

**UNIVERSITE TOULOUSE III PAUL SABATIER
FACULTE DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES**

ANNEE : 2013

THESES 2013 TOU3 2080

THESE

POUR LE DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

Présentée et soutenue publiquement
par

DELMAS Audrey

Implication de la voie de signalisation c-Jun/RhoB/AKT dans la
résistance des cellules de mélanome au Vemurafenib

28 Octobre 2013

Directeur de thèse : Professeur FAVRE Gilles

JURY

Président :	Professeur FAVRE Gilles
1 ^{er} assesseur :	Docteur CORRE Jill
2 ^{ème} assesseur :	Docteur GUILBAUD Nicolas
3 ^{ème} assesseur :	Professeur BROUILLET Jean-Paul
4 ^{ème} assesseur :	Docteur PRADINES Anne

*« Ne juge pas chaque jour à la récolte que tu fais
mais aux graines que tu sèmes. »*

Robert Louis Stevenson

A ma cousine regrettée, Chantal,

Que ta joie et ta force de vivre continuent de me guider.

REMERCIEMENTS

Aux membres du jury

Aux Docteurs Corre et Guilbaud, au Professeur Brouillet, je vous remercie de m'avoir fait l'honneur d'accepter de participer à ce jury de thèse, merci pour le temps que vous avez consacré à la lecture de ce manuscrit, merci pour votre présence.

A mes directeurs de thèse

Gilles, je vous remercie de m'avoir donné l'opportunité de réaliser ma thèse et mon internat de pharmacie dans votre laboratoire. Je vous remercie très sincèrement de m'avoir permis de participer à des collaborations et d'encadrer des étudiants. J'ai énormément appris au cours de ces 5 dernières années tant que le plan professionnel qu'humain. Merci pour votre confiance, pour l'autonomie que vous m'avez donné.

Anne, je n'ai pas assez de mots pour exprimer ici toute ma gratitude, je resterai donc synthétique. Durant ces 5 années, tu m'as beaucoup apporté tant pour la science que dans mes interrogations sur l'avenir, tu as toujours été disponible, tu m'as toujours soutenu et poussée vers l'avant dans les moments de doutes. Merci pour ta présence et tes conseils éclairés.

Aux membres de l'équipe Favre

Aux personnes qui ont participé à ce travail

Julia, ma binôme de folie, merci pour tout, tes conseils, nos coups de gueule, nos fous rire. Je te souhaite tout plein de bonheur et de réussite pour la suite. Félicitation à toi et Pierre.

Claire, merci pour les manip à 4 mains, merci pour ton soutien technique et moral.

Magdalena, je m'excuse les débuts un peu froids. Merci pour ton aide tu as vraiment très bien et beaucoup bossé. Je te souhaite beaucoup de réussite et de courage pour la suite.

Je remercie également Anne-Laure pour le FACS, Anne C. pour les qPCR et Magali pour les séquençages.

Olivier S., je te remercie pour la relecture de l'article, tes remarques et tes conseils.

Nicolas M., merci pour nos discussions, pour la relecture de ce manuscrit et tes blagues.

A Isabelle

Je te remercie pour ton soutien, tes conseils, nos discussions nocturnes et le weekend à refaire le monde en général et le labo en particulier. Merci pour la confiance et la liberté que tu m'as données en enseignement. Tu as inspiré tant d'étudiants, je rêve encore de pouvoir un jour suivre ton exemple.

A mes colocataires de bureau, compagnons de soirée et de délires présents et passés

Remi, Nico B., Olivier C., Laura K., Emilie, Valérie, Alexis, Claire M.D., Faten, Christine, Iotefa, merci pour votre bonne humeur, nos discussions, vos blagues, vous allez me manquer, travailler sans vous sera difficile. Merci aussi pour les soirées, les sorties skis, paint-ball,...J'espère qu'il y aura encore beaucoup de soirées.

Merci également à tous les stagiaires qui ont contribué à la bonne ambiance quotidienne.

A tous ceux que je n'ai pas cités

Je remercie tous les membres présents et passés de l'équipe Favre, travailler avec vous fut un plaisir.

Joce, Lourdes, Marie-Ange et Jeanine

Merci pour votre gentillesse, votre disponibilité, votre aide.

Aux autres équipes de l'ICR,

Merci aux membres des équipes Radiobio, Poirot, Vagner et Radiobio que j'ai eu l'occasion de rencontrer en particulier en culture.

Merci en particulier à Maud, Mika et Philou pour leur bonne humeur.

Merci à Aurélie pour la démonstration de gavage de souris.

A Grégory Segala, « merci » pour m'avoir poussé chaque vendredi soir à voir calmement la réalité en face : « non je n'ai pas encore de papiers en premier auteur ».

Merci à Benoit pour nos échanges de bons procédés.

Merci à Sandra et Adrien pour votre gentillesse, les soirées, les weekends suisses, etc...

A mes amis

A mes amis de l'ENS,

Lily tu es la première à m'avoir parlé « salut, moi c'est Aurélie, et toi ? », 8 ans plus tard tu es toujours là pour moi, pour me dire que je fais des bêtises, me soutenir, me ramasser à la petite cuillère. Merci pour tout, je te souhaite tout plein de réussite pour ton American Dream, promis je viendrai te voir.

Claire et Vich, Félicitation, votre petit bout est vraiment trop chou. Je vous souhaite tout plein de bonheur et de réussite à tous les 3. Peut-être que je peux me reconvertir et monter une agence matrimoniale ?

A Fayçal, même si nos chemins se sont séparés depuis, je te remercie pour ton soutien et ton amour tout au long de ces 4 ans, sans toi cette thèse ne serait sûrement pas arrivée à son terme.

Aux copinous de St Sernin,

Arnaud, Cath, Eric, Ghis, Lionnel, Manue, Nath, Noémie, Manue, Tristan, c'était quand même bien le lycée, l'insouciance !!! Merci pour ces 15 ans d'amitiés.

A mes camarades de pharmacie,

Bibi, Arnaud, Julien, Carole, même si l'on ne se voit plus, je vous remercie d'avoir rendues mes années de pharma à Toulouse moins ennuyeuses.

A mes co-internes de l'IFB, merci pour l'entraide et les arrangements de gardes

A ma famille

Merci à mes parents, pour leur amour, pour m'avoir donné le goût du travail, l'envie de me dépasser, je sais que vous me soutiendrez toujours. Je vous aime.

Aurélie, ma cousine, ma compagne de jeu, mon amie, merci pour tout, j'espère qu'on arrivera maintenant à se voir plus souvent. Je vous souhaite à toi et Loïc tout plein de bonheur et de réussite.

Merci à toute ma famille et en particulier à Tatie Régine, Tonton Hubert, Tonton Daniel, Mamie Aurore, pour m'avoir aidé à grandir, accompagné dans la vie, fait découvrir les joies de la vie, le sens du mot famille. Merci pour votre amour.

Alison, le courage avec lequel tu traverses les accidents de la vie est un exemple pour moi. J'ai toujours essayé de faire mon possible pour t'aider, te soutenir, te montrer la direction à prendre, remplir mon rôle de Marraine de mon mieux. Je t'aime, crois en toi et donne-toi les moyens de tes ambitions.

Table des matières

REMERCIEMENTS	3
Table des matières	6
Table des abbréviations	9
Revue Bibliographique	10
I - Le mélanome cutané.....	11
A - Physiopathologie	11
1 – La peau	11
2 – Histoire naturelle du développement des mélanomes	12
3 - Formes Anato-mo-cliniques	13
a - Le mélanome à extension superficielle.....	13
b - le mélanome nodulaire.....	14
c - Le mélanome de Dubreuilh	14
d - Le mélanome acrolentigineux.....	15
e - Les mélanomes muqueux	15
f - Les mélanomes uvéaux.....	15
4 - Epidémiologie.....	16
5 - Facteurs de risque	17
a - Les facteurs extrinsèques.....	17
b - Les facteurs intrinsèques	18
B - Carcinogénèse : gènes et voies de signalisation impliqués dans la mélanomagenèse	19
1 - Généralités	19
2 – La voie MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinase)	19
3 - Activation de la voie PI3K/AKT	19
a - Présentation de la voie PI3K/AKT.....	19
b - Perte de PTEN	20
c - Activation d'AKT3	22
4 - Inactivation des voies p16 ^{INK4A} /CDK4/CD1/Rb et/ou p14 ^{ARF} /p53	23
a - Le locus <i>CDKN2A</i>	23
b - Implication de la voie p16 ^{INK4A} /CDK4/CD1/Rb	24
c - La voie p14 ^{ARF} /HDM2/p53	26
5 - Les voies spécifiques de contrôle de la différenciation, de la prolifération et de la survie des cellules mélanocytaires	26
a – MITF.....	26
b - MC1R.....	29
6 - Conclusions et réflexions sur la carcinogénèse du mélanome.....	30
7 - Implication du micro-environnement dans la mélanomagenèse	31
C- Prise en charge	32
1 – Diagnostic	32
a - Suspicion clinique de mélanome.....	32
b - Diagnostic anatomopathologique.....	34
c - Détermination du grade	35
d - Bilan d'extension.....	35
2 - Traitement.....	37
a - Chirurgie.....	37
b - Immunothérapie	38
c - Chimiothérapie.....	40
d - Radiothérapie	42
e - Thérapies ciblées.....	42

