

Université de Limoges

ED524 BioSanté

EA3842 Homéostasie Cellulaire et Pathologies, Chaire de Pneumologie
Expérimentale

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

Spécialité : Cancérologie

Présentée et soutenue par
Hussein AL-AKHRASS

Le 4 Octobre 2017

Un rôle inédit de la sortiline dans le contrôle du transport rétrograde de l'EGFR pour limiter la croissance tumorale

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

JURY :

Président du jury

Mme. Julie Gavard, Directeur de Recherche de 2^{ème} classe (DR2), Inserm U892, CNRS UMR 6299, Centre de Recherche en Cancérologie et Immunologie Nantes-Angers.

Rapporteurs

M. Patrick Brest, Chargé de Recherche de 1^{ère} classe (CR1), INSERM U1081, CNRS UMR 7284, Institut de Recherche sur le Cancer et le Vieillissement, Nice (IRCAN).

M. Jacques Robert, Professeur des Universités et Praticien Hospitalier (PU, PH), Inserm U1218, Institut Bergonié, Bordeaux.

Examineur

Mme. Marie-Odile Jauberteau, Professeur des Universités et Praticien Hospitalier (PU, PH), EA3842, Faculté de Médecine de Limoges.

Invité

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





A Sabah, ma déesse de la joie, de l'harmonie et de l'équilibre

A Hiba, l'Elyssa phénicienne libre, ma première et ma dernière reine

Et au regard perçant des yeux qui m'ont dominé inlassablement pendant 26 ans





Résister, Perforer, Exister, Mobilité et Simplicité
Thomas Naves





Remerciements

Il y a trois ans, j'ai entamé ma thèse sans savoir que celle-ci, malgré le fait qu'elle représente un grade académique, est une véritable sculpture qui orne le cœur par des souvenirs inoubliables. La façon dont la rédaction de mon manuscrit s'est déroulée m'intrigue en permanence. Bien que la matière scientifique suive adéquatement un plan défini, mes émotions cachées entre les lignes de ceci, quant à eux, ils ne suivent aucun ordre, aucune logique. Mes émotions les plus profondes me projettent dans l'esprit les visages de toutes les personnes avec qui je grandis, depuis trois ans, me donnant cette forte envie de revivre si pleinement ces années auprès de vous, et de revenir à ce que j'étais, il y a trois ans.

D'abord, je tiens à exprimer mes remerciements les plus sincères aux membres de jury d'avoir accepté de consacrer leur temps pour lire et juger mon travail. Je remercie infiniment madame Gavard d'avoir accepté de présider ce jury, votre brillance irisera la fin de ces trois ans par des ondes d'énergie positive. Le jugement de ce travail par l'œil professionnel de monsieur Robert ne peut m'être qu'une véritable joie. Monsieur Brest, il est extrêmement difficile de chercher des mots qui exprimeraient la gratitude ressentie envers mon premier encadrant dans ma vie française, l'air azuréen m'avait positivement impressionné, en bonne partie grâce à vous.

Merci pour la Chaire de Pneumologie Expérimentale et l'Association Limousine d'Aide aux Insuffisants Respiratoires-Assistance Ventilatoire à Domicile (ALAIR-AVD) pour le financement et surtout la confiance accordée à notre projet. Je remercie également l'Association du Développement Education Recherche-Limousin Poitou-Charentes (ADER-LPC) de m'avoir attribué le financement pour réaliser mon doctorat et je remercie spécifiquement monsieur Baronnet pour sa vive sympathie.

Marie-Odile, la maman de notre équipe, je vous offre du fond de mon cœur, un bouquet d'affection pour toute la tendresse que vous montrez et la bienveillance que vous nous accordez pour unir les membres de cette formidable famille. A mes encadrants Fabrice et François, mes sentiments envers vous sont à la hauteur de votre dévouement envers moi. Je vous remercie, François, de tout ce que vous veillez à faire pour que notre équipe irradie, ainsi que de m'avoir facilité le chemin pour participer aux congrès de Nice et de Washington. Il me tient à cœur de savoir gré à plusieurs « Fabrices » au cœur de « mon Fabrice » : merci pour Fabrice le directeur, Fabrice l'altruiste et avant tout, Fabrice l'ami. On dit que le temps passe vite quand on est heureux. Trois ans sont passés en un claquement de doigts grâce à ta compagnie, Thomas. Je te dois le socle de ma personnalité scientifique en ce début de chemin. Au-delà de labeur du quotidien, je vous remercie, Nadine et Thomas, de votre générosité illimitée et votre hospitalité qui m'a toujours fait chaud au cœur car à St Amand, on se sent vite chez soi.

Une inquiétude m'entrave lors de la rédaction de cette partie la plus difficile de ma thèse. Ce n'est pas du tout la peur d'oublier quelqu'un car toutes les personnes que je voudrais remercier occupent leurs parties dans mon cœur et me reviennent systématiquement à l'esprit. C'est la peur que mes mots me trahissent et notre alphabet ne



suffise pas pour vous montrer le degré de ma gratitude et l'intensité de mon ressenti envers vous. Aux membres de notre équipe, vous avez, comme des oiseaux, salué de votre chant l'approche de mon matin.

Merci Nicolas d'être un agréable ami toujours aussi bien généreux que bienveillant. Grâce à ta compagnie, je connais beaucoup plus de choses sur la France, le Français et les français. Merci également pour toutes les discussions scientifiques que nous avons eu pendant ces 3 ans. Niki, le grand cœur et la pureté de l'âme, on dit que c'est difficile de trouver de vrais amis, et quand ça concerne des personnes ayant des qualités d'anges, l'amitié devient encore plus sensée, plus fortifiée et plus durable.

Amazigue, comme j'ai toujours préféré t'appeler, merci d'avoir grandement contribué à mon immersion dans ma vie limougeaude. Quand je regarde les photos / vidéos des premiers déménagements, je suis surpris de la vitesse à laquelle le temps file, mettant fin à cette période et tournant la page vers une nouvelle période de réussite, j'espère. Marcela, je suis certain que nos génomes hébergent des polymorphismes communs. Merci d'être la libanaise que tu caches dans ton cœur brésilien.

Merci à Barbara pour toutes les discussions « spatio-philosophe-existentielles ». Merci Marine pour la vivacité que tu as semée au sein de l'équipe suite à ton arrivée. « Mon petit » Sofiane, malgré le fait que tu aies été suffisamment lourd en m'embêtant au début de la thèse, aujourd'hui je te remercie pour cette lourdeur agréable. Ma puce Sophie (je sais que tu adores que je t'appelle comme ça), merci pour tous les post-its extraordinaires sur mon bureau. Merci « Mista » Hugo d'avoir supporté desfois ma lourdeur notamment vis-à-vis du lien entre le rythme de ta démarche et ton rythme cardiaque, voire circadien. Merci Sabrina pour toutes les discussions qui ont toujours allégé le fardeau des petits soucis de la vie, merci aussi pour le Père Noël. Merci Hafidha pour la tendresse que tu montres envers tous les doctorants de l'équipe. « Miguelito », j'avais du mal à comprendre ce que tu voulais exprimer quand je venais de faire ta connaissance, néanmoins, je n'avais jamais douté de ton grand cœur amoureux de la vie et des insouciances de la jeunesse. Paul-François, merci pour ton humour que je souhaite retrouver au sein d'une Soirée Jaune II.

Mohammad, mon Saint-Just, Merci pour cette foi gigantesque que tu as. Merci d'avoir combattu la cruauté et la lâcheté de la mort qui t'a volé assez tôt le socle de ta vie. Sans ta présence... Je ne veux même pas y penser.

A Hassan Ragheb de la « Haute-Montagne », à chaque fois que nos souvenirs du collège me reviennent à l'esprit, un sourire se dessine involontairement sur mon visage. Mille mercis pour tous ces souvenirs et bon courage dans ta nouvelle bataille sur cette nouvelle page de ta vie.

Adonis et Sunset, la fortune de ma vie niçoise et la touche de joie qui façonne les détails de mon quotidien, merci d'avoir su m'apporter les moments de bonheur nécessaires, ainsi que de m'avoir aidé à prendre du recul sur le monde entier. A mon tour: I love you both for who you both are.

Randala, Vielen Dank für deine Anwesenheit. Ich danke dir für die Unterstützung und meine Balance in allem, in Harmonie zu halten.



A ma famille : « on peut vivre sans parfum, mais on ne peut pas vivre sans ses artères ». Je vous dédie ma thèse et je finis en vous adressant les plus beaux vers de la plus belle chanson au monde :

عَذِّبْ بِمَا شِئْتَ غَيْرَ الْبَعْدِ عَنْكَ تَجِدْ __ أَوْفَى مُحِبِّ، بِمَا يُرْضِيكَ مُبْتَهَجِ
وَحَدْ بَقِيَّةَ مَا أَبْقَيْتَ مِنْ رَمَقِ __ لَا خَيْرَ فِي الْحَبِّ إِنْ أَبْقَى عَلَى الْمَهْجِ





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/>





Liste des abréviations

aa	amino acid
ABL	Abelson tyrosine-protein kinase
ADAM-10	disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 10
ADAM-17	disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 17
ADC	adenocarcinoma
Akt	RAC-beta serine/threonine-protein kinase
ALK	anaplastic lymphoma kinase
AP-2	adaptor protein complex 2
apoB-100	apolipoprotein B-100
APPL-1	DCC-interacting protein 13-alpha
ATM	serine-protein kinase ATM
ATP	adenosine triphosphate
ATRS	AT-rich sequence
BCR	breakpoint cluster region protein
BDNF	brain-derived neurotrophic factor
BTC	betacellulin
C/EBP	CCAAT/enhancer-binding protein
Cbl	E3 ubiquitin-protein ligase CBL
CBNPC	cancer bronchique non à petites cellules
CBPC	cancer bronchique à petites cellules
CCR	Colorectal cancer
CD38	cluster of differentiation 38
CD44s	cluster of differentiation 44 isoform s
CE	squamous cell carcinoma
CELSR2	cadherin EGF LAG seven-pass G-type receptor 2
C-Jun	AP-1 transcription factor
CREB	cyclic AMP-responsive element-binding protein
CTLA-4	cytotoxic T-lymphocyte protein 4
DAG	diacylglycerol
DNA	deoxyribonucleic acid
DNAPK	DNA-dependent protein kinase
EEA-1	early endosome antigen 1
EGF	epidermal growth factor
EGFR	epidermal growth factor receptor
EPGN	epigen
Eph	ephrin type-A receptor
Eps-15	epidermal growth factor receptor substrate 15
Epsin-1	clathrin interactor EPSIN 1
ERBB-1	tyrosine kinase-type cell surface receptor HER-1
ERBB-2	tyrosine kinase-type cell surface receptor HER-2
ERC	endocytic recycling compartment



EREG	epiregulin
Erk	extracellular regulated mitogen-activated kinase
ESCRT	endosomal sorting complex required for transport
FAK	focal adhesion kinase
FGF	fibroblast growth factor
FGFR-1	fibroblast growth factor receptor 1
FGFR-2	fibroblast growth factor receptor 2
FGFR-3	fibroblast growth factor receptor 3
Gab-1	Grb2-associated-binding protein 1
Gab-1	GRB2-associated-binding protein 1
GBM	glioblastoma
GDP	guanosine diphosphate
Glut-4	solute carrier family 2, facilitated glucose transporter member 4
Grb-2	growth factor receptor-bound protein 2
Grb-2	growth factor receptor-bound protein 2
GTP	guanosine triphosphate
HB-EGF	heparin-binding EGF-like growth factor
HER-1	receptor tyrosine-protein kinase erbB-1
HER-3	receptor tyrosine-protein kinase erbB-3
Hrs	hepatocyte growth factor-regulated tyrosine kinase substrate
IGF-1	insulin-like growth factor I
IL-8	interleukine 8
iTK	tyrosine kinase inhibitor
kDa	kilo Dalton
KO	knockout
KRT-7	keratin, type II cytoskeletal 7
LAMP-2	lysosome-associated membrane glycoprotein 2
LAMTOR-1	late endosomal/lysosomal adaptor, MAPK and MTOR activator 1
LDL	low-density lipoprotein
LOH	loss of heterozogosity
LpL	lipoprotein lipase
LRP	low-density lipoprotein receptor-related protein
M6PR	mannose-6-phosphate receptor
MAPK	mitogen-activated protein kinase
MCM-7	DNA replication licensing factor MCM-7
Mek	dual specificity mitogen-activated protein kinase kinase 1
MET	hepatocyte growth factor receptor
MUC-1	mucin-1
MYBPHL	myosine binding protein H like
NGF- β	beta-nerve growth factor
NTRK-1	neurotrophic tyrosine kinase receptor type 1
NTS	neurotensin
NTSR-1	neurotensin receptor 1
NTSR-2	neurotensin receptor 2
NTSR-3	neurotensin receptor 3



p75NTR	low affinity neurotrophin receptor p75NTR
PCNA	proliferating cell nuclear antigen
PD-1	programmed cell death protein 1
PDGF	platelet-derived growth factor
PDL-1	programmed cell death protein ligand 1
PHD-3	prolyl hydroxylase 3
PI3K	phosphoinositide-3-kinase
PIP3	phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate
PKC	protein kinase C
PLCγ1	1-phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate phosphodiesterase gamma-1
PMA	phorbol 12-myristate 13-acetate
PNPase	polynucleotide phosphorylase
PSMA5	proteasome Subunit Alpha 5
PSRC1	proline/serine-rich coiled-coil protein 1
PTEN	phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate 3-phosphatase and dual-specificity protein phosphatase PTEN
Rab-4	Ras-related protein Rab-4A
Rab-5	Ras-related protein Rab-5A
Rab-7	Ras-related protein Rab-7A
Rabex-5	rabaptin-5-associated exchange factor for Rab5
Raf	RAF proto-oncogene serine/threonine-protein kinase, effector of Ras
RAP	low density lipoprotein receptor-related protein-associated protein 1
Ras	resistance to audiogenic seizures GTPase Hras
RCPG	G protein-coupled receptor
RHA	RNA helicase A
RNA	ribonucleic acid
ROS-1	proto-oncogene tyrosine-protein kinase ROS
RTK	tyrosine kinase receptor
SH2	Src homology 2
Shc	Src homology 2 domain-containing-transforming protein C
shRNA	short hairpin RNA
siRNA	small interfering RNA
SNP	single nucleotide polymorphism
SNX-1	sorting nexin 1
SNX-2	sorting nexin 2
Sos	son of sevenless homolog 1
SOX-2	SRY-box 2
SPRY-2	protein sprouty homolog 2
Src	proto-oncogene tyrosine-protein kinase Src
STAT-3	signal transducer and activator of transcription 3
VPS	vacuolar protein sorting





Sommaire

Remerciements	7
Liste des abréviations	13
Sommaire	17
Introduction	20
Chapitre I. Le cancer du poumon	21
I.1. L'anatomie du poumon.....	21
I.2. L'épidémiologie	22
I.3. Les facteurs de risque.....	22
I.4. Les symptômes.....	22
I.5. Les outils de diagnostic.....	23
I.6. L'établissement des différents stades du cancer du poumon	23
I.7. La classification des cancers pulmonaires	23
I.8. Les approches thérapeutiques	24
I.9. La résistance et l'échappement thérapeutique du cancer bronchique non à petites cellules.....	30
Chapitre II. Les récepteurs à domaine tyrosine kinase	34
II.1. Les mécanismes d'activation des récepteurs à domaine tyrosine kinase	35
II.2. Les voies de signalisation canoniques de l'EGFR.....	36
II.3. Les voies de signalisation non-canoniques de l'EGFR.....	38
II.4. L'influence de l'épissage alternatif de l'EGFR sur sa signalisation	43
II.5. La régulation spatiale de l'EGFR.....	45
II.6. La dérégulation du trafic de l'EGFR dans le cancer	54
Chapitre III. La sortiline.....	59
III.1. La découverte de la sortiline	59
III.2. Les sites actifs de trafic dans la séquence de la sortiline	60
III.3. Les voies alternatives du trafic de la sortiline	63
III.4. L'influence de l'épissage alternatif de la sortiline sur son trafic et sa fonction.....	64
III.5. La structure du domaine VPS10P de la sortiline	64
III.6. Les ligands de la sortiline	64
III.7. Le trafic de la neurotensine par la sortiline	67
III.8. La sortiline et la signalisation de mort induite par les pro-neurotrophines.....	67
III.9. L'effet antidépresseur du pro-peptide de la sortiline	68
III.10. La sortiline régule le trafic de Glut-4.....	69
III.11. La modulation du trafic des lipoprotéines par la sortiline	69
III.12. L'implication de la sortiline dans le cancer	70
III.13. « A new role under sortilin's belt in cancer » (Wilson <i>et al.</i> , 2016).....	76
Objectifs	83
Matériels et méthodes	85
Résultats	93
Chapitre IV. La sortiline contrôle l'internalisation de l'EGFR et limite la croissance tumorale	94



Chapitre V. L’extinction de l’expression de sortiline inhibe la translocation nucléaire de l’EGFR	137
Discussion.....	139
Conclusion et perspectives.....	147
Références bibliographiques	149
Table des illustrations.....	178
Annexes	180





Introduction



Chapitre I. Le cancer du poumon

I.1. L'anatomie du poumon

Les poumons droit et gauche, enveloppés par la cavité pleurale, sont situés dans 2 cavités hémithoraciques distinctes, séparées par le cœur et les structures médiastinales et bordés dans leur partie basse par le diaphragme. Dans les descriptions anatomiques, le poids du poumon est la mesure habituelle fournie. La gamme de poids normale de chaque poumon chez un adulte est d'environ 300 à 450 g (Jr and Farver, 2008). Lorsque le poids du poumon augmente, il s'agit d'une indication de congestion, d'œdème ou d'exsudats inflammatoires. Le volume pulmonaire, mesuré à l'état gonflé par déplacement d'eau peut varier de 3,5 à 8,5 L pour les deux poumons (Jr and Farver, 2008; Thurlbeck, 1979). Le poumon droit est légèrement plus volumineux (53%) que le poumon gauche (47%) (Jr and Farver, 2008). En raison de leur nature élastique, les poumons rétrécissent d'environ un tiers de leur taille lorsque la cavité thoracique est ouverte (Parson, 2009). Le poumon est recouvert d'une plèvre viscérale lisse et translucide, celle-ci repose sur le poumon ce qui lui donne une couleur rose. Avec l'âge, la plèvre accumule invariablement des pigments noirs dont la quantité reflète le degré d'exposition aux particules environnementales (Jr and Farver, 2008). Le poumon gauche comprend deux lobes et le poumon droit en compte trois. Les lobes sont divisés en plusieurs segments séparés les uns des autres par des cloisons appelées scissures. Chaque lobe contient les bronches qui sont reliées à la trachée et formées d'alvéoles connectées entre elles par les bronchioles (Figure 1).

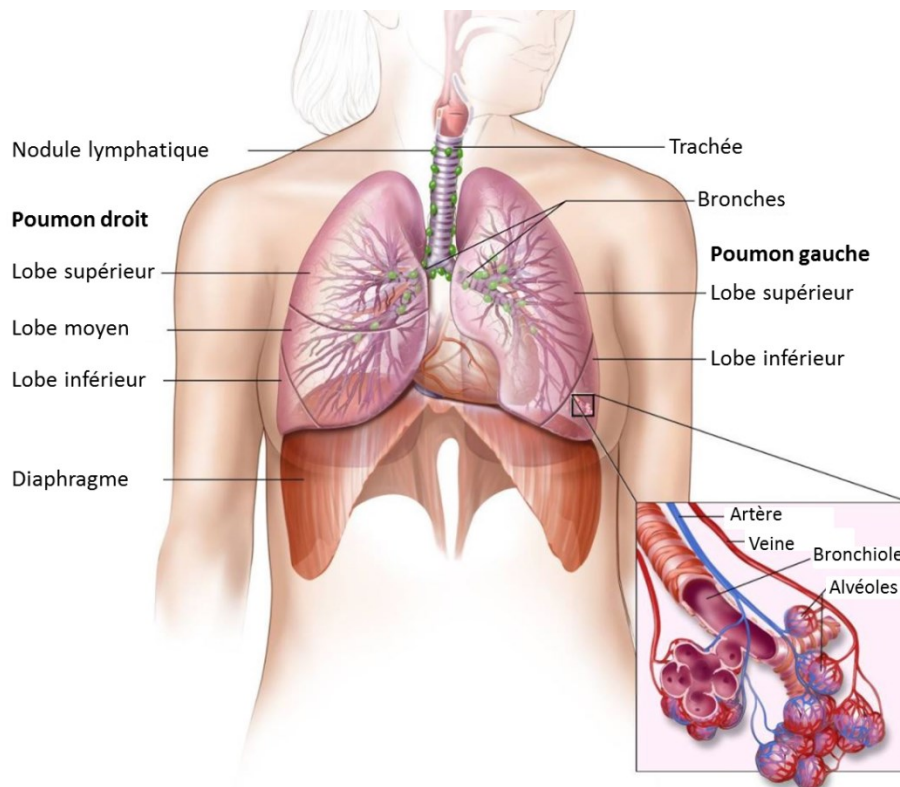


Figure 1 : l'anatomie du système respiratoire montrant la trachée, les deux poumons avec leurs lobes et voies aériennes.



Les ganglions lymphatiques et le diaphragme sont également montrés. L'oxygène est inhalé dans les poumons et passe au travers des membranes minces des alvéoles pour rejoindre la circulation sanguine (voir l'encadré). Adapté de « PDQ Cancer Information Summaries » (Cancer Information Summaries, 2002).

I.2. L'épidémiologie

Le cancer du poumon est le 3^{ème} cancer le plus fréquent chez la femme après le cancer du sein et le cancer colorectal (CCR), il est le 2^{ème} cancer chez l'homme derrière le cancer de la prostate. Le cancer du poumon est la principale cause de décès par cancer dans le monde, avec une mortalité annuelle supérieure à 1 million (Herbst *et al.*, 2008). En France, le nombre de nouveaux cas est estimé à 38500 par an, avec une mortalité annuelle de près de 30000 dont près de ¾ sont des hommes (Ribassin-Majed *et al.*, 2017).

I.3. Les facteurs de risque

Entre 80% et 90% des cancers du poumon sont liés au tabagisme (Centers for Disease Control and Prevention [CDC], 2005). Le pourcentage restant représente des patients non-fumeurs (tabagisme passif et / ou pollution). Le cancer bronchique chez des patients non-fumeurs représente la 7^{ème} cause de mortalité par cancer dans le monde (Sun *et al.*, 2007; Thun *et al.*, 2008). Les cancers du fumeur et du non-fumeur présentent des caractéristiques cliniques et moléculaires différentes, ce qui suggère qu'ils appartiennent à deux entités distinctes. De nombreuses études épidémiologiques concernant le cancer du poumon chez les non-fumeurs ont décrit des facteurs de risque, tels que le tabagisme passif, les maladies pulmonaires préexistantes, l'exposition aux agents cancérigènes et la prédisposition génétique (McCarthy *et al.*, 2012; Samet *et al.*, 2009; Subramanian and Govindan, 2007; Sun *et al.*, 2007).

I.4. Les symptômes

Dans la majorité des cas, le cancer du poumon est malheureusement diagnostiqué à un stade tardif voire métastatique. Ceci est dû aux particularités de l'anatomie pulmonaire permettant à la tumeur de croître et potentiellement de se disséminer pendant une période considérable sans que le patient ne présente de symptômes de la pathologie. Le cancer est alors diagnostiqué à un stade avancé, pour lequel la tumeur est inopérable dans près de 80% des cas. Ce diagnostic tardif explique en partie le taux de survie de 15% des patients à 5 ans (Spiro *et al.*, 2007). Les symptômes du cancer du poumon sont multiples, ceux qui sont liés aux voies respiratoires représentent des symptômes universels tels que l'apparition d'une toux, des expectorations sanguinolentes (hémoptysies), des douleurs thoraciques et un essoufflement. Le patient peut également présenter des anomalies aspécifiques, telles que la perte de poids et la fatigue musculaire (Corner *et al.*, 2005; Muers and Round, 1993).



I.5. Les outils de diagnostic

Bien que les symptômes du cancer bronchique soient connus, aucune preuve ne permet de prédire le type et le stade de la tumeur qui reste cliniquement silencieuse pendant son développement précoce. Les trois dernières décennies ont vu une évolution exponentielle des outils et techniques de diagnostic du cancer du poumon, notamment grâce à la tomodensitométrie qui permet de numériser et de reconstruire en 2D ou 3D la tumeur dans sa structure anatomique. Aujourd'hui, le scanner représente la technique de référence pour le diagnostic d'une tumeur pulmonaire après la radiologie thoracique classique en première ligne. Cette évolution technique remarquable s'est accompagnée du développement de nombreux outils précis d'imagerie, tels que la tomographie par émission de positons (TEP), la micro-endoscopie confocale et la bronchoscopie d'auto-fluorescence (Sutedja, 2003). Le dépistage par tomodensitométrie joue un rôle majeur dans l'amélioration de la médiane de survie des patients bien supérieur à celui de la radiologie pulmonaire classique (The National Lung Screening Trial Research Team, 2011). Cependant, des clones cellulaires potentiellement malins demeurent inférieurs au seuil de détection par cette technique, ce qui nécessite le développement des outils de diagnostic plus précis et sensibles pour la détection et le traitement précoce, notamment à travers des biomarqueurs sériques tels que des acides nucléiques (Chen *et al.*, 2016; Leon *et al.*, 1977; Sanfiorenzo *et al.*, 2013; Underhill *et al.*, 2016), des protéines (Farlow *et al.*, 2010; Patz *et al.*, 2007), des microvésicules (Jakobsen *et al.*, 2015; Park *et al.*, 2013) et cellules tumorales circulantes (Ilie *et al.*, 2014; Parkinson *et al.*, 2012). Malgré le progrès conceptuel et technique réalisé dans ce domaine, de nombreuses études ont besoin d'élargir leur cohorte de patients. En outre, le dépistage du cancer à travers la biopsie liquide (cellules tumorales circulantes et ADN tumoral circulant) représente un grand défi vu l'hétérogénéité des signatures tumorales dans la circulation sanguine (Yong, 2014).

I.6. L'établissement des différents stades du cancer du poumon

Un système formel basé sur un code alphanumérique a été adopté pour décrire la croissance et l'extension d'un cancer solide, y compris le cancer du poumon, c'est le système TNM pour tumeur, ganglion et métastase respectivement (van Meerbeeck and Janssens, 2013; Mirsadraee *et al.*, 2012). Cette classification repose sur une évaluation de la taille de la tumeur primaire et de sa capacité d'extension soit dans les tissus proches, tels que les ganglions lymphatiques (N), soit vers des régions distantes *via* des métastases (M). Les sites métastatiques les plus communs pour le cancer du poumon sont le cerveau, le tissu osseux, les glandes surrénales, le foie, les reins et le second poumon (Popper, 2016). Les chiffres ou les lettres apparaissant après T, N et M fournissent d'amples détails sur chacun de ces facteurs. Des nombres plus élevés signifient que le cancer est plus avancé. La combinaison des différentes catégories T, N et M permet de conclure à un stade global du cancer (van Meerbeeck and Janssens, 2013; Mirsadraee *et al.*, 2012).

I.7. La classification des cancers pulmonaires



Les carcinomes pulmonaires se divisent grossièrement en deux sous-groupes selon leurs caractéristiques cliniques et histopathologiques. Le cancer bronchique non à petites cellules (CBNPC) qui représente près de 80% du diagnostic de cancer du poumon, et le cancer bronchique à petites cellules (CBPC) qui correspond à 20% des cas (Herbst *et al.*, 2008). L'évolution de la classification histologique du CBPC se résume de la manière suivante. En 1962, le Dr Kreyberg a proposé la classification du CBPC en 2 sous-types qui sont le carcinome en grains d'avoine et le carcinome à cellules polygonales (Kreyberg, 1962). La classification actuelle ne reconnaît que le CBPC pur ou combiné (Travis, 2012). Le CBPC combiné est défini comme une tumeur pulmonaire formée majoritairement de petites cellules, avec au moins 10% de cellules plus grandes qui sont alors qualifiées comme un CBNPC.

I.7.1. Les sous-types du cancer bronchique non à petites cellules

Le CBNPC est actuellement défini par des caractéristiques pathologiques. Les deux phénotypes histologiques prédominants sont les adénocarcinomes (ADCs, ~ 50%) et les carcinomes épidermoïdes (CEs; ~ 40%) (Brambilla, 2010; Davidson *et al.*, 2013). En général, les ADCs proviennent des voies respiratoires distales, alors que les CEs ont pour origine les voies plus proximales et sont plus fortement associés au tabagisme et à l'inflammation chronique que les ADCs (Brambilla, 2010; Davidson *et al.*, 2013). Les ADCs ont souvent une histologie glandulaire et expriment des biomarqueurs compatibles avec une origine dans le poumon distal, y compris le facteur de transcription de la thyroïde 1 (TTF-1) et la kératine 7 (KRT-7) (Brambilla, 2010; Davidson *et al.*, 2013). En revanche, les CEs sont caractérisés par une différenciation squameuse rappelant l'épithélium pseudostratifié qui tapisse la trachée et les voies respiratoires supérieures (Rock *et al.*, 2010). Cliniquement, les CEs se distinguent des ADCs par l'abondance de la Cytokératine 5, la Cytokératine 6 et / ou les facteurs de transcription SRY-box 2 (SOX-2) et p63 (Brambilla, 2010; Davidson *et al.*, 2013; Lu *et al.*, 2010). D'autres sous-types de CBNPC comprennent le carcinome à grandes cellules qui est diagnostiqué par exclusion si la tumeur ne présente pas les caractéristiques des ADCs ou des CEs. En 2011, la Société Thoracique Américaine et la Société Respiratoire Européenne ont développé une nouvelle classification des ADCs en éliminant le terme de carcinome « broncho-alvéolaire » et en introduisant les nouveaux concepts d'adénocarcinome *in situ* et d'adénocarcinome mini-invasif pour les petits adénocarcinomes présentant une croissance lépidique pure ou prédominante avec une invasion ≤ 5 mm, dans le but de définir les patients qui, s'ils subissent une résection chirurgicale, auraient 100% de chance de survie au cancer (Travis *et al.*, 2011).

I.8. Les approches thérapeutiques

I.8.1. Le cancer bronchique à petites cellules

Comparé au CBNPC, le CBPC se caractérise par une croissance rapide et un potentiel métastatique précoce et répandu. Par conséquent, 60% à 70% des patients présentent un cancer de stade étendu lors du premier diagnostic (Veronesi *et al.*, 2015), ce



qui se définit comme un cancer s'étant propagé au-delà des ganglions lymphatiques et ganglionnaires ipsilatéraux et ne pouvant pas être inclus dans un seul champ de radiation. Il n'existe actuellement aucune méthode d'efficacité prouvée pour la détection précoce du CBPC (Aberle *et al.*, 2013; 2011). En outre, aucune thérapie ciblée n'est approuvée pour une utilisation contre le CBPC. En effet, le protocole thérapeutique dépend du stade de la tumeur. En général, un CBPC de stade limité (un cancer confiné au thorax dans un seul champ de radiation) est traité avec une radiochimiothérapie concomitante, alors qu'un cancer de stade étendu est traité uniquement avec la chimiothérapie (Byers and Rudin, 2015). A l'heure actuelle, le traitement le plus efficace comprend une chimiothérapie par cisplatine (agent endommageant l'ADN suite à la formation de ponts intra-brins entre 2 guanines) en association avec la radiothérapie (Amini *et al.*, 2014). Les essais cliniques ont montré la supériorité de la radiothérapie hyperfractionnée et l'importance de commencer les séances aussi tôt que possible au cours du traitement (De Ruyscher *et al.*, 2006; Turrisi *et al.*, 1999). Malgré la réponse vigoureuse à la première ligne de chimiothérapie (Simon *et al.*, 2004), ceci est fortement contrastée par la résistance à la deuxième ligne de chimiothérapie ainsi qu'aux thérapies mises en place à la suite de la récurrence (Byers and Rudin, 2015).

I.8.2. Le cancer bronchique non à petites cellules

I.8.2.1. Les thérapies conventionnelles

Les traitements conventionnels du CBNPC consistent en une résection chirurgicale lorsque la tumeur est accessible, une radiothérapie standard et une chimiothérapie à base de sels de platine. Une thérapie combinée à ces approches est recommandée dans la pratique clinique (Li *et al.*, 2016). La majorité des patients sont diagnostiqués à un stade avancé perdant par conséquent la fenêtre d'opportunité pour une intervention chirurgicale, ce qui représente un obstacle principal au traitement du CBNPC. Ainsi, la radiothérapie et la chimiothérapie représentent les seules approches thérapeutiques contre les tumeurs chirurgicalement inaccessibles (Ettinger *et al.*, 2016). La radiothérapie et la chimiothérapie à base de sels de platine jouent un rôle clé dans le traitement du CBNPC en endommageant l'ADN et en induisant la mort préférentiellement des cellules tumorales (Li *et al.*, 2016). Cependant, malgré ces thérapies conventionnelles, le taux de survie à cinq ans des patients atteints de CBNPC n'a toujours pas été significativement amélioré (Spira and Ettinger, 2004). La chimiothérapie classique demeure limitée par sa toxicité importante et la résistance thérapeutique fréquemment acquise (Vanneman and Dranoff, 2012).

I.8.2.2. Les thérapies ciblées

Au cours des deux dernières décennies, le paradigme du traitement du cancer est passé d'agents cytotoxiques relativement non spécifiques à des thérapies sélectives inhibant des voies critiques nécessaires pour la croissance et la progression tumorale. Une liste impressionnante de cibles thérapeutiques potentielles a été mise en évidence modifiant d'une manière radicale l'évaluation clinique et le traitement des patients (Tableau 1) (Chen *et al.*, 2014). L'histoire de la thérapie ciblée est étroitement liée au succès de l'imatinib (Glivec)



dans le traitement de la leucémie myéloïde chronique (Druker, 2004). Cet inhibiteur de tyrosine kinase (iTK) bloque la protéine kinase ABL qui est activée par la translocation *BCR-ABL* (Nowell, 2007). Le succès de l'imatinib dans cette pathologie fût une véritable opportunité pour le développement de molécules ATP-mimétiques capables d'inhiber les protéines réceptrices à domaine tyrosine kinase. En effet, il a été démontré que ces iTKs peuvent entrer en compétition efficacement avec les sites de fixation de l'ATP et ainsi inhiber sélectivement la poche catalytique des protéines kinases (Druker, 2004). Cependant, la sensibilité aux iTKs dépend de la présence d'anomalies « conductrices » encore appelées mutations activatrices mais aussi de mutations inhibitrices susceptibles de bloquer la réponse aux traitements. La stratégie thérapeutique permettant d'améliorer la réponse aux thérapies ciblées repose donc sur la caractérisation moléculaire précise de la tumeur et pas uniquement sur le type et le stade définis par le pathologiste. Le développement des plateformes de séquençage à haut débit permettent aux cliniciens d'examiner l'ampleur des mutations génétiques au sein des tumeurs et d'orienter le diagnostic et la prise en charge. Les différentes mutations du gène codant pour le récepteur du facteur de croissance épidermique (*EGFR*) ont été les premières à être découvertes chez des patients atteints d'ADC pulmonaire et à être associées à la réponse aux iTKs. Plus de 20000 tests pour la recherche de mutations de l'*EGFR* sont réalisés par an dans le cancer du poumon (Shepherd *et al.*, 2005). À l'heure actuelle, les iTKs de l'*EGFR* de 1^{ère} génération, le gefitinib et l'erlotinib, ainsi que leur analogue de 2^{ème} génération, l'afatinib, sont approuvés pour le traitement de première intention du CBNPC métastatique présentant des mutations activatrices de l'*EGFR* (L858R ou la délétion de l'exon19 [Del19]). L'osimertinib est un iTK de l'*EGFR* de 3^{ème} génération. Cet iTK est approuvé pour traiter le CBNPC avancé ou métastatique ayant développé une résistance acquise aux inhibiteurs de l'*EGFR*, notamment *via* l'apparition de la mutation résistante T790M (Sullivan and Planchard, 2016). Par la suite, l'identification des mutations *KRAS* et *BRAF* (Davies *et al.*, 2002; Santos *et al.*, 1984) découvertes chez des patients atteints d'ADC pulmonaire a été associée à la réponse aux iTKs (Gazdar, 2009; Paez *et al.*, 2004; Pao *et al.*, 2004;). D'autres mutations et amplifications des gènes codant pour des récepteurs à domaine tyrosine kinase (RTKs) ont été identifiées dans le CBNPC, y compris les mutations du gène codant pour le récepteur de type 2 de la famille *EGFR* humaine (*ERBB2* codant pour la protéine HER-2), du gène codant pour le récepteur du facteur de croissance des hépatocytes (*MET*), du gène codant pour le récepteur du facteur de croissance des fibroblastes 1 et 2 (*FGFR1* et *FGFR2*), du gène du récepteur kinase orphelin ROS-1 (*ROS1*), du gène codant pour le récepteur tyrosine kinase des neurotrophines type 1 (*NTRK1*), ainsi que le réarrangement oncogénique du gène codant pour la kinase anaplastique du lymphome (*ALK*) (Engelman *et al.*, 2007; Fernandez-Cuesta *et al.*, 2014; Rikova *et al.*, 2007; Stephens *et al.*, 2004; Vaishnavi *et al.*, 2013) (Tableau 1). Il est utile de noter que le cetuximab (anticorps bloquant de l'*EGFR*) n'a pas montré d'effets significatifs sur la survie globale des patients atteint de CBNPC (Sgambato *et al.*, 2014). En plus, l'utilisation de cetuximab n'est pas recommandée en association avec une chimiothérapie chez des patients précédemment traités avec le cisplatine (Kim *et al.*, 2013). Les mutations survenant sur les iTKs ne sont pas les seules à permettre d'orienter la stratégie thérapeutique. Ainsi, d'autres thérapies ciblées basées sur des agents anti-angiogéniques ont été développées parallèlement y compris dans le CBNPC (Corrales *et al.*, 2017). L'angiogenèse est une caractéristique du cancer essentielle pour la croissance, la progression et les métastases de nombreux types de tumeurs solides (Carmeliet and Jain, 2000; Makrilia *et al.*, 2009). Les mécanismes responsables de l'angiogenèse tumorale comprennent plusieurs voies de signalisation mettant en jeu le facteur de croissance



endothélial vasculaire (VEGF-A) et son récepteur VEGFR-2, le facteur de croissance des fibroblastes (FGF) et les voies de signalisation du facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGF) (Amini *et al.*, 2014; Raica and Cimpian, 2010; Saylor *et al.*, 2012). À ce jour, le bevacizumab (anti-VEGF) reste le seul traitement anti-angiogénique ayant reçu une Autorisation de Mise sur le Marché en association avec les sels de platine dans le traitement du CBNPC avancé (Corrales *et al.*, 2017). Son utilisation est restreinte aux patients atteints de tumeurs ayant une histologie non squameuse (Sandler *et al.*, 2006; Soria *et al.*, 2013).

La progression des cellules cancéreuses et la formation des métastases sont deux mécanismes fortement dépendants de la fonction lysosomale (Gocheva *et al.*, 2006; Kirkegaard and Jäättelä, 2009). Dans une cellule tumorale, le lysosome présente des altérations importantes par comparaison à une cellule saine, notamment au niveau du volume du compartiment lysosomal, de la distribution intracellulaire, de sa composition ainsi que l'efficacité de ses enzymes (Sui *et al.*, 2013). Ces altérations sont corrélées à l'invasion, l'angiogenèse et la résistance à la chimiothérapie (Fehrenbacher and Jäättelä, 2005). Il existe actuellement 5 catégories de traitements ciblant le lysosome dans le cancer. Tous ces traitements sont en phase de recherche préclinique à l'exception des dérivés de chloroquine (CQ) qui sont utilisés dans plusieurs essais cliniques en combinaison avec d'autres traitements dans de nombreux cancers tels que le CBNPC (identifiants : NCT00969306, NCT00809237 et NCT01649947). La CQ est un traitement préventif de la malaria (Ursing *et al.*, 2016), cet agent lysosomotrope inhibe l'acidification des endosomes ce qui perturbe l'activité des enzymes lysosomales bloquant ainsi l'autophagie (Dunmore *et al.*, 2013). Dans le cancer bronchique, l'activation de l'autophagie est l'un des mécanismes décrits dans la résistance aux inhibiteurs de l'EGFR (*e.g.* erlotinib, gefitinib). La combinaison entre l'erlotinib ou le gefitinib avec la CQ permet de contourner la résistance thérapeutique en augmentant l'efficacité de ces iTKs. Néanmoins, l'utilisation de la CQ dans le cancer bronchique n'a pas montré d'amélioration significative sur la survie globale des patients (Tang *et al.*, 2015; Zou *et al.*, 2013).

I.8.2.3. L'immunothérapie

Au cours des dernières années, les inhibiteurs de points de contrôle immunitaire sont apparus comme des agents thérapeutiques prometteurs dans le cancer CBNPC. À ce jour, les points de contrôle immunitaire les mieux caractérisés et les plus appropriés sur le plan thérapeutique sont l'antigène cytotoxique associé aux lymphocytes T4 (CTLA-4) (Callahan *et al.*, 2010) et la voie de la protéine-1 de mort cellulaire programmée (PD-1, codé par le gène *PDCD1*) (Zitvogel and Kroemer, 2012). Dans les premières études, les inhibiteurs du ligand de PD-1 (PDL-1, codé par le gène *CD274*) ont montré une activité anti-tumorale prometteuse et des réponses cliniques durables dans un sous-ensemble de patients (Sundar *et al.*, 2015). Sur la base de ces résultats encourageants, plusieurs inhibiteurs de PD-1 / PD-L1 sont entrés dans le développement clinique, et deux agents (nivolumab et pembrolizumab) ont obtenu une approbation réglementaire aux États-Unis pour le traitement du CBNPC (Herzberg *et al.*, 2017). Dans plusieurs grandes études randomisées, les inhibiteurs de PD-1 / PD-L1 ont produit des améliorations significatives dans la survie globale établissant un nouveau niveau de soins dans ce cancer (Sundar *et al.*, 2015). Des recherches et des essais cliniques sont en cours pour combiner l'immunothérapie avec la chimiothérapie ciblée pour



identifier les patients susceptibles d'avoir une réponse optimale aux inhibiteurs de la voie PD-1 / PD-L1 (Sundar *et al.*, 2015).



Tableau 1 : les altérations géniques potentiellement importantes dans l'ADC et le CE.

Gene	Status (M, C or F)*	Frequency (%)		Available GEMMs	Currently available targeted therapies	Selected potential targeted therapies	Refs	
		ADC	SCC				Preclinical evidence	Clinical evidence
Receptor tyrosine kinases								
EGFR	M or C	10 (M)	2-3	L858R, Del19, T790M and Ins20	Erlotinib, gefitinib, and afatinib	AZD9291, CO-1686 and HM61713	126	11
FGFR1	C	N/A	20	N/A	N/A	Dovitinib, ponatinib, AZD4547 and BGJ398	150	22
FGFR2	M or C	3 (M)	3	N/A	N/A	Dovitinib, ponatinib, AZD4547 and BGJ398	151	20
ALK	F	3-5	<1	ALK fusion, L1196M and F1174L	Crizotinib and ceritinib	AP26113, alectinib, ganetespi and onartuzumb	125	18
MET	C	2-4	N/A	Overexpression	Crizotinib	Tivantinib, cabozantinib, INC280 and onartuzumab	152	14
ROS1	F	1-2	N/A	N/A	Crizotinib	PF-06463922	153	17
NTRK1	F	1-2	N/A	N/A	N/A	Crizotinib and lestaurtinib	21	21
RET	F	1	N/A	N/A	N/A	Carbozantinib and vandetanib	154	16
HER2	M or C	2-4 (M)	N/A	HER2-YVMA insertion	N/A	Neratinib, afatinib, lapatinib and trastuzumab	155	19
DDR2	M	N/A	2-3	N/A	N/A	Dasatinib	27	27
PDGFRA	M	6-7	4	N/A	N/A	Sunitinib	156	28
Signalling								
KRAS	M	15-25	1-2	G12D, G12C and G12V	N/A	Selumetinib plus docetaxel combination	157	158
NF1	M	12	10	Null	N/A		159	28
BRAF	M	1-6	4-5	V600E	N/A	Vemurafenib, dabrafenib and trametinib	N/A	160
PIK3CA	M	5	15	p110 α	N/A	BEZ235, BKM120 AND GDC0941	99	161
MEK1	M	1	N/A	N/A	N/A	Selumetinib and trametinib	N/A	162
NOTCH1	M	8	1	Conditional null	N/A	N/A	163	164
Epigenetic factors								
MLL2	M	9	20	N/A	N/A	N/A	165	28
EZH2	M	2	2	N/A	N/A	N/A	166	28
TET2	M	3	2	N/A	N/A	N/A	167	28
DNMT3A	M	4	1	N/A	N/A	N/A	168	28
Transcription factors								
SOX2	C	6	65	Overexpression	N/A	N/A	7	103
MYC	C	25	N/A	Overexpression	N/A	N/A	133	104
Proteolysis								
KEAP1	M	17	12	N/A	N/A	N/A	169	170
Cell cycle								
CDKN2A	M	7	15	Null	N/A	N/A	171	172
Ligand								
NRG1	F	<1	N/A	N/A	N/A	N/A	15	15
Tumor suppressor								
TP53	M	52	79	Conditional null and R172H	N/A	N/A	98	173
LKB1	M	9	2	Conditional null	N/A	N/A	65	174
PTEN	M	2	8	Conditional null	N/A	BEZ235, BKM120 AND GDC0941	175	176



“ADC, adenocarcinoma; ALK, anaplastic lymphoma kinase; CDKN2A, cyclin-dependent kinase inhibitor 2A; DDR2, discoidin domain-containing receptor 2; Del19, EGFR exon 19 deletion; DNMT3A, DNA (cytosine 5-)-methyltransferase 3 α ; EGFR, epidermal growth factor receptor; EZH2, enhancer of zeste homologue 2; FGFR1, fibroblast growth factor receptor 1; GEMM, genetically engineered mouse model; Ins20, EGFR exon 20 insertion; KEAP1, kelch-like ECH-associated protein 1; LKB1, liver kinase B1; MLL2, mixed-lineage leukaemia 2; N/A, not available; NF1, neurofibromin 1; NRG1, neuregulin 1; NTRK1, neurotrophic tyrosine kinase receptor type 1; PDGFRA, platelet-derived growth factor receptor- α ; PIK3CA, PI3K catalytic subunit- α ; SCC, squamous cell carcinoma; SOX2, SRY-box 2; TET2, TET methylcytosine dioxygenase 2”. * Le statut se réfère à des mécanismes par lesquels chaque gène est altéré dans les tumeurs par mutation (M), gain de nombre de copies (C) ou par fusion (F). Adapté de Chen *et al.*, 2014.

I.9. La résistance et l'échappement thérapeutique du cancer bronchique non à petites cellules

La résistance à la thérapie ciblée limite inévitablement l'efficacité des traitements du CBNPC, y compris les iTKs. De ce fait, comprendre les bases biologiques de la résistance aux iTKs est la clé du développement des futures stratégies thérapeutiques. Des études récentes soulignent la nature grandement hétérogène et polyvalente des tumeurs présentant une résistance intrinsèque ou acquise aux traitements. En plus de l'EGFR et d'ALK, plusieurs autres acteurs oncogéniques ont été découverts dans le CBNPC, notamment au sein de l'ADC bronchique représentant le sous-type histologique le plus fréquent et hébergeant des altérations oncogéniques dans plus de 60% des tumeurs (Barlesi *et al.*, 2016; Kris *et al.*, 2014) (Figure 2).

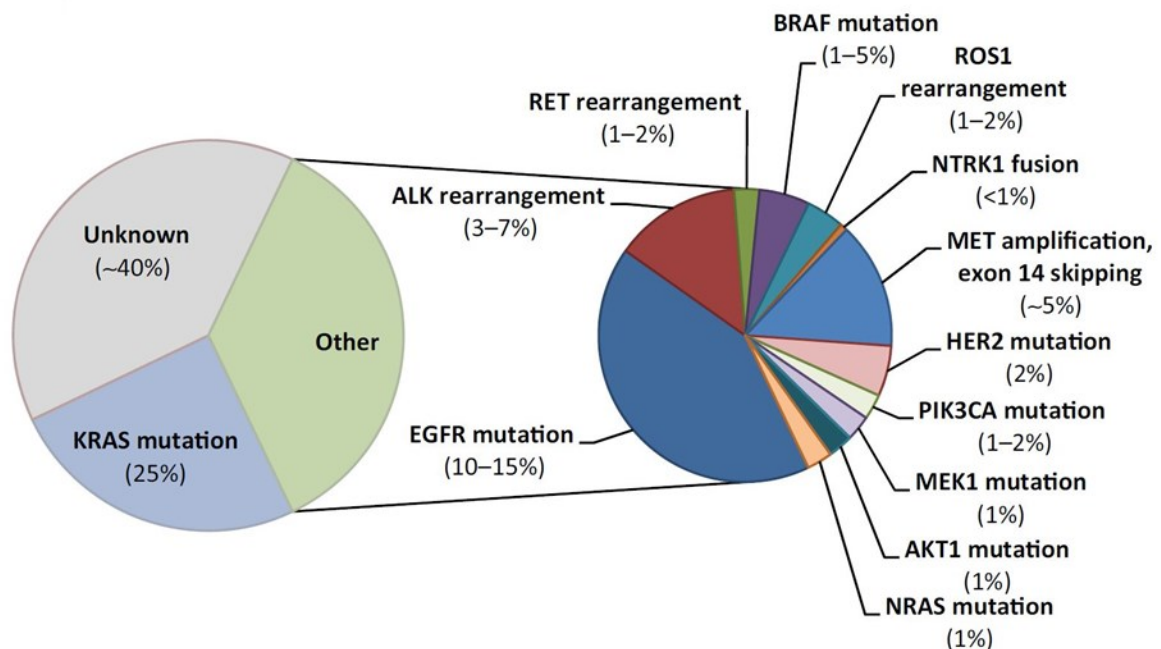


Figure 2 : la répartition des altérations connues des conducteurs oncogéniques dans les ADCs pulmonaires avec des pourcentages estimés pour chaque mutation.

Pour environ 40% des ADCs, Les altérations génétiques sous-jacentes demeurent inconnues, environ 25% des cas portent la mutation KRAS, pour lesquelles les thérapies ciblées ne sont pas encore disponibles. Adapté de Lin and Shaw, 2016.

I.9.1. La résistance intrinsèque / primaire aux inhibiteurs de tyrosine kinase

La résistance primaire ou intrinsèque est généralement définie comme une inefficacité immédiate du traitement. Les mécanismes sous-jacents à la résistance intrinsèque aux iTKs ne sont pas entièrement élucidés, mais ils comprennent des altérations insensibles au traitement dans la kinase cible, tels que des mutations du domaine tyrosine kinase de l'EGFR. Par exemple, des insertions activatrices dans l'exon 20 de son domaine tyrosine kinase confèrent une résistance aux iTKs de première génération (Yasuda *et al.*, 2013). Bien que la mutation ponctuelle T790M soit l'une des mutations les plus étudiées dans le cadre de la résistance acquise, des études ont montré la préexistence des clones exprimant cette mutation en amont de la thérapie ciblée, favorisant la résistance aux iTKs (Su *et al.*, 2012). En revanche, des altérations génétiques en dehors de la kinase cible peuvent également contribuer à la perte de sensibilité aux iTKs, tels que l'amplification de *MET*, ou l'inhibition des membres de la famille des activateurs pro-apoptotiques de BCL-2 chez les patients exprimant un *EGFR* muté avant l'exposition aux iTKs (Karachaliou *et al.*, 2015). En outre, des altérations dans des gènes régulant la transition épithélio-mésenchymateuse ont été décrites parmi les mécanismes de résistance intrinsèque de la tumeur (Byers *et al.*, 2013).

I.9.2. La résistance acquise/secondaire aux inhibiteurs de tyrosine kinase

Au cours des dernières années, des efforts considérables ont conduit à l'élucidation de multiples mécanismes de résistance acquise aux iTKs. Conceptuellement, ces mécanismes peuvent être considérés comme des manifestations de l'évolution des cellules cancéreuses sous la pression sélective des thérapies ciblées. La compréhension de chaque mécanisme est primordiale pour développer des stratégies thérapeutiques qui surmonteraient, voire préviendraient la résistance aux iTKs.

I.9.2.1. Les mutations somatiques

Les mutations somatiques secondaires de la kinase cible permettent une activation constitutive du récepteur malgré la présence de l'inhibiteur. En général, ces altérations entravent la capacité de la kinase à lier la molécule inhibitrice en modifiant la conformation de sa poche catalytique. Dans le CBNPC exprimant un *EGFR* muté, la mutation T790M dans l'exon 20 a été l'une des premières mutations résistantes décrites. Elle est détectée chez 50 à 60% des récidives. La mutation T790M de l'*EGFR* représente la cause dominante de la résistance à l'erlotinib ou au gefitinib (Arcila *et al.*, 2011; Sequist *et al.*, 2011; Yu *et al.*, 2013a). D'autres mutations somatiques ont été décrites dans le CBNPC avec une fréquence plus faible par rapport à celles de l'*EGFR*, notamment la mutation ALK-L1196M qui confère une résistance contre le crizotinib (Choi *et al.*, 2010) et le réarrangement de *NTRK1* (Vaishnavi *et al.*, 2013). Plus récemment, des mutations secondaires (G595R et G667C) de *NTRK1* induisant une résistance à l'entrectinib ont été décrites dans le CCR (Russo *et al.*, 2016), ce qui met en relief l'importance d'avoir des données moléculaires concernant ces deux mutations dans le CBNPC métastatique.



I.9.2.2. L'amplification de la cible

L'augmentation du nombre de copies des récepteurs oncogéniques par amplification est également une cause importante et décrite dans la résistance acquise aux iTKs. Par exemple, l'amplification de l'*EGFR* a été identifiée dans des tumeurs résistantes à l'erlotinib ou le gefitinib (Sequist *et al.*, 2011). Ainsi, les cellules tumorales demeurent dépendantes de la kinase.

I.9.2.3. L'activation des voies de signalisation de contournement

Les cellules tumorales orchestrent un réseau de voies de signalisation pour soutenir leur survie. Lorsqu'une voie dominante est inhibée par un iTK, la dérivation vers des voies de signalisation parallèles peut permettre aux cellules de réactiver des effecteurs critiques en aval de la cible, permettant une survie et une croissance continue de la tumeur. À titre d'exemple, l'amplification de *MET* a été l'un des premiers mécanismes décrits de la résistance contre des inhibiteurs de l'*EGFR* (Yu *et al.*, 2013a). Ceci conduit à la phosphorylation de HER-3 et la réactivation de la voie de signalisation PI3K / AKT en contournant l'*EGFR*. D'autres exemples de trans-activation ont été validés cliniquement sur des échantillons tumoraux y compris l'activation du récepteur 3 du facteur de croissance des fibroblastes (FGFR-3) dans la résistance aux inhibiteurs de l'*EGFR* (Crystal *et al.*, 2014). Les études en cours sur les mécanismes de résistance aux iTKs ont mis en relief la complexité profonde de la biologie tumorale et ont souligné l'importance du développement de nouvelles stratégies thérapeutiques pour lutter contre la résistance et surmonter ainsi l'échappement thérapeutique.

I.9.2.4. Le rôle du trafic des récepteurs à domaine tyrosine kinase dans l'échappement thérapeutique

Le trafic de matériel biologique à travers les membranes est un mécanisme évolutif conservé et indispensable pour l'homéostasie cellulaire. On peut distinguer 2 voies principales de trafic intracellulaire, une voie menant à l'internalisation et au stockage des RTKs dans la cellule et une seconde conduisant à l'intégration des RTKs dans les exosomes en vue de leur transfert vers les cellules cibles. Dans le cancer, l'activité aberrante de la machinerie d'exportation entraîne la modulation du microenvironnement tumoral à travers une communication intercellulaire, mettant notamment en jeu des microvésicules extracellulaires. De nombreuses études ont mis en évidence l'importance des exosomes dans la médiation de cette communication (Tkach and Théry, 2016). Les exosomes sont des microvésicules de diamètre variant de 40 à 100 nm qui sont dérivés de la maturation des endosomes (Colombo *et al.*, 2014). Ils transfèrent leur contenu cellulaire vers les cellules avoisinantes modifiant ainsi le microenvironnement tumoral afin de promouvoir l'immunosuppression induite par la tumeur, l'angiogenèse et la formation de niche pré-métastatique (Simons and Raposo, 2009; Théry *et al.*, 2009; Wilson *et al.*, 2014). En outre, la cellule peut se débarrasser des molécules anti-cancéreuses *via* les exosomes, constituant ainsi une barrière supplémentaire contre l'action correcte de ces agents (Azmi *et al.*, 2013). Dans l'avenir, la stratégie idéale de prise en charge thérapeutique nécessite donc de prendre



en compte la fonction des exosomes dans l'échappement thérapeutique. Leur rôle dépend de leur contenu en acides nucléiques, lipides ou protéines. Cependant, tous les RTKs ne sont pas systématiquement destinés aux exosomes. En effet, l'internalisation des RTKs et leur incorporation dans les endosomes pourrait permettre de désensibiliser les cellules tumorales aux traitements par des iTKs et diminuerait ainsi l'efficacité thérapeutique de ces derniers. Par exemple, une mutation qui entraîne une signalisation aberrante d'un RTK à partir des endosomes peut échapper à l'inactivation du récepteur par des inhibiteurs. De même, dans certains cas, les cellules tumorales expriment des niveaux élevés de formes clivées intracellulaires ou même nucléaires d'un RTK particulier, engendrant une signalisation de résistance sous l'effet du stress induit par les iTKs. Ceci conduit à des changements de sensibilité aux thérapies ciblées disponibles (Scaltriti *et al.*, 2007; Tomas *et al.*, 2014).

Par conséquent, la signalisation des RTKs n'est pas limitée à la membrane plasmique, mais elle peut se poursuivre de façon continue au niveau des plateformes de signalisation intracellulaires pour activer des voies de signalisation distinctes. Ce mécanisme est détaillé dans le chapitre II (voir **II.4** pour consulter des explications sur la signalisation à partir des endosomes).



Chapitre II. Les récepteurs à domaine tyrosine kinase

Au cours du développement, les mécanismes régissant la prolifération, l'organisation et le mouvement cellulaire sont parfaitement synchronisés de manière à assurer le maintien de l'homéostasie cellulaire. Les cellules et les tissus exercent un contrôle spatial étroit des RTKs exprimés, permettant la morphogenèse et la fonction des tissus, tout en empêchant les divisions et les migrations cellulaires aberrantes susceptible d'aboutir à la formation de tumeurs. L'analyse du rôle clé de la régulation du trafic intracellulaire des RTKs au cours du développement permet de constater qu'un dysfonctionnement au niveau de la machinerie de transport de ces récepteurs contribue potentiellement au développement du cancer, ce qui peut même affecter la sensibilité et la résistance de la tumeur aux inhibiteurs pharmacologiques.

En 1962, le Dr Stanley Cohen a isolé et caractérisé une protéine provenant de la glande salivaire et induisant l'ouverture des yeux et l'éruption des dents chez les souris nouveau-nées (Cohen, 1962). Des expérimentations ultérieures ont démontré qu'elle pourrait stimuler la prolifération des cellules épithéliales, elle a donc été nommée le facteur de croissance épidermique (EGF) (Cohen, 1965). Dix ans plus tard, le Dr Graham Carpenter a identifié la présence du récepteur de liaison spécifique à l'EGF sur les cellules cibles, l'EGFR (Carpenter *et al.*, 1975, 1978). Dans les années 1980, l'EGFR a été cloné, séquencé et ensuite reconnu comme un RTK (Ullrich *et al.*, 1984). L'identification de l'EGFR en tant que RTK a contribué à des études pionnières permettant de faire évoluer notre compréhension de l'activation des RTKs (Riedel *et al.*, 1986; Schlessinger, 1988) et des voies de signalisation en aval régulées par l'EGFR telles que les voies PI3K / AKT, Ras / Raf / Mek / ERK et PLC γ 1 / PKC. Depuis la découverte de ce prototype des RTKs, de nombreux membres de cette famille de récepteurs de surface cellulaire sont apparus comme régulateurs clés des processus cellulaires critiques, tels que la prolifération, la différenciation, la survie cellulaire, le métabolisme, la migration cellulaire et le contrôle du cycle cellulaire (Blume-Jensen and Hunter, 2001; Ullrich and Schlessinger, 1990). L'Homme possède 58 RTKs connus, appartenant à 20 sous-familles (Figure 3).

Tous les RTKs possèdent une architecture moléculaire similaire, avec des domaines de liaison de ligands dans leur partie extracellulaire, une seule hélice transmembranaire et une partie cytoplasmique contenant le domaine régulateur juxtamembranaire, le domaine tyrosine kinase et la queue carboxy-terminale (Lemmon and Schlessinger, 2010). La topologie globale des RTKs, leur mécanisme d'activation et les composants clés des voies de signalisation intracellulaire qu'ils déclenchent sont fortement conservés dans l'évolution. En outre, de nombreuses maladies résultent de changements génétiques ou d'anomalies qui altèrent l'activité, l'abondance, la distribution cellulaire ou la régulation des RTKs. Les mutations dans les RTKs et l'activation aberrante de leurs voies de signalisation intracellulaire sont directement associées au cancer, au diabète, à l'inflammation, aux troubles osseux sévères, à l'athérosclérose et à l'angiogenèse (Blume-Jensen and Hunter, 2001; Lemmon and Schlessinger, 2010). Ces liens étroit avec divers mécanismes pathologiques ont favorisé le développement d'études visant à analyser les mécanismes d'activation de ces récepteurs et à plus long terme ont abouti au développement d'une nouvelle génération de médicaments qui bloquent ou atténuent l'activité des RTKs.



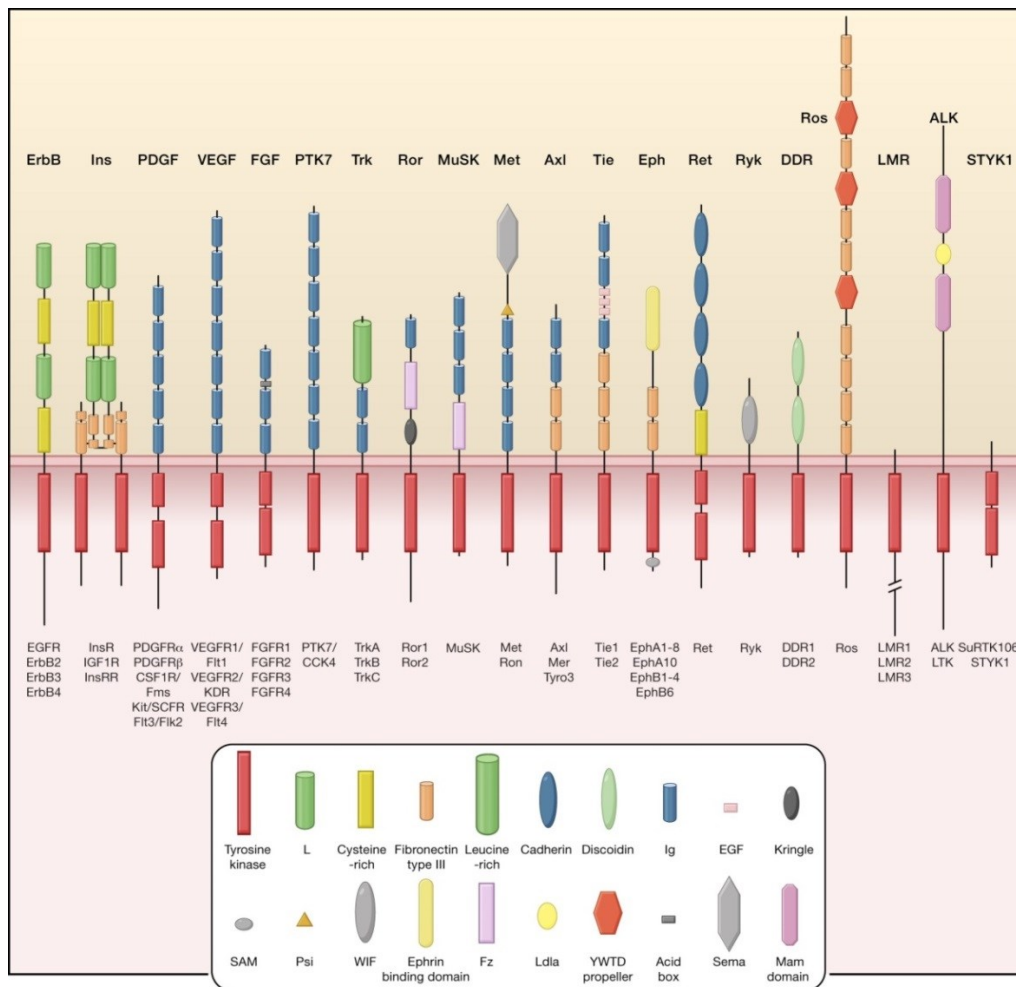


Figure 3 : les différentes sous-familles des RTKs.

Les RTKs contiennent 20 sous-familles, schématiquement présentées avec leurs membres listés sous chaque récepteur. Les domaines structuraux dans la partie extracellulaire sont marqués selon la clé de la figure. Les domaines intracellulaires sont représentés sous forme de rectangles rouges. D'après Lemmon and Schlessinger, 2010.

