il a augmenté (variation annuelle moyenne de + 3,5 %).

Pour ce qui est de la survie, entre 2005 et 2010, le taux de survie nette standardisée 5 ans après le diagnostic de cancer du poumon était de 17 % (16 % chez l'homme et 20 % chez la femme), et entre 1989 et 2010, le taux de survie nette standardisée à 10 ans était de 10 % (9 % chez l'homme et 13 % chez la femme). Depuis 1989, les taux de survie nette standardisée à 1 an et à 5 ans s'améliorent puisqu'ils passent de 40 % et 13 %, respectivement, entre 1989 et 1993 à 47 % et 17 %, respectivement, entre 2005 et 2010.

I.A.2.b. Epidémiologie en Europe et dans le Monde.

En Europe :

D'après une étude menée dans 40 pays européens en 2018 (1), l'incidence des cancers bronchiques s'élève à 470 000 nouveaux cas soit 12 % des nouveaux cas pour tous les cancers confondus (15,1 % pour les hommes et 8,5 % pour les femmes) et la mortalité par cancer du poumon s'élève à 387 900 décès soit 20,1 % des décès pour tous les cancers confondus (24,8 % chez l'homme et 14,2 % chez la femme).

Ainsi, au niveau européen, pour les deux sexes combinés, le cancer du poumon se situe au 2^{ème} rang en termes d'incidence des cancers (après le cancer colorectal) et au 1^{er} rang en termes de mortalité par cancer. Chez l'homme, le cancer du poumon se situe au 2^{ème} rang en termes d'incidence des cancers (après le cancer de la prostate) et au 1^{er} rang en termes de mortalité par cancer. Et chez la femme, il se situe au 3^{ème} rang en termes d'incidence des cancers (après le cancer du sein et le cancer colorectal) et au 2^{ème} rang en termes de mortalité par cancer (après le cancer du sein).

D'après les données de l'étude EURO CARE-5, le taux de survie nette standardisée à 5 ans chez les européens diagnostiqués pour un cancer du poumon entre 2000 et 2007 est d'environ 13 % et il est d'autant plus bas que l'âge au moment du diagnostic est élevé. Ainsi, le taux de survie nette standardisée à 5 ans chez les patients âgés de 15 à 44 ans est de 24,3 % et il passe à 7,9 % chez les patients de plus de 75 ans. De plus, il est à noter que le taux de survie nette standardisée à 5 ans ne s'est que légèrement amélioré depuis le début du XXI^{ème} siècle puisqu'il était de 11,6 % en 1999-2001 et de 13,4 % en 2005-2007 (2,3).

Dans le Monde :

D'après le projet GLOBOCAN (Global Cancer Statistics) mené dans 185 pays en 2018 (4), l'incidence des cancers bronchiques s'élève à 2,09 millions de nouveaux cas soit 11,6 % des nouveaux cas pour tous les cancers confondus (avec 14,5 % pour les hommes et 8,4 % pour les femmes) et la mortalité par cancer du poumon s'élève à 1,7 million de décès soit 18,4 % des décès pour tous les cancers confondus (22 % chez l'homme et 13,8 % chez la femme).

Ainsi, à l'échelle mondiale, pour les deux sexes combinés, les cancers bronchiques sont les cancers les plus fréquemment diagnostiqués et représentent la première cause de mortalité par cancer (suivi de près par le cancer du sein, le cancer de la prostate et le cancer colorectal en termes d'incidence des cancers et le cancer colorectal, le cancer de l'estomac et le cancer du foie en termes de mortalité par cancer). Chez l'homme, le cancer bronchique se situe au premier rang en termes d'incidence des cancers et de mortalité par cancer. Et chez la femme, il se situe au 3^{ème} rang en termes d'incidence des cancers (après le cancer du sein et le cancer colorectal) et au 2^{ème} rang en termes de mortalité par cancer (après le cancer du sein).

Concernant la survie au niveau mondial, d'après l'étude CONCORD-2 qui a évalué la survie pour des patients diagnostiqués entre 1995 et 2009 dans 67 pays, le taux de survie globale à 5 ans varie grandement selon les pays (2 % en Libye contre 30 % au Japon) (5). Ces variations sont pour beaucoup dues au niveau socio-économique de chaque pays qui influence la précocité du diagnostic (6,7). C'est en Europe de l'Est (Hongrie) et en Asie de l'Est (Chine) que les taux d'incidence et de mortalité du cancer du poumon sont les plus élevés chez l'homme ; et en Amérique du Nord et en Europe du Nord (Danemark, Islande, Pays-Bas) chez la femme. Pour les deux sexes, c'est en Afrique que les taux d'incidence et de mortalité sont les plus faibles (1,4).

Toutes les données épidémiologiques relatives au cancer du poumon en France, en Europe et dans le Monde sont résumées dans le tableau suivant :

	Incidence Rang auquel se place le cancer du poumon en termes d'incidence des cancers	Mortalité Rang auquel se place le cancer du poumon en termes de mortalité par cancer	Survie Taux de survie à 5 ans (%)
France	4 ^{ème} 2 ^{ème} – 3 ^{ème}	1 ^{er} 1 ^{er} – 2 ^{ème}	17 % (nette standardisée)
Europe	2 ^{ème} 2 ^{ème} – 3 ^{ème}		13 % (nette standardisée)
Monde	1 ^{er} 1 ^{er} – 3 ^{ème}		2-30 % (globale)

Tableau 1 : Données d'incidence, de mortalité et de survie des cancers du poumon en France, en Europe et dans le Monde. En bleu figurent les données observées chez les hommes et en rose les données observées chez les femmes. (D'après les données de l'INCa et (1-6)).

I.A.3. Epidémiologie étiologique : les facteurs de risque de cancer du poumon.

Plusieurs facteurs sont reconnus comme pouvant être à l'origine du développement d'un cancer bronchique, le premier étant le tabagisme.

I.A.3.a. Tabagisme.

Selon l'OMS (Organisme Mondial de la Santé), le tabac est incontestablement le premier facteur de risque de cancer du poumon puisqu'il est responsable de huit cancers du poumon sur dix.

Dans les pays à fort indice de développement, 90 % des cancers du poumon chez l'homme et 70 % chez la femme sont attribuables au tabagisme. Alors que dans les pays à faible indice de développement qui sont également les pays où les fumeurs sont moins nombreux (surtout chez les femmes), 65 % des cancers du poumon chez l'homme et 25 % chez la femme sont imputables au tabagisme (6).

On estime que 90 % des décès par cancer du poumon sont dus au tabagisme. Le tabagisme multiplie par 15 à 40 fois le risque de développer un cancer du poumon et toutes les formes de tabagisme (cigarettes, cigares, pipes) augmentent ce risque (8,9).

Le tabagisme passif augmente lui aussi le risque de cancer du poumon : ce risque est augmenté de 20 à 30 % chez les femmes non fumeuses exposées au tabagisme de leur conjoint et de 16 à 19 % chez les non-fumeurs exposés à un tabagisme environnemental sur leur lieu de travail (9,10).

Le tabagisme reste la première cause de mortalité évitable en France et il apparaît indispensable de poursuivre les actions de prévention du tabagisme pour enrayer cette évolution. L'arrêt du tabac reste donc une mesure de prévention primordiale pour diminuer l'incidence des cancers bronchiques. De plus, l'arrêt du tabac chez les patients atteints d'un cancer du poumon est également bénéfique puisqu'il diminue le risque de décès par cancer du poumon, il diminue le risque de récurrence et améliore la réponse aux différents traitements (8).

I.A.3.b. Facteurs professionnels et environnementaux.

De nombreux facteurs environnementaux et professionnels sont reconnus comme cancérigènes pour les poumons. Une liste de ces carcinogènes est établie et mise à jour par l'International Agency for Research on Cancer (IARC).

Hormis le tabagisme actif et passif, cette liste comprend notamment :

- L'amiante. Il s'agit d'un matériau utilisé dans de nombreuses industries notamment l'industrie du bâtiment. L'exposition à l'amiante serait responsable de 10 à 15 % des cancers bronchiques, ce qui en fait l'exposition professionnelle associée au cancer du poumon la plus fréquente. Par conséquent, l'amiante a été interdit en France depuis 1997.
- Les rayons externes ionisants X et γ qui sont utilisés dans le traitement des cancers par radiothérapie et dans certains examens d'imagerie médicale ou bien qui peuvent être d'origine naturelle (rayonnement cosmique et tellurique). Ainsi, ce sont les personnels navigants de l'aviation, les travailleurs de l'industrie nucléaire et les travailleurs ayant une activité vétérinaire ou médicale qui sont exposés à ces carcinogènes. Le risque de cancer du poumon associé à ces rayonnements est proportionnel à la dose reçue. Afin de prévenir cette exposition, les personnes travaillant avec des rayonnements ionisants doivent porter un dosimètre permettant de mesurer la dose reçue par la personne et de vérifier qu'elle ne dépasse pas la norme tolérée.
- Le radon-222 et ses produits de dégradation. Le radon est un gaz radioactif, incolore et inodore, qui se trouve naturellement dans l'environnement rocheux et qui est issu de la désintégration de l'uranium et du radium. Il est donc présent partout à la surface de la planète (dans l'air, l'eau, les bâtiments) à des concentrations variables selon les régions. On estime qu'il est responsable de 9 % des cancers du poumon en Europe (11) et 10 % des décès par cancer du poumon en France, ce qui en fait la deuxième cause de mortalité par cancer du poumon en France après le tabagisme (12).
- Les gaz d'échappement des moteurs diesel. Les professions concernées par cette exposition sont principalement les mineurs, les travailleurs des chemins de fer et les travailleurs de l'industrie des transports routiers. Une étude américaine menée sur des mineurs montre une tendance à l'augmentation de 2 à 3 fois du risque de cancer du poumon liée à une forte exposition aux gaz d'échappement des moteurs diesel (13,14). Une autre étude américaine, cette fois portant sur des cheminots, a montré une augmentation significative de 70 à 80 % du risque chez les travailleurs exposés, de plus, ce risque augmente avec la durée d'exposition (15). Enfin, une vaste étude de cohorte aux Etats-Unis a rapporté une augmentation de 15 à 40 % du risque de cancer du poumon chez les chauffeurs routiers et dockers exposés régulièrement aux gaz d'échappement des moteurs diesel, avec une tendance significative à l'augmentation du risque avec la durée de la période d'emploi (16,17).
- La pollution atmosphérique. En Europe, l'étude ESCAPE (European Study of Cohorts for Air Pollution Effects) a analysé 17 études de cohortes et démontré que le risque de cancer du poumon lié à une exposition à des particules atmosphériques inférieures à $10\mu\text{m}$ est majoré

de 22 % et de 18 % pour des particules inférieures à 2.5µm. Cette étude établit également un lien entre l'intensité du trafic routier au voisinage du lieu de résidence et le risque de cancer bronchique (18).

- L'exposition à différentes substances telle que la silice cristalline, le cadmium, le chrome hexavalent, les composés du nickel, l'arsenic, le béryllium et le benzo(a)pyrène fait également partie des facteurs de risque de cancer du poumon.

Tous ces cancérogènes sont classés en groupe 1 par l'IARC, c'est-à-dire que ce sont des cancérogènes avérés pour l'homme.

Selon l'INVS (Institut national de veille sanitaire), l'exposition en milieu professionnel serait impliquée dans 15 à 30 % des cancers du poumon. Ainsi, de nombreux secteurs professionnels sont concernés : agriculture, bâtiment et travaux publics, céramiques et porcelaines, chimie, imprimerie, métallurgie, textile, etc... Dans le cas où le cancer est provoqué par un facteur professionnel, il peut être reconnu comme maladie professionnelle.

Même si la part de ces facteurs environnementaux et professionnels reconnus comme cancérogènes pour les poumons (radon, hydrocarbures aromatiques polycycliques, amiante...) reste inférieure à celle du tabagisme, le renforcement de la protection et du suivi des travailleurs exposés et la réduction de l'exposition de la population aux polluants atmosphériques et aux rayonnements ionisants restent également des actions prioritaires.

I.B. Classification anatomopathologique des cancers du poumon.

D'après un rapport d'experts de l'Inserm « Cancer et environnement » publié en 2008, la plupart des cancers du poumon sont des carcinomes (99 %) et se développent à partir de l'épithélium bronchique des voies respiratoires larges et moyennes et des alvéoles pulmonaires.

Il existe deux grandes catégories de cancer du poumon :

- Les carcinomes non à petites cellules, désignés par extension sous le terme de cancers bronchiques non à petites cellules (CBNPC), qui représentent 85 % des cancers du poumon et qui dérivent des cellules épithéliales de la muqueuse broncho-pulmonaire. Ils se subdivisent en trois types majeurs :
 - o Les adénocarcinomes (42,1 % des cancers bronchiques chez l'homme et 56,6 % chez la femme selon les dernières données de l'INCa) qui sont des tumeurs épithéliales avec une architecture glandulaire (présence de glandes et/ou d'une muco-sécrétion) ;
 - o Les carcinomes épidermoïdes ou squameux (26,7 % des cancers bronchiques chez l'homme et 12,7 % chez la femme selon les dernières données de l'INCa) qui sont des tumeurs épithéliales ayant une architecture malpighienne (présence de pont d'union ou de kératine) ;
 - o Et les carcinomes à grandes cellules (10-15 %) qui sont dotés d'une architecture indifférenciée avec de grandes cellules atypiques.
- Les carcinomes à petites cellules, désignés par extension sous le terme de cancers bronchiques à petites cellules (CBPC), qui représentent 11,3 % des cancers bronchiques chez l'homme et 11,6 % chez la femme (données INCa) et qui sont également d'origine épithéliale avec une différenciation neuroendocrine et la présence de cellules de petite taille ayant un fort rapport nucléo-cytoplasmique et des mitoses nombreuses.

Néanmoins, il faut garder à l'esprit que les cancers du poumon sont souvent hétérogènes sur le plan histologique du fait de la plasticité de la différenciation cellulaire au sein de la tumeur. En effet, on

distingue des tumeurs hybrides telles que les carcinomes adénosquameux ou les carcinomes pleïomorphes ainsi que des différenciations neuro-endocrines dans les CBNPC.

Tous les types histologiques de cancer bronchique sont associés au tabac (19), mais ce sont les adénocarcinomes qui sont préférentiellement retrouvés chez les fumeurs. L'augmentation de la proportion d'adénocarcinomes depuis les années 1950 est due à une augmentation du tabagisme et à une modification de la structure et de la composition des cigarettes. En effet, d'une part les cigarettes possèdent désormais des filtres qui pourraient être responsables d'une inspiration plus profonde dans l'arbre respiratoire le rendant plus exposé aux carcinogènes, et d'autre part, les cigarettes ont vu leur concentration en nitrosamines augmenter (19–21). Au niveau mondial, depuis les années 1980, la proportion d'adénocarcinomes chez les hommes semble se stabiliser alors qu'elle augmente chez les femmes qui se sont mises à consommer du tabac plus tardivement que les hommes (22).

En France, d'après les données recueillies par l'INCa, la répartition des cas incidents de cancer du poumon selon le type histologique a considérablement évolué ces trente dernières années. En effet, les adénocarcinomes dominent désormais tous les autres types histologiques, passant de 17,2 % entre 1990 et 1995 à 42,1 % entre 2010 et 2015 chez l'homme, et de 36,7 % à 56,6 % chez la femme. Les cancers épidermoïdes suivent l'évolution inverse puisque leur part passe de 51,5 % entre 1990 et 1994 à 26,7 % entre 2010 et 2015 chez l'homme, et de 27,3 % à 12,7 % chez la femme. Les cancers à petites cellules, quant à eux, ont sensiblement diminué entre 1990-1995 et 2010-2015 chez les deux sexes, passant de 14,0 % à 11,3 % chez l'homme, et de 15,0 % à 11,6 % chez la femme.

Ces tendances observées en France sont similaires à celles observées au niveau international (22,23). Cependant, aux Etats-Unis, en Australie et en Islande, l'incidence des adénocarcinomes chez l'homme semble se stabiliser depuis les années 1980 (22) et même diminuer depuis 2005 aux Etats-Unis (24). Chez la femme, l'adénocarcinome a toujours été le type histologique le plus répandu et sa proportion continue d'augmenter dans la plupart des pays. Néanmoins, une tendance à la diminution est observée chez les femmes nées après 1950 aux Etats-Unis, au Canada, au Danemark et en Australie (22).

A l'évidence, le pronostic de chaque patient dépend du type de cancer qu'il présente. Selon des données recueillies en Australie et aux Etats-Unis, la survie relative à 5 ans est d'environ 20 % pour les adénocarcinomes, 17,5 % pour les carcinomes épidermoïdes, 8 % pour les carcinomes à grandes cellules et 6,5 % pour les CBPC (6).

La classification anatomopathologique des cancers du poumon la plus actualisée est celle de l'OMS publiée en 2015 (25). Cette classification reprend et complète la classification de l'OMS de 2004 (26) et reprend les recommandations de l'« International Association for the Study of Lung Cancer/American Thoracic Society/European Respiratory Society International Multidisciplinary Classification of Lung Adenocarcinoma » publiées en 2011 (27).

Ne seront développés dans la suite de cette introduction que les CBNPC puisque ce sont ces types de cancers qui sont concernés par le projet de recherche faisant l'objet de cette thèse.

I.C. Caractérisation moléculaire des cancers du poumon.

Grâce aux progrès des techniques de biologie moléculaire, les cancers bronchiques sont désormais caractérisés selon les altérations génétiques responsables de l'oncogenèse pulmonaire.

Le projet du TCGA (The Cancer Genome Atlas) lancé en 2006, a permis de disposer de plus larges informations sur la caractérisation moléculaire des tumeurs. Ce projet vise, grâce à des

techniques de séquençage à haut débit et à des outils bio-informatiques, à recueillir et cataloguer les données génomiques, épigénomiques, transcriptomiques et protéomiques de 33 types de cancers. Ainsi, concernant le cancer du poumon, nous disposons des données génomiques de 230 adénocarcinomes (28), 178 cancers épidermoïdes (29) et 110 CBPC (30).

Ces études ont permis de confirmer et d'identifier de nouveaux gènes altérés dans les cancers bronchiques, que ce soit des oncogènes (*KRAS*, *EGFR*, *BRAF*, *MET*, *PI3KCA*), des gènes suppresseurs de tumeurs (*TP53*, *KEAP1*, *STK11*, *NF1*, *RB1*, *CDKN2A*), des gènes associés à la régulation de l'état chromatinien (*SETD2*, *ARID1A*, *SMARCA4*, *CREBBP*, *EP300*), des gènes associés à la régulation de l'ARN (*RBM10*, *U2AF1*), etc... Tout cela dans le but d'identifier de potentielles cibles thérapeutiques.

Ces données montrent également les voies de signalisation les plus fréquemment altérées dans les cancers bronchiques :

- Dans les adénocarcinomes, la voie RAS/RAF/MEK/ERK (76% des cas), la voie PI3K-AKT (25%), la voie de p53 (63%), les voies de régulation du cycle cellulaire (64%) , les voies de régulation du stress oxydatif (22%) et les voies de régulation de l'état chromatinien et de l'épissage des ARN (49%) sont les plus fréquemment altérées (28).

- Dans les cancers bronchiques épidermoïdes, il s'agit des voies régulant le stress oxydatif (34%), des voies impliquées dans la différenciation épidermoïde (44%), de la voie PI3K/AKT (47%) et des voies de régulation du cycle cellulaire (72%) (29).

Certaines des altérations géniques mises en évidence dans les tumeurs sont « ciblables » par des thérapies ciblées (EGFR, ALK, etc...). Leur identification pourra donc influencer la prise en charge des patients ainsi que leur pronostic. C'est pour cette raison que désormais, les altérations génétiques potentiellement ciblables sont systématiquement recherchées chez tous les patients atteints d'un cancer du poumon, on parle alors de la recherche de biomarqueurs.

Ces biomarqueurs peuvent être identifiés à partir de différents types d'échantillons biologiques et par différentes techniques de biologie moléculaire.

Obtenus à partir de méthodes plus ou moins invasives, les échantillons biologiques sur lesquels l'identification de ces biomarqueurs est réalisable sont (31) :

- Le tissu tumoral récupéré après la chirurgie ou issu d'une biopsie et conservé par inclusion en paraffine ou congélation.
- Les aspirations trans-bronchiques guidées par échographie ou trans-thoraciques.
- Les prélèvements sanguins.
- Le liquide pleural.
- Et les lavages broncho-alvéolaires.

Après recueil de ces échantillons biologiques, différentes techniques de biologie moléculaire peuvent être mises en œuvre (31) :

- Pour détecter les mutations, sont utilisées des méthodes qui recherchent un faible nombre d'altérations génétiques connues *a priori* comme par exemple la PCR (Polymerase Chain Reaction) à l'aide d'amorces Taqman®, le BEAMing ou encore la PCR digitale, ou bien des méthodes de séquençage qui permettent de détecter un plus large nombre d'altérations (Sanger, pyroséquençage ou NGS (Next Generation Sequencing)).
- Pour détecter les réarrangements géniques, les techniques employées sont la FISH (hybridation *in situ* en fluorescence), la PCR ou encore l'analyse de l'ARN.

Les biomarqueurs les plus fréquemment retrouvés dans les CBNPC de la population caucasienne sont les suivants (31,32) :

- Des mutations de KRAS dans 20 à 25 % des cas.
- Des altérations génétiques de l'EGFR dans environ 10 à 15 % des cas.

- Des translocations de ALK dans 3 à 5 % des cas.
- Des altérations génétiques de MET dans 2 à 5 % des cas.
- Des mutations de BRAF dans 2 % des cas.
- Des altérations de la voie PI3K/AKT dans 2 % des cas.
- Des translocations de RET dans 1 à 2 % des cas.
- Des translocations de ROS1 dans 1 % des cas.
- Et des mutations de HER2 dans 1 % des cas.

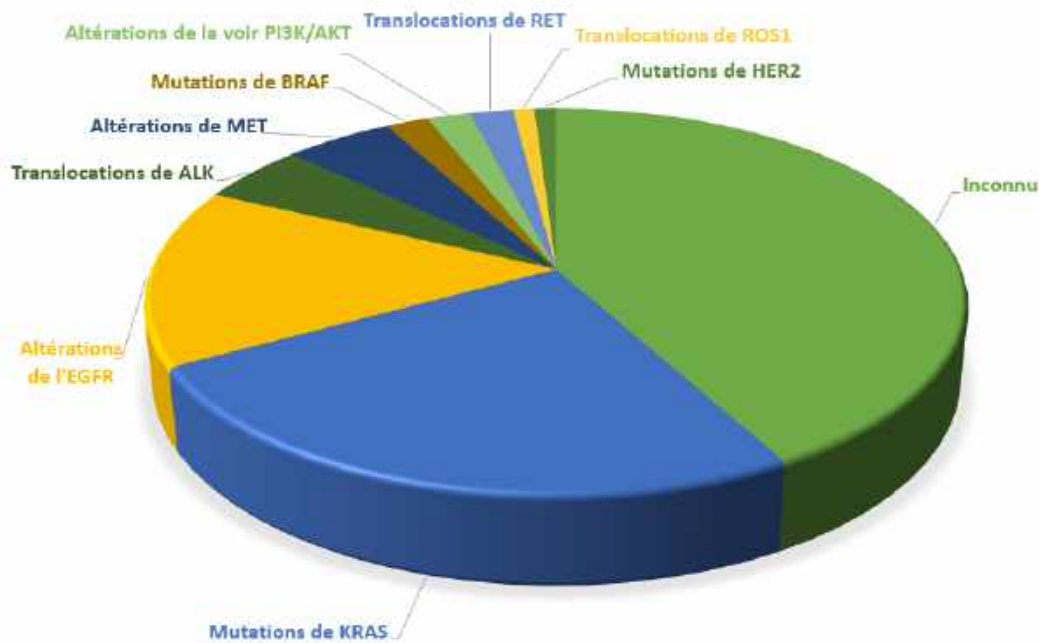


Figure 1 : Biomarqueurs génétiques des cancers bronchiques non à petites cellules (d'après Calvayrac et al., 2017).

Pour chacun des biomarqueurs cités, seront détaillés dans la partie « Thérapeutiques » de cette introduction, les différents types d'altérations retrouvées et leurs distributions, la description du mécanisme oncogénique médié par ces altérations et les médicaments indiqués ou en essais cliniques ciblant ces altérations.

I.D. Diagnostic des cancers du poumon.

(D'après le référentiel Auvergne Rhône-Alpes en oncologie thoracique, cancer bronchique non à petites cellules, 2020 et les données du Vidal Recos, mise à jour du 18 février 2020).

Le diagnostic de cancer bronchique est établi grâce à un certain nombre d'examen, certains vont permettre d'orienter vers le diagnostic de cancer du poumon et d'autres vont permettre un diagnostic de certitude.

Les examens permettant d'orienter le clinicien vers le diagnostic de cancer du poumon sont :

- L'examen clinique : il a pour but de faire un bilan de l'état général, des antécédents et des facteurs de risque du patient. Le diagnostic de cancer du poumon doit être évoqué devant toute symptomatologie thoracique persistante ou résistante aux traitements, surtout chez un patient fumeur ou ancien fumeur. Les signes cliniques évocateurs sont multiples : toux persistante, hémoptysie, symptômes d'obstruction bronchique, d'envahissement local ou liés à la présence d'une ou plusieurs métastases, altération de l'état général et perte de poids,

douleurs cervicales ou de l'épaule pour les tumeurs de l'apex, syndrome paranéoplasique.

- Les examens d'imagerie : la radiographie du thorax peut permettre de mettre en évidence une anomalie pulmonaire. Sinon le scanner thoracique, plus sensible que la radiographie pulmonaire, permet de révéler la présence d'une anomalie pulmonaire, sa taille et sa localisation et éventuellement de donner une indication sur le type de cellules impliquées. Un bilan d'extension est également réalisé afin d'évaluer l'extension loco-régionale de la tumeur et les potentielles lésions cérébrales et viscérales (IRM, TEP-TDM).

Le diagnostic de certitude est établi grâce à la caractérisation anatomopathologique du cancer. Cette caractérisation peut être réalisée directement sur la tumeur, sur les ganglions envahis ou éventuellement sur une métastase.

L'ensemble de ces examens va permettre de déterminer le stade tumoral qui conditionnera la prise en charge du patient. Ce stade est déterminé selon un système international de classification appelé TNM (Tumor, Nodes, Metastasis) (33). Comme l'indique son acronyme, il prend en compte :

- La taille de la tumeur primitive (T0 à T4).
- L'envahissement de ganglions lymphatiques régionaux (N0 à N3).
- La présence de métastases à distance (M0 ou M1).

Le tableau suivant donne les détails de la classification TNM :

Taille de la tumeur primitive (T)	Tx	Tumeur primitive ne pouvant être évaluée ou tumeur prouvée par la présence de cellules malignes dans les sécrétions broncho-pulmonaires mais non visibles aux examens radiologiques et endoscopiques.	
	T0	Pas d'évidence de tumeur primaire.	
	Tis	Carcinome in situ.	
	T1	Tumeur ≤ 3cm dans ses plus grandes dimensions entourée par du poumon ou de la plèvre viscérale sans évidence d'invasion proximale que les bronches lobaires à la bronchoscopie (c'est-à-dire pas dans les bronches souches).	
		T1a (mi)	Adénocarcinome peu invasif.
		T1a	Tumeur ≤ 1cm dans ses plus grandes dimensions.
		T1b	Tumeur > 1cm mais ≤ 2cm dans ses plus grandes dimensions.
	T2	Tumeur > 3cm mais ≤ 5cm ou présentant l'une des caractéristiques suivantes : - Envahissement de la bronche principale quelle que soit la distance par rapport à la bronche souche mais sans envahissement de la bronche souche. - Envahissement de la plèvre viscérale. - Présence d'une atélectasie ou d'une pneumonie obstructive qui s'étend à la région hilare, impliquant une partie ou tout le poumon .	
		T2a	Tumeur > 3cm mais ≤ 4cm dans ses plus grandes dimensions.
		T2b	Tumeur > 4cm mais ≤ 5cm dans ses plus grandes dimensions.
T3	Tumeur > 5cm mais ≤ 7cm dans ses plus grandes dimensions. ou associée à un ou plusieurs nodule(s) tumoral(aux) distinct(s) dans le même lobe que la tumeur primitive. ou avec envahissement direct d'une des structures suivantes : paroi thoracique (y compris les tumeurs de la plèvre pariétale et du sillon supérieur), le nerf phrénique, le péricarde pariétal.		
T4	Tumeur > 7cm dans ses plus grandes dimensions. Ou associée à un ou plusieurs nodule(s) tumoral(aux) distinct(s) dans un lobe du même côté que celui de la tumeur primitive. Ou avec envahissement de l'une des structures suivantes : diaphragme, médiastin, cœur, gros vaisseaux, trachée, nerf laryngé récurrent, œsophage, corps vertébraux et carène.		
Envahissement de ganglions lymphatiques régionaux (N)	Nx	Envahissement des nœuds lymphatiques régionaux non évaluable.	
	N0	Absence de métastase dans les ganglions lymphatiques régionaux.	
	N1	Présence de métastases ganglionnaires péri-bronchiques homolatérales et/ou hilaires homolatérales et intra-pulmonaires, incluant une atteinte par extension directe.	
	N2	Métastases dans le(s) ganglion(s) lymphatique(s) médiastinal(aux) et/ou sub-carénal(aux) homolatéral(aux).	
	N3	Métastases dans le médiastin controlatéral, le hile controlatéral, le scalène homolatéral ou controlatéral, ou le(s) ganglion(s) lymphatique(s) supra-claviculaire(s).	
Métastases à distance (M)	M0	Pas de métastase à distance.	
	M1	Présence de métastases :	
		M1a	Nodule(s) tumoral(aux) séparé(s) dans un lobe controlatéral ; tumeur avec nodule(s) pleural(aux) ou péricardique(s) ou épanchement pleural ou péricardique malin.
		M1b	Métastase extra-thoracique unique.
M1c	Métastases extra-thoraciques multiples dans un ou plusieurs organes.		

Tableau 2 : Classification TNM des cancers du poumon - 8ème édition- (d'après (33)).

Le stade TNM est qualifié de clinique (cTNM) s'il est déterminé à l'issue du bilan diagnostique mais il est souvent réévalué suite à la chirurgie, il est alors qualifié de pathologique (pTNM) et répond aux mêmes critères.

La classification TNM permet de définir quatre stades différents du cancer bronchique, numérotés de I à IV : les stades I et II pour les cancers localisés au thorax avec possiblement un ou plusieurs ganglions lymphatiques voisins de la tumeur atteints, le stade III pour les formes localement avancées et le stade IV pour les cancers métastatiques.

Plus le stade auquel le patient est diagnostiqué est avancé plus la survie globale à 5 ans est faible. Ceci démontre donc l'importance de rendre le diagnostic le plus précoce possible afin d'améliorer la prise en charge et ainsi la survie des patients (33).

La correspondance entre classification TNM et stadification I à IV des cancers du poumon est détaillée dans le tableau suivant. Ce tableau indique également les pourcentages de survie globale à 5 ans pour chaque stade.

	N0	N1	N2	N3	M1a-b quel que soit N	M1c quel que soit N
T1a	IA-1 (92%)	IIB (53%)	IIIA (36%)	IIIB (26%)	IV-A (10%)	IV-B (0%)*
T1b	IA-2 (83%)	IIB (53%)	IIIA (36%)	IIIB (26%)	IV-A (10%)	IV-B (0%)*
T1c	IA-3 (77%)	IIB (53%)	IIIA (36%)	IIIB (26%)	IV-A (10%)	IV-B (0%)*
T2a	IB (68%)	IIB (53%)	IIIA (36%)	IIIB (26%)	IV-A (10%)	IV-B (0%)*
T2b	IIA (60%)	IIB (53%)	IIIA (36%)	IIIB (26%)	IV-A (10%)	IV-B (0%)*
T3	IIB (53%)	IIIA (36%)	IIIB (26%)	IIIC (13%)	IV-A (10%)	IV-B (0%)*
T4	IIIA (36%)	IIIA (36%)	IIIB (26%)	IIIC (13%)	IV-A (10%)	IV-B (0%)*

Tableau 3 : Correspondance entre la classification TNM et le stade pour les cancers du poumon – 8ème édition (d'après (33)). Entre parenthèses figurent les pourcentages de survie globale à 5 ans pour chaque stade clinique, * la survie globale à 1 an des stades IV-B est de 10%.

I.E. Thérapeutiques mises en œuvre dans la prise en charge des cancers bronchiques non à petites cellules.

I.E.1. Chirurgie.

(D'après le référentiel Auvergne Rhône-Alpes en oncologie thoracique, cancer bronchique non à petites cellules, 2020 et les données du Vidal Recos, mise à jour du 18 février 2020).

Dans le cadre de la prise en charge du cancer du poumon, la chirurgie peut avoir plusieurs fonctions :

- Elle peut être à visée curative, ainsi elle a pour but une exérèse macroscopique et microscopique la plus complète possible de la tumeur. C'est le traitement de référence pour les stades localisés (I et II) éligibles et éventuellement pour le stade IIIA.
- Ou bien à visée palliative, ainsi elle permet de réduire le volume tumoral afin d'atténuer la douleur qu'elle engendre.

La chirurgie du poumon est réalisée le plus souvent par thoracotomie (incision de la paroi thoracique) ou bien par chirurgie thoracique vidéo-assistée (CTVA) qui est moins invasive et destinée aux tumeurs de petite taille sans envahissement ganglionnaire.

Le chirurgien peut choisir deux options (d'autres options existent mais elles sont moins pratiquées) :

- Une lobectomie qui consiste à l'exérèse d'un lobe pulmonaire dans sa totalité. Elle comprend aussi un curage ganglionnaire c'est-à-dire l'exérèse de la chaîne ganglionnaire correspondante.
- Une pneumonectomie, c'est-à-dire la résection totale du poumon où se trouve la tumeur associée à un curage ganglionnaire. Cette intervention, plus radicale, reste moins fréquente.

Après la chirurgie, les tissus d'exérèse sont transmis au laboratoire d'anatomopathologie et de biologie moléculaire. Leur analyse permettra de confirmer le diagnostic, d'évaluer l'efficacité de la chirurgie, de faire un bilan sur l'extension de la tumeur (envahissement ganglionnaire et des vaisseaux sanguins et lymphatiques), de rechercher d'éventuelles anomalies géniques ou biomarqueurs prédictifs de réponse à des thérapies ciblées qui permettront par la suite de guider les choix thérapeutiques.

1.E.2. Radiothérapie.

(D'après le référentiel Auvergne Rhône-Alpes en oncologie thoracique, cancer bronchique non à petites cellules, 2020 et les données du Vidal Recos, mise à jour du 18 février 2020).

Tout comme la chimiothérapie, la radiothérapie peut être :

- A visée curative soit en traitement d'induction afin de rendre une tumeur plus accessible à la chirurgie, soit adjuvante afin de consolider les effets de la chirurgie ou de la chimiothérapie dans l'objectif d'éviter les récives.
- A visée palliative ou symptomatique afin d'atténuer la douleur engendrée par la tumeur.

Elle peut être réalisée de façon concomitante à la chimiothérapie, ou bien avant ou après la chimiothérapie.

La radiothérapie est un traitement localisé qui repose sur l'utilisation de rayonnements ionisants qui peuvent être électromagnétiques (photons X ou γ) ou particulaires (particules chargées ou non). Ces rayonnements vont avoir une action directe sur les tissus et plus précisément sur les molécules d'ADN ainsi qu'une action indirecte via un phénomène de radiolyse de l'eau aboutissant à la synthèse de radicaux libres hautement réactifs sur l'ADN. Ces deux actions conduisent à des lésions de l'ADN irréversibles et donc à la mort des cellules cancéreuses ciblées.

On distingue deux techniques de radiothérapie : la radiothérapie externe lorsque la source d'irradiation est externe à l'organisme et la curiethérapie lorsque la source d'irradiation (radio-isotopes) est interne à l'organisme. Mais cette dernière technique n'est que très rarement utilisée pour traiter les cancers du poumon.

Dans le cadre du traitement du cancer du poumon, deux techniques de radiothérapie externe sont utilisées :

- La radiothérapie conformationnelle en trois dimensions (3D). Cette technique consiste en une irradiation ciblée de la zone à traiter guidée par des images en 3D de la zone à traiter et des organes avoisinants obtenues par scanner le plus souvent. Ceci permet de diriger le plus précisément possible les faisceaux d'irradiation à la tumeur tout en limitant l'irradiation des tissus sains voisins.
- La radiothérapie stéréotaxique. C'est une technique de haute précision basée sur l'utilisation de microfaisceaux convergents. Elle permet d'irradier de petits volumes mais à haute dose et s'adresse donc plutôt aux petites tumeurs non accessibles chirurgicalement ou à des patients non éligibles à la chirurgie.

En pratique, avant le traitement radio-thérapeutique à proprement parler, une étape de repérage de la zone à traiter est effectuée puis une étape de dosimétrie qui permet de calculer la distribution de la dose adéquate. Le traitement par radiothérapie s'étale ensuite sur cinq à sept semaines avec cinq séances par semaine.

Remarque : La radiofréquence, qui ne doit pas être confondue avec la radiothérapie, peut également être utilisée dans le traitement des cancers du poumon. Elle permet la destruction de la tumeur par la chaleur à l'aide d'une aiguille comprenant un introducteur et une électrode. Cette technique, peu invasive, s'adresse aux patients non opérables et pour des tumeurs limitées à 3 cm.

1.E.3. Chimiothérapies.

(D'après le référentiel Auvergne Rhône-Alpes en oncologie thoracique, cancer bronchique non à petites cellules, 2020 et les données du Vidal Recos, mise à jour du 18 février 2020)

On entend par chimiothérapie l'administration de médicaments ayant un effet cytotoxique sur les cellules tumorales.

I.E.2.a. Objectifs de la chimiothérapie.

La chimiothérapie a pour objectifs :

- Soit de réduire la masse tumorale avant d'envisager une chirurgie ou une radiothérapie, elle est alors qualifiée de néo-adjuvante.
- Soit de détruire les cellules tumorales résiduelles après une chirurgie afin d'éviter les récives, dans ce cas on parle de chimiothérapie adjuvante.
- Soit elle constitue le traitement de première intention des tumeurs non opérables ou chez les patients non éligibles à la chirurgie, elle a alors pour objectif une lyse la plus totale possible de la tumeur afin d'éviter les récives.
- Soit elle a une visée symptomatique afin de limiter les douleurs dues à la tumeur.
- Ou encore elle peut être utilisée comme traitement d'entretien après une réponse initiale.

I.E.2.b. Agents de chimiothérapie couramment utilisés.

Les agents de chimiothérapie sont souvent associés entre eux, on parle alors de poly-chimiothérapie. Ceci dans le but d'associer des molécules ayant des effets additifs ou synergiques.

Ils peuvent être administrés par différentes voies mais la voie intraveineuse (IV) et orale sont les plus utilisées. Souvent, l'adaptation de la dose administrée se fait en fonction du poids et de la taille du patient. Elle peut aussi se faire, selon les molécules, selon la fonction rénale du patient.

Les protocoles thérapeutiques varient selon les molécules utilisées mais souvent les chimiothérapies sont administrées par cycle de 21 jours (3 à 6 cycles).

Les chimiothérapies sont considérées comme des traitements « non ciblés » des cancers puisqu'elles ne sont pas spécifiques des cellules cancéreuses. Par conséquent, elles vont avoir de nombreux effets indésirables particulièrement sur les tissus à fort renouvellement, à savoir les tissus digestifs, hématologiques et cutanés. Ces effets indésirables sont à court terme et sont par exemple : des troubles cutanéomuqueux (alopécie, mucites, troubles cutanés), des troubles digestifs (nausées, vomissements, diarrhées), des troubles liés à la myélosuppression (une neutropénie entraînant un risque d'infection, une anémie provoquant fatigue et pâleur, et une thrombopénie pouvant engendrer un risque d'hématomes et de saignements), des troubles neurologiques (neuropathies périphériques).

La chimiothérapie, peut également engendrer des effets indésirables à long terme : risque de leucémie secondaire, troubles de la reproduction.

Les différentes classes de médicaments chimiothérapeutiques utilisées dans le traitement des cancers du poumon sont résumées dans le tableau suivant. Les classes les plus utilisées dans le traitement des cancers bronchiques sont : les sels de platine, les taxanes et les anti-métabolites.

Classe thérapeutique	Molécules	Mécanisme d'action	Toxicités	Mode d'administration
Sels de platine	Cisplatine Carboplatine	Agents alkylants ; Formation d'adduits avec l'ADN par des liaisons covalentes => Inhibition de la réplication et de la transcription => Mort des cellules tumorales	-Néphrotoxique -Neurotoxique -Émétique -Forte myélosuppression	IV
Alcaloïdes de la pervenche ou vinca-alcaloïdes	Vinorelbine	Poison du fuseau mitotique ; Inhibition de la polymérisation de la tubuline => blocage des cellules en métaphase => Mort des cellules tumorales	-Fortement émétique	-IV -per os
Taxanes	Docétaxel Paclitaxel (souvent associés aux sels de platine)	Poison du fuseau mitotique ; Inhibition de la dépolymérisation de la tubuline => blocage des cellules en métaphase => Mort des cellules tumorales	-Hypersensibilité -Forte myélosuppression -Alopécie -Neurotoxicité -Cardiotoxicité (docétaxel) -Syndrome de rétention hydrique et toxicité cutanée (paclitaxel)	IV
Anti-métabolites	Gemcitabine	Anti-métabolite pyrimidique ; Analogue structural de la cytidine => Incorporation frauduleuse à l'ADN => Inhibition de la réplication => Mort des cellules cancéreuses	-Néphrotoxicité -Toxicité digestive -Radiosensibilisation (à administrer à distance d'une radiothérapie)	IV
	Pémétréxed	Anti-folique ; Inhibition de la thymidylate synthétase => Inhibition de la synthèse des acides nucléiques => Apoptose des cellules tumorales	-Myélosuppression -Toxicité digestive -Hypersensibilité cutanée	IV
Inhibiteurs de topo-isomérase	Etoposide (inhibiteur de topo-isomérase II) Topotécane (inhibiteurs de topo-isomérase I).	Les topo-isomérase I et II => coupures transitoires de l'ADN (simple brin pour la I et double brin pour la II) => dénouement => réplication et transcription. Les inhibiteurs => stabilisation du complexe covalent entre l'enzyme et l'ADN => Accumulation de complexes de clivage => Apoptose des cellules tumorales.	-Forte myélosuppression -Alopécie -Toxicité digestive	-IV -per os

Tableau 4 : Différents médicaments de chimiothérapie utilisés dans le traitement des cancers du poumon.

I.E.4. Thérapies ciblées dirigées contre les mécanismes oncogéniques (hors inhibiteurs de l'activité tyrosine kinase de l'EGFR).

Toutes les altérations moléculaires mises en évidence dans les CBNPC sont aujourd'hui devenues des cibles thérapeutiques. Certaines ont permis le développement de médicaments

couramment utilisés dans la prise en charge de routine des patients, et d'autres font encore l'objet de recherches fondamentales ou cliniques.

Le tableau suivant résume les différents biomarqueurs du CBNPC, les types d'altérations et leur incidence ainsi que les molécules approuvées ou en cours d'essais cliniques les ciblant :

Gènes altérés	Types d'altérations	Pourcentage d'incidence	Médicaments approuvés	Molécules faisant l'objet d'essais cliniques
EGFR	Mutations	10-15	géfitinib, erlotinib, afatinib, osimertinib	rociletinib, olmutinib, nazartinib, naquotinib, etc...
KRAS	Mutations	20-25	-	AMG-510, MRTX849
ALK	Translocations	3-5	crizotinib, céritinib, alectinib, brigatinib, lorlatinib	entrectinib, ensartinib, repotrectinib, etc...
MET	Mutations Amplifications	2-5	crizotinib (RTU)	capmatinib, tepotinib, cabozantinib, savolitinib, tivantinib, onartuzumab, emibetuzumab, etc...
BRAF	Mutations	2	dabrafénib + tramétinib	vémurafénib, sorafénib, encorafénib, etc...
PI3K/AKT	Mutations	2	-	Inhibiteurs de mTOR (sirolimus, évérolimus, temsirolimus, ridaforolimus), inhibiteurs d'AKT (perifosine), inhibiteurs de PI3K
RET	Translocations	1-2	-	cabozantinib, vandetinib, sunitinib, selpercatinib, pralsetinib, etc...
ROS1	Translocations	1	crizotinib	céritinib, lorlatinib, entrectinib, cabozantinib, etc...
HER2	Mutations	1	-	afatinib, dacomitinib, lapatinib, nélatinib, pyrotinib, trastuzumab, pertuzumab

Tableau 5 : Les altérations moléculaires des CBNPC, leur incidence et leurs thérapeutiques. RTU : Recommandation temporaire d'utilisation.

La description des altérations de l'EGFR et des inhibiteurs de l'activité tyrosine kinase de l'EGFR sera réalisée dans la deuxième partie de cette introduction.

I.E.4.a. KRAS.

La protéine KRAS (V-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog) appartient à la famille des proto-oncogènes RAS (avec NRAS et HRAS). C'est une protéine G monomérique de 21kDa, codée par le gène KRAS situé sur le chromosome 12 et dont les fonctions dépendent de son état d'activation. Liée au GDP, la protéine KRAS est inactive alors que liée au GTP, elle est sous forme active et active à son tour les voies de signalisation situées en aval : la voie RAS/MEK/ERK, la voie PI3K/AKT, etc... qui contrôlent la prolifération, la différenciation et la survie cellulaire (Downward, 2003).

Dans les cancers bronchiques, des mutations activatrices de *KRAS* sont retrouvées dans 20 à 25 % des cas (31) alors que les mutations des autres membres de sa famille, *NRAS* et *HRAS*, ne sont retrouvées que dans moins de 1 % des cas (35).

Ces mutations activatrices de *KRAS* concernent le plus fréquemment le codon 12 et plus rarement les codons 13 et 61 (35,36). C'est la mutation G12C la plus retrouvée (52,2 % des cas) suivie des mutations G12V, G12D, G12A et G12S (avec respectivement 11,6 %, 7,2 %, 2,9 % et 1,5 % des cas) (37).

Comme l'ont confirmé plusieurs méta-analyses (38,39), les mutations de *KRAS* sont clairement associées au tabagisme puisque qu'on retrouve ces mutations environ 4 fois plus souvent chez les fumeurs que chez les non-fumeurs. Cependant, elles sont tout de même retrouvées chez environ 5 % de non-fumeurs (40).

Quelles que soient les mutations activatrices de *KRAS*, elles entraînent toutes une perte de l'activité GTPase de la protéine, une activité constitutive du récepteur et donc une activation continue des voies de signalisation d'aval impliquées dans la prolifération et la survie cellulaire responsables de l'oncogenèse pulmonaire (34,41).

Malheureusement, malgré plus de trois décennies de tentatives, aucun inhibiteur pharmacologique de *KRAS*, direct ou indirect, n'a pu être utilisé en clinique de routine (42). Parmi ces inhibiteurs figurent notamment les inhibiteurs de la farnésyltransférase (FTI) qui visent à empêcher la farnésylation et donc la forme pro-tumorale de *KRAS* (cf. partie III.B.7.).

Dernièrement, des espoirs se fondent sur deux inhibiteurs spécifiques de la mutation G12C de *KRAS*, l'AMG-510 et le MRTX849. L'AMG-510, en phase préclinique, a permis la régression de xénogreffes dérivées de lignées tumorales *KRAS*^{G12C} ou de tumeurs issues de patients *KRAS*^{G12C} et amélioré l'efficacité anti-tumorale des chimiothérapies, des thérapies ciblées et de l'immunothérapie. De plus, dans une première étude d'escalade de dose chez l'homme, l'AMG-510 a montré également une régression tumorale chez des patients atteints d'adénocarcinomes bronchiques *KRAS*^{G12C} (43). Le MRTX849 a également montré des régressions tumorales sur des modèles de xénogreffes dérivées de lignées tumorales *KRAS*^{G12C} ou de tumeurs issues de patients *KRAS*^{G12C} ainsi que chez des patients atteints de cancers bronchiques ou colorectaux *KRAS*^{G12C} (44). Ces molécules sont en cours d'essais cliniques de phase I/II dans le traitement des cancers solides *KRAS*^{G12C}.

I.E.4.b. ALK.

La protéine ALK (Anaplastic Lymphoma Kinase) fait partie de la famille des récepteurs à l'insuline et est également un récepteur à activité tyrosine kinase, elle est codée par le gène *ALK* situé sur le chromosome 2. Cette protéine a d'abord été identifiée au sein de l'oncogène de fusion *NPM-ALK*, qui correspond à une translocation entre les chromosomes 2 et 5 dans les lymphomes non hodgkiniens (45), puis dans les lymphomes de Hodgkin (46).

Dans les CBNPC, *ALK* est impliqué dans l'oncogène de fusion *EML4-ALK* qui résulte d'une courte translocation au sein du chromosome 2p (47,48), ou bien dans d'autres gènes de fusion avec d'autres partenaires tels que *KIF5B* (49).

Quel que soit le partenaire de fusion de *ALK*, ces translocations entraînent une activité constitutive et incontrôlée du récepteur ALK et donc une activation permanente des voies de signalisation qu'il contrôle : la voie PI3K/AKT, la voie STAT3 et la voie RAS/MEK/ERK. Ceci donnant lieu à une hyperactivation des signaux de survie et de prolifération au sein des cellules tumorales.

Les réarrangements de *ALK* sont retrouvés dans 3 à 5 % des CBNPC (31) et plus fréquemment chez des sujets jeunes et non-fumeurs ou fumeurs légers (50).

Ces réarrangements sont maintenant systématiquement recherchés chez les patients atteints de cancers bronchiques car ils peuvent désormais être traités par des thérapies ciblées, les inhibiteurs de ALK, dont le chef de file a été le crizotinib (51).

Il existe deux générations de molécules inhibitrices de ALK possédant une AMM (autorisation de mise sur le marché) en France, le crizotinib qui est un inhibiteur de première génération, l'alectinib et le céritinib qui appartiennent à la deuxième génération et qui viennent d'être rejoints par le brigatinib et le lorlatinib. Ce sont de petites molécules inhibitrices et sélectives du récepteur ALK et de ses variants oncogéniques. L'inhibition du récepteur empêche son activation et donc l'activation consécutive des voies de signalisation d'aval. Ceci a pour conséquences une inhibition puissante et sélective de la croissance et une induction de l'apoptose dans les cellules cibles responsables de l'oncogenèse pulmonaire. Ces médicaments sont administrés par voie orale, une ou deux fois/jour selon les spécialités et jusqu'à progression de la maladie ou survenue d'une toxicité inacceptable. Ils sont relativement bien tolérés, les effets indésirables les plus fréquents sont des éruptions cutanées, une diarrhée, des pneumopathies interstitielles, des toxicités hépatiques, des troubles visuels, des troubles hématologiques et lymphatiques. La mise en évidence des altérations géniques de *ALK*, *c-Met* et *ROS1* (selon les indications) doit être confirmée par des techniques spécifiques et validées avant l'instauration du traitement par inhibiteurs de ALK.

Le crizotinib est le chef de file de la classe. Alectinib et céritinib sont des molécules de 2^{ème} génération et l'alectinib est maintenant prescrit en première ligne ou bien après échec du crizotinib. En effet, en première ligne de traitement des CBNPC ALK-positifs et avancés, l'analyse intermédiaire de l'essai de phase III ALEX comparant alectinib et crizotinib, a mis en évidence que l'alectinib amène une meilleure efficacité et une moindre toxicité par rapport au crizotinib. Cet essai montre que le taux de réponse objective est supérieur avec l'alectinib (82,9 % *versus* 75,5 %), que la survenue d'une progression de la maladie ou d'un décès est moins fréquente avec l'alectinib (41 % *versus* 68 %) et que la progression métastatique cérébrale est moins fréquente avec l'alectinib (12 % *versus* 45 %) (52).

Le brigatinib, quant à lui, n'est indiqué qu'en cas d'échec du crizotinib mais son indication en première ligne n'est pas encore évaluée et sa place vis-à-vis des autres inhibiteurs de deuxième génération n'est pas encore définie.

Un nouvel inhibiteur, le lorlatinib (53), vient d'obtenir une ATUn (autorisation temporaire d'utilisation nominative) dans le traitement des formes résistantes soit à l'alectinib ou au céritinib utilisés en première ligne soit au crizotinib et à au moins un autre inhibiteur de ALK.

Malheureusement, tout comme les inhibiteurs de l'activité tyrosine kinase de l'EGFR, les inhibiteurs de ALK se confrontent à des mécanismes de résistance (54,55).

D'autres inhibiteurs de ALK sont en cours d'essai clinique : l'entrectinib, l'ensartinib, le repotrectinib, etc... (56).

I.E.4.c. MET.

La protéine MET, aussi appelée c-Met ou HGFR (Hepatocyte Growth Factor Receptor) est un récepteur à activité tyrosine kinase transmembranaire de 190 kDa constituée de deux sous-unités α et β . Elle est codée par le proto-oncogène *MET* situé sur le chromosome 7. Après fixation de son ligand, le HGF (Hepatocyte Growth Factor), le récepteur est capable de se dimériser, de s'autophosphoryler et par la suite d'activer les voies de signalisation d'aval : la voie RAS/MEK/ERK, la voie PI3K/AKT/mTOR, la voie STAT3 qui vont réguler différentes fonctions biologiques : survie, migration, invasion, angiogenèse, régénération tissulaire, transition epithelio-mésenchymateuse, etc... (57).

Dans les cancers bronchiques, les altérations de *MET* sont :

- Des mutations somatiques introniques conduisant à la délétion de l'exon 14 (28,58–64). L'exon 14 de *MET* code en partie pour le domaine juxta-membranaire intracellulaire de la protéine

MET et contient des éléments de régulation importants : la tyrosine 1003 et le site de liaison à la protéine CBL qui modulent l'activation du récepteur ainsi qu'un site d'ubiquitinylation favorisant la dégradation de la protéine (65).

- Ou bien des amplifications géniques (28,60–62,64,66,67).

Ces altérations sont présentes chez 2 à 5 % des patients atteints de CBNPC (31,68). Leur fréquence semble être plus importante chez les patients âgés (> 70 ans), chez les femmes et chez les fumeurs (58,63,64). Ces altérations aboutissent à une hyperactivation du récepteur et donc des voies de signalisation situées en aval, provoquant la cancérogénèse pulmonaire.

En termes de molécules inhibitrices de MET, de nombreuses études sur de faibles nombres de patients atteints de CBNPC et porteurs de ces altérations de *MET*, ont démontré que les inhibiteurs de MET tels que le crizotinib, le capmatinib, le cabozantinib ou encore le tépotinib, entre autres, sont capables d'entraîner des régressions tumorales (59,63,69). Si bien qu'actuellement, en France, le crizotinib possède une RTU (recommandation temporaire d'utilisation) dans le traitement des CBNPC localement avancés ou métastatiques et présentant une mutation de l'exon 14 de *MET*, après au moins une ligne de chimiothérapie à base de sel de platine associée ou non à une immunothérapie.

De nombreux autres inhibiteurs de ces altérations de *MET* sont actuellement en cours d'investigation clinique (68,70) avec par exemple :

- Le capmatinib qui possède une autorisation temporaire d'utilisation nominative dans le traitement des CBNPC avancés ou métastatiques porteurs d'une mutation de *MET* affectant l'exon 14, chez des patients ayant déjà reçu une première ligne de traitement et non éligible aux essais cliniques actuellement en cours.

Il est actuellement en cours d'essai clinique de phase II chez des patients atteints de CBNPC avancés ou métastatiques, non porteurs d'altérations de l'*EGFR* ou de *ALK* dans l'étude GEOMETRY Mono-1. Il est également en cours d'essai clinique chez des patients possédant également des altérations de l'*EGFR* en association avec un EGFR-TKI de première génération après échec d'un premier traitement par EGFR-TKI (71) ainsi qu'en association avec un EGFR-TKI de troisième génération en première ligne (NCT02335944).

- Le tepotinib qui est actuellement en essai clinique de phase II dans le traitement des adénocarcinomes du poumon de stade IIIB/IV présentant une mutation de *MET* affectant l'exon 14, après échec d'au moins une ligne de traitement comprenant une chimiothérapie à base de sels de platine (étude MS200095-0022).
- D'autres inhibiteurs sont en cours d'essai clinique parfois en association avec des EGFR-TKI ou de l'immunothérapie (clinicaltrials.gov).

I.E.4.d. BRAF.

La protéine BRAF (V-Raf Murine Sarcoma Viral Oncogene Homolog B) appartient à la famille des sérine/thréonine kinases. Elle est codée par le gène *BRAF* situé sur le chromosome 7. Cette kinase appartient à la voie de signalisation des MAP kinase, la voie RAS/MEK/ERK : en s'associant à CRAF, BRAF va activer par phosphorylation les kinases MEK puis ERK. La protéine ERK ainsi activée peut transloquer dans le noyau des cellules et réguler la transcription de gènes impliqués dans la prolifération, la différenciation, l'angiogenèse et l'équilibre survie/apoptose (72).

Les mutations de *BRAF* se situent dans le domaine sérine/thréonine kinase de la protéine et provoquent une hyperactivation de BRAF et de sa voie. Dans les cancers bronchiques ces mutations sont retrouvées dans environ 2 % des cas (32,73) et de façon plus fréquente chez les femmes (65 %) et les fumeurs (71 %) (73).

Les mutations de *BRAF* les plus fréquemment retrouvées sont des mutations ponctuelles avec (74) :

- La mutation c.1799T>A qui donne lieu à la substitution d'une valine par un glutamate sur le codon 600 de la protéine (V600E) et qui représente 50% des cas.

- La mutation G469A dans 39% des cas.
- Et la mutation D594G dans 11% des cas.

Ces mutations sont désormais recherchées de manière systématique chez les patients atteints de cancers bronchiques.

Les patients porteurs de ces mutations pourront bénéficier de thérapies ciblées dirigées contre la voie RAS/MEK/ERK ; à savoir la combinaison d'un inhibiteur de BRAF, le dabrafénib, et d'un inhibiteur de MEK1/2, le tramétinib. L'association de ces deux mécanismes va donc permettre une double inhibition de la voie RAS/MEK/ERK constitutivement active dans les cancers porteurs de mutations activatrices de *BRAF* permettant ainsi une forte activité anti-tumorale (75). Ces deux médicaments sont administrés par voie orale jusqu'à récurrence ou survenue d'une toxicité inacceptable. Ces molécules sont relativement bien tolérées puisque les effets indésirables les plus fréquents (incidence $\geq 20\%$) avec l'association du dabrafénib avec le tramétinib sont : pyrexie, fatigue, nausées, frissons, céphalées, diarrhée, vomissements, arthralgie, et éruptions cutanées.

L'efficacité de cette association dans cette indication a été évaluée par deux essais cliniques :

- L'un portant chez des sujets qui n'avaient encore reçus aucun traitement. Cet essai montre que la réponse globale obtenue avec l'association est de 64 % avec 6 % de réponses complètes et 58 % de réponses partielles et que la médiane de survie sans progression est de 10,9 mois et de survie globale de 22,6 mois (76).
- Et l'autre chez des patients préalablement traités par au moins une ligne de chimiothérapie à base de sels de platine. Cet essai montre que la réponse globale obtenue avec l'association est de 63 % et que la médiane de survie sans progression est de 9,7 mois (77).

Le dabrafénib seul a également montré son efficacité chez les patients atteints de CBNPC avancés et porteurs de la mutation *BRAF*^{V600E} en première ou deuxième ligne dans un essai de phase II (78), mais il ne possède une autorisation en France qu'en association avec le tramétinib.

D'autres inhibiteurs de BRAF font l'objet d'essais cliniques dans les cancers du poumon, le vémurafénib et le sorafénib par exemple (79,80).

I.E.4.e. Voie PI3K/AKT.

Les PI3Ks (phosphoinositide 3-kinase) sont des kinases composées d'une sous-unité régulatrice de 85 kDa et d'une sous-unité catalytique de 110 kDa. Elles sont capables de phosphoryler le phosphatidyl-inositol biphosphate (PIP2) en phosphatidyl-inositol triphosphate (PIP3) à la membrane cellulaire, ce qui permet par la suite le recrutement d'AKT et l'activation de la voie PI3K/AKT/mTOR. La réaction inverse de passage du PIP3 au PIP2 est catalysée par la phosphatase PTEN qui est codée par un gène suppresseur de tumeur. Les différentes isoformes des PI3Ks sont divisées en 3 classes (I à III). Les membres de la classe I sont les plus connus avec PI3KCA possédant une sous-unité p110 α , PI3KCB (sous-unité β), PI3KCG (sous-unité γ) et PI3KCD (sous-unité δ).

La voie PI3K/AKT/mTOR est engagée dans de nombreux processus cellulaires : survie, différenciation, prolifération, métabolisme, trafic vésiculaire, migration, régulation du cytosquelette d'actine, etc... (81). Cette voie est fréquemment altérée dans de nombreux cancers notamment les cancers du sein, des ovaires, de la tête et du cou et les cancers colorectaux (82).

Dans les cancers bronchiques, on retrouve en majorité (83) :

- Des pertes de fonctions de *PTEN* soit par perte d'hétérozygotie (84,85) qui est mise en évidence dans 42 % des CBPC et dans 27 % des CBNPC, soit par mutations qui concernent les exons 1 à 9 (86,87) et sont retrouvées dans 10 % des CBPC et dans 2 à 5 % des CBNPC .
- Des altérations de *PI3KCA* avec soit des mutations identifiées dans 3 à 10 % des CBPC et dans 0 à 2,7 % des CBNPC, soit des amplifications géniques retrouvées dans 35 % des CBPC et dans 7 % des CBNPC. Les mutations de *PI3KCA* concernent principalement les exons 9 et 20 et

peuvent concerner la sous-unité p110 avec principalement 3 résidus : E542, E545 et H1047 (E542K, E545K, E545Q, H1047R) (88,89) ou bien la sous-unité p85 plus rarement (R38H, G106V, C420R et E453Q) (90).

- Des mutations activatrices d'*AKT1* dans 1 à 2 % des carcinomes épidermoïdes avec la mutation E17K (91–95).

De nombreux inhibiteurs ciblant cette voie ont été testés, que ce soit des inhibiteurs de mTORC1 (rapamycine, évérolimus, temsirolimus), des inhibiteurs de l'activité catalytique de mTOR, des inhibiteurs spécifiques de PI3K, des inhibiteurs doubles PI3K/mTOR ou bien des inhibiteurs d'AKT, mais aucun n'a, à ce jour, passé la barre des essais cliniques afin d'être utilisé en routine (96).

I.E.4.f. RET.

RET est un proto-oncogène situé sur le chromosome 10 qui code pour le récepteur à activité tyrosine kinase RET appartenant à la famille GDNF (Glial cell line-Derived Neurotrophic Factor) (97).

Ce récepteur subit des réarrangements dans 1 à 2 % des CBNPC (98) afin de former des gènes de fusion avec différents partenaires (*KIF5B*, *CCDC6*, *NCO4A*) (98–104). Ces translocations vont rendre le récepteur RET hyperactif ainsi que les voies de signalisation qu'il contrôle ; à savoir la voie RAS/MEK/ERK, la voie STAT3 et la voie PI3K/AKT qui régulent la prolifération, la survie, la migration cellulaire, etc... De plus, ces translocations sont préférentiellement retrouvées chez des patients jeunes (< 70 ans) et non-fumeurs (98).

De nombreux inhibiteurs de RET sont actuellement en cours d'évaluation clinique, aucun n'est spécifique de RET. Ces évaluations cliniques, pour la plupart de phase II ou bien rétrospectives, sont réalisées chez des cohortes de patients de petite taille (99,105). L'étude la plus étendue est l'étude rétrospective GLORY (105) portant sur 53 patients atteints de CBNPC porteurs d'un réarrangement de *RET* et ayant reçu un traitement par cabozantinib (inhibiteur de VEGFR2, MET, AXL, c-KIT, FLT3, TIE2 et RET) ou vandétinib (inhibiteur de VEGFR, EGFR et RET) ou sunitinib (inhibiteur de VEGFR1-3, PDGFRB, c-KIT, FLT3 et RET) ou d'autres inhibiteurs (sorafénib, alectinib, lenvatinib, nintedanib, ponatinib ou regorafenib). Les taux de réponse (complète et partielle) ont été de 37 % avec le cabozantinib, 18 % avec le vandétinib et 22 % avec le sunitinib. A ce jour, l'analyse globale des essais en cours et des essais de plus grande ampleur sont nécessaires pour pouvoir utiliser une de ces molécules en clinique de routine.

Récemment, deux inhibiteurs sélectifs de RET ont été développés et ont fait l'objet d'essais cliniques : le selpercatinib (LOX0-292) et le pralsetinib (BLU-667).

Comme rapporté au congrès de l'IASLC (International Association for the Study of Lung Cancer) en 2019, dans l'essai de phase I/II LIBRETTO-001, l'utilisation du selpercatinib chez des patients atteints d'un CBNPC porteurs d'un réarrangement de *RET* précédemment traités par une ou plusieurs lignes de traitement a permis un taux de réponse objective de 68% et une médiane de survie sans progression de 20,3 mois. De plus, cette molécule est capable de passer la barrière hémato-encéphalique lui conférant une bonne activité sur les métastases cérébrales mesurables avec un taux de réponse objective de 91 %. Concernant la toxicité, les effets indésirables rapportés ont majoritairement été de bas grade et seulement 1,7 % des patients ont interrompu le traitement à cause d'un effet indésirable lié au traitement.

Le pralsetinib, quant à lui, est évalué dans l'essai de phase I/II ARROW chez des patients atteints d'un CBNPC porteurs d'un réarrangement de *RET* précédemment traités par une ou plusieurs lignes de traitement. Comme rapporté au congrès de l'ASCO (American Society of Clinical Oncology) en 2019, le pralsetinib a montré un taux de réponse objective de 56 %, un taux de contrôle de la maladie de 91 % et une activité sur les métastases cérébrales. De plus, d'une part la majorité des effets indésirables observés étaient de bas grade et réversibles et d'autre part seulement 3 % des patients

ont arrêté le traitement pour cause d'évènement indésirable lié au traitement. Ces deux molécules font donc l'objet d'une demande d'AMM en France à ce jour.

I.E.4.g. ROS1.

ROS1 (V-Ros Avian UR2 Sarcoma Virus Oncogene Homolog 1), aussi appelé c-ROS, est un récepteur à activité tyrosine kinase de la famille des récepteurs à l'insuline, il est codé par le proto-oncogène *ROS1* situé sur le chromosome 6 (106). Les translocations du gène *ROS1* ont d'abord été mises en évidence dans une lignée de glioblastome dans laquelle *ROS1* forme un gène de fusion avec le gène *FIG* (107) puis dans une tumeur de glioblastome où *ROS1* est fusionné avec le gène *CEP85L* (108).

Des translocations de *ROS1* ont ensuite été identifiées dans de nombreux cancers dont les cancers bronchiques dans lesquels il est capable de fusionner avec de nombreux partenaires (*SLC34A2*, *CD74*, *TPM3*, *SDC4*, *EZR*, *LRIG3*, *KDELRL2* et *CCDC6*) (49,104,109,110). Dans les CBNPC, les translocations de *ROS1* sont retrouvées dans 1 à 2 % des cas (111). Ces translocations entraînent une hyperactivation du récepteur et donnent lieu à l'activation des voies RAS/MEK/ERK, PI3K/AKT et STAT3 responsables de l'oncogenèse pulmonaire. Comme les translocations de *ALK*, les réarrangements de *ROS1* sont aussi plus fréquemment retrouvés chez les non-fumeurs et chez les patients jeunes (111).

Le crizotinib, capable d'inhiber à la fois ALK, c-MET et ROS1, a rapidement été testé chez les patients atteints d'un CBNPC et porteurs d'un réarrangement de *ROS1*. Il a donné lieu à des taux de réponse objective très bons, de l'ordre de 70 à 80 % (111–113). Par exemple, l'essai clinique PROFILE 1001 de phase I a permis d'évaluer l'efficacité du crizotinib chez des patients atteints de CBNPC ROS1-positifs prétraités ou non. Cet essai a montré un taux de réponse objective de 72 % avec une médiane de survie sans progression de 19,3 mois et une médiane de survie globale de 51,4 mois. Les probabilités de survie à 1, 2, 3 et 4 ans étaient respectivement de 79 %, 67 %, 53 % et 51 %. De plus, le profil de tolérance du crizotinib a été le même que celui observé chez les patients ALK-positifs étudiés dans les essais cités précédemment (113,114). Ainsi, cet inhibiteur possède en France une AMM dans le traitement des CBNPC ROS1-positifs et avancés.

Malheureusement, des mécanismes de résistance au crizotinib chez les patients ROS1-positifs sont déjà mis en évidence, ce sont des mutations retrouvées au niveau du domaine kinase de *ROS1* (G2032R majoritairement) (115). D'autres inhibiteurs de ROS1 sont donc en cours d'évaluation clinique (céritinib, lorlatinib, entrectinib, cabozantinib et bien d'autres) (116).

I.E.4.h. HER2.

HER2 (human epidermal growth factor 2), aussi appelée erbB2/neu, est une glycoprotéine transmembranaire de 185 kDa à activité tyrosine kinase codée par le gène *ERBB2* situé sur le chromosome 17. Ce récepteur ne possède pas de ligand propre mais il est capable de former des homo- ou des hétéro-dimères avec les autres membres de la famille erbB (EGFR, HER3, HER4). Il contrôle donc les voies de signalisation intracellulaires PI3K/AKT, RAS/MEK/ERK entre autres qui régulent la survie et la prolifération cellulaire (117).

Dans les CBNPC, les altérations de *HER2* identifiées sont des mutations ou bien des amplifications de *HER2* ou des surexpressions de *HER2*.

Les mutations de *HER2* sont majoritairement des insertions au niveau de l'exon 20 (118,119). Ces mutations sont retrouvées dans environ 1 à 4 % des CBNPC (119–126) et induisent une activité constitutive du récepteur et donc une hyperactivation des voies de signalisation situées en aval et responsables de l'oncogenèse bronchique (127). De plus, ces mutations sont plus fréquemment

identifiées chez les femmes, les non-fumeurs et les cancers bronchiques de type adénocarcinome, tout comme les altérations de l'*EGFR* (119–126).

Les surexpressions de la protéine HER2 et les amplifications du gène *HER2* sont présentes dans 6 à 47 % et dans 2 à 22 % des CBNPC, respectivement (128–130,118,131–134).

Il a été montré que des patients atteints de cancer bronchique présentant des altérations de *HER2* peuvent bénéficier d'inhibiteurs de HER2 tels que :

- Des inhibiteurs de l'activité tyrosine kinase pan-HER avec l'afatinib, le lapatinib, le nératinib et le dacomitinib (135–141) ou des inhibiteurs spécifiques de HER2 avec le poziotinib et le pyrotinib (142,143).
- Des anticorps monoclonaux (trastuzumab, pertuzumab) (137).
- Ou bien des traitements reposant sur la conjugaison d'un anticorps avec un cytotoxique tels que le trastuzumab-emtansine (T-DM1) (137,144,145) ou le trastuzumab-deruxtecan (T-DXd) (146).

I.E.5. Thérapies ciblées dirigées vers le microenvironnement tumoral.

I.E.5.a. Inhibiteurs du VEGF.

L'angiogenèse est cruciale pour la croissance tumorale et la dissémination métastatique, et le VEGF joue un rôle fondamental dans ce processus. D'où le développement d'inhibiteurs du VEGF. Les inhibiteurs de VEGF indiqués dans le cancer du poumon sont le bévacizumab et le ramucirumab.

Ces médicaments sont administrés par voie IV en perfusion, toutes les 2 ou 3 semaines selon l'indication. Ces molécules peuvent entraîner la survenue ou l'aggravation d'une hypertension artérielle (HTA) qui doit être surveillée chez les patients présentant des antécédents d'HTA (protéinurie). Elles peuvent aussi provoquer des effets indésirables graves : perforations gastro-intestinales, évènements thromboemboliques artériels, hémorragies.

Le bévacizumab est un anticorps monoclonal humanisé dirigé contre le VEGF qui va empêcher la fixation du VEGF endogène à son récepteur à la surface des cellules endothéliales. Ceci conduit à l'inhibition de la formation de néovaisseaux tumoraux et à la régression ou normalisation des néovaisseaux préexistants nourrissant la tumeur. Ce médicament altère le processus de cicatrisation. Par conséquent, le traitement par bévacizumab doit être suspendu en cas d'intervention chirurgicale durant 28 jours ou du moins jusqu'à cicatrisation des plaies.

Il est indiqué en première ligne dans :

- Les CBNPC avancés et non opérables, métastatiques ou en rechute en association à une chimiothérapie à base de sels de platine, lorsque l'histologie n'est pas à prédominance épidermoïde.

L'essai clinique de phase III AVAiL a comparé l'association du bévacizumab avec une chimiothérapie associant cisplatine et gemcitabine à la chimiothérapie seule. Il indique que l'adjonction du bévacizumab augmente la survie sans progression qui passe d'une médiane de 6,1 mois en absence de bévacizumab à 6,7 mois s'il est administré à la posologie de 7,5 mg/kg ou à 6,5 mois à la posologie de 15 mg/kg (147,148).

- Les CBNPC non épidermoïdes, présentant des altérations géniques de l'*EGFR*, en association avec l'erlotinib.

L'essai clinique de phase II JO25567 a comparé l'association erlotinib + bévacizumab à l'erlotinib seul en première ligne chez des patients atteints de CBNPC EGFR-mutés non épidermoïdes. Cet essai démontre que l'adjonction du bévacizumab améliore la survie sans progression avec une médiane qui passe de 9,7 mois à 16 mois, tout en n'augmentant pas la toxicité puisque la proportion d'effets indésirables graves reste la même entre les deux bras, sauf pour l'hypertension qui augmente la

proportion d'effets indésirables de grade 3 ou plus dans le bras avec le bévacizumab (149,150). Plus récemment, l'essai clinique de phase III NEJ026 faisant suite à cet essai de phase II confirme dans son analyse intermédiaire que l'adjonction du bévacizumab améliore la survie sans progression avec une médiane qui passe de 13,3 mois à 16,9 mois. Néanmoins, les effets indésirables liés au traitement sont majorés dans le bras erlotinib + bévacizumab comparé au bras erlotinib seul (151).

Le Ramucirumab est un anticorps monoclonal recombinant humain de type IgG1 dirigé contre le VEGF2. Il dispose d'une AMM :

- Dans le traitement des CBNPC localement avancés ou métastatiques après progression suite à une chimiothérapie à base de sels de platine et en association avec le docétaxel.

L'essai clinique de phase III REVEL a permis de comparer un bras docétaxel + ramucirumab à un bras docétaxel seul chez des patients atteints de CBNPC épidermoïdes ou non et ayant reçu une première ligne de chimiothérapie à base de sels de platine. Les résultats de cet essai démontrent que l'ajout du ramucirumab au traitement par docétaxel permet d'améliorer la survie globale (médiane de 8,3 mois pour l'association contre 6,3 mois pour le docétaxel seul), la survie sans progression (médiane de 4 mois *versus* 2,5 mois) et le taux de réponse objective (22,5 % *versus* 12,6 %), tout en n'augmentant pas la survenue d'événements indésirables (152,153).

- Et dans le traitement des CBNPC EGFR-mutés, en association avec l'erlotinib.

L'essai clinique de phase III RELAY a évalué l'efficacité et la sécurité de l'association ramucirumab + erlotinib comparé à l'erlotinib seul. Les résultats de l'analyse intermédiaire de cet essai indiquent que l'ajout de l'anti VEGF améliore la survie sans progression avec une médiane qui passe de 12,4 mois à 19,4 mois, mais au prix d'une augmentation d'effets indésirables de grade 3 et 4 (72 % avec la combinaison *versus* 54 % avec l'erlotinib seul) tels que l'hypertension artérielle (154).

Ainsi, à ce jour, le bévacizumab occupe plutôt une place en première ligne, en association avec la chimiothérapie ou l'erlotinib, dans les cancers non épidermoïdes, alors que le ramucirumab est lui placé en deuxième ligne, toujours en association avec la chimiothérapie ou l'erlotinib, quelle que soit l'histologie du cancer. Pour autant l'intérêt du ramucirumab sur le bévacizumab ou inversement n'a, à ce jour, pas encore fait l'objet d'essais cliniques (155).

Un autre anti-angiogénique, le nintedanib, a démontré une efficacité en association avec le docétaxel en deuxième ligne de traitement des CBNPC de toute histologie, mais il ne possède pas pour l'instant d'autorisation en France (156).

Malgré les bons résultats obtenus avec les anti-VEGF, aucun biomarqueur moléculaire (VEGF, bFGF, ICAM, E-cadhérine) permettant de prédire la réponse à ces inhibiteurs n'a été validé à ce jour afin d'optimiser le bénéfice clinique apporté par ces molécules (155).

I.E.5.b. Immunothérapie.

Immunité et cancer :

L'idée que le système immunitaire pouvait jouer un rôle dans la suppression ou la promotion du cancer a été un sujet à débat depuis plus d'un siècle. Ce n'est que dans les années 1950 que le concept d'immunosurveillance des cancers de Burnet et Thomas est né, ce concept envisage que l'immunité adaptative est capable de prévenir le développement du cancer chez des sujets immunocompétents. Ce concept a par la suite été beaucoup débattu dans la communauté des immunologistes, pour finalement finir par être admis et complété dans les années 1990 après l'amélioration des connaissances sur le système immunitaire et notamment la mise en évidence des antigènes tumoraux. Désormais, il est admis que le système immunitaire joue trois rôles distincts dans la prévention du cancer : il protège l'hôte contre les infections virales et inhibe donc les tumeurs induites par des virus ; il prévient l'établissement d'un environnement inflammatoire qui contribue à la tumorigénèse ; il élimine les cellules tumorales dans certains tissus grâce à la reconnaissance de ligands

spécifiques et d'antigènes tumoraux exprimés par les cellules tumorales par les cellules du système immunitaire inné et adaptatif (157).

En 2001, le concept d'immunogénicité des tumeurs voit le jour, il met en évidence que le système immunitaire est capable de contrôler la « quantité » tumorale mais aussi sa qualité en sélectionnant les cellules tumorales les plus à même de survivre et d'être responsables d'un échappement (158). Ainsi, le concept d'immunosurveillance est donc actualisé et remplacé par le concept d'immunoediting (159). Ce processus comprend trois phases :

- Une phase d'élimination qui correspond à l'immunosurveillance. Suite notamment à l'émission de signaux de danger (INF de type I) et à l'expression d'antigènes tumoraux à la surface des cellules tumorales, le système immunitaire inné (cellules NT, macrophages, cellules dendritiques, mastocytes etc...) et le système immunitaire adaptatif (lymphocytes B et T) vont être activés et collaborer afin de détecter les cellules tumorales et de les détruire. A l'issue de cette phase, toutes les cellules tumorales peuvent être éliminées, le sujet sera donc exempt de cancer. *A contrario*, une partie des cellules peut résister et entrer dans la phase d'équilibre.
- Une phase d'équilibre. Durant cette phase, le système immunitaire adaptatif va maintenir les cellules tumorales restantes dans un état de dormance fonctionnelle. A ce moment-là, deux cas de figure peuvent avoir lieu : soit l'équilibre est maintenu et le cancer devient occulte durant une période plus ou moins longue, soit les cellules tumorales vont évoluer et subir l'étape d'immunogénicité. Les cellules tumorales vont alors pouvoir soit ne plus être reconnues par l'immunité adaptative (perte d'antigènes tumoraux ou défaut de leur présentation), soit devenir insensibles aux mécanismes immunitaires effecteurs, soit induire un microenvironnement tumoral immunosuppresseur. Ces cellules vont alors pouvoir entrer dans la phase d'échappement.
- Une phase d'échappement où les cellules tumorales vont retrouver leurs capacités prolifératives et donc induire la formation d'une véritable tumeur clinique.

L'immunothérapie va donc avoir pour objectif de réveiller le système immunitaire et de l'éduquer pour qu'il puisse éliminer les cellules tumorales. Pour cela, l'immunothérapie recèle différents outils :

- Des cytokines de synthèse (IL-2 et INF- α) qui vont stimuler la réponse immunitaire globale.
- Des vaccins thérapeutiques qui vont avoir pour but de stimuler et de diriger le système immunitaire spécifiquement contre les cellules cancéreuses, en lui présentant un antigène tumoral capable de déclencher une réponse immune efficace.
- Des approches de thérapie cellulaire et génétique avec les cellules CAR-T (Chimeric Antigen Receptor-T) ou transfert adoptif de cellules qui ont vocation à modifier génétiquement les cellules immunitaires du patient, afin de les armer contre la tumeur. Concrètement, les lymphocytes T du patient lui sont prélevés, modifiés *in vitro* de façon à exprimer à leur surface un récepteur qui sera capable de reconnaître l'antigène tumoral, multipliés puis réinjectés au patient où ils vont pouvoir lyser les cellules tumorales.
- Des immuno-modulateurs ou inhibiteurs de points de contrôle immunitaire qui vont lever les mécanismes d'inhibition du système immunitaire induits par la tumeur.

Dans le cadre du cancer du poumon, beaucoup de ces stratégies sont en cours d'évaluation dans de nombreux essais cliniques. A ce jour, seuls des immuno-modulateurs ont obtenu l'AMM pour des indications dans la prise en charge des cancers bronchiques.

Les stratégies d'immuno-modulation : (160,161).

Lors d'une réponse immunitaire, l'activation des lymphocytes T exige deux signaux :

- Un premier signal qui est dépendant de l'antigène et qui consiste en la reconnaissance de l'antigène tumoral présenté par une molécule du CMH (Complexe Majeur d'Histocompatibilité) à la surface d'une cellule présentatrice d'antigène (CPA) (cellules

dendritiques, monocytes, macrophages, lymphocytes B, cellule tumorale) par le TCR (Récepteur des cellules T) à la surface du lymphocyte T.

- Un second signal dit de co-stimulation qui peut être activateur ou inhibiteur :
 - o S'il y a interaction entre CD86 (aussi appelé B7-1) à la surface de la CPA et CD28 à la surface du lymphocyte T c'est un co-signal activateur du lymphocyte qui va alors s'activer et pouvoir lyser la cellule tumorale.
 - o S'il y a interaction entre CD80 (aussi appelé B7-2) à la surface de la CPA et CTLA4 à la surface du lymphocyte T le co-signal est inhibiteur et le lymphocyte T ne sera pas activé.

Il existe d'autres signaux activateurs ou inhibiteurs :

- L'interaction entre PDL2 ou PD-L1 à la surface de la CPA et PD-1 à la surface du lymphocyte T est inhibitrice de l'activation du lymphocyte T.
- L'interaction entre CD40 à la surface de la CPA et CD40-L à la surface du lymphocyte T est activatrice de l'activation du lymphocyte T.
- L'interaction entre CD137-L à la surface de la CPA et CD137 à la surface du lymphocyte T est activatrice de l'activation du lymphocyte T.
- Etc...

En situation physiologique, c'est l'équilibre complexe entre les signaux activateurs et les signaux inhibiteurs qui détermine si une cellule immunitaire peut s'activer. Ce phénomène est primordial afin de prévenir le risque d'autoimmunité (récepteurs inhibiteurs) mais aussi de renforcer l'activation du système immunitaire en cas d'infection par exemple (récepteurs activateurs). Il permet aussi de prévenir une réaction excessive du système immunitaire : lorsqu'une réponse immunitaire a lieu, les signaux inflammatoires libérés dans le microenvironnement vont favoriser l'expression de ligands des récepteurs inhibiteurs par les cellules à proximité afin d'éviter un emballement de la réaction immune.

Les cellules cancéreuses sont capables de détourner le système de point de contrôle à leur avantage en surexprimant à leur surface des ligands de récepteurs inhibiteurs afin d'échapper au système immunitaire. Ceci peut avoir lieu de manière directe c'est-à-dire que la tumeur va se mettre à exprimer naturellement les ligands inhibiteurs, soit de façon indirecte c'est-à-dire que la libération de cytokines inflammatoires (IFN γ) par les cellules immunes du microenvironnement va stimuler l'expression de ces ligands inhibiteurs à la surface des cellules tumorales. Ainsi, les cellules tumorales vont surexprimer le ligand inhibiteur PD-L1 à leur surface qui va interagir avec PD-1 à la surface du lymphocyte T ce qui conduit à l'inhibition de l'activité du lymphocyte T et donc à l'inhibition de la réponse immunitaire anti-tumorale.

Les inhibiteurs de points de contrôle ou immuno-modulateurs utilisés en cancérologie sont donc dirigés contre des récepteurs inhibiteurs, à savoir :

- CTLA4. C'est un modulateur précoce de l'activation du lymphocyte T naïf dans le ganglion.
- PD1 et son ligand PD-L1. Cette voie agit plus tardivement dans le processus d'activation des lymphocytes lors de sa phase effectrice au contact de la tumeur. Le mode d'action des anti-PD-1/PD-L1 est résumé dans la figure n°2.

Les immunomodulateurs vont bloquer le fonctionnement de ces récepteurs et ainsi les empêcher d'inhiber la réponse immunitaire. La levée des freins du système immunitaire permet de réactiver une réponse immunitaire anti-tumorale qui était jusque-là endormie.

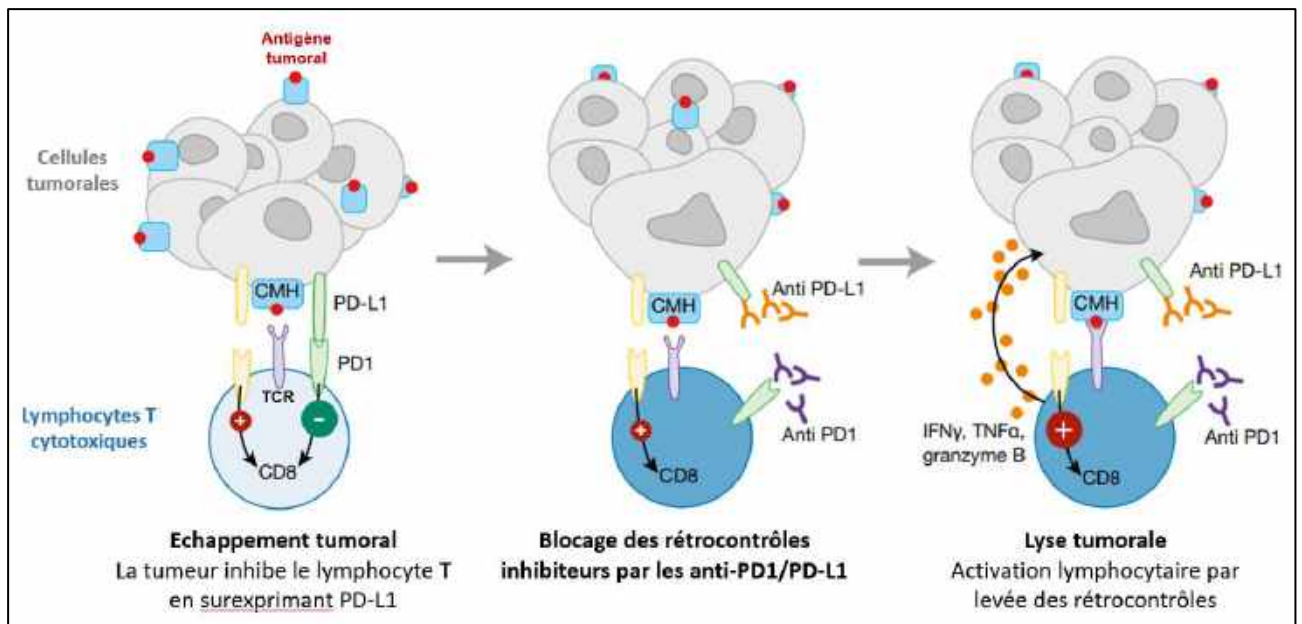


Figure 2 : Mode d'action des anti- PD-1/PD-L1 (adapté d'après "Immunothérapies anti-checkpoints : aspects fondamentaux" Perrine Vuagnat, Stéphane Champiat, MCED n°95, décembre 2018).

Dans le cadre de la prise en charge du cancer du poumon, seuls les immuno-modulateurs ciblant la voie PD1/PD-L1 possèdent une AMM, les anti-CTLA4 sont quant à eux indiqués dans le traitement des mélanomes avancés. Les anti-PD1/PD-L1 ont démontré un taux de réponse objective d'environ 20 % pour les CBNPC et 23 % pour les CBPC (162).

Les médicaments immunomodulateurs indiqués dans le cancer du poumon en France :

Les anti-PD1/PL-1 sont des anticorps monoclonaux dirigés contre PD1 ou PD-L1 permettant d'empêcher l'inhibition de la réponse immunitaire anti-tumorale médiée par les lymphocytes T cytotoxiques au sein de la tumeur. Ces médicaments sont administrés par voie IV en perfusion, toutes les 2 à 3 semaines, jusqu'à progression de la maladie ou toxicité inacceptable. Ils sont relativement bien tolérés, les effets indésirables les plus communs sont une asthénie et des éruptions cutanées. Dans moins de 5 % des cas seulement des effets indésirables sévères peuvent être observés : pneumopathies inflammatoires, dysthyroïdies, colites, hépatites, atteintes rénales, rashes cutanés sévères. Ces effets indésirables concernent surtout les patients âgés (> 75 ans).

Pour les patients ne présentant pas d'altération génique ciblable (*EGFR*, *ALK*, *ROS1*, *BRAF*), l'immunothérapie, en monothérapie ou en association avec une chimiothérapie, en première ou en deuxième ligne, est devenue une option de traitement privilégiée. Le choix entre les options thérapeutiques d'immunothérapie peut par contre être difficile puisqu'il n'y a pas, à ce jour, d'essais comparatifs, ni de réelle validation de biomarqueurs d'efficacité (expression de PD-L1, charge mutationnelle tumorale) (163,164).