3 - Prévention et dépistage	44
a - Prévention.....	44
b - Dépistage	44
II - La voie Ras/Raf/MEK/ERK, cible thérapeutique majeure dans les mélanomes	46
A - La voie Ras/Raf/MEK/ERK.....	46
1 - Généralités sur les voies MAP Kinases	46
a - ERK1/2.....	46
b - JNK1/2/3	46
c - p38.....	47
d - ERK5	47
e - Les MAPKs atypiques : ERK3, ERK4, ERK7 et NLK.....	47
2 - Présentation des différents membres de la voie Ras/Raf/MEK/ERK	47
a - Ras	47
b - Raf	48
c - MEK1/2	49
d - ERK1/2.....	50
3 - La transduction du signal via Ras/Raf/MEK/ERK	50
a - RTK => Ras	50
b - Ras => Raf.....	51
c - Raf => MEK1/2.....	52
d - MEK => ERK	53
e - Retour à l'état inactif : le rétrocontrôle négatif.....	53
f - Mécanismes physiologiquement contrôlés par la voie MAPK	54
B - La voie MAPK, "driver" de la mélanomagenèse	55
1 - Rôle de la voie MAPK dans la carcinogenèse	55
2 - Mutations activant la voie MAPK dans les mélanomes	58
a - B-Raf et N-Ras, oncogènes clés des mélanomes cutanés SSM et NM.....	58
c - KIT	61
d - GNAQ et GNA11	62
3 - Intérêt du ciblage de la voie MAPK	63
a - Preuve de concept	63
b - Les premiers écueils.....	64
C - Le Vemurafenib	65
1 - Conception	65
2 - Développement préclinique	66
a - Caractérisation <i>in vitro</i> et <i>in cellulo</i>	66
b - Etudes <i>in vivo</i>	67
c - Vemurafenib et immunité anti-tumorale	68
3 - Essais cliniques	68
4 - Résistance.....	72
a - Altérations activant des RTKs.....	73
b - Activation de Ras	75
c - Altérations touchant les protéines Raf.....	76
d - Activation de MEK indépendamment de B-Raf	77
e - La voie PI3K/AKT et PTEN.....	78
f - La voie Cycline D ₁ /RB	79
g - FOXD3, modèle de la résistance adaptative.....	79
h - Bilan concernant les mécanismes de résistance.....	80
5 - Autres inhibiteurs de la voie MAPK ayant obtenu une AMM ou en cours d'évaluation clinique	81
a - Autre Inhibiteur de B-Raf ^{V600E} : le GSK2118436 / Dabrafenib	81
b - Inhibiteurs pan Raf.....	82
c - Inhibiteurs de MEK	82
d - Inhibiteurs d'ERK1/2	85
e - Les inhibiteurs de KIT	85
6 - Intérêts de combinaisons thérapeutiques incluant un inhibiteur de la voie MAPK.....	85
a - Inhibiteurs de B-Raf et de MEK	86

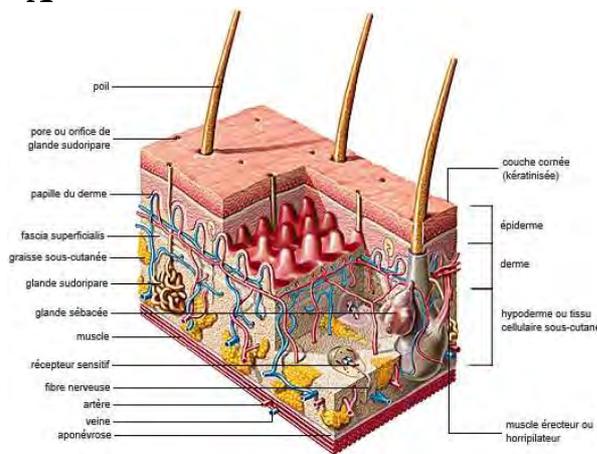
b - Vemurafenib et Ipilimumab	87
c – Co-inhibition des voies MAPK et PI3K/AKT	87
d - Autres combinaisons thérapeutiques	88
D - Mélanome / MAPK / Vemurafenib, Bilan	88
III - RhoB, une RhoGTPase atypique impliquée dans la résistance thérapeutique à l'apoptose	90
A – La famille des RhoGTPases	90
1 - Généralités	90
2 - Implication dans la mélanomagenèse	92
a – RhoC	92
b - Rac-1	92
c - RhoJ	94
d - Rnd3/RhoE	94
e – RhoA	95
B - La GTPase RhoB	95
1 – Généralités	95
2 – Régulation	96
a – Activité transcriptionnelle du promoteur	96
b - Stabilité de l'ARNm	99
c – Les miARN	100
d - Stabilité de la protéine	101
e – Modification post-traductionnelle	101
f - Activité de la protéine	102
3 - Signalisation et rôles cellulaires de RhoB	103
a - Les effecteurs	103
b - Fonctions cellulaires	103
4 - Oncogenèse:	105
a - Expression dans les tumeurs	105
b – Mécanismes conduisant à l'oncogenèse	106
C – RhoB, acteur majeur de la réponse aux thérapies anti-cancéreuses	108
1 - Implication de RhoB dans le contrôle de la balance apoptose / survie	108
2 - Voie de signalisation contrôlant la balance apoptose/survie en aval de RhoB	109
a - La voie Akt	109
b – La voie NF- κ B	110
c - La voie JNK	111
d - La Cyclin B ₁	111
3 - Réponse aux thérapies ciblées	112
Résultats	113
Introduction	114
Article en préparation	116
Résultats complémentaires	160
Discussion	173
Conclusions & Perspectives	180
Bibliographie	182

Table des abréviations

5-FU : 5- Fluoro-Uracile	miARN : microARN
α -MSH : Melanocytes Stimulating Hormone	MC1R : MelanoCortin 1 Récepteur
AMM : Autorisation de Mise sur le Marché	MEF : Fibroblastes embryonnaires murins
ADN : Acide Désoxy-riboNucléique	MITF : Microphtalmia-associated Transcription Factor
ARN : Acide Ribo-Nucléique	NF- κ B : Nuclear Factor-Kappa B
ARNi : ARN interférent	NM : Nodular Melanoma
ATU : Autorisations Temporaires d'Utilisation	PARP : Poly (ADP-ribose) polymerase
CREB : cAMP Response Element-Binding protein	PDGFR : Platelet Derived Growth Factor Receptor
CDK : Cyclin Dependant Kinase	PDK1 : Phosphoinositide-Dependent protein Kinase 1
CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité	PI3K : Phosphatidyl-Inositol-3 Kinase
CTLA4 : Cytotoxic T Lymphocyte Antigene 4	PIP ₂ : Phospho-Inositide-4,5-biPhosphate
EGF : Epidermal Growth Factor	PIP ₃ : Phospho-Inositide-3,4,5-triPhosphate
EGFR : Récepteur à l'EGF	PKB : Protein Kinase B, AKT
EMT : Epithelio-Mesenchymal Transition	PTEN : Phosphatase TENSin homologue
ERK : Extracellular signal-Regulated Kinase	RCPG : Récepteur Couplé aux Protéines G
GAP : GTPase-Activating Protein	RGP : Radial Growth Phase, Mélanome à extension radiale
GDI : Guanine nucleotide Dissociation Inhibitor	RTK : Récepteur à Tyrosine Kinase
GEF : Guanine nucléotide Exchange Factor	SCF : Stem-Cell Factor
GIST : Gastro Intestinale Stromal Tumor	shARN : Short-Hairpin ARN
HDAC : Histone DeACétylase	SSM : Superficial Spreading Melanoma
IC50 : Concentration Inhibitrice 50%	SNP : Single Nucléotide Polymorphism
IFN : InterFéron	SOS : Son of Sevenless
IGF-1R : Insuline-like Growth Factor-1 Receptor	TGF : Tumor Growth Factor
IL-2 : Interleukine 2	VEGF : Vascular Growth Factor
JNK : Jun N-terminal Kinase	UTR : UnTranslated Region
KSR : Kinase Suppressor of Ras	UV : rayons Ultra-Violets
MAPK : Mitogen-Activated Protein Kinase, désigne la voie canonique Ras/Raf/MEK/ERK	VGP : Vertical Growth Phase
MAPKK: MAPK Kinase	
MAPKKK: MAPKK Kinase	
MAPKKKK: MAPKKK Kinase	
MAPKAPK: MAPK Activated Protein Kinase	

Revue Bibliographique

A



B

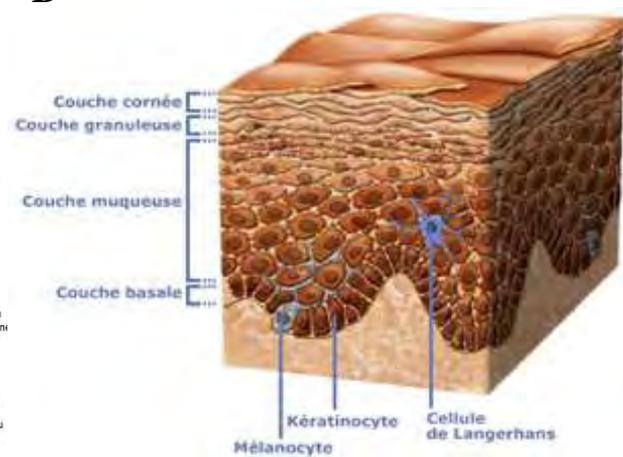


Figure 1 : Représentation schématique de la structure de la peau

A : Structure de la peau

(Dessin François Poulain – Archives Larousse)

B : Structure de l'épiderme

(<http://anatomieludique.unblog.fr/la-peau/>)

I - Le mélanome cutané

Le mélanome est une tumeur cutanée maligne relativement rare (moins de 5% de l'ensemble des tumeurs cutanées) mais particulièrement agressive puisqu'elle est responsable de la majorité des décès liés aux cancers de la peau (Chen *et al.*, 2013; Rogers *et al.*, 2010). Cette agressivité est en particulier liée aux capacités métastatiques des mélanomes comparativement aux autres tumeurs cutanées.

C'est cette agressivité tumorale particulièrement marquée, son épidémiologie en progression constante dans des populations jeunes et les difficultés de prise en charge thérapeutique des formes métastatiques qui font considérer le mélanome comme un véritable problème de santé publique dans les pays occidentaux.

A - Physiopathologie

1 – La peau

La peau est l'organe de revêtement des vertébrés impliqué dans la protection de l'organisme contre le milieu extérieur, le maintien de la température corporelle, le toucher, l'immunité et diverses fonctions métaboliques comme la synthèse de la vitamine D. La peau est composée de 3 couches : le derme, l'épiderme et l'hypoderme (Figure 1A). Le derme est un tissu conjonctif synthétisé par les fibroblastes. Il contient de nombreux vaisseaux sanguins et lymphatiques, des nerfs et des terminaisons nerveuses sensibles. Il assure les fonctions mécaniques visco-élastiques de résistance et de soutien de l'épiderme et assure sa nutrition par diffusion. L'épiderme est séparé du derme par la membrane basale. C'est un épithélium pavimenteux stratifié kératinisé composé de 4 types cellulaires : les keratinocytes, les mélanocytes, les cellules de Merkel et les cellules de Langherhans (Figure 1B)(Mélissopoulos and Levacher, 1998).

- **Les kératinocytes** sont des cellules épithéliales synthétisant la kératine, ce sont les cellules majoritaires de l'épiderme. Ils subissent en permanence une maturation caractérisée par une évolution morphologique témoignant de leur kératinisation et assurant le rôle de barrière protectrice (mécanique et chimique) de l'épiderme. Cette évolution se fait de la profondeur vers la surface et permet de distinguer sur une coupe d'épiderme quatre couches superposées : la couche germinative (ou basale), la couche à épines (ou spinieuse), la couche granuleuse et la couche cornée (compacte, puis desquamante).