II.1. Les mécanismes d'activation des récepteurs à domaine tyrosine kinase

En général, la liaison aux facteurs de croissance actifs induit la dimérisation et l'activation du RTK (Ullrich and Schlessinger, 1990). Cependant, il est important de noter qu'un sous-ensemble de RTKs forme des oligomères (homo- ou hétéro-dimères) même en l'absence de ligand. Par exemple, le récepteur de l'insuline et le récepteur de l'IGF-1 sont exprimés sur la surface de la cellule en tant que dimères liés par un pont disulfure de type $\alpha\beta 2$ en dehors de la stimulation par leurs ligands (Ward *et al.*, 2007). La liaison de l'insuline ou de l'IGF-1 induit des changements structuraux dans ce dimère stimulant l'activité tyrosine kinase et la signalisation cellulaire. Certaines études ont suggéré que le facteur de croissance épidermique (EGF) se lie et active des oligomères préexistants de son récepteur (Clayton *et al.*, 2005; Gadella and Jovin, 1995), mais la nature et la taille précises de ces oligomères n'ont pas été décrites. En outre, il est prouvé que l'activation de certains RTKs,



tels que Tie-2 (un récepteur de l'angiopoïétine) et des récepteurs Eph, peut nécessiter la formation de plus grands oligomères (Barton *et al.*, 2006; Smith *et al.*, 2004). L'activation du récepteur nécessite que le ligand lié stabilise une conformation spécifique entre des récepteurs dimériques ou oligomériques actifs. Un récepteur activé phosphoryle ensuite une ou plusieurs tyrosines dans le domaine cytoplasmique d'un RTK voisin et le récepteur phosphorylé sert alors de site d'assemblage et d'activation de protéines de signalisation intracellulaire (Ullrich and Schlessinger, 1990). D'une manière originale, une étude récente a démontré l'implication de la région transmembranaire dans le rapprochement des régions juxtamembranaires intracellulaires induisant un changement conformationnel entraînant l'activation de l'EGFR. En effet, les données fonctionnelles ont prouvé que l'activation du récepteur nécessite une interaction N-terminale entre les hélices transmembranaires, favorisant une interaction antiparallèle entre les segments juxtamembranaires et la levée de l'inhibition exercée par la membrane plasmique (Endres *et al.*, 2013) (Figure 4). Cependant, sans EGF et uniquement à haute densité membranaire, l'EGFR intact peut échapper à cette inhibition (Arkhipov *et al.*, 2013; Endres *et al.*, 2013).

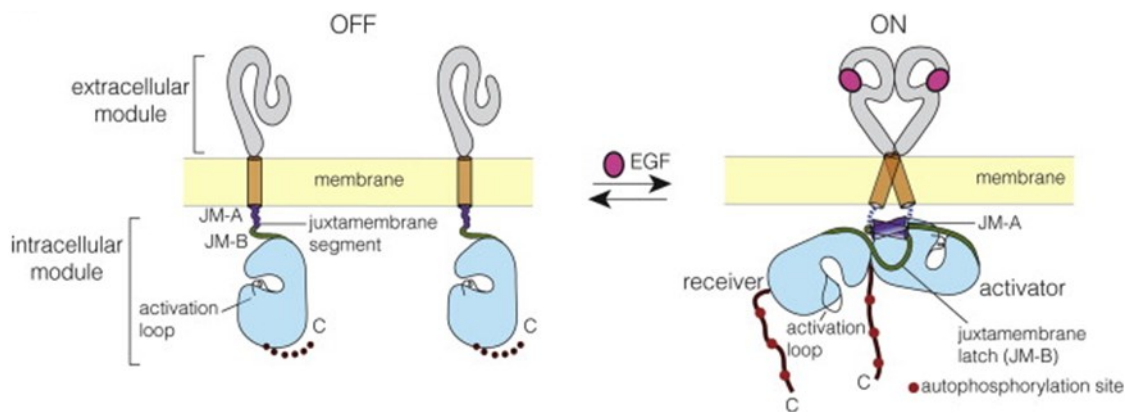


Figure 4 : représentation schématique de l'architecture d'activation de l'EGFR.

Adapté d'Endres *et al.*, 2013.

II.2. Les voies de signalisation canoniques de l'EGFR

L'EGFR, HER-1 chez l'humain, est également appelé ERBB-1 suite à la mise en évidence d'une forte homologie à la protéine rétrovirale v-ERBB du virus de l'érythroblastose aviaire qui induit la transformation oncogénique des cellules du poulet. Ses ligands connus comprennent l'EGF, le facteur de croissance transformant (TGF- α), l'amphiréguline, l'épigen (EPGN), la betacelluline (BTC), l'épiréguline (EREG) et l'EGF se liant à l'héparine (HB-EGF) (Yarden and Sliwkowski, 2001). L'EGF, l'amphiréguline et le TGF- α sont les 3 ligands spécifiques de l'EGFR. La liaison d'un ligand induit l'activation du récepteur engendrant ainsi une cascade de signalisation intracellulaire, permettant à la cellule d'avoir une réponse appropriée vis-à-vis des signaux extracellulaires. L'activation du récepteur conduit à la phosphorylation des résidus de tyrosine clés dans la partie COOH-terminal de l'EGFR et par conséquent, fournit des sites d'ancrage spécifiques pour des protéines adaptatrices cytoplasmiques contenant des domaines d'homologie de type 2 à la kinase Src (SH2) et de liaison à la phosphotyrosine (Hynes and Lane, 2005). Ces protéines se lient à des résidus

spécifiques de phosphotyrosine et initient la transduction du signal par l'intermédiaire de plusieurs voies (Figure 5).

II.2.1. La voie Ras / Raf / MAPK

C'est une voie d'une importance cruciale régulant la prolifération et la survie cellulaires. Suite à la phosphorylation de l'EGFR, le complexe formé par les protéines adaptatrices Grb-2 et Sos (son of sevenless) se lie directement, ou *via* la protéine adaptatrice Shc à des sites d'amarrage spécifiques sur le récepteur (Batzer *et al.*, 1994; Lowenstein *et al.*, 1992). Cette interaction induit à une modification conformationnelle de Sos, qui devient alors capable de recruter Ras-GDP et de déclencher un échange du GDP en GTP, ce qui conduit à l'activation de Ras. L'une des voies de survie engendrée par Ras-GTP passe à travers l'activation de Raf-1 qui, par étapes intermédiaires, phosphoryle ERK1/2 (« extracellular signal regulated kinase 1 et 2 ») qui sont des protéines kinases activées par les mitogènes appartenant à la famille des MAPKs (Hallberg *et al.*, 1994; Liebmann, 2001). Les MAPKs activés sont transloqués dans le noyau où ils phosphorylent des facteurs de transcription spécifiques impliqués dans la prolifération cellulaire (Gaestel, 2006; Hill and Treisman, 1995).

II.2.2. La voie phosphatidylinositol 3-kinase / AKT

Cette voie est impliquée dans la croissance cellulaire, la résistance à l'apoptose, l'invasion et la migration (Shaw and Cantley, 2006; Vivanco and Sawyers, 2002). La phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) est une enzyme dimérique composée d'une sous-unité régulatrice p85, responsable de l'ancrage aux sites d'amarrage spécifiques de l'EGFR et d'une sous-unité catalytique p110 qui génère le phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate (PIP3). Ce dernier recrute la « 3-phosphoinositide-dependent protein kinase 1 » (PDK-1) et Akt. PDK-1 est responsable de la phosphorylation et de l'activation de la protéine serine / thréonine kinase AKT (Vivanco and Sawyers, 2002). Le mécanisme d'activation de PI3K dépend de l'hétérodimérisation de l'EGFR avec HER-3. En effet, l'EGFR ne possède pas des sites d'ancrage directs pour la sous-unité p85, alors que ces sites sont abondants sur HER-3 (Carpenter *et al.*, 1993; Yarden and Sliwkowski, 2001). Néanmoins, la sous-unité p85 peut se lier à l'EGFR par l'intermédiaire de la protéine d'échafaudage Gab-1 (Mattoon *et al.*, 2004).

II.2.3. La voie phospholipase C γ

La phospholipase C γ interagit directement avec l'EGFR activé et hydrolyse le phosphatidylinositol-4,5-diphosphate (PIP2) pour donner l'inositol-1,4,5-triphosphate (IP3), important pour la libération de calcium intracellulaire et le 1,2-diacylglycérol (DAG), un cofacteur dans l'activation de la protéine kinase C (PKC) (Ji *et al.*, 1999; Patterson *et al.*,



2005). L'activation de PKC peut, à son tour, entraîner une activation de la voie des MAPKs et c-Jun (McClellan *et al.*, 1999; Schönwasser *et al.*, 1998).

II.2.4. La voie des transducteurs de signal et activateurs de transcription

Les transducteurs de signal et activateurs de transcription (STAT) interagissent avec les résidus de phosphotyrosine *via* leurs domaines SH2 lors de leur dimérisation, ils transloquent vers le noyau et stimulent l'expression de gènes cibles spécifiques (Haura *et al.*, 2005). L'activation constitutive des protéines STAT et en particulier STAT-3 a été trouvée dans de nombreux cancers primaires et lignées cellulaires tumorales (Bromberg, 2002). L'activité intensifiée des RTKs membranaires, tels que l'EGFR, favorise une activation constitutive de STAT-3, ce qui peut contribuer à l'oncogenèse ou à la progression tumorale (Bromberg, 2002).

II.2.5. La voie de la kinase Src

La kinase Src est l'archétype et fait partie d'une famille de protéines non-réceptrices à domaine tyrosine kinase codées par 9 gènes différents et dont les membres jouent un rôle essentiel dans la régulation de la prolifération cellulaire, de la migration, de l'adhésion, de l'angiogenèse et de la fonction immunitaire (Summy and Gallick, 2006; Yeatman, 2004). Src est une kinase cytosolique qui active une série de substrats, y compris les protéines kinases d'adhésion focale (FAK), PI3K et STAT (Summy and Gallick, 2006; Yeatman, 2004). Bien que Src puisse fonctionner de manière indépendante, elle coopère également avec d'autres transducteurs de signal suite à l'activation des RTKs. L'interaction entre l'EGFR et Src est complexe. D'une part, Src sert de transducteur de signal permettant de maintenir l'activation de l'EGFR. D'autre part, il est soupçonné d'être impliqué dans la résistance aux inhibiteurs de l'EGFR *via* une activation ou une association indépendante avec d'autres récepteurs (Jorissen *et al.*, 2003; Leu and Maa, 2003).

II.3. Les voies de signalisation non-canoniques de l'EGFR

Plusieurs travaux ont souligné la fonction non-canonique de l'EGFR qui agit comme un facteur de transcription et un régulateur de la chromatine dans le noyau, régulant ainsi l'expression des gènes, la réplication de l'ADN ou encore la réparation des dommages à l'ADN (Tomas *et al.*, 2014). En outre, l'EGFR peut même exercer son impact à l'extérieur de la cellule par la sécrétion de vésicules exosomales. Le concept émergent des rôles non-canoniques de la famille EGFR révèle un schéma étonnant et élaboré sur les fonctions moléculaires des RTKs membranaires, offrant de nouvelles idées sur la biologie de ces récepteurs ainsi que le développement de stratégies thérapeutiques complètes.



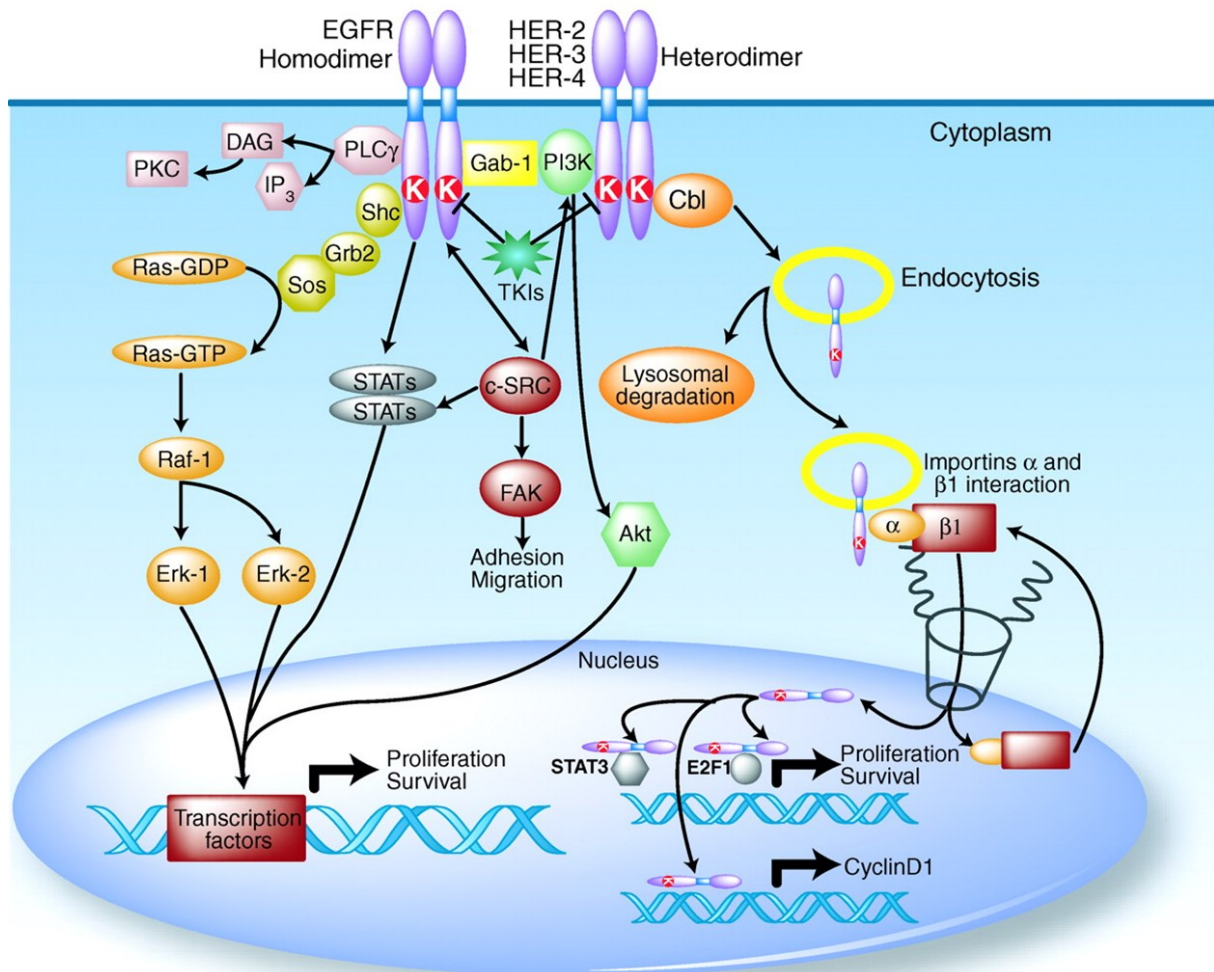


Figure 5 : les voies de signalisation de l'EGFR.

L'activation de l'EGFR conduit à l'homodimérisation / hétérodimérisation, à la phosphorylation de résidus spécifiques de tyrosine et au recrutement de plusieurs protéines à la partie intracellulaire des récepteurs. La Phospholipase C γ (rose) et les facteurs de transcription STAT (bleu) se lient directement au récepteur, alors que la voie de Ras / Raf / MAPK (orange) et PI3K (verte) nécessite plusieurs protéines adaptatrices spécifiques (jaune). En même temps, les récepteurs activés subissent une endocytose et suivent deux voies possibles: la dégradation lysosomale ou la translocation nucléaire médiée par l'importation du récepteur. Une fois dans le noyau, l'EGFR peut soit se comporter comme un cofacteur se liant à d'autres facteurs de transcription pour stimuler la transcription des gènes cibles (seul le gène codant pour la cycline D1 est présenté sur la figure). Les deux voies entraînent une activation nucléaire des gènes liés à la prolifération cellulaire, à la survie, à l'invasion et à la métastase. Les iTKs sont en concurrence sur le site de liaison de l'ATP dans le domaine kinase du récepteur. DAG, 1,2-diacylglycérol; IP₃, inositol-1,3,5-triphosphate; PLC γ , phospholipase C γ ; ERK-1, kinase-1 régulée par le signal extracellulaire; ERK-2, kinase-2 régulée par le signal extracellulaire; FAK, kinase d'adhésion focale; PKC, protéine kinase C. Adapté de Scaltriti and Baselga, 2006.



II.3.1. La signalisation nucléaire

Les fonctions de l'EGFR nucléaire ont été largement étudiées et sont principalement liées à la régulation transcriptionnelle, la transduction de la signalisation kinase et l'interaction protéine-protéine (Figure 6). Ces différentes fonctions peuvent affecter une variété de fonctions physiologiques et pathologiques telles que la prolifération cellulaire, la progression tumorale, la réplication / synthèse de l'ADN, la réparation des dommages à l'ADN et la résistance thérapeutique.

II.3.1.1. La régulation transcriptionnelle

L'EGFR nucléaire possède une activité de transactivation intrinsèque au niveau de sa queue carboxy-terminale qui régule l'activité des promoteurs de gènes cibles codant pour la cycline D1 (Lin *et al.*, 2001), iNOS (Lo *et al.*, 2005), Aurora-A (Hung *et al.*, 2008), la cyclooxygénase-2 (cox-2) (Lo *et al.*, 2010), c-Myc (Jaganathan *et al.*, 2011), B-Myb (Hanada *et al.*, 2006), la thymidylate synthase (Kim *et al.*, 2009), les protéines de résistance du cancer du sein (BCRP) (Huang *et al.*, 2011) et STAT-1 (Han *et al.*, 2013). Ces gènes cibles sont liés à la tumorigenèse, l'instabilité des chromosomes, la résistance thérapeutique ou l'inflammation.

En 2001, l'EGFR nucléaire activé par l'EGF a d'abord été décrit comme un co-activateur transcriptionnel qui se lie indirectement à une séquence de réponse riche en AT (ATRS) dans le promoteur du gène codant pour la cycline D1 pour stimuler son expression (Lin *et al.*, 2001). En 2010, l'ARN hélicase A (RHA) a été identifié comme un partenaire de liaison à l'ADN de l'EGFR (Huo *et al.*, 2010) en fonctionnant comme médiateur par sa liaison à l'ATRS. En outre, la mucine MUC-1 a également été associée à l'EGFR nucléaire pour stimuler l'expression du gène de la cycline D1 (Bitler *et al.*, 2010). D'autre part, il a été prouvé que la protéine de leucémie promédélocytaire suppresseur de tumeur (PMLIV) interagit avec l'EGFR nucléaire et réprime l'activité transcriptionnelle du promoteur du gène de la cycline D1 en inhibant l'hyperacétylation d'histones dans son promoteur (Kuo *et al.*, 2013). En plus de la cycline D1, l'EGFR nucléaire activé induit l'expression d'autres gènes cibles, tels les gènes codant pour iNOS, Aurora-A, c-Myc et B-Myb à travers son association avec des facteurs de transcription, y compris les protéines STAT et E2F1 (Hung *et al.*, 2008). Étant donné que l'EGFR ne contient pas de domaine de liaison à l'ADN, son association avec les facteurs de transcription semble être essentielle pour induire l'expression de chaque gène cible. Cependant, il n'est pas encore clair si des partenaires liés à l'ADN sont impliqués dans la transcription des gènes codant pour la thymidylate synthase et BCRP (Kim *et al.*, 2009). Par conséquent, d'autres facteurs de transcription restent à découvrir.

II.3.1.2. L'interaction EGFR-protéines nucléaires

Les dommages à l'ADN, telles que ceux induits par la radiothérapie ou le cisplatine, déclenchent la translocation nucléaire de l'EGFR et son interaction subséquente avec la



protéine kinase dépendante de l'ADN (DNAPK), une enzyme clé et requise pour la jonction d'extrémités non homologues d'ADN suite à une cassure double-brin (Dittmann *et al.*, 2005; Hsu *et al.*, 2009; Liccardi *et al.*, 2011). En effet, cette interaction induit une surexpression de *c-Myc* conduisant ainsi à une survie cellulaire et une radiorésistance. Un mécanisme a été proposé dans lequel l'EGFR nucléaire inactive une protéine récemment identifiée comme partenaire nucléaire de l'EGFR, la polynucléotide phosphorylase (PNPase), à travers la phosphorylation de PNPase par DNAPK (PNPase possède une activité exoribonucléase responsable de la dégradation l'ARNm de *c-Myc*) (Yu *et al.*, 2012). En outre, l'irradiation induit la phosphorylation de l'EGFR sur la thréonine 654, entraînant son transfert nucléaire et conférant une résistance à la radiothérapie (Dittmann *et al.*, 2010).

Dans le noyau, l'EGFR exerce également sa fonction kinase comme l'illustre la phosphorylation médiée par l'EGFR de l'antigène nucléaire cellulaire prolifératif lié à la chromatine (PCNA), entraînant une augmentation de sa stabilité et un maintien de ses fonctions, telles que la réplication la réparation des dommages à l'ADN (Wang *et al.*, 2006a). En 2013, l'EGFR vIII (variant tronqué de l'EGFR constitutivement activé dont le domaine extracellulaire N-terminal de liaison au ligand est manquant) (Lammering *et al.*, 2003) a été décrit comme un substrat de la phosphorylation catalysée par l'EGFR. Après translocation dans le noyau, l'EGFR vIII phosphorylé serait capable de former des complexes avec STAT-3 induisant ainsi la phosphorylation de ce dernier, ce qui conduit à une progression maligne du glioblastome (GBM) (Fan *et al.*, 2013). Différents types de modifications post-traductionnelles des histones sont connus pour jouer des rôles fondamentaux dans la dynamique et les fonctions de la chromatine (Bannister and Kouzarides, 2011). Cependant, les *stimuli* qui régulent en amont ces fonctions importantes ne sont pas entièrement élucidés. D'une manière intéressante, l'EGFR nucléaire phosphoryle l'histone H4 au résidu tyrosine-72 qui recrute des histone-méthyltransférases pour augmenter son taux de méthylation sur la Lysine K20. Cette étape constitue un événement clé dans la régulation de la synthèse de l'ADN et dans la réparation des cassures double-brins (Chou *et al.*, 2014).

Un autre mécanisme mettant en jeu l'EGFR nucléaire dans la régulation de la réponse aux dommages à l'ADN a été mis à jour. L'ATM est une protéine serine / thréonine kinase qui module la réponse aux dommages à l'ADN, en particulier les cassures double-brins, en contrôlant l'arrêt du cycle cellulaire et l'apoptose (Shiloh and Ziv, 2013). Cependant, les *stimuli* régulant en amont l'activation de l'ATM restent mal connus. Récemment, un mécanisme novateur sous-jacent à la régulation de l'ATM permettant la résistance à la radiothérapie a été décrit. L'interaction de l'EGFR avec l'ATM au niveau du site de cassures double-brins suite à l'irradiation permet la phosphorylation d'ATM sur la tyrosine 370 (Y370) (Lee *et al.*, 2015). L'EGFR peut également augmenter la phosphorylation de la protéine de maintenance du minichromosome 7 (MCM-7) via l'activation de la protéine tyrosine kinase non réceptrice Lyn (Huang *et al.*, 2013). Ainsi, la signalisation de l'EGFR est fonctionnellement impliquée dans la régulation de l'initiation et l'élongation de la réplication de l'ADN, ce qui constitue une étape importante pour l'initiation de la prolifération cellulaire dans les cancers humains. Ces résultats ouvrent une nouvelle voie vers l'étude de la relation entre les RTKs et la structure chromatinienne.



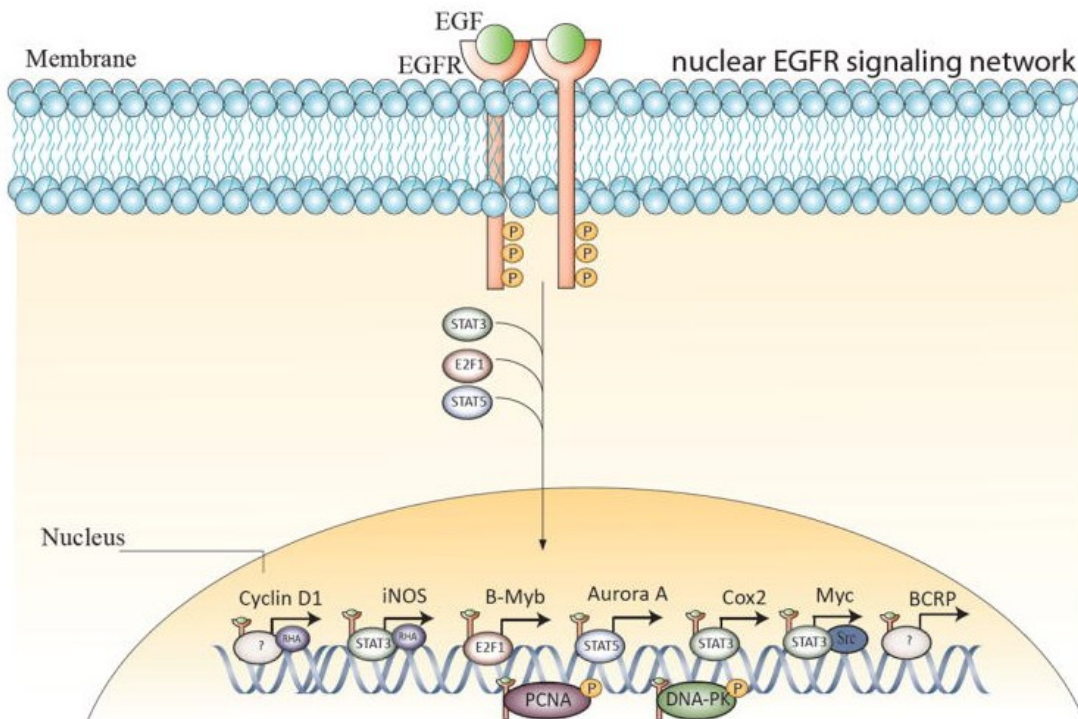


Figure 6 : le réseau de signalisation nucléaire de l'EGFR.

L'EGFR a systématiquement été détecté dans les noyaux des cellules cancéreuses des échantillons de tumeurs primaires et des tissus hautement prolifératifs. L'EGFR se lie à plusieurs facteurs de transcription pour réguler la transcription des gènes codant pour de la cycline D1, iNOS, B-Myb, Aurora Kinase A, COX-2, c-Myc et BCRP. De plus, il a été prouvé que l'EGFR phosphoryle et active à la fois PCNA et DNAPK dans le noyau. D'après Brand *et al.*, 2011.

II.3.2. La signalisation exosomale

L'EGFR sécrétée dans les exosomes peut exister sous sa forme totale ou la partie carboxy-terminale attachée à la membrane. La sécrétion des deux formes est renforcée suite à la stimulation des kératinocytes humains par l'EGF (Sanderson *et al.*, 2008). Ces formes de l'EGFR sont détectées dans les cellules cancéreuses du pancréas alors que le domaine extracellulaire de l'EGFR existe sous une forme soluble dans le surnageant du milieu de culture (Adamczyk *et al.*, 2011; Perez-Torres *et al.*, 2008; Sanderson *et al.*, 2008).

II.3.2.1. La communication intercellulaire

Les exosomes enrichis en EGFR sont sécrétés dans le microenvironnement tumoral et peuvent à leur tour être absorbés par les cellules endothéliales, ce qui conduit à une angiogenèse tumorale (Al-Nedawi *et al.*, 2009). Le transfert intercellulaire de l'EGFR médié



par les exosomes tumoraux déclenche l'angiogenèse par activation des voies des MAPKs et d'AKT, accompagné de la stimulation de l'expression du VEGF et de sa signalisation autocrine dans les cellules endothéliales (Al-Nedawi *et al.*, 2009). D'une manière très intéressante, Wilson et ses collaborateurs ont démontré que dans les cellules du CBNPC humain A549, le mécanisme de libération d'exosomes est étroitement lié à une protéine de tri, la sortiline (également appelé récepteur 3 de la neurotensine [NTSR-3]) (Wilson *et al.*, 2014). En effet, cette sortiline occupe un rôle central en favorisant la formation d'un complexe formé par l'assemblage de la sortiline avec deux RTKs, le récepteur des neurotrophines TrkB (également connu sous le nom de NTRK-2) et l'EGFR. Ce complexe, nommé TES, exerce un contrôle sur les cellules endothéliales en activant l'angiogenèse suite au transfert d'exosomes.

II.3.2.2. L'EGFR exosomal en tant que biomarqueur de diagnostic

L'EGFR exosomal a été étudié dans différentes tumeurs malignes telles que le pancréas (Adamczyk *et al.*, 2011; Arscott and Camphausen, 2011), le poumon (Park *et al.*, 2013; Wilson *et al.*, 2014; Yamashita *et al.*, 2013), la vessie (Welton *et al.*, 2010) et le CCR (Choi *et al.*, 2011; Demory Beckler *et al.*, 2013). En effet, l'EGFR a été retrouvé dans cinq lignées cellulaires du cancer du pancréas humain grâce à l'analyse du sécrétome couplée à la spectrométrie de masse (Adamczyk *et al.*, 2011). Les patients atteints de cancer du poumon présentent des taux supérieurs d'EGFR exosomal dans le plasma comparés aux sujets sains (Yamashita *et al.*, 2013). En plus de la circulation sanguine, les exosomes dérivés des effusions pleurales du cancer du poumon humain sont très enrichis en EGFR (Park *et al.*, 2013). En outre, des ligands de l'EGFR, tels que l'amphiréguline, le TGF- α et le HB-EGF sont également présents dans les exosomes tumoraux et sont corrélés à une invasion accrue des cellules tumorales (Higginbotham *et al.*, 2011). Ces résultats mettent l'accent sur l'intérêt de prendre en considération l'EGFR exosomal en tant que biomarqueur de diagnostic en oncologie. L'endocytose de l'EGFR et la maturation endosomale subséquente est à l'origine de la biogenèse des exosomes. Ce processus est soumis à une régulation spatiale étroite médiée par des facteurs contrôlant à la fois l'internalisation et l'adressage de l'EGFR dans différents compartiments intracellulaires. Une dérégulation du trafic intracellulaire de l'EGFR peut affecter son relargage dans le microenvironnement tumoral et influencer la durée et l'ampleur de sa signalisation.

II.4. L'influence de l'épissage alternatif de l'EGFR sur sa signalisation

L'EGFR contient 30 exons (Figure 7) et l'épissage alternatif du message génère 8 variants (Abou-Fayçal *et al.*, 2017). Ces derniers codent pour des isoformes solubles de l'EGFR (sEGFRv2, sEGFRv3 et sEGFRv4) ou des isoformes non-solubles (mLEEK, EGFRvA, EGFRvIII, EGFRvIVa, et EGFRvIVb). En plus de l'épissage alternatif, le clivage enzymatique est un mécanisme décrit dans la biogenèse des isoformes solubles de l'EGFR (Perez-Torres *et al.*, 2008; Sanderson *et al.*, 2008). Les isoformes sEGFRs ont été détectées dans de nombreux tissus sains notamment la sEGFRv2 qui est fortement exprimée dans le placenta, ce qui suggère un rôle de cette isoforme dans ce tissu (Armant *et al.*, 2015; Ileikis



et al., 1995). Dans plusieurs cancers, tels que le cancer de l'ovaire, du sein et le CBNPC, les isoformes solubles de l'EGFR sont exprimées à l'intérieur de la tumeur ainsi que dans le sérum des patients (Abou-Fayçal *et al.*, 2017; Lemos-González *et al.*, 2007; Maramotti *et al.*, 2016). Etant donné qu'elles ne contiennent que le domaine extracellulaire, l'expression des isoformes solubles ralentit la croissance et la progression tumorale des cellules de méningiome (Guillaudeau *et al.*, 2012). Dans le CBNPC et les cancers des voies aéro-digestives supérieures, l'expression des isoformes solubles est inhibée par rapport à des sujets sains, ce qui suggère qu'elles représentent potentiellement un biomarqueur dans la détection précoce de ces tumeurs (Lemos-González *et al.*, 2007). Contrairement aux variants sEGFRs, l'EGFRvIII représente le variant le plus commun de l'EGFR auquel manquent les exons 2-7 du domaine extracellulaire. Par conséquent, l'EGFRvIII ne peut pas lier son ligand (Nagane *et al.*, 1996). Néanmoins, ce récepteur est constitutivement phosphorylé et induit de multiples voies de signalisation à travers une dimérisation basale lui conférant un fort potentiel oncogénique (Huang *et al.*, 2009; Nagane *et al.*, 1996). L'EGFRvIII est souvent co-exprimé avec la forme sauvage notamment dans les tumeurs avec une amplification de l'*EGFR* telles que le GBM, le cancer du sein et le cancer bronchique (Abou-Fayçal *et al.*, 2017; Ekstrand *et al.*, 1991; Moscatello *et al.*, 1995). Dans ces modèles, l'expression de l'EGFRvIII est associée à une agressivité tumorale accrue et a un mauvais pronostic. Les variants EGFRvIV a et b présentent une délétion immédiatement en aval du domaine tyrosine kinase, ce qui leur confère une stabilité supérieure, ainsi qu'une dimérisation basale accrue avec l'activation des voies de signalisation distinctes (Abou-Fayçal *et al.*, 2017; Ekstrand *et al.*, 1992). Ces variants n'ont été détectés que dans le GBM et la littérature ne présente pas de données concernant leur potentiel oncogénique dans d'autres modèles (Abou-Fayçal *et al.*, 2017; Pines *et al.*, 2010). L'EGFRvA est caractérisé par une substitution de l'exon 28 par une séquence riche en sérine/thréonine dans la queue c-terminale (Zhou *et al.*, 2013). Ce variant est également détecté dans le GBM et code pour un récepteur plus stable suite à une diminution de son interaction avec la ligase Cbl (Song *et al.*, 2016). L'EGFRvA stimule la migration et l'invasion des cellules cancéreuses via l'activation de STAT3 (Zhou *et al.*, 2013). Récemment, un nouveau transcrit d'épissage alternatif de l'EGFR a été décrit, le variant mLEEK (Piccione *et al.*, 2012). L'isoforme mLEEK perd le domaine extracellulaire, transmembranaire et le site de liaison à l'ATP dans le domaine tyrosine kinase. Elle est exprimée dans de nombreux tissus sains et surexprimée dans plusieurs cancers tels que le cancer de l'ovaire et du poumon. D'une manière intéressante, l'isoforme mLEEK est localisée dans le noyau où elle régule l'expression des gènes impliqués dans la réponse aux facteurs de stress cellulaire (Piccione *et al.*, 2012).



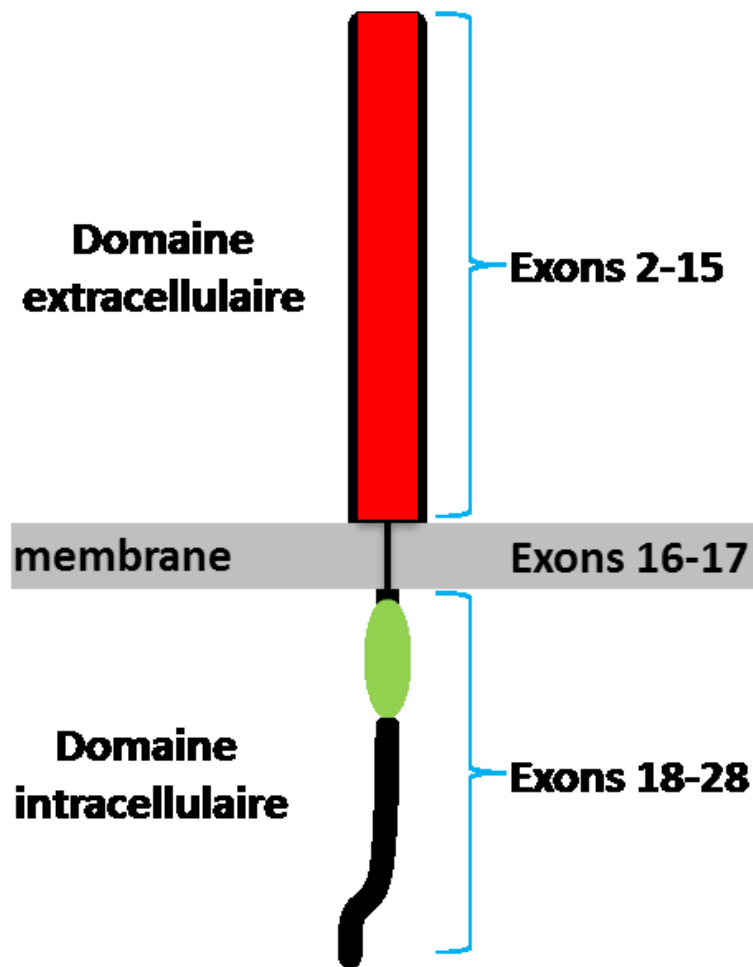


Figure 7 : représentation schématique de la structure de l'EGFR. Le domaine tyrosine kinase est en vert.

Adapté de (Abou-Fayçal *et al.*, 2017).

II.5. La régulation spatiale de l'EGFR

L'EGFR activé engendre une signalisation principalement à partir de la membrane plasmique (Brankatschk *et al.*, 2012; Sousa *et al.*, 2012). L'endocytose du récepteur déclenche le processus d'atténuation du signal. Cependant, l'internalisation de l'EGFR activé peut engendrer des voies de signalisation spécifiques à partir des compartiments intracellulaires. De ce fait, le trafic endocyttaire de l'EGFR joue un double-rôle dans le rétrocontrôle de la signalisation de ce récepteur (Vieira *et al.*, 1996).

II.5.1. L'endocytose dépendante de la clathrine

La clathrine est composé de 3 chaînes lourdes et légères. Son domaine N-terminal structuré en hélice β permet de médier l'interaction avec ses partenaires d'interaction. D'un point de vue structural, lorsque la clathrine s'auto-polymérise, ces hélices sont repliées sous la cage qui entoure la vésicule endocytée (Figure 8a) (Marsh and McMahon, 1999). L'endocytose médiée par la clathrine est responsable de l'internalisation des nutriments, des agents pathogènes, des antigènes, des facteurs de croissance et des récepteurs. Elle représente le mécanisme le mieux caractérisé de l'entrée des molécules dans la cellule. Ce mécanisme est visible en microscopie électronique (Figure 9a). Les complexes adaptateurs sont des composants clés de cette voie et interagissent directement avec la clathrine elle-même ou avec d'autres protéines régulatrices ou encore avec le contenu des cages de clathrines pour stimuler la formation du manteau de clathrine enrobant la vésicule internalisée (Le Roy and Wrana, 2005). La dynamine est une GTPase multidomaine qui est recrutée au niveau des zones de repliment de la membrane. Elle s'assemble en spirale ou collier pour induire la dissociation de la membrane et la libération des vésicules internalisée (Figure 9b) (Antonny *et al.*, 2016). Par la suite, une réaction de dissociation permet de recycler les constituants du manteau de clathrine qui seront utilisés dans une endocytose ultérieure.

II.5.1.1. Le complexe de protéines adaptatrices AP-2

Le complexe de protéines adaptatrices AP-2 est l'adaptateur majeur de la clathrine à la membrane plasmique. Il est le mieux caractérisé de tous les complexes adaptateurs AP. A l'image des autres complexes AP, AP-2 est un hétérotétramère constitué de deux grandes sous-unités α et $\beta 2$, une sous-unité moyenne $\mu 2$ et une petite sous-unité $\sigma 2$. Les domaines N-terminaux de α et $\beta 2$, conjointement avec $\mu 2$ et $\sigma 2$, sont assemblés en un noyau ou une tête. Les domaines C-terminaux de α et $\beta 2$ forment l'appendice du complexe et sont reliés au noyau par des régions charnières souples (Owen *et al.*, 2004) (Figure 8b). Les domaines C-terminaux des sous-unités α et $\beta 2$ interagissent avec d'autres protéines impliquées dans l'endocytose médiée par la clathrine et forment un réseau interconnecté. Le domaine N-terminal de la sous-unité α se lie aux phospholipides et est ainsi impliqué dans le recrutement d'AP-2 à la membrane plasmique. La sous-unité $\mu 2$ possède également le site de liaison aux phospholipides et elle interagit en plus avec le signal d'internalisation YXXZ (tyrosine-X-X-résidu hydrophobe) qui se trouve dans les protéines de cargaison (Owen *et al.*, 2004). L'implication du complexe AP-2 dans l'endocytose de l'EGFR a fait l'objet d'un débat suite à des études contradictoires sur les effets de l'extinction des sous unités de ce complexe sur l'endocytose de l'EGFR (Motley *et al.*, 2003; Rappoport and Simon, 2009). L'EGFR interagit avec la sous-unité $\mu 2$ de l'AP-2 (Huang *et al.*, 2003). En revanche, la stimulation à l'EGF induit la phosphorylation des résidus tyrosine de la sous-unité $\beta 2$ d'AP-2 d'une manière dépendante du motif dileucine dans la queue carboxy-terminale de l'EGFR (Huang *et al.*, 2003). Cependant, la mutation de ce motif n'affecte pas l'endocytose de l'EGFR, mais perturbe l'adressage du récepteur vers la voie de dégradation. Ceci suggère que le motif dileucine de l'EGFR ou la phosphorylation de la sous-unité $\beta 2$ du complexe AP-2 facilite le recrutement des protéines de tri en aval. Ces études suggèrent que bien que



l'AP-2 ne soit pas absolument nécessaire à l'endocytose de l'EGFR médiée par la clathrine, son interaction avec l'EGFR et son rôle dans le recrutement d'autres composants de la machinerie endocytaire peuvent faciliter l'internalisation et l'engagement du récepteur dans cette voie.

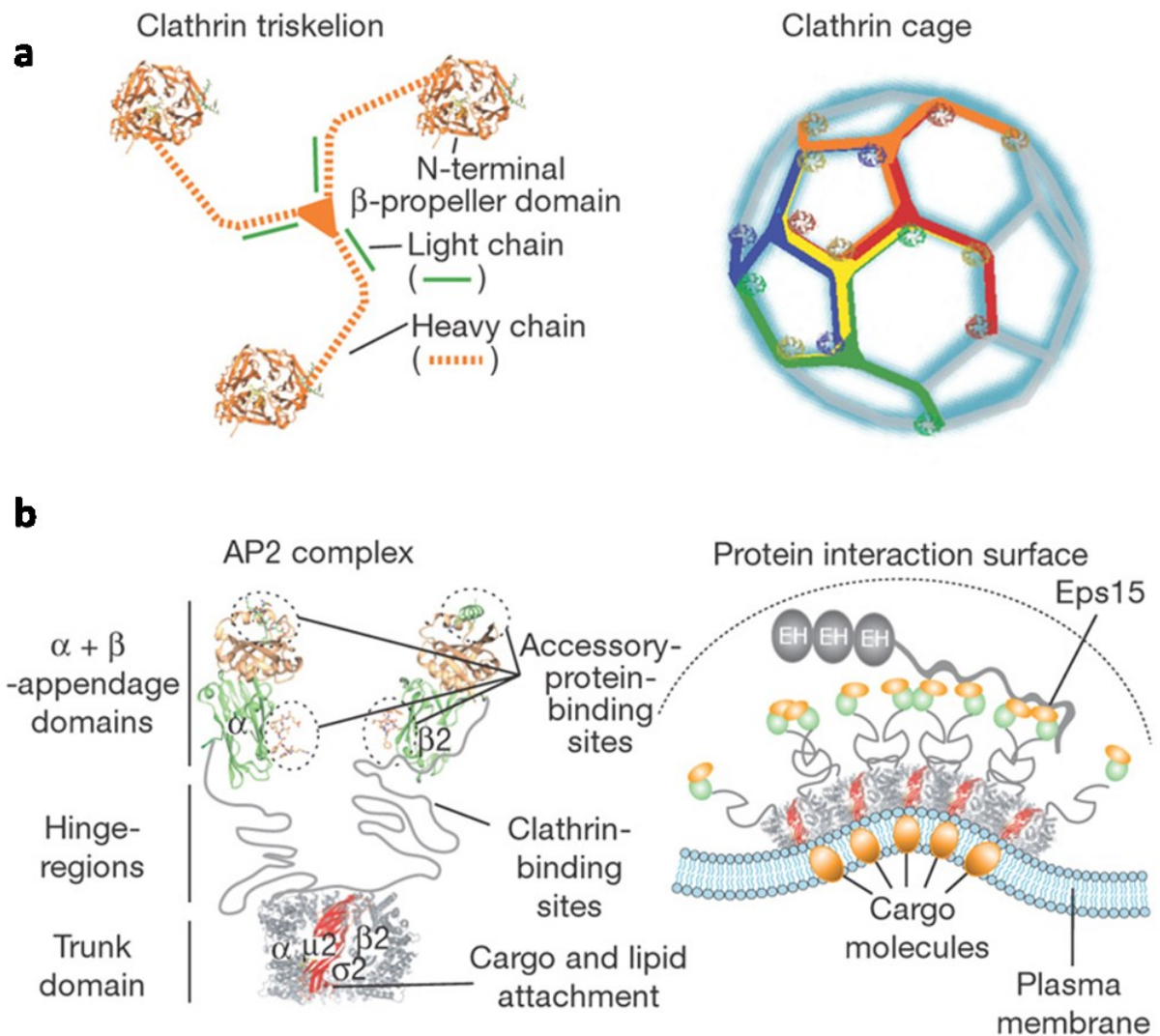


Figure 8 : représentation schématique des principaux domaines de la clathrine et du complexe AP-2.

(a) Une triscèle de clathrine composée de trois chaînes lourdes et légères. La clathrine interagit avec ses ligands *via* son domaine N-terminal sous forme d'hélice β . Lorsque la clathrine s'auto-polymérise dans une cage (panneau droit), ces hélices sont repliées sous la cage de formation. (b) Le complexe de protéines adaptatrices majeur est le complexe AP-2. Ceci est composé de quatre sous-unités (α , β 2, μ 2 et σ 2). La cargaison interagit principalement avec la sous-unité μ 2 (en rouge), tandis que les domaines d'appendice (orange et vert) sont responsables de la liaison à d'autres protéines régulatrices (quatre domaines d'interactions sont mis en évidence par des lignes pointillées). Le panneau de droite montre une représentation d'un cadre de membrane plasmique contenant la cargaison et logeant un complexe AP-2 étroitement emballé, générant une surface d'interaction protéique dense. →

Les AP-2 sont stabilisés par des protéines de regroupement telles que le substrat de l'EGFR, Eps-15. Adapté de Schmid and McMahon, 2007.

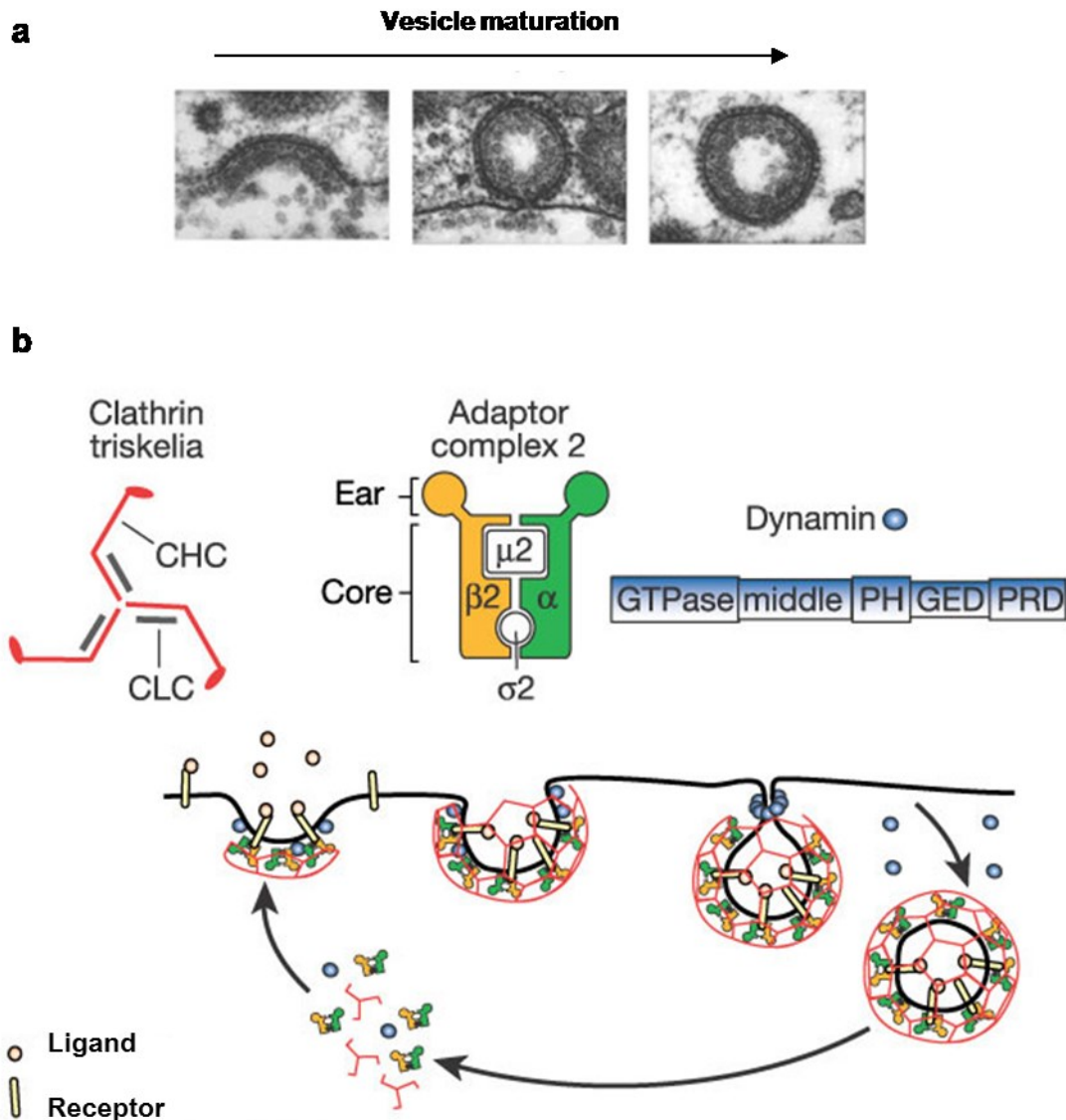


Figure 9 : l'endocytose médiée par la clathrine.

(a) Le bourgeonnement d'une vésicule suite à l'invagination de la membrane et la polymérisation de la clathrine. Adapté de (Perry and Gilbert, 1979). (b) L'assemblage des protéines adaptatrices avec la clathrine induit l'invagination et le bourgeonnement de la vésicule contenant la cargaison. La dynamine s'assemble au niveau de la zone d'invagination membranaire et provoque la fission de la membrane. Un dévêtement ultérieur de la vésicule endocytée permet une nouvelle utilisation des composants de la machinerie d'endocytose. Adapté de Conner and Schmid, 2003.

II.5.1.2. Grb-2 et l'ubiquitination de l'EGFR

Une autre protéine adaptatrice de liaison à l'EGFR est la protéine 2 liée au récepteur des facteurs de croissance (Grb-2) (Figure 10). Cette protéine lie l'EGFR activé par son

domaine SH2 (Batzer *et al.*, 1994). Cette interaction aboutit à des effets opposés sur la signalisation. En effet, Grb-2 recrute l'ubiquitine ligase E3 (Cbl), entraînant une ubiquitination mono- et polymérique sur les résidus lysine dans le domaine catalytique de l'EGFR (Huang *et al.*, 2006), ce qui aboutit à une régulation négative à travers l'initiation de l'adressage du récepteur vers la voie de dégradation. En revanche, les domaines SH3 de Grb-2 interagissent avec la protéine adaptatrice Sos, un facteur d'échange du nucléotide GTP de la protéine Ras (Chardin *et al.*, 1993). L'interaction Sos–Ras induit l'activation de Ras et par conséquent l'initiation de la cascade de signalisation Raf / MAPK (voir II.2.1 pour consulter des explications sur cette voie de signalisation), ainsi que l'activation de PI3K. L'interaction de Grb-2 avec sa protéine associée Gab-1 induit également l'activation de PI3K (Mattoon *et al.*, 2004). En effet, Gab-1 interagit avec la sous-unité P85 de PI3K. L'activation de PI3K et la production consécutive de PIP3 induit un enrichissement de Gab-1 à la membrane plasmique suite à l'interaction du domaine PH de Gab-1 avec l'PIP3. A la membrane, l'interaction directe Gab1–EGFR potentialise la voie des MAPKs, illustrant ainsi une boucle positive de signalisation suite à la stimulation par l'EGF (Rodrigues *et al.*, 2000).

L'ubiquitination de l'EGFR est reconnue par des protéines liées au manteau de clathrine, y compris les protéines d'interaction avec l'AP-2, l'Epsine-1 et l'Eps-15 (Figure 10). Bien que l'ubiquitination soit connue pour faciliter le recrutement de l'EGFR activé dans les puits recouverts de clathrine et ainsi promouvoir son endocytose (Bertelsen *et al.*, 2011; Madshus and Stang, 2009), un EGFR muté et dépourvu de 15 résidus de lysine dans son domaine kinase demeure normalement internalisé (Huang *et al.*, 2007). En plus, l'extinction d'Epsine-1 ou d'Eps-15 n'affecte pas l'internalisation de l'EGFR suite à la stimulation par l'EGF (Chen and Zhuang, 2008; Huang *et al.*, 2004) sauf dans une seule étude qui a signalé une diminution de l'internalisation de l'EGFR en raison de l'extinction d'Epsine-1 (Kazazic *et al.*, 2009). L'étendue de la contribution de l'ubiquitination et des effecteurs dépendants de l'ubiquitination (e.g. Epsine-1 et Eps-15) à l'internalisation de l'EGFR peut dépendre du type de cellule et des conditions physiologiques. D'une manière intéressante, la mutation de 21 résidus de lysine, dont trois pouvant être acétylés, entraîne une diminution de l'internalisation du récepteur (Goh *et al.*, 2010), ce qui suggère que l'acétylation pourrait être nécessaire pour la dimérisation et l'endocytose de l'EGFR (Yuan *et al.*, 2005). En conclusion, les mécanismes de régulation de l'endocytose de l'EGFR demeurent incomplètement élucidés, notamment en ce qui concerne le rôle d'Epsine-1. Ce processus est complexe et implique une combinaison de nombreux facteurs fonctionnant à la fois de façon redondante et coopérative.



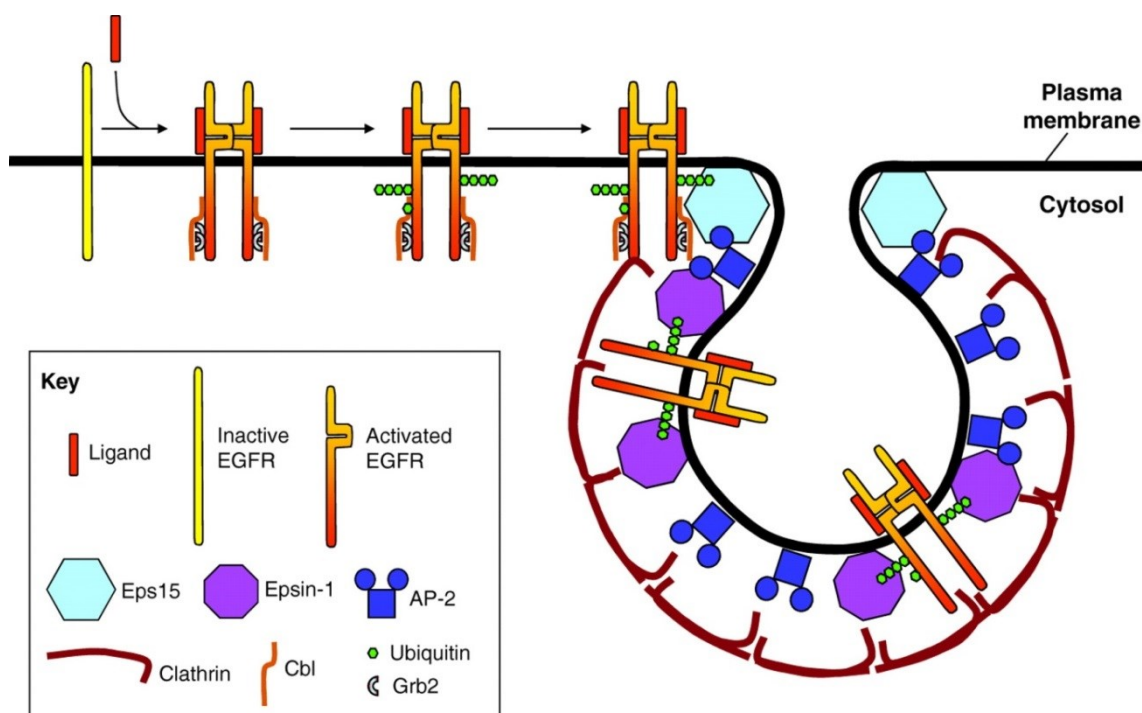


Figure 10 : un modèle illustrant les événements requis pour le recrutement de l'EGFR dans des fosses enduites de clathrine.

La liaison du ligand à l'EGFR induit la dimérisation et l'activation des récepteurs permettant à Cbl de se lier directement ou indirectement par Grb-2. Le recrutement de Cbl entraîne une mono- et une polyubiquitination de la queue c-terminale de l'EGFR. Les chaînes poly-ubiquitines interagissent avec l'Epsine-1 et l'Eps-15. La membrane revêtue de clathrine invagine ensuite et est libérée dans l'intérieur de la cellule. D'après Madshus and Stang, 2009.

II.5.2. L'endocytose indépendante de la clathrine

L'endocytose dépendante de la clathrine offre une voie d'internalisation rapide. Cependant, des mécanismes plus lents et indépendants de la clathrine ont également été décrits. La concentration du ligand est importante pour diriger le passage du récepteur à travers la voie endocyttaire. En effet, des concentrations élevées d'EGF (20 ng / mL) favorise l'endocytose indépendante de la clathrine (Sigismund *et al.*, 2008), mais de manière dépendante d'Epsine-1 et d'Eps-15 (Sigismund *et al.*, 2005), probablement en raison de la saturation de la voie médiée par la clathrine. Néanmoins, des études ont démontré que l'extinction de la clathrine inhibe l'endocytose de l'EGFR indépendamment de la concentration du ligand (Henriksen *et al.*, 2013; Kazazic *et al.*, 2006). Plus récemment, une étude a démontré la corrélation entre l'endocytose indépendante de la clathrine et le taux d'ubiquitination de l'EGFR par Grb-2 et Cbl, bien que le lien mécanistique entre ces deux processus demeure à élucider (Sigismund *et al.*, 2013). La nature même du ligand est importante et peut influencer le mécanisme d'endocytose. L'activation du récepteur par l'EGF ou le TGF- α entraîne uniquement une endocytose dépendante de la clathrine, tandis que le HB-EGF et la BTC stimulent l'internalisation par les deux voies (Henriksen *et al.*, 2013).

Plusieurs exemples illustrent l'endocytose indépendante de la clathrine. Ils incluent l'absorption par la cavéoline (Anderson, 1998) ou par macropinocytose en réponse à la stimulation par l'EGF dans la lignée A431 (West *et al.*, 1989). Ainsi, un nombre croissant de preuves soutient l'existence d'un mécanisme d'internalisation de l'EGFR indépendant de la clathrine et qui pourrait être dû à une saturation de la clathrine à la membrane ou à la réponse cellulaire à un ligand puissant. Ce mécanisme maintiendrait l'homéostasie du signal en ciblant le récepteur vers la voie de dégradation (Mayor *et al.*, 2014; West *et al.*, 1989).

II.5.3. Le tri post-endocyttaire de l'EGFR

Deux voies majeures existent pour le trafic de l'EGFR depuis les endosomes précoces : (i) la voie de recyclage vers la surface de la cellule, (ii) la voie de dégradation lysosomale. Un équilibre délicat entre ces deux voies maintient la balance entre une signalisation soutenue à la fois dans les endosomes et à la membrane plasmique ou l'atténuation du signal grâce à la voie de la dégradation. En outre, la sous-compartmentation de la signalisation se produit au sein de la voie endocyttaire. Une sous-population des endosomes précoces exprime la protéine adaptatrice APPL-1 qui interagit avec AKT et soutient ainsi sa signalisation (Schenck *et al.*, 2008). De plus, le complexe constitué de protéines d'échafaudage composé de LAMTOR-1, -2 et -3 interagit avec ERK-1 pour maintenir une signalisation MAPK continue et dépendante de l'EGF à partir des endosomes tardifs et du lysosome, favorisant ainsi la prolifération cellulaire *in vivo* (de Araújo *et al.*, 2013).

II.5.3.1. L'adressage vers le corps multivésiculé et les complexes ESCRT (complexe de tri endosomal requis pour le transport)

L'ubiquitination du récepteur est cruciale pour trier l'EGFR activé dans les endosomes (Eden *et al.*, 2012). Les complexes ESCRT chargent le récepteur ubiquitinylé dans des vésicules intraluminales pendant la maturation des endosomes, ce qui permet de l'adresser vers la dégradation lysosomale. Les récepteurs ubiquitinylés sont reconnus par des protéines omniprésentes contenant un domaine d'interaction avec l'ubiquitine, ainsi que par le facteur d'échange Rab-5, Rabex-5 (Penengo *et al.*, 2006), le substrat de tyrosine kinase régulé par le facteur de croissance des hépatocytes (Hrs) (un composant du complexe ESCRT-0) et la protéine du gène de susceptibilité tumorale 101 (Tsg-101) (un composant du complexe ESCRT-I). En effet, l'ubiquitination de l'EGFR est nécessaire pour son interaction avec Hrs et son adressage lysosomal (Eden *et al.*, 2012). L'interaction de Hrs avec Tsg-101 favorise le recrutement des complexes ESCRT, avec une scission dépendante d'ESCRT-III complétant la biogenèse des vésicules intraluminales (Schöneberg *et al.*, 2017) (Figure 11). Avant le chargement de l'EGFR dans ces vésicules, l'ubiquitine est éliminée par des enzymes déubiquitinyantes et est recyclée pour maintenir le pool d'ubiquitine libre. Un moyen supplémentaire de régulation négative du signal est la déphosphorylation directe de l'EGFR par des phosphatases (Eden *et al.*, 2010; Tiganis, 2002). La fusion du corps multivésiculé avec le lysosome entraîne la dégradation du récepteur (Ganley *et al.*, 2011; Vanlandingham and Ceresa, 2009). Cependant, les vésicules intraluminales peuvent aussi



être sécrétées à l'extérieur de la cellule suite à la fusion du corps multivésiculé avec la membrane plasmique (Colombo *et al.*, 2014). Par conséquent, la biogenèse du corps multivésiculé peut contribuer à la biogenèse et la sécrétion d'exosomes dans la matrice extracellulaire.

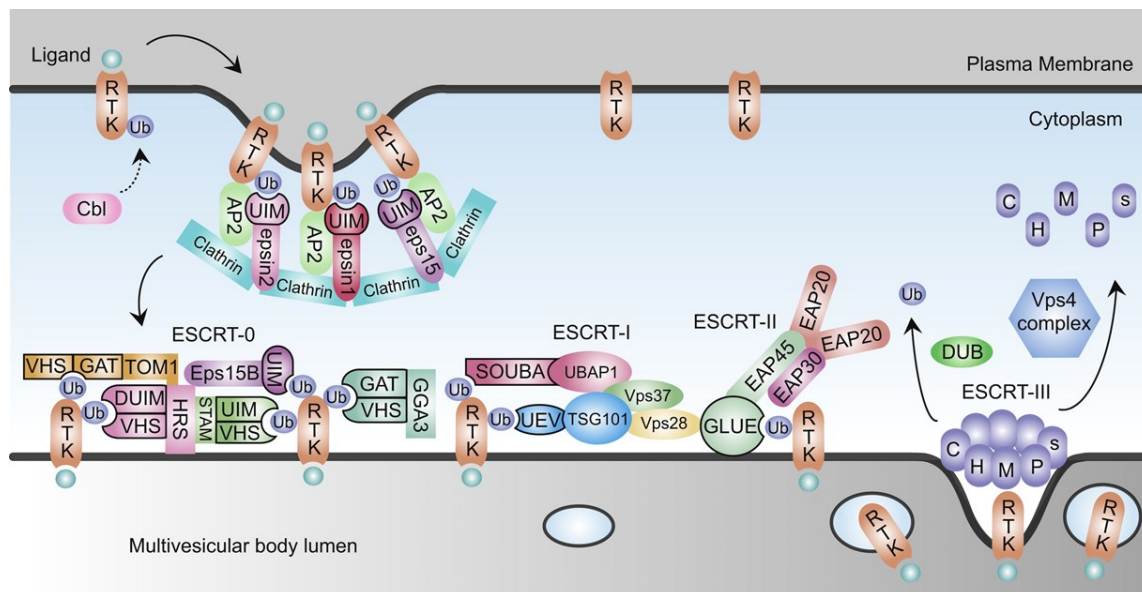


Figure 11 : le tri d'un RTK au sein de la voie endocytaire implique des protéines contenant un domaine d'interaction avec l'ubiquitine.

Suite à l'activation par un ligand, le RTK est ubiquitinylé par Cbl. Les protéines contenant un domaine d'interaction avec l'ubiquitine agissent comme des liens entre les récepteurs, l'AP-2 et la clathrine. Pendant la maturation endocytaire, la machinerie ESCRT prend en charge les récepteurs ubiquitinylés, ce qui conduit à leur inclusion dans des vésicules intraluminales créant ainsi le corps multivésiculé destiné à fusionner avec le lysosome. L'amorçage de l'inclusion des récepteurs dans les vésicules intraluminales se fait par l'intermédiaire des composants Hrs et STAM du complexe ESCRT-0. D'après Clague *et al.*, 2012.