Les molécules anti-PD1 sont le nivolumab, le pembrolizumab et le durvalumab. Ce sont des anticorps monoclonaux qui vont se lier au récepteur PD1 et empêcher son interaction avec son ligand PD-L1 ou PD-L2. Dans le traitement des CBNPC au stade IV et ne présentant pas d'altération génique ciblable, c'est le pembrolizumab qui est indiqué parfois en association avec une chimiothérapie, selon l'histologie du cancer (cf. partie I.F.3.).

Un seul anti-PD-L1 est indiqué en France, il s'agit de l'atézolizumab.

I.F. Stratégies de prise en charge des patients atteints de cancers bronchiques non à petites cellules.

(D'après le référentiel Auvergne Rhône-Alpes en oncologie thoracique, cancer bronchique non à petites cellules, 2020)

En France, la prise en charge des patients atteints de cancers bronchiques est multidisciplinaire (médecin traitant, oncologue, pneumologue, radiothérapeute, chirurgien thoracique, radiologue, agents paramédicaux) et coordonnée.

Les modalités de prise en charge sont décidées en accord avec le patient et en lien avec le médecin traitant sur la base d'un avis établi en réunion de concertation pluridisciplinaire (RCP). La prise en charge du cancer du poumon doit être globale. En plus des traitements « curatifs » (chirurgie, chimiothérapie, radiothérapie, thérapies ciblées, immunothérapie), le patient recevra un arsenal de traitements plus « symptomatiques ». Ces derniers sont qualifiés de « soins de support » et comprennent : la prise en charge de la douleur, les traitements des effets indésirables imputables aux traitements curatifs (nausées et vomissements, troubles digestifs, troubles cutanés etc...), l'aide au sevrage tabagique, une prise en charge psychologique et sociale, l'éducation thérapeutique du patient, les soins visant la rééducation et la réadaptation fonctionnelle, une prise en charge nutritionnelle, les soins palliatifs, etc...

Les traitements « curatifs » sont conditionnés par le stade tumoral.

I.F.1. Prise en charge des cancers bronchiques non à petites cellules de stade I et II.

Le traitement de référence et de première intention des patients atteints de CBNPC au stade I et II est la chirurgie. Si le patient n'est pas opérable, une radiothérapie est indiquée associée ou non à une chimiothérapie.

A titre indicatif, la prise en charge des CBNPC aux stade I et II est résumée dans l'arbre décisionnel suivant :

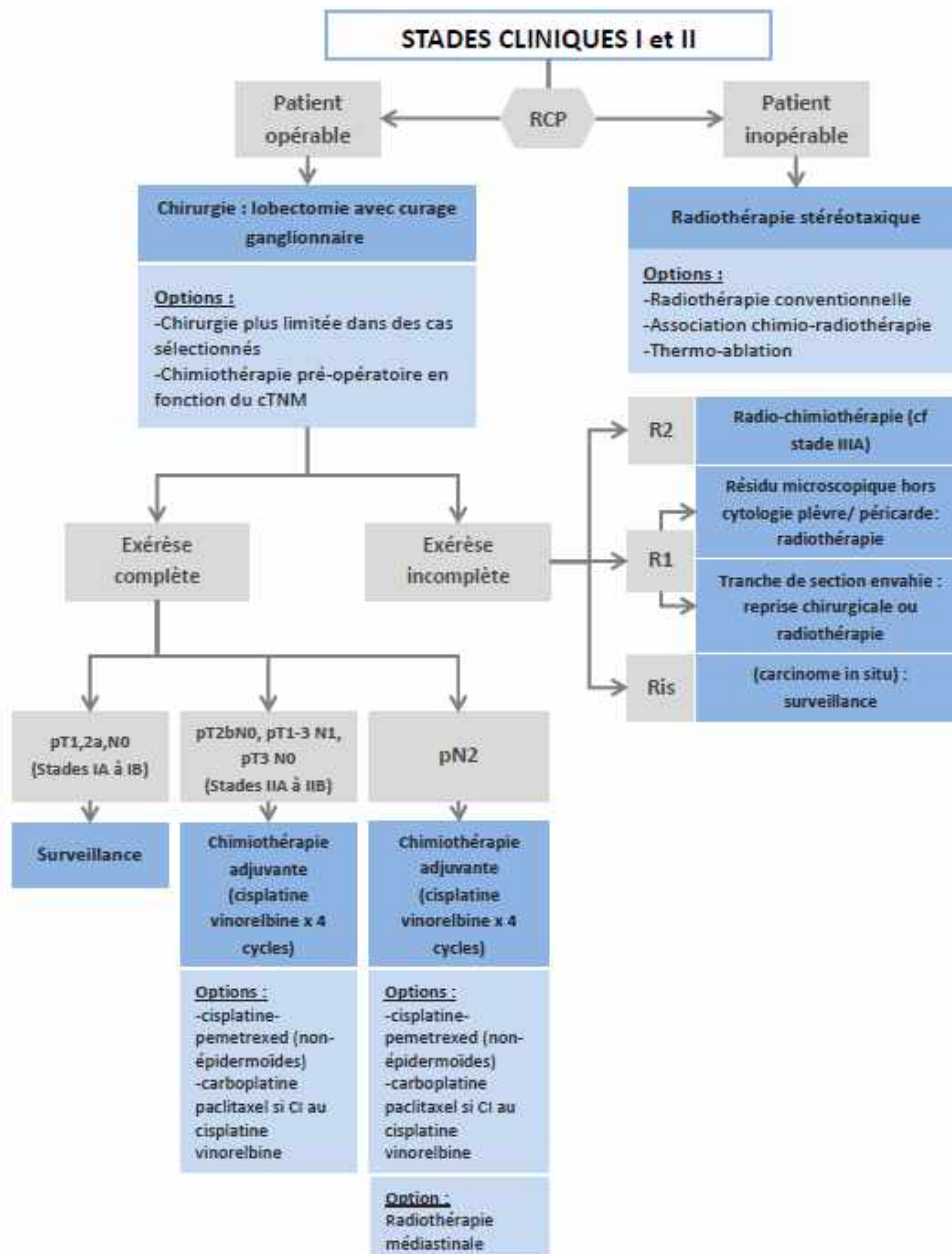


Figure 3 : Arbre décisionnel de prise en charge des CBNPC aux stades I et II (D'après le référentiel Auvergne Rhône-Alpes en oncologie thoracique, cancer bronchique non à petites cellules, 2020).

I.F.2. Prise en charge des cancers bronchiques non à petites cellules de stade III.

Chez les patients atteints de CBNPC au stade IIIA, la chirurgie doit être réalisée dans la mesure du possible.

Si la tumeur est résécable d'emblée, le patient subira une chirurgie avant ou après une chimiothérapie puis éventuellement une radiothérapie.

Si la résécabilité de la tumeur est limitée, une chimiothérapie néo-adjuvante sera réalisée avant la chirurgie. Puis deux cas de figures existent : soit le patient est éligible à la chirurgie, il est donc opéré puis recevra éventuellement une radiothérapie ; soit le patient n'est toujours pas éligible à la chirurgie et il recevra une chimio-radiothérapie concomitante ou séquentielle selon l'état général du patient.

Pour les patients de stades IIIB et IIIC, les patients de moins de 70 ans et ayant un score de performance (PS) à 0 ou 1 recevront une radiothérapie concomitante à une chimiothérapie. Les

patients de plus de 70 ans ou ayant un score de performance de 2 recevront une chimio-radiothérapie séquentielle. Le score de performance évalue les capacités du patient à réaliser les gestes du quotidien.

De plus, les patients de stade IIIA non opérés et les patients au stade IIIB et IIIC de moins de 70 ans et ayant un score de performance à 0 ou 1, pourront recevoir un traitement par immunothérapie pendant un an (anti-PDL1 : durvalumab) si leur tumeur exprime à 1 % ou plus le marqueur PD-L1.

A titre indicatif, la prise en charge des CBNPC au stade III est résumée dans les arbres décisionnels suivants :

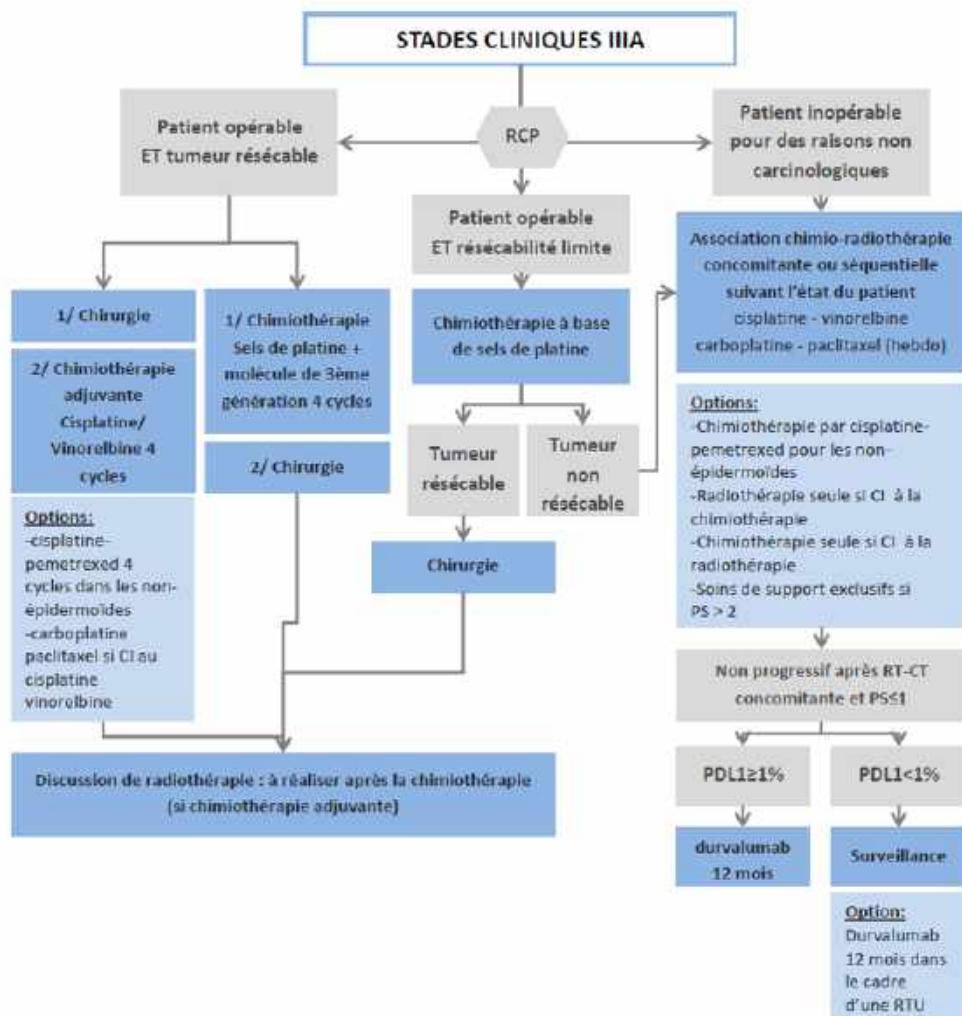


Figure 4 : Arbre décisionnel de prise en charge des CBNPC au stade IIIA (D'après le référentiel Auvergne Rhône-Alpes en oncologie thoracique, cancer bronchique non à petites cellules, 2020).

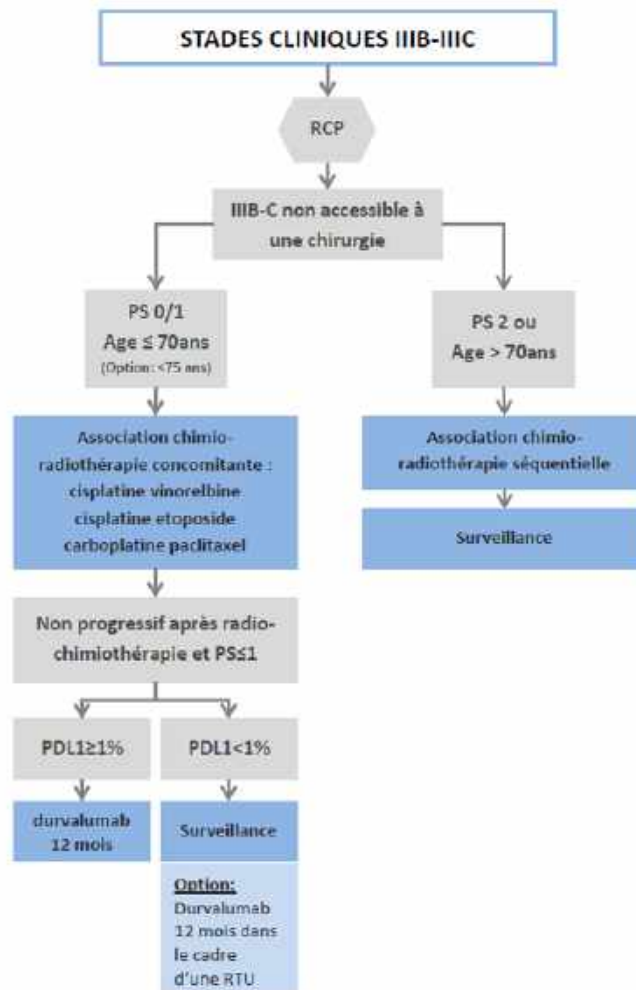


Figure 5 : Arbre décisionnel de prise en charge des CBNPC au stade IIIB-C (D'après le référentiel Auvergne Rhône-Alpes en oncologie thoracique, cancer bronchique non à petites cellules, 2020).

I.F.3. Prise en charge des cancers bronchiques non à petites cellules de stade IV.

La prise en charge des CBNPC au stade IV dépend tout d'abord de la présence ou non d'une altération génique ciblable (altérations de l'EGFR, réarrangement de ALK ou de ROS1). La recherche de ces altérations est réalisée sur le tissu tumoral en première intention et si la quantité de tissu est insuffisante sur l'ADN tumoral circulant.

I.F.3.a. Prise en charge des cancers bronchiques non à petites cellules de stade IV sans altération ciblable.

En l'absence d'altération ciblable, la prise en charge des CBNPC au stade IV dépend de la forme histologique, épidermoïde ou non épidermoïde, de l'expression tumorale de PD-L1 afin d'indiquer ou non un traitement par immunothérapie (anti-PD1 : pembrolizumab) et également du score de performance obtenu par le patient (165).

A titre indicatif, la prise en charge des CBNPC au stade IV et ne présentant pas d'altération génique ciblable est résumée dans les arbres décisionnels suivants :

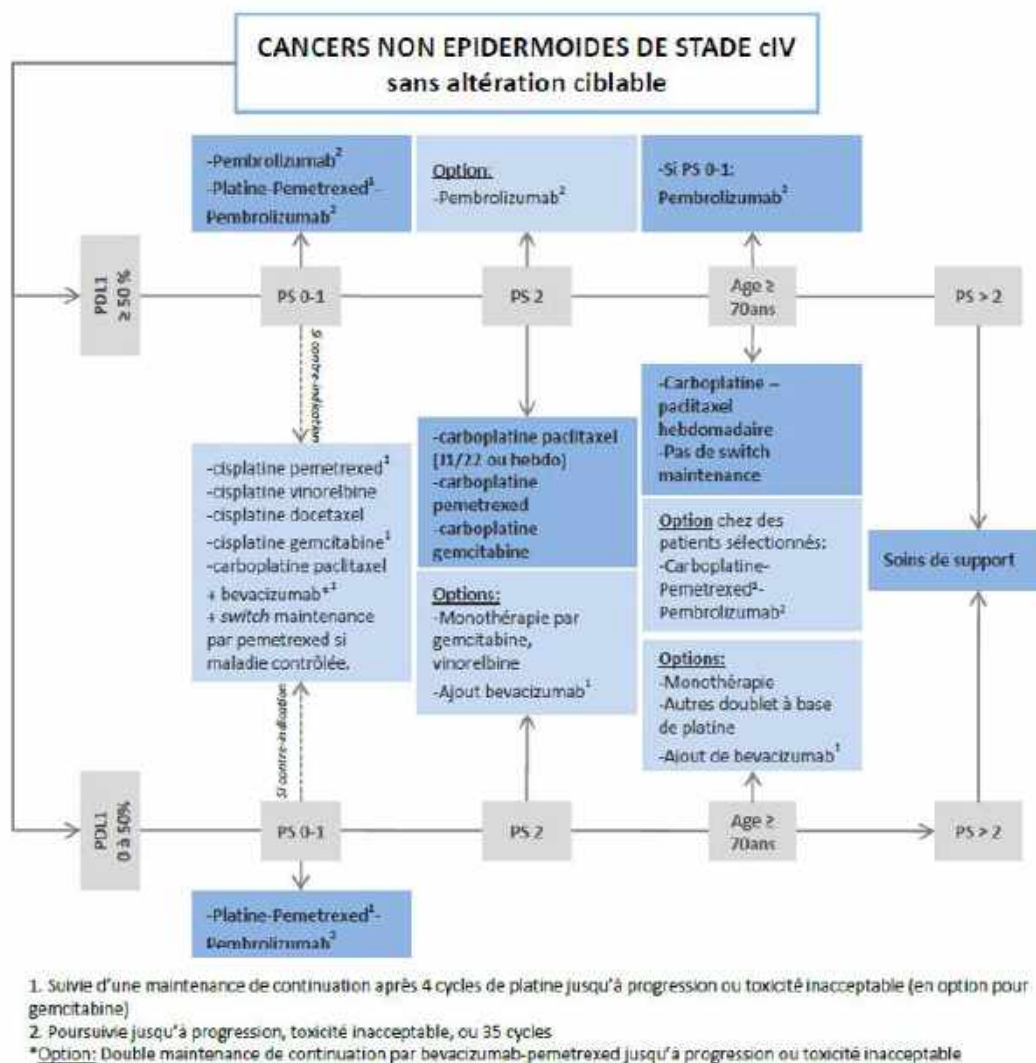


Figure 6 : Arbre décisionnel de prise en charge des CBNPC au stade IV non épidermoïdes ne présentant pas d'altération génique ciblable (D'après le référentiel Auvergne Rhône-Alpes en oncologie thoracique, cancer bronchique non à petites cellules, 2020).

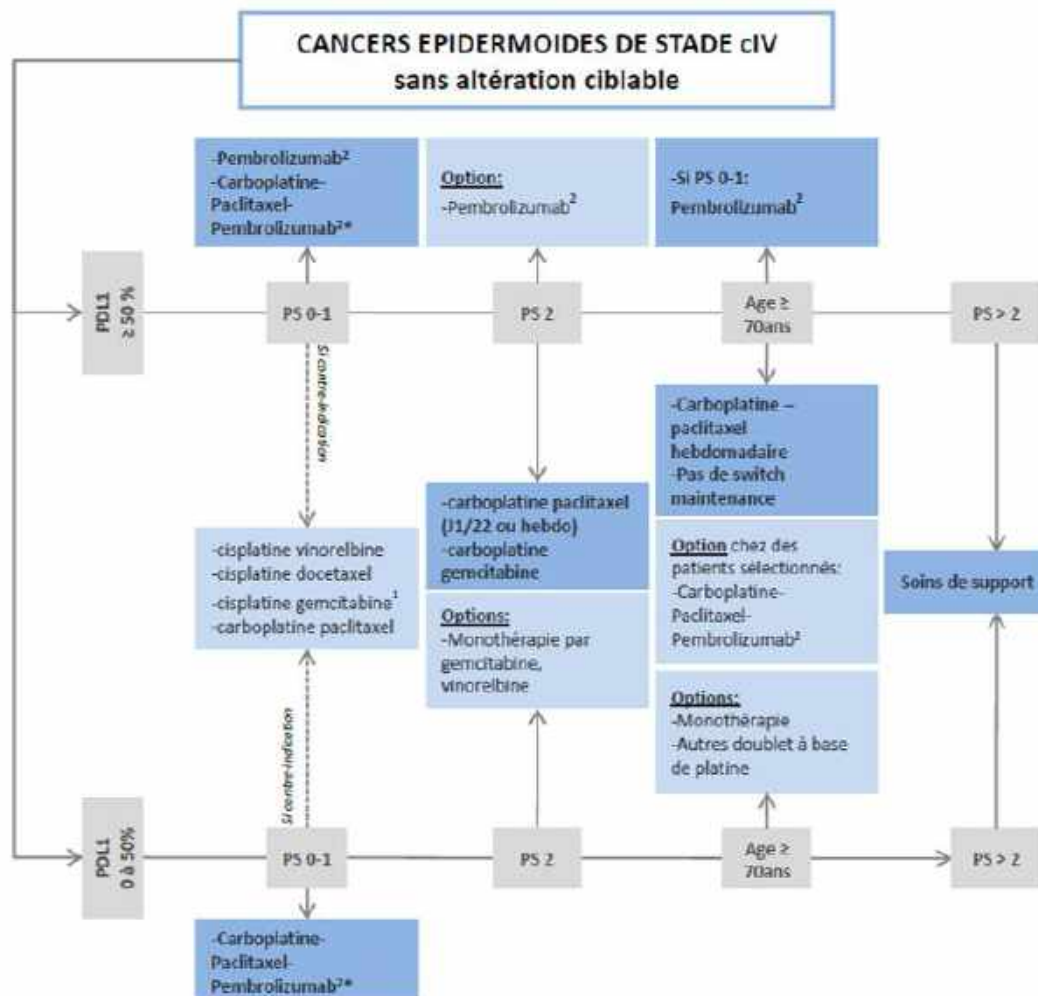


Figure 7 : Arbre décisionnel de prise en charge des CBNPC au stade IV épidermoïdes ne présentant pas d'altération génique ciblable (D'après le référentiel Auvergne Rhône-Alpes en oncologie thoracique, cancer bronchique non à petites cellules, 2020).

I.F.3.b. Prise en charge des cancers bronchiques non à petites cellules de stade IV avec altération ciblable.

Mutation activatrice de l'EGFR :

En cas de mutation activatrice de l'EGFR, un traitement par un inhibiteur de l'activité tyrosine kinase de l'EGFR est indiqué, avec en première ligne l'osimertinib (cf. partie II.).

Réarrangement de ALK :

Dans le cas de la détection d'un réarrangement de ALK, c'est l'alectinib qui est indiqué en première ligne. Le traitement de seconde ligne repose sur un autre inhibiteur de l'activité tyrosine kinase de ALK choisi selon le profil moléculaire mis en évidence à la progression.

Réarrangement de ROS1 :

Le crizotinib a une AMM dès la première ligne en cas de réarrangement de ROS1 mais ne dispose pas encore de prix dans cette indication à ce jour.

Mutation BRAF^{V600E} :

Chez les patients présentant une mutation BRAFV600E l'association dabrafénib et tramétinib est indiquée en seconde ligne (après chimiothérapie et/ou immunothérapie). Elle devrait obtenir rapidement son remboursement dans cette indication.

II. Les inhibiteurs de l'activité tyrosine kinase de l'EGFR : EGFR-TKI.

II.A. L'EGFR et ses altérations dans les cancers du poumon.

L'EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor ; ErbB-1 ; HER1) appartient à la famille des récepteurs à activité tyrosine kinase de la famille ERBB (166). Le gène codant l'EGFR se situe sur le chromosome 7 et code pour une glycoprotéine transmembranaire de 170 kDa possédant une activité tyrosine kinase. Après liaison du ligand sur la partie extracellulaire du récepteur, l'EGFR subit un changement de conformation qui va mener à son auto-phosphorylation et donc à son activation entraînant l'activation des voies de signalisation de prolifération et de survie situées en aval, à savoir : la voie PI3K/AKT, la voie RAS/MEK/ERK et la voie JAK/STAT (167).

Dans les cancers bronchiques, les altérations génétiques oncogéniques de l'EGFR sont retrouvées sur les exons 18 à 21 du gène qui codent pour le domaine à activité tyrosine kinase du récepteur et plus précisément au niveau de la poche de liaison à l'ATP de l'enzyme (168). Ces altérations sont :

- Dans environ 45 % des cas : une large délétion sur l'exon 19 (souvent delE746-A750) (168).
- Dans 40 % des cas : une mutation ponctuelle par substitution L858R dans l'exon 21 (168).
- Les 15 % restants sont de rares mutations dont des insertions situées sur les exons 19 (1 %) et 20 (6 %), des mutations ponctuelles sur l'exon 21 (L861Q : 1 %) et sur l'exon 18 (le plus souvent G719X : 3 %) (169–171).

Les détails de ces altérations sont reportés dans la figure suivante :

Exon 18	Exon 19	Exon 20	Exon 21
G719X (3,1%) G719A G719A+S768I/L861Q/L861R G719S G719S+S768I/L861Q/E709A G719C G719C+S768I/E709K/E709H autres	Del19 (44,8%) delE746_A750 delL747_P753insS delL747_T751 delL747_A750insP delL747_S752 delE746_S752insV delE746_P753insVS delL747_T751insP delE746_T751insA delL747_P753 1 delS752_I759 autres	Ins20 (5,8%) V769_D770insASV D770_N771insSVD H773_V774insH A763_Y764insFQEA H773_V774insPH H773_V774insNPH N771_P772insN H773_V774insAH D770delinsGY V774_C775insHv autres	L858R (39,8%) L861Q (0,9%)
E709X (0,3%) E709K+G719S/G719C/L858R E709A+G719S/G719E autres	Ins19 (0,6%) I744_K745insKIPVAI K745_E746insIPVAIK K745_E746insVPVAIK K745_E746insTPVAIK	S768I (1,1%) T790M (données très variables)	

Figure 8 : Les différentes altérations de l'EGFR dans les cancers du poumon – modifié à partir de (172). La fréquence de détection de la mutation EGFR T790M au niveau de l'exon 20 chez les patients atteints de CBNPC et naïfs de tout traitement est très variable selon les études (cf. partie II.C.1.a).

Ces altérations sont plus fréquemment retrouvées chez les patients non-fumeurs et les femmes. En effet, l'EGFR est génétiquement altéré dans 21 % des cancers bronchiques féminins et 44 % des cancers bronchiques des non-fumeurs (32). De plus, les altérations de l'EGFR sont mutuellement exclusives avec les mutations de KRAS et les réarrangements de ALK (173).

En situation physiologique, l'activation de l'EGFR se passe de la façon suivante (174) :

- Le ligand se fixe sur la partie extracellulaire du récepteur ;
- Le récepteur est alors dans une conformation favorable à son homo- ou à son hétéro-dimérisation avec d'autres monomères de la famille ERBB ;

- Ceci permet la trans-phosphorylation de tyrosines situées dans le domaine kinase intracellulaire du récepteur ;
- Le récepteur est alors actif et recrute des protéines de signalisation intracellulaire qui activent principalement les voies de signalisation intracellulaire : RAS/MEK/ERK, PI3K/AKT/mTOR et JAK/STAT ;
- Ces cascades de signalisation aboutissent à l'activation de facteurs de transcription dans le noyau régulant la transcription de gènes impliqués dans la prolifération, la survie cellulaire, etc...

Lorsque l'EGFR est altéré génétiquement, la liaison du ligand n'est plus nécessaire à son activation, ainsi le récepteur est constitutivement actif et donc les voies situées à son aval sont activées en permanence. Ceci aboutit donc à une survie et une prolifération incontrôlées des cellules à l'origine de la formation d'une tumeur.

La signalisation de l'EGFR en situation physiologique et lorsqu'il est génétiquement altéré est résumée dans la figure suivante :

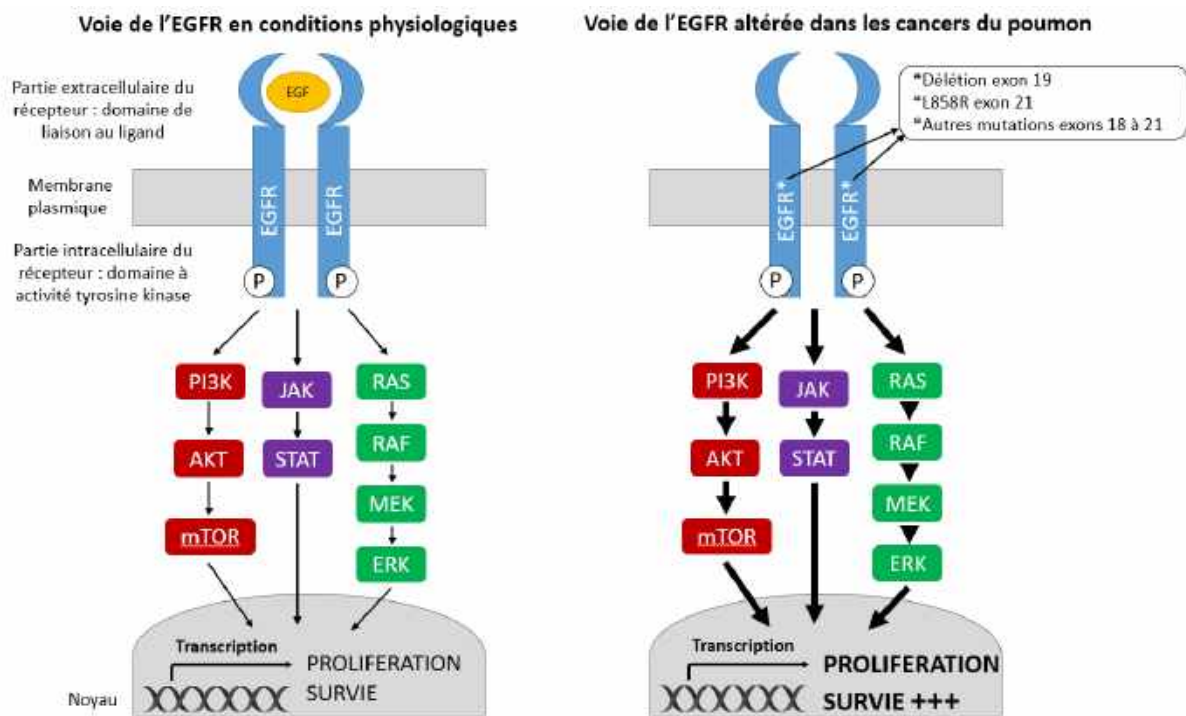


Figure 9 : Représentation schématique de la voie de l'EGFR dans des conditions physiologiques puis lorsque l'EGFR est génétiquement altéré au cours de l'oncogénèse pulmonaire.

Partant de cette constatation, des recherches se sont donc concentrées à essayer d'inhiber l'EGFR. Deux modalités d'inhibition de l'EGFR ont alors été développées (174) :

- La première consiste à empêcher le récepteur d'adopter la conformation stérique nécessaire à sa dimérisation et donc à son activation en agissant sur sa partie extracellulaire à l'aide d'anticorps monoclonaux (cétuximab, panitumumab). Ces médicaments sont administrés par voie injectable intraveineuse ;
- La deuxième consiste à inhiber l'activité tyrosine kinase du domaine intracellulaire et ainsi à bloquer la transduction du signal médiée par le récepteur grâce à de petites molécules : les inhibiteurs de l'activité tyrosine kinase de l'EGFR ou EGFR-TKIs qui, eux, sont administrés par voie orale.

Seuls des EGFR-TKIs possèdent une AMM dans le traitement des cancers bronchiques.

II.B. EGFR-TKIs : Mécanisme d'action et molécules utilisées dans le traitement des cancers bronchiques présentant des altérations de l'EGFR.

II.B.1. Mécanisme d'action des EGFR-TKIs.

Les EGFR-TKIs sont des inhibiteurs compétitifs de l'ATP (Adénosine TriPhosphate). Ayant plus d'affinité pour la poche à l'ATP que l'ATP lui-même, ils se fixent à la place de l'ATP et ainsi empêchent l'autophosphorylation du récepteur et donc son activation. Le récepteur ne peut donc pas activer à son tour les voies de signalisation d'aval contrôlant survie et prolifération. Ainsi, l'apoptose est induite dans les cellules. Ce mécanisme d'action des EGFR-TKIs est schématisé dans la figure suivante :

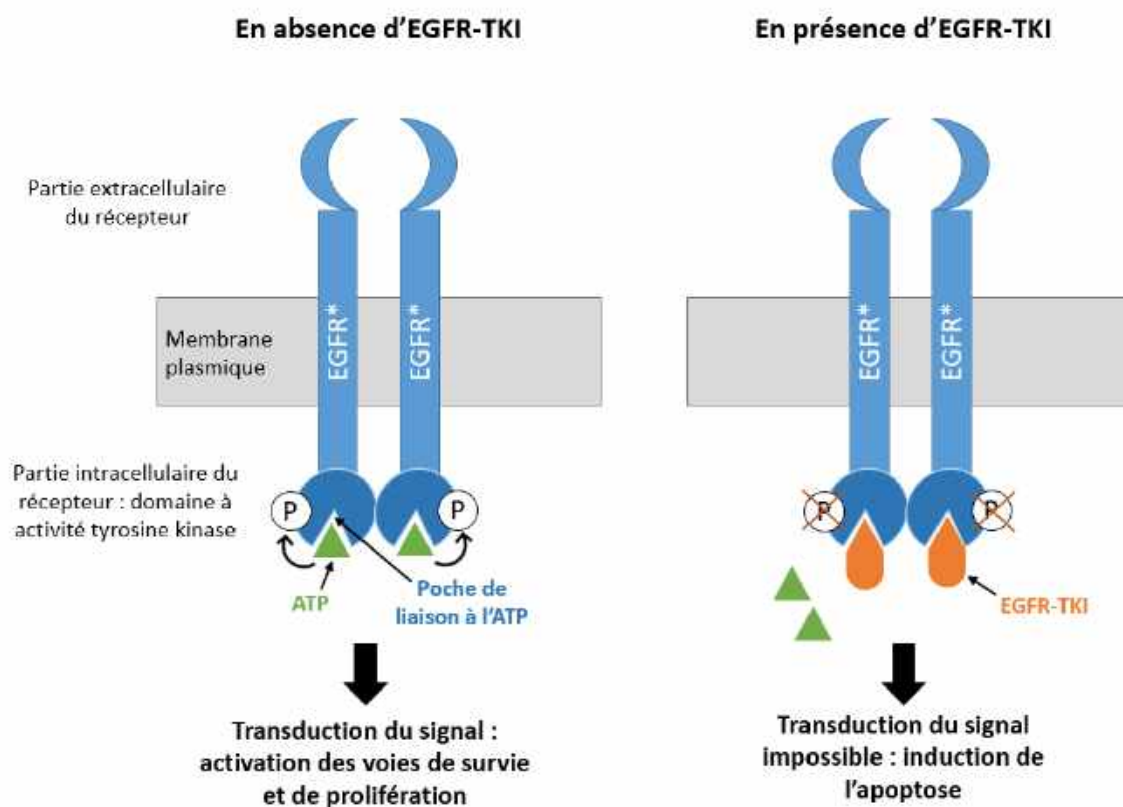


Figure 10 : Représentation schématique du mécanisme d'action des EGFR-TKIs.

De nombreux EGFR-TKIs ont été développés, ces inhibiteurs présentent des propriétés pharmacologiques différentes en termes de sélectivité, de mode de liaison, et d'activité clinique.

II.B.2. Les différentes générations d'inhibiteurs : propriétés pharmacologiques et historique.

II.B.2.a. Propriétés pharmacologiques des différentes générations d'EGFR-TKIs.

A ce jour, il existe trois générations d'inhibiteurs de l'activité tyrosine kinase de l'EGFR (175,176).

Les EGFR-TKIs de première génération, géfitinib et erlotinib, possèdent une structure basée sur un noyau 4-anilinoquinazoline et ont démontré une activité à la fois sur le récepteur portant des altérations de l'EGFR et sur le récepteur sauvage (EGFR wild-type, EGFR^{WT}), en s'y liant de façon réversible (176).

Les EGFR-TKIs de deuxième génération, afatinib et dacomitinib, diffèrent de ceux de première génération parce que, d'une part ils sont capables de se lier au récepteur de façon irréversible du fait de la présence dans leur structure d'un groupement acrylamide électrophile, et d'autre part car en plus d'être actifs sur l'EGFR altéré ils ont une activité sur d'autres récepteurs de la famille ErbB (HER2, HER4). Ces inhibiteurs sont également actifs sur l'EGFR présentant la mutation de résistance T790M, même si en clinique cette activité reste relative (177,178,176).

Enfin, les EGFR-TKIs de troisième génération, osimertinib et rociletinib, sont également irréversibles et ont une structure basée sur un noyau pyrimidine. Ils sont actifs sur l'EGFR altéré en épargnant l'EGFR^{WT}. Et surtout, ils possèdent une activité sur l'EGFR portant la mutation de résistance aux inhibiteurs de première génération et de deuxième génération EGFR^{T790M} en se liant de façon covalente au résidu C797 de la poche à ATP du récepteur (179–181,176).

Les propriétés pharmacologiques des trois générations d'EGFR-TKIs sont résumées dans le tableau suivant :

Génération		1 ^{ère} génération	2 ^{ème} génération	3 ^{ème} génération
Mode de liaison à l'EGFR		Réversible	Irréversible	Irréversible
Sélectivité	EGFR ^{WT}	+	+	-
	EGFR ^{Del19/L858R}	+	++	++
	EGFR ^{T790M}	-	+	+++
	HER2	-	+	-
	HER4	-	+	-
Passage de la barrière hémato-encéphalique		+	+	+++
Molécules		Géfitinib, Erlotinib	Afatinib, Dacomitinib	Osimertinib, Rociletinib

Tableau 6 : Propriétés pharmacologiques des trois générations d'EGFR-TKIs. Adapté de (175).

II.B.2.b. Historique du développement des EGFR-TKIs dans le traitement des cancers du poumon.

L'avènement de ces trois générations d'inhibiteurs et leur approbation par les autorités sanitaires compétentes ont bien évidemment été guidées par des découvertes scientifiques clés. La chronologie de ces événements est résumée dans la figure suivante :

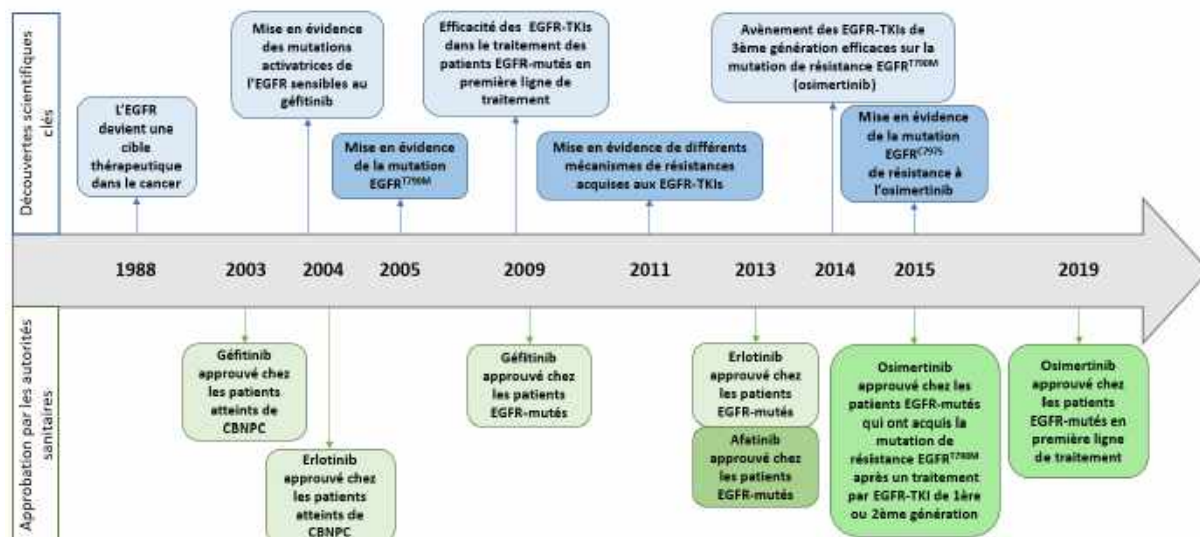


Figure 11 : Historique du développement des EGFR-TKIs dans le traitement des cancers du poumon. Adapté de (175).

En 2003, le premier EGFR-TKI, le géfitinib, est approuvé par la FDA (Food and Drug Administration) aux Etats-Unis, approbation qui sera finalement retirée à cause du manque d'efficacité de la molécule sur la survie. En 2004, il est démontré que les patients bénéficiant d'une bonne réponse au traitement par géfitinib (environ 10 %) sont ceux porteurs de mutations activatrices de l'*EGFR* (182,183). Des essais cliniques avec le géfitinib et un autre inhibiteur, l'erlotinib, sont alors engagés chez ces patients et l'efficacité des EGFR-TKIs est démontrée (184–190). Erlotinib et géfitinib sont alors approuvés en première ligne de traitement chez les patients porteurs de mutations activatrices de l'*EGFR*.

Cependant, des résistances apparaissent chez les patients après une médiane d'environ une année de traitement. Différents mécanismes sont décrits (cf. partie II.C) mais le plus représenté (environ 50 %) est l'acquisition d'une mutation T790M sur l'*EGFR* rendant les EGFR-TKIs de première génération inefficaces. Figurent aussi parmi ces résistances l'amplification de *HER2* qui va permettre l'activation d'une voie de signalisation alternative à celle de l'*EGFR* permettant de contourner le mécanisme d'inhibition par les EGFR-TKIs (191,192).

Ces découvertes ont conduit au développement des inhibiteurs de deuxième génération qui possèdent une sélectivité sensée surmonter ces résistances. Mais malheureusement, malgré des données précliniques encourageantes (177,178), ni l'afatinib (193), ni le dacomitinib (194), n'ont démontré une activité clinique remarquable, principalement à cause de fortes toxicités liées aux concentrations élevées utilisées pour avoir une activité sur les mécanismes de résistance ciblés.

La deuxième génération d'inhibiteurs a donc été rapidement supplantée par la troisième génération avec l'osimertinib (181) et le rociletinib (195). Ces inhibiteurs ont donné une bonne réponse clinique chez les patients ayant résisté aux EGFR-TKIs de première et deuxième génération (196,197) et l'osimertinib est maintenant approuvé en traitement de première ligne chez les patients porteurs de mutations activatrices de l'*EGFR* (198).

Néanmoins, des mécanismes de résistance à ces inhibiteurs de troisième génération existent également (cf. partie II.C). Le mécanisme de résistance le plus représenté (dans environ 40 % des cas) est une mutation tertiaire de l'*EGFR*, la mutation C797S qui empêche la liaison des EGFR-TKIs de troisième génération, les rendant inefficaces (199).

Cette course incessante aux inhibiteurs illustre bien le fait que la plasticité tumorale et la pression de sélection sont sans cesse capables de moduler la tumeur afin qu'elle puisse mettre en place des mécanismes de résistance adaptative. Ceci souligne l'importance de désormais s'intéresser aux mécanismes originels conduisant à ces résistances.

II.B.3. Efficacité et Sécurité des EGFR-TKIs dans le traitement des cancers du poumon.

II.B.3.a. Efficacité des EGFR-TKIs selon les altérations géniques de l'EGFR.

La sensibilité aux EGFR-TKIs est dépendante du type d'altération de l'*EGFR*. En effet, sous EGFR-TKIs de première ou de deuxième génération, les patients présentant des mutations communes de l'*EGFR* (délétion dans l'exon 19, mutation L858R dans l'exon 21) présentent une meilleure réponse aux EGFR-TKIs que les patients porteurs de mutations rares de l'*EGFR* (G719X, L861Q, S768I, insertions sur l'exon 20 etc...) (170,200,169,201). Ainsi, si on compare les patients porteurs de mutations communes de l'*EGFR* et ceux porteurs de mutations rares, le taux de réponse objective passe de 63,8 % à 32,4 %, la médiane de survie sans progression de 16,5 mois à 3,9 mois et la médiane de survie globale de 37,3 mois à 17,4 mois, respectivement (169).

De plus, parmi les patients porteurs d'altérations les plus sensibles aux EGFR-TKIs, ce sont les patients porteurs de délétions au niveau de l'exon 19 de l'*EGFR* qui répondent aux EGFR-TKIs encore mieux que ceux porteurs de la mutation L858R. Et parmi les patients porteurs d'altérations les moins sensibles aux EGFR-TKIs, ce sont les patients présentant les mutations G719X sur l'exon 18 et L861Q sur l'exon 21 qui sont les plus à même de montrer des réponses aux EGFR-TKIs alors que les insertions au niveau de l'exon 20 sont associées à une résistance aux EGFR-TKIs (170,200,169,201).

Par conséquent, une question se pose : Quel EGFR-TKI choisir pour traiter les patients présentant des altérations géniques rares de l'*EGFR* ? La majorité des essais cliniques n'apportent que des informations limitées sur les patients porteurs de ces rares altérations. Néanmoins, des résultats combinés des essais cliniques LUX-Lung 2, 3 et 6 démontrent que l'afatinib possède une meilleure activité sur les mutations G719X sur l'exon 18, L861Q sur l'exon 21 et S768I sur l'exon 20 et améliore considérablement la survie sans progression et la survie globale chez les patients porteurs de ces mutations. Par contre, chez les patients porteurs de la mutation de résistance T790M et chez les patients porteurs d'insertions au niveau de l'exon 20, l'efficacité de l'afatinib reste limitée (202,172).

L'osimertinib présente également une activité favorable chez les patients porteurs de mutations rares de l'*EGFR* comme le démontre un récent essai clinique de phase II coréen. Cet essai mené chez des patients porteurs de mutations G719X, L861Q, S768I principalement, montre que l'osimertinib permet un taux de réponse objective de 50 % et une médiane de survie sans progression de 8,2 mois, sachant que la médiane de survie globale n'a pas encore été atteinte à ce jour (203). Néanmoins, malgré quelques espoirs fondés sur des études précliniques (204,205) et des études de cas isolés ou de petites cohortes (206,207), l'osimertinib semble avoir une efficacité limitée chez les patients porteurs d'insertions au niveau de l'exon 20 de l'*EGFR*. En effet, dans une récente étude menée chez 21 patients porteurs de mutations sur l'exon 20 de l'*EGFR*, le traitement par osimertinib n'a permis un taux de réponse objective que de 5 %, même si le taux de contrôle de la maladie est de 71 % (208). Ces résultats restent à confirmer sur des cohortes plus importantes, mais en attendant, chez ces patients porteurs d'insertions au niveau de l'exon 20 de l'*EGFR*, la chimiothérapie reste à ce jour l'option la plus sage faute de mieux.

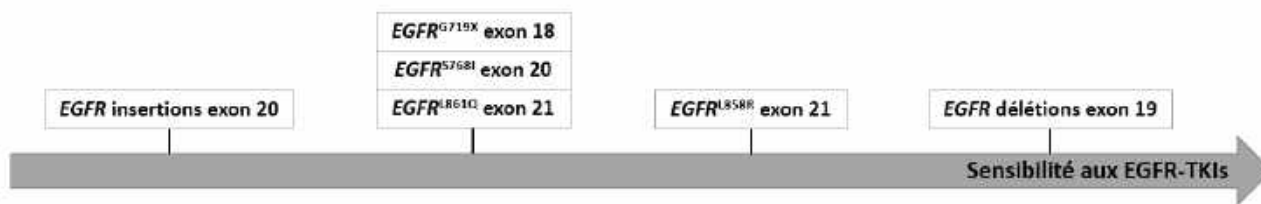


Figure 12 : Schéma récapitulatif du degré de sensibilité des patients atteints de cancers bronchiques aux EGFR-TKIs en fonction de l'altération génique de l'EGFR qu'ils portent.

II.B.3.b. Efficacité et Sécurité des EGFR-TKIs de première génération.

Géfitinib :

En première ligne et en monothérapie dans le traitement des CBNPC localement avancés ou métastatiques et porteurs de mutations activatrices de l'EGFR en comparaison avec la chimiothérapie : étude IPASS et autres :

En première ligne de traitement l'essai clinique de phase III IPASS a comparé un bras géfitinib à un bras chimiothérapie (carboplatine associée au paclitaxel) chez des patients d'Asie de l'Est atteints d'adénocarcinomes avancés et non-fumeurs ou anciens fumeurs légers. Chez les patients porteurs de mutations de l'EGFR, le géfitinib a démontré une supériorité significative sur le taux de réponse objective (71,2 % *versus* 47,3 %), sur la survie sans progression (médiane de 9,5 mois *versus* 6,3 mois), sur la qualité de vie (taux d'amélioration de 70,2 % *versus* 44,5 %) et sur le soulagement de la symptomatologie (taux d'amélioration des symptômes de 75,6 % *versus* 53,9 %), mais sans différence significative sur la médiane de survie globale (21,6 mois *versus* 21,9 mois). En revanche, chez les patients non porteurs de mutations de l'EGFR, aucun de ces paramètres n'a été amélioré, au contraire, par le géfitinib en comparaison avec la chimiothérapie. En effet, chez ces patients traités par géfitinib, le taux de réponse objective a été de 1,1 % (*versus* 23,5 % pour la chimiothérapie), la médiane de survie sans progression de 1,5 mois (*versus* 5,5 mois sous chimiothérapie) s'accompagnant d'une diminution de la qualité de vie et du taux d'amélioration des symptômes (184,209,210).

D'autres essais cliniques de phase III ont par la suite confirmé la supériorité du géfitinib par rapport à la chimiothérapie chez les patients porteurs de mutations activatrices de l'EGFR dans cette indication : l'essai WJTOG3405 (186), l'essai NEJ002 (185) et l'essai First-SIGNAL (189).

L'ensemble de ces essais ont montré une amélioration de la réponse objective et de la survie sans progression avec le géfitinib en comparaison avec la chimiothérapie. Cependant, ces essais ne rapportent pas de différences en termes de survie globale mais ceci peut s'expliquer par le fait que beaucoup de patients assignés premièrement au bras chimiothérapie ont reçu par la suite le géfitinib (209,211,212).

Dans le traitement des CBNPC localement avancés ou métastatiques, porteurs de mutations activatrices de l'EGFR et après échec d'au moins une ligne de chimiothérapie : Etude INTEREST et autres :

Versus chimiothérapie :

Chez les patients atteints de CBPNC localement avancé ou métastatique et ayant préalablement été traités par au moins une ligne de chimiothérapie à base de sels de platine, l'essai

clinique de phase III INTEREST a permis la comparaison entre un traitement par géfitinib et un traitement par docétaxel. Cette étude montre une supériorité significative du géfitinib mais uniquement chez les patients porteurs de mutations de l'*EGFR*. En effet, chez ces patients, le géfitinib permet une amélioration significative du taux de réponse objective (42,1 % *versus* 21,1 %) et de la survie sans progression (médiane de 7 mois *versus* 4,1 mois). Par contre, la survie globale n'est pas améliorée chez ces patients. Chez les patients non porteurs de mutations de l'*EGFR*, les taux de réponse objective, la survie sans progression et la survie globale sont mauvais pour les 2 bras et le géfitinib ne montre pas d'avantage, au contraire, face à la chimiothérapie.

En termes d'évaluation de la tolérance au traitement, le géfitinib a été associé à un moindre taux d'effets indésirables liés au traitement par rapport au docétaxel : la proportion d'effets indésirables sérieux passent de 4 % avec le géfitinib contre 18 % avec le docétaxel, les arrêts de traitements liés à des effets indésirables de 4 à 11 % et les effets indésirables de grade 3 et 4 de 9 à 41 %. Les taux d'amélioration de la qualité de vie sont également meilleurs avec le géfitinib (213,214).

D'autres essais de phase III ont comparé le géfitinib au docétaxel chez des patients atteints de CBNPC avancés ou métastatiques prétraités par chimiothérapie : l'essai japonais V-15-32 (215,216) et l'essai coréen ISTANA (217). Ces deux essais montrent également un avantage au traitement par géfitinib dans cette indication. Et enfin, un autre essai de phase III, l'essai coréen KCSG-LU08-01, a permis de comparer un traitement par géfitinib et un traitement par pémétréxed chez des patients atteints d'adénocarcinomes bronchiques avancés et non-fumeurs. Cet essai conclut également à un bénéfice du traitement par géfitinib en terme d'amélioration de la survie sans progression et ceci d'autant plus chez les patients présentant des mutations activatrices de l'*EGFR* (218).

Versus placebo :

L'essai de phase III ISEL a cette fois comparé un traitement par géfitinib à un traitement par placebo chez des patients atteints d'un CBNPC localement avancé ou métastatique, réfractaires ou intolérants à une précédente chimiothérapie. Les résultats de cet essai chez les patients porteurs de mutations activatrices de l'*EGFR*, indiquent que le taux de réponse objective est de 37,5 % chez ces patients (contre 8 % pour la population globale) et que le délai médian jusqu'à échec du traitement est de 10,8 mois pour ceux recevant le géfitinib contre 3,8 mois pour ceux recevant le placebo (219,220).

L'ensemble de ces essais menés avec le géfitinib, lui ont permis d'être indiqué en monothérapie dans le traitement des CBNPC localement avancés ou métastatiques et porteurs de mutations activatrices de l'*EGFR*, en première ligne ou après échec d'une chimiothérapie antérieure.

Erlotinib :

L'erlotinib possède une AMM en traitement de première ligne pour les formes localement avancées ou métastatiques du CBNPC chez les patients porteurs de mutations activatrices de l'*EGFR*.

Chez des patients atteints de CBNPC porteurs de mutations de l'*EGFR* et non préalablement traités, l'essai clinique de phase III EURTAC a permis de comparer un bras erlotinib et un bras chimiothérapie (cisplatine ou carboplatine + docétaxel ou gemcitabine) en première ligne de traitement. Cet essai indique que l'erlotinib confère une meilleure survie sans progression (médiane de 9,7 mois *versus* 5,2 mois) et un meilleur taux de réponse globale (64 % *versus* 18 %). En revanche, la survie globale est similaire dans les deux bras (médiane de 19,3 mois pour le bras erlotinib et 19,5 mois pour le bras chimiothérapie). En termes de tolérance au traitement, l'erlotinib semble conférer un meilleur profil de tolérance puisque les proportions d'effets indésirables de grade 3 ou 4 passent de 67 % avec la chimiothérapie à 45 % avec l'erlotinib, et les proportions d'arrêt du traitement pour effets indésirables liés au traitement de 20 % à 6 %. L'effet indésirable le plus fréquent sous erlotinib

est la survenue d'un rash cutané qui concerne 67 % des patients à un grade 1-2 et 13 % des patients à un grade 3 (188).

Deux autres essais de phase III, l'essai ENSURE (190) et l'essai OPTIMAL (187), vont dans le même sens en démontrant que le traitement par erlotinib permet un gain de survie sans progression, tout en améliorant la tolérance au traitement.

Géfitinib versus erlotinib :

Un premier essai clinique de phase III mené chez des patients atteints d'adénocarcinomes bronchiques préalablement traités par au moins une ligne de chimiothérapie a permis la comparaison entre géfitinib et erlotinib. Cet essai ne met pas en évidence de différence significative entre les deux traitements en termes de survie sans progression et de survie globale, ni dans la population totale, ni chez les patients porteurs de mutations activatrices de l'*EGFR* (221).

Un autre essai clinique de phase III mené chez des patients atteints de CBNPC localement avancés ou métastatiques, porteurs de mutations activatrices de l'*EGFR* et ayant été prétraités ou non, en arrive aux mêmes conclusions. En effet, les médianes de survie globale et de survie sans progression ne diffèrent pas significativement entre le bras géfitinib et le bras erlotinib, ni en première ligne, ni en deuxième ligne (222).

II.B.3.c. Efficacité et Sécurité des EGFR-TKIs de deuxième génération.

Afatinib :

En monothérapie dans le traitement des CBNPC localement avancés ou métastatiques, porteurs de mutations activatrices de l'*EGFR* et naïfs d'un traitement par EGFR-TKI : Etudes LUX-Lung 3, 6 et 7 :

Versus chimiothérapie :

Les essais cliniques de phase III LUX-Lung 3 et 6 ont permis de comparer l'afatinib à un traitement par chimiothérapie à base de sels de platine (pemetrexed + cisplatine pour LUX-Lung 3 et gemcitabine + cisplatine pour LUX-Lung 6) en première ligne chez des patients atteints de CBNPC localement avancés ou métastatiques et porteurs de mutations de l'*EGFR*. L'afatinib a démontré un bénéfice en comparaison avec la chimiothérapie en termes de médiane de survie sans progression (11,1 mois *versus* 6,9 mois pour l'essai LUX-Lung 3 et 11 mois contre 5,6 mois pour l'essai LUX-Lung 6) et de taux de réponse (56 % contre 23 % pour l'essai LUX-Lung 3 et 66,9 % *versus* 23 % pour l'essai LUX-Lung 6). En revanche, dans ces deux essais, l'afatinib n'a pas permis une amélioration de la médiane de survie globale excepté pour les patients porteurs d'une délétion de l'exon 19 (contrairement aux patients porteurs de la mutation L858R).

Pour ce qui est de la survenue d'effets indésirables de grade 3 ou plus elle est de 49 % pour le bras afatinib et de 48 % dans le bras chimiothérapie dans l'essai LUX-Lung 3 et de 36 % pour le bras afatinib contre 60,2 % pour le bras chimiothérapie dans l'essai LUX-Lung 6. Les effets indésirables les plus fréquemment rapportés sous afatinib ont été des rashes cutanés, des diarrhées et des paronychies.

De plus, l'afatinib a permis une amélioration des symptômes de la maladie en retardant le délai de détérioration par toux, dyspnée et douleur et également une amélioration de la santé globale et de la qualité de vie des patients (223–226).

Versus EGFR-TKI de première génération :

L'essai clinique LUX-Lung 7 de phase IIb adressé à des patients atteints de CBNPC localement avancés ou métastatiques et porteurs de mutations activatrices de l'*EGFR*, compare en première ligne

un bras afatinib à un bras géfitinib. L'afatinib a permis une amélioration significative de la survie sans progression (11 mois *versus* 10,9 mois), du délai de temps jusqu'à échec thérapeutique (13,7 mois contre 11,5 mois) et du taux de réponse objective (72,5 % *versus* 56 %) en comparaison avec le géfitinib. En revanche la médiane de survie globale a été améliorée mais pas de façon significative. De plus, l'afatinib semble moins bien toléré que le géfitinib puisque la survenue d'événements indésirables de grade 3 ou plus liés au traitement ont été de 31,3 % dans le groupe afatinib contre 19,5 % dans le groupe géfitinib avec une majoration du nombre de survenue de rashes cutanés, de diarrhées et de fatigue. L'amélioration de la qualité de vie a été similaire dans les deux bras (227,228).

En monothérapie dans le traitement des patients atteints d'un CBNPC de type épidermoïde, localement avancé ou métastatique, progressant sous ou après chimiothérapie à base de platine en comparaison avec un EGFR-TKI de première génération : Etude LUX-Lung 8 :

En deuxième ligne chez des patients atteints de CBNPC de type épidermoïde de stade avancé et qui ont progressé après au moins 4 cycles de chimiothérapie à base de sel de platine, l'essai de phase III LUX-Lung 8 a permis la comparaison entre afatinib et erlotinib. Cette étude indique que l'afatinib permet un gain en termes de survie sans progression (médiane de 3,5 mois *versus* 2,5 mois) et de survie globale (médiane de 8,4 mois *versus* 6,6 mois). Et ceci d'autant plus chez les patients présentant des mutations activatrices de gènes de la famille ErbB.

De plus, la survenue de toxicités a été similaire dans les deux bras puisque la survenue d'effets indésirables de grade 3 ou plus est de 57 % pour les deux bras. Néanmoins, les effets indésirables de diarrhées et de stomatites ont été plus fréquents avec l'afatinib, alors que les rashes cutanés ont été plus retrouvés sous erlotinib. Il est à noter également que plus de patients ont eu une amélioration de la qualité de vie liée à la santé dans le bras afatinib (36 %) par rapport au bras erlotinib (28 %). (229,230).

L'ensemble de ces essais menés avec l'afatinib, lui ont permis de rentrer dans la stratégie de traitement, en monothérapie :

- Des patients atteints de CBNPC localement avancés ou métastatiques, porteurs de mutations activatrices de l'*EGFR* et naïfs d'un traitement par EGFR-TKI.
- Des patients atteints d'un CBNPC de type épidermoïde, localement avancé ou métastatique, progressant sous ou après chimiothérapie à base de platine.

Dacomitinib :

Dans l'essai clinique de phase III ARCHER 1050, chez des patients atteints d'un CBNPC localement avancé, non éligibles au traitement curatif par chirurgie ou par radiothérapie ou métastatique avec mutations activatrices de l'*EGFR*, le dacomitinib a été comparé au géfitinib en première ligne de traitement. Le dacomitinib permet une amélioration de la survie sans progression (médiane de 14,7 mois *versus* 9,2 mois), de la survie globale (médiane de 34,1 mois contre 26,8 mois) et du taux de réponse objective (74,9 % *versus* 71,6 %).

Par contre, les effets indésirables sévères liés au traitement ont été plus nombreux avec le dacomitinib (9 % *versus* 4 %). Et les effets indésirables les plus fréquemment décrits avec le dacomitinib sont des diarrhées, des paronychies, des dermatites acnéiformes et des stomatites. (231,232).

L'essai clinique de phase III, ARCHER 1009, a permis la comparaison entre dacomitinib et erlotinib chez des patients atteints de CBNPC localement avancés ou métastatiques et ayant progressé après au moins une ligne de chimiothérapie. Cet essai n'a pas mis en évidence de différence significative entre les deux traitements en termes de survie globale et de survie sans progression, ni dans la population globale, ni chez les patients *EGFR*-mutés (233).

Le dacomitinib a également été comparé à un traitement par placebo dans l'essai NCIC CTG BR.26, mené chez des patients atteints de CBNPC avancés ou métastatiques et lourdement prétraités par au moins trois lignes de traitement comprenant chimiothérapie et EGFR-TKIs de première génération. Chez ces patients le dacomitinib ne permet pas une amélioration de la survie globale, ni dans la population totale, ni chez les patients porteurs de mutations activatrices de l'EGFR. Par contre le taux de réponse objective et la médiane de survie sans progression ont été significativement améliorés même s'ils restent très mauvais (234).

Ces deux derniers essais cliniques de phase III n'ayant pas été concluants, le dacomitinib n'obtiendra l'AMM que chez les patients atteints d'un CBNPC localement avancé ou métastatique avec mutations activatrices de l'EGFR, en première ligne et en monothérapie, suite aux résultats de l'essai ARCHER 1050.

Ces essais menés avec l'afatinib et le dacomitinib ainsi que leurs propriétés pharmacologiques, à savoir un spectre plus large et une irréversibilité de liaison à leurs cibles (178,235), ont permis de placer les EGFR-TKIs de deuxième génération avant ceux de première génération dans la stratégie thérapeutique de première ligne et de deuxième ligne des CBNPC, mais sûrement au prix d'effets indésirables plus nombreux (rashes cutanés, diarrhées) et pour une courte durée puisque que les EGFR-TKIs de troisième génération ont vite balayé ceux des générations précédentes.

II.B.3.d. Efficacité et Sécurité des EGFR-TKIs de troisième génération.

Osimertinib :

En première ligne et en monothérapie chez les patients atteints d'un CBNPC localement avancé ou métastatique, porteurs de mutations activatrices de l'EGFR en comparaison avec un traitement par EGFR-TKI de première génération : Etude FLAURA :

Cette étude a été réalisée chez des patients atteints de CBNPC avec mutations activatrices de l'EGFR, localement avancés, non éligibles à la radiothérapie ou à la chirurgie à visée curative, ou métastatiques, et n'ayant pas reçu de traitement systémique antérieur pour leur maladie avancée. Cet essai clinique a permis la comparaison entre un bras osimertinib et un bras EGFR-TKI de première génération (géfinitib ou erlotinib). En terme d'efficacité, cet essai démontre une supériorité du traitement par osimertinib car il permet une amélioration de la survie sans progression (médiane de 18,9 mois *versus* 10,2 mois) et de la survie globale (médiane de 38,6 mois *versus* 31,8 mois). A 3 ans, 28 % des patients continuent de recevoir le traitement par osimertinib, alors que 9 % continue de recevoir le traitement par EGFR-TKI de première génération. De plus, l'osimertinib réduit le risque de progression métastatique cérébrale et est plus efficace sur les métastases cérébrales que les EGFR-TKIs de première génération.

En termes de toxicité, le bras osimertinib semble à peine mieux toléré que le bras EGFR-TKIs de première génération puisque la proportion d'événements indésirables de grade 3 ou plus est de 42 % dans le bras osimertinib *versus* 47 %, la proportion d'événements indésirables sérieux est de 27 % dans les deux groupes et la proportion d'interruptions de traitements pour effets indésirables est de 15 % pour le bras osimertinib *versus* 18 %. Les effets indésirables les plus fréquents sont les rashes cutanés et les diarrhées pour les deux bras. Néanmoins, des effets indésirables cardiaques à type de diminution de la fraction d'éjection ou d'allongement du QT sont environ deux fois plus fréquents dans le bras osimertinib, même s'ils restent de grade 1 ou 2 (236,237,198).

Cet essai a permis de placer l'osimertinib en première ligne du traitement des CBNPC localement avancés ou métastatiques et porteurs de mutations activatrices de l'EGFR. Tout patient répondant à ces caractéristiques reçoit désormais l'osimertinib en première intention et non plus les inhibiteurs de première ou de deuxième génération.

En monothérapie chez les patients atteints d'un CBNPC localement avancé ou métastatique, porteurs de la mutation de résistance *EGFR*^{T790M} en comparaison avec une chimiothérapie : Etude AURA3 :

L'efficacité et la sécurité de l'osimertinib dans le traitement des patients atteints d'un CBNPC localement avancé ou métastatique dont la maladie a progressé sous ou après traitement par un autre EGFR-TKI et porteurs de la mutation de résistance *EGFR*^{T790M} ont été démontrées dans l'essai clinique de phase III AURA3. Cet essai compare un bras osimertinib avec un bras chimiothérapie (pémétréxed + carboplatine ou cisplatine). Le traitement par osimertinib apporte un bénéfice significatif en termes de taux de réponse objective (médiane de 71 % *versus* 31 %) et de survie dans progression (10,1 mois *versus* 4,4 mois) en comparaison avec la chimiothérapie. De plus, l'osimertinib possède une efficacité supérieure à la chimiothérapie dans le traitement des métastases cérébrales puisque chez les patients présentant au moins une lésion cérébrale mesurable le taux de réponse objective est de 70 % avec l'osimertinib *versus* 31 % avec la chimiothérapie et la médiane de survie sans progression chez les patients porteurs de lésions cérébrales mesurables ou non est de 11,7 mois avec l'osimertinib contre 5,6 mois avec la chimiothérapie.

Concernant la sécurité de l'osimertinib dans cette indication, l'osimertinib a provoqué moins d'effets indésirables de grade 3 ou plus que la chimiothérapie (23 % contre 47 %) et moins d'arrêts de traitement imputables à des effets indésirables liés au traitement (7 % *versus* 10 %). Les effets indésirables les plus fréquemment retrouvés avec l'osimertinib ont été des diarrhées et des rashes cutanés.

Il est à noter également que le traitement par osimertinib retarde le délai jusqu'à détérioration pour toux, dyspnée et douleurs thoraciques par rapport à la chimiothérapie et augmente la proportion de patients symptomatiques relatant une amélioration de la santé globale et de la qualité de vie (37 % *versus* 22 % avec la chimiothérapie) (238–240).

Ces deux essais ont permis à l'osimertinib d'être indiqué :

- En première ligne et en monothérapie chez les patients atteints d'un CBNPC localement avancé ou métastatique, porteurs de mutations activatrices de l'*EGFR*.
- En monothérapie chez les patients atteints d'un CBNPC localement avancé ou métastatique, porteurs de la mutation de résistance *EGFR*^{T790M}.

L'essai clinique de phase III ADAURA, actuellement en cours, évalue le bénéfice d'un traitement par osimertinib *versus* placebo chez des patients atteints de CBNPC au stade précoce (IB à IIIA), porteurs de mutations activatrices de l'*EGFR* et ayant uniquement subi une résection chirurgicale complète de la tumeur. Les résultats de cet essai sont attendus pour 2021 (241), toutefois un communiqué de presse du laboratoire pharmaceutique gérant cet essai en date du 10 avril 2020 annonce que les résultats de cet essai sont positifs sans donner de chiffres pour le moment.

Rociletinib :

Dans l'essai de phase I/II TIGER-X, le rociletinib a montré une activité sur les patients atteints de CBNPC porteurs de mutations activatrices de l'*EGFR* et de la mutation de résistance T790M (taux de réponse objective de 59 % *versus* 29 % chez les patients non porteurs de la mutation T790M) (197).

Le rociletinib a fait l'objet d'un essai clinique de phase III (TIGER-3) dans lequel il est comparé à la chimiothérapie chez les patients atteints de CBNPC avancé ou métastatique ayant progressé après au moins un traitement par chimiothérapie et un traitement par EGFR-TKI. Les résultats de cet essai ne sont pas encore publiés. Cependant le développement du rociletinib a été arrêté en 2019 du fait de son profil de toxicité défavorable (en particulier du fait de l'induction d'un diabète rapporté dans de nombreux cas).

D'autres inhibiteurs de troisième génération sont actuellement en cours d'investigation clinique : l'olmutinib (HM61713) (242), le nazartinib (EGF816) (243) et le naquotinib (ASP8273) (244–247)

Les EGFR-TKIs de 3^{ème} génération représentent une avancée scientifique primordiale dans le traitement des patients atteints de CBNPC porteurs de la mutation de résistance T790M puisqu'ils ont permis un allongement de la survie globale chez ces patients. Si bien que l'osimertinib est maintenant indiqué dès la première ligne chez les patients porteurs de mutations activatrices de l'EGFR. Malheureusement ces inhibiteurs se heurtent eux aussi à des mécanismes de résistance qui seront développés dans la prochaine partie de cette introduction.

II.C. Les résistances aux EGFR-TKIs dans les cancers bronchiques possédant des altérations géniques de l'EGFR.

La résistance thérapeutique se définit comme la capacité héréditaire des cellules à survivre à des concentrations d'inhibiteur cliniquement pertinentes (248).

II.C.1. Résistances primaires ou acquises.

Sous traitement par EGFR-TKIs, deux types de résistances se distinguent : les résistances primaires (intrinsèques ou innées) et les résistances acquises (adaptatives ou secondaires) (249–251).

II.C.1.a Résistances primaires.

Les résistances primaires font référence aux patients n'ayant pour meilleure réponse au traitement qu'une progression ou une stabilisation de la maladie. Elles concernent environ 10 % des patients traités par EGFR-TKIs (249,250).

Ainsi, les résistances intrinsèques sont présentes dans la tumeur avant le traitement et se réfèrent à la capacité d'une population de cellules à survivre à la thérapie en raison d'une altération génétique ou d'un état cellulaire préexistants (248).

Les mécanismes de résistance primaire sont peu connus, on peut tout de même citer :

- Les rares mutations activatrices de l'*EGFR* associées à une faible sensibilité voire une résistance aux EGFR-TKIs (les mutations G719X, L861Q, S768I et surtout les insertions au niveau de l'exon 20) (cf. partie II.B.3.a.).
- Ou encore la mutation *EGFR*^{T790M}, connue pour être un mécanisme de résistance acquise majeur suite au traitement par EGFR-TKIs de première génération et deuxième génération, mais qui semble également être retrouvée chez des patients naïfs de tout traitement par EGFR-TKI. Ceci reste néanmoins assez controversé car le taux de détection de cette mutation dépend grandement de la sensibilité de la méthode de détection utilisée (252–257). Cependant, la détection de cette mutation avant traitement est associée à un moins bon taux de réponse objective aux EGFR-TKIs et à une survie sans progression plus courte mais qui reste cependant plus longue que chez les patients *EGFR*^{WT} (253,256). Désormais, de nombreuses études utilisant des méthodes de plus en plus sensibles et spécifiques montrent que la présence de cette mutation *EGFR*^{T790M} chez les patients atteints de CBNPC avant traitement n'est pas négligeable. Par exemple, Vendrell *et al.* en utilisant la technique de la digital droplet PCR (sensibilité de 0.001%) ont montré la présence en très faible proportion (0.1% soit un mutant pour 999 WT) de cette mutation chez 66 % des patients (99 patients sur 150) (258).
- Une faible expression de la protéine BIM. Cette protéine est un des membres de la famille BCL-2 et possède une activité pro-apoptotique en régulant l'activation des caspases et donc l'apoptose notamment médiée par les EGFR-TKIs (259–261). Ainsi, une faible expression de

BIM par polymorphisme empêche l'induction de l'apoptose et donc la lyse des cellules tumorales médiée par les EGFR-TKIs (262,263).

- Une faible expression de la protéine NF1 (neurofibromine 1). Cette protéine est un régulateur négatif des protéines Ras du fait de son activité de GAP (GTPase-activating protein). Ainsi, une faible expression de NF1 va entraîner une levée du contrôle négatif qu'elle exerce sur la voie des MAP kinases, augmenter la signalisation médiée par Ras et donc rendre les cellules résistantes aux EGFR-TKIs (264,265). De plus, une diminution de l'expression de NF1 est également observée au cours du traitement par EGFR-TKIs, mais son implication directe dans les résistances acquises aux EGFR-TKIs n'est pas encore prouvée.
- Une forte expression de la protéine RHOB. Calvayrac *et al.*, ont mis en évidence qu'une forte expression de la GTPase RHOB avant le début du traitement constitue un marqueur prédictif de résistance aux EGFR-TKIs. RHOB est responsable d'un maintien de l'activation de la voie AKT rendant les cellules plus résistantes au traitement par EGFR-TKIs (266). Ce rôle de RHOB sera plus amplement développé dans la troisième partie de cette introduction.
- D'autres mécanismes donnant lieu à la réactivation de la voie PI3K/AKT ou de la voie des MAP kinases, à savoir par exemple, la perte de *PTEN*, des mutations de *PI3KCA*, des mutations de *BRAF* (267–269).
- L'activation des voies IGFR1 (270) ou NF-κB (271).

II.C.1.a Résistances acquises.

Les résistances acquises font référence aux patients qui ont une progression de la maladie suite à une réponse objective initiale ou qui ont une stabilité prolongée de la maladie. Une définition plus détaillée a été proposée par Jackman *et al.*, elle comprend 4 critères (272) :

- Le patient doit avoir reçu une thérapie avec un seul agent EGFR-TKI.
- La tumeur du patient possède une mutation de l'*EGFR* connue comme étant sensible aux EGFR-TKIs (délétion dans l'exon 19, mutation L858R, G719X, L861Q) ; Et/ou le patient a présenté un bénéfice clinique objectif au traitement par EGFR-TKI se définissant soit par une réponse complète ou partielle documentée (selon les critères RECIST (Response Evaluation Criteria In Solid Tumors) ou WHO (World Health Organization)), soit par un bénéfice clinique significatif (maladie stable selon les critères RECIST ou WHO) et durable (≥ 6 mois).
- Puis le patient a expérimenté une progression systémique de la maladie (selon les critères RECIST ou WHO) sous EGFR-TKI au cours des trente derniers jours.
- Il n'y a pas eu de traitement systémique entre l'arrêt de l'EGFR-TKI et un nouveau traitement.

Ainsi, les résistances acquises se développent pendant le traitement par sélection de cellules génétiquement résistantes préexistantes dans la tumeur et/ou par acquisition de nouvelles mutations de résistance, recrutement d'autres facteurs de survie, adaptations métaboliques ou changements épigénétiques (248). De plus, il ne faut pas perdre de vue que le microenvironnement tumoral peut également contribuer aux résistances acquises notamment via la sécrétion de divers facteurs par les cellules du stroma résidentes de la tumeur qui promeuvent la survie des cellules tumorales (273).

Dans la suite de cette introduction, nous nous intéresserons plus particulièrement aux résistances acquises et à leurs mécanismes, plus connus que ceux des résistances primaires.

II.C.2. Les différents types de mécanismes de résistances acquises et leurs distributions.

Il existe trois grands types de mécanismes de résistances acquises aux EGFR-TKIs qui sont (249) :

- Les altérations de leur cible : mutations secondaires sur l'*EGFR* (T790M, C797S, et autres...), amplifications de l'*EGFR*.

- L'activation de voies de signalisation compensatoires : amplification de *MET*, amplification de *HER2*, activation de la voie PI3K/AKT, activation de la voie des MAP kinases, activation de AXL, activation de IGF1R/KDM5A, etc...
- La transformation du phénotype cellulaire qui comprend la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) et la transformation histologique.

Ces mécanismes sont résumés dans la figure suivante :

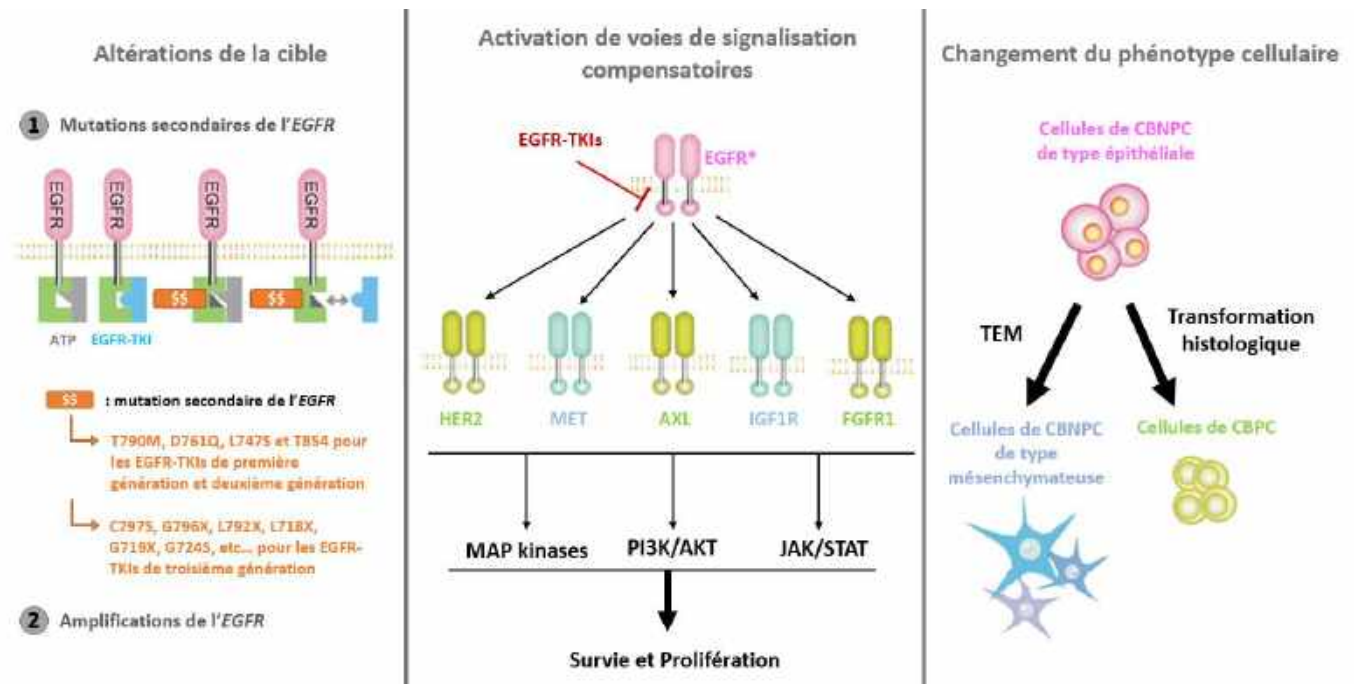


Figure 13 : Les trois grands types de mécanismes de résistances acquis aux EGFR-TKIs.

II.C.2.a. Mécanismes de résistance aux EGFR-TKIs de première et deuxième générations.

En première ligne du traitement des CBNPC porteurs de mutations de l'*EGFR*, les EGFR-TKIs de première génération et de deuxième génération ont été un réel succès clinique puisqu'ils ont permis des taux de réponse globale de 60 à 70 %. Malheureusement cette réponse n'est que de courte durée puisque les médianes de survie sans progression sous ces EGFR-TKIs varient entre 9 et 13 mois. Ainsi, la quasi-totalité des patients développent des mécanismes de résistance au traitement au bout d'environ une année de traitement (184–188,223,225,232).

De nombreux mécanismes de résistance adaptatifs à ces inhibiteurs ont été élucidés et feront l'objet de la suite de cet exposé, mais chez 10 % des patients le mécanisme de résistance reste inconnu. Le mécanisme de résistance le plus fréquemment retrouvé, touchant environ la moitié des patients, consiste en une mutation secondaire de l'*EGFR*, la mutation T790M.

Les mécanismes de résistances acquis aux inhibiteurs de première et deuxième générations identifiés et leurs proportions sont résumés dans la figure suivante :

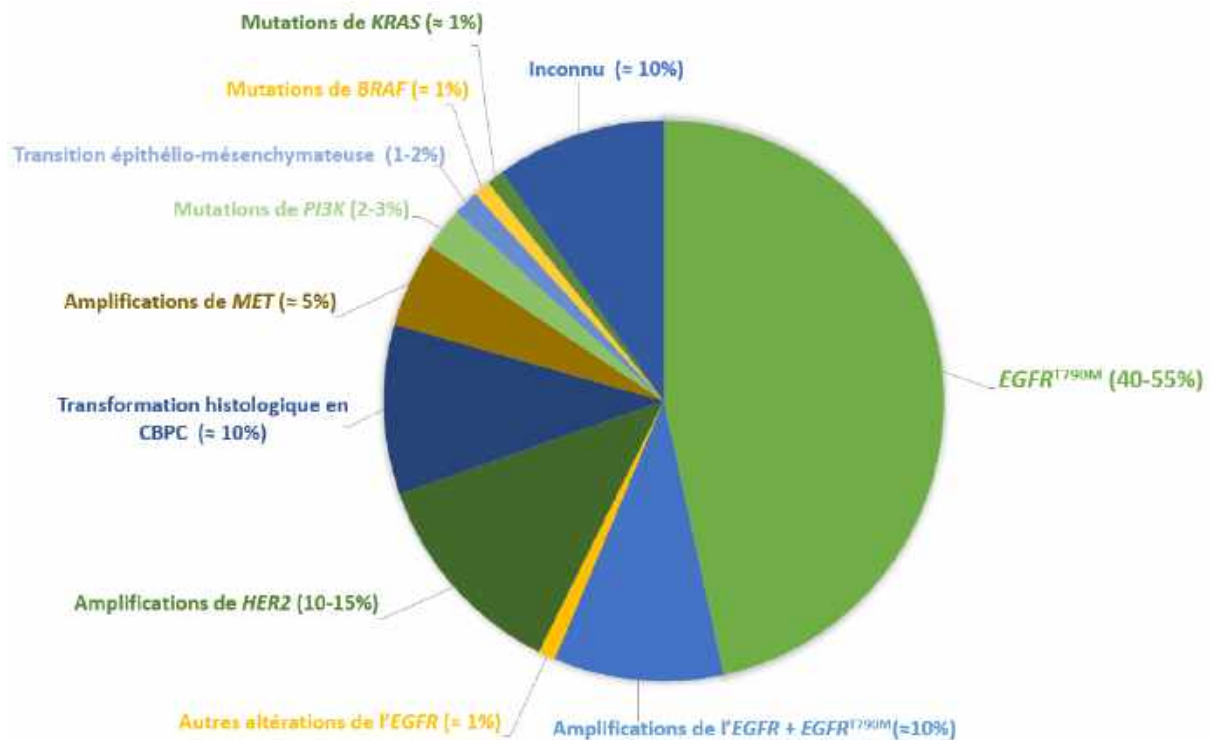


Figure 14 : Les différents mécanismes de résistances acquis identifiés chez les patients traités par EGFR-TKIs de première et deuxième générations. D'après (274).

II.C.2.b. Mécanismes de résistance aux EGFR-TKIs de troisième génération.

Les EGFR-TKIs de troisième génération ont été développés pour cibler à la fois la mutation activatrice originelle de l'EGFR et la mutation de résistance T790M. Ainsi, l'osimertinib utilisé en deuxième ligne après échec d'un traitement par EGFR-TKIs de première ou deuxième générations chez des patients porteurs de la mutation T790M a démontré des taux de réponse objective de 60 à 70 % et une médiane de survie sans progression d'environ 10 mois (196,275,238). Utilisé en première ligne de traitement il démontre également une bonne efficacité en prolongeant la médiane de survie sans progression (18,9 mois au lieu de 10,2 mois pour les EGFR-TKIs de générations précédentes) (236).

Malgré ces très bonnes réponses, inmanquablement, des mécanismes de résistances à ces inhibiteurs de troisième génération apparaissent (238,276). Ces mécanismes sont désormais de plus en plus documentés et étudiés.

Les mécanismes de résistances acquises à l'osimertinib utilisé en première ou deuxième ligne identifiés et leurs proportions sont résumés dans le tableau suivant :

Mécanismes de résistances acquises à l'osimertinib	En première ligne	En deuxième ligne
EGFR^{C797X} et autres mutations secondaires ou amplifications de l'EGFR	6-10 %	10-25 %
Amplifications de MET, HER2 ou PI3KCA	8-17 %	5-50 %
Fusions oncogéniques (RET, BRAF, ALK, FGRFR3, NTRK)	1-8 %	3-10 %
Altérations de la voie PI3K/AKT ou de la voie des MAP kinases	13-14 %	2-10 %
Altérations de gènes impliqués dans la régulation du cycle cellulaire (codant la cycline D1/D2 et E1, les CDK4 et 6 ou CDKN2A)	10 %	12 %
Transformation histologique en CBPC	15 %	10-15 %
Inconnu	40-50 %	30-40 %

Tableau 7 : Les différents mécanismes de résistances acquises identifiés chez les patients traités par osimertinib en première ou deuxième ligne de traitement. D'après (277,278) et les travaux sur les résistances à l'osimertinib dans l'essai FLAURA (non publiés mais présentés au congrès de l'ESMO 2019).

II.C.3. Description des différents mécanismes de résistances acquises aux EGFR-TKIs.

II.C.3.a. Altérations de la cible.

Le mécanisme de résistance aux EGFR-TKIs le plus fréquemment identifié consiste en l'acquisition d'une mutation secondaire sur l'EGFR. La mutation secondaire la plus retrouvée est la T790M sous EGFR-TKIs de première ou deuxième génération et la mutation C797S sous EGFR-TKIs de troisième génération, mais il en existe d'autres décrits dans ce chapitre.

EGFR^{T790M} :

C'est en 2005, que deux équipes indépendantes mettent en évidence la mutation c.2369C>T sur l'exon 20 de l'EGFR chez des patients ayant progressé sous géfitinib ou erlotinib après une réponse initiale (279,280). Cette mutation T790M entraîne la substitution d'une méthionine par une thréonine en position 790 du domaine kinase et plus précisément au niveau de la poche à ATP. Elle a pour conséquence d'augmenter l'affinité de la kinase pour l'ATP d'environ cinq fois, ainsi la concentration d'ATP nécessaire à l'activité kinase diminue et l'affinité pour l'ATP se rapproche de celle de l'EGFR^{WT}, réduisant l'efficacité des EGFR-TKIs de première et deuxième générations (281).

Cette mutation secondaire responsable de la résistance aux EGFR-TKIs de première et deuxième générations est mise en évidence chez environ 50 % des patients porteurs de mutations activatrices de l'EGFR et résistants aux EGFR-TKIs (191,192,282–284).

L'évaluation du statut EGFR^{T790M} est donc devenue primordiale afin d'aiguiller les cliniciens sur les prochaines thérapies à proposer aux patients. A l'origine cette évaluation n'était possible que sur du tissu tumoral issu d'une re-biopsie, mais désormais elle est largement réalisée sur l'ADN circulant (ctDNA) en première intention. Ces biopsies liquides offrent de nombreux avantages par rapport aux biopsies tissulaires : ce sont des examens beaucoup moins invasifs pour le patient, moins coûteux et plus rapidement réalisés en routine. De plus, elles permettent un suivi itératif de la réponse au traitement par EGFR-TKI et de pallier à l'hétérogénéité tumorale (285–287). En outre, Oxnard *et al.*, ont montré que 31 % des patients testés négatifs pour la mutation T790M sur tissu se sont avérés positifs dans l'ADN circulant (288). Ainsi, à ce jour, la détection des mutations de l'EGFR sur les biopsies liquides est la seule indication clinique approuvée par les agences compétentes nationales.

EGFR^{C797S} :

Le mécanisme de résistance aux EGFR-TKIs de troisième génération le plus fréquent est l'acquisition d'une mutation secondaire sur l'exon 20 de l'*EGFR* : la mutation C797S. Tout comme la mutation T790M, elle entraîne une substitution d'acides aminés, à savoir la substitution d'une cystéine par une sérine en position 797, au niveau de la poche à ATP du récepteur. Cette substitution va entraîner un changement conformationnel de la protéine et empêcher la fixation de l'EGFR-TKI de troisième génération sur le site actif de l'EGFR (179,289–291).

Cette mutation a d'abord été identifiée dans des études précliniques (199,290). Puis la mutation C797S a été mise en évidence chez des patients résistants à l'osimertinib (289,292–294,277) et au rocilétinib (295,296). Cependant il existe des disparités en termes de fréquence d'apparition de cette mutation de résistance entre osimertinib et rocilétinib. En effet, la mutation C797S est retrouvée chez 14 à 24 % des patients résistants à l'osimertinib alors qu'elle n'est retrouvée que chez 2 à 5 % des patients résistants au rocilétinib (297). De plus, la mutation C797S est retrouvée moins fréquemment lorsque l'osimertinib est administré en première ligne (7 %) (d'après les travaux sur les résistances à l'osimertinib dans l'essai FLAURA non publiés mais présentés au congrès de l'ESMO 2019) plutôt qu'en deuxième ligne (10-26 %) (277).

Le contexte allélique dans lequel se trouve cette mutation revêt une importance particulière puisqu'il va avoir une implication dans le choix d'un autre traitement. En effet, trois cas de figure existent : soit les cellules présentant la mutation C797S et restent sensibles aux EGFR-TKIs à structure quinazoline, soit la mutation C797S est présente en *trans* avec la mutation T790M et elles pourront être ciblées par l'association d'un EGFR-TKI de première génération avec un EGFR-TKI de troisième génération, soit enfin les deux mutations sont en *cis* et dans ce cas les cellules seront résistantes aux trois générations d'EGFR-TKIs seuls ou en combinaison (199,298,299).

Autres mutations secondaires de l'EGFR :

Sous EGFR-TKIs de première et deuxième générations :

D'autres mutations secondaires de l'*EGFR* se situant sur l'exon 19 et engendrant une diminution de la sensibilité aux EGFR-TKIs de première et deuxième générations ont été rapportées dans des cas cliniques isolés : la mutation D761Y (282), la mutation L747S (259,300) et la mutation T854A (301).