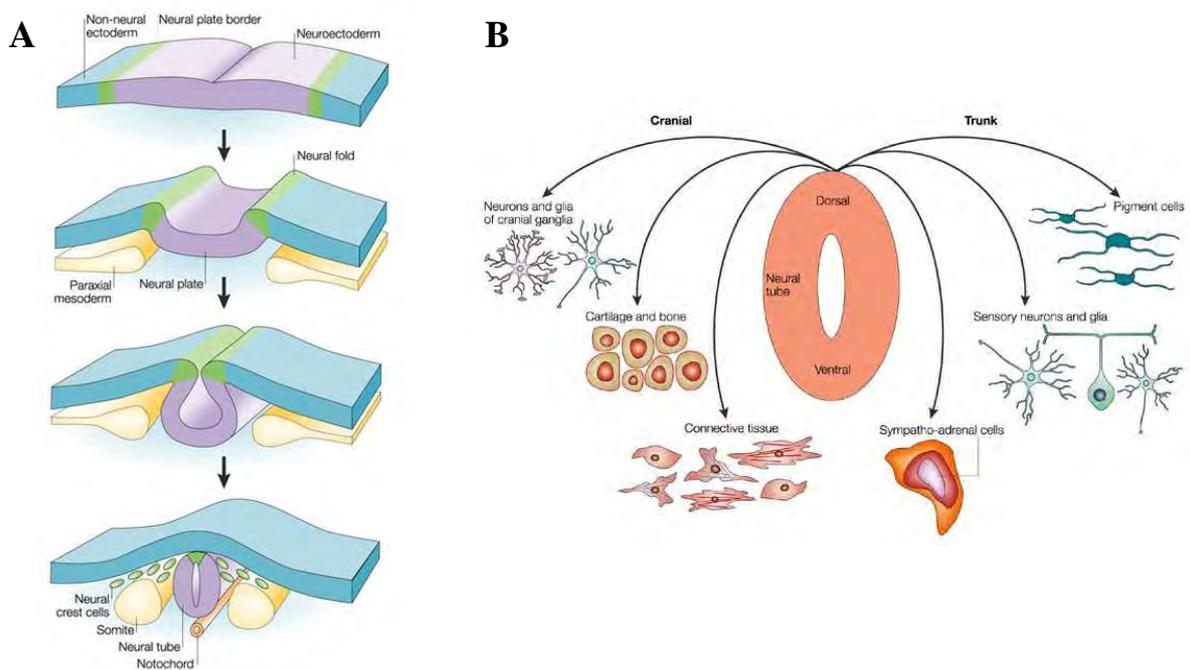


Figure 2 : Origine des mélanocytes

A : Origine des cellules de la crête neurale: Durant le neurulation, la plaque neurale (en violet) s’invagine, laissant se former de part et d’autres les crêtes neurales (en vert). Les crêtes fusionnent et le tube neural se sépare de l’ectoderme. Les cellules des crêtes neurales délaminent alors depuis la face dorsale du tube neural et migrent au sein de l’embryon.

(D’après Gammill, 2003)

B: Les différents types cellulaires dérivant des cellules des crêtes neurales

(D’après Mason, 2007)

- **Les mélanocytes** sont les cellules responsables de la synthèse de la mélanine, le pigment assurant la pigmentation de la peau et des phanères. Ces cellules se situent dans la couche germinative de l'épiderme, elles sécrètent la mélanine sous forme de granules encapsulés appelés mélanosomes. Les mélanosomes sont transférés aux kératinocytes voisins dans un processus actif partiellement dépendant des rayonnements UV. On appelle unité épidermique de mélanisation l'ensemble constitué par un mélanocyte et quelques dizaines de kératinocytes qui en dépendent (en moyenne 1 mélanocyte pour 36 kératinocytes)(Hoath and Leahy, 2003). A la différence des kératinocytes qui sont des cellules épithéliales dérivant de l'ectoderme, les mélanocytes dérivent des cellules de la crête neurale. Au cours de l'embryogenèse, lors de la formation du tube neural qui deviendra le système nerveux central, les cellules des crêtes neurales s'isolent (Figure 2A), migrent dans différentes parties du corps et se différencient en différents types cellulaires tels que les mélanocytes, les cellules neuro-endocrines (cellules chromaffines de la médullo-surrénale, cellules parafolliculaires, cellules sécrétrices de calcitonine de la thyroïde) et les cellules du système nerveux central périphérique (neurones sensoriels et glie des ganglions sympathiques et parasympathiques, cellules des capsules frontières, cellules de Rohon-Beard, cellules de Merkel, cellules satellites des ganglions autonomes et sensitifs, cellules de Schwann des nerfs périphériques)(Figure 2B). De ce fait, ces cellules issues des crêtes neurales présentent des capacités migratoires remarquables ainsi qu'une grande diversité phénotypique puisqu'elles donnent naissance à de nombreux types cellulaires. L'origine embryonnaire des mélanocytes pourrait expliquer les capacités métastatiques spécifiques des mélanomes liées d'une part à des propriétés migratoires particulièrement importantes et d'autre part, à leur plasticité, ces cellules étant capables de s'établir dans différents organes au cours du processus métastatique.

- **Les cellules de Langerhans** sont des cellules dendritiques dérivant des cellules souches hématopoïétiques de la moelle osseuse et sont présentes dans tous les épithéliums pavimenteux stratifiés des mammifères. Ces cellules sont situées au niveau de couche suprabasale entre les kératinocytes avec un rapport aux alentours de 1 cellule de Langerhans pour 53 kératinocytes (Hoath and Leahy, 2003). Les cellules de Langerhans initient et propagent les réponses immunes dirigées contre les antigènes appliqués sur la peau.

- **Les cellules de Merkel** seraient impliquées dans la mécano-réception. Elles sont retrouvées de façon dispersée dans la couche germinative entre les kératinocytes basaux au contact d'une terminaison nerveuse libre.

2 – Histoire naturelle du développement des mélanomes

Les mélanomes se développent à partir des mélanocytes sous dépendance des UV. Ils apparaissent au niveau de la jonction derme-épiderme de la peau. Ils peuvent apparaître *de novo* (70

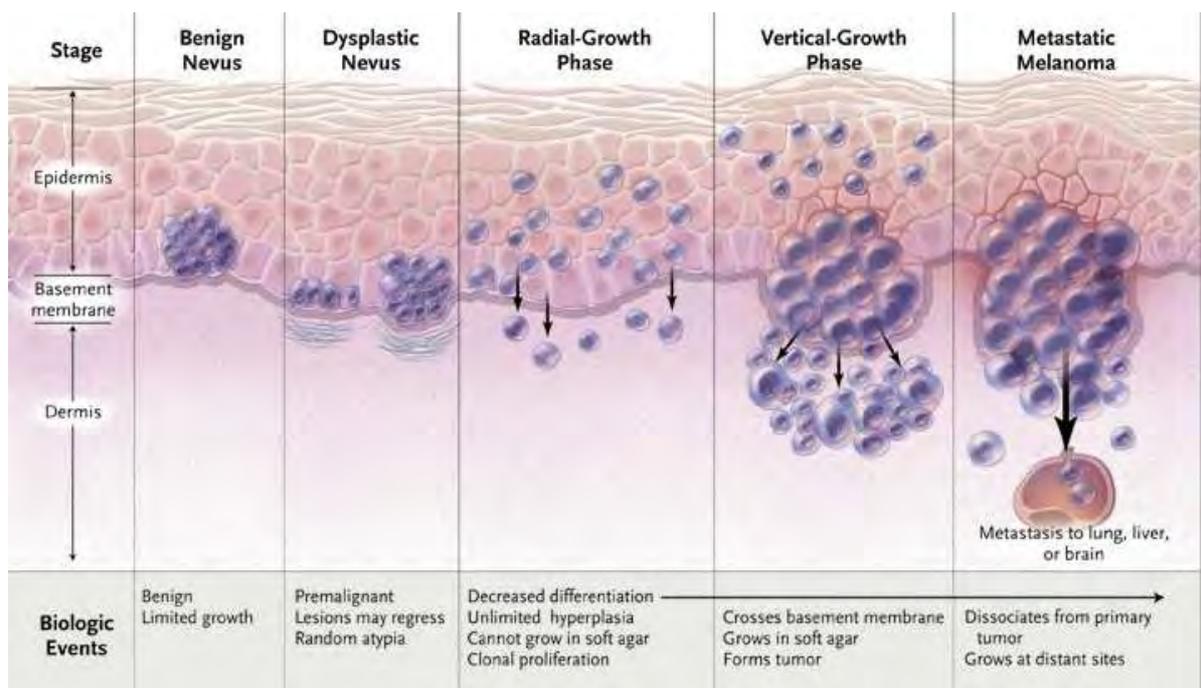


Figure 3 : Schéma de progression du mélanome selon le modèle de Clark

(Adapté de Miller, 2006)

à 80% des cas) ou à partir d'un nævus préexistant (Clark *et al.*, 1984). Les nævus, couramment appelés « grains de beauté » sont des tumeurs bénignes de la peau développées aux dépens des mélanocytes. La progression du mélanome se fait généralement en 3 stades décrits par le modèle de Clark (Figure 3) (Clark *et al.*, 1969; Miller and Mihm Jr, 2006) :

- Au cours du premier stade les cellules de mélanome présentent une prolifération anarchique mais elles sont incapables de traverser la jonction dermo-épidermique et de survivre dans le derme à distance des kératinocytes. A ce stade le mélanome reste donc localisé dans l'épiderme. Il peut uniquement s'étendre de manière latérale au sein même de l'épiderme. Ce stade est appelé mélanome à extension radiale ou RGP (Radial Growth Phase) et pourrait durer de 1 à 5 ans (Ibrahim and Haluska, 2009). L'exérèse d'un tel mélanome prévient toute évolution de la maladie et assure une guérison complète de la tumeur sans risque de récurrence métastatique de la maladie (voir partie II-C-2-a-i).

- A un stade de plus avancé, les cellules de mélanome deviennent plus agressives : elles sont capables de traverser la membrane basale, de quitter l'épiderme, de survivre dans le derme et de le coloniser. Le mélanome s'étend dès lors verticalement et envahit les tissus sous-jacents, ce stade de la maladie est appelée mélanome à croissance verticale ou VGP (Vertical Growth Phase). A cette étape du développement tumoral, l'évaluation du pronostic et du risque de récurrence se complexifie car la tumeur acquiert un potentiel de dissémination métastatique. Les bilans d'extension par imagerie médicale ne permettent pas toujours de dépister les micro-métastases qui peuvent être déjà présentes. Afin de mieux différencier ce stade du suivant, depuis plusieurs années est évalué l'intérêt de la technique de ganglions sentinelle dont nous reparlerons plus tard (partie I-A-C-1-d-ii).