II.5.3.2. Le recyclage de l'EGFR

L'importance de l'ubiquitinylation dans la dégradation de l'EGFR activé est largement décrite dans la littérature. Des mutants de l'EGFR ne pouvant pas être ubiquitinylés échappent à la voie de dégradation et sont plutôt recyclés à la membrane plasmique (Eden *et al.*, 2012). Ainsi, le recyclage pourrait servir de voie de défaut. Cependant, l'identification de plusieurs effecteurs du recyclage de l'EGFR suggère un processus actif et régulé. La famille des Rab GTPases compte plus que 60 petites protéines jouant un rôle clé dans la régulation du trafic post-membranaire (Pylypenko and Goud, 2012). Le recyclage de l'EGFR peut se produire soit directement à partir des endosomes précoces à travers la voie régulée par Rab-4 et Rab-35, soit à partir du compartiment de recyclage endocytaire (ERC) par une voie dépendante de Rab-11 (Figure 12). L'ERC étant une série de membranes tubulaires et vésiculaires réparties dans des régions périnucléaires et régulant le recyclage vers la

membrane plasmique (Xie *et al.*, 2016). Un autre exemple permettant d'illustrer le recyclage de l'EGFR à partir de l'ERC est celui du ligand de la cyclophiline modulant le calcium (CAML) qui interagit avec le domaine kinase de l'EGFR favorisant le recyclage du récepteur suite à l'activation par l'EGF. Ce recyclage se déroule potentiellement à partir de l'ERC et il joue un rôle dans la signalisation prolongée de l'EGFR suite à la stimulation par un ligand (Tran *et al.*, 2003). L'Eps-15S, une isoforme courte d'Eps-15, cible l'EGFR endocyté vers le recyclage à partir de l'ERC et d'une manière dépendante de Rab-11 (Chi *et al.*, 2011). En outre, la protéine adaptatrice Odine, un substrat de la kinase Src (Emaduddin *et al.*, 2008), favorise le recyclage des récepteurs stimulés par l'EGF (Tong *et al.*, 2013). Bien que le mécanisme de recyclage soit corrélé avec une signalisation prolongée, Odine a également été décrite comme un régulateur négatif de la signalisation de l'EGFR (Pandey *et al.*, 2002). Le ligand peut également diriger le trafic de l'EGFR en fonction de la stabilité de l'interaction ligand-récepteur de façon dépendante du pH (French *et al.*, 1995). Par exemple, la liaison de l'EGF est stable au pH réduit des endosomes, ce qui permet de cibler la voie de la dégradation. En revanche, le TGF- α se dissocie au pH endosomal. La déubiquitinylation qui en résulte lors de cette dissociation permet au récepteur d'échapper à l'adressage lysosomal et d'être recyclé à la membrane plasmique, en accord avec les effets mitogènes accrus du TGF- α (Roepstorff *et al.*, 2009). En outre, les partenaires de dimérisation de l'EGFR peuvent dicter son destin. En plus de former des homodimères, l'EGFR peut former des hétérodimères avec d'autres membres de la famille EGFR. Alors que les homodimères de l'EGFR sont triés pour la dégradation, les hétérodimères ne recrutent pas Cbl, évitant ainsi la dégradation et sont plutôt recyclés. Par exemple, les hétérodimères EGFR / ERBB-2, qui sont surexprimés dans de nombreuses tumeurs humaines, sont internalisés à un rythme plus lent, avec un recyclage accru à la surface de la cellule (Peschard and Park, 2003).

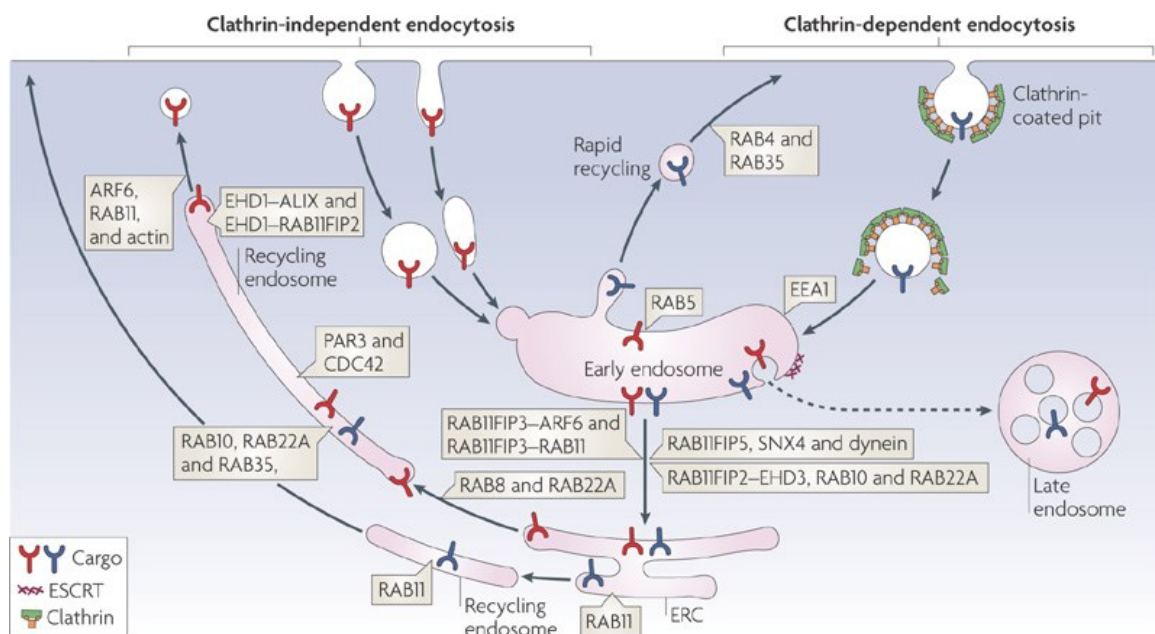


Figure 12 : l'itinéraire des récepteurs entrant dans la cellule par endocytose dépendante (récepteur bleu) ou indépendante (récepteur rouge) de la clathrine.

Le trafic entre l'endosome précoce, le compartiment de recyclage endocytaire (ERC) et l'endosome de recyclage est présenté. Rab-5 et l'antigène 1 de l'endosome précoce (EEA-1) jouent un rôle clé dans la génération et la maintenance de des endosomes précoces. Certaines cargaisons sont sélectionnées dans l'endosome précoce par les complexes ESCRT pour entrer dans la voie du corps multivesiculé et être transportées vers des endosomes tardifs (flèche pointillée). Les cargaisons de l'endocytose dépendante de la clathrine peuvent être recyclées vers la surface de la cellule grâce à une voie de recyclage rapide nécessitant Rab-4 et Rab-35. Les deux types de cargaison peuvent passer de l'endosome précoce à l'ERC par un procédé qui nécessite le tri par des protéines diverses. De l'ERC, le recyclage des deux types de cargaison nécessite Rab-11. D'après Grant and Donaldson, 2009.

II.5.3.3. Des voies alternatives d'adressage intracellulaire de l'EGFR

Le tri de l'EGFR activé pour la dégradation lysosomale (et donc l'atténuation du signal) ou le recyclage vers la membrane plasmique (*i.e.* signalisation prolongée) est fondamental pour la régulation de la signalisation de l'EGFR. Cependant, des tris alternatifs de l'EGFR activé émergent, notamment ceux concernant son trafic vers le noyau et la mitochondrie. L'EGFR possède une séquence de localisation nucléaire dans son domaine juxtamembranaire qui interagit avec l'importine- β (Wang *et al.*, 2010). Cependant, il existe un large éventail de publications qui analysent le trafic de l'EGFR sans aborder le transport nucléaire. Ainsi, les mécanismes exacts régissant sa translocation nucléaire restent controversés (voir II.3.1 pour consulter des explications sur la signalisation nucléaire de l'EGFR). Le transport de l'EGFR aux mitochondries est un mécanisme à la fois constitutif et en réponse à une gamme de *stimuli* tels que la stimulation par un ligand. L'EGFR mitochondrial phosphoryle la sous-unité II de la cytochrome c oxydase (CoxII), impliquée dans l'initiation de l'apoptose, ce qui réduit son activité (Demory *et al.*, 2009). Par conséquent, un rôle de l'EGFR mitochondrial dans l'échappement thérapeutique a été suggéré (Cao *et al.*, 2011). Cependant, le mécanisme de la translocation et la fonction mitochondriale de l'EGFR reste à élucider.

II.6. La dérégulation du trafic de l'EGFR dans le cancer

L'expression anormale et la dérégulation du trafic intracellulaire de l'EGFR jouent des rôles importants dans l'oncogenèse. Les dérégulations du trafic résultent en un défaut de localisation et par conséquent un échappement du récepteur à la dégradation, ce qui conduit à une signalisation proliférative soutenue (Roepstorff *et al.*, 2008; Sorkin and von Zastrow, 2009). Différents mécanismes par lesquels les modulations du trafic et de la fonction de l'EGFR conduisent potentiellement à une progression tumorale ou modifient la réponse aux molécules anti-cancéreuses.

II.6.1. Les effets des inducteurs de stress cellulaire sur le trafic de l'EGFR



Les inducteurs de stress cellulaire, y compris l'irradiation UV, l'antibiotique anisomycine, le cisplatine et le facteur de nécrose tumorale alpha (TNF- α), ont tous été trouvés pour induire une internalisation de l'EGFR indépendante du ligand (Figure 13). Tous ces inducteurs déclenchent une activation de la p38 MAPK qui est requise pour l'internalisation de l'EGFR dans ces conditions. Le *stimulus* le mieux caractérisé est l'irradiation UV (Tomas *et al.*, 2014).

L'irradiation UV induit une internalisation rapide de l'EGFR médiée par la clathrine et indépendante du ligand (Tomas *et al.*, 2015; Zwang and Yarden, 2006). Contrairement à l'EGFR, le trafic d'autres récepteurs incluant c-Met, le récepteur de l'insuline et le récepteur de la transferrine n'est pas affecté par l'irradiation UV (Tomas *et al.*, 2015; Zwang and Yarden, 2006). Alors que l'internalisation de l'EGFR activé dépend de son activité tyrosine kinase et nécessite une autophosphorylation de multiples résidus tyrosines, l'internalisation induite par les UV est indépendante de cette activité (Oksvold *et al.*, 2002). Au lieu de cela, elle nécessite une phosphorylation des résidus de serine et de thréonine dans la queue carboxy-terminale cytoplasmique de l'EGFR (Oksvold *et al.*, 2004), ainsi que l'activation continue de p38 MAPK (Zwang and Yarden, 2006). Contrairement à l'EGF qui stimule la dégradation de l'EGFR, les UV induisent une accumulation stable du récepteur ou un arrêt de la maturation endosomale (Oksvold *et al.*, 2002). Bien que la dégradation de l'EGFR soit observée après une exposition UV à long terme, cela peut refléter un clivage non spécifique par les caspases suite au déclenchement de l'apoptose plutôt que par le tri de l'EGFR vers la dégradation lysosomale (He *et al.*, 2003).

L'anisomycine est un antibiotique qui induit également une internalisation de l'EGFR médiée par p38 MAPK et indépendante de son activité tyrosine kinase (Vergarajauregui *et al.*, 2006). Suite au traitement à l'anisomycine, l'EGFR est phosphorylé sur la Ser 1039 et la Thr 1041, ainsi que d'autres résidus Ser / Thr en aval de p38 MAPK. Ces résidus sont phosphorylés mais à des niveaux très faibles en réponse à l'EGF (Tong *et al.*, 2009, 2014). Les variations du niveau de phosphorylation de l'EGFR sont en relation avec des voies de trafic intracellulaires distinctes du récepteur et constituent une nouvelle piste afin d'étudier le trafic de l'EGFR dans le futur. De manière surprenante, bien que la réponse globale de l'EGFR à l'anisomycine et aux UV semble similaire, l'anisomycine déclenche une dégradation rapide de l'EGFR par l'intermédiaire de mécanismes d'ubiquitinylation indépendants du lysosome (Vergarajauregui *et al.*, 2006).

Les cytokines inflammatoires, telles que le TNF- α , induisent une activation transitoire de p38 MAPK et par conséquent une phosphorylation et une internalisation de l'EGFR. Ceci est suivi d'un recyclage rapide de l'EGFR à la membrane plasmique une fois que p38 MAPK est inactivée (Zwang and Yarden, 2006).

Le cisplatine quant à lui déclenche également la phosphorylation, l'internalisation et l'arrêt endosomal de l'EGFR. Son action dépend de l'activation de p38 MAPK et est indépendante de l'ubiquitinylation ou de la dégradation de l'EGFR (Tomas *et al.*, 2015; Zwang and Yarden, 2006).



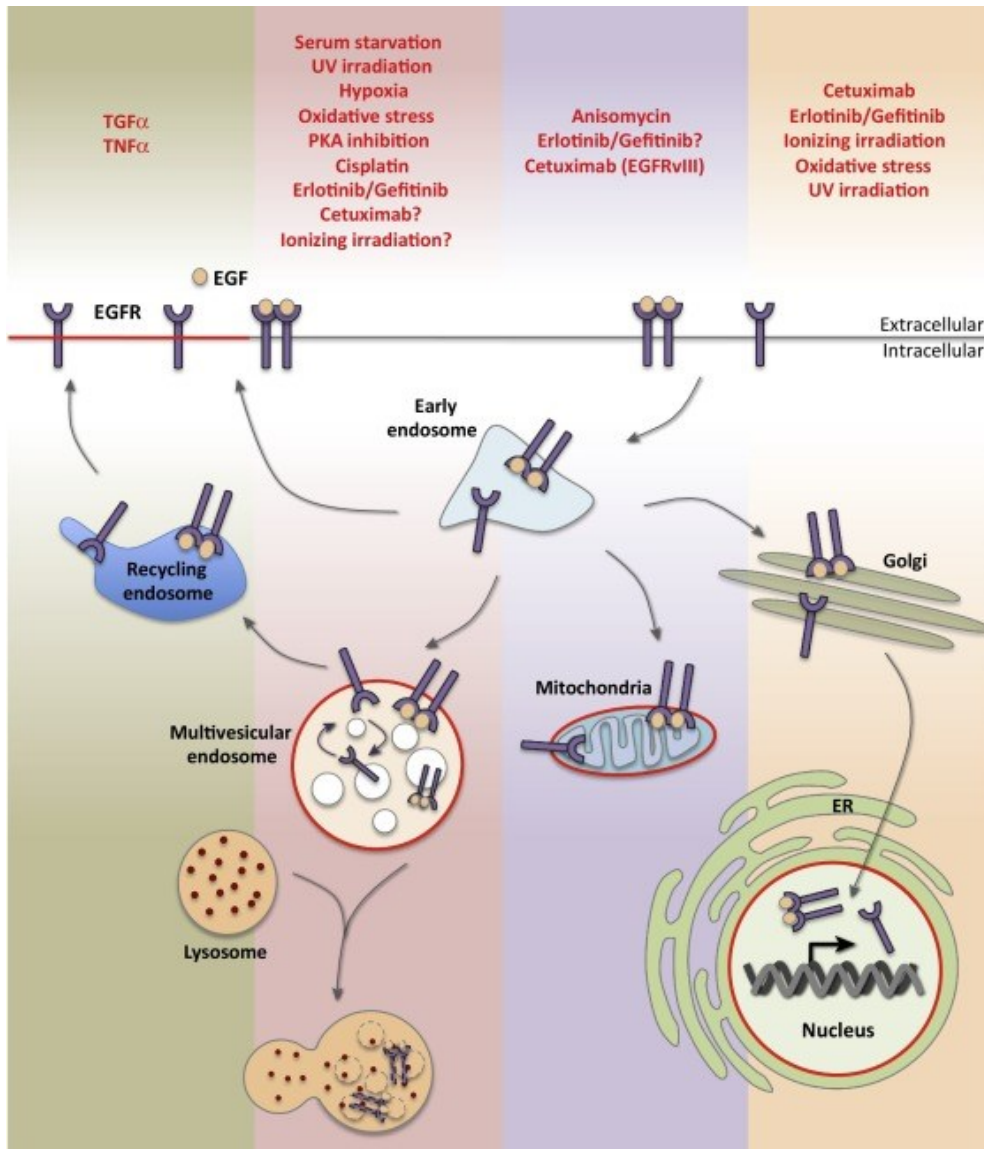


Figure 13 : les différentes destinations de l'EGFR en fonction des inducteurs de stress cellulaire.

Le ligand et les inducteurs de stress cellulaires divers stimulent l'internalisation de l'EGFR et son trafic intracellulaire. Suite à la stimulation par le ligand ou l'exposition à un stress cellulaire, l'EGFR est internalisé et peut ensuite être recyclé à la membrane plasmique ou trié vers le corps multivésiculé (MVE), les mitochondries, ou le noyau. Sur la figure, les différentes couleurs de fond mettent en évidence le trafic de l'EGFR vers des destinations subcellulaires spécifiques (compartiments rouges) sous l'effet de différents inducteurs de stress cellulaires (en haut). À chaque compartiment intracellulaire, l'EGFR stimulée par un stress cellulaire possède à la fois des fonctions dépendantes et indépendantes de son activité tyrosine kinase. Bien que l'EGFR stimulée par un ligand soit principalement destinée à la dégradation lysosomale, la plupart des inducteurs de stress provoquent l'arrêt de l'EGFR dans des endosomes non dégradants, conduisant à une signalisation soutenue. D'après Tan *et al.*, 2016.



II.6.2. Les mutations oncogéniques et le défaut du trafic de l'EGFR

La surexpression et les mutations oncogéniques particulières de l'EGFR conduisent à une dimérisation spontanée du récepteur entraînant son activation (Shan *et al.*, 2012). Deux types majeurs de mutations de l'EGFR ont été identifiés au sein des tumeurs et sont associés à une activation constitutive du récepteur : les mutants EGFR tronqués et les mutations dans le domaine tyrosine kinase (Boerner *et al.*, 2003). Des mutations activatrices de l'EGFR ont été décrites dans le CBNPC. Ces mutations stimulent le trafic de l'EGFR vers le ERC, entraînant une signalisation prolongée du récepteur notamment à travers son interaction avec la kinase Src, un partenaire crucial de la signalisation oncogénique de l'EGFR (Chung *et al.*, 2009). La synergie entre ces deux kinases est due à une colocalisation et un trafic intracellulaire commun (Donepudi and Resh, 2008). D'une manière intéressante, l'EGFR muté dans le CBNPC semble avoir une ubiquitination altérée par Cbl, entraînant un défaut de la dégradation du récepteur (Shtiegman *et al.*, 2007). Dans le GBM, l'EGFR VIII abrite une délétion de 267 aa dans le domaine extracellulaire (Gan *et al.*, 2009) et est régulé négativement suite à l'ubiquitination médiée par Cbl (Davies *et al.*, 2006).

II.6.3. L'influence des partenaires de l'EGFR dans la régulation de son trafic

Les protéines associées à l'EGFR pendant son trafic intracellulaire affecte potentiellement son destin et par conséquent sa signalisation. Le facteur d'échange de nucléotide guanine Vav-2 est un régulateur de Rho GTPases connue pour réguler l'adhésion, la migration et la prolifération cellulaire en réponse à la signalisation déclenchée par les facteurs de croissance. La surexpression de Vav-2 retarde l'internalisation et la dégradation de l'EGFR. Vav-2 stabilise l'EGFR internalisé dans les endosomes précoces Rab-5⁺ soutenant ainsi sa signalisation et contribuant à une augmentation prolongée de la phosphorylation d'ERK et d'AKT (Thalappilly *et al.*, 2010). CD44s est une protéine de surface cellulaire et produit de l'épissage alternatif de CD44. Une étude récente a démontré que CD44s stimule la conversion de Rab-7-GTP en Rab-7-GDP, ce qui inhibe la dégradation lysosomale de l'EGFR et soutient ainsi la signalisation AKT suite à la stimulation par l'EGF (Wang *et al.*, 2017). Un autre exemple de l'importance de la régulation du trafic de l'EGFR dans la tumorigénèse est l'interaction entre les suppresseurs de tumeurs PTEN (homologue à la phosphatase et la tensine) et SPRY-2 (homologue sprouty 2). Une expression réduite de SPRY-2 provoque une hyperactivation de la signalisation PI3K / AKT d'une manière dépendante de PTEN, entraînant une prolifération et une invasion accrue des cellules du cancer de la prostate (Gao *et al.*, 2012). Cette régulation positive du signal résulte d'une internalisation accrue de l'EGFR et d'une signalisation soutenue au niveau des endosomes précoces, dans un mécanisme impliquant l'activation du p38 MAPK. Comme décrit précédemment, l'activation de p38 facilite l'internalisation médiée par la clathrine et l'échappement à la dégradation de l'EGFR, ce qui aboutit à une signalisation cellulaire soutenue. La prolyl-hydroxylase PHD-3 contrôle l'activité de l'EGFR en agissant comme une protéine d'échafaudage qui s'associe à l'adaptateur endocytaire Eps-15 pour favoriser l'internalisation de l'EGFR. Une expression réduite de PHD-3 dans les cellules tumorales supprime l'internalisation de l'EGFR et hyperactive sa signalisation pour augmenter la prolifération et la survie cellulaire (Garvalov *et al.*, 2014). Les protéines de tri peuvent



également affecter le trafic de l'EGFR. Les protéines de tri de nexine 1 et nexine 2 (SNX-1 et SNX-2) sont homologues à la protéine de tri vacuolaire 5p chez la levure (VPS5p). SNX-1 et SNX-2 sont impliquées dans le tri de l'EGFR activé vers la dégradation lysosomale (Gullapalli *et al.*, 2004). L'ensemble de ces résultats suggèrent l'importance des protéines de tri dans le trafic des RTKs. C'est la raison pour laquelle nous sommes intéressés par la suite à la fonction d'une protéine de tri cellulaire connue, la sortiline, dans le trafic des RTKs.



III.1. La découverte de la sortiline

Le tri des enzymes lysosomales néo-synthétisées du Golgi vers les endosomes tardifs dans des cellules eucaryotes est un processus de transport sophistiqué impliquant des récepteurs de tri spécifiques dans le réseau trans-Golgien (Kornfeld and Mellman, 1989). Chez les mammifères, les récepteurs de mannose-6-phosphate (M6PR) de 46 et 275-kDa sont des récepteurs de tri connus pour lier les résidus de mannoses phosphorylés dans les hydrolases lysosomales, adressant ainsi ces enzymes vers les endosomes tardifs qui fusionneront ensuite avec le lysosome (Kornfeld and Mellman, 1989; Pearse and Robinson, 1990). Chez la levure, une voie de tri indépendante des M6PRs a été démontrée par l'identification de la protéine 10 de tri de protéines vacuolaires (VPS10) (Marcusson *et al.*, 1994) et d'une protéine hautement homologue (VPS10 homologue 2) codée par le gène *VTH2* (Cooper and Stevens, 1996). Ces deux protéines sont capables de cibler la carboxypeptidase Y vers la vacuole, un organite de la levure équivalent au lysosome chez les mammifères (Cooper and Stevens, 1996; Marcusson *et al.*, 1994). Chez l'humain, le défaut de stockage des enzymes lysosomales suite à une perturbation de leur adressage lysosomal est une maladie rare, la mucopolysaccharidose II (Paik *et al.*, 2005). Elle résulte d'une mutation du gène codant pour la N-acétylgucosamine-1-phosphotransférase, ce qui conduit à un défaut de phosphorylation des résidus mannose des hydrolases. Par conséquent, les patients atteints de la mucopolysaccharidose présentent une insuffisance enzymatique dans les lysosomes (Hwu *et al.*, 1994). Néanmoins, certains patients présentent un taux normal d'enzymes lysosomales dans les cellules du foie, du rein, du cerveau et de la rate, ce qui suggère la présence des mécanismes alternatifs de tri de ces enzymes chez les mammifères (Glickman and Kornfeld, 1993; Owada and Neufeld, 1982; Waheed *et al.*, 1982). La découverte de la sortiline a commencé en 1994 où Gliemann *et al.* ont découvert une protéine d'environ 100 kDa qui se lie à la protéine associée aux récepteurs (RAP) en étudiant la maturation des récepteurs des lipoprotéines de basse densité (LRP) (Gliemann *et al.*, 1994). La même année, Zsürger *et al.* ont découvert un récepteur de la neurotensine par chromatographie d'affinité sur des lysats du cerveau des nouveau-nés humains (Zsürger *et al.*, 1994). La protéine apparentée est constituée d'une seule chaîne et présente un poids moléculaire d'environ 100 kDa. En 1997, Petersen *et al.* ont identifié la protéine de 95 kDa désignée gp95 / sortiline par chromatographie d'affinité à la RAP à partir de lysats de tissus cérébraux humains (Petersen *et al.*, 1997). Un an après, Mazella *et al.* ont cloné le récepteur de la neurotensine décrit précédemment et qui a été identique à la sortiline, représentant ainsi le premier récepteur transmembranaire au neuropeptide n'appartenant pas à la famille des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) (Mazella *et al.*, 1998). Aujourd'hui, la famille des récepteurs à domaine VPS10P compte 5 membres (Hermey, 2009). Tous les membres représentent des récepteurs transmembranaires de type I à domaine transmembranaire unique. Ils partagent également la présence du domaine VPS10P dans leur partie N-terminale (Figure 14).

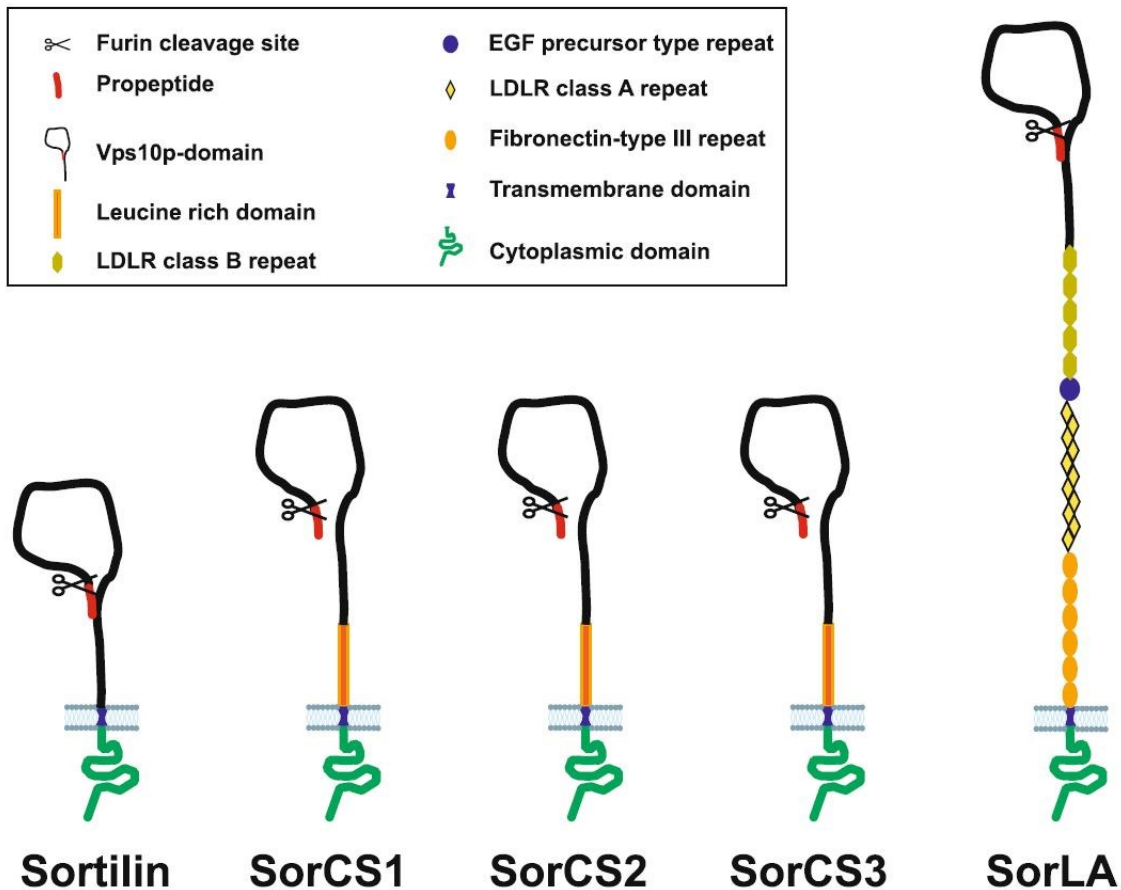


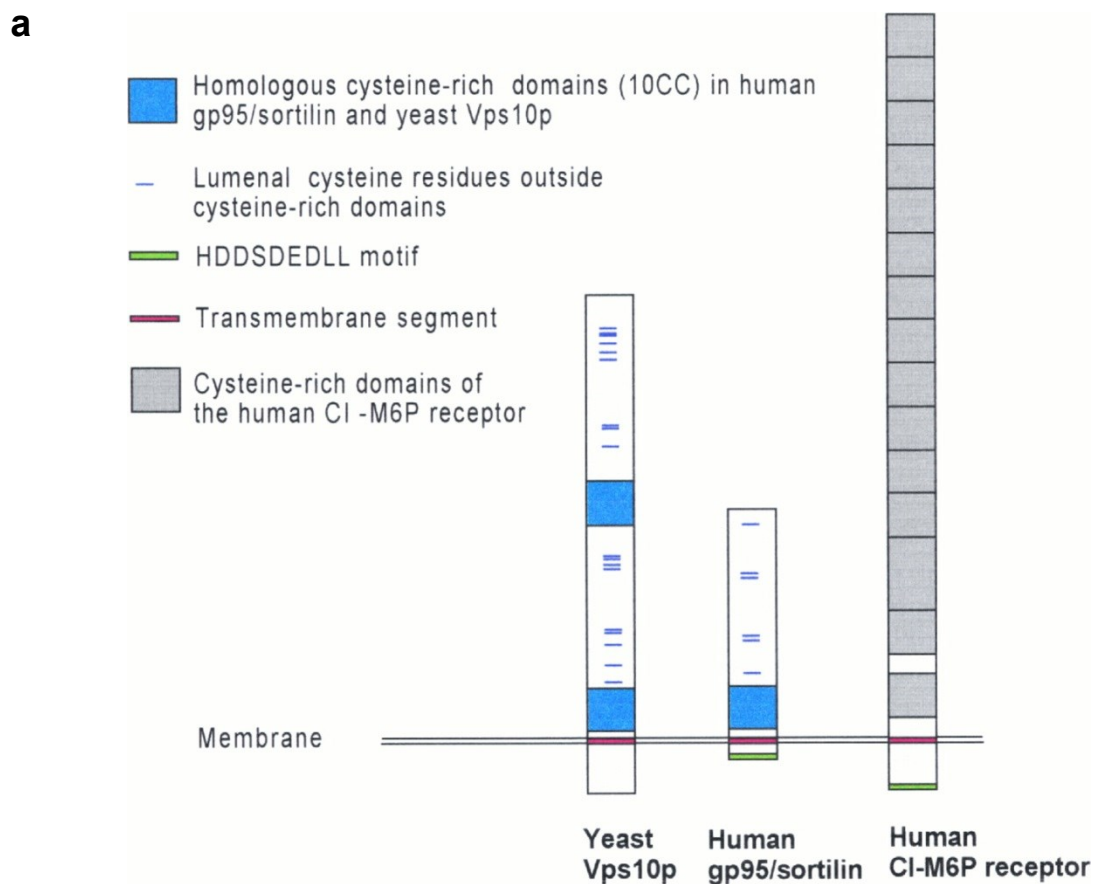
Figure 14 : les 5 membres de la famille des récepteurs à domaine VPS10P.

D'après Hermeij, 2009.

III.2. Les sites actifs de trafic dans la séquence de la sortiline

La sortiline est une protéine ubiquitaire, les expressions les plus élevées ont été trouvées dans le cerveau, la moelle épinière, les testicules et les muscles squelettiques (Hermans-Borgmeyer *et al.*, 1999; Mazella *et al.*, 1985; Petersen *et al.*, 1997). La sortiline est synthétisée sous forme d'une pro-protéine de 831 acides aminés (aa) qui est convertie en protéine mature dans le Golgi suite au clivage de 44 aa dans son domaine N-terminal par la furine (Petersen *et al.*, 1997). Le peptide clivé empêche, par encombrement stérique, les ligands d'accéder à des sites de liaison dans la pro-sortiline (Munck Petersen *et al.*, 1999). Ainsi, la furine est responsable de la génération d'une sortiline bioactive. Le site de clivage par la furine se trouve dans certains précurseurs de facteurs de croissance et pré-récepteurs de facteurs de croissance, y compris le récepteur de l'insuline (Bravo *et al.*, 1994) et le facteur de croissance des hépatocytes β (Hosaka *et al.*, 1991). Le domaine VPS10P constitue tout le domaine luminal / extracellulaire de la sortiline. Cette homologie de séquence conservée entre la levure et l'Homme a permis de définir un domaine structural riche en cystéine (Petersen *et al.*, 1997) (Figure 15a). La petite queue C-terminale révèle une homologie de séquence avec le domaine C-terminal des M6PRs, notamment avec celui du M6PR cation indépendant de 275 kDa (Figure 15a). En effet, la séquence C-terminale

extrême de la sortiline contient un tronçon de 9 aa (HDDSDEDLL) qui est retrouvé à la fin de la queue C-terminale de ce M6PR (Petersen *et al.*, 1997). Ce nanopeptide est potentiellement important, il possède deux sites fonctionnels, un site de phosphorylation par la caséine II et le motif dileucine adjacent (Figure 15b). Ces deux sites représentent les sites fonctionnels majeurs des M6PRs pour le tri entre le Golgi et les endosomes tardifs. Bien que le site de phosphorylation par la caséine II soit essentiel pour le recrutement du complexe AP-1 et par conséquent la formation des vésicules trans-Golgiennes, le motif dileucine est impliqué dans des mécanismes de tri ultérieurs (Petersen *et al.*, 1997). En plus de ces deux sites, la sortiline contient au moins deux autres signaux de tri. La séquence YSVL (aa 14-17 dans la queue cytoplasmique) qui respecte le motif consensus YXXZ, où Z représente un résidu hydrophobe volumineux ou aromatique (Sandoval and Bakke, 1994; Trowbridge *et al.*, 1993) (Figure 15b). Cette séquence est impliquée dans l'internalisation rapide et le tri des protéines membranaires, telles que CD3 γ et le récepteur M6PR de 46 kDa (Johnson *et al.*, 1990; Trowbridge *et al.*, 1993). D'une manière intéressante, ce signal de tri est retrouvé dans la séquence du domaine VPS10P chez la levure (Reitman *et al.*, 1981). Le deuxième signal de tri est la séquence FLVHRY (aa 9-14 dans la queue cytoplasmique). Immédiatement adjacente au domaine transmembranaire et partiellement chevauchante avec le tetrapeptide YSVL (Figure 15b), cette séquence constitue un autre signal d'internalisation / tri conformément au motif (F/Y)XXXX(F/Y) (Reitman *et al.*, 1981; Sandoval and Bakke, 1994; Trowbridge *et al.*, 1993).



b

	10	20	30	↓	40	50
MERPWGAADG	<i>LSRWPHG</i> LGL	LLLQLLPPS	<i>TL</i> SQDR <i>LDAP</i>		PPPAAPLPRW	
60	70	↓80	90	100		
SGPIGVSWGL	RAAAAGGAFP	RGGRWRR	SAP	GEDEECGRVR	DFVAKLANNT	
110	120	130	140	150		
HQHVFDDLRG	SVSLSWVGDS	TGVILVLTTF	HVPLVIMTFG	QSKLYRSEDY		
160	170	180	190	200		
GKNFKDITDL	INNTFIRTEF	GMAIGPENSG	KVVLTAEVSG	GSRGGRIERS		
210	220	230	240	250		
SDFAKNFVQT	DLPFHPLTQM	MYS PQNSDYL	LALSTENGLW	VSKNFGGKWE		
260	270	280	290	300		
EIHKAVCLAK	WGSDNTIFFT	TYANGSCKAD	LGALELWRTS	DLGKSEKTIG		
310	320	330	340	350		
VKIYSFGLGG	RFLFASVMAD	KDTTRRIHVS	TDQGD TWSMA	QLPSVGQE QF		
360	370	380	390	400		
YSILAANDDM	VFMHVDEPGD	TGFGTIFTSD	DRGIVYSKSL	DRHLYTTTGG		
410	420	430	440	450		
ETDFTNVTSL	RGVYITSVLS	EDNSIQTMIT	FDQGGRWTHL	RKPENSECDA		
460	470	480	490	500		
TAKNKNECSL	HIHASYSISQ	KLNVPMAPLS	EPNAVGI VIA	HGSVGD AISV		
510	520	530	540	550		
MVPDVYISDD	GGYSWTKMLE	GPHYYTILDS	GGIIVAI EHS	SRPINVIKFS		
560	570	580	590	600		
TDEGQCWQTY	TFTRDPIYFT	GLASEPGARS	MNISIWGFTE	SFLTSQWVSY		
610	620	630	640	650		
TIDFKDILER	NCEEKDYTIW	LAHSTDPEDY	EDGCILGYKE	QFLRLRKSSV		
660	670	680	690	700		
CQNGRDYVVT	KQPSICLCSL	EDFLCDFGY	RPENDSKCVE	QPELKGHDLE		
710	720	730	740	750		
FCLYGREEHL	TTNGYRKIPG	DKCQGGVNPV	REVKDLKKKC	TSNFLSPEKQ		
760	770	780	790	800		
NSKSNS VPII	LAI VG LM LV	VVAG VL LIV KK	YVCGGR FL VH	RYS VL QQ HAE		
810	820	830				
ANGVDGVDAL	DTASHTNKSG	<u>YHDDSDEDLL</u>	E			

Figure 15 : les sites actifs de tri dans la séquence de la sortiline.

(a) Représentation schématique de l'homologie entre la sortiline, VPS10P chez la levure et le M6PR cation indépendant de 275 kDa chez l'Homme. (b) La séquence primaire de la sortiline. Le peptide signal de 33 aa est représenté en italique, le pro-peptide de 44 aa dans la sortiline immature en bleu, les domaines transmembranaires en rouge et les sites actifs de tri dans le domaine C-terminal en vert souligné. La flèche noire indique le site prédit de clivage du peptide signal. La flèche bleue indique le site de clivage de la sortiline immature par la furine. Adapté de Petersen *et al.*, 1997.



III.3. Les voies alternatives du trafic de la sortiline

Suite à son activation, la sortiline suit au moins trois voies alternatives de trafic à partir du Golgi (étape 1) (Figure 16). Elle peut être adressée vers la surface de la cellule par la voie constitutive de vésicules sécrétoires (étape 2). A la membrane cellulaire, la sortiline peut subir le clivage de son domaine extracellulaire par la métalloprotéase 10 (ADAM-10) (Evans *et al.*, 2011) ou ADAM-17 (Hermeijer *et al.*, 2006), et un clivage par les γ -secrétases (Nyborg *et al.*, 2006) (étape 3). La libération du domaine extracellulaire produit une forme soluble de la sortiline dépourvue des domaines transmembranaire et intracellulaire. Ainsi, cette forme soluble demeure incapable d'adresser ses ligands, tels que les neurotrophines, à la dégradation par le lysosome (Evans *et al.*, 2011). Néanmoins, environ 95% de la sortiline restent intactes à la surface cellulaire et interagissent avec des ligands ou des récepteurs membranaires (Nykjaer and Willnow, 2012). La sortiline peut également faciliter l'endocytose médiée par la clathrine en se liant à l'AP-2 (étape 4) (Morinville *et al.*, 2004; Nielsen *et al.*, 2001). A partir des endosomes tubulaires ou précoces, les récepteurs internalisés peuvent retourner au Golgi (étape 5) (Mari *et al.*, 2008; Seaman, 2007) où le tri rétrograde nécessite l'interaction de la sortiline avec AP-1 et les protéines retromères GGA (Kim *et al.*, 2010; Nielsen *et al.*, 2001). Pendant son transport antérograde, la sortiline peut être adressée vers les endosomes précoces (étape 6) (Canuel *et al.*, 2008). Les ligands et dans certains cas la sortiline sont ciblés vers la dégradation lysosomale (étape 7) (Tanimoto *et al.*, 2017). Une troisième voie pour l'exportation de la sortiline du Golgi représente sa sécrétion dans le milieu extracellulaire par l'intermédiaire de vésicules exprimant la secrétogranine (étape 8) (Yang *et al.*, 2011), ou par des vésicules extracellulaires tels que les exosomes (Wilson *et al.*, 2014).

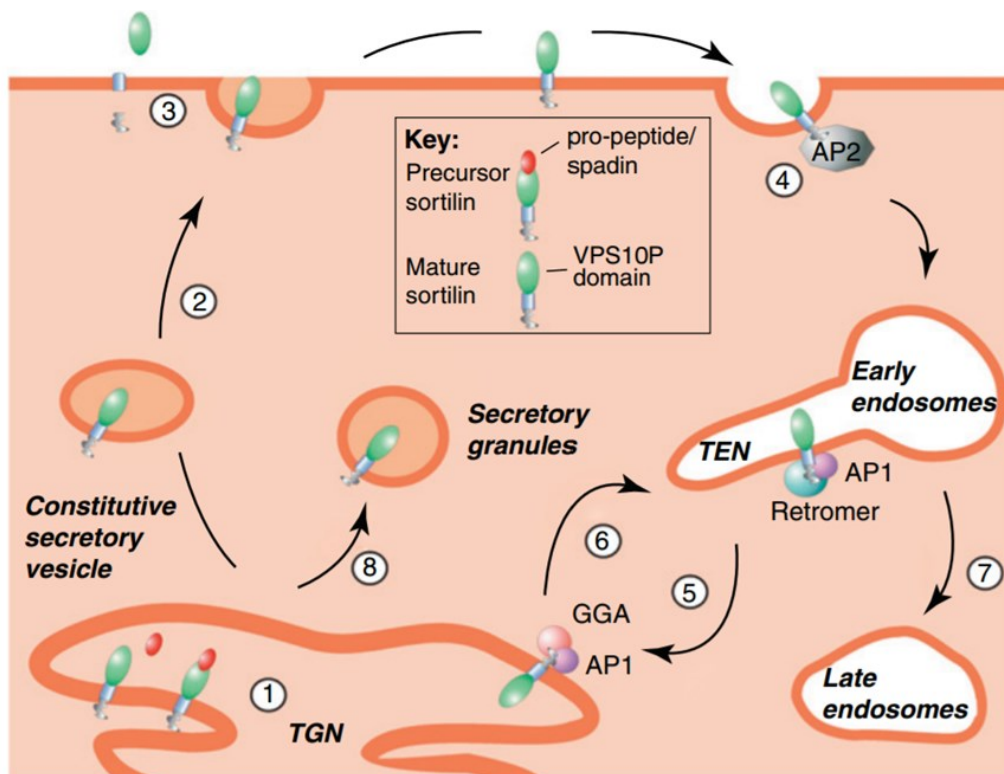


Figure 16 : les différentes voies du trafic de la sortiline.

D'après (Nykjaer and Willnow, 2012).



III.4. L'influence de l'épissage alternatif de la sortiline sur son trafic et sa fonction

Le gène codant la sortiline contient 20 exons (Figure 17a). 10 isoformes de *SORT1* sont obtenus par épissage alternatif. Des anomalies peuvent cependant survenir lors du mécanisme d'épissage alternatif et ainsi modifier la fonction de la protéine finale. Parmi les protéines importantes pour réguler l'épissage alternatif correct de la sortiline, on trouve la protéine de liaison à l'ADN TAR DNA-binding protein-43 (TDP-43). Cette protéine a pour fonction d'inhiber la production d'une forme tronquée de la sortiline délétère pour les cellules. Le mécanisme d'action de TDP-43 est basé sur l'inhibition de l'inclusion de l'exon 17b dans le transcrite mature de la sortiline (Mohagheghi et al., 2016). Au contraire, chez l'homme un défaut de localisation nucléaire de TDP-43 caractérisé par une aggrégation cytoplasmique conduit à l'insertion de l'exon 17b dans le transcrite final. Cet exon codant un codon stop prématuré, l'isoforme obtenue génère une protéine tronquée, non-fonctionnelle et relargée dans le milieu extracellulaire (Prudencio et al., 2012). Dans le cerveau, la *SORT1* normale joue notamment le rôle de récepteur de la progranuline (PGRN) et est impliquée dans la régulation du niveau de PGRN via son internalisation. La PGRN est un facteur de croissance impliqué dans de nombreux mécanismes allant de la réponse inflammatoire à la tumorigenèse. Elle est exprimée dans de nombreux types cellulaires du système nerveux central. Lorsque *SORT1* est tronquée à la suite de l'inclusion de l'exon 17b dans le transcrite mature, l'internalisation de la PGRN est inhibée ainsi que son adressage lysosomal. Ce défaut de régulation de l'épissage alternatif de *SORT1* dépendant de la TDP-43 permet d'expliquer l'altération du métabolisme de la PGRN dans certaines pathologies neurodégénératives. Ainsi, dans la dégénérescence lobaire fronto-temporale, la séquestration de TDP-43 dans le cytoplasme inhibe la fonction nucléaire de cette dernière sur l'exon 17 et contribue ainsi à la dégénérescence neuronale. (Figure 17b) (Prudencio et al., 2012).

III.5. La structure du domaine VPS10P de la sortiline

La structure du domaine extracellulaire de la sortiline liant la neurotensine a été déterminée par cristallographie. Le domaine VPS10P se compose de 3 domaines structuraux. La partie N-terminale (résidus 45-576) se révèle comme le premier exemple d'une structure hélicoïdale formée de dix feuillets β . L'hélice est suivie de deux petits domaines, désignés 10CC-a et 10CC-b (résidus 577-633 et 634-716, respectivement). Ces deux domaines constituent le module 10CC qui possède un faible contenu de structures secondaires et interagit fortement avec l'hélice β . Cette étude a démontré également que le domaine C-terminal de la neurotensine se lie au tunnel entourant la lumière de l'hélice du domaine VPS10P (Quistgaard et al., 2009).

III.6. Les ligands de la sortiline

La sortiline mature lie différents ligands : son propre pro-peptide (Munck Petersen et al., 1999), la neurotensine (Mazella et al., 1998), la pro-forme du facteur de croissance



nerveuse β (pro-NGF β) (Nykjaer *et al.*, 2004), la pro-forme du facteur neurotrophique dérivé du cerveau (pro-BDNF) (Teng *et al.*, 2005), la pro-granuline (Tanimoto *et al.*, 2017), la lipoprotéine lipase (LpL) (Nielsen *et al.*, 1999), l'apo-lipoprotéine AV-14 (Nilsson *et al.*, 2008), l'isoforme 4 du transporteur de glucose (Glut-4) (Shi and Kandror, 2005) et la RAP (Petersen *et al.*, 1997). La sortiline peut aussi former des hétérodimères avec des récepteurs membranaires, tels que le récepteur des neurotrophines p75^{NTR} (Nykjaer *et al.*, 2004). L'étude de la compétition entre les ligands montre que la neurotensine a la plus forte affinité pour la sortiline et inhibe la liaison de tous les autres ligands connus (Quistgaard *et al.*, 2009).



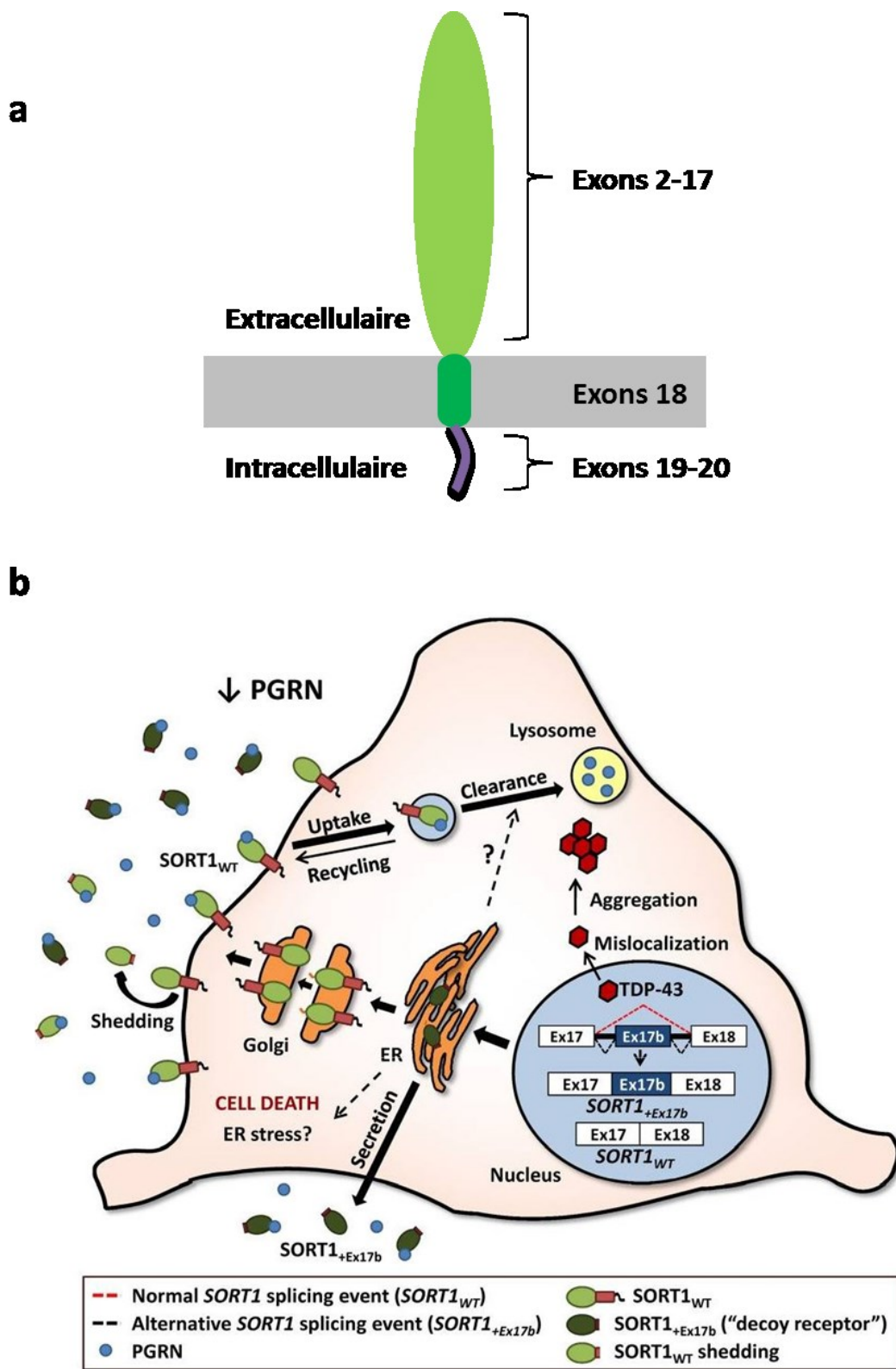


Figure 17 : (a) Représentation schématique de la structure de la sortiline. (b) Le modèle illustrant l'influence de l'exon 17b sur le métabolisme de la progranuline.

Adapté de (Prudencio *et al.*, 2012)

III.7. Le trafic de la neurotensine par la sortiline

La neurotensine est fortement exprimée dans le système nerveux central et périphérique. Ce neuropeptide présente des fonctions neurales, endocrines, cardiovasculaires et digestives (Rostène and Alexander, 1997). Jusqu'à présent, trois récepteurs de la neurotensine ont été clonés dont deux appartiennent à la famille des RCPG qui sont NTSR-1 et NTSR-2 (Vincent *et al.*, 1999). La sortiline s'est révélée comme un récepteur insolite de la neurotensine n'appartenant pas à la famille des RCPG (Mazella *et al.*, 1998). La présence des sites efficaces d'internalisation / tri dans la séquence de la sortiline suggère un rôle de cette protéine dans le transport intracellulaire de la neurotensine. Morinville *et al.* ont examiné le trafic intracellulaire de la sortiline suite au traitement à la neurotensine dans la lignée cellulaire HT29 de carcinome humain. A l'état basal, la sortiline est majoritairement localisée dans le Golgi. Une faible proportion (environ 10%) de la sortiline est localisée à la membrane plasmique, tandis qu'une proportion plus importante (environ 25%) est à l'intérieur du noyau (Morinville *et al.*, 2004). Suite à la stimulation par la neurotensine, le complexe sortiline–neurotensine est internalisé et il est ainsi engagé dans la voie endosomale. Ensuite, ce complexe est adressé au réseau trans-Golgien. A ce niveau, la sortiline présente un poids moléculaire inférieur à celui de la sortiline présente à la membrane ou dans les endosomes précoces (Morinville *et al.*, 2004). Ceci suggère la présence des deux formes distinctes de la sortiline avec des fonctions différentes selon le type de cellules. La sortiline ayant un poids moléculaire supérieur régule l'endocytose de la neurotensine à partir de la membrane plasmique, tandis que l'autre forme de poids moléculaire inférieur joue un rôle dans le tri au niveau du réseau trans-Golgien. La présence de ces deux formes suggère l'existence d'un mécanisme de clivage préalable de la forme mature et permet ainsi de s'interroger sur la nature des enzymes impliquées.

III.8. La sortiline et la signalisation de mort induite par les pro-neurotrophines

Bien que la sortiline agisse comme un récepteur de la neurotensine (Hermans-Borgmeyer *et al.*, 1999; Mazella *et al.*, 1998), elle est bien exprimée dans des régions du système nerveux central qui ne synthétisent, ni ne répondent à ce neuropeptide (Sarret *et al.*, 2003), ce qui suggère l'existence de fonctions supplémentaires de la sortiline. En effet, la sortiline est exprimée pendant l'embryogenèse dans des zones où le NGF et son précurseur, le pro-NGF, ont des effets bien caractérisés (Hermans-Borgmeyer *et al.*, 1999; Sarret *et al.*, 2003). Ces neurotrophines peuvent être libérées par les tissus neuronaux (Beattie *et al.*, 2002; Hasan *et al.*, 2003) et peuvent réguler le développement neuronal par des signalisations de survie ou de mort cellulaire. Le NGF induit la survie ou la mort cellulaire par liaison à deux récepteurs différents, TrkA (Zhang *et al.*, 2000) et p75^{NTR} (Soilu-Hänninen *et al.*, 1999) respectivement. En revanche, le pro-NGF induit sélectivement l'apoptose à travers le récepteur de mort p75^{NTR} mais pas TrkA (Lee *et al.*, 2001). Cependant, toutes les cellules exprimant p75^{NTR} ne répondent pas au pro-NGF, ce qui suggère que des protéines membranaires supplémentaires sont requises pour l'induction de la mort cellulaire. Nykjaer *et al.* ont mis en évidence le rôle du pro-NGF dans la formation d'un complexe de signalisation à travers une interaction simultanée avec p75^{NTR} et la sortiline (Nykjaer *et al.*, 2004). Ainsi, la sortiline agit comme un co-récepteur et un commutateur moléculaire régissant le signal pro-



apoptotique transduit par p75^{NTR}. Par conséquent, la sortiline favorise la signalisation apoptotique dans les cellules neuronales exprimant à la fois TrkA et p75^{NTR}, suite à sa liaison de forte affinité au pro-NGF (Nykjaer *et al.*, 2004). En absence de sortiline, les protéases extracellulaires peuvent cliver le pro-NGF (Lee *et al.*, 2001) et la forme mature induit une signalisation de survie cellulaire à travers TrkA. Une question évidente soulevée par ces résultats est de savoir s'ils reflètent une propriété unique du pro-NGF ou si les précurseurs d'autres membres de la famille des neurotrophines sont également actifs dans la modulation de la signalisation de p75^{NTR}. Un mutant non-clivable du BDNF a été générés (Teng *et al.*, 2005). Les résultats ont démontré qu'il s'agit d'un ligand pro-apoptotique efficace dans les neurones sympathiques *in vitro*. Pour initier la mort cellulaire, le pro-BDNF nécessite à la fois p75^{NTR} et la sortiline (Teng *et al.*, 2005). Ces résultats suggèrent que les pro-neurotrophines ne soient pas seulement des précurseurs intracellulaires, mais qu'elles pourraient également être des ligands ayant des fonctions physiologiques distinctes.

III.9. L'effet antidépresseur du pro-peptide de la sortiline

Le canal potassique TREK-1 a été identifié comme cible thérapeutique pour le traitement de la dépression (Heurteaux *et al.*, 2006). Dans le cerveau de rat, TREK-1 et la sortiline sont exprimés fortement dans des structures cérébrales impliquées dans la physiopathologie de la dépression, tels que le cortex préfrontal, l'amygdale, l'hippocampe, le noyau accumbens, le rachis dorsal et l'hypothalamus (Sarret *et al.*, 2003). L'étude des relations structure-fonction a permis d'identifier la séquence partielle W¹⁷-R²⁸ de la spadine comme une partie présentant une affinité à la forme mature de la sortiline similaire au pro-peptide entier (Westergaard *et al.*, 2004). De ce fait, un peptide a été conçu afin de tester son rôle potentiel dans la régulation du flux ionique engendré par TREK-1. Ce peptide conserve la séquence W¹⁷-R²⁸ ainsi que les acides aminés A¹²-P¹⁶ en amont pour maintenir un stress conformationnel (Mazella *et al.*, 2010). Dans les neurones corticaux, ce peptide lie et bloque TREK-1 spécifiquement (Mazella *et al.*, 2010). *In vivo*, les souris traitées par la spadine résistent à la dépression, de façon comparable aux souris TREK-1^{-/-} (Heurteaux *et al.*, 2006; Mazella *et al.*, 2010) Un traitement intraveineux de 4 jours avec la spadine induit non seulement un effet antidépresseur efficace, mais aussi augmente la phosphorylation du facteur de transcription de liaison aux éléments de réponse à l'AMP cyclique (CREB) dans les cellules de la zone sous-granulaire du gyrus denté, ainsi que dans la neurogénèse (Mazella *et al.*, 2010). Ce travail montre également le développement d'une méthode fiable pour doser la spadine dans le sérum de souris en utilisant la technologie AlphaScreen (une méthode basée sur la proximité physique de deux billes, donneuses et acceptrices conjuguées à des protéines). Ces résultats démontrent la fonction de la spadine comme un antidépresseur putatif de nouvelle génération avec un début d'action rapide. La spadine peut être considérée comme le premier peptide antidépresseur naturel, sans effets secondaires notamment vis-à-vis de l'absorption du glucose par les adipocytes et l'inflammation (Hivelin *et al.*, 2017).



III.10. La sortiline régule le trafic de Glut-4

Un défaut de translocation de Glut-4 sur la membrane plasmique dans les adipocytes et les myocytes squelettiques contribue potentiellement au développement du diabète sucré de type 2 (Abel *et al.*, 2001; Bogan, 2012; Huang and Czech, 2007). Glut-4 est localisé dans des vésicules de stockage spécialisées (VSS) formées dans l'appareil de Golgi (Kupriyanova and Kandror, 2000; Lin *et al.*, 1997). L'insuline stimule la translocation membranaire de Glut-4 et induit ainsi une diminution proportionnelle et simultanée du nombre des VSS (Bryant *et al.*, 2002). L'étude de la biogenèse des VSS montre qu'elles sont formées suite à l'induction de l'expression de la sortiline au 2^{ème} jour lors de la différenciation des adipocytes 3T3-L1 (Shi and Kandror, 2005). Une expression antérieure de Glut-4 conduit à une dégradation rapide du transporteur, alors que la surexpression de la sortiline augmente la formation des VSS et stimule l'absorption de glucose en réponse à l'insuline (Shi and Kandror, 2005). D'une manière très intéressante, la double transfection de la sortiline et de Glut-4 dans les adipocytes indifférenciés conduit à la formation des VSS fonctionnelles (Shi and Kandror, 2005). Ces résultats montrent que l'expression de la sortiline est essentielle et suffisante à la formation et à la régulation du trafic antérograde des VSS. Une étude récente a démontré que la sortiline contrôle le transport rétrograde de Glut-4 dans les adipocytes 3T3-L1 en protégeant le transporteur de la dégradation lysosomale (Pan *et al.*, 2017). Du point de vue mécanistique, le domaine VPS10P de la sortiline interagit avec le domaine luminal / extracellulaire de Glut-4, tandis que la queue C-terminale de la sortiline interagit avec les GGA (Nielsen *et al.*, 2001; Pan *et al.*, 2017). Ainsi, les endosomes contenant Glut-4 retournent au Golgi, sortant par conséquent de la voie d'adressage vers le lysosome. Il serait judicieux que des études ultérieures abordent les mécanismes qui régissent l'engagement de la sortiline dans le transport antéro- ou rétrograde de Glut-4.

III.11. La modulation du trafic des lipoprotéines par la sortiline

Plusieurs études d'association pan-génomiques ont démontré une corrélation entre le locus 1p13.3 contenant *SORT1* (le gène coant pour la sortiline) et le risque d'infarctus de myocarde (Aulchenko *et al.*, 2009; Kathiresan *et al.*, 2008, 2009; Sabatti *et al.*, 2009; Teslovich *et al.*, 2010; Wallace *et al.*, 2008; Willer *et al.*, 2008). Musunuru *et al.* ont démontré qu'un polymorphisme d'un seul nucléotide (SNP), rs12740374, dans ce locus crée un site fonctionnel de liaison du facteur de transcription C / EBP stimulant ainsi l'expression hépatique de *SORT1* (Musunuru *et al.*, 2010). La surexpression de la sortiline est fortement corrélée à une diminution du taux plasmatique des lipoprotéines de basse densité (LDL), notamment les LDL de très faible densité (VLDL) (Musunuru *et al.*, 2010). Les auteurs proposent un modèle dans lequel la sortiline régule négativement la sécrétion hépatique des LDL. Cependant, le locus 1p13.3 contient deux autres gènes (*CELSR2* et *PSRC1*) dont l'expression est régulée de la même manière que *SORT1* et dont les fonctions sont encore inconnues (Kathiresan *et al.*, 2008; Linsel-Nitschke *et al.*, 2010). De plus, cette étude n'aborde pas la modulation de la sortie hépatique des LDL par la sortiline du point de vue mécanistique.



Un mode d'action plus direct de la sortiline dans le métabolisme des LDL a été suggéré par Linsel-Nitschke *et al.* (Linsel-Nitschke *et al.*, 2010). Celui-ci est basé sur l'augmentation de l'absorption des LDL par les cellules embryonnaires de rein humain (HEK-293) surexprimant la sortiline. Les auteurs ont proposé un rôle de la sortiline hépatique dans l'élimination des LDL de la circulation sanguine jouant un rôle protecteur contre les maladies coronariennes. Les deux études susmentionnées montrent une corrélation négative entre le niveau d'expression de la sortiline et le taux plasmatique des LDL. Cependant, une étude récente ne montre pas une telle corrélation dans un modèle de souris KO pour la sortiline (Kjolby *et al.*, 2010). Dans ce cas, la perte d'expression de la sortiline est corrélée à une réduction des LDL et à une diminution de l'hypercholestérolémie et de l'athérosclérose chez les souris KO. En outre, la surexpression de la sortiline spécifiquement dans les hépatocytes murins a entraîné une augmentation de la sécrétion de VLDL et des niveaux plus élevés de cholestérol plasmatique (Kjolby *et al.*, 2010). Des études complémentaires *in vitro* sur des cultures primaires d'hépatocytes ont démontré une interaction directe de la sortiline avec l'apolipoprotéine B (apoB100). Sur la base de ces données, un rôle de la sortiline dans le trafic des lipoprotéines a été proposé (Kjolby *et al.*, 2010). Contrairement au modèle de Linsel-Nitschke *et al.* (Linsel-Nitschke *et al.*, 2010), Kjolby *et al.* ne détectent aucune différence dans l'endocytose des LDL en fonction de l'expression hépatique de la sortiline (Kjolby *et al.*, 2010).

Tous ces modèles suggèrent une implication de la sortiline dans les maladies cardiovasculaires. Cependant, la mécanistique et l'itinéraire intracellulaire précis de la sortiline n'est pas complètement clarifié et ne permet pas de déterminer précisément sa fonction dans ces différents modèles.

III.12. L'implication de la sortiline dans le cancer

Les données de la littérature révèlent une implication de la sortiline dans différents modèles cancéreux (Wilson *et al.*, 2016). La sortiline apparaît comme un oncogène dans le CCR (Massa *et al.*, 2013, 2014), le GBM (Xiong *et al.*, 2013), la leucémie (Bellanger *et al.*, 2011; Fauchais *et al.*, 2008; Garza-Veloz *et al.*, 2015), le mélanome (Truzzi *et al.*, 2008), les cancers du rein (De la Cruz-Morcillo *et al.*, 2016), du sein (Demont *et al.*, 2012; Roselli *et al.*, 2015), de l'ovaire (Ghaemimanesh *et al.*, 2014) et du poumon (Wilson *et al.*, 2014). Dans la plupart de ces modèles, la sortiline semble avoir un potentiel pré-métastatique l'impliquant ainsi dans la progression tumorale notamment suite à l'action des neurotrophines ou de la neurotensine. En revanche, la sortiline agit comme un suppresseur de tumeur dans le cancer de la prostate (Tanimoto *et al.*, 2015, 2017). Il serait indispensable que des études fournissent d'amples renseignements sur la mécanistique sous-jacente au rôle de la sortiline dans plusieurs de ces modèles, ainsi qu'élargir la cohorte des patients notamment dans le cadre du cancer de l'ovaire. Une brève récapitulation des données concernant l'implication de la sortiline dans ces différents modèles est donnée ci-dessous, ainsi qu'un tableau regroupant les études majeures concernant cette implication.

III.12.1. L'implication de la sortiline dans le cancer colorectal



Dans les lignées du CCR HT-29, Lovo, et Caco-2, la sortiline membranaire peut subir le clivage et la perte de son domaine extracellulaire (Navarro *et al.*, 2002). Cette forme soluble de la sortiline a été détectée également dans des cellules normales telles que les cellules microgliales (Evans *et al.*, 2011; Hermey *et al.*, 2006). De ce fait, ce mécanisme semble être une propriété spécifique de la sortiline indépendante de la lignée cellulaire utilisée. Le clivage de la partie extracellulaire de la sortiline est indépendant du ligand, mais il est fortement activé par l'ester de phorbol PMA (Navarro *et al.*, 2002) et pourrait ainsi impliquer la PKC connue pour activer le clivage du domaine extracellulaire des récepteurs membranaires via les métalloprotéases (Schlöndorff and Blobel, 1999). Le domaine clivé représente une protéine active qui peut être internalisée par les cellules cancéreuses induisant une augmentation de la concentration intracellulaire de calcium et une activation de la voie PI3K d'une manière dépendante de la phosphorylation des kinases FAK et Src (Massa *et al.*, 2013). Ces résultats suggèrent un rôle du domaine VPS10P de la sortiline soluble dans le maintien de la survie des cellules du CCR. De plus, l'internalisation de la sortiline soluble diminue l'expression de plusieurs intégrines et modifie l'architecture des desmosomes stimulant ainsi le détachement des cellules (Massa *et al.*, 2014). Le potentiel de la sortiline soluble dans la modification de la morphologie et de l'adhésion cellulaire suggère un rôle complémentaire de cette protéine dans l'individualisation des cellules, un processus crucial pour l'initiation des métastases (van Zijl *et al.*, 2011). Il est utile de noter que la sortiline interagit avec NTSR-1 à la surface des cellules du CCR (Martin *et al.*, 2002). Cet hétérodimère est internalisé suite à la stimulation par la neurotensine, d'où la nécessité d'exploiter le rôle potentiel de NTSR-1 comme une porte d'entrée du domaine VPS10P à l'intérieur de la cellule. La fonction pré-métastatique de la sortiline dans le CCR a également été suggérée par Akil *et al.* qui ont trouvé que le BDNF induit une surexpression de la sortiline (forme totale) dans des lignées primaires et métastatiques (Akil *et al.*, 2011), ce qui sous-entend que la sortiline pourrait agir sur le trafic des neurotrophines dans ce modèle.