Ces mutations restent cependant très rares et leur relevance clinique reste à préciser puisque le mécanisme de résistance médié par ces mutations n'est pas encore bien élucidé. Cependant, il a été démontré *in vitro* que de plus fortes concentrations d'EGFR-TKI sont capables d'inhiber ces mutants et que ces mutations entraîneraient un changement conformationnel de la kinase réduisant l'affinité pour l'EGFR-TKI (259,300).

De plus, les mutations D761Q et L747S ont également été mises en évidence chez des patients naïfs de traitement par EGFR-TKIs et qui ont éventuellement développé des résistances primaires au géfitinib (302–305).

Sous EGFR-TKIs de troisième génération :

Outre la mutation C797S, de très nombreuses autres mutations secondaires de l'*EGFR* chez les patients résistants aux EGFR-TKIs de troisième génération ont été mises en évidence :

- La mutation C797G qui a été identifiée dans l'ADN tumoral circulant (306) ou dans la biopsie pleurale (associée à des amplifications de MYC et de l'*EGFR*) de patients résistants à l'osimertinib (307).

- Les mutations G796S/R/D détectées chez environ 2 % des patients résistants à l'osimertinib (306), sachant que la mutation G796R semble être celle ayant le plus fort impact sur la liaison de l'osimertinib (308,309,306,310).
- Des mutations sur le résidu L792 retrouvées dans environ 11 % des cas (306) dont la plus fréquente est la mutation L792H, qui en général coexiste avec d'autres mutations de l'*EGFR*, en *cis* avec la mutation T790M et en *trans* avec la mutation G796/C797, et qui restent sensibles au géfitinib *in vitro* (306,308).
- Des mutations sur le résidu L718 sont également responsables de résistances à l'osimertinib (7 % des cas) (306,311). La plus fréquente est la mutation L718Q et en général ces mutations ne coexistent pas avec les mutations C797 (306,312). La mutation L718Q semble conserver une sensibilité aux EGFR-TKIs de première et deuxième générations en l'absence de la mutation T790M (313–315).
- Des mutations sur le résidu G719 dans environ 2 % des cas (306) avec la mutation G719A (306,308).
- La mutation G724S sur l'exon 18 empêche également la fixation de l'osimertinib sur son site effecteur et reste sensible aux EGFR-TKIs de deuxième génération (316–320).
- Les mutations E709K, L692V et L798I identifiées dans l'ADN tumoral circulant de patients résistants au rociletinib (295).
- Ainsi que la mutation M766Q retrouvée après séquençage de l'ADN tumoral circulant d'une patiente initialement *EGFR*^{L858R/T790M} qui a progressé sous osimertinib. *In vitro* cette mutation empêche la fixation de l'osimertinib sur l'EGFR (321).

Amplification de l'EGFR :

Des amplifications de l'*EGFR* ont également été mises en évidence chez environ 10 % des patients résistants aux EGFR-TKIs de première et deuxième générations. Ces amplifications sont toujours détectées en présence de la mutation T790M (282,322). Cependant, l'implication exacte de ces amplifications dans le mécanisme de résistance n'est pas encore bien élucidée à ce jour.

Ces amplifications de l'*EGFR* ont également été mises en évidence sous osimertinib et rociletinib (323,295,324,325,296,294,306), ainsi qu'une augmentation de l'expression de l'ARNm de l'EGFR dans des tissus tumoraux de patients ayant progressé sous osimertinib (326).

II.C.3.b. Activation de voies de signalisation compensatoires.

En deuxième position des mécanismes de résistance aux EGFR-TKIs, nous trouvons les mécanismes dits de « contournement ». Ils consistent en l'activation de voies de signalisation alternatives, par des mécanismes génétiques mais aussi non génétiques, qui permettent d'activer les mêmes effecteurs que la voie de l'EGFR, à savoir principalement ERK1/2 et AKT.

Amplification de HER2 :

Les amplifications de *HER2* sont identifiées chez 10 à 15 % des patients résistants aux EGFR-TKIs de première ou deuxième générations (192,327). Ces amplifications sont également un mécanisme de résistance aux EGFR-TKIs de troisième génération (328,293,295,329).

Takezawa et al., ont démontré *in vitro*, qu'une sur-expression de HER2 confère une résistance aux anti-EGFR alors qu'une diminution de son expression confère une sensibilité. De plus, les amplifications de *HER2* s'avèrent être un mécanisme de résistance aux EGFR-TKIs chez les patients porteurs de mutations activatrices de l'*EGFR*, ceci indépendamment de la mutation secondaire T790M de l'*EGFR* (327). Ceci explique pourquoi une double inhibition de l'EGFR et de HER2 en associant l'afatinib et le cétuximab (anticorps monoclonal dirigé contre l'EGFR) permet de surmonter la

résistance aux EGFR-TKIs dans des modèles murins et chez des patients, indépendamment de la présence de la mutation T790M de l'*EGFR* (330,331).

De plus, les amplifications de *HER2* ont également été mises en évidence chez 1 % des patients naïfs d'un traitement par EGFR-TKIs (327), suggérant que ces altérations moléculaires pourraient jouer un rôle dans l'acquisition des mécanismes de résistances aux EGFR-TKIs chez un petit nombre de patients.

Ainsi, pour reverser ces résistances l'association d'un inhibiteur de HER2 avec un EGFR-TKI a été proposée (332) et est en cours d'évaluation dans la cohorte n°11 de l'essai CAPTUR (NCT03297606).

Amplification de *MET* et activation de la voie de l'*HGFR* :

Les amplifications géniques de *MET* détectées le plus souvent par une technique de FISH sont retrouvées chez environ 5 % des patients ayant résisté aux EGFR-TKIs de première ou deuxième générations (191,192,333) et de troisième génération (328,334,293,295,335). Cette amplification conduit à l'hétéro-dimérisation de MET avec le récepteur HER3 provoquant une activation permanente de la voie PI3K/AKT, en contournant l'inhibition de la voie de l'*EGFR* inhibée par les EGFR-TKIs (336).

D'autres études ont montré qu'une suractivation de MET ou HGFR pouvait être due à une hypersécrétion de son ligand naturel, l'*HGF*, engendrant également une résistance acquise au géfitinib (337,338) et à un EGFR-TKI irréversible (339).

De plus, des amplifications de *MET* ont également été mises en évidence rarement et au niveau d'une sous-population de cellules tumorales chez des patients naïfs de traitement par EGFR-TKIs (340–342). Cette sous-population pourra vraisemblablement être sélectionnée sous traitement et provoquer la résistance acquise.

Des nombreuses stratégies thérapeutiques se sont évertuées à surmonter cette résistance acquise (343). Bien qu'il n'y ait aucune thérapie ciblée spécifiquement approuvée chez les patients atteints de CBNPC ayant progressé sous EGFR-TKIs *via* une amplification de *MET*, des cas cliniques ont démontré l'efficacité de l'association d'un EGFR-TKI avec un inhibiteur de MET (344–346). De nombreux essais cliniques sont actuellement en cours pour évaluer l'association d'un inhibiteur de MET avec un EGFR-TKI avec par exemple l'association cabozantinib/erlotinib (347), l'association capmatinib/erlotinib (NCT02468661)(348), capmatinib/géfitinib (71), et bien d'autres. Récemment, un l'essai de phase Ib TATTON évaluant l'association de l'osimertinib avec le savolitinib a démontré une bonne tolérance de l'association et un taux de réponse objective de 44 % (349) . L'essai de phase I/II INSIGHT évaluant l'association du géfitinib avec le tepotinib a également démontré une nette supériorité en termes de survie sans progression et de survie globale par rapport au traitement chimiothérapeutique standard chez les patients présentant une surexpression ou une amplification de MET (350).

Autres altérations permettant l'activation de la voie PI3K/AKT :

En dehors des amplifications de *MET* que nous venons de voir, l'activation de la voie PI3K/AKT dans les résistances aux EGFR-TKIs peut se faire *via* d'autres altérations géniques comme la perte de *PTEN* (268,351,352,326) ou bien des mutations de *PI3KCA* avec notamment la mutation E545K qui est la plus fréquente ou d'autres mutations moins fréquentes (E542K, E453K, H1047R, R88Q, N345K et E418K) (267,326,295,353,277).

Ces altérations dans la voie PI3K/AKT représentent 2 à 3 % des mécanismes de résistances acquises aux EGFR-TKIs (191,274).

Autres altérations permettant l'activation de la voie des MAP kinases :

L'activation compensatoire de la voie des MAP kinases dans les résistances aux EGFR-TKIs peut se faire par différentes altérations géniques qui représentent environ 2 % des mécanismes de résistance aux EGFR-TKIs. Ces altérations sont :

- Des amplifications de *MAPK1*, aussi connue sous le nom de ERK2 (326,354).
- Des altérations de *BRAF* avec les mutations G469A et V600E (269,355,356,277,357).
- Des mutations de *KRAS* telles que les mutations G12A/D/S, G13D, Q61H/R/K et A146T mises en évidence dans l'ADN tumoral circulant (Chabon et al., 2016) ou les biopsies tumorales (293,324,358,313,353) de patients résistants à un EGFR-TKI de troisième génération.
- Des amplifications de *KRAS* (358).
- Des mutations de *NRAS* dont la mutation E63K identifiée sur des cellules résistantes à l'osimertinib *in vitro* (359).

Afin de contrer cette activation de la voie des MAP kinases, des associations d'EGFR-TKIs avec des inhibiteurs de MEK (sélumétinib, tramétinib) ou de BRAF (encorafénib) ont montré leur efficacité (359,360,355) et sont actuellement en cours d'évaluation clinique.

Autres mécanismes : activation d'AXL, d'IGF1R, de FGFR1 et de Notch :

AXL est un récepteur à activité tyrosine kinase capable d'activer les voies de signalisation PI3K/AKT/mTOR, MEK/ERK, NFκB et JAK/STAT afin de réguler divers processus cellulaires tels que la survie, la prolifération et la migration cellulaire, la réponse immunitaire et l'inflammation (361,362).

L'activation de la voie AXL a été démontrée comme étant un mécanisme de résistance aux EGFR-TKIs en jouant notamment un rôle dans le processus de TEM. En effet, une augmentation de l'expression d'AXL et de son ligand GAS6 a été mise en évidence chez 20 % des patients résistants à l'erlotinib ou au géfitinib. De plus, l'inhibition d'AXL restaure la sensibilité à l'erlotinib (363–365) et l'association d'un inhibiteur d'AXL à un traitement par EGFR-TKI retarde considérablement l'émergence de résistance *in vitro* et *in vivo* (365–367).

Ainsi, AXL est devenue une cible thérapeutique prometteuse chez les patients résistants aux EGFR-TKIs (362) et de nombreux essais cliniques sont en cours comme l'essai de phase I/II qui évalue l'inhibiteur spécifique de AXL (BGB324) (NCT02424617) associé à l'erlotinib dans les CBNPC ou bien d'autres essais avec des inhibiteurs multi-cibles comme le cabozantinib (347,368).

L'activation de la voie de l'**IGF1R** (insulin-like growth factor 1 receptor) est aussi reconnue comme faisant partie des mécanismes de résistance aux EGFR-TKIs. En effet, l'activation de cette voie associée à une diminution de l'expression de répresseurs tels que IGFBP3 et IGFBP4, court-circuite l'inhibition médiée par le géfitinib en activant la voie PI3K/AKT. De plus, l'inhibition de la voie de l'IGF1R restaure la sensibilité au géfitinib (369). Ceci a été confirmé sous inhibiteurs irréversibles de deuxième et troisième générations (370–373).

En 2010, Sharma *et al.*, démontrent par ailleurs l'existence d'une sous-population de cellules capables de résister à l'erlotinib grâce à l'activation de la voie de l'IGF1R et à un état chromatinien réprimé qui requiert l'expression de la lysine déméthylase KDM5A. L'inhibition de la voie de l'IGF1R, la déplétion de KDM5A ou bien l'utilisation d'inhibiteurs d'histone désacétylase (HDACs) sur cette population de cellules résistantes en combinaison avec un EGFR-TKI restaure la sensibilité à l'EGFR-TKI et empêche l'émergence d'un mécanisme de résistance. De plus, l'inhibition de la voie de l'IGF1R entraîne une diminution de l'expression de KDM5A, suggérant un lien entre ces deux voies (270).

Afin de surmonter ce mécanisme de résistance, l'association de l'erlotinib avec différents anticorps monoclonaux inhibiteurs d'IGF1R a été testée dans différents essais cliniques mais

malheureusement ces essais peinent à démontrer une amélioration de la survie sans progression et de la survie globale avec l'association (374–376). Une sélection des patients les plus à même de répondre à ces traitements grâce à l'évaluation de biomarqueurs prédictifs de réponse validés (IGF-1 circulant) pourrait être utile afin de tirer profit des inhibiteurs d'IGF1R.

L'activation de la voie du **FGF2/FGFR1** (Fibroblast Growth Factor Receptor 1) fait également partie des mécanismes de résistance aux EGFR-TKIs en permettant l'activation de la voie PI3K/AKT et de la voie MEK/ERK. En effet, l'augmentation de l'expression de FGF2 et du FGFR1 est constatée sur des cellules résistantes aux EGFR-TKIs de première et deuxième générations et l'inhibition de FGFR permet de restaurer la sensibilité de ces cellules aux EGFR-TKIs (377–379). Qui plus est, les voies du FGFR2 et du FGFR3 semblent également être impliquées dans les résistances acquises au géfitinib (380).

De plus, une amplification génique du *FGFR1* a également été rapportée chez un patient ayant progressé sous osimertinib associée à une augmentation de l'expression du FGF2, suggérant l'implication de la boucle autocrine FGF2-FGFR1 dans cette résistance (326).

Par conséquent des molécules inhibant le FGFR1 sont maintenant en cours de développement (381,382).

La voie **Notch** a également été décrite comme mécanisme de résistance aux EGFR-TKIs (383–386). Bousquet-Mur et al., ont mis en évidence que l'inhibition pharmacologique de la voie Notch sensibilise les tumeurs résistantes aux EGFR-TKIs dans des modèles murins transgéniques et des PDX *EGFR*^{T790M/L858R} traités par géfitinib. De plus, l'inhibition de Notch permet également de sensibiliser des tumeurs *EGFR*^{C797S} résistantes à l'osimertinib dans des modèles de xénogreffes. Cet effet est médié par la diminution de l'expression de HES1 via la fixation de phospho-STAT3 sur son promoteur. HES1 est une protéine répressive de la transcription et une forte expression de HES1 avant traitement est corrélée à un mauvais pronostic chez les patients atteints d'adénocarcinomes bronchiques et traités par EGFR-TKIs. De plus, son expression continue d'augmenter au moment de la rechute tumorale. Tout ceci fait de HES1 un marqueur prédictif de réponse aux EGFR-TKIs et suggère un rôle de cette protéine dans les résistances acquises aux EGFR-TKIs (386).

II.C.3.c. Modification du phénotype cellulaire : transformation histologique et transition épithélio-mésenchymateuse.

Transformation histologique :

Parmi les phénomènes de résistances aux EGFR-TKIs figurent les transformations histologiques en CBPC qui ont d'abord été rapportées dans de nombreux cas cliniques (387–392,326,323,393–395).

Puis, ces passages d'une histologie de CBNPC à une histologie de CBPC, prouvés notamment par l'expression de marqueurs neuroendocriniens par la tumeur, suite à un traitement par EGFR-TKIs ont été rapportés chez environ 10 à 15 % des patients (333,191,192,277,294,320).

Ces patients sont alors sensibles aux thérapeutiques utilisées pour traiter les CBPC, à savoir une chimiothérapie à base de sel de platine et d'étoposide (191,393). De plus, les mutations originelles de l'*EGFR* sont maintenues dans le CBPC ce qui exclut la possibilité du développement d'un second type de cancer primitif chez ces patients. Par ailleurs, ces transformations histologiques semblent être un mécanisme de résistance spécifique aux EGFR-TKIs car aucun patient *EGFR*-wild type sur 69 testés traités par chimiothérapie ou radiothérapie n'a montré un tel phénomène (191).

Les mécanismes moléculaires à l'origine de ce changement phénotypique des cellules cancéreuses sont mal connus. Néanmoins, il semble lié à une perte d'expression de la protéine du rétinoblastome (RB) associée une diminution de l'expression de l'*EGFR*, comme ce qui est fréquemment retrouvé dans les CBPC primitifs (326,396). En effet, Niederst *et al.* ont rapporté une

perte totale de l'expression de RB chez tous les cas de transformation histologique suite à une résistance acquise aux EGFR-TKIs de première génération étudiés. Cependant, *in vitro*, la déplétion de RB est insuffisante pour provoquer la résistance et la différenciation neuroendocrinienne des cellules. Ceci suggère que cette transformation histologique semble impliquer un mécanisme plus complexe avec l'accumulation d'altérations géniques (comme la perte de RB1 et de TP53) et l'implication d'un état chromatinien particulier, impliquant notamment les enzymes du système APOBEC (apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide-like). Ces enzymes permettraient aux cellules pluripotentes résistantes de se différencier en une lignée de CBPC ne nécessitant pas de signalisation EGFR (396,397). Cette hypothèse est soutenue par le fait que CBNPC et CBPC semblent partager une même cellule d'origine qui pourra se différencier en l'une ou l'autre des lignées selon les altérations géniques qu'elle va acquérir (perte de RB1 pour la lignée CBPC, mutations de EGFR ou KRAS pour la lignée CBNPC) (398–401).

En outre, des transformations histologiques en cancers épidermoïdes ont également été rarement rapportées sous EGFR-TKIs (402–405,294,406,407,320). Ces transformations phénotypiques sont associées à une considérable complexité et diversité génomique et malheureusement à une courte survie après progression.

Quoi qu'il en soit, de plus amples études sont nécessaires pour mieux élucider les ressorts génétiques et non génétiques de ces transformations histologiques comme mécanisme de résistance aux EGFR-TKIs.

Transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) :

La transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) est un processus biologique qui permet à une cellule épithéliale, de subir des modifications moléculaires et biochimiques lui conférant un phénotype mésenchymal. Cette transition comporte plusieurs étapes majeures : perte d'adhérence cellule-cellule, réorganisation du cytosquelette, rupture de la membrane basale, migration et invasion de la matrice extracellulaire et production de collagènes de type I, III et IV, de protéoglycanes et de fibronectine. Cela confère aux cellules des capacités migratoires et invasives ainsi qu'une plus forte résistance à l'apoptose. Ainsi, la TEM est un processus central de la progression tumorale et de la formation de métastases (408).

Depuis les années 2010, de plus en plus d'évidences cliniques et moléculaires ont permis d'établir un lien entre la TEM et les résistances acquises aux EGFR-TKIs. En effet, *in vitro*, l'acquisition d'une résistance aux EGFR-TKIs s'accompagne d'un changement du phénotype cellulaire reflétant un processus de TEM avec une diminution de l'expression de marqueurs épithéliaux tels que la E-cadhérine et une augmentation de l'expression de marqueurs mésenchymateux tels que la vimentine, la N-cadhérine ou des facteurs de transcription impliqués dans le processus de TEM (ZEB1/2, SNAIL, SLUG, TWIST1) (409–413). Qui plus est, la surexpression de facteurs impliqués dans la TEM, comme SNAIL ou SLUG, ou bien le traitement des cellules avec un inducteur de TEM tel que le TGF- β promeuvent la résistance (410,411). Et, au contraire, la réexpression de la E-cadhérine ou bien l'inhibition de facteurs impliqués dans la TEM comme TWIST1 ou ZEB1 restaure la sensibilité aux EGFR-TKIs (410,414,412,413). Tous ces résultats argumentent l'implication de la TEM dans le développement de résistances aux EGFR-TKIs.

De plus, la TEM est également mise en évidence dans de nombreux cas cliniques de patients porteurs de tumeurs résistantes aux EGFR-TKIs. Sont retrouvées chez ces patients, une diminution de marqueurs épithéliaux tels que la E-cadhérine, la β -caténine et une augmentation de marqueurs mésenchymateux tels que la vimentine, la fibronectine, etc... (415,409,191,416).

Mais quelles sont les voies de signalisation permettant l'activation et la réalisation de ce processus de TEM ? Plusieurs signaux intracellulaires ont été identifiés comme pouvant activer la TEM dans un contexte de résistance aux EGFR-TKIs :

- La voie du TGF- β .

Le TGF- β est l'un des inducteurs de la TEM le mieux caractérisé sous traitement par EGFR-TKIs. En effet, le traitement par géfitinib permet d'augmenter la sécrétion de TGF- β dans des cellules tumorales bronchiques porteuses de mutations activatrices de l'*EGFR* et d'engendrer l'activation des protéines SMAD2/3 jouant un rôle crucial dans le processus de TEM (417). Suite à leur activation, les protéines SMAD sont transportées du cytoplasme vers le noyau pour jouer leur rôle de co-activateurs transcriptionnels afin de promouvoir la transcription de gènes « mésenchymateux » ou bien de co-répresseurs afin d'inhiber la transcription de gènes « épithéliaux » (418). Les protéines SMAD sont également capables d'activer le facteur de transcription ZEB1 impliqué dans la TEM dans des cellules tumorales porteuses de mutations activatrices de l'*EGFR* et résistantes à l'erlotinib (414).

En plus d'activer la voie SMAD, le TGF- β est capable d'activer la voie des MAP kinases également impliquée dans la TEM et la résistance aux EGFR-TKIs (419,420).

Enfin, Yao *et al.* ont montré que les cellules résistantes à l'erlotinib possèdent des marqueurs de TEM (augmentation de l'expression de la vimentine et des facteurs de transcription impliqués dans la TEM, SNAI et ZEB2, et diminution de l'expression de la E-cadhérine) et une augmentation de l'activation de l'axe TGF- β /IL-6. De plus, l'activation du TGF- β 1 ou du TGF- β 2 est nécessaire à la résistance à l'erlotinib et à la TEM. En effet, la diminution de l'expression du TGF- β 1 ou β 2 dans les cellules résistantes à l'erlotinib induit une transition d'un état mésenchymateux vers un état épithélial (TME) avec une diminution de l'expression de marqueurs mésenchymateux au profit de marqueurs épithéliaux et une re-sensibilisation des cellules à l'erlotinib (421).

- La voie de Notch-1.

Xie *et al.*, rapportent que l'expression de Notch-1 est augmentée dans les cellules résistantes au géfitinib. De plus, l'expression de la forme active du récepteur Notch-1 promeut la TEM dans des cellules tumorales bronchiques porteuses de mutations activatrices de l'*EGFR*. *A contrario*, dans les cellules résistantes, la diminution de l'expression de Notch-1 *via* des siARN reverse le processus de TEM et restaure la sensibilité au géfitinib (422).

Zhang *et al.*, mettent en évidence que Notch-1 est capable de promouvoir la TEM et la résistance aux EGFR-TKIs induites par le facteur de transcription ZEB1. Qui plus est, l'inhibition de la signalisation de Notch *via* l'utilisation d'un inhibiteur de γ -sécrétase restaure partiellement la sensibilité au géfitinib (423).

De plus, la voie du TGF- β et la voie Notch-1 coopèrent pour réguler la reprogrammation génique à l'origine de la TEM, via l'activation de l'histone-désacétylase HDAC6 (424,425).

- La voie de AXL.

Zhang *et al.*, ont mis en évidence que l'expression d'AXL est augmentée dans les cellules résistantes à l'erlotinib et chez les patients résistants aux EGFR-TKIs. De plus, cette surexpression promeut la résistance *in vitro* et dans des modèles de xénogreffes et elle est associée à un processus de TEM notamment montré par l'augmentation de l'expression de la vimentine. De plus, l'inhibition d'AXL restaure la sensibilité à l'erlotinib. Enfin, la déplétion de la vimentine permet de diminuer l'expression de AXL et la déplétion concomitante de la vimentine et de AXL sensibilise les cellules résistantes à l'erlotinib, suggérant un rôle de la TEM dans le développement de résistances aux EGFR-TKIs *via* la voie AXL (364).

Ces résultats sont confirmés par ceux de Byers *et al.* qui montrent que les cellules mésenchymateuses sont plus résistantes aux EGFR-TKIs et que l'inhibition d'AXL reverse le processus

de TEM et sensibilise sélectivement les cellules mésenchymateuses résistantes aux EGFR-TKIs *in vitro* et dans des modèles de xéno greffes (363).

- La voie de l'IGFR1.

Zhou *et al.*, ont montré que le traitement de cellules naïves de traitement par EGFR-TKI par de l'IGF-1 exogène induit leur TEM et les rend résistantes aux EGFR-TKIs *via* l'activation de l'IGFR1 qui active la voie des MAP kinases. De plus l'inhibition de l'IGFR1, tout comme la surexpression de la E-cadhérine, permet de réverser le processus de TEM et la résistance aux EGFR-TKIs (426).

- La voie Src/FAK.

Cette voie est activée dans les cellules résistantes à l'erlotinib et présentant des caractéristiques mésenchymateuses. De plus l'inhibition de cette voie *via* l'utilisation de siRNA ou *via* un traitement par un inhibiteur de Abl/Src, le dasatinib, permet d'induire l'apoptose sélective des cellules résistantes mésenchymateuses (427).

Aussi, Li *et al.* montrent que les extraits de la fumée de cigarette induisent un phénomène de TEM sur des cellules tumorales bronchiques porteuses d'altérations activatrices de l'EGFR *via* l'activation de la voie Src. Aussi, les extraits de fumée de cigarette entraînent une résistance au géfitinib de ces cellules, ceci étant en accord avec le fait que les fumeurs atteints de CBNPC et EGFR-mutés ont souvent une mauvaise réponse thérapeutique aux EGFR-TKIs. De plus, le traitement de ces cellules par la N-acétyl-cystéine (NAC), qui diminue la phosphorylation de Src, réverse le processus de TEM induit par les extraits de fumée de cigarette et sensibilise les cellules au géfitinib, suggérant l'implication de la voie Src dans la TEM et la résistance aux EGFR-TKIs (428).

- La voie Hedgehog.

La voie Hedgehog (Hh) étant connue pour induire la TEM, Della corte *et al.* ont investigué le rôle de cette voie dans les résistances aux EGFR-TKIs. Ils ont mis en évidence que la voie Hh est bien activée dans les cellules résistantes aux EGFR-TKIs, avec notamment une amplification du récepteur de cette voie nommé SMO et une surexpression du facteur de transcription de la voie nommé GLI1. De plus, l'inhibition génétique ou pharmacologique de ces acteurs de la voie Hh induit une diminution de la viabilité et des capacités d'invasion et de migration des cellules résistantes ainsi qu'une diminution de l'expression de marqueurs mésenchymateux, démontrant que la voie Hh est requise pour l'acquisition de résistance aux EGFR-TKIs *via* un processus de TEM (429).

Bai *et al.*, ont démontré que la voie Hh est réprimée dans des cellules de CBNPC sensibles aux EGFR-TKIs, alors qu'elle est anormalement activée dans les cellules résistantes. De plus, la surexpression de la voie Hh induit une diminution de l'expression de la E-cadhérine, une augmentation de l'expression de SNAIL, ainsi qu'une tolérance au géfitinib chez des cellules initialement sensibles. Inversement, l'inhibition de la voie Hh induit une restauration de l'expression de la E-cadhérine, une diminution de l'expression de SNAIL dans les cellules initialement résistantes. De plus, le traitement combiné de l'EGFR-TKI avec un agoniste de SMO, qui bloque la voie Hh, inhibe la tumorigenèse et la prolifération des cellules résistantes aux EGFR-TKIs (430).

Ces résultats ont été confirmés dans des modèles résistants aux EGFR-TKIs des trois générations disponibles (431).

En plus de ces signaux intracellulaires, la TEM médiée en réponse au traitement par EGFR-TKIs semble aussi pouvoir être régulée par des miARN. En effet, des cellules rendues résistantes au géfitinib possèdent une diminution de l'expression de miR-155 et miR-200c qui normalement sont respectivement capables d'inhiber SMAD2 et ZEB1. Ainsi la déplétion en ces miRNA induit une activation de la TEM dans ces cellules (432).

Ainsi, de nombreux et divers signaux intracellulaires sont capables d'induire la TEM en réponse au traitement par EGFR-TKIs, cependant, à ce jour, le mécanisme *via* lequel la TEM promeut la résistance aux EGFR-TKIs n'est pas encore bien élucidé.

II.C.3.d. Autres mécanismes émergents.

Altérations de gènes régulant le cycle cellulaire :

Des altérations de gènes régulant le cycle cellulaire sont de plus en plus rapportées en tant que mécanismes de résistances aux EGFR-TKIs. Selon les études préliminaires des mécanismes de résistances associés à l'osimertinib dans les essais cliniques AURA3 et FLAURA qui ne sont pas encore publiées, ces altérations sont retrouvées chez environ 10 % des patients progressant sous osimertinib (277) et elles sont associées à un mauvais pronostic chez ces patients (433).

Ces altérations sont des amplifications des gènes codant la cycline D1, la cycline D2, la cycline E1, CDK4 et CDK6 ainsi que des délétions du gène codant l'inhibiteur de CDK2A (277). Cependant, à ce jour, les mécanismes reliant directement ces altérations à la résistance aux EGFR-TKIs ne sont pas encore bien compris.

Fusions d'oncogènes :

D'après l'étude préliminaire des mécanismes de résistance associés à l'osimertinib dans l'essai clinique AURA3 qui n'est pas encore publié, des fusions oncogéniques sont identifiées chez 3 à 10 % des cas de résistances acquises à l'osimertinib en deuxième ligne et elles coexistent avec la mutation C797S de l'*EGFR*, des mutations de *BRAF* et des amplifications de *MET* (277).

Ces fusions géniques sont par exemple : *FGFR3-TACC3*, *RET-ERC1*, *CCDC6-RET*, *NTRK1-TPM3*, *NCOA4-RET*, *GOPC-ROS1*, *AGK-BRAF*, *ESYT2-BRAF*, *PLEKHA7-BRAF* et *EML4-ALK* (434,313,353,294,435-437,277).

L'association de l'osimertinib avec un inhibiteur de RET permet de contrer la résistance attribuée à l'oncogène de fusion *CCDC6-RET* (294), de même l'association de l'osimertinib avec le crizotinib annule la résistance attribuée à l'oncogène de fusion *EML4-ALK* (437).

Il est cependant à noter que l'implication exacte de ces fusions géniques dans les mécanismes de résistance aux EGFR-TKIs doit être mieux caractérisée.

II.C.4 L'hétérogénéité tumorale : un autre niveau de complexité dans la compréhension des mécanismes de résistance aux EGFR-TKIs.

L'hétérogénéité tumorale est connue pour promouvoir les résistances aux thérapies anti-cancéreuses, dont les EGFR-TKIs (438,439).

Du fait de l'hétérogénéité intra-tumorale, différents mécanismes de résistance aux EGFR-TKIs peuvent être retrouvés chez un patient soit au sein d'une même tumeur soit au sein de différents sites tumoraux (tumeur primitive et métastases).

Ainsi, différents degrés d'amplifications du gène *MET* associés ou non à la mutation T790M sur l'*EGFR* ont été mis en évidence au niveau de différents sites métastatiques après autopsie d'un patient décédé des suites d'un adénocarcinome bronchique résistant aux EGFR-TKIs (440).

Aussi, au sein d'une même tumeur d'un patient traité par géfitinib, Taniguchi *et al.*, ont mis en évidence la présence de zones où les cellules possèdent des mutations de l'*EGFR* et d'autres zones où l'*EGFR* ne présente pas de mutations. De plus, les patients porteurs de cette hétérogénéité ont progressé plus rapidement et ont eu une survie globale plus courte que les patients présentant des

tumeurs homogènes en termes de mutations de l'*EGFR* (441). Chez un autre patient résistant à l'erlotinib, la population tumorale résistante s'est également révélée mixte, avec seulement une partie des cellules présentant des amplifications de *MET* (environ 50%) (340).

La présence de cette hétérogénéité intra-tumorale a été confirmée par la suite par Chen *et al.*, qui l'ont identifiée chez 10 patients sur 34 ayant développé une résistance aux EGFR-TKIs (442).

Il est à noter que cette hétérogénéité des mécanismes de résistance, en plus d'être spatiale, est également temporelle puisqu'elle va évoluer dans le temps chez un même patient en fonction des différents traitements qu'il sera amené à recevoir. Ce phénomène a été rapporté par de nombreuses équipes et chez de nombreux cas cliniques sous tous les types d'EGFR-TKIs (191,443,289,323).

En effet, Sequist *et al.* ont étudié un patient présentant initialement un adénocarcinome porteur de la mutation *EGFR*^{L858R}. Ce patient est premièrement traité par une chimiothérapie à laquelle il ne répond que modestement, il est donc traité ensuite par erlotinib. Après une très bonne réponse durant huit mois, il développe un mécanisme de résistance avec émergence de la mutation *EGFR*^{T790M}. Il reçoit alors deux lignes de chimiothérapie sur une période de 8 mois au total qui vont s'avérer non efficaces avec développement de métastases osseuses et hépatiques. Une biopsie de la lésion pulmonaire est alors réalisée et révèle la présence de la mutation L858R mais pas de mutation T790M et le patient redevient sensible à l'erlotinib (191). La pseudo-disparition du mécanisme de résistance après l'interruption du traitement par EGFR-TKI indique qu'en l'absence de la pression de sélection exercée par l'EGFR-TKI la clonalité de la population tumorale est modifiée et parfois la réintroduction du traitement initial, aussi appelée « rechallenge », peut être efficace (444).

Les concepts d'hétérogénéité spatiale et temporelle des mécanismes de résistance aux EGFR-TKIs sont résumés dans la figure suivante :

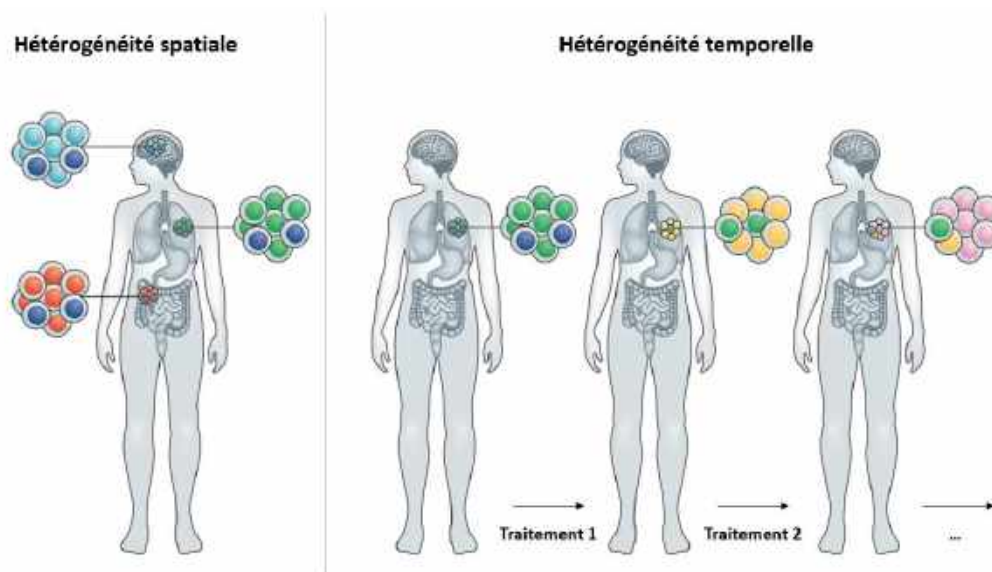


Figure 15 : Hétérogénéité spatiale et temporelle des mécanismes de résistance aux EGFR-TKIs. Adapté d'après (445).

L'impact de l'hétérogénéité tumorale sur l'évaluation et la compréhension des mécanismes de résistance aux EGFR-TKIs est vraisemblablement sous-estimé. En effet, l'identification des mécanismes de résistance se fait généralement sur une seule biopsie tumorale qui peut ne pas être le reflet de la tumeur dans son ensemble et des sites métastatiques. Par conséquent, l'interprétation de l'efficacité des thérapies ainsi que le choix des futures thérapies à proposer peuvent être biaisés. De ce fait, des biopsies séquentielles et au niveau de différents sites tumoraux ou bien le recours à des biopsies

liquides à différents moments de l'évolution de la maladie sont nécessaires afin de mieux appréhender l'hétérogénéité tumorale et les décisions thérapeutiques qui en découlent.

II.C.5. Origine des résistances adaptatives : l'hypothèse des « Drug Tolerant Cells ».

Il est aujourd'hui admis que les mécanismes de résistances aux EGFR-TKIs sont imputables à des mécanismes génétiques mais également à des mécanismes non génétiques. De plus, comme vu précédemment ces mécanismes sont hétérogènes dans le temps et dans l'espace (248). La figure suivante résume ce caractère multifactoriel et hétérogène des résistances aux EGFR-TKIs :

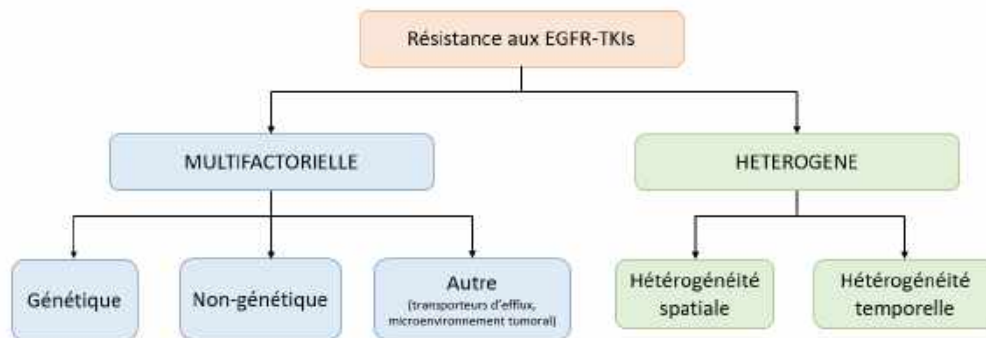


Figure 16 : La résistance aux EGFR-TKIs est multifactorielle et hétérogène : un réel défi pour traiter les cancers bronchiques porteurs de mutations activatrices de l'EGFR. Adapté de (248).

Ainsi, la prise en compte des résistances aux EGFR-TKIs dans leur ensemble et leur complexité représente donc à l'heure actuelle un réel défi dans le traitement des patients atteints de CBNPC porteurs de mutations activatrices de l'EGFR.

Désormais de plus en plus d'études s'attachent à comprendre l'origine même de l'émergence de mécanismes de résistance. Pour expliquer l'acquisition de mécanismes de résistance aux EGFR-TKIs, deux théories existent (446) :

- Soit ces mécanismes de résistance étaient présents dans un sous-clone de la tumeur d'origine, ils étaient alors indétectables par les technologies dont nous disposons actuellement, puis ils ont été sélectionnés de façon darwinienne sous traitement provoquant la rechute tumorale.
- Soit ces mécanismes n'étaient pas présents dans la tumeur d'origine et ont été développés au cours du traitement par une sous-population de cellules particulières appelées « drug tolerant persisters » ou « drug tolerant cells » (DTC). Ces cellules résistent au traitement en entrant dans un état de pseudo-dormance (270), puis elles deviennent capables d'acquérir des mécanismes de résistance génétiques leur conférant un avantage prolifératif occasionnant la reprise tumorale (446,447).

In vitro, ces deux théories sont pertinentes et peuvent coexister au sein d'une même population de cellules (446,447). Néanmoins, aucune information n'est à ce jour disponible pour vérifier l'existence de chacun de ces phénomènes *in vivo*.

Ces deux théories sont résumées dans la figure suivante :

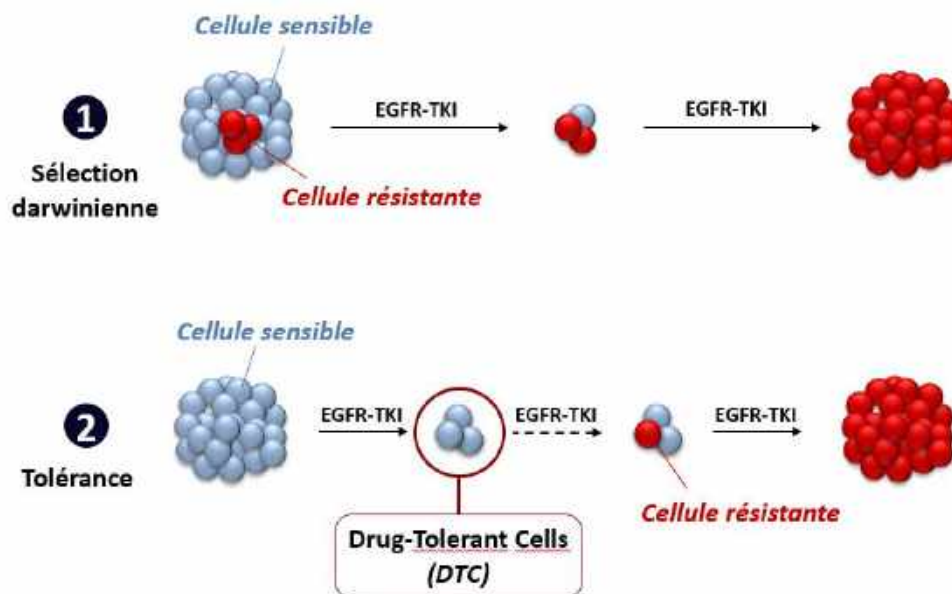


Figure 17 : Schéma explicatif des deux modèles pouvant expliquer l'acquisition de mécanismes de résistance aux EGFR-TKIs.

L'hypothèse des DTC soulève plusieurs questions : Comment ces cellules arrivent-elles à résister au traitement par EGFR-TKI sans faire appel à un mécanisme génétique ? Et comment arrivent-elles par la suite à acquérir un mécanisme génétique de résistance ?

De nombreux arguments soutiennent le fait que les résistances aux EGFR-TKIs impliquent des mécanismes non mutationnels, épigénétiques. D'une part, la forte prévalence des résistances suggère que l'acquisition de mutations ne peut expliquer à elle seule ce phénomène, d'autre part, la résistance acquise est souvent réversible après l'arrêt de la pression de sélection exercée par la molécule, et enfin, dans de nombreuses tumeurs résistantes aucune altération génique et aucune altération des voies de signalisation n'a été rapportée (448).

L'épigénétique correspond aux modifications de l'expression génique qui sont indépendantes des modifications de séquence de l'ADN et qui persistent plusieurs divisions cellulaires. L'expression génique est contrôlée par de nombreux mécanismes avec principalement des modifications covalentes de l'ADN et des histones. Les modifications épigénétiques affectent la transcription génique en modulant l'état chromatinien et donc l'accessibilité des enzymes et des facteurs de transcription (449). Ainsi, un phénotype cellulaire résistant peut être la résultante d'une combinaison de marques génétiques et épigénétiques dans une population tumorale hétérogène (448).

Ainsi, les cellules au stade DTC résisteraient au traitement par EGFR-TKIs grâce à des mécanismes épigénétiques (270,450).

Les DTC ont d'abord été décrites et étudiées par Sharma *et al.* en 2010 sur la lignée cellulaire tumorale PC9 issue d'un adénocarcinome bronchique et porteuse d'une délétion de l'exon 19 de l'*EGFR*. Le traitement de cette lignée par un EGFR-TKI de première génération à une concentration correspondant aux concentrations plasmatiques retrouvées chez les patients (soit environ 50 à 100 fois l'IC50) conduit à une forte mortalité cellulaire. Mais environ 0,3% de la population de départ va survivre, ce sont les DTC (270).

Les cellules DTC vont alors entrer dans une période de latence de quelques jours ou semaines. A ce moment-là ces cellules sont peu prolifératives puisqu'elles se situent majoritairement dans la phase G0/G1 du cycle cellulaire, elles expriment des marqueurs de cellules souches cancéreuses tels que CD133, CD24 (270) et ALDH1A1 (451) et elles résistent à l'apoptose (446).

Ensuite environ 20 % de ces DTC reprennent leur prolifération en présence de l'EGFR-TKI, on parle alors de DTEC (Drug Tolerant Expanded Cells) capables de proliférer indéfiniment sous EGFR-TKIs (270). Ces DTEC possèdent une diversité d'altérations géniques de résistance aux EGFR-TKIs qui sont identiques à celles retrouvées chez les patients résistants aux EGFR-TKIs ; à savoir : des altérations géniques de l'*EGFR* avec la mutation T790M (446,447), des amplifications de *MET*, des altérations de la voie des MAP kinase et de la voie PI3K/AKT (447).

D'autre part, tout comme ce qui est observé chez les patients, une période d'arrêt du traitement par EGFR-TKI induit à plus ou moins long terme une perte du mécanisme de résistance et une re-sensibilisation des cellules (191,452), indiquant que le mécanisme adaptatif est dépendant de la pression de sélection de la drogue.

Ainsi, ce modèle récapitule exactement ce qui est observé chez les patients traités par EGFR-TKIs : une forte réponse initiale suivie par une période de réponse où la tumeur est indétectable puis l'émergence d'un mécanisme de résistance qui occasionne la rechute tumorale, comme résumé dans la figure suivante :

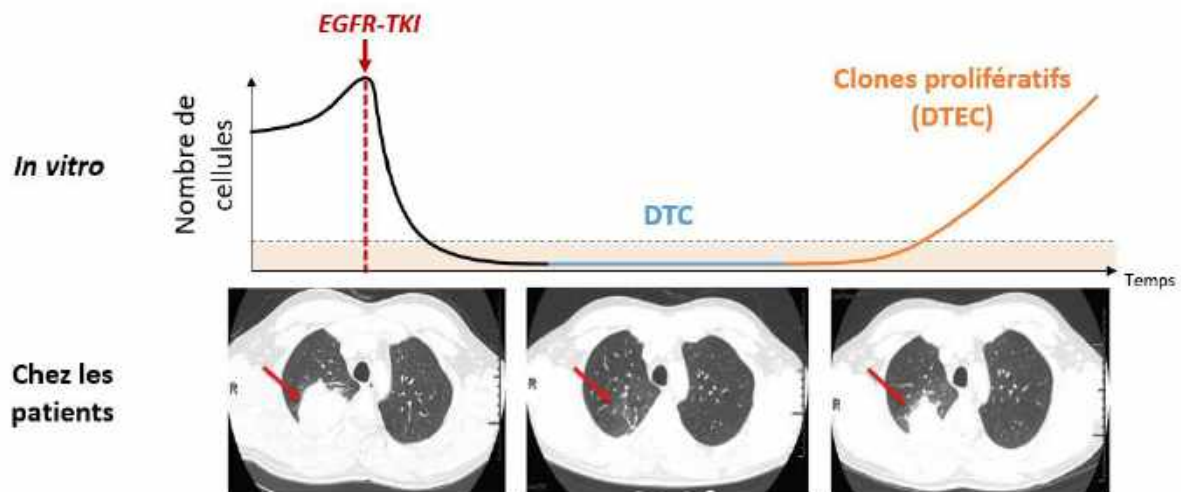


Figure 18 : Schéma montrant le parallèle qui peut être fait entre le modèle des « Drug Tolerant Cells » établi *in vitro* et l'évolution des patients traités par EGFR-TKIs. La partie basse de cette figure représente les scanners d'un patient atteint d'un adénocarcinome bronchique porteur de mutation de l'EGFR et traité par EGFR-TKI, obtenus à partir de (453) : à gauche le scanner avant l'induction du traitement par EGFR-TKI, au milieu le scanner obtenu six semaines après le début du traitement par EGFR-TKI et montrant une rémission totale de la lésion d'origine, à droite le scanner réalisé plusieurs mois après le début du traitement par EGFR-TKI montrant une rechute de la tumeur d'origine.

La survie des DTC sous EGFR-TKIs fait appel à des mécanismes épigénétiques. En effet, Sharma *et al.* ont montré que la survie des DTC est due à l'engagement de la voie de l'IGF1R ainsi qu'à un état chromatinien altéré (avec notamment une diminution de l'expression de la lysine 4 de l'histone H3 méthylée : H3K4me2/3) qui requiert notamment la lysine déméthylase KDM5A (270). Cette enzyme permet la déméthylation de la lysine 4 de l'histone H3 (H3K4me2/3) qui fait partie des modifications d'histones permettant l'ouverture de la chromatine et donc l'activation de la transcription génique (454). De plus, l'inhibition de la voie de l'IGF1R entraîne une diminution de l'expression de KDM5A, suggérant que la voie de l'IGF1R est capable de réguler l'activité de KDM5A. Qui plus est, l'inhibition de la voie de l'IGF1R ou l'inhibition de KDM5A ou l'utilisation d'inhibiteurs d'HDAC (histone désacétylases) en association avec le traitement par EGFR-TKIs permettent de prévenir le développement de résistances *in vitro* (270,455).

Cependant, plusieurs essais cliniques ont investigué l'adjonction d'un inhibiteur d'HDAC (entinostat, vorinostat) au traitement par EGFR-TKI chez des patients atteints de CBNPC ayant

progressé sous chimiothérapie ou sous EGFR-TKI, mais ces essais n'ont pas ou peu démontré une amélioration de la survie sans progression et de la survie globale (456–458).

D'autres molécules répressives de la transcription ont alors été testées notamment le THZ1 qui inhibe les CDK7 et CDK12 connues pour réguler l'ARN-polymérase II. Dans la lignée PC9, l'adjonction de cet inhibiteur avec l'erlotinib permet d'augmenter la mort cellulaire et d'empêcher l'émergence de cellules résistantes *in vitro*. Cet inhibiteur empêche la régulation des facteurs de transcription et des activateurs de la transcription provoquée par les EGFR-TKIs et donc entrave l'échappement des cellules sous EGFR-TKIs (459).

Guler *et al.* sont allés plus loin dans la caractérisation de l'altération de l'état chromatinien des DTCs en démontrant que la survie des DTC sous EGFR-TKIs est rendue possible grâce à la répression épigénétique d'éléments transposables répétés tels que les éléments LINE-1 *via* le concours de la H3K9-méthyltransférase. La répression de ces éléments transposables permettrait la protection du génome des DTC en réponse à un stress cytotoxique (450).

En outre, Raha *et al.* ont démontré que l'expression de marqueurs de cellules souches par les DTC tels que ALDH1A1 est requis pour le maintien de l'état DTC en permettant de protéger les DTC des effets toxiques des ROS (espèces réactives de l'oxygène) induites par le traitement. De plus, l'inhibition de l'activité aldéhyde-déshydrogénase induit l'accumulation des ROS, l'induction de dommages à l'ADN et donc l'apoptose de la sous-population des DTC. Ainsi, la combinaison d'un inhibiteur de l'activité aldéhyde-déshydrogénase avec un EGFR-TKIs permet de retarder la rechute tumorale *in vitro* et *in vivo* (451).

Hata *et al.*, ont également mis en évidence que la survie des DTC était de façon logique liée à leur capacité à résister à l'apoptose induite par les EGFR-TKIs et que la combinaison d'un inhibiteur de BCL-2 et BCL-xl (navitoclax), qui sont des molécules pro-apoptotiques, avec un EGFR-TKI restaure la sensibilité aux EGFR-TKIs en induisant l'apoptose des DTC (446). Cette combinaison thérapeutique est d'ailleurs en cours d'évaluation clinique chez des patients atteints de CBNPC avancés ou métastatiques porteurs de mutations activatrices de l'*EGFR* (NCT02520778).

Une autre équipe a démontré que la survie des DTC implique la voie de l'ufmylation et l'activation d'un stress du réticulum endoplasmique responsable de l'activation de la protéine STING qui promeut une signalisation inflammatoire pro-tumorale et une dépendance vis-à-vis de l'apoptose médiée par BCL-xl (460).

Phuchareon *et al.*, avancent que dans la population DTC obtenue suite à un traitement par géfitinib, l'inhibition d'AKT entraîne l'inhibition du facteur de transcription Ets-1 et donc la diminution de la transcription de ses gènes cibles : les cyclines D1, D3 et E2, ce qui est concordant avec l'état de dormance cellulaire observé, ainsi que la phosphatase DUSP6. Cette phosphatase est un régulateur négatif de ERK1/2, ainsi l'inhibition de sa transcription induit une activation de ERK1/2 et donc l'activation de la voie des MAP kinases responsable de la survie des DTC (461). Par ailleurs, cette réactivation de la voie ERK *via* l'inhibition de la transcription de DUSP6 avait déjà été observée sous traitement par un EGFR-TKI irréversible (354). L'association d'un traitement inhibiteur de MEK au traitement par EGFR-TKI pourrait donc empêcher la survie des DTC. Et en effet, *in vitro* et dans des modèles murins, cette combinaison thérapeutique permet d'empêcher le développement de résistances acquises (360).

La voie de la peroxydase lipidique GPX4 (Gluthation Peroxydase 4) a également été identifiée comme impliquée dans la survie des DTC. Cette peroxydase permet de protéger les cellules de la ferroptose qui est une mort cellulaire induite par l'accumulation de lipides peroxydiques toxiques (462). Ainsi, la combinaison d'un inhibiteur de GPX4 avec un EGFR-TKI permet de réduire la population des DTC *in vitro* en induisant leur ferroptose (463).

De nombreuses études ayant rapporté l'implication de la voie du FGFR dans la résistance aux EGFR-TKIs *in vitro*, Raoof *et al.*, ont investigué le rôle du FGFR dans la survie des DTC dans des lignées de cancer bronchique porteuses de mutations activatrices de l'*EGFR* et traitées par EGFR-TKIs de première ou troisième générations. Ils démontrent que les DTC possèdent des caractéristiques mésenchymateuses et que le FGFR3 est nécessaire à leur survie. De plus, ils montrent que *in vitro* et dans des modèles de xéno greffes, la combinaison d'un inhibiteur de FGFR avec l'EGFR-TKI inhibe la survie des DTC et empêche donc le développement de résistances (464).

Enfin, très récemment, Kurppa *et al.* ont étudié les DTC obtenues suite à la combinaison d'un traitement par EGFR-TKI, l'osimertinib, avec un inhibiteur de MEK, le tramétinib. Ils ont mis en évidence que ces cellules dormantes présentent des caractéristiques de sénescence cellulaire, ainsi qu'une activité augmentée de la voie YAP/TEAD (Yes-associated protein/TEA domain transcription factor) impliquée dans la prolifération cellulaire et la balance apoptose/survie. L'activation de la voie YAP/TEAD est requise pour l'établissement de l'état DTC et cette voie permet la survie des cellules DTC *via* la répression de l'induction du facteur pro-apoptotique BMF par le concours du facteur de transcription SLUG impliqué dans la TEM. En outre, l'inhibition pharmacologique de YAP/TEAD, associée à la double inhibition EGFR/MEK, permet d'éradiquer les cellules DTC en augmentant la réponse apoptotique induite par la double inhibition EGFR/MEK (465).

Tous ces résultats indiquent que la survie des DTC semble faire appel à de nombreux mécanismes cellulaires non génétiques et que les efforts pour caractériser cette population de DTC résistante aux EGFR-TKIs doivent être poursuivis et notamment dans des modèles *vivo* de PDX (xéno greffes tumorales dérivées de patients) et sur des échantillons émanant de patients. Tout ceci dans l'expectative de développer des approches thérapeutiques qui permettront d'éradiquer ce réservoir de cellules à l'origine des rechutes tumorales.

Il est à noter également que Sharma *et al.*, ont mis en évidence cette rare population de cellules résistantes DTC dans d'autres lignées cellulaires tumorales traitées par des chimiothérapies ou des thérapies ciblées, à savoir : la lignée PC9 traitée par cisplatine, des lignées de mélanome et de cancer colorectal porteuses de la mutation *BRAF*^{V600E} et traitées par un inhibiteur de RAF, des lignées de cancers mammaires possédant une hyperactivation de HER2 traitées par lapatinib, et une lignée de cancer gastrique porteuse d'une amplification de *MET* traitée par un inhibiteur de MET (270). Ceci suggère que cette résistance thérapeutique non génétique pourrait être un mécanisme commun à différentes formes de pression thérapeutique et à d'autres types de cancers.

En effet, par la suite, les cellules DTC ont aussi été décrites dans d'autres types de cancers traités par thérapies ciblées ou chimiothérapies, notamment les mélanomes traités par vémurafenib +/- tramétinib (466,467,463,468–470), les glioblastomes traités par dasatinib (471), les cancers gastriques traités par crizotinib (451), les cancers du sein traités par lapatinib (463) ou tramétinib (472), les cancers du poumon traités par carboplatine + paclitaxel (473) et les leucémies traitées par inhibiteur de γ -sécrétase (474).

II.C.6. La sénescence induite par les thérapies (ou Therapy-Induced Senescence (TIS)) : un nouveau mécanisme de résistance ?

II.C.6.a. La sénescence cellulaire : définition, marqueurs et différents types.

La sénescence cellulaire correspond à un arrêt irréversible du cycle cellulaire conduisant à la mort cellulaire. Ce processus est impliqué dans le remodelage tissulaire pendant le développement de l'organisme ou au cours de la cicatrisation tissulaire, dans la suppression de tumeurs, mais il contribue également au vieillissement tissulaire et aux pathologies liées à l'âge.

Le concept de sénescence fut décrit pour la première fois en 1961 par Hayflick et Moorheads qui démontrèrent que les capacités de prolifération de fibroblastes humains *in vitro* étaient limitées ; à l'issue d'un nombre défini de divisions cellulaires, le nombre de mitoses déclinait jusqu'à devenir nul malgré l'apport de facteurs de croissance et l'absence d'inhibition de contact des cellules (475,476). Par la suite, la sénescence répliquative a été mise en évidence dans de nombreux autres types cellulaires (477). Ce processus se différencie de la quiescence par sa stabilité et son irréversibilité en présence de facteurs de croissance (478).

Par la suite, la communauté scientifique s'est évertuée à identifier des marqueurs universels de sénescence. Malheureusement, le processus de sénescence est complexe et le phénotype sénéscent hétérogène, si bien que c'est la combinaison de plusieurs caractéristiques qui permettent de le définir. Ces caractéristiques sont les suivantes (479,480) et sont résumées dans la figure 19 :

- Une morphologie cellulaire élargie et irrégulière.
- Un arrêt du cycle cellulaire régulé par l'inhibition des CDKs (Cyclin-Dependant Kinase ou kinases dépendantes des cyclines) par les CDKIs (Cyclin-Dependant Kinase Inhibitors ou inhibiteurs des kinases dépendantes des cyclines) tels que p16 (CDKN2A), p15 (CDKN2B), p21 (CDKN1A) ou encore p27 (CDKN1B) (481). Cette inhibition des CDKs conduit à une diminution de l'expression de la forme phosphorylée de la protéine du rétinoblastome (RB) ce qui va entraîner la séquestration du facteur de transcription E2F induisant ainsi la répression de la transcription de gènes impliqués dans la progression du cycle cellulaire (482,483). L'arrêt du cycle cellulaire peut également être évalué *via* l'évaluation du potentiel de prolifération des cellules (potentiel à former des colonies, mesure de la synthèse d'ADN par incorporation de BrdU/EdU ou évaluation de l'expression de Ki67).
- Une augmentation de la masse et de l'activité lysosomale qui se caractérise notamment par une élévation de l'activité de la β -galactosidase lysosomale qui se mesure à pH6 (ou SA- β Gal activity pour Senescence-Associated β -Galactosidase activity, soit activité β -galactosidase associée à la sénescence) (484,485) et par une augmentation de l'expression de la lipofuscine (486).
- Un phénotype sécrétoire appelé SASP (pour Senescence-Associated Secretory Phenotype, soit phénotype sécrétoire associé à la sénescence) qui consiste en la sécrétion de nombreux facteurs tels que le TGF- β (Transformin Growth Factor β), les IGF1BP (Insulin-like Growth Factor 1 Binding Protein), PAI1 (Plasminogen Activator Inhibitor 1) et des cytokines ou chemokines inflammatoires ou impliquées dans le remodelage de la matrice extracellulaire telles que IL-1, IL-6, IL-8, CCL2, MMP-1, MMP-3, etc...(487-489).
- Une réponse aux dommages à l'ADN qui se caractérise par la présence de marqueurs de dommages et de réparation de l'ADN tels que les foci de l'histone γ -H2AX (490) et l'activation par phosphorylation de p53 (491,492).
- Des modifications nucléaires se définissant par des foci d'hétérochromatine nommés SAHF (Senescence-Associated Heterochromatine Foci, ou foci d'hétérochromatine associés à la sénescence) contenant des marqueurs d'hétérochromatine comme l'histone H3 triméthylée sur la lysine 9 (H3K9me3), la protéine HP1 γ (Heterochromatin protein 1 homologue γ), la protéine macroH2A (493,494). Une déstabilisation de l'enveloppe nucléaire par perte de l'expression de la lamine B1 peut également être observée (495,496).

- Une résistance à l'apoptose qui se traduit notamment par l'activation de protéines anti-apoptotiques telles que les protéines de la famille BCL (Bcl-2, Bcl-w, Bcl-xL) et un défaut d'activation de protéines pro-apoptotiques comme PUMA ou NOXA (497).
- D'autres caractéristiques telles que : des modifications du métabolisme des cellules (promotion de la phosphorylation oxydative aux dépens de la glycolyse), l'augmentation du nombre de mitochondries, l'activation de mécanismes d'autophagie et un stress du réticulum endoplasmique.

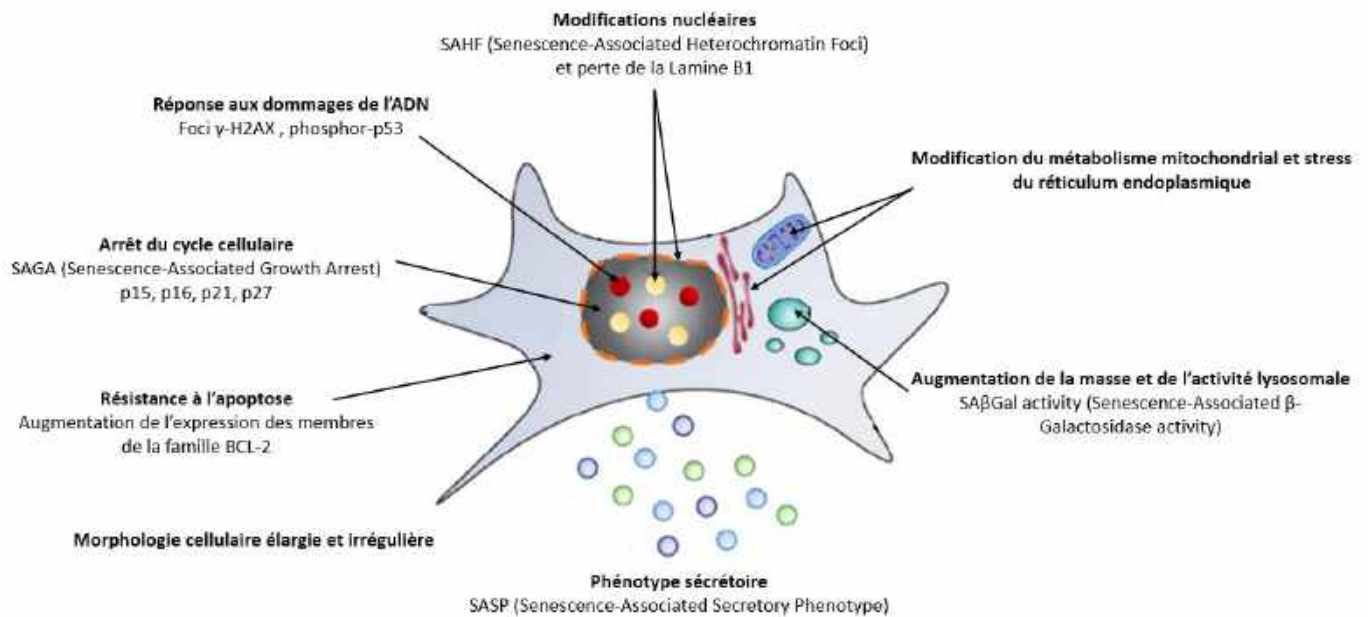


Figure 19 : Les caractéristiques de la sénescence cellulaire. Modifié à partir de (498).

Il existe deux grands types de sénescence cellulaire, à savoir (479,499) :

- La sénescence répliquative qui est consécutive au raccourcissement des télomères ou à la modification de leur structure (nommée uncapping ou décapuchonnage) liés aux mitoses successives des cellules en répliquant. Elle est ainsi qualifiée de sénescence dépendante des télomères (491).
- La sénescence induite par des stress ou SIPS (Stress-Induced Premature Senescence, soit sénescence prématurée induite par un stress). Les stress induisant ce type de sénescence peuvent être de différentes natures :
 - o Génétiques via l'activation d'oncogènes comme Ras (500,501) ou Raf (502) ou l'inactivation de suppresseurs de tumeurs comme PTEN (503) ou NF1 (504). C'est ce qu'on appelle l'OIS (Oncogene-induced senescence, ou sénescence induite par des oncogènes).
 - o Le stress oxydatif potentiellement consécutif à des dommages de l'ADN (505,506) ou à des dysfonctionnements mitochondriaux (507).
 - o Thérapeutiques et notamment les traitements anticancéreux (radiations ionisantes, chimiothérapies, thérapies ciblées). C'est ce qu'on appelle la TIS (Therapy-Induced Senescence, ou sénescence induite par les thérapeutiques).

La sénescence induite par les radiations ionisantes :

Les radiations ionisantes, utilisées en tant que thérapie anticancéreuse visant à détruire l'ADN des cellules tumorales et induire leur mort, induisent des processus de sénescence cellulaire dans de nombreux types tumoraux et de façon dépendante de la dose.

En effet, l'induction de la sénescence par les radiations ionisantes a été rapportée dans des lignées de cancers bronchiques (508,509), de cancers mammaires (510), de cancers colorectaux et de cancers cérébraux (511).

La sénescence induite par les chimiothérapies :

De nombreux agents de chimiothérapie anticancéreuse sont capables d'induire la sénescence des cellules tumorales, que ce soit des agents inhibant la réplication de l'ADN (hydroxyurée, gemcitabine, etc...), des inhibiteurs des topo-isomérases (doxorubicine, étoposide, etc...), des agents alkylants (cisplatine, cyclophosphamide, etc...), des poisons du fuseau mitotique (paclitaxel, docetaxel, etc...) ou encore des modificateurs épigénétiques (inhibiteurs de méthyltransférases et d'histonedésacétylases) (512,513).

La sénescence induite par les thérapies ciblées :

La sénescence cellulaire peut également être engendrée par bon nombre de thérapies ciblées antitumorales qui sont :

- Des inhibiteurs de kinases :
 - Les inhibiteurs de l'activité kinase de l'oncogène de fusion BCR-ABL impliqué dans les leucémies : imatinib (514) et nilotinib (515).
 - Les inhibiteurs de MEK et de BRAF utilisés dans le traitement des mélanomes porteurs d'une mutation activatrice de *BRAF* : tramétinib et vémurafenib (516–520).
 - Le dasatinib qui est un inhibiteur de l'activité kinase de multiples cibles (BCR-ABL, SRC, C-Kit, PDGFR β , BRAF) utilisé dans les CBNPC porteurs de mutations activatrices de *BRAF* (521,522).
 - Les inhibiteurs de HER2 utilisés dans les cancers du sein porteurs d'une altération de *HER2* : lapatinib, neratinib et afatinib (523).
 - Les EGFR-TKIs : gefitinib, erlotinib et osimertinib (524,525,465).
- Des anticorps monoclonaux :
 - Anti-CD20 utilisés dans le traitement des lymphomes : rituximab et obinutuzumab (526).
 - Anti-HER2 utilisés dans le traitement des cancers mammaires HER2-positifs : trastuzumab et pertuzumab (527).
 - Anti-VEGF utilisés dans les cancers mammaires et colorectaux : bevacizumab (528).
- Les inhibiteurs de CKD4/6 comme le palbociclib indiqué dans les cancers du sein hormono-dépendants mais qui a montré induire la sénescence dans différents modèles tumoraux : les glioblastomes (529), les mélanomes (530–532), cancers mammaires, cancers bronchiques (533), les carcinomes hépatocellulaires (534).
- Les inhibiteurs de PARP (Poly-ADP-ribose Polymerase) comme l'olaparib ou le rucaparib indiqués dans les cancers mammaires et gynécologiques ont également été montrés comme inducteurs de sénescence dans des modèles de cancers colorectaux (535), de cancers de la prostate (536) et de leucémies (537).

II.C.6.c. L'échappement de la sénescence induite par les thérapies.

Ainsi, de nombreuses thérapies anticancéreuses sont capables d'induire la sénescence dans divers modèles tumoraux. Néanmoins, alors qu'on pensait que la sénescence était un phénomène irréversible conduisant à la mort cellulaire, de plus en plus d'études démontrent que, sous thérapie, des cellules sont capables de s'échapper de cet état de sénescence pour retrouver des capacités prolifératives et occasionner la rechute tumorale. Cet état de sénescence transitoire est alors souvent qualifié de « pseudo-sénescence » ou « senescence-like arrest » (538).

En 2005, Elmore *et al.* ont mis en évidence que après deux semaines d'induction de sénescence *via* un traitement par adriamycine, des clones prolifératifs de cellules MCF-7 tumorales mammaires apparaissent (539). Roberson *et al.* font le même constat sur des cellules H1299 de carcinome bronchique traitées par différentes chimiothérapies (540). Dans les deux cas, les clones résistants présentent une surexpression de Cdc2/Cdk1 responsable de l'échappement de l'état de sénescence (539–541).

L'échappement de l'état de sénescence sous thérapie semble lié à trois déterminants principaux :

- la polyplôidie (542–545) ;
- l'expression de caractères souches tels que CD34, CD117 (c-kit), CD133 et Oct-4 (546,547) ;
- et l'expression de marqueurs d'agressivité tels qu'une augmentation du potentiel d'invasion, de migration et un plus fort pouvoir tumorigène *in vivo* (548).

En 2018, Milanovic *et al.* montrent, en effet, que dans leurs modèles d'hémopathies malignes, la TIS résulte en une reprogrammation génétique profonde qui promeut le caractère souche et l'échappement de l'arrêt du cycle cellulaire pouvant occasionner la rechute tumorale. De plus, les cellules tumorales ayant échappé à la TIS sont plus malignes et agressives puisqu'elles ont des capacités augmentées d'initiation de tumeurs chez des modèles murins immunocompétents en comparaison avec des cellules qui n'ont jamais été sénescents (549).

Cependant, ces clones prolifératifs qui émergent sous traitement sont-ils issus des cellules présentant les caractéristiques de sénescence ou bien d'une sous-population cellulaire qui n'expriment pas ces caractéristiques et qui résistent d'emblée à la TIS ?

Récemment, Saleh *et al.* rapportent que des lignées tumorales bronchiques, colorectales et mammaires induites en sénescence par un traitement par étoposide ou doxorubicine sont capables de retrouver leur capacités prolifératives sous traitement. De plus, cette récupération des capacités prolifératives est retrouvée pour la population cellulaire totale mais aussi pour la population de cellules enrichies en phénotype sénescents. Cette reprise de prolifération des cellules enrichies en phénotype sénescents est objectivée par l'observation de mitoses grâce à une technique de microscopie en temps réel par interférométrie à grande vitesse, parallèle à la perte progressive des caractères de sénescence. Par ailleurs, les cellules enrichies en phénotype sénescents sont capables de former des tumeurs après xénogreffes chez des souris immunodéficientes et immunocompétentes (550).

In vivo, dans des modèles murins transgéniques, Demaria *et al.* démontrent que la sénescence induite par la chimiothérapie favorise la rechute tumorale et les effets indésirables liés à la chimiothérapie (551).

Qui plus est, l'échappement de la TIS n'est pas observé uniquement sous agents chimiothérapeutiques mais aussi après traitement par des radiations ionisantes (510,552,535).

A ce jour, aucun échappement de la sénescence induite par les EGFR-TKIs n'a été mis en évidence et incriminé en tant que nouveau mécanisme de résistance aux EGFR-TKIs.

II.C.7. Conclusion sur les résistances aux EGFR-TKIs.

Ainsi, les résistances aux EGFR-TKIs font appel à des mécanismes très variés, d'origine génétiques et non génétiques. De plus, ces mécanismes sont hétérogènes entre les patients, chez un même patient et cette hétérogénéité évolue également dans le temps sous l'influence de l'histoire de la maladie et des thérapies utilisées.

Les différents types de résistances aux EGFR-TKIs avec leur examen diagnostique, leurs mécanismes et les thérapies proposées pour les contrer sont résumés dans la figure suivante :

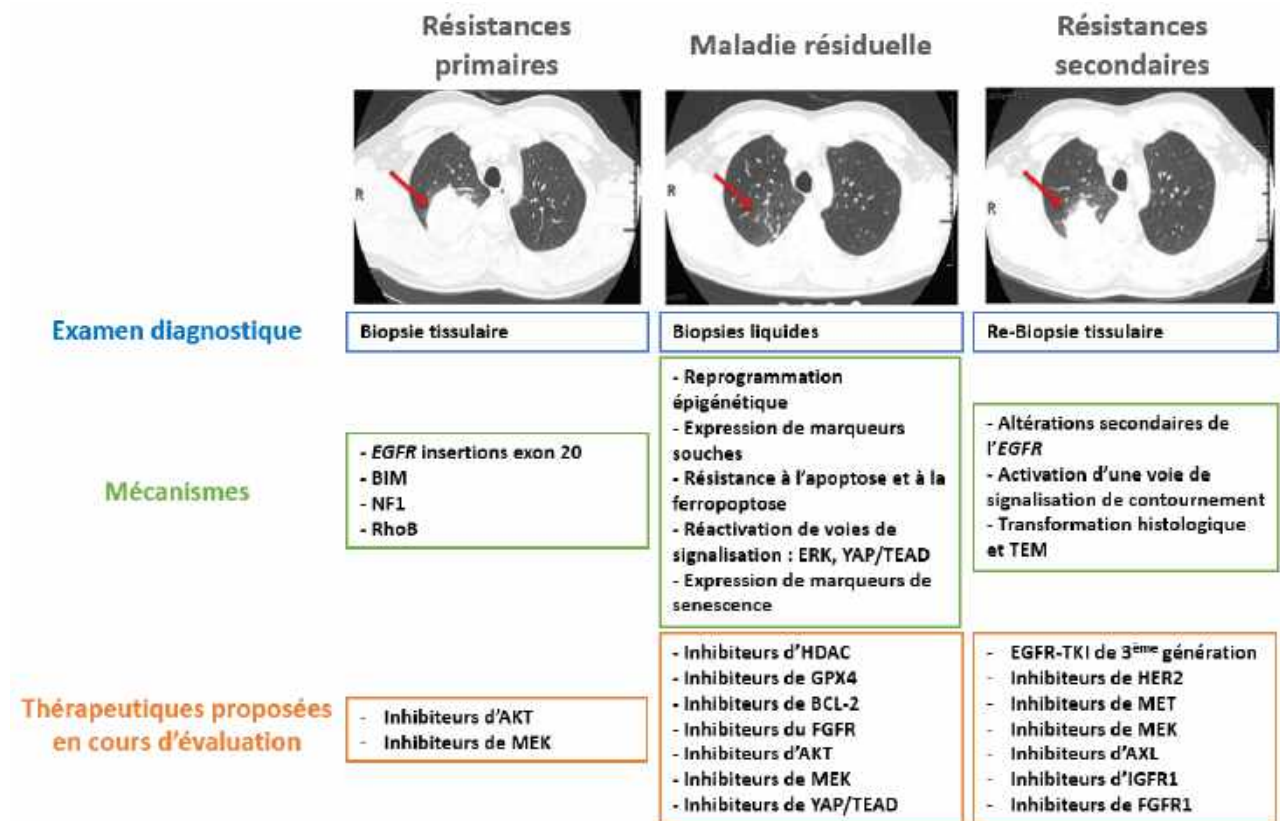


Figure 20 : Les différents types de résistances aux EGFR-TKIs : examen diagnostique, mécanismes et thérapies proposées pour les contrer. Les images de scanner sont extraites de (453).

III. La GTPase RhoB et son implication dans les résistances aux thérapies ciblées.

III.A. La GTPase RhoB.

III.A.1. Organisation phylogénétique et fonctions générales des protéines Rho.

Les protéines de la superfamille Ras sont des petites guanosine-triphosphatases (GTPases) monomériques de faible poids moléculaire (20-25kDa). Elles possèdent un domaine G qui permet la liaison au GTP ou au GDP (553). Ces petites GTPases fonctionnent comme des interrupteurs moléculaires des voies de signalisation en contrôlant, selon leur état d'activation, l'initiation ou l'arrêt de la transduction de signaux intracellulaires impliqués dans de nombreux processus cellulaires (553,554).

La superfamille Ras se divise en cinq familles possédant des structures et/ou des fonctions différentes (553) :

- La famille Ras qui régule la prolifération, la différenciation, la morphologie cellulaire, l'apoptose et l'expression génique.
- La famille Rab (Ras-like protein in brain) qui contrôle le trafic vésiculaire intracellulaire.
- La famille Arf (ADP-ribosylation factor) qui joue un rôle dans l'endocytose et l'exocytose.
- La famille Ran (Ras-like nuclear) qui est impliquée dans l'organisation du cytosquelette de microtubules en mitose, l'assemblage de l'enveloppe nucléaire, la réplication de l'ADN et le transport nucléo-cytoplasmique de protéines et d'ARN.
- Et enfin la famille Rho (Ras homologous) qui comprend la protéine RhoB.

La famille des GTPases Rho compte 20 membres chez les mammifères et se subdivise en 8 sous-familles établies selon l'alignement des séquences en acides aminés des 20 membres (programme ClustalW) (555). Certaines sous-familles sont qualifiées de typiques, elles cyclent entre un état actif lié au GTP et un état inactif lié au GDP sous le contrôle de protéines régulatrices (cf. partie III.A.2), et d'autres d'atypiques, elles sont liées au GTP de façon prédominante et seraient régulées par leur niveau d'expression et par phosphorylation.

L'ensemble des membres de la famille des GTPases Rho est représenté dans la figure suivante :

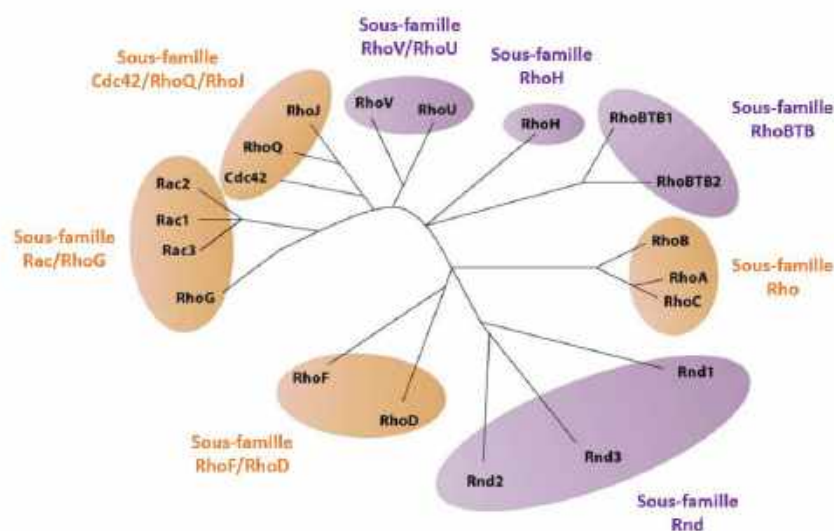


Figure 21 : Arbre phylogénétique de la famille des GTPases Rho. En orange sont représentées les sous-familles typiques et en violet figurent les sous-familles qualifiées d'atypiques. Adapté de (555).

Les GTPases Rho régulent de nombreux processus cellulaires, à savoir : la dynamique du cytosquelette d'actine, la migration, l'adhésion et la morphologie cellulaire, la cytokinèse, la prolifération et le cycle cellulaire, l'expression génique, la balance apoptose/survie et le trafic endosomal (555–558).

III.A.2. Cycle d'activation de la GTPase RhoB.

La GTPase RhoB, comme toutes les autres GTPases Rho dites typiques, est capable d'allumer ou d'éteindre la transmission de signaux intracellulaires selon son état d'activation, c'est pour cette raison qu'on la qualifie d'interrupteur moléculaire. Cet état d'activation est sous la dépendance d'un cycle d'activation finement régulé. Liée au GTP, la protéine RhoB est dans une conformation active, alors que liée au GDP elle est dans une conformation inactive. La transition entre ces deux états est réalisée par deux mécanismes finement régulés au niveau de la membrane plasmique :

- L'activation correspond à l'échange entre un nucléotide GDP contre un nucléotide GTP catalysée par la Guanine nucleotide Exchange Factors (GEF). C'est uniquement sous cette conformation que la protéine RhoB va pouvoir interagir avec des effecteurs afin d'induire des effets biologiques.
- L'inactivation correspond à l'hydrolyse du GTP en GDP catalysée par des GTPase Activating Proteins (GAP).

De plus, d'autres régulateurs, les Guanine nucleotide Dissociation Inhibitors (GDI) sont capables de maintenir la GTPase sous forme inactive en bloquant la dissociation du GDP et d'extraire la GTPase de la membrane plasmique afin d'empêcher son activation mais également afin de prévenir sa dégradation (555,559).

Le cycle d'activation/inactivation de RhoB est représenté schématiquement dans la figure suivante :

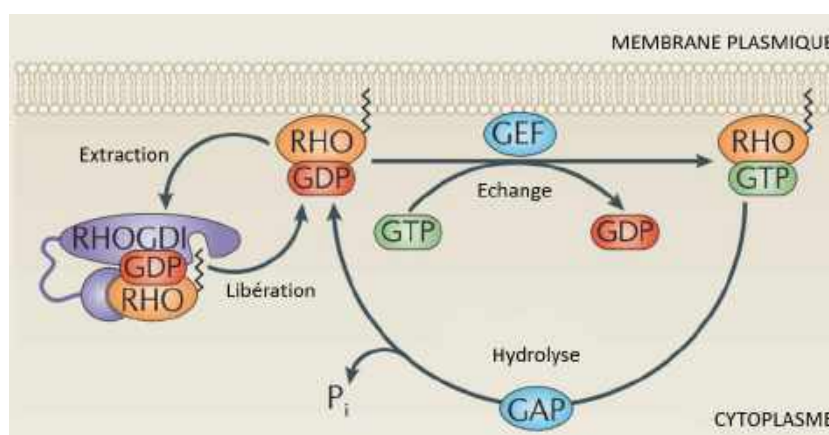


Figure 22 : Cycle d'activation/inactivation de la GTPase RhoB. Modifié à partir de (559).

III.A.3. Structure de RhoB.

RhoB présente une importante homologie de séquences d'acides aminés avec ses homologues RhoA et RhoC (85% d'homologie de séquence entre RhoA, RhoB et RhoC) (560).

Les GTPases de la sous-famille Rho sont organisées en domaines fonctionnels (560,561) avec :

- Une partie N-terminale très conservée, qui comprend le domaine P-loop où se lie le nucléotide et son cofacteur magnésium (Mg^{2+}) ainsi que les domaines switch I et II qui sont impliqués dans

la liaison aux régulateurs et aux effecteurs. Ces domaines switch sont capables de changer de conformation selon la nature du nucléotide lié à la GTPase (GDP ou GTP).

- Un domaine spécifique « Insert-Rho » qui constitue une hélice uniquement présente dans la structure des GTPases Rho et non dans la structure des autres GTPases de la superfamille Ras. Ce domaine permet l'interaction avec les GEF et également l'interaction avec certains effecteurs.
- Une partie C-terminale qui est essentielle à la localisation de la protéine et qui concentre l'essentiel des différences de séquence primaire entre les GTPases Rho. Elle comprend une région hypervariable ainsi que la boîte CAAX (C : Cystéine, A : acide aminé aliphatique, X : autre acide aminé). Ces domaines vont subir des modifications post-traductionnelles influençant la localisation de la protéine et donc ses fonctions. Cette région C-terminale est également impliquée dans l'interaction avec des régulateurs et des effecteurs.



Figure 23: Alignement des séquences en acides aminés et organisation structurale des GTPases de la sous-famille Rho. Les résidus qui diffèrent entre RhoA et RhoB sont en vert et ceux qui diffèrent entre RhoA et RhoC sont en rouge. Modifié à partir de (562).

La cristallographie des GTPases Rho montre que leur structure secondaire se compose d'un feuillet β comprenant 6 brins entourés de 5 hélices α et 3 hélices 3_{10} , reliés par des boucles (563,564,561).

III.A.4. Mécanismes de régulation de RhoB.

La protéine RhoB peut être régulée de différentes manières : par les effecteurs qui modulent son cycle d'activation (GEF, GAP, GDI), *via* des modifications post-traductionnelles, transcriptionnelles ou post-transcriptionnelles, ou *via* la régulation de l'équilibre entre sa stabilisation et sa dégradation.

III.A.4.a. Modulation de l'état d'activation de RhoB.

Régulation de l'état d'activation de RhoB par les GEFs :

Les GEFs sont capables de réaliser l'échange d'un GDP par un GTP sur RhoB et ainsi de lui donner une conformation active capable d'interagir avec différents effecteurs cellulaires et donc de réguler différents processus cellulaires (555,559).

De nombreuses protéines GEFs de RhoB ont été mises en évidence dans des expériences *in vitro*. On compte parmi ces protéines : Vav2 (565,566), GEF-H1 (567,568), Ect2, Net1 (566), XPLN (569), p115-RhoGEF (566,570), PRG, p190-RhoGEF (570), LARG (569,570) et p63-RhoGEF (571).

Régulation de l'état d'activation de RhoB par les GAPs :

Les GAPs sont capables de catalyser l'hydrolyse du GTP en GDP et donc de mettre RhoB sous sa conformation inactive (555,559). Plusieurs GAPs non spécifiques de RhoB ont été identifiées *in vitro* : p190-RhoGAP (572,573), DLC-1 et DLC-3 (574).

Régulation de l'état d'activation de RhoB par les GDIs :

Les GDIs sont capables d'extraire RhoB de la membrane plasmique et ainsi d'empêcher son activation ou de prévenir sa dégradation. Ces protéines peuvent également conserver RhoB sous sa conformation inactive en inhibant la dissociation du GDP (555,559).

Trois GDIs ont été identifiées à ce jour chez l'homme : RhoGDI1, RhoGDI2 et RhoGDI3 qui diffèrent par leur spécificité pour les différentes GTPases Rho, par leur expression tissulaire et par leur localisation subcellulaire. RhoGDI1 (ou RhoGDI α) est ubiquitaire, RhoGDI2 (ou RhoGDI β) est essentiellement exprimée dans les cellules hématopoïétiques lymphocytaires (575,576) et RhoGDI3 (ou RhoGDI γ) est retrouvée au niveau du cerveau, des poumons, des testicules et des reins chez la souris (577). RhoGDI1 et RhoGDI2 sont cytosoliques alors que RhoGDI3 peut être également localisé au niveau d'endomembranes cellulaires (578).

Le rôle des GDIs dans la régulation de RhoB reste controversé. Seul RhoGDI3 semble capable d'interagir avec RhoB (577). Sinon la régulation de RhoB via les GDI semble se faire par un mécanisme indirect, ainsi l'interaction de RhoA avec RhoGDI1 régulerait négativement l'expression de RhoB, mais ces mécanismes sont mal connus (579).

III.A.4.b. Modifications post-traductionnelles de RhoB.

Après sa traduction, la protéine RhoB peut être modifiée par quatre procédés : prénylation, palmitoylation, phosphorylation et sumoylation.

La prénylation de RhoB :

Comme les autres GTPases Rho, RhoB peut être prénylé de façon post-traductionnelle. Cette prénylation consiste en l'ajout d'un groupement isoprényle sur la boîte CAAX. Les groupements isoprényles sont des dérivés du cholestérol et peuvent être (580) :

- Un géranylgeranyl (GG) à 20 carbones dont l'ajout est catalysé par la géranylgeranyltransférase (GGTase) I.
- Ou un farnésyl (F) à 15 carbones dont l'ajout est réalisé *via* la farnésyltransférase (FTase).

L'isoprénylation rend la GTPase plus hydrophobe et favorise son ancrage à la membrane plasmique où elle effectue ses fonctions biologiques. De plus, elle est requise pour la palmitoylation de la protéine.

Alors que les GTPases RhoA et RhoC sont uniquement géranylgeranylées, la GTPase RhoB peut être à la fois géranylgeranylée et farnésylée sur la cystéine en position 193 (580–582).

La palmitoylation de RhoB :

La palmitoylation correspond à l'ajout d'un lipide : l'acide palmitique. Cette modification post-traductionnelle n'est observée que sur RhoB, et n'a pas lieu sur RhoA et RhoC. En effet, la protéine RhoB peut être doublement palmitoylée sur les cystéines en position 189 et 192 (580,581,583).

La palmitoylation de RhoB permet son adressage à la membrane plasmique puisque son inhibition avec du 2-bromopalmitate empêche cet adressage et conduit à une localisation aberrante de RhoB au niveau du réticulum endoplasmique et de la membrane nucléaire. De plus, elle pourrait aussi jouer un rôle dans l'interaction de RhoB avec les GDIs (583).

La phosphorylation de RhoB :

RhoB peut également subir une phosphorylation en position 185 par la sérine/thréonine kinase CK1 (Casein Kinase 1) aboutissant à son inactivation. De plus, l'inhibition spécifique de CK1 induit une activation de RhoB et de ses fonctions comme la formation de fibres de stress d'actine et la stabilisation de l'EGFR (584).

En réponse à des dommages de l'ADN, RhoB peut être également phosphorylé par Chk1 sur ses thréonines en position 173 et 175 ce qui va permettre par la suite sa sumoylation puis son adressage aux lysosomes (585).

La sumoylation de RhoB :

En réponse à des dommages de l'ADN, RhoB est phosphorylé par Chk1 ce qui promeut sa liaison à la SUMO-E3-ligase PIAS1 qui va effectuer la sumoylation de la protéine. Cette sumoylation a été mise en évidence sur les lysines 7, 135 et 194 de RhoB. Une fois phosphorylée et sumoylée la protéine RhoB permet la translocation du complexe TSC (Tuberous Sclerosis Complex) au niveau des lysosomes qui va induire un processus d'autophagie *via* l'inhibition de mTORC1 (585).