- Les cellules de mélanome deviennent ensuite métastatiques, disséminent depuis le derme dans l'organisme par voie hématogène et/ou lymphatique et s'implantent à distance de la tumeur initiale. Après une première phase optionnelle pouvant associer des métastases loco-régionales cutanées et/ou dans les ganglions lymphatiques, les patients développent des métastases à distance cutanées et viscérales affectant par ordre de fréquence les poumons, le cerveau et le foie (Nguyen *et al.*, 2009).

3 - Formes Anatomo-cliniques

Six sous-types histologiques du mélanome ont été décrits (Figure 4)(Porras and Cockerell, 1997; Scolyer *et al.*, 2011):

a - Le mélanome à extension superficielle

(en anglais SSM pour Superficial Spreading Melanoma) (Figure 4A)

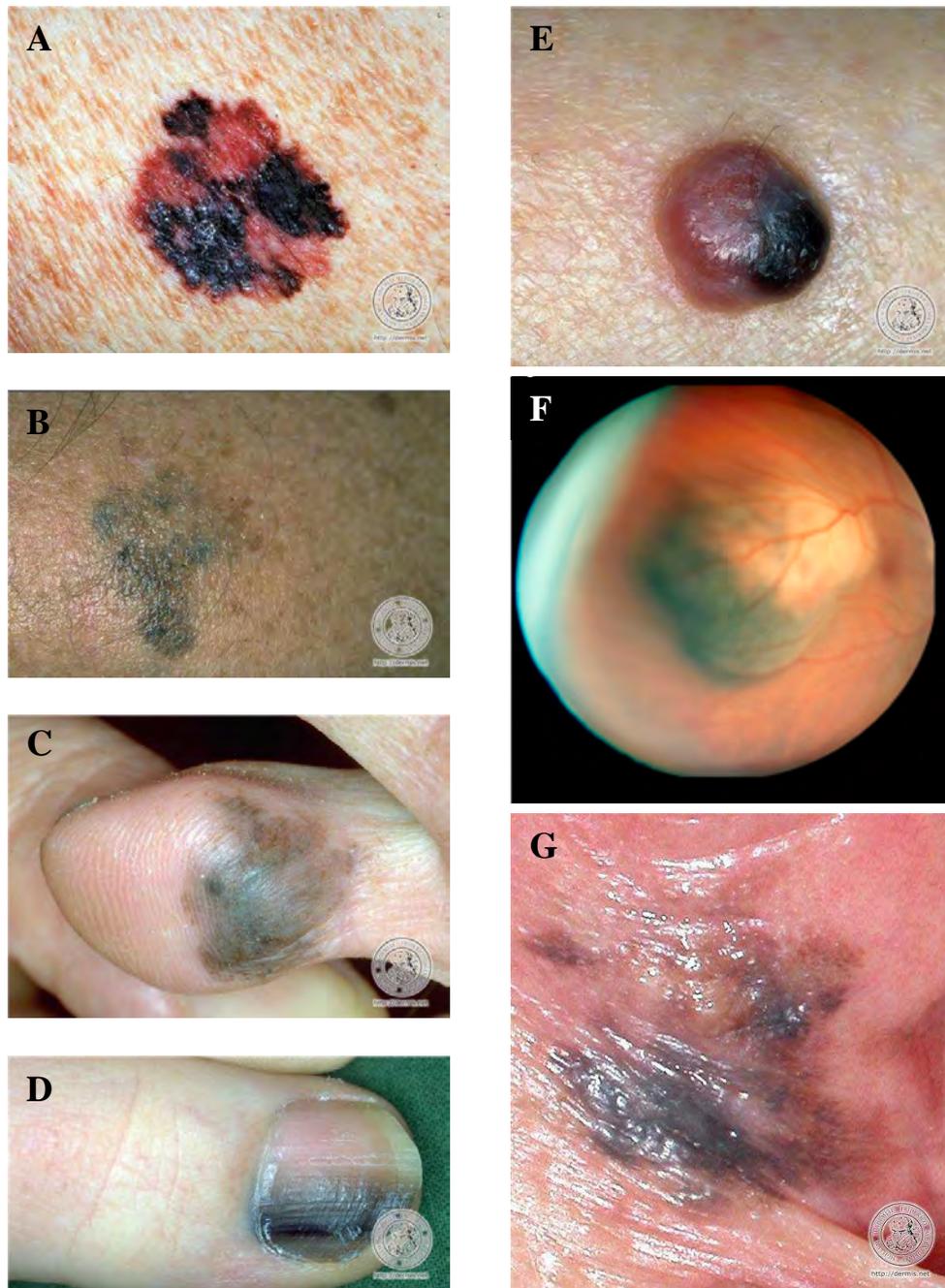


Figure 4 : Les différentes formes anatomo-cliniques des mélanomes cutanés

A : Mélanome à extension superficielle (SSM : Superficial Spreading Melanoma)

B : Mélanome de Dubreuilh (Lentigo Melanoma)

C : Mélanome acrolentigineux affectant la plante des pieds

D : Mélanome acrolentigineux affectant l'ongle

E : Mélanome nodulaire

F : Mélanome uvéal affectant la choroïde

G : Mélanome muqueux

(D'après www.dermis.net et Tsao, 2012)

Le mélanome à extension superficielle est la forme la plus fréquente de mélanome puisqu'il représente environ 70% des cas. Il se caractérise par une phase de croissance horizontale intra-épidermique (mélanome *in situ*) qui précède de plusieurs mois à plusieurs années une phase de croissance verticale, les cellules malignes franchissant dès lors la jonction dermo-épidermique. Pendant sa phase de croissance horizontale qui suit le modèle de Clark décrit ci-dessus, le mélanome présente l'aspect d'une lésion pigmentée à contours irréguliers polycycliques, de couleur inhomogène ou polychrome (noir, marron, rouge, achromique), de diamètre supérieur à 5 mm et dont l'aspect change dans le temps (évolutif). Ces critères définissent la règle ABCDE qui sert de base à l'évaluation clinique des lésions pigmentées pour le dépistage du mélanome (voir partie I-C-1-a-i).

b - Le mélanome nodulaire

(en anglais NM pour Nodular Melanoma) (Figure 4E)

Le mélanome nodulaire représente 15 à 30% des mélanomes (Ibrahim and Haluska, 2009), il se présente sous la forme d'un nodule généralement de couleur noire mais parfois achromique, ferme, arrondi, pouvant être ulcéré, suinter ou saigner. Sa croissance est très rapide (de quelques semaines à quelques mois) et d'emblée verticale. En conséquence, l'épaisseur tumorale (indice de Breslow) est souvent élevée (l'indice de Breslow est le principal critère pronostic du mélanome. Nous verrons sa définition et sa signification par la suite partie I-C-1-b-i).

c - Le mélanome de Dubreuilh

(en anglais LMM pour Lentigo Malignant Melanoma)(Figure 4B)

Le mélanome de Dubreuilh se développe au niveau des zones soumises à une photo-exposition chronique telles que la tête (et en particulier les joues) et le cou. La peau péri-tumorale est le siège d'une élastose solaire et l'épiderme est atrophique. L'âge moyen de diagnostic est beaucoup plus élevé que pour les autres formes de mélanome et se situe aux environs de 65 ans. La phase de croissance horizontale intra-épidermique dure plusieurs années avant que les cellules tumorales franchissent la jonction dermo-épidermique (phase d'envahissement vertical). Le mélanome de Dubreuilh se présente sous la forme d'une lésion pigmentée inhomogène allant du noir au marron foncé. En l'absence de traitement et après plusieurs années, le mélanome de Dubreuilh évolue vers une forme localement invasive. Bien que la phase initiale de développement intra-épidermique soit très lente, dès que le mélanome de Dubreuilh acquiert la capacité de franchir la jonction dermo-épidermique, son pronostic et son potentiel de progression dans l'organisme deviennent alors comparables aux autres mélanomes.

d - Le mélanome acrolentigineux

(en anglais ALM pour Acral Lentiginous Melanoma) (Figure 4C et D)

Le mélanome acrolentigineux ne représente que 5% des mélanomes de la population générale mais c'est la forme clinique majoritairement retrouvée chez les populations de phototype foncé (> 4) (Figure 6)(Ibrahim and Haluska, 2009). Dans sa phase initiale il se présente le plus souvent sous la forme d'une tache brune ou noire, aux contours irréguliers au niveau de la plante des mains ou des pieds. Le mélanome acrolentigineux peut également se localiser au niveau de la matrice de l'ongle ou sur la peau péri-unguéale, sur n'importe quel doigt ou orteil. Il a alors le plus souvent l'aspect d'une bande pigmentée longitudinale. Les signes cliniques évocateurs sont : une bande mélanique > 6 mm de large, un élargissement proximal, une irrégularité de la pigmentation, une extension péri-unguéale de la pigmentation (signe de Hutchinson).

e - Les mélanomes muqueux

(en anglais mucosal melanoma)(Figure 4G)

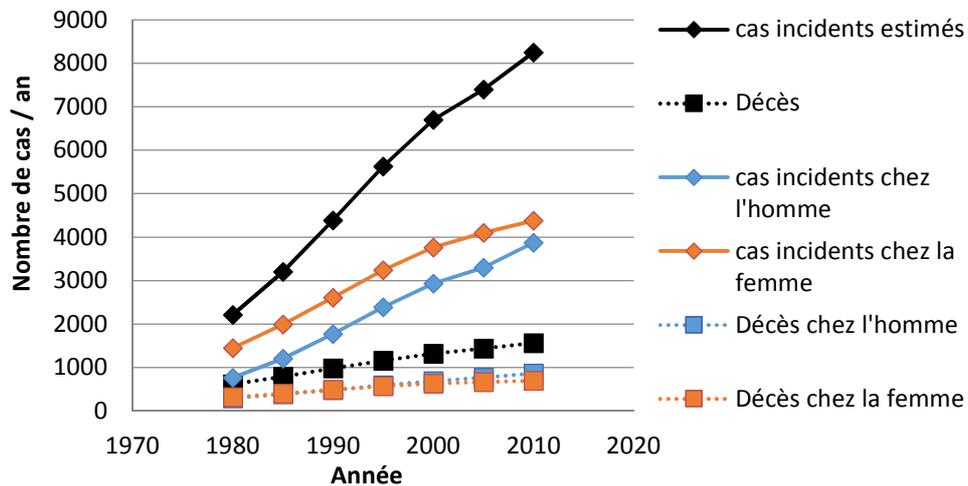
Les mélanomes muqueux sont des mélanomes rares puisqu'ils représentent moins de 5% de ces derniers. Ils peuvent toucher l'ensemble des muqueuses avec une prédilection pour la vulve, le vagin, la naso-pharynx et les sinus. Ils se présentent le plus souvent sous la forme d'une tache ou d'un nodule brun.

f - Les mélanomes uvéaux (en anglais uveal melanoma)(Figure 4F)

Ce sont des mélanomes localisés dans l'œil, ils peuvent affecter l'iris, le corps ciliaire ou la choroïde, cette dernière localisation étant la plus fréquente. Ils sont rares et ne représentent que 500 cas par an en France. Cependant il est à noter que cette forme est particulièrement agressive puisque plus de 50% des patients développent des métastases à distance, avec une prédilection particulière pour les localisations secondaires hépatiques (Jovanovic *et al.*, 2013).