III.12.2. L'implication de la sortiline dans le glioblastome

L'expression du pro-BDNF, p75^{NTR} et de la sortiline augmentent avec le grade pathologique chez une cohorte de patients atteints de GBM et elle est corrélée à l'agressivité de la tumeur (Xiong *et al.*, 2013). Les auteurs s'appuient sur la diminution du rapport pro-BDNF / BDNF-mature pour expliquer la résistance de ces cellules contre l'apoptose malgré l'expression forte du pro-BDNF. Ils montrent également qu'*in vitro*, la surexpression du pro-BDNF engendre une signalisation apoptotique dans la lignée C6 de GBM de rat (Xiong *et al.*, 2013). En accord avec ces résultats, Pinet *et al.* ont trouvé que l'extinction du marqueur mésenchymateux YKL-40 dans des lignées de GBM diminue l'expression de TrkB, p75^{NTR} et de la sortiline et engendre un phénotype moins agressif (Pinet *et al.*, 2016).

III.12.3. L'implication de la sortiline dans le cancer du rein

De La Cruz-Morcillo *et al.* ont trouvé que le pro-BDNF, p75^{NTR}, et dans une moindre mesure TrkB et la sortiline sont surexprimés dans le tissu tumoral par comparaison avec le tissu contrôle dans une cohorte de patients atteints de carcinome rénal à cellules claires



(De la Cruz-Morcillo *et al.*, 2016). Ces auteurs montrent pour la première fois que le pro-BDNF augmente la viabilité et la migration des cellules cancéreuses du rein *in vitro*. Cependant, dans cette étude, ces mécanismes ne sont pas corrélés à l'expression de la sortiline.

III.12.4. L'implication de la sortiline dans la leucémie

Fauchais *et al.* ont démontré que la privation sérique stimule la sécrétion du BDNF par des lignées de lymphocytes B aussi bien que l'expression membranaire de ses récepteurs p75^{NTR} et TrkB. Le BDNF exerce un effet autocrine et anti-apoptotique sur les cellules B. Cet effet protecteur du BDNF dépend de la sortiline qui semble être un élément clé dans cette boucle de régulation (Fauchais *et al.*, 2008). Ces résultats suggèrent un rôle de la sortiline dans la survie des cellules de la leucémie lymphoblastique de type B, au regard de l'expression des neurotrophines et de leurs récepteurs dans des conditions de culture normale dans les lignées de lymphome diffus à grandes cellules (Bellanger *et al.*, 2011). Une analyse transcriptomique de 45 gènes sur une cohorte de 73 patients atteints d'une leucémie aigue lymphoblastique a décrit une corrélation positive entre l'expression de *SORT1* et l'échappement thérapeutique exclusivement chez les adultes (18 patients) et uniquement à la 8^{ème} semaine de traitement (Garza-Veloz *et al.*, 2015). Le nombre restreint de données ne permet pas de conclure sur le rôle de la sortiline dans la résistance thérapeutique dans ces différents modèles.

III.12.5. L'implication de la sortiline dans le cancer du sein

De nombreuses lignées cancéreuses du sein expriment et secrètent le pro-NGF dans le milieu de culture (Demont *et al.*, 2012). Des analyses immunohistochimiques ont révélé une surexpression du pro-NGF dans des échantillons tumoraux de cancer du sein en comparaison avec des biopsies contrôles. Une corrélation entre l'expression des marqueurs et l'invasion des ganglions lymphatiques a été établie (Demont *et al.*, 2012). Contrairement à son rôle pro-apoptotique dans les neurones (Beattie *et al.*, 2002), le pro-NGF stimule la migration des cellules cancéreuses du sein (Demont *et al.*, 2012). Le mécanisme sous-jacent à cette boucle autocrine dépend de TrkA et de la sortiline avec une activation des kinases AKT et Src mais pas de la voie des MAPKs (Demont *et al.*, 2012). Une étude récente a analysé l'expression de la sortiline dans 318 tissus tumoraux du sein (Roselli *et al.*, 2015). En accord avec les résultats obtenus dans ce modèle, la sortiline est fortement exprimée dans le carcinome canalaire invasif, ainsi que dans le carcinome lobulaire invasif (Roselli *et al.*, 2015). L'expression de la sortiline était corrélée avec l'atteinte des ganglions lymphatiques (Roselli *et al.*, 2015). *In vitro*, l'inhibition de l'expression de la sortiline est associée à une diminution de la migration, la prolifération, l'activation des kinases FAK et Src. Ces résultats suggèrent un potentiel pré-métastatique de la sortiline dans le cancer du sein, en accord avec les résultats obtenus dans le cadre du CCR (Massa *et al.*, 2013, 2014).



III.12.6. L'implication de la sortiline dans le cancer de l'ovaire

Une étude sur 7 échantillons tumoraux de carcinome ovarien a montré une surexpression de la sortiline en comparaison avec 5 tissus contrôles (kystes ovariens) (Ghaemimanesh *et al.*, 2014). L'extinction de l'expression de la sortiline par siARN augmente l'apoptose et diminue la prolifération des cellules Caov-4 de carcinome ovarien (Ghaemimanesh *et al.*, 2014). Les auteurs en déduisent un rôle de la sortiline dans la survie des cellules tumorales de l'ovaire et proposent que la sortiline puisse représenter une nouvelle cible thérapeutique dans ce cancer.

III.12.7. L'implication de la sortiline dans le mélanome

Les cellules tumorales de mélanome primaire et métastatique synthétisent et secrètent les neurotrophines et elles expriment leurs récepteurs (Truzzi *et al.*, 2008). Les neurotrophines exercent leur fonction autocrine en favorisant la viabilité cellulaire d'une manière dépendante des récepteurs de la famille Trk (Truzzi *et al.*, 2008). Elles stimulent également la migration des cellules cancéreuses notamment les cellules des lignées métastatiques. L'induction de la migration par les neurotrophines dépend de p75^{NTR} et des Trks. D'une manière intéressante, le pro-NGF induit la migration des cellules du mélanome *via* la sortiline et p75^{NTR} (Truzzi *et al.*, 2008). Ces résultats indiquent que la sortiline joue un rôle dans la progression du mélanome et suggèrent une fonction dans la sécrétion des neurotrophines par les cellules cutanées dans la modulation du microenvironnement tumoral.

III.12.8. L'implication de la sortiline dans le cancer du pancréas

Les cellules de l'adénocarcinome ductulaire du pancréas peuvent migrer aussi bien collectivement qu'individuellement (Friedl and Wolf, 2003; Hegerfeldt *et al.*, 2002). La neurotensine module la migration de ces cellules d'une manière largement dépendante de la matrice extracellulaire (Mijatovic *et al.*, 2007). La neurotensine inhibe la migration collective mais elle stimule la migration individuelle des cellules cancéreuses du pancréas sur une matrice de vitronectine, cet effet dépend principalement de la sortiline (Mijatovic *et al.*, 2007). La neurotensine altère l'expression des sous-unités αV et $\beta 5$ des intégrines (Mijatovic *et al.*, 2007). Elle induit aussi des altérations dans le cytosquelette d'actine modifiant ainsi les propriétés adhésives des cellules (Mijatovic *et al.*, 2007). Les auteurs de cette étude suggèrent une implication forte de la neurotensine et de la sortiline dans le processus métastatique du cancer pancréatique.

III.12.9. L'implication de la sortiline dans le cancer de la prostate

Le facteur de croissance pro-granuline stimule la migration, l'invasion et la prolifération des cellules cancéreuses de la prostate à travers l'activation d'AKT et de la voie



des MAPKs (Monami *et al.*, 2009). Au niveau transcriptomique, la pro-granuline est surexprimée dans le tissu tumoral prostatique, ce qui suggère un rôle de ce facteur de croissance dans la formation des métastases (Monami *et al.*, 2009). La sortiline est faiblement exprimée dans différentes lignées cancéreuses de la prostate, notamment le cancer de la prostate hormono-résistant (Tanimoto *et al.*, 2015). La surexpression de la sortiline provoque une diminution de l'activation et de la stabilité d'AKT (Tanimoto *et al.*, 2015). Ces résultats sont compatibles avec ceux obtenus à la suite de l'inhibition de la pro-granuline (Monami *et al.*, 2009). La surexpression de la sortiline inhibe également la migration, l'invasion et la prolifération des cellules cancéreuses de la prostate (Tanimoto *et al.*, 2015). D'une manière intéressante, la sortiline favorise l'endocytose (clathrine dépendante) de la pro-granuline, ainsi que son adressage vers la dégradation lysosomale atténuant la signalisation oncogénique (Tanimoto *et al.*, 2015). Ces résultats suggèrent fortement que la perte de l'expression de la sortiline est associée à une progression du cancer de la prostate. En revanche, des altérations dans la biogenèse des endosomes ont été décrites dans le cancer de la prostate (Johnson *et al.*, 2014). Ceci a conduit à l'étude des signatures transcriptomiques des gènes impliqués dans la biogenèse ou associés aux endosomes. L'expression de *SORT1* est significativement corrélée à un mauvais pronostic et un risque d'échappement thérapeutique (Johnson *et al.*, 2015). Cependant, la cohorte des patients est restreinte et les auteurs n'abordent pas l'expression protéique de la sortiline qui ne représente pas le cœur de cette étude (Johnson *et al.*, 2015).

III.12.10. L'implication de la sortiline dans le cancer du poumon

D'une manière extrêmement intéressante, Wilson *et al.* ont découvert un complexe formé par l'assemblage d'une protéine de tri, la sortiline, avec deux RTKs qui sont l'EGFR et TrkB (Wilson *et al.*, 2014). Ce complexe (nommé complexe TES) est sécrété dans les exosomes de la lignée du CBNPC A549 et exerce un contrôle sur les cellules endothéliales favorisant ainsi l'angiogenèse tumorale (Figure 18). L'extinction de la sortiline inhibe fortement le chargement et la sécrétion de ces deux RTKs dans les exosomes. En outre, la sortiline exosomale présente un poids moléculaire inférieur à celui de la sortiline intracellulaire (Wilson *et al.*, 2014). Ces résultats soulignent l'importance de la sortiline dans le tri des RTKs et suggèrent un rôle clé de cette protéine dans le trafic intracellulaire de ces récepteurs en amont du chargement dans les vésicules intraluminales.



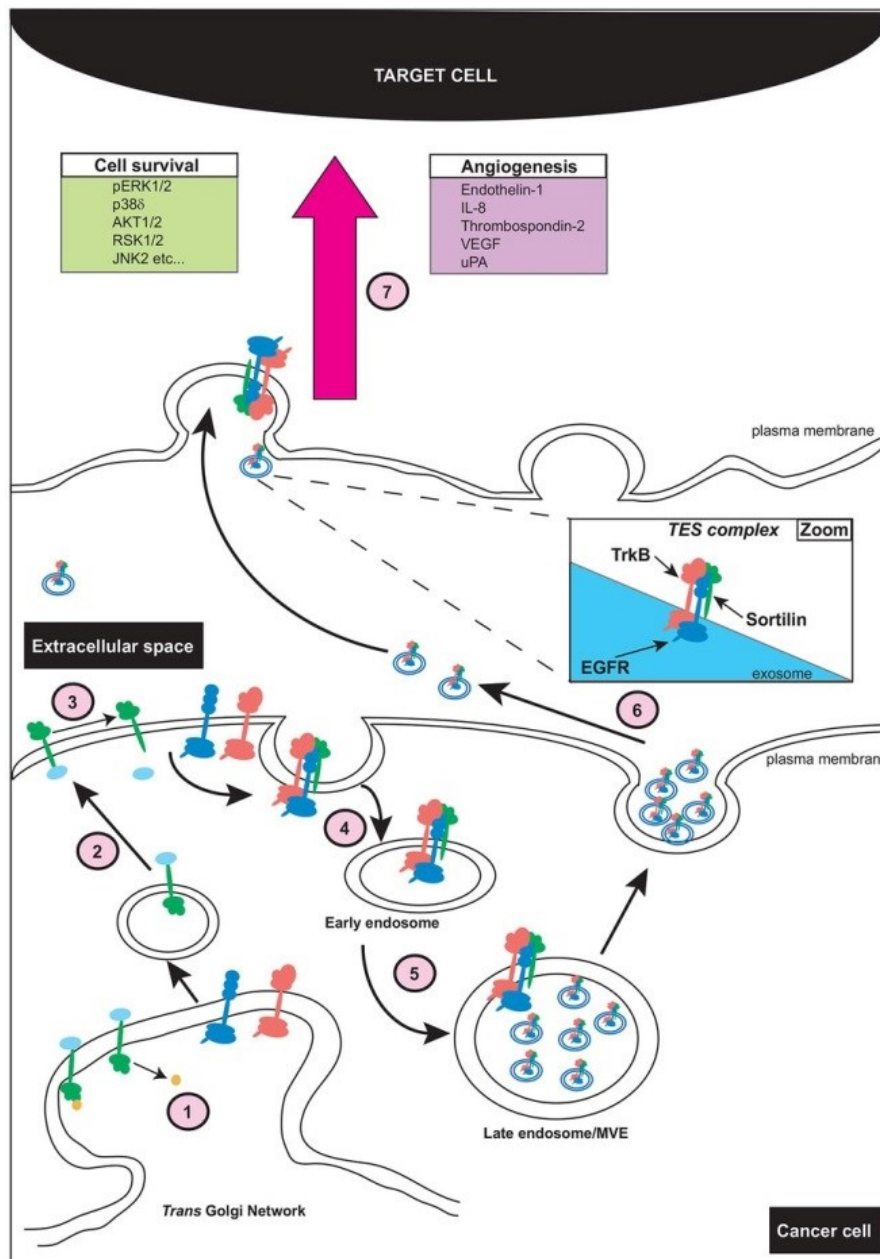


Figure 18 : le rôle de la sortiline dans la biogenèse des exosomes.

Pendant la voie sécrétoire, la sortiline est synthétisée sous forme d'une pro-protéine qui est clivée dans le Golgi par des convertases (étape 1). En aval de la voie sécrétoire, plusieurs itinéraires existent pour la sortiline. Seul son rôle dans le chargement de l'EGFR et de TrkB dans les exosomes est présenté (étapes 2-6). L'étape 7 représente l'effet pro-angiogénique de ces exosomes sur la cellule cible. D'après Wilson *et al.*, 2014.

Cancer	Auteurs	Effet	Mécanistique	Patients
GBM	Xiong <i>et al.</i> , 2015	+apoptose <i>in vitro</i>	Pro-BDNF/p75 ^{NTR} /sortiline	65
Sein	Demont <i>et al.</i> , 2012	+migration	Pro-NGF/TrkA/sortiline +AKT +MAPK	X
	Roselli <i>et al.</i> , 2015	+migration +prolifération	+FAK +Src	318
Poumon	Wilson <i>et al.</i> , 2014	+angiogenèse	+MAPK	X
Rein	De la Cruz Morcillo <i>et al.</i> , 2016	+migration	Pro-BDNF/ p75 ^{NTR} /sortiline/TrkB-T1	83
CRC	Massa <i>et al.</i> , 2013	+Migration	+PI3K +FAK +Src	X
	Massa <i>et al.</i> , 2014	+Migration	Altération des desmosomes et des intégrines	X
Pancréas	Mijatovic <i>et al.</i> , 2007	+Migration individuelle	≥ intégrines α V β 5	X
Ovaire	Ghaemimanesh <i>et al.</i> , 2014	-apoptose	X	7
Mélanome	Truzzi <i>et al.</i> , 2008	+Migration	Pro-NGF/p75 ^{NTR} /sortiline	X
Prostate	Tanimoto <i>et al.</i> , 2015	-Prolifération - Migration - Invasion	-Progranuline -AKT	X

Tableau 2 : récapitulatif des études majeures sur l'implication de la sortiline dans le cancer. Pour chaque cancer, l'effet potentiel de la sortiline, la mécanistique sous-jacente et le nombre de patients recrutés sont indiqués. + : stimule / active ; - : inhibe ; ≥ augmente ; X : absence.

III.13. « A new role under sortilin's belt in cancer » (Wilson *et al.*, 2016)



A new role under sortilin's belt in cancer

Cornelia M. Wilson^{a,c}, Thomas Naves^a, Hussein Al Akhrass^a, François Vincent^{a,b}, Boris Melloni^b, François Bonnaud^b, Fabrice Lalloué^a, and Marie-Odile Jauberteau^a

^aEA3842 Homéostasie cellulaire et pathologies and Chaire de Pneumologie Expérimentale, Faculté de Médecine, Université de Limoges, Limoges, France; ^bService de Pathologie Respiratoire, Center Hospitalier et Universitaire de Limoges, Limoges, France; ^cUniversity of Liverpool, Institute of Translational Medicine, Department of Molecular & Clinical Cancer Medicine, Liverpool, UK

ABSTRACT

The neurotensin receptor-3 also known as sortilin was the first member of the small family of vacuolar protein sorting 10 protein domain (Vps10p) discovered two decades ago in the human brain. The expression of sortilin is not confined to the nervous system but sortilin is ubiquitously expressed in many tissues. Sortilin has multiple roles in the cell as a receptor or a co-receptor, in protein transport of many interacting partners to the plasma membrane, to the endocytic pathway and to the lysosomes for protein degradation. Sortilin could be considered as the cell's own shuttle system. In many human diseases including neurological diseases and cancer, sortilin expression has been shown to be deregulated. In addition, some studies have highlighted that the extracellular domain of sortilin is shed into the culture media by an unknown mechanism. Sortilin can be released in exosomes and appears to control some mechanisms of exosome biogenesis. In lung cancer cells, sortilin can associate with two receptor tyrosine kinase receptors called the TES complex found in exosomes. Exosomes carrying the TES complex can convey a microenvironment control through the activation of ErbB signaling pathways and the release of angiogenic factors. Deregulation of sortilin function is now emerging to be implicated in four major human diseases: cardiovascular disease, Type 2 diabetes mellitus, Alzheimer disease and cancer.

ARTICLE HISTORY

Received 20 November 2015
Revised 4 December 2015
Accepted 4 December 2015

KEYWORDS

exosome; EGFR; lung cancer; sortilin; TrkB

Exosomes discovery timeline

Exosomes are small extracellular vesicles ("cell bubbles") secreted by most eukaryotic cells. They range from 30 to 100nm in size found in the cell culture media and many biological fluids such as blood, saliva and urine, and hence have a potential involvement in intercellular communication. They were originally described in 1983 such as small released vesicles from the multivesicular body (or also known as multivesicular late endosome) fusion with the plasma membrane during red blood cell maturation¹ (Figure 1). For many years these vesicles were believed to be the cell's own garage disposal route. Some years later, these scarcely understood microvesicles have been called exosomes.² Since the last decade, exosomal research is growing exponentially, especially after the discovery of distinct subsets of RNAs into the exosomal cargo,³ which has enriched the knowledge of the molecular cocktail that may be shuttled by exosomes. In doing so, many laboratories have investigated the close link between exosome secretion and disease,

indicative but not exhaustive, such as cardiomyocyte hypertrophy,⁴ diabetes⁵ and cancer.⁶⁻⁸ Remarkably, cancer cells may take advantage of exosome secretion in order to control the tumor microenvironment, and could endorse thereby the aggressiveness and the tumorigenic features of the tumor, such as angiogenesis,⁶ invasion^{8,9} and therapeutic escape.⁷ Encouragingly, exosomes are shedding light on their utility as disease diagnostic markers,^{10,11} as well as in the development of novel cancer treatment,¹² and could take the lion's share of this major challenge.

Sortilin

Sortilin is a newly identified member of a small family of proteins characterized to contain a Vps10p domain. Sortilin can function alone or as part of a co-receptor as well as a transporter of proteins from the trans-Golgi network (TGN).¹³ As a co-receptor of p75 neurotrophin receptor (p75^{NTR}), sortilin binds the immature, pro-forms of nerve growth factor (NGF) or brain derived

CONTACT Cornelia M. Wilson  cornelia.wilson@unilim.fr, Cornelia.Wilson@liverpool.ac.uk  University of Liverpool, Institute of Translational Medicine, Dept of Molecular & Clinical Cancer Medicine, Liverpool, L7 8TX, UK.

© Cornelia M. Wilson, Thomas Naves, Hussein Al Akhrass, François Vincent, Boris Melloni, François Bonnaud, Fabrice Lalloué, and Marie-Odile Jauberteau
This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>), which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited. The moral rights of the named author(s) have been asserted.

Published with license by Taylor & Francis Group, LLC

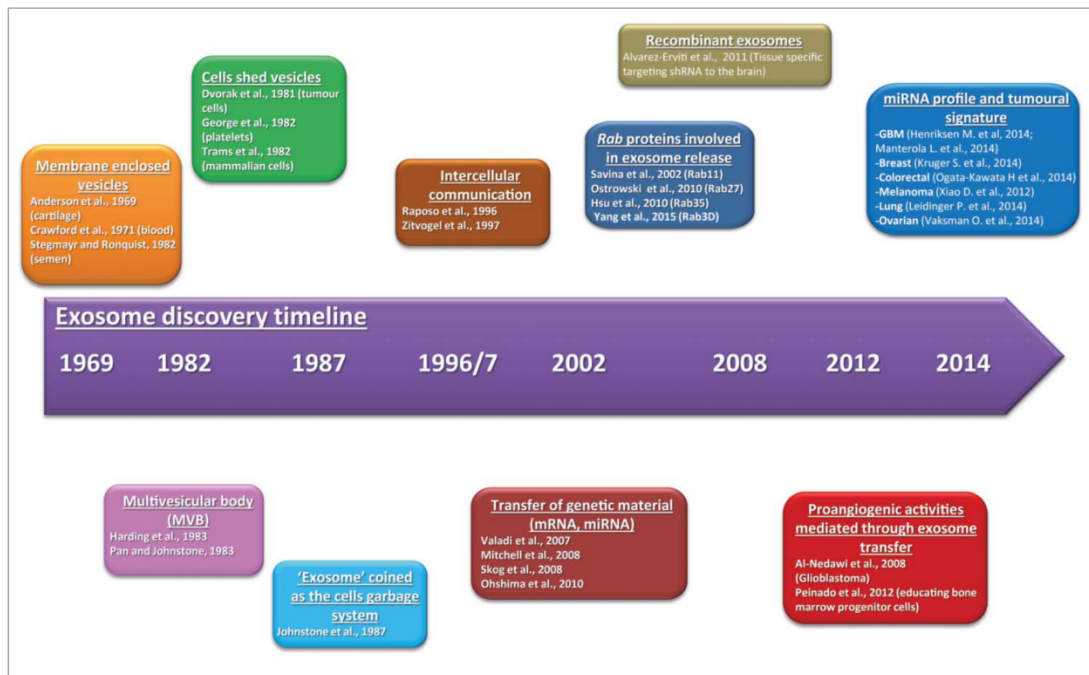


Figure 1. Main discoveries in extracellular vesicle biology. Timeline showing the main discoveries in the extracellular vesicle research.

neurotrophic growth factor (BDNF) and induces apoptosis in neuronal cells.¹⁴ Sortilin's cytoplasmic tail shares similarity to the mannose-6-phosphate receptor with colocalisation to the endosomes and endosome to TGN cargo vesicles.¹⁵ In addition, sphingolipid activator proteins, acid sphingomyelinase, and cathepsin D and H have been shown to be trafficked by sortilin to the lysosomes.¹⁶⁻¹⁸ These studies demonstrate that sortilin has a dual role both in endocytosis and in receptor trafficking allowing the correct sorting of ligands from the cell surface to lysosomes and the traffic of pro-neurotrophins (proNTs) such as the neuropeptide neurotensin (NT), proNGF and proBDNF.^{14,19-23}

Role of sortilin in cancer

Given the important function of pro-neurotrophin receptors such as sortilin play in cellular development, cell survival and death.²⁴ An imbalance in cellular homeostasis can be affected by neurotrophin signaling which could lead to the progression of cancer.^{24,25} Not surprising, sortilin expression is elevated in several human cancer cells including brain, prostate, colon, pancreas, skin, pituitary.²⁵⁻²⁹ Some of the initial studies demonstrated that a furin-cleaved form of sortilin could bind NT at the cell surface^{19,20} and traffic NT to the endocytic pathway while maintaining a constant level of sortilin expression at the cell surface.²¹ In a later study, sortilin was shown to be released from cells requiring cleavage of

sortilin luminal domain by a protein kinase C-dependent protease.³⁰ However, the mechanism used for sortilin release from these cells and the consequence to the microenvironment was uncertain. In colon cancer, sortilin forms a dimeric complex with NTSR1 which is internalised upon NT stimulation.³¹ The binding of NT to sortilin-NTSR1 and trafficking of this complex induces signaling pathways by modification of mitogen-activated protein (MAP) kinases and the turnover of phosphoinositide (PI) facilitated by NTSR1.³¹ It is not known why sortilin is released from cancer cells but evidence is now emerging to implicate that sortilin may modify the neighboring cells/environment. Massa and colleagues studied the human adenocarcinoma epithelial cell line (HT29) to assess the ability of soluble sortilin to be released and internalised using radioreceptor assays and microscopy.³² The binding of soluble sortilin is independent from the transactivation of the epidermal growth factor receptor (EGFR) resulting in raised intracellular calcium concentration and significant activation of PI3 kinase pathway through Akt phosphorylation dependent upon of FAK/Src phosphorylation.³² The PI3 kinase pathway is implicated in the survival mechanisms of cancer cells.³³ The action of soluble sortilin could be explained to have an autocrine/paracrine function.

A number of reports have hinted that NT mediated by sortilin stimulated by an autocrine/paracrine function could be a mechanism associated with the tumorigenesis.²⁶⁻²⁸ The cell responds to two types of neurotrophin

signal, one elicited by the p75^{NTR} and the other by Trk tyrosine kinase receptors.³⁴ Sortilin can interact with either of these receptors but the consequential outcome affects cell survival. Sortilin traffics from the TGN to the cell surface through the secretory pathway where it interacts with p75^{NTR} that can signal a pro-neurotrophin-induced cell death. The signals induce cell death by the

pathway of c-Jun N-terminal kinase 3 and caspases 3, 6 and 9.³⁵⁻³⁸ Trk interaction with sortilin promotes cell survival, differentiation, innervation and plasticity /effect cell survival. Sortilin can associate with all the Trk receptors (A, B and C)^{24,25} implicating an important role in cell survival that is disrupted in human disease.

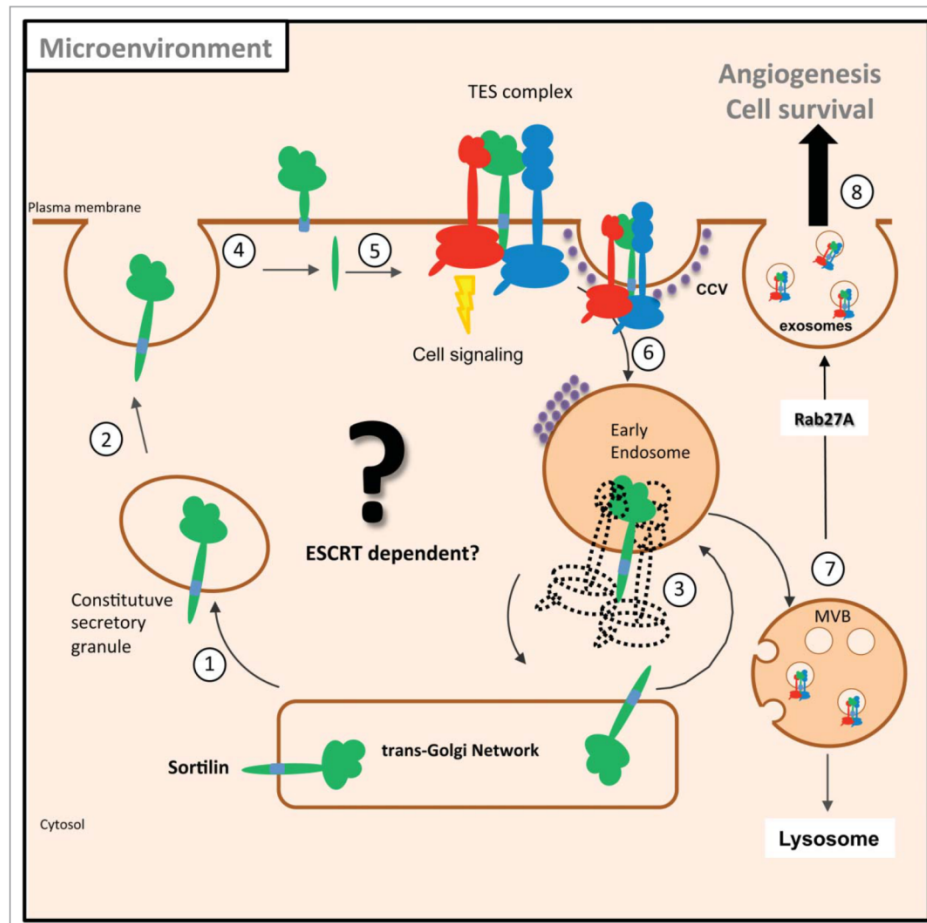


Figure 2. Role of sortilin in EV biogenesis. Sortilin is initially synthesized in the constitutive secretory pathway as a precursor encoding a short propeptide sequence. The propeptide is cleaved by pro-protein convertases at the TGN allowing sortilin to enter the secretory pathway (stage 1). There are a number of likely routes that sortilin can be trafficked. Sortilin can be trafficked along a number of possible routes such as trafficking to the plasma membrane through constitutive secretory vesicles (stage 2). Alternatively, sortilin could be anterograde transported from the TGN by itself or with its binding partners to the early endosomes (stage 3). Sortilin present at the cell surface or in the endocytic pathway could be cleaved by disintegrin and metalloproteinase domain-converting protein (ADAM) 10 or ADAM17, and followed by g-secretase (stage 5). Following endoproteolytic cleavage, sortilin could form a heterotrimeric complex with TrkB and EGFR (TES complex) which is internalized through a clathrin-dependent endocytosis process into early endosomes (stage 6). At the plasma membrane, the purple spots represent clathrin associated with vesicles (clathrin-coated vesicles [CCV]) or the bilayered clathrin coats at the endosome. The intraluminal vesicles (ILV) are formed by an invagination event at the membrane of the late endosomes/multivesicular body (MVB). Sortilin may play a role in the recruitment of certain cargo such as its binding partners- TrkB and EGFR, which could be an ESCRT-dependent mechanism. The MVB and its content could be degraded via the lysosome-mediated pathway for degradation or alternatively the MVB are transported to the cell surface where they dock at the plasma membrane requiring Rab27A to release the vesicles into the extracellular space (stage 7). The exosomes carrying the TES complex could be released and taken up in the target cell. The uptake of TES-containing exosomes initiates cellular communication through upregulation of cell signaling events by the induction of cell survival through the EGFR cascade and the angiogenesis process (stage 8).

Sortilin is a key component of exosome biogenesis

Unprecedented reports have found that sortilin expression level is associated to different types of cancer.²⁴⁻²⁶ Some of these studies have implicated that sortilin could play a role in the tumorigenesis process.^{24,26} Our team has been interested in these links between sortilin and cancer and at the same time the cross-talk between the epidermal growth factor receptor (EGFR) and tyrosine kinase receptor (Trk) signaling pathways.¹³ We have discovered that sortilin can form a novel complex with TrkB and EGFR found in exosomes that are released from lung cancer cells conveying a microenvironmental control upon endothelial cells.³⁹ In this study, we examined closely the secretion mechanism utilized for the extracellular domain of sortilin from human lung cancer cells (A549) and the effect on the microenvironment. We show for the first time that sortilin uses a ‘canonical pathway’ and can be found in exosomes. We demonstrate that sortilin is a key component of exosomes mediating communication between A549 and endothelial cells (Figure 2). Sortilin is already known to play a prime function in cancer cells; however we have reported herein that it plays a new role in both the assembly of a tyrosine kinase complex and its exosome release. This novel complex called ‘**TES**’ complex expressed by exosomes results in the linkage of two tyrosine kinase receptors, TrkB and EGFR with sortilin. We demonstrate in this study that the TES complex conveys a control on the microenvironment i.e. endothelial cells and initiates the activation of angiogenesis via exosome transfer. Therefore, our data suggested that sortilin and its partners have a paracrine through exosome transfer and control of the microenvironment. This novel complex containing sortilin could play the role as a molecular switch in cancer progression by promoting angiogenesis.

The unanswered questions of sortilin’s role in exosome/EV biogenesis

It is well appreciated that MVBs have two fates in the cell; they act as a platform to deliver cargo destined for lysosome-mediated degradation or as a portal to release ILVs/exosomes from the cell. The endosomal sorting of cargo is mediated by a sequence events involving four multiprotein complexes (ESCRT0, -I, -II, and -III). The clathrin coats condense and cluster cargo at the cytosolic face of the MVB membrane ready to be captured and recruited to ILVs. These early events of cargo recruitment are assisted by the ESCRT machinery, ESCRT-0 and ESCRT-I. In a previous study, the HRS gene found in the ESCRT-0 complex could be involved in the

formation and secretion of exosomes.⁴⁰ Knocking down some of the genes that encode for components of the ESCRT-0 complex (HRS, STAM1 or TSG101) perturb exosome release and affect the size and/or protein content of the ILVs demonstrating an important role played by the ESCRT complex.⁴¹ Our data suggested a possible unreported new role for sortilin as a possible cargo recruiter to ILVs through cargo recognition and sorting at the MVB. The challenge remains to determine several questions: (1) what is the intracellular route of sortilin trafficking through the secretory pathway; (2) at what stage is sortilin important for ILV formation at the MVB; (3) what is sortilin’s mechanism to recruit cargo or the regulation of ILV formation; (4) and at the same time whether sortilin released as exosomes from cells plays a role in the angiogenesis process. Furthermore, an imbalance in sortilin expression in cancer could alter the content of exosomes regulating the delivery of both a genomic and proteomic content to the target cells. To this end, the challenge remains to define the exact role of sortilin in cancer thus providing clues to sortilin’s global role in other types of human diseases.

Disclosure of potential conflicts of interest

No potential conflicts of interest were disclosed.

References

- [1] Harding C, Heuser J, Stahl P. Receptor-mediated endocytosis of transferrin and recycling of the transferrin receptor in rat reticulocytes. *J Cell Biol* 1983; 97:329-39; PMID:6309857; <http://dx.doi.org/10.1083/jcb.97.2.329>
- [2] Johnstone RM, Adam M, Hammond JR, Orr L, Turbide C. Vesicle formation during reticulocyte maturation. Association of plasma membrane activities with released vesicles (exosomes). *J Biol Chem* 1987; 262:9412-20.
- [3] Valadi H, Ekström K, Bossios A, Sjöstrand M, Lee JJ, Lötvall JO. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol* 2007; 9:654-9; PMID:17486113; <http://dx.doi.org/10.1038/ncb1596>
- [4] Bang C, Batkai S, Dangwal S, Gupta SK, Foinquinos A, Holzmann A, Just A, Remke J, Zimmer K, Zeug A, et al. Cardiac fibroblast-derived microRNA passenger strand-enriched exosomes mediate cardiomyocyte hypertrophy. *J Clin Invest* 2014; 124:2136-46; PMID:24743145; <http://dx.doi.org/10.1172/JCI70577>
- [5] Lei H, Venkatakrisnan A, Yu S, Kazlauskas A. Protein kinase A-dependent translocation of Hsp90 α impairs endothelial nitric-oxide synthase activity in high glucose and diabetes. *J Biol Chem* 2007; 282:9364-71; PMID:17202141; <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M608985200>
- [6] Chowdhury R, Webber JP, Gurney M, Mason MD, Tabi Z, Clayton A. Cancer exosomes trigger mesenchymal stem cell differentiation into pro-angiogenic and pro-invasive myofibroblasts. *Oncotarget* 2014; 6:715-31.

- [7] Ciravolo V, Huber V, Ghedini GC, Venturelli E, Bianchi F, Campiglio M, Morelli D, Villa A, Della Mina P, Menard S, et al. Potential role of HER2-overexpressing exosomes in countering trastuzumab-based therapy. *J Cell Physiol* 2012; 227:658-67; PMID:21465472; <http://dx.doi.org/10.1002/jcp.22773>
- [8] Singh R, Pochampally R, Watabe K, Lu Z, Mo YY. Exosome-mediated transfer of miR-10b promotes cell invasion in breast cancer. *Mol Cancer* 2014; 13:256; PMID:25428807; <http://dx.doi.org/10.1186/1476-4598-13-256>
- [9] Kaplan RN, Riba RD, Zacharoulis S, Bramley AH, Vincent L, Costa C, MacDonald DD, Jin DK, Shido K, Kerns SA, et al., VEGFR1-positive haematopoietic bone marrow progenitors initiate the pre-metastatic niche. *Nature* 2005; 438:820-7; PMID:16341007; <http://dx.doi.org/10.1038/nature04186>
- [10] Hogan MC, Bakeberg JL, Gainullin VG, Irazabal MV, Harmon AJ, Lieske JC, Charlesworth MC, Johnson KL, Madden BJ, Zenka RM, et al. Identification of Biomarkers for PKD1 Using Urinary Exosomes. *J Am Soc Nephrol* 2014; 26:1661-70.
11. Musante L, Tataruch DE, Holthofer H, Use and isolation of urinary exosomes as biomarkers for diabetic nephropathy. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2014; 5:149; PMID:25309511
- [12] Yang T, Martin P, Fogarty B, Brown A, Schurman K, Phipps R, Yin VP, Lockman P, Bai S. Exosome Delivered Anticancer Drugs Across the Blood-Brain Barrier for Brain Cancer Therapy in Danio Rerio. *Pharm Res* 2015; 32:2003-14
- [13] Wilson CM, Naves T, Saada S, Pinet S, Vincent F, Lalloué F, Jauberteau MO. The implications of sortilin/vps10p domain receptors in neurological and human diseases. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 2014; 13:1354-65; PMID:25345507; <http://dx.doi.org/10.2174/1871527313666141023151642>
- [14] Nykjaer A, Lee R, Teng KK, Jansen P, Madsen P, Nielsen MS, Jacobsen C, Kliemann M, Schwarz E, Willnow TE, et al., Sortilin is essential for proNGF-induced neuronal cell death. *Nature* 2004; 427:843-8; PMID:14985763; <http://dx.doi.org/10.1038/nature02319>
- [15] Mari M, Bujny MV, Zeuschner D, Geerts WJ, Griffith J, Petersen CM, Cullen PJ, Klumperman J, Geuze HJ. SNX1 defines an early endosomal recycling exit for sortilin and mannose 6-phosphate receptors. *Traffic* 2008; 9:380-93; PMID:18088323; <http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-0854.2007.00686.x>
- [16] Canuel M, Lefrancois S, Zeng J, Morales CR. AP-1 and retromer play opposite roles in the trafficking of sortilin between the Golgi apparatus and the lysosomes. *Biochem Biophys Res Commun* 2008; 366:724-30; PMID:18078806; <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2007.12.015>
- [17] Lefrancois S, Zeng J, Hassan AJ, Canuel M, Morales CR. The lysosomal trafficking of sphingolipid activator proteins (SAPs) is mediated by sortilin. *EMBO J* 2003; 22:6430-7; <http://dx.doi.org/10.1093/emboj/cdg629>
- [18] Ni X, Morales CR. The lysosomal trafficking of acid sphingomyelinase is mediated by sortilin and mannose 6-phosphate receptor. *Traffic* 2006; 7:889-902; PMID:16787399; <http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-0854.2006.00429.x>
- [19] Mazella J, Zsürger N, Navarro V, Chabry J, Kaghad M, Caput D, Ferrara P, Vita N, Gully D, Maffrand JP, et al. The 100-kDa neurotensin receptor is gp95/sortilin, a non-G-protein-coupled receptor. *J Biol Chem* 1998; 273:26273-6; PMID:9756851; <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.273.41.26273>
- [20] Munck Petersen C, Nielsen MS, Jacobsen C, Tauris J, Jacobsen L, Gliemann J, Moestrup SK, Madsen P. Propeptide cleavage conditions sortilin/neurotensin receptor-3 for ligand binding. *EMBO J* 1999; 18:595-604; PMID:9927419; <http://dx.doi.org/10.1093/emboj/18.3.595>
- [21] Navarro V, Martin S, Sarret P, Nielsen MS, Petersen CM, Vincent J, Mazella J. Pharmacological properties of the mouse neurotensin receptor 3. Maintenance of cell surface receptor during internalization of neurotensin. *FEBS Lett*, 2001. 495:100-5; PMID:11322955; [http://dx.doi.org/10.1016/S0014-5793\(01\)02367-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0014-5793(01)02367-5)
- [22] Teng HK, Teng KK, Lee R, Wright S, Tevar S, Almeida RD, Kermani P, Torkin R, Chen ZY, Lee FS, et al. ProBDNF induces neuronal apoptosis via activation of a receptor complex of p75NTR and sortilin. *J Neurosci* 2005; 25:5455-63; PMID:15930396; <http://dx.doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5123-04.2005>
- [23] Nilsson SK, Christensen S, Raarup MK, Ryan RO, Nielsen MS, Olivecrona G. Endocytosis of apolipoprotein A-V by members of the low density lipoprotein receptor and the VPS10p domain receptor families. *J Biol Chem*, 2008. 283:25920-7; PMID:18603531; <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M802721200>
- [24] Vaegter CB, Jansen P, Fjorback AW, Glerup S, Skeldal S, Kjolby M, Richner M, Erdmann B, Nyengaard JR, Tessarollo L, et al. Sortilin associates with Trk receptors to enhance anterograde transport and neurotrophin signaling. *Nat Neurosci* 2011; 14:54-61.
- [25] Akil H, Perraud A, Melin C, Jauberteau MO, Mathonnet M. Fine-tuning roles of endogenous brain-derived neurotrophic factor, TrkB and sortilin in colorectal cancer cell survival. *PLoS One* 2011; 6:e25097.
- [26] Dal Farra C, Sarret P, Navarro V, Botto JM, Mazella J, Vincent JP. Involvement of the neurotensin receptor subtype NTR3 in the growth effect of neurotensin on cancer cell lines. *Int J Cancer* 2001; 92:503-9.
- [27] Truzzi F, Marconi A, Lotti R, Dallaglio K, French LE, Hempstead BL, Pincelli C. Neurotrophins and their receptors stimulate melanoma cell proliferation and migration. *J Invest Dermatol* 2008; 128:2031-40.
- [28] Giorgi RR, Chile T, Bello AR, Reyes R, Fortes MA, Machado MC, Cescato VA, Musolino NR, Bronstein MD, Giannella-Neto D, et al. Expression of neurotensin and its receptors in pituitary adenomas. *J Neuroendocrinol* 2008; 20:1052-7.
- [29] Xiong J, Zhou L, Yang M, Lim Y, Zhu YH, Fu DL, Li ZW, Zhong JH, Xiao ZC, Zhou XF. ProBDNF and its receptors are upregulated in glioma and inhibit the growth of glioma cells in vitro. *Neuro Oncol* 2013; 15:990-1007.
- [30] Navarro V, Vincent JP, Mazella J. Shedding of the luminal domain of the neurotensin receptor-3/sortilin in the HT29 cell line. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; 298:760-4.
- [31] Martin S, Navarro V, Vincent JP, Mazella J. Neurotensin receptor-1 and -3 complex modulates the cellular signaling of neurotensin in the HT29 cell line. *Gastroenterology* 2002; 123:1135-43.

- [32] Massa F, Devader C, Beraud-Dufour S, Brau F, Coppola T, Mazella J. Focal adhesion kinase dependent activation of the PI3 kinase pathway by the functional soluble form of neurotensin receptor-3 in HT29 cells. *Int J Biochem Cell Biol* 2013; 45:952-9.
- [33] Liu P, Cheng H, Roberts TM, Zhao JJ. Targeting the phosphoinositide 3-kinase pathway in cancer. *Nat Rev Drug Discov* 2009; 8:627-44.
- [34] Schecterson LC, Bothwell M. Neurotrophin receptors: Old friends with new partners. *Dev Neurobiol* 2010; 70:332-8.
- [35] Skeldal S, Matusica D, Nykjaer A, Coulson EJ. Proteolytic processing of the p75 neurotrophin receptor: A prerequisite for signalling?: Neuronal life, growth and death signalling are crucially regulated by intra-membrane proteolysis and trafficking of p75(NTR). *BioEssays* 2011; 33:614-25.
- [36] Reichardt LF. Neurotrophin-regulated signalling pathways. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2006; 361: 1545-64.
- [37] Volosin M, Song W, Almeida RD, Kaplan DR, Hempstead BL, Friedman WJ. Interaction of survival and death signaling in basal forebrain neurons: roles of neurotrophins and proneurotrophins. *J Neurosci* 2006; 26: 7756-66.
- [38] Harrington AW, Leiner B, Blechschmitt C, Arevalo JC, Lee R, Morl K, Meyer M, Hempstead BL, Yoon SO, Giehl KM. Secreted proNGF is a pathophysiological death-inducing ligand after adult CNS injury. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101:6226-30.
- [39] Wilson CM, Naves T, Vincent F, Melloni B, Bonnaud F, Lalloue F, Jauberteau MO. Sortilin mediates the release and transfer of exosomes in concert with two tyrosine kinase receptors. *J Cell Sci* 2014; 127:3983-97.
- [40] Tamai K, Tanaka N, Nakano T, Kakazu E, Kondo Y, Inoue J, Shiina M, Fukushima K, Hoshino T, Sano K, et al. Exosome secretion of dendritic cells is regulated by Hrs, an ESCRT-0 protein. *Biochem Biophys Res Commun* 2010; 399:384-90.
- [41] Colombo M, Moita C, van Niel G, Kowal J, Vigneron J, Benaroch P, Manel N, Moita LF, Thery C, Raposo G. Analysis of ESCRT functions in exosome biogenesis, composition and secretion highlights the heterogeneity of extracellular vesicles. *J Cell Sci* 2013; 126:5553-65.



Objectifs



Comme précisé ci-dessus (voir **III.11.** pour consulter des explications sur l'implication de la sortiline dans le cancer), des preuves accrues soulignent l'implication de la sortiline dans la modulation de la progression tumorale. Les recherches de Wilson *et al.* ont dévoilé un rôle crucial de la sortiline dans le chargement des RTKs dans les exosomes des cellules du CBNPC (Wilson *et al.*, 2014). Ces travaux suggèrent fortement un rôle de la sortiline dans le trafic intracellulaire qui précède la sécrétion exosomale de ces récepteurs. Face à ces résultats originaux et au rôle étendu de la signalisation de l'EGFR dans la survie des cellules cancéreuses (Shan *et al.*, 2012), nous avons voulu investiguer le rôle de la sortiline dans la prise en charge de l'EGFR dans le cadre du CBNPC. Ce projet a pour objectifs :

- (i) d'exploiter la nature (active vs passive) de l'association entre la sortiline et l'EGFR grâce à l'évaluation de l'effet de l'internalisation de l'EGFR, par stimulation avec un ligand, sur cette interaction.
- (ii) d'identifier le compartiment intracellulaire où débute l'interaction EGFR–sortiline et de traquer ce complexe pour chercher potentiellement des voies d'adressage supplémentaires de l'EGFR médiées par la sortiline.
- (iii) de déterminer les domaines d'interaction entre ces deux protéines, ainsi que de suivre l'effet des mutations somatiques de l'EGFR sur cette interaction mais aussi d'analyser les répercussions probables sur le tri de l'EGFR par la sortiline.
- (iv) de suivre l'effet de l'extinction / surexpression de la sortiline sur le trafic et la signalisation de l'EGFR.
- (v) de réaliser des analyses fonctionnelles qui permettront de caractériser les cellules modifiées pour l'expression de la sortiline et d'évaluer leur croissance *in vivo*.
- (vi) d'évaluer l'expression de la sortiline en fonction du grade pathologique de la tumeur au sein d'une cohorte de patients atteints du CBNPC.
- (vii) de réaliser des analyses *in silico* en se servant des bases de données accessibles pour stratifier les patients en fonction de l'expression de *SORT1* afin d'évaluer la corrélation avec la survie globale. L'objectif ultime étant d'évaluer la valeur pronostique de la sortiline dans le CBNPC.



Matériels et méthodes



Western Blot

Les cellules ont été lavées avec du PBS 1X (Gibco, France) et ensuite lysées dans du tampon de lyse cellulaire (Cell Signaling) contenant 1% de cocktail d'inhibiteurs de protéases (Roche, France) et un inhibiteur de phosphatases (Sigma, France). Les lysats cellulaires ont été soniqués (Vibra-Cell Sonifier, fixé à 50% d'amplitude) à trois reprises (2 s chacune, avec au moins 1 min de repos sur les impulsions de glace) et les débris ont été éliminés par centrifugation à 18 000 g. Les protéines solubilisées (30 µg) ont été soumises à une SDS-PAGE et l'analyse par transfert de Western en utilisant des anticorps spécifiques pour la sortiline (BD Biosciences, #612101 ; Dilution 1/200), P-EGFR (Tyr 1068, Cell Signaling, Ozyme, France, #3777 ; Dilution 1/1000), EGFR (Cell Signaling, Ozyme, Life Technologies, Fischer Scientific, France, #4267; Dilution 1/1000), P-ERK1/2 (Thr202 / Thr204; Cell Signaling, Ozyme, #4370; Dilution 1/1000), ERK1/2 (Cell Signaling, Ozyme, #9102; Dilution 1/1000), P-AKT (Ser 473, Cell Signaling, Ozyme, #4060; Dilution 1/1000) AKT (Cell Signaling, Ozyme, #4691; Dilution 1/1000), EEA-1 (Cell Signaling, Ozyme, #3288; Dilution 1/1000), Rab-5 (Cell Signaling, Ozyme, #3547; Dilution 1/1000), Rab-7 (Cell Signaling, Ozyme, #9367; Dilution 1/1000), Rab-11 (Cell Signaling, Ozyme, #5589; Dilution 1/1000), LAMP2 (Santa Cruz Biotechnology, Tebu, France, sc-18822; Dilution 1/200), TGN-46 (sigma, T7576; Dilution 1/200), v5 (Life Technologies, Fischer Scientific, MA5-15253; Dilution 1/1000), GFP tag (Life Technologies, Fischer Scientific, MA5-15256; Dilution 1/1000) et actine (Sigma, a5441; Dilution 1/10000) (utilisé comme témoin de chargement). Les anticorps primaires sont détectés par des anticorps secondaires (Dako, Agilent, France; Dilution 1/1000) conjugués à la peroxydase de raifort (HRP). Les bandes immunoréactives sont alors détectées avec de l'ECL⁺, un substrat de chimioluminescence. Les membranes sont révélées avec une G-Box (Ozyme, France).

Immunoprécipitation

Les cellules ont été lavées avec du PBS glacé et lysées dans du tampon de lyse IP (Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, 150 mM de NaCl, 1% de Triton X-100, 2 mM EDTA, tous les réactifs de Sigma) contenant 1% cocktail d'inhibiteurs de protéases (Roche) et un inhibiteur de phosphatases (Roche). Après une première centrifugation à 18 000 g, les lysats ont été saturés par incubation pendant 1 h à 4°C avec 10% (v / v) de cocktail protéique de la souche de *S. aureus* non productrice de la protéine A (Sigma). Le cocktail protéique a été éliminé par centrifugation pendant 5 min à 18 000 g. 1 mL de la protéine A couplée à des billes de sépharose (Sigma) a été lavé trois fois avec le tampon IP et remis en suspension dans 1 mL de tampon IP. Ensuite, 200 µg de lysat protéique et 2 µg d'anticorps ont été solubilisés dans 1 mL de tampon IP contenant 50 µl de la solution de protéine A couplée à des billes de sépharose préparée précédemment et incubés pendant une nuit à 4 °C avec agitation légère. Le lysat contrôle a été mélangé avec une IgG de souris ou de lapin. après 1 nuit, les immunoprécipitats ont été lavés trois fois avec 1 mL de tampon de lyse IP à 4 °C, puis chauffés dans un tampon de chargement (Bio-Rad) à 95 °C pendant 5 min. Les billes ont été éliminées par centrifugation de 5 min à 18000 g et les lysats immunoprécipités ont été déposés sur un gel SDS-PAGE et analysés par Western Blot (Bio-Rad).



Culture cellulaire et traitements

Les lignées cellulaires HEK-293T, A549 et H1650 utilisées dans cette étude ont été obtenues auprès de l'«American Type Culture Collection» (ATCC) alors que les lignées cellulaires H3255 et H1975 ont été généreusement fournies par Sylvie Gazzeri de l'Institut Albert Bonniot (Grenoble, France) et Patrick Brest de l'Institut de Recherche sur le Cancer et le Vieillessement de Nice (IRCAN, France), respectivement. Toutes les lignées cellulaires ont été maintenues dans le milieu GlutaMAX™ (Gibco), le milieu Eagle modifié de Dulbecco supplémenté de 10% de sérum bovin fœtal (IDbio), 1% d'acides aminés non essentiels (Gibco) et d'antibiotiques (IDbio). Toutes les cellules ont été cultivées dans un incubateur humidifié réglé à 5% de CO₂ et à 37°C. Les cellules ont été cultivées dans des conditions sériques normales avant la stimulation avec l'EGF (Life Technologies) à 50 ng.mL⁻¹. Pour les traitements avec des composés chimiques, les cellules A549 ont été prétraitées avec le Dynasore 100 μM (Sigma), la bafilomycine A1 (Sigma) ou MG-132 (sigma) (10 μM) pendant 2 h avant la stimulation avec l'EGF (50 ng.mL⁻¹, 30 min).

Prolifération cellulaire et cytométrie en flux

La prolifération cellulaire a été mesurée à l'aide de l'essai de cytométrie en flux Alexa Fluor 488 Click-it EdU (Invitrogen). En résumé, les cellules ont été incubées pendant une nuit sur des plaques à six puits, incubées avec l'EdU pendant 2 h, puis stimulées pendant 1 h avec de l'EGF (50 ng.mL⁻¹). La prolifération a été évaluée par cytométrie de flux sur un instrument FACS Calibur (BD Biosciences) et les données ont été analysées à l'aide du logiciel Cell Quest (BD Biosciences). Chaque expérience a été répétée au moins trois fois. L'expression de l'EGFR à la surface cellulaire a été analysée par cytométrie de flux sur des cellules vivantes sans perméabilisation. Après lavage dans du PBS glacé, les cellules ont été immunomarquées sur de la glace pendant 10 min avec un anti-EGFR conjugué à l'APC (Biolegend) dans du PBS contenant 2% de BSA. Après deux autres lavages dans du PBS glacé contenant 2% de BSA et un lavage dans du PBS glacé, les cellules ont été mises en suspension dans du PBS et analysées par cytométrie en flux sur un instrument FACS Calibur (BD Biosciences, France). Les données ont été analysées à l'aide du logiciel Cell Quest. Les mesures ont été comparées au contrôle isotopique (IgG anti-rat conjugué à l'APC, Biolegend) pour déterminer les seuils de fond et de positivité. Chaque expérience a été répétée au moins trois fois.

Transfections transitoire et stable

Pour les transfections transitoire et stable, les cellules ont été transfectées en utilisant le réactif de transfection JetPei (transfection Polyplus, Ozyme). Des transfection de shARN à l'aide de lentivirus ont été utilisées pour générer des lignées cellulaires stables de sortilin-knockdown comme décrit précédemment par Wilson *et al.* (Wilson *et al.*, 2014). Pour la sortiline, la séquence du shARN a été TRCN0000005295 (59-CCGGCCAGTGTACTTTACCAATATACTCGAGTATATTGGTAAAGTACACTGGTTTTT-39). Le vecteur de l'EGFR sauvage a été généreusement fourni par Matthew Meyerson (Greulich



et al., 2005) (plasmide Addgene n° 11011). Celui de l'EGFR-GFP a été généreusement fourni par Alexander Sorkin (Carter and Sorkin, 1998) (addgene plasmid # 32751); La forme totale et tronquée de la sortiline ont été généreusement fournies par Gina Finan (Finan *et al.*, 2011).

ARN interférent

Pour les tests d'interférence, les cellules A549 inactivées pour l'expression de la sortiline ont été transfectées en utilisant l'INTERFERin (Polyplus transfection, Illkirch, France). Dans chaque transfection, 100 nM de siARN contre l'EGFR (SignalSilence® EGF Receptor siRNA I, Ozyme) ou siARN contrôle (signalSilence® Control siRNA [Non conjugué], Ozyme) ont été utilisés.

Transcription inverse et PCR en temps réel

Le kit Qiagen RNeasy a été utilisé pour isoler l'ARN total des cellules selon les recommandations du fournisseur (Qiagen). L'ADNc a été préparé en utilisant le kit de transcription inverse d'ADNc à haute capacité (Applied Biosystems). La réaction a été arrêtée par incubation à 95 °C pendant 5 min. 100 ng d'ADNc ont été utilisés pour chaque réaction de qPCR qui a été effectuée avec des sondes TaqMan (Applied Biosystems) sur un appareil de qPCR ABI Step One Plus (Applied Biosystems). Les amorces de qPCR et les sondes pour l'EGFR (Hs01076090_m1) et HPRT (Hs02800695_m1) proviennent de Life Technologies, et les amorces / sonde de la sortiline ont été réalisées spécifiquement pour cette étude. La séquence de l'amorce sens a été AGCCAGTGGGTCTCCTACAC. Celle de l'amorce anti-sens a été CACTCCACAGACCCTGAAGA. La séquence de la sonde a été TCCTTGAAAGGAACTGTGAAGAGAAGGACT.

Immunofluorescence et essai de ligature de proximité

Les cellules ont été cultivées sur des lamelles de verre et lavées deux fois dans du PBS avant d'être fixées dans du méthanol glacé pendant 10 min sur de la glace. Après la fixation, les cellules ont été lavées avec un tampon de lavage, PBS contenant 1% (p / v) de BSA et bloquées pendant 30 min avec du PBS contenant 3% de BSA (IDbio). Les cellules ont été immunomarquées à 4 °C pendant une nuit avec l'anticorps primaire (Dilution 1/100) dans la solution de blocage. Le lendemain matin, les cellules ont été lavées trois fois (PBS, 1% BSA), et les anticorps primaires ont été marqués soit avec des anti-IgG de lapin conjugués à l'Alexa Fluo 488, soit avec des anticorps anti-IgG de souris conjugués à l'Alexa Fluo 594 pendant 2 h à température ambiante (Life Technologies, dilution 1/1000). Les cellules ont été lavées trois fois (PBS, 1% BSA). Enfin, les cellules ont été montées en utilisant un milieu de montage Fluoroshield (Sigma) contenant du 4',6-diamidino-2-phénylindole (DAPI) pour marquer les noyaux. Les images de fluorescence ont été obtenues à l'aide des microscopes à épifluorescence (Zeiss Axiovert) équipés d'un système d'imagerie confocale à balayage laser (Zeiss LSM 510 META ou LSM880). Les coefficients de Manders



ont été calculés à l'aide du logiciel Zeiss LSM 510 META ou ZEN (Zeiss) à partir d'images non saturées avec une tranche optique de 0,8 μm . Au moins 30 cellules ont été acquises pour chaque condition. L'expression à la surface cellulaire de l'EGFR ou de la sortiline (calculée à partir de la différence d'expression sur la cellule entière et les moyennes de fluorescence intracellulaire) a été analysée à l'aide du logiciel [ImageJ](#) (NIH, Bethesda).

Pour l'essai de ligature de proximité (PLA), les cellules ont été fixées avec du paraformaldéhyde 4% pendant 10 min puis perméabilisées pendant 30 min sur de la glace dans du PBS 0,1% de Triton X-100 (Sigma). Par la suite, les cellules ont été lavées avec du PBS, et une solution de saturation (PBS, 2% BSA) a été appliquée pendant 30 min à 37 °C dans une chambre humidifiée. Les anticorps primaires contre l'EGFR (souris monoclonal, dilution 1/100, Life Technologies) et la sortiline (lapin polyclonal, dilution 1/100, Abcam) ont été dilués dans la solution de saturation et les échantillons ont été incubés pendant 30 min à 37 °C. Les cellules ont ensuite été lavées avec un tampon A du kit PLA Duolink II (Olink Bioscience, Sigma). Par la suite, la sonde Duolink II PLA anti-souris Minus et la sonde PLA Duolink II anti-lapin Plus ont été ajoutées aux cellules et l'échantillon a été incubé pendant 60 min à 37 °C. Pour lier les deux sondes, les cellules ont été lavées dans du tampon A et incubées pendant 30 min à 37 °C dans un tampon de ligature Duolink II dilué dans de l'eau distillée filtrée contenant de la ligase. Après ligature, les cellules ont été lavées dans du tampon A, puis incubées pendant 100 min à 37 °C avec le tampon d'amplification Duolink II contenant la polymérase. Les cellules ont ensuite été lavées trois fois dans le tampon B et montées avec un milieu de montage *in situ* contenant le DAPI. Les analyses quantitatives obtenues à partir de chaque échantillon indépendant ont été effectuées à l'aide du logiciel [ImageJ](#) (NIH, Bethesda) en fonction des valeurs moyennes de fluorescence. Au moins 50 cellules ont été acquises pour chaque condition et les résultats ont été normalisés par rapport aux cellules témoins.

Fractionnement subcellulaire sur gradient d'OptiPrep

Les cellules ont été lavées avec du PBS glacé, rapidement gonflées avec du tampon osmotique (Tris-HCl 10 mM [Sigma], pH 7,4) et raclées dans un tampon d'homogénéisation (Tris-HCl 10 mM, pH 7,4, EGTA 1 mM, 0,5 mM, EDTA, saccharose 0,25 M, tous les réactifs de Sigma) contenant 1% de cocktail d'inhibiteurs de protéases et de phosphatases. Les cellules ont été homogénéisées à l'aide d'un homogénéisateur Dounce (IKALaborstechnik) et les surnageants post-nucléaires (PNS) ont été obtenus par centrifugation de l'homogénat pendant 10 min à 1000 g. Les PNS ont été centrifugés à 10000 g pendant 20 min à 4 °C pour précipiter la membrane plasmique, les mitochondries et le réticulum endoplasmique rugueux. Le PNS a ensuite été fractionné sur un gradient de densité d'OptiPrep (Sigma) discontinu 10-30% (p / v) tel que décrit par Li et Donowitz (Li and Donowitz, 2008).

Une solution d'OptiPrep de travail (WS) à 50% (p / v) a été préparée en mélangeant 5 volumes d'OptiPrep avec 1 volume de solution de diluant (saccharose 0,25 M, EDTA 6 mM, Tris-HCl 60 mM, pH 7,4). Ensuite, le WS de 50% d'OptiPrep a été dilué dans des milieux d'homogénéisation (HM) (saccharose 0,25 M, EDTA 1 mM, Tris-HCl 10 mM, pH 7,4) pour obtenir neuf solutions contenant différents pourcentages d'OptiPrep (10%, 12,5% 15%, 17,5%, 20%, 22,5%, 25%, 27,5% et 30%). Les couches d'OptiPrep ont été stratifiées manuellement dans un tube d'ultracentrifugeuse, avec les concentrations les plus fortes au



fond et les concentrations les plus faibles en haut. Le PNS a été dilué dans le HM et chargé sur le dessus des couches avant d'être ultracentrifugé à 100000 g pendant 16 h à 4 °C. Le lendemain matin, 20 fractions à partir des 10 couches ont été recueillies et les protéines ont été précipitées en utilisant 20% (p / v) d'acide trichloroacétique (Sigma) et 10% (p / v) d'acétone glacée (Sigma). Les protéines précipitées ont été granulées par centrifugation à 18000 g pendant 30 min à 4 °C, puis lavées deux fois dans de l'acétone glacée par centrifugation répétée de 18000 g pendant 2 min à 4 °C. Les protéines ont été solubilisées dans le tampon de chargement et ont été chauffées à 95 °C pendant 5 min. Les protéines ont été déposées puis séparées par électrophorèse SDS-PAGE dans l'ordre de la collecte (*i.e.* à partir des vésicules les plus légères aux plus lourdes au fond du tube). L'analyse par Western Blot a été effectuée avec les anticorps correspondants.

Extraction des protéines nucléaires et cytoplasmiques

L'extraction des protéines nucléaires et cytoplasmiques a été faite selon le protocole du kit « NE-PER™ Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents » (Thermo Fisher, France). En résumé, 10^6 cellules ont été transférées dans un tube 1.5 mL puis centrifugées à 500g pendant 3 min. Le culot cellulaire a été lysé avec le tampon CER I glacé ($V_{\text{CER I}} = 10 \cdot V_{\text{culot cellulaire}}$), vortexé vigoureusement pendant 15 s pour suspendre le culot et incubé sur glace pendant 10 min. Ensuite, le tampon CER II glacé a été rajouté ($V_{\text{CER II}} = V_{\text{culot cellulaire}} / 2$), le lysat a été vortexé pendant 5 s, incubé 1 min sur la glace, vortexé de nouveau pendant 5 s et centrifugé à vitesse maximale pendant 5 min. Le surnageant correspondant aux protéines cytoplasmiques a été transféré immédiatement dans un autre tube, le culot insoluble contenant les noyaux a été lysé avec le tampon NER ($V_{\text{NER}} = 5 \cdot V_{\text{culot cellulaire}}$), vortexé 15 s toutes les 10 min pendant 40 min. Enfin, le lysat nucléaire a été centrifugé à vitesse maximale pendant 10 min et le surnageant a été transféré dans un autre tube. A l'issue des extractions, les protéines nucléaires et cytoplasmiques ont été analysées par Western Blot.