Les différentes modifications post-traductionnelles de la partie hypervariable de la protéine RhoB sont représentées dans la figure suivante :

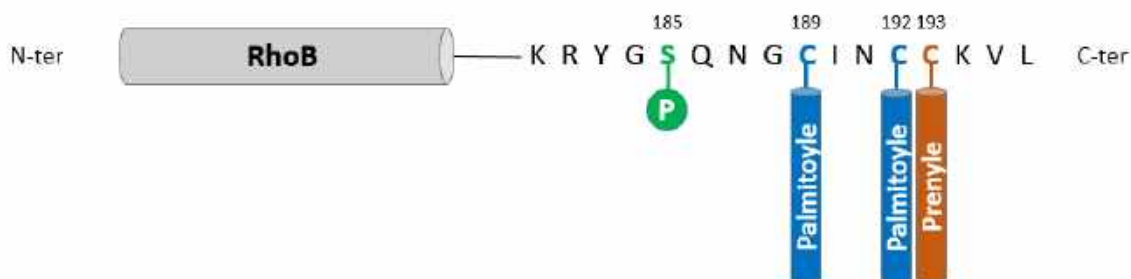


Figure 24 : Principales modifications post-traductionnelles de la région hypervariable de RhoB.

III.A.4.c. Régulation transcriptionnelle et post-transcriptionnelle de RhoB

Le gène *RHOB* se situe sur le chromosome 2, il est constitué d'un seul exon et ne possède pas d'introns. Il possède de nombreuses séquences consensus de transcription au niveau de son promoteur ainsi que de nombreuses séquences de reconnaissance de facteurs de transcription. Les facteurs de transcription pouvant se lier au gène *RHOB* sont nombreux : DB1/VEZF1, AP-1, NFY, AP-2, AP-4, SP1, NF- κ B, c-REL, SRF, PPAR, c-Jun, ATF-2 ET p300 (586–591).

Régulation transcriptionnelle de RhoB :

L'ARNm de RhoB possède une demi-vie courte, contrairement à celui de RhoA et RhoC, de moins d'une heure.

Le gène *RHOB* est un gène de réponse précoce à différents stimuli aboutissant à une induction de sa transcription. Ces stimuli sont nombreux et sont :

- Des facteurs de croissance tels que l'EGF, le sérum, le PDGF (592,593), le TGF- β (594,595), ou bien des signaux tels que l'hypoxie (596).
- Des génotoxiques avec les ultraviolets (UV) (590,592,597), les radiations ionisantes (598,599) et les chimiothérapies telles que le cisplatine (592), ou encore d'autres médicaments comme les glucocorticoïdes (600).
- Des thérapies ciblées avec les inhibiteurs de BRAF tels que le vémurafénib (601) ou encore les EGFR-TKIs tels que l'erlotinib (266).

De plus, l'induction de la transcription de *RHOB* peut être le résultat de la stabilisation de son transcrite, grâce à la liaison de son extrémité 3'UTR non traduite avec la protéine HuR (602,603) et en réponse à des stimuli tels que : le sérum (604), les UV (597,603), la chaleur (605) et des génotoxiques tels que la camptothécine (602).

L'expression de RhoB peut également être régulée par des mécanismes épigénétiques. En effet, dans les cancers du poumon, l'expression de RhoB est diminuée du fait d'une désacétylation des histones catalysée par des enzymes HDAC (histone désacétylases) (606–608) et l'utilisation d'inhibiteur d'HDAC permet une réexpression de RhoB (607). Inversement, dans les cellules traitées par des inhibiteurs de farnésyltransférase et de géranylgeranyltransférases (FTI et GGTIs) la transcription de RhoB est induite grâce à une dissociation de l'enzyme HDAC1 et à l'acétylation du promoteur de RhoB par l'histone acétyltransférase p300 (609). De même, la régulation de l'expression de RhoB semble aussi pouvoir être effectuée *via* un dialogue entre HDAC6 et p300 (610).

Régulation post-transcriptionnelle de RhoB :

De façon post-transcriptionnelle, l'expression de RhoB peut être régulée par des microARN (miARN). Ces miARN sont capables de s'apparier avec la région 3'UTR de l'ARNm de RhoB et d'induire soit sa dégradation, soit la répression de sa traduction. Le transcrite de RhoB peut s'apparier à différents miARN : miR-19 (611), miR-223 (612) et miR-21 (613–615).

Par exemple, le miR-21 est surexprimé dans de nombreux cancers (cancers du sein, cancers colorectaux et glioblastomes) dans lesquels il possède des propriétés pro-oncogéniques notamment *via* la répression qu'il exerce sur RhoB (613,614,616).

III.A.4.d. Régulation de la dégradation de RhoB.

La protéine RhoB est dégradée par voie lysosomale. Ceci se fait sous la dépendance de la région C-terminale de RhoB qui possède une séquence d'adressage et de dégradation *via* la voie endo-lysosomale (617).

De plus, c'est aussi en région C-terminale que RhoB peut être palmitoylé ou bien isoprénylé, si ce n'est pas le cas, *via* des mutations de résidus dans cette région ou bien *via* des inhibiteurs pharmacologiques, RhoB est stabilisé et non adressé à la dégradation (617,618).

De surcroît, en réponse à des dommages de l'ADN, la voie ATR/Chk1/Smurf1/RhoB est activée. Smurf1 surexprimé est capable d'interagir avec RhoB et de l'adresser au protéasome pour dégradation, ce qui promeut la tumorigenèse (619).

Par ailleurs, en réponse à des dommages de l'ADN, la protéine RhoB peut être phosphorylée par Chk1 ce qui promeut sa sumoylation par la SUMO-E3-ligase PIAS1. Ces modifications entraînent la translocation du complexe RhoB/TSC aux lysosomes, l'inhibition de mTORC1 et l'activation de l'autophagie des cellules. Ainsi, la déplétion de RhoB diminue la translocation du complexe TSC aux lysosomes et l'autophagie induite en réponse à des dommages de l'ADN. *A contrario*, dans ces cellules déplétées en RhoB la réexpression de RhoB wild-type restaure le processus d'autophagie (585).

III.A.5. Localisation subcellulaire de RhoB.

Comme décrit précédemment, la GTPase RhoB peut être à la fois farnésylée et géranylgeranylée ainsi que doublement palmitoylée en région C-terminale, contrairement aux GTPases RhoA et RhoC qui ne peuvent être que géranylgeranylées. Ces modifications post-traductionnelles particulières à RhoB vont lui conférer une localisation subcellulaire et des fonctions qui diffèrent de ses homologues.

La protéine RhoB est toujours associée aux membranes (620) : à la membrane plasmique et aux membranes vésiculaires endosomales et de l'appareil de Golgi (620,621,567,622,623,617,624), ainsi qu'à la membrane nucléaire principalement dans les cellules endothéliales (625,626).

Ces différentes localisations subcellulaires de RhoB sont dépendantes des modifications post-traductionnelles subies par la protéine puisque :

- D'une part, le traitement de cellules Hela par un inhibiteur pharmacologique de farnésyltransférase (FTI) entraînant une déplétion de la forme farnésylée au profit de la forme géranylgeranylée (627), s'accompagne d'une disparition du pool de RhoB au niveau de la membrane plasmique et d'une conservation du pool vésiculaire (621).
- D'autre part, la surexpression des formes exclusivement farnésylées ou exclusivement géranylgeranylées dans la lignée fibroblastique NIH 3T3 indique une localisation membranaire pour la forme farnésylée et vésiculaire pour la forme géranylgeranylée (628).

Ainsi, il semblerait que RhoB-farnésylée soit préférentiellement membranaire alors que RhoB-géranylgeranylée soit préférentiellement vésiculaire, même si ces travaux n'ont pas été confirmés dans d'autres études qui ne mettent pas en évidence une influence de la prénylation sur la localisation subcellulaire de RhoB (581).

De plus, ces différentes localisations subcellulaires sont évidemment en lien avec les fonctions biologiques exercées par la protéine RhoB. Ainsi, une localisation au niveau de la membrane plasmique et des endosomes est corrélée à sa fonction dans le trafic vésiculaire, le cytosquelette d'actine ou encore l'adhésion et une localisation nucléaire est liée à ses fonctions dans l'expression génique. Ces fonctions biologiques de RhoB seront développées dans la prochaine partie de cette introduction.

De même une localisation au niveau de l'appareil de Golgi est attribuée à sa palmitoylation (629) et une localisation aux lysosomes à sa dégradation (617,624).

III.A.6. Fonctions biologiques de RhoB.

La protéine RhoB possède de nombreux rôles dans divers processus cellulaires avec principalement : la régulation du cytosquelette d'actine, la régulation de l'adhésion et de la migration cellulaire, la régulation du trafic intracellulaire, la régulation de l'expression génique et la régulation de l'angiogenèse et de la lymphangiogenèse.

III.A.6.a. Régulation du cytosquelette d'actine.

Comme la majorité des GTPases Rho, la protéine RhoB est impliquée dans la régulation du cytosquelette d'actine (557).

Allal *et al.*, ont démontré que la surexpression d'un mutant constitutivement actif de RhoB G14V dans des fibroblastes immortalisés NIH-3T3 augmente la formation de fibres de stress d'actine ainsi que des points focaux d'adhésion (630).

A contrario, la surexpression d'un mutant dominant négatif de RhoB T19N inhibe la formation de fibres de stress d'actine induite par le TGF- β 1 dans des fibroblastes Swiss-3T3 (631).

Idem dans une lignée tumorale de cancer prostatique, où ce même mutant dominant négatif inhibe la formation de fibres de stress d'actine induite par la testostérone (632)

Dans des cellules de glandes surrénales de rat, l'inhibition de RhoB, soit par traitement par la toxine botulique de type A qui induit sa dégradation par le protéasome, soit via l'utilisation de siARN, inhibe la réorganisation du cytosquelette d'actine induite par l'acide lysophosphatidique (LPA) (633).

Cette fonction de régulation du cytosquelette d'actine de RhoB engendre des répercussions directes sur le trafic intracellulaire des endosomes (cf. partie III.A.6.b.).

III.A.6.b. Régulation du trafic intracellulaire.

La protéine RhoB est connue pour participer à l'adressage de différentes protéines vers des localisations subcellulaires spécifiques où elles exercent leurs actions.

Trafic intracellulaire de l'EGFR :

Tout d'abord, l'implication de la protéine RhoB a été décrite dans le trafic intracellulaire de l'EGFR.

En effet, Gampel *et al.*, ont montré que la surexpression de RhoB dans des cellules Hela induit un retard du transport de l'EGFR des endosomes précoces vers les endosomes tardifs et que ceci se fait par le biais de l'interaction de RhoB avec sa protéine effectrice PRK1 (634).

Wherlock *et al.*, démontrent par la suite que cet effet est attribué à la forme géranylgeranylée de RhoB puisque le traitement de ces cellules par un FTI, qui provoque une diminution de la fraction de RhoB-farnésylée au profit de la fraction RhoB-géranylgeranylée, diminue l'adressage de l'EGFR aux lysosomes et augmente son adressage à la membrane plasmique (621).

De plus, l'inhibition de RhoB entraîne une diminution de l'expression et de l'activation de l'EGFR. Et il a également été montré que RhoB interagit avec la chaîne légère de la protéine associée aux microtubules MAP1A/LC2 et que cette interaction est responsable d'une stabilisation des microtubules qui va faciliter le trafic endocytaire de l'EGFR (623).

Ainsi, tous ces résultats démontrent que RhoB contrôle le trafic intracellulaire de l'EGFR en inhibant son adressage des endosomes tardifs vers les lysosomes, ce qui prévient sa dégradation et qui favorise son recyclage au niveau de la membrane plasmique où il maintient sa voie de signalisation active.

Trafic intracellulaire du PDGFR :

La protéine RhoB est également impliquée dans la régulation du trafic intracellulaire du récepteur du facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGFR, Platelet-Derived Growth Factor Receptor).

Effectivement, dans des conditions normales, au niveau des cellules musculaires lisses vasculaires, le PDGF stimule le trafic de son récepteur PDGFR- β au niveau des endosomes tardifs péri-nucléaires et permet l'entrée de Src, AKT ou encore ERK dans le noyau pour réguler la transcription de gènes impliqués dans la prolifération et la survie cellulaire. Dans des cellules déplétées en RhoB, la stimulation par le PDGF n'induit aucun de ces effets. A l'inverse, la réexpression de RhoB dans ces cellules permet de restaurer l'adressage du PDGFR- β aux endosomes tardifs et la translocation nucléaire de Src, AKT et ERK (635).

Trafic intracellulaire de Rac1 et Cdc42 :

RhoB joue également un rôle dans le trafic et l'activation d'autres membres de la famille des GTPases Rho, Rac1 et Cdc42.

En effet, dans le même modèle que celui qui vient d'être exposé, Huang *et al.*, ont montré que, après stimulation par le PDGF, RhoB permet, *via* le recrutement du GEF Vav2, l'adressage de Rac1 et Cdc42 de la région péri-nucléaire vers la membrane plasmique où ils exercent leur fonction dans la migration cellulaire (636).

Trafic intracellulaire d'AKT :

RhoB régule également le trafic intracellulaire d'AKT vers le noyau.

Dans un modèle de cellules endothéliales, la déplétion de RhoB diminue la translocation nucléaire d'AKT et entraîne sa dégradation par le protéasome, conduisant à l'apoptose des cellules (625).

Trafic intracellulaire de c-Src :

Selon les travaux menés par Sandilands *et al.*, ainsi que par Arnette *et al.*, RhoB régule également le trafic intracellulaire et l'activation de c-Src qui est impliqué dans la régulation du cytosquelette d'actine.

En effet, c-Src est co-localisé avec RhoB au niveau des endosomes (637,638). Et dans des fibroblastes embryonnaires murins l'invalidation du gène codant la protéine RhoB induit une diminution considérable de l'activation de c-Src alors que sa réexpression restaure l'activation de c-Src et sa localisation au niveau de la membrane plasmique (637).

En outre, le trafic intracellulaire de c-Src dépend du cytosquelette de microtubules et également du cytosquelette d'actine, régulés par RhoB et son interaction avec GEF-H1 (637,638).

Trafic intracellulaire des formines mDia :

RhoB contrôle le trafic des endosomes en recrutant et activant les formines mDia.

Fernandez-Borja *et al.*, ont montré que l'expression du mutant actif de RhoB G14V induit la localisation des endosomes précoces en périphérie des cellules. De plus, RhoB permet l'activation de la formine mDia1 et donc la polymérisation de l'actine au niveau de la membrane plasmique ce qui retarde la maturation des endosomes vers les compartiments vésiculaires plus tardifs (639).

Waller *et al.*, ont mis en évidence que la protéine RhoB doit être sous sa forme active, liée au GTP, pour pouvoir exercer son rôle dans la régulation du trafic endosomal et que cette régulation se fait grâce à l'interaction entre mDia2 et RhoB au niveau des endosomes (640).

Trafic intracellulaire d'autres protéines :

La protéine RhoB est capable de réguler le trafic intracellulaire d'autres protéines primordiales, telles que :

- La kinase GSK-3. La déplétion de RhoB va diminuer la localisation nucléaire de cette kinase et donc l'accès à son substrat c-Myc dont elle favorise la dégradation par le protéasome, provoquant ainsi une induction de la prolifération cellulaire (641).
- Le récepteur d'adhésion MCAM (Melanoma Cell Adhesion Molecule). Dans une lignée tumorale de mélanome, après stimulation par la glycoprotéine Wnt5a, RhoB va être activé et contrôler l'organisation de MCAM, du cytosquelette d'actine et de myosine afin de permettre la migration cellulaire (642).
- Le récepteur aux chimiokines CXCR2. RhoB va réguler son adressage à la membrane plasmique où il sera recyclé ou bien son adressage aux lysosomes où il sera dégradé, contrôlant ainsi la migration cellulaire en réponse à des stimuli chimio-attractants (643).

III.A.6.c. Régulation de l'adhésion et de la migration.

La protéine RhoB est capable de réguler de nombreux facteurs impliqués dans l'adhésion et la migration cellulaire. Néanmoins, RhoB peut avoir un rôle pro-migratoire ou anti-migratoire selon le contexte cellulaire et le type cellulaire.

Les études portant sur le rôle de RhoB dans l'adhésion et la migration cellulaire sont résumées dans le tableau suivant :

Rôle anti-migratoire	Rôle pro-migratoire
(568), (644) : lignées tumorales prostatiques	(568) : lignées tumorales prostatiques
(645) : lignées épithéliales bronchiques	(636) : cellules musculaires lisses vasculaires primaires murines
(613) : lignées tumorales hépatiques et mammaires	(646) : lignée tumorale prostatique
(647) : lignées tumorales gastriques	(648) : lignée tumorale prostatique
(649) : lignée fibroblastique murine transformée avec l'oncogène <i>HRAS</i> et lignée tumorale pancréatique	

Tableau 8 : Liste des différentes études rapportant un rôle anti-migratoire ou un rôle pro-migratoire de la protéine RhoB et modèles utilisés dans ces études.

Rôle anti-migratoire :

Tout d'abord, Vega *et al.*, ont démontré dans une lignée tumorale prostatique que la diminution de l'expression de RhoB induit la diminution de l'expression et de l'activation de l'intégrine $\beta 1$, impliquée dans le processus d'adhésion cellulaire, au niveau de la membrane plasmique ainsi que l'altération de la dynamique des adhésions focales (568). De plus, dans une autre lignée tumorale prostatique, RhoB permet le maintien des jonctions intercellulaires en régulant l'expression et la localisation de la E-cadhérine, ce qui réduit leurs capacités migratoires (644).

Bousquet *et al.*, ont montré que dans des lignées cellulaires bronchiques, la déplétion de RhoB obtenue par interférence à l'ARN conduit à une promotion de l'adhésion, de la migration et de l'invasion cellulaires ainsi qu'à des modifications de la structure de l'actine, ceci sous la dépendance de Rac1 et d'AKT1 (645).

La surexpression de RhoB obtenue soit *via* la déplétion en miR-21, soit par transfection d'un vecteur d'expression, dans des cellules tumorales hépatiques ou de cancer du sein, induit une diminution de la migration, de l'invasion et de l'élongation cellulaire (613).

Dans des modèles de cancer gastrique, l'expression de RhoB inhibe la migration et l'invasion cellulaire (647).

De plus, l'expression ectopique de RhoB inhibe la migration et l'invasion de cellules transformées par l'oncogène Ras (649).

Rôle pro-migratoire :

Comme exposé précédemment, RhoB est capable de réguler l'activation et le trafic intracellulaire de Rac1 et Cdc42 vers la membrane plasmique. Par ce biais, RhoB participe à la formation de protusions cellulaires nécessaires à la migration (636).

RhoB participe également à la formation de lamellipodes *via* l'activation de Rac1 (568).

Dans des cellules de carcinome prostatique, la déplétion de RhoB inhibe la migration, l'invasion et l'adhésion induite par l'uPA (urokinase-type plasminogen activator) *via* la réduction de l'activité des intégrines et l'inhibition de la paxilline ainsi que de la cofiline chargée de réguler l'actine (646).

La surexpression de RhoB dans des cellules de cancers de la prostate induit la migration et l'invasion notamment grâce à une augmentation de l'expression de la métalloprotéase MMP1 (648).

III.A.6.d. Régulation de l'expression génique.

La protéine RhoB est capable de contrôler l'expression de nombreux gènes en régulant plusieurs facteurs de transcription.

Il a été montré que RhoB peut stimuler la transcription *via* la séquence régulatrice appelée élément de réponse au sérum (SRE, Serum Response Element) retrouvée au niveau du promoteur du proto-oncogène c-fos et de nombreux autres gènes régulés par les mitogènes comme les facteurs de croissance (650,651).

Un criblage double-hybride chez la levure a permis de mettre en évidence l'interaction de RhoB avec le facteur de transcription DB1/VEZF1 ce qui induit l'inhibition de la transcription de l'interleukine-3 (586).

De même, RhoB régule négativement la transcription de gènes codant pour des protéines impliquées dans l'apoptose en se liant au facteur de transcription NF- κ B (587).

Et il a également été montré que RhoB est capable de se lier au facteur de transcription AP-1 afin de réprimer la transcription du gène codant le TGF- β 2 (588).

III.A.6.e. Régulation de l'angiogenèse et de la lymphangiogenèse.

RhoB joue également un rôle dans la régulation de l'angiogenèse et la lymphangiogenèse.

Tout d'abord, Adini *et al.*, ont montré que des souris chez qui le gène *RHOB* est invalidé présentent un retard de croissance vasculaire visible au niveau de la rétine et que le traitement d'autres souris par un FTI inhibe l'angiogenèse rétinienne. De plus, la déplétion de RhoB dans des cellules endothéliales primaires, obtenue soit par transfection d'une construction antisens soit par utilisation d'un dominant négatif du gène, induit l'apoptose des cellules et leur incapacité à former des tubes vasculaires (625).

Dans des modèles de tumeurs mammaires, il a été montré que l'expression de RhoB est augmentée dans les vaisseaux sanguins associées aux tumeurs en comparaison aux vaisseaux sanguins associés au tissu non tumoral. De plus, la délétion de RhoB dans les cellules endothéliales induit une diminution de l'activation d'AKT et un défaut d'angiogenèse (652).

La diminution de l'expression de RhoB dans les cellules endothéliales, *via* l'expression de miR-21, induit une diminution de la migration de ces cellules ainsi qu'une réduction de la tubulogenèse (653).

Enfin, Gerald *et al.*, ont montré que RhoB possède des rôles opposés dans l'angiogenèse et la lymphangiogenèse. Effectivement, en réponse à une blessure, RhoB est capable d'interagir avec le facteur de transcription VEZF1 et de réguler positivement la transcription de gènes impliqués dans l'angiogenèse et négativement la transcription de gènes impliqués dans la lymphangiogenèse (626).

III.B. Implication de RhoB dans les cancers et les résistances aux thérapies ciblées.

III.B.1. Dérégulation de RhoB dans les cancers.

III.B.1.a. Modifications de l'expression de RhoB dans les cancers.

Contrairement à ses homologues RhoA et RhoC qui sont surexprimés dans les tumeurs (654), l'expression de RhoB est fréquemment diminuée dans de nombreux cancers :

- les cancers du sein (655) et les cancers ovariens (656) ;
- les cancers de la tête et du cou (657) ;
- les cancers du cerveau (658) ;
- les carcinomes cutanés à cellules squameuses (659) et les mélanomes (660) ;
- les cancers colorectaux (614) et gastriques (647) ;
- les carcinomes hépatocellulaires (661) ;
- les cancers du col de l'utérus (662) ;
- les cancers de la vessie (663,664) et du rein (665) ;
- les cancers du pancréas (666) ;
- et les cancers du poumon (667,608,645,668).

De plus, la perte d'expression de RhoB est corrélée au stade de la progression tumorale et à l'agressivité tumorale (655,657,659,667).

Toutefois, il est à noter que certaines études rapportent une augmentation de l'expression de RhoB dans les cancers du sein (669) et les adénocarcinomes bronchiques (670).

III.B.1.b. Mutations de RhoB dans les cancers.

Des mutations du gène *RHOB* ont été retrouvées dans environ 5% des cancers de la vessie (671).

Une analyse des bases de données cBioportal et IntoGen portant sur les mutations des RhoGTPases retrouvées dans des échantillons de patients met également en évidence de très rares mutations de RhoB, touchant un cas voire deux au maximum, dans plusieurs autres types de cancers et à de multiples endroits du gène (672). Pour autant, les conséquences fonctionnelles de ces mutations n'ont pas encore été étudiées.

III.B.2. Implication de RhoB dans la cancérogenèse et la progression tumorale.

En cancérogenèse, le rôle de RhoB est controversé. Certaines études ont démontré que RhoB possède un rôle pro-tumoral et d'autres, plus nombreuses, démontrent un rôle suppresseur de tumeur de RhoB en jouant sur le maintien de la stabilité du génome.

En effet, dans des carcinomes cutanés à cellules squameuses indifférenciés, la perte d'expression de RhoB est associée à une augmentation de l'expression de marqueurs des cassures double brin de l'ADN tels que phospho- γ H2AX et phospho-53BP1 (659).

Par ailleurs, Mamouni *et al.*, ont montré que des fibroblastes dermiques murins déficients en *RHOB* accumulent des foyers phospho- γ H2AX, possèdent des anomalies chromosomiques ainsi qu'une plus forte instabilité génomique. Ils démontrent également que l'induction de cassures double brins *via* un traitement de lignées tumorales par la camptothécine qui est un inhibiteur de la topoisomérase I, induit une augmentation de l'expression et de l'activité de *RHOB* ainsi que sa stabilisation ce qui conduit à l'activation de la voie Chk2-HuR-RhoB. Cette voie va alors activer la phosphatase PP2A qui va permettre la déphosphorylation de γ H2AX afin de permettre la réparation de la cassure par recombinaison homologue (602).

Ainsi, RhoB contribue au maintien de la stabilité du génome en promouvant la réparation des cassures double brins de l'ADN.

Malgré tout, la fonction de suppresseur de tumeurs de RhoB est controversée et semble dépendre du contexte cellulaire et du type de tumeurs. Certaines études confirment cette fonction et d'autres ont montré que RhoB contribue à l'oncogenèse en stimulant la prolifération, l'angiogenèse, la migration et l'invasion tumorale.

Les différentes études relatant les rôles opposés de RhoB dans les cancers sont résumées dans le tableau suivant :

Type de cancer	Rôle suppresseur de tumeurs	Rôle pro-oncogénique
Poumon	(607)	(670)
	(608)	
	(667)	
	(668)	
	(645)	
Vessie	(663)	-
	(664)	
Cerveau	(658)	(674)
	(673)	(675)
Sein	(655)	(669)
	(652)	(655)
		(652)
Col de l'utérus	(662)	-
Colorectal	(614)	-
Estomac	(647)	-
Tête et cou	(657)	-
Rein	(665)	(676)
Foie	-	(677)
Sang	(678) : lymphomes de Burkitt	(679) : leucémies aigües lymphoblastiques
Ovaires	(656)	-
	(680)	
	(681)	
Pancréas	(682)	-
	(666)	
Prostate	-	(648)
Peau	(649)	(597)
	(683)	(659)
	(660)	
	(659)	
Thyroïde	(684)	-

Tableau 9 : Liste des différentes études scientifiques rapportant un rôle oncogénique ou un rôle suppresseur de tumeur de la protéine RhoB (les références écrites en orange incluent des études portant sur des échantillons de patients, celles écrites en bleu incluent des études in vivo effectuées sur des modèles murins).

III.B.2.a. Rôle suppresseur de tumeurs de RhoB.

La fonction suppresseur de tumeur de RhoB a été confirmée dans de nombreuses études démontrant que la diminution de l'expression de RhoB joue un rôle dans l'induction, la migration et l'invasion tumorale. Ces études concernent principalement le cancer du poumon, les cancers de la peau, les cancers du cerveau et les cancers ovariens ainsi que d'autres types de cancers.

Cancers du poumon :

La diminution de l'expression de RhoB est très fréquente au cours de l'oncogenèse pulmonaire (667,608,645,668).

Mazières *et al.*, ont démontré que l'expression de RhoB décroît au cours de la progression tumorale et qu'elle est corrélée au stade tumoral et à l'index de prolifération tumorale. De plus, l'expression ectopique de RhoB dans une lignée cellulaire de cancer bronchique inhibe la prolifération

cellulaire, la croissance tumorale dépendante de l'ancrage et la croissance tumorale de xénogreffes sur des souris immunodéficientes (667).

De plus, Sato *et al.*, démontrent que dans de nombreuses lignées cellulaires de CBNPC le gène codant la protéine RhoB se situe dans une région de délétion homozygote du chromosome 2p24 possédant souvent des pertes alléliques responsables de la diminution d'expression de RhoB (608).

Cancers de la peau :

L'expression de RhoB a été rapportée comme diminuée dans les cellules de mélanomes en comparaison avec les mélanocytes sains (660).

Jiang *et al.*, ont mis en évidence que l'expression ectopique de RhoB inhibe la transformation, la migration et l'invasion, et induit l'apoptose dans les cellules de mélanome transformées par l'oncogène Ras (649).

De plus, les souris invalidées pour le gène *RHOB* sont plus susceptibles de développer des tumeurs de la peau induites chimiquement (683).

Enfin, la délétion de RhoB dans des modèles murins réduit le risque de cancer cutané induit par les UVs. Mais cette étude montre également que les tumeurs occasionnées sont plus indifférenciées et prolifératives. Tout ceci suggérant que RhoB pourrait promouvoir l'initiation tumorale des cancers cutanés mais en limitant leur agressivité. En outre, l'analyse de carcinomes cutanés à cellules squameuses révèle que les tumeurs indifférenciées et ayant une faible expression de RhoB présentent plus de cassures double brin de l'ADN identifiées par un marquage phospho- γ H2AX et phospho-53BP1 augmenté. Ces données suggèrent que la perte de RhoB pourrait augmenter les cassures double brin de l'ADN et donc l'instabilité génique ce qui contribuerait à la progression tumorale de ces types de tumeurs (659).

Cancers cérébraux :

Forget *et al.*, ont rapporté que l'expression de RhoB diminue dans les tumeurs cérébrales (astrocytomes, astrocytomes anaplasiques, glioblastomes et astrocytomes pilocytiques) en comparaison avec le tissu cérébral sain. De surcroît, l'expression de RhoB est inversement corrélée à l'agressivité tumorale (658).

Par la suite, une étude démontre que l'expression de RhoB permet d'inhiber la migration et l'invasion des cellules de glioblastomes (673).

Cancers ovariens :

L'expression de RhoB est diminuée voire abolie dans les carcinomes ovariens et ceci d'autant plus chez les tumeurs de grade élevé. De plus, la réexpression de RhoB *via* l'utilisation d'un inhibiteur d'HDAC permet de réduire la prolifération en inhibant la progression dans le cycle cellulaire des cellules de cancers ovariens (656).

De surcroît, la surexpression de RhoB par transduction adénovirale *in vitro* dans des lignées de cancers ovariens induit une diminution de la prolifération et une induction de l'apoptose de ces cellules. De même, *in vivo*, la surexpression de RhoB inhibe la croissance tumorale de xénogreffes de lignées de cancer ovarien (680).

Autres types de cancers :

Comme décrit dans la partie III.B.1.a. de cette introduction, l'expression de RhoB est diminuée dans de nombreux autres cancers.

Dans les cancers gastriques, Zhou *et al.*, ont démontré que l'expression de RhoB est fréquemment diminuée voire perdue dans les tumeurs gastriques, contrairement à ses homologues RhoA et RhoC. Aussi, l'expression de RhoB dans des lignées de cancers gastriques inhibe la prolifération, la migration et l'invasion de ces cellules (647).

Dans les carcinomes rénaux à cellules claires, l'expression de RhoB est diminuée et ceci est inversement corrélé à la taille tumorale. La surexpression de RhoB induit une inhibition de la prolifération, de la capacité à former des colonies, de la migration et de l'invasion des cellules de carcinomes rénaux à cellules claires ainsi qu'une promotion de leur apoptose (665).

Dans des cellules de cancers pancréatiques, l'expression de RhoB est diminuée (666) et l'expression ectopique de RhoB inhibe la croissance tumorale de xénogreffes chez la souris immunodéficiente (682).

Dans des cellules de cancers thyroïdiens, l'expression de RhoB induit une inhibition de la prolifération et de l'invasion *in vitro* et *in vivo* (684).

Dernièrement, dans les cancers du sein, Ju *et al.* démontrent que la surexpression de RhoB contribue à diminuer le pouvoir métastatique (596).

III.B.2.a. Rôle oncogénique de RhoB.

En revanche, dans d'autres modèles, RhoB semble contribuer à la tumorigenèse, notamment dans les cancers cérébraux, les cancers du sein, les adénocarcinomes bronchiques, ainsi que d'autres types de cancers.

Cancers cérébraux :

Ma *et al.*, ont évalué le niveau d'expression de RhoB dans des tissus de gliomes ainsi que dans des PDX et rapportent que l'expression de RhoB est la même en comparaison avec du tissu cérébral sain. Néanmoins, *in vivo*, l'inactivation du gène codant la protéine RhoB induit l'arrêt du cycle cellulaire, l'apoptose et réduit le potentiel tumorigène. Cependant, la surexpression de RhoB ou l'expression d'un mutant actif de *RhoB* n'affecte pas la croissance des cellules tumorales, excluant un rôle de RhoB dans l'initiation tumorale dans ces modèles (674).

RhoB semble être un régulateur d'une voie de signalisation permettant aux cellules de gliomes de résister à l'hypoxie, connue pour être un facteur de mauvais pronostic chez les patients, ce qui pourrait expliquer le rôle pro-oncogénique de RhoB dans ce contexte. Ainsi, l'hypoxie promeut la libération d'espèces réactives de l'oxygène qui vont induire l'activation de RhoB. De plus, la déplétion de RhoB dans des conditions hypoxiques entraîne une inhibition de la voie de survie AKT (675).

Cancers du sein :

Fritz *et al.*, ont démontré que l'expression de RhoB est augmentée dans les cancers du sein en comparaison avec le tissu sain et cette surexpression est corrélée au grade tumoral (669).

De plus, Médale-Giamarchi *et al.* montrent que l'expression de RhoB est corrélée à l'expression du récepteur α aux œstrogènes et que RhoB joue un rôle dans la régulation de la prolifération des cellules de cancers du sein positives pour le récepteur α aux œstrogènes(655).

Kazerounian *et al.* mettent en évidence un double rôle de RhoB. D'une part, RhoB joue un rôle suppresseur de tumeur dans les cellules tumorales puisque la diminution de son expression promeut l'initiation tumorale et la croissance tumorale *via* un maintien de l'activation de la voie de survie AKT. D'autre part, il va jouer un rôle pro-oncogénique en favorisant la croissance et la survie des cellules endothéliales du microenvironnement tumoral ce qui promeut la formation de vaisseaux au sein de la tumeur et donc la croissance tumorale, tout ceci grâce cette fois-ci à une activation de la voie de survie AKT (652).

Adénocarcinomes bronchiques :

Luis-Ravelo *et al.*, rapportent que l'expression de RhoB est augmentée dans les adénocarcinomes bronchiques hautement métastatiques. De plus, RhoB promeut les étapes précoces et tardives de la formation de métastases. En effet, l'injection intracardiaque d'une lignée cellulaire tumorale bronchique déplétée en RhoB dans un modèle murin induit une diminution du nombre et de la taille des métastases osseuses. Inversement, dans un modèle murin orthotopique, la surexpression de RhoB promeut la formation de métastases macroscopiques extra-pulmonaires, démontrant que RhoB est donc capable de favoriser les étapes précoces de la formation de métastases telles que l'invasion et l'intravasation (670).

Autres types de cancers :

D'autres études concernant d'autres localisations tumorales font état du fait que RhoB est capable de promouvoir les fonctions conduisant à la tumorigénèse.

Dans des cellules de cancer de la prostate, *in vitro*, la surexpression de RhoB promeut la migration et l'invasion des cellules en jouant sur la voie GSK3 et l'expression de la métalloprotéase MMP1 (648).

Dans les lymphocytes T de leucémies aigües lymphoblastiques, l'expression de RhoB est augmentée comparée aux cellules T saines et elle est corrélée avec le nombre de cellules blanches (679).

La diminution de l'expression de RhoB dans des cellules rénales *via* l'utilisation de siARN induit l'apoptose cellulaire (676).

Dans les cellules de carcinomes hépatocellulaires, le facteur chimiotactique CCL24 favorise la migration et l'invasion cellulaire par la voie RhoB/VEGFA (677).

Canguilhem *et al.*, ont démontré que RhoB protège les kératinocytes de l'apoptose induite par les UV-B, suggérant son rôle potentiel dans la carcinogénèse induite par les UVs (597).

III.B.3. Influence des modifications post-traductionnelles de RhoB sur son rôle dans les cancers.

Les modifications post-traductionnelles de RhoB sont capables d'influencer ses fonctions biologiques en situation physiologique mais également dans un contexte de cancer.

En effet, la palmitoylation de RhoB sur sa cystéine 192 et sa prénylation sur la cystéine 193 sont des éléments nécessaires à sa fonction de suppresseur de tumeur et à ses activités pro-apoptotiques (685,686).

La forme farnésylée de RhoB et sa forme géranylgeranylée exercent des fonctions différentes. En effet, Mazières *et al.*, ont mis en évidence que seule la forme géranylgeranylée de RhoB et non sa forme farnésylée est capable d'empêcher la transformation tumorale médiée par l'oncogène *Ras* dans un modèle de fibroblastes murins immortalisé NIH-3T3 en médiant une action anti-proliférative et pro-apoptotique (687).

D'autres travaux menés sur plusieurs lignées cellulaires *in vitro* et sur des xenogreffes de souris immunodéficientes, montrent au contraire que les deux formes sont capables d'inhiber la transformation tumorale et la croissance tumorale (682).

Ces disparités illustrent le fait que le contexte cellulaire influence de façon importante les fonctions de ces différentes formes de RhoB et l'importance de déterminer la fonction propre à chaque forme.

III.B.4. Implication de RhoB dans la réponse à des stress cellulaires radio- ou chimio-induits.

Comme décrit dans la partie III.A.4.c, l'expression et/ou l'activation de RhoB peuvent être induites en réponse à de nombreux stress cellulaires provoqués par les agents de chimiothérapie ou de radiothérapie. Mais le rôle de RhoB en réponse à ces stimuli est controversé puisqu'il va pouvoir avoir un rôle pro-apoptotique ou anti-apoptotique selon la nature du stress et le type cellulaire.

III.B.3.a. Fonction pro-apoptotique de RhoB en réponse à des stress cellulaires radio- ou chimio-induits.

Réponse aux stress chimio-induits :

Dans la lignée immortalisée fibroblastique murine NIH-3T3 la surexpression de RhoB induit une réponse apoptotique à des agents alkylants (688).

De même, dans un modèle de cellules Hela issues d'un cancer du col de l'utérus, la diminution de l'expression de RhoB induit une diminution de la réponse apoptotique médiée par des agents alkylants (619).

Liu Ax *et al.*, ont également mis en évidence que, dans des modèles cellulaires transformés, l'inhibition de RhoB rend les cellules résistantes à l'apoptose médiée par la doxorubicine, le taxol et les radiations γ (689).

Dans les cancers gastriques, RhoB promeut la sensibilité des cellules à des agents cytotoxiques tels que l'adriamycine, le 5-fluorouracile et le cisplatine (647).

De plus, une étude a montré que la combinaison des agents cytotoxiques ixabepilone et du sunitinib induit l'apoptose de cellules de cancers ovariens, et s'accompagne d'une induction de l'expression de RhoB. De plus, la déplétion de RhoB *via* l'utilisation d'un shARN a permis de mettre en évidence le rôle central de RhoB dans l'apoptose induite par cette combinaison (681).

Réponse aux stress radio-induits :

En réponse à des radiations γ , RhoB induit l'apoptose de cellules lymphocytaires immortalisées Jurkatt (599).

La diminution de l'expression de RhoB rend des cellules de cancer du sein résistantes aux radiations ionisantes par inhibition de l'induction de leur apoptose (566).

III.B.3.a. Fonction anti-apoptotique de RhoB en réponse à des stress cellulaires radio- ou chimio-induits.

Ou bien, RhoB peut avoir une fonction anti-apoptotique en réponse à des stimuli radio- ou chimio-induits.

C'est le cas dans des modèles *in vivo* d'adénocarcinomes bronchiques dans lesquels RhoB induit une résistance à une chimiothérapie à base de taxane et aux radiations γ (670).

Dans des cellules NIH-3T3 fibroblastiques murines immortalisées, RhoB inhibe la mort mitotique des cellules suite à une exposition à des radiations ionisantes (628).

Dans un modèle de cellules Hela issues d'un cancer du col de l'utérus, l'activation de RhoB protège les cellules des radiations ionisantes en empêchant la mort cellulaire post-mitotique (690).

L'ensemble de ces données indique que les fonctions de RhoB dans les cancers sont fortement dépendantes du contexte tumoral ainsi que du type cellulaire. En effet, plusieurs études démontrent que les rôles de RhoB dans l'initiation tumorale et dans la progression et l'agressivité tumorales s'opposent (652,659). De même, soumis à divers stress thérapeutiques, le rôle de RhoB dans le processus apoptotique varie selon le type de stress et le type cellulaire. Néanmoins, il est évident que RhoB joue un rôle essentiel dans de nombreux cancers. Ainsi, le rôle de RhoB nécessite d'être mieux précisé. Pour cela, de plus amples études, sur des modèles se rapprochant le plus possible de l'oncogenèse humaine (PDX), sont nécessaires afin d'investiguer le rôle de RhoB dans les différents stades de l'oncogenèse (initiation tumorale, croissance tumorale et pourvoir métastatique) et dans la réponse aux thérapeutiques anti-tumorales, notamment les thérapies ciblées.

III.B.5. Implication de RhoB dans les résistances aux thérapies ciblées.

III.B.6.a. Implication de RhoB dans les résistances aux thérapies ciblées dans les mélanomes.

Delmas *et al.*, en 2015, ont montré le rôle de RhoB dans la réponse aux inhibiteurs de la voie de la MAP kinases dans les mélanomes porteurs de mutations activatrices de *BRAF*.

D'une part, l'expression de RhoB est induite dans des lignées de mélanome porteuses de la mutation activatrice *BRAF*^{V600X} traitées par des inhibiteurs spécifiques de BRAF ou de MEK. Cette induction de RhoB est due à une augmentation de sa transcription médiée par le facteur de transcription c-Jun.

D'autre part, l'inhibition de RhoB sensibilise les cellules de mélanome à l'apoptose médiée par les inhibiteurs de la voie des MAP kinases. Et chez les patients atteints de mélanomes porteurs de mutations activatrices de *BRAF*, une forte expression de RhoB au moment du diagnostic est un marqueur prédictif de mauvaise réponse aux inhibiteurs de BRAF.

Enfin, la résistance aux inhibiteurs de BRAF médiée par RHOB est attribuée à un maintien de l'activation de la voie de survie AKT. Et, *in vitro* ainsi que *in vivo*, l'association d'un inhibiteur d'AKT à

un inhibiteur de BRAF permet de surmonter ce mécanisme de résistance et d'améliorer la réponse anti-tumorale (601).

L'implication de la signalisation des Rho GTPases dans les résistances aux inhibiteurs de BRAF dans les mélanomes a été dernièrement confirmée par Misek *et al.*, sans préciser quel membre de la famille est directement impliqué (691).

III.B.6.b. Implication de RhoB dans les résistances aux thérapies ciblées dans les cancers bronchiques.

RhoB joue également un rôle dans les résistances aux EGFR-TKIs dans les cancers bronchiques possédant des mutations activatrices de l'*EGFR* (266). Calvayrac *et al.*, ont démontré, que l'expression de RhoB module la réponse aux EGFR-TKIs dans des modèles de CBNPC porteurs de mutations activatrices de l'*EGFR* :

- *In vitro*, la modulation de l'expression de RhoB dans des lignées tumorales bronchiques possédant des mutations de l'*EGFR* détermine le niveau de réponse aux EGFR-TKIs. En effet, l'inhibition de RhoB par des siARN sensibilise les cellules aux EGFR-TKIs et la réexpression de RhoB par transduction adénovirale reverse cet effet. De plus, l'augmentation graduelle de la surexpression de RhoB, par augmentation graduelle de la quantité d'adénovirus transduite, s'accompagne d'une augmentation proportionnelle de l'IC50 (concentration inhibitrice de 50% de l'effet) de l'erlotinib, suggérant une diminution de la sensibilité à cet EGFR-TKI.
- *In vivo*, dans un modèle de souris transgéniques développant des tumeurs porteuses de la mutation *EGFR*^{L858R} spécifiquement au niveau du poumon et possédant un fond génétique RhoB déficient ou proficient, il a été montré que les souris proficientes en RhoB résistent à l'erlotinib alors que les souris déficientes en RhoB sont sensibles à l'erlotinib.
- Chez des patients atteints de CBNPC porteurs de mutations activatrices de l'*EGFR*, l'expression tumorale de RhoB au moment du diagnostic est un marqueur prédictif de réponse aux EGFR-TKIs. En effet, au moment du diagnostic, les patients présentant une forte expression tumorale de RhoB possèdent une survie sans progression significativement plus courte (médiane de 5,6 mois) que les patients présentant une faible expression tumorale de RhoB (médiane de 15,3 mois) après traitement par EGFR-TKIs de première ou deuxième générations, quelle que soit la ligne de traitement. De plus, si l'on compare l'expression tumorale de RhoB au moment du diagnostic avec celle au moment de la rechute tumorale sous EGFR-TKI, elle augmente chez 8 patients sur les 11 étudiés, suggérant un rôle de RhoB dans les résistances adaptatives aux EGFR-TKIs.

De plus, la résistance aux EGFR-TKIs en lien avec RhoB observée peut s'expliquer par le maintien de l'activation de la voie de survie AKT. En effet, la surexpression de RhoB dans les cellules traitées par erlotinib maintient la phosphorylation d'AKT. Chez les souris proficientes en RhoB, l'expression tumorale de phospho-AKT est également maintenue, alors qu'elle est diminuée chez les souris déficientes en RhoB. Et l'expression constitutive d'un mutant actif d'AKT, tout comme la surexpression de RhoB, augmente l'IC50 de l'erlotinib. Ainsi l'expression de RhoB prévient la déphosphorylation d'AKT induite par l'erlotinib, suggérant un rôle de la voie RHOB/AKT dans la sensibilité des cellules porteuses de mutations de l'*EGFR* aux EGFR-TKIs (266).

Qui plus est, l'inhibition d'AKT avec l'ipatasertib reverse la résistance à l'erlotinib induite par l'erlotinib *in vitro* et *in vivo*. En effet, l'inhibition d'AKT dans des cellules surexprimant RhoB entraîne une sensibilisation des cellules à l'erlotinib en induisant l'apoptose de ces cellules. De même, *in vivo*, l'association d'un inhibiteur d'AKT avec l'erlotinib permet d'obtenir une diminution du nombre de tumeurs chez les souris proficientes en RhoB (266). Ces données suggèrent que l'association d'un inhibiteur d'AKT aux EGFR-TKIs chez les patients atteints de CBNPC, porteurs de mutations activatrices

de l'EGFR et possédant une forte expression tumorale de RhoB au moment du diagnostic pourrait permettre d'éviter les résistances aux EGFR-TKIs observées chez ces patients.

Les résultats de cette étude sont résumés dans la figure suivante :

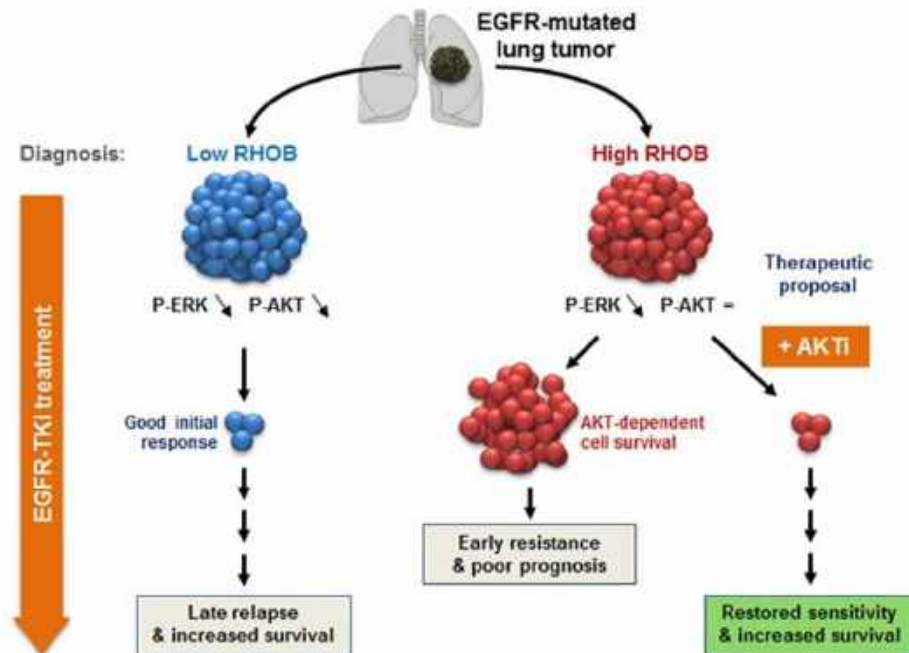


Figure 25 : Une forte expression tumorale de RhoB dans les cancers bronchiques porteurs de mutations activatrices de l'EGFR est un marqueur prédictif de résistance au traitement par EGFR-TKI. L'association thérapeutique d'un EGFR-TKI avec un inhibiteur d'AKT pourrait rétablir la sensibilité aux EGFR-TKIs chez les patients possédant une forte expression de RhoB avant traitement – Tiré de (266).

A ce jour, cette étude de Calvayrac *et al.* est la seule rapportant un rôle de RhoB dans les résistances aux thérapies ciblées dans les cancers bronchiques. Cependant, de plus amples expérimentations sont nécessaires pour préciser le mécanisme d'implication de RhoB dans les résistances aux EGFR-TKIs ainsi que pour rechercher un rôle similaire dans les résistances à d'autres thérapies ciblées utilisées dans le cancer bronchique (inhibiteurs de ALK par exemple).

III.B.7. Utilisation des inhibiteurs de la farnésyltransférase (FTIs) dans le traitement des cancers.

Comme exposé précédemment, les modifications post-traductionnelles des membres des familles Ras et Rho par prénylation (farnésylation ou géranylgéranoylation) sont catalysées par la FTase ou la GGTase I et sont capitales dans la régulation de la localisation cellulaire de ces protéines ainsi que dans la régulation de leurs fonctions aussi bien dans des conditions physiologiques que dans un contexte de cancer.

Les oncogènes de la famille Ras étant impliqués dans environ 25 % des cancers humains, des stratégies inhibitrices de RAS ont alors été développées avec notamment des inhibiteurs de sa farnésylation (692), les inhibiteurs de la farnésyltransférase (FTIs).

LA FTase est une enzyme cytosolique capable de catalyser l'addition d'un groupement à 15 carbones provenant du farnésyl-diphosphate sur la boîte CAAX d'une protéine telle que HRAS, NRAS, KRAS ou RHOB par exemple.

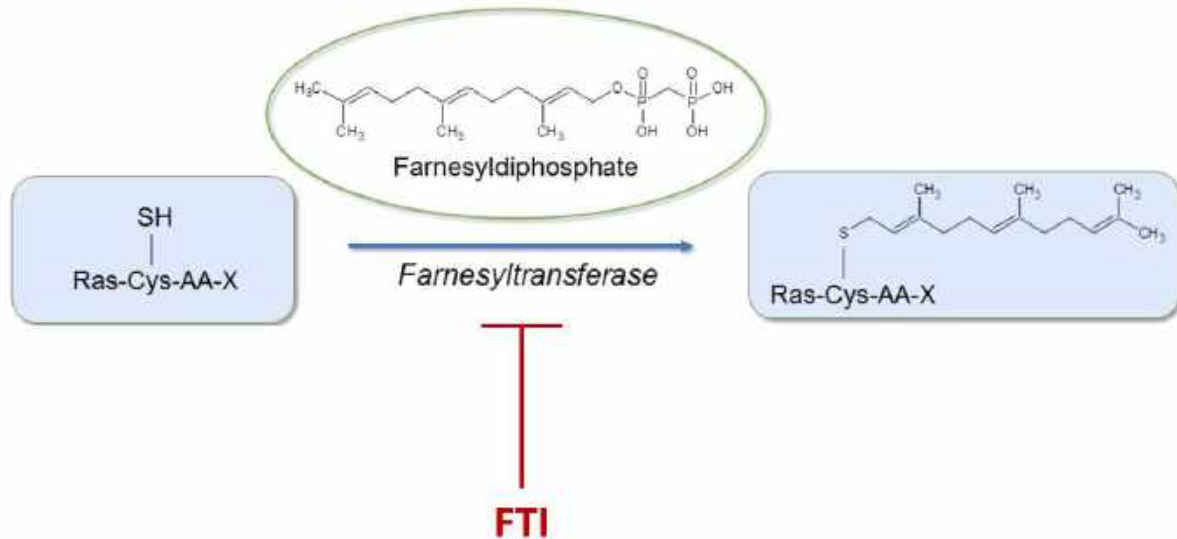


Figure 26 : Les inhibiteurs de farnésyltransférases (FTIs). Modifié à partir de (693).

Dans la cellule des centaines de protéines peuvent être prénylées, certaines peuvent être exclusivement farnésylées (HRAS) ou géranylgeranylées (RhoA, RhoC), d'autres peuvent subir les deux modifications (RhoB) et enfin, lorsque la farnésylation est inhibée, d'autres protéines normalement farnésylées deviennent géranylgeranylées (KRAS, NRAS) (694).

Depuis les premières expérimentations menées avec les FTIs en 1990 (695), de nombreuses publications ont rapporté une efficacité des FTI en préclinique et particulièrement sur les cellules transformées par l'oncogène *HRAS* (696,697). Au vu de ces résultats, le développement clinique des FTIs a été lancé et, depuis les années 2000, quatre molécules ont été testées : le tipifarnib (R115777), le lonafarnib (SCH66336), le L-778123 et le BMS-214662.

III.B.7.a. Utilisation des inhibiteurs de la farnésyltransférase (FTIs) en monothérapie dans le traitement des cancers.

Les FTIs ont d'abord été testés en monothérapie dans le traitement des cancers. Les résultats des essais cliniques de phase II et III du tipifarnib et du lonafarnib utilisés en monothérapie dans différentes indications tumorales sont rapportés dans le tableau suivant :

Indications	Phase	Nombre de patients	Efficacité sur l'activité FTase (AFT) ou la prénylation de protéines cibles	Taux de réponse objective (%)	Références	
Tipifarnib						
Cancers solides (CS)	Cancers de la vessie avancés	II	34	ND	6	(698)
	Cancers du sein avancés	II	76	ND	11,8	(699)
	Cancer colorectaux avancés	II	55	ND	1,8	(700)
		III	235 (tipifarnib)	ND	0,4	(701)
	133 (placebo)		0			
	CBNPC avancés	II	44	Diminution de l'AFT chez 83 % des patients et de la farnésylation de HDJ2 et pré-lamine A	0	(702)
	CBPC	II	20	ND	0	(703)
	Cancers cérébraux	II	81	ND	2,5	(704)
	Glioblastomes multiformes	II	67	ND	7,5	(705)
	Cancers du pancréas métastatiques	II	21	AFT réduite de 50 % et diminution de la farnésylation de HDJ2 de 33 %	0	(706)
	Cancers du pancréas	II	53	ND	0	(707)
	Mélanomes	II	14	AFT réduite de 85 à 98 %	0	(708)
Cancers hématologiques (CH)	Leucémies aiguës myéloïdes	II	252	ND	7,5	(709)
		II	145	Diminution de la farnésylation de HDJ2	17,2	(710)
		II	333	ND	12,9	(711)
		III	228 (tipifarnib)	ND	16,7	(712)
			229 (soins de support)		1,3	
	Syndromes myélodysplasiques	II	27	ND	11,1	(713)
		II	82	ND	31,7	(714)
	Myélomes multiples	II	36	Diminution de l'AFT et de la farnésylation de HDJ2	0	(715)
	Leucémies myéloïdes chroniques, myélofibroses et myélomes multiples	II	40	ND	17,5	(716)
	Lymphomes	II	11	ND	9	(717)
		II	93	ND	20,4	(718)
Lonafarnib						
CS	Cancers colorectaux métastatiques	II	21	ND	0	(719)
	Cancers urothéliaux réfractaires	II	10	Légère diminution de la farnésylation de HDJ2	0	(720)
	Cancers de la tête et du cou	II	15	ND	0	(721)
CH	Syndromes myélodysplasiques et leucémies aiguës myéloïdes	II	16	ND	6,7	(722)

Tableau 10 : Essais cliniques de phase II et III évaluant le tipifarnib et le lornatinib en monothérapie dans le traitement des cancers solides et hématologiques. ND = non déterminé.

Les faibles taux de réponses objectives des FTIs en monothérapie démontrent une absence ou une faible activité anti-tumorale sur les cancers solides. En revanche, l'activité anti-tumorale des FTIs est meilleure sur les cancers hématologiques.

De plus, l'ensemble de ces essais montrent que les FTIs exposent à des effets indésirables principalement d'ordre hématologique avec des neutropénies, des anémies et des thrombocytopenies, mais aussi des effets indésirables gastro-intestinaux (diarrhées et nausées), des neuropathies périphériques et une asthénie.

Mais qu'en est-il des FTIs en combinaison avec d'autres thérapeutiques anti-tumorales ?

III.B.7.b. Utilisation des inhibiteurs de la farnésyltransférase (FTIs) en association à d'autres thérapeutiques anti-tumorales dans le traitement des cancers.

Les résultats des essais cliniques de phase II et III du tipifarnib et du lonafarnib en association à d'autres traitements anti-cancéreux cytotoxiques et dans différentes indications tumorales sont rapportés dans le tableau suivant :

Indications	Molécule(s) associée(s)	Phase	Nombre de patients	Efficacité sur l'activité FTase (AFT)	Taux de réponse objective (%)	Auteurs de l'essai
Tipifarnib						
Cancers du sein avancés	doxorubicine + cyclophosphamide	II	32	Réduction de l'AFT de 55 à 100 %	21,9	(723)
	letrozole	II	74 tipifarnib	ND	30	(724)
			39 placebo		38	
paclitaxel + doxorubicine + cyclophosphamide	II	55	ND	Réponse complète : 4 à 18 %	(725)	
Cancers du sein métastatiques	gemcitabine	II	30	ND	16,7	(726)
Cancers du sein stade IIB-III C	doxorubicine + cyclophosphamide	II	44	Réduction de l'AFT de 91 % en moyenne	25	(727)
Cancers du sein hormono-dépendants réfractaires au tamoxifène	tamoxifène	II	20	ND	5	(728)
Cancers du sein hormono-dépendants	fluvestrant	II	31	ND	35,5	(729)
Cancers du sein métastatiques réfractaires aux taxanes	capécitabine	II	63	ND	9,5	(730)
Cancers du pancréas avancés	gemcitabine	III	341 tipifarnib	ND	1,8	(731)
			347 placebo		2,3	
	Gemcitabine + paclitaxel + radiothérapie et +/- tipifarnib en maintenance	II	94 tipifarnib	ND	Survie globale : 8,9 mois	(732)
91 placebo	11,5 mois					
Glioblastomes	radiothérapie	II	27	ND	0	(733)
Gliomes (enfants)	radiothérapie	II	40	ND	17,5	(734)
Syndromes myélodysplasiques et leucémies aiguës myéloïdes	idarubicine+ cytarabine	II	95 tipifarnib	ND	74	(735)
			108 placebo		70	
Leucémies aiguës myéloïdes du sujet âgé	cytarabine à faible dose	II	33 tipifarnib	ND	18	(736)
			32 placebo		25	
	etoposide	II	84	ND	36	(737)
Lonafarnib						
Cancers ovariens stade IIB-IV	carboplatine + paclitaxel	II	53 lonafarnib	ND	Survie globale : 34,3 mois	(738)
			52 placebo		47,3 mois	
CBNPC ayant progressé pendant ou après un traitement par taxanes	paclitaxel	II	29	ND	10,3	(739)
Cancers urothéliaux	gemcitabine	II	31	ND	32,3	(740)

Tableau 11 : Essais cliniques de phase II et III évaluant le tipifarnib et le lornatinib en association avec d'autres thérapeutiques anti-tumorales cytotoxiques dans le traitement des cancers. ND = non déterminé.

L'ensemble de ces résultats montre que l'efficacité des FTIs en association à d'autres thérapeutiques anti-cancéreuses cytotoxiques reste également limitée.

L'efficacité des FTIs en association avec des thérapies ciblées a rarement été évaluée dans le traitement des cancers et les quelques essais réalisés démontrent également que cette efficacité semble limitée.

L'association du tipifarnib avec le sorafénib (inhibiteur de l'activité tyrosine kinase de multiples kinases : CRAF, BRAF, c-KIT, VEGFR, PDGFR) dans un essai clinique de phase II s'adressant à 39 patients atteints de mélanomes a permis un taux de réponse objective de 2,5 % uniquement (741).

Le tipifarnib a été testé en combinaison avec un EGFR-TKI, l'erlotinib, dans un essai de phase I chez des patients atteints de tumeurs solides avancées. Les patients testés n'ont pas été sélectionnés selon le statut mutationnel de l'*EGFR* de leur tumeur. En termes d'efficacité, sur les 23 patients testés, 2 ont eu une régression partielle de leur tumeur (un patient atteint d'un cancer hépatique et l'autre d'un mélanome), 10 une stabilité de la maladie et 11 ont progressé (742).

Quels sont les facteurs pouvant expliquer cette efficacité limitée des FTIs en monothérapie ainsi qu'en association ?

III.B.7.c. L'utilisation d'inhibiteurs de la farnésyltransférase (FTIs) dans le traitement des cancers : pourquoi une efficacité limitée ?

Tout d'abord il a été montré que les protéines KRAS et NRAS normalement farnésylées deviennent géranylgeranylées et restent actives sous traitement par FTIs contrairement à HRAS. Ceci pourrait expliquer pourquoi les patients porteurs de mutations de *KRAS* (ou *NRAS*) échappent à l'inhibition médiée par les FTI (743–746).

Une étude de 2002 a tenté de traiter des patients porteurs de mutations de *KRAS* avec un inhibiteur de la FTase et de la GGTase, mais malheureusement les concentrations utilisées n'ont pas permis d'inhiber la prénylation de *KRAS* (747). Puis, récemment, un double inhibiteur de la FTase et de la GGTase, le FGTI (pour farnesyl- and geranylgeranyl-transferases inhibitor) a été testé sur des modèles de cancers du pancréas, du poumon et du colon porteurs de mutations activatrices de *KRAS*. Cette étude montre que le FGTI est capable d'inhiber la prénylation et la localisation membranaire de *KRAS*, conduisant à l'induction de l'apoptose et l'inhibition de la croissance tumorale de xénogreffes exclusivement des lignées cellulaires dont la survie est dépendante de mutations activatrices de *KRAS*, pas des lignées indépendantes de *KRAS* (748). Malheureusement, cette étude n'a pas comparé pas l'action du FGTI à celle de FTIs ou GGTIs administrés seuls.

Or des études ont montré que l'inhibition de la croissance tumorale médiée par les FTIs n'est pas corrélée à la présence de mutations de *KRAS* (749–751). Ceci suggère que dans des modèles murins mutés *KRAS* (752,753), sensibles aux FTIs, la croissance tumorale peut-être régulée par une autre protéine farnésylée ciblée par les FTIs. En effet, des études mécanistiques ont révélé que les effets des FTIs n'étaient pas dus qu'à la simple inhibition de Ras, mais également à une inhibition de la farnésylation de RhoB (754). Le traitement par FTI conduit à une diminution de l'expression de la protéine RhoB-farnésylée et à une augmentation de l'expression de la protéine RhoB-géranylgeranylée (685). Or, plusieurs travaux ont montré que, sous traitement par FTI, l'augmentation du taux de forme géranylgeranylée de RhoB est suffisante pour inhiber la croissance cellulaire et induire l'apoptose (685,755,756). De plus, contrairement à la forme farnésylée de RhoB qui peut avoir un effet pro- ou anti-tumoral selon le contexte, la forme géranylgeranylée de RhoB exerce toujours une activité anti-tumorale (627,755,682,687). Mais de plus amples investigations sont nécessaires pour valider le fait que RhoB pourrait être la cible privilégiée des FTIs dans différents contextes tumoraux.

Il est à noter que la proportion de patients porteurs de mutations de *KRAS* est beaucoup plus importante que celle de patients porteurs de mutations de *HRAS* (757). Or dans la majorité des essais cliniques, les patients n'ont pas été sélectionnés selon le génotype de la tumeur conduisant à une sous-

estimation de l'efficacité des FTIs, qui pourrait augmenter sur des patients porteurs de mutations de *HRAS*.

Des données récentes vont d'ailleurs dans ce sens.

En effet, *in vivo*, le traitement de souris transgéniques possédant des tumeurs de la thyroïde mutées pour le gène *HRAS* par le tipifarnib induit une régression tumorale et une amélioration de la survie de façon significative. Et chez ces souris l'association du tipifarnib avec un inhibiteur de MEK améliore encore la régression tumorale et empêche la rechute tumorale observée sous tipifarnib seul (758).

De même, Gilardi *et al.* ont testé le tipifarnib dans des modèles de cancers épidermoïdes de la tête et du cou porteurs de mutations de *HRAS*. *In vitro*, ils démontrent que le tipifarnib permet une inhibition de la localisation membranaire de *HRAS* qui s'accompagne d'une inhibition de la prolifération et de la survie des cellules mutées pour *HRAS* ainsi que d'une inhibition de la formation de sphéroïdes à partir de ces cellules. *In vivo*, le tipifarnib induit une régression ou une stabilisation tumorale dans des modèles de xénogreffes de lignées mutées pour *HRAS* (759).

Le tipifarnib a également été évalué dans le traitement des carcinomes urothéliaux porteurs de mutations de *HRAS* dans un essai de phase II. Chez ces patients, le tipifarnib a permis un taux de réponses objectives de 33% et une médiane de survie sans progression de 5,1 mois (*versus* 0,8 mois pour les patients non porteurs de mutations de *HRAS*). Concernant la tolérance, les effets indésirables les plus rapportés ont été une asthénie et des troubles hématologiques avec le plus souvent une neutropénie qui a pu nécessiter des transfusions sanguines (760).

De plus, le tipifarnib fait actuellement l'objet d'un essai clinique de phase II dans les cancers épidermoïdes de la tête et du cou porteurs de mutations de *HRAS*. Au congrès de l'AACR 2019 à Boston, des premiers résultats de l'essai indique que le tipifarnib permet une réponse partielle chez 10 patients sur 18 et une stabilisation de la maladie chez le reste des patients (<https://www.aacr.org/about-the-aacr/newsroom/news-releases/tipifarnib-shows-promising-clinical-activity-in-patients-with-hras-mutant-head-and-neck-cancer/>).

De plus, il est également à noter que la vaste majorité des essais cliniques évaluant l'efficacité des FTIs portent sur des patients ayant un cancer avancé voire métastatique. On peut supposer que chez ces patients l'hétérogénéité tumorale est vraisemblablement plus importante, ce qui pourrait limiter l'efficacité des FTIs.

Enfin, comme exposé précédemment certaines tumeurs (tumeurs mammaires et hématologiques) semblent être plus dépendantes de la fonction de protéines farnésylées pour leur survie que d'autres tumeurs. Ainsi, l'identification des cibles des FTIs pour chaque type tumoral est primordiale afin de sélectionner les patients les plus à même de répondre à ces traitements. Parmi ces cibles cliniquement exploitables, en plus de *HRAS* et *RHOB*, figure la protéine *RHEB*, un homologue de *RAS* enrichi dans le cerveau, qui est, comme *HRAS*, exclusivement farnésylée (761). Cette protéine est impliquée dans l'activation de la voie *mTOR* (762,763) et est souvent surexprimée dans les cellules tumorales (761,764). De plus, l'efficacité des FTIs dans l'inhibition de la croissance tumorale est dépendante de *RHEB* (764,765).

Il semble ainsi essentiel d'identifier des marqueurs prédictifs de réponse aux FTIs, comme cela a été initié dans quelques études dans des tumeurs hématologiques (766–768) et dans des tumeurs solides (769,770).

OBJECTIFS

L'arrivée des EGFR-TKIs dans la stratégie thérapeutique des cancers bronchiques porteurs de mutations de l'*EGFR* a permis une amélioration considérable de la survie sans progression des patients. Malheureusement, des mécanismes de résistance limitent la durée de cette réponse thérapeutique et entraînent une rechute tumorale chez la quasi-totalité des patients.

A ce jour, les mécanismes de résistance aux EGFR-TKIs dans les cancers bronchiques, très étudiés, sont catégorisés en trois grands types de mécanismes qui sont : les altérations de l'*EGFR*, l'activation de voies de signalisation compensatoires *via* notamment l'acquisition de nouvelles mutations et les modifications du phénotype cellulaire.

Afin de contrer ces résistances, de nouvelles générations d'EGFR-TKIs ou bien l'association d'un EGFR-TKI avec d'autres inhibiteurs (inhibiteurs de MET, de HER2, de MEK, de BRAF, d'IGFR1, etc...) sont maintenant indiquées ou font l'objet d'essais cliniques.

Malheureusement, ces approches, bien qu'efficaces dans un premier temps, se heurtent également à de nouveaux mécanismes de résistance. L'historique du développement pharmaceutique des EGFR-TKIs en est un des meilleurs exemples. En effet, la mutation de résistance EGFR^{T790M} a motivé le développement des EGFR-TKIs de deuxième puis de troisième générations qui eux-mêmes sont sujets à de nouvelles mutations de résistance comme la mutation EGFR^{C797S}, et font l'objet de développement de nouveaux inhibiteurs (291,771).

Ceci souligne la nécessité de s'intéresser aux mécanismes de développement de ces résistances et notamment à la phase de dormance/tolérance des cellules (DTC, Drug Tolerant Cells). Ces DTC résistent au traitement par EGFR-TKIs en entrant dans un état de pseudo-dormance, puis elles acquièrent des mécanismes de résistance génétiques leur conférant un avantage prolifératif occasionnant la reprise tumorale. Néanmoins, cet état de tolérance n'a été étudié majoritairement que sur un modèle cellulaire, la lignée PC9, et n'a pas été mis en évidence *in vivo*.

Ainsi, le premier objectif de ma thèse a été d'élargir et d'approfondir la caractérisation de cet état de transition qui mène aux résistances aux EGFR-TKIs dans les cancers bronchiques. Ceci dans un premier temps *in vitro* sur un panel de plusieurs lignées tumorales bronchiques porteuses de mutations activatrices de l'*EGFR* puis aussi sur un modèle murin de xénogreffes dérivées de patients atteints de CBNPC et porteurs de mutations activatrices de l'*EGFR*. La perspective de ce travail étant d'identifier de nouvelles cibles ou stratégies thérapeutiques permettant d'éradiquer ce réservoir de cellules à l'origine de la rechute tumorale.

La caractérisation de cet état de tolérance a notamment révélé l'implication des processus de contractilité cellulaire dans la survie des DTC sous EGFR-TKIs. Or, la GTPase RhoB est impliquée dans la régulation du cytosquelette d'actine mais aussi dans la réponse thérapeutique aux EGFR-TKIs chez les patients atteints de CBNPC porteurs de mutations activatrices de l'*EGFR* comme l'ont montré les travaux de l'équipe (266,645).

Ainsi, le deuxième objectif de ma thèse a été d'investiguer le rôle de RhoB dans la résistance adaptative aux EGFR-TKIs dans les cancers bronchiques et notamment dans la survie des cellules tolérantes aux EGFR-TKIs.

Enfin, la protéine RhoB étant régulée par son état de prénylation et notamment sa farnésylation, le troisième objectif de ma thèse a été de tester l'effet de l'association d'un inhibiteur de farnéyltransférase avec un EGFR-TKI sur la survie et l'émergence de résistances *in vitro* et *in vivo*. Ceci dans la perspective de proposer cette stratégie thérapeutique en clinique permettant d'éviter les rechutes tumorales sous EGFR-TKIs.

RESULTATS

Les résultats obtenus au cours du doctorat ainsi que les matériels et méthodes utilisés seront présentés ci-dessous sous la forme d'un article scientifique.

The farnesyltransferase inhibitor tipifarnib prevents EGFR-TKI resistance in lung cancer

Sarah Figarol^{1,2}, Célia Delahaye¹, Rémi Gence¹, Raghda Asslan¹, Sandra Pagano^{1,2}, Claudine Tardy¹, Jacques Colinge⁵, Simon Cabello-Aguilar⁵, Isabelle Lajoie-Mazenc^{1,2}, Estelle Clermont^{1,3}, Anne Casanova³, Anne Pradines^{1,3}, Julien Mazières^{1,2,4}, Olivier Calvayrac¹, Gilles Favre^{1,2,3}.

1 Cancer Research Center of Toulouse, INSERM U1037 CNRS ERL5294 UPS, Toulouse, France;

2 University Paul Sabatier, Toulouse, France ;

3 Institut Claudius Regaud, Institut Universitaire du Cancer de Toulouse-OncoPole, Laboratory of Medical Biology and Oncogenetics, Toulouse, France ;

4 CHU Toulouse, Toulouse, France

5 Cancer Research Institute of Montpellier, INSERM U1194, Montpellier, France

ABSTRACT

Lung cancer patients with EGFR activating mutation benefit from the development of EGFR tyrosine kinase inhibitors (EGFR-TKI). However, the effectiveness of these therapies, although high, is only transitory, and patients inevitably develop resistances. Previous studies suggest that these resistances could arise from a population of drug-tolerant cells (or DTC) which enter a pseudo-dormant state in response to treatment before developing resistance mechanisms. This state of tolerance has been studied *in vitro* mainly on only one cell line and remains poorly characterized. In this study, we report a step-by-step phenotypic and molecular characterization of the different phases that occur during the acquisition of resistances using a panel of EGFR-mutated lung cancer cell lines and a Patient-Derived Xenograft (PDX) model. Our results reveal that actin remodelling through Rho-GTPase activation is a common feature of drug tolerance in highly divergent models of acquired resistance, and could be targeted by the clinically available farnesyltransferase inhibitors tipifarnib. These results reinforce our previous observations on the role of the RAS-related GTPase RHOB in EGFR-TKI resistance in lung cancer patients, and offer a rationale for the use of tipifarnib to prevent the emergence of EGFR-TKI. Moreover, we provide an extensive characterization of a new non-conventional therapy-induced

senescent (TIS)-like phenotype that predisposes to epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) responsible for the acquisition of aggressive properties of resistant cells. Altogether, our results should help to better understand the drug tolerant state and propose a new therapeutic strategy to prevent the emergence resistances to EGFR-TKI in lung cancer.

INTRODUCTION

Epidermal growth factor receptor-tyrosine kinase inhibitors (EGFR-TKI) are effective therapies for advanced non-small cells lung cancer (NSCLC) patients bearing EGFR-activating mutations, but are not curative due to the invariable apparition of resistances. The mechanisms of acquired resistance have been well described in patients (mostly secondary mutations on EGFR such as T790M¹ or C797X^{1,2} depending on the TKI, MET³ or HER2⁴ amplifications, epithelial to mesenchymal transition (EMT)⁵, or transformation into small cell lung cancer SCLC¹, among others⁶). But the origin of these resistances (*i.e.* whether they are pre-existing at undetectable levels or generated in response to treatment) is still being debated. *In vitro* findings have revealed the existence of a small proportion of cells that could survive lethal doses of EGFR-TKI by entering a slow-to-non cycling state (referred to as Drug-Tolerant Persisters, DTP⁷, by analogy to the mechanisms of bacterial resistance to antibiotics) before developing genetic resistance mechanisms (*e.g.* mutations or amplifications) that allow them to resume proliferation despite the presence of the drug⁸⁻¹⁰. To date, EGFR-TKI-derived drug-tolerant “dormant” cells have been characterized almost exclusively in the PC9 cell line^{7,8,10,11} and little information exists in other *in vitro* models or *in vivo*. Paradoxically, PC9 cell line has been shown to harbor a pre-existing resistant EGFR^{T790M} sub-clone that could be selected and amplified early during EGFR-TKI treatment, which may have biased the characterization of the drug-tolerant state. Moreover, “dormancy” of Drug-tolerant cells (DTC) is often described as a quiescence process with a G0/G1 cell cycle arrest⁷, although the mechanisms by which DTC can stop cell cycle and resume proliferation remain elusive.

Our study provides a step-by-step phenotypic and molecular characterization of the different phases that occur during the acquisition of resistances using genetically homogeneous clonal cell populations that have been generated from a panel of EGFR-mutated lung cancer cell lines in order to limit/avoid the presence of pre-existing resistant cells. This characterization led us to identify involvement of contractility process in drug tolerance under EGFR-TKI. Consistent with our previous work on the role of the RAS-related GTPase RHOB in EGFR-TKI resistance in lung cancer patients¹² and role of Rho GTPases in actin cytoskeleton remodeling¹³, we show that RHOB plays a crucial role in DTC survival. Therefore, as RHOB activity is regulated by farnesylation, we propose combination of a clinically available farnesyltransferase inhibitor, tipifarnib, with EGFR-TKI to prevent the emergence of resistance to EGFR-TKIs in lung tumors harboring EGFR activating mutations.

RESULTS

Drug tolerance is a dynamic rather than a “dormant” state

DTC are often defined as “dormant” cancer cells that have entered a slow-to-non cycling state to survive lethal doses of anti-cancer drug, however, the molecular mechanisms of cell cycle arrest and of the proliferation relapse have not yet been fully addressed. To a more extensive characterization of the “dormancy” state we first performed real-time monitoring of cell cycle dynamics at the single-cell level following erlotinib or osimertinib treatment using the FUCCI system¹⁴ in a panel of EGFR-mutated lung adenocarcinoma cell lines, including the extensively studied PC9 cell line^{7,9,8,10,11} but also other models that have been less (HCC4006, HCC827) or not (H3255, HCC2935) described for their capacity to generate DTC in response to lethal doses of EGFR-TKI. We observed a gradual cell accumulation in G1 phase within the first 24 to 48 hours of erlotinib or osimertinib treatment (Fig. 1A, Supp Fig. 1A, videos) together with a common pattern of RB (Retinoblastoma) dephosphorylation and accumulation of p27^{Kip1} (Supp Fig. 1B, data not shown). ShRNA knockdown of p27^{Kip1} in PC9 cells cause an increased phosphorylation of RB in basal condition and partially reverted osimertinib-induced RB dephosphorylation, suggesting that p27^{Kip1} was involved, at least in part, in RB regulation during EGFR-TKI treatment (Supp Fig. 1C). Interestingly, RB dephosphorylation and p27^{Kip1} overexpression were also observed in other oncogenic models treated with tyrosine kinase inhibitors such as the ALK-translocated lung cancer cell line H3122 treated with crizotinib (Supp Fig. 1D) or the BRAF-mutated cell lines A375 and WM-266-4 treated with vemurafenib (Supp Fig. 1E), suggesting that this process is commonly involved during MAPK pathway inhibition.

Immediately after this period of G1 accumulation, cells started to die, massively and quickly (between 3 to 5 days of treatment) for the PC9 cells, more gradually in the other models while a fraction of cells survived and remained in G1 phase for longer periods (up to several weeks) and progressively died (Fig. 1A, Supp Fig. 1A, videos). During this drug-tolerant “dormant” state, we observed that some cells escaped from G1 soon after the beginning of the treatment and progressed through S/G2 phase (Fig. 1A, Supp Fig 1A, videos). As these “early escapers” could result from the selection of a pre-existing primary resistant cells as previously reported (*e.g.* EGFR^{T790M} in PC9⁸, or MET amplification in HCC827¹⁵), we sub-cloned the different cell lines to reduce/avoid the drug selection of already resistant cells to specially focus on the emergence of secondary resistances from DTC. The clonal populations displayed a delayed relapse compared to their parental counterparts, with a longer drug-tolerant phase and a more stable G1 arrest (Fig. 1A, Supp Fig. 1A), consistent with a potential elimination of pre-existing resistant cells. However, few early escapers could still be observed in the sub-clones, especially in the PC9 cell line, suggesting that the capacity of cells to escape G1 arrest may not be due

to an already established resistance mechanism. The hypothesis of a lack of primary resistance mechanism of these cells was further supported by the fact that the majority of early escapers did not give rise to a resistant proliferative clone (referred to as “RPC”). Indeed, the cell fate of these escapers was highly heterogeneous intra and inter cell lines. Asymmetrical divisions were observed, where one daughter cell survived whereas the other died (Supp Fig. 2A), consistent with a potential acquisition of stem-like properties as previously reported⁷. Some other escapers showed one or several rounds of endoreplication¹⁶, revealed by an S/G2 to G1 transition without mitosis and increased nuclear size (Supp Fig. 2B). Although most endoreplicating cells ultimately died, probably due to a mitotic catastrophe¹⁷, some others continued to divide resulting in a subpopulation of polyploid cells in resistant clones (Supp Fig 2C). Interestingly, HCC2935 and H3255 cell lines were unable to develop resistant proliferative clones (Fig. 1A, sup Fig. 2D), however DTC could still be observed after several weeks of treatment (Supp Fig. 2D). This suggests that these cell lines lacked a molecular mechanism needed to fully evade the drug-tolerant state under high dose of EGFR-TKI, even though these cells could still resume proliferation after drug withdrawal (Supp Fig. 2E).

After this period of balance between cell death and re-cycling corresponding to the drug-tolerant state, some escapers progressively acquired fully proliferating capacities, with increased migratory properties, and cell shape modifications consistent with an Epithelial-to-Mesenchymal (EMT) process (videos).

Altogether, our data indicate that the establishment of an adaptive resistance mechanism through a drug-tolerant state is a dynamic and progressive rather than a “stop-and-go” process, and is highly variable intra and inter cell lines, even in genetically homogeneous cellular models.

Drug-tolerant cells display a highly labile senescent-like phenotype that predisposes to EMT

We observed that DTC displayed enlarged and flattened morphology after only few days of treatment, that was especially obvious for PC9, H3255 and H2935 cells (Supp Fig. 3, videos). As these morphological changes may be associated with a senescence process¹⁸, we assessed several senescence features in DTC. We observed a potent SA-beta-galactosidase (SA-βGal) activity in almost all erlotinib- or osimertinib-induced DTC from HCC4006sc, H3255 and HCC2935 cells but not in PC9sc nor HCC827sc cells (Fig. 1B, Supp Fig. 4A and 4B). Conversely, Senescence-Associated Secretory Phenotype (SASP) was detected in PC9-derived DTC but not in HCC4006sc nor H3255, although IL6 was secreted by HCC4006 resistant proliferative cells (Fig. 1B, Supp Fig. 5A). Other senescent-associated markers such as Senescence-Associated Heterochromatin Foci (SAHF) were not detected in any cellular

models when compared to a positive control of oncogene-induced senescence (Supp Fig. 5B and data not shown). Moreover, we noticed that this enlarged and flattened morphology persisted in PC9-derived G1-escapers (Supp Fig. 1, videos) and also in fully resistant proliferative clones (Supp Fig. 3B, videos), showing that these morphological rearrangements, although considered as a hallmark of senescence, were not restricted to non-proliferating cells but could be maintained in proliferating cells.

SA- β Gal activity was also detected *in vivo* in a PDX model of EGFR^{L858R/T790M} lung adenocarcinoma treated with osimertinib for 7 weeks with p-EGFR inhibition, RB dephosphorylation and p27^{Kip1} overexpression consistent with a “drug-tolerant” phase (Fig. 1C-E). We noticed also, in the tumors that have relapsed, high SA- β Gal staining, low RB phosphorylation and high levels of p27^{Kip1} were still observed, that occurred concomitantly with EGFR reactivation (Fig. 1E). These data suggest either that senescent-like non-proliferative DTC remained after relapse, or alternatively cells that have resumed proliferation may still harbor senescent-like features.

Our results obtained from *in vitro* and *in vivo* models suggest that drug-tolerant cells may have engaged a therapy-induced senescent (TIS)-like process in response to EGFR-TKI, driven by p27^{Kip1}/RB pathway, however senescent properties of these cell seemed to be partial and superficial rather than a deep senescence. These data prompted us to determine whether senescent-like cells can be the reservoir of resistant cells. We first tested senescence reversibility using HCC4006sc cell line that displayed for most of them a SA- β Gal staining (Fig 1B, Supp Fig. 4B). We assessed the capacity of SA- β Gal-positive DTC cells to resume proliferation after EGFR-TKI withdrawal. We observed a rapid re-proliferation of the large majority of cells soon after drug removal, together with a drastic morphological rearrangement. The flattened cells became elongated and highly motile, with an aggressive behavior (Fig. 1H, video). Mitotic cell still displayed SA- β Gal staining 24 hours and 48 hours after drug removal, confirming that proliferating cells had emerged from previously senescent-like cells and also emphasizing that senescence features could still be observed after early senescence escape (Fig. 1I). Cell elongation and increased motility suggested that cells that have escaped from this senescent-like state may have entered an Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT) process. Indeed, we observed that the mesenchymal marker N-Cadherin was induced 72 hours after drug removal, together with the reactivation of EGFR, phosphorylation of RB and decreased levels of p27^{Kip1}, although the levels of epithelial marker E-Cadherin remained unchanged (Fig. 1J). We also observed that the EMT transcription factors (EMT-TF) SNAIL and SLUG were strongly inhibited in DTC, while SNAIL, but not SLUG, was re-expressed after drug removal. Moreover, the mesenchymal-associated cytoskeletal protein Vimentin was overexpressed during the DTC state but was inhibited after drug withdrawal.

Altogether, our data suggest that senescent-like DTC can resume proliferation after drug removal by acquiring mesenchymal properties with increased migratory capacities.

Moreover, in RPC from PC9sc and HCC4006sc cells under erlotinib treatment SA-βGal staining has disappeared (Fig. 1B), suggesting that senescence may be also reversible upon EGFR-TKI treatment. To decipher the involved molecular mechanisms, we aimed to determine the transcriptomic changes that occur during the different phases of the establishment of an adaptive response to EGFR-TKI.

Cytoskeletal reorganization is a common feature of EGFR-TKI-induced drug-tolerance

We performed RNA-seq analysis at different time-points of erlotinib treatment using the three cellular models that displayed highly divergent behavior upon EGFR-TKI (PC9sc, HCC4006sc and H3255) at early time (24 hours), during the drug-tolerant state (defined as the time of best response i.e. 7 days for PC9sc and 21 days for HCC4006sc and H3255), at the transition between the DTC state and the emergence of RPC for PC9 cells (21 days referred to as “late DTC”) and after relapse for PC9 and HCC4006 (75 days for PC9 and 4 months for HCCC4006) (Fig. 2A).

The global transcriptomic changes induced by erlotinib at 1 μM appeared to be strongly divergent between the 3 cell lines (Fig. 2B) as determined by principal component analysis (PCA) together with a strong decrease in cell-cycle-associated signatures at 24 hours and at the DTC state as revealed by Gene set enrichment analysis (GSEA) (Fig. 2C). We first observed that the drug-tolerant state was not associated with senescence-related signatures (Supp Fig. 6A and 6B), which confirmed that senescence features observed in these models were not associated with a conventional senescent phenotype. This discrepancy from a canonical senescent process was further supported by the fact that senolytic drugs, such as venetoclax which is a BCL-2 specific inhibitor and Bay 11-7802 which is a NF-κB-mediated SASP inhibitor, did not sensitize EGFR-TKI-induced drug-tolerant cells and did not prevent the emergence of resistant proliferative clones (Supp Fig. 6C), suggesting that inhibition of BCL-2 or NF-κB signaling is not sufficient to eradicate HCC4006 pseudo-senescent cells under erlotinib treatment ¹⁹.

Moreover, gene signature for Epithelial-to-Mesenchymal Transition (*HALLMARK_EMT*), a commonly accepted resistance mechanism to EGFR-TKI, was not associated with the drug-tolerant state of HCC4006sc cells, but it was highly upregulated in fully-resistant proliferative clones in this model (NES= 2.21, FDRq < 0.0001) (Fig. 2C and 2D). Similarly, EMT signature was also not associated with the drug-tolerant state of H3255 and was even downregulated, although this inhibition did not reach significance (Fig. 2C and 2D). These results contrast from the PC9sc model that showed an activation of the EMT signature as early as 7 days of treatment and was maintained during all the process of the

acquisition of a full resistance (Fig. 2C and 2D), as previously reported for parental PC9 cell line^{8,11}. We noticed that the large majority of erlotinib-induced EMT genes was implicated in extracellular matrix organization (Supp Fig. 7 and 8). However, this could have been biased by the fact that “HALLMARK_EMT” signature itself is predominantly composed by genes involved in this biological function (Supp Fig. 9), so we deeper explored the expression of several classic EMT biomarkers. N-Cadherin was overexpressed in RPC of HCC4006sc (Fig 2E) as after drug removal (Fig 1J) but not at the DTC state, whereas its expression was null in PC9sc at any time (Fig. 2E, Supp. Fig. 10B). Moreover, several EMT-related transcription factors (EMT-TF, *e.g.* Snail or Slug) as well as several stemness-related markers such as CD133 or SOX2 were neither nor modulated or inhibited at the DTC state in the majority of the cell lines (Supp Fig. 11A), but were overexpressed at relapse (Fig. 2E, Supp Fig. 10B and 10C). Altogether, these data suggest that canonical EMT is not a universal “tolerance” process but should rather be associated with the relapse. The expression of Vimentin was increased during the drug-tolerant phase in every tested cell lines excepted PC9, and this expression was maintained in HCC4006sc resistant proliferative clones (Fig. 2E, sup fig. 10B and 10C). This suggests that cytoskeletal reorganization could be an early event of erlotinib-induced EMT, at least in HCC4006 cell line, and may be maintained during relapse in presence of the treatment.

To further characterize the molecular changes associated with this particular “pre-EMT” phenotype in DTC, we performed a deeper gene ontology (GO) analysis which revealed that genes signatures related to cell contractility were the only signatures shared by the three cellular models (*GO_Contractile Fiber*, *GO_Myofibril Assembly*, *GO_Muscle Contraction*) (Fig. 2F). *MYOZ1*, *MYL9*, *CRYAB* or *ANKRD1* were among the most commonly upregulated genes present in these signatures (Supp Fig. 10D), and this upregulation seemed to be specific to the drug-tolerant state as it was reverted in fully resistant proliferative clones (Supp Fig. 10D). Consistent with these results, F-actin staining showed a highly reorganized cytoskeleton with the presence of actin stress fibers and lamellipodia in the vast majority of DTC in all cell lines (Fig. 2H) together with an increase of total and phosphorylated Myosin Light Chain 2 (MLC2, Supp Fig. 10E). We explored these contractile signatures on data recently published and generated on *in vivo* single-cell RNAseq (scRNAseq) performed in a tumor dormancy developed by Pasi Janne’s and collaborators¹¹, in which EGFR-mutated lung tumor cells displayed a senescent-like phenotype in response to a combination of osimertinib and trametinib (OT) as we observed herein with erlotinib or osimertinib. The population OT-treated cells (Fig. 2I, Supp Fig. 11A) appeared to be strongly associated with contractile signatures (Fig. 2J), suggesting that cell contractility was also associated with drug-tolerance *in vivo*.