Les mécanismes de carcinogenèse conduisant à ces différentes formes semblent très différents de même que leurs facteurs de risque et leur pronostic. En effet, alors que le mélanome de Dubreuilh survient dans un contexte d'exposition solaire chronique, les mélanomes à extension superficielle sont épidémiologiquement associés à des expositions solaires intermittentes intenses et en particulier aux coups de soleil. Au contraire les mélanomes acrolentigineux et muqueux ne sont pas liés à l'exposition

A



B

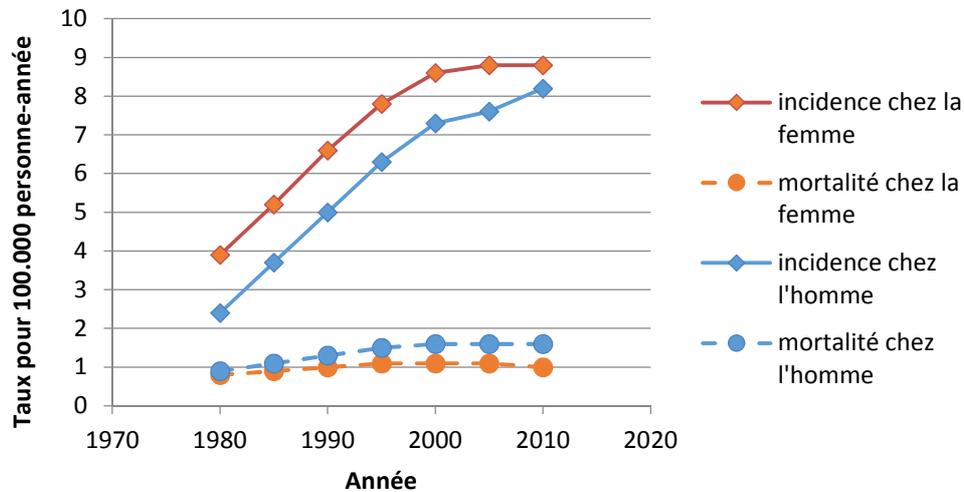


Figure 5 : Epidémiologie du mélanome en France entre 1980 et 2010

A : Evolution du nombre de nouveaux-cas et de décès.

B : Evolution de l'incidence et de la mortalité

(D'après les données Belot, 2008)

solaire. Concernant leur agressivité, les mêmes différences existent : les mélanomes nodulaires envahissent d'emblée le derme et sont à ce titre de très mauvais pronostic alors que les mélanomes de Dubreuilh mettent de nombreuses années à franchir la membrane basale. Par ailleurs, les oncogènes impliqués dans ces différentes formes sont différents : alors que les mutations de *BRAF* et de *NRAS* sont prédominantes dans les mélanomes à extension superficielle, celles de *KIT*, rarissimes dans ces dernières formes (<2%), sont majoritaires dans les mélanomes acrolentigineux.

Pour les raisons précédemment citées les différentes formes de mélanomes sont considérées comme des entités cliniques différentes. Par la suite nous nous intéresserons plus particulièrement aux mélanomes à extensions superficielles qui sont les plus fréquents.

4 - Epidémiologie

En 1995, la prévalence du mélanome - définie par le nombre de personnes atteintes d'une maladie à un temps « t » - était de 30,8 cas pour 100 000 personnes-année en France et était un des taux parmi les plus bas d'Europe d'après l'étude Europrevail (Micheli *et al.*, 2002). Par comparaison, la prévalence du mélanome en Suède et en Autriche était 4 à 5 fois plus élevée. Le classement des pays européen par ordre décroissant de prévalence était le suivant : Suède, Autriche, Suisse, Danemark, Finlande, Écosse, Pays-Bas, Islande, Allemagne, Angleterre, Italie, France et Espagne (HAS, 2006).

D'après les données recueillies sur la période 1980-2005 et publiées en 2008, l'incidence - définie par le nombre de nouveaux cas d'une maladie diagnostiquée sur une période donnée - serait actuellement de 7400 nouveaux cas en France par an (Belot *et al.*, 2008). Ce nombre reste relativement faible en comparaison aux cancers les plus fréquents à savoir le cancer du sein (42.000 nouveaux cas en 2005), de la prostate (39 000 nouveaux cas), colorectaux (36 000 nouveaux-cas) ou du poumon (28 000 nouveaux cas). Les femmes sont plus exposées que les hommes au mélanome puisque l'incidence chez les femmes est de 8,8 cas pour 100 000 alors qu'elle n'est que de 7,6 cas pour 100 000 chez l'homme. Le mélanome se classe au 12^{ème} rang des cancers les plus fréquents chez l'homme et au 6^{ème} rang chez la femme. En raison de l'augmentation très importante de son incidence, le mélanome est devenu ces dernières décennies un problème de santé publique dans les pays occidentaux (Thompson *et al.*, 2005a). En effet, en France, ce taux a été multiplié par 3 chez l'homme et 2,4 chez la femme entre 1980 et 2000 (Figure 5). Cette augmentation serait en particulier liée au développement des habitudes d'exposition récréative au soleil. Les campagnes de sensibilisation du public aux méfaits du soleil menées dans les années 1980-90 pourraient avoir porté leurs fruits puisque l'incidence semble se stabiliser depuis les années 2000 surtout chez les femmes. En outre, il est à noter que l'augmentation des nouveaux cas observée entre 1980 et 2000 correspond surtout au diagnostic de

mélanomes à un stade précoce. Par exemple, d'après le registre des cancers du Bas-Rhin entre 1980 et 1997 l'incidence des mélanomes de stade I avec un indice de Breslow inférieur à 1 mm est multipliée par 6 alors que le nombre de nouveaux cas de mélanome d'une épaisseur supérieure à 1 mm reste stable (HAS, 2006; INVS). De même aux Etats-Unis l'incidence des mélanomes de bas grade a été multipliée par 3 entre 1973 et 1994 alors que l'incidence des mélanomes avec extension régionale et à distance est restée relativement stable sur cette période (Hall *et al.*, 1999).

Malgré l'augmentation d'incidence observée au cours de 3 dernières décennies, le nombre de décès est resté relativement constant (Figure 5). Il était estimé à 1 570 en 2010 en France soit un taux de mortalité standardisé sur la population mondiale de 1,6 pour 100 000 personnes chez l'homme et 1,1 pour 100 000 personnes chez la femme. En 2000, le taux de mortalité pour 100 000 personnes-année lié au mélanome plaçait ce cancer au 17^{ème} rang des différents types de cancer chez la femme et au 18^{ème} rang chez l'homme (Belot *et al.*, 2008).

L'épidémiologie du mélanome reste en conséquence préoccupante car malgré une amélioration théorique du pronostic de la maladie au moment du diagnostic, la mortalité par mélanome reste stable dans la majorité des pays occidentaux.

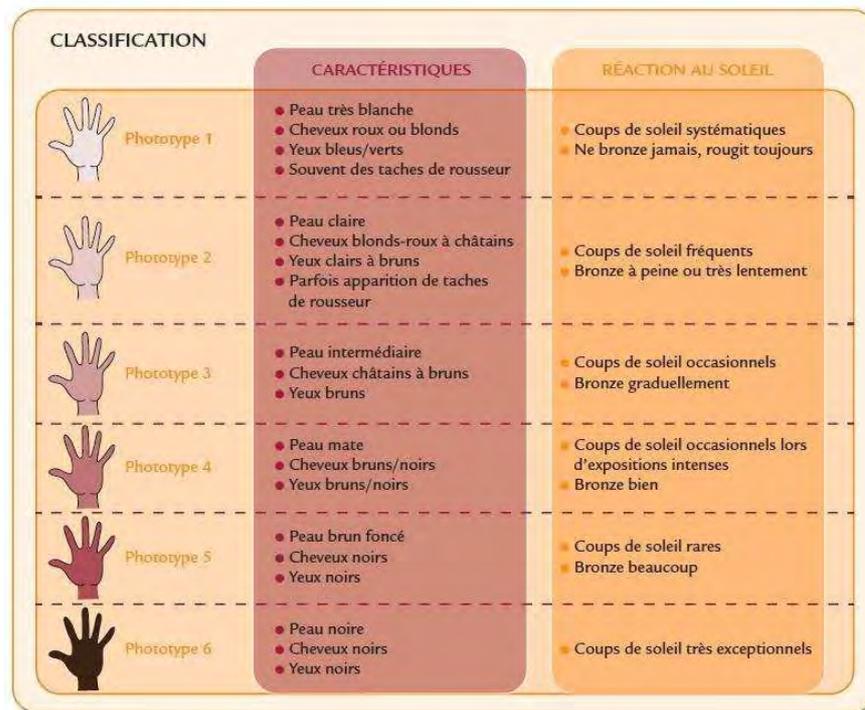
5 - Facteurs de risque

Les facteurs de risque multipliant le risque relatif par 2 ou plus peuvent être classés en 2 catégories: les facteurs extrinsèques (environnementaux et/ou comportementaux) tels que l'exposition aux UV, et des facteurs intrinsèques ou innés liés au patrimoine génétique de chaque individu.

a - Les facteurs extrinsèques

Le lien entre mélanome et exposition solaire a été soupçonné dès 1957 par des études australiennes. L'Australie est le pays le plus touché par ce cancer avec une incidence supérieure à 30 cas pour 100 000 habitants (Thompson *et al.*, 2005a). Ceci semble lié à la conjonction de la localisation géographique de ce pays se trouvant à des faibles latitudes, dans une zone où la protection de la couche d'ozone est diminuée et du phototype majoritairement clair de ses habitants. Il a été noté que l'incidence du mélanome en Australie était beaucoup plus élevée qu'en Angleterre dont est originaire la majorité de la population. Par ailleurs ce taux est également plus élevé près des côtes où la population s'expose plus au soleil du fait des loisirs balnéaires que dans les terres. Ce lien entre exposition au soleil et mélanome a été confirmé par la suite. L'augmentation d'incidence observée ces trente dernières années serait en particulier liée au développement des loisirs balnéaires depuis les années 50.