Greffe de cellules tumorales *in vivo*

Des souris NOD SCID (Janvier Labs, France) ont été élevées et suivies à l'animalerie EOPS de la Faculté de Médecine de Limoges en respectant les recommandations européennes concernant l'expérimentation animale. Le protocole expérimental a été déposé auprès du comité d'éthique. Les souris ont été injectées par voie sous-cutanée dans la cuisse gauche avec $1 \cdot 10^6$ cellules dans 20 μ L de PBS. Le volume tumoral (= Longueur x Largeur x [(Longueur + Largeur) / 2]) a été mesuré deux fois par semaine. Les souris ont été sacrifiées 25 jours après l'injection. Les tumeurs ont été prélevées, puis fixées avec du formaldéhyde 4% avant d'être incorporées dans de la paraffine puis traitées pour les marquages immunohistochimiques.



Analyse *ex vivo* : immunohistochimie sur les TMA de patients atteints d'adénocarcinome bronchique

Les microarrays de tissus d'adénocarcinome pulmonaire contenant 48 cas avec des informations sur les résultats du grade pathologique ont été fournis par US Biomax (BCS04017a, US Biomax, États-Unis). De plus, 30 blocs de paraffine contenant des tumeurs d'adénocarcinome pulmonaire ont été cédés par le CRB (Centre de ressources biologiques) du Service de pathologies du CHU de Limoges (protocole [AC-2013-1853, DC-2011-1264]). Tous les patients ont été informés de l'utilisation de leurs échantillons de tissus dans des études de recherche et ont signé une déclaration de non opposition pour l'utilisation de leur prélèvement à des fins de recherche. Les marquages immunohistochimiques ont été réalisés sur des sections consécutives de 5 μm d'épaisseur. Des anticorps contre la sortiline (Alomone, Israël, 1/175), l'EGFR (Cell Signaling, Ozyme, 1/25) et le Ki-67 (Dako, 1/200) ont été utilisés pour le marquage des tissus. Leica Bond-Max a été utilisé avec le kit Bond Polymer Filter. Pour le marquage de la sortiline et de l'EGFR, les échantillons ont été prétraités avec la solution de récupération 1 du kit (ER1) pendant 5 min. Pour le marquage Ki-67, les échantillons ont été prétraités pendant 20 min avec la solution de récupération 2 (ER2). Le marquage a été effectué avec le même dispositif (Leica Bond-Max) et les lames ont été montées avec un milieu de montage non aqueux. Les images ont été acquises avec un scanner de lames Hamamatsu. Chaque capture d'image a été quantifiée visuellement par la méthode du score Hirsh adaptée (Pirker *et al.*, 2012) et les quantifications ont été effectuées en triple aveugle. Pour évaluer le pourcentage de noyaux Ki67 positifs, nous utilisons le logiciel publique [Immunoratio](#) (Tuominen *et al.*, 2010).

Analyses *in silico* et base de données

La survie globale en fonction de l'expression *SORT1* a été obtenue en utilisant une courbe de Kaplan-Meier pour le cancer du poumon avec le programme KMplot ([kmplot](#)) à l'aide de données extraites de la base de données Gene Expression Omnibus (GEO) avec les numéros d'accès GSE14814, GSE19188, GSE29013, GSE30219, GSE31210, GSE3141, GSE31908, GSE37745 et GSE50081. Les données d'expression de l'EGFR, de *SORT1* et les données globales correspondantes sur la survie du patient et l'état vital ont été extraites de la base de données [cBioPortal](#) tiré des archives de l'Atlas du génome du cancer (TCGA, Nature 2014, TCGA provisoire), représentant des données sur un total de 673 patients atteints d'adénocarcinome pulmonaire.

Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été effectuées en utilisant le logiciel StatView (v.5.0). Les données présentées sont représentatives d'au moins trois expériences indépendantes. Les résultats sont présentés à partir d'histogrammes représentant la moyenne + / - l'écart-type (« standard deviation »). Des analyses de variance (ANOVA) ou des tests t de Student ont été réalisés pour comparer les résultats entre les différentes conditions ou entre les différentes cellules. Une valeur de $p \leq 0,05$ est considéré comme significative (* $p \leq 0,05$, ** p

$\leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$). La survie globale a été déterminée à partir d'analyse de survie de type Kaplan-Meier. L'influence de l'expression de l'*EGFR* et de *SORT1* sur la survie globale a été analysée en utilisant un modèle de régression de Cox. Les seuils ont été déterminés à l'aide de [Cutoff Finder](#) (Budczies *et al.*, 2012).



Résultats



Chapitre IV. La sortiline contrôle l'internalisation de l'EGFR et limite la croissance tumorale

Une activation aberrante des RTKs est détectée dans environ 75% des ADCs pulmonaires (Cancer Genome Atlas Research Network, 2014). Les RTKs relayent les signaux extracellulaires à l'intérieur de la cellule engendrant ainsi une signalisation impliquée dans de nombreux processus, tels que la prolifération, la migration et la survie cellulaire (Lemmon and Schlessinger, 2010). L'EGFR est l'archétype des RTKs (Tomas *et al.*, 2015; Ullrich *et al.*, 1984). La liaison d'un ligand, tel que l'EGF, entraîne la dimérisation du récepteur et l'autophosphorylation des résidus tyrosine dans son domaine cytoplasmique. L'EGFR engendre ainsi une signalisation intracellulaire et est alors internalisé (Capuani *et al.*, 2015). L'internalisation de l'EGFR ainsi que son tri intracellulaire sont étroitement régulés par des protéines adaptatrices amarrées au domaine C-terminal de l'EGFR (Torrise *et al.*, 1999).

L'internalisation et la dégradation rapide de l'EGFR sont sous un contrôle spatio-temporel étroit pour limiter la signalisation engendrée par les MAPKs (Sorkin and von Zastrow, 2009). Ce mécanisme de rétrocontrôle qui régit par la dégradation lysosomale induite par le ligand constitue la fin du signal contrecarrant ainsi le potentiel oncogénique de l'EGFR (Kawamata *et al.*, 1994). En effet, la surexpression de l'EGFR est une caractéristique commune à plusieurs cancers. En outre, l'inactivation des protéines de tri qui régulent à la fois l'intensité et la durée de la signalisation joue un rôle clé dans la croissance tumorale dépendante de l'EGFR à travers une signalisation soutenue représentant l'une des caractéristiques centrales du cancer (Hanahan and Weinberg, 2011).

Etant donné que plusieurs facettes du trafic de l'EGFR restent non résolues (Rappoport and Simon, 2009) et que l'internalisation du récepteur représente une étape cruciale pour inhiber sa signalisation, nous avons cherché à déterminer si une autre protéine pouvait intervenir dans la régulation du trafic intracellulaire de l'EGFR suite à la stimulation par l'EGF. La sortiline qui est un récepteur de type I appartient à la famille des protéines à domaine VPS10P (Mazella *et al.*, 1998; Petersen *et al.*, 1997) représente un candidat potentiel. Cette protéine est majoritairement localisée dans l'appareil de Golgi et elle est continuellement recyclée entre celui-ci et la membrane plasmique (Nykjaer and Willnow, 2012). Le domaine VPS10P constitue la partie extracellulaire / luminale de la sortiline est connue pour son implication dans le trafic des RTKs spécifiques, les récepteurs des neurotrophines dans les neurones (Nykjaer *et al.*, 2004; Teng *et al.*, 2005). Dans une étude antérieure, nous avons démontré que la sortiline facilite le transport et le chargement de l'EGFR dans des vésicules extracellulaires exprimant des marqueurs exosomaux (Wilson *et al.*, 2014). Etant donné que l'EGFR n'est pas présent dans les exosomes provenant des cellules inactivées pour l'expression de la sortiline, nous avons donc analysé la fonction exacte de la sortiline dans le trafic intracellulaire de l'EGFR.

Nos résultats sont en accord avec ceux de Wilson *et al.*, qui démontre que l'EGFR interagit avec la sortiline à l'état basal. Cependant, la stimulation des cellules A549 par l'EGF (50 ng.mL⁻¹) augmente significativement cette interaction à partir de 2 min de traitement. Sans stimulation par son ligand, l'EGFR est majoritairement membranaire, tandis que la sortiline colocalise avec le marqueur de l'appareil de Golgi TGN-46 et celui des endosomes précoces Rab-5. La stimulation par l'EGF induit l'internalisation et la dégradation de l'EGFR,



ce qui est confirmé par l'augmentation de sa colocalisation avec Rab-5 et le marqueur lysosomal LAMP-2. L'EGFR colocalise, dans une moindre mesure, avec TGN-46. Cette observation est compatible avec sa translocation nucléaire induite par le ligand et qui nécessite le passage préalable par l'appareil de Golgi (Brand *et al.*, 2011). En revanche, l'EGF induit une délocalisation de la sortiline vers les endosomes précoces, ce qui est confirmée par l'augmentation significative de sa colocalisation avec Rab-5. L'EGFR et la sortiline sont colocalisés dans ces mêmes organites intracellulaires à la suite à la stimulation par l'EGF, suggérant ainsi que la sortiline et l'EGFR interagissent ensemble durant la phase précoce de l'internalisation du RTK (Henriksen *et al.*, 2013).

D'une manière intéressante, la rétention de l'EGFR à la membrane plasmique suite à l'action du Dynasore (un inhibiteur des dynamines) (Macia *et al.*, 2006) démontre une augmentation de la triple colocalisation entre l'EGFR, la sortiline et l'antigène-1 des endosomes précoces (EEA-1) suite à la stimulation par l'EGF. D'une manière surprenante, le traitement au Dynasore seul met en relief une forte interaction EGFR-sortiline à la membrane plasmique suggérant une interaction indépendante de la phosphorylation de l'EGFR. En effet, la stimulation par l'EGF ne montre pas d'effet significatif sur cette interaction dans les cellules A549 pré-traitées par le Dynasore. Ces résultats indiquent que l'association entre l'EGFR et la sortiline débute à la membrane plasmique en amont du recrutement d'EEA-1. Afin de valider cette interaction membranaire, nous avons utilisé la lignée cellulaire non-tumorale HEK-293T qui présente une faible expression endogène de l'EGFR et de la sortiline (Nykjaer *et al.*, 2004; Stern *et al.*, 2007). Dans cette lignée, nous avons co-surexprimé l'EGFR et la forme totale ou la forme tronquée de la sortiline. La sortiline tronquée dépourvue de sa partie C-terminale est incapable d'être recyclée à partir de la membrane plasmique vers les endosomes ou le Golgi. L'EGFR interagit fortement avec la sortiline tronquée à la surface des cellules HEK-293T. Ces résultats confirment l'interaction membranaire entre l'EGFR et la sortiline et indiquent que celle-ci est accentuée suite à l'enrichissement de la sortiline à la membrane plasmique indépendamment de la stimulation par l'EGF.

A la lumière de ces résultats, nous avons voulu définir quels étaient les domaines d'interaction entre l'EGFR et la sortiline. La co-surexpression de l'EGFR avec le domaine intra- ou extracellulaire de la sortiline dans les cellules HEK-293T indique que le domaine extracellulaire de l'EGFR interagit avec le domaine VPS10P (extracellulaire) de la sortiline. Ces résultats suggèrent que les mutations somatiques dans le domaine tyrosine kinase de l'EGFR n'affectent pas son interaction avec la sortiline. Les lignées exprimant un *EGFR* muté (H1650, H3255 et H1975) ont révélé une forte interaction basale entre l'EGFR et la sortiline supérieure à celle détectée dans les cellules A549 exprimant un *EGFR* sauvage. Ce résultat est en accord avec le fait que le trafic des mutants de l'EGFR soient augmenté en comparaison avec celui de la forme sauvage (Chung *et al.*, 2009; Tomas *et al.*, 2014). La stimulation par l'EGF induit une augmentation de l'association entre l'EGFR et la sortiline dans les lignées H1650 et H3255 mais pas dans la lignée H1975, suggérant un trafic plus intense de l'EGFR dans cette lignée. L'ensemble de ces résultats suggèrent un rôle de la sortiline dans l'internalisation de l'EGFR à partir de la membrane plasmique.

L'inactivation de la sortiline par transfection lentivirale de shARN dirigé contre la sortiline (SORT1 shRNA) permet de maintenir l'EGFR à la membrane plasmique des cellules A549 malgré la stimulation par l'EGF. Dans ces cellules, l'EGFR est constitutivement actif et il engendre une signalisation intracellulaire d'une manière indépendante du ligand. En plus, l'EGFR échappe à la dégradation lysosomale dans les cellules A549 SORT1 shRNA. En



accord avec cette signalisation activée par l'EGFR, les cellules A549 SORT1 shRNA présentent un taux de prolifération supérieur à celui des cellules contrôles (A549 pLKO). L'extinction de la sortiline n'affecte pas le niveau des transcrits de l'EGFR ni l'activité lysosomale dans ces cellules. Ces résultats confirment que la rétention membranaire de l'EGFR et son hyperphosphorylation sont dues à un défaut d'internalisation et d'adressage intracellulaire de l'EGFR. Dans notre modèle, le taux supérieur d'EGFR dans les cellules inhibées pour l'expression de la sortiline est causé par une accumulation de l'EGFR mature dans la cellule et un délai de dégradation par le lysosome. Nous avons ensuite démontré que la lignée H1975 qui est résistante aux inhibiteurs de l'EGFR, tels que le géfitinib, exprime un niveau faible de sortiline endogène. Cependant, la surexpression de la sortiline inverse le phénotype résistant de ces cellules comme cela a pu être démontré *via* la diminution de la phosphorylation d'AKT et d'ERK, ainsi que la diminution du taux de prolifération cellulaire.

In vivo, les cellules A549 SORT1 shRNA montrent une croissance tumorale significativement plus importante que celle des cellules pLKO, en accord avec le taux de prolifération supérieur des cellules SORT1 shRNA *in vitro*. Les analyses immunohistochimiques démontrent quant à elles que l'expression du marqueur de prolifération (ki67) est supérieure dans ces cellules en comparaison avec les cellules pLKO reflétant la croissance tumorale supérieure des cellules SORT1 shRNA.

Les approches *ex vivo* menées sur une cohorte de patients atteints d'ADC pulmonaire, apportent la preuve que l'expression de la sortiline diminue significativement avec le grade tumoral alors que celle du marqueur de prolifération ki67 augmente. Ce résultat suggère que l'expression de la sortiline est inversement corrélée au taux de prolifération des cellules tumorales. Ceci a été confirmé par les analyses *in silico* qui ont révélées qu'une expression élevée de *SORT1* est fortement corrélée à une meilleure survie globale des patients atteints d'ADC pulmonaire. De plus, Une expression élevée de *SORT1* est corrélée avec une meilleure survie des patients exprimant un *EGFR* amplifié ou ayant des mutations sensibles aux iTKs. Etant donné que la sortiline atténue la signalisation proliférative de l'EGFR, comme cela a pu être observé dans la lignée cellulaire résistante au géfitinib, son expression dans les tumeurs représente donc potentiellement un nouveau marqueur possédant une valeur prédictive sur la réponse thérapeutique.



Sortilin limits EGFR signaling by promoting its internalization in lung cancer

Hussein Al Akhrass^{1,*}, Thomas Naves^{1,*,#}, François Vincent^{1,2}, Amandine Magnaudeix¹, Karine Durand^{1,3}, François Bertin⁴, Boris Melloni², Marie-Odile Jauberteau^{1,5,§} and Fabrice Lalloué^{1,§}

¹EA3842 Homéostasie Cellulaire et Pathologies and Chaire de Pneumologie Expérimentale, Université de Limoges, Faculté de Médecine, 2 Rue du Dr. Raymond Marcland, 87025 Limoges CEDEX-France.

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

³Service d'anatomopathologie, Centre Hospitalier et Universitaire de Limoges, 87042 Limoges CEDEX-France.

⁴Service de Chirurgie Thoracique et Cardio-vasculaire, Centre Hospitalier et Universitaire de Limoges, 87042 Limoges CEDEX-France.

⁵Service d'Immunologie, Centre Hospitalier et Universitaire de Limoges, 87042 Limoges CEDEX-France.

*These authors contributed equally to this work.

§Jointly supervised

Please address correspondence to:

Thomas Naves

Chaire de Pneumologie Expérimentale

EA3842, Laboratoire Homéostasie Cellulaire et Pathologies

Faculté de Médecine

2, Rue du Docteur Marcland

87025, Limoges CEDEX

FRANCE

Tel: +33 5 55 45 59 70

Fax: +33 5 55 43 59 16

Mail: thomas.naves@unilim.fr



Abstract

Tyrosine kinase receptors such as the epidermal growth factor receptor (EGFR) transduce information from the microenvironment into the cell and activate homeostatic signaling pathways. Internalization and degradation of EGFR after ligand binding limits the intensity of proliferative signaling, thereby helping to maintain cell integrity. In cancer cells, deregulation of EGFR trafficking has a variety of effects on tumor progression. Here, we report that sortilin is a key regulator of EGFR internalization. Loss of sortilin in tumor cells promoted cell proliferation by sustaining EGFR signaling at the cell surface, ultimately accelerating tumor growth. In lung cancer patients, sortilin expression decreased with increased pathologic grade, and expression of sortilin was strongly correlated with survival, especially in patients with high EGFR expression. Sortilin is therefore a regulator of EGFR intracellular trafficking that promotes receptor internalization and limits signaling, which in turn impacts tumor growth.



Aberrant activation of tyrosine kinase receptors (TKRs), which mediate signal transduction between cells and their microenvironment, occurs in 76% of all cases of lung adenocarcinomas¹. TKRs relay the extracellular cues into the cell, leading to regulation of intracellular processes related to cell proliferation, migration and survival². The epidermal growth factor receptor (EGFR) is the archetypal TKR^{3,4}. EGFR signaling is triggered by binding of its growth factor ligands, such as epidermal growth factor (EGF), leading to the autophosphorylation of tyrosine residues in its cytoplasmic tail and thereby inducing cell signaling. Subsequently, EGFR is internalized⁵, and both the endocytic route and the fate of EGFR are regulated by adaptor proteins that dock with the tyrosine kinase domain⁶.

The rapid internalization and degradation of the EGFR are under tight spatiotemporal control to limit cell proliferation promoted by mitogen activated protein kinases (MAPKs)⁷⁻⁹. This negative feedback mechanism, governed by ligand-induced lysosomal degradation of EGFR, ensures signal termination and counteracts the oncogenic and transforming role of EGFR¹⁰⁻¹². Accordingly, high EGFR expression is a common feature of multiple cancers. Furthermore, inactivation of sorting proteins, which regulate both the duration and the intensity of EGFR signaling, plays a causal role in EGFR-induced promotion of tumor growth by sustaining proliferative signaling, a hallmark of cancer¹³⁻¹⁸.

Because multiple facets of EGFR trafficking remain unresolved¹⁹, and EGFR internalization represents a crucial step for signal termination, we investigated the role of sortilin²⁰⁻²² in EGFR regulation following EGF-induced EGFR internalization. Sortilin, a member of the vacuolar protein sorting 10 (VPS10) protein family of sorting receptors²³, shuttles between the plasma membrane and the trans-Golgi network (TGN)^{21,22,24}. The VPS10 domain constitutes the entire luminal domain of sortilin²⁵, which is considered to be a multifaceted sorting receptor involved in neurotrophin TKR trafficking in neurons²⁶. In a previous report, we showed that sortilin also facilitates both the transport and loading of EGFR into extracellular vesicles containing exosome specific markers²⁷. Because EGFR is not present in exosomes derived from sortilin-depleted cells, we focused on the function of sortilin in EGFR intracellular trafficking. Our results reveal that sortilin regulates EGFR by controlling its internalization from the plasma membrane, thereby limiting proliferative signaling, an essential driving force behind tumor aggressiveness. Moreover, we found that low expression of sortilin is associated with more aggressive lung adenocarcinoma tumors. Hence, sortilin expression represents a favorable prognostic marker in lung adenocarcinoma patients.



Results

EGF stimulation promotes EGFR and sortilin interaction

Sortilin has been implicated in several protein sorting pathways between the plasma membrane, endosomes, and the TGN²⁸. Based on findings from an earlier report in which we observed that sortilin participates in loading of EGFR into exosomes²⁷, and because exosome synthesis depends on endosome trafficking²⁹, we speculated that sortilin is involved in sorting a pool of EGFR that increases upon ligand-induced EGFR internalization. To achieve complete EGFR endocytosis and avoid endosome arrest and EGFR recycling via EGFR-inhibited autophagy³⁰, we stimulated A549 human non-small cell lung carcinoma cells with EGF under normal serum conditions, analyzed the canonical EGF-induced pathways of active EGFR in whole-cell lysate (WCL), and investigated whether EGF stimulation promoted the interaction between EGFR and sortilin. As expected, EGFR activation induced MAP kinase signaling, as evidenced by elevated ERK1/2 phosphorylation downstream of EGFR activation (Figure 1a, WCL panel). Furthermore, EGF stimulation promoted EGFR internalization, as reflected by the reduction in EGFR levels following lysosomal degradation³¹.

Consistent with the initial hypothesis, immunoprecipitation (IP) performed on the same lysates confirmed that EGFR co-immunoprecipitated with sortilin under basal conditions, and that this interaction was strengthened following EGF stimulation (Figure 1a, IP panel). In addition, we used a proximity ligation assay (PLA) to confirm the EGFR–sortilin interaction over a time course (Figure 1b, insets 1-1 to 5-2). In the images, the red spots indicate sites of proximity ligation amplification, reflecting the interaction between EGFR and sortilin, which was significantly strengthened after just 2 min of EGF stimulation (Figure 1c), suggesting that the EGFR–sortilin interaction occurs in the early stage of EGFR internalization. These results were further confirmed by fluorescence resonance energy transfer (FRET) assay (Supplementary Figures S1a and S1b). To determine where EGFR and sortilin interact, we first investigated the colocalization of EGFR and sortilin colocalization with various organelle markers, including the early endosome (EE) marker Rab5 (Ras-related protein Rab5), the late endosome/lysosome marker LAMP2 (Lysosome-associated membrane glycoprotein 2), and the TGN marker TGN46, in the presence or absence of EGF (Figure 1d). Under basal conditions, EGFR is mainly localized at the cell membrane (Figure 1d, insets 1-3). As expected, upon EGF stimulation, internalized EGFR overlapped primarily with the Rab5 and LAMP2 markers (Figure 1d, insets 7 and 8), indicating that the majority of active EGFR resided in the endosomal and lysosomal degradation pathways, consistent with the initial results (Figure 1a). We also observed weak colocalization of EGFR with TGN46 (Figure 1d, inset 9) consistent with its translocation through the Golgi¹⁶. However, to determine the subcellular localization of sortilin, we transfected A549 cells with a sortilin-GFP fusion



protein, thereby avoiding cross-reactivity with the secondary antibody (Figure 1d, insets 4-6 and 10-12). Under basal conditions, sortilin-GFP overlapped primarily with TGN46 and Rab5, in agreement with published reports that less than 10% of the total sortilin pool is expressed at the plasma membrane before being recycled back to the TGN through endosomes^{22,24,32}. Upon EGF stimulation, sortilin-GFP overlapped continuously with TGN46, and sortilin-GFP significantly colocalized with Rab5-positive compartments (Figure 1d, insets 10 and 12) rather than with the lysosomal marker LAMP2 (Figure 1d, inset 11). To rule out the possibility that EGF stimulation induces EGFR and sortilin interaction in the TGN after post-translational modifications, we used the protein synthesis inhibitor cycloheximide (CHX). PLA performed on EGF-stimulated cells in the presence of CHX revealed no signal variation (Supplementary Figures S1c to S1e). These results were also supported by the absence of variation in mRNA and protein levels of either EGFR or sortilin after EGF stimulation (Supplementary Figure S1f). Hence, we excluded the possibility of an interaction between EGFR and sortilin in the TGN, where the majority of the sortilin resides. These observations were also supported by colocalization analysis based on Mander's overlap coefficients (Figure 1e) and the colocalization of EGFR, Rab5, and sortilin in sortilin-GFP-transfected cells following EGF stimulation (Figure 1f, insets 1-1 and 1-2). Post-nuclear supernatants from A549 cells stimulated or not with EGF were separated onto a 0–30% Iodixanol gradient and subjected to ultracentrifugation (Supplementary Figure S1g). In the absence of EGF stimulation, intracellular EGFR was distributed diffusely between the EE and the TGN enriched fractions, corresponding to EGFR turnover, whereas sortilin was mainly in the TGN fraction. Interestingly, upon EGF stimulation, EGFR and sortilin are distributed into two populations according to EGFR engagement in intracellular trafficking and especially in the EE.

Together, these results suggest that EGF strongly induces the EGFR–sortilin interaction following EGFR activation and internalization, and that sortilin interacts with EGFR during the early stage of EGFR internalization.



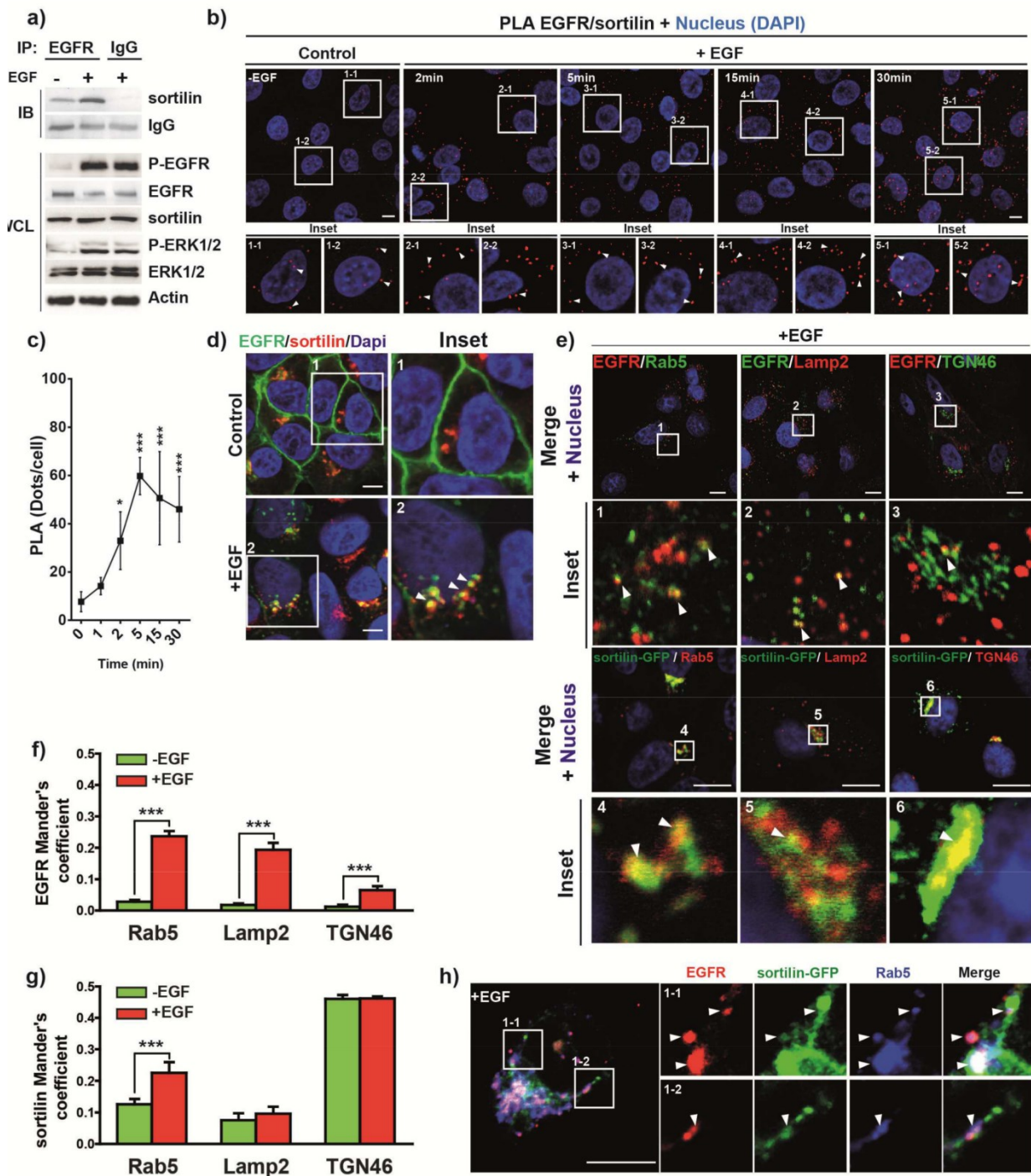


Figure 1. EGF promotes the EGFR–sortilin interaction.

(a) A549 cells grown in complete cell culture media were stimulated or not with EGF (50 ng/mL) for 30 min. Immunoprecipitations (IP) were performed using anti-EGFR antibody, and the immunocomplexes were immunoblotted (IB) using anti-sortilin antibody (top panel). In



parallel, immunoblots for P-EGFR, EGFR, sortilin, P-ERK and ERK were performed on whole-cell lysates (WCL); the isotypic lane Immunoglobulin G (IgG) represents the IP control. **(b)** Proximity ligation assays (PLA) were performed on A549 cells, non-stimulated or stimulated with EGF (50 ng/mL) for 2, 5, 15, and 30 min. Red spots indicate sites of proximity ligation assay amplification, reflecting the EGFR–sortilin interaction (white arrows). Scale bar, 10 μ m. **(c)** Quantification of PLA time course, in comparison with non-stimulated cells. Data represent means \pm SD of the number of dots per cell. **(d)** A549 cells were stimulated or not with EGF (50 ng/mL) for 30 min, and then co-immunolabeled for EGFR and markers of the early endosome (Rab5), the late endosome/lysosome (LAMP2) and the trans-Golgi network (TGN46). For sortilin labeling, A549 cells were transiently transfected with sortilin-GFP to adapt a set of functional antibodies, and then immunolabeled for the same markers. Scale bar, 5 μ m. **(e)** Quantitative analysis of EGFR or sortilin-GFP colocalization with the aforementioned organelle-specific markers. Data represent means \pm SD. **(f)** A549 cells were transiently transfected with sortilin-GFP, and then stimulated with EGF (50 ng/mL) for 30 min. Next, cells were fixed and co-immunolabeled for EGFR and Rab5. Scale bar, 10 μ m.

EGFR interacts with sortilin at the plasma membrane

To determine whether the early stage of EGFR endocytosis promotes the EGFR–sortilin interaction, we inhibited endocytosis using Dynasore, a cell-permeable dynamin inhibitor³³. Indeed, inhibition of dynamin prevents clathrin-mediated EGFR endocytosis³⁴ and endosome maturation in the early stage of endocytosis³⁵. Thus, Dynasore inhibits both endosome maturation and endocytosis of newly formed endosomes. In non-stimulated or Dynasore-pretreated cells, EGFR was mainly localized at the cell surface (Figure 2a, insets 1-1, 1-2, 3-1 and 3-2). EGF stimulation elicited colocalization between EGFR and the early endosome antigen 1 (EEA1) (Figure 2a, insets 2-1 and 2-2), whereas dynamin inhibition impaired EGF-induced EGFR endocytosis, as confirmed by the presence of EGFR clusters at the cell surface and a reduction in the overlap between the EGFR and EEA1 signals (Figure 2a; insets 4-1 4-2 and 4-3 [bright-field]). As expected, following plasma membrane retention of the EGFR upon Dynasore treatment, EGF-stimulated cells exhibited both sustained EGFR phosphorylation and reduced EGFR degradation (Figure 2b). Furthermore, Dynasore alone did not induce EGFR phosphorylation (Figure 2b). In A549 cells, we observed an overlap between EGFR and sortilin that colocalized poorly with EEA1 (EEA1-GFP), as revealed by confocal microscopy (Figure 2c, insets 1-1 and 1-2) and the colocalization profile (Figure 2d). Together, these results suggest that EGFR interacts with sortilin in forming endosomes upstream of EEA1 recruitment.

Therefore, we next performed PLA assays to investigate whether the EGFR–sortilin interactions were maintained by Dynasore treatment. Interestingly, Dynasore alone induced



a robust EGFR–sortilin interaction that is significantly stronger than the basal interaction in control cells or that induced by a pulse of EGF (Figure 2e, insets 1-1 to 3-2 and Figure 2f). Furthermore, this interaction was still independent of EGFR activation, as observed in the results described above, and EGFR was not phosphorylated in the presence of Dynasore alone (Figure 2b). Surprisingly, addition of EGF to Dynasore–pre-treated cells did not alter the EGFR–sortilin interaction in comparison to that in cells treated with Dynasore alone (Figure 2e, insets 4-1 to 4-4 and Figure 2f). Because sortilin cycles continually between the plasma membrane and TGN^{22,24,32}, Dynasore might impair the normal trafficking of EGFR–sortilin through their endocytic route, forcing them to maintain their interaction. These results suggest that sortilin participates in the internalization of unliganded EGFR, which is 10-fold slower than that of EGF-stimulated receptor³⁶.

Together, these results indicate that in A549 cells, the EGFR–sortilin complex takes place at the plasma membrane. However, Dynasore could alter endosome maturation, TGN or other trafficking intermediates driving to accumulated structures close to the plasma membrane. Hence, to better delineate the location of EGFR–sortilin, we used a version of sortilin that cannot be endocytosed, leading to accumulation of sortilin at the cell surface.



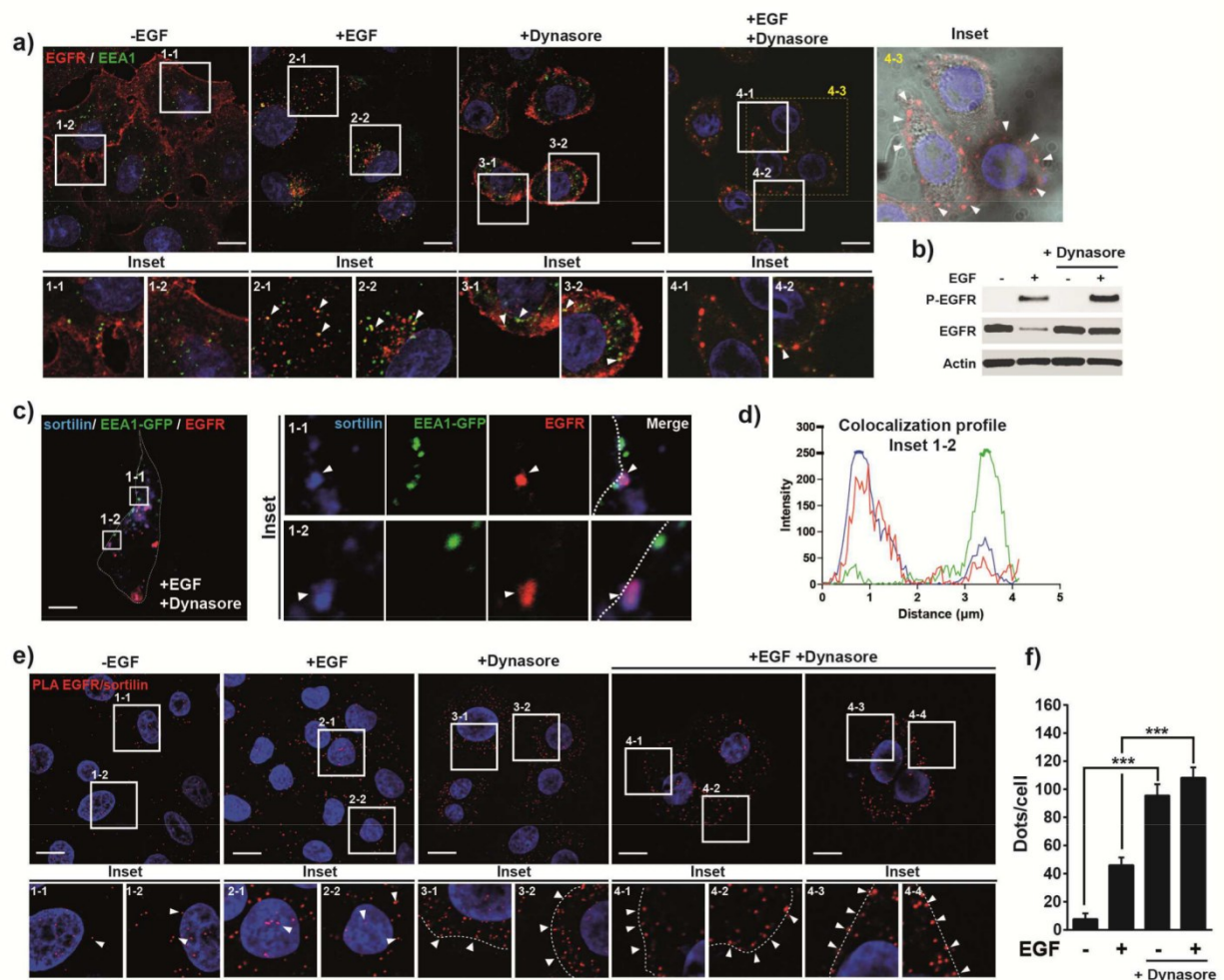


Figure 2. EGFR interacts with sortilin at the cell surface.

(a) A549 cells were pretreated or not with the cell-permeable dynamin inhibitor Dynasore (40 μM) for 2 h, and then stimulated or not with EGF (50 ng/mL) for 15 min. Cells were immunolabeled for EGFR and the early endosome marker EEA1, and then analyzed by confocal microscopy. Scale bar, 10 μm. Inset 4-3: Bright-field image of A549 cells; white arrows show EGFR clusters at the cell surface. Scale bar, 10 μm. (b) A549 cells were pretreated or not with Dynasore (40 μM) for 2 h, and then stimulated or not with EGF (50 ng/mL) for 15 min. The cell lysates were analyzed by western blotting for P-EGFR and EGFR. (c) A549 cells were transfected with EEA1-GFP, pretreated with Dynasore (40 μM) for 2 h, then stimulated with EGF (50 ng/mL) for 30 min. Next, cells were co-immunolabeled for EGFR and sortilin. Scale bar, 10 μm. The colocalization profile is shown in (d). (e) Proximity ligation assays (PLA) were performed on A549 cells under the same conditions



described above in **(a)**. Scale bar, 10 μ m. **(f)** PLA quantification in comparison with A549 non-stimulated cells. Data represent means \pm SD.

Cell surface-enriched sortilin strongly interacts with EGFR

To investigate the mechanism underlying the EGFR–sortilin interaction, we used the non-tumor cell line HEK-293, which expresses low levels of both endogenous EGFR and sortilin^{37,38}. Because sortilin cycles from the plasma membrane to the TGN, and in light of our previous observation that Dynasore alone unveiled the EGFR–sortilin interaction, we overexpressed a sortilin mutant lacking the intracellular C-terminal domain (Δ c-sortilin) but containing the extracellular VPS10 sorting domain²³. Because the C-terminal domain of sortilin controls its internalization, Δ c-sortilin cannot be recycled from the plasma membrane^{24,39}. We transfected HEK-293 cells with either full-length (FL) or truncated (Δ c) GFP-tagged sortilin, and then monitored colocalization of both proteins with TGN46. As expected, FL-sortilin was largely localized to the perinuclear region, along with TGN46, whereas Δ c-sortilin exhibited plasma membrane retention, as indicated by Mander's overlap coefficient (Figure 3a, insets 1-1 to 2-2, Figure 3b, Figure 3c). Next, we overexpressed both EGFR and sortilin to evaluate the interactions between EGFR and FL- or Δ c-sortilin. Interestingly, EGFR immunostaining overlapped with GFP-tagged Δ c-sortilin signal at the cell surface (Figure 3d, insets 1-1 to 2-2). Next, we transiently transfected cells with EGFR and FL- or a Δ c-v5 tagged sortilin. Without EGF stimulation, IP revealed a stronger interaction between EGFR and the Δ c-sortilin that accumulated at the cell surface (Figure 3e). We then generated HEK-293 stable cell lines that overexpressed both GFP-tagged EGFR and untagged FL- or Δ c-sortilin. In both stable cell lines, the canonical pathway of EGF-induced EGFR activity was unaltered, as attested by the proper phosphorylation of MAPK ERK1/2 (Figure 3f, WCL panel). Interestingly, IP confirmed the EGFR/ Δ c-sortilin interaction, with an increase in the EGFR/FL-sortilin interaction occurring exclusively after EGF stimulation (Figure 3f, IB panel), as previously observed in A549 cells.

Taken together, these data demonstrate that the EGFR–sortilin interaction occurs at the cell surface, and is strengthened when sortilin is enriched at the cell membrane regardless of EGF stimulation.

Sortilin and EGFR interact by their extracellular domains

To further delineate the domain of interaction between EGFR and sortilin, we transiently co-transfected Δ c-sortilin with either the extracellular (ECD) or intracellular domain (ICD) of EGFR in HEK-293 cells. Interestingly, EGFR-ECD mostly immunoprecipitated with sortilin (Figure 3g), indicating that this interaction involves the ECD of EGFR, and the sortilin VPS10 sorting domain, which constitutes the entire ECD of sortilin, is implicated in several



intracellular sorting processes^{22,23,40}. These results suggest that point mutations or deletion of the EGFR intracellular tyrosine kinase domain, frequently reported in lung adenocarcinoma, cannot prevent the EGFR–sortilin interaction. Indeed, mutant EGFR proteins are strongly tyrosine-phosphorylated even in the absence of ligand⁴¹. Consistent with the constitutive hyperphosphorylated state of EGFR, sortilin and EGFR interacted in H1650 (delE746-A750), H3255 (L858R), and H1975 (L858R/T790M), as attested by immunoprecipitations and PLA (Figure 3h and Figure 3j). Interestingly, in the absence of ligand stimulation, the EGFR–sortilin interaction remained stronger in EGFR-mutated cell lines (Figure 3i) than in A549 cells, suggesting that the greater ability of the EGFR mutants to be internalized^{42,43} facilitates their interaction with sortilin. Surprisingly, although EGF stimulation significantly promoted the EGFR–sortilin interaction in H1650, H3255, and A549 cells, it had no such effect in H1975 cells (Figure 3i).

Together, these results suggest that the VPS10 sorting domain of sortilin interacts with EGFR, and that sortilin acts as a sorting receptor for EGFR following its internalization.



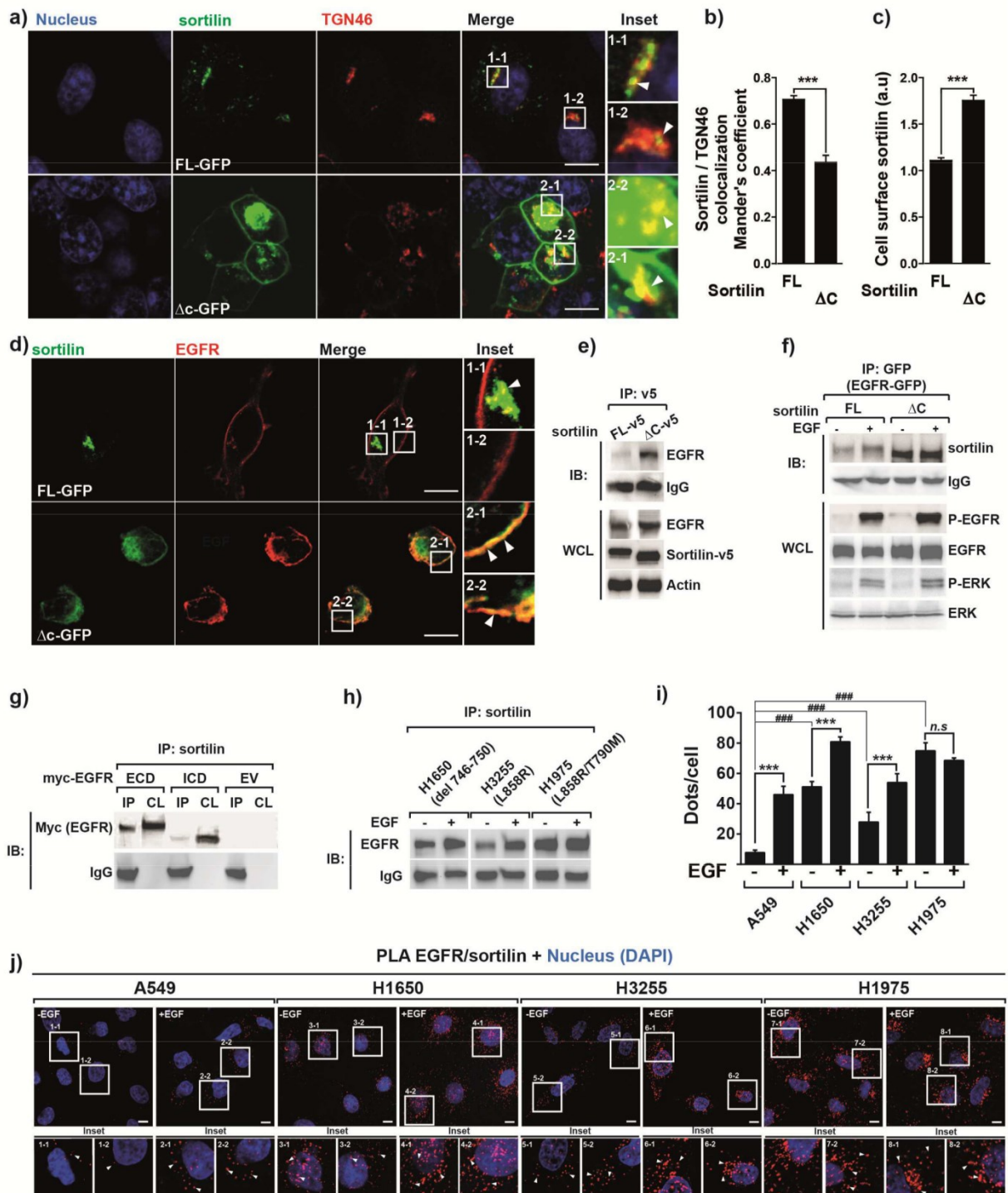


Figure 3. C-terminally truncated sortilin strongly interacts with EGFR at the cell surface independently of ligand stimulation.

(a) HEK-293 cells were transiently transfected with either full-length (FL) or C-terminally truncated (Δc) sortilin-GFP. Cells were fixed and immunolabeled for the trans-Golgi network

marker TGN46, and then analyzed by confocal microscope. Scale bar, 10 μm . **(b)** Bars show the Mander's coefficient, indicating that FL sortilin-GFP colocalized with TGN46 to a greater degree than Δc -sortilin-GFP. Data represent means \pm SD. **(c)** Bars show quantification of cell surface GFP intensity. **(d)** Strong interaction between EGFR and Δc -sortilin at the plasma membrane. HEK-293 cells were transiently co-transfected with EGFR and FL- or Δc sortilin-GFP, and then fixed and immunolabeled for EGFR; immunofluorescence was analyzed by confocal microscopy. Scale bar, 10 μm . **(e)** HEK-293 cells were transiently co-transfected with EGFR and FL or Δc sortilin-v5. Immunoprecipitations (IP) were performed using anti-v5 antibody, and immunocomplexes were analyzed by western blotting using anti-EGFR antibody. In parallel, immunoblots of EGFR and sortilin-v5 were performed on whole-cell lysate (WCL). **(f)** HEK-293 cells were transiently co-transfected with EGFR-GFP and FL- or Δc sortilin. Next, cells were stimulated or not with EGF (50 ng/mL) for 30 min and immunoprecipitated using anti-GFP antibody. Immunocomplexes were analyzed by western blotting for sortilin. In parallel, immunoblots of P-EGFR, EGFR, P-ERK, and ERK were performed on WCL. **(g)** HEK-293 cells were transiently co-transfected with ΔC sortilin and the myc-tagged extra- or intracellular domain (ECD and ICD, respectively). Next, cell lysates (CL) were immunoprecipitated (IP) with anti-sortilin and immunoblotted with anti-myc. **(h)** NSCLC cell lines harboring EGFR deletion (H1650) or point mutations (H3255, H1975) were stimulated or not with EGF (50 ng/mL) for 30 min. Cell lysates were immunoprecipitated (IP) using anti-sortilin, and immunocomplexes were analyzed by western blotting with anti-EGFR. **(i)** PLA quantification performed on NSCLC cell lines stimulated or not with EGF (50 ng/mL) for 30 min. **(j)** Proximity ligation assays (PLA) were performed on NSCLC cells under the same conditions as described in **(h)**.

Sortilin depletion retains EGFR at the cell surface

Several lines of evidence indicate that sortilin is involved in EGFR trafficking, independently of EGF-induced EGFR internalization. Consequently, the absence of sortilin could limit EGFR endocytosis from the plasma membrane. Interestingly, in sortilin-depleted A549 cells²⁷, EGFR internalization was perturbed, as revealed by immunostaining showing EGFR clusters at the plasma membrane irrespective of EGF stimulation (Figure 4a, insets 1-1 to 2-2). Confocal images showed that sortilin depletion significantly altered the ratio of whole-cell EGFR vs. intracytoplasmic EGFR (Figure 4b). These observations were supported by fluorescence-activated cell sorting (FACS) analysis in which we measured the cell surface level of EGFR to monitor its internalization following EGF stimulation over a 60-min time course (Figure 4c). Our results revealed that EGFR internalization was significantly slower in sortilin-depleted cells than in controls (Figure 4c, point 30 and 60 min). Accordingly,



endocytic assay using fluorescent EGF supports the delay of EGFR internalization in sortilin-depleted cells (Supplementary Figure S2a).

Subsequently, we investigated whether sortilin depletion would impair the EGFR canonical signaling pathway. Interestingly, under basal conditions, sortilin-depleted cells exhibited sustained EGFR signaling, as evidenced by the hyperphosphorylated state of EGFR and MAP kinases AKT and ERK (Figure 4d). Following EGF stimulation, control cells exhibited an increase of EGFR phosphorylation, followed by MAPK activation, as evidenced by elevated phosphorylation of both AKT and ERK1/2 (Figure 4e). Furthermore, whole-cell levels of EGFR decreased with increasing treatment time, consistent with the lysosomal degradation of the protein. Importantly, disruption of EGFR internalization delayed EGFR turnover and increased both the activity and amount of EGFR. Strikingly, sortilin depletion maintained EGFR in a constitutive hyper-phosphorylated state, in agreement with its plasma membrane retention¹⁴ (Figure 4d and 4e). Hence, EGFR induced constitutive signaling, as attested by phosphorylation of the MAP kinases AKT and ERK1/2 (Figure 4d and 4e), suggesting that EGFR plasma membrane retention drives proliferative signaling in the absence of sortilin. As expected, silencing of EGFR in A549 sortilin-depleted cells decreased MAP kinase signaling (Figure 4f). Accordingly, sortilin depletion significantly increased 5-ethynyl-2'-deoxyuridine (EdU) incorporation, reflecting a higher rate of cell proliferation, in comparison with control cells (Figure 4g). However, EGF stimulation did not increase cell proliferation of sortilin-depleted cells, consistent with the basal hyper-activated status of both EGFR and its downstream network (Figure 4g). Interestingly, EGFR silencing significantly decreased the proliferation of sortilin-depleted cells, supporting the idea that the higher proliferation rate of these cells is governed by sustained EGFR proliferative signaling. We reproduced these results in two other EGFR-amplified cell lines, the human glioblastoma U87-MG and the epidermoid squamous A431 cells (Supplementary Figures S2b to S2g).

However, to rule out the possibility that sortilin depletion impairs the EGFR degradative pathway, we individually inhibited the lysosome and proteasome. Bafilomycin A1, a lysosomal acidification inhibitor, decreased EGFR degradation upon EGF stimulation in both control and sortilin-depleted cells; by contrast, the proteasome inhibitor MG132 had no such effect. Conversely, sortilin degradation was limited upon proteasome inhibition (Figure 4h). These results suggest that sortilin is transiently associated with, and acts as a sorting receptor from the plasma membrane, and that the EGFR degradative pathway remains functional despite the absence of sortilin. Furthermore, sortilin depletion did not increase the EGFR mRNA level irrespective of the presence of EGF (Figure 4i), supporting the idea that EGFR accumulation in sortilin-depleted cells corresponds to mis-sorting of EGFR from the plasma membrane. Our results suggested that sortilin limits EGFR proliferative signaling. Interestingly, H1975 cells expressed a lower level of endogenous sortilin than other EGFR-



mutated cell lines (Figure 4j). Because H1975 harbors the EGFR T790M point mutation, which is insensitive to EGFR tyrosine kinase inhibitor (TKI) therapy, we transiently overexpressed sortilin in these cells. Transient sortilin overexpression in H1975 cells decreased both AKT and ERK phosphorylation under basal conditions (Figure 4k), as well as cell proliferation (Figure 4l), suggesting that sortilin alters the malignant behavior of these cells. Thus, despite the strong EGFR–sortilin interaction in the H1975 cell line (Figure 3i), the weak expression of endogenous sortilin seems insufficient to counteract the EGFR proliferative signaling pathway. Strikingly, sortilin overexpression reversed the gefitinib-resistance phenotype of H1975 cells, as evidenced by reduced AKT and ERK phosphorylations in comparison with control cells (Figure 4m).

Together, these results demonstrate that loss of sortilin impairs EGFR internalization and sustains its proliferative signaling.

Sortilin depletion accelerates tumor growth *in vivo*

Previous studies show that sortilin is required for EGFR turnover *in vitro*, and that sortilin downregulation sustains EGFR proliferative signaling. To determine whether the loss of sortilin is important for tumor maintenance *in vivo*, we examined the effect of sortilin depletion on human adenocarcinoma xenografts. For this purpose, we subcutaneously engrafted A549 control or sortilin-depleted cells into nude immunodeficient mice, and then followed tumor growth. As expected, sortilin-depleted cells exhibited much faster tumor growth than control cells from the 15th day onward (Fig. 5a and b). Consistent with this, tumors derived from sortilin-depleted cells were significantly larger on day 25 (Fig. 5a and b). To further assess the proportion of proliferative cells in each group of engrafted mice, we performed immunohistochemical (IHC) staining for Ki-67, a marker of proliferation. In agreement with their faster growth, sortilin-depleted cells had an elevated Ki-67 proliferative index (~80%) relative to control cells (~25%) (Figure 5c and d). Together, these results show that loss of sortilin dramatically increases cell proliferation, and consequently tumor growth, *in vivo*.



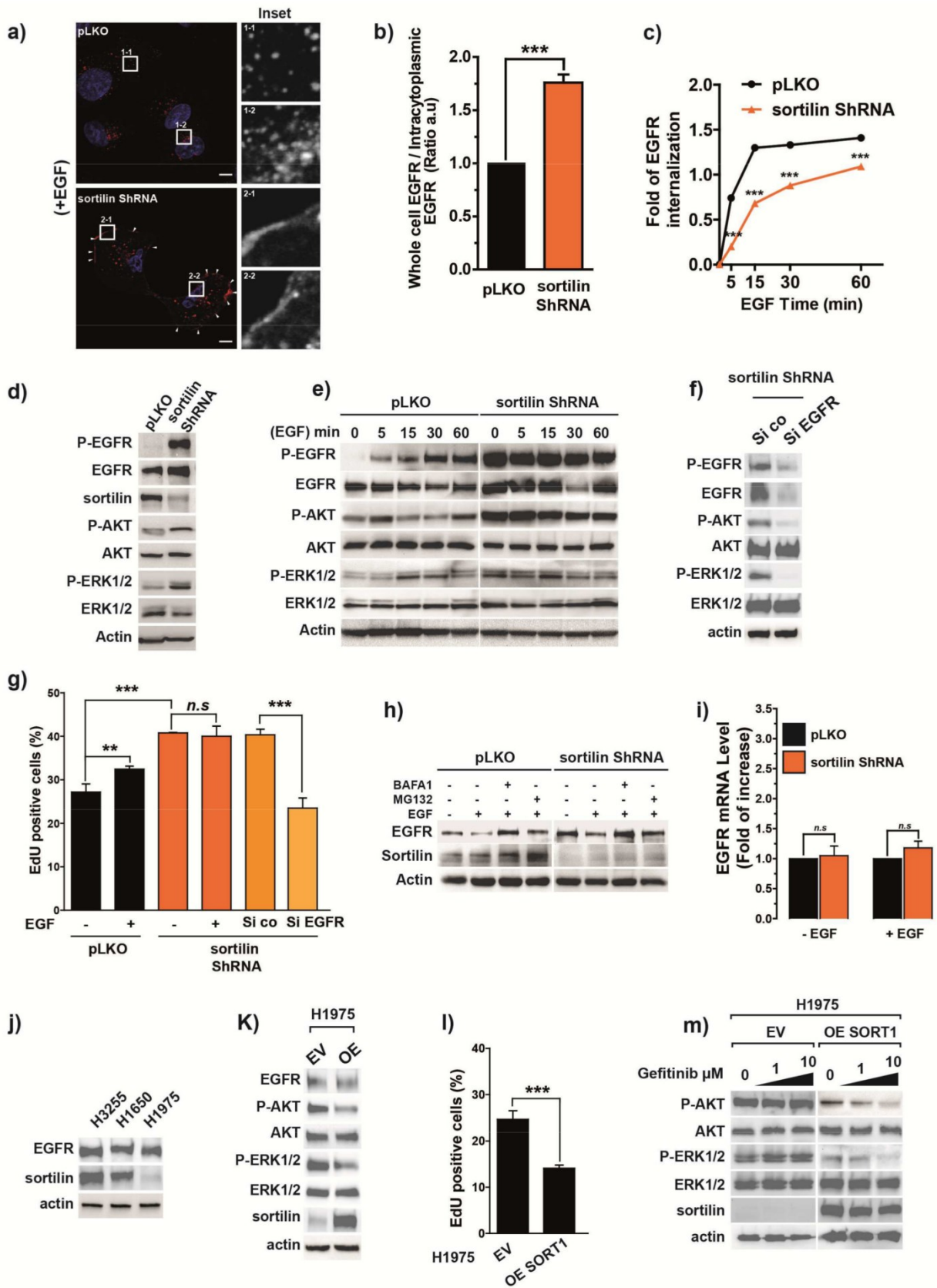


Figure 4. Loss of sortilin greatly perturbs EGFR internalization and dramatically promotes EGFR signaling.

(a) A549 cells expressing shRNA targeting sortilin and control cells (pLKO) were stimulated with EGF (50 ng/mL) for 30 min, and then fixed and immunolabeled for EGFR. Immunofluorescence was analyzed by confocal microscopy. The ratio between whole-cell and intracytoplasmic EGFR intensities, reflecting EGFR membrane retention, is quantified in **(b)**. Data represent means \pm SD. **(c)** Sortilin-depleted and control A549 cells (pLKO) were stimulated with EGF (50 ng/mL) over a 60 min time course. At each time point, cell surface EGFR was stained at 4°C using Alexa Fluor 488 anti-EGFR, and then analyzed by flow cytometry. Curves represent mean fluorescence intensity in sortilin-depleted cells relative to the control. **(d)** Cell lysates from sortilin-depleted (sortilin shRNA) or control A549 cells (pLKO) were immunoblotted with the indicated antibodies. **(e)** A549 sortilin-depleted and control cells (pLKO) were stimulated with EGF (50 ng/mL) over a 60 min time course. Cell lysates were analyzed by western blotting for components of the canonical EGFR signaling pathway using the indicated antibodies. **(f)** Sortilin-depleted cells were transfected with control siRNA (Si co) or EGFR siRNA. Cell lysates were analyzed by western blotting with the indicated antibodies. **(g)** Representative histograms of cell proliferation, as determined by EdU incorporation. Sortilin-depleted cells transfected or not with EGFR siRNA and control A549 cells (pLKO) were stimulated with EGF (50 ng/mL) for 1 h, and then fixed and treated for EdU incorporation. Percentages of EdU-positive cells were calculated by flow-cytometric analysis. **(h)** Sortilin-depleted (sortilin shRNA) or control A549 cells (pLKO) were pretreated with bafilomycin A1 (BAFA1) or MG132 for 2 h, and then stimulated or not with EGF (50 ng/mL) for 30 min. Cell lysates were analyzed by western blotting for EGFR and sortilin protein expression. **(i)** Quantitative PCR analysis of EGFR expression in sortilin-depleted and control A549 cells (pLKO) with or without EGF stimulation (50 ng/mL for 30 min). Results are presented in terms of fold change after normalization against *HPRT* mRNA. **(j)** Cell lysates from H3255, H1650, and H1975 were analyzed for EGFR and sortilin protein expression. **(k)** H1975 cells were transfected or not with *SORT1* overexpression vector, and cell lysates were then analyzed by western blotting for the indicated proteins. **(l)** Representative histograms of cell proliferation, as determined by EdU incorporation in sortilin-overexpressing and control H1975 cells. **(m)** Sortilin-overexpressing and control H1975 cells were treated with increasing doses of gefitinib for 24 h, and cell lysates were analyzed by western blotting for the indicated proteins.



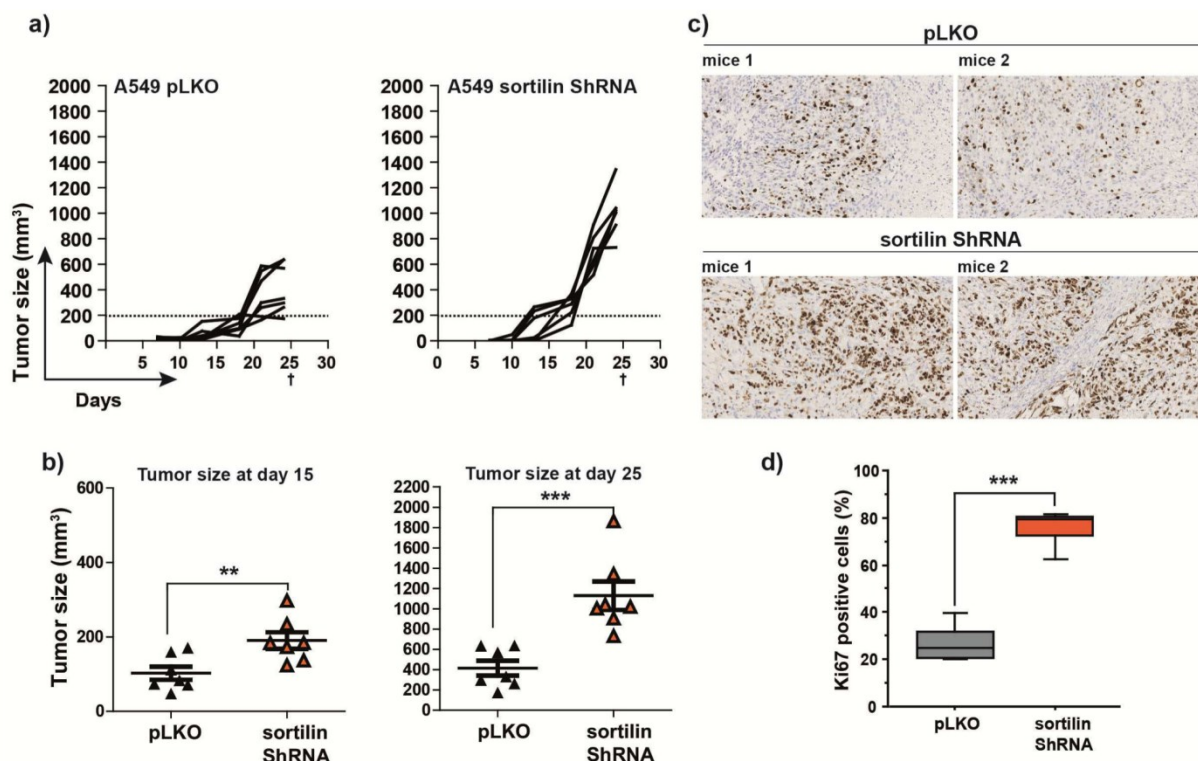


Figure 5. Sortilin depletion dramatically accelerates tumor growth *in vivo*

(a) Tumor growth curves showing evolution of the tumor volume after engraftment of 1×10^6 sortilin-depleted or control A549 cells (pLKO). (b) Grouped column scatter shows the mean difference tumor volume between sortilin-depleted and control cells, 15 and 25 days after engraftment. (c) Twenty-five days after engraftment, all mice were euthanized, and tumors were excised and subjected to immunohistochemical analysis. Tumors from sortilin-depleted or control A549 cells were stained using anti-Ki-67 antibody. Percentages of Ki-67-positive cells are quantified in (d).

Sortilin downregulation is associated with poorer prognosis

Our results obtained on animal models reveal that loss of sortilin is associated with elevated cellular proliferation and accelerated tumor growth. To determine whether this phenomenon is also relevant to human cancer, we performed IHC analysis on 78 patients with non-small cell lung adenocarcinomas (NSCLCs). We analyzed sortilin expression according to grade: grades I–III correspond to well-differentiated, moderately differentiated, and poorly differentiated pathology, respectively; this grade increases with the tumor aggressiveness. We complemented this approach by calculating the percentage of Ki-67-positive nuclei. Interestingly, sortilin expression decreased significantly with pathologic grade (Figure 6a and 6b, insets 1 to 3), whereas the percentage of positive nuclei was significantly higher in grade III than in grades I and II (Figure 6c and 6d insets 4 to 6). These results support the

relationship between grade and aberrant cell proliferation, which is associated with poor prognosis and survival in patients with lung adenocarcinomas⁴⁴. These observations were further supported by the pattern of TTF-1 expression. TTF-1 is highly expressed in lung adenocarcinomas, but loss of TTF-1 is associated with tumor aggressiveness and reduced median survival^{45,46} (Supplementary data S3: as with sortilin, expression of TTF-1 decreases with grade). Thus, reduced expression of sortilin in NSCLC patients was correlated with increased cellular proliferation, accelerated tumor growth, and TTF-1–negative poorly differentiated tumors. Collectively, the phenotypes of sortilin-downregulated tumors were associated with an NSCLC subtype with poorer prognosis.