Altogether, our data show that extracellular matrix reorganization and actin remodeling represent unique common features in the establishment of drug tolerant state, and seem to precede a canonical EMT process.

RhoB inhibition inhibits stress fiber formation and prevents the emergence of resistance to EGFR-TKI

Actin polymerization is a tightly regulated process orchestrated by GTPases¹³. Given our knowledge on the role of RHOB in resistance to targeted therapy^{20,12}, we assessed whether this GTPase could be implicated in the DTC state. We first observed that erlotinib- or osimertinib-treatment strongly increased RHOB protein levels in all the cell lines tested after 4-24 hours depending on the cell line (Supp Fig. 12A). This overexpression was maintained during the drug-tolerant state except for PC9 cells for which RHOB overexpression in DTC was restricted to osimertinib treatment (Fig. 3A, Supp Fig 12C). RHOB activity was also increased in DTC as determined by immunoprecipitation using a Rho-GTP specific antibody (Supp Fig. 12B), while protein expression and activity of the closely related GTPases RHOA and RHOC were decreased (Supp Fig. 12B and 12C). RHOB protein expression was also significantly induced *in vivo* during the drug tolerant state and at relapse in our PDX model of EGFR^{L858R/T790M} lung adenocarcinoma treated with osimertinib, whereas RHOC and RHOA were increased only at relapse. These data suggest that RHOB, but not RHOA nor RHOC, may participate to the establishment of the drug-tolerant state. Using available *in vivo* scRNAseq analysis¹¹, we observed that RHOB was among the most overexpressed genes in OT-treated tumors, together with RHOE (RND3), another closely related GTPase implicated in the regulation of actin stress fiber formation (Fig. 3D, supp Fig. 13A and 13B). Interestingly, transcription factor AP-1 (Activator Protein 1) family members JUN, JUNB, JUND, FOS, FOSB and ATF3 were also found within the 40 most OT-induced genes (Supp Fig. 13B). As we previously reported that c-Jun mediates RHOB overexpression in response to vemurafenib in BRAF-mutated melanoma²⁰ thus promoting drug resistance, we aimed to determine whether this transcription factor could also be implicated in RHOB regulation by EGFR-TKI in lung cancer cells. We observed that c-Jun was activated after 24-48 hours of erlotinib treatment (Supp Fig. 15A) and that siRNA-mediated c-Jun downregulation completely prevented RHOB induction by erlotinib (Supp Fig. 14B), strongly suggesting that the c-Jun/RHOB axis is a commonly activated pathway in response to MAPK inhibition in different oncogenic contexts. Strikingly, we found a strong association between AP-1 family members and expression of RHOB in human adenocarcinomas as revealed by a TCGA analysis on 512 tumor samples (Fig. 3E, Supp Fig. 14C), suggesting that AP-1 could also participate to RHOB regulation in lung cancer patients. This analysis also revealed a strong

negative correlation between RHOB expression and E2F target genes, which could suggest that RHOB could be preferentially expressed in low-proliferating tumors as it is the case during EGFR-TKI treatment. Indeed, treatment with CDK4/6 inhibitor palbociclib or high confluence, which both exert cell cycle arrest by activating RB, strongly increased RHOB expression (Supp Fig. 15B and 15C). Altogether, these data suggest that AP-1/RHOB pathway activation is a common response to cell cycle arrest in lung cancer cells.

We next aimed to determine the implication of the Rho-GTPases in EGFR-TKI-induced cytoskeletal reorganization and DTC survival. Treatment with the Rho-inhibitor Tat-C3 exoenzyme (Supp Fig. 16A) strongly decreased EGFR-TKI-induced stress fiber formation (Fig. 1F), and completely eradicated DTC population in all our cellular models (Fig. 1G). Similar results were obtained with RHOB knockdown, suggesting that this GTPase may be involved in both EGFR-TKI-induced stress fiber and DTC survival (Fig. 3F, Supp Fig. 16B).

The farnesyltransferase inhibitor tipifarnib prevents the emergence of resistances to TKI *in vitro*

RHOB has no clinically-compatible specific inhibitor, however its activity is dependent on its prenylation status (either farnesylated or geranylgeranylated) and thus can be targeted by farnesyltransferase inhibitors (FTi) or geranylgeranyl transferase inhibitors (GGTi) ²¹⁻²³. Therefore, we next determined *in vitro* the efficacy of FTi or GGTi in combination with erlotinib or osimertinib in several EGFR-mutated cell lines (PC9, HCC827 and HCC4006). Combination with GGTi 298 at 1 μ M did not prevent the emergence of resistant proliferative clones, whereas combination with FTi tipifarnib efficiently eliminated all drug tolerant cells when used at 1 μ M (Fig. 3I) but also at 0.1 μ M (Supp Fig. 17A and 17B), and fully prevented the emergence of resistant clones. Interestingly, similar results were observed in other oncogenic models such as ALK-translocated lung cancer cells (e.g. H3122) treated with alectinib or BRAF-mutated melanoma cells (A375) treated with vemurafenib (Supp Fig. 17C), suggesting that co-treatment with tipifarnib could interfere with other targeted therapies that target (RTK)-ERK pathway.

MATERIALS AND METHODS

Cell culture

The human NSCLC cell-lines HCC4006 (CRL-2871, EGFR del L747-E749, A750P), HCC827 (CRL-2868, EGFR del E749-A750), HCC2935 (CRL-2869, EGFR del E746-T751, S752I) and human melanoma cell-lines A375 (CRL-1619, BRAF V600E), WM266-4 (CRL-1676, BRAF V600E) were obtained from the American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA). The H3255 NSCLC cell line (EGFR L858R) were a kind gift from Helene Blons (APHP, Paris, France). PC9 NSCLC cell-line (EGFR del E746-A750) and H3122 NSCLC cell-line (EML4-ALK fusion) were a kind gift from Antonio Maraver (IRCM, Montpellier, France). For each cell-line subclones were generated by limiting dilution in order to reduce/avoid pre-existing resistant subpopulation that must likely coexist within our cell lines. Moreover, subcultures were conducted for a limited period of time in order to limit cell deviation.

NSCLC cell-lines were cultured in RPMI (Roswell Park Memorial Institute) 1640 medium and melanoma cell-lines were cultured in DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) medium containing 10% fetal bovine serum (FBS) and were maintained at 37°C in a humidified chamber containing 5% CO₂. Cell lines were authenticated and tested for mycoplasma contamination within the experimental time frame.

SiRNA targeting RHOB

RNA interference of EGFR-mutated cell-lines was achieved by transfection of small interfering RNA (siRNA) against RHOB: si#1, 5'-GUCCAAGAAACUGAUGUUA-3', and si#2, 5'-GCUAAGAUGGUGUUAUUUA-3', or control (siNeg, SR-CL000-005; Eurogentec) using jetPRIME® (Polyplus transfection®), following the manufacturer's instructions.

SiRNA targeting c-Jun

RNA interference of EGFR-mutated cell-lines was achieved by transfection of small interfering RNA (siRNA) SMARTpool against c-Jun: si#1, 5'-UGGAAACGACCUUCAUGA-3', si#2, 5'-UAACGCAGCAGUUGCAAAC-3', si#3, 5'-GAGCGGACCUUAUGGCUAC-3' and si#4, 5'-AAGUCAUGAACCACGUUAA-3' (Thermo Scientific) or control (siNeg, SR-CL000-005; Eurogentec) using Oligofectamine™ (Thermo Fisher Scientific), following the manufacturer's instructions.

ShRNA targeting p27 and p57

EGFR-mutated cell-lines were transduced with a lentiviral pTRIP vector coding sh RNA against human p27 (nm-004064-TRCN0000009856) or human p57 (nm-000076-TRCN-0000237878).

Inhibitors

Target	Drug	Provider/Supplier/Synthesis	Reference	Concentrations used
EGFR	Erlotinib (OSI-744, CP-358774, NSC 718781)	LC Laboratories	E4997	1 μ M
EGFR	Osimertinib (AZD9291)	LC Laboratories	0-7200	1 μ M
Farnésyl-transférase	Tipifarnib (R115777, IND 58359)	Selleckchem	S1453	1 μ M
Géranylgeranyl-transférase I	GGTI-298	Selleckchem	S7466	1 μ M
RhoA,B,C	TAT-C3 or TAT- β Gal	C3 exoenzyme or β -galactosidase coupled to permeant peptide TAT (1 or 10 μ g/ml) were produced and purified in our laboratory using an Akta purifier (GE Healthcare) as previously described ²⁴ . TAT- β Gal is used as control of TAT effect.	2 à 5 μ g/ml	1 μ M
CDK4/6	Palbociclib (PD0332991)	Selleckchem	S1579	1 μ M
BCL2	Venetoclax (ABT-199, GDC-0199)	Abmole	AB-M2017	1 μ M
NF- κ B	Bay 11-7082	Sigma-Aldrich/Merck	B5556	1 μ M
BRAF V600	Vemurafenib (PLX4032)	Clinisciences	A304	5-20 μ M
ALK fusion	Crizotinib (PF-02341066°)	Selleckchem	S1068	2 μ M
ALK fusion	Alectinib (CH5424802)	Roche		2 μ M

Cell growth and viability assays

Each parental cells lines and subclones were transduced with a lentiviral vector designed by the vectorology platform of the Cancer Research Center of Toulouse (CRCT) (pLenti CMV GFP DEST (736-1), 9216bp) to obtain a constitutive expression of GFP protein. Then GFP-positives cells were selected by cell sorting by cytometry platform of the CRCT using FACS Melody (BD Biosciences). In cells treated or not with erlotinib or osimertinib and in combination or not with others inhibitors, fluorescence intensity in each well of 96-well plate was evaluated twice a week using Synergy™ 2 Multi-Detection Microplate Reader. Relative cell survival in the presence of inhibitors which is proportional to fluorescence intensity was normalized to untreated cells after background corrections.

Crystal violet staining

Untreated control cells and treated cells in culture plates were wash with PBS, fixed with paraformaldehyde 4 % solution for 10 min and stained with a solution containing PBS - 0.5% crystal violet (Sigma-Aldrich/Merck, ref: C3886) – 25% methanol for 10 minutes. After 3 washes and drying, cell staining was imaged with a ChemiDoc™ MP Imaging system (Bio-Rad).

Nuclear staining

Cells were seeded in 12-well plate with 80.000 cells by well. 2 days after seeding, erlotinib 1 μ M treatment begins. At each time of treatment, 3 wells were incubated with NucBlue Live ReadyProbes™ (ThermoFisher Scientific, #R37605) according to manufacturer's instructions. 20 minutes after incubation, each well was imaged with Eclipse 90i microscope and Camera Control Unit DS-2 (Nikon). Nuclei quantification was performed with ImageJ software.

Western blot analysis

For *in vitro* experiments, untreated control cells and erlotinib- or osimertinib-treated cells were lysate with Tris-SDS 1% buffer complemented with proteases- and phosphatases-inhibitors in order to obtain protein lysates. For animal experiments, frozen tumors of control- or treated-mice were grind and lysate with Tris-SDS 1% buffer complemented with proteases- and phosphatases-inhibitors in order to obtain protein lysates. After sonication, protein content was quantified using Bradford method. Protein extracts were separated on SDS-PAGE and electrotransferred onto polyvinylidene difluoride membranes. Blots were probed with primary antibodies reported in following table:

Target	Provider	Reference
RhoB	Santa Cruz Biotechnology	Sc-180
RhoA	Santa Cruz Biotechnology	Sc-418
RhoC	Cell Signaling	#3430
P-ERK1/2 Thr202/Tyr204	Cell Signaling	#4377
ERK	Santa Cruz Biotechnology	Sc-93
p-EGFR Tyr1068	Cell Signaling	#2234
EGFR	Cell Signaling	#4267
Vimentin	Cell Signaling	#3932
E-cadherin	Cell Signaling	#3195
N-cadherin	Cell Signaling	#4061
SLUG	Cell Signaling	#9585
SNAIL	Cell Signaling	#3879
p-RB Ser807/811	Cell Signaling	#9308
RB	Cell Signaling	#9309
p-p27 Ser10	Abcam	Ab62364
p27	Cell Signaling	#3686
p53	Cell Signaling	#48818
p21	Cell Signaling	#2946
Cyclin D1	Cell Signaling	#2978
Cyclin E1	Cell Signaling	#20808
p-MLC2 Ser19	Cell Signaling	#3671
MLC2	Cell Signaling	#8505
CD133	Cell Signaling	#64326
SOX2	Cell Signaling	#3579
p-C-Jun Ser63	Cell Signaling	#9261
C-Jun	Cell Signaling	#9165

Detection was performed using peroxydase-conjugated secondary antibodies and chemiluminescence detection kit (Clarity™ Western ECL, Bio-Rad) with a ChemiDoc™ MP Imaging system (Bio-Rad). Quantifications were carried out for three independent experiments with ImageLab software (Bio-Rad) and normalized to actin.

Immunoprecipitation

Untreated control cells and erlotinib-treated cells were immunoprecipitated with a specific antibody for the GTP-bound active form of RHOA, RHOB and RHOC GTPases (RH12) designed in the laboratory^{25,26}. Then RHOA-, RHOB- and RHOC-active form expression was revealed by western blot.

Senescence-associated Beta-Galactosidase blue staining

Untreated control cells and erlotinib- or osimertinib-treated cells were stained using Senescence β -Galactosidase Staining Kit (Cell signaling #9860) according to manufacturer's protocol. After staining, cells were imaged with ZEISS Axio Vert.A1 microscope and analysed with ZEN software (ZEISS).

Fluorescence Activated Cell Sorting- Senescence-associated Beta-Galactosidase

Senescence-associated Beta-galactosidase labelling was performed as previously described²⁷. First, lysosomes were alkalinized by pre-treatment of the cells with 150µM chloroquine (Sigma-Aldrich/Merck, #C6628) for 2h in medium 37°C, 5% CO₂. Then 33 µL (for 35mm diameter dishes) of Beta-galactosidase substrate C12FDG (Invitrogen, #D2893) previously diluted 1/10 were added directly to the medium for 2 hours. After to washes with PBS, senescence-associated Beta-galactosidase positive cells related to C12FDG substrate cleaved by Beta-galactosidase enzyme were detected by flow cytometry at 488 nm. Data were analysed with Flowlogic software.

Senescence-associated Heterochromatin Foci staining

Untreated control cells and erlotinib-treated cells were first fixed with paraformaldehyde 3.7 % solution and, after 2 washes with PBS, stained using DAPI (4', 6-diamidino-2-phenylindole, dihydrochloride, ThermoFisherScientific, #D1306) 0.5 µM/ml in PBS for 5 minutes.

BJ V600E cells after senescence induction by doxycyclin 1 µg/ml treatment for 20 days serve as positive control.

Senescence-associated cytokine profiling

48h after last medium change, supernatants of untreated control cells and erlotinib- or osimertinib-treated cells were collected. Quantity of supernatant to analyse was adjusted between conditions according to protein content quantification evaluated using Bradford method. Supernatant cytokine profiling was then performed using Proteome Profiler Human Cytokine Array Kit (RnD Systems, #ARY005B) according to manufacturer's protocol. Detection was performed with a ChemiDoc™ MP Imaging system (Bio-Rad). Quantifications were made using ImageLab software (Bio-Rad) and normalized to references.

Phalloidin staining

Untreated control cells and erlotinib- or osimertinib-treated cells were first fixed with paraformaldehyde 4 % solution, permeabilized with a PBS-BSA 0.1 %- Triton X-100 0.5 % solution, blocked with a PBS-BSA 1 %- Triton X-100 0.1 % solution and stained using Alexa Fluor™ 594 phalloidin (ThermoFisher Scientific, #A12381) diluted 50 times in a PBS-BSA 0.1 %- Triton X-100 0.1 % solution. Then, nuclei were stained with DAPI (4', 6-diamidino-2-phenylindole, dihydrochloride,

ThermoFisherScientific, #D1306). Images were acquired with ZEISS Axio Vert.A1 microscope and analysed with ZEN software (ZEISS).

Cell cycle analysis

Cells were transduced with Incucyte® Cell Cycle Green/Red Lentivirus Reagent (EF1 α -Puro) (Sartorius, Cat. No. 4779) as recommended by the manufacturer. Untreated or erlotinib- or osimertinib-treated cells were imaged each hour thanks to Incucyte® S3 Live-Cell Analysis System (Sartorius). G1-phase, S/G2/M-phase and G1/S-phase cells were quantified thanks to Incucyte® S3 Live-Cell Analysis software (Sartorius).

RNA sequencing

RNA extraction from untreated control cells and erlotinib- or osimertinib-treated cells was performed using AllPrep DNA/RNA Mini kit (Qiagen, #80204) according to manufacturer's protocol.

RNA quality was assessed using Fragment Analyzer (Agilent technologies) and the RQN values were provided to confirm the integrity of total RNA. RNA concentration was determined by fluorescent method using Quant-iT™ RNA Assay Kit, Broad Range (ThermoFisher Scientific).

RNA samples were processed with Illumina TruSeq® Stranded mRNA Library Preparation Kit following the manufacturer's protocol. Library size and quality were confirmed on Fragment analyzer (Agilent Technologies). KAPA quantification kit for Illumina platforms (KAPA Biosystems, Roche) was used to quantify library by qPCR. Indexed libraries were pooled and sequenced on an Illumina NextSeq 550 (2x75 bp paired-end reads).

Reads were mapped and counted using the RNA-Seq by Expectation Maximization (RSEM) software v. 1.3 (with bowtie2-2.3.5.1) based on the human reference genome UCSC hg38²⁸. Differential expression was analysed with DESeq2²⁹.

Single cell RNA sequencing analysis

The single cell transcriptomic data was loaded from Kurppa et al. 11on GEO under accession number GSE131604. The data from the different conditions were pulled together to create a global counts matrix. A dimension reduction by principal component analysis (PCA), a t-SNE³⁰ projection and a k-means clustering were done using the clustering function of the SingleCellSignalR R package³¹. Two differential gene expression analysis were done using the cluster_analysis function of SingleCellSignalR using respectively the cluster vector from the clustering function cited above and a cluster vector created to correspond to the different conditions. The p-value threshold was set by default at 5%. A

pathway signature genes table was retrieved from Reactome and GO. The mean expression of the genes in each pathway was calculated in each cell to create a mean pathway expression matrix. Violin plots of the mean pathway expression were computed and displayed using the ggplot2 package. The heatmaps were generated using the ComplexHeatmap R package. The t-SNE expression plots were done using the expression_plot function of SingleCellSignalR. All the analysis were carried out with RStudio.

Patient-Derived Xenograft Mice Model

Patient tumor harboring EGFR^{T790M/L858R} mutation was obtained in collaboration with CNIO (Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas – Madrid – Spain) and previously characterized ³². Tumor sections (0.5 to 1 mm³) were inserted subcutaneously into the right flanks of 6 to 8-weeks-old, female NSG mice (Charles River Laboratories). When tumor size reached 1000 mm³, mice were randomized and the treatments started: osimertinib 10mg/kg or vehicle, once daily, by oral gavage. Tumors size was measured twice a week. Mice were humanely killed at indicated times and at the end of treatment and tumors harvested.

FIGURE LEGENDS

Fig.1: Drug tolerance is a dynamic rather than a “dormant” state with pseudo-senescence features.

(A) Cell cycle analysis of PC9, HCC4006, HCC2935 cells transduced with FUCCI system and treated with 1 μ M of erlotinib.

Top panels: Fraction of total cell number of PC9, HCC4006, HCC2935 parental cells or PC9 subclone 3, HCC4006 subclone 2, HCC2935 subclone 3 cells (100% refers to the number of plated cells).

Middle panels: Distribution of G1-phase (red), S/G2/M-phases (green) and G1/S-phases (yellow) PC9, HCC4006, HCC2935 parental or subclone cells. DTC state refers to the period between the onset of cell mortality and the recovery of cell proliferation.

Bottom panels: Representative phase contrast and fluorescence pictures of PC9, HCC4006, HCC2935 parental or subclone cells.

(B) Senescence-associated features of PC9, HCC4006 and H3255 cells under 1 μ M erlotinib treatment. Senescence-associated Beta-Galactosidase staining (SA- β Gal) of control (CT) or 1 μ M erlotinib treated (DTC state and RPC states) cells.

Senescence-associated Secretory Phenotype (SASP): Log₂ fold change of cytokine and chemokine secretion in supernatants of cells under 1 μ M erlotinib treatment normalized to control cells (CT).

(C) Tumor volume of EGFR^{L858R/T790M} PDX mice control (CT) or treated with osimertinib (10 mg/kg once daily) for 15 weeks.

(D) Senescence-associated Beta-Galactosidase staining (SA- β Gal) of tumor tissue from control- (CT) or treated-EGFR^{L858R/T790M} PDX mice for 7 or 15 weeks with osimertinib (10 mg/kg, once daily).

(E) Western blot analysis of EGFR and senescence-associated cell cycle regulators of tumors from EGFR^{L858R/T790M} PDX mice models control (CT) or treated 7 or 15 weeks with osimertinib (10 mg/kg, once daily).

(F) Effects of 1 μ M erlotinib treatment removal on cell survival in HCC4006 cells.

Top: Cell proliferation measured by fluorescence intensity of GFP-HCC4006 subclone 2 cells under treatment (21 days) or after drug withdrawal.

Bottom: Representative phase contrast images of HCC4006 subclone 2 cells treated until day 21 then 24 or 72 hours after drug withdrawal.

(G) Senescence-associated Beta-Galactosidase (SA- β Gal) staining of HCC4006 subclone 2 cells treated until DTC state (21 days) then 24 or 72 hours after drug withdrawal. 24 hours after drug withdrawal mitosis of SA- β Gal positives-cells are seen.

(H) Western blot analysis of EMT-related markers, phospho-EGFR and senescence-associated cell cycle regulators of HCC4006 subclone 2 cells treated until DTC state (21 days) and at 72 hours after drug withdrawal.

Fig.2: DTC state predisposes to EMT process and have a cytoskeletal reorganization.

- (A) Scheme of cell line treatment before RNA-Seq analysis.
- (B) Principal Component Analysis (PCA) of each replicate of RNA-Seq samples.
- (C) GSEA of hallmark gene sets comparing erlotinib-treated cells versus control cells. Only hallmark gene sets with NOM p-value <0.05 are shown.
- (D) Normalized enrichment scores (NES) and NOM p-value (NOM p-val) of EMT hallmark gene sets obtained thanks to GSEA.
- (E) Western blot analysis of EGFR downstream signalling and EMT markers in PC9 and HCC4006 treated cells.
- (F) Gene ontology analysis showing shared gene ontology signatures between RNA-Seq samples at DTC state. Only GO_Contractile Fiber, GO_Myofibril Assembly and GO_Muscle Contraction are shared between DTC state of the 3 cell-lines studied.
- (G) Normalized enrichment scores (NES) and NOM p-value (NOM p-val) obtained thanks to gene ontology analysis of cells treated with 1 μ M erlotinib until DTC state. Blue points refer to GO_Contractile fiber and red points to GO_Myofibril assembly.
- (H) Phalloidin staining of F-actin fiber cytoskeleton of untreated-cells or treated-cells with 1 μ M erlotinib for 10 days.
- (I) 2D projection of t-distributed stochastic neighbor embedding (t-sne) distribution of single-cell RNA-Seq of PC9-xenograft mice models treated with with DMSO or osimertinib (10 mg/kg once daily) +/- trametinib (1 mg/kg once daily) for 21 days (analysis of data provided from Kurppa et al.,2020). Cluster 1 is mainly composed of DMSO-treated cells, cluster 2 of osimertinib + trametinib-treated cells and cluster 3 of osimertinib-treated cells.
- (J) GSEA and Gene Ontology analysis of above single-cell RNA-Seq samples

Fig.3: RHOB is overexpressed and overactivated in DTC state and RHOB inhibition leads to prevent emergence of resistance.

- (A) Western blot analysis of senescence-associated cell cycle regulators and RHOB of PC9, HCC4006 and H3255 cells untreated-cells or treated with 1 μ M erlotinib or osimertinib.
- (B) Western blot analysis of RHOA, RHOB and RHOC of EGFR^{L858R/T790M} PDX mice tumors untreated control (CT) or treated 7 weeks or 15 weeks with osimertinib (daily, 10 mg/kg).
- (C) Quantification of RHO expression obtained in (B)

(D) 2D projection of t-distributed stochastic neighbor embedding (t-sne) distribution of single-cell RNA-Seq of PC9-xenograft mice tumors treated with osimertinib alone or in combination with a MEK inhibitor (data provided from Kurppa et al.,2020) showing single-cell level of expression of RHOB.

(E) GSEA of gene set corresponding to upregulated genes by osimertinib + MEK inhibitor treatment PC9-xenograft mice models (data provided from Kurppa et al.,2020) in a list of genes RHOB-correlated in 512 samples of human lung adenocarcinomas. NES: Normalized enrichment scores (NES); FDR: False Discovery Rate.

(F) Phalloidin staining of F-actin fiber cytoskeleton of PC9 treated cells with 1 μ M erlotinib alone for 10 days or with 1 μ M erlotinib alone then in combination with 2 μ g/ml TatC3 exoenzyme the last 2 days.

(G) Proliferation measured by fluorescence intensity of GFP-HCC4006 subclone 2 cells treated with 1 μ M erlotinib or with a combination of 1 μ M erlotinib with 2 μ g/ml TatC3 exoenzyme. 100% refers to fluorescence intensity of GFP-positives at treatment beginning.

(H) Phalloidin staining of F-actin fibers of PC9 cells transfected with siRNA control (siNeg) or siRNA against RHOB (siRHOB #1 and #2) treated with 1 μ M erlotinib for 10 days.

(I) Proliferation measured by fluorescence intensity of GFP-PC9, HCC4006 and HCC827 cells treated with 1 μ M erlotinib alone or in combination with 2 μ g/ml TatC3 exoenzyme, farnesyltransferase inhibitor (FTI, tipifarnib 1 μ M) or geranylgeranyltransferase inhibitor (GGTI 1 μ M). 100% refers to fluorescence intensity of GFP-positives cells at treatments beginning.

Supp Fig.1:

(A) Cell cycle analysis of PC9, HCC4006, HCC2935 cells transduced with FUCCI system and treated with 1 μ M of erlotinib or osimertinib.

Top panels: Fraction of total cell number of HCC4006, PC9, HCC2935 parental or HCC4006 subclone 2, PC9 subclone 3, HCC2935 subclone 3, HCC827 subclone 3 cells (100% refers to the number of plated cells).

Bottom panels: Distribution of G1-phase (red), S/G2/M-phases (green) and G1/S-phases (yellow) PC9, HCC4006, HCC2935 and HCC827 parental or subclone cells.

(B) Western blot analysis of EGFR downstream signalling and senescence-associated cell cycle regulators of PC9 subclone 3, HCC827 subclone 3, HCC4006 subclone 2, HCC2935 parental and H3255 parental untreated-cells or treated-cells with erlotinib 1 μ M for indicated durations.

(C) Western blot analysis of senescence-associated cell cycle regulators of PC9 cells transduced with shRNA control (CT) or shRNA against p27 or p57 proteins and untreated or treated with osimertinib 1 μ M for 24 hours.

(D) Western blot analysis of senescence-associated cell cycle regulators of H3122 untreated-cells or crizotinib 1 μ M-treated cells for 48 hours.

(E) Western blot analysis of senescence-associated cell cycle regulators of A375 and WM266-4 untreated-cells or vemurafenib 5 μ M-treated cells for 48 hours.

Supp Fig.2:

(A) Pictures of PC9 subclone 3 cells transduced with FUCCI system under osimertinib 1 μ M treatment showing asymmetric divisions with death of one daughter cell.

(B) Endoreplication process under EGFR-TKI treatment.

Top panel: Pictures of PC9 subclone 3 cells transduced with FUCCI system under osimertinib 1 μ M treatment showing endoreplication process.

Bottom panel: Quantification of nuclear size of a PC9 subclone 3 cell transduced with FUCCI system under osimertinib 1 μ M treatment.

(C) Analysis by FACS of DNA content, evaluated thanks to EdU labelling, in HCC4006 subclone 2 untreated-cells (CT) or erlotinib-resistant clones.

(D) Cell survival showed with log₁₀ quantification of nuclei number (labelled thanks to Nucblue® staining) according to treatment beginning (T₀) of PC9 subclone 3 cells, HCC2935 and H3255 parental cells under erlotinib 1 μ M treatment (left panel) or osimertinib 1 μ M treatment (right panel). 100 refers to total number of nuclei at treatment beginning.

(E) Cell survival showed with crystal violet staining of H3255 parental cells treated for 10 or 17 days with erlotinib or osimertinib 1 μ M and at 17 days after 7 days of drug withdrawal.

Supp Fig.3:

(A) Phase contrast pictures of PC9, HCC4006, HCC827, HCC2935 and H3255 untreated-cells (CT) or treated-cells with osimertinib 1 μ M until DTC state. Magnification: 20X.

(B) Phase contrast images of PC9 untreated-cells (CT) or treated-cells with osimertinib 1 μ M for 7 or 37 days.

Supp Fig.4:

(A) Senescence-associated Beta-Galactosidase (SA- β Gal) staining of HCC827 subclone 3, HCC2935 subclone 3 untreated-cells (CT) or treated-cells with erlotinib 1 μ M until DTC state and of H1975 untreated-cells (CT) or treated-cells with osimertinib 1 μ M until DTC state.

(B) Senescence-associated Beta-Galactosidase activity (SA-βGal) in PC9 subclone 3 and HCC4006 subclone 2 untreated-cells (CT) or erlotinib 1 μM-treated cells until DTC state assessed by FACS.

Supp Fig.5:

(A) Senescence-associated cytokines and chemokines secretion in supernatant of PC9 subclone 3, HCC4006 subclone 2 and H3255 parental untreated-cells (CT) or erlotinib 1 μM treated-cells until DTC state or RPC state. Histograms represent quantification normalized to internal references.

(B) Senescence-associated Heterochromatin Foci (SAHF) staining in HCC4006 subclone 2 untreated-cells (CT) or erlotinib 1 μM-treated cells until DTC state. BJ V600E cells under doxycyclin (1 μg/ml) treatment for 20 days is as positive control of SAHF.

(C) Western blot analysis of senescence-associated cell cycle regulators of PC9 subclone 3, HCC4006 subclone 2, H3255 parental untreated-cells or treated-cells with erlotinib or osimertinib 1 μM until DTC state.

Supp Fig.6:

(A) GSEA of 4 senescence hallmark gene sets in PC9 subclone 3, HCC4006 subclone 2 and H3255 parental cells under erlotinib treatment according to untreated cells.

NES: Normalized enrichment scores (NES); FDR: False Discovery Rate.

(B) Enrichment plot of 4 senescence hallmark gene sets summarized in (A).

(C) Cell survival of HCC4006 subclone 2 cells under erlotinib 1μM or osimertinib 1μM treatment alone or in combination with NF-κB inhibitor (Bay 11-7802, 1 μM) or with BCL-2 inhibitor (Venetoclax, 1 μM). 100% refers to total number of cell at treatment beginning.

Supp Fig.7:

Enrichment plot of EMT hallmark gene set obtained thanks to GSEA of PC9 subclone 3 cells under erlotinib treatment. NES: Normalized enrichment scores (NES); FDR: False Discovery Rate

List of the most positively-correlated gene of EMT hallmark gene set in PC9 subclone 3 cells under erlotinib treatment.

Reactome pathways analysis of gene involved in EMT hallmark gene set in PC9 subclone 3 cells under erlotinib treatment.

FDR: False Discovery Rate

Supp Fig.8:

Enrichment plot of EMT hallmark gene set obtained thanks to GSEA of HCC4006 subclone 2 cells and H3255 parental cells under erlotinib treatment.

NES: Normalized enrichment scores (NES); FDR: False Discovery Rate

List of the most positively-correlated gene of EMT hallmark gene set in HCC4006 subclone 2 cells and H3255 parental cells under erlotinib treatment.

Reactome pathways analysis of gene involved in EMT hallmark gene set in HCC4006 subclone 2 cells and H3255 parental cells under erlotinib treatment.

FDR: False Discovery Rate

Supp Fig.9:

List of 200 genes of EMT hallmark gene set in GSEA software.

Reactome pathways content of gene involved in EMT hallmark gene set.

Supp Fig.10:

(A) Western blot analysis of senescence-associated cell cycle regulators, EMT-related markers and stemness markers on PC9 subclone 3, HCC4006 subclone 2, HCC2935 subclone 3 and H3255 untreated-cells or treated-cells with erlotinib 1 μ M until DTC state.

(B) mRNA expression of VIM, CDH2, TWIST1 and ZEB1 genes implicated in EMT process in RNA-Seq samples.

(C) Western blot analysis phosphor-RB, SNAIL, SOX2, cyclin D1 and vimentin on PC9 subclone 3 and HCC4006 subclone 2 untreated-cells or treated-cells with erlotinib 1 μ M until DTC state or until RPC state.

(D) mRNA expression of MYOZ1 gene implicated in contractility process and ANKRD1 gene which is a YAP pathway target in RNA-Seq samples.

(E) Western blot analysis of senescence-associated cell cycle regulators and contractility markers on HCC4006 subclone 2 untreated-cells or treated-cells with erlotinib 1 μ M until DTC state (21 days) and 24 hours or 48 hours or 6 days after drug withdrawal.

Supp Fig.11:

(A) 2D projection of t-distributed stochastic neighbor embedding (t-sne) distribution of single-cell RNA-Seq of PC9-xenograft mice models treated with DMSO or with osimertinib alone or in combination with a MEK inhibitor (data provided from Kurppa et al.,2020).

(B) Index of correlation of GSEA hallmarks and gene ontology analysis signatures.

Supp Fig.12:

(A) Western blot analysis of RHOB and ERK of PC9, HCC4006, HCC827, HCC2935 and H3255 untreated-cells or treated-cells with erlotinib 1 μ M treatment for 1 to 72 hours.

(B) Western blot analysis of RHOB total form expression or active form expression after immunoprecipitation with RH12 antibody specific to GTP-bound form of RhoGTPases of PC9, HCC4006 or H3255 untreated-cells or treated-cells with erlotinib 1 μ M until DTC state. NR53 antibody serves as negative control of immunoprecipitation.

(C) Western blot analysis of RHOA, RHOB and RHOC expression of PC9, HCC827, HCC4006, HCC2935 and H3255 untreated-cells or treated-cells with erlotinib 1 μ M until DTC state.

Supp Fig.13:

(A) 2D projection of t-distributed stochastic neighbor embedding (t-sne) distribution of single-cell RNA-Seq of PC9-xenograft mice models (data provided from Kurppa et al.,2020) showing single-cell level of expression of RHOGTPases members in DMSO treatment condition (CT), in osimertinib treatment alone condition (Osi) and in osimertinib + trametinib treatment condition.

(B) List of gene the most induced in osimertinib + trametinib treatment condition according to DMSO treatment condition in single-cell RNA-Seq of PC9-xenograft mice models (data provided from Kurppa et al.,2020) with Log fold change (FC) and normalized enrichment score (NES) of each gene in osimertinib + trametinib treatment condition comparing to DMSO treatment. Highlighted genes in blue belong to AP-1 family and highlighted genes in orange belong to Rho family.

Supp Fig.14:

(A) Western blot analysis of c-JUN of HCC827, HCC4006 and H3255 untreated-cells or treated-cells with erlotinib 1 μ M for 1 to 72 hours.

(B) Western blot analysis of RHOB and c-JUN of HCC4006, HCC827, HCC2935, H3255 and PC9 cells transduced with siRNA control (siNeg) or siRNA against Jun and treated or not with erlotinib 100nM for 48 hours.

(C) Correlation coefficient of genes correlated to RHOB mRNA in lung adenocarcinomas.

Supp Fig.15:

(A) GSEA of E2F_TARGETS hallmark gene set in a list of genes RHOB-correlated in 512 samples of human lung adenocarcinomas.

NES: Normalized enrichment scores (NES); FDR: False Discovery Rate

(B) Western blot analysis of RHOB and p-RB expression of PC9, HCC4006, HCC827 and H3255 untreated-cells or treated-cells for 48 hours with CDK4/CDK6 inhibitor, palbociclib 1 μ M.

(C) Western blot analysis of RHOB and p-RB expression of PC9 and HCC4006 cells harboring 30% or 70% of confluency.

Supp Fig.16:

(A) Western blot analysis of RHOA and RHOB expression of HCC4006 subclone 2 and H3255 untreated-cells or treated-cells with erlotinib 1 μ M alone, TatC3 exoenzyme 5 μ g/ml alone or combination of erlotinib and TatC3 exoenzyme for 48 hours. Under TatC3 exoenzyme treatment, shift in RHOA and RHOB size is shown.

(B) Cell survival evaluated after nuclei staining of PC9, HCC827, HCC4006, HCC2935 and H3255 cells treated for 5 days with erlotinib 1 μ M alone or in combination with siRNA against RHOB or with TatC3 exoenzyme (inhibitor of RHOA, RHOB and RHOC, 5 μ g/ml). 100% refers to total number of nuclei at treatment beginning.

Supp Fig.17:

(A) Cell survival measured by fluorescence intensity of GFP-positives cells of PC9, HCC4006 and HCC827 cells under erlotinib 1 μ M treatment alone or in combination with farnesyltransferase inhibitor (FTI, tipifarnib 0.1 μ M). 100% refers to total number of cells at treatment beginning.

(B) Fluorescence images of PC9, HCC4006 and HCC827 cells under erlotinib 1 μ M or osimertinib 1 μ M treatment alone or in combination with farnesyltransferase inhibitor (FTI, tipifarnib 0.1 μ M) at respectively days 48, 42 and 32.

(C) Cell survival measured by fluorescence intensity of GFP-positives cells of H3122 and A375 cells under alectinib 2 μ M or vemurafenib 5 μ M treatment alone or in combination with farnesyltransferase inhibitor (FTI, tipifarnib 0.1 μ M).

FIGURES

Fig. 1

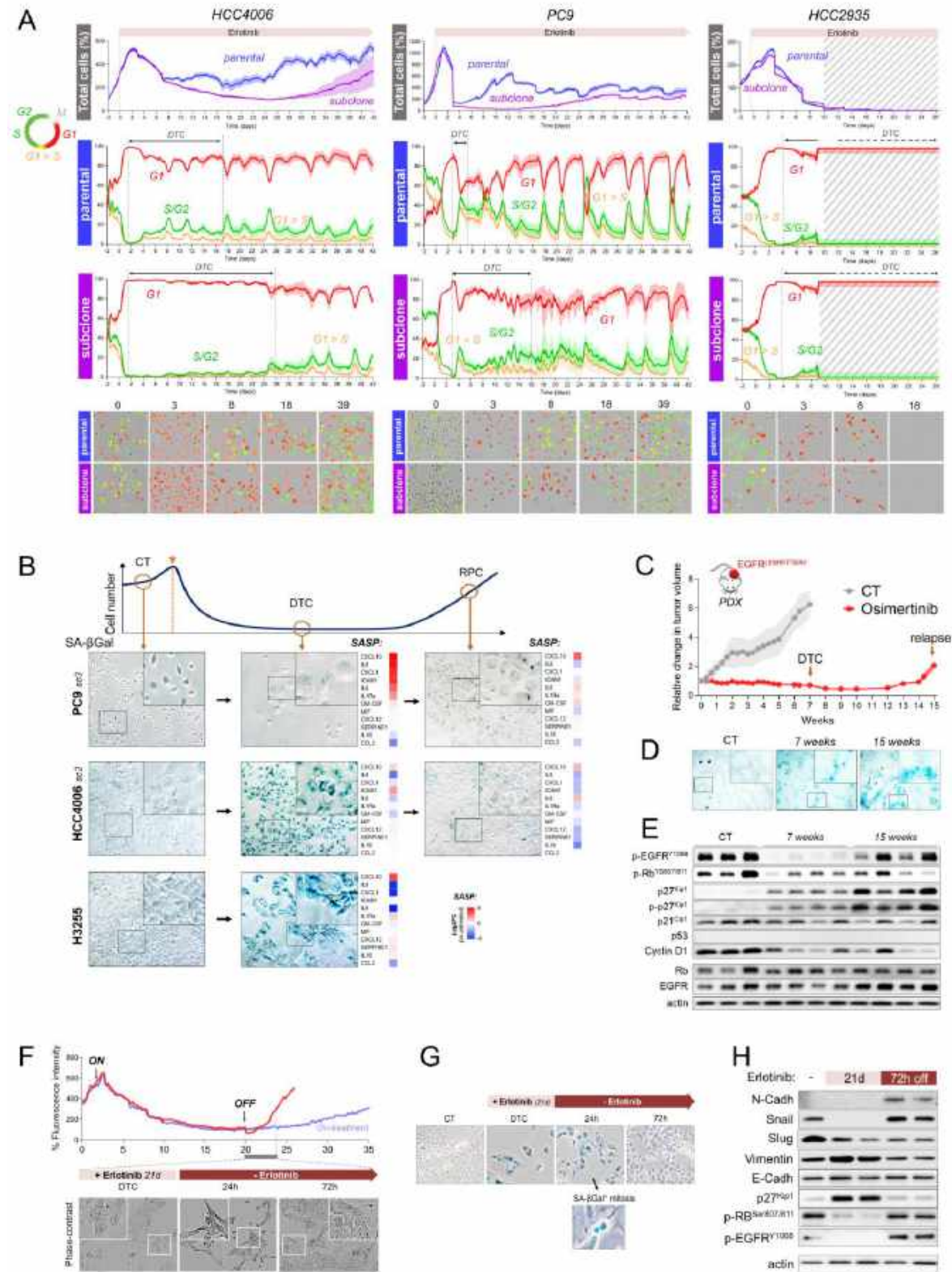


Fig. 2

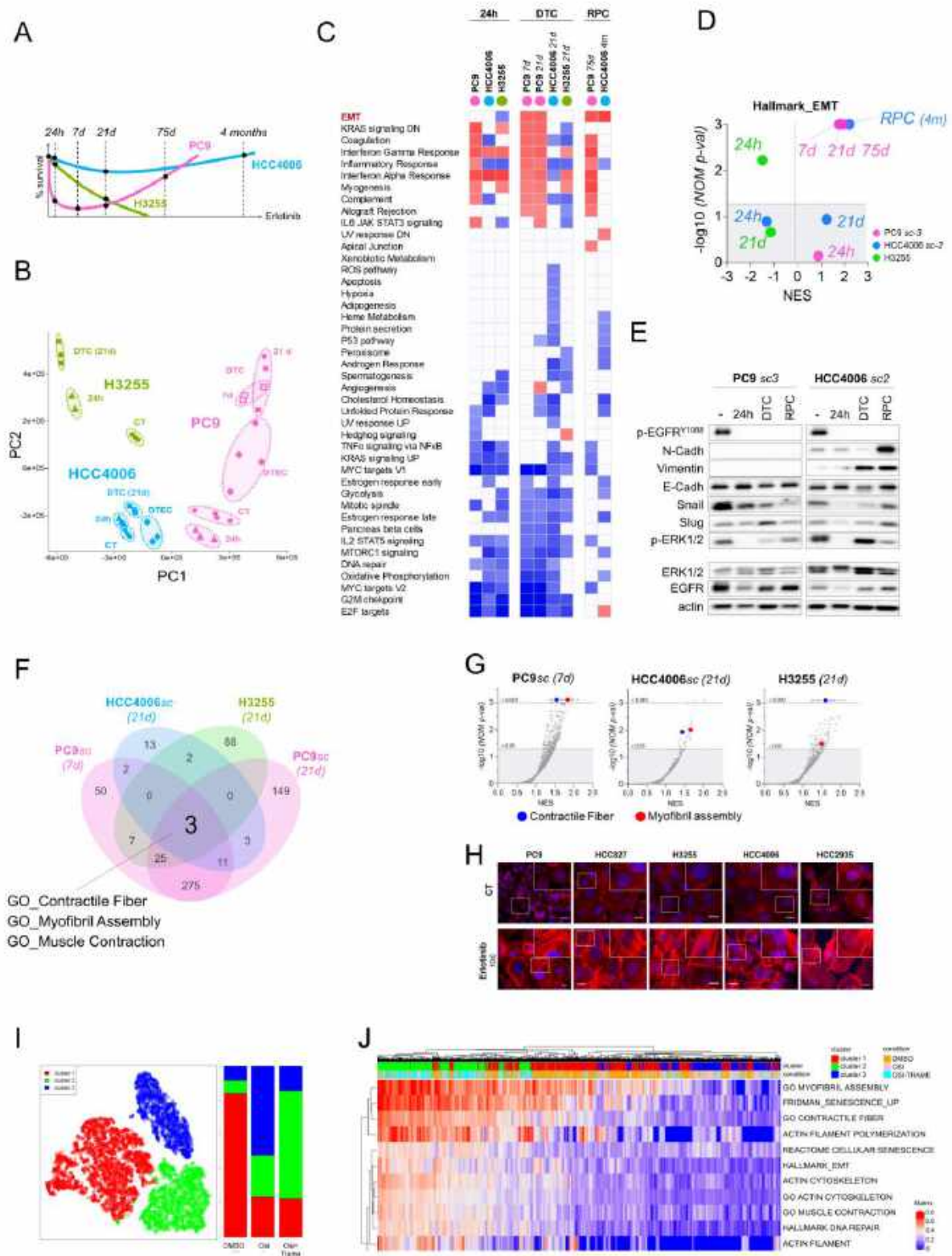
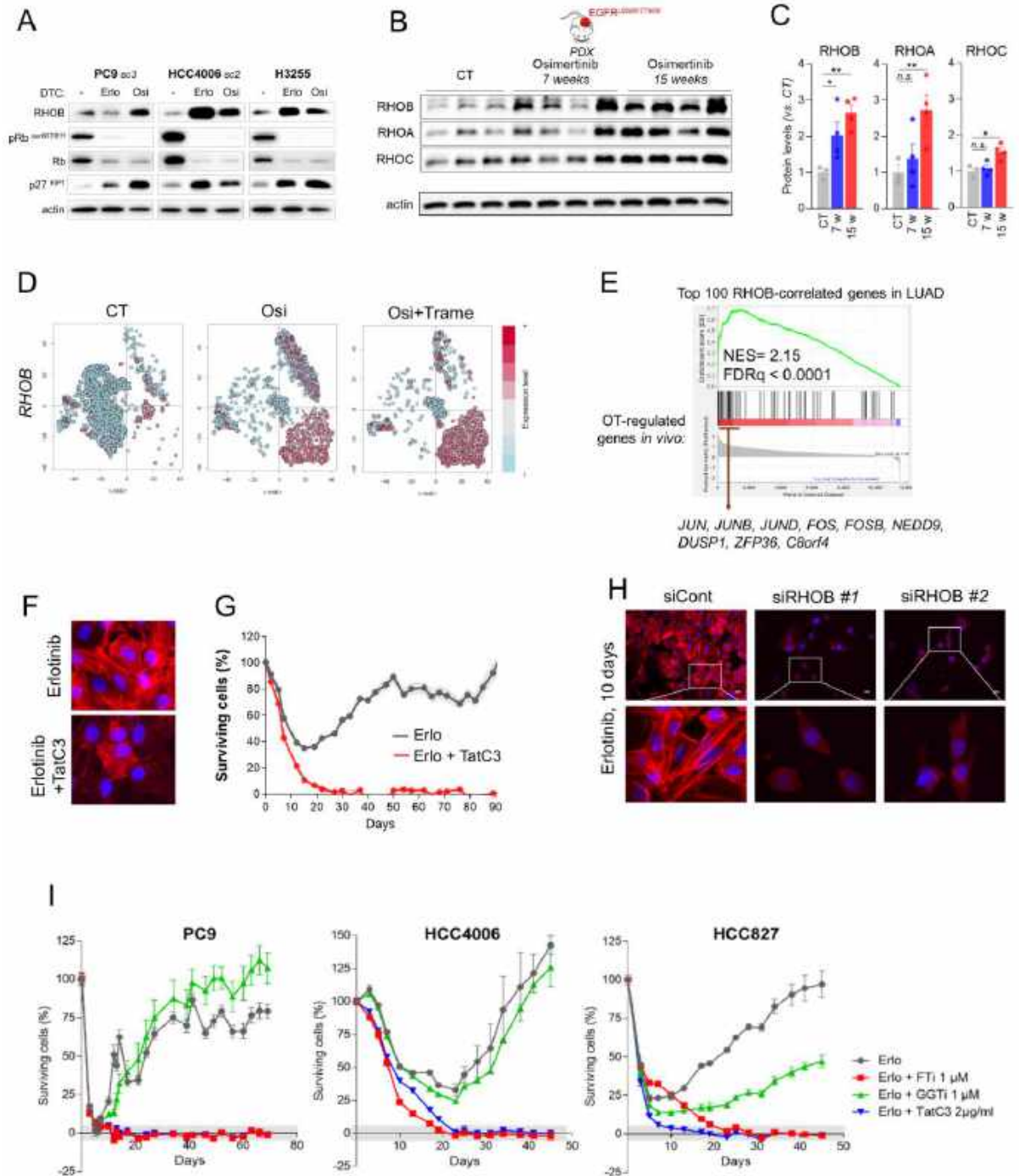
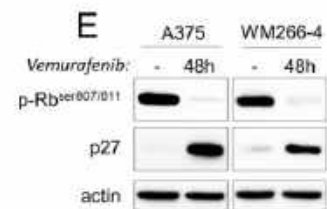
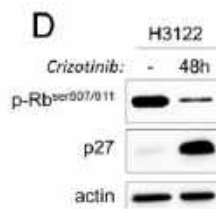
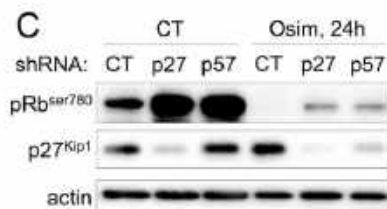
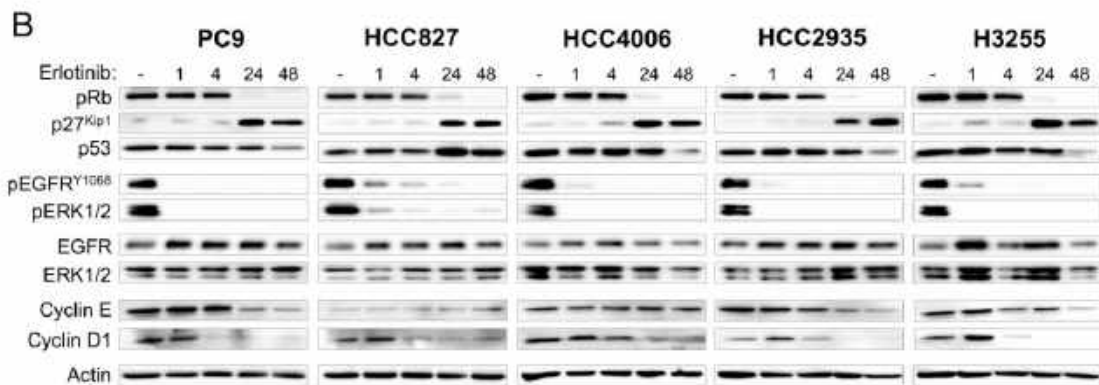
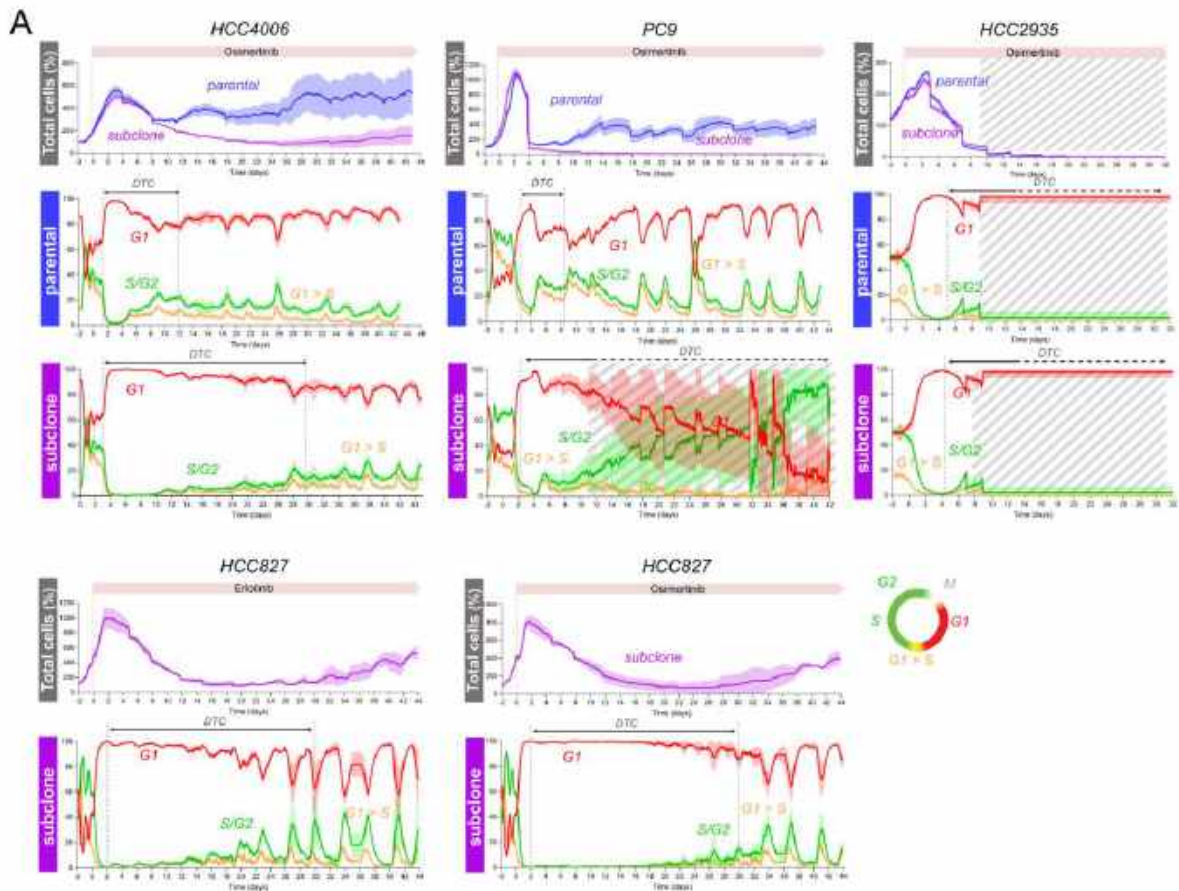


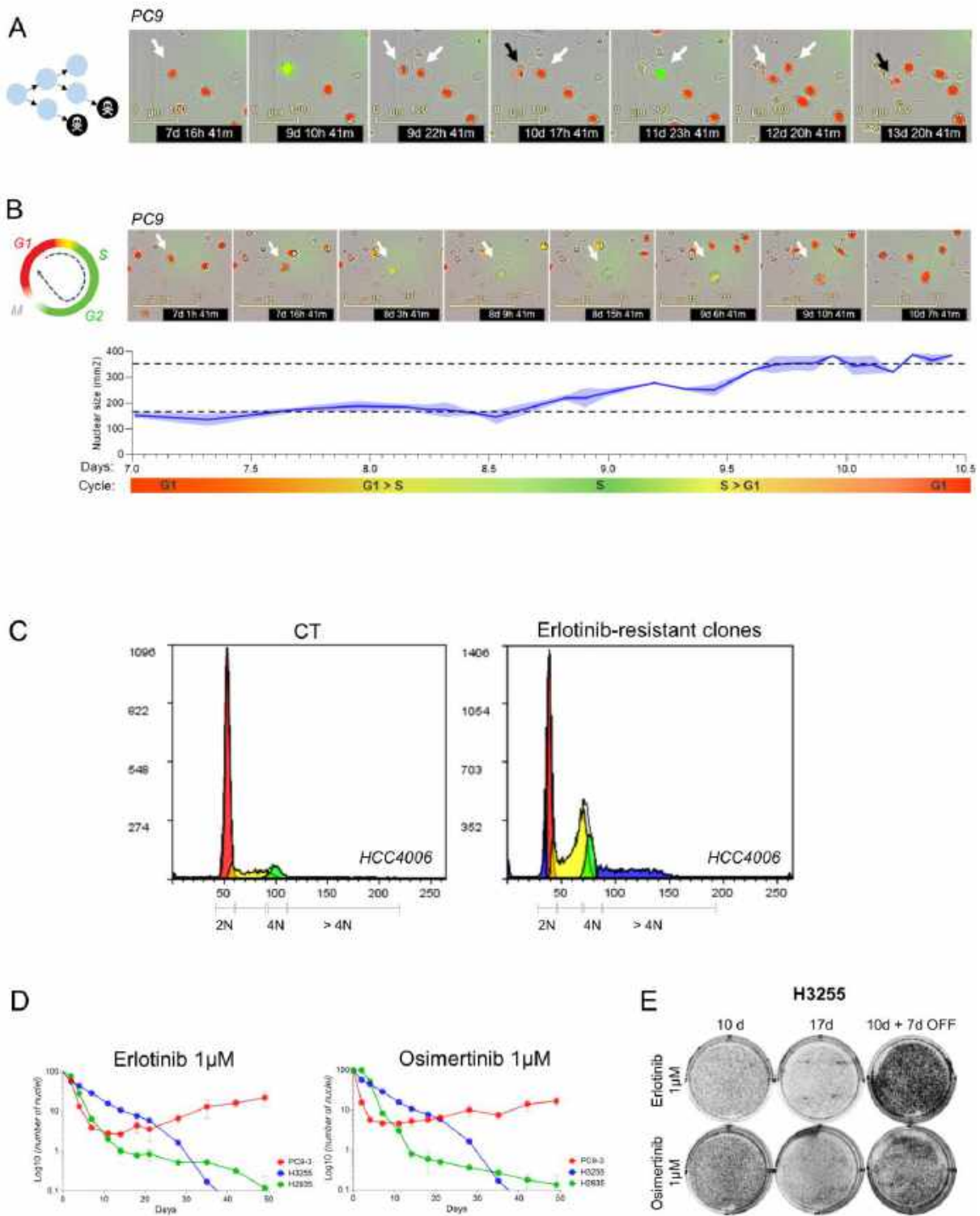
Fig. 3



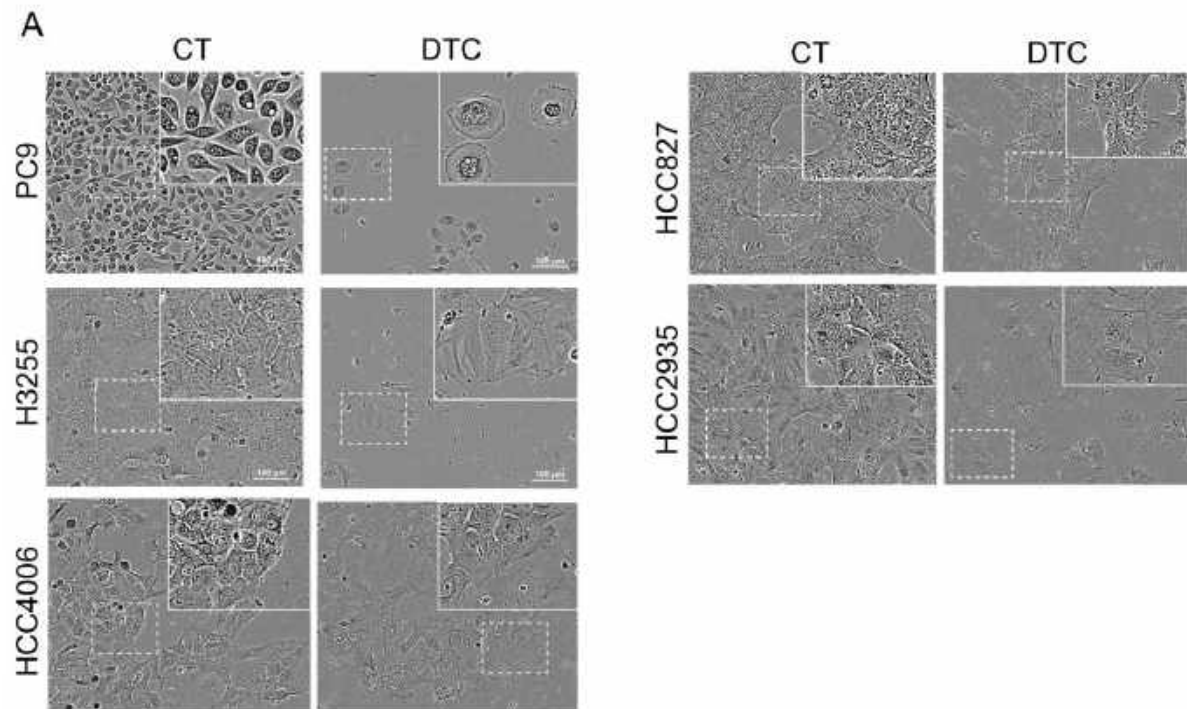
Supp Fig. 1



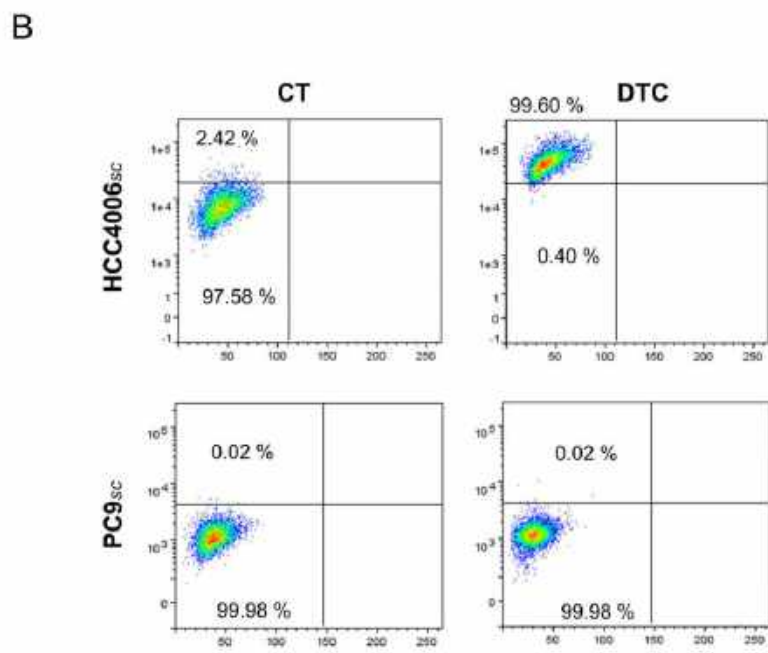
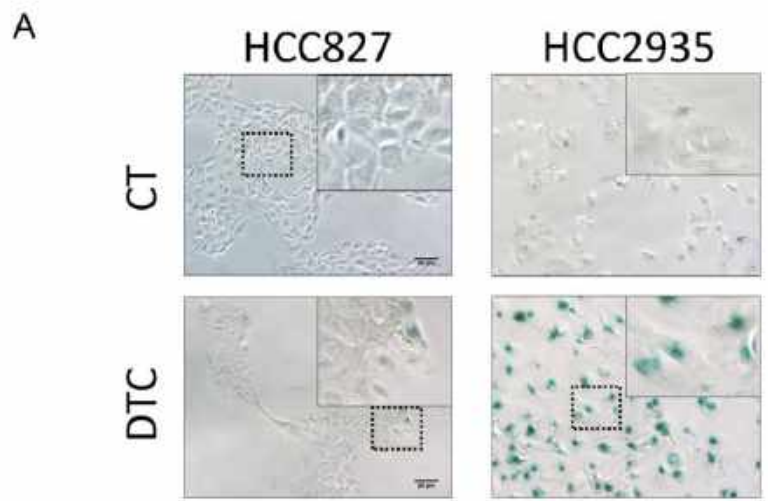
Supp Fig. 2



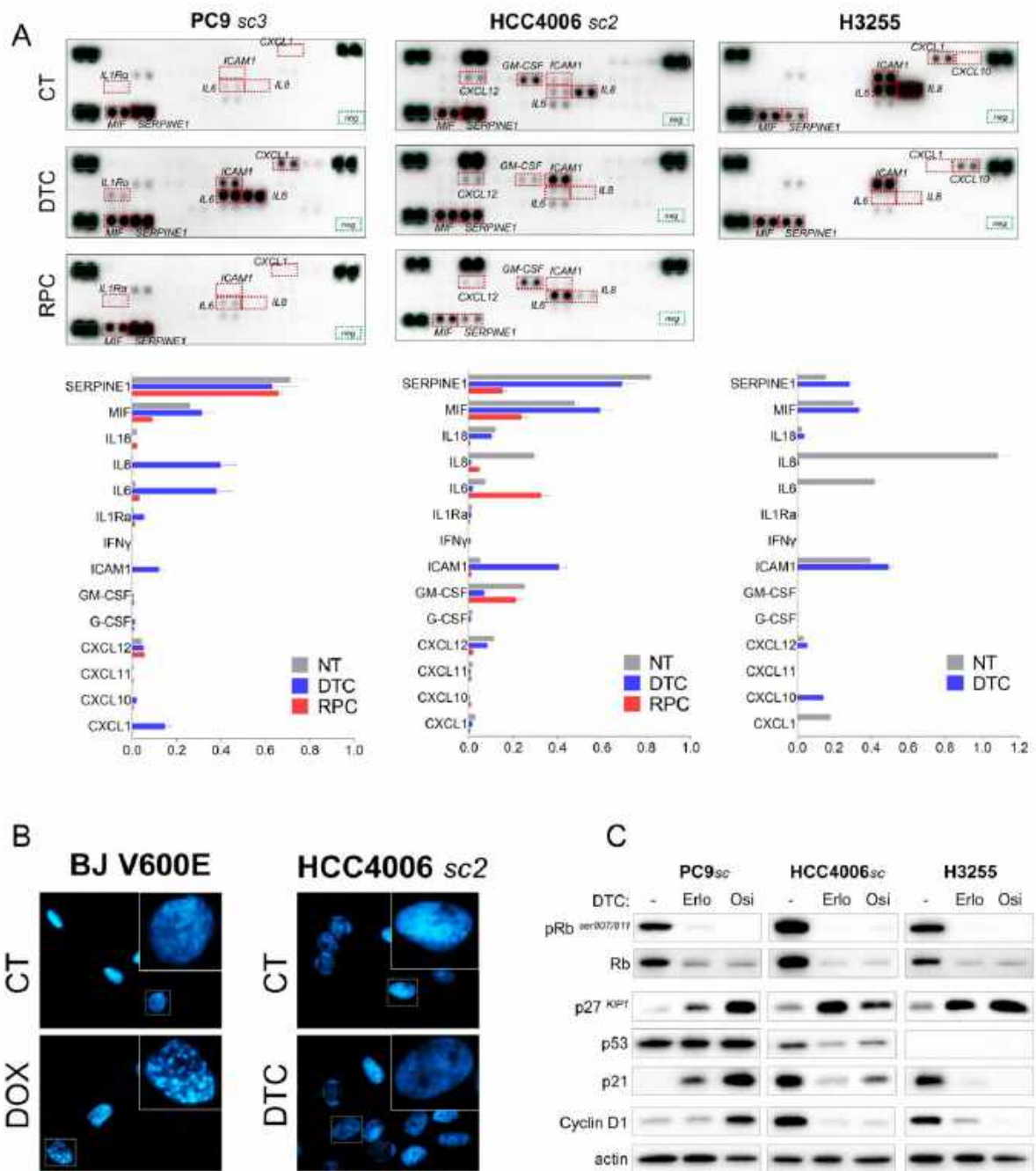
Supp Fig. 3



Supp Fig. 4



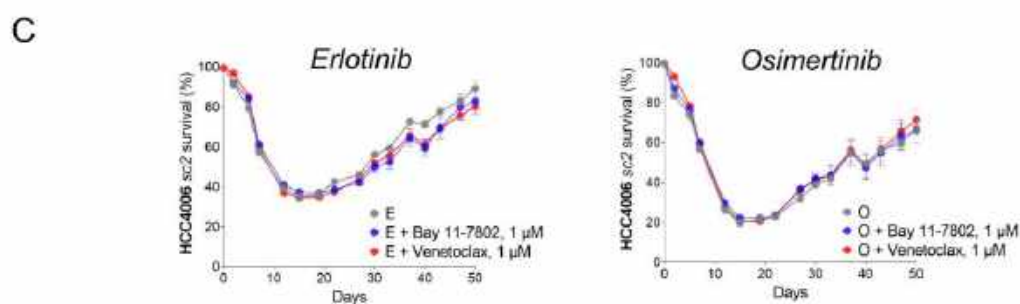
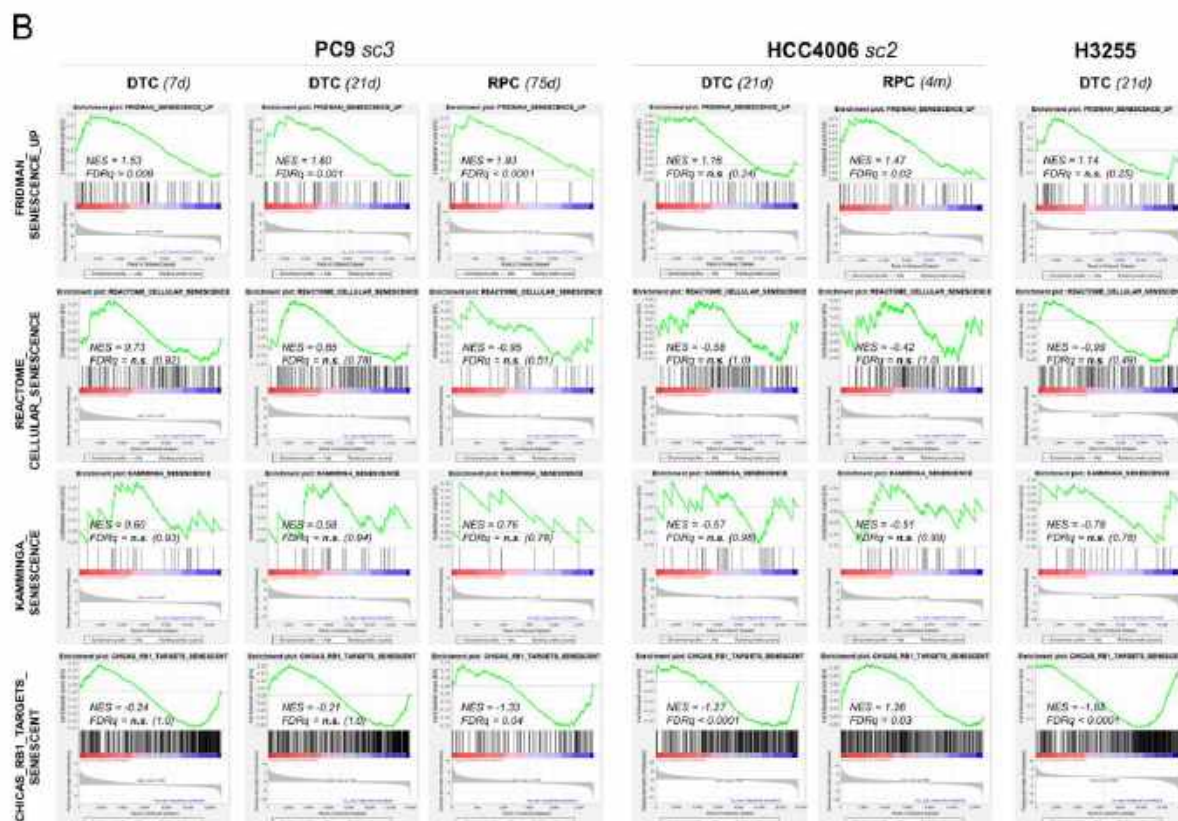
Supp Fig. 5



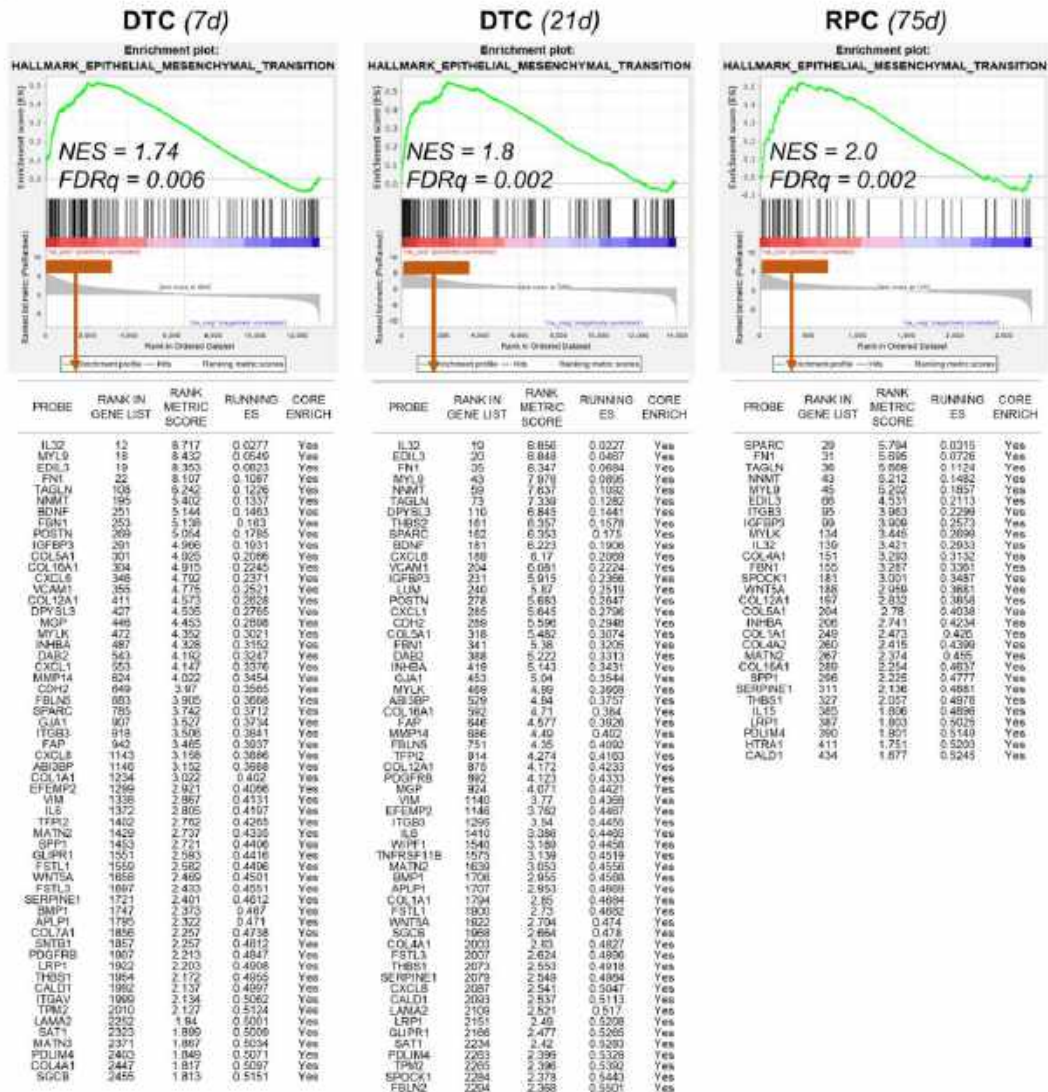
Supp Fig. 6

A

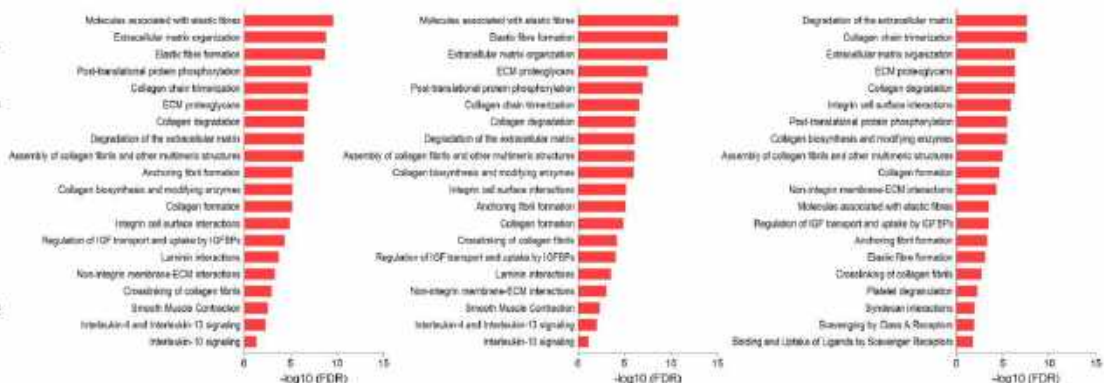
	DTC						RPC	
	PC9 sc3		HCC4006 sc2	H3255	PC9 sc3	HCC4006 sc2		
	7d	21d	21d	21d	75d	4m		
FRIDMAN_SENESCENCE_UP	NES 1.53 FDRq 0.009	NES 1.6 FDRq 0.001	NES 1.16 FDRq 0.24	NES 1.14 FDRq 0.25	NES 1.93 FDRq < 0.0001	NES 1.47 FDRq 0.02		
REACTOME_CELLULAR_SENESCENCE	NES 0.73 FDRq 0.92	NES 0.85 FDRq 0.78	NES -0.58 FDRq 1	NES -0.42 FDRq 1	NES -0.95 FDRq 0.51	NES -0.99 FDRq 0.49		
KAMMINGA_SENESCENCE	NES 0.6 FDRq 0.93	NES 0.58 FDRq 0.94	NES -0.57 FDRq 0.98	NES -0.79 FDRq 0.78	NES 0.76 FDRq 0.75	NES -0.51 FDRq 0.99		
CHICAS_RB1_TARGETS_SENESCENT	NES -0.24 FDRq 1	NES -0.21 FDRq 1	NES -1.27 FDRq < 0.0001	NES -1.85 FDRq < 0.0001	NES -1.33 FDRq 0.04	NES 1.26 FDRq 0.03		



PC9 sc

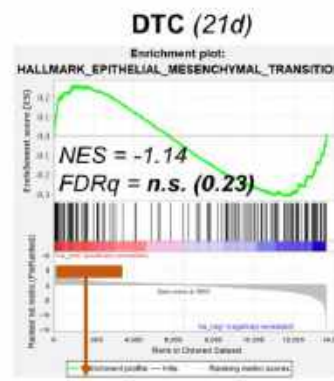
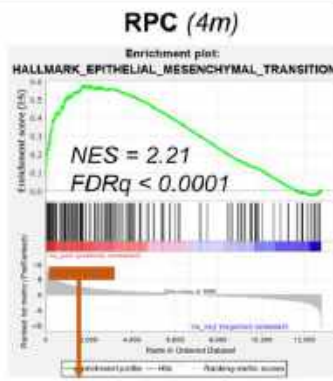
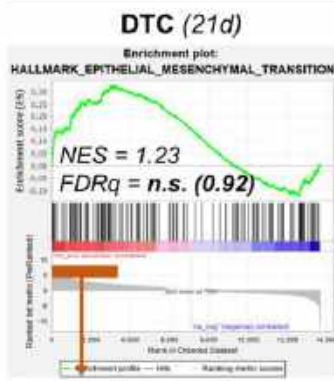


Reactome pathways analysis
(genes involved in EMT signature)



HCC4006 sc

H3255

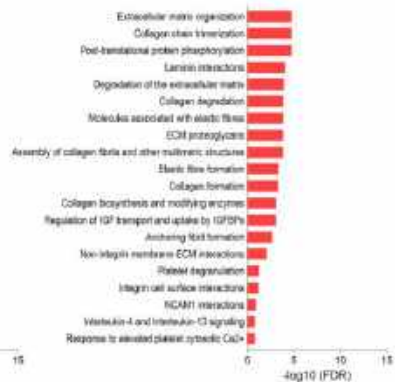
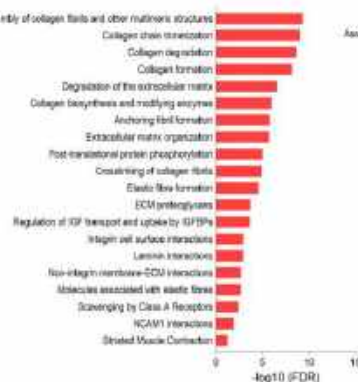


PROBE	RANK IN GENE LIST	RANK METRIC SCORE	RUNNING ES	CORE ENRICH
SCRPN1	72	8.221	0.0280	Yes
COL11B	73	7.262	0.0225	Yes
COL1A2	70	6.704	0.0750	Yes
MKRA5	112	6.169	0.0253	Yes
INHBA	126	6.048	0.1183	Yes
OLFR1	173	5.907	0.1334	Yes
GPR4	284	5.780	0.1450	Yes
SGCG	336	4.419	0.1416	Yes
COL1A1	631	4.390	0.1501	Yes
THBS2	757	3.982	0.1588	Yes
GREM1	815	3.68	0.1571	Yes
THBS1	934	3.651	0.1691	Yes
LAMA3	982	3.58	0.1780	Yes
SCG2	1003	3.545	0.19	Yes
PER1	1016	3.508	0.2017	Yes
IL6	1114	3.384	0.207	Yes
MYL9	1174	3.297	0.2146	Yes
COL4A1	1204	3.254	0.2243	Yes
TAGLN	1281	3.101	0.2302	Yes
IGFBP3	1339	3.085	0.2372	Yes
TFPI2	1453	2.981	0.2388	Yes
LAMP2	1462	2.952	0.2407	Yes
PMEP1	1514	2.802	0.2585	Yes
FSTL1	1718	2.702	0.2513	Yes
DRN1	1783	2.636	0.2601	Yes
COL3A1	1803	2.621	0.2643	Yes
IPM1	1902	2.582	0.2693	Yes
COL13	2149	2.448	0.2537	Yes
RHOB	2082	2.253	0.2551	Yes
NFM	2347	2.213	0.2684	Yes
THY1	2363	2.191	0.2636	Yes
ADAM12	2501	2.112	0.2628	Yes
PTH1H	2545	2.082	0.2672	Yes
MATN2	2547	2.081	0.2748	Yes
TNFRSF11B	2556	1.974	0.281	Yes
FSTL3	2581	2.008	0.2875	Yes
CALD1	2628	2.044	0.2915	Yes
COL18A1	2688	2.003	0.2946	Yes
ID2	2898	1.990	0.301	Yes
UMI	2747	1.949	0.3046	Yes
LOX	2847	1.913	0.3043	Yes
TGFBI	2899	1.888	0.3074	Yes
SPRY2	2624	1.872	0.3124	Yes
COL4A3	2807	1.851	0.318	Yes
COL5A1	3002	1.832	0.3202	Yes
COL12A1	3124	1.767	0.3177	Yes
IL32	3137	1.76	0.3232	Yes

PROBE	RANK IN GENE LIST	RANK METRIC SCORE	RUNNING ES	CORE ENRICH
LUM	2	12.485	0.0282	Yes
RGS4	8	12.001	0.0253	Yes
COL11A1	5	11.534	0.0015	Yes
COL11A1	18	10.368	0.104	Yes
VCAM1	22	9.899	0.1261	Yes
SCRPN1	55	9.837	0.1493	Yes
DCN	29	8.936	0.1701	Yes
COL1A1	47	8.919	0.180	Yes
THBS2	63	8.843	0.208	Yes
FAP	56	8.42	0.227	Yes
MNMT	112	7.107	0.2388	Yes
PROSG2	128	6.892	0.2520	Yes
GLPR1	159	6.613	0.260	Yes
PTX3	171	6.437	0.2796	Yes
NCAM	182	6.369	0.2734	Yes
INHBA	187	6.31	0.3074	Yes
SCG2	204	6.203	0.3202	Yes
COL2A3	209	6.157	0.334	Yes
CDH2	266	5.776	0.3425	Yes
POXF8	275	5.722	0.3549	Yes
GREM1	278	5.708	0.3677	Yes
THY1	280	5.697	0.3805	Yes
FOXO2	322	5.495	0.3968	Yes
COL3A1	399	5.077	0.3953	Yes
GAB1	426	4.944	0.4044	Yes
EDIL3	450	4.836	0.4120	Yes
SGCG	474	4.744	0.4225	Yes
COL1B	497	4.625	0.4313	Yes
IL6	652	4.777	0.4285	Yes
COL7A1	656	4.169	0.4379	Yes
MKRA5	666	4.164	0.4473	Yes
CDH5	679	4.104	0.4549	Yes
CAP2	708	4.022	0.4618	Yes
THBS1	811	3.729	0.4623	Yes
ME2	817	3.702	0.4704	Yes
ADAM12	820	3.756	0.4788	Yes
COL12A1	945	3.706	0.4853	Yes
SPOCK1	973	3.638	0.4814	Yes
COL6A7	874	3.635	0.4907	Yes
LOX	903	3.587	0.5057	Yes
TAGLN	945	3.48	0.5103	Yes
ECM1	1012	3.333	0.5126	Yes
MYLK	1050	3.288	0.5171	Yes
LOX1	1111	3.228	0.5184	Yes
LOX2	1169	3.009	0.5217	Yes
MMP2	1210	2.822	0.5245	Yes
SCRPN2	1224	2.813	0.5308	Yes
TRN1	1263	2.847	0.5342	Yes
FGF2	1288	2.81	0.5385	Yes
FN1	1360	2.697	0.5382	Yes
MYL9	1404	2.633	0.5418	Yes
PTH1H	1457	2.577	0.5420	Yes
IPM1	1464	2.559	0.5480	Yes
TSP1B	1554	2.458	0.5474	Yes
PLD2	1579	2.43	0.551	Yes
FSTL1	1583	2.426	0.5563	Yes
TNFRSF11B	1602	2.398	0.5603	Yes
SLIT2	1637	2.393	0.565	Yes
SFRP4	1639	2.369	0.5683	Yes
CADM1	1667	2.345	0.5715	Yes
ANEP	1674	2.34	0.5763	Yes
PMEP1	1722	2.302	0.5778	Yes

PROBE	RANK IN GENE LIST	RANK METRIC SCORE	RUNNING ES	CORE ENRICH
TIMP3	5	9.158	0.0242	No
ITM	26	7.256	0.0422	No
COL4A1	36	6.748	0.0595	No
SLIT3	62	6.004	0.0738	No
LAMA3	96	6.436	0.0864	No
AB3BP	96	6.369	0.1006	No
SPARC	109	5.273	0.1137	No
ITRA1	140	4.806	0.1241	No
COL5A1	156	4.656	0.1352	No
COL4A3	175	4.608	0.1469	No
CALD1	179	4.604	0.1561	No
CDH11	181	4.514	0.1703	No
MSX1	226	4.33	0.1794	No
EDIL3	241	4.249	0.1856	No
RDNF	316	3.955	0.1940	No
COL18A1	331	3.675	0.2043	No
NID2	432	3.446	0.2061	No
ID2	458	3.361	0.2132	No
SFRP4	511	3.151	0.2170	No
PMP22	548	3.003	0.2232	No
FSTL3	662	2.838	0.2265	No
THBS1	696	2.813	0.2286	No
CADD45B	799	2.448	0.2225	No
MYL9	812	2.431	0.2311	No
FN1	895	2.349	0.2343	No
CADM1	870	3.311	0.2395	No
MATN2	873	2.300	0.2459	No
FBLN5	896	2.278	0.25	No
FERMT2	965	2.165	0.2516	No
TNFAIP3	967	2.162	0.2573	No
SGCB	1108	2.003	0.2518	No
IL6	1158	1.943	0.2530	No
IL32	1181	1.913	0.2567	No
UMI	1238	1.885	0.2591	No
JUN	1300	1.708	0.251	No
COL12A1	1480	1.643	0.2503	No
MATN3	1461	1.56	0.2471	No
RHOB	1571	1.446	0.2507	No
VEGFA	1560	1.533	0.2534	No

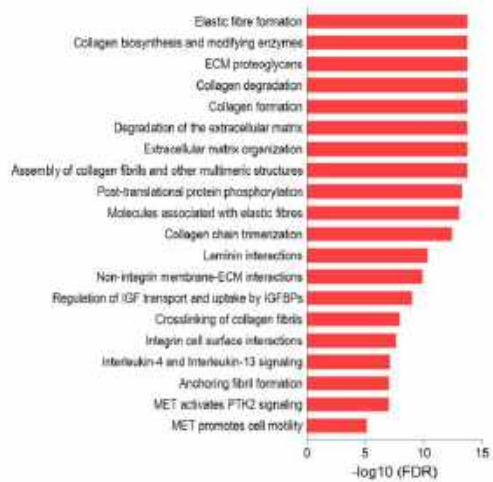
Reactome pathways analysis (genes involved in EMT signature)