A



B

Race/Ethnicity	Male	Female
All Races	27.4 per 100,000	16.7 per 100,000
White	31.9 per 100,000	20.0 per 100,000
Black	1.1 per 100,000	1.0 per 100,000
Asian/Pacific Islander	1.6 per 100,000	1.1 per 100,000
American Indian/Alaska Native	4.1 per 100,000	3.5 per 100,000
Hispanic	4.7 per 100,000	4.4 per 100,000

Figure 6 : Influence des phototypes sur l'incidence des mélanomes

A : Définition des phototypes

(D'après Vigie Cancer, votre peau en danger)

B : Incidence du mélanome aux Etats Unis en fonction de l'éthnie

(D'après les données du NCI, www.seer.cancer.gov)

Les mélanomes de Dubreuilh au même titre que les carcinomes cutanés seraient favorisés par des expositions solaires chroniques. Au contraire le risque de développer des SSM et NM serait corrélé à des expositions aiguës et intermittentes, en particulier le nombre de coups de soleil pendant l'enfance serait un facteur prédictif fort (Armstrong and Kricger, 2001).

Enfin, au même titre, l'exposition aux UV artificiels via l'utilisation de cabines à bronzer a également été démontrée comme un facteur de risque majeur de développer des mélanomes (Chen *et al.*, 2013).

En dehors de l'exposition aux UV, l'immunosuppression qu'elle soit médicamenteuse (traitement immunosuppresseur consécutif à des greffes), pathologique (Syndrome d'ImmunoDéfiance Acquise) ou physiologique (grossesse) favorise la survenue de mélanomes cutanés.

b - Les facteurs intrinsèques

Les facteurs intrinsèques correspondent essentiellement à des prédispositions génétiques. Ces facteurs sont d'autant importants qu'ils se cumulent entre eux ainsi qu'aux facteurs de risques comportementaux (Thompson *et al.*, 2005a). Voici ci-dessous listés les facteurs de risques :

- Un phototype cutané clair : Le risque de développer un mélanome est d'autant plus important que la coloration de la peau est claire, les sujets dits « Caucasiens » (à peau claire) ont 20 fois plus de risque de développer un mélanome que les sujets Afro-Américains (Figure 6)(Armstrong and Kricger, 2001). Ce risque est maximal pour les personnes de phototype I c'est-à-dire une peau très claire avec des cheveux roux ou blonds.

- La présence de nævus : Les personnes porteuses d'un nombre de nævus > 40, d'au moins 2 nævus cliniquement atypique ou d'un nævus congénital de diamètre > 20 cm sont considérées comme à risque (Gandini *et al.*, 2005).

- Les antécédents personnels de mélanome : Le risque relatif est multiplié par 4 et 10% des patients ayant présenté un premier mélanome en présenteront un second distinct.

- Les antécédents familiaux de mélanome : 10% des cas de mélanome se développent dans un contexte d'antécédent familial de mélanome (Tsao *et al.*, 2012a). Il existe un risque relatif supérieur à 2 dès lors que sont touchés au moins 2 membres de la parenté du premier degré, et le risque relatif de développer un mélanome lorsque 3 membres de la famille est estimé à 8 quel que soit le degré de parenté présentent un antécédent de mélanome. Dans ce contexte, il a été identifié que certaines formes de mélanome se développent dans le contexte de la transmission familiale de mutations constitutionnelles des gènes *CDKN2A* et *CDK4*. Ces mutations sont associées à un risque accru de mélanome et peuvent faire l'objet d'une procédure de dépistage familial.

- Les personnes atteintes de *Xeroderma Pigmentosum* (Enfants de la Lune) ont également un risque très élevé de développer des mélanomes suite à l'exposition aux UV.

B - Carcinogène : gènes et voies de signalisation impliqués dans la mélanomagenèse

1 - Généralités

L'identification des oncogènes et des gènes suppresseurs de tumeurs est à l'origine d'avancées majeures en cancérologie. La découverte des oncogènes a été permise par l'étude de virus oncogènes tels que celui du sarcome de Rous du poulet (Weiss and Vogt, 2011). Le génome de ce dernier code pour la protéine Src qui, lorsqu'elle est exprimée dans les cellules infectées par le virus, induit leur transformation cancéreuse. Par la suite de nombreux oncogènes cellulaires ont été identifiés, notamment *RAS*, *EGFR*, *BRAF*. Ces derniers sont la cible de mutations induisant une activation constitutive de la voie de signalisation correspondante et responsable de leur effet transformant. Si l'activation d'un seul oncogène pourrait suffire dans quelques pathologies à initier la tumorigenèse, dans la majorité des cas la transformation cancéreuse des cellules résulte de l'activation conjointe de plusieurs oncogènes et/ou de la perte de gènes suppresseurs de tumeurs.

La fréquence, la localisation et la nature des altérations génétiques varient fortement d'un cancer à l'autre. Les mélanomes feraient partie des tumeurs concentrant un très fort taux de mutations (Alexandrov *et al.*, 2013; Vogelstein *et al.*, 2013).

2 – La voie MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinase)

L'activation de la voie des MAPKs suite à l'activation d'oncogènes comme *NRAS*, *BRAF* et *KIT* constitue l'altération la plus fréquemment retrouvée dans les mélanomes. Nous détaillerons dans le chapitre suivant les causes et conséquences de l'activation de cette voie ainsi que l'intérêt et les limites de son ciblage thérapeutique (voir partie II).

3 - Activation de la voie PI3K/AKT

a - Présentation de la voie PI3K/AKT

La voie PI3K/AKT est une voie de signalisation cellulaire impliquée dans de nombreux processus tels que la croissance et la prolifération cellulaire, la survie, le métabolisme et la réponse immunitaire. A l'état physiologique, cette voie permet l'intégration de signaux issus des récepteurs membranaires

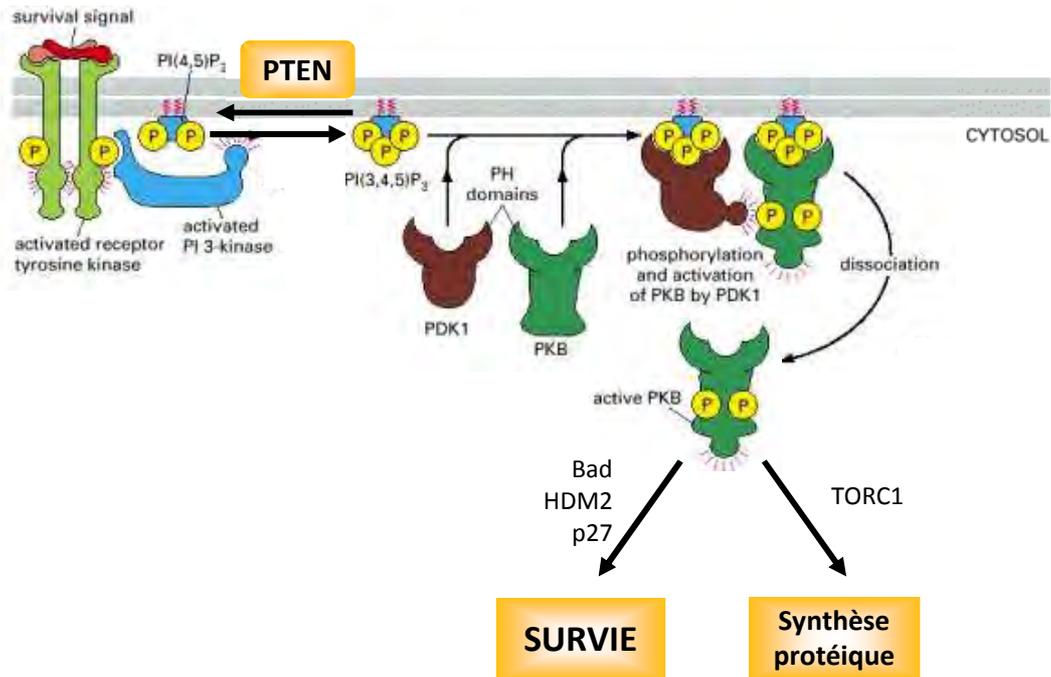


Figure 7 : Voie de signalisation PI3K/AKT

La fixation d'un facteur de croissance sur son RTK active de ce dernier par autophosphorylation activant ensuite une PI-3-Kinase (PI3K). Cette dernière transforme le PIP_2 membranaire et PIP_3 , la réaction inverse étant assurée par la phosphatase PTEN. La formation de PIP_3 par la PI3K induit le recrutement à la membrane des protéines à domaine Pleckstrine AKT/PKB et PDK1. PDK1 est alors phosphorylée et phosphoryle à son tour AKT/PKB conduisant à son activation. AKT/PKB ainsi activée se dissocie de la membrane et active par phosphorylation ses différentes cibles cytosoliques et nucléaires. Ces dernières induisent alors l'augmentation de la synthèse protéique et des signaux de survie permettant la croissance cellulaire.

(Adapté de Alberts, 2002)

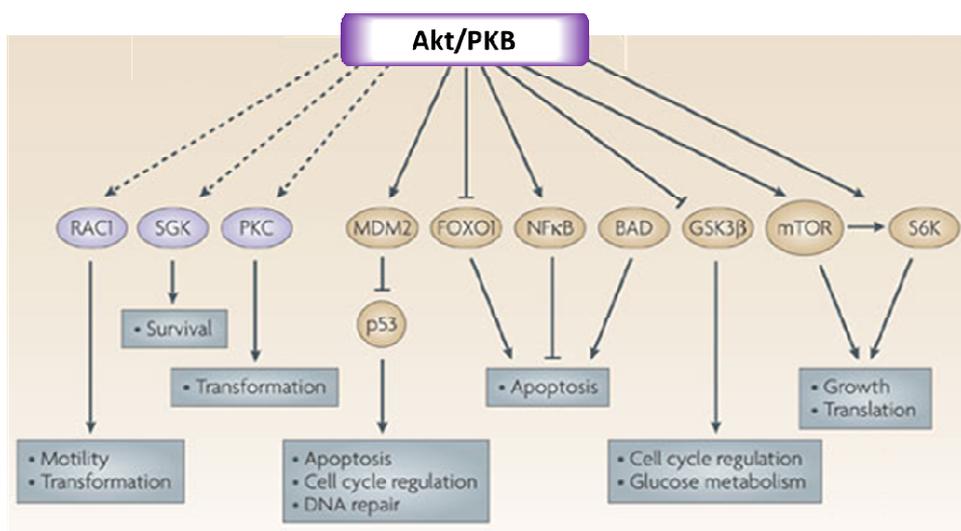


Figure 8 : Processus cellulaires contrôlés par AKT via ses différentes cibles

(D'après Liu, 2009)

couplés à des tyrosines kinases (RTK) ou aux protéines G (RCPG). En réponse à la fixation d'un facteur de croissance sur son récepteur, une Phosphatidyl-Inositol-3 Kinase (PI3K) est activée et phosphoryle le Phospho-Inositide-4,5-biPhosphate (PIP₂) en Phospho-Inositide-3,4,5-triPhosphate (PIP₃). Ce dernier recrute alors, via son domaine PH (Pleckstrin Homology), les kinases PDK1 (Phosphoinositide-Dependent protein Kinase 1) et AKT (également appelé PKB, Protein Kinase B) conduisant à l'activation de cette dernière par phosphorylation (Figure 7). AKT peut dès lors phosphoryler ses nombreuses cibles aussi bien membranaires que cytosoliques ou nucléaires impliquées dans la survie et la croissance cellulaire telles que HDM2, NF-κB, mTOR, p27, BAD (Figure 8)(Alberts *et al.*; Liu *et al.*, 2009).