In light of these results, we performed statistical analysis of publicly available adenocarcinoma datasets from the MSKCC cBioPortal database^{47,48}, based on The Cancer Genome Atlas¹ (TCGA) and the Gene Expression Omnibus (GEO). We manually sorted datasets based on overall survival and expression of *SORT1*, the gene encoding sortilin. The Kaplan–Meier method was used to plot the overall survival of adenocarcinoma patients (n=673) stratified by expression of *SORT1*, and statistical significance was assessed by log-rank test^{49,50}. High expression of sortilin (black curve) was significantly correlated (log-rank $p=3.10^{-9}$) with better survival, in contrast to low expression (orange curve) (Figure 6e). From these results, we analyzed publicly available data to investigate whether sortilin expression could be affected by oncogenic drivers such as KRAS or *EGFR* amplification, as observed in lung adenocarcinoma. Although our statistical tests supported no significance of KRAS mutations, they highlighted an increase in *SORT1* expression in *EGFR*-overexpressing tumors (Figure 6f). Next, we investigated *SORT1* expression in a cohort of patients with low or high *EGFR* expression. Our analyses revealed that sortilin expression was significantly higher in patients with *EGFR* amplification (Figure 6g). Because *EGFR* amplification is correlated with poor outcome, we sorted and curated patients (n=522) with high *EGFR* expression (n=30). Strikingly, Kaplan–Meier analysis revealed that high *SORT1* expression in *EGFR*-overexpressing patients significantly increased overall survival (Figure 6h). Because 75% of tumors with *EGFR* amplification harbor *EGFR* mutations^{51,52}, we analyzed the TCGA data to investigate sortilin expression in these patients. Interestingly, lung adenocarcinomas with *EGFR* TKI–sensitive mutations expressed high levels of *SORT1* (Figure 6i).

Given that *EGFR* is often associated with initiation and the progression of NSCLC^{53,54} and sortilin attenuates *EGFR* proliferative signaling, as observed above in a TKI-resistant cell line (Figure 4k, l, and m), sortilin expression in tumors potentially represents a useful predictive marker of patient outcome.



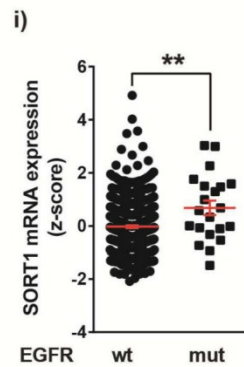
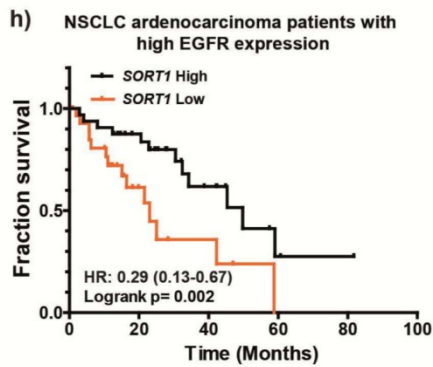
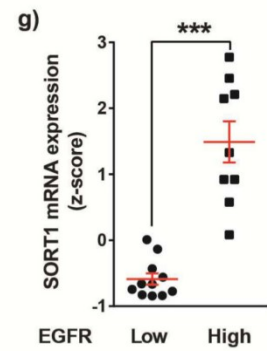
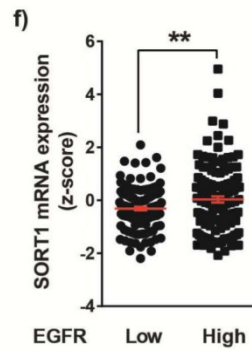
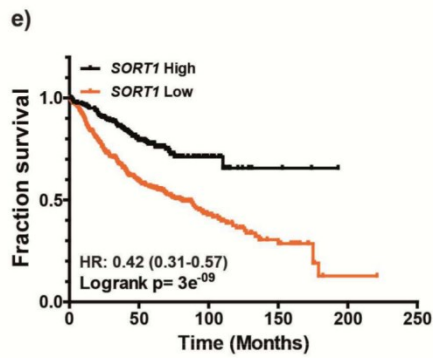
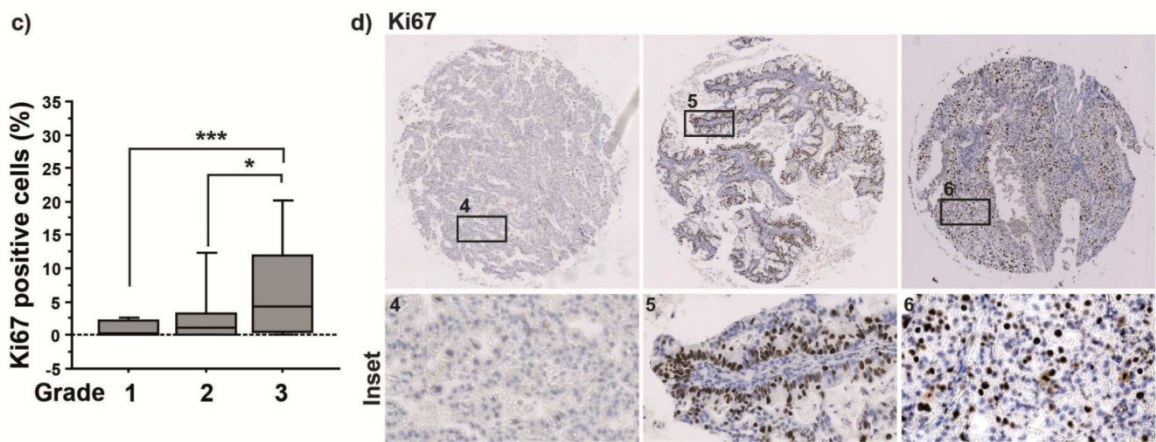
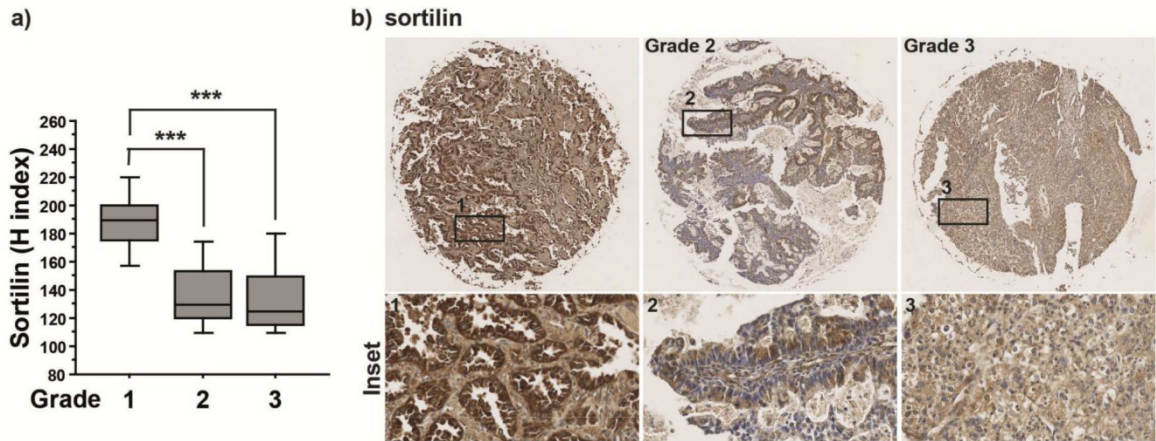


Figure 6. Sortilin expression decreased with the tumor aggressiveness

(a) Boxplot diagram represents the quantification (Hirsch index) of sortilin expression in human lung adenocarcinoma ($n=78$) and highlights the high expression of sortilin at low grade, as seen in representative images in (b): grade I, well-differentiated; grade II, moderately differentiated; grade III, poorly differentiated. Magnification 50 \times , insets 200 \times . (c) Boxplot diagram of the percentage of Ki-67–positive nuclei, reflecting cancer cell proliferation, and tumor aggressiveness in the same patients shown in (b) with representative images (d). Magnification 50 \times , insets 200 \times . (e) Kaplan–Meier curves of overall survival were constructed for the following groups of patients with high (black curve, $n=248$) or low (orange curve, $n=425$) *SORT1* expression, using the online tool at kmplot.com. (f) *In silico* analysis of *SORT1* expression in lung adenocarcinoma with high or low *EGFR* expression; data were obtained from the MSKCC cBioPortal for Cancer Genomics database or Genome Expression Omnibus. (g) Quantitative PCR analyses for *SORT1* and *EGFR* expression in a cohort of patients ($n=20$) with high or low *EGFR* expression. (h) Kaplan–Meier curves showing the survival benefit provided by high *SORT1* expression (black curve, $n=32$) relative to low *SORT1* expression (orange curve, $n=30$) on a subset patients with high *EGFR* expression; data were obtained from the lung adenocarcinoma cohort in the MSKCC cBioPortal database ($n=522$). (i) *In silico* analysis for *SORT1* expression in lung adenocarcinoma with or without *EGFR* TKI–sensitive mutations, using data from the MSKCC cBioPortal for Cancer Genomics database or Genome Expression Omnibus.

Discussion

In this study, we identified sortilin as a key regulator of EGFR trafficking and demonstrated that it limits EGFR proliferative signaling. Our finding supports a model in which sortilin sorts EGFR, modulating its accumulation at the cell surface, and thereby prevents autocrine and sustained signaling, both of which are hallmarks of cancer. The role of sortilin in plasma membrane EGFR regulation and the putative underlying mechanism are summarized in Figure 7. In this model, ligand binding accelerates routing of EGFR by sortilin toward rapid internalization and degradation. This inhibitory mechanism is of central importance to the control of signal duration and intensity. Several mechanisms can result in activation of TKR pathways during initiation and progression of NSCLC, including TKR amplification, upregulated autocrine signaling, and mutations^{36,40,42}. Both histopathological and molecular genetics studies have shown that aberrant activation of TKRs is more frequent in lung adenocarcinomas than in other cancers^{1,55}. EGFR plays key roles in processes related to tumorigenesis, including cell proliferation, cell survival, and metastasis. Because the EGFR downstream signaling network is one of the most frequently deregulated pathways in human cancer, and because multiple facets of EGFR trafficking remain unresolved¹⁹, the roles



played by sorting proteins such as sortilin in EGFR regulation have attracted increasing attention. At the cellular level, the EGFR–sortilin interaction is supported by the results of multilayered analysis of the EGFR interactome following ligand-induced EGFR trafficking⁵⁶. The initial site of the EGFR–sortilin interaction remains to be elucidated. Because sortilin resides mainly in the TGN, it was tempting to speculate that sortilin regulates the anterograde transport of EGFR signaling. Our observations made by inhibiting endocytosis or in cells expressing a recycling-defective variant of sortilin indicated that the two proteins interact primarily at the plasma membrane. Interestingly, the EGFR–sortilin interaction was independent of EGF-induced EGFR phosphorylation and endocytosis and did not trigger EGFR phosphorylation. In the absence of sortilin, almost all EGFR remained at the cell surface, supporting the idea that sortilin is not required to localize EGFR to the plasma membrane following post-translational modification. Thus, these observations indicate that sortilin is not a ligand for EGFR, and is instead involved in turnover of EGFR at the plasma membrane.

Downregulation of sortilin affected EGFR internalization and increased the proportion of the receptor localized to the cell surface. Plasma membrane retention of EGFR subjects the receptor to free ligands, and sustains both its proliferative and potential autocrine signaling. Therefore, loss of sortilin promotes EGFR proliferative signaling and accelerates tumor growth *in vivo*. Overexpression of sortilin in TKI-resistant cells resulted in strong decreases in cell proliferation and gefitinib resistance. Sortilin in the mutant EGFR lung cancer context appears to be acting as a tumor suppressor or inhibiting malignant behavior, while in other cancers it appears to act as an oncogene or promote malignant behavior^{57–59}. These differences will need to be resolved in future studies. Lung adenocarcinoma patients with weak expression of sortilin have poorly differentiated tumors with accelerated proliferation. Overall, the pathologic characteristics of sortilin-downregulated tumors correspond to a subtype of adenocarcinoma with poorer prognosis. Interestingly, in patients whose tumors express high levels of *EGFR*, which is associated with poor prognosis value, higher expression of *SORT1* significantly improved the overall survival.

In summary, our findings describe for the first time the role of sortilin in limiting proliferative signaling by EGFR, and reveal a connection between sortilin expression and patient outcome. The striking role of sortilin in EGFR trafficking should be investigated in the context of other TKRs that are involved in initiation and progression of lung adenocarcinoma.



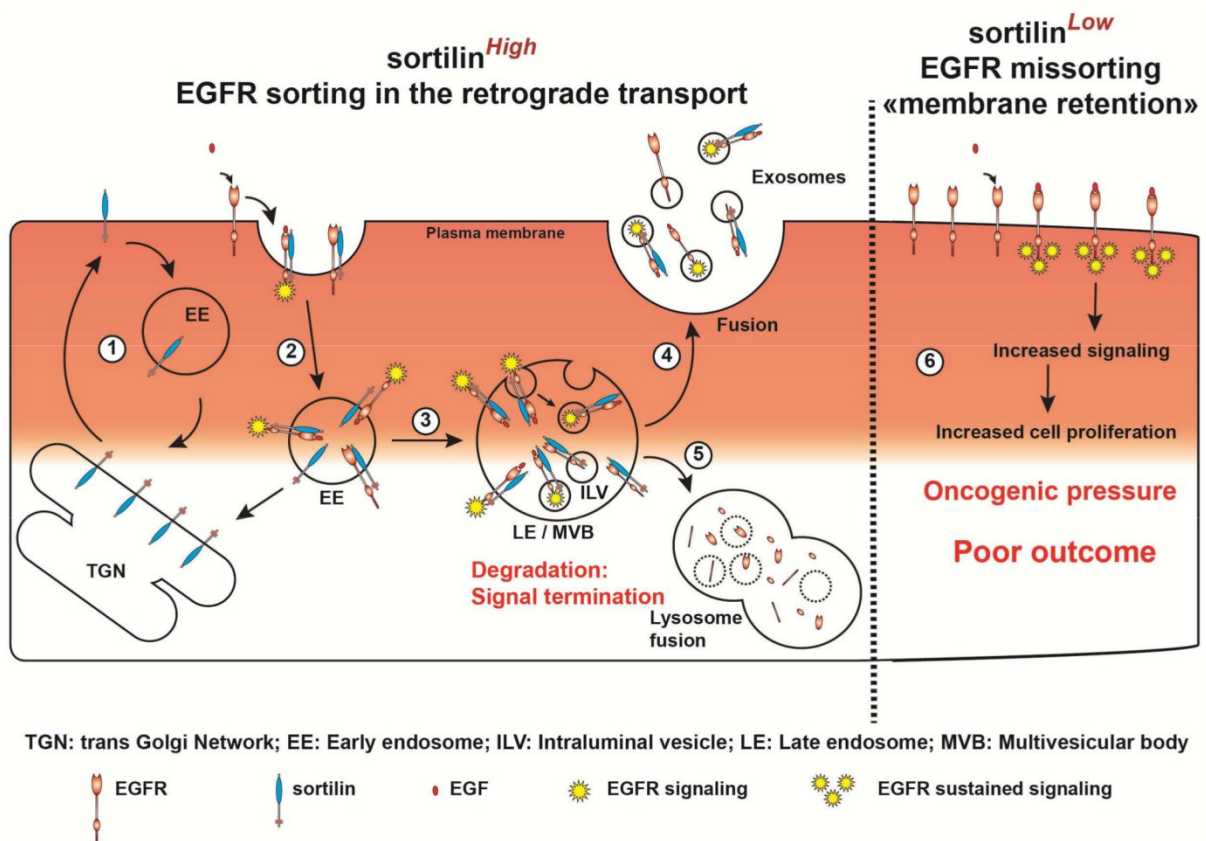


Figure 7. Model of sortilin function in regulation of EGFR at the cell surface

Representative scheme in which sortilin acts as a key regulator of EGFR retrograde transport. Sortilin is mainly localized at the trans-Golgi network (TGN), and the plasma membrane fraction of sortilin cycles continually between the cell surface and the TGN via the endosomes (1). Sortilin binds both unstimulated and stimulated EGFR to allow their internalization (2). Thus, EGFR undergoes intracellular trafficking and sortilin mediates its loading in intraluminal vesicles (3). This ultimately results either in EGFR release through exosomes (4) or receptor degradation (5), thus ensuring signal termination. Conversely, sortilin downregulation impairs EGFR internalization (6), and EGFR consequently retained at the cell surface. Moreover, in sortilin-downregulated cells, EGFR exists in a hyperphosphorylated state, and transduces a constitutive survival signal that promotes tumor growth.

Methods

Immunoblotting and immunoprecipitation

For immunoblotting, cells were washed with ice-cold phosphate-buffered saline (PBS, Gibco, France), and then lysed in cell lysis buffer (Cell Signaling) containing 1% protease inhibitor cocktail (Roche, France) and phosphatase inhibitor (Sigma, France). Cell lysates were sonified (Vibra-Cell Sonifier, set at 50% amplitude) three times (2 sec each, with at least 1 min of rest on ice pulses) and clarified by centrifugation at 18,000 *g*. Solubilized proteins (30 µg) were subjected to SDS-PAGE and western blot analysis using antibodies specific for sortilin (BD Bioscience, #612101), P-EGFR (Tyr 1068, #3777; Cell Signaling, Ozyme, France), EGFR (Cell Signaling, #4267, Ozyme or Life Technologies, clone H11 #MA5-13070, Fischer Scientific, France), pERK1/2 (Thr202/Thr204, #4370, Cell Signaling, Ozyme), ERK1/2 (Cell Signaling, #9102, Ozyme), pAKT (Ser 473, #4060, Cell Signaling, Ozyme) AKT (Cell Signaling, #4691, Ozyme), EEA1 (Cell Signaling, #3288, Ozyme), Rab5 (Cell Signaling, #3547, Ozyme), LAMP2 (Santa Cruz Biotechnology, sc-18822, Tebu, France), TGN46 (Sigma, #T7576), v5, GFP tag (Life Technologies, respectively #MA5-15253 and #MA5-15256, Fischer Scientific), and actin (Sigma, #A2066) (used as a loading control). Immunoreactive bands were detected with horseradish peroxidase (HRP)-conjugated secondary antibodies (Dako, Agilent, France) in the presence of enhanced chemiluminescence substrate.

For IP, cells were washed with ice-cold PBS and lysed in IP lysis buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 2 mM EDTA; all reagents from Sigma) containing 1% protease inhibitor cocktail (Roche) and phosphatase inhibitor (Roche). Lysates were clarified by centrifugation at 18,000 *g*. Cell lysates were precleared for 1 h at 4°C with 10% (v/v) cocktail from a non-protein A-producing *S. aureus* strain (Sigma). Precleared lysates were clarified by centrifugation for 5 min at 18,000 *g*. 1 mL of Protein A Sepharose beads (Sigma) were washed three times with IP buffer and resuspended in 1 mL of IP buffer. Then, 200 µg protein lysate and 2 µg antibody were solubilized in 1 mL IP buffer and 50 µL of previously prepared Protein A Sepharose beads were added to the suspension and incubated overnight at 4°C with gentle rocking. Control lysate was mixed with normal mouse IgG or normal rabbit IgG and beads. The next morning, immunoprecipitates were washed three times with 1 mL of IP lysis buffer at 4°C, and then boiled in loading buffer (Bio-Rad) at 95°C for 5 min. The beads were removed by centrifugation, and immunoprecipitated lysates were subjected to SDS-PAGE and western blot analysis (Bio-Rad).

Cell culture and treatments



Cell lines HEK293T, A549, H1650, and H1975 were obtained from American Type Culture Collection (ATCC), whereas H3255 was generously provided by Sylvie Gazzeri of the Albert Bonniot Institut (France). All cell lines were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium GlutaMAX™ (Gibco) supplemented with 10% fetal bovine serum (IDbio), 1% non-essential amino acids (Gibco), and antibiotics (IDbio). All cells were cultured in a humidified incubator set at 5% CO₂ and 37°C. Cells were cultured under serum conditions prior to stimulation with EGF (Life Technologies) at 50 ng/mL for 30 min. For treatments with chemical compounds, A549 cells were pretreated with 100 μM Dynasore (Sigma) for 2 h prior to EGF stimulation (50 ng/mL, 30 min).

Cell proliferation assays and flow cytometry

Cell proliferation was measured using the Click-it EdU Alexa Fluor 488 Flow Cytometry Assay (Invitrogen). Briefly, cells (2×10⁵ per well) were incubated overnight on six-well plates, incubated with EdU for 2 h, and then stimulated for 1 h with EGF (50 ng/mL). Proliferation was assessed by flow cytometry on a FACS Calibur instrument (BD Biosciences), and the data were analyzed using the Cell Quest software (BD Biosciences). Each experiment was repeated at least three times. Expression of cell surface EGFR was monitored by flow cytometry on living cells without permeabilization. After washing in ice-cold PBS, cells were immunolabeled on ice for 10 min with APC-conjugated anti-EGFR (Biolegend, #BLE352906, Ozyme) in PBS containing 2% BSA. After two further washes in ice-cold PBS containing 2% BSA and one wash in ice-cold PBS, cells were suspended in PBS and analyzed by flow cytometry on a FACSCalibur instrument; data were analyzed using the Cell Quest software. Measurements were compared to the isotopic control (APC-conjugated anti-mouse IgG1, Biolegend clone MOPC-21 #BLE400122, Ozyme) to determine background and positivity thresholds. Each experiment was repeated at least three times.

Lysosome and proteasome inhibition

A549 cells were cultured in a humidified incubator set at 5% CO₂ and 37°C and pretreated with bafilomycin A1 (Sigma) (50 nM) or MG-132 (Sigma) (10 μM) for 2 h prior to EGF stimulation (50 ng/mL, 30 min).

Plasmids and lentivirus-mediated RNA interference

For both transient and stable transfection, cells were transfected using the JetPei transfection reagent (Polyplus transfection, Ozyme). Lentivirus-mediated RNA interference was used to generate stable sortilin-knockdown cell lines. The *SORT1* shRNA sequence was: TRCN0000005295

(5'-CCGGCCAGTGTACTTTACCAATATACTCGAGTATATTGGTAAAGTACACTGGTTTTT-



3')^{27,60}. Wild-type EGFR was a gift from Matthew Meyerson⁶¹ (Addgene plasmid # 11011); EGFR-GFP was a gift from Alexander Sorkin⁶² (Addgene plasmid # 32751); EGFR-ECD (1-644) and EGFR-ICD (645-1186) were a gift from Mien-Chie Hung⁶³ (Addgene plasmid # 42666 and # 42667); and sortilin Full-Length and Δc constructs were gifts from Gina Finan³⁹.

RNA interference

For interference assays, sortilin-depleted A549 cells were transfected using INTERFERin (Polyplus transfection, Illkirch, France). Each transfection used 100 nM siRNA against EGFR (SignalSilence® EGF Receptor siRNA I, Ozyme), or control siRNA (SignalSilence® Control siRNA [Unconjugated], Ozyme).

Quantitative reverse transcription-PCR

The Qiagen RNeasy kit was used to isolate total RNA from cells (Qiagen). Single-stranded cDNA was prepared using the high capacity cDNA reverse transcription kit (Applied Biosystems). The reaction was stopped by incubation at 95°C for 5 min. Approximately 100 ng of cDNA was used for each PCR reaction, performed with TaqMan (Applied Biosystems) on an ABI Step One Plus real-time thermal cycler (Applied Biosystems). PCR primers and probes for EGFR (Hs01076090_m1) and HPRT (Hs02800695_m1) were from Life Technologies, and the primer/probe set for sortilin was designed for this study.

Immunofluorescence, PLA and confocal microscopy analysis

Cells grown on glass coverslips and were washed twice in ice-cold PBS before fixation in methanol or 4% paraformaldehyde for 10 min on ice. After fixation, the cells were washed with wash buffer solution, PBS containing 1% (w/v) BSA, and blocked for 30 min with PBS containing 3% BSA (IDbio). The cells were immunolabeled at 4°C overnight with the indicated primary antibody, anti EGFR (Cell Signaling, Ozyme, #4267, 1/100), anti sortilin (Abcam, #ab16640, France) in blocking solution. The following morning, the cells were washed three times (PBS, 1% BSA), and primary antibodies were labeled either with Alexa Fluor 594–conjugated anti-rabbit-IgG or Alexa Fluor 488–conjugated anti-mouse-IgG antibodies (1:1000; Life Technologies) for 2 h at room temperature. The cells were washed three times (PBS, 1% BSA). Finally, the cells were mounted using Fluoroshield mounting media (Sigma) containing 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) to stain the nuclei. For endocytic assay, biotinylated EGF, complexed to Alexa Fluor 647, was used following manufacturer's instructions (Life Technologies, France, #E35351). Fluorescence images were obtained using epifluorescence microscopes (Zeiss Axiovert) equipped with a laser-scanning confocal imaging system (Zeiss LSM 510 META or LSM800). Mander's coefficients were calculated using the Zeiss LSM 510 META or ZEN software (Zeiss) on non-saturated



pictures with an optical slice of 0.8 μm . At least 30 cells were acquired for each condition. Cell surface expression of either EGFR or sortilin (calculated from the difference between the whole-cell and the intracellular means of fluorescence) were analyzed using the ImageJ software ([ImageJ](#)).

For PLA, the cells were fixed with 4% paraformaldehyde for 10 min, and then permeabilized for 30 min on ice in 0.1% Triton X-100 (Sigma) in PBS. Subsequently, the cells were washed with PBS, and blocking solution (2% BSA in PBS) was applied for 30 min at 37°C in a humidified chamber. Primary antibodies against EGFR (mouse monoclonal, 1:100, Life Technologies) and sortilin (rabbit polyclonal, 1:100, Abcam) diluted in blocking solution were added, and the sample was incubated for 30 min at 37°C. The cells were then washed with buffer A of the Duolink II proximity ligation assay kit (Olink Bioscience, Sigma). Subsequently, the Duolink II PLA probe anti-mouse Minus and the Duolink II PLA probe anti-rabbit Plus were added to the cells, and the sample was incubated for 60 min at 37°C. To link the two probes, the cells were washed in buffer A and incubated for 30 min at 37°C in Duolink II ligation buffer diluted in filtered distilled water containing ligase. Following ligation, the cells were washed in buffer A, and then incubated for 100 min at 37°C with the Duolink II orange amplification buffer containing polymerase. The cells were then washed three times in buffer B and mounted with *in-situ* mounting media containing DAPI. Quantitative analyses obtained from each independent sample were performed using the ImageJ software (NIH, Bethesda) based on the mean fluorescence values. At least 50 cells were acquired for each condition, and the results are presented as ratios relative to the control cells.

Endosome/subcellular fractionation

Cells were washed with ice-cold PBS (pH 7.4), rapidly swelled with osmotic buffer (10 mM Tris-HCl [Sigma], pH 7.4), and scraped into homogenization buffer (10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 1 mM EGTA, 0.5 mM EDTA, 0.25 M sucrose; all reagents from Sigma) containing 1% protease inhibitor cocktail and phosphatase inhibitor. The disrupted cells were homogenized using a Dounce homogenizer (IKALabortechnik), and post-nuclear supernatants (PNS) were obtained by centrifugation of the homogenate for 10 min at 1000 g. PNS were centrifuged at 10,000 g for 20 min at 4°C to pellet the plasma membrane, mitochondria, and rough endoplasmic reticulum. The PNS were then fractionated on a discontinuous 10–30% (w/v) OptiPrep (Sigma) density gradient as described by Li and Donowitz⁴⁹.

A 50% (w/v) OptiPrep working solution (WS) was prepared by mixing 5 volumes of OptiPrep with 1 volume of diluent solution (0.25 M sucrose, 6 mM EDTA, 60 mM Tris-HCl, pH 7.4). Then, the WS of 50% OptiPrep was diluted in homogenization media (HM) (0.25 M sucrose, 1 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl, pH 7.4) to obtain nine solutions containing different percentages of OptiPrep (10%, 12.5%, 15%, 17.5%, 20%, 22.5%, 25%, 27.5%, and 30%).



The OptiPrep cushions were layered manually in an ultracentrifuge tube, with higher concentrations at the bottom and lower concentrations at the top. The PNS were diluted into the HM and loaded onto the top of the light cushion before to at ultracentrifugation at 100,000 g for 16 h at 4°C. The following morning, 20 fractions of the 10 layers were collected, and the proteins were precipitated using 20% (w/v) of trichloroacetic acid (Sigma) and 10% (w/v) of ice-cold acetone (Sigma). The precipitated proteins were pelleted by centrifugation at 18,000 g for 30 min at 4°C, then washed twice in ice-cold acetone by repeated centrifugation of 18.000 g for 2 min at 4°C. Protein pellets were solubilized in the loading buffer and boiled at 95°C for 5 min. Proteins were subjected to SDS–PAGE in the order of collection (i.e., from light to the heavy subcellular membrane vesicles), and western blot analysis was performed with the corresponding antibodies.

Mice and *in vivo* tumor growth

Nude female mice were obtained from Janvier Labs (France). Mice were housed in specific pathogen–free conditions, and experiments were done in accordance with the guidelines of the French Veterinary Department. Young mice (6-8 weeks of age) were injected subcutaneously in the left thigh with 1×10^6 cells in 20 μ L of PBS. Tumor volume (=Length x Width x [(Length + Width)/2]) was measured twice weekly. Mice were sacrificed 25 days after injection. Tumors were harvested, fixed with formaldehyde, embedded in paraffin, and processed for IHC.

Patients and immunohistochemistry

Lung adenocarcinoma tissue microarrays containing 48 cases of lung adenocarcinoma, with information about pathological grade and TTF-1 IHC results, were provided by US Biomax (BCS04017a; US Biomax, United States). In addition, 30 lung adenocarcinoma tumors in paraffin-embedded blocks were obtained from the Tumor Bank (Biolim) of Limoges University Hospital, under protocols approved by the Institutional Review Board (AC-2013-1853, DC-2011-1264) of the Anatomic-Pathology department of CHU Dupuytren Limoges. All patients were informed of the use of their tissue samples in research studies. Immunohistochemical and hematoxylin/eosin staining was performed on 5- μ m-thick consecutive sections. Antibodies against sortilin (Alomone, Israël, 1/175, #ANT-009), EGFR (Cell Signaling, Ozyme, #4267, 1/25), and Ki-67 (Dako, clone MIB-1, #M7240, 1/200) were used for tissue labeling on a Leica Bond-Max using the Bond Polymer Refine Detection kit. For sortilin and EGFR labeling, samples were pretreated with ER1 for 5 min; for Ki-67 labeling, samples were pretreated for 20 min with ER2. Labeling was performed with the same device (Leica Bond-Max), and slides were mounted in a non-aqueous mounting medium. Images were acquired on a Hamamatsu slide scanner. Each image capture was



visually quantified by the adapted Hirsh score method⁶⁴, performed in a triple-blind manner. To evaluate the percentage of Ki-67–positive nuclei, the publicly available software [ImmunoRatio](#)⁶⁵ was used.

Bioinformatic analyses

Overall survival and vital status were obtained using the Kaplan–Meier Plotter for lung cancer ([kmpplot](#)), and computed as a function of sortilin expression using data extracted from GEO (n=673 patients) datasets with accession numbers GSE14814, GSE19188, GSE29013, GSE30219, GSE31210, GSE3141, GSE31908, GSE37745, and GSE50081. EGFR and sortilin expression data and corresponding overall patient survival and vital status data were extracted from the [cBioPortal](#) dataset taken from TCGA archives (TCGA, Nature 2014; Provisional TCGA), representing data from a total of 522 lung adenocarcinoma patients.

Statistical analysis

Treatments, relative fluorescence intensities, antibody arrays, and western blotting experiments were compared with controls using the StatView software (v.5.0). Data shown are representative of at least three independent experiments. Error bars represent s.e.m. Results were analyzed for statistical significance by one-way ANOVA or Student's t-test. $p \leq 0.05$ was considered significant, with actual values represented by asterisks (* $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$). Survival data were subjected to Kaplan–Meier analysis. EGFR and sortilin expression data were correlated using Cox regression analysis. Cutoff values were determined using the [Cutoff Finder](#)⁴⁹.

Acknowledgements

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

Competing interests



The authors declare no competing interests.

Author contributions

H.A., T.N. performed the experiments and analyzed the data. A.M. contributed to image analysis. K.F., F.B. and B.M. participated in collection of patient's samples and clinical data collection. H.A., T.N., F.V., F.B., and M-O.J. participated in the study design. H.A., T.N., F.V., F.L., and M-O. J. coordinated the study. All authors read and approved the final manuscript.



References

1. Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive molecular profiling of lung adenocarcinoma. *Nature* **511**, 543–550 (2014).
2. Lemmon, M. A. & Schlessinger, J. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell* **141**, 1117–1134 (2010).
3. Ullrich, A. *et al.* Human epidermal growth factor receptor cDNA sequence and aberrant expression of the amplified gene in A431 epidermoid carcinoma cells. *Nature* **309**, 418–425 (1984).
4. Tomas, A. *et al.* WASH and Tsg101/ALIX-dependent diversion of stress-internalized EGFR from the canonical endocytic pathway. *Nat. Commun.* **6**, (2015).
5. Capuani, F. *et al.* Quantitative analysis reveals how EGFR activation and downregulation are coupled in normal but not in cancer cells. *Nat. Commun.* **6**, 7999 (2015).
6. Torrisi, M. R. *et al.* Eps15 is recruited to the plasma membrane upon epidermal growth factor receptor activation and localizes to components of the endocytic pathway during receptor internalization. *Mol. Biol. Cell* **10**, 417–434 (1999).
7. Sebolt-Leopold, J. S. & Herrera, R. Targeting the mitogen-activated protein kinase cascade to treat cancer. *Nat. Rev. Cancer* **4**, 937–947 (2004).
8. Roberts, P. J. & Der, C. J. Targeting the Raf-MEK-ERK mitogen-activated protein kinase cascade for the treatment of cancer. *Oncogene* **26**, 3291–3310 (2007).
9. Sorkin, A. & Goh, L. K. Endocytosis and intracellular trafficking of ErbBs. *Exp. Cell Res.* **315**, 683–696 (2009).
10. Di Fiore, P. P. *et al.* Overexpression of the human EGF receptor confers an EGF-dependent transformed phenotype to NIH 3T3 cells. *Cell* **51**, 1063–1070 (1987).
11. Kawamata, H., Kameyama, S. & Oyasu, R. In vitro and in vivo acceleration of the neoplastic phenotype of a low-tumorigenicity rat bladder carcinoma cell line by transfected transforming growth factor-alpha. *Mol. Carcinog.* **9**, 210–219 (1994).



12. Hayman, M. J. & Enrietto, P. J. Cell transformation by the epidermal growth factor receptor and v-erbB. *Cancer Cells Cold Spring Harb. N* 1989 **3**, 302–307 (1991).
13. Henze, A.-T. *et al.* Loss of PHD3 allows tumours to overcome hypoxic growth inhibition and sustain proliferation through EGFR. *Nat. Commun.* **5**, 5582 (2014).
14. Garvalov, B. K. *et al.* PHD3 regulates EGFR internalization and signalling in tumours. *Nat. Commun.* **5**, 5577 (2014).
15. Ying, H. *et al.* Mig-6 controls EGFR trafficking and suppresses gliomagenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 6912–6917 (2010).
16. Du, Y. *et al.* Syntaxin 6-mediated Golgi translocation plays an important role in nuclear functions of EGFR through microtubule-dependent trafficking. *Oncogene* **33**, 756–770 (2014).
17. Nicholson, R. I., Gee, J. M. & Harper, M. E. EGFR and cancer prognosis. *Eur. J. Cancer Oxf. Engl.* 1990 **37 Suppl 4**, S9-15 (2001).
18. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* **144**, 646–674 (2011).
19. Rappoport, J. Z. & Simon, S. M. Endocytic trafficking of activated EGFR is AP-2 dependent and occurs through preformed clathrin spots. *J. Cell Sci.* **122**, 1301–1305 (2009).
20. Mazella, J. *et al.* The 100-kDa neurotensin receptor is gp95/sortilin, a non-G-protein-coupled receptor. *J. Biol. Chem.* **273**, 26273–26276 (1998).
21. Mazella, J. Sortilin/neurotensin receptor-3: a new tool to investigate neurotensin signaling and cellular trafficking? *Cell. Signal.* **13**, 1–6 (2001).
22. Petersen, C. M. *et al.* Molecular identification of a novel candidate sorting receptor purified from human brain by receptor-associated protein affinity chromatography. *J. Biol. Chem.* **272**, 3599–3605 (1997).
23. Marcusson, E. G., Horazdovsky, B. F., Cereghino, J. L., Gharakhanian, E. & Emr, S. D. The sorting receptor for yeast vacuolar carboxypeptidase Y is encoded by the VPS10 gene. *Cell* **77**, 579–586 (1994).



24. Kim, T. & Hempstead, B. L. NRH2 is a trafficking switch to regulate sortilin localization and permit proneurotrophin-induced cell death. *EMBO J.* **28**, 1612–1623 (2009).
25. Quistgaard, E. M. *et al.* Ligands bind to Sortilin in the tunnel of a ten-bladed beta-propeller domain. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **16**, 96–98 (2009).
26. Vaegter, C. B. *et al.* Sortilin associates with Trk receptors to enhance anterograde transport and neurotrophin signaling. *Nat. Neurosci.* **14**, 54–61 (2011).
27. Wilson, C. M. *et al.* Sortilin mediates the release and transfer of exosomes in concert with two tyrosine kinase receptors. *J. Cell Sci.* **127**, 3983–3997 (2014).
28. Nielsen, M. S. *et al.* The sortilin cytoplasmic tail conveys Golgi-endosome transport and binds the VHS domain of the GGA2 sorting protein. *EMBO J.* **20**, 2180–2190 (2001).
29. Colombo, M., Raposo, G. & Théry, C. Biogenesis, secretion, and intercellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **30**, 255–289 (2014).
30. Wei, Y. *et al.* EGFR-mediated Beclin 1 phosphorylation in autophagy suppression, tumor progression, and tumor chemoresistance. *Cell* **154**, 1269–1284 (2013).
31. Carpenter, G. Receptors for epidermal growth factor and other polypeptide mitogens. *Annu. Rev. Biochem.* **56**, 881–914 (1987).
32. Mazella, J. Sortilin/neurotensin receptor-3: a new tool to investigate neurotensin signaling and cellular trafficking? *Cell. Signal.* **13**, 1–6 (2001).
33. Macia, E. *et al.* Dynasore, a cell-permeable inhibitor of dynamin. *Dev. Cell* **10**, 839–850 (2006).
34. Vieira, A. V., Lamaze, C. & Schmid, S. L. Control of EGF receptor signaling by clathrin-mediated endocytosis. *Science* **274**, 2086–2089 (1996).
35. Mesaki, K., Tanabe, K., Obayashi, M., Oe, N. & Takei, K. Fission of tubular endosomes triggers endosomal acidification and movement. *PLoS One* **6**, e19764 (2011).
36. Wiley, H. S. *et al.* The role of tyrosine kinase activity in endocytosis, compartmentation, and down-regulation of the epidermal growth factor receptor. *J. Biol. Chem.* **266**, 11083–11094 (1991).



37. Nykjaer, A. *et al.* Sortilin is essential for proNGF-induced neuronal cell death. *Nature* **427**, 843–848 (2004).
38. Stern, K. A. *et al.* Epidermal Growth Factor Receptor Fate Is Controlled by Hrs Tyrosine Phosphorylation Sites That Regulate Hrs Degradation. *Mol. Cell. Biol.* **27**, 888–898 (2007).
39. Finan, G. M., Okada, H. & Kim, T.-W. BACE1 retrograde trafficking is uniquely regulated by the cytoplasmic domain of sortilin. *J. Biol. Chem.* **286**, 12602–12616 (2011).
40. Cooper, A. A. & Stevens, T. H. Vps10p cycles between the late-Golgi and prevacuolar compartments in its function as the sorting receptor for multiple yeast vacuolar hydrolases. *J. Cell Biol.* **133**, 529–541 (1996).
41. Sharma, S. V., Bell, D. W., Settleman, J. & Haber, D. A. Epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer. *Nat. Rev. Cancer* **7**, 169–181 (2007).
42. Chung, B. M. *et al.* Aberrant trafficking of NSCLC-associated EGFR mutants through the endocytic recycling pathway promotes interaction with Src. *BMC Cell Biol.* **10**, 84 (2009).
43. Tomas, A., Futter, C. E. & Eden, E. R. EGF receptor trafficking: consequences for signaling and cancer. *Trends Cell Biol.* **24**, 26–34 (2014).
44. Martin, B. *et al.* Ki-67 expression and patients survival in lung cancer: systematic review of the literature with meta-analysis. *Br. J. Cancer* **91**, 2018–2025 (2004).
45. Saad, R. S., Liu, Y. L., Han, H., Landreneau, R. J. & Silverman, J. F. Prognostic significance of thyroid transcription factor-1 expression in both early-stage conventional adenocarcinoma and bronchioloalveolar carcinoma of the lung. *Hum. Pathol.* **35**, 3–7 (2004).
46. Solis, L. M. *et al.* Histologic patterns and molecular characteristics of lung adenocarcinoma associated with clinical outcome. *Cancer* **118**, 2889–2899 (2012).
47. Gao, J. *et al.* Integrative analysis of complex cancer genomics and clinical profiles using the cBioPortal. *Sci. Signal.* **6**, p11 (2013).
48. Cerami, E. *et al.* The cBio cancer genomics portal: an open platform for exploring multidimensional cancer genomics data. *Cancer Discov.* **2**, 401–404 (2012).



49. Budczies, J. *et al.* Cutoff Finder: a comprehensive and straightforward Web application enabling rapid biomarker cutoff optimization. *PLoS One* **7**, e51862 (2012).
50. Gyórfy, B., Surowiak, P., Budczies, J. & Lániczky, A. Online survival analysis software to assess the prognostic value of biomarkers using transcriptomic data in non-small-cell lung cancer. *PLoS One* **8**, e82241 (2013).
51. Li, A. R. *et al.* EGFR mutations in lung adenocarcinomas: clinical testing experience and relationship to EGFR gene copy number and immunohistochemical expression. *J. Mol. Diagn. JMD* **10**, 242–248 (2008).
52. Ladanyi, M. & Pao, W. Lung adenocarcinoma: guiding EGFR-targeted therapy and beyond. *Mod. Pathol. Off. J. U. S. Can. Acad. Pathol. Inc* **21 Suppl 2**, S16-22 (2008).
53. Ohsaki, Y. *et al.* Epidermal growth factor receptor expression correlates with poor prognosis in non-small cell lung cancer patients with p53 overexpression. *Oncol. Rep.* **7**, 603–607 (2000).
54. Inamura, K., Ninomiya, H., Ishikawa, Y. & Matsubara, O. Is the epidermal growth factor receptor status in lung cancers reflected in clinicopathologic features? *Arch. Pathol. Lab. Med.* **134**, 66–72 (2010).
55. Alexandrov, L. B. *et al.* Signatures of mutational processes in human cancer. *Nature* **500**, 415–421 (2013).
56. Francavilla, C. *et al.* Multilayered proteomics reveals molecular switches dictating ligand-dependent EGFR trafficking. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **23**, 608–618 (2016).
57. Roselli, S. *et al.* Sortilin is associated with breast cancer aggressiveness and contributes to tumor cell adhesion and invasion. *Oncotarget* **6**, 10473–10486 (2015).
58. Massa, F. *et al.* Impairment of HT29 Cancer Cells Cohesion by the Soluble Form of Neurotensin Receptor-3. *Genes Cancer* **5**, 240–249 (2014).
59. Ghaemimanesh, F. *et al.* The effect of sortilin silencing on ovarian carcinoma cells. *Avicenna J. Med. Biotechnol.* **6**, 169–177 (2014).



60. Magnaudeix, A. *et al.* PP2A blockade inhibits autophagy and causes intraneuronal accumulation of ubiquitinated proteins. *Neurobiol. Aging* **34**, 770–790 (2013).
61. Greulich, H. *et al.* Oncogenic transformation by inhibitor-sensitive and -resistant EGFR mutants. *PLoS Med.* **2**, e313 (2005).
62. Carter, R. E. & Sorkin, A. Endocytosis of functional epidermal growth factor receptor-green fluorescent protein chimera. *J. Biol. Chem.* **273**, 35000–35007 (1998).
63. Hsu, S.-C. & Hung, M.-C. Characterization of a novel tripartite nuclear localization sequence in the EGFR family. *J. Biol. Chem.* **282**, 10432–10440 (2007).
64. Pirker, R. *et al.* EGFR expression as a predictor of survival for first-line chemotherapy plus cetuximab in patients with advanced non-small-cell lung cancer: analysis of data from the phase 3 FLEX study. *Lancet Oncol.* **13**, 33–42 (2012).
65. Tuominen, V. J., Ruotoistenmäki, S., Viitanen, A., Jumppanen, M. & Isola, J. ImmunoRatio: a publicly available web application for quantitative image analysis of estrogen receptor (ER), progesterone receptor (PR), and Ki-67. *Breast Cancer Res. BCR* **12**, R56 (2010).
66. Li, X. & Donowitz, M. Fractionation of subcellular membrane vesicles of epithelial and non-epithelial cells by OptiPrep™ density gradient ultracentrifugation. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* **1174**, 85–99 (2014).



SUPPLEMENTARY FIGURES

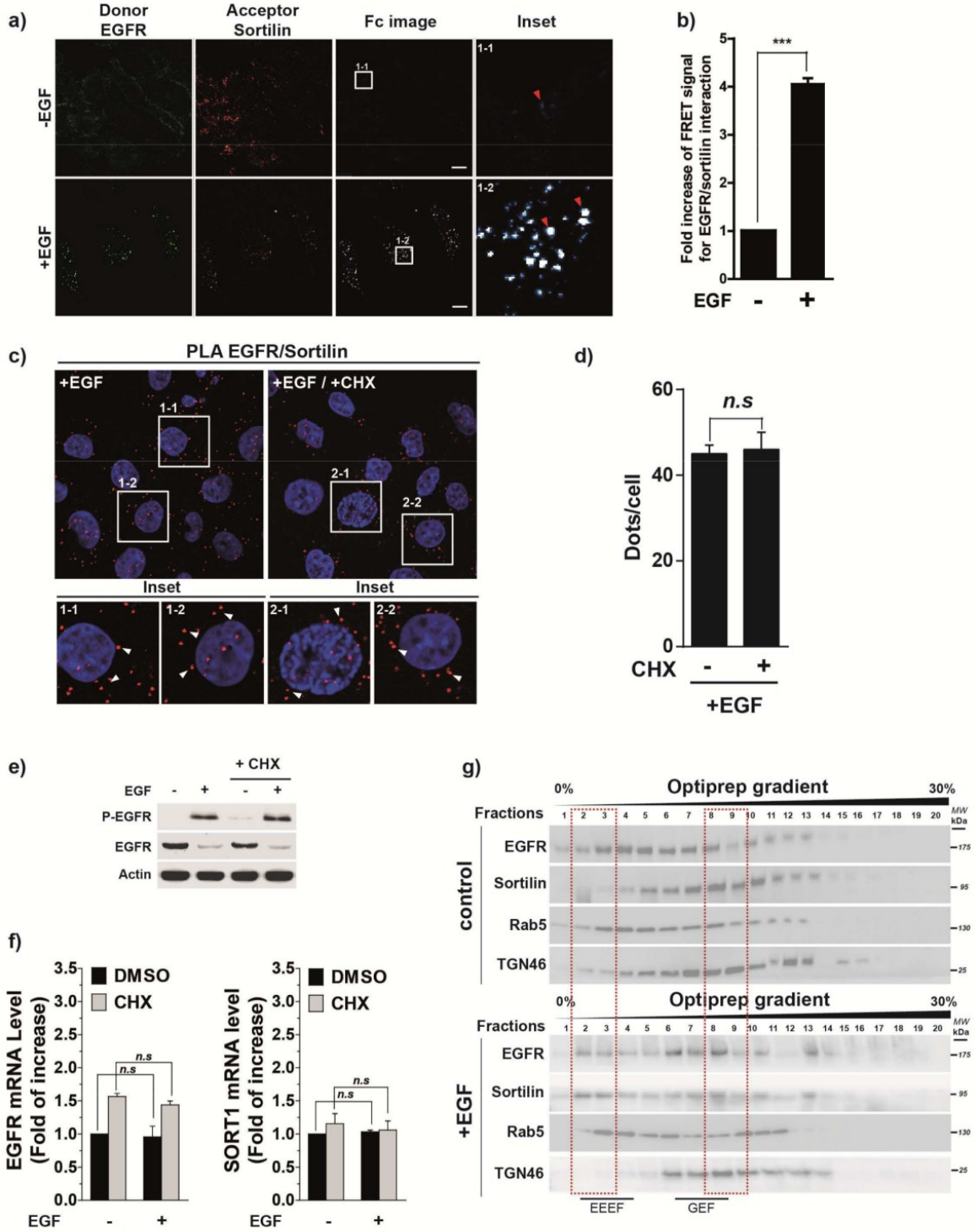


Figure S1 (related to Figure 1) (a) A549 cells stimulated or not with EGF (50 ng/mL) for 30 min were incubated with anti-EGFR (donor) and anti-sortilin (acceptor). Next, fluorescence resonance energy transfer (FRET) was analyzed by confocal microscopy. (b) FRET is quantified relative to non-stimulated A549 cells. Data represent means \pm SD. (c) A549 cells were pretreated or not with the protein synthesis inhibitor cycloheximide (CHX) (100 μ g/mL) for 2 h, and then stimulated with EGF (50 ng/mL⁻¹) for 30 min. Cells were fixed, and proximity ligation assays were performed using anti-EGFR and anti-sortilin antibodies. Red dots indicate sites of EGFR–sortilin interaction (white arrows). Scale bar, 10 μ m. (d) PLA quantification is shown relative to EGF-stimulated A549 cells. Data represent means \pm SD. (e) A549 cells were pretreated or not with CHX (100 μ g/mL) for 2 h, and then stimulated or not with EGF (50 ng/mL) for 30 min. The cell lysates were analyzed by western blotting for P-EGFR and EGFR. (f) Quantitative PCR analysis of EGFR and sortilin (*SORT1*) expressions, under the same conditions described above for (e). Results are presented in terms of fold change after normalizing against *HPRT* mRNA. (g) Post-nuclear Supernatant from A549 cells treated or not with EGF (50 ng/mL) for 30 min were loaded onto a 0–30% OptiPrep density gradient medium and subjected to ultracentrifugation. Early endosome (Rab5) and Golgi (TGN46) markers were used to identify the corresponding fractions. EGFR and sortilin levels in the respective organelle-enriched fractions were analyzed by immunoblotting.



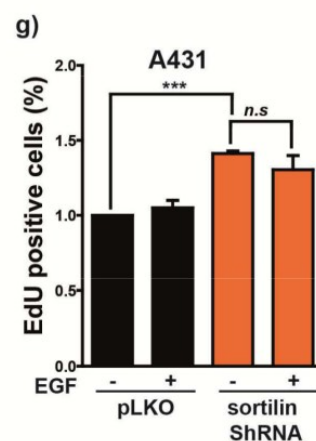
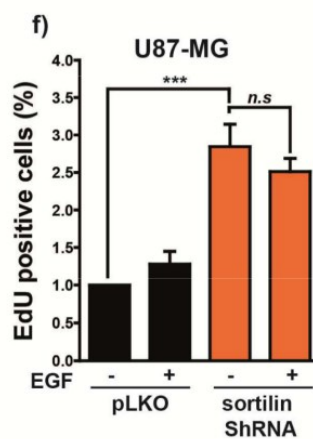
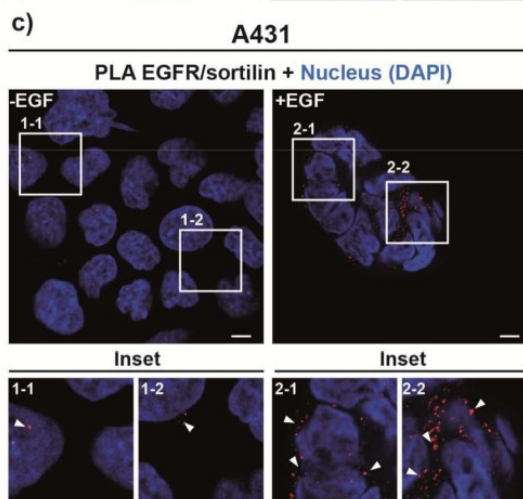
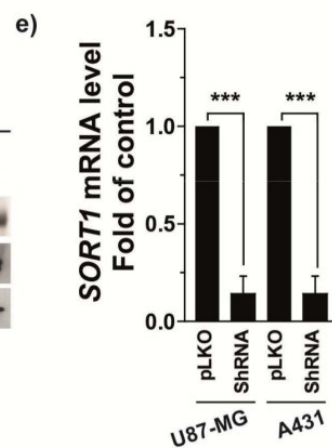
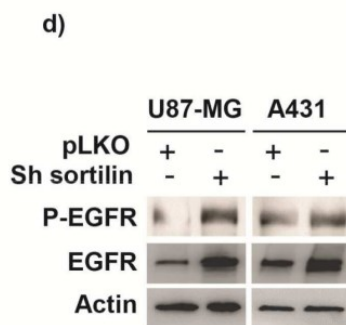
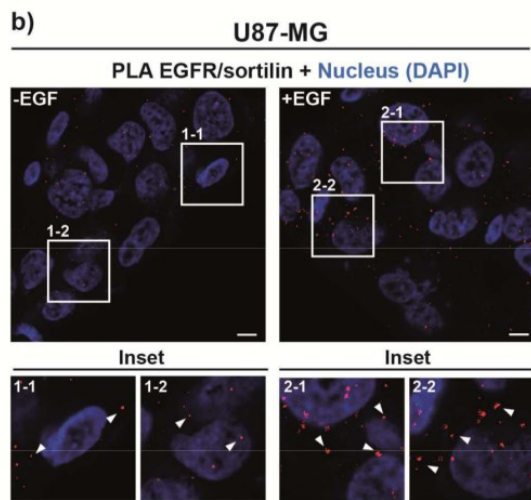
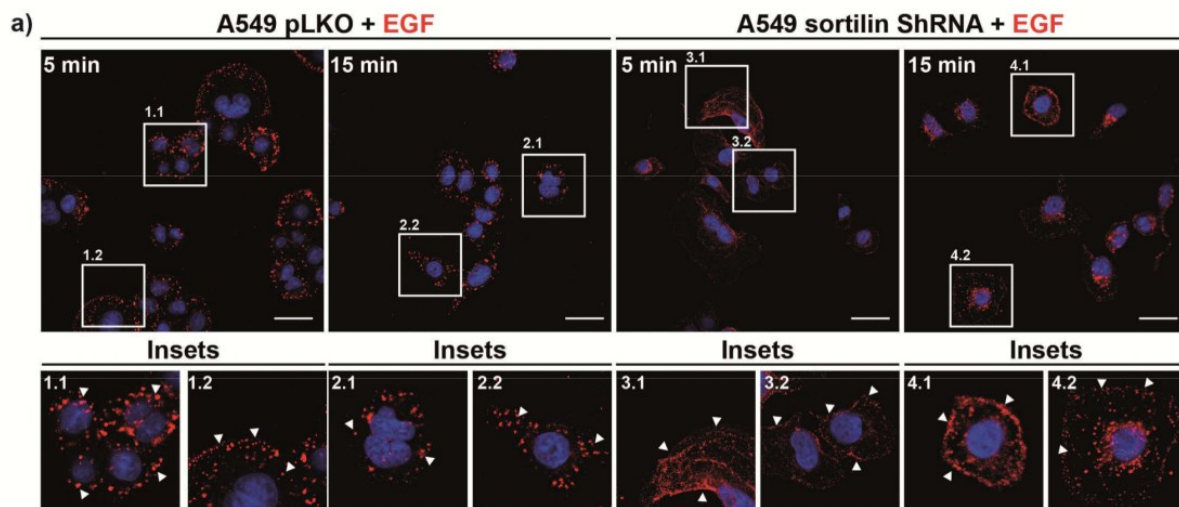


Figure S2 (related to Figure 4) (a) Representative images for A549 control and sortilin-depleted cells following stimulation with fluorescent EGF. Scale bar, 10 μ m. (b,c) Proximity ligation assays (PLA) were performed on U87-MG and A431 cells stimulated or not with EGF (50 ng/mL) for 30 min. Red dots indicate the sites of PLA amplification, reflecting the EGFR–sortilin interaction (white arrows). Scale bar, 10 μ m. (c) Lysates from sortilin-depleted U87-MG and A431 (sortilin shRNA) cells and control cells (pLKO), analyzed by western-blotting for P-EGFR and EGFR. (d) Validation of sortilin depletion in U87-MG and A431 cells by quantitative PCR to detect sortilin (*SORT1*) mRNA. Results are presented in terms of fold change after normalization against *HPRT* mRNA. (e,f) Representative histograms of cell proliferation, as determined by EdU incorporation. Control or sortilin-depleted U87-MG and A431 cells were stimulated with EGF (50 ng/mL) for 1 h, and then fixed and processed for EdU incorporation. The percentages of EdU-positive cells were calculated by flow cytometry.

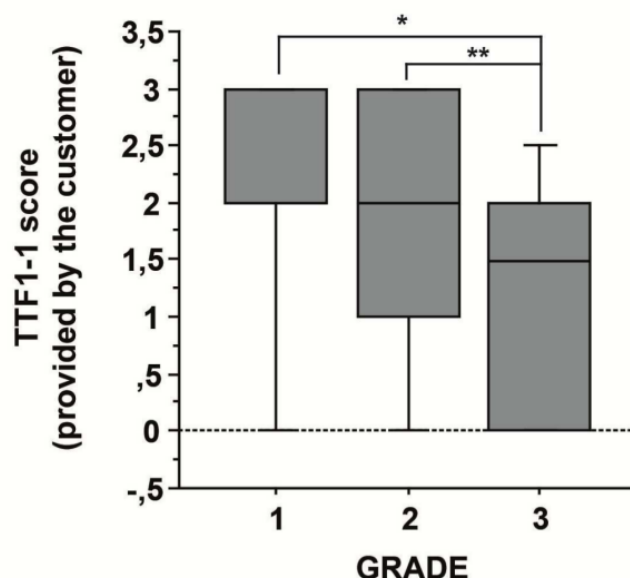


Figure S3 (related to figure 6). Boxplot diagram represents quantification (score provided by the manufacturer, US Biomax) of TTF1 expression in human lung adenocarcinoma ($n=78$), and revealed that its expression decreases with increasing pathologic grade.



Chapitre V. L'extinction de l'expression de sortiline inhibe la translocation nucléaire de l'EGFR

Comme précisé dans l'introduction du manuscrit (II.3.1), le transport de l'EGFR vers le noyau représente une signalisation non-canonique qui a été corrélée à la prolifération cellulaire et la résistance thérapeutique dans le cancer (Hsu *et al.*, 2009; Tomas *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2010). Dans le noyau, l'EGFR peut stimuler l'expression des gènes cibles en s'associant à des facteurs de transcription au sein des complexes transcriptionnels, ou engendrer une signalisation kinase nucléaire (Lin *et al.*, 2001; Lo *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2006a). Etant donné que la translocation nucléaire de l'EGFR nécessite son passage par le Golgi (Tomas *et al.*, 2014) où la majorité de la sortiline réside (Nielsen *et al.*, 2001; Nykjaer and Willnow, 2012), nous avons voulu analyser le rôle potentiel de la sortiline dans le contrôle du trafic nucléaire de l'EGFR. L'acquisition d'images en microscopie confocale a révélé la présence de complexes EGFR–sortiline dans le noyau des cellules A549 (Figure 17a). La stimulation par l'EGF augmente significativement le taux nucléaire de ce complexe (Figure 19b). A l'état basal, le fractionnement subcellulaire a montré une diminution de l'expression de l'EGFR dans la fraction correspondant aux noyaux des cellules A549 SORT1 shRNA en comparaison avec les cellules contrôles (Figure 17c). Bien que la stimulation par l'EGF induise une translocation nucléaire de l'EGFR dans les deux lignées, le taux d'EGFR nucléaire demeure significativement inférieur dans les cellules éteintes pour l'expression de la sortiline (Figure 19d et e). Ce résultat est en adéquation avec la rétention membranaire de l'EGFR observée dans ces mêmes cellules à la suite de la stimulation par l'EGF ainsi qu'avec le défaut de tri intracellulaire de l'EGFR induit par la perte d'expression de la sortiline. Ces résultats suggèrent également une inhibition de la signalisation nucléaire de l'EGFR dans la lignée A549 SORT1 shRNA. Cependant, 3 gènes cibles de l'EGFR sont constitutivement surexprimés dans les cellules éteintes pour l'expression de la sortiline en comparaison avec la lignée pLKO (Figure 19f). Ces gènes sont liés à la prolifération cellulaire (*c-Myc* et *CCND1*) et la résistance à la chimiothérapie (*ABCG2*) (Mo and Zhang, 2011; Musgrove *et al.*, 2011; Schmidt, 1999). Cette signature transcriptomique a été validée dans deux autres lignées cancéreuses éteintes pour l'expression de la sortiline et présentant un *EGFR* amplifié, les lignées A431 de carcinome épidermoïde et U87-MG de glioblastome (Figure 17f). L'ensemble de ces résultats suggèrent une fonction nucléaire inédite du complexe EGFR–sortiline.



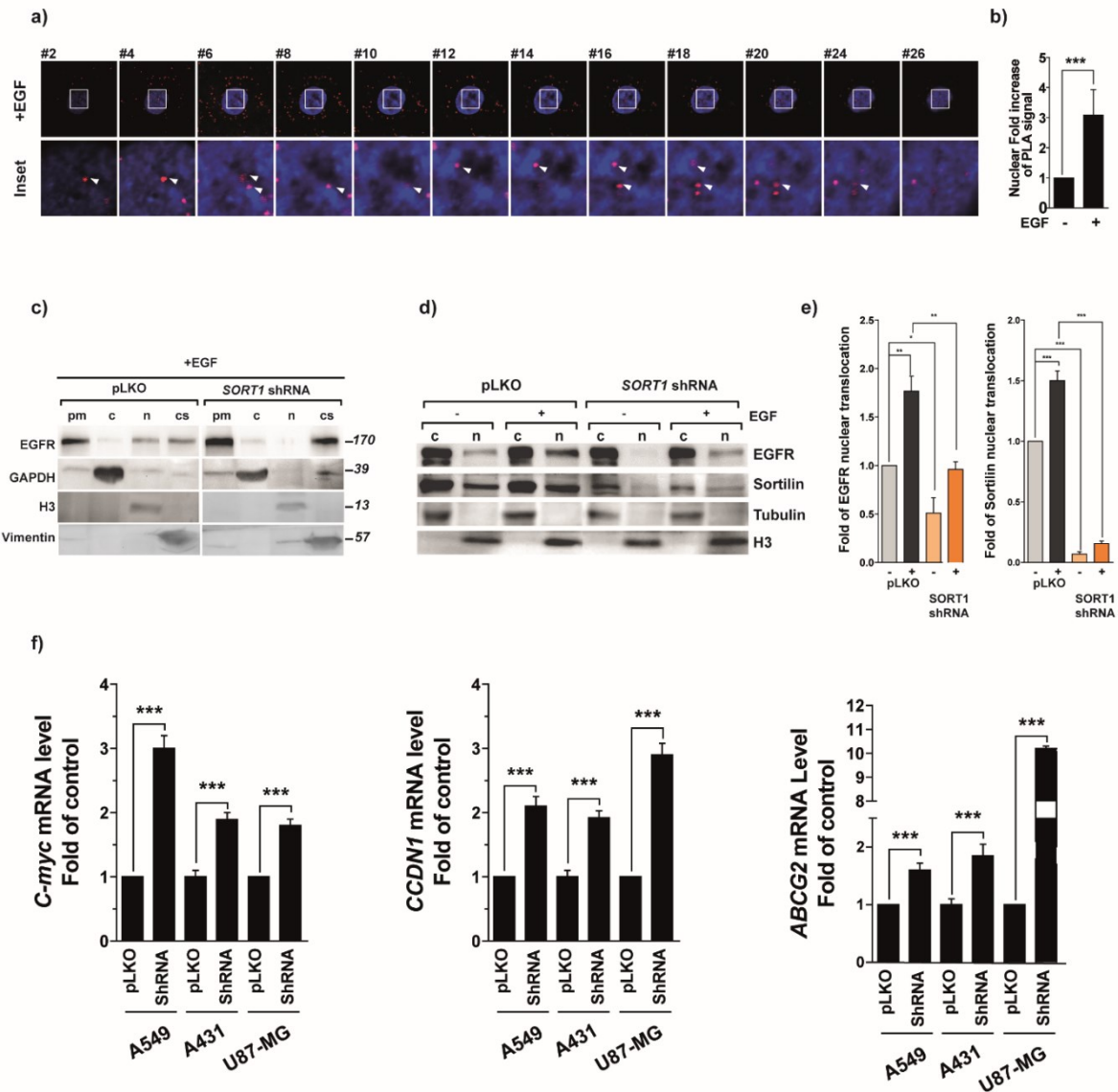


Figure 19 : l'extinction de la sortiline altère le trafic nucléaire de l'EGFR.

(a) Pile d'images acquises en Z stack au microscope confocal à partir de cellules A549 pLKO stimulées par l'EGF. **(b)** Quantification du signal nucléaire du PLA par rapport aux cellules A549 pLKO non stimulées par l'EGF. **(c)** Fractionnement subcellulaire montrant la répartition de l'EGFR dans la membrane plasmique (pm), le cytoplasme (c), le noyau (n) et le cytosquelette (cs) des cellules A549 pLKO et SORT1 shRNA stimulées par l'EGF. **(d)** Les protéines nucléaires (n) et cytoplasmiques (c) ont été extraites à partir des cellules A549 pLKO et SORT1 shRNA stimulées ou pas avec l'EGF et analysées par Western Blot pour les protéines indiquées. **(e)** Quantification de la translocation nucléaire de l'EGFR et de la sortiline à partir des mêmes conditions expérimentales que (d). **(f)** Analyse par PCR quantitative de l'expression génique de *C-Myc*, *CCND1* et *ABCG2* dans les lignées indiquées.