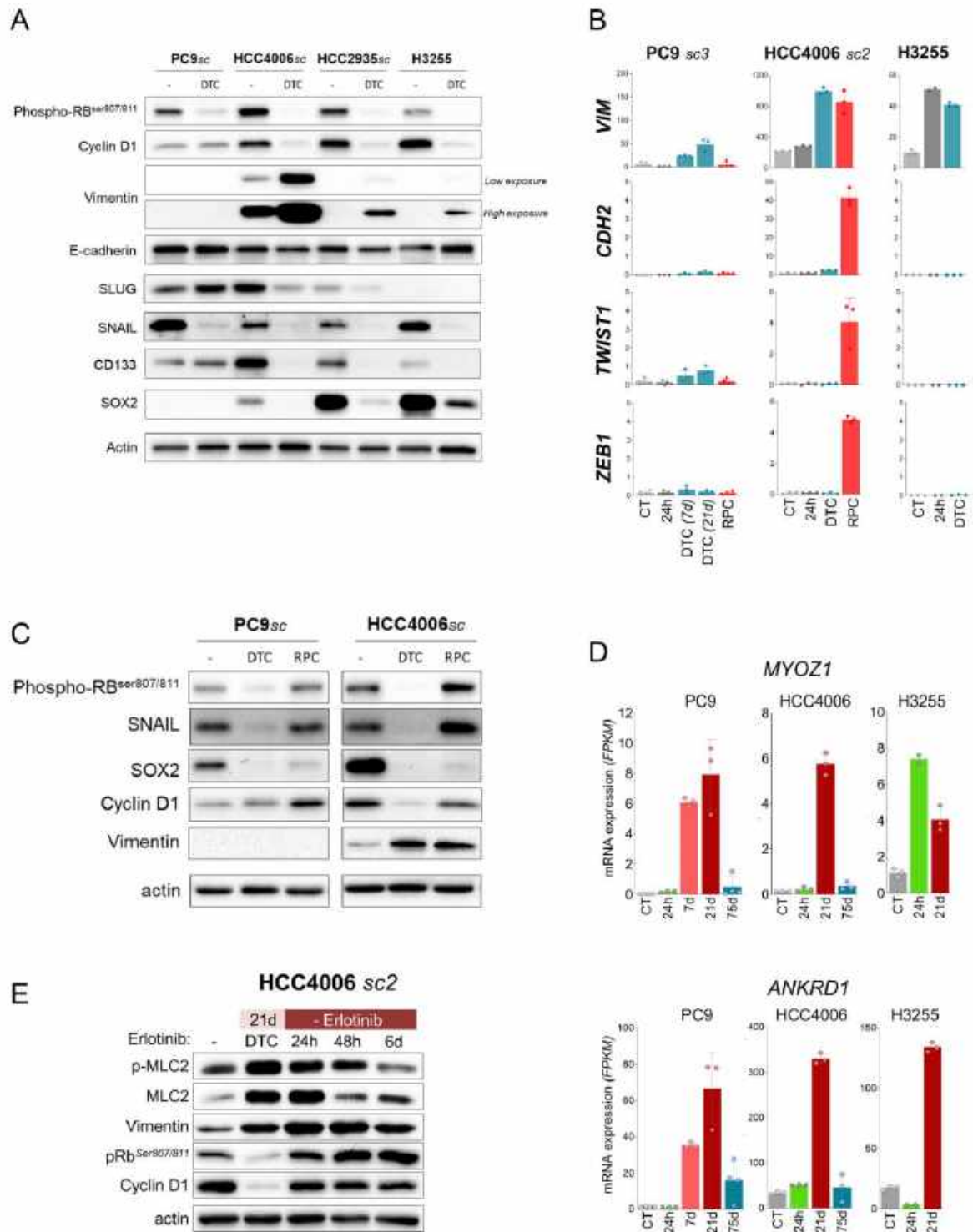
Hallmark EMT (GSEA, 200 genes)

ABI3BP	DST	LAMA1	PTX3
ACTA2	ECM1	LAMA2	PVR
ADAM12	ECM2	LAMA3	QSOX1
ANPEP	EDIL3	LAMC1	RGS4
APLP1	EFEMP2	LAMC2	RHOB
AREG	ELN	LGALS1	SAT1
BASP1	EMP3	LOX	SCG2
BDNF	ENO2	LOXL1	SDC1
BGN	FAP	LOXL2	SDC4
BMP1	FAS	LRP1	SERPINE1
CADM1	FBLN1	LRRC15	SERPINE2
CALD1	FBLN2	LUM	SERPINH1
CALU	FBLN5	MAGEE1	SFRP1
CAP2	FBN1	MATN2	SFRP4
CAPG	FBN2	MATN3	SGCB
CCN1	FERM12	MCM7	SGCD
CCN2	FGF2	MEST	SGCG
CD44	FLNA	MFAP5	SLC6A8
CD59	FMOD	MGP	SLIT2
CDH11	FN1	MMP1	SLIT3
CDH2	FOXC2	MMP14	SNAI2
CDH8	FSTL1	MMP2	SNTB1
COL11A1	FSTL3	MMP3	SPARC
COL12A1	FUCA1	MSX1	SPOCK1
COL16A1	FZD8	MXRA5	SPP1
COL1A1	GADD45A	MYL9	TAGLN
COL1A2	GADD45B	MYLK	TFPI2
COL3A1	GAS1	NID2	TGFB1
COL4A1	GEM	NNMT	TGFB1
COL4A2	GJA1	NOTCH2	TGFBR3
COL5A1	GLIPR1	NT5E	TGM2
COL5A2	GPC1	NTM	THBS1
COL5A3	GPX7	OXTR	THBS2
COL8A2	GREM1	P3H1	THY1
COL8A3	HTRA1	PCOLCE	TIMP1
COL7A1	ID2	PCOLCE2	TIMP3
COL8A2	IGFBP2	PDGFRB	TNC
COLGALT1	IGFBP3	PDIM4	TNFAIP3
COMP	IGFBP4	PFN2	TNFRSF11B
COPA	IL15	PLALR	TNFRSF12A
CRLF1	IL32	FLOD1	TPM1
CTHRC1	IL6	FLOD2	TPM2
CXCL1	INHBA	FLOD3	TPM4
CXCL12	ITGA2	PMEPA1	VCAM1
CXCL8	ITGA5	PMP22	VCAN
CXCL8	ITGAV	POSTN	VEGFA
DAB2	ITGB1	PI1B	VEGFC
DCN	ITGB3	PRRX1	VIM
DKK1	ITGB5	PRSS2	WIPF1
DPYSL3	JUN	PTHLH	WNT5A

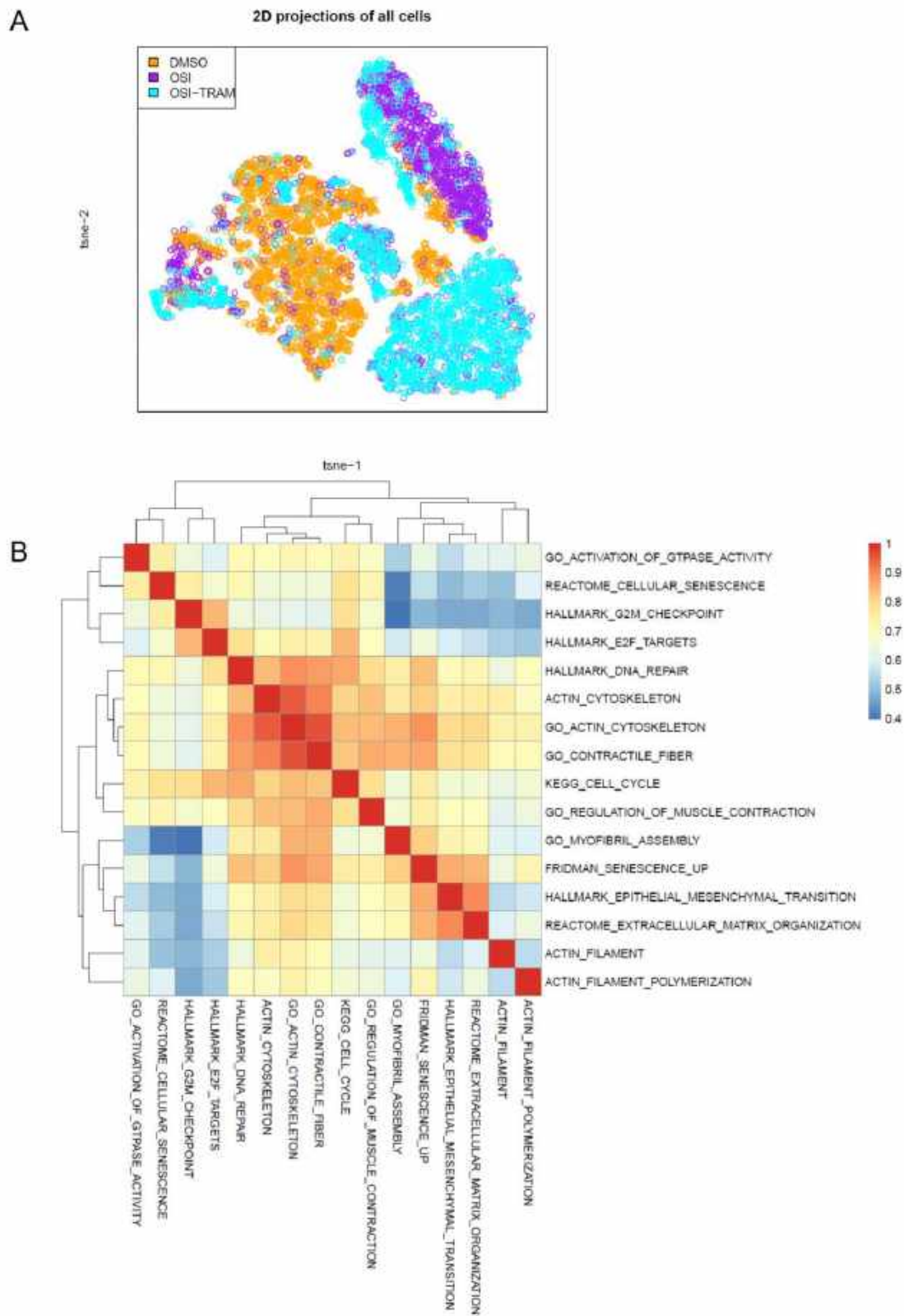
Reactome pathways analysis (genes involved in EMT signature)



Supp Fig. 10

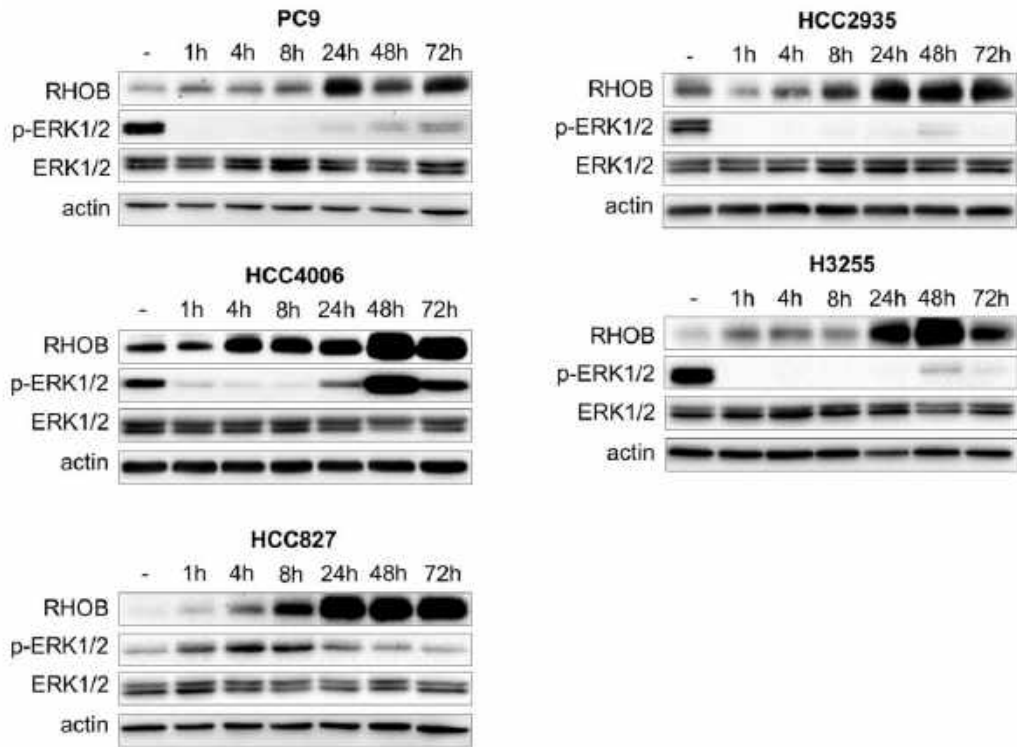


Supp Fig. 11



Supp Fig. 12

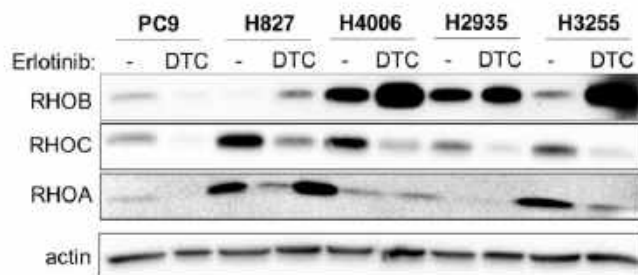
A



B

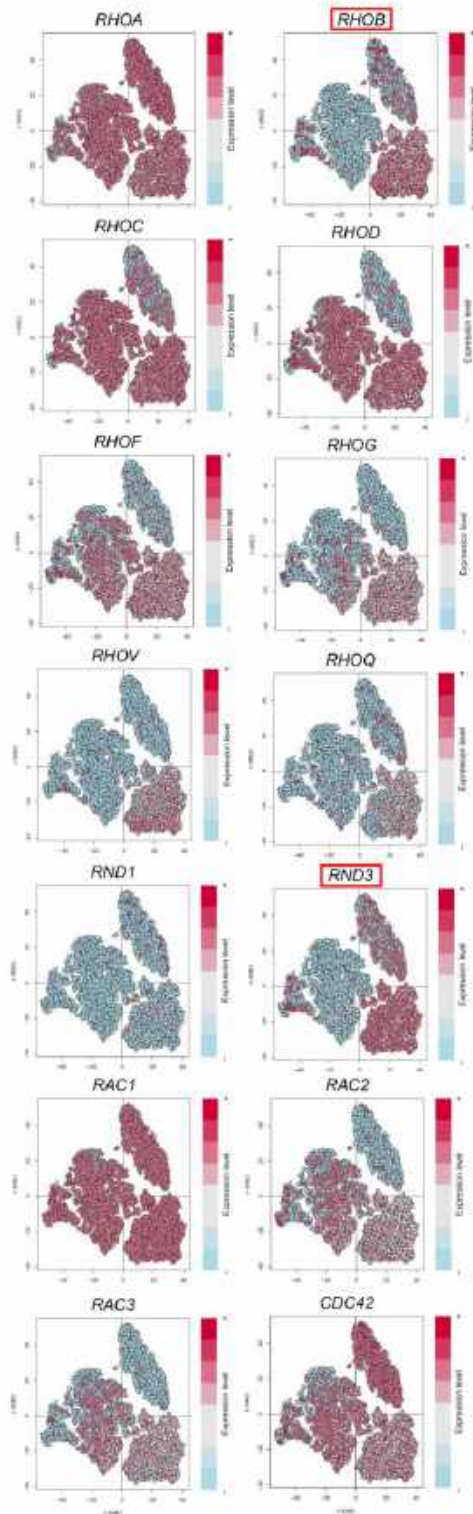


C



Supp Fig. 13

A

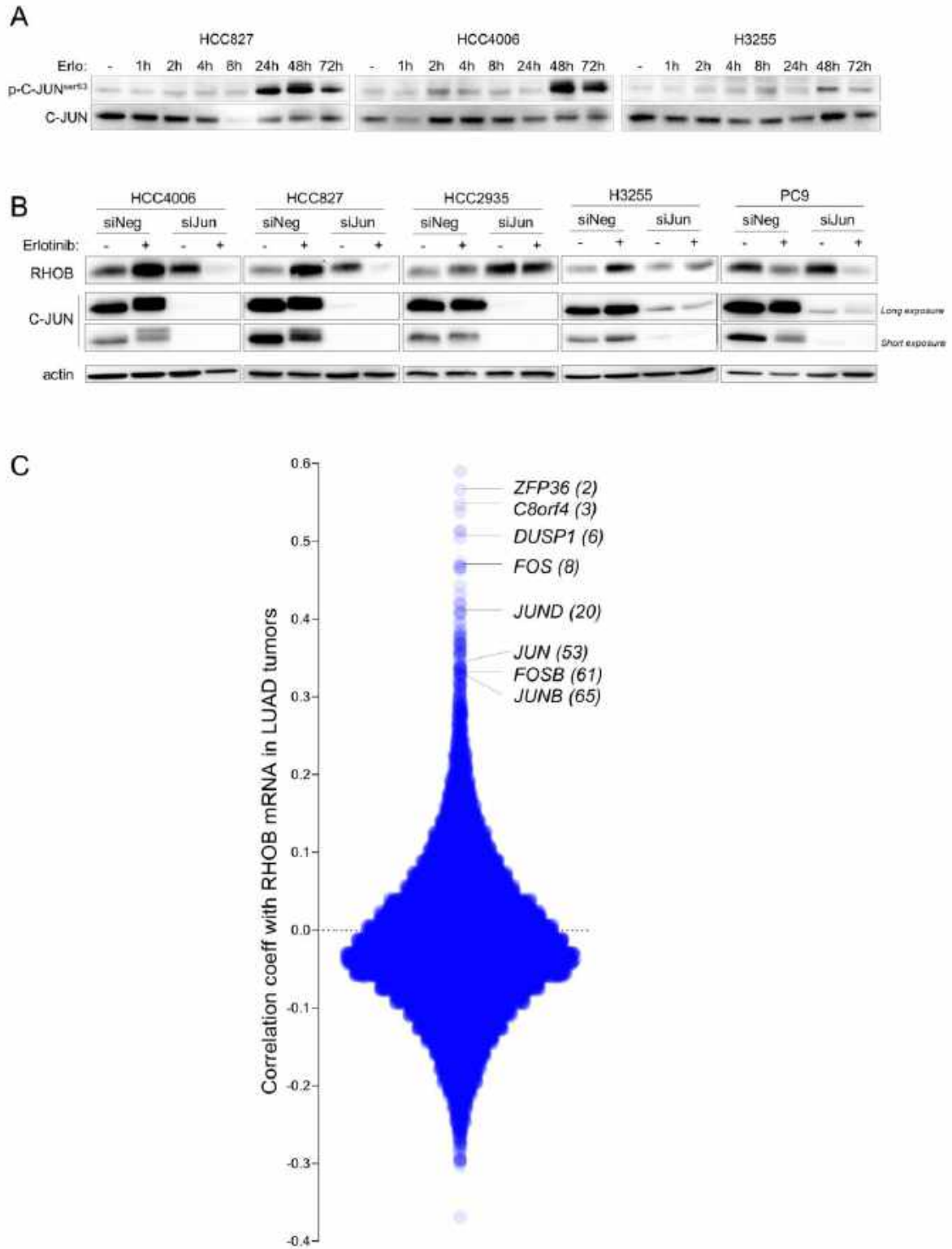


B

Ranking	genes	logFC	FDR
1	AGR2	2.75	0
2	ELF3	2.71	0
3	SOX4	2.62	0
4	CLDN4	2.60	0
5	ALDH3A1	2.53	0
6	MALAT1	2.50	0
7	RND3	2.47	0
8	DUSP1	2.46	0
9	FOSB	2.38	0
10	KLF6	2.34	0
11	AKR1B10	2.32	0
12	NEAT1	2.30	0
13	CLDN3	2.28	0
14	JUN	2.26	0
15	CITED4	2.23	0
16	ATF3	2.22	0
17	TM4SF1	2.22	0
18	HES1	2.21	0
19	CLU	2.18	0
20	RARRES2	2.17	0
21	C8orf4	2.16	0
22	GPRC5A	2.16	0
23	RHOB	2.15	0
24	TPPP3	2.15	0
25	SNCG	2.14	0
26	BPGM	2.13	0
27	ZFP36L2	2.12	0
28	PSCA	2.12	0
29	ZFP36L1	2.11	0
30	ZFP36	2.04	0
31	DDX17	2.04	0
32	JUND	2.03	0
33	NEDD9	2.03	0
34	FOS	2.02	0
35	JUNB	1.99	0
36	PTGS2	1.98	0
37	TGIF1	1.98	0
38	TNFRSF21	1.97	0
39	PLK2	1.97	0
40	CFD	1.95	0

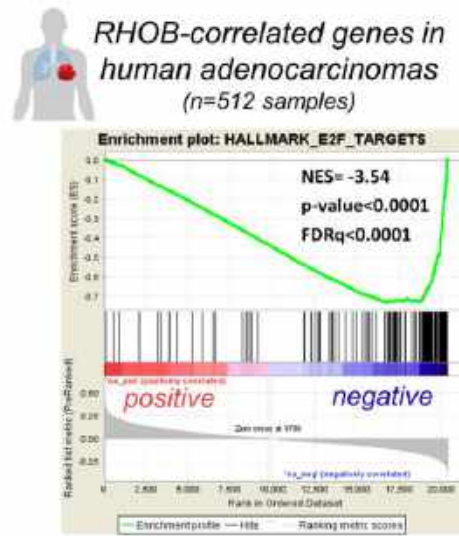
Rho family of Ras-related GTPases
 AP-1 family members

Supp Fig. 14

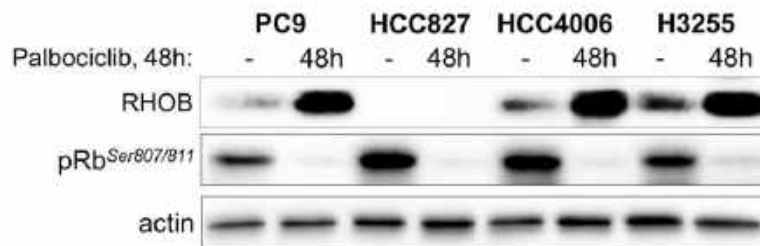


Supp Fig. 15

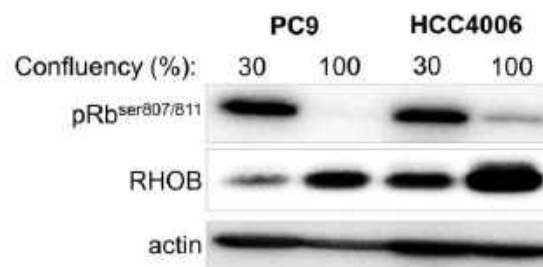
A



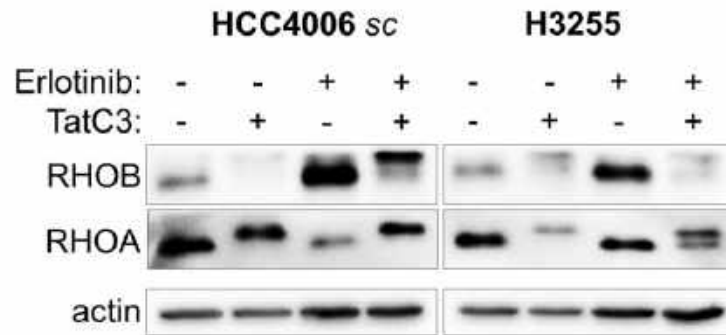
B



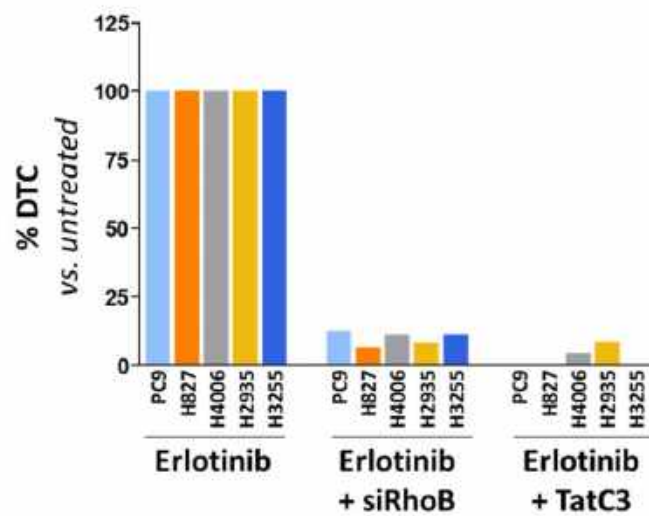
C



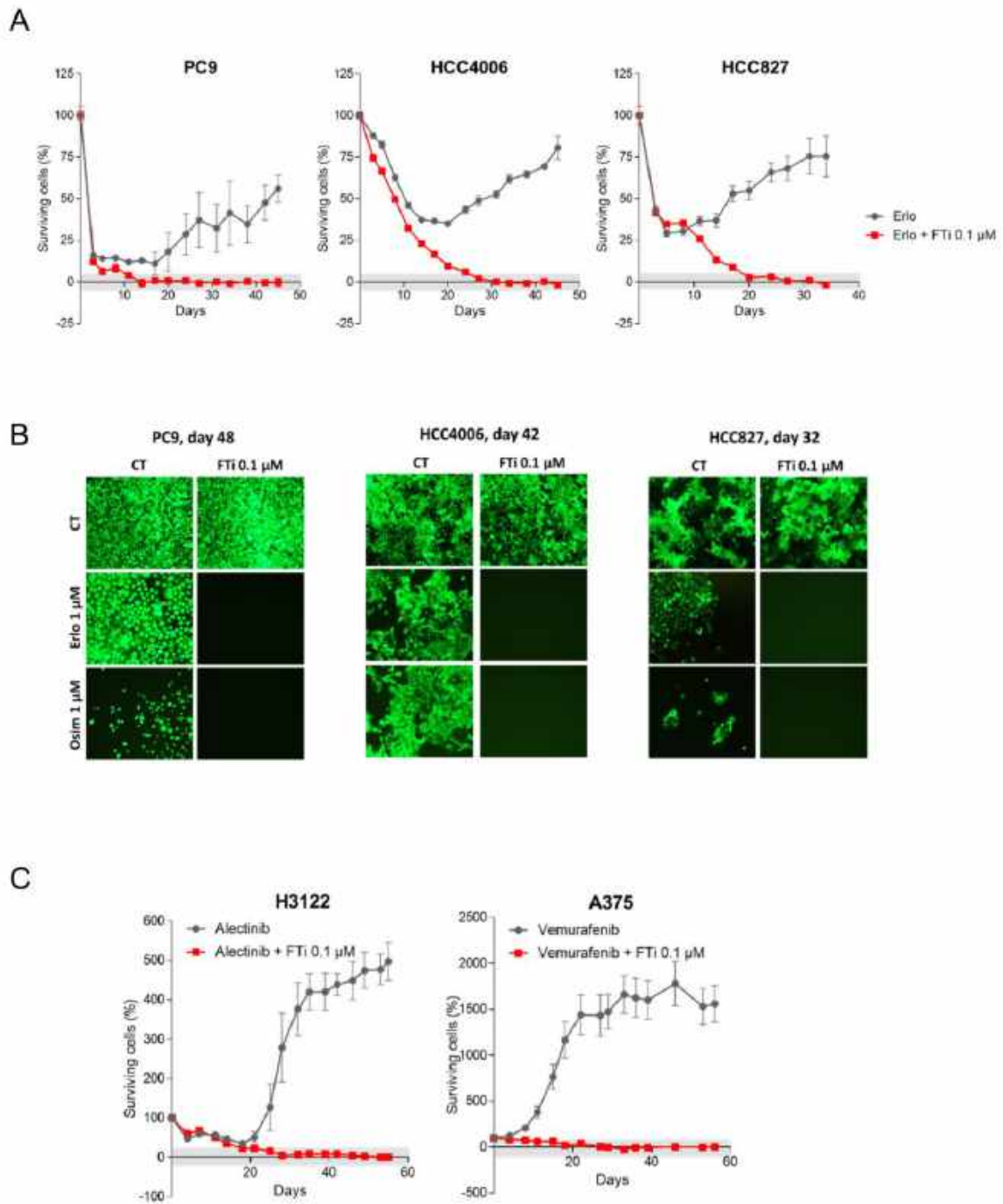
A



B



Supp Fig. 17



REFERENCES

1. Yu, H. A. *et al.* Analysis of tumor specimens at the time of acquired resistance to EGFR-TKI therapy in 155 patients with EGFR-mutant lung cancers. *Clin. Cancer Res.* **19**, 2240–2247 (2013).
2. Thress, K. S. *et al.* Acquired EGFR C797S mutation mediates resistance to AZD9291 in non-small cell lung cancer harboring EGFR T790M. *Nat. Med.* **21**, 560–562 (2015).
3. Engelman, J. A. *et al.* MET Amplification Leads to Gefitinib Resistance in Lung Cancer by Activating ERBB3 Signaling. *Science* **316**, 1039–1043 (2007).
4. Takezawa, K. *et al.* HER2 amplification: a potential mechanism of acquired resistance to EGFR inhibition in EGFR-mutant lung cancers that lack the second-site EGFR T790M mutation. *Cancer Discov* **2**, 922–933 (2012).
5. Thomson, S. *et al.* Epithelial to Mesenchymal Transition Is a Determinant of Sensitivity of Non-Small-Cell Lung Carcinoma Cell Lines and Xenografts to Epidermal Growth Factor Receptor Inhibition. *Cancer Research* **65**, 9455–9462 (2005).
6. Calvayrac, O., Pradines, A., Pons, E., Mazières, J. & Guibert, N. Molecular biomarkers for lung adenocarcinoma. *European Respiratory Journal* **49**, 1601734 (2017).
7. Sharma, S. V. *et al.* A Chromatin-Mediated Reversible Drug-Tolerant State in Cancer Cell Subpopulations. *Cell* **141**, 69–80 (2010).
8. Hata, A. N. *et al.* Tumor cells can follow distinct evolutionary paths to become resistant to epidermal growth factor receptor inhibition. *Nature Medicine* **22**, 262–269 (2016).
9. Ramirez, M. *et al.* Diverse drug-resistance mechanisms can emerge from drug-tolerant cancer persister cells. *Nature Communications* **7**, (2016).
10. Guler, G. D. *et al.* Repression of Stress-Induced LINE-1 Expression Protects Cancer Cell Subpopulations from Lethal Drug Exposure. *Cancer Cell* **32**, 221-237.e13 (2017).
11. Kurppa, K. J. *et al.* Treatment-Induced Tumor Dormancy through YAP-Mediated Transcriptional Reprogramming of the Apoptotic Pathway. *Cancer Cell* **37**, 104-122.e12 (2020).
12. Calvayrac, O. *et al.* The RAS-related GTPase RHOB confers resistance to EGFR-tyrosine kinase inhibitors in non-small-cell lung cancer via an AKT-dependent mechanism. *EMBO Molecular Medicine* **9**, 238–250 (2017).
13. Hall, A. Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science* **279**, 509–514 (1998).
14. Sakaue-Sawano, A. *et al.* Visualizing spatiotemporal dynamics of multicellular cell-cycle progression. *Cell* **132**, 487–498 (2008).
15. Turke, A. B. *et al.* Preexistence and clonal selection of MET amplification in EGFR mutant NSCLC. *Cancer Cell* **17**, 77–88 (2010).
16. Edgar, B. A. & Orr-Weaver, T. L. Endoreplication Cell Cycles. *Cell* **105**, 297–306 (2001).

17. Puig, P.-E. *et al.* Tumor cells can escape DNA-damaging cisplatin through DNA endoreduplication and reversible polyploidy. *Cell Biol. Int.* **32**, 1031–1043 (2008).
18. Hernandez-Segura, A., Nehme, J. & Demaria, M. Hallmarks of Cellular Senescence. *Trends Cell Biol.* **28**, 436–453 (2018).
19. He, S. & Sharpless, N. E. Senescence in Health and Disease. *Cell* **169**, 1000–1011 (2017).
20. Delmas, A. *et al.* The c-Jun/RHOB/AKT pathway confers resistance of *BRAF*-mutant melanoma cells to MAPK inhibitors. *Oncotarget* **6**, (2015).
21. Lebowitz, P. F. & Prendergast, G. C. Non-Ras targets of farnesyltransferase inhibitors: focus on Rho. *Oncogene* **17**, 1439–1445 (1998).
22. Mazières, J., Pradines, A. & Favre, G. [Farnesyl transferase inhibitors: one target may be found in another]. *Med Sci (Paris)* **19**, 211–216 (2003).
23. Mazières, J. *et al.* Geranylgeranylated, but not farnesylated, RhoB suppresses Ras transformation of NIH-3T3 cells. *Exp. Cell Res.* **304**, 354–364 (2005).
24. Sahai, E. & Olson, M. F. Purification of TAT-C3 exoenzyme. *Meth. Enzymol.* **406**, 128–140 (2006).
25. Moutel, S. *et al.* NaLi-H1: A universal synthetic library of humanized nanobodies providing highly functional antibodies and intrabodies. *Elife* **5**, (2016).
26. Bery, N. *et al.* A Targeted Protein Degradation Cell-Based Screening for Nanobodies Selective toward the Cellular RHOB GTP-Bound Conformation. *Cell Chem Biol* **26**, 1544-1558.e6 (2019).
27. Debacq-Chainiaux, F., Erusalimsky, J. D., Campisi, J. & Toussaint, O. Protocols to detect senescence-associated beta-galactosidase (SA-beta-gal) activity, a biomarker of senescent cells in culture and in vivo. *Nat Protoc* **4**, 1798–1806 (2009).
28. Li, B. & Dewey, C. N. RSEM: accurate transcript quantification from RNA-Seq data with or without a reference genome. *BMC Bioinformatics* **12**, 323 (2011).
29. Love, M. I., Huber, W. & Anders, S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol.* **15**, 550 (2014).
30. van der Maaten, Hinton, L. J. P., G. E. Visualizing High-Dimensional Data Using t-SNE. *Journal of Machine Learning Research* (2008).
31. Cabello-Aguilar, S. *et al.* SingleCellSignalR: inference of intercellular networks from single-cell transcriptomics. *Nucleic Acids Res.* **48**, e55 (2020).
32. Quintanal-Villalonga, A. *et al.* FGFR1 Cooperates with EGFR in Lung Cancer Oncogenesis, and Their Combined Inhibition Shows Improved Efficacy. *J Thorac Oncol* **14**, 641–655 (2019).

DISCUSSION et PERSPECTIVES

Les cancers bronchiques porteurs de mutations activatrices de l'*EGFR* ont bénéficié ces quinze dernières années du développement des inhibiteurs de l'activité tyrosine kinase de l'*EGFR* (EGFR-TKI). Cependant l'efficacité de ces thérapeutiques bien qu'élevée n'est que transitoire ce qui se traduit chez les patients par une amélioration significative de la survie sans progression mais pas d'une nette amélioration de la survie globale (185,188,236,198). En effet, ces thérapies se heurtent inévitablement à des phénomènes de résistance limitant la durabilité de leur efficacité. Ces mécanismes de résistance adaptative sont assez bien caractérisés et sont catégorisés en trois grands types de mécanismes qui sont : les altérations de l'*EGFR*, l'activation de voies de signalisation compensatoires et les modifications du phénotype cellulaire (249).

Pour expliquer l'origine de ces résistances, deux théories coexistent. Une première théorie propose que ces mécanismes de résistance proviennent de la sélection darwinienne d'un sous-clone de la population cellulaire d'origine déjà résistant et qui est sélectionné au cours du traitement. Une seconde théorie, plus récente, suggère que cette résistance pourrait provenir d'une population de cellules tolérantes au traitement ou Drug-Tolerant Cells (DTC) ne possédant pas de mutation de résistance initialement mais qui, après un état de pseudo-dormance, sont capables de l'acquérir (270,447). Cet état de tolérance a été décrit *in vitro*, essentiellement sur la lignée cellulaire PC9 et de façon beaucoup plus parcourue sur les lignées HCC827 et HCC4006 (270,451,447,446,450,465). Néanmoins, les mécanismes moléculaires impliqués dans cette phase de tolérance qui conduit à la résistance aux EGFR-TKIs dans les cancers bronchiques reste peu caractérisée.

Ce travail de thèse a été effectué sur un panel élargi de lignées tumorales bronchiques porteuses de mutations activatrices de l'*EGFR* et sur des sous-clones de chacune de ces lignées afin d'éviter et de réduire la sélection de cellules déjà résistantes sous traitement, pour se concentrer uniquement sur l'étude de l'émergence de résistances consécutives à l'état de tolérance au traitement. Nos résultats montrent une hétérogénéité dans la durée de la phase de tolérance et le potentiel de reprise de la prolifération selon la lignée étudiée, selon le type d'EGFR-TKI utilisé mais aussi au sein d'une même lignée, alors que la réponse initiale aux EGFR-TKI était homogène entre les lignées parentales et les sous-clones étudiés. De plus, la réponse initiale de chaque lignée au traitement ne prédit en rien sa capacité à s'échapper de l'état de tolérance pour redonner des clones prolifératifs.

De façon originale, afin d'approfondir la caractérisation de l'état de tolérance nous avons suivi la dynamique du cycle cellulaire en temps réel sous traitement par EGFR-TKI dans des cellules transduites par des marqueurs fluorescents du cycle cellulaire (772). Un tel suivi en temps réel sous traitement EGFR-TKI à long terme n'a pas été rapporté dans les cancers bronchiques. Un travail similaire a déjà été rapporté dans des cellules de mélanome porteuses de mutations activatrices de *BRAF* traitées par vémurafenib, mais seulement sur des temps courts n'excédant pas quatre jours (468).

Nos résultats montrent que la phase de tolérance, qui paraît assez statique lorsqu'on regarde la survie globale, n'est pas un état de « dormance » comme souvent décrit (270), mais au contraire un état dynamique de balance mort/survie. En effet, assez précocement après un blocage en phase G1, des cellules progressent de nouveau dans le cycle cellulaire et potentiellement parviennent à se diviser. Ces divisions sont souvent asymétriques ce qui explique le fait que le nombre total de cellules n'augmente pas au cours de la phase DTC. Puis de rares cellules parviennent à se diviser normalement et permettent l'émergence de clones prolifératifs sous traitement. Néanmoins, les mécanismes moléculaires impliqués dans cet échappement de l'arrêt du cycle n'ont pas encore été investigués. Pour cela, nous avons isolé par tri des cellules PC9 ou HCC4006 ayant progressé en phase S sous traitement et des cellules bloquées en G1, et nous avons réalisé une étude transcriptomique en cellules uniques afin de comparer ces deux contingents de cellules. Les données de cette transcriptomique sont en cours d'analyse mais nous espérons mettre en évidence des signatures moléculaires impliquées dans l'échappement de l'arrêt du cycle. Nous définirons également en parallèle le statut

mutationnel de ces cellules par NGS (Next Generation Sequencing) afin de déterminer si l'émergence très précoce de mutations de résistance pourrait être à l'origine de cet échappement.

Suite à nos observations sur cet arrêt dans le cycle et au vu de la morphologie aplatie et élargie des cellules sous EGFR-TKI nous avons investigué les marqueurs de sénescence dans nos modèles cellulaires, confortés de plus par quelques rares travaux ayant rapporté l'induction de caractéristiques de sénescence sous EGFR-TKIs dans des modèles de cancers bronchiques (524,525,465). La sénescence est un mécanisme complexe et le phénotype sénescence hétérogène, si bien que c'est la combinaison de plusieurs caractéristiques qui permet de le définir (479,480). Notre exploration assez exhaustive de différents marqueurs de sénescence (SA- β Gal, SASP, SAHF) indique que, bien que les DTC issues des différentes lignées présentent quelques marqueurs associés à la sénescence, cet état particulier semble être partiel ou peu profond. Ceci pourrait être le reflet d'un état transitoire plus ou moins prononcé selon les lignées, mais réversible puisque ces caractéristiques de sénescence sont progressivement perdues très rapidement après enlèvement du traitement et au cours du développement des clones prolifératifs sous traitement. La sénescence induite par les thérapies ou TIS est un processus largement mis en évidence sous traitements anti-cancéreux et sous thérapies ciblées. De plus en plus d'arguments suggèrent que l'échappement à ce processus de sénescence pourrait être impliqué dans les résistances adaptatives aux thérapies anti-tumorales, d'où l'utilisation du terme de pseudo-sénescence (513). Ainsi, nous émettons l'hypothèse que sous EGFR-TKI les cellules entrent dans un état de pseudo-sénescence qui est réversible.

Néanmoins il reste à prouver que les cellules résistantes sont bel et bien issues de ces cellules pseudo-sénescences. Un argument en faveur de cette hypothèse est que la levée du traitement induit une reprise de prolifération de cellules au sein desquelles le marquage SA- β Gal persiste transitoirement. De plus, les cellules HCC4006 au stade DTC sont quasiment toutes positives au marquage SA- β Gal et pourtant elles évoluent en clones résistants prolifératifs sous traitement, il semble donc peu probable que l'infime partie de cellules SA- β Gal négatives soit à l'origine de cette reprise proliférative. Afin de valider cette hypothèse nous vérifierons que les cellules qui progressent en phase S/G2 du cycle après un blocage en G1 sont positives au marquage SA- β Gal. Par ailleurs, nous souhaitons mettre au point un co-marquage de la SA- β Gal et d'un marqueur de prolifération (incorporation d'EdU) sur nos cellules traitées par EGFR-TKIs, comme ceci a été réalisé dans d'autres modèles (773).

De plus si cette hypothèse est vraie, l'association d'un traitement sénolytique au traitement par EGFR-TKI devrait d'empêcher la rechute tumorale. Or nos résultats menés avec le vénétoclax, inhibiteur spécifique de BCL-2, montrent que ce n'est pas le cas. Celui-ci n'empêche ni ne retarde l'émergence de clones résistants prolifératifs, indiquant que soit les cellules sous EGFR-TKI sont dans un état de pseudo-sénescence qui est insensible aux sénolytiques, soit le vénétoclax n'est pas un sénolytique assez puissant. En effet, des études montrent que le vénétoclax n'est pas un sénolytique puissant *in vitro*, contrairement au navitoclax (inhibiteur de BCL-2 BCL-xl et BCL-w) qui possède un spectre plus large potentiellement nécessaire à une lyse efficace des cellules sénescences (774). Ainsi, nous testerons l'efficacité de l'association d'EGFR-TKIs avec d'autres sénolytiques tels que le navitoclax ou l'association dasatinib + quercétine (le dasatinib étant un inhibiteur multi-cible de BCR-ABL, SRC, c-KIT, PDGFR et du récepteur de l'éphrine ; et la quercétine étant un agent anti-inflammatoire et anti-oxydant) (775).

L'arrêt du cycle en lien avec la sénescence est classiquement orchestré par deux voies de signalisation principales : la voie médiée par p53/p21 et la voie médiée par p15-p16/RB (491). Nos résultats indiquent que l'arrêt général du cycle observé chez la majeure partie de la population cellulaire sous EGFR-TKI s'accompagne d'une altération de la voie de la protéine du rétinoblastome et de la protéine inhibitrice de CDK p27 comme cela a été également montré par d'autres travaux sous EGFR-TKIs (525). De plus, nous avons montré que l'altération de cette voie est également observée sous traitement avec d'autres inhibiteurs de la voie des MAP kinases dans d'autres contextes tumoraux (vémurafénib dans des modèles de mélanomes porteurs de mutations activatrices de *BRAF* et

crizotinib dans des modèles de CBNPC présentant des réarrangements de *ALK*). Il est à noter que dans trois de nos lignées (HCC4006, HCC2935 et H3255) les locus *CDKN2A* et *CDKN2B* codant respectivement p14/p16 et p15 sont délétés, suggérant que l'arrêt du cycle observé dans nos lignées fait appel à une voie non classique impliquant p27 et RB. Cependant, nous n'avons pas ou peu exploré la voie p21/p53 et notamment l'état de phosphorylation de p53 qui est décrit pour influencer sur son activité de façon plus significative que son expression (492).

Il est à noter également que sous EGFR-TKI, nous observons une diminution de la forme phosphorylée de RB mais également de sa forme totale. Or l'expression des ARNm de RB que nous avons analysée par RTqPCR n'est pas impactée par le traitement par EGFR-TKI. Ceci pourrait suggérer une instabilité de la forme non phosphorylée de RB sous traitement.

La perte de RB est aussi connue comme étant un mécanisme engagé dans la transformation histologique des CBNPC en CBPC (191). Pour évaluer l'hypothèse d'une transformation histologique sous EGFR-TKI, il serait donc intéressant d'explorer d'autres marqueurs de CBPC dans nos modèles cellulaires sous EGFR-TKIs tels que des marqueurs neuroendocriniens comme la synaptophysine ou la chromogranine A (396).

Nos résultats *in vivo* sur des PDX montrent une inhibition de la phosphorylation de RB et une surexpression de p27 lors de la phase de tolérance cette dernière persistant au moment de la rechute tumorale. Nous avons observé que p27 était phosphorylée au niveau de la serine 10, ce qui pourrait affecter sa localisation et son activité subcellulaire comme cela a été précédemment signalé dans les cellules traitées au gefitinib (776). Ainsi, nous envisageons d'explorer la localisation subcellulaire de p27 par immunofluorescence. De plus, l'implication réelle de cette modification post-traductionnelle dans l'acquisition d'un état de tolérance aux médicaments reste à élucider. Cependant, nous n'observons pas non plus de réexpression de la forme phosphorylée de RB. Ainsi, une voie alternative à celle de la protéine du rétinoblastome pourrait être impliquée dans la reprise proliférative sous traitement.

Nos analyses du cycle cellulaire en temps réel sous traitement nous ont permis de mettre en évidence un processus de polyploïdisation des cellules par endoréplication. Ce phénomène a été rapporté comme étant un mécanisme d'échappement à la sénescence induite par les thérapies (542–545). Ainsi, nos résultats indiquent que sous EGFR-TKI les cellules acquièrent un phénotype pseudo-sénéscent qui pour certaines s'accompagne d'un processus de polyploïdisation qui pourrait contribuer à la sortie de sénescence et à la reprise proliférative occasionnant la rechute tumorale. Cependant, nous n'avons pas quantifié l'occurrence de ce processus sous EGFR-TKIs ni le devenir des cellules polyploïdes et notamment leur implication dans l'émergence de clones résistants prolifératifs sous traitement.

Par ailleurs, ces mêmes analyses ont montré que, sous traitement, bon nombre de cellules qui progressent en phase S/G2 du cycle après un blocage en G1 accomplissent des divisions asymétriques. Ces processus sont compatibles avec l'acquisition de caractéristiques souches par les cellules sous EGFR-TKIs (270,451).

Nos analyses transcriptomiques ont révélé que la signature moléculaire de transition épithélio-mésenchymateuse (TEM), processus souvent décrit comme impliqué dans la résistance aux EGFR-TKI (777,465), est faiblement présente au stade DTC alors qu'elle est ensuite fortement surreprésentée dans les clones prolifératifs. Ceci est confirmé par nos analyses de l'expression protéique de marqueurs spécifiques de TEM, tels que la N-cadhérine ainsi que les facteurs de transcription associés à la TEM, SNAIL et SLUG. Ceci suggère que la TEM n'est pas un processus universel de « tolérance » mais serait plutôt associée à la phase de rechute. De même, la levée du traitement au stade DTC provoquant la reprise de prolifération s'accompagne de l'induction de certains facteurs de TEM. Ces résultats restent néanmoins à valider en analysant l'expression de gènes cibles de la TEM par RTqPCR dans les différentes phases. Ainsi, nous émettons l'hypothèse que l'état de pseudo-sénescence semble plutôt prédisposer à l'acquisition d'un phénotype mésenchymateux par les cellules, synonyme d'agressivité tumorale, lorsque la résistance est déjà instaurée.

L'acquisition de marqueurs souches a été rapportée comme étant un marqueur du stade de tolérance sous EGFR-TKI (270,451,525). Nos résultats de transcriptomique indiquent que l'acquisition de caractéristiques souches sous EGFR-TKI semble également peu marquée au stade DTC. Une évaluation par RTqPCR de l'expression de différents marqueurs souches au sein des clones résistants prolifératifs sous traitement est en cours afin de déterminer si, comme la TEM, la dédifférenciation cellulaire *via* l'acquisition de caractères souches est une caractéristique de résistance plutôt que de tolérance au traitement par EGFR-TKIs. Cette hypothèse est d'autant plus importante à vérifier que l'échappement de sénescence s'accompagne de l'apparition de caractéristiques souches (546,547).

Enfin, des travaux antérieurs montrent l'engagement de processus épigénétiques dans la phase de tolérance sous EGFR-TKI avec notamment la mise en évidence d'un état chromatinien altéré montré par des modifications de la méthylation d'histones jouant un rôle dans l'ouverture de la chromatine et donc la transcription génique. De plus, ces travaux proposent d'inhiber cet état réprimé de la chromatine impliqué dans la survie des DTC *via* l'utilisation d'inhibiteurs d'histones désacétylases (HDAC) (270,450). Nos résultats préliminaires à ce sujet confirment ces modifications des histones dans nos lignées traitées par EGFR-TKI ou laissées à haut niveau de confluence, mais également traitées par palbociclib (inhibiteur de CDK4/6), suggérant que ces mécanismes pourraient être mis en jeu dans d'autres contextes d'inhibition du cycle cellulaire. Ces résultats sont à consolider et compléter notamment en explorant également l'engagement d'acteurs tels que des histones méthyltransférases et des HDAC dans ce processus, certains de ces acteurs étant également impliqués dans la régulation de la voie RB (778). D'autant plus que d'autres de nos résultats, non montrés dans ce manuscrit, indiquent que la trichostatine A (TSA), traitement inhibiteur de HDAC, associé à un traitement par EGFR-TKI, possède un effet limité sur la lignée HCC4006 alors qu'il est efficace sur les autres lignées, ce qui laisse supposer l'implication d'autres régulateurs des processus épigénétiques dans la survie des cellules tolérantes aux EGFR-TKIs.

Par ailleurs, nos résultats montrent la présence de signatures moléculaires associées à la contractilité cellulaire lors de l'état de tolérance sous EGFR-TKI associée à la présence de fibres de stress d'actine dans l'ensemble des lignées après quelques jours de traitement par EGFR-TKI.

En lien avec le fait que la polymérisation de l'actine est un processus étroitement régulé par l'activation des RhoGTPases (779) et que nos précédents travaux montrent une implication de la GTPase RhoB dans la résistance aux EGFR-TKI chez les patients (266), nous avons mis en évidence que RhoB est surexprimé et suractivé précocement sous EGFR-TKI ainsi qu'au stade DTC dans les différentes lignées cellulaires. L'analyse GSEA des données de transcriptomique en cellule unique des cellules PC9 traitées par l'osimertinib en association avec un inhibiteur de MEK publiées par Kurppa *et al* en 2020 (465) montre également une induction de l'expression de RhoB, mais également de RhoE, parmi toutes les Rho GTPases étudiées. La protéine RhoE, aussi connue sous le nom de Rnd3, est une Rho GTPase de la superfamille Ras et de la sous-famille Rnd. Comme les autres membres de sa sous-famille, il s'agit d'une GTPase dite atypique, c'est-à-dire qu'elle est constitutivement retrouvée sous sa forme active, liée au GTP. Par ailleurs, tout comme RhoB, elle peut avoir une fonction pro-tumorigène ou suppresseur de tumeur selon le contexte cellulaire et le type de cancer (780). Néanmoins dans les cancers bronchiques RhoE semble jouer un rôle suppresseur de tumeur (781,782). A ce jour, nous n'avons pas poursuivi l'exploration de l'implication de RhoE dans les processus de résistance aux EGFR-TKIs.

De plus, nous avons observé que l'inhibition pharmacologique des membres de la sous-famille Rho par un traitement à l'exoenzyme C3 transférase (ou TatC3) ou bien l'inhibition spécifique de RhoB par des siARN permettaient de prévenir l'apparition des fibres de stress induites par un traitement par EGFR-TKI, et de façon plus importante de prévenir l'émergence de clones résistants dans tous nos modèles expérimentaux. Ces résultats suggèrent qu'une des fonctions de RhoB pourrait être un élément déterminant dans l'acquisition de résistances aux EGFR-TKI. Parmi ces fonctions de RhoB, nos résultats laissent supposer un engagement de la fonction de RhoB dans la réorganisation du

cytosquelette d'actine (557) mais d'autres fonctions peuvent également être évoquées telles que le rôle de RhoB dans la régulation du trafic cellulaire notamment de l'EGFR (634,621,597,623), l'implication de RhoB dans l'instabilité génétique et les mécanismes de réparation des cassures double brins de l'ADN par recombinaison homologue (602,659) ou encore le rôle de RhoB dans le pouvoir migratoire et invasif des cellules tumorales bronchiques (645,668,783). Nous sommes par ailleurs en train de générer des cellules déficientes en RhoB et en RhoE *via* la méthode CRISPR/Cas9 afin de vérifier l'implication de ces GTPases dans le processus de tolérance.

Il n'existe à ce jour aucun inhibiteur spécifique de RhoB utilisable en clinique. Néanmoins, l'activité de RhoB dépend fortement de son état de prénylation et notamment sa farnésylation. Nos résultats montrent que le co-traitement par l'EGFR-TKI avec un inhibiteur de farnéyltransférase, le tipifarnib, permet de prévenir l'émergence de clones résistants chez l'ensemble des lignées testées.

Afin de valider l'implication de RhoB dans l'effet du FTI, dans un premier temps, nous analyserons l'effet du tipifarnib dans des lignées cellulaires surexprimant une construction de RhoB myristoylé dont l'activité est indépendante de son état de prénylation. Nous testerons également l'effet d'un traitement avec un anticorps bloquant spécifiquement l'activation de RHOB développé au laboratoire (784). De plus, nous sommes en train de réaliser une analyse comparée par séquençage de l'ARN d'un traitement combiné (osimertinib associé au tipifarnib) versus les mono-traitements (osimertinib ou tipifarnib) afin de déterminer les signatures moléculaires responsables de l'effet du tipifarnib sur les DTC et d'identifier les protéines farnésylées ciblées par le traitement par tipifarnib dans nos modèles.

Enfin, l'association osimertinib + tipifarnib est en train d'être validée *in vivo* sur des modèles de xénogreffes des lignées PC9 et HCC4006 ainsi que sur le modèle de PDX EGFR^{L858R/T790M}. Nous souhaitons par ailleurs tester, *in vitro* et *in vivo*, l'adjonction d'un traitement par tipifarnib à d'autres inhibiteurs de tyrosine kinase tels que l'alectinib dans le traitement des cancers bronchiques porteurs de réarrangements de *ALK* ou le vémurafénib/tramétinib dans le traitement des mélanomes porteurs de la mutation *BRAF*^{V600E}. Ceci permettrait d'élargir l'indication du tipifarnib en association avec plusieurs types d'inhibiteurs de tyrosine kinase.

La perspective de ces travaux menés *in vitro* principalement serait également de caractériser cet état de tolérance que l'on apparente à la notion de maladie résiduelle chez des patients atteints de cancers bronchiques porteurs de mutations de l'EGFR et traités par EGFR-TKI. Pour cela, nous souhaitons rechercher sur des cellules tumorales circulantes isolées de patients à différents moments du traitement (au moment de l'induction du traitement, au moment où la réponse clinique et radiologique est la meilleure et au moment de la rechute tumorale) notamment l'expression de marqueurs de sénescence et de marqueurs de la transition épithélio-mésenchymateuse, mais également des marqueurs que nous mettrons en évidence grâce à nos expérimentations de séquençage de l'ARN sur cellules uniques issues de cultures cellulaires mais aussi grâce à nos expérimentations *in vivo* sur notre modèle de PDX. L'objectif de ces caractérisations menées sur des échantillons de patients serait d'une part de mettre en évidence le phénotype DTC pour la première fois chez les patients, et d'autre part d'identifier des marqueurs précoces de rechute tumorale afin d'adapter la stratégie thérapeutique le plus précocement possible avant l'instauration d'une rechute clinique et radiologique avérée.

RÉFÉRENCES

BIBLIOGRAPHIQUES

1. Ferlay J, Colombet M, Soerjomataram I, Dyba T, Randi G, Bettio M, et al. Cancer incidence and mortality patterns in Europe: Estimates for 40 countries and 25 major cancers in 2018. *European Journal of Cancer*. nov 2018;103:356-87.
2. De Angelis R, Sant M, Coleman MP, Francisci S, Baili P, Pierannunzio D, et al. Cancer survival in Europe 1999–2007 by country and age: results of EUROCARE-5—a population-based study. *The Lancet Oncology*. janv 2014;15(1):23-34.
3. Francisci S, Minicozzi P, Pierannunzio D, Ardanaz E, Eberle A, Grimsrud TK, et al. Survival patterns in lung and pleural cancer in Europe 1999–2007: Results from the EUROCARE-5 study. *European Journal of Cancer*. oct 2015;51(15):2242-53.
4. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*. 2018;68(6):394-424.
5. Allemani C, Weir HK, Carreira H, Harewood R, Spika D, Wang X-S, et al. Global surveillance of cancer survival 1995–2009: analysis of individual data for 25 676 887 patients from 279 population-based registries in 67 countries (CONCORD-2). *The Lancet*. mars 2015;385(9972):977-1010.
6. Cheng T-YD, Cramb SM, Baade PD, Youlten DR, Nwogu C, Reid ME. The International Epidemiology of Lung Cancer: Latest Trends, Disparities, and Tumor Characteristics. *Journal of Thoracic Oncology*. oct 2016;11(10):1653-71.
7. Walters S, Maringe C, Coleman MP, Peake MD, Butler J, Young N, et al. Lung cancer survival and stage at diagnosis in Australia, Canada, Denmark, Norway, Sweden and the UK: a population-based study, 2004-2007. *Thorax*. juin 2013;68(6):551-64.
8. Ozlü T, Bülbül Y. Smoking and lung cancer. *Tuberk Toraks*. 2005;53(2):200-9.
9. Sasco AJ, Secretan MB, Straif K. Tobacco smoking and cancer: a brief review of recent epidemiological evidence. *Lung Cancer*. août 2004;45:S3-9.
10. Zhong L, Goldberg MS, Parent ME, Hanley JA. Exposure to environmental tobacco smoke and the risk of lung cancer: a meta-analysis. *Lung Cancer*. janv 2000;27(1):3-18.
11. Darby S, Hill D, Auvinen A, Barros-Dios JM, Baysson H, Bochicchio F, et al. Radon in homes and risk of lung cancer: collaborative analysis of individual data from 13 European case-control studies. *BMJ*. 29 janv 2005;330(7485):223.
12. Ajrouche R, Roudier C, Cléro E, Ielsch G, Gay D, Guillevic J, et al. Quantitative health impact of indoor radon in France. *Radiat Environ Biophys*. août 2018;57(3):205-14.
13. Attfield MD, Schleiff PL, Lubin JH, Blair A, Stewart PA, Vermeulen R, et al. The Diesel Exhaust in Miners study: a cohort mortality study with emphasis on lung cancer. *J Natl Cancer Inst*. 6 juin 2012;104(11):869-83.
14. Silverman DT, Samanic CM, Lubin JH, Blair AE, Stewart PA, Vermeulen R, et al. The Diesel Exhaust in Miners study: a nested case-control study of lung cancer and diesel exhaust. *J Natl Cancer Inst*. 6 juin 2012;104(11):855-68.
15. Laden F, Hart JE, Eschenroeder A, Smith TJ, Garshick E. Historical estimation of diesel exhaust exposure in a cohort study of U.S. railroad workers and lung cancer. *Cancer Causes Control*. sept 2006;17(7):911-9.
16. Garshick E, Laden F, Hart JE, Rosner B, Davis ME, Eisen EA, et al. Lung cancer and vehicle exhaust in trucking industry workers. *Environ Health Perspect*. oct 2008;116(10):1327-32.
17. Garshick E, Laden F, Hart JE, Davis ME, Eisen EA, Smith TJ. Lung cancer and elemental carbon exposure in trucking industry workers. *Environ Health Perspect*. sept 2012;120(9):1301-6.
18. Raaschou-Nielsen O, Andersen ZJ, Beelen R, Samoli E, Stafoggia M, Weinmayr G, et al. Air pollution and lung cancer incidence in 17 European cohorts: prospective analyses from the European Study of Cohorts for Air Pollution Effects (ESCAPE). *The Lancet Oncology*. août 2013;14(9):813-22.
19. Khuder SA. Effect of cigarette smoking on major histological types of lung cancer: a meta-analysis. *Lung Cancer*. mars 2001;31(2-3):139-48.



20. Burns DM, Anderson CM, Gray N. Do changes in cigarette design influence the rise in adenocarcinoma of the lung? *Cancer Causes Control*. janv 2011;22(1):13-22.
21. Thun MJ, Lally CA, Flannery JT, Calle EE, Flanders WD, Heath CW. Cigarette smoking and changes in the histopathology of lung cancer. *J Natl Cancer Inst*. 5 nov 1997;89(21):1580-6.
22. Lortet-Tieulent J, Soerjomataram I, Ferlay J, Rutherford M, Weiderpass E, Bray F. International trends in lung cancer incidence by histological subtype: Adenocarcinoma stabilizing in men but still increasing in women. *Lung Cancer*. avr 2014;84(1):13-22.
23. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012: Globocan 2012. *Int J Cancer*. 1 mars 2015;136(5):E359-86.
24. Lewis DR, Check DP, Caporaso NE, Travis WD, Devesa SS. US lung cancer trends by histologic type. *Cancer*. 15 sept 2014;120(18):2883-92.
25. Travis WD, Brambilla E, Nicholson AG, Yatabe Y, Austin JHM, Beasley MB, et al. The 2015 World Health Organization Classification of Lung Tumors. *Journal of Thoracic Oncology*. sept 2015;10(9):1243-60.
26. Beasley MB, Brambilla E, Travis WD. The 2004 World Health Organization classification of lung tumors. *Seminars in Roentgenology*. avr 2005;40(2):90-7.
27. Travis WD, Brambilla E, Noguchi M, Nicholson AG, Geisinger KR, Yatabe Y, et al. International association for the study of lung cancer/american thoracic society/european respiratory society international multidisciplinary classification of lung adenocarcinoma. *J Thorac Oncol*. févr 2011;6(2):244-85.
28. Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive molecular profiling of lung adenocarcinoma. *Nature*. 31 juill 2014;511(7511):543-50.
29. Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive genomic characterization of squamous cell lung cancers. *Nature*. 27 sept 2012;489(7417):519-25.
30. George J, Lim JS, Jang SJ, Cun Y, Ozretić L, Kong G, et al. Comprehensive genomic profiles of small cell lung cancer. *Nature*. 6 août 2015;524(7563):47-53.
31. Calvayrac O, Pradines A, Pons E, Mazières J, Guibert N. Molecular biomarkers for lung adenocarcinoma. *European Respiratory Journal*. avr 2017;49(4):1601734.
32. Barlesi F, Mazieres J, Merlio J-P, Debieuvre D, Mosser J, Lena H, et al. Routine molecular profiling of patients with advanced non-small-cell lung cancer: results of a 1-year nationwide programme of the French Cooperative Thoracic Intergrup (IFCT). *The Lancet*. avr 2016;387(10026):1415-26.
33. Goldstraw P, Chansky K, Crowley J, Rami-Porta R, Asamura H, Eberhardt WEE, et al. The IASLC Lung Cancer Staging Project: Proposals for Revision of the TNM Stage Groupings in the Forthcoming (Eighth) Edition of the TNM Classification for Lung Cancer. *Journal of Thoracic Oncology*. janv 2016;11(1):39-51.
34. Downward J. Targeting RAS signalling pathways in cancer therapy. *Nat Rev Cancer*. janv 2003;3(1):11-22.
35. Prior IA, Lewis PD, Mattos C. A comprehensive survey of Ras mutations in cancer. *Cancer Res*. 15 mai 2012;72(10):2457-67.
36. Riely GJ, Kris MG, Rosenbaum D, Marks J, Li A, Chitale DA, et al. Frequency and Distinctive Spectrum of KRAS Mutations in Never Smokers with Lung Adenocarcinoma. *Clinical Cancer Research*. 15 sept 2008;14(18):5731-4.
37. Fiala O, Pesek M, Finek J, Benesova L, Belsanova B, Minarik M. The dominant role of G12C over other KRAS mutation types in the negative prediction of efficacy of epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors in non-small cell lung cancer. *Cancer Genetics*. janv 2013;206(1-2):26-31.
38. Dearden S, Stevens J, Wu Y-L, Blowers D. Mutation incidence and coincidence in non small-cell lung cancer: meta-analyses by ethnicity and histology (mutMap). *Ann Oncol*. sept 2013;24(9):2371-6.

39. Porta M, Crous-Bou M, Wark PA, Vineis P, Real FX, Malats N, et al. Cigarette smoking and K-ras mutations in pancreas, lung and colorectal adenocarcinomas: Etiopathogenic similarities, differences and paradoxes. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*. sept 2009;682(2-3):83-93.
40. Couraud S, Zalcmán G, Milleron B, Morin F, Souquet P-J. Lung cancer in never smokers – A review. *European Journal of Cancer*. juin 2012;48(9):1299-311.
41. Karnoub AE, Weinberg RA. Ras oncogenes: split personalities. *Nat Rev Mol Cell Biol*. juill 2008;9(7):517-31.
42. Cox AD, Fesik SW, Kimmelman AC, Luo J, Der CJ. Drugging the undruggable RAS: Mission possible? *Nat Rev Drug Discov*. nov 2014;13(11):828-51.
43. Canon J, Rex K, Saiki AY, Mohr C, Cooke K, Bagal D, et al. The clinical KRAS(G12C) inhibitor AMG 510 drives anti-tumour immunity. *Nature*. nov 2019;575(7781):217-23.
44. Hallin J, Engstrom LD, Hargis L, Calinisan A, Aranda R, Briere DM, et al. The KRASG12C Inhibitor MRTX849 Provides Insight toward Therapeutic Susceptibility of KRAS-Mutant Cancers in Mouse Models and Patients. *Cancer Discov*. janv 2020;10(1):54-71.
45. Morris SW, Kirstein MN, Valentine MB, Dittmer KG, Shapiro DN, Saltman DL, et al. Fusion of a kinase gene, ALK, to a nucleolar protein gene, NPM, in non-Hodgkin's lymphoma. *Science*. 4 mars 1994;263(5151):1281-4.
46. Orscheschek K, Merz H, Hell J, Feller AC, Bartels H, Binder T. Large-cell anaplastic lymphoma-specific translocation (t[2;5] [p23;q35]) in Hodgkin's disease: indication of a common pathogenesis? *The Lancet*. janv 1995;345(8942):87-90.
47. Choi YL, Takeuchi K, Soda M, Inamura K, Togashi Y, Hatano S, et al. Identification of novel isoforms of the EML4-ALK transforming gene in non-small cell lung cancer. *Cancer Res*. 1 juill 2008;68(13):4971-6.
48. Soda M, Choi YL, Enomoto M, Takada S, Yamashita Y, Ishikawa S, et al. Identification of the transforming EML4-ALK fusion gene in non-small-cell lung cancer. *Nature*. 2 août 2007;448(7153):561-6.
49. Takeuchi K, Choi YL, Togashi Y, Soda M, Hatano S, Inamura K, et al. KIF5B-ALK, a Novel Fusion Oncokinase Identified by an Immunohistochemistry-based Diagnostic System for ALK-positive Lung Cancer. *Clinical Cancer Research*. 1 mai 2009;15(9):3143-9.
50. Shaw AT, Yeap BY, Mino-Kenudson M, Digumarthy SR, Costa DB, Heist RS, et al. Clinical features and outcome of patients with non-small-cell lung cancer who harbor EML4-ALK. *J Clin Oncol*. 10 sept 2009;27(26):4247-53.
51. Ou S-HI, Kwak EL, Siwak-Tapp C, Dy J, Bergethon K, Clark JW, et al. Activity of Crizotinib (PF02341066), a Dual Mesenchymal-Epithelial Transition (MET) and Anaplastic Lymphoma Kinase (ALK) Inhibitor, in a Non-small Cell Lung Cancer Patient with De Novo MET Amplification. *Journal of Thoracic Oncology*. mai 2011;6(5):942-6.
52. Peters S, Camidge DR, Shaw AT, Gadgeel S, Ahn JS, Kim D-W, et al. Alectinib versus Crizotinib in Untreated ALK-Positive Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med*. 31 2017;377(9):829-38.
53. Zou HY, Friboulet L, Kodack DP, Engstrom LD, Li Q, West M, et al. PF-06463922, an ALK/ROS1 Inhibitor, Overcomes Resistance to First and Second Generation ALK Inhibitors in Preclinical Models. *Cancer Cell*. 13 juill 2015;28(1):70-81.
54. Gainor JF, Dardaei L, Yoda S, Friboulet L, Leshchiner I, Katayama R, et al. Molecular Mechanisms of Resistance to First- and Second-Generation ALK Inhibitors in ALK-Rearranged Lung Cancer. *Cancer Discov*. 2016;6(10):1118-33.
55. Recondo G, Mezquita L, Facchinetti F, Planchard D, Gazzah A, Bigot L, et al. Diverse Resistance Mechanisms to the Third-Generation ALK Inhibitor Lorlatinib in ALK-Rearranged Lung Cancer. *Clin Cancer Res*. 01 2020;26(1):242-55.
56. Thai AA, Solomon BJ. Treatment of ALK-positive nonsmall cell lung cancer: recent advances. *Current Opinion in Oncology*. mars 2018;30(2):84-91.
57. Sakai K, Aoki S, Matsumoto K. Hepatocyte growth factor and Met in drug discovery. *Journal of Biochemistry*. 1 mai 2015;157(5):271-84.

58. Awad MM, Oxnard GR, Jackman DM, Savukoski DO, Hall D, Shivdasani P, et al. *MET* Exon 14 Mutations in Non-Small-Cell Lung Cancer Are Associated With Advanced Age and Stage-Dependent *MET* Genomic Amplification and c-Met Overexpression. *JCO*. 1 mars 2016;34(7):721-30.
59. Frampton GM, Ali SM, Rosenzweig M, Chmielecki J, Lu X, Bauer TM, et al. Activation of MET via diverse exon 14 splicing alterations occurs in multiple tumor types and confers clinical sensitivity to MET inhibitors. *Cancer Discov*. août 2015;5(8):850-9.
60. Kong-Beltran M, Seshagiri S, Zha J, Zhu W, Bhawe K, Mendoza N, et al. Somatic Mutations Lead to an Oncogenic Deletion of Met in Lung Cancer. *Cancer Res*. 1 janv 2006;66(1):283-9.
61. Okuda K, Sasaki H, Yukiue H, Yano M, Fujii Y. Met gene copy number predicts the prognosis for completely resected non-small cell lung cancer. *Cancer Sci*. nov 2008;99(11):2280-5.
62. Onozato R, Kosaka T, Kuwano H, Sekido Y, Yatabe Y, Mitsudomi T. Activation of MET by Gene Amplification or by Splice Mutations Deleting the Juxtamembrane Domain in Primary Resected Lung Cancers. *Journal of Thoracic Oncology*. janv 2009;4(1):5-11.
63. Schrock AB, Frampton GM, Suh J, Chalmers ZR, Rosenzweig M, Erlich RL, et al. Characterization of 298 Patients with Lung Cancer Harboring MET Exon 14 Skipping Alterations. *Journal of Thoracic Oncology*. sept 2016;11(9):1493-502.
64. Tong JH, Yeung SF, Chan AWH, Chung LY, Chau SL, Lung RWM, et al. MET Amplification and Exon 14 Splice Site Mutation Define Unique Molecular Subgroups of Non-Small Cell Lung Carcinoma with Poor Prognosis. *Clinical Cancer Research*. 15 juin 2016;22(12):3048-56.
65. Peschard P, Fournier TM, Lamorte L, Naujokas MA, Band H, Langdon WY, et al. Mutation of the c-Cbl TKB domain binding site on the Met receptor tyrosine kinase converts it into a transforming protein. *Mol Cell*. nov 2001;8(5):995-1004.
66. Cappuzzo F, Marchetti A, Skokan M, Rossi E, Gajapathy S, Felicioni L, et al. Increased MET gene copy number negatively affects survival of surgically resected non-small-cell lung cancer patients. *J Clin Oncol*. 1 avr 2009;27(10):1667-74.
67. Ma PC, Kijima T, Maulik G, Fox EA, Sattler M, Griffin JD, et al. c-MET mutational analysis in small cell lung cancer: novel juxtamembrane domain mutations regulating cytoskeletal functions. *Cancer Res*. 1 oct 2003;63(19):6272-81.
68. Drilon A, Cappuzzo F, Ou S-HI, Camidge DR. Targeting MET in Lung Cancer: Will Expectations Finally Be MET? *Journal of Thoracic Oncology*. janv 2017;12(1):15-26.
69. Paik PK, Drilon A, Fan P-D, Yu H, Rekhtman N, Ginsberg MS, et al. Response to MET Inhibitors in Patients with Stage IV Lung Adenocarcinomas Harboring MET Mutations Causing Exon 14 Skipping. *Cancer Discovery*. 1 août 2015;5(8):842-9.
70. Reungwetwattana T, Liang Y, Zhu V, Ou S-HI. The race to target MET exon 14 skipping alterations in non-small cell lung cancer: The Why, the How, the Who, the Unknown, and the Inevitable. *Lung Cancer*. janv 2017;103:27-37.
71. Wu Y-L, Zhang L, Kim D-W, Liu X, Lee DH, Yang JC-H, et al. Phase Ib/II Study of Capmatinib (INC280) Plus Gefitinib After Failure of Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) Inhibitor Therapy in Patients With EGFR-Mutated, MET Factor-Dysregulated Non-Small-Cell Lung Cancer. *J Clin Oncol*. 01 2018;36(31):3101-9.
72. Garnett MJ, Marais R. Guilty as charged: B-RAF is a human oncogene. *Cancer Cell*. oct 2004;6(4):313-9.
73. Pratilas CA, Hanrahan AJ, Halilovic E, Persaud Y, Soh J, Chitale D, et al. Genetic predictors of MEK dependence in non-small cell lung cancer. *Cancer Res*. 15 nov 2008;68(22):9375-83.
74. Paik PK, Arcila ME, Fara M, Sima CS, Miller VA, Kris MG, et al. Clinical characteristics of patients with lung adenocarcinomas harboring BRAF mutations. *J Clin Oncol*. 20 mai 2011;29(15):2046-51.
75. Leonetti A, Facchinetti F, Rossi G, Minari R, Conti A, Friboulet L, et al. BRAF in non-small cell lung cancer (NSCLC): Pickaxing another brick in the wall. *Cancer Treat Rev*. mai 2018;66:82-94.

76. Planchard D, Smit EF, Groen HJM, Mazieres J, Besse B, Helland Å, et al. Dabrafenib plus trametinib in patients with previously untreated BRAFV600E-mutant metastatic non-small-cell lung cancer: an open-label, phase 2 trial. *The Lancet Oncology*. oct 2017;18(10):1307-16.
77. Planchard D, Besse B, Groen HJM, Souquet P-J, Quoix E, Baik CS, et al. Dabrafenib plus trametinib in patients with previously treated BRAFV600E-mutant metastatic non-small cell lung cancer: an open-label, multicentre phase 2 trial. *The Lancet Oncology*. juill 2016;17(7):984-93.
78. Planchard D, Kim TM, Mazieres J, Quoix E, Riely G, Barlesi F, et al. Dabrafenib in patients with BRAF(V600E)-positive advanced non-small-cell lung cancer: a single-arm, multicentre, open-label, phase 2 trial. *Lancet Oncol*. 2016;17(5):642-50.
79. Alvarez JGB, Otterson GA. Agents to treat BRAF-mutant lung cancer. *Drugs Context*. 2019;8:212566.
80. Mazieres J, Cropet C, Montané L, Barlesi F, Souquet PJ, Quantin X, et al. Vemurafenib in non-small-cell lung cancer patients with BRAFV600 and BRAFnonV600 mutations. *Ann Oncol*. févr 2020;31(2):289-94.
81. Vanhaesebroeck B, Guillermet-Guibert J, Graupera M, Bilanges B. The emerging mechanisms of isoform-specific PI3K signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol*. mai 2010;11(5):329-41.
82. Thorpe LM, Yuzugullu H, Zhao JJ. PI3K in cancer: divergent roles of isoforms, modes of activation and therapeutic targeting. *Nat Rev Cancer*. janv 2015;15(1):7-24.
83. Pérez-Ramírez C, Cañadas-Garre M, Molina MÁ, Faus-Dáder MJ, Calleja-Hernández MÁ. PTEN and PI3K/AKT in non-small-cell lung cancer. *Pharmacogenomics*. nov 2015;16(16):1843-62.
84. Petersen S, Wolf G, Bockmühl U, Gellert K, Dietel M, Petersen I. Allelic loss on chromosome 10q in human lung cancer: association with tumour progression and metastatic phenotype. *Br J Cancer*. 1998;77(2):270-6.
85. Marsit CJ, Zheng S, Aldape K, Hinds PW, Nelson HH, Wiencke JK, et al. PTEN expression in non-small-cell lung cancer: evaluating its relation to tumor characteristics, allelic loss, and epigenetic alteration. *Hum Pathol*. juill 2005;36(7):768-76.
86. Forgacs E, Biesterveld EJ, Sekido Y, Fong K, Muneer S, Wistuba II, et al. Mutation analysis of the PTEN/MMAC1 gene in lung cancer. *Oncogene*. 24 sept 1998;17(12):1557-65.
87. Jin G, Kim MJ, Jeon H-S, Choi JE, Kim DS, Lee EB, et al. PTEN mutations and relationship to EGFR, ERBB2, KRAS, and TP53 mutations in non-small cell lung cancers. *Lung Cancer*. sept 2010;69(3):279-83.
88. Huang C-H, Mandelker D, Schmidt-Kittler O, Samuels Y, Velculescu VE, Kinzler KW, et al. The structure of a human p110alpha/p85alpha complex elucidates the effects of oncogenic PI3Kalpha mutations. *Science*. 14 déc 2007;318(5857):1744-8.
89. Miled N, Yan Y, Hon W-C, Perisic O, Zvelebil M, Inbar Y, et al. Mechanism of two classes of cancer mutations in the phosphoinositide 3-kinase catalytic subunit. *Science*. 13 juill 2007;317(5835):239-42.
90. Samuels Y, Velculescu VE. Oncogenic mutations of PIK3CA in human cancers. *Cell Cycle*. oct 2004;3(10):1221-4.
91. Bleeker FE, Felicioni L, Buttitta F, Lamba S, Cardone L, Rodolfo M, et al. AKT1(E17K) in human solid tumours. *Oncogene*. 18 sept 2008;27(42):5648-50.
92. Do H, Solomon B, Mitchell PL, Fox SB, Dobrovic A. Detection of the transforming AKT1 mutation E17K in non-small cell lung cancer by high resolution melting. *BMC Res Notes*. 16 mai 2008;1:14.
93. Malanga D, Scrima M, De Marco C, Fabiani F, De Rosa N, De Gisi S, et al. Activating E17K mutation in the gene encoding the protein kinase AKT1 in a subset of squamous cell carcinoma of the lung. *Cell Cycle*. 1 mars 2008;7(5):665-9.
94. Rekhtman N, Paik PK, Arcila ME, Tafe LJ, Oxnard GR, Moreira AL, et al. Clarifying the spectrum of driver oncogene mutations in biomarker-verified squamous carcinoma of lung: lack of EGFR/KRAS and presence of PIK3CA/AKT1 mutations. *Clin Cancer Res*. 15 févr 2012;18(4):1167-76.

95. Scrima M, De Marco C, Fabiani F, Franco R, Pirozzi G, Rocco G, et al. Signaling networks associated with AKT activation in non-small cell lung cancer (NSCLC): new insights on the role of phosphatidylinositol-3 kinase. *PLoS ONE*. 2012;7(2):e30427.
96. Fumarola C, Bonelli MA, Petronini PG, Alfieri RR. Targeting PI3K/AKT/mTOR pathway in non small cell lung cancer. *Biochemical Pharmacology*. août 2014;90(3):197-207.
97. Eng C. RET proto-oncogene in the development of human cancer. *J Clin Oncol*. janv 1999;17(1):380-93.
98. Wang R, Hu H, Pan Y, Li Y, Ye T, Li C, et al. RET fusions define a unique molecular and clinicopathologic subtype of non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol*. 10 déc 2012;30(35):4352-9.
99. Ferrara R, Auger N, Auclin E, Besse B. Clinical and Translational Implications of RET Rearrangements in Non-Small Cell Lung Cancer. *J Thorac Oncol*. 2018;13(1):27-45.
100. Ju YS, Lee W-C, Shin J-Y, Lee S, Bleazard T, Won J-K, et al. A transforming KIF5B and RET gene fusion in lung adenocarcinoma revealed from whole-genome and transcriptome sequencing. *Genome Res*. mars 2012;22(3):436-45.
101. Kohno T, Ichikawa H, Totoki Y, Yasuda K, Hiramoto M, Nammo T, et al. KIF5B-RET fusions in lung adenocarcinoma. *Nat Med*. 12 févr 2012;18(3):375-7.
102. Li F, Feng Y, Fang R, Fang Z, Xia J, Han X, et al. Identification of RET gene fusion by exon array analyses in « pan-negative » lung cancer from never smokers. *Cell Res*. mai 2012;22(5):928-31.
103. Lipson D, Capelletti M, Yelensky R, Otto G, Parker A, Jarosz M, et al. Identification of new ALK and RET gene fusions from colorectal and lung cancer biopsies. *Nat Med*. 12 févr 2012;18(3):382-4.
104. Takeuchi K, Soda M, Togashi Y, Suzuki R, Sakata S, Hatano S, et al. RET, ROS1 and ALK fusions in lung cancer. *Nat Med*. mars 2012;18(3):378-81.
105. Gautschi O, Milia J, Filleron T, Wolf J, Carbone DP, Owen D, et al. Targeting RET in Patients With RET-Rearranged Lung Cancers: Results From the Global, Multicenter RET Registry. *J Clin Oncol*. 1 mai 2017;35(13):1403-10.
106. Acquaviva J, Wong R, Charest A. The multifaceted roles of the receptor tyrosine kinase ROS in development and cancer. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*. janv 2009;1795(1):37-52.
107. Birchmeier C, Sharma S, Wigler M. Expression and rearrangement of the ROS1 gene in human glioblastoma cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. déc 1987;84(24):9270-4.
108. Stransky N, Cerami E, Schalm S, Kim JL, Lengauer C. The landscape of kinase fusions in cancer. *Nat Commun*. 10 sept 2014;5:4846.
109. Davies KD, Le AT, Theodoro MF, Skokan MC, Aisner DL, Berge EM, et al. Identifying and Targeting ROS1 Gene Fusions in Non-Small Cell Lung Cancer. *Clin Cancer Res*. 1 sept 2012;18(17):4570-9.
110. Rikova K, Guo A, Zeng Q, Possemato A, Yu J, Haack H, et al. Global survey of phosphotyrosine signaling identifies oncogenic kinases in lung cancer. *Cell*. 14 déc 2007;131(6):1190-203.
111. Bergethon K, Shaw AT, Ignatius Ou S-H, Katayama R, Lovly CM, McDonald NT, et al. ROS1 Rearrangements Define a Unique Molecular Class of Lung Cancers. *JCO*. 10 mars 2012;30(8):863-70.
112. Mazières J, Zalcman G, Crinò L, Biondani P, Barlesi F, Filleron T, et al. Crizotinib Therapy for Advanced Lung Adenocarcinoma and a ROS1 Rearrangement: Results From the EUROS1 Cohort. *JCO*. 20 mars 2015;33(9):992-9.
113. Shaw AT, Ou S-H, Bang Y-J, Camidge DR, Solomon BJ, Salgia R, et al. Crizotinib in ROS1-rearranged non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med*. 20 nov 2014;371(21):1963-71.
114. Shaw AT, Riely GJ, Bang Y-J, Kim D-W, Camidge DR, Solomon BJ, et al. Crizotinib in ROS1-rearranged advanced non-small-cell lung cancer (NSCLC): updated results, including overall survival, from PROFILE 1001. *Annals of Oncology*. juill 2019;30(7):1121-6.

115. Gainor JF, Tseng D, Yoda S, Dagogo-Jack I, Friboulet L, Lin JJ, et al. Patterns of Metastatic Spread and Mechanisms of Resistance to Crizotinib in ROS1-Positive Non-Small-Cell Lung Cancer. *JCO Precis Oncol.* 2017;2017.
116. Lin JJ, Shaw AT. Recent Advances in Targeting ROS1 in Lung Cancer. *Journal of Thoracic Oncology.* nov 2017;12(11):1611-25.
117. Yarden Y, Sliwkowski MX. Untangling the ErbB signalling network. *Nat Rev Mol Cell Biol.* févr 2001;2(2):127-37.
118. Stephens P, Hunter C, Bignell G, Edkins S, Davies H, Teague J, et al. Lung cancer: intragenic ERBB2 kinase mutations in tumours. *Nature.* 30 sept 2004;431(7008):525-6.
119. Shigematsu H, Takahashi T, Nomura M, Majmudar K, Suzuki M, Lee H, et al. Somatic mutations of the HER2 kinase domain in lung adenocarcinomas. *Cancer Res.* 1 mars 2005;65(5):1642-6.
120. Buttitta F, Barassi F, Fresu G, Felicioni L, Chella A, Paolizzi D, et al. Mutational analysis of the HER2 gene in lung tumors from Caucasian patients: mutations are mainly present in adenocarcinomas with bronchioloalveolar features. *Int J Cancer.* 1 déc 2006;119(11):2586-91.
121. Tomizawa K, Suda K, Onozato R, Kosaka T, Endoh H, Sekido Y, et al. Prognostic and predictive implications of HER2/ERBB2/neu gene mutations in lung cancers. *Lung Cancer.* oct 2011;74(1):139-44.
122. Arcila ME, Chaft JE, Nafa K, Roy-Chowdhuri S, Lau C, Zaidinski M, et al. Prevalence, Clinicopathologic Associations, and Molecular Spectrum of ERBB2 (HER2) Tyrosine Kinase Mutations in Lung Adenocarcinomas. *Clinical Cancer Research.* 15 sept 2012;18(18):4910-8.
123. Li C, Sun Y, Fang R, Han X, Luo X, Wang R, et al. Lung adenocarcinomas with HER2-activating mutations are associated with distinct clinical features and HER2/EGFR copy number gains. *J Thorac Oncol.* janv 2012;7(1):85-9.
124. Cardarella S, Ortiz TM, Joshi VA, Butaney M, Jackman DM, Kwiatkowski DJ, et al. The introduction of systematic genomic testing for patients with non-small-cell lung cancer. *J Thorac Oncol.* déc 2012;7(12):1767-74.
125. Mazières J, Peters S, Lepage B, Cortot AB, Barlesi F, Beau-Faller M, et al. Lung Cancer That Harbors an *HER2* Mutation: Epidemiologic Characteristics and Therapeutic Perspectives. *JCO.* 1 juin 2013;31(16):1997-2003.
126. Pillai RN, Behera M, Berry LD, Rossi MR, Kris MG, Johnson BE, et al. HER2 mutations in lung adenocarcinomas: A report from the Lung Cancer Mutation Consortium. *Cancer.* 1 nov 2017;123(21):4099-105.
127. Perera SA, Li D, Shimamura T, Raso MG, Ji H, Chen L, et al. HER2YVMA drives rapid development of adenosquamous lung tumors in mice that are sensitive to BIBW2992 and rapamycin combination therapy. *Proc Natl Acad Sci USA.* 13 janv 2009;106(2):474-9.
128. Ménard S, Casalini P, Campiglio M, Pupa S, Agresti R, Tagliabue E. HER2 overexpression in various tumor types, focussing on its relationship to the development of invasive breast cancer. *Ann Oncol.* 2001;12 Suppl 1:S15-19.
129. Pellegrini C, Falleni M, Marchetti A, Cassani B, Miozzo M, Buttitta F, et al. HER-2/Neu alterations in non-small cell lung cancer: a comprehensive evaluation by real time reverse transcription-PCR, fluorescence in situ hybridization, and immunohistochemistry. *Clin Cancer Res.* 1 sept 2003;9(10 Pt 1):3645-52.
130. Heinmöller P, Gross C, Beyser K, Schmidtgen C, Maass G, Pedrocchi M, et al. HER2 status in non-small cell lung cancer: results from patient screening for enrollment to a phase II study of herceptin. *Clin Cancer Res.* 1 nov 2003;9(14):5238-43.
131. Rouquette I, Lauwers-Cances V, Allera C, Bouchet L, Milia J, Nicaise Y, et al. Characteristics of lung cancer in women: importance of hormonal and growth factors. *Lung Cancer.* juin 2012;76(3):280-5.
132. Li BT, Ross DS, Aisner DL, Chaft JE, Hsu M, Kako SL, et al. HER2 Amplification and HER2 Mutation Are Distinct Molecular Targets in Lung Cancers. *J Thorac Oncol.* mars 2016;11(3):414-9.
133. Kim EK, Kim KA, Lee CY, Shim HS. The frequency and clinical impact of HER2 alterations in lung adenocarcinoma. *PLoS ONE.* 2017;12(2):e0171280.