Cette voie de signalisation est en revanche inhibée par la phosphatase PTEN (Phosphatase TENSin homologue) qui induit l'inactivation du PIP₃ (Figure 7).

Dans les cancers la voie PI3K/AKT est souvent hyperactivée. Cette hyperactivation peut être la conséquence de plusieurs anomalies :

- Mutations activatrices d'une PI3K.
- Mutations activatrices ou amplifications d'AKT.
- Mutations inactivatrices ou délétions de *PTEN*.
- Mutations activatrices de Ras et de RTK.

Les 2 dernières éventualités sont majoritaires dans les mélanomes bien qu'une étude récente ait mis en évidence des mutations des sous-unités régulatrices de PI3K (Shull *et al.*, 2012). Au total, les altérations de la voie PI3K pourraient concerner plus de 60% des mélanomes (Nikolaou *et al.*, 2012).

b - Perte de PTEN

PTEN est une lipide/protéine phosphatase qui inhibe la voie PI3K/AKT jouant ainsi un rôle de suppresseur de tumeurs (Figure 7 et 9A).

Dans les cancers, de nombreuses anomalies de ce gène conduisant à une perte de fonction de la protéine correspondante ont été identifiées (Figure 9B)(Song *et al.*, 2012b):

- Délétion partielle ou complète du gène.
- Mutations ponctuelles induisant l'apparition d'un codon STOP et aboutissant à une protéine tronquée non fonctionnelle.
- Mutations ponctuelles induisant la substitution d'acides aminés primordiaux ou le décalage du cadre de lecture. Ces mutations sont retrouvées sur l'intégralité du gène, mais l'exon 5 codant pour le domaine phosphatase est touché de manière préférentielle (33% des mutations).

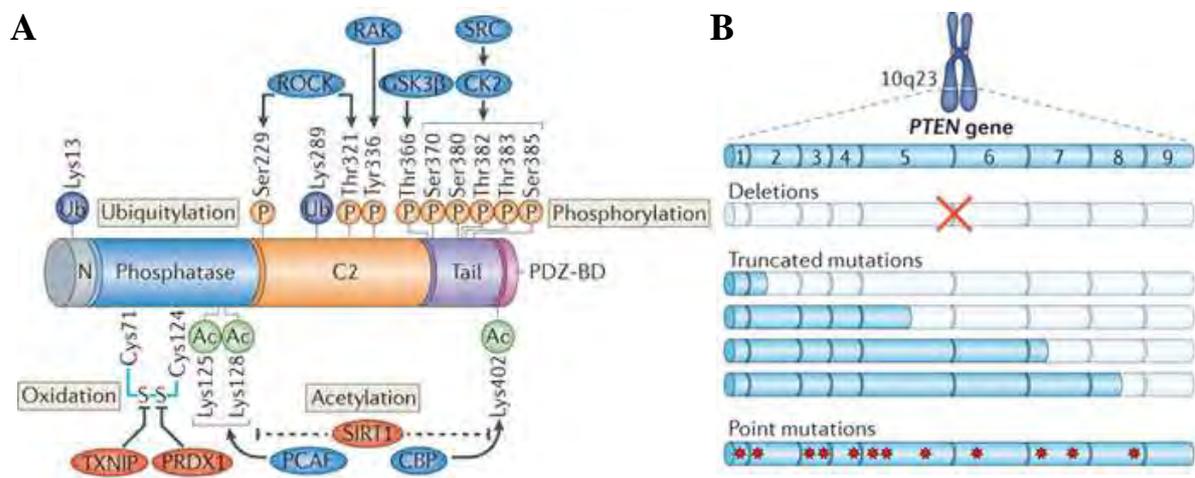


Figure 9 : Anomalies affectant le gène PTEN dans les cancers, localisations, conséquences sur la protéine

A: Structure de la protéine PTEN et localisation de ses modifications post-traductionnelles. PTEN est une protéine de 403 acides aminés structurée en 5 domaines fonctionnels:

- Un domaine PBD en N-terminal de liaison au PIP₃
- Un domaine porteur de l'activité catalytique phosphatase
- Un domaine C2 commun avec certaines PI3K et impliqué dans l'adressage de ces protéines à la membrane plasmique
- Un domaine « queue » (« tail ») permettant le repliement du domaine PDZ sur le domaine C2 en conformation inactive
- Un domaine « PDZ-Binding Domain » impliqué dans la liaison de PTEN à des protéines portant des domaines PDZ telle que p85.

PTEN est par ailleurs régulée par de nombreuses modifications post-traductionnelles (phosphorylation, Oxydation, Acétylation, Ubiquinylation) mentionnées sur le schéma.

B: Localisation et conséquences sur la protéine correspondante de anomalies affectant PTEN dans les cancers.

Dans les cancers, le gène PTEN peut être totalement ou partiellement délété. Il peut contenir des mutations ponctuelles formant des codons STOP ou des substitutions d'acides aminés. Il en résulte respectivement une absence totale de la protéine, une protéine mutée ou une protéine tronquée inactive.

(D'après Song, 2012)

- Perte d'expression de la protéine malgré une séquence génétique indemne par méthylation du promoteur.

Dès 1988, des anomalies du chromosome 10 et spécialement le locus 10q24, correspondant à *PTEN*, ont été mises en évidence et semblaient être plus fréquentes dans les formes avancées de la maladie, en particulier métastatiques (Parmiter *et al.*, 1988). Par la suite des études plus détaillées ont montré que les altérations génétiques de *PTEN* étaient fréquentes dans les lignées de mélanome (30-40%) mais plus rarement retrouvées au niveau de biopsies (5-15%) (Birck *et al.*, 2000; Dahl and Guldberg, 2007; Guldberg *et al.*, 1997). Le faible taux des altérations génétiques de *PTEN* dans les mélanomes semble en contradiction avec son rôle-clé de suppresseur de tumeurs démontré *in vitro*. En effet, il a été démontré que la ré-expression de *PTEN* dans des lignées cellulaires de mélanome qui en étaient dépourvues affectait leur prolifération, leur tumorigénicité et leurs capacités métastatiques suggérant le rôle-clé de *PTEN* en tant que gène suppresseur de tumeur dans ce cancer et en particulier au cours de la progression métastatique (Stewart *et al.*, 2002). Ces données ont conduit à des études plus approfondies s'intéressant en particulier à l'expression de la protéine *PTEN* dans des prélèvements tumoraux de mélanome. Celles-ci ont montré que l'expression de *PTEN* était altérée dans la majorité des mélanomes (15% perte totale d'expression, 50% expression diminuée). De manière surprenante la perte d'expression n'était pas toujours en rapport avec des mutations ou des délétions. En fait, il existe des îlots CpG dans le promoteur de *PTEN* qui sont méthylés dans la majorité des mélanomes conduisant à une réduction de l'expression de ce gène. Cette régulation épigénétique touche plus de 50% des patients et constituerait un facteur de mauvais pronostic (Aguissa-Touré and Li, 2011; Lathz *et al.*, 2009). Cependant, ces taux semblent très variables d'une étude à l'autre, Goel et ses collaborateurs ne retrouvent une perte d'expression de *PTEN* que dans 20% des tumeurs (Goel *et al.*, 2006). Il est par ailleurs à noter que ces altérations sont plus fréquemment retrouvées dans des biopsies de métastases qu'au sein de tumeurs primaires.

Enfin des études sur modèles murins complétées par des données cliniques ont montré de manière très élégante que *PTEN* coopérait avec *BRAF* pour promouvoir la progression des mélanomes. En effet, l'introduction de la mutation *BRAF*^{V600E} ou la délétion de *PTEN* spécifiquement dans les mélanocytes de souris génétiquement modifiées ne conduit pas à l'apparition de mélanome. La mutation *BRAF*^{V600E} induit une hyperplasie mélanocytaire présentant des similitudes avec les nævus humains, ces lésions n'évoluant pas vers des tumeurs malignes même après 20 mois de suivi. Parallèlement, l'inactivation de *PTEN* par la délétion homozygote d'un ou plusieurs de ses exons par le système Cre/Lox dans les mélanocytes ne conduit à aucune modification phénotypique particulière, démontrant l'absence de rôle initiateur de la perte de *PTEN* dans le mélanome. En revanche, la perte de *PTEN* concomitante avec l'activation *BRAF* conduit à l'apparition extrêmement rapide (7-10 jours)

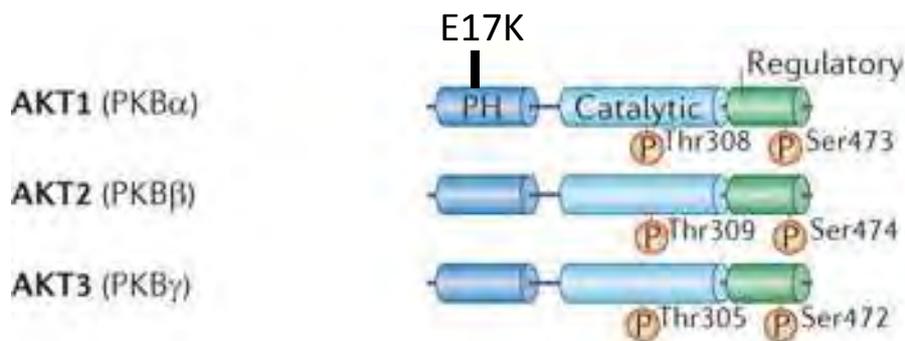


Figure 10 : Structure des protéines AKT

Les 3 isoformes AKT1, 2 et 3 sont composées de 3 domaines:

- Le domaine PH (Pleckstrin Homology) permet via la liaison au PIP₃ le recrutement d'AKT à la membrane plasmique. Le hotspot de mutation E17K de *AKT1* est situé dans ce domaines.