Discussion



L'EGFR est l'archétype des RTKs, il représente le RTK le plus dérégulé dans les cancers humains (Rappoport and Simon, 2009). La signalisation engendrée par l'EGFR est fortement impliquée dans la prolifération, la survie et la formation des métastases (Garvalov *et al.*, 2014; Sigismund *et al.*, 2008). Au niveau génomique, la mutation ou l'amplification du gène codant pour l'EGFR peuvent augmenter sa signalisation intracellulaire. Au niveau protéomique, l'EGFR transactive d'autres RTKs *via* son association avec ces récepteurs au sein d'un hétérodimère. Etant donné la complexité des mécanismes régissant la signalisation aberrante de l'EGFR, plusieurs études de la répartition subcellulaire et du trafic de ce récepteur ont été menées (Chung *et al.*, 2009; Garvalov *et al.*, 2014; Tan *et al.*, 2016). Il est actuellement communément admis que la signalisation engendrée par l'EGFR ne se restreint pas à la surface cellulaire, mais elle s'étend potentiellement aux plateformes de signalisation à partir de l'EGFR s'accumulant dans les endosomes, échappant ainsi à la dégradation (Tomas *et al.*, 2014).

La fonction de la sortiline dans la prise en charge de l'EGFR membranaire et la régulation de sa signalisation

Notre étude est la première à démontrer la fonction d'une protéine de tri cellulaire possédant un domaine VPS10P, la sortiline, dans le trafic intracellulaire de l'EGFR ainsi que son rôle majeur afin de contrôler et de limiter la signalisation proliférative induite par ce RTK. Nous proposons un modèle dans lequel la sortiline trie l'EGFR en le prenant en charge à partir de la surface cellulaire modulant ainsi son accumulation membranaire et sa signalisation autocrine sous-jacente. La liaison d'un ligand induit l'internalisation de l'EGFR et sa dégradation par la voie lysosomale (Tomas *et al.*, 2014). L'association de la sortiline avec l'EGFR membranaire est indispensable pour l'endocytose précoce du récepteur et son adressage lysosomal, deux mécanismes cruciaux pour le contrôle spatiotemporel de la signalisation à travers un RTK (Casaletto and McClatchey, 2012). La dérégulation de ce contrôle contribue potentiellement à l'initiation et la progression de la tumeur, notamment dans le cadre du CBNPC où environ 75% des cas présentent une activation aberrante des RTKs conduisant à une agressivité tumorale supérieure (Cancer Genome Atlas Research Network, 2014).

La stimulation par l'EGF induit l'internalisation de l'EGFR et favorise son association avec la sortiline. En effet, le complexe EGFR–sortiline est détecté à l'état basal, comme démontré précédemment dans les corps multi-vésiculés et comme le souligne l'effet du Dynasore dans la mise en relief d'une association constitutive entre ces deux partenaires. Le Dynasore est à un inhibiteur de la dynamine, il bloque l'endocytose aussi bien que la maturation endosomale (Macia *et al.*, 2006). Le traitement par le Dynasore a révélé la présence des complexes EGFR–sortiline à la surface cellulaire. Cependant, ces structures membranaires pourraient correspondre à des sites de formation des endosomes précoces, vu la capacité du Dynasore à inhiber la dissociation des invaginations membranaires en forme de « U » durant la formation des endosomes précoces. Dans le but de clarifier le site initial de formation du complexe EGFR–sortiline et d'identifier ainsi la phase précise où débute cette interaction, nous avons utilisé un vecteur conçu par Finan *et al.* codant pour une sortiline tronquée dépourvue du domaine intracellulaire contenant des sites actifs de tri (Finan *et al.*, 2011). Etant donné que la sortiline circule continuellement entre le Golgi et la surface cellulaire, l'utilisation de cette forme tronquée induit un enrichissement de la sortiline



à la membrane plasmique et une inhibition de son engagement dans le transport rétrograde. La sortiline tronquée interagit fortement avec l'EGFR à la surface cellulaire, ce qui valide la présence de ce complexe au niveau de la membrane plasmique en dehors des sites de formation des endosomes. La stimulation par l'EGF augmente l'interaction entre l'EGFR et la sortiline exclusivement dans les cellules surexprimant la forme totale de la sortiline. Néanmoins, l'interaction entre ces 2 protéines demeure plus forte dans les cellules surexprimant la sortiline tronquée, ce qui pourrait s'expliquer par l'altération du trafic endocyttaire et rétrograde de cette protéine empêchant la dégradation de l'EGFR et par conséquent la dissociation de ce complexe. Ces résultats sont concordant avec le fait qu'il existe une association entre l'EGFR et la sortiline d'une manière indépendante du ligand. Nous avons également démontré que cette interaction implique le domaine VPS10P de la sortiline et le domaine extracellulaire de l'EGFR. La fonction de la sortiline dans la prise en charge de l'EGFR est ainsi étendue aux formes mutées du récepteur indépendamment du type de mutation du domaine tyrosine kinase intracellulaire. Un trafic intracellulaire intense augmente la formation du complexe EGFR–sortiline, comme observé dans les lignées de CBNPC présentant un EGFR muté et ayant une capacité accrue à être internalisé (Martin *et al.*, 2004). De façon surprenante, la stimulation par l'EGF n'induit pas une augmentation de l'association entre l'EGFR et la sortiline dans la lignée H1975, contrairement aux autres lignées du CBNPC utilisées dans cette étude. Ce résultat suggère un trafic cellulaire plus intense de l'EGFR dans cette lignée. Ainsi, l'ensemble de ces données montrent que l'augmentation de l'association EGFR–sortiline est indirectement liée à l'activation du récepteur, vu que la phosphorylation de l'EGFR déclenche la mise en place de la machinerie d'endocytose dont la sortiline représente un élément clé. Dans notre modèle, que ce soit induit par un ligand ou non, le déclenchement du trafic rétrograde de l'EGFR corrèle avec une interaction accrue avec la sortiline au niveau de la membrane plasmique, ce qui nous a conduits à évaluer l'impact de l'inhibition de l'expression de la sortiline sur la prise en charge de l'EGFR durant son transport rétrograde.

L'extinction de l'expression de la sortiline induit un délai dans l'internalisation de l'EGFR et l'accumulation membranaire qui s'ensuit. A la surface cellulaire, l'EGFR accumulé est constitutivement activé et il engendre une signalisation de prolifération constitutive. Cette activation de l'EGFR est très probablement due à la densité membranaire élevée du récepteur qui permet de lever l'inhibition exercée par la bicouche phospholipidique sur les domaines juxta-membranaires et favorise ainsi l'interaction entre ces domaines, un mécanisme indispensable pour l'activation du domaine tyrosine kinase (Arkhipov *et al.*, 2013; Endres *et al.*, 2013). L'accumulation de l'EGFR a été observée dans d'autres lignées cancéreuses présentant un *EGFR* amplifié, la lignée de glioblastome U87-MG et la lignée A431 du carcinome épidermoïde de la peau. Ces résultats mettent l'accent sur le caractère ubiquitaire de la fonction de la sortiline dans la régulation du trafic de l'EGFR dans différents cancers. En effet, la sortiline joue le rôle d'un co-récepteur de p75^{NTR} et cette association est indispensable pour engendrer la signalisation à travers cet axe. Ce mécanisme a été validé dans plusieurs modèles dont les cellules neuronales (Nykjaer *et al.*, 2004; Teng *et al.*, 2005) et les cellules lymphocytaires (Fauchais *et al.*, 2008). Vu l'accumulation de l'EGFR induite par l'inactivation de l'expression de la sortiline dans d'autres modèles cancéreux, nous proposons une fonction élargie de la sortiline dans la régulation de la signalisation dépendante de ce récepteur. La signalisation proliférative et autocrine est dépendante de l'EGFR membranaire ce qui conduit à une prolifération cellulaire accrue des cellules inactivées pour l'expression de la sortiline *in vitro*. En accord avec ces résultats, nous avons



démontré qu'*in vivo*, l'expression de la sortiline est inversement corrélée à l'expression du marqueur de prolifération ki67 ainsi qu'à la croissance tumorale. L'augmentation de la prolifération est donc provoquée par un délai dans l'internalisation de l'EGFR pendant son transport rétrograde et sa signalisation membranaire consécutive. Cependant, l'inhibition de la voie sécrétoire / antérograde n'affecte pas l'interaction entre ces deux protéines. Ceci indique que la stimulation de l'interaction entre l'EGFR et la sortiline déclenchée par le ligand implique bien l'EGFR mature et non le récepteur au cours de sa synthèse ou de sa maturation.

La translocation nucléaire du complexe EGFR–sortiline

Outre les plateformes de signalisation, le noyau représente la destination intracellulaire ultime de l'EGFR suite à la translocation nucléaire à partir du Golgi, ce qui conduit à une signalisation nucléaire et non-canonique du récepteur (Brand *et al.*, 2011). Face à ce constat et suite à l'identification de la sortiline comme un régulateur clé du chargement de l'EGFR dans les exosomes des cellules de CBNPC (Wilson *et al.*, 2014), nous nous sommes intéressés au rôle de la sortiline dans le tri de l'EGFR précédant la biogenèse des corps multi-vésiculés, des organites intracellulaires contenant les nano-vésicules destinées à la sécrétion. En accord avec la rétention membranaire de l'EGFR, l'inhibition de l'expression de la sortiline provoque une diminution du taux nucléaire de ce récepteur à l'état basal. De plus, la translocation nucléaire de l'EGFR suite à la stimulation par son ligand est également inhibée. Ces résultats ont suggéré une diminution de la signalisation nucléaire de l'EGFR, notamment à travers la régulation de ses gènes cibles, dans les cellules SORT1 shARN. D'une manière surprenante, l'inhibition de l'expression de la sortiline stimule l'expression de trois gènes cibles de l'EGFR impliqués dans la prolifération et la résistance thérapeutique (*c-Myc*, *CCND1* et *ABCG2*). La surexpression de ces 3 gènes est également observée dans les lignées U87-MG et A431. Des travaux antérieurs ont démontré que la surexpression de *c-Myc* dans le glioblastome est sous le contrôle de la neurotensine qui stimule ainsi la prolifération cellulaire (Ouyang *et al.*, 2016). Etant donné que la sortiline est inhibée dans les cellules de GBM U87-MG SORT1 shARN, cela suggère que la surexpression de *c-Myc* constatée ne dépend pas de l'interaction de la neurotensine (NTS) avec la sortiline (NTSR-3). En effet dans ce modèle l'activation de l'expression de *c-Myc* dépendrait plutôt de l'interaction de la NTS avec NTSR-1 (Ouyang *et al.*, 2016). Il serait donc intéressant de vérifier si une augmentation de l'expression de la sortiline dans ces cellules pourrait bloquer l'expression de *c-Myc* ou encore de vérifier si l'absence d'expression de *SORT-1* renforce la voie NTS / NTSR-1 et déclenche ainsi une surexpression de l'EGFR associée à une activation autocrine / paracrine comme cela a été constaté précédemment dans le cancer bronchique (Younes *et al.*, 2014). Une activation aberrante de la voie NTS / interleukine-8 (IL-8) a été décrite dans plusieurs modèles cancéreux tels que le carcinome hépatocellulaire et le CCR (Wang *et al.*, 2006b; Yu *et al.*, 2013b). L'IL-8 induit une résistance aux iTKs des cellules de cancer bronchique en leur conférant des propriétés de cellules souches (Liu *et al.*, 2015). L'IL-8 induit également l'expression du transporteur ABCG2 dans le carcinome hépatocellulaire (Park *et al.*, 2014). Hors, il est actuellement admis que le transporteur ABCG2 est l'un des principaux canaux MDR (« multidrug resistance ») des cellules souches cancéreuses (Zhou *et al.*, 2001). De ce fait, il serait très intéressant de rechercher l'effet potentiel de l'IL-8 dans l'induction de



l'expression de ce marqueur suite à l'inhibition de l'expression de la sortiline, ainsi que de vérifier l'expression des marqueurs de cellules souches cancéreuses dans les cellules inactivées pour l'expression de la sortiline. Ce mécanisme compensatoire dépendant de l'activation d'une voie alternative devra être clarifié dans des études ultérieures. La translocation nucléaire inédite de la sortiline suite à la stimulation par un facteur de croissance suggère une fonction du couple EGFR–sortiline en tant que facteurs transcriptionnels. L'EGFR ne contient pas de domaine de liaison à l'ADN (Huo *et al.*, 2010). Puisqu'aucune donnée de la littérature n'aborde la translocation et la fonction potentielle de la sortiline dans le noyau, nous avons cherché si cette protéine possède un domaine prédit de liaison à l'ADN en utilisant les bases de données accessibles (« [Protein Data Bank archive-information](#) » et « [DNA Binding Protein prediction](#) ») (Szilágyi and Skolnick, 2006). En se basant sur la structure tridimensionnelle de la sortiline complexée avec la neurotensine (Quistgaard *et al.*, 2009), les résultats n'ont pas prédit de domaine de liaison à l'ADN (probabilité : 0.3703). Par conséquent, ces deux protéines exerceraient un contrôle transcriptionnel en association avec d'autres facteurs de transcription.

L'altération de la signalisation proliférative et de la résistance au gefitinib par la sortiline

Wilson *et al.*, ont précédemment démontré que la sortiline est un acteur indispensable du trafic rétrograde de l'EGFR (Wilson *et al.*, 2014). La dérégulation de ce transport est également corrélée à la résistance thérapeutique dans de nombreux modèles cancéreux dont le CBNPC (Gazdar, 2010; Tomas *et al.*, 2014). Afin de vérifier cela, nous avons étudié l'effet de la surexpression de la sortiline dans la modulation du phénotype oncogénique de la lignée H1975 résistante aux iTKs. Nos résultats indiquent que la surexpression de la sortiline diminue le taux de prolifération *et* altère la résistance de cette lignée au gefitinib. A la suite de la surexpression de la sortiline, une diminution de la signalisation proliférative a été observée suggérant un adressage accru de l'EGFR vers la dégradation lysosomale dans les cellules H1975. Ces résultats suggèrent l'absence d'un taux suffisant de sortiline endogène pour achever ce tri dans ces cellules. A la lumière de ces résultats, nous avons suggéré un rôle suppresseur de tumeur de la sortiline dans les cellules du CBNPC, ce qui nous a conduits à évaluer sa valeur pronostique en analysant les changements de son expression au sein d'une cohorte de 30 patients atteints d'ADC pulmonaire du CHU de Limoges, ainsi que 48 patients de la société américaine « US Biomax ». En parallèle, nous avons utilisé une approche *in silico* reposant sur les bases de données accessibles (673 patients).

La valeur prédictive de la sortiline sur la survie globale des patients atteints d'ADC pulmonaire

Les patients atteints d'ADC pulmonaire présentent des tumeurs peu différenciées ou anaplasiques avec un taux de prolifération élevé ayant une faible expression de la sortiline. L'expression de la sortiline diminue en effet significativement à partir du grade II tandis que le nombre de noyaux positifs pour ki67 augmente comme attendu. Afin de fournir des



explications biologiques concernant la perte d'expression de la sortiline dans les ADCs pulmonaires avancés, nous avons analysé des données accessibles sur le site de TCGA. Ces données concernent la perte putative d'hétérozygotie (LOH), les mutations ou la méthylation du promoteur de *SORT1*. Ce gène codant pour la sortiline est situé sur le chromosome 1 au locus 1p13.3, flanqué par les gènes *MYBPHL* (Myosine Binding Protein H Like) et *PSMA5* (Proteasome Subunit Alpha 5). Après avoir validé que tous les patients présentaient la même LOH pour la sortiline et ses gènes voisins, nos analyses statistiques ont révélé que la LOH se produit depuis le stade I et que sa fréquence est significativement plus élevée au stade III ($p = 0,0010$ entre les stades I et III). La LOH pourrait donc expliquer en partie la diminution de l'expression de *SORT1* dans les stades avancés d'ADC pulmonaire. En revanche, les mutations de *SORT1* ne se produisent que chez 0,4% des patients, un seul patient avec une mutation dans *SORT1* a été détecté parmi les 524 cas référencés dans la base de données, ce qui suggère que les mutations ne représentent pas un facteur causal qui expliquerait l'expression réduite ou la perte de fonction de *SORT1* dans les stades pathologiques avancés. De même, nous n'avons détecté aucune différence significative dans la méthylation du promoteur de *SORT1* entre les stades I et III. Cependant, Ces données ne sont pas fournies par le TCGA pour le tissu témoin du même patient. Il est utile de noter qu'en se basant sur nos analyses *in silico*, aucune corrélation entre l'expression de la sortiline, le stade tumoral et la survie globale n'a été révélée dans les autres sous-types de cancer bronchique, tels que le CE. La corrélation inverse entre l'expression de la sortiline et l'agressivité tumorale nous a conduits à analyser les changements d'expression de cette protéine en fonction de la survie globale des patients. Nos analyses *in silico* révèlent une forte corrélation entre l'expression élevée de la sortiline et une meilleure survie globale des patients atteints d'ADC pulmonaire. Nos résultats sont donc en accord avec ceux obtenus *in vitro* et qui montrent que la sortiline limite la prolifération cellulaire et la croissance tumorale. De nombreuses études publiées tentent de corréliser la surexpression de l'EGFR avec la survie globale des patients atteints de cancer bronchique. Cependant, les données concernant la valeur pronostique de l'expression de l'EGFR sont incohérentes et confuses (Fang and Wang, 2014; Hirsch *et al.*, 2003; Lee, 2006). Il existe une forte controverse entre l'expression de l'EGFR et la survie des patients. Certaines publications indiquent qu'une expression élevée de l'EGFR est corrélée avec une survie médiocre alors que d'autres études ne concluent pas aux mêmes résultats (Lee, 2006). Il est intéressant de noter que chez les patients exprimant un taux élevé d'EGFR, une expression élevée de *SORT1* améliore significativement la survie globale. Dans notre modèle, l'impact de l'expression de l'EGFR sur la survie globale semble dépendre des facteurs régissant sa signalisation oncogénique et modulant l'atténuation de celle-ci à travers un trafic intracellulaire qui adresserait ce récepteur activé vers la dégradation. Alors qu'aucune corrélation n'a été révélée entre l'expression de *SORT1* et la présence des mutations oncogéniques telles que KRAS et BRAF, *SORT1* est plus exprimée chez les patients avec un EGFR présentant des mutations sensibles aux iTKs. L'expression de la sortiline est associée à un phénotype tumoral moins agressif suggérant que son expression a la capacité potentiel d'inverser la résistance au gefitinib des cellules de la lignée H1975 *in vitro*.



La sortiline, une épée à double tranchant dans le cancer

L'ensemble de nos résultats identifie la sortiline comme un facteur de bon pronostic chez les patients atteints d'ADC bronchique, en accord avec son rôle suppresseur de tumeur observé dans le cadre du cancer de la prostate (Tanimoto *et al.*, 2015). Cependant, dans d'autres modèles cancéreux tels que le CCR, le cancer de l'ovaire et du sein, la sortiline paraît comme une protéine oncogénique qui favorise principalement la migration cellulaire présentant ainsi un effet pro-métastatique (Ghaemimanesh *et al.*, 2014; Massa *et al.*, 2013, 2014; Roselli *et al.*, 2015). L'allure de l'expression de la sortiline en fonction du stade tumoral diffère selon le type de cancer, ce qui suggère une différence dans les mécanismes régissant l'expression de la sortiline entre les différents modèles. Ces mécanismes pourraient impliquer la LOH, la méthylation du promoteur de *SORT1* ou des régulations post-transcriptionnelles notamment à travers des miRNA dont l'expression varierait différemment entre les stades et le type de cancer. Jusqu'à présent, ces mécanismes demeurent non élucidés dans la littérature. Dans le cancer de l'ovaire, Ghaemimanesh *et al.* ont démontré que la sortiline est surexprimée dans le tissu tumoral en comparaison avec le tissu contrôle provenant des kystes ovariens (Ghaemimanesh *et al.*, 2014). Cependant, leur cohorte est restreinte à 7 patients. Malgré ce nombre restreint et l'absence d'approches mécanistiques concernant l'implication de la sortiline dans la survie des cellules de carcinome ovarien, les auteurs suggèrent que la sortiline pourrait être une nouvelle cible thérapeutique dans le cancer de l'ovaire. Ces études ont besoin d'être étayées par des approches abordant les acteurs de cette signalisation « pro-survie » suggérée par les auteurs. Dans le cancer du sein, Demont *et al.* ont démontré que le pro-NGF stimule la migration des cellules cancéreuses à travers une boucle autocrine impliquant TrkA et la sortiline (Demont *et al.*, 2012). Les auteurs montrent que l'expression du pro-NGF augmente avec le grade pathologique. Ils n'abordent cependant pas l'expression de la sortiline qui semble être indispensable pour la signalisation induite par le pro-NGF dans ce modèle. En utilisant une analyse de type Kaplan-Meier dans le cancer du sein, nous avons pu constater qu'une expression élevée de *SORT1* est corrélée à un taux de survie significativement plus élevé ($p=0,0018$). D'où la nécessité d'explorer l'expression de la sortiline dans des échantillons tumoraux de sein dans le futur. A l'image d'autres protéines matures dont le clivage aboutit à une forme présentant un poids moléculaire plus léger et biologiquement active, telles que p75^{NTR} (Schachtrup *et al.*, 2015), Massa *et al.* ont démontré que le clivage de la sortiline membranaire cause le relargage d'une forme soluble qui représente un ligand actif. Ce ligand exerce un effet pro-métastatique sur les cellules du CCR à travers l'augmentation de la concentration calcique dans les cellules réceptrices, ainsi qu'une activation de la voie PI3K dépendante de la phosphorylation des kinases FAK et Src (Massa *et al.*, 2013). Cette démonstration valide la différence de fonction de la sortiline en fonction de son poids moléculaire. Ces résultats sont en accord avec le rôle pro-angiogénique de la sortiline clivée démontré par Wilson *et al.* dans le CBNPC (Wilson *et al.*, 2014). En effet, la sortiline joue un rôle dans le chargement et le relargage des RTKs, l'EGFR et TrkB, dans le microenvironnement tumoral à travers les exosomes des cellules A549. Ces exosomes stimulent l'expression des facteurs pro-angiogéniques dans les cellules réceptrices. La sortiline provenant du surnageant des cellules A549 présente un poids moléculaire inférieur à celui détecté dans le lysat cellulaire, ceci reflète une différence dans son rôle pro-tumorale vs suppresseur de tumeur dépendamment de sa forme. Etant donné que la sortiline est accrochée à la bicouche phospholipidique des exosomes provenant des cellules A549, cette



forme demeure différente de la forme soluble décrite par Massa *et al.* dans le CCR. Afin de confirmer l'ensemble des données concernant le clivage de la sortiline, il serait nécessaire de séquencer toutes les formes clivées dans ces modèles. Cela permettrait de déterminer la séquence exacte qui régit les fonctions anti- ou pro-tumorale de cette protéine, ainsi que son trafic intracellulaire à la fois dans les cellules émettrices et réceptrices. Le clivage de la sortiline pourrait abolir des sites actifs de tri intracellulaire, notamment à travers la perte des motifs régissant son trafic intracellulaire (*e.g.* motif dileucine) (Johnson *et al.*, 1990; Mari *et al.*, 2008).



Conclusion et perspectives



En conclusion, nos travaux montrent que l'expression de la sortiline est modulée dans des tumeurs bronchiques humaines. Cette étude identifie la sortiline comme un marqueur de bon pronostic chez les patients atteints d'ADC pulmonaire. La sortiline est indispensable pour déclencher l'internalisation de l'EGFR et sa dégradation subséquente. La perte de l'expression de la sortiline induit une rétention membranaire de l'EGFR dans un état hyperphosphorylé, une prolifération cellulaire accrue et une croissance tumorale accélérée. La sortiline inverse également la résistance aux iTKs *in vitro*. Collectivement, ces travaux confirment le rôle clé de la régulation spatiotemporelle de la signalisation à travers un RTK dans l'initiation et la progression du cancer. Cette étude marque le rôle d'une protéine de tri appartenant à la familles des protéines à domaine VPS10P dans l'atténuation de la signalisation proliférative engendrée par un RTK pour limiter la croissance tumorale. De nombreuses perspectives sont suggérées par ce travail :

- i. La mise au point un modèle de cellules tumorales dans lesquelles nous stimulerons l'expression de la sortiline d'une manière inductible. Dans cette optique, nous pourrions valider l'effet de l'induction de cette expression sur la résistance aux iTKs *in vivo*, ainsi que traquer la signalisation proliférative de l'EGFR. Ces manipulations présentent un intérêt majeur pour étudier l'impact de la sortiline dans la modulation de l'agressivité tumorale.
- ii. Le clivage de la sortiline joue un rôle prépondérant dans la modulation de son trafic et par conséquent sa fonction. Dans les exosomes, la sortiline présente un poids moléculaire inférieur à celui détecté dans le lysat cellulaire total et elle exerce une fonction pro-angiogénique sur les cellules réceptrices (Wilson *et al.*, 2014). Nous souhaitons poursuivre ce travail en analysant par spectrométrie de masse la séquence de la sortiline sécrétée dans les microvésicules circulantes. Ces analyses concerneront à la fois le surnageant des lignées cellulaires ainsi que notre sérothèque construite à partir des patients atteints de cancer bronchique. Les résultats qui en découleront feront partie d'un projet se focalisant sur le rôle potentiel des enzymes de clivage dans la manipulation des fonctions pro- ou anti-tumorale de la sortiline.
- iii. Les miRNA sont des ARN simple-brin qui, en s'appariant à des ARNm, guident leur dégradation ou la répression de leur traduction en protéine (Brest *et al.*, 2011). Etant donné que l'expression de la sortiline est différentielle entre les stades d'ADC pulmonaire, l'étude de la régulation potentielle de son expression par des miRNA représente une approche intéressante.
- iv. VPS10P est le domaine extracellulaire de la sortiline impliqué dans son interaction avec l'EGFR. Nous souhaitons évaluer l'implication d'autres membres de la famille des protéines à domaine VPS10P dans l'atténuation de la signalisation proliférative de l'EGFR. Dans cette perspective, il serait intéressant d'étendre cette étude à d'autres RTKs dérégulés dans le cancer bronchique, tels que ALK et ROS-1.



Références bibliographiques



Abel, E.D., Peroni, O., Kim, J.K., Kim, Y.B., Boss, O., Hadro, E., Minnemann, T., Shulman, G.I., and Kahn, B.B. (2001). Adipose-selective targeting of the GLUT4 gene impairs insulin action in muscle and liver. *Nature* 409, 729–733.

Aberle, D.R., DeMello, S., Berg, C.D., Black, W.C., Brewer, B., Church, T.R., Clingan, K.L., Duan, F., Fagerstrom, R.M., Gareen, I.F., *et al.* (2013). Results of the two incidence screenings in the National Lung Screening Trial. *N. Engl. J. Med.* 369, 920–931.

Abou-Fayçal, C., Hatat, A.-S., Gazzeri, S., and Eymin, B. (2017). Splice Variants of the RTK Family: Their Role in Tumour Progression and Response to Targeted Therapy. *Int. J. Mol. Sci.* 18.

Adamczyk, K.A., Klein-Scory, S., Tehrani, M.M., Warnken, U., Schmiegel, W., Schnölzer, M., and Schwarte-Waldhoff, I. (2011). Characterization of soluble and exosomal forms of the EGFR released from pancreatic cancer cells. *Life Sci.* 89, 304–312.

Al-Nedawi, K., Meehan, B., Kerbel, R.S., Allison, A.C., and Rak, J. (2009). Endothelial expression of autocrine VEGF upon the uptake of tumor-derived microvesicles containing oncogenic EGFR. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 3794–3799.

Amini, A., Byers, L.A., Welsh, J.W., and Komaki, R.U. (2014). Progress in the management of limited-stage small cell lung cancer. *Cancer* 120, 790–798.

Anderson, R.G. (1998). The caveolae membrane system. *Annu. Rev. Biochem.* 67, 199–225.

Antonny, B., Burd, C., De Camilli, P., Chen, E., Daumke, O., Faelber, K., Ford, M., Frolov, V.A., Frost, A., Hinshaw, J.E., *et al.* (2016). Membrane fission by dynamin: what we know and what we need to know. *EMBO J.* 35, 2270–2284.

de Araújo, M.E.G., Stasyk, T., Taub, N., Ebner, H.L., Fürst, B., Filipek, P., Weys, S.R., Hess, M.W., Lindner, H., Kremser, L., *et al.* (2013). Stability of the endosomal scaffold protein LAMTOR3 depends on heterodimer assembly and proteasomal degradation. *J. Biol. Chem.* 288, 18228–18242.

Arcila, M.E., Oxnard, G.R., Nafa, K., Riely, G.J., Solomon, S.B., Zakowski, M.F., Kris, M.G., Pao, W., Miller, V.A., and Ladanyi, M. (2011). 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. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 17, 1169–1180.

Arkhipov, A., Shan, Y., Das, R., Endres, N.F., Eastwood, M.P., Wemmer, D.E., Kuriyan, J., and Shaw, D.E. (2013). Architecture and membrane interactions of the EGF receptor. *Cell* 152, 557–569.

Armant, D.R., FRITZ, R., KILBURN, B.A., KIM, Y.M., NIEN, J.K., MAIHLE, N.J., ROMERO, R., and LEACH, R.E. (2015). Reduced Expression of the Epidermal Growth Factor Signaling System in Preeclampsia. *Placenta* 36, 270–278.

Arscott, W.T., and Camphausen, K.A. (2011). EGFR isoforms in exosomes as a novel method for biomarker discovery in pancreatic cancer. *Biomark. Med.* 5, 821.

Aulchenko, Y.S., Ripatti, S., Lindqvist, I., Boomsma, D., Heid, I.M., Pramstaller, P.P., Penninx, B.W.J.H., Janssens, A.C.J.W., Wilson, J.F., Spector, T., *et al.* (2009). Loci influencing lipid levels and coronary heart disease risk in 16 European population cohorts. *Nat. Genet.* 41, 47–55.



Azmi, A.S., Bao, B., and Sarkar, F.H. (2013). Exosomes in Cancer Development, Metastasis and Drug Resistance: A Comprehensive Review. *Cancer Metastasis Rev.* 32.

Bannister, A.J., and Kouzarides, T. (2011). Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell Res.* 21, 381–395.

Barlesi, F., Mazieres, J., Merlio, J.-P., Debieuvre, D., Mosser, J., Lena, H., Ouafik, L., Besse, B., Rouquette, I., Westeel, V., *et al.* (2016). Routine molecular profiling of patients with advanced non-small-cell lung cancer: results of a 1-year nationwide programme of the French Cooperative Thoracic Intergroup (IFCT). *Lancet Lond. Engl.* 387, 1415–1426.

Barton, W.A., Tzvetkova-Robev, D., Miranda, E.P., Kolev, M.V., Rajashankar, K.R., Himanen, J.P., and Nikolov, D.B. (2006). Crystal structures of the Tie2 receptor ectodomain and the angiopoietin-2-Tie2 complex. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 13, 524–532.

Batzer, A.G., Rotin, D., Ureña, J.M., Skolnik, E.Y., and Schlessinger, J. (1994). Hierarchy of binding sites for Grb2 and Shc on the epidermal growth factor receptor. *Mol. Cell. Biol.* 14, 5192–5201.

Beattie, M.S., Harrington, A.W., Lee, R., Kim, J.Y., Boyce, S.L., Longo, F.M., Bresnahan, J.C., Hempstead, B.L., and Yoon, S.O. (2002). ProNGF induces p75-mediated death of oligodendrocytes following spinal cord injury. *Neuron* 36, 375–386.

Bellanger, C., Dubanet, L., Lise, M.-C., Fauchais, A.-L., Bordessoule, D., Jauberteau, M.-O., and Troutaud, D. (2011). Endogenous Neurotrophins and Trk Signaling in Diffuse Large B Cell Lymphoma Cell Lines Are Involved in Sensitivity to Rituximab-Induced Apoptosis. *PLoS ONE* 6.

Bertelsen, V., Sak, M.M., Breen, K., Rødland, M.S., Johannessen, L.E., Traub, L.M., Stang, E., and Madshus, I.H. (2011). A chimeric pre-ubiquitinated EGF receptor is constitutively endocytosed in a clathrin-dependent, but kinase-independent manner. *Traffic Cph. Den.* 12, 507–520.

Bitler, B.G., Goverdhan, A., and Schroeder, J.A. (2010). MUC1 regulates nuclear localization and function of the epidermal growth factor receptor. *J. Cell Sci.* 123, 1716–1723.

Blume-Jensen, P., and Hunter, T. (2001). Oncogenic kinase signalling. *Nature* 411, 355–365.

Boerner, J.L., Danielsen, A., and Maihle, N.J. (2003). Ligand-independent oncogenic signaling by the epidermal growth factor receptor: v-ErbB as a paradigm. *Exp. Cell Res.* 284, 111–121.

Bogan, J.S. (2012). Regulation of glucose transporter translocation in health and diabetes. *Annu. Rev. Biochem.* 81, 507–532.

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

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

Brankatschk, B., Wichert, S.P., Johnson, S.D., Schaad, O., Rossner, M.J., and Gruenberg, J. (2012). Regulation of the EGF transcriptional response by endocytic sorting. *Sci. Signal.* 5, ra21.



- Bravo, D.A., Gleason, J.B., Sanchez, R.I., Roth, R.A., and Fuller, R.S. (1994). Accurate and efficient cleavage of the human insulin proreceptor by the human proprotein-processing protease furin. Characterization and kinetic parameters using the purified, secreted soluble protease expressed by a recombinant baculovirus. *J. Biol. Chem.* **269**, 25830–25837.
- Brest, P., Lapaquette, P., Souidi, M., Lebrigand, K., Cesaro, A., Vouret-Craviari, V., Mari, B., Barbry, P., Mosnier, J.-F., Hébuterne, X., *et al.* (2011). A synonymous variant in IRGM alters a binding site for miR-196 and causes deregulation of IRGM-dependent xenophagy in Crohn's disease. *Nat. Genet.* **43**, 242–245.
- Bromberg, J. (2002). Stat proteins and oncogenesis. *J. Clin. Invest.* **109**, 1139–1142.
- Bryant, N.J., Govers, R., and James, D.E. (2002). Regulated transport of the glucose transporter GLUT4. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **3**, 267–277.
- Budczies, J., Klauschen, F., Sinn, B.V., Györfy, B., Schmitt, W.D., Darb-Esfahani, S., and Denkert, C. (2012). Cutoff Finder: a comprehensive and straightforward Web application enabling rapid biomarker cutoff optimization. *PLoS One* **7**, e51862.
- Byers, L.A., and Rudin, C.M. (2015). Small cell lung cancer: where do we go from here? *Cancer* **121**, 664–672.
- Byers, L.A., Diao, L., Wang, J., Saintigny, P., Girard, L., Peyton, M., Shen, L., Fan, Y., Giri, U., Tumula, P.K., *et al.* (2013). 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. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **19**, 279–290.
- Callahan, M.K., Wolchok, J.D., and Allison, J.P. (2010). Anti-CTLA-4 Antibody Therapy: Immune Monitoring During Clinical Development of a Novel Immunotherapy. *Semin. Oncol.* **37**, 473–484.
- Cancer Genome Atlas Research Network (2014). Comprehensive molecular profiling of lung adenocarcinoma. *Nature* **511**, 543–550.
- Canuel, M., Lefrançois, S., Zeng, J., and Morales, C.R. (2008). AP-1 and retromer play opposite roles in the trafficking of sortilin between the Golgi apparatus and the lysosomes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **366**, 724–730.
- Cao, X., Zhu, H., Ali-Osman, F., and Lo, H.-W. (2011). EGFR and EGFRvIII undergo stress- and EGFR kinase inhibitor-induced mitochondrial translocation: a potential mechanism of EGFR-driven antagonism of apoptosis. *Mol. Cancer* **10**, 26.
- Capuani, F., Conte, A., Argenzio, E., Marchetti, L., Priami, C., Polo, S., Di Fiore, P.P., Sigismund, S., and Ciliberto, A. (2015). Quantitative analysis reveals how EGFR activation and downregulation are coupled in normal but not in cancer cells. *Nat. Commun.* **6**, 7999.
- Carmeliet, P., and Jain, R.K. (2000). Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* **407**, 249–257.
- Carpenter, C.L., Auger, K.R., Chanudhuri, M., Yoakim, M., Schaffhausen, B., Shoelson, S., and Cantley, L.C. (1993). Phosphoinositide 3-kinase is activated by phosphopeptides that bind to the SH2 domains of the 85-kDa subunit. *J. Biol. Chem.* **268**, 9478–9483.



Carpenter, G., Lembach, K.J., Morrison, M.M., and Cohen, S. (1975). Characterization of the binding of 125-I-labeled epidermal growth factor to human fibroblasts. *J. Biol. Chem.* *250*, 4297–4304.

Carpenter, G., King, L., and Cohen, S. (1978). Epidermal growth factor stimulates phosphorylation in membrane preparations in vitro. *Nature* *276*, 409–410.

Carter, R.E., and Sorkin, A. (1998). Endocytosis of functional epidermal growth factor receptor-green fluorescent protein chimera. *J. Biol. Chem.* *273*, 35000–35007.

Casaletto, J.B., and McClatchey, A.I. (2012). Spatial regulation of receptor tyrosine kinases in development and cancer. *Nat. Rev. Cancer* *12*, 387–400.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC) (2005). Annual smoking-attributable mortality, years of potential life lost, and productivity losses--United States, 1997-2001. *MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep.* *54*, 625–628.

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

Chen, C., and Zhuang, X. (2008). Epsin 1 is a cargo-specific adaptor for the clathrin-mediated endocytosis of the influenza virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *105*, 11790–11795.

Chen, K.-Z., Lou, F., Yang, F., Zhang, J.-B., Ye, H., Chen, W., Guan, T., Zhao, M.-Y., Su, X.-X., Shi, R., *et al.* (2016). Circulating Tumor DNA Detection in Early-Stage Non-Small Cell Lung Cancer Patients by Targeted Sequencing. *Sci. Rep.* *6*, 31985.

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

Chi, S., Cao, H., Wang, Y., and McNiven, M.A. (2011). Recycling of the epidermal growth factor receptor is mediated by a novel form of the clathrin adaptor protein Eps15. *J. Biol. Chem.* *286*, 35196–35208.

Choi, D.-S., Park, J.O., Jang, S.C., Yoon, Y.J., Jung, J.W., Choi, D.-Y., Kim, J.-W., Kang, J.S., Park, J., Hwang, D., *et al.* (2011). Proteomic analysis of microvesicles derived from human colorectal cancer ascites. *Proteomics* *11*, 2745–2751.

Choi, Y.L., Soda, M., Yamashita, Y., Ueno, T., Takashima, J., Nakajima, T., Yatabe, Y., Takeuchi, K., Hamada, T., Haruta, H., *et al.* (2010). EML4-ALK mutations in lung cancer that confer resistance to ALK inhibitors. *N. Engl. J. Med.* *363*, 1734–1739.

Chou, R.-H., Wang, Y.-N., Hsieh, Y.-H., Li, L.-Y., Xia, W., Chang, W.-C., Chang, L.-C., Cheng, C.-C., Lai, C.-C., Hsu, J.L., *et al.* (2014). EGFR modulates DNA synthesis and repair through Tyr phosphorylation of histone H4. *Dev. Cell* *30*, 224–237.

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

Clayton, A.H.A., Walker, F., Orchard, S.G., Henderson, C., Fuchs, D., Rothacker, J., Nice, E.C., and Burgess, A.W. (2005). Ligand-induced dimer-tetramer transition during the activation of the cell surface epidermal growth factor receptor-A multidimensional microscopy analysis. *J. Biol. Chem.* *280*, 30392–30399.



Cohen, S. (1962). Isolation of a mouse submaxillary gland protein accelerating incisor eruption and eyelid opening in the new-born animal. *J. Biol. Chem.* 237, 1555–1562.

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

Colombo, M., Raposo, G., and Théry, C. (2014). Biogenesis, secretion, and intercellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 30, 255–289.

Cooper, A.A., and Stevens, T.H. (1996). Vps10p cycles between the late-Golgi and prevacuolar compartments in its function as the sorting receptor for multiple yeast vacuolar hydrolases. *J. Cell Biol.* 133, 529–541.

Corner, J., Hopkinson, J., Fitzsimmons, D., Barclay, S., and Muers, M. (2005). Is late diagnosis of lung cancer inevitable? Interview study of patients' recollections of symptoms before diagnosis. *Thorax* 60, 314–319.

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

Crystal, A.S., Shaw, A.T., Sequist, L.V., Friboulet, L., Niederst, M.J., Lockerman, E.L., Frias, R.L., Gainor, J.F., Amzallag, A., Greninger, P., *et al.* (2014). Patient-derived models of acquired resistance can identify effective drug combinations for cancer. *Science* 346, 1480–1486.

Davidson, M.R., Gazdar, A.F., and Clarke, B.E. (2013). The pivotal role of pathology in the management of lung cancer. *J. Thorac. Dis.* 5 Suppl 5, S463-478.

Davies, G.C., Ryan, P.E., Rahman, L., Zajac-Kaye, M., and Lipkowitz, S. (2006). EGFRvIII undergoes activation-dependent downregulation mediated by the Cbl proteins. *Oncogene* 25, 6497–6509.

Davies, H., Bignell, G.R., Cox, C., Stephens, P., Edkins, S., Clegg, S., Teague, J., Woffendin, H., Garnett, M.J., Bottomley, W., *et al.* (2002). Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature* 417, 949–954.

De la Cruz-Morcillo, M.A., Berger, J., Sánchez-Prieto, R., Saada, S., Naves, T., Guillaudeau, A., Perraud, A., Sindou, P., Lacroix, A., Descazeaud, A., *et al.* (2016). p75 neurotrophin receptor and pro-BDNF promote cell survival and migration in clear cell renal cell carcinoma. *Oncotarget* 7, 34480–34497.

De Ruyscher, D., Pijls-Johannesma, M., Bentzen, S.M., Minken, A., Wanders, R., Lutgens, L., Hochstenbag, M., Boersma, L., Wouters, B., Lammering, G., *et al.* (2006). Time between the first day of chemotherapy and the last day of chest radiation is the most important predictor of survival in limited-disease small-cell lung cancer. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 24, 1057–1063.

Demont, Y., Corbet, C., Page, A., Ataman-Önal, Y., Choquet-Kastylevsky, G., Fliniaux, I., Le Bourhis, X., Toillon, R.-A., Bradshaw, R.A., and Hondermarck, H. (2012). Pro-nerve growth factor induces autocrine stimulation of breast cancer cell invasion through tropomyosin-related kinase A (TrkA) and sortilin protein. *J. Biol. Chem.* 287, 1923–1931.



Demory, M.L., Boerner, J.L., Davidson, R., Faust, W., Miyake, T., Lee, I., Hüttemann, M., Douglas, R., Haddad, G., and Parsons, S.J. (2009). Epidermal growth factor receptor translocation to the mitochondria: regulation and effect. *J. Biol. Chem.* *284*, 36592–36604.

Demory Beckler, M., Higginbotham, J.N., Franklin, J.L., Ham, A.-J., Halvey, P.J., Imasuen, I.E., Whitwell, C., Li, M., Liebler, D.C., and Coffey, R.J. (2013). Proteomic analysis of exosomes from mutant KRAS colon cancer cells identifies intercellular transfer of mutant KRAS. *Mol. Cell. Proteomics MCP* *12*, 343–355.

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

Dittmann, K., Mayer, C., Fehrenbacher, B., Schaller, M., Kehlbach, R., and Rodemann, H.P. (2010). Nuclear EGFR shuttling induced by ionizing radiation is regulated by phosphorylation at residue Thr654. *FEBS Lett.* *584*, 3878–3884.

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

Druker, B.J. (2004). Imatinib as a paradigm of targeted therapies. *Adv. Cancer Res.* *91*, 1–30.

Dunmore, B.J., Drake, K.M., Upton, P.D., Toshner, M.R., Aldred, M.A., and Morrell, N.W. (2013). The lysosomal inhibitor, chloroquine, increases cell surface BMPR-II levels and restores BMP9 signalling in endothelial cells harbouring BMPR-II mutations. *Hum. Mol. Genet.* *22*, 3667–3679.

Eden, E.R., White, I.J., Tsapara, A., and Futter, C.E. (2010). Membrane contacts between endosomes and ER provide sites for PTP1B-epidermal growth factor receptor interaction. *Nat. Cell Biol.* *12*, 267–272.

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

Ekstrand, A.J., James, C.D., Cavenee, W.K., Seliger, B., Pettersson, R.F., and Collins, V.P. (1991). Genes for epidermal growth factor receptor, transforming growth factor alpha, and epidermal growth factor and their expression in human gliomas in vivo. *Cancer Res.* *51*, 2164–2172.

Ekstrand, A.J., Sugawa, N., James, C.D., and Collins, V.P. (1992). Amplified and rearranged epidermal growth factor receptor genes in human glioblastomas reveal deletions of sequences encoding portions of the N- and/or C-terminal tails. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *89*, 4309–4313.

Emaduddin, M., Edelman, M.J., Kessler, B.M., and Feller, S.M. (2008). Odin (ANKS1A) is a Src family kinase target in colorectal cancer cells. *Cell Commun. Signal. CCS* *6*, 7.

Endres, N.F., Das, R., Smith, A.W., Arkhipov, A., Kovacs, E., Huang, Y., Pelton, J.G., Shan, Y., Shaw, D.E., Wemmer, D.E., *et al.* (2013). Conformational Coupling Across the Plasma Membrane in Activation of the EGF receptor. *Cell* *152*, 543–556.



Engelman, J.A., Zejnullahu, K., Mitsudomi, T., Song, Y., Hyland, C., Park, J.O., Lindeman, N., Gale, C.-M., Zhao, X., Christensen, J., *et al.* (2007). MET amplification leads to gefitinib resistance in lung cancer by activating ERBB3 signaling. *Science* 316, 1039–1043.

Ettinger, D.S., Wood, D.E., Akerley, W., Bazhenova, L.A., Borghaei, H., Camidge, D.R., Cheney, R.T., Chirieac, L.R., D'Amico, T.A., Dilling, T.J., *et al.* (2016). NCCN Guidelines Insights: Non-Small Cell Lung Cancer, Version 4.2016. *J. Natl. Compr. Cancer Netw. JNCCN* 14, 255–264.

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

Fan, Q.-W., Cheng, C.K., Gustafson, W.C., Charron, E., Zipper, P., Wong, R.A., Chen, J., Lau, J., Knobbe-Thomsen, C., Weller, M., *et al.* (2013). EGFR phosphorylates tumor-derived EGFRvIII driving STAT3/5 and progression in glioblastoma. *Cancer Cell* 24, 438–449.

Fang, S., and Wang, Z. (2014). EGFR mutations as a prognostic and predictive marker in non-small-cell lung cancer. *Drug Des. Devel. Ther.* 8, 1595–1611.

Farlow, E.C., Patel, K., Basu, S., Lee, B.-S., Kim, A.W., Coon, J.S., Faber, L.P., Bonomi, P., Liptay, M.J., and Borgia, J.A. (2010). Development of a multiplexed tumor-associated autoantibody-based blood test for the detection of non-small cell lung cancer. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 16, 3452–3462.

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

Fehrenbacher, N., and Jäättelä, M. (2005). Lysosomes as targets for cancer therapy. *Cancer Res.* 65, 2993–2995.

Fernandez-Cuesta, L., Plenker, D., Osada, H., Sun, R., Menon, R., Leenders, F., Ortiz-Cuaran, S., Peifer, M., Bos, M., Daßler, J., *et al.* (2014). CD74-NRG1 fusions in lung adenocarcinoma. *Cancer Discov.* 4, 415–422.

Finan, G.M., Okada, H., and Kim, T.-W. (2011). BACE1 retrograde trafficking is uniquely regulated by the cytoplasmic domain of sortilin. *J. Biol. Chem.* 286, 12602–12616.

French, A.R., Tadaki, D.K., Niyogi, S.K., and Lauffenburger, D.A. (1995). Intracellular trafficking of epidermal growth factor family ligands is directly influenced by the pH sensitivity of the receptor/ligand interaction. *J. Biol. Chem.* 270, 4334–4340.

Friedl, P., and Wolf, K. (2003). Tumour-cell invasion and migration: diversity and escape mechanisms. *Nat. Rev. Cancer* 3, 362–374.

Gadella, T.W., and Jovin, T.M. (1995). Oligomerization of epidermal growth factor receptors on A431 cells studied by time-resolved fluorescence imaging microscopy. A stereochemical model for tyrosine kinase receptor activation. *J. Cell Biol.* 129, 1543–1558.

Gaestel, M. (2006). MAPKAP kinases - MKs - two's company, three's a crowd. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 7, 120–130.

Gan, H.K., Kaye, A.H., and Luwor, R.B. (2009). The EGFRvIII variant in glioblastoma multiforme. *J. Clin. Neurosci. Off. J. Neurosurg. Soc. Australas.* 16, 748–754.



Ganley, I.G., Wong, P.-M., Gammoh, N., and Jiang, X. (2011). Distinct autophagosomal-lysosomal fusion mechanism revealed by thapsigargin-induced autophagy arrest. *Mol. Cell* 42, 731–743.

Gao, M., Patel, R., Ahmad, I., Fleming, J., Edwards, J., McCracken, S., Sahadevan, K., Seywright, M., Norman, J., Sansom, O., *et al.* (2012). SPRY2 loss enhances ErbB trafficking and PI3K/AKT signalling to drive human and mouse prostate carcinogenesis. *EMBO Mol. Med.* 4, 776–790.

Garvalov, B.K., Foss, F., Henze, A.-T., Bethani, I., Gräf-Höchst, S., Singh, D., Filatova, A., Dopeso, H., Seidel, S., Damm, M., *et al.* (2014). PHD3 regulates EGFR internalization and signalling in tumours. *Nat. Commun.* 5, 5577.

Garza-Veloz, I., Martinez-Fierro, M.L., Jaime-Perez, J.C., Carrillo-Sanchez, K., Ramos-Del Hoyo, M.G., Lugo-Trampe, A., Rojas-Martinez, A., Gutierrez-Aguirre, C.H., Gonzalez-Llano, O., Salazar-Riojas, R., *et al.* (2015). Identification of Differentially Expressed Genes Associated with Prognosis of B Acute Lymphoblastic Leukemia. *Dis. Markers* 2015.

Gazdar, A. (2009). Activating and resistance mutations of EGFR in non-small-cell lung cancer: role in clinical response to EGFR tyrosine kinase inhibitors. *Oncogene* 28, S24–S31.

Gazdar, A.F. (2010). Epidermal growth factor receptor inhibition in lung cancer: the evolving role of individualized therapy. *Cancer Metastasis Rev.* 29, 37–48.

Ghaemimanesh, F., Ahmadian, G., Talebi, S., Zarnani, A.-H., Behmanesh, M., Hemmati, S., Hadavi, R., Jeddi-Tehrani, M., Farzi, M., Akhondi, M.M., *et al.* (2014). The Effect of Sortilin Silencing on Ovarian Carcinoma Cells. *Avicenna J. Med. Biotechnol.* 6, 169–177.

Glickman, J.N., and Kornfeld, S. (1993). Mannose 6-phosphate-independent targeting of lysosomal enzymes in I-cell disease B lymphoblasts. *J. Cell Biol.* 123, 99–108.

Gliemann, J., Nykjaer, A., Petersen, C.M., Jørgensen, K.E., Nielsen, M., Andreasen, P.A., Christensen, E.I., Lookene, A., Olivecrona, G., and Moestrup, S.K. (1994). The multiligand alpha 2-macroglobulin receptor/low density lipoprotein receptor-related protein (alpha 2MR/LRP). Binding and endocytosis of fluid phase and membrane-associated ligands. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 737, 20–38.

Gocheva, V., Zeng, W., Ke, D., Klimstra, D., Reinheckel, T., Peters, C., Hanahan, D., and Joyce, J.A. (2006). Distinct roles for cysteine cathepsin genes in multistage tumorigenesis. *Genes Dev.* 20, 543–556.

Goh, L.K., Huang, F., Kim, W., Gygi, S., and Sorkin, A. (2010). Multiple mechanisms collectively regulate clathrin-mediated endocytosis of the epidermal growth factor receptor. *J. Cell Biol.* 189, 871–883.

Greulich, H., Chen, T.-H., Feng, W., Jänne, P.A., Alvarez, J.V., Zappaterra, M., Bulmer, S.E., Frank, D.A., Hahn, W.C., Sellers, W.R., *et al.* (2005). Oncogenic transformation by inhibitor-sensitive and -resistant EGFR mutants. *PLoS Med.* 2, e313.

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

Gullapalli, A., Garrett, T.A., Paing, M.M., Griffin, C.T., Yang, Y., and Trejo, J. (2004). A Role for Sorting Nexin 2 in Epidermal Growth Factor Receptor Down-regulation: Evidence for



Distinct Functions of Sorting Nexin 1 and 2 in Protein Trafficking. *Mol. Biol. Cell* 15, 2143–2155.

Hallberg, B., Rayter, S.I., and Downward, J. (1994). Interaction of Ras and Raf in intact mammalian cells upon extracellular stimulation. *J. Biol. Chem.* 269, 3913–3916.

Han, W., Carpenter, R.L., Cao, X., and Lo, H.-W. (2013). STAT1 gene expression is enhanced by nuclear EGFR and HER2 via cooperation with STAT3. *Mol. Carcinog.* 52, 959–969.

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

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

Hasan, W., Pedchenko, T., Krizsan-Agbas, D., Baum, L., and Smith, P.G. (2003). Sympathetic neurons synthesize and secrete pro-nerve growth factor protein. *J. Neurobiol.* 57, 38–53.

Haura, E.B., Turkson, J., and Jove, R. (2005). Mechanisms of disease: Insights into the emerging role of signal transducers and activators of transcription in cancer. *Nat. Clin. Pract. Oncol.* 2, 315–324.

He, Y.-Y., Huang, J.-L., Gentry, J.B., and Chignell, C.F. (2003). Epidermal growth factor receptor down-regulation induced by UVA in human keratinocytes does not require the receptor kinase activity. *J. Biol. Chem.* 278, 42457–42465.

Hegerfeldt, Y., Tusch, M., Bröcker, E.-B., and Friedl, P. (2002). Collective cell movement in primary melanoma explants: plasticity of cell-cell interaction, beta1-integrin function, and migration strategies. *Cancer Res.* 62, 2125–2130.

Henriksen, L., Grandal, M.V., Knudsen, S.L.J., van Deurs, B., and Grøvdal, L.M. (2013). Internalization mechanisms of the epidermal growth factor receptor after activation with different ligands. *PloS One* 8, e58148.

Herbst, R.S., Heymach, J.V., and Lippman, S.M. (2008). Lung cancer. *N. Engl. J. Med.* 359, 1367–1380.

Hermans-Borgmeyer, I., Hermey, G., Nykjaer, A., and Schaller, C. (1999). Expression of the 100-kDa neurotensin receptor sortilin during mouse embryonal development. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 65, 216–219.

Hermey, G. (2009). The Vps10p-domain receptor family. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 66, 2677–2689.

Hermey, G., Sjøgaard, S.S., Petersen, C.M., Nykjaer, A., and Gliemann, J. (2006). Tumour necrosis factor alpha-converting enzyme mediates ectodomain shedding of Vps10p-domain receptor family members. *Biochem. J.* 395, 285–293.

Herzberg, B., Campo, M.J., and Gainor, J.F. (2017). Immune Checkpoint Inhibitors in Non-Small Cell Lung Cancer. *The Oncologist* 22, 81–88.

Heurteaux, C., Lucas, G., Guy, N., El Yacoubi, M., Thümmler, S., Peng, X.-D., Noble, F., Blondeau, N., Widmann, C., Borsotto, M., *et al.* (2006). Deletion of the background



potassium channel TREK-1 results in a depression-resistant phenotype. *Nat. Neurosci.* **9**, 1134–1141.

Higginbotham, J.N., Demory Beckler, M., Gephart, J.D., Franklin, J.L., Bogatcheva, G., Kremers, G.-J., Piston, D.W., Ayers, G.D., McConnell, R.E., Tyska, M.J., *et al.* (2011). Amphiregulin exosomes increase cancer cell invasion. *Curr. Biol.* **21**, 779–786.

Hill, C.S., and Treisman, R. (1995). Transcriptional regulation by extracellular signals: mechanisms and specificity. *Cell* **80**, 199–211.

Hirsch, F.R., Varella-Garcia, M., Bunn, P.A., Di Maria, M.V., Veve, R., Bremmes, R.M., Barón, A.E., Zeng, C., and Franklin, W.A. (2003). Epidermal growth factor receptor in non-small-cell lung carcinomas: correlation between gene copy number and protein expression and impact on prognosis. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **21**, 3798–3807.

Hivelin, C., Mazella, J., and Coppola, T. (2017). Sortilin derived propeptide regulation during adipocyte differentiation and inflammation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **482**, 87–92.

Hosaka, M., Nagahama, M., Kim, W.S., Watanabe, T., Hatsuzawa, K., Ikemizu, J., Murakami, K., and Nakayama, K. (1991). Arg-X-Lys/Arg-Arg motif as a signal for precursor cleavage catalyzed by furin within the constitutive secretory pathway. *J. Biol. Chem.* **266**, 12127–12130.

Hsu, S.-C., Miller, S.A., Wang, Y., and Hung, M.-C. (2009). Nuclear EGFR is required for cisplatin resistance and DNA repair. *Am. J. Transl. Res.* **1**, 249–258.

Huang, S., and Czech, M.P. (2007). The GLUT4 glucose transporter. *Cell Metab.* **5**, 237–252.

Huang, F., Jiang, X., and Sorkin, A. (2003). Tyrosine phosphorylation of the beta2 subunit of clathrin adaptor complex AP-2 reveals the role of a di-leucine motif in the epidermal growth factor receptor trafficking. *J. Biol. Chem.* **278**, 43411–43417.

Huang, F., Khvorova, A., Marshall, W., and Sorkin, A. (2004). Analysis of clathrin-mediated endocytosis of epidermal growth factor receptor by RNA interference. *J. Biol. Chem.* **279**, 16657–16661.

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

Huang, F., Goh, L.K., and Sorkin, A. (2007). EGF receptor ubiquitination is not necessary for its internalization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**, 16904–16909.

Huang, P.H., Xu, A.M., and White, F.M. (2009). Oncogenic EGFR signaling networks in glioma. *Sci. Signal.* **2**, re6.

Huang, T.-H., Huo, L., Wang, Y.-N., Xia, W., Wei, Y., Chang, S.-S., Chang, W.-C., Fang, Y.-F., Chen, C.-T., Lang, J.-Y., *et al.* (2013). Epidermal growth factor receptor potentiates MCM7-mediated DNA replication through tyrosine phosphorylation of Lyn kinase in human cancers. *Cancer Cell* **23**, 796–810.

Huang, W.-C., Chen, Y.-J., Li, L.-Y., Wei, Y.-L., Hsu, S.-C., Tsai, S.-L., Chiu, P.-C., Huang, W.-P., Wang, Y.-N., Chen, C.-H., *et al.* (2011). Nuclear Translocation of Epidermal Growth Factor Receptor by Akt-dependent Phosphorylation Enhances Breast Cancer-resistant Protein Expression in Gefitinib-resistant Cells. *J. Biol. Chem.* **286**, 20558–20568.



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

Huo, L., Wang, Y.-N., Xia, W., Hsu, S.-C., Lai, C.-C., Li, L.-Y., Chang, W.-C., Wang, Y., Hsu, M.-C., Yu, Y.-L., *et al.* (2010). RNA helicase A is a DNA-binding partner for EGFR-mediated transcriptional activation in the nucleus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 16125–16130.

Hwu, W.L., Chuang, S.C., Wang, W.C., and Wang, T.R. (1994). Diagnosis of I-cell disease. *Zhonghua Minguo Xiao Er Ke Yi Xue Hui Za Zhi J. Zhonghua Minguo Xiao Er Ke Yi Xue Hui* **35**, 508–513.

Hynes, N.E., and Lane, H.A. (2005). ERBB receptors and cancer: the complexity of targeted inhibitors. *Nat. Rev. Cancer* **5**, 341–354.

Ilekis, J.V., Stark, B.C., and Scoccia, B. (1995). Possible role of variant RNA transcripts in the regulation of epidermal growth factor receptor expression in human placenta. *Mol. Reprod. Dev.* **41**, 149–156.

Ilie, M., Hofman, V., Long-Mira, E., Selva, E., Vignaud, J.-M., Padovani, B., Mouroux, J., Marquette, C.-H., and Hofman, P. (2014). “Sentinel” Circulating Tumor Cells Allow Early Diagnosis of Lung Cancer in Patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *PLoS ONE* **9**.

Jaganathan, S., Yue, P., Paladino, D.C., Bogdanovic, J., Huo, Q., and Turkson, J. (2011). A Functional Nuclear Epidermal Growth Factor Receptor, Src and Stat3 Heteromeric Complex in Pancreatic Cancer Cells. *PLoS ONE* **6**.

Jakobsen, K.R., Paulsen, B.S., Bæk, R., Varming, K., Sorensen, B.S., and Jørgensen, M.M. (2015). Exosomal proteins as potential diagnostic markers in advanced non-small cell lung carcinoma. *J. Extracell. Vesicles* **4**, 26659.

Ji, Q., Chattopadhyay, A., Vecchi, M., and Carpenter, G. (1999). Physiological Requirement for Both SH2 Domains for Phospholipase C- γ 1 Function and Interaction with Platelet-Derived Growth Factor Receptors. *Mol. Cell. Biol.* **19**, 4961–4970.

Johnson, I.R.D., Parkinson-Lawrence, E.J., Shandala, T., Weigert, R., Butler, L.M., and Brooks, D.A. (2014). Altered Endosome Biogenesis in Prostate Cancer has Biomarker Potential. *Mol. Cancer Res. MCR* **12**, 1851–1862.

Johnson, I.R.D., Parkinson-Lawrence, E.J., Keegan, H., Spillane, C.D., Barry-O’Crowley, J., Watson, W.R., Selemidis, S., Butler, L.M., O’Leary, J.J., and Brooks, D.A. (2015). Endosomal gene expression: a new indicator for prostate cancer patient prognosis? *Oncotarget* **6**, 37919–37929.

Johnson, K.F., Chan, W., and Kornfeld, S. (1990). Cation-dependent mannose 6-phosphate receptor contains two internalization signals in its cytoplasmic domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **87**, 10010–10014.

Jorissen, R.N., Walker, F., Pouliot, N., Garrett, T.P.J., Ward, C.W., and Burgess, A.W. (2003). Epidermal growth factor receptor: mechanisms of activation and signalling. *Exp. Cell Res.* **284**, 31–53.



Jr, J.F.T., and Farver, C.F. (2008). Anatomy and Histology of the Lung. In Dail and Hammar's Pulmonary Pathology, J.F.T.J. MD, P.T.C. MD, C.F.F. MD, and A.E.F. MD, eds. (Springer New York), pp. 20–48.

Karachaliou, N., Codony-Servat, J., Teixidó, C., Pilotto, S., Drozdowskyj, A., Codony-Servat, C., Giménez-Capitán, A., Molina-Vila, M.A., Bertrán-Alamillo, J., Gervais, R., *et al.* (2015). BIM and mTOR expression levels predict outcome to erlotinib in EGFR-mutant non-small-cell lung cancer. *Sci. Rep.* 5, 17499.

Kathiresan, S., Melander, O., Guiducci, C., Surti, A., Burt, N.P., Rieder, M.J., Cooper, G.M., Roos, C., Voight, B.F., Havulinna, A.S., *et al.* (2008). Six new loci associated with blood low-density lipoprotein cholesterol, high-density lipoprotein cholesterol or triglycerides in humans. *Nat. Genet.* 40, 189–197.

Kathiresan, S., Willer, C.J., Peloso, G.M., Demissie, S., Musunuru, K., Schadt, E.E., Kaplan, L., Bennett, D., Li, Y., Tanaka, T., *et al.* (2009). Common variants at 30 loci contribute to polygenic dyslipidemia. *Nat. Genet.* 41, 56–65.

Kawamata, H., Kameyama, S., and Oyasu, R. (1994). In vitro and in vivo acceleration of the neoplastic phenotype of a low-tumorigenicity rat bladder carcinoma cell line by transfected transforming growth factor- α . *Mol. Carcinog.* 9, 210–219.

Kazazic, M., Roepstorff, K., Johannessen, L.E., Pedersen, N.M., van Deurs, B., Stang, E., and Madhus, I.H. (2006). EGF-induced activation of the EGF receptor does not trigger mobilization of caveolae. *Traffic Cph. Den.* 7, 1518–1527.

Kazazic, M., Bertelsen, V., Pedersen, K.W., Vuong, T.T., Grandal, M.V., Rødland, M.S., Traub, L.M., Stang, E., and Madhus, I.H. (2009). Epsin 1 is involved in recruitment of ubiquitinated EGF receptors into clathrin-coated pits. *Traffic Cph. Den.* 10, 235–245.

Kim, E., Lee, Y., Lee, H.-J., Kim, J.S., Song, B.-S., Huh, J.-W., Lee, S.-R., Kim, S.-U., Kim, S.-H., Hong, Y., *et al.* (2010). Implication of mouse Vps26b-Vps29-Vps35 retromer complex in sortilin trafficking. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 403, 167–171.

Kim, E.S., Neubauer, M., Cohn, A., Schwartzberg, L., Garbo, L., Caton, J., Robert, F., Reynolds, C., Katz, T., Chittoor, S., *et al.* (2013). Docetaxel or pemetrexed with or without cetuximab in recurrent or progressive non-small-cell lung cancer after platinum-based therapy: a phase 3, open-label, randomised trial. *Lancet Oncol.* 14, 1326–1336.