134. Mishra R, Hanker AB, Garrett JT. Genomic alterations of ERBB receptors in cancer: clinical implications. *Oncotarget*. 26 déc 2017;8(69):114371-92.
135. De Grève J, Moran T, Graas M-P, Galdermans D, Vuylsteke P, Canon J-L, et al. Phase II study of afatinib, an irreversible ErbB family blocker, in demographically and genotypically defined lung adenocarcinoma. *Lung Cancer*. avr 2015;88(1):63-9.
136. Kris MG, Camidge DR, Giaccone G, Hida T, Li BT, O'Connell J, et al. Targeting HER2 aberrations as actionable drivers in lung cancers: phase II trial of the pan-HER tyrosine kinase inhibitor dacomitinib in patients with HER2-mutant or amplified tumors. *Ann Oncol*. juill 2015;26(7):1421-7.
137. Mazières J, Barlesi F, Filleron T, Besse B, Monnet I, Beau-Faller M, et al. Lung cancer patients with HER2 mutations treated with chemotherapy and HER2-targeted drugs: results from the European EUHER2 cohort. *Annals of Oncology*. févr 2016;27(2):281-6.
138. Peters S, Curioni-Fontecedro A, Nechushtan H, Shih J-Y, Liao W-Y, Gautschi O, et al. Activity of Afatinib in Heavily Pretreated Patients With ERBB2 Mutation-Positive Advanced NSCLC: Findings From a Global Named Patient Use Program. *J Thorac Oncol*. 2018;13(12):1897-905.
139. Hyman DM, Piha-Paul SA, Won H, Rodon J, Saura C, Shapiro GI, et al. HER kinase inhibition in patients with HER2- and HER3-mutant cancers. *Nature*. 08 2018;554(7691):189-94.
140. Dziadziuszko R, Smit EF, Dafni U, Wolf J, Wasąg B, Biernat W, et al. Afatinib in NSCLC With HER2 Mutations: Results of the Prospective, Open-Label Phase II NICHE Trial of European Thoracic Oncology Platform (ETOP). *J Thorac Oncol*. 2019;14(6):1086-94.
141. Lai WV, Lebas L, Barnes TA, Milia J, Ni A, Gautschi O, et al. Afatinib in patients with metastatic or recurrent HER2-mutant lung cancers: a retrospective international multicentre study. *Eur J Cancer*. 2019;109:28-35.
142. Robichaux JP, Elamin YY, Vijayan RSK, Nilsson MB, Hu L, He J, et al. Pan-Cancer Landscape and Analysis of ERBB2 Mutations Identifies Poziotinib as a Clinically Active Inhibitor and Enhancer of T-DM1 Activity. *Cancer Cell*. 14 oct 2019;36(4):444-457.e7.
143. Wang Y, Jiang T, Qin Z, Jiang J, Wang Q, Yang S, et al. HER2 exon 20 insertions in non-small-cell lung cancer are sensitive to the irreversible pan-HER receptor tyrosine kinase inhibitor pyrotinib. *Ann Oncol*. 01 2019;30(3):447-55.
144. Hotta K, Aoe K, Kozuki T, Ohashi K, Ninomiya K, Ichihara E, et al. A Phase II Study of Trastuzumab Emtansine in HER2-Positive Non-Small Cell Lung Cancer. *J Thorac Oncol*. 2018;13(2):273-9.
145. Li BT, Shen R, Buonocore D, Olah ZT, Ni A, Ginsberg MS, et al. Ado-Trastuzumab Emtansine for Patients With HER2-Mutant Lung Cancers: Results From a Phase II Basket Trial. *J Clin Oncol*. 20 2018;36(24):2532-7.
146. Tsurutani J, Iwata H, Krop I, Jänne PA, Doi T, Takahashi S, et al. Targeting HER2 with Trastuzumab Deruxtecan: A Dose-Expansion, Phase I Study in Multiple Advanced Solid Tumors. *Cancer Discov*. mai 2020;10(5):688-701.
147. Leighl NB, Zatloukal P, Mezger J, Ramlau R, Moore N, Reck M, et al. Efficacy and safety of bevacizumab-based therapy in elderly patients with advanced or recurrent nonsquamous non-small cell lung cancer in the phase III BO17704 study (AVAIL). *J Thorac Oncol*. déc 2010;5(12):1970-6.
148. Reck M, von Pawel J, Zatloukal P, Ramlau R, Gorbounova V, Hirsh V, et al. Overall survival with cisplatin-gemcitabine and bevacizumab or placebo as first-line therapy for nonsquamous non-small-cell lung cancer: results from a randomised phase III trial (AVAIL). *Ann Oncol*. sept 2010;21(9):1804-9.
149. Kato T, Seto T, Nishio M, Goto K, Yamamoto N, Okamoto I, et al. Erlotinib Plus Bevacizumab Phase II Study in Patients with Advanced Non-small-Cell Lung Cancer (JO25567): Updated Safety Results. *Drug Saf*. 2018;41(2):229-37.
150. Seto T, Kato T, Nishio M, Goto K, Atagi S, Hosomi Y, et al. Erlotinib alone or with bevacizumab as first-line therapy in patients with advanced non-squamous non-small-cell lung cancer harbouring EGFR mutations (JO25567): an open-label, randomised, multicentre, phase 2 study. *Lancet Oncol*. oct 2014;15(11):1236-44.

151. Saito H, Fukuhara T, Furuya N, Watanabe K, Sugawara S, Iwasawa S, et al. Erlotinib plus bevacizumab versus erlotinib alone in patients with EGFR-positive advanced non-squamous non-small-cell lung cancer (NEJ026): interim analysis of an open-label, randomised, multicentre, phase 3 trial. *Lancet Oncol.* 2019;20(5):625-35.
152. Garon EB, Ciuleanu T-E, Arrieta O, Prabhaskar K, Syrigos KN, Goksel T, et al. Ramucirumab plus docetaxel versus placebo plus docetaxel for second-line treatment of stage IV non-small-cell lung cancer after disease progression on platinum-based therapy (REVEL): a multicentre, double-blind, randomised phase 3 trial. *Lancet.* 23 août 2014;384(9944):665-73.
153. Reck M, Paz-Ares L, Bidoli P, Cappuzzo F, Dakhil S, Moro-Sibilot D, et al. Outcomes in patients with aggressive or refractory disease from REVEL: A randomized phase III study of docetaxel with ramucirumab or placebo for second-line treatment of stage IV non-small-cell lung cancer. *Lung Cancer.* 2017;112:181-7.
154. Nakagawa K, Garon EB, Seto T, Nishio M, Ponce Aix S, Paz-Ares L, et al. Ramucirumab plus erlotinib in patients with untreated, EGFR-mutated, advanced non-small-cell lung cancer (RELAY): a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet Oncol.* déc 2019;20(12):1655-69.
155. Manzo A, Montanino A, Carillio G, Costanzo R, Sandomenico C, Normanno N, et al. Angiogenesis Inhibitors in NSCLC. *Int J Mol Sci.* 21 sept 2017;18(10).
156. Reck M, Kaiser R, Mellemaard A, Douillard J-Y, Orlov S, Krzakowski M, et al. Docetaxel plus nintedanib versus docetaxel plus placebo in patients with previously treated non-small-cell lung cancer (LUME-Lung 1): a phase 3, double-blind, randomised controlled trial. *Lancet Oncol.* févr 2014;15(2):143-55.
157. Schreiber RD, Old LJ, Smyth MJ. Cancer Immunoediting: Integrating Immunity's Roles in Cancer Suppression and Promotion. *Science.* 25 mars 2011;331(6024):1565-70.
158. Shankaran V, Ikeda H, Bruce AT, White JM, Swanson PE, Old LJ, et al. IFN γ and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. *Nature.* 26 avr 2001;410(6832):1107-11.
159. Dunn GP, Bruce AT, Ikeda H, Old LJ, Schreiber RD. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat Immunol.* nov 2002;3(11):991-8.
160. Constantinidou A, Alifieris C, Trafalis DT. Targeting Programmed Cell Death -1 (PD-1) and Ligand (PD-L1): A new era in cancer active immunotherapy. *Pharmacology & Therapeutics.* févr 2019;194:84-106.
161. Pardoll DM. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer.* 22 mars 2012;12(4):252-64.
162. Hirsch L, Zitvogel L, Eggermont A, Marabelle A. PD-L1: a cancer entity with a shared sensitivity to the PD-1/PD-L1 pathway blockade. *Br J Cancer.* 2019;120(1):3-5.
163. Giroux Leprieux E, Dumenil C, Julie C, Giraud V, Dumoulin J, Labrune S, et al. Immunotherapy revolutionises non-small-cell lung cancer therapy: Results, perspectives and new challenges. *European Journal of Cancer.* juin 2017;78:16-23.
164. Martinez P, Peters S, Stammers T, Soria J-C. Immunotherapy for the First-Line Treatment of Patients with Metastatic Non-Small Cell Lung Cancer. *Clin Cancer Res.* 1 mai 2019;25(9):2691-8.
165. Hanna NH, Schneider BJ, Temin S, Baker S, Brahmer J, Ellis PM, et al. Therapy for Stage IV Non-Small-Cell Lung Cancer Without Driver Alterations: ASCO and OH (CCO) Joint Guideline Update. *JCO.* 10 mai 2020;38(14):1608-32.
166. Hynes NE, Lane HA. ERBB receptors and cancer: the complexity of targeted inhibitors. *Nat Rev Cancer.* mai 2005;5(5):341-54.
167. Henson ES, Gibson SB. Surviving cell death through epidermal growth factor (EGF) signal transduction pathways: Implications for cancer therapy. *Cellular Signalling.* déc 2006;18(12):2089-97.
168. Sharma SV, Bell DW, Settleman J, Haber DA. Epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer. *Nat Rev Cancer.* mars 2007;7(3):169-81.

169. Arrieta O, Cardona AF, Corrales L, Campos-Parra AD, Sánchez-Reyes R, Amieva-Rivera E, et al. The impact of common and rare EGFR mutations in response to EGFR tyrosine kinase inhibitors and platinum-based chemotherapy in patients with non-small cell lung cancer. *Lung Cancer*. févr 2015;87(2):169-75.
170. Beau-Faller M, Prim N, Ruppert A-M, Nanni-Metéllus I, Lacave R, Lacroix L, et al. Rare EGFR exon 18 and exon 20 mutations in non-small-cell lung cancer on 10 117 patients: a multicentre observational study by the French ERMETIC-IFCT network. *Ann Oncol*. janv 2014;25(1):126-31.
171. D'Arcangelo M, D'Incecco A, Cappuzzo F. Rare mutations in non-small-cell lung cancer. *Future Oncol*. mai 2013;9(5):699-711.
172. Masood A, Kancha RK, Subramanian J. Epidermal growth factor receptor (EGFR) tyrosine kinase inhibitors in non-small cell lung cancer harboring uncommon EGFR mutations: Focus on afatinib. *Seminars in Oncology*. juin 2019;46(3):271-83.
173. Gainor JF, Varghese AM, Ou S-HI, Kabraji S, Awad MM, Katayama R, et al. ALK Rearrangements Are Mutually Exclusive with Mutations in EGFR or KRAS: An Analysis of 1,683 Patients with Non-Small Cell Lung Cancer. *Clinical Cancer Research*. 1 août 2013;19(15):4273-81.
174. Sergina NV, Moasser MM. The HER family and cancer: emerging molecular mechanisms and therapeutic targets. *Trends in Molecular Medicine*. déc 2007;13(12):527-34.
175. Ke E-E, Wu Y-L. EGFR as a Pharmacological Target in EGFR -Mutant Non-Small-Cell Lung Cancer: Where Do We Stand Now? *Trends in Pharmacological Sciences*. nov 2016;37(11):887-903.
176. Fogli S, Polini B, Re MD, Petrini I, Passaro A, Crucitta S, et al. EGFR-TKIs in non-small-cell lung cancer: focus on clinical pharmacology and mechanisms of resistance. *Pharmacogenomics*. juin 2018;19(8):727-40.
177. Engelman JA, Zejnullahu K, Gale C-M, Lifshits E, Gonzales AJ, Shimamura T, et al. PF00299804, an irreversible pan-ERBB inhibitor, is effective in lung cancer models with EGFR and ERBB2 mutations that are resistant to gefitinib. *Cancer Res*. 15 déc 2007;67(24):11924-32.
178. Li D, Ambrogio L, Shimamura T, Kubo S, Takahashi M, Chirieac LR, et al. BIBW2992, an irreversible EGFR/HER2 inhibitor highly effective in preclinical lung cancer models. *Oncogene*. 7 août 2008;27(34):4702-11.
179. Zhou W, Ercan D, Chen L, Yun C-H, Li D, Capelletti M, et al. Novel mutant-selective EGFR kinase inhibitors against EGFR T790M. *Nature*. 24 déc 2009;462(7276):1070-4.
180. Ward RA, Anderton MJ, Ashton S, Bethel PA, Box M, Butterworth S, et al. Structure- and reactivity-based development of covalent inhibitors of the activating and gatekeeper mutant forms of the epidermal growth factor receptor (EGFR). *J Med Chem*. 12 sept 2013;56(17):7025-48.
181. Cross DAE, Ashton SE, Giorghiu S, Eberlein C, Nebhan CA, Spitzler PJ, et al. AZD9291, an irreversible EGFR TKI, overcomes T790M-mediated resistance to EGFR inhibitors in lung cancer. *Cancer Discov*. sept 2014;4(9):1046-61.
182. Lynch TJ, Bell DW, Sordella R, Gurubhagavatula S, Okimoto RA, Brannigan BW, et al. Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *N Engl J Med*. 20 mai 2004;350(21):2129-39.
183. Paez JG, Jänne PA, Lee JC, Tracy S, Greulich H, Gabriel S, et al. EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy. *Science*. 4 juin 2004;304(5676):1497-500.
184. Mok TS, Wu Y-L, Thongprasert S, Yang C-H, Chu D-T, Saijo N, et al. Gefitinib or carboplatin-paclitaxel in pulmonary adenocarcinoma. *N Engl J Med*. 3 sept 2009;361(10):947-57.
185. Maemondo M, Inoue A, Kobayashi K, Sugawara S, Oizumi S, Isobe H, et al. Gefitinib or chemotherapy for non-small-cell lung cancer with mutated EGFR. *N Engl J Med*. 24 juin 2010;362(25):2380-8.
186. Mitsudomi T, Morita S, Yatabe Y, Negoro S, Okamoto I, Tsurutani J, et al. Gefitinib versus cisplatin plus docetaxel in patients with non-small-cell lung cancer harbouring mutations of the epidermal growth factor receptor (WJTOG3405): an open label, randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol*. févr 2010;11(2):121-8.

187. Zhou C, Wu Y-L, Chen G, Feng J, Liu X-Q, Wang C, et al. 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.* août 2011;12(8):735-42.
188. Rosell R, Carcereny E, Gervais R, Vergnenegre A, Massuti B, Felip E, et al. Erlotinib versus standard chemotherapy as first-line treatment for European patients with advanced EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer (EURTAC): a multicentre, open-label, randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol.* mars 2012;13(3):239-46.
189. Han J-Y, Park K, Kim S-W, Lee DH, Kim HY, Kim HT, et al. First-SIGNAL: first-line single-agent iressa versus gemcitabine and cisplatin trial in never-smokers with adenocarcinoma of the lung. *J Clin Oncol.* 1 avr 2012;30(10):1122-8.
190. Wu Y-L, Zhou C, Liang C-K, Wu G, Liu X, Zhong Z, et al. First-line erlotinib versus gemcitabine/cisplatin in patients with advanced EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer: analyses from the phase III, randomized, open-label, ENSURE study. *Ann Oncol.* sept 2015;26(9):1883-9.
191. Sequist LV, Waltman BA, Dias-Santagata D, Digumarthy S, Turke AB, Fidias P, et al. Genotypic and Histological Evolution of Lung Cancers Acquiring Resistance to EGFR Inhibitors. *Science Translational Medicine.* 23 mars 2011;3(75):75ra26-75ra26.
192. Yu HA, Arcila ME, Rekhtman N, Sima CS, Zakowski MF, Pao W, et al. Analysis of tumor specimens at the time of acquired resistance to EGFR-TKI therapy in 155 patients with EGFR-mutant lung cancers. *Clin Cancer Res.* 15 avr 2013;19(8):2240-7.
193. Miller VA, Hirsh V, Cadranel J, Chen Y-M, Park K, Kim S-W, et al. Afatinib versus placebo for patients with advanced, metastatic non-small-cell lung cancer after failure of erlotinib, gefitinib, or both, and one or two lines of chemotherapy (LUX-Lung 1): a phase 2b/3 randomised trial. *Lancet Oncol.* mai 2012;13(5):528-38.
194. Reckamp KL, Giaccone G, Camidge DR, Gadgeel SM, Khuri FR, Engelman JA, et al. A phase 2 trial of dacomitinib (PF-00299804), an oral, irreversible pan-HER (human epidermal growth factor receptor) inhibitor, in patients with advanced non-small cell lung cancer after failure of prior chemotherapy and erlotinib. *Cancer.* 15 avr 2014;120(8):1145-54.
195. Walter AO, Sjin RTT, Haringsma HJ, Ohashi K, Sun J, Lee K, et al. Discovery of a mutant-selective covalent inhibitor of EGFR that overcomes T790M-mediated resistance in NSCLC. *Cancer Discov.* déc 2013;3(12):1404-15.
196. Jänne PA, Yang JC-H, Kim D-W, Planchard D, Ohe Y, Ramalingam SS, et al. AZD9291 in EGFR inhibitor-resistant non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med.* 30 avr 2015;372(18):1689-99.
197. Sequist LV, Soria J-C, Goldman JW, Wakelee HA, Gadgeel SM, Varga A, et al. Rociletinib in EGFR-mutated non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med.* 30 avr 2015;372(18):1700-9.
198. Ramalingam SS, Vansteenkiste J, Planchard D, Cho BC, Gray JE, Ohe Y, et al. Overall Survival with Osimertinib in Untreated, EGFR-Mutated Advanced NSCLC. *N Engl J Med.* 02 2020;382(1):41-50.
199. Niederst MJ, Hu H, Mulvey HE, Lockerman EL, Garcia AR, Piotrowska Z, et al. The Allelic Context of the C797S Mutation Acquired upon Treatment with Third-Generation EGFR Inhibitors Impacts Sensitivity to Subsequent Treatment Strategies. *Clin Cancer Res.* 1 sept 2015;21(17):3924-33.
200. Jackman DM. Exon 19 Deletion Mutations of Epidermal Growth Factor Receptor Are Associated with Prolonged Survival in Non-Small Cell Lung Cancer Patients Treated with Gefitinib or Erlotinib. *Clinical Cancer Research.* 1 juill 2006;12(13):3908-14.
201. Karachaliou N, Molina-Vila MA, Rosell R. The impact of rare EGFR mutations on the treatment response of patients with non-small cell lung cancer. *Expert Review of Respiratory Medicine.* 4 mai 2015;9(3):241-4.
202. Yang JC-H, Sequist LV, Geater SL, Tsai C-M, Mok TSK, Schuler M, et al. Clinical activity of afatinib in patients with advanced non-small-cell lung cancer harbouring uncommon EGFR mutations: a combined post-hoc analysis of LUX-Lung 2, LUX-Lung 3, and LUX-Lung 6. *Lancet Oncol.* juill 2015;16(7):830-8.

203. Cho JH, Lim SH, An HJ, Kim KH, Park KU, Kang EJ, et al. Osimertinib for Patients With Non-Small-Cell Lung Cancer Harboring Uncommon EGFR Mutations: A Multicenter, Open-Label, Phase II Trial (KCSG-LU15-09). *J Clin Oncol.* 10 févr 2020;38(5):488-95.
204. Hirano T, Yasuda H, Tani T, Hamamoto J, Oashi A, Ishioka K, et al. In vitro modeling to determine mutation specificity of EGFR tyrosine kinase inhibitors against clinically relevant EGFR mutants in non-small-cell lung cancer. *Oncotarget.* 17 nov 2015;6(36):38789-803.
205. Floc'h N, Martin MJ, Riess JW, Orme JP, Staniszewska AD, Ménard L, et al. Antitumor Activity of Osimertinib, an Irreversible Mutant-Selective EGFR Tyrosine Kinase Inhibitor, in NSCLC Harboring EGFR Exon 20 Insertions. *Mol Cancer Ther.* mai 2018;17(5):885-96.
206. Piotrowska Z, Fintelmann FJ, Sequist LV, Jahagirdar B. Response to Osimertinib in an EGFR Exon 20 Insertion-Positive Lung Adenocarcinoma. *J Thorac Oncol.* 2018;13(10):e204-6.
207. Fang W, Huang Y, Hong S, Zhang Z, Wang M, Gan J, et al. EGFR exon 20 insertion mutations and response to osimertinib in non-small-cell lung cancer. *BMC Cancer.* 17 juin 2019;19(1):595.
208. van Veggel B, Madeira R Santos JFV, Hashemi SMS, Paats MS, Monkhorst K, Heideman D a. M, et al. Osimertinib treatment for patients with EGFR exon 20 mutation positive non-small cell lung cancer. *Lung Cancer.* mars 2020;141:9-13.
209. Fukuoka M, Wu Y-L, Thongprasert S, Sunpaweravong P, Leong S-S, Sriuranpong V, et al. 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). *JCO.* 20 juill 2011;29(21):2866-74.
210. Thongprasert S, Duffield E, Saijo N, Wu Y-L, Yang JC-H, Chu D-T, et al. Health-related quality-of-life in a randomized phase III first-line study of gefitinib versus carboplatin/paclitaxel in clinically selected patients from Asia with advanced NSCLC (IPASS). *J Thorac Oncol.* nov 2011;6(11):1872-80.
211. Inoue A, Kobayashi K, Maemondo M, Sugawara S, Oizumi S, Isobe H, et al. Updated overall survival results from a randomized phase III trial comparing gefitinib with carboplatin-paclitaxel for chemo-naïve non-small cell lung cancer with sensitive EGFR gene mutations (NEJ002). *Ann Oncol.* janv 2013;24(1):54-9.
212. Yoshioka H, Shimokawa M, Seto T, Morita S, Yatabe Y, Okamoto I, et al. Final overall survival results of WJTOG3405, a randomized phase III trial comparing gefitinib versus cisplatin with docetaxel as the first-line treatment for patients with stage IIIB/IV or postoperative recurrent EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer. *Ann Oncol.* 01 2019;30(12):1978-84.
213. Kim ES, Hirsh V, Mok T, Socinski MA, Gervais R, Wu Y-L, et al. Gefitinib versus docetaxel in previously treated non-small-cell lung cancer (INTEREST): a randomised phase III trial. *Lancet.* 22 nov 2008;372(9652):1809-18.
214. Douillard J-Y, Shepherd FA, Hirsh V, Mok T, Socinski MA, Gervais R, et al. 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.* 10 févr 2010;28(5):744-52.
215. Maruyama R, Nishiwaki Y, Tamura T, Yamamoto N, Tsuboi M, Nakagawa K, et al. Phase III study, V-15-32, of gefitinib versus docetaxel in previously treated Japanese patients with non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol.* 10 sept 2008;26(26):4244-52.
216. Sekine I, Ichinose Y, Nishiwaki Y, Yamamoto N, Tsuboi M, Nakagawa K, et al. Quality of life and disease-related symptoms in previously treated Japanese patients with non-small-cell lung cancer: results of a randomized phase III study (V-15-32) of gefitinib versus docetaxel. *Ann Oncol.* sept 2009;20(9):1483-8.
217. Lee DH, Park K, Kim JH, Lee J-S, Shin SW, Kang J-H, et al. Randomized Phase III trial of gefitinib versus docetaxel in non-small cell lung cancer patients who have previously received platinum-based chemotherapy. *Clin Cancer Res.* 15 févr 2010;16(4):1307-14.
218. Sun J-M, Lee KH, Kim S-W, Lee DH, Min YJ, Yun HJ, et al. Gefitinib versus pemetrexed as second-line treatment in patients with nonsmall cell lung cancer previously treated with platinum-based chemotherapy (KCSG-LU08-01): an open-label, phase 3 trial. *Cancer.* 15 déc 2012;118(24):6234-42.

219. Chang A, Parikh P, Thongprasert S, Tan EH, Perng R-P, Ganzon D, et al. Gefitinib (IRESSA) in patients of Asian origin with refractory advanced non-small cell lung cancer: subset analysis from the ISEL study. *J Thorac Oncol.* oct 2006;1(8):847-55.
220. Hirsch FR, Varella-Garcia M, Bunn PA, Franklin WA, Dziadziuszko R, Thatcher N, et al. Molecular predictors of outcome with gefitinib in a phase III placebo-controlled study in advanced non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol.* 1 nov 2006;24(31):5034-42.
221. Urata Y, Katakami N, Morita S, Kaji R, Yoshioka H, Seto T, et al. Randomized Phase III Study Comparing Gefitinib With Erlotinib in Patients With Previously Treated Advanced Lung Adenocarcinoma: WJOG 5108L. *JCO.* 20 sept 2016;34(27):3248-57.
222. Yang JJ, Zhou Q, Yan HH, Zhang XC, Chen HJ, Tu HY, et al. A phase III randomised controlled trial of erlotinib vs gefitinib in advanced non-small cell lung cancer with EGFR mutations. *Br J Cancer.* févr 2017;116(5):568-74.
223. Sequist LV, Yang JC-H, Yamamoto N, O'Byrne K, Hirsh V, Mok T, et al. Phase III study of afatinib or cisplatin plus pemetrexed in patients with metastatic lung adenocarcinoma with EGFR mutations. *J Clin Oncol.* 20 sept 2013;31(27):3327-34.
224. Yang JC-H, Hirsh V, Schuler M, Yamamoto N, O'Byrne KJ, Mok TSK, et al. Symptom control and quality of life in LUX-Lung 3: a phase III study of afatinib or cisplatin/pemetrexed in patients with advanced lung adenocarcinoma with EGFR mutations. *J Clin Oncol.* 20 sept 2013;31(27):3342-50.
225. Wu Y-L, Zhou C, Hu C-P, Feng J, Lu S, Huang Y, et al. Afatinib versus cisplatin plus gemcitabine for first-line treatment of Asian patients with advanced non-small-cell lung cancer harbouring EGFR mutations (LUX-Lung 6): an open-label, randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol.* févr 2014;15(2):213-22.
226. Yang JC-H, Wu Y-L, Schuler M, Sebastian M, Popat S, Yamamoto N, et al. Afatinib versus cisplatin-based chemotherapy for EGFR mutation-positive lung adenocarcinoma (LUX-Lung 3 and LUX-Lung 6): analysis of overall survival data from two randomised, phase 3 trials. *The Lancet Oncology.* févr 2015;16(2):141-51.
227. Park K, Tan E-H, O'Byrne K, Zhang L, Boyer M, Mok T, et al. Afatinib versus gefitinib as first-line treatment of patients with EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer (LUX-Lung 7): a phase 2B, open-label, randomised controlled trial. *Lancet Oncol.* 2016;17(5):577-89.
228. Paz-Ares L, Tan E-H, O'Byrne K, Zhang L, Hirsh V, Boyer M, et al. Afatinib versus gefitinib in patients with EGFR mutation-positive advanced non-small-cell lung cancer: overall survival data from the phase IIb LUX-Lung 7 trial. *Ann Oncol.* 01 2017;28(2):270-7.
229. Goss GD, Felip E, Cobo M, Lu S, Syrigos K, Lee KH, et al. Association of ERBB Mutations With Clinical Outcomes of Afatinib- or Erlotinib-Treated Patients With Lung Squamous Cell Carcinoma: Secondary Analysis of the LUX-Lung 8 Randomized Clinical Trial. *JAMA Oncol.* 01 2018;4(9):1189-97.
230. Soria J-C, Felip E, Cobo M, Lu S, Syrigos K, Lee KH, et al. Afatinib versus erlotinib as second-line treatment of patients with advanced squamous cell carcinoma of the lung (LUX-Lung 8): an open-label randomised controlled phase 3 trial. *The Lancet Oncology.* août 2015;16(8):897-907.
231. Mok TS, Cheng Y, Zhou X, Lee KH, Nakagawa K, Niho S, et al. Improvement in Overall Survival in a Randomized Study That Compared Dacomitinib With Gefitinib in Patients With Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer and EGFR-Activating Mutations. *J Clin Oncol.* 01 2018;36(22):2244-50.
232. Wu Y-L, Cheng Y, Zhou X, Lee KH, Nakagawa K, Niho S, et al. Dacomitinib versus gefitinib as first-line treatment for patients with EGFR-mutation-positive non-small-cell lung cancer (ARCHER 1050): a randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet Oncol.* 2017;18(11):1454-66.
233. Ramalingam SS, Jänne PA, Mok T, O'Byrne K, Boyer MJ, Von Pawel J, et al. Dacomitinib versus erlotinib in patients with advanced-stage, previously treated non-small-cell lung cancer (ARCHER 1009): a randomised, double-blind, phase 3 trial. *Lancet Oncol.* nov 2014;15(12):1369-78.
234. Ellis PM, Shepherd FA, Millward M, Perrone F, Seymour L, Liu G, et al. Dacomitinib compared with placebo in pretreated patients with advanced or metastatic non-small-cell lung cancer (NCIC CTG BR.26): a double-blind, randomised, phase 3 trial. *Lancet Oncol.* nov 2014;15(12):1379-88.

235. Solca F, Dahl G, Zoephel A, Bader G, Sanderson M, Klein C, et al. Target binding properties and cellular activity of afatinib (BIBW 2992), an irreversible ErbB family blocker. *J Pharmacol Exp Ther.* nov 2012;343(2):342-50.
236. Soria J-C, Ohe Y, Vansteenkiste J, Reungwetwattana T, Chewaskulyong B, Lee KH, et al. Osimertinib in Untreated EGFR-Mutated Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med.* 11 2018;378(2):113-25.
237. Reungwetwattana T, Nakagawa K, Cho BC, Cobo M, Cho EK, Bertolini A, et al. CNS Response to Osimertinib Versus Standard Epidermal Growth Factor Receptor Tyrosine Kinase Inhibitors in Patients With Untreated EGFR-Mutated Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer. *J Clin Oncol.* 28 août 2018;JCO2018783118.
238. Mok TS, Wu Y-L, Ahn M-J, Garassino MC, Kim HR, Ramalingam SS, et al. Osimertinib or Platinum-Pemetrexed in EGFR T790M-Positive Lung Cancer. *N Engl J Med.* 16 2017;376(7):629-40.
239. Wu Y-L, Ahn M-J, Garassino MC, Han J-Y, Katakami N, Kim HR, et al. CNS Efficacy of Osimertinib in Patients With T790M-Positive Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer: Data From a Randomized Phase III Trial (AURA3). *J Clin Oncol.* 10 2018;36(26):2702-9.
240. Lee CK, Novello S, Rydén A, Mann H, Mok T. Patient-Reported Symptoms and Impact of Treatment With Osimertinib Versus Chemotherapy in Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer: The AURA3 Trial. *J Clin Oncol.* 20 2018;36(18):1853-60.
241. Wu Y-L, Herbst RS, Mann H, Rukazenkov Y, Marotti M, Tsuboi M. ADAURA: Phase III, Double-blind, Randomized Study of Osimertinib Versus Placebo in EGFR Mutation-positive Early-stage NSCLC After Complete Surgical Resection. *Clin Lung Cancer.* 2018;19(4):e533-6.
242. Kim D-W, Lee DH, Han J-Y, Lee J, Cho BC, Kang JH, et al. Safety, tolerability, and anti-tumor activity of olmutinib in non-small cell lung cancer with T790M mutation: A single arm, open label, phase 1/2 trial. *Lung Cancer.* sept 2019;135:66-72.
243. Tan DS-W, Leighl NB, Riely GJ, Yang JC-H, Sequist LV, Wolf J, et al. Safety and efficacy of nazartinib (EGF816) in adults with EGFR-mutant non-small-cell lung carcinoma: a multicentre, open-label, phase 1 study. *Lancet Respir Med.* 15 janv 2020;
244. Yu HA, Spira A, Horn L, Weiss J, West H, Giaccone G, et al. A Phase I, Dose Escalation Study of Oral ASP8273 in Patients with Non-small Cell Lung Cancers with Epidermal Growth Factor Receptor Mutations. *Clin Cancer Res.* 15 déc 2017;23(24):7467-73.
245. Azuma K, Nishio M, Hayashi H, Kiura K, Satouchi M, Sugawara S, et al. ASP8273 tolerability and antitumor activity in tyrosine kinase inhibitor-naïve Japanese patients with EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer. *Cancer Sci.* août 2018;109(8):2532-8.
246. Murakami H, Nokihara H, Hayashi H, Seto T, Park K, Azuma K, et al. Clinical activity of ASP8273 in Asian patients with non-small-cell lung cancer with EGFR activating and T790M mutations. *Cancer Sci.* sept 2018;109(9):2852-62.
247. Kelly RJ, Shepherd FA, Krivoshik A, Jie F, Horn L. A phase III, randomized, open-label study of ASP8273 versus erlotinib or gefitinib in patients with advanced stage IIIB/IV non-small-cell lung cancer. *Ann Oncol.* 01 2019;30(7):1127-33.
248. Chatterjee N, Bivona TG. Polytherapy and Targeted Cancer Drug Resistance. *Trends in Cancer.* mars 2019;5(3):170-82.
249. Chong CR, Janne PA. The quest to overcome resistance to EGFR-targeted therapies in cancer. *Nat Med.* nov 2013;19(11):1389-400.
250. Cortot AB, Janne PA. Molecular mechanisms of resistance in epidermal growth factor receptor-mutant lung adenocarcinomas. *European Respiratory Review.* 1 sept 2014;23(133):356-66.
251. Tetsu O, Hangauer MJ, Phuchareon J, Eisele DW, McCormick F. Drug Resistance to EGFR Inhibitors in Lung Cancer. *Chemotherapy.* 2016;61(5):223-35.
252. Inukai M, Toyooka S, Ito S, Asano H, Ichihara S, Soh J, et al. Presence of epidermal growth factor receptor gene T790M mutation as a minor clone in non-small cell lung cancer. *Cancer Res.* 15 août 2006;66(16):7854-8.

253. Rosell R, Molina MA, Costa C, Simonetti S, Gimenez-Capitan A, Bertran-Alamillo J, et al. Pretreatment EGFR T790M mutation and BRCA1 mRNA expression in erlotinib-treated advanced non-small-cell lung cancer patients with EGFR mutations. *Clin Cancer Res.* 1 mars 2011;17(5):1160-8.
254. Su K-Y, Chen H-Y, Li K-C, Kuo M-L, Yang JC-H, Chan W-K, et al. Pretreatment epidermal growth factor receptor (EGFR) T790M mutation predicts shorter EGFR tyrosine kinase inhibitor response duration in patients with non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol.* 1 févr 2012;30(4):433-40.
255. Lee JK, Shin J-Y, Kim S, Lee S, Park C, Kim J-Y, et al. Primary resistance to epidermal growth factor receptor (EGFR) tyrosine kinase inhibitors (TKIs) in patients with non-small-cell lung cancer harboring TKI-sensitive EGFR mutations: an exploratory study. *Ann Oncol.* août 2013;24(8):2080-7.
256. Yu HA, Arcila ME, Hellmann MD, Kris MG, Ladanyi M, Riely GJ. Poor response to erlotinib in patients with tumors containing baseline EGFR T790M mutations found by routine clinical molecular testing. *Ann Oncol.* févr 2014;25(2):423-8.
257. Costa C, Molina MA, Drozdowskyj A, Giménez-Capitán A, Bertran-Alamillo J, Karachaliou N, et al. The impact of EGFR T790M mutations and BIM mRNA expression on outcome in patients with EGFR-mutant NSCLC treated with erlotinib or chemotherapy in the randomized phase III EURTAC trial. *Clin Cancer Res.* 1 avr 2014;20(7):2001-10.
258. Vendrell JA, Mazieres J, Senal R, Rouquette I, Quantin X, Pujol J-L, et al. Ultra-sensitive EGFR T790M Detection as an Independent Prognostic Marker for Lung Cancer Patients Harboring EGFR del19 Mutations and Treated with First-generation TKIs. *Clin Cancer Res.* 15 2019;25(14):4280-9.
259. Costa DB, Halmos B, Kumar A, Schumer ST, Huberman MS, Boggon TJ, et al. BIM mediates EGFR tyrosine kinase inhibitor-induced apoptosis in lung cancers with oncogenic EGFR mutations. *PLoS Med.* oct 2007;4(10):1669-79; discussion 1680.
260. Cragg MS, Kuroda J, Puthalakath H, Huang DCS, Strasser A. Gefitinib-induced killing of NSCLC cell lines expressing mutant EGFR requires BIM and can be enhanced by BH3 mimetics. *PLoS Med.* oct 2007;4(10):1681-9; discussion 1690.
261. Gong Y, Somwar R, Politi K, Balak M, Chmielecki J, Jiang X, et al. Induction of BIM is essential for apoptosis triggered by EGFR kinase inhibitors in mutant EGFR-dependent lung adenocarcinomas. *PLoS Med.* 9 oct 2007;4(10):e294.
262. Faber AC, Corcoran RB, Ebi H, Sequist LV, Waltman BA, Chung E, et al. BIM expression in treatment-naïve cancers predicts responsiveness to kinase inhibitors. *Cancer Discov.* sept 2011;1(4):352-65.
263. Ng KP, Hillmer AM, Chuah CTH, Juan WC, Ko TK, Teo ASM, et al. A common BIM deletion polymorphism mediates intrinsic resistance and inferior responses to tyrosine kinase inhibitors in cancer. *Nat Med.* 18 mars 2012;18(4):521-8.
264. de Bruin EC, Cowell C, Warne PH, Jiang M, Saunders RE, Melnick MA, et al. Reduced NF1 expression confers resistance to EGFR inhibition in lung cancer. *Cancer Discov.* mai 2014;4(5):606-19.
265. Maertens O, Cichowski K. Paths of resistance to EGFR inhibitors: is NF enough? *Cancer Discov.* mai 2014;4(5):519-21.
266. Calvayrac O, Mazières J, Figarol S, Marty-Detraves C, Raymond-Letron I, Bousquet E, et al. The RAS-related GTPase RHOB confers resistance to EGFR-tyrosine kinase inhibitors in non-small-cell lung cancer via an AKT-dependent mechanism. *EMBO Molecular Medicine.* févr 2017;9(2):238-50.
267. Engelman JA, Mukohara T, Zejnullahu K, Lifshits E, Borrás AM, Gale C-M, et al. Allelic dilution obscures detection of a biologically significant resistance mutation in EGFR-amplified lung cancer. *J Clin Invest.* oct 2006;116(10):2695-706.
268. Sos ML, Koker M, Weir BA, Heynck S, Rabinovsky R, Zander T, et al. PTEN loss contributes to erlotinib resistance in EGFR-mutant lung cancer by activation of Akt and EGFR. *Cancer Res.* 15 avr 2009;69(8):3256-61.
269. Ohashi K, Sequist LV, Arcila ME, Moran T, Chmielecki J, Lin Y-L, et al. Lung cancers with acquired resistance to EGFR inhibitors occasionally harbor BRAF gene mutations but lack mutations in KRAS, NRAS, or MEK1. *Proc Natl Acad Sci USA.* 31 juill 2012;109(31):E2127-2133.

270. 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*. avr 2010;141(1):69-80.
271. Bivona TG, Hieronymus H, Parker J, Chang K, Taron M, Rosell R, et al. FAS and NF- κ B signalling modulate dependence of lung cancers on mutant EGFR. *Nature*. 24 mars 2011;471(7339):523-6.
272. Jackman D, Pao W, Riely GJ, Engelman JA, Kris MG, Jänne PA, et al. Clinical Definition of Acquired Resistance to Epidermal Growth Factor Receptor Tyrosine Kinase Inhibitors in Non-Small-Cell Lung Cancer. *JCO*. 10 janv 2010;28(2):357-60.
273. Obenauf AC, Zou Y, Ji AL, Vanharanta S, Shu W, Shi H, et al. Therapy-induced tumour secretomes promote resistance and tumour progression. *Nature*. 16 avr 2015;520(7547):368-72.
274. Westover D, Zugazagoitia J, Cho BC, Lovly CM, Paz-Ares L. Mechanisms of acquired resistance to first- and second-generation EGFR tyrosine kinase inhibitors. *Annals of Oncology*. janv 2018;29:i10-9.
275. Goss G, Tsai C-M, Shepherd FA, Bazhenova L, Lee JS, Chang G-C, et al. Osimertinib for pretreated EGFR Thr790Met-positive advanced non-small-cell lung cancer (AURA2): a multicentre, open-label, single-arm, phase 2 study. *Lancet Oncol*. déc 2016;17(12):1643-52.
276. Sequist LV, Soria J-C, Camidge DR. Update to Rociletinib Data with the RECIST Confirmed Response Rate. *N Engl J Med*. 9 juin 2016;374(23):2296-7.
277. Leonetti A, Sharma S, Minari R, Perego P, Giovannetti E, Tiseo M. Resistance mechanisms to osimertinib in EGFR-mutated non-small cell lung cancer. *British Journal of Cancer* [Internet]. 30 sept 2019 [cité 2 oct 2019]; Disponible sur: <http://www.nature.com/articles/s41416-019-0573-8>
278. Schmid S, Li JJN, Leighl NB. Mechanisms of osimertinib resistance and emerging treatment options. *Lung Cancer*. 18 juill 2020;147:123-9.
279. Kobayashi S, Boggon TJ, Dayaram T, Jänne PA, Kocher O, Meyerson M, et al. EGFR mutation and resistance of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *N Engl J Med*. 24 févr 2005;352(8):786-92.
280. Pao W, Miller VA, Politi KA, Riely GJ, Somwar R, Zakowski MF, et al. Acquired resistance of lung adenocarcinomas to gefitinib or erlotinib is associated with a second mutation in the EGFR kinase domain. *PLoS Med*. mars 2005;2(3):e73.
281. Yun C-H, Mengwasser KE, Toms AV, Woo MS, Greulich H, Wong K-K, et al. The T790M mutation in EGFR kinase causes drug resistance by increasing the affinity for ATP. *Proc Natl Acad Sci USA*. 12 févr 2008;105(6):2070-5.
282. Balak MN, Gong Y, Riely GJ, Somwar R, Li AR, Zakowski MF, et al. Novel D761Y and common secondary T790M mutations in epidermal growth factor receptor-mutant lung adenocarcinomas with acquired resistance to kinase inhibitors. *Clin Cancer Res*. 1 nov 2006;12(21):6494-501.
283. Kosaka T, Yatabe Y, Endoh H, Yoshida K, Hida T, Tsuboi M, et al. Analysis of epidermal growth factor receptor gene mutation in patients with non-small cell lung cancer and acquired resistance to gefitinib. *Clin Cancer Res*. 1 oct 2006;12(19):5764-9.
284. Oxnard GR, Arcila ME, Sima CS, Riely GJ, Chmielecki J, Kris MG, et al. Acquired resistance to EGFR tyrosine kinase inhibitors in EGFR-mutant lung cancer: distinct natural history of patients with tumors harboring the T790M mutation. *Clin Cancer Res*. 15 mars 2011;17(6):1616-22.
285. Haber DA, Velculescu VE. Blood-based analyses of cancer: circulating tumor cells and circulating tumor DNA. *Cancer Discov*. juin 2014;4(6):650-61.
286. Sacher AG, Paweletz C, Dahlberg SE, Alden RS, O'Connell A, Feeney N, et al. Prospective Validation of Rapid Plasma Genotyping for the Detection of EGFR and KRAS Mutations in Advanced Lung Cancer. *JAMA Oncol*. 1 août 2016;2(8):1014-22.
287. Guibert N, Pradines A, Favre G, Mazieres J. Current and future applications of liquid biopsy in nonsmall cell lung cancer from early to advanced stages. *Eur Respir Rev*. 31 mars 2020;29(155).

288. Oxnard GR, Thress KS, Alden RS, Lawrance R, Paweletz CP, Cantarini M, et al. Association Between Plasma Genotyping and Outcomes of Treatment With Osimertinib (AZD9291) in Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer. *J Clin Oncol.* 01 2016;34(28):3375-82.
289. Thress KS, Paweletz CP, Felip E, Cho BC, Stetson D, Dougherty B, et al. Acquired EGFR C797S mutation mediates resistance to AZD9291 in non-small cell lung cancer harboring EGFR T790M. *Nat Med.* juin 2015;21(6):560-2.
290. Ercan D, Choi HG, Yun C-H, Capelletti M, Xie T, Eck MJ, et al. EGFR Mutations and Resistance to Irreversible Pyrimidine-Based EGFR Inhibitors. *Clin Cancer Res.* 1 sept 2015;21(17):3913-23.
291. Jia Y, Yun C-H, Park E, Ercan D, Manuia M, Juarez J, et al. Overcoming EGFR(T790M) and EGFR(C797S) resistance with mutant-selective allosteric inhibitors. *Nature.* 02 2016;534(7605):129-32.
292. Yu HA, Tian SK, Drilon AE, Borsu L, Riely GJ, Arcila ME, et al. Acquired Resistance of EGFR-Mutant Lung Cancer to a T790M-Specific EGFR Inhibitor: Emergence of a Third Mutation (C797S) in the EGFR Tyrosine Kinase Domain. *JAMA Oncol.* oct 2015;1(7):982-4.
293. Ortiz-Cuaran S, Scheffler M, Plenker D, Dahmen L, Scheel AH, Fernandez-Cuesta L, et al. Heterogeneous Mechanisms of Primary and Acquired Resistance to Third-Generation EGFR Inhibitors. *Clin Cancer Res.* 1 oct 2016;22(19):4837-47.
294. Piotrowska Z, Isozaki H, Lennerz JK, Gainor JF, Lennes IT, Zhu VW, et al. Landscape of Acquired Resistance to Osimertinib in EGFR-Mutant NSCLC and Clinical Validation of Combined EGFR and RET Inhibition with Osimertinib and BLU-667 for Acquired RET Fusion. *Cancer Discov.* 2018;8(12):1529-39.
295. Chabon JJ, Simmons AD, Lovejoy AF, Esfahani MS, Newman AM, Haringsma HJ, et al. Circulating tumour DNA profiling reveals heterogeneity of EGFR inhibitor resistance mechanisms in lung cancer patients. *Nat Commun.* 10 2016;7:11815.
296. Helman E, Nguyen M, Karlovich CA, Despain D, Choquette AK, Spira AI, et al. Cell-Free DNA Next-Generation Sequencing Prediction of Response and Resistance to Third-Generation EGFR Inhibitor. *Clin Lung Cancer.* 2018;19(6):518-530.e7.
297. Zhang Y-C, Zhou Q, Wu Y-L. Clinical management of third-generation EGFR inhibitor-resistant patients with advanced non-small cell lung cancer: Current status and future perspectives. *Cancer Letters.* sept 2019;459:240-7.
298. Wang Z, Yang J-J, Huang J, Ye J-Y, Zhang X-C, Tu H-Y, et al. Lung Adenocarcinoma Harboring EGFR T790M and In Trans C797S Responds to Combination Therapy of First- and Third-Generation EGFR TKIs and Shifts Allelic Configuration at Resistance. *J Thorac Oncol.* 2017;12(11):1723-7.
299. Arulananda S, Do H, Musafir A, Mitchell P, Dobrovic A, John T. Combination Osimertinib and Gefitinib in C797S and T790M EGFR-Mutated Non-Small Cell Lung Cancer. *J Thorac Oncol.* 2017;12(11):1728-32.
300. Costa DB, Schumer ST, Tenen DG, Kobayashi S. Differential responses to erlotinib in epidermal growth factor receptor (EGFR)-mutated lung cancers with acquired resistance to gefitinib carrying the L747S or T790M secondary mutations. *J Clin Oncol.* 1 mars 2008;26(7):1182-4; author reply 1184-1186.
301. Bean J, Riely GJ, Balak M, Marks JL, Ladanyi M, Miller VA, et al. Acquired resistance to epidermal growth factor receptor kinase inhibitors associated with a novel T854A mutation in a patient with EGFR-mutant lung adenocarcinoma. *Clin Cancer Res.* 15 nov 2008;14(22):7519-25.
302. Tokumo M, Toyooka S, Ichihara S, Ohashi K, Tsukuda K, Ichimura K, et al. Double mutation and gene copy number of EGFR in gefitinib refractory non-small-cell lung cancer. *Lung Cancer.* juill 2006;53(1):117-21.
303. Toyooka S, Date H, Uchida A, Kiura K, Takata M. The epidermal growth factor receptor D761Y mutation and effect of tyrosine kinase inhibitor. *Clin Cancer Res.* 1 juin 2007;13(11):3431; author reply 3431-3432.
304. Pallis AG, Voutsina A, Kalikaki A, Souglakos J, Briasoulis E, Murray S, et al. « Classical » but not « other » mutations of EGFR kinase domain are associated with clinical outcome in gefitinib-treated patients with non-small cell lung cancer. *Br J Cancer.* 3 déc 2007;97(11):1560-6.

305. Yamaguchi F, Fukuchi K, Yamazaki Y, Takayasu H, Tazawa S, Tateno H, et al. Acquired resistance L747S mutation in an epidermal growth factor receptor-tyrosine kinase inhibitor-naïve patient: A report of three cases. *Oncol Lett.* févr 2014;7(2):357-60.
306. Yang Z, Yang N, Ou Q, Xiang Y, Jiang T, Wu X, et al. Investigating Novel Resistance Mechanisms to Third-Generation EGFR Tyrosine Kinase Inhibitor Osimertinib in Non-Small Cell Lung Cancer Patients. *Clin Cancer Res.* 01 2018;24(13):3097-107.
307. Menon R, Müller J, Schneider P, Lakis S, Thress K, Wolf J, et al. A Novel EGFR(C797) Variant Detected in a Pleural Biopsy Specimen from an Osimertinib-Treated Patient Using a Comprehensive Hybrid Capture-Based Next-Generation Sequencing Assay. *J Thorac Oncol.* 2016;11(9):e105-107.
308. Ou S-HI, Cui J, Schrock AB, Goldberg ME, Zhu VW, Albacker L, et al. Emergence of novel and dominant acquired EGFR solvent-front mutations at Gly796 (G796S/R) together with C797S/R and L792F/H mutations in one EGFR (L858R/T790M) NSCLC patient who progressed on osimertinib. *Lung Cancer.* 2017;108:228-31.
309. Zheng D, Hu M, Bai Y, Zhu X, Lu X, Wu C, et al. EGFR G796D mutation mediates resistance to osimertinib. *Oncotarget.* 25 juill 2017;8(30):49671-9.
310. Zhang Q, Zhang X-C, Yang J-J, Yang Z-F, Bai Y, Su J, et al. EGFR L792H and G796R: Two Novel Mutations Mediating Resistance to the Third-Generation EGFR Tyrosine Kinase Inhibitor Osimertinib. *J Thorac Oncol.* 2018;13(9):1415-21.
311. Yang Z, Yang J, Chen Y, Shao YW, Wang X. Acquired EGFR L718V Mutation as the Mechanism for Osimertinib Resistance in a T790M-Negative Non-Small-Cell Lung Cancer Patient. *Target Oncol.* 2019;14(4):369-74.
312. Bersanelli M, Minari R, Bordi P, Gnetti L, Bozzetti C, Squadrilli A, et al. L718Q Mutation as New Mechanism of Acquired Resistance to AZD9291 in EGFR-Mutated NSCLC. *J Thorac Oncol.* 2016;11(10):e121-123.
313. Le X, Puri S, Negrao MV, Nilsson MB, Robichaux J, Boyle T, et al. Landscape of EGFR-Dependent and -Independent Resistance Mechanisms to Osimertinib and Continuation Therapy Beyond Progression in EGFR-Mutant NSCLC. *Clin Cancer Res.* 15 2018;24(24):6195-203.
314. Liu Y, Li Y, Ou Q, Wu X, Wang X, Shao YW, et al. Acquired EGFR L718V mutation mediates resistance to osimertinib in non-small cell lung cancer but retains sensitivity to afatinib. *Lung Cancer.* 2018;118:1-5.
315. Liu J, Jin B, Su H, Qu X, Liu Y. Afatinib helped overcome subsequent resistance to osimertinib in a patient with NSCLC having leptomeningeal metastasis bearing acquired EGFR L718Q mutation: a case report. *BMC Cancer.* 17 juill 2019;19(1):702.
316. Oztan A, Fischer S, Schrock AB, Erlich RL, Lovly CM, Stephens PJ, et al. Emergence of EGFR G724S mutation in EGFR-mutant lung adenocarcinoma post progression on osimertinib. *Lung Cancer.* 2017;111:84-7.
317. Fassunke J, Müller F, Keul M, Michels S, Dammert MA, Schmitt A, et al. Overcoming EGFRG724S-mediated osimertinib resistance through unique binding characteristics of second-generation EGFR inhibitors. *Nat Commun.* 07 2018;9(1):4655.
318. Brown BP, Zhang Y-K, Westover D, Yan Y, Qiao H, Huang V, et al. On-target Resistance to the Mutant-Selective EGFR Inhibitor Osimertinib Can Develop in an Allele-Specific Manner Dependent on the Original EGFR-Activating Mutation. *Clin Cancer Res.* 01 2019;25(11):3341-51.
319. Zhang Y, He B, Zhou D, Li M, Hu C. Newly emergent acquired EGFR exon 18 G724S mutation after resistance of a T790M specific EGFR inhibitor osimertinib in non-small-cell lung cancer: a case report. *Onco Targets Ther.* 2019;12:51-6.
320. Schoenfeld AJ, Chan JM, Kubota D, Sato H, Rizvi H, Daneshbod Y, et al. Tumor Analyses Reveal Squamous Transformation and Off-Target Alterations As Early Resistance Mechanisms to First-line Osimertinib in EGFR - Mutant Lung Cancer. *Clin Cancer Res.* 1 juin 2020;26(11):2654-63.
321. Castellano GM, Aisner J, Burley SK, Vallat B, Yu HA, Pine SR, et al. A Novel Acquired Exon 20 EGFR M766Q Mutation in Lung Adenocarcinoma Mediates Osimertinib Resistance but is Sensitive to Neratinib and Pozotinib. *J Thorac Oncol.* 2019;14(11):1982-8.

322. Ercan D, Zejnullahu K, Yonesaka K, Xiao Y, Capelletti M, Rogers A, et al. Amplification of EGFR T790M causes resistance to an irreversible EGFR inhibitor. *Oncogene*. 22 avr 2010;29(16):2346-56.
323. Piotrowska Z, Niederst MJ, Karlovich CA, Wakelee HA, Neal JW, Mino-Kenudson M, et al. Heterogeneity Underlies the Emergence of EGFR T790M Wild-Type Clones Following Treatment of T790M-Positive Cancers with a Third-Generation EGFR Inhibitor. *Cancer Discov*. juill 2015;5(7):713-22.
324. Nukaga S, Yasuda H, Tsuchihara K, Hamamoto J, Masuzawa K, Kawada I, et al. Amplification of EGFR Wild-Type Alleles in Non-Small Cell Lung Cancer Cells Confers Acquired Resistance to Mutation-Selective EGFR Tyrosine Kinase Inhibitors. *Cancer Res*. 15 2017;77(8):2078-89.
325. Knebel FH, Bettoni F, Shimada AK, Cruz M, Alessi JV, Negrão MV, et al. Sequential liquid biopsies reveal dynamic alterations of EGFR driver mutations and indicate EGFR amplification as a new mechanism of resistance to osimertinib in NSCLC. *Lung Cancer*. 2017;108:238-41.
326. Kim TM, Song A, Kim D-W, Kim S, Ahn Y-O, Keam B, et al. Mechanisms of Acquired Resistance to AZD9291: A Mutation-Selective, Irreversible EGFR Inhibitor. *J Thorac Oncol*. déc 2015;10(12):1736-44.
327. Takezawa K, Pirazzoli V, Arcila ME, Nebhan CA, Song X, de Stanchina E, et al. HER2 amplification: a potential mechanism of acquired resistance to EGFR inhibition in EGFR-mutant lung cancers that lack the second-site EGFR T790M mutation. *Cancer Discov*. oct 2012;2(10):922-33.
328. Planchard D, Loriot Y, André F, Gobert A, Auger N, Lacroix L, et al. EGFR-independent mechanisms of acquired resistance to AZD9291 in EGFR T790M-positive NSCLC patients. *Ann Oncol*. oct 2015;26(10):2073-8.
329. Xu C, Wang W, Zhu Y, Yu Z, Zhang H, Wang H, et al. Potential resistance mechanisms using next generation sequencing from Chinese EGFR T790M+ non-small cell lung cancer patients with primary resistance to osimertinib: A multicenter study. *Ann Oncol*. avr 2019;30 Suppl 2:ii48.
330. 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. *J Clin Invest*. oct 2009;119(10):3000-10.
331. Janjigian YY, Smit EF, Groen HJM, 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 Discov*. sept 2014;4(9):1036-45.
332. Hsu C-C, Liao B-C, Liao W-Y, Markovets A, Stetson D, Thress K, et al. Exon 16-Skipping HER2 as a Novel Mechanism of Osimertinib Resistance in EGFR L858R/T790M-Positive Non-Small Cell Lung Cancer. *J Thorac Oncol*. 2020;15(1):50-61.
333. Arcila ME, Oxnard GR, Nafa K, Riely GJ, Solomon SB, Zakowski MF, et al. Rebiopsy of lung cancer patients with acquired resistance to EGFR inhibitors and enhanced detection of the T790M mutation using a locked nucleic acid-based assay. *Clin Cancer Res*. 1 mars 2011;17(5):1169-80.
334. Ou S-HI, Agarwal N, Ali SM. High MET amplification level as a resistance mechanism to osimertinib (AZD9291) in a patient that symptomatically responded to crizotinib treatment post-osimertinib progression. *Lung Cancer*. 2016;98:59-61.
335. Martinez-Marti A, Felip E, Matito J, Mereu E, Navarro A, Cedrés S, et al. Dual MET and ERBB inhibition overcomes intratumor plasticity in osimertinib-resistant-advanced non-small-cell lung cancer (NSCLC). *Ann Oncol*. 1 oct 2017;28(10):2451-7.
336. 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*. 18 mai 2007;316(5827):1039-43.
337. Yano S, Wang W, Li Q, Matsumoto K, Sakurama H, Nakamura T, et al. Hepatocyte growth factor induces gefitinib resistance of lung adenocarcinoma with epidermal growth factor receptor-activating mutations. *Cancer Res*. 15 nov 2008;68(22):9479-87.
338. Yano S, Yamada T, Takeuchi S, Tachibana K, Minami Y, Yatabe Y, et al. Hepatocyte growth factor expression in EGFR mutant lung cancer with intrinsic and acquired resistance to tyrosine kinase inhibitors in a Japanese cohort. *J Thorac Oncol*. déc 2011;6(12):2011-7.

339. Yamada T, Matsumoto K, Wang W, Li Q, Nishioka Y, Sekido Y, et al. Hepatocyte growth factor reduces susceptibility to an irreversible epidermal growth factor receptor inhibitor in EGFR-T790M mutant lung cancer. *Clin Cancer Res.* 1 janv 2010;16(1):174-83.
340. Bean J, Brennan C, Shih J-Y, Riely G, Viale A, Wang L, et al. MET amplification occurs with or without T790M mutations in EGFR mutant lung tumors with acquired resistance to gefitinib or erlotinib. *Proc Natl Acad Sci USA.* 26 déc 2007;104(52):20932-7.
341. Cappuzzo F, Jänne PA, Skokan M, Finocchiaro G, Rossi E, Ligorio C, et al. MET increased gene copy number and primary resistance to gefitinib therapy in non-small-cell lung cancer patients. *Ann Oncol.* févr 2009;20(2):298-304.
342. Turke AB, Zejnullahu K, Wu Y-L, Song Y, Dias-Santagata D, Lifshits E, et al. Preexistence and clonal selection of MET amplification in EGFR mutant NSCLC. *Cancer Cell.* 19 janv 2010;17(1):77-88.
343. Gelsomino F, Facchinetti F, Haspinger ER, Garassino MC, Trusolino L, De Braud F, et al. Targeting the MET gene for the treatment of non-small-cell lung cancer. *Critical Reviews in Oncology/Hematology.* févr 2014;89(2):284-99.
344. Deng L, Kiedrowski LA, Ravera E, Cheng H, Halmos B. Response to Dual Crizotinib and Osimertinib Treatment in a Lung Cancer Patient with MET Amplification Detected by Liquid Biopsy Who Acquired Secondary Resistance to EGFR Tyrosine Kinase Inhibition. *J Thorac Oncol.* 2018;13(9):e169-72.
345. Gainor JF, Niederst MJ, Lennerz JK, Dagogo-Jack I, Stevens S, Shaw AT, et al. Dramatic Response to Combination Erlotinib and Crizotinib in a Patient with Advanced, EGFR-Mutant Lung Cancer Harboring De Novo MET Amplification. *J Thorac Oncol.* 2016;11(7):e83-85.
346. York ER, Varella-Garcia M, Bang TJ, Aisner DL, Camidge DR. Tolerable and Effective Combination of Full-Dose Crizotinib and Osimertinib Targeting MET Amplification Sequentially Emerging after T790M Positivity in EGFR-Mutant Non-Small Cell Lung Cancer. *J Thorac Oncol.* 2017;12(7):e85-8.
347. Reckamp KL, Frankel PH, Ruel N, Mack PC, Gitlitz BJ, Li T, et al. Phase II Trial of Cabozantinib Plus Erlotinib in Patients With Advanced Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR)-Mutant Non-small Cell Lung Cancer With Progressive Disease on Epidermal Growth Factor Receptor Tyrosine Kinase Inhibitor Therapy: A California Cancer Consortium Phase II Trial (NCI 9303). *Front Oncol.* 2019;9:132.
348. Lara MS, Holland WS, Chinn D, Burich RA, Lara PN, Gandara DR, et al. Preclinical Evaluation of MET Inhibitor INC-280 With or Without the Epidermal Growth Factor Receptor Inhibitor Erlotinib in Non-Small-Cell Lung Cancer. *Clin Lung Cancer.* mai 2017;18(3):281-5.
349. Oxnard GR, Yang JC-H, Yu H, Kim S-W, Saka H, Horn L, et al. TATTON: a multi-arm, phase Ib trial of osimertinib combined with selumetinib, savolitinib, or durvalumab in EGFR-mutant lung cancer. *Ann Oncol.* 2020;31(4):507-16.
350. Wu Y-L, Cheng Y, Zhou J, Lu S, Zhang Y, Zhao J, et al. Tepotinib plus gefitinib in patients with EGFR-mutant non-small-cell lung cancer with MET overexpression or MET amplification and acquired resistance to previous EGFR inhibitor (INSIGHT study): an open-label, phase 1b/2, multicentre, randomised trial. *Lancet Respir Med.* 29 mai 2020;
351. Yamasaki F, Johansen MJ, Zhang D, Krishnamurthy S, Felix E, Bartholomeusz C, et al. Acquired resistance to erlotinib in A-431 epidermoid cancer cells requires down-regulation of MMAC1/PTEN and up-regulation of phosphorylated Akt. *Cancer Res.* 15 juin 2007;67(12):5779-88.
352. Yamamoto C, Basaki Y, Kawahara A, Nakashima K, Kage M, Izumi H, et al. Loss of PTEN expression by blocking nuclear translocation of EGR1 in gefitinib-resistant lung cancer cells harboring epidermal growth factor receptor-activating mutations. *Cancer Res.* 1 nov 2010;70(21):8715-25.
353. Oxnard GR, Hu Y, Mileham KF, Husain H, Costa DB, Tracy P, et al. Assessment of Resistance Mechanisms and Clinical Implications in Patients With EGFR T790M-Positive Lung Cancer and Acquired Resistance to Osimertinib. *JAMA Oncol.* 01 2018;4(11):1527-34.
354. Ercan D, Xu C, Yanagita M, Monast CS, Pratilas CA, Montero J, et al. Reactivation of ERK signaling causes resistance to EGFR kinase inhibitors. *Cancer Discov.* oct 2012;2(10):934-47.

355. Ho C-C, Liao W-Y, Lin C-A, Shih J-Y, Yu C-J, Yang JC-H. Acquired BRAF V600E Mutation as Resistant Mechanism after Treatment with Osimertinib. *J Thorac Oncol.* 2017;12(3):567-72.
356. Minari R, Bordi P, La Monica S, Squadrilli A, Leonetti A, Bottarelli L, et al. Concurrent Acquired BRAF V600E Mutation and MET Amplification as Resistance Mechanism of First-Line Osimertinib Treatment in a Patient with EGFR-Mutated NSCLC. *J Thorac Oncol.* 2018;13(6):e89-91.
357. La Monica S, Minari R, Cretella D, Bonelli M, Fumarola C, Cavazzoni A, et al. Acquired BRAF G469A Mutation as a Resistance Mechanism to First-Line Osimertinib Treatment in NSCLC Cell Lines Harboring an EGFR Exon 19 Deletion. *Target Oncol.* 2019;14(5):619-26.
358. Ramalingam SS, Yang JC-H, Lee CK, Kurata T, Kim D-W, John T, et al. Osimertinib As First-Line Treatment of EGFR Mutation-Positive Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer. *J Clin Oncol.* 2018;36(9):841-9.
359. Eberlein CA, Stetson D, Markovets AA, Al-Kadhimi KJ, Lai Z, Fisher PR, et al. Acquired Resistance to the Mutant-Selective EGFR Inhibitor AZD9291 Is Associated with Increased Dependence on RAS Signaling in Preclinical Models. *Cancer Res.* 15 juin 2015;75(12):2489-500.
360. Tricker EM, Xu C, Uddin S, Capelletti M, Ercan D, Ogino A, et al. Combined EGFR/MEK Inhibition Prevents the Emergence of Resistance in EGFR-Mutant Lung Cancer. *Cancer Discov.* sept 2015;5(9):960-71.
361. Scaltriti M, Elkabets M, Baselga J. Molecular Pathways: AXL, a Membrane Receptor Mediator of Resistance to Therapy. *Clin Cancer Res.* 15 mars 2016;22(6):1313-7.
362. Gay CM, Balaji K, Byers LA. Giving AXL the axe: targeting AXL in human malignancy. *Br J Cancer.* 14 févr 2017;116(4):415-23.
363. Byers LA, Diao L, Wang J, Saintigny P, Girard L, Peyton M, et al. An epithelial-mesenchymal transition gene signature predicts resistance to EGFR and PI3K inhibitors and identifies Axl as a therapeutic target for overcoming EGFR inhibitor resistance. *Clin Cancer Res.* 1 janv 2013;19(1):279-90.
364. Zhang Z, Lee JC, Lin L, Olivas V, Au V, LaFramboise T, et al. Activation of the AXL kinase causes resistance to EGFR-targeted therapy in lung cancer. *Nat Genet.* 1 juill 2012;44(8):852-60.
365. Jimbo T, Hatanaka M, Komatsu T, Taira T, Kumazawa K, Maeda N, et al. DS-1205b, a novel selective inhibitor of AXL kinase, blocks resistance to EGFR-tyrosine kinase inhibitors in a non-small cell lung cancer xenograft model. *Oncotarget.* 27 août 2019;10(50):5152-67.
366. Taniguchi H, Yamada T, Wang R, Tanimura K, Adachi Y, Nishiyama A, et al. AXL confers intrinsic resistance to osimertinib and advances the emergence of tolerant cells. *Nat Commun.* 16 2019;10(1):259.
367. Okura N, Nishioka N, Yamada T, Taniguchi H, Tanimura K, Katayama Y, et al. ONO-7475, a Novel AXL Inhibitor, Suppresses the Adaptive Resistance to Initial EGFR-TKI Treatment in EGFR-Mutated Non-Small Lung Cancer. *Clin Cancer Res.* 17 janv 2020;
368. Neal JW, Dahlberg SE, Wakelee HA, Aisner SC, Bowden M, Huang Y, et al. Erlotinib, cabozantinib, or erlotinib plus cabozantinib as second-line or third-line treatment of patients with EGFR wild-type advanced non-small-cell lung cancer (ECOG-ACRIN 1512): a randomised, controlled, open-label, multicentre, phase 2 trial. *Lancet Oncol.* déc 2016;17(12):1661-71.
369. Guix M, Faber AC, Wang SE, Olivares MG, Song Y, Qu S, et al. Acquired resistance to EGFR tyrosine kinase inhibitors in cancer cells is mediated by loss of IGF-binding proteins. *J Clin Invest.* juill 2008;118(7):2609-19.
370. Cortot AB, Repellin CE, Shimamura T, Capelletti M, Zejnullahu K, Ercan D, et al. Resistance to irreversible EGF receptor tyrosine kinase inhibitors through a multistep mechanism involving the IGF1R pathway. *Cancer Res.* 15 janv 2013;73(2):834-43.
371. Park JH, Choi YJ, Kim SY, Lee J-E, Sung KJ, Park S, et al. Activation of the IGF1R pathway potentially mediates acquired resistance to mutant-selective 3rd-generation EGF receptor tyrosine kinase inhibitors in advanced non-small cell lung cancer. *Oncotarget.* 19 avr 2016;7(16):22005-15.

372. Manabe T, Yasuda H, Terai H, Kagiwada H, Hamamoto J, Ebisudani T, et al. IGF2 Autocrine-Mediated IGF1R Activation Is a Clinically Relevant Mechanism of Osimertinib Resistance in Lung Cancer. *Mol Cancer Res. avr 2020*;18(4):549-59.
373. Hayakawa D, Takahashi F, Mitsuishi Y, Tajima K, Hidayat M, Winardi W, et al. Activation of insulin-like growth factor-1 receptor confers acquired resistance to osimertinib in non-small cell lung cancer with EGFR T790M mutation. *Thorac Cancer. janv 2020*;11(1):140-9.
374. Ramalingam SS, Spigel DR, Chen D, Steins MB, Engelman JA, Schneider C-P, et al. Randomized phase II study of erlotinib in combination with placebo or R1507, a monoclonal antibody to insulin-like growth factor-1 receptor, for advanced-stage non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol. 1 déc 2011*;29(34):4574-80.
375. Moran T, Felip E, Keedy V, Borghaei H, Shepherd FA, Insa A, et al. Activity of dalotuzumab, a selective anti-IGF1R antibody, in combination with erlotinib in unselected patients with Non-small-cell lung cancer: a phase I/II randomized trial. *Exp Hematol Oncol. 2014*;3(1):26.
376. Scagliotti GV, Bondarenko I, Blackhall F, Barlesi F, Hsia T-C, Jassem J, et al. Randomized, phase III trial of figitumumab in combination with erlotinib versus erlotinib alone in patients with nonadenocarcinoma nonsmall-cell lung cancer. *Ann Oncol. mars 2015*;26(3):497-504.
377. Terai H, Soejima K, Yasuda H, Nakayama S, Hamamoto J, Arai D, et al. Activation of the FGF2-FGFR1 autocrine pathway: a novel mechanism of acquired resistance to gefitinib in NSCLC. *Mol Cancer Res. juill 2013*;11(7):759-67.
378. Ware KE, Hinz TK, Kleczko E, Singleton KR, Marek LA, Helfrich BA, et al. A mechanism of resistance to gefitinib mediated by cellular reprogramming and the acquisition of an FGF2-FGFR1 autocrine growth loop. *Oncogenesis. 25 mars 2013*;2:e39.
379. Azuma K, Kawahara A, Sonoda K, Nakashima K, Tashiro K, Watari K, et al. FGFR1 activation is an escape mechanism in human lung cancer cells resistant to afatinib, a pan-EGFR family kinase inhibitor. *Oncotarget. 15 août 2014*;5(15):5908-19.
380. Ware KE, Marshall ME, Heasley LR, Marek L, Hinz TK, Hercule P, et al. Rapidly acquired resistance to EGFR tyrosine kinase inhibitors in NSCLC cell lines through de-repression of FGFR2 and FGFR3 expression. *PLoS ONE. 29 nov 2010*;5(11):e14117.
381. Chen G, Bao Y, Weng Q, Zhao Y, Lu X, Fu L, et al. Compound 15c, a Novel Dual Inhibitor of EGFR L858R/T790M and FGFR1, Efficiently Overcomes Epidermal Growth Factor Receptor-Tyrosine Kinase Inhibitor Resistance of Non-Small-Cell Lung Cancers. *Front Pharmacol. 2019*;10:1533.
382. Lian Z, Du W, Zhu J, Zeng Y, Liu Z, Huang J-A. Anlotinib can overcome acquired resistance to EGFR-TKIs via FGFR1 signaling in non-small cell lung cancer. *Ann Oncol. avr 2019*;30 Suppl 2:ii50.
383. Konishi J, Yi F, Chen X, Vo H, Carbone DP, Dang TP. Notch3 cooperates with the EGFR pathway to modulate apoptosis through the induction of bim. *Oncogene. 28 janv 2010*;29(4):589-96.
384. Arasada RR, Amann JM, Rahman MA, Huppert SS, Carbone DP. EGFR blockade enriches for lung cancer stem-like cells through Notch3-dependent signaling. *Cancer Res. 1 oct 2014*;74(19):5572-84.
385. Hu S, Fu W, Li T, Yuan Q, Wang F, Lv G, et al. Antagonism of EGFR and Notch limits resistance to EGFR inhibitors and radiation by decreasing tumor-initiating cell frequency. *Sci Transl Med. 08 2017*;9(380).
386. Bousquet Mur E, Bernardo S, Papon L, Mancini M, Fabbrizio E, Goussard M, et al. Notch inhibition overcomes resistance to tyrosine kinase inhibitors in EGFR-driven lung adenocarcinoma. *J Clin Invest. 3 févr 2020*;130(2):612-24.
387. Okamoto I, Araki J, Suto R, Shimada M, Nakagawa K, Fukuoka M. EGFR mutation in gefitinib-responsive small-cell lung cancer. *Ann Oncol. juin 2006*;17(6):1028-9.
388. Zakowski MF, Ladanyi M, Kris MG, Memorial Sloan-Kettering Cancer Center Lung Cancer OncoGenome Group. EGFR mutations in small-cell lung cancers in patients who have never smoked. *N Engl J Med. 13 juill 2006*;355(2):213-5.

389. Fukui T, Tsuta K, Furuta K, Watanabe S-I, Asamura H, Ohe Y, et al. Epidermal growth factor receptor mutation status and clinicopathological features of combined small cell carcinoma with adenocarcinoma of the lung. *Cancer Sci.* nov 2007;98(11):1714-9.
390. Morinaga R, Okamoto I, Furuta K, Kawano Y, Sekijima M, Dote K, et al. Sequential occurrence of non-small cell and small cell lung cancer with the same EGFR mutation. *Lung Cancer.* déc 2007;58(3):411-3.
391. Tatematsu A, Shimizu J, Murakami Y, Horio Y, Nakamura S, Hida T, et al. Epidermal growth factor receptor mutations in small cell lung cancer. *Clin Cancer Res.* 1 oct 2008;14(19):6092-6.
392. Popat S, Wotherspoon A, Nutting CM, Gonzalez D, Nicholson AG, O'Brien M. Transformation to « high grade » neuroendocrine carcinoma as an acquired drug resistance mechanism in EGFR-mutant lung adenocarcinoma. *Lung Cancer.* avr 2013;80(1):1-4.
393. Ham JS, Kim S, Kim HK, Byeon S, Sun J-M, Lee S-H, et al. Two Cases of Small Cell Lung Cancer Transformation from EGFR Mutant Adenocarcinoma During AZD9291 Treatment. *J Thorac Oncol.* janv 2016;11(1):e1-4.
394. Li L, Wang H, Li C, Wang Z, Zhang P, Yan X. Transformation to small-cell carcinoma as an acquired resistance mechanism to AZD9291: A case report. *Oncotarget.* 14 mars 2017;8(11):18609-14.
395. Taniguchi Y, Horiuchi H, Morikawa T, Usui K. Small-Cell Carcinoma Transformation of Pulmonary Adenocarcinoma after Osimertinib Treatment: A Case Report. *Case Rep Oncol.* août 2018;11(2):323-9.
396. Niederst MJ, Sequist LV, Poirier JT, Mermel CH, Lockerman EL, Garcia AR, et al. RB loss in resistant EGFR mutant lung adenocarcinomas that transform to small-cell lung cancer. *Nat Commun.* 11 mars 2015;6:6377.
397. Lee J-K, Lee J, Kim S, Kim S, Youk J, Park S, et al. Clonal History and Genetic Predictors of Transformation Into Small-Cell Carcinomas From Lung Adenocarcinomas. *J Clin Oncol.* 10 sept 2017;35(26):3065-74.
398. Meuwissen R, Linn SC, Linnoila RI, Zevenhoven J, Mooi WJ, Berns A. Induction of small cell lung cancer by somatic inactivation of both Trp53 and Rb1 in a conditional mouse model. *Cancer Cell.* sept 2003;4(3):181-9.
399. Sutherland KD, Proost N, Brouns I, Adriaensen D, Song J-Y, Berns A. Cell of origin of small cell lung cancer: inactivation of Trp53 and Rb1 in distinct cell types of adult mouse lung. *Cancer Cell.* 14 juin 2011;19(6):754-64.
400. Lin C, Song H, Huang C, Yao E, Gacayan R, Xu S-M, et al. Alveolar type II cells possess the capability of initiating lung tumor development. *PLoS ONE.* 2012;7(12):e53817.
401. Oser MG, Niederst MJ, Sequist LV, Engelman JA. Transformation from non-small-cell lung cancer to small-cell lung cancer: molecular drivers and cells of origin. *Lancet Oncol.* avr 2015;16(4):e165-172.
402. Paik PK, Varghese AM, Sima CS, Moreira AL, Ladanyi M, Kris MG, et al. Response to erlotinib in patients with EGFR mutant advanced non-small cell lung cancers with a squamous or squamous-like component. *Mol Cancer Ther.* nov 2012;11(11):2535-40.
403. Bruno R, Proietti A, Ali G, Puppo G, Ribechini A, Chella A, et al. Squamous cell transformation and EGFR T790M mutation as acquired resistance mechanisms in a patient with lung adenocarcinoma treated with a tyrosine kinase inhibitor: A case report. *Oncol Lett.* nov 2017;14(5):5947-51.
404. Izumi H, Yamasaki A, Ueda Y, Sumikawa T, Maeta H, Nakamoto S, et al. Squamous Cell Carcinoma Transformation from EGFR-mutated Lung Adenocarcinoma: A Case Report and Literature Review. *Clin Lung Cancer.* 2018;19(1):e63-6.
405. Lin C-C, Shih J-Y, Yu C-J, Ho C-C, Liao W-Y, Lee J-H, et al. Outcomes in patients with non-small-cell lung cancer and acquired Thr790Met mutation treated with osimertinib: a genomic study. *Lancet Respir Med.* 2018;6(2):107-16.
406. Shinohara S, Ichiki Y, Fukuichi Y, Honda Y, Kanayama M, Taira A, et al. Squamous cell carcinoma transformation from adenocarcinoma as an acquired resistance after the EGFR TKI therapy in (EGFR-mutated) non-small cell lung cancer. *J Thorac Dis.* juill 2018;10(7):E526-31.

407. Mehlman C, Cadranel J, Rousseau-Bussac G, Lacave R, Pujals A, Girard N, et al. Resistance mechanisms to osimertinib in EGFR-mutated advanced non-small-cell lung cancer: A multicentric retrospective French study. *Lung Cancer*. 2019;137:149-56.
408. Kalluri R, Weinberg RA. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest*. juin 2009;119(6):1420-8.
409. Chung J-H, Rho JK, Xu X, Lee JS, Yoon HI, Lee CT, et al. Clinical and molecular evidences of epithelial to mesenchymal transition in acquired resistance to EGFR-TKIs. *Lung Cancer*. août 2011;73(2):176-82.
410. Suda K, Tomizawa K, Fujii M, Murakami H, Osada H, Maehara Y, et al. Epithelial to mesenchymal transition in an epidermal growth factor receptor-mutant lung cancer cell line with acquired resistance to erlotinib. *J Thorac Oncol*. juill 2011;6(7):1152-61.
411. Lee A-F, Chen M-C, Chen C-J, Yang C-J, Huang M-S, Liu Y-P. Reverse epithelial-mesenchymal transition contributes to the regain of drug sensitivity in tyrosine kinase inhibitor-resistant non-small cell lung cancer cells. *PLoS ONE*. 2017;12(7):e0180383.
412. Weng C-H, Chen L-Y, Lin Y-C, Shih J-Y, Lin Y-C, Tseng R-Y, et al. Epithelial-mesenchymal transition (EMT) beyond EGFR mutations per se is a common mechanism for acquired resistance to EGFR TKI. *Oncogene*. 2019;38(4):455-68.
413. Yochum ZA, Cades J, Wang H, Chatterjee S, Simons BW, O'Brien JP, et al. Targeting the EMT transcription factor TWIST1 overcomes resistance to EGFR inhibitors in EGFR-mutant non-small-cell lung cancer. *Oncogene*. 2019;38(5):656-70.
414. Yoshida T, Song L, Bai Y, Kinose F, Li J, Ohaegbulam KC, et al. ZEB1 Mediates Acquired Resistance to the Epidermal Growth Factor Receptor-Tyrosine Kinase Inhibitors in Non-Small Cell Lung Cancer. *PLoS ONE*. 2016;11(1):e0147344.
415. Uramoto H, Iwata T, Onitsuka T, Shimokawa H, Hanagiri T, Oyama T. Epithelial-mesenchymal transition in EGFR-TKI acquired resistant lung adenocarcinoma. *Anticancer Res*. juill 2010;30(7):2513-7.
416. Uramoto H, Shimokawa H, Hanagiri T, Kuwano M, Ono M. Expression of selected gene for acquired drug resistance to EGFR-TKI in lung adenocarcinoma. *Lung Cancer*. sept 2011;73(3):361-5.
417. Soucheray M, Capelletti M, Pulido I, Kuang Y, Paweletz CP, Becker JH, et al. Intratumoral Heterogeneity in EGFR-Mutant NSCLC Results in Divergent Resistance Mechanisms in Response to EGFR Tyrosine Kinase Inhibition. *Cancer Res*. 15 oct 2015;75(20):4372-83.
418. Lamouille S, Xu J, Derynck R. Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition. *Nat Rev Mol Cell Biol*. mars 2014;15(3):178-96.
419. Lee MK, Pardoux C, Hall MC, Lee PS, Warburton D, Qing J, et al. TGF-beta activates Erk MAP kinase signalling through direct phosphorylation of ShcA. *EMBO J*. 5 sept 2007;26(17):3957-67.
420. Buonato JM, Lazzara MJ. ERK1/2 blockade prevents epithelial-mesenchymal transition in lung cancer cells and promotes their sensitivity to EGFR inhibition. *Cancer Res*. 1 janv 2014;74(1):309-19.
421. Yao Z, Fenoglio S, Gao DC, Camiolo M, Stiles B, Lindsted T, et al. TGF-beta IL-6 axis mediates selective and adaptive mechanisms of resistance to molecular targeted therapy in lung cancer. *Proc Natl Acad Sci USA*. 31 août 2010;107(35):15535-40.
422. Xie M, Zhang L, He C, Xu F, Liu J, Hu Z, et al. Activation of Notch-1 enhances epithelial-mesenchymal transition in gefitinib-acquired resistant lung cancer cells. *J Cell Biochem*. mai 2012;113(5):1501-13.
423. Zhang T, Guo L, Creighton CJ, Lu Q, Gibbons DL, Yi ES, et al. A genetic cell context-dependent role for ZEB1 in lung cancer. *Nat Commun*. 26 2016;7:12231.
424. Derynck R, Muthusamy BP, Saeteurn KY. Signaling pathway cooperation in TGF- β -induced epithelial-mesenchymal transition. *Curr Opin Cell Biol*. déc 2014;31:56-66.
425. Deskin B, Lasky J, Zhuang Y, Shan B. Requirement of HDAC6 for activation of Notch1 by TGF- β 1. *Sci Rep*. 08 2016;6:31086.

426. Zhou J, Wang J, Zeng Y, Zhang X, Hu Q, Zheng J, et al. Implication of epithelial-mesenchymal transition in IGF1R-induced resistance to EGFR-TKIs in advanced non-small cell lung cancer. *Oncotarget*. 29 déc 2015;6(42):44332-45.
427. Wilson C, Nicholes K, Bustos D, Lin E, Song Q, Stephan J-P, et al. Overcoming EMT-associated resistance to anti-cancer drugs via Src/FAK pathway inhibition. *Oncotarget*. 15 sept 2014;5(17):7328-41.
428. Li D, Zhang L, Zhou J, Chen H. Cigarette smoke extract exposure induces EGFR-TKI resistance in EGFR-mutated NSCLC via mediating Src activation and EMT. *Lung Cancer*. mars 2016;93:35-42.
429. Della Corte CM, Bellevisine C, Vicidomini G, Vitagliano D, Malapelle U, Accardo M, et al. SMO Gene Amplification and Activation of the Hedgehog Pathway as Novel Mechanisms of Resistance to Anti-Epidermal Growth Factor Receptor Drugs in Human Lung Cancer. *Clin Cancer Res*. 15 oct 2015;21(20):4686-97.
430. Bai X-Y, Zhang X-C, Yang S-Q, An S-J, Chen Z-H, Su J, et al. Blockade of Hedgehog Signaling Synergistically Increases Sensitivity to Epidermal Growth Factor Receptor Tyrosine Kinase Inhibitors in Non-Small-Cell Lung Cancer Cell Lines. *PLoS ONE*. 2016;11(3):e0149370.
431. Della Corte CM, Malapelle U, Vigliar E, Pepe F, Troncone G, Ciaramella V, et al. Efficacy of continuous EGFR-inhibition and role of Hedgehog in EGFR acquired resistance in human lung cancer cells with activating mutation of EGFR. *Oncotarget*. 4 avr 2017;8(14):23020-32.
432. Narita M, Shimura E, Nagasawa A, Aiuchi T, Suda Y, Hamada Y, et al. Chronic treatment of non-small-cell lung cancer cells with gefitinib leads to an epigenetic loss of epithelial properties associated with reductions in microRNA-155 and -200c. *PLoS ONE*. 2017;12(2):e0172115.
433. Blakely CM, Watkins TBK, Wu W, Gini B, Chabon JJ, McCoach CE, et al. Evolution and clinical impact of co-occurring genetic alterations in advanced-stage EGFR-mutant lung cancers. *Nat Genet*. déc 2017;49(12):1693-704.
434. Klempner SJ, Bazhenova LA, Braiteh FS, Nikolinakos PG, Gowen K, Cervantes CM, et al. Emergence of RET rearrangement co-existing with activated EGFR mutation in EGFR-mutated NSCLC patients who had progressed on first- or second-generation EGFR TKI. *Lung Cancer*. sept 2015;89(3):357-9.
435. Zeng L, Yang N, Zhang Y. GOPC-ROS1 Rearrangement as an Acquired Resistance Mechanism to Osimertinib and Responding to Crizotinib Combined Treatments in Lung Adenocarcinoma. *J Thorac Oncol*. 2018;13(7):e114-6.
436. Schrock AB, Zhu VW, Hsieh W-S, Madison R, Creelan B, Silberberg J, et al. Receptor Tyrosine Kinase Fusions and BRAF Kinase Fusions are Rare but Actionable Resistance Mechanisms to EGFR Tyrosine Kinase Inhibitors. *J Thorac Oncol*. 2018;13(9):1312-23.
437. Offin M, Somwar R, Rekhman N, Benayed R, Chang JC, Plodkowski A, et al. Acquired ALK and RET Gene Fusions as Mechanisms of Resistance to Osimertinib in EGFR-Mutant Lung Cancers. *JCO Precis Oncol*. 2018;2.
438. Turner NC, Reis-Filho JS. Genetic heterogeneity and cancer drug resistance. *Lancet Oncol*. avr 2012;13(4):e178-185.
439. Wu D, Wang DC, Cheng Y, Qian M, Zhang M, Shen Q, et al. Roles of tumor heterogeneity in the development of drug resistance: A call for precision therapy. *Semin Cancer Biol*. 2017;42:13-9.
440. Suda K, Murakami I, Katayama T, Tomizawa K, Osada H, Sekido Y, et al. Reciprocal and complementary role of MET amplification and EGFR T790M mutation in acquired resistance to kinase inhibitors in lung cancer. *Clin Cancer Res*. 15 nov 2010;16(22):5489-98.
441. Taniguchi K, Okami J, Kodama K, Higashiyama M, Kato K. Intratumor heterogeneity of epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer and its correlation to the response to gefitinib. *Cancer Sci*. mai 2008;99(5):929-35.
442. Chen Z-Y, Zhong W-Z, Zhang X-C, Su J, Yang X-N, Chen Z-H, et al. EGFR mutation heterogeneity and the mixed response to EGFR tyrosine kinase inhibitors of lung adenocarcinomas. *Oncologist*. 2012;17(7):978-85.
443. Hata A, Katakami N, Yoshioka H, Kaji R, Masago K, Fujita S, et al. Spatiotemporal T790M Heterogeneity in Individual Patients with EGFR-Mutant Non-Small-Cell Lung Cancer after Acquired Resistance to EGFR-TKI. *J Thorac Oncol*. nov 2015;10(11):1553-9.

444. Kuczynski EA, Sargent DJ, Grothey A, Kerbel RS. Drug rechallenge and treatment beyond progression--implications for drug resistance. *Nat Rev Clin Oncol*. oct 2013;10(10):571-87.
445. Dagogo-Jack I, Shaw AT. Tumour heterogeneity and resistance to cancer therapies. *Nat Rev Clin Oncol*. 2018;15(2):81-94.
446. Hata AN, Niederst MJ, Archibald HL, Gomez-Caraballo M, Siddiqui FM, Mulvey HE, et al. Tumor cells can follow distinct evolutionary paths to become resistant to epidermal growth factor receptor inhibition. *Nature Medicine*. mars 2016;22(3):262-9.
447. Ramirez M, Rajaram S, Steining RJ, Osipchuk D, Roth MA, Morinishi LS, et al. Diverse drug-resistance mechanisms can emerge from drug-tolerant cancer persister cells. *Nature Communications* [Internet]. déc 2016 [cité 21 nov 2018];7(1). Disponible sur: <http://www.nature.com/articles/ncomms10690>
448. Wilting RH, Dannenberg J-H. Epigenetic mechanisms in tumorigenesis, tumor cell heterogeneity and drug resistance. *Drug Resistance Updates*. févr 2012;15(1-2):21-38.
449. Allis CD, Jenuwein T. The molecular hallmarks of epigenetic control. *Nat Rev Genet*. 2016;17(8):487-500.
450. Guler GD, Tindell CA, Pitti R, Wilson C, Nichols K, KaiWai Cheung T, et al. Repression of Stress-Induced LINE-1 Expression Protects Cancer Cell Subpopulations from Lethal Drug Exposure. *Cancer Cell*. août 2017;32(2):221-237.e13.
451. Raha D, Wilson TR, Peng J, Peterson D, Yue P, Evangelista M, et al. The cancer stem cell marker aldehyde dehydrogenase is required to maintain a drug-tolerant tumor cell subpopulation. *Cancer Res*. 1 juill 2014;74(13):3579-90.
452. Chmielecki J, Foo J, Oxnard GR, Hutchinson K, Ohashi K, Somwar R, et al. Optimization of dosing for EGFR-mutant non-small cell lung cancer with evolutionary cancer modeling. *Sci Transl Med*. 6 juill 2011;3(90):90ra59.
453. Jonsson VD, Blakely CM, Lin L, Asthana S, Matni N, Olivas V, et al. Novel computational method for predicting polytherapy switching strategies to overcome tumor heterogeneity and evolution. *Sci Rep*. 13 2017;7:44206.
454. Christensen J, Agger K, Cloos PAC, Pasini D, Rose S, Sennels L, et al. RBP2 belongs to a family of demethylases, specific for tri- and dimethylated lysine 4 on histone 3. *Cell*. 23 mars 2007;128(6):1063-76.
455. Vinogradova M, Gehling VS, Gustafson A, Arora S, Tindell CA, Wilson C, et al. An inhibitor of KDM5 demethylases reduces survival of drug-tolerant cancer cells. *Nat Chem Biol*. juill 2016;12(7):531-8.
456. Witta SE, Jotte RM, Konduri K, Neubauer MA, Spira AI, Ruxer RL, et al. Randomized phase II trial of erlotinib with and without entinostat in patients with advanced non-small-cell lung cancer who progressed on prior chemotherapy. *J Clin Oncol*. 20 juin 2012;30(18):2248-55.
457. Reguart N, Rosell R, Cardenal F, Cardona AF, Isla D, Palmero R, et al. Phase I/II trial of vorinostat (SAHA) and erlotinib for non-small cell lung cancer (NSCLC) patients with epidermal growth factor receptor (EGFR) mutations after erlotinib progression. *Lung Cancer*. mai 2014;84(2):161-7.
458. Han J-Y, Lee SH, Lee GK, Yun T, Lee YJ, Hwang KH, et al. Phase I/II study of gefitinib (Iressa®) and vorinostat (IVORI) in previously treated patients with advanced non-small cell lung cancer. *Cancer Chemother Pharmacol*. mars 2015;75(3):475-83.
459. Rusan M, Li K, Li Y, Christensen CL, Abraham BJ, Kwiatkowski N, et al. Suppression of Adaptive Responses to Targeted Cancer Therapy by Transcriptional Repression. *Cancer Discov*. janv 2018;8(1):59-73.
460. Terai H, Kitajima S, Potter DS, Matsui Y, Quiceno LG, Chen T, et al. ER Stress Signaling Promotes the Survival of Cancer "Persister Cells" Tolerant to EGFR Tyrosine Kinase Inhibitors. *Cancer Res*. 15 févr 2018;78(4):1044-57.
461. Phuchareon J, McCormick F, Eisele DW, Tetsu O. EGFR inhibition evokes innate drug resistance in lung cancer cells by preventing Akt activity and thus inactivating Ets-1 function. *Proc Natl Acad Sci USA*. 21 juill 2015;112(29):E3855-3863.

462. Viswanathan VS, Ryan MJ, Dhruv HD, Gill S, Eichhoff OM, Seashore-Ludlow B, et al. Dependency of a therapy-resistant state of cancer cells on a lipid peroxidase pathway. *Nature*. 27 2017;547(7664):453-7.
463. Hangauer MJ, Viswanathan VS, Ryan MJ, Bole D, Eaton JK, Matov A, et al. Drug-tolerant persister cancer cells are vulnerable to GPX4 inhibition. *Nature* [Internet]. 1 nov 2017 [cité 21 nov 2018]; Disponible sur: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nature24297>
464. Raouf S, Mulford IJ, Frisco-Cabanos H, Nangia V, Timonina D, Labrot E, et al. Targeting FGFR overcomes EMT-mediated resistance in EGFR mutant non-small cell lung cancer. *Oncogene*. 2019;38(37):6399-413.
465. Kurppa KJ, Liu Y, To C, Zhang T, Fan M, Vajdi A, et al. Treatment-Induced Tumor Dormancy through YAP-Mediated Transcriptional Reprogramming of the Apoptotic Pathway. *Cancer Cell*. 13 janv 2020;37(1):104-122.e12.
466. Roesch A, Vultur A, Bogeski I, Wang H, Zimmermann KM, Speicher D, et al. Overcoming intrinsic multidrug resistance in melanoma by blocking the mitochondrial respiratory chain of slow-cycling JARID1B(high) cells. *Cancer Cell*. 10 juin 2013;23(6):811-25.
467. Ravindran Menon D, Das S, Krepler C, Vultur A, Rinner B, Schauer S, et al. A stress-induced early innate response causes multidrug tolerance in melanoma. *Oncogene*. 20 août 2015;34(34):4448-59.
468. Fallahi-Sichani M, Becker V, Izar B, Baker GJ, Lin J-R, Boswell SA, et al. Adaptive resistance of melanoma cells to RAF inhibition via reversible induction of a slowly dividing de-differentiated state. *Mol Syst Biol*. 09 2017;13(1):905.
469. Shaffer SM, Dunagin MC, Torborg SR, Torre EA, Emert B, Krepler C, et al. Rare cell variability and drug-induced reprogramming as a mode of cancer drug resistance. *Nature*. 15 2017;546(7658):431-5.
470. Rambow F, Rogiers A, Marin-Bejar O, Aibar S, Femel J, Dewaele M, et al. Toward Minimal Residual Disease-Directed Therapy in Melanoma. *Cell*. 09 2018;174(4):843-855.e19.
471. Liao BB, Sievers C, Donohue LK, Gillespie SM, Flavahan WA, Miller TE, et al. Adaptive Chromatin Remodeling Drives Glioblastoma Stem Cell Plasticity and Drug Tolerance. *Cell Stem Cell*. 02 2017;20(2):233-246.e7.
472. Risom T, Langer EM, Chapman MP, Rantala J, Fields AJ, Boniface C, et al. Differentiation-state plasticity is a targetable resistance mechanism in basal-like breast cancer. *Nat Commun*. 19 2018;9(1):3815.
473. Dalvi MP, Wang L, Zhong R, Kollipara RK, Park H, Bayo J, et al. Taxane-Platin-Resistant Lung Cancers Co-develop Hypersensitivity to JumonjiC Demethylase Inhibitors. *Cell Rep*. 23 2017;19(8):1669-84.
474. Knoechel B, Roderick JE, Williamson KE, Zhu J, Lohr JG, Cotton MJ, et al. An epigenetic mechanism of resistance to targeted therapy in T cell acute lymphoblastic leukemia. *Nat Genet*. avr 2014;46(4):364-70.
475. Hayflick L, Moorhead PS. The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res*. déc 1961;25:585-621.
476. Hayflick L. THE LIMITED IN VITRO LIFETIME OF HUMAN DIPLOID CELL STRAINS. *Exp Cell Res*. mars 1965;37:614-36.
477. Childs BG, Durik M, Baker DJ, van Deursen JM. Cellular senescence in aging and age-related disease: from mechanisms to therapy. *Nat Med*. déc 2015;21(12):1424-35.
478. Terzi MY, Izmirlı M, Gogebakan B. The cell fate: senescence or quiescence. *Mol Biol Rep*. nov 2016;43(11):1213-20.
479. Hernandez-Segura A, Nehme J, Demaria M. Hallmarks of Cellular Senescence. *Trends Cell Biol*. 2018;28(6):436-53.
480. Gorgoulis V, Adams PD, Alimonti A, Bennett DC, Bischof O, Bishop C, et al. Cellular Senescence: Defining a Path Forward. *Cell*. 31 2019;179(4):813-27.
481. Muñoz-Espín D, Serrano M. Cellular senescence: from physiology to pathology. *Nat Rev Mol Cell Biol*. juill 2014;15(7):482-96.
482. Sherr CJ, McCormick F. The RB and p53 pathways in cancer. *Cancer Cell*. août 2002;2(2):103-12.

483. Chicas A, Wang X, Zhang C, McCurrach M, Zhao Z, Mert O, et al. Dissecting the unique role of the retinoblastoma tumor suppressor during cellular senescence. *Cancer Cell*. 13 avr 2010;17(4):376-87.
484. Dimri GP, Lee X, Basile G, Acosta M, Scott G, Roskelley C, et al. A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA*. 26 sept 1995;92(20):9363-7.
485. Kurz DJ, Decary S, Hong Y, Erusalimsky JD. Senescence-associated (beta)-galactosidase reflects an increase in lysosomal mass during replicative ageing of human endothelial cells. *J Cell Sci*. oct 2000;113 (Pt 20):3613-22.
486. Georgakopoulou E, Tsimaratou K, Evangelou K, Fernandez M-P, Zoumpourlis V, Trougakos I, et al. Specific lipofuscin staining as a novel biomarker to detect replicative and stress-induced senescence. A method applicable in cryo-preserved and archival tissues. *aging*. 29 déc 2012;5(1):37-50.
487. Kuilman T, Michaloglou C, Vredeveld LCW, Douma S, van Doorn R, Desmet CJ, et al. Oncogene-induced senescence relayed by an interleukin-dependent inflammatory network. *Cell*. 13 juin 2008;133(6):1019-31.
488. Kuilman T, Peeper DS. Senescence-messaging secretome: SMS-ing cellular stress. *Nat Rev Cancer*. févr 2009;9(2):81-94.
489. Acosta JC, Banito A, Wuestefeld T, Georgilis A, Janich P, Morton JP, et al. A complex secretory program orchestrated by the inflammasome controls paracrine senescence. *Nat Cell Biol*. août 2013;15(8):978-90.
490. Wang C, Jurk D, Maddick M, Nelson G, Martin-Ruiz C, von Zglinicki T. DNA damage response and cellular senescence in tissues of aging mice. *Aging Cell*. juin 2009;8(3):311-23.
491. Campisi J, d'Adda di Fagagna F. Cellular senescence: when bad things happen to good cells. *Nat Rev Mol Cell Biol*. sept 2007;8(9):729-40.
492. Rufini A, Tucci P, Celardo I, Melino G. Senescence and aging: the critical roles of p53. *Oncogene*. 24 oct 2013;32(43):5129-43.
493. Narita M, Núñez S, Heard E, Narita M, Lin AW, Hearn SA, et al. Rb-mediated heterochromatin formation and silencing of E2F target genes during cellular senescence. *Cell*. 13 juin 2003;113(6):703-16.
494. Zhang R, Poustovoitov MV, Ye X, Santos HA, Chen W, Daganzo SM, et al. Formation of MacroH2A-containing senescence-associated heterochromatin foci and senescence driven by ASF1a and HIRA. *Dev Cell*. janv 2005;8(1):19-30.
495. Shimi T, Butin-Israeli V, Adam SA, Hamanaka RB, Goldman AE, Lucas CA, et al. The role of nuclear lamin B1 in cell proliferation and senescence. *Genes Dev*. 15 déc 2011;25(24):2579-93.
496. Freund A, Laberge R-M, Demaria M, Campisi J. Lamin B1 loss is a senescence-associated biomarker. *Mol Biol Cell*. juin 2012;23(11):2066-75.
497. Childs BG, Baker DJ, Kirkland JL, Campisi J, van Deursen JM. Senescence and apoptosis: dueling or complementary cell fates? *EMBO Rep*. nov 2014;15(11):1139-53.
498. Malaquin N, Martinez A, Rodier F. Keeping the senescence secretome under control: Molecular reins on the senescence-associated secretory phenotype. *Exp Gerontol*. 2016;82:39-49.
499. Mikuła-Pietrasik J, Niklas A, Uruski P, Tykarski A, Książek K. Mechanisms and significance of therapy-induced and spontaneous senescence of cancer cells. *Cell Mol Life Sci*. janv 2020;77(2):213-29.
500. Serrano M, Lin AW, McCurrach ME, Beach D, Lowe SW. Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a. *Cell*. 7 mars 1997;88(5):593-602.
501. Dimauro T, David G. Ras-induced senescence and its physiological relevance in cancer. *Curr Cancer Drug Targets*. déc 2010;10(8):869-76.
502. Jeanblanc M, Ragu S, Gey C, Contrepolis K, Courbeyrette R, Thuret J-Y, et al. Parallel pathways in RAF-induced senescence and conditions for its reversion. *Oncogene*. 21 juin 2012;31(25):3072-85.

503. Alimonti A, Nardella C, Chen Z, Clohessy JG, Carracedo A, Trotman LC, et al. A novel type of cellular senescence that can be enhanced in mouse models and human tumor xenografts to suppress prostate tumorigenesis. *J Clin Invest.* mars 2010;120(3):681-93.
504. Courtois-Cox S, Genter Williams SM, Reczek EE, Johnson BW, McGillicuddy LT, Johannessen CM, et al. A negative feedback signaling network underlies oncogene-induced senescence. *Cancer Cell.* déc 2006;10(6):459-72.
505. Chen Q, Fischer A, Reagan JD, Yan LJ, Ames BN. Oxidative DNA damage and senescence of human diploid fibroblast cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 9 mai 1995;92(10):4337-41.
506. Lee AC, Fenster BE, Ito H, Takeda K, Bae NS, Hirai T, et al. Ras proteins induce senescence by altering the intracellular levels of reactive oxygen species. *J Biol Chem.* 19 mars 1999;274(12):7936-40.
507. Wiley CD, Velarde MC, Lecot P, Liu S, Sarnoski EA, Freund A, et al. Mitochondrial Dysfunction Induces Senescence with a Distinct Secretory Phenotype. *Cell Metab.* 9 févr 2016;23(2):303-14.
508. Suzuki K, Mori I, Nakayama Y, Miyakoda M, Kodama S, Watanabe M. Radiation-induced senescence-like growth arrest requires TP53 function but not telomere shortening. *Radiat Res.* janv 2001;155(1 Pt 2):248-53.
509. He X, Yang A, McDonald DG, Riemer EC, Vanek KN, Schulte BA, et al. MiR-34a modulates ionizing radiation-induced senescence in lung cancer cells. *Oncotarget.* 19 sept 2017;8(41):69797-807.
510. Jones KR, Elmore LW, Jackson-Cook C, Demasters G, Povirk LF, Holt SE, et al. p53-Dependent accelerated senescence induced by ionizing radiation in breast tumour cells. *Int J Radiat Biol.* juin 2005;81(6):445-58.
511. Mirzayans R, Scott A, Cameron M, Murray D. Induction of accelerated senescence by gamma radiation in human solid tumor-derived cell lines expressing wild-type TP53. *Radiat Res.* janv 2005;163(1):53-62.
512. Petrova NV, Velichko AK, Razin SV, Kantidze OL. Small molecule compounds that induce cellular senescence. *Aging Cell.* déc 2016;15(6):999-1017.
513. Saleh T, Bloukh S, Carpenter VJ, Alwohoush E, Bakeer J, Darwish S, et al. Therapy-Induced Senescence: An « Old » Friend Becomes the Enemy. *Cancers (Basel).* 29 mars 2020;12(4).
514. Drullion C, Trégoat C, Lagarde V, Tan S, Gioia R, Priault M, et al. Apoptosis and autophagy have opposite roles on imatinib-induced K562 leukemia cell senescence. *Cell Death Dis.* 16 août 2012;3:e373.
515. Sun R, Bao M-Y, Long X, Yuan Y, Wu M-M, Li X, et al. Metabolic gene NR4A1 as a potential therapeutic target for non-smoking female non-small cell lung cancer patients. *Thorac Cancer.* 2019;10(4):715-27.
516. Haferkamp S, Borst A, Adam C, Becker TM, Motschenbacher S, Windhövel S, et al. Vemurafenib induces senescence features in melanoma cells. *J Invest Dermatol.* juin 2013;133(6):1601-9.
517. Krayem M, Najem A, Journe F, Morandini R, Sales F, Awada A, et al. Acquired resistance to BRAFi reverses senescence-like phenotype in mutant BRAF melanoma. *Oncotarget.* 7 août 2018;9(61):31888-903.
518. Ruscetti M, Leibold J, Bott MJ, Fennell M, Kulick A, Salgado NR, et al. NK cell-mediated cytotoxicity contributes to tumor control by a cytostatic drug combination. *Science.* 21 2018;362(6421):1416-22.
519. Wang Y, Li N, Jiang W, Deng W, Ye R, Xu C, et al. Mutant LKB1 Confers Enhanced Radiosensitization in Combination with Trametinib in KRAS-Mutant Non-Small Cell Lung Cancer. *Clin Cancer Res.* 15 2018;24(22):5744-56.
520. Hartman ML, Sztiller-Sikorska M, Czyz M. Whole-exome sequencing reveals novel genetic variants associated with diverse phenotypes of melanoma cells. *Mol Carcinog.* 2019;58(4):588-602.
521. Sen B, Peng S, Tang X, Erickson HS, Galindo H, Mazumdar T, et al. Kinase-impaired BRAF mutations in lung cancer confer sensitivity to dasatinib. *Sci Transl Med.* 30 mai 2012;4(136):136ra70.
522. Peng S, Sen B, Mazumdar T, Byers LA, Diao L, Wang J, et al. Dasatinib induces DNA damage and activates DNA repair pathways leading to senescence in non-small cell lung cancer cell lines with kinase-inactivating BRAF mutations. *Oncotarget.* 5 janv 2016;7(1):565-79.

523. McDermott MSJ, Conlon N, Browne BC, Szabo A, Synnott NC, O'Brien NA, et al. HER2-Targeted Tyrosine Kinase Inhibitors Cause Therapy-Induced-Senescence in Breast Cancer Cells. *Cancers*. 8 févr 2019;11(2):197.
524. Wang M, Morsbach F, Sander D, Gheorghiu L, Nanda A, Benes C, et al. EGF receptor inhibition radiosensitizes NSCLC cells by inducing senescence in cells sustaining DNA double-strand breaks. *Cancer Res*. 1 oct 2011;71(19):6261-9.
525. Kunimasa K, Nagano T, Shimono Y, Dokuni R, Kiri T, Tokunaga S, et al. Glucose metabolism-targeted therapy and withaferin A are effective for epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor-induced drug-tolerant persisters. *Cancer Sci*. juill 2017;108(7):1368-77.
526. Decaup E, Jean C, Laurent C, Gravelle P, Fruchon S, Capilla F, et al. Anti-tumor activity of obinutuzumab and rituximab in a follicular lymphoma 3D model. *Blood Cancer J*. 9 août 2013;3:e131.
527. Rosemblyt C, Datta J, Lowenfeld L, Xu S, Basu A, Kodumudi K, et al. Oncodriver inhibition and CD4+ Th1 cytokines cooperate through Stat1 activation to induce tumor senescence and apoptosis in HER2+ and triple negative breast cancer: implications for combining immune and targeted therapies. *Oncotarget*. 1 mai 2018;9(33):23058-77.
528. Hasan MR, Ho SHY, Owen DA, Tai IT. Inhibition of VEGF induces cellular senescence in colorectal cancer cells. *Int J Cancer*. 1 nov 2011;129(9):2115-23.
529. Michaud K, Solomon DA, Oermann E, Kim J-S, Zhong W-Z, Prados MD, et al. Pharmacologic inhibition of cyclin-dependent kinases 4 and 6 arrests the growth of glioblastoma multiforme intracranial xenografts. *Cancer Res*. 15 avr 2010;70(8):3228-38.
530. Anders L, Ke N, Hydrbring P, Choi YJ, Widlund HR, Chick JM, et al. A systematic screen for CDK4/6 substrates links FOXM1 phosphorylation to senescence suppression in cancer cells. *Cancer Cell*. 15 nov 2011;20(5):620-34.
531. Yoshida A, Lee EK, Diehl JA. Induction of Therapeutic Senescence in Vemurafenib-Resistant Melanoma by Extended Inhibition of CDK4/6. *Cancer Res*. 15 2016;76(10):2990-3002.
532. Muñoz-Espín D, Rovira M, Galiana I, Giménez C, Lozano-Torres B, Paez-Ribes M, et al. A versatile drug delivery system targeting senescent cells. *EMBO Mol Med*. 2018;10(9).
533. Kovatcheva M, Liu DD, Dickson MA, Klein ME, O'Connor R, Wilder FO, et al. MDM2 turnover and expression of ATRX determine the choice between quiescence and senescence in response to CDK4 inhibition. *Oncotarget*. 10 avr 2015;6(10):8226-43.
534. Bollard J, Miguela V, Ruiz de Galarreta M, Venkatesh A, Bian CB, Roberto MP, et al. Palbociclib (PD-0332991), a selective CDK4/6 inhibitor, restricts tumour growth in preclinical models of hepatocellular carcinoma. *Gut*. 2017;66(7):1286-96.
535. Alotaibi M, Sharma K, Saleh T, Povirk LF, Hendrickson EA, Gewirtz DA. Radiosensitization by PARP Inhibition in DNA Repair Proficient and Deficient Tumor Cells: Proliferative Recovery in Senescent Cells. *Radiat Res*. mars 2016;185(3):229-45.
536. Chatterjee P, Choudhary GS, Sharma A, Singh K, Heston WD, Ciezki J, et al. PARP inhibition sensitizes to low dose-rate radiation TMPRSS2-ERG fusion gene-expressing and PTEN-deficient prostate cancer cells. *PLoS ONE*. 2013;8(4):e60408.
537. Esposito MT, Zhao L, Fung TK, Rane JK, Wilson A, Martin N, et al. Synthetic lethal targeting of oncogenic transcription factors in acute leukemia by PARP inhibitors. *Nat Med*. déc 2015;21(12):1481-90.
538. Saleh T, Tyutyunyk-Massey L, Gewirtz DA. Tumor Cell Escape from Therapy-Induced Senescence as a Model of Disease Recurrence after Dormancy. *Cancer Res*. 15 2019;79(6):1044-6.
539. Elmore LW, Di X, Dumur C, Holt SE, Gewirtz DA. Evasion of a single-step, chemotherapy-induced senescence in breast cancer cells: implications for treatment response. *Clin Cancer Res*. 1 avr 2005;11(7):2637-43.
540. Roberson RS, Kussick SJ, Vallieres E, Chen S-YJ, Wu DY. Escape from therapy-induced accelerated cellular senescence in p53-null lung cancer cells and in human lung cancers. *Cancer Res*. 1 avr 2005;65(7):2795-803.

541. Wang Q, Wu PC, Roberson RS, Luk BV, Ivanova I, Chu E, et al. Survivin and escaping in therapy-induced cellular senescence. *Int J Cancer*. 1 avr 2011;128(7):1546-58.
542. Puig P-E, Guilly M-N, Bouchot A, Droin N, Cathelin D, Bouyer F, et al. Tumor cells can escape DNA-damaging cisplatin through DNA endoreduplication and reversible polyploidy. *Cell Biol Int*. sept 2008;32(9):1031-43.
543. Wang Q, Wu PC, Dong DZ, Ivanova I, Chu E, Zeliadt S, et al. Polyploidy road to therapy-induced cellular senescence and escape. *Int J Cancer*. 1 avr 2013;132(7):1505-15.
544. Mosieniak G, Sliwinska MA, Alster O, Strzeszewska A, Sunderland P, Piechota M, et al. Polyploidy Formation in Doxorubicin-Treated Cancer Cells Can Favor Escape from Senescence. *Neoplasia*. déc 2015;17(12):882-93.
545. Rohnalter V, Roth K, Finkernagel F, Adhikary T, Obert J, Dorzweiler K, et al. A multi-stage process including transient polyploidization and EMT precedes the emergence of chemoresistant ovarian carcinoma cells with a dedifferentiated and pro-inflammatory secretory phenotype. *Oncotarget*. 24 nov 2015;6(37):40005-25.
546. Sabisz M, Skladanowski A. Cancer stem cells and escape from drug-induced premature senescence in human lung tumor cells: implications for drug resistance and in vitro drug screening models. *Cell Cycle*. 1 oct 2009;8(19):3208-17.
547. Achuthan S, Santhoshkumar TR, Prabhakar J, Nair SA, Pillai MR. Drug-induced senescence generates chemoresistant stemlike cells with low reactive oxygen species. *J Biol Chem*. 28 oct 2011;286(43):37813-29.
548. Yang L, Fang J, Chen J. Tumor cell senescence response produces aggressive variants. *Cell Death Discov*. 2017;3:17049.
549. Milanovic M, Fan DNY, Belenki D, Däbritz JHM, Zhao Z, Yu Y, et al. Senescence-associated reprogramming promotes cancer stemness. *Nature*. 04 2018;553(7686):96-100.
550. Saleh T, Tyutyunyk-Massey L, Murray GF, Alotaibi MR, Kawale AS, Elsayed Z, et al. Tumor cell escape from therapy-induced senescence. *Biochem Pharmacol*. 2019;162:202-12.
551. Demaria M, O'Leary MN, Chang J, Shao L, Liu S, Alimirah F, et al. Cellular Senescence Promotes Adverse Effects of Chemotherapy and Cancer Relapse. *Cancer Discov*. 2017;7(2):165-76.
552. Chitikova ZV, Gordeev SA, Bykova TV, Zubova SG, Pospelov VA, Pospelova TV. Sustained activation of DNA damage response in irradiated apoptosis-resistant cells induces reversible senescence associated with mTOR downregulation and expression of stem cell markers. *Cell Cycle*. 2014;13(9):1424-39.
553. Wennerberg K. The Ras superfamily at a glance. *Journal of Cell Science*. 1 mars 2005;118(5):843-6.
554. Vetter IR. The Guanine Nucleotide-Binding Switch in Three Dimensions. *Science*. 9 nov 2001;294(5545):1299-304.
555. Haga RB, Ridley AJ. Rho GTPases: Regulation and roles in cancer cell biology. *Small GTPases*. oct 2016;7(4):207-21.
556. Heasman SJ, Ridley AJ. Mammalian Rho GTPases: new insights into their functions from in vivo studies. *Nat Rev Mol Cell Biol*. sept 2008;9(9):690-701.
557. Jaffe AB, Hall A. Rho GTPases: biochemistry and biology. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2005;21:247-69.
558. Lawson CD, Ridley AJ. Rho GTPase signaling complexes in cell migration and invasion. *J Cell Biol*. 05 2018;217(2):447-57.
559. Garcia-Mata R, Boulter E, Burridge K. The « invisible hand »: regulation of RHO GTPases by RHOGDIs. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 22 juill 2011;12(8):493-504.
560. Wheeler AP, Ridley AJ. Why three Rho proteins? RhoA, RhoB, RhoC, and cell motility. *Exp Cell Res*. 15 nov 2004;301(1):43-9.
561. Schaefer A, Reinhard NR, Hordijk PL. Toward understanding RhoGTPase specificity: structure, function and local activation. *Small GTPases*. 2014;5(2):6.

562. Ridley AJ. RhoA, RhoB and RhoC have different roles in cancer cell migration. *J Microsc.* sept 2013;251(3):242-9.
563. Ihara K, Muraguchi S, Kato M, Shimizu T, Shirakawa M, Kuroda S, et al. Crystal structure of human RhoA in a dominantly active form complexed with a GTP analogue. *J Biol Chem.* 17 avr 1998;273(16):9656-66.
564. Soundararajan M, Turnbull A, Fedorov O, Johansson C, Doyle DA. RhoB can adopt a Mg²⁺ free conformation prior to GEF binding: The Mg²⁺ Free Conformation of RhoB. *Proteins.* juill 2008;72(1):498-505.
565. Gampel A, Mellor H. Small interfering RNAs as a tool to assign Rho GTPase exchange-factor function in vivo. *Biochem J.* 1 sept 2002;366(Pt 2):393-8.
566. Srougi MC, Burridge K. The nuclear guanine nucleotide exchange factors Ect2 and Net1 regulate RhoB-mediated cell death after DNA damage. *PLoS ONE.* 23 févr 2011;6(2):e17108.
567. Kamon H, Kawabe T, Kitamura H, Lee J, Kamimura D, Kaisho T, et al. TRIF-GEFH1-RhoB pathway is involved in MHCII expression on dendritic cells that is critical for CD4 T-cell activation. *EMBO J.* 6 sept 2006;25(17):4108-19.
568. Vega FM, Colomba A, Reymond N, Thomas M, Ridley AJ. RhoB regulates cell migration through altered focal adhesion dynamics. *Open Biol.* mai 2012;2(5):120076.
569. Arthur WT, Ellerbroek SM, Der CJ, Burridge K, Wennerberg K. XPLN, a guanine nucleotide exchange factor for RhoA and RhoB, but not RhoC. *J Biol Chem.* 8 nov 2002;277(45):42964-72.
570. Jaiswal M, Gremer L, Dvorsky R, Haeusler LC, Cirstea IC, Uhlenbrock K, et al. Mechanistic insights into specificity, activity, and regulatory elements of the regulator of G-protein signaling (RGS)-containing Rho-specific guanine nucleotide exchange factors (GEFs) p115, PDZ-RhoGEF (PRG), and leukemia-associated RhoGEF (LARG). *J Biol Chem.* 20 mai 2011;286(20):18202-12.
571. Rojas RJ, Yohe ME, Gershburg S, Kawano T, Kozasa T, Sondek J. Galphaq directly activates p63RhoGEF and Trio via a conserved extension of the Dbl homology-associated pleckstrin homology domain. *J Biol Chem.* 5 oct 2007;282(40):29201-10.
572. Ridley AJ, Self AJ, Kasmi F, Paterson HF, Hall A, Marshall CJ, et al. rho family GTPase activating proteins p190, bcr and rhoGAP show distinct specificities in vitro and in vivo. *EMBO J.* 15 déc 1993;12(13):5151-60.
573. Wang L, Yang L, Luo Y, Zheng Y. A novel strategy for specifically down-regulating individual Rho GTPase activity in tumor cells. *J Biol Chem.* 7 nov 2003;278(45):44617-25.
574. Braun AC, Olayioye MA. Rho regulation: DLC proteins in space and time. *Cell Signal.* août 2015;27(8):1643-51.
575. Lelias JM, Adra CN, Wulf GM, Guillemot JC, Khagad M, Caput D, et al. cDNA cloning of a human mRNA preferentially expressed in hematopoietic cells and with homology to a GDP-dissociation inhibitor for the rho GTP-binding proteins. *Proc Natl Acad Sci USA.* 15 févr 1993;90(4):1479-83.
576. Scherle P, Behrens T, Staudt LM. Ly-GDI, a GDP-dissociation inhibitor of the RhoA GTP-binding protein, is expressed preferentially in lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci USA.* 15 août 1993;90(16):7568-72.
577. Zalcman G, Closson V, Camonis J, Honoré N, Rousseau-Merck MF, Tavitian A, et al. RhoGDI-3 is a new GDP dissociation inhibitor (GDI). Identification of a non-cytosolic GDI protein interacting with the small GTP-binding proteins RhoB and RhoG. *J Biol Chem.* 29 nov 1996;271(48):30366-74.
578. Brunet N, Morin A, Olofsson B. RhoGDI-3 regulates RhoG and targets this protein to the Golgi complex through its unique N-terminal domain. *Traffic.* mai 2002;3(5):342-57.
579. Ho TTG, Merajver SD, Lapière CM, Nusgens BV, Deroanne CF. RhoA-GDP regulates RhoB protein stability. Potential involvement of RhoGDIalpha. *J Biol Chem.* 1 août 2008;283(31):21588-98.
580. Adamson P, Marshall CJ, Hall A, Tilbrook PA. Post-translational modifications of p21rho proteins. *J Biol Chem.* 5 oct 1992;267(28):20033-8.

581. Roberts PJ, Mitin N, Keller PJ, Chenette EJ, Madigan JP, Currin RO, et al. Rho Family GTPase Modification and Dependence on C AAX Motif-signaled Posttranslational Modification. *J Biol Chem.* 12 sept 2008;283(37):25150-63.
582. Winter-Vann AM, Casey PJ. Post-prenylation-processing enzymes as new targets in oncogenesis. *Nat Rev Cancer.* mai 2005;5(5):405-12.
583. Michaelson D, Silletti J, Murphy G, D'Eustachio P, Rush M, Philips MR. Differential localization of Rho GTPases in live cells: regulation by hypervariable regions and RhoGDI binding. *J Cell Biol.* 8 janv 2001;152(1):111-26.
584. Tillement V, Lajoie-Mazenc I, Casanova A, Froment C, Penary M, Tovar D, et al. Phosphorylation of RhoB by CK1 impedes actin stress fiber organization and epidermal growth factor receptor stabilization. *Exp Cell Res.* 10 sept 2008;314(15):2811-21.
585. Liu M, Zeng T, Zhang X, Liu C, Wu Z, Yao L, et al. ATR/Chk1 signaling induces autophagy through sumoylated RhoB-mediated lysosomal translocation of TSC2 after DNA damage. *Nat Commun.* 08 2018;9(1):4139.
586. Lebowitz PF, Prendergast GC. Functional interaction between RhoB and the transcription factor DB1. *Cell Adhes Commun.* 1998;6(4):277-87.
587. Fritz G, Kaina B. Ras-related GTPase RhoB represses NF-kappaB signaling. *J Biol Chem.* 2 févr 2001;276(5):3115-22.
588. Adnane J, Seijo E, Chen Z, Bizouarn F, Leal M, Sebt SM, et al. RhoB, not RhoA, represses the transcription of the transforming growth factor beta type II receptor by a mechanism involving activator protein 1. *J Biol Chem.* 8 mars 2002;277(10):8500-7.
589. Tovar D, Faye J-C, Favre G. Cloning of the human RHOB gene promoter: characterization of a VNTR sequence that affects transcriptional activity. *Genomics.* mai 2003;81(5):525-30.
590. Ahn J, Choi J-H, Won M, Kang C-M, Gyun M-R, Park H-M, et al. The activation of p38 MAPK primarily contributes to UV-induced RhoB expression by recruiting the c-Jun and p300 to the distal CCAAT box of the RhoB promoter. *Biochem Biophys Res Commun.* 3 juin 2011;409(2):211-6.
591. Kim B-K, Im J-Y, Han G, Lee W-J, Won K-J, Chung K-S, et al. p300 cooperates with c-Jun and PARP-1 at the p300 binding site to activate RhoB transcription in NSC126188-mediated apoptosis. *Biochim Biophys Acta.* mai 2014;1839(5):364-73.
592. Fritz G, Kaina B, Aktories K. The ras-related small GTP-binding protein RhoB is immediate-early inducible by DNA damaging treatments. *J Biol Chem.* 20 oct 1995;270(42):25172-7.
593. Jähner D, Hunter T. The ras-related gene rhoB is an immediate-early gene inducible by v-Fps, epidermal growth factor, and platelet-derived growth factor in rat fibroblasts. *Mol Cell Biol.* juill 1991;11(7):3682-90.
594. Engel ME, Datta PK, Moses HL. RhoB is stabilized by transforming growth factor beta and antagonizes transcriptional activation. *J Biol Chem.* 17 avr 1998;273(16):9921-6.
595. Vasilaki E, Papadimitriou E, Tajadura V, Ridley AJ, Stournaras C, Kardassis D. Transcriptional regulation of the small GTPase RhoB gene by TGF{beta}-induced signaling pathways. *FASEB J.* mars 2010;24(3):891-905.
596. Ju JA, Godet I, DiGiacomo JW, Gilkes DM. RhoB is regulated by hypoxia and modulates metastasis in breast cancer. *Cancer Rep (Hoboken).* févr 2020;3(1):e1164.
597. Canguilhem B, Pradines A, Baudouin C, Boby C, Lajoie-Mazenc I, Charveron M, et al. RhoB Protects Human Keratinocytes from UVB-induced Apoptosis through Epidermal Growth Factor Receptor Signaling. *Journal of Biological Chemistry.* 30 déc 2005;280(52):43257-63.
598. Monferran S, Skuli N, Delmas C, Favre G, Bonnet J, Cohen-Jonathan-Moyal E, et al. Alphavbeta3 and alphavbeta5 integrins control glioma cell response to ionising radiation through ILK and RhoB. *Int J Cancer.* 15 juill 2008;123(2):357-64.
599. Kim C-H, Won M, Choi C-H, Ahn J, Kim B-K, Song K-B, et al. Increase of RhoB in gamma-radiation-induced apoptosis is regulated by c-Jun N-terminal kinase in Jurkat T cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 8 janv 2010;391(2):1182-6.

600. Chen Y-X, Li Z-B, Diao F, Cao D-M, Fu C-C, Lu J. Up-regulation of RhoB by glucocorticoids and its effects on the cell proliferation and NF-kappaB transcriptional activity. *J Steroid Biochem Mol Biol.* nov 2006;101(4-5):179-87.
601. Delmas A, Cherier J, Pohorecka M, Medale-Giamarchi C, Meyer N, Casanova A, et al. The c-Jun/RHOB/AKT pathway confers resistance of *BRAF*-mutant melanoma cells to MAPK inhibitors. *Oncotarget* [Internet]. 20 juin 2015 [cité 21 nov 2018];6(17). Disponible sur: <http://www.oncotarget.com/fulltext/3888>
602. Mamouni K, Cristini A, Guirouilh-Barbat J, Monferran S, Lemarié A, Faye J-C, et al. RhoB Promotes γ H2AX Dephosphorylation and DNA Double-Strand Break Repair. *Molecular and Cellular Biology.* 15 août 2014;34(16):3144-55.
603. Westmark CJ, Bartleson VB, Malter JS. RhoB mRNA is stabilized by HuR after UV light. *Oncogene.* 13 janv 2005;24(3):502-11.
604. Malcolm T, Ettehadieh E, Sadowski I. Mitogen-responsive expression of RhoB is regulated by RNA stability. *Oncogene.* 18 sept 2003;22(40):6142-50.
605. Li Y-D, Liu Y-P, Cao D-M, Yan Y-M, Hou Y-N, Zhao J-Y, et al. Induction of small G protein RhoB by non-genotoxic stress inhibits apoptosis and activates NF- κ B. *J Cell Physiol.* mars 2011;226(3):729-38.
606. Wang S, Yan-Neale Y, Fischer D, Zeremski M, Cai R, Zhu J, et al. Histone deacetylase 1 represses the small GTPase RhoB expression in human nonsmall lung carcinoma cell line. *Oncogene.* 18 sept 2003;22(40):6204-13.
607. Mazières J, Tovar D, He B, Nieto-Acosta J, Marty-Detraves C, Clanet C, et al. Epigenetic regulation of RhoB loss of expression in lung cancer. *BMC Cancer* [Internet]. déc 2007 [cité 21 nov 2018];7(1). Disponible sur: <http://bmccancer.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2407-7-220>
608. Sato N, Fukui T, Taniguchi T, Yokoyama T, Kondo M, Nagasaka T, et al. RhoB is frequently downregulated in non-small-cell lung cancer and resides in the 2p24 homozygous deletion region of a lung cancer cell line. *Int J Cancer.* 1 févr 2007;120(3):543-51.
609. Delarue FL, Adnane J, Joshi B, Blaskovich MA, Wang D-A, Hawker J, et al. Farnesyltransferase and geranylgeranyltransferase I inhibitors upregulate RhoB expression by HDAC1 dissociation, HAT association and histone acetylation of the RhoB promoter. *Oncogene.* 1 févr 2007;26(5):633-40.
610. Marlow LA, Bok I, Smallridge RC, Copland JA. RhoB upregulation leads to either apoptosis or cytostasis through differential target selection. *Endocr Relat Cancer.* oct 2015;22(5):777-92.
611. Glorian V, Maillot G, Polès S, Iacovoni JS, Favre G, Vagner S. HuR-dependent loading of miRNA RISC to the mRNA encoding the Ras-related small GTPase RhoB controls its translation during UV-induced apoptosis. *Cell Death Differ.* nov 2011;18(11):1692-701.
612. Sun G, Li H, Rossi JJ. Sequence context outside the target region influences the effectiveness of miR-223 target sites in the RhoB 3'UTR. *Nucleic Acids Res.* janv 2010;38(1):239-52.
613. Connolly EC, Van Doorslaer K, Rogler LE, Rogler CE. Overexpression of miR-21 promotes an in vitro metastatic phenotype by targeting the tumor suppressor RHOB. *Mol Cancer Res.* mai 2010;8(5):691-700.
614. Liu M, Tang Q, Qiu M, Lang N, Li M, Zheng Y, et al. miR-21 targets the tumor suppressor RhoB and regulates proliferation, invasion and apoptosis in colorectal cancer cells. *FEBS Lett.* 3 oct 2011;585(19):2998-3005.
615. Yang Y, Ma Y, Shi C, Chen H, Zhang H, Chen N, et al. Overexpression of miR-21 in patients with ulcerative colitis impairs intestinal epithelial barrier function through targeting the Rho GTPase RhoB. *Biochem Biophys Res Commun.* 17 mai 2013;434(4):746-52.
616. Liu M, Bi F, Zhou X, Zheng Y. Rho GTPase regulation by miRNAs and covalent modifications. *Trends Cell Biol.* juill 2012;22(7):365-73.
617. Pérez-Sala D, Boya P, Ramos I, Herrera M, Stamatakis K. The C-terminal sequence of RhoB directs protein degradation through an endo-lysosomal pathway. *PLoS ONE.* 2 déc 2009;4(12):e8117.

618. Stamatakis K, Cernuda-Morollón E, Hernández-Perera O, Pérez-Sala D. Isoprenylation of RhoB is necessary for its degradation. A novel determinant in the complex regulation of RhoB expression by the mevalonate pathway. *J Biol Chem.* 20 déc 2002;277(51):49389-96.
619. Wang M, Guo L, Wu Q, Zeng T, Lin Q, Qiao Y, et al. ATR/Chk1/Smurf1 pathway determines cell fate after DNA damage by controlling RhoB abundance. *Nat Commun.* 24 sept 2014;5:4901.
620. Adamson P, Paterson HF, Hall A. Intracellular localization of the P21rho proteins. *J Cell Biol.* nov 1992;119(3):617-27.
621. Wherlock M. Farnesyltransferase inhibitors disrupt EGF receptor traffic through modulation of the RhoB GTPase. *Journal of Cell Science.* 1 juill 2004;117(15):3221-31.
622. Rondanino C, Rojas R, Ruiz WG, Wang E, Hughey RP, Dunn KW, et al. RhoB-dependent modulation of postendocytic traffic in polarized Madin-Darby canine kidney cells. *Traffic.* juill 2007;8(7):932-49.
623. Lajoie-Mazenc I, Tovar D, Penary M, Lortal B, Allart S, Favard C, et al. MAP1A Light Chain-2 Interacts with GTP-RhoB to Control Epidermal Growth Factor (EGF)-dependent EGF Receptor Signaling. *Journal of Biological Chemistry.* 15 févr 2008;283(7):4155-64.
624. Valero RA, Oeste CL, Stamatakis K, Ramos I, Herrera M, Boya P, et al. Structural determinants allowing endolysosomal sorting and degradation of endosomal GTPases. *Traffic.* sept 2010;11(9):1221-33.
625. Adini I, Rabinovitz I, Sun JF, Prendergast GC, Benjamin LE. RhoB controls Akt trafficking and stage-specific survival of endothelial cells during vascular development. *Genes Dev.* 1 nov 2003;17(21):2721-32.
626. Gerald D, Adini I, Shechter S, Perruzzi C, Varnau J, Hopkins B, et al. RhoB controls coordination of adult angiogenesis and lymphangiogenesis following injury by regulating VEZF1-mediated transcription. *Nat Commun.* 2013;4:2824.
627. Lebowitz PF, Casey PJ, Prendergast GC, Thissen JA. Farnesyltransferase inhibitors alter the prenylation and growth-stimulating function of RhoB. *J Biol Chem.* 20 juin 1997;272(25):15591-4.
628. Milia J, Teyssier F, Dalenc F, Ader I, Delmas C, Pradines A, et al. Farnesylated RhoB inhibits radiation-induced mitotic cell death and controls radiation-induced centrosome overduplication. *Cell Death Differ.* mai 2005;12(5):492-501.
629. Rocks O, Gerauer M, Vartak N, Koch S, Huang Z-P, Pechlivanis M, et al. The palmitoylation machinery is a spatially organizing system for peripheral membrane proteins. *Cell.* 30 avr 2010;141(3):458-71.
630. Allal C, Pradines A, Hamilton AD, Sebti SM, Favre G. Farnesylated RhoB prevents cell cycle arrest and actin cytoskeleton disruption caused by the geranylgeranyltransferase I inhibitor GGTI-298. *Cell Cycle.* déc 2002;1(6):430-7.
631. Vardouli L, Moustakas A, Stournaras C. LIM-kinase 2 and cofilin phosphorylation mediate actin cytoskeleton reorganization induced by transforming growth factor-beta. *J Biol Chem.* 25 mars 2005;280(12):11448-57.
632. Papadopoulou N, Charalampopoulos I, Alevizopoulos K, Gravanis A, Stournaras C. Rho/ROCK/actin signaling regulates membrane androgen receptor induced apoptosis in prostate cancer cells. *Exp Cell Res.* 15 oct 2008;314(17):3162-74.
633. Ishida H, Zhang X, Erickson K, Ray P. Botulinum toxin type A targets RhoB to inhibit lysophosphatidic acid-stimulated actin reorganization and acetylcholine release in nerve growth factor-treated PC12 cells. *J Pharmacol Exp Ther.* sept 2004;310(3):881-9.
634. Gampel A, Parker PJ, Mellor H. Regulation of epidermal growth factor receptor traffic by the small GTPase rhoB. *Curr Biol.* 9 sept 1999;9(17):955-8.
635. Huang M, Duhadaway JB, Prendergast GC, Laury-Kleintop LD. RhoB regulates PDGFR-beta trafficking and signaling in vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* déc 2007;27(12):2597-605.

636. Huang M, Satchell L, Duhadaway JB, Prendergast GC, Laury-Kleintop LD. RhoB links PDGF signaling to cell migration by coordinating activation and localization of Cdc42 and Rac. *J Cell Biochem.* juin 2011;112(6):1572-84.
637. Sandilands E, Cans C, Fincham VJ, Brunton VG, Mellor H, Prendergast GC, et al. RhoB and actin polymerization coordinate Src activation with endosome-mediated delivery to the membrane. *Dev Cell.* déc 2004;7(6):855-69.
638. Arnette C, Frye K, Kaverina I. Microtubule and Actin Interplay Drive Intracellular c-Src Trafficking. *PLoS ONE.* 2016;11(2):e0148996.
639. Fernandez-Borja M, Janssen L, Verwoerd D, Hordijk P, Neefjes J. RhoB regulates endosome transport by promoting actin assembly on endosomal membranes through Dia1. *J Cell Sci.* 15 juin 2005;118(Pt 12):2661-70.
640. Wallar BJ, Deward AD, Resau JH, Alberts AS. RhoB and the mammalian Diaphanous-related formin mDia2 in endosome trafficking. *Exp Cell Res.* 1 févr 2007;313(3):560-71.
641. Huang M, Kamasani U, Prendergast GC. RhoB facilitates c-Myc turnover by supporting efficient nuclear accumulation of GSK-3. *Oncogene.* 2 mars 2006;25(9):1281-9.
642. Witze ES, Litman ES, Argast GM, Moon RT, Ahn NG. Wnt5a control of cell polarity and directional movement by polarized redistribution of adhesion receptors. *Science.* 18 avr 2008;320(5874):365-9.
643. Neel NF, Lapierre LA, Goldenring JR, Richmond A. RhoB plays an essential role in CXCR2 sorting decisions. *J Cell Sci.* 1 mai 2007;120(Pt 9):1559-71.
644. Vega FM, Thomas M, Reymond N, Ridley AJ. The Rho GTPase RhoB regulates cadherin expression and epithelial cell-cell interaction. *Cell Commun Signal.* 29 janv 2015;13:6.
645. Bousquet E, Mazieres J, Privat M, Rizzati V, Casanova A, Ledoux A, et al. Loss of RhoB Expression Promotes Migration and Invasion of Human Bronchial Cells Via Activation of AKT1. *Cancer Research.* 1 août 2009;69(15):6092-9.
646. Alfano D, Ragno P, Stoppelli MP, Ridley AJ. RhoB regulates uPAR signalling. *J Cell Sci.* 15 mai 2012;125(Pt 10):2369-80.
647. Zhou J, Zhu Y, Zhang G, Liu N, Sun L, Liu M, et al. A distinct role of RhoB in gastric cancer suppression. *Int J Cancer.* 1 mars 2011;128(5):1057-68.
648. Yoneda M, Hirokawa YS, Ohashi A, Uchida K, Kami D, Watanabe M, et al. RhoB enhances migration and MMP1 expression of prostate cancer DU145. *Exp Mol Pathol.* févr 2010;88(1):90-5.
649. Jiang K, Sun J, Cheng J, Djeu JY, Wei S, Sebt S. Akt mediates Ras downregulation of RhoB, a suppressor of transformation, invasion, and metastasis. *Mol Cell Biol.* juin 2004;24(12):5565-76.
650. Treisman R. The serum response element. *Trends Biochem Sci.* oct 1992;17(10):423-6.
651. Lebowitz PF, Du W, Prendergast GC. Prenylation of RhoB is required for its cell transforming function but not its ability to activate serum response element-dependent transcription. *J Biol Chem.* 27 juin 1997;272(26):16093-5.
652. Kazerounian S, Gerald D, Huang M, Chin YR, Udayakumar D, Zheng N, et al. RhoB differentially controls Akt function in tumor cells and stromal endothelial cells during breast tumorigenesis. *Cancer Res.* 1 janv 2013;73(1):50-61.
653. Sabatel C, Malvaux L, Bovy N, Deroanne C, Lambert V, Gonzalez M-LA, et al. MicroRNA-21 exhibits antiangiogenic function by targeting RhoB expression in endothelial cells. *PLoS ONE.* 10 févr 2011;6(2):e16979.
654. Karlsson R, Pedersen ED, Wang Z, Brakebusch C. Rho GTPase function in tumorigenesis. *Biochim Biophys Acta.* déc 2009;1796(2):91-8.
655. Médale-Giamarchi C, Lajoie-Mazenc I, Malissein E, Meunier E, Couderc B, Bergé Y, et al. RhoB modifies estrogen responses in breast cancer cells by influencing expression of the estrogen receptor. *Breast Cancer Res.* 22 janv 2013;15(1):R6.

656. Liu Y, Song N, Ren K, Meng S, Xie Y, Long Q, et al. Expression loss and revivification of RhoB gene in ovary carcinoma carcinogenesis and development. *PLoS ONE*. 2013;8(11):e78417.
657. Adnane J, Muro-Cacho C, Mathews L, Sebti SM, Muñoz-Antonia T. Suppression of rho B expression in invasive carcinoma from head and neck cancer patients. *Clin Cancer Res*. juill 2002;8(7):2225-32.
658. Forget M-A, Desrosiers RR, Del M, Moumdjian R, Shedid D, Berthelet F, et al. The expression of rho proteins decreases with human brain tumor progression: potential tumor markers. *Clin Exp Metastasis*. 2002;19(1):9-15.
659. Meyer N, Peyret-Lacombe A, Canguilhem B, Médale-Giamarchi C, Mamouni K, Cristini A, et al. RhoB Promotes Cancer Initiation by Protecting Keratinocytes from UVB-Induced Apoptosis but Limits Tumor Aggressiveness. *Journal of Investigative Dermatology*. janv 2014;134(1):203-12.
660. Wen S-J, Zhang W, Ni N-N, Wu Q, Wang X-P, Lin Y-K, et al. Expression of Rho GTPases family in melanoma cells and its influence on cytoskeleton and migration. *Oncotarget*. 2 mai 2017;8(18):30112-22.
661. Delpuech O, Trabut J-B, Carnot F, Feuillard J, Brechot C, Kremsdorf D. Identification, using cDNA macroarray analysis, of distinct gene expression profiles associated with pathological and virological features of hepatocellular carcinoma. *Oncogene*. 25 avr 2002;21(18):2926-37.
662. Kim D-M, Chung K-S, Choi S-J, Jung Y-J, Park S-K, Han G-H, et al. RhoB induces apoptosis via direct interaction with TNFAIP1 in HeLa cells. *Int J Cancer*. 1 déc 2009;125(11):2520-7.
663. Kamai T, Tsujii T, Arai K, Takagi K, Asami H, Ito Y, et al. Significant association of Rho/ROCK pathway with invasion and metastasis of bladder cancer. *Clin Cancer Res*. juill 2003;9(7):2632-41.
664. Volanis D, Zaravinos A, Kadiyska T, Delakas D, Zoumpourlis V, Spandidos DA. Expression profile of Rho kinases in urinary bladder cancer. *J BUON*. sept 2011;16(3):511-21.
665. Chen W, Niu S, Ma X, Zhang P, Gao Y, Fan Y, et al. RhoB Acts as a Tumor Suppressor That Inhibits Malignancy of Clear Cell Renal Cell Carcinoma. *PLoS ONE*. 2016;11(7):e0157599.
666. Tan Y, Yin H, Zhang H, Fang J, Zheng W, Li D, et al. Sp1-driven up-regulation of miR-19a decreases RHOB and promotes pancreatic cancer. *Oncotarget*. 10 juill 2015;6(19):17391-403.
667. Mazieres J, Antonia T, Daste G, Muro-Cacho C, Berchery D, Tillement V, et al. Loss of RhoB expression in human lung cancer progression. *Clin Cancer Res*. 15 avr 2004;10(8):2742-50.
668. Calvayrac O, Pradines A, Raymond-Letron I, Rouquette I, Bousquet E, Lauwers-Cances V, et al. RhoB Determines Tumor Aggressiveness in a Murine EGFR^{L858R}-Induced Adenocarcinoma Model and Is a Potential Prognostic Biomarker for Lepidic Lung Cancer. *Clinical Cancer Research*. 15 déc 2014;20(24):6541-50.
669. Fritz G, Brachetti C, Bahlmann F, Schmidt M, Kaina B. Rho GTPases in human breast tumours: expression and mutation analyses and correlation with clinical parameters. *Br J Cancer*. 9 sept 2002;87(6):635-44.
670. Luis-Ravelo D, Antón I, Zanduetta C, Valencia K, Pajares M-J, Agorreta J, et al. RHOB influences lung adenocarcinoma metastasis and resistance in a host-sensitive manner. *Mol Oncol*. mars 2014;8(2):196-206.
671. Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive molecular characterization of urothelial bladder carcinoma. *Nature*. 20 mars 2014;507(7492):315-22.
672. Porter AP, Papaioannou A, Malliri A. Deregulation of Rho GTPases in cancer. *Small GTPases*. 2 juill 2016;7(3):123-38.
673. Baldwin RM, Parolin D a. E, Lorimer I a. J. Regulation of glioblastoma cell invasion by PKC iota and RhoB. *Oncogene*. 5 juin 2008;27(25):3587-95.
674. Ma Y, Gong Y, Cheng Z, Loganathan S, Kao C, Sarkaria JN, et al. Critical functions of RhoB in support of glioblastoma tumorigenesis. *Neuro-oncology*. avr 2015;17(4):516-25.

675. Skuli N, Monferran S, Delmas C, Lajoie-Mazenc I, Favre G, Toulas C, et al. Activation of RhoB by hypoxia controls hypoxia-inducible factor-1alpha stabilization through glycogen synthase kinase-3 in U87 glioblastoma cells. *Cancer Res.* 1 janv 2006;66(1):482-9.
676. Hutchison N, Hendry BM, Sharpe CC. Rho isoforms have distinct and specific functions in the process of epithelial to mesenchymal transition in renal proximal tubular cells. *Cell Signal.* oct 2009;21(10):1522-31.
677. Jin L, Liu W-R, Tian M-X, Jiang X-F, Wang H, Zhou P-Y, et al. CCL24 contributes to HCC malignancy via RhoB- VEGFA- VEGFR2 angiogenesis pathway and indicates poor prognosis. *Oncotarget.* 17 janv 2017;8(3):5135-48.
678. Ferreira AC dos S, de-Freitas-Junior JCM, Morgado-Díaz JA, Ridley AJ, Klumb CE. Dual inhibition of histone deacetylases and phosphoinositide 3-kinases: effects on Burkitt lymphoma cell growth and migration. *J Leukoc Biol.* avr 2016;99(4):569-78.
679. Bhavsar PJ, Infante E, Khwaja A, Ridley AJ. Analysis of Rho GTPase expression in T-ALL identifies RhoU as a target for Notch involved in T-ALL cell migration. *Oncogene.* 10 janv 2013;32(2):198-208.
680. Couderc B, Pradines A, Rafii A, Golzio M, Deviers A, Allal C, et al. In vivo restoration of RhoB expression leads to ovarian tumor regression. *Cancer Gene Ther.* juill 2008;15(7):456-64.
681. Vishnu P, Colon-Otero G, Kennedy GT, Marlow LA, Kennedy WP, Wu KJ, et al. RhoB mediates antitumor synergy of combined ixabepilone and sunitinib in human ovarian serous cancer. *Gynecol Oncol.* mars 2012;124(3):589-97.
682. Chen Z, Sun J, Pradines A, Favre G, Adnane J, Sebti SM. Both farnesylated and geranylgeranylated RhoB inhibit malignant transformation and suppress human tumor growth in nude mice. *J Biol Chem.* 16 juin 2000;275(24):17974-8.
683. Liu AX, Rane N, Liu JP, Prendergast GC. RhoB is dispensable for mouse development, but it modifies susceptibility to tumor formation as well as cell adhesion and growth factor signaling in transformed cells. *Mol Cell Biol.* oct 2001;21(20):6906-12.
684. Ichijo S, Furuya F, Shimura H, Hayashi Y, Takahashi K, Ohta K, et al. Activation of the RhoB signaling pathway by thyroid hormone receptor β in thyroid cancer cells. *PLoS ONE.* 2014;9(12):e116252.
685. Du W, Lebowitz PF, Prendergast GC. Cell growth inhibition by farnesyltransferase inhibitors is mediated by gain of geranylgeranylated RhoB. *Mol Cell Biol.* mars 1999;19(3):1831-40.
686. Wang D-A, Sebti SM. Palmitoylated cysteine 192 is required for RhoB tumor-suppressive and apoptotic activities. *J Biol Chem.* 13 mai 2005;280(19):19243-9.
687. Mazières J, Tillement V, Allal C, Clanet C, Bobin L, Chen Z, et al. Geranylgeranylated, but not farnesylated, RhoB suppresses Ras transformation of NIH-3T3 cells. *Exp Cell Res.* 1 avr 2005;304(2):354-64.
688. Fritz G, Kaina B. Ras-related GTPase RhoB forces alkylation-induced apoptotic cell death. *Biochem Biophys Res Commun.* 24 févr 2000;268(3):784-9.
689. Liu Ax null, Cerniglia GJ, Bernhard EJ, Prendergast GC. RhoB is required to mediate apoptosis in neoplastically transformed cells after DNA damage. *Proc Natl Acad Sci USA.* 22 mai 2001;98(11):6192-7.
690. Ader I, Toulas C, Dalenc F, Delmas C, Bonnet J, Cohen-Jonathan E, et al. RhoB controls the 24 kDa FGF-2-induced radioresistance in HeLa cells by preventing post-mitotic cell death. *Oncogene.* 5 sept 2002;21(39):5998-6006.
691. Misek SA, Appleton KM, Dexheimer TS, Lisabeth EM, Lo RS, Larsen SD, et al. Rho-mediated signaling promotes BRAF inhibitor resistance in de-differentiated melanoma cells. *Oncogene.* févr 2020;39(7):1466-83.
692. Hobbs GA, Der CJ, Rossman KL. RAS isoforms and mutations in cancer at a glance. *J Cell Sci.* 1 avr 2016;129(7):1287-92.
693. Klochkov SG, Neganova ME, Yarla NS, Parvathaneni M, Sharma B, Tarasov VV, et al. Implications of farnesyltransferase and its inhibitors as a promising strategy for cancer therapy. *Semin Cancer Biol.* 2019;56:128-34.

694. Berndt N, Hamilton AD, Sebti SM. Targeting protein prenylation for cancer therapy. *Nat Rev Cancer*. 24 2011;11(11):775-91.
695. Reiss Y, Goldstein JL, Seabra MC, Casey PJ, Brown MS. Inhibition of purified p21ras farnesyl:protein transferase by Cys-AAX tetrapeptides. *Cell*. 13 juill 1990;62(1):81-8.
696. Kohl NE, Omer CA, Conner MW, Anthony NJ, Davide JP, deSolms SJ, et al. Inhibition of farnesyltransferase induces regression of mammary and salivary carcinomas in ras transgenic mice. *Nat Med*. août 1995;1(8):792-7.
697. Nagasu T, Yoshimatsu K, Rowell C, Lewis MD, Garcia AM. Inhibition of human tumor xenograft growth by treatment with the farnesyl transferase inhibitor B956. *Cancer Res*. 15 nov 1995;55(22):5310-4.
698. Rosenberg JE, von der Maase H, Seigne JD, Mardiak J, Vaughn DJ, Moore M, et al. A phase II trial of R115777, an oral farnesyl transferase inhibitor, in patients with advanced urothelial tract transitional cell carcinoma. *Cancer*. 15 mai 2005;103(10):2035-41.
699. Johnston SRD, Hickish T, Ellis P, Houston S, Kelland L, Dowsett M, et al. Phase II study of the efficacy and tolerability of two dosing regimens of the farnesyl transferase inhibitor, R115777, in advanced breast cancer. *J Clin Oncol*. 1 juill 2003;21(13):2492-9.
700. Whitehead RP, McCoy S, Macdonald JS, Rivkin SE, Neubauer MA, Dakhil SR, et al. Phase II trial of R115777 (NSC #70818) in patients with advanced colorectal cancer: a Southwest Oncology Group study. *Invest New Drugs*. juill 2006;24(4):335-41.
701. Rao S, Cunningham D, de Gramont A, Scheithauer W, Smakal M, Humblet Y, et al. Phase III double-blind placebo-controlled study of farnesyl transferase inhibitor R115777 in patients with refractory advanced colorectal cancer. *J Clin Oncol*. 1 oct 2004;22(19):3950-7.
702. Adjei AA, Mauer A, Bruzek L, Marks RS, Hillman S, Geyer S, et al. Phase II study of the farnesyl transferase inhibitor R115777 in patients with advanced non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol*. 1 mai 2003;21(9):1760-6.
703. Heymach JV, Johnson DH, Khuri FR, Safran H, Schlabach LL, Yunus F, et al. Phase II study of the farnesyl transferase inhibitor R115777 in patients with sensitive relapse small-cell lung cancer. *Ann Oncol*. août 2004;15(8):1187-93.
704. Fouladi M, Nicholson HS, Zhou T, Laningham F, Helton KJ, Holmes E, et al. A phase II study of the farnesyl transferase inhibitor, tipifarnib, in children with recurrent or progressive high-grade glioma, medulloblastoma/primitive neuroectodermal tumor, or brainstem glioma: a Children's Oncology Group study. *Cancer*. 1 déc 2007;110(11):2535-41.
705. Cloughesy TF, Wen PY, Robins HI, Chang SM, Groves MD, Fink KL, et al. Phase II trial of tipifarnib in patients with recurrent malignant glioma either receiving or not receiving enzyme-inducing antiepileptic drugs: a North American Brain Tumor Consortium Study. *J Clin Oncol*. 1 août 2006;24(22):3651-6.
706. Cohen SJ, Ho L, Ranganathan S, Abbruzzese JL, Alpaugh RK, Beard M, et al. Phase II and pharmacodynamic study of the farnesyltransferase inhibitor R115777 as initial therapy in patients with metastatic pancreatic adenocarcinoma. *J Clin Oncol*. 1 avr 2003;21(7):1301-6.
707. Macdonald JS, McCoy S, Whitehead RP, Iqbal S, Wade JL, Giguere JK, et al. A phase II study of farnesyl transferase inhibitor R115777 in pancreatic cancer: a Southwest oncology group (SWOG 9924) study. *Invest New Drugs*. oct 2005;23(5):485-7.
708. Gajewski TF, Salama AKS, Niedzwiecki D, Johnson J, Linette G, Bucher C, et al. Phase II study of the farnesyltransferase inhibitor R115777 in advanced melanoma (CALGB 500104). *J Transl Med*. 10 déc 2012;10:246.
709. Haraeusseau J-L, Lancet JE, Reiffers J, Lowenberg B, Thomas X, Huguet F, et al. A phase 2 study of the oral farnesyltransferase inhibitor tipifarnib in patients with refractory or relapsed acute myeloid leukemia. *Blood*. 15 juin 2007;109(12):5151-6.
710. Lancet JE, Gojo I, Gotlib J, Feldman EJ, Greer J, Liesveld JL, et al. A phase 2 study of the farnesyltransferase inhibitor tipifarnib in poor-risk and elderly patients with previously untreated acute myelogenous leukemia. *Blood*. 15 févr 2007;109(4):1387-94.

711. Erba HP, Othus M, Walter RB, Kirschbaum MH, Tallman MS, Larson RA, et al. Four different regimens of farnesyltransferase inhibitor tipifarnib in older, untreated acute myeloid leukemia patients: North American Intergroup Phase II study SWOG S0432. *Leuk Res.* mars 2014;38(3):329-33.
712. Harousseau J-L, Martinelli G, Jedrzejczak WW, Brandwein JM, Bordessoule D, Masszi T, et al. A randomized phase 3 study of tipifarnib compared with best supportive care, including hydroxyurea, in the treatment of newly diagnosed acute myeloid leukemia in patients 70 years or older. *Blood.* 6 août 2009;114(6):1166-73.
713. Kurzrock R, Albitar M, Cortes JE, Estey EH, Faderl SH, Garcia-Manero G, et al. Phase II study of R115777, a farnesyl transferase inhibitor, in myelodysplastic syndrome. *J Clin Oncol.* 1 avr 2004;22(7):1287-92.
714. Fenaux P, Raza A, Mufti GJ, Aul C, Germing U, Kantarjian H, et al. A multicenter phase 2 study of the farnesyltransferase inhibitor tipifarnib in intermediate- to high-risk myelodysplastic syndrome. *Blood.* 15 mai 2007;109(10):4158-63.
715. Alsina M, Fonseca R, Wilson EF, Belle AN, Gerbino E, Price-Troska T, et al. Farnesyltransferase inhibitor tipifarnib is well tolerated, induces stabilization of disease, and inhibits farnesylation and oncogenic/tumor survival pathways in patients with advanced multiple myeloma. *Blood.* 1 mai 2004;103(9):3271-7.
716. Cortes J, Albitar M, Thomas D, Giles F, Kurzrock R, Thibault A, et al. Efficacy of the farnesyl transferase inhibitor R115777 in chronic myeloid leukemia and other hematologic malignancies. *Blood.* 1 mars 2003;101(5):1692-7.
717. Rolland D, Ribrag V, Haioun C, Ghesquieres H, Jardin F, Bouabdallah R, et al. Phase II trial and prediction of response of single agent tipifarnib in patients with relapsed/refractory mantle cell lymphoma: a Groupe d'Etude des Lymphomes de l'Adulte trial. *Cancer Chemother Pharmacol.* mars 2010;65(4):781-90.
718. Witzig TE, Tang H, Micallef INM, Ansell SM, Link BK, Inwards DJ, et al. Multi-institutional phase 2 study of the farnesyltransferase inhibitor tipifarnib (R115777) in patients with relapsed and refractory lymphomas. *Blood.* 3 nov 2011;118(18):4882-9.
719. Sharma S, Kemeny N, Kelsen DP, Ilson D, O'Reilly E, Zaknoen S, et al. A phase II trial of farnesyl protein transferase inhibitor SCH 66336, given by twice-daily oral administration, in patients with metastatic colorectal cancer refractory to 5-fluorouracil and irinotecan. *Ann Oncol.* juill 2002;13(7):1067-71.
720. Winquist E, Moore MJ, Chi KN, Ernst DS, Hirte H, North S, et al. A multinomial Phase II study of lonafarnib (SCH 66336) in patients with refractory urothelial cancer. *Urol Oncol.* juin 2005;23(3):143-9.
721. Hanrahan EO, Kies MS, Glisson BS, Khuri FR, Feng L, Tran HT, et al. A phase II study of Lonafarnib (SCH66336) in patients with chemorefractory, advanced squamous cell carcinoma of the head and neck. *Am J Clin Oncol.* juin 2009;32(3):274-9.
722. Ravoet C, Mineur P, Robin V, Debusscher L, Bosly A, André M, et al. Farnesyl transferase inhibitor (lonafarnib) in patients with myelodysplastic syndrome or secondary acute myeloid leukaemia: a phase II study. *Ann Hematol.* nov 2008;87(11):881-5.
723. Sparano JA, Moulder S, Kazi A, Vahdat L, Li T, Pellegrino C, et al. Targeted inhibition of farnesyltransferase in locally advanced breast cancer: a phase I and II trial of tipifarnib plus dose-dense doxorubicin and cyclophosphamide. *J Clin Oncol.* 1 juill 2006;24(19):3013-8.
724. Johnston SRD, Semiglazov VF, Manikhas GM, Spaeth D, Romieu G, Dodwell DJ, et al. A phase II, randomized, blinded study of the farnesyltransferase inhibitor tipifarnib combined with letrozole in the treatment of advanced breast cancer after antiestrogen therapy. *Breast Cancer Res Treat.* juill 2008;110(2):327-35.
725. Andreopoulou E, Vigoda IS, Valero V, Hershman DL, Raptis G, Vahdat LT, et al. Phase I-II study of the farnesyl transferase inhibitor tipifarnib plus sequential weekly paclitaxel and doxorubicin-cyclophosphamide in HER2/neu-negative inflammatory carcinoma and non-inflammatory estrogen receptor-positive breast carcinoma. *Breast Cancer Res Treat.* oct 2013;141(3):429-35.
726. Yam C, Murthy RK, Valero V, Szklaruk J, Shroff GS, Stalzer CJ, et al. A phase II study of tipifarnib and gemcitabine in metastatic breast cancer. *Invest New Drugs.* 2018;36(2):299-306.

727. Sparano JA, Moulder S, Kazi A, Coppola D, Negassa A, Vahdat L, et al. Phase II trial of tipifarnib plus neoadjuvant doxorubicin-cyclophosphamide in patients with clinical stage IIB-IIIC breast cancer. *Clin Cancer Res.* 15 avr 2009;15(8):2942-8.
728. Dalenc F, Doisneau-Sixou SF, Allal BC, Marsili S, Lauwers-Cances V, Chaoui K, et al. Tipifarnib plus tamoxifen in tamoxifen-resistant metastatic breast cancer: a negative phase II and screening of potential therapeutic markers by proteomic analysis. *Clin Cancer Res.* 15 févr 2010;16(4):1264-71.
729. Li T, Christos PJ, Sparano JA, Hershman DL, Hoschander S, O'Brien K, et al. Phase II trial of the farnesyltransferase inhibitor tipifarnib plus fulvestrant in hormone receptor-positive metastatic breast cancer: New York Cancer Consortium Trial P6205. *Ann Oncol.* avr 2009;20(4):642-7.
730. Li T, Guo M, Gradishar WJ, Sparano JA, Perez EA, Wang M, et al. A phase II trial of capecitabine in combination with the farnesyltransferase inhibitor tipifarnib in patients with anthracycline-treated and taxane-resistant metastatic breast cancer: an Eastern Cooperative Oncology Group Study (E1103). *Breast Cancer Res Treat.* juill 2012;134(1):345-52.
731. Van Cutsem E, van de Velde H, Karasek P, Oettle H, Vervenne WL, Szawlowski A, et al. Phase III trial of gemcitabine plus tipifarnib compared with gemcitabine plus placebo in advanced pancreatic cancer. *J Clin Oncol.* 15 avr 2004;22(8):1430-8.
732. Rich TA, Winter K, Safran H, Hoffman JP, Erickson B, Anne PR, et al. Weekly paclitaxel, gemcitabine, and external irradiation followed by randomized farnesyl transferase inhibitor R115777 for locally advanced pancreatic cancer. *Onco Targets Ther.* 2012;5:161-70.
733. Ducassou A, Uro-Coste E, Verrelle P, Filleron T, Benouaich-Amiel A, Lubrano V, et al. $\alpha\beta 3$ Integrin and Fibroblast growth factor receptor 1 (FGFR1): Prognostic factors in a phase I-II clinical trial associating continuous administration of Tipifarnib with radiotherapy for patients with newly diagnosed glioblastoma. *Eur J Cancer.* juin 2013;49(9):2161-9.
734. Haas-Kogan DA, Banerjee A, Poussaint TY, Kocak M, Prados MD, Geyer JR, et al. Phase II trial of tipifarnib and radiation in children with newly diagnosed diffuse intrinsic pontine gliomas. *Neuro-oncology.* mars 2011;13(3):298-306.
735. Jabbour E, Kantarjian H, Ravandi F, Garcia-Manero G, Estrov Z, Verstovsek S, et al. A phase 1-2 study of a farnesyltransferase inhibitor, tipifarnib, combined with idarubicin and cytarabine for patients with newly diagnosed acute myeloid leukemia and high-risk myelodysplastic syndrome. *Cancer.* 15 mars 2011;117(6):1236-44.
736. Burnett AK, Russell NH, Culligan D, Cavanagh J, Kell J, Wheatley K, et al. The addition of the farnesyl transferase inhibitor, tipifarnib, to low dose cytarabine does not improve outcome for older patients with AML. *Br J Haematol.* août 2012;158(4):519-22.
737. Karp JE, Vener TI, Raponi M, Ritchie EK, Smith BD, Gore SD, et al. Multi-institutional phase 2 clinical and pharmacogenomic trial of tipifarnib plus etoposide for elderly adults with newly diagnosed acute myelogenous leukemia. *Blood.* 5 janv 2012;119(1):55-63.
738. Meier W, du Bois A, Rau J, Gropp-Meier M, Baumann K, Huober J, et al. Randomized phase II trial of carboplatin and paclitaxel with or without lonafarnib in first-line treatment of epithelial ovarian cancer stage IIB-IV. *Gynecol Oncol.* août 2012;126(2):236-40.
739. Kim ES, Kies MS, Fossella FV, Glisson BS, Zaknoen S, Statkevich P, et al. Phase II study of the farnesyltransferase inhibitor lonafarnib with paclitaxel in patients with taxane-refractory/resistant nonsmall cell lung carcinoma. *Cancer.* 1 août 2005;104(3):561-9.
740. Theodore C, Geoffrois L, Vermorken JB, Caponigro F, Fiedler W, Chollet P, et al. Multicentre EORTC study 16997: feasibility and phase II trial of farnesyl transferase inhibitor & gemcitabine combination in salvage treatment of advanced urothelial tract cancers. *Eur J Cancer.* mai 2005;41(8):1150-7.
741. Margolin KA, Moon J, Flaherty LE, Lao CD, Akerley WL, Othus M, et al. Randomized phase II trial of sorafenib with temsirolimus or tipifarnib in untreated metastatic melanoma (S0438). *Clin Cancer Res.* 15 févr 2012;18(4):1129-37.

742. Jazieh K, Molina J, Allred J, Yin J, Reid J, Goetz M, et al. A phase I study of the farnesyltransferase inhibitor Tipifarnib in combination with the epidermal growth factor tyrosine kinase inhibitor Erlotinib in patients with advanced solid tumors. *Invest New Drugs*. 2019;37(2):307-14.
743. Lerner EC, Zhang TT, Knowles DB, Qian Y, Hamilton AD, Sebti SM. Inhibition of the prenylation of K-Ras, but not H- or N-Ras, is highly resistant to CAAX peptidomimetics and requires both a farnesyltransferase and a geranylgeranyltransferase I inhibitor in human tumor cell lines. *Oncogene*. sept 1997;15(11):1283-8.
744. Rowell CA, Kowalczyk JJ, Lewis MD, Garcia AM. Direct demonstration of geranylgeranylation and farnesylation of Ki-Ras in vivo. *J Biol Chem*. 30 mai 1997;272(22):14093-7.
745. Whyte DB, Kirschmeier P, Hockenberry TN, Nunez-Oliva I, James L, Catino JJ, et al. K- and N-Ras are geranylgeranylated in cells treated with farnesyl protein transferase inhibitors. *J Biol Chem*. 30 mai 1997;272(22):14459-64.
746. Sun J, Qian Y, Hamilton AD, Sebti SM. Both farnesyltransferase and geranylgeranyltransferase I inhibitors are required for inhibition of oncogenic K-Ras prenylation but each alone is sufficient to suppress human tumor growth in nude mouse xenografts. *Oncogene*. mars 1998;16(11):1467-73.
747. Lobell RB, Liu D, Buser CA, Davide JP, DePuy E, Hamilton K, et al. Preclinical and clinical pharmacodynamic assessment of L-778,123, a dual inhibitor of farnesyl:protein transferase and geranylgeranyl:protein transferase type-I. *Mol Cancer Ther*. juill 2002;1(9):747-58.
748. Kazi A, Xiang S, Yang H, Chen L, Kennedy P, Ayaz M, et al. Dual Farnesyl and Geranylgeranyl Transferase Inhibitor Thwarts Mutant KRAS-Driven Patient-Derived Pancreatic Tumors. *Clin Cancer Res*. 01 2019;25(19):5984-96.
749. Sepp-Lorenzino L, Ma Z, Rands E, Kohl NE, Gibbs JB, Oliff A, et al. A peptidomimetic inhibitor of farnesyl:protein transferase blocks the anchorage-dependent and -independent growth of human tumor cell lines. *Cancer Res*. 15 nov 1995;55(22):5302-9.
750. End DW, Smets G, Todd AV, Applegate TL, Fuery CJ, Angibaud P, et al. Characterization of the antitumor effects of the selective farnesyl protein transferase inhibitor R115777 in vivo and in vitro. *Cancer Res*. 1 janv 2001;61(1):131-7.
751. Kurzrock R, Kantarjian HM, Cortes JE, Singhania N, Thomas DA, Wilson EF, et al. Farnesyltransferase inhibitor R115777 in myelodysplastic syndrome: clinical and biologic activities in the phase 1 setting. *Blood*. 15 déc 2003;102(13):4527-34.
752. Kohl NE, Wilson FR, Mosser SD, Giuliani E, deSolms SJ, Conner MW, et al. Protein farnesyltransferase inhibitors block the growth of ras-dependent tumors in nude mice. *Proc Natl Acad Sci USA*. 13 sept 1994;91(19):9141-5.
753. Omer CA, Chen Z, Diehl RE, Conner MW, Chen HY, Trumbauer ME, et al. Mouse mammary tumor virus-Ki-rasB transgenic mice develop mammary carcinomas that can be growth-inhibited by a farnesyl:protein transferase inhibitor. *Cancer Res*. 15 mai 2000;60(10):2680-8.
754. Lebowitz PF, Davide JP, Prendergast GC. Evidence that farnesyltransferase inhibitors suppress Ras transformation by interfering with Rho activity. *Mol Cell Biol*. déc 1995;15(12):6613-22.
755. Du W, Prendergast GC. Geranylgeranylated RhoB mediates suppression of human tumor cell growth by farnesyltransferase inhibitors. *Cancer Res*. 1 nov 1999;59(21):5492-6.
756. Liu A x, Du W, Liu JP, Jessell TM, Prendergast GC. RhoB alteration is necessary for apoptotic and antineoplastic responses to farnesyltransferase inhibitors. *Mol Cell Biol*. août 2000;20(16):6105-13.
757. Bos JL. ras oncogenes in human cancer: a review. *Cancer Res*. 1 sept 1989;49(17):4682-9.
758. Untch BR, Dos Anjos V, Garcia-Rendueles MER, Knauf JA, Krishnamoorthy GP, Saqcena M, et al. Tipifarnib Inhibits HRAS-Driven Dedifferentiated Thyroid Cancers. *Cancer Res*. 15 2018;78(16):4642-57.
759. Gilardi M, Wang Z, Proietto M, Chillà A, Calleja-Valera JL, Goto Y, et al. Tipifarnib as a Precision Therapy for HRAS-Mutant Head and Neck Squamous Cell Carcinomas. *Mol Cancer Ther*. 29 juill 2020;

760. Lee HW, Sa JK, Gualberto A, Scholz C, Sung HH, Jeong BC, et al. A phase II trial of tipifarnib for patients with previously-treated, metastatic urothelial carcinoma harboring HRAS mutations. *Clin Cancer Res.* 7 juill 2020;
761. Basso AD, Mirza A, Liu G, Long BJ, Bishop WR, Kirschmeier P. The farnesyl transferase inhibitor (FTI) SCH66336 (lonafarnib) inhibits Rheb farnesylation and mTOR signaling. Role in FTI enhancement of taxane and tamoxifen anti-tumor activity. *J Biol Chem.* 2 sept 2005;280(35):31101-8.
762. Long X, Lin Y, Ortiz-Vega S, Yonezawa K, Avruch J. Rheb binds and regulates the mTOR kinase. *Curr Biol.* 26 avr 2005;15(8):702-13.
763. Bai X, Ma D, Liu A, Shen X, Wang QJ, Liu Y, et al. Rheb activates mTOR by antagonizing its endogenous inhibitor, FKBP38. *Science.* 9 nov 2007;318(5852):977-80.
764. Mavrikis KJ, Zhu H, Silva RLA, Mills JR, Teruya-Feldstein J, Lowe SW, et al. Tumorigenic activity and therapeutic inhibition of Rheb GTPase. *Genes Dev.* 15 août 2008;22(16):2178-88.
765. Zheng H, Liu A, Liu B, Li M, Yu H, Luo X. Ras homologue enriched in brain is a critical target of farnesyltransferase inhibitors in non-small cell lung cancer cells. *Cancer Lett.* 1 nov 2010;297(1):117-25.
766. Raponi M, Harousseau J-L, Lancet JE, Löwenberg B, Stone R, Zhang Y, et al. Identification of molecular predictors of response in a study of tipifarnib treatment in relapsed and refractory acute myelogenous leukemia. *Clin Cancer Res.* 1 avr 2007;13(7):2254-60.
767. Raponi M, Lancet JE, Fan H, Dossey L, Lee G, Gojo I, et al. A 2-gene classifier for predicting response to the farnesyltransferase inhibitor tipifarnib in acute myeloid leukemia. *Blood.* 1 mars 2008;111(5):2589-96.
768. Alonso-Alonso R, Mondéjar R, Martínez N, García-Díaz N, Pérez C, Merino D, et al. Identification of tipifarnib sensitivity biomarkers in T-cell acute lymphoblastic leukemia and T-cell lymphoma. *Sci Rep.* 21 avr 2020;10(1):6721.
769. Kauh J, Chanel-Vos C, Escuin D, Fanucchi MP, Harvey RD, Saba N, et al. Farnesyl transferase expression determines clinical response to the docetaxel-lonafarnib combination in patients with advanced malignancies. *Cancer.* 1 sept 2011;117(17):4049-59.
770. Bachmann HS, Meier W, du Bois A, Kimmig R, Kuhlmann JD, Siffert W, et al. The FNTB promoter polymorphism rs11623866 as a potential predictive biomarker for lonafarnib treatment of ovarian cancer patients. *Br J Clin Pharmacol.* nov 2015;80(5):1139-48.
771. Jang J, To C, De Clercq DJH, Park E, Ponthier CM, Shin BH, et al. Mutant-Selective Allosteric EGFR Degraders are Effective Against a Broad Range of Drug-Resistant Mutations. *Angew Chem Int Ed Engl.* 8 juin 2020;
772. Sakaue-Sawano A, Kurokawa H, Morimura T, Hanyu A, Hama H, Osawa H, et al. Visualizing spatiotemporal dynamics of multicellular cell-cycle progression. *Cell.* 8 févr 2008;132(3):487-98.
773. Milanovic M, Fan DNY, Belenki D, Däbritz JHM, Zhao Z, Yu Y, et al. Senescence-associated reprogramming promotes cancer stemness. *Nature.* 20 déc 2017;553(7686):96-100.
774. He S, Sharpless NE. Senescence in Health and Disease. *Cell.* 1 juin 2017;169(6):1000-11.
775. Zhu Y, Tchkonja T, Fuhrmann-Stroissnigg H, Dai HM, Ling YY, Stout MB, et al. Identification of a novel senolytic agent, navitoclax, targeting the Bcl-2 family of anti-apoptotic factors. *Aging Cell.* 2016;15(3):428-35.
776. Lee M-S, Kim H-P, Kim T-Y, Lee JW. Gefitinib resistance of cancer cells correlated with TM4SF5-mediated epithelial-mesenchymal transition. *Biochim Biophys Acta.* févr 2012;1823(2):514-23.
777. Thomson S, Buck E, Petti F, Griffin G, Brown E, Ramnarine N, et al. Epithelial to Mesenchymal Transition Is a Determinant of Sensitivity of Non-Small-Cell Lung Carcinoma Cell Lines and Xenografts to Epidermal Growth Factor Receptor Inhibition. *Cancer Research.* 15 oct 2005;65(20):9455-62.
778. Dick FA, Goodrich DW, Sage J, Dyson NJ. Non-canonical functions of the RB protein in cancer. *Nat Rev Cancer.* 2018;18(7):442-51.

779. Hall A. Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science*. 23 janv 1998;279(5350):509-14.
780. Paysan L, Piquet L, Saltel F, Moreau V. Rnd3 in Cancer: A Review of the Evidence for Tumor Promoter or Suppressor. *Mol Cancer Res*. 2016;14(11):1033-44.
781. Cuiyan Z, Jie H, Fang Z, Kezhi Z, Junting W, Susheng S, et al. Overexpression of RhoE in Non-small Cell Lung Cancer (NSCLC) is associated with smoking and correlates with DNA copy number changes. *Cancer Biol Ther*. mars 2007;6(3):335-42.
782. Zhang C, Zhou F, Li N, Shi S, Feng X, Chen Z, et al. Overexpression of RhoE has a prognostic value in non-small cell lung cancer. *Ann Surg Oncol*. sept 2007;14(9):2628-35.
783. Bousquet E, Calvayrac O, Mazières J, Lajoie-Mazenc I, Boubekeur N, Favre G, et al. RhoB loss induces Rac1-dependent mesenchymal cell invasion in lung cells through PP2A inhibition. *Oncogene*. avr 2016;35(14):1760-9.
784. Bery N, Keller L, Soulié M, Gence R, Iscache A-L, Cherier J, et al. A Targeted Protein Degradation Cell-Based Screening for Nanobodies Selective toward the Cellular RHOB GTP-Bound Conformation. *Cell Chem Biol*. 21 2019;26(11):1544-1558.e6.

Serment De Galien

Je jure en présence de mes Maîtres de la Faculté et de mes condisciples :

- d'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement ;
- d'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement ;
- de ne jamais oublier ma responsabilité, mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine, de respecter le secret professionnel.

En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser les actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères, si j'y manque.

Etude des résistances adaptatives aux inhibiteurs de tyrosine kinase de l'EGFR dans les cancers bronchiques

Le cancer bronchique porteur d'une mutation activatrice de l'EGFR bénéficie du développement des inhibiteurs de tyrosine kinase de l'EGFR (EGFR-TKI). Cependant l'efficacité de ces thérapeutiques bien qu'élévée n'est que transitoire, ces thérapies se heurtent inévitablement à des phénomènes de résistance. Des études antérieures suggèrent que cette résistance pourrait provenir d'une population de cellules tolérantes (ou Drug-Tolerant Cells, DTC) qui, après un état de pseudo-dormance, développent de nouveaux mécanismes de résistance dont des mutations secondaires de l'EGFR, des amplifications de MET, etc.... Cet état de tolérance a été mis en évidence *in vitro* essentiellement sur une seule lignée cellulaire et reste assez peu caractérisé. L'objectif de ce travail de thèse a été d'élargir et d'approfondir l'étude des mécanismes de résistance à différentes lignées cellulaires tumorales bronchiques porteuses de mutations activatrices de l'EGFR traitées par des EGFR-TKIs de première (erlotinib) ou de dernière génération (osimertinib). Nos travaux montrent que la durée de la phase de tolérance et l'émergence de clones prolifératifs résistants aux EGFR-TKIs sont très hétérogènes entre les lignées étudiées mais aussi au sein d'une même lignée. En revanche la majorité des DTC ont une morphologie élargie associée à un remodelage du cytosquelette d'actine ainsi qu'à un état de pseudo-sénescence, qui semble prédisposer à la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) se développant progressivement du stade DTC jusqu'au stade prolifératif, après la perte des caractéristiques de sénescence. Des analyses en RNAseq montrent que des signatures géniques liées à la contractilité cellulaire sont retrouvées au stade DTC dans les trois modèles cellulaires étudiés. Les travaux antérieurs du laboratoire ayant montré le rôle de la petite GTPase RhoB dans la régulation du cytosquelette d'actine et dans la résistance à l'erlotinib, nous avons investigué son rôle dans la tolérance aux EGFR TKIs. RhoB, contrairement à ses homologues RhoA et RhoC, est surexprimée et surexprimée dans les DTC. De plus son inhibition par la C3 exoenzyme, toxine inhibant spécifiquement RhoA, RhoB et RhoC, permet l'éradication des DTC et prévient l'émergence de clones résistants. RhoB étant régulée par sa prénylation et notamment sa farnésylation, l'association d'un inhibiteur de farnésyltransférase (FTI) et d'un EGFR-TKI a été analysée et montre qu'elle prévient très efficacement l'émergence de clones prolifératifs. Ces résultats nous conduisent à proposer cette association comme nouvelle stratégie thérapeutique dans les cancers bronchiques porteurs de mutations activatrices de l'EGFR.

Mots-clés : Cancers bronchiques / Inhibiteurs de tyrosine kinase de l'EGFR / Résistances / Tolérance / GTPases Rho / Inhibiteurs de la farnésyltransférase

Evaluation of adaptive resistances to EGFR tyrosine kinase inhibitors in lung cancers

Lung cancer with EGFR activating mutation benefits from the development of EGFR tyrosine kinase inhibitors (EGFR-TKI). However, the effectiveness of these therapies, although high, is only transitory, and patients inevitably develop resistance phenomena. Previous studies suggest that this resistance could arise from a population of tolerant cells (or Drug-Tolerant Cells, DTC) which, after a pseudo-dormant state, develop new resistance mechanisms including secondary EGFR mutations, MET amplifications, etc. This state of tolerance has been demonstrated *in vitro* mainly on only one cell line and remains poorly characterized. The objective of this PhD work was to broaden and deepen the study of the mechanisms of resistance to different lung tumor cell lines harboring EGFR activating mutations treated with first (erlotinib) or latest-generation (osimertinib) EGFR-TKIs. Our work shows that duration of the tolerance phase and then the development of EGFR-TKIs resistant proliferative clones are very heterogeneous between the cell lines studied but also within the same cell line. However, most DTC have an enlarged morphology associated with remodelling of the actin cytoskeleton as well as a pseudo-senescent state, which seems to predispose towards the epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) developing progressively from the DTC state to the proliferative state, after loss of senescence characteristics. RNA-seq analyses show that gene signatures related to cell contractility are found at the DTC state in the three cell models studied. As previous work in the laboratory has shown the role of the small GTPase RhoB in the regulation of the actin cytoskeleton and in resistance to erlotinib, we investigated its role in tolerance to EGFR TKIs. RhoB, unlike its counterparts RhoA and RhoC, is over-expressed and over-activated in DTC. Moreover, its inhibition by the C3 exoenzyme, a toxin that specifically inhibits RhoA, RhoB and RhoC, allows the eradication of DTC and thus prevents the emergence of resistant clones. Since RhoB is regulated by prenylation and in particular by farnesylation, the combination of a farnesyltransferase inhibitor (FTI) and an EGFR-TKI was analyzed and shows that it effectively prevents the emergence of proliferative clones. These results lead us to propose this combination as a new therapeutic strategy in lung cancers carrying EGFR activating mutations.

Keywords : Lung cancer / EGFR-tyrosine kinase inhibitors / Resistances / Drug Tolerant Cells / Rho GTPases / Farnesyltransferase inhibitors