- Le domaine kinase porteur de l'activité catalytique. Il est régulé par phosphorylation par PDK1 sur la thréonine en position 308 (pour AKT 1 et 2 et 305 pour AKT3). Quand AKT est inactive, localisée dans le cytosol, le domaine kinase est masqué par le domaine PH. Le recrutement à la membrane d'AKT induit un changement de conformation rendant alors le domaine kinase accessible à PDK1. Cette phosphorylation est nécessaire et suffisante à l'activation d'AKT.

- Le domaine régulateur contenant une queue hydrophobe. Sa phosphorylation sur la sérine 473, si elle n'est pas strictement nécessaire, augmente l'activité catalytique d'AKT. Elle pourrait également moduler la spécificité d'AKT pour ses différentes cibles. Les mécanismes induisant une telle phosphorylation sont encore mal caractérisés, ils pourraient impliquer l'autophosphorylation d'AKT ou sa phosphorylation par d'autres kinases. Des kinases aussi variées que PDK2, ILK, mTOR2, DNA-PK ont été proposées.

Les mécanismes conduisant à l'inactivation d'AKT sont mal connus, la phosphatase PP2A serait impliquée dans la déphosphorylation de la T308 et PHLPP dans celle de la S473.

(Adapté de Song, 2012)

de mélanomes accompagnés de métastases ganglionnaires et pulmonaires nécessitant l'euthanasie de ces souris dans les 20 à 25 jours (Dankort *et al.*, 2009).

Chez l'Homme, plusieurs études retrouvent une association fréquente entre la perte de *PTEN* et la mutation *BRAF*^{V600E} aussi bien dans des lignées cellulaires que sur des biopsies, renforçant ainsi l'hypothèse d'une coopération de ces 2 voies dans la mélanomagenèse (Haluska, 2006; Tsao *et al.*, 2004a). En revanche, l'association de la perte *PTEN* avec des mutations activatrices de *NRAS* semble beaucoup plus rare même s'il existe des contradictions entre les différentes études. Il est possible d'émettre l'hypothèse que les mutations de *NRAS*, conduisant déjà une activation de la voie PI3K, la perte additionnelle de *PTEN* n'apporte pas d'avantage aux cellules tumorales.

c - Activation d'AKT3

Initialement *AKT* a été identifiée comme l'oncogène responsable du pouvoir transformant du rétrovirus murin AKT8 induisant des lymphomes chez la souris. Par homologie, 3 gènes indépendants, *AKT1*, *AKT2* puis *AKT3* ont été identifiés chez l'Homme. Ils codent pour les 3 protéines AKT1, 2 et 3 (ou PKB α , β et γ) présentant plus de 85% d'homologie. Ces protéines sont des sérine/thréonine kinases dont la structure et les mécanismes d'activation sont détaillés dans la figure 10 (Hers *et al.*, 2011; Vivanco and Sawyers, 2002).

Les rôles spécifiques de chaque homologue restent mal définis. *In vitro* elles ont toutes 3 un pouvoir transformant. En revanche leur expression respective varie d'un tissu à l'autre : *AKT1* est exprimée de manière relativement ubiquitaire, *AKT2* est fortement exprimée dans les muscles et les adipocytes où elle est impliquée dans la régulation du métabolisme glucidique en réponse à l'insuline alors que l'expression d'*AKT3* serait restreinte physiologique aux testicules et au cerveau.

Dans les cancers, des anomalies induisant une hyperactivation d'*AKT* indépendante de PI3K ont été décrites (Liu *et al.*, 2009) :

- La mutation activatrice E17K d'*AKT1* a été mise en évidence dans des cancers du sein, colorectal et ovarien.
- Des amplifications d'*AKT2* sont fréquemment retrouvées dans les cancers ovariens, pancréatiques (10%), colorectaux (57%), hépatiques (40% des hépatocarcinomes).
- *AKT3* est également le siège d'amplification et de mutations.

Dans le cas particulier des mélanomes, c'est préférentiellement *AKT3* qui semble jouer un rôle. Peu de mutations de ce dernier gène ont été reportées (un seul article rapporte de telles mutations dans 2 lignées cellulaires sur les 65 et dans 2 biopsies issues du même patient sur 137 échantillons)

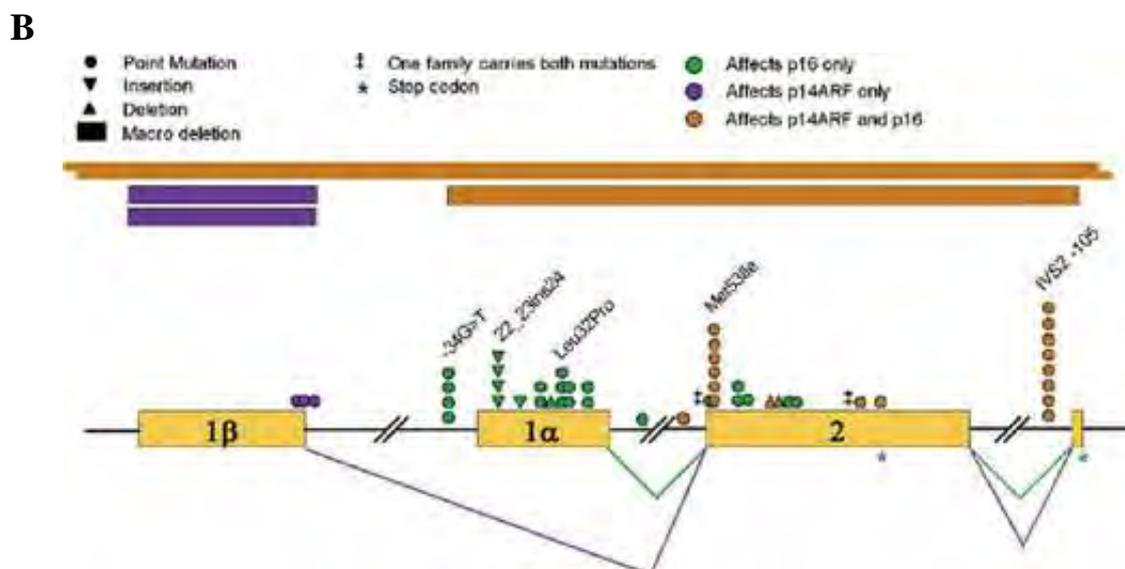
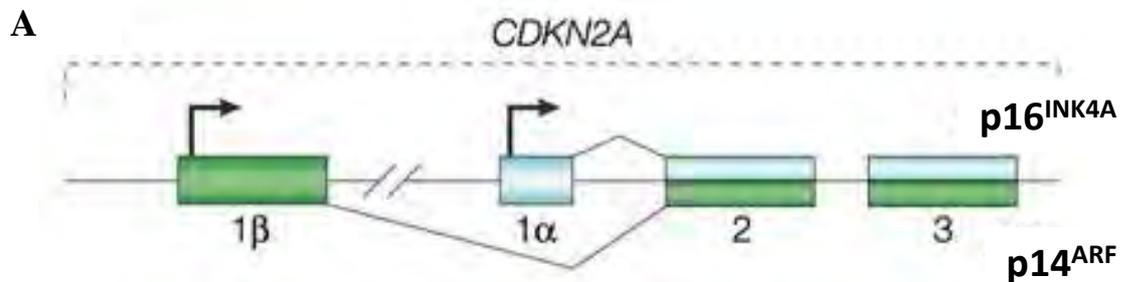


Figure 11 : *CDKN2A*, un gène majeur de prédisposition au mélanome

A: Structure du gène *CDKN2A*. Il conduit via 2 promoteurs distincts et un épissage alternatif à 2 transcrits différant par leur premier exon et codant pour les protéines p16^{INK4A} et p14^{ARF}. (D'après Chin, Nat Rev. Cancer 2003)

B: Localisation des mutations de *CDKN2A* retrouvées dans les familles prédisposées au mélanome. Les mutations sont réparties sur l'intégralité du gène et affectent p16^{INK4A} et/ou p14^{ARF} en fonction de leur localisation. (Iconographie tiré du site <http://www.limm.leeds.ac.uk>)

(Davies *et al.*, 2008). En revanche, des amplifications induisant une surexpression corrélée à une hyperactivation d'AKT3 sont retrouvées dans 40 à 60% des mélanomes par comparaison à des nævus (Stahl *et al.*, 2004).

Cette hyperactivation d'AKT3 serait impliquée au même titre que la perte de PTEN dans la progression du mélanome au cours des stades tardifs. En effet, à ce jour aucune étude n'a montré *in vitro* ou chez la souris l'implication d'AKT dans l'initiation du mélanome. En revanche, cette activation semble coopérer avec d'autres mutations telles que celle de *BRAF* et favoriser la progression en particulier la transition RGP/VGP (Cheung *et al.*, 2008; Govindarajan *et al.*, 2007).

Enfin, il est à noter que la voie PI3K/AKT est à ce jour considérée comme une cible thérapeutique d'intérêt majeur en cancérologie. De nombreux inhibiteurs sont en cours de développement ou d'essais cliniques (voir Figure 22B).

4 - Inactivation des voies p16^{INK4A}/CDK4/CD₂/Rb et/ou p14^{ARF}/p53

a - Le locus *CDKN2A*

Le lien entre les prédispositions familiales aux mélanomes et les mutations du gène *CDKN2A* a été clairement démontré dès 1994 (Hussussian *et al.*, 1994). *CDKN2A* est à ce jour le principal gène impliqué. En effet, des altérations de ce dernier sont retrouvées dans 40% des mélanomes familiaux et, selon la région géographique de résidence, 58 à 91% des porteurs de telles altérations développent un mélanome avant l'âge de 80 ans (Bishop *et al.*, 2002; Ward *et al.*, 2012). Ce gène est également muté ou éteint par méthylation dans 25 à 50% des mélanomes sporadiques (Miller and Mihm Jr, 2006) ainsi que dans d'autres cancers. Ses mutations germinales prédisposent également au cancer du pancréas mais avec une pénétrance beaucoup plus faible que pour le mélanome (Goldstein, 2004).

Le gène *CDKN2A* est constitué de 4 exons et code via 2 promoteurs et un épissage alternatif pour 2 protéines ayant un rôle de suppresseur