Kim, H.-P., Yoon, Y.-K., Kim, J.-W., Han, S.-W., Hur, H.-S., Park, J., Lee, J.-H., Oh, D.-Y., Im, S.-A., Bang, Y.-J., *et al.* (2009). Lapatinib, a Dual EGFR and HER2 Tyrosine Kinase Inhibitor, Downregulates Thymidylate Synthase by Inhibiting the Nuclear Translocation of EGFR and HER2. *PLoS ONE* 4.

Kirkegaard, T., and Jäättelä, M. (2009). Lysosomal involvement in cell death and cancer. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.* 1793, 746–754.

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

Kornfeld, S., and Mellman, I. (1989). The biogenesis of lysosomes. *Annu. Rev. Cell Biol.* 5, 483–525.



- Kreyberg, L. (1962). Histological lung cancer types. A morphological and biological correlation. *Acta Pathol. Microbiol. Scand. Suppl. Suppl 157*, 1–92.
- Kris, M.G., Johnson, B.E., Berry, L.D., Kwiatkowski, D.J., Iafrate, A.J., Wistuba, I.I., Varella-Garcia, M., Franklin, W.A., Aronson, S.L., Su, P.-F., *et al.* (2014). Using multiplexed assays of oncogenic drivers in lung cancers to select targeted drugs. *JAMA 311*, 1998–2006.
- Kuo, H.-Y., Chen, Y.-C., Chang, H.-Y., Jeng, J.-C., Lin, E.-H., Pan, C.-M., Chang, Y.-W., Wang, M.-L., Chou, Y.-T., Shih, H.-M., *et al.* (2013). The PML isoform IV is a negative regulator of nuclear EGFR's transcriptional activity in lung cancer. *Carcinogenesis 34*, 1708–1716.
- Kupriyanova, T.A., and Kandrор, K.V. (2000). Cellugyrin is a marker for a distinct population of intracellular Glut4-containing vesicles. *J. Biol. Chem. 275*, 36263–36268.
- Lammering, G., Hewit, T.H., Valerie, K., Contessa, J.N., Amorino, G.P., Dent, P., and Schmidt-Ullrich, R.K. (2003). EGFRvIII-mediated radioresistance through a strong cytoprotective response. *Oncogene 22*, 5545–5553.
- Le Roy, C., and Wrana, J.L. (2005). Clathrin- and non-clathrin-mediated endocytic regulation of cell signalling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 6*, 112–126.
- Lee, S.M. (2006). Is EGFR expression important in non-small cell lung cancer? *Thorax 61*, 98–99.
- Lee, H.-J., Lan, L., Peng, G., Chang, W.-C., Hsu, M.-C., Wang, Y.-N., Cheng, C.-C., Wei, L., Nakajima, S., Chang, S.-S., *et al.* (2015). Tyrosine 370 phosphorylation of ATM positively regulates DNA damage response. *Cell Res. 25*, 225–236.
- Lee, R., Kermani, P., Teng, K.K., and Hempstead, B.L. (2001). Regulation of cell survival by secreted proneurotrophins. *Science 294*, 1945–1948.
- Lemmon, M.A., and Schlessinger, J. (2010). Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell 141*, 1117–1134.
- Lemos-González, Y., Rodríguez-Berrocal, F.J., Cordero, O.J., Gómez, C., and Páez de la Cadena, M. (2007). Alteration of the serum levels of the epidermal growth factor receptor and its ligands in patients with non-small cell lung cancer and head and neck carcinoma. *Br. J. Cancer 96*, 1569–1578.
- Leon, S.A., Shapiro, B., Sklaroff, D.M., and Yaros, M.J. (1977). Free DNA in the serum of cancer patients and the effect of therapy. *Cancer Res. 37*, 646–650.
- Leu, T.-H., and Maa, M.-C. (2003). Functional implication of the interaction between EGF receptor and c-Src. *Front. Biosci. J. Virtual Libr. 8*, s28-38.
- Li, X., and Donowitz, M. (2008). Fractionation of subcellular membrane vesicles of epithelial and nonepithelial cells by OptiPrep density gradient ultracentrifugation. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ 440*, 97–110.
- Li, L., Zhu, T., Gao, Y.-F., Zheng, W., Wang, C.-J., Xiao, L., Huang, M.-S., Yin, J.-Y., Zhou, H.-H., and Liu, Z.-Q. (2016). Targeting DNA Damage Response in the Radio(Chemo)therapy of Non-Small Cell Lung Cancer. *Int. J. Mol. Sci. 17*.



- Liccardi, G., Hartley, J.A., and Hochhauser, D. (2011). EGFR nuclear translocation modulates DNA repair following cisplatin and ionizing radiation treatment. *Cancer Res.* 71, 1103–1114.
- Liebmann, C. (2001). Regulation of MAP kinase activity by peptide receptor signalling pathway: paradigms of multiplicity. *Cell. Signal.* 13, 777–785.
- Lin, B.Z., Pilch, P.F., and Kandror, K.V. (1997). Sortilin is a major protein component of Glut4-containing vesicles. *J. Biol. Chem.* 272, 24145–24147.
- Lin, S.Y., Makino, K., Xia, W., Matin, A., Wen, Y., Kwong, K.Y., Bourguignon, L., and Hung, M.C. (2001). Nuclear localization of EGF receptor and its potential new role as a transcription factor. *Nat. Cell Biol.* 3, 802–808.
- Linsel-Nitschke, P., Heeren, J., Aherrahrou, Z., Bruse, P., Gieger, C., Illig, T., Prokisch, H., Heim, K., Doering, A., Peters, A., *et al.* (2010). Genetic variation at chromosome 1p13.3 affects sortilin mRNA expression, cellular LDL-uptake and serum LDL levels which translates to the risk of coronary artery disease. *Atherosclerosis* 208, 183–189.
- Liu, Y.-N., Chang, T.-H., Tsai, M.-F., Wu, S.-G., Tsai, T.-H., Chen, H.-Y., Yu, S.-L., Yang, J.C.-H., and Shih, J.-Y. (2015). IL-8 confers resistance to EGFR inhibitors by inducing stem cell properties in lung cancer. *Oncotarget* 6, 10415–10431.
- Lo, H.-W., Hsu, S.-C., Ali-Seyed, M., Gunduz, M., Xia, W., Wei, Y., Bartholomeusz, G., Shih, J.-Y., and Hung, M.-C. (2005). Nuclear interaction of EGFR and STAT3 in the activation of the iNOS/NO pathway. *Cancer Cell* 7, 575–589.
- Lo, H.-W., Cao, X., Zhu, H., and Ali-Osman, F. (2010). COX-2 is a Novel Transcriptional Target of the Nuclear EGFR-STAT3 and EGFRvIII-STAT3 Signaling Axes. *Mol. Cancer Res. MCR* 8, 232–245.
- Lowenstein, E.J., Daly, R.J., Batzer, A.G., Li, W., Margolis, B., Lammers, R., Ullrich, A., Skolnik, E.Y., Bar-Sagi, D., and Schlessinger, J. (1992). The SH2 and SH3 domain-containing protein GRB2 links receptor tyrosine kinases to ras signaling. *Cell* 70, 431–442.
- Lu, Y., Futtner, C., Rock, J.R., Xu, X., Whitworth, W., Hogan, B.L.M., and Onaitis, M.W. (2010). Evidence that SOX2 overexpression is oncogenic in the lung. *PLoS One* 5, e11022.
- Macia, E., Ehrlich, M., Massol, R., Boucrot, E., Brunner, C., and Kirchhausen, T. (2006). Dynasore, a cell-permeable inhibitor of dynamin. *Dev. Cell* 10, 839–850.
- Madshus, I.H., and Stang, E. (2009). Internalization and intracellular sorting of the EGF receptor: a model for understanding the mechanisms of receptor trafficking. *J. Cell Sci.* 122, 3433–3439.
- Makrilia, N., Lappa, T., Xyla, V., Nikolaidis, I., and Syrigos, K. (2009). The role of angiogenesis in solid tumours: an overview. *Eur. J. Intern. Med.* 20, 663–671.
- Maramotti, S., Paci, M., Manzotti, G., Rapicetta, C., Gugnoni, M., Galeone, C., Cesario, A., and Lococo, F. (2016). Soluble Epidermal Growth Factor Receptors (sEGFRs) in Cancer: Biological Aspects and Clinical Relevance. *Int. J. Mol. Sci.* 17.
- Marcusson, E.G., Horazdovsky, B.F., Cereghino, J.L., Gharakhanian, E., and Emr, S.D. (1994). The sorting receptor for yeast vacuolar carboxypeptidase Y is encoded by the VPS10 gene. *Cell* 77, 579–586.



Mari, M., Bujny, M.V., Zeuschner, D., Geerts, W.J.C., Griffith, J., Petersen, C.M., Cullen, P.J., Klumperman, J., and Geuze, H.J. (2008). SNX1 defines an early endosomal recycling exit for sortilin and mannose 6-phosphate receptors. *Traffic Cph. Den.* 9, 380–393.

Marsh, M., and McMahon, H.T. (1999). The structural era of endocytosis. *Science* 285, 215–220.

Martin, B., Paesmans, M., Mascaux, C., Berghmans, T., Lothaire, P., Meert, A.-P., Lafitte, J.-J., and Sculier, J.-P. (2004). Ki-67 expression and patients survival in lung cancer: systematic review of the literature with meta-analysis. *Br. J. Cancer* 91, 2018–2025.

Martin, S., Navarro, V., Vincent, J.P., and Mazella, J. (2002). Neurotensin receptor-1 and -3 complex modulates the cellular signaling of neurotensin in the HT29 cell line. *Gastroenterology* 123, 1135–1143.

Massa, F., Devader, C., Béraud-Dufour, S., Brau, F., Coppola, T., and Mazella, J. (2013). Focal adhesion kinase dependent activation of the PI3 kinase pathway by the functional soluble form of neurotensin receptor-3 in HT29 cells. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 45, 952–959.

Massa, F., Devader, C., Lacas-Gervais, S., Béraud-Dufour, S., Coppola, T., and Mazella, J. (2014). Impairment of HT29 Cancer Cells Cohesion by the Soluble Form of Neurotensin Receptor-3. *Genes Cancer* 5, 240–249.

Mattoon, D.R., Lamothe, B., Lax, I., and Schlessinger, J. (2004). The docking protein Gab1 is the primary mediator of EGF-stimulated activation of the PI-3K/Akt cell survival pathway. *BMC Biol.* 2, 24.

Mayor, S., Parton, R.G., and Donaldson, J.G. (2014). Clathrin-Independent Pathways of Endocytosis. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 6.

Mazella, J., Kitabgi, P., and Vincent, J.P. (1985). Molecular properties of neurotensin receptors in rat brain. Identification of subunits by covalent labeling. *J. Biol. Chem.* 260, 508–514.

Mazella, J., Zsürger, N., Navarro, V., Chabry, J., Kaghad, M., Caput, D., Ferrara, P., Vita, N., Gully, D., Maffrand, J.P., *et al.* (1998). The 100-kDa neurotensin receptor is gp95/sortilin, a non-G-protein-coupled receptor. *J. Biol. Chem.* 273, 26273–26276.

Mazella, J., Pétrault, O., Lucas, G., Deval, E., Béraud-Dufour, S., Gandin, C., El-Yacoubi, M., Widmann, C., Guyon, A., Chevet, E., *et al.* (2010). Spadin, a Sortilin-Derived Peptide, Targeting Rodent TREK-1 Channels: A New Concept in the Antidepressant Drug Design. *PLoS Biol.* 8.

McCarthy, W.J., Meza, R., Jeon, J., and Moolgavkar, S. (2012). Lung cancer in never smokers Epidemiology and risk prediction models. *Risk Anal. Off. Publ. Soc. Risk Anal.* 32, S69–S84.

McClellan, M., Kievit, P., Auersperg, N., and Rodland, K. (1999). Regulation of proliferation and apoptosis by epidermal growth factor and protein kinase C in human ovarian surface epithelial cells. *Exp. Cell Res.* 246, 471–479.

van Meerbeeck, J.P., and Janssens, A. (2013). The seventh tumour-node-metastasis staging system for lung cancer: Sequel or prequel? *EJC Suppl. EJC Off. J. EORTC Eur. Organ. Res. Treat. Cancer AI* 11, 150–158.



Mijatovic, T., Gailly, P., Mathieu, V., De Nève, N., Yeaton, P., Kiss, R., and Decaestecker, C. (2007). Neurotensin is a Versatile Modulator of In Vitro Human Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Cell (PDAC) Migration. *Cell. Oncol. Off. J. Int. Soc. Cell. Oncol.* 29, 315–326.

Mirsadraee, S., Oswal, D., Alizadeh, Y., Caulo, A., and van Beek, E.J. (2012). The 7th lung cancer TNM classification and staging system: Review of the changes and implications. *World J. Radiol.* 4, 128–134.

Mo, W., and Zhang, J.-T. (2011). Human ABCG2: structure, function, and its role in multidrug resistance. *Int. J. Biochem. Mol. Biol.* 3, 1–27.

Monami, G., Emiliozzi, V., Bitto, A., Lovat, F., Xu, S.-Q., Goldoni, S., Fassan, M., Serrero, G., Gomella, L.G., Baffa, R., *et al.* (2009). Proepithelin Regulates Prostate Cancer Cell Biology by Promoting Cell Growth, Migration, and Anchorage-Independent Growth. *Am. J. Pathol.* 174, 1037–1047.

Morinville, A., Martin, S., Lavallée, M., Vincent, J.-P., Beaudet, A., and Mazella, J. (2004). Internalization and trafficking of neurotensin via NTS3 receptors in HT29 cells. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 36, 2153–2168.

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

Motley, A., Bright, N.A., Seaman, M.N.J., and Robinson, M.S. (2003). Clathrin-mediated endocytosis in AP-2-depleted cells. *J. Cell Biol.* 162, 909–918.

Muers, M.F., and Round, C.E. (1993). Palliation of symptoms in non-small cell lung cancer: a study by the Yorkshire Regional Cancer Organisation Thoracic Group. *Thorax* 48, 339–343.

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

Musgrove, E.A., Caldon, C.E., Barraclough, J., Stone, A., and Sutherland, R.L. (2011). Cyclin D as a therapeutic target in cancer. *Nat. Rev. Cancer* 11, 558–572.

Musunuru, K., Strong, A., Frank-Kamenetsky, M., Lee, N.E., Ahfeldt, T., Sachs, K.V., Li, X., Li, H., Kuperwasser, N., Ruda, V.M., *et al.* (2010). From noncoding variant to phenotype via SORT1 at the 1p13 cholesterol locus. *Nature* 466, 714–719.

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

Navarro, V., Vincent, J.-P., and Mazella, J. (2002). Shedding of the luminal domain of the neurotensin receptor-3/sortilin in the HT29 cell line. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 298, 760–764.

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



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

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

Nowell, P.C. (2007). Discovery of the Philadelphia chromosome: a personal perspective. *J. Clin. Invest.* *117*, 2033–2035.

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

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

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

Oksvold, M.P., Huitfeldt, H.S., Østfold, A.C., and Skarpen, E. (2002). UV induces tyrosine kinase-independent internalisation and endosome arrest of the EGF receptor. *J. Cell Sci.* *115*, 793–803.

Oksvold, M.P., Thien, C.B.F., Widerberg, J., Chantry, A., Huitfeldt, H.S., and Langdon, W.Y. (2004). UV-radiation-induced internalization of the epidermal growth factor receptor requires distinct serine and tyrosine residues in the cytoplasmic carboxy-terminal domain. *Radiat. Res.* *161*, 685–691.

Ouyang, Q., Chen, G., Zhou, J., Li, L., Dong, Z., Yang, R., Xu, L., Cui, H., Xu, M., and Yi, L. (2016). Neurotensin signaling stimulates glioblastoma cell proliferation by upregulating c-Myc and inhibiting miR-29b-1 and miR-129-3p. *Neuro-Oncol.* *18*, 216–226.

Owada, M., and Neufeld, E.F. (1982). Is there a mechanism for introducing acid hydrolases into liver lysosomes that is independent of mannose 6-phosphate recognition? Evidence from I-cell disease. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *105*, 814–820.

Owen, D.J., Collins, B.M., and Evans, P.R. (2004). Adaptors for clathrin coats: structure and function. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* *20*, 153–191.

Paez, J.G., Jänne, P.A., Lee, J.C., Tracy, S., Greulich, H., Gabriel, S., Herman, P., Kaye, F.J., Lindeman, N., Boggon, T.J., *et al.* (2004). EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy. *Science* *304*, 1497–1500.

Paik, K.H., Song, S.M., Ki, C.S., Yu, H.-W., Kim, J.S., Min, K.H., Chang, S.H., Yoo, E.J., Lee, I.J., Kwan, E.K., *et al.* (2005). Identification of mutations in the GNPTA (MGC4170) gene coding for GlcNAc-phosphotransferase alpha/beta subunits in Korean patients with mucopolidosis type II or type IIIA. *Hum. Mutat.* *26*, 308–314.

Pan, X., Zaarur, N., Singh, M., Morin, P., and Kandror, K.V. (2017). Sortilin and Retromer Mediate Retrograde Transport of Glut4 in 3T3-L1 Adipocytes. *Mol. Biol. Cell.*



Pandey, A., Blagoev, B., Kratchmarova, I., Fernandez, M., Nielsen, M., Kristiansen, T.Z., Ohara, O., Podtelejnikov, A.V., Roche, S., Lodish, H.F., *et al.* (2002). Cloning of a novel phosphotyrosine binding domain containing molecule, Odin, involved in signaling by receptor tyrosine kinases. *Oncogene* 21, 8029–8036.

Pao, W., Miller, V., Zakowski, M., Doherty, J., Politi, K., Sarkaria, I., Singh, B., Heelan, R., Rusch, V., Fulton, L., *et al.* (2004). EGF receptor gene mutations are common in lung cancers from “never smokers” and are associated with sensitivity of tumors to gefitinib and erlotinib. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 13306–13311.

Park, J.O., Choi, D.-Y., Choi, D.-S., Kim, H.J., Kang, J.W., Jung, J.H., Lee, J.H., Kim, J., Freeman, M.R., Lee, K.Y., *et al.* (2013). Identification and characterization of proteins isolated from microvesicles derived from human lung cancer pleural effusions. *Proteomics* 13, 2125–2134.

Park, S.Y., Han, J., Kim, J.B., Yang, M.-G., Kim, Y.J., Lim, H.-J., An, S.Y., and Kim, J.-H. (2014). Interleukin-8 is related to poor chemotherapeutic response and tumourigenicity in hepatocellular carcinoma. *Eur. J. Cancer Oxf. Engl.* 1990 50, 341–350.

Parkinson, D.R., Dracopoli, N., Petty, B.G., Compton, C., Cristofanilli, M., Deisseroth, A., Hayes, D.F., Kapke, G., Kumar, P., Lee, J.S., *et al.* (2012). Considerations in the development of circulating tumor cell technology for clinical use. *J. Transl. Med.* 10, 138.

Parson, S.H. (2009). *Clinically Oriented Anatomy*, 6th edn. *J. Anat.* 215, 474.

Patterson, R.L., van Rossum, D.B., Nikolaidis, N., Gill, D.L., and Snyder, S.H. (2005). Phospholipase C-gamma: diverse roles in receptor-mediated calcium signaling. *Trends Biochem. Sci.* 30, 688–697.

Patz, E.F., Campa, M.J., Gottlin, E.B., Kusmartseva, I., Guan, X.R., and Herndon, J.E. (2007). Panel of serum biomarkers for the diagnosis of lung cancer. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 25, 5578–5583.

Pearse, B.M., and Robinson, M.S. (1990). Clathrin, adaptors, and sorting. *Annu. Rev. Cell Biol.* 6, 151–171.

Penengo, L., Mapelli, M., Murachelli, A.G., Confalonieri, S., Magri, L., Musacchio, A., Di Fiore, P.P., Polo, S., and Schneider, T.R. (2006). Crystal structure of the ubiquitin binding domains of rabex-5 reveals two modes of interaction with ubiquitin. *Cell* 124, 1183–1195.

Perez-Torres, M., Valle, B.L., Maihle, N.J., Negron-Vega, L., Nieves-Alicea, R., and Cora, E.M. (2008). Shedding of epidermal growth factor receptor is a regulated process that occurs with overexpression in malignant cells. *Exp. Cell Res.* 314, 2907–2918.

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

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

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



Pines, G., Huang, P.H., Zwang, Y., White, F.M., and Yarden, Y. (2010). EGFRvIV: a previously uncharacterized oncogenic mutant reveals a kinase autoinhibitory mechanism. *Oncogene* 29, 5850–5860.

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

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

Polymenidou, M., Lagier-Tourenne, C., Hutt, K.R., Huelga, S.C., Moran, J., Liang, T.Y., Ling, S.-C., Sun, E., Wancewicz, E., Mazur, C., *et al.* (2011). Long pre-mRNA depletion and RNA missplicing contribute to neuronal vulnerability from loss of TDP-43. *Nat. Neurosci.* 14, 459–468.

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

Prudencio, M., Jansen-West, K.R., Lee, W.C., Gendron, T.F., Zhang, Y.-J., Xu, Y.-F., Gass, J., Stuani, C., Stetler, C., Rademakers, R., *et al.* (2012). Misregulation of human sortilin splicing leads to the generation of a nonfunctional progranulin receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109, 21510–21515.

Pylypenko, O., and Goud, B. (2012). Posttranslational modifications of Rab GTPases help their insertion into membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109, 5555–5556.

Quistgaard, E.M., Madsen, P., Grøftehaug, M.K., Nissen, P., Petersen, C.M., and Thirup, S.S. (2009). Ligands bind to Sortilin in the tunnel of a ten-bladed beta-propeller domain. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 16, 96–98.

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

Rappoport, J.Z., and Simon, S.M. (2009). Endocytic trafficking of activated EGFR is AP-2 dependent and occurs through preformed clathrin spots. *J. Cell Sci.* 122, 1301–1305.

Reitman, M.L., Varki, A., and Kornfeld, S. (1981). Fibroblasts from patients with I-cell disease and pseudo-Hurler polydystrophy are deficient in uridine 5'-diphosphate-N-acetylglucosamine: glycoprotein N-acetylglucosaminylphosphotransferase activity. *J. Clin. Invest.* 67, 1574–1579.

Ribassin-Majed, L., Le-Teuff, G., and Hill, C. (2017). [The frequency of cancer in France: Most recent data and trends]. *Bull. Cancer (Paris)* 104, 20–29.

Riedel, H., Dull, T.J., Schlessinger, J., and Ullrich, A. (1986). A chimaeric receptor allows insulin to stimulate tyrosine kinase activity of epidermal growth factor receptor. *Nature* 324, 68–70.

Rikova, K., Guo, A., Zeng, Q., Possemato, A., Yu, J., Haack, H., Nardone, J., Lee, K., Reeves, C., Li, Y., *et al.* (2007). Global survey of phosphotyrosine signaling identifies oncogenic kinases in lung cancer. *Cell* 131, 1190–1203.



Rock, J.R., Randell, S.H., and Hogan, B.L.M. (2010). Airway basal stem cells: a perspective on their roles in epithelial homeostasis and remodeling. *Dis. Model. Mech.* 3, 545–556.

Rodrigues, G.A., Falasca, M., Zhang, Z., Ong, S.H., and Schlessinger, J. (2000). A novel positive feedback loop mediated by the docking protein Gab1 and phosphatidylinositol 3-kinase in epidermal growth factor receptor signaling. *Mol. Cell. Biol.* 20, 1448–1459.

Roepstorff, K., Grøvdal, L., Grandal, M., Lerdrup, M., and van Deurs, B. (2008). Endocytic downregulation of ErbB receptors: mechanisms and relevance in cancer. *Histochem. Cell Biol.* 129, 563–578.

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

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

Rostène, W.H., and Alexander, M.J. (1997). Neurotensin and neuroendocrine regulation. *Front. Neuroendocrinol.* 18, 115–173.

Russo, M., Misale, S., Wei, G., Siravegna, G., Crisafulli, G., Lazzari, L., Corti, G., Rospo, G., Novara, L., Mussolin, B., *et al.* (2016). Acquired Resistance to the TRK Inhibitor Entrectinib in Colorectal Cancer. *Cancer Discov.* 6, 36–44.

Sabatti, C., Service, S.K., Hartikainen, A.-L., Pouta, A., Ripatti, S., Brodsky, J., Jones, C.G., Zaitlen, N.A., Varilo, T., Kaakinen, M., *et al.* (2009). Genome-wide association analysis of metabolic traits in a birth cohort from a founder population. *Nat. Genet.* 41, 35–46.

Samet, J.M., Avila-Tang, E., Boffetta, P., Hannan, L.M., Olivo-Marston, S., Thun, M.J., and Rudin, C.M. (2009). LUNG CANCER IN NEVER SMOKERS: CLINICAL EPIDEMIOLOGY AND ENVIRONMENTAL RISK FACTORS. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 15, 5626–5645.

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

Sandler, A., Gray, R., Perry, M.C., Brahmer, J., Schiller, J.H., Dowlati, A., Lilienbaum, R., and Johnson, D.H. (2006). Paclitaxel-carboplatin alone or with bevacizumab for non-small-cell lung cancer. *N. Engl. J. Med.* 355, 2542–2550.

Sandoval, I.V., and Bakke, O. (1994). Targeting of membrane proteins to endosomes and lysosomes. *Trends Cell Biol.* 4, 292–297.

Sanfiorenzo, C., Ilie, M.I., Belaid, A., Barlési, F., Mouroux, J., Marquette, C.-H., Brest, P., and Hofman, P. (2013). Two panels of plasma microRNAs as non-invasive biomarkers for prediction of recurrence in resectable NSCLC. *PLoS One* 8, e54596.

Santos, E., Martin-Zanca, D., Reddy, E.P., Pierotti, M.A., Della Porta, G., and Barbacid, M. (1984). Malignant activation of a K-ras oncogene in lung carcinoma but not in normal tissue of the same patient. *Science* 223, 661–664.



Sarret, P., Krzywkowski, P., Segal, L., Nielsen, M.S., Petersen, C.M., Mazella, J., Stroh, T., and Beaudet, A. (2003). Distribution of NTS3 receptor/sortilin mRNA and protein in the rat central nervous system. *J. Comp. Neurol.* *461*, 483–505.

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

Scaltriti, M., Rojo, F., Ocaña, A., Anido, J., Guzman, M., Cortes, J., Di Cosimo, S., Matias-Guiu, X., Ramon y Cajal, S., Arribas, J., *et al.* (2007). Expression of p95HER2, a truncated form of the HER2 receptor, and response to anti-HER2 therapies in breast cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* *99*, 628–638.

Schachtrup, C., Ryu, J.K., Mammadzada, K., Khan, A.S., Carlton, P.M., Perez, A., Christian, F., Le Moan, N., Vagena, E., Baeza-Raja, B., *et al.* (2015). Nuclear pore complex remodeling by p75(NTR) cleavage controls TGF- β signaling and astrocyte functions. *Nat. Neurosci.* *18*, 1077–1080.

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

Schlessinger, J. (1988). Signal transduction by allosteric receptor oligomerization. *Trends Biochem. Sci.* *13*, 443–447.

Schlöndorff, J., and Blobel, C.P. (1999). Metalloprotease-disintegrins: modular proteins capable of promoting cell-cell interactions and triggering signals by protein-ectodomain shedding. *J. Cell Sci.* *112* (Pt 21), 3603–3617.

Schmidt, E.V. (1999). The role of c-myc in cellular growth control. *Oncogene* *18*, 2988–2996.

Schöneberg, J., Lee, I.-H., Iwasa, J.H., and Hurley, J.H. (2017). Reverse-topology membrane scission by the ESCRT proteins. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *18*, 5–17.

Schönwasser, D.C., Marais, R.M., Marshall, C.J., and Parker, P.J. (1998). Activation of the mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase pathway by conventional, novel, and atypical protein kinase C isotypes. *Mol. Cell. Biol.* *18*, 790–798.

Seaman, M.N.J. (2007). Identification of a novel conserved sorting motif required for retromer-mediated endosome-to-TGN retrieval. *J. Cell Sci.* *120*, 2378–2389.

Sequist, L.V., Waltman, B.A., Dias-Santagata, D., Digumarthy, S., Turke, A.B., Fidias, P., Bergethon, K., Shaw, A.T., Gettinger, S., Cospers, A.K., *et al.* (2011). Genotypic and Histological Evolution of Lung Cancers Acquiring Resistance to EGFR Inhibitors. *Sci. Transl. Med.* *3*, 75ra26.

Sgambato, A., Casaluce, F., Maione, P., Rossi, A., Ciardiello, F., and Gridelli, C. (2014). Cetuximab in advanced non-small cell lung cancer (NSCLC): the showdown? *J. Thorac. Dis.* *6*, 578–580.

Shan, Y., Eastwood, M.P., Zhang, X., Kim, E.T., Arkhipov, A., Dror, R.O., Jumper, J., Kuriyan, J., and Shaw, D.E. (2012). Oncogenic mutations counteract intrinsic disorder in the EGFR kinase and promote receptor dimerization. *Cell* *149*, 860–870.

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



Shepherd, F.A., Rodrigues Pereira, J., Ciuleanu, T., Tan, E.H., Hirsh, V., Thongprasert, S., Campos, D., Maoleekoonpiroj, S., Smylie, M., Martins, R., *et al.* (2005). Erlotinib in previously treated non-small-cell lung cancer. *N. Engl. J. Med.* **353**, 123–132.

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

Shiloh, Y., and Ziv, Y. (2013). The ATM protein kinase: regulating the cellular response to genotoxic stress, and more. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **14**, 197–210.

Shtiegman, K., Kochupurakkal, B.S., Zwang, Y., Pines, G., Starr, A., Vexler, A., Citri, A., Katz, M., Lavi, S., Ben-Basat, Y., *et al.* (2007). Defective ubiquitinylation of EGFR mutants of lung cancer confers prolonged signaling. *Oncogene* **26**, 6968–6978.

Sigismund, S., Woelk, T., Puri, C., Maspero, E., Tacchetti, C., Transidico, P., Di Fiore, P.P., and Polo, S. (2005). Clathrin-independent endocytosis of ubiquitinated cargos. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 2760–2765.

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

Sigismund, S., Algisi, V., Nappo, G., Conte, A., Pascolutti, R., Cuomo, A., Bonaldi, T., Argenzio, E., Verhoef, L.G.G.C., Maspero, E., *et al.* (2013). Threshold-controlled ubiquitination of the EGFR directs receptor fate. *EMBO J.* **32**, 2140–2157.

Simon, M., Argiris, A., and Murren, J.R. (2004). Progress in the therapy of small cell lung cancer. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **49**, 119–133.

Simons, M., and Raposo, G. (2009). Exosomes--vesicular carriers for intercellular communication. *Curr. Opin. Cell Biol.* **21**, 575–581.

Smith, F.M., Vearing, C., Lackmann, M., Treutlein, H., Himanen, J., Chen, K., Saul, A., Nikolov, D., and Boyd, A.W. (2004). Dissecting the EphA3/Ephrin-A5 interactions using a novel functional mutagenesis screen. *J. Biol. Chem.* **279**, 9522–9531.

Soilu-Hänninen, M., Ekert, P., Bucci, T., Syroid, D., Bartlett, P.F., and Kilpatrick, T.J. (1999). Nerve growth factor signaling through p75 induces apoptosis in Schwann cells via a Bcl-2-independent pathway. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **19**, 4828–4838.

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

Soria, J.-C., Mauguén, A., Reck, M., Sandler, A.B., Saijo, N., Johnson, D.H., Burcoveanu, D., Fukuoka, M., Besse, B., Pignon, J.-P., *et al.* (2013). Systematic review and meta-analysis of randomised, phase II/III trials adding bevacizumab to platinum-based chemotherapy as first-line treatment in patients with advanced non-small-cell lung cancer. *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol.* **24**, 20–30.

Sorkin, A., and von Zastrow, M. (2009). Endocytosis and signalling: intertwining molecular networks. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **10**, 609–622.

Sousa, L.P., Lax, I., Shen, H., Ferguson, S.M., De Camilli, P., and Schlessinger, J. (2012). Suppression of EGFR endocytosis by dynamin depletion reveals that EGFR signaling occurs primarily at the plasma membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **109**, 4419–4424.



Spira, A., and Ettinger, D.S. (2004). Multidisciplinary management of lung cancer. *N. Engl. J. Med.* 350, 379–392.

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

Stephens, P., Hunter, C., Bignell, G., Edkins, S., Davies, H., Teague, J., Stevens, C., O'Meara, S., Smith, R., Parker, A., *et al.* (2004). Lung cancer: intragenic ERBB2 kinase mutations in tumours. *Nature* 431, 525–526.

Stern, K.A., Visser Smit, G.D., Place, T.L., Winistorfer, S., Piper, R.C., and Lill, N.L. (2007). Epidermal Growth Factor Receptor Fate Is Controlled by Hrs Tyrosine Phosphorylation Sites That Regulate Hrs Degradation. *Mol. Cell. Biol.* 27, 888–898.

Su, K.-Y., Chen, H.-Y., Li, K.-C., Kuo, M.-L., Yang, J.C.-H., Chan, W.-K., Ho, B.-C., Chang, G.-C., Shih, J.-Y., Yu, S.-L., *et al.* (2012). Pretreatment epidermal growth factor receptor (EGFR) T790M mutation predicts shorter EGFR tyrosine kinase inhibitor response duration in patients with non-small-cell lung cancer. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 30, 433–440.

Subramanian, J., and Govindan, R. (2007). Lung cancer in never smokers: a review. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 25, 561–570.

Sui, X., Chen, R., Wang, Z., Huang, Z., Kong, N., Zhang, M., Han, W., Lou, F., Yang, J., Zhang, Q., *et al.* (2013). Autophagy and chemotherapy resistance: a promising therapeutic target for cancer treatment. *Cell Death Dis.* 4, e838.

Sullivan, I., and Planchard, D. (2016). Next-Generation EGFR Tyrosine Kinase Inhibitors for Treating EGFR-Mutant Lung Cancer beyond First Line. *Front. Med.* 3, 76.

Summy, J.M., and Gallick, G.E. (2006). Treatment for advanced tumors: SRC reclaims center stage. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 12, 1398–1401.

Sun, S., Schiller, J.H., and Gazdar, A.F. (2007). Lung cancer in never smokers — a different disease. *Nat. Rev. Cancer* 7, 778–790.

Sundar, R., Cho, B.-C., Brahmer, J.R., and Soo, R.A. (2015). Nivolumab in NSCLC: latest evidence and clinical potential. *Ther. Adv. Med. Oncol.* 7, 85–96.

Sutedja, G. (2003). New techniques for early detection of lung cancer. *Eur. Respir. J. Suppl.* 39, 57s–66s.

Szilágyi, A., and Skolnick, J. (2006). Efficient prediction of nucleic acid binding function from low-resolution protein structures. *J. Mol. Biol.* 358, 922–933.

Tan, X., Lambert, P.F., Rapraeger, A.C., and Anderson, R.A. (2016). Stress-Induced EGFR Trafficking: Mechanisms, Functions, and Therapeutic Implications. *Trends Cell Biol.* 26, 352–366.

Tang, M.-C., Wu, M.-Y., Hwang, M.-H., Chang, Y.-T., Huang, H.-J., Lin, A.M.-Y., and Yang, J.C.-H. (2015). Chloroquine Enhances Gefitinib Cytotoxicity in Gefitinib-Resistant Nonsmall Cell Lung Cancer Cells. *PLoS ONE* 10.



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

Tanimoto, R., Palladino, C., Xu, S.-Q., Buraschi, S., Neill, T., Gomella, L.G., Peiper, S.C., Belfiore, A., Iozzo, R.V., and Morrione, A. (2017). The perlecan-interacting growth factor progranulin regulates ubiquitination, sorting, and lysosomal degradation of sortilin. *Matrix Biol. J. Int. Soc. Matrix Biol.*

Teng, H.K., Teng, K.K., Lee, R., Wright, S., Tevar, S., Almeida, R.D., Kermani, P., Torkin, R., Chen, Z.-Y., Lee, F.S., *et al.* (2005). ProBDNF induces neuronal apoptosis via activation of a receptor complex of p75NTR and sortilin. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *25*, 5455–5463.

Teslovich, T.M., Musunuru, K., Smith, A.V., Edmondson, A.C., Stylianou, I.M., Koseki, M., Pirruccello, J.P., Ripatti, S., Chasman, D.I., Willer, C.J., *et al.* (2010). Biological, clinical and population relevance of 95 loci for blood lipids. *Nature* *466*, 707–713.

Thalappilly, S., Soubeyran, P., Iovanna, J.L., and Dusetti, N.J. (2010). VAV2 regulates epidermal growth factor receptor endocytosis and degradation. *Oncogene* *29*, 2528–2539.

Théry, C., Ostrowski, M., and Segura, E. (2009). Membrane vesicles as conveyors of immune responses. *Nat. Rev. Immunol.* *9*, 581–593.

Thun, M.J., Hannan, L.M., Adams-Campbell, L.L., Boffetta, P., Buring, J.E., Feskanich, D., Flanders, W.D., Jee, S.H., Katanoda, K., Kolonel, L.N., *et al.* (2008). Lung Cancer Occurrence in Never-Smokers: An Analysis of 13 Cohorts and 22 Cancer Registry Studies. *PLoS Med.* *5*.

Thurlbeck, W.M. (1979). Post-mortem lung volumes. *Thorax* *34*, 735–739.

Tiganis, T. (2002). Protein tyrosine phosphatases: dephosphorylating the epidermal growth factor receptor. *IUBMB Life* *53*, 3–14.

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

Tomas, A., Futter, C.E., and Eden, E.R. (2014). EGF receptor trafficking: consequences for signaling and cancer. *Trends Cell Biol.* *24*, 26–34.

Tomas, A., Vaughan, S.O., Burgoyne, T., Sorkin, A., Hartley, J.A., Hochhauser, D., and Futter, C.E. (2015). WASH and Tsg101/ALIX-dependent diversion of stress-internalized EGFR from the canonical endocytic pathway. *Nat. Commun.* *6*.

Tong, J., Taylor, P., Peterman, S.M., Prakash, A., and Moran, M.F. (2009). Epidermal growth factor receptor phosphorylation sites Ser991 and Tyr998 are implicated in the regulation of receptor endocytosis and phosphorylations at Ser1039 and Thr1041. *Mol. Cell. Proteomics MCP* *8*, 2131–2144.

Tong, J., Sydorsky, Y., St-Germain, J.R., Taylor, P., Tsao, M.S., and Moran, M.F. (2013). Odin (ANKS1A) modulates EGF receptor recycling and stability. *PLoS One* *8*, e64817.

Tong, J., Taylor, P., and Moran, M.F. (2014). Proteomic analysis of the epidermal growth factor receptor (EGFR) interactome and post-translational modifications associated with receptor endocytosis in response to EGF and stress. *Mol. Cell. Proteomics MCP* *13*, 1644–1658.



- Torrise, M.R., Lotti, L.V., Belleudi, F., Gradini, R., Salcini, A.E., Confalonieri, S., Pelicci, P.G., and Di Fiore, P.P. (1999). Eps15 Is Recruited to the Plasma Membrane upon Epidermal Growth Factor Receptor Activation and Localizes to Components of the Endocytic Pathway during Receptor Internalization. *Mol. Biol. Cell* 10, 417–434.
- Tran, D.D., Russell, H.R., Sutor, S.L., van Deursen, J., and Bram, R.J. (2003). CAML is required for efficient EGF receptor recycling. *Dev. Cell* 5, 245–256.
- Travis, W.D. (2012). Update on small cell carcinoma and its differentiation from squamous cell carcinoma and other non-small cell carcinomas. *Mod. Pathol. Off. J. U. S. Can. Acad. Pathol. Inc* 25 *Suppl* 1, S18-30.
- Travis, W.D., Brambilla, E., Noguchi, M., Nicholson, A.G., Geisinger, K.R., Yatabe, Y., Beer, D.G., Powell, C.A., Riely, G.J., Van Schil, P.E., *et al.* (2011). International Association for the Study of Lung Cancer/American Thoracic Society/European Respiratory Society International Multidisciplinary Classification of Lung Adenocarcinoma. *J. Thorac. Oncol. Off. Publ. Int. Assoc. Study Lung Cancer* 6, 244–285.
- Trowbridge, I.S., Collawn, J.F., and Hopkins, C.R. (1993). Signal-dependent membrane protein trafficking in the endocytic pathway. *Annu. Rev. Cell Biol.* 9, 129–161.
- Truzzi, F., Marconi, A., Lotti, R., Dallaglio, K., French, L.E., Hempstead, B.L., and Pincelli, C. (2008). Neurotrophins and their receptors stimulate melanoma cell proliferation and migration. *J. Invest. Dermatol.* 128, 2031–2040.
- Tuominen, V.J., Ruotoistenmäki, S., Viitanen, A., Jumppanen, M., and Isola, J. (2010). ImmunoRatio: a publicly available web application for quantitative image analysis of estrogen receptor (ER), progesterone receptor (PR), and Ki-67. *Breast Cancer Res. BCR* 12, R56.
- Turrisi, A.T., Kim, K., Blum, R., Sause, W.T., Livingston, R.B., Komaki, R., Wagner, H., Aisner, S., and Johnson, D.H. (1999). Twice-daily compared with once-daily thoracic radiotherapy in limited small-cell lung cancer treated concurrently with cisplatin and etoposide. *N. Engl. J. Med.* 340, 265–271.
- Ullrich, A., and Schlessinger, J. (1990). Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity. *Cell* 61, 203–212.
- Ullrich, A., Coussens, L., Hayflick, J.S., Dull, T.J., Gray, A., Tam, A.W., Lee, J., Yarden, Y., Libermann, T.A., and Schlessinger, J. (1984). Human epidermal growth factor receptor cDNA sequence and aberrant expression of the amplified gene in A431 epidermoid carcinoma cells. *Nature* 309, 418–425.
- Underhill, H.R., Kitzman, J.O., Hellwig, S., Welker, N.C., Daza, R., Baker, D.N., Gligorich, K.M., Rostomily, R.C., Bronner, M.P., and Shendure, J. (2016). Fragment Length of Circulating Tumor DNA. *PLoS Genet.* 12.
- Ursing, J., Rombo, L., Bergqvist, Y., Rodrigues, A., and Kofoed, P.-E. (2016). High-Dose Chloroquine for Treatment of Chloroquine-Resistant Plasmodium falciparum Malaria. *J. Infect. Dis.* 213, 1315–1321.
- Vaishnavi, A., Capelletti, M., Le, A.T., Kako, S., Butaney, M., Ercan, D., Mahale, S., Davies, K.D., Aisner, D.L., Pilling, A.B., *et al.* (2013). Oncogenic and drug-sensitive NTRK1 rearrangements in lung cancer. *Nat. Med.* 19, 1469–1472.



- Vanlandingham, P.A., and Ceresa, B.P. (2009). Rab7 Regulates Late Endocytic Trafficking Downstream of Multivesicular Body Biogenesis and Cargo Sequestration. *J. Biol. Chem.* *284*, 12110–12124.
- Vanneman, M., and Dranoff, G. (2012). Combining Immunotherapy and Targeted Therapies in Cancer Treatment. *Nat. Rev. Cancer* *12*, 237–251.
- Vergarajauregui, S., San Miguel, A., and Puertollano, R. (2006). Activation of p38 mitogen-activated protein kinase promotes epidermal growth factor receptor internalization. *Traffic Cph. Den.* *7*, 686–698.
- Veronesi, G., Bottoni, E., Finocchiaro, G., and Alloisio, M. (2015). When is surgery indicated for small-cell lung cancer? *Lung Cancer Amst. Neth.* *90*, 582–589.
- Vieira, A.V., Lamaze, C., and Schmid, S.L. (1996). Control of EGF receptor signaling by clathrin-mediated endocytosis. *Science* *274*, 2086–2089.
- Vincent, J.P., Mazella, J., and Kitabgi, P. (1999). Neurotensin and neurotensin receptors. *Trends Pharmacol. Sci.* *20*, 302–309.
- Vivanco, I., and Sawyers, C.L. (2002). The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer. *Nat. Rev. Cancer* *2*, 489–501.
- Waheed, A., Hasilik, A., and von Figura, K. (1982). UDP-N-acetylglucosamine:lysosomal enzyme precursor N-acetylglucosamine-1-phosphotransferase. Partial purification and characterization of the rat liver Golgi enzyme. *J. Biol. Chem.* *257*, 12322–12331.
- Wallace, C., Newhouse, S.J., Braund, P., Zhang, F., Tobin, M., Falchi, M., Ahmadi, K., Dobson, R.J., Marçano, A.C.B., Hajat, C., *et al.* (2008). Genome-wide association study identifies genes for biomarkers of cardiovascular disease: serum urate and dyslipidemia. *Am. J. Hum. Genet.* *82*, 139–149.
- Wang, S.-C., Nakajima, Y., Yu, Y.-L., Xia, W., Chen, C.-T., Yang, C.-C., McIntush, E.W., Li, L.-Y., Hawke, D.H., Kobayashi, R., *et al.* (2006a). Tyrosine phosphorylation controls PCNA function through protein stability. *Nat. Cell Biol.* *8*, 1359–1368.
- Wang, W., Zhang, H., Liu, S., Kim, C.K., Xu, Y., Hurley, L.A., Nishikawa, R., Nagane, M., Hu, B., Stegh, A.H., *et al.* (2017). Internalized CD44s splice isoform attenuates EGFR degradation by targeting Rab7A. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*
- Wang, X., Wang, Q., Ives, K.L., and Evers, B.M. (2006b). Curcumin inhibits neurotensin-mediated interleukin-8 production and migration of HCT116 human colon cancer cells. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* *12*, 5346–5355.
- Wang, Y.-N., Yamaguchi, H., Hsu, J.-M., and Hung, M.-C. (2010). Nuclear trafficking of the epidermal growth factor receptor family membrane proteins. *Oncogene* *29*, 3997–4006.
- Ward, C.W., Lawrence, M.C., Streltsov, V.A., Adams, T.E., and McKern, N.M. (2007). The insulin and EGF receptor structures: new insights into ligand-induced receptor activation. *Trends Biochem. Sci.* *32*, 129–137.
- Welton, J.L., Khanna, S., Giles, P.J., Brennan, P., Brewis, I.A., Staffurth, J., Mason, M.D., and Clayton, A. (2010). Proteomics analysis of bladder cancer exosomes. *Mol. Cell. Proteomics MCP* *9*, 1324–1338.



- West, M.A., Bretscher, M.S., and Watts, C. (1989). Distinct endocytotic pathways in epidermal growth factor-stimulated human carcinoma A431 cells. *J. Cell Biol.* *109*, 2731–2739.
- Westergaard, U.B., Sørensen, E.S., Hermey, G., Nielsen, M.S., Nykjaer, A., Kirkegaard, K., Jacobsen, C., Gliemann, J., Madsen, P., and Petersen, C.M. (2004). Functional organization of the sortilin Vps10p domain. *J. Biol. Chem.* *279*, 50221–50229.
- Willer, C.J., Sanna, S., Jackson, A.U., Scuteri, A., Bonnycastle, L.L., Clarke, R., Heath, S.C., Timpson, N.J., Najjar, S.S., Stringham, H.M., *et al.* (2008). Newly identified loci that influence lipid concentrations and risk of coronary artery disease. *Nat. Genet.* *40*, 161–169.
- Wilson, C.M., Naves, T., Vincent, F., Melloni, B., Bonnaud, F., Lalloué, F., and Jauberteau, M.-O. (2014). Sortilin mediates the release and transfer of exosomes in concert with two tyrosine kinase receptors. *J. Cell Sci.* *127*, 3983–3997.
- Wilson, C.M., Naves, T., Al Akhrass, H., Vincent, F., Melloni, B., Bonnaud, F., Lalloué, F., and Jauberteau, M.-O. (2016). A new role under sortilin's belt in cancer. *Commun. Integr. Biol.* *9*, e1130192.
- Xie, S., Bahl, K., Reinecke, J.B., Hammond, G.R.V., Naslavsky, N., and Caplan, S. (2016). The endocytic recycling compartment maintains cargo segregation acquired upon exit from the sorting endosome. *Mol. Biol. Cell* *27*, 108–126.
- Xiong, J., Zhou, L., Yang, M., Lim, Y., Zhu, Y., Fu, D., Li, Z., Zhong, J., Xiao, Z., and Zhou, X.-F. (2013). ProBDNF and its receptors are upregulated in glioma and inhibit the growth of glioma cells in vitro. *Neuro-Oncol.* *15*, 990–1007.
- Yamashita, T., Kamada, H., Kanasaki, S., Maeda, Y., Nagano, K., Abe, Y., Inoue, M., Yoshioka, Y., Tsutsumi, Y., Katayama, S., *et al.* (2013). Epidermal growth factor receptor localized to exosome membranes as a possible biomarker for lung cancer diagnosis. *Pharm.* *68*, 969–973.
- Yang, M., Lim, Y., Li, X., Zhong, J.-H., and Zhou, X.-F. (2011). Precursor of Brain-derived Neurotrophic Factor (proBDNF) Forms a Complex with Huntingtin-associated Protein-1 (HAP1) and Sortilin That Modulates proBDNF Trafficking, Degradation, and Processing. *J. Biol. Chem.* *286*, 16272–16284.
- Yarden, Y., and Sliwkowski, M.X. (2001). Untangling the ErbB signalling network. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *2*, 127–137.
- Yasuda, H., Park, E., Yun, C.-H., Sng, N.J., Lucena-Araujo, A.R., Yeo, W.-L., Huberman, M.S., Cohen, D.W., Nakayama, S., Ishioka, K., *et al.* (2013). Structural, biochemical, and clinical characterization of epidermal growth factor receptor (EGFR) exon 20 insertion mutations in lung cancer. *Sci. Transl. Med.* *5*, 216ra177.
- Yeatman, T.J. (2004). A renaissance for SRC. *Nat. Rev. Cancer* *4*, 470–480.
- Yong, E. (2014). Cancer biomarkers: Written in blood. *Nature* *511*, 524–526.
- Younes, M., Wu, Z., Dupouy, S., Lupo, A.M., Mourra, N., Takahashi, T., Fléjou, J.F., Trédaniel, J., Régnard, J.F., Damotte, D., *et al.* (2014). Neurotensin (NTS) and its receptor (NTSR1) causes EGFR, HER2 and HER3 over-expression and their autocrine/paracrine activation in lung tumors, confirming responsiveness to erlotinib. *Oncotarget* *5*, 8252–8269.



- Yu, H.A., Arcila, M.E., Rekhtman, N., Sima, C.S., Zakowski, M.F., Pao, W., Kris, M.G., Miller, V.A., Ladanyi, M., and Riely, G.J. (2013a). 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. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* *19*, 2240–2247.
- Yu, J., Ren, X., Chen, Y., Liu, P., Wei, X., Li, H., Ying, G., Chen, K., Winkler, H., and Hao, X. (2013b). Dysfunctional activation of neurotensin/IL-8 pathway in hepatocellular carcinoma is associated with increased inflammatory response in microenvironment, more epithelial mesenchymal transition in cancer and worse prognosis in patients. *PLoS One* *8*, e56069.
- Yu, Y.-L., Chou, R.-H., Wu, C.-H., Wang, Y.-N., Chang, W.-J., Tseng, Y.-J., Chang, W.-C., Lai, C.-C., Lee, H.-J., Huo, L., *et al.* (2012). Nuclear EGFR suppresses ribonuclease activity of polynucleotide phosphorylase through DNAPK-mediated phosphorylation at serine 776. *J. Biol. Chem.* *287*, 31015–31026.
- Yuan, Z.-L., Guan, Y.-J., Chatterjee, D., and Chin, Y.E. (2005). Stat3 dimerization regulated by reversible acetylation of a single lysine residue. *Science* *307*, 269–273.
- Zhang, Y., Moheban, D.B., Conway, B.R., Bhattacharyya, A., and Segal, R.A. (2000). Cell surface Trk receptors mediate NGF-induced survival while internalized receptors regulate NGF-induced differentiation. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *20*, 5671–5678.
- Zhou, M., Wang, H., Zhou, K., Luo, X., Pan, X., Shi, B., Jiang, H., Zhang, J., Li, K., Wang, H.-M., *et al.* (2013). A novel EGFR isoform confers increased invasiveness to cancer cells. *Cancer Res.* *73*, 7056–7067.
- Zhou, S., Schuetz, J.D., Bunting, K.D., Colapietro, A.M., Sampath, J., Morris, J.J., Lagutina, I., Grosveld, G.C., Osawa, M., Nakauchi, H., *et al.* (2001). The ABC transporter Bcrp1/ABCG2 is expressed in a wide variety of stem cells and is a molecular determinant of the side-population phenotype. *Nat. Med.* *7*, 1028–1034.
- van Zijl, F., Krupitza, G., and Mikulits, W. (2011). Initial steps of metastasis: Cell invasion and endothelial transmigration. *Mutat. Res.* *728*, 23–34.
- Zitvogel, L., and Kroemer, G. (2012). Targeting PD-1/PD-L1 interactions for cancer immunotherapy. *Oncoimmunology* *1*, 1223–1225.
- Zou, Y., Ling, Y.-H., Sironi, J., Schwartz, E.L., Perez-Soler, R., and Piperdi, B. (2013). The autophagy inhibitor chloroquine overcomes the innate resistance to erlotinib of non-small cell lung cancer cells with wild-type EGFR. *J. Thorac. Oncol. Off. Publ. Int. Assoc. Study Lung Cancer* *8*.
- Zsürger, N., Mazella, J., and Vincent, J.P. (1994). Solubilization and purification of a high affinity neurotensin receptor from newborn human brain. *Brain Res.* *639*, 245–252.
- Zwang, Y., and Yarden, Y. (2006). p38 MAP kinase mediates stress-induced internalization of EGFR: implications for cancer chemotherapy. *EMBO J.* *25*, 4195–4206.
- (2011). Reduced Lung-Cancer Mortality with Low-Dose Computed Tomographic Screening. *N. Engl. J. Med.* *365*, 395–409.



Table des illustrations

Figure 1 : l'anatomie du système respiratoire montrant la trachée, les deux poumons avec leurs lobes et voies aériennes.	21
Figure 2 : la répartition des altérations connues des conducteurs oncogéniques dans les ADCs pulmonaires avec des pourcentages estimés pour chaque mutation.	30
Figure 3 : les différentes sous-familles des RTKs.	35
Figure 4 : représentation schématique de l'architecture d'activation de l'EGFR.	36
Figure 5 : les voies de signalisation de l'EGFR.	39
Figure 6 : le réseau de signalisation nucléaire de l'EGFR.	42
Figure 7 : représentation schématique de la structure de l'EGFR. Le domaine tyrosine kinase est en vert.	45
Figure 8 : représentation schématique des principaux domaines de la clathrine et du complexe AP-2.	47
Figure 9 : l'endocytose médiée par la clathrine.	48
Figure 10 : un modèle illustrant les événements requis pour le recrutement de l'EGFR dans des fosses enduites de clathrine.	50
Figure 11 : le tri d'un RTK au sein de la voie endocyttaire implique des protéines contenant un domaine d'interaction avec l'ubiquitine.	52
Figure 12 : l'itinéraire des récepteurs entrant dans la cellule par endocytose dépendante (récepteur bleu) ou indépendante (récepteur rouge) de la clathrine.	53
Figure 13 : les différentes destinations de l'EGFR en fonction des inducteurs de stress cellulaire.	56
Figure 14 : les 5 membres de la famille des récepteurs à domaine VPS10P.	60
Figure 15 : les sites actifs de tri dans la séquence de la sortiline.	62
Figure 16 : les différentes voies du trafic de la sortiline.	63
Figure 17 : (a) Représentation schématique de la structure de la sortiline. (b) Le modèle illustrant l'influence de l'exon 17b sur le métabolisme de la progranuline.	66
Figure 18 : le rôle de la sortiline dans la biogenèse des exosomes.	75
Figure 19 : l'extinction de la sortiline altère le trafic nucléaire de l'EGFR.	138





Annexes

Concours Ma Thèse en 180s (MT180s).....	181
---	-----



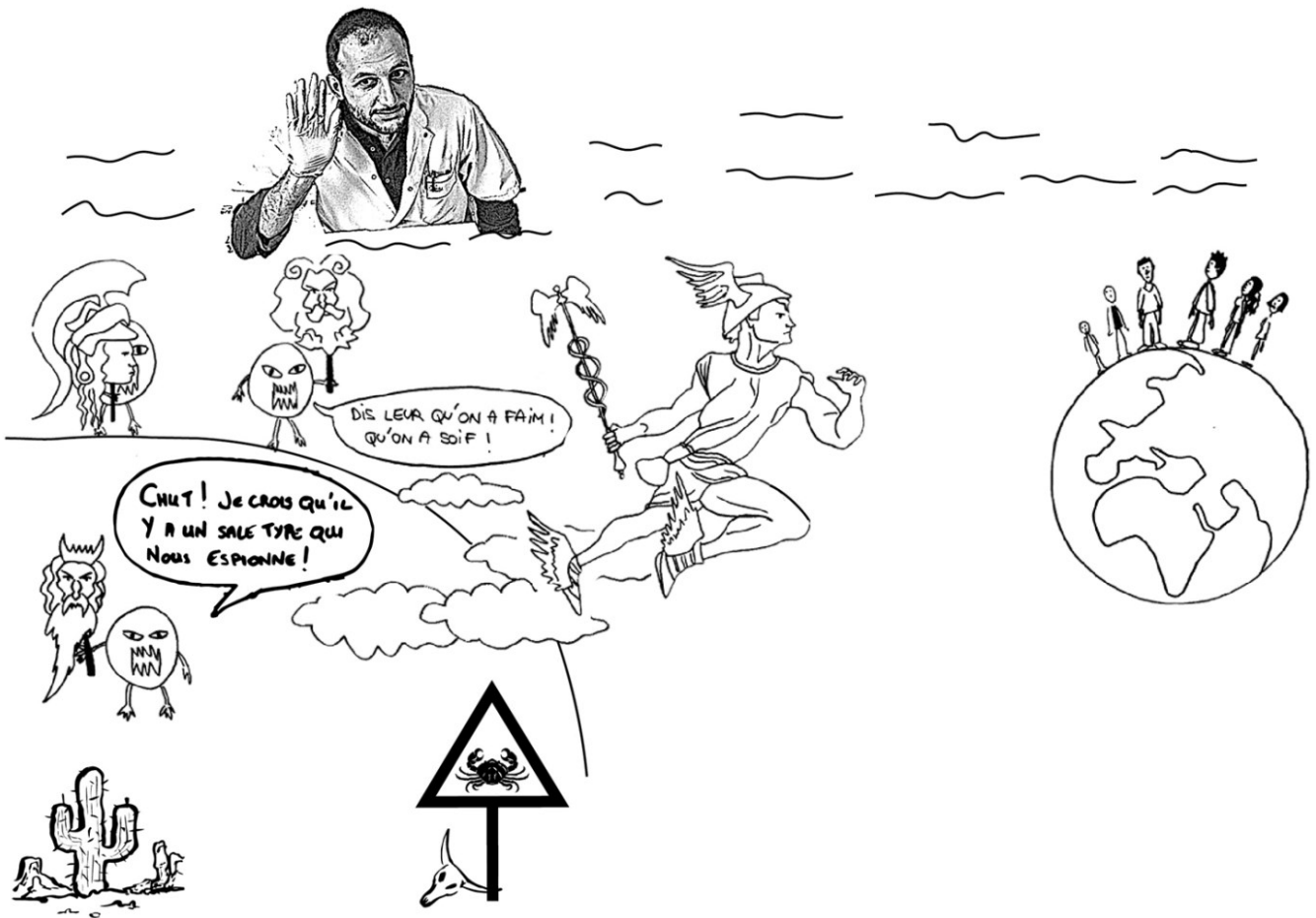
Concours Ma Thèse en 180s (MT180s)

- Lauréat au concours MT180s de l'Université de Limoges.
- Prix du public de la finale MT180s interuniversitaire au sein de l'Université Confédérale Léonard de Vinci (Universités de Limoges, Poitiers, La Rochelle, Orléans et Tours) le 26 Avril 2016.
- Lien pour accéder à la vidéo : <https://www.youtube.com/watch?v=GEcUY9rzm9o>
- Discours :

Dans la mythologie grecque, Hermès était le messager de l'aile-chaussé des Olympiens, c'est le fils bien-aimé de Zeus et de la nymphe, Maia. Il a été commis à de nombreuses responsabilités confiées par Zeus, le plus important était de servir de lien entre les deux mondes, prendre des messages aux dieux pour l'humanité. En appliquant la sagesse de la philosophie antique à la recherche biomédicale moderne, on remarque une véritable ressemblance entre la façon dont les deux mondes, l'humanité et les dieux, ont co-évolué et les moyens du développement de la tumeur: c'est la communication par des messagers, appelés exosomes ou oncosomes qui pendant des années étaient inconnues des scientifiques.

En effet, la tumeur naît et croît dans un environnement qui lui est hostile où les cellules immunitaires, ces gendarmes cellulaires, traquent les cellules à l'intégrité compromise. Pour se nourrir et respirer, cette tumeur utilise des serviteurs, les vaisseaux sanguins. Hélas, la malice d'une cellule cancéreuse dépasse un simple désir d'exister et de se nourrir, bien au contraire, à envahir, conquérir, réduisant les chances de guérison. Face à un tel constat, il devient indispensable que notre catapulte de médicament puisse bombarder cette place forte, atteindre le cœur de la tumeur de manière rapide et efficace. Notre adversaire est le cancer du poumon, nous essayons de le comprendre à travers ses messagers, émanant de la tumeur et circulant dans le sang du patient. Ces messagers ressemblent à des astres 10000 fois plus petits qu'un millimètre. L'identité de leur ensemble est loin d'être connue, pour nous, ils représentent un reflet de la tumeur expéditrice, il faut les espionner, se glisser dans leurs valises et percer leur mystère. D'une manière intéressante, nous avons dévoilé l'identité d'un messager au dessein sombre, qui une fois libéré par la tumeur, répand sa volonté et impose la construction de plus de vaisseaux sanguins, soit plus de nutriments, plus d'oxygène pour alimenter la déesse tumorale. En décryptant les messages transportés, je pourrais déterminer les désirs de la déesse, anticiper sa stratégie offensive et envahissante, étouffer ses « messagers-obscurs » avant même leur naissance. Dans le but de la démunir de tout outil de lutte contre les médicaments anticancéreux. Le but ultime serait de semer le doute entre la tumeur et son environnement, et pourquoi ne pas fabriquer et injecter dans le sang du patient des messagers curatifs qui pourraient retourner la force de la déesse contre elle-même?





Une représentation vulgarisée du rôle des microvésicules circulantes dans la communication entre la cellule tumorale et son microenvironnement, ainsi que de la contribution de la recherche biomédicale moderne dans l'identification de nouvelles cibles thérapeutique. Dessin réalisé par Anaïs Himeur (page FaceBook : @anaistaoshimeur), Amandine Magnaudeix, Hussein Al Akhrass et Thomas Naves.



Un rôle inédit de la sortiline dans le contrôle du transport rétrograde de l'EGFR pour limiter la croissance tumorale

Le cancer du poumon est le troisième cancer le plus fréquent chez les femmes et le deuxième chez les hommes, il est la cause principale de décès par cancer dans le monde, avec une mortalité annuelle supérieure à 1 million. Malgré des progrès remarquables dans la thérapie ciblée, la majorité des patients atteints de cancer du poumon sont diagnostiqués dans un stade avancé où ils ne connaissent pas d'amélioration significative de leur survie globale. Les récepteurs à domaine tyrosine kinase, tels que le récepteur du facteur de croissance épidermique (EGFR), traduisent les informations du microenvironnement dans la cellule en activant des voies de signalisation homéostatiques. L'internalisation et la dégradation de l'EGFR suite à la liaison du ligand limitent l'intensité de la signalisation proliférative, ce qui contribue à maintenir l'intégrité cellulaire. Dans les cellules cancéreuses, la dérégulation du trafic de l'EGFR aboutit à des effets divers sur la progression tumorale. Dans cette étude, nous avons identifié la sortiline comme un régulateur clé de l'internalisation de l'EGFR à partir de la membrane plasmique. La perte de l'expression de la sortiline dans les cellules tumorales augmente la prolifération cellulaire en soutenant la signalisation de l'EGFR à la surface de la cellule, ce qui accélère la croissance tumorale. Chez les patients atteints de cancer du poumon, l'expression de la sortiline diminue avec l'augmentation du grade pathologique et l'expression de son gène, *SORT1*, est fortement corrélée à une meilleure survie globale, en particulier chez les patients présentant une forte expression de l'EGFR. Ainsi, la sortiline représente un nouveau régulateur du trafic intracellulaire de l'EGFR, elle agit en contrôlant l'internalisation de ce récepteur et en limitant la croissance tumorale.

Mots-clés : Cancer, Signalisation, EGFR, Sortiline.

A new role of sortilin in the control of EGFR retrograde trafficking to limit tumour growth.

Lung cancer is the third most common cancer in women and the second in men, it is the leading cause of cancer-related death worldwide, with an annual mortality of more than 1 million. Despite remarkable advances in targeted therapy, the majority of patients with lung cancer are diagnosed at an advanced stage where they do not experience a significant improvement in overall survival. Tyrosine kinase receptors such as the epidermal growth factor receptor (EGFR) transduce information from the microenvironment into the cell and activate homeostatic signalling pathways. Internalisation and degradation of EGFR after ligand binding limits the intensity of its proliferative signalling, thereby helping to maintain cell integrity. In cancer cells, deregulation of EGFR trafficking has a variety of effects on tumour progression. Here, we report that sortilin is a key regulator of EGFR internalisation. Loss of sortilin in tumour cells promotes cell proliferation by sustaining EGFR signalling at the cell surface, ultimately accelerating tumour growth. In lung cancer patients, sortilin expression decreases with increased pathologic grade, and the expression of *SORT1* (the gene encoding sortilin) is strongly correlated with a better survival, notably in patients with high *EGFR* expression. Thus, sortilin is a novel regulator of EGFR intracellular trafficking acting by controlling receptor internalisation and limiting tumour growth.

Keywords: Cancer, Signalling, EGFR, Sortiline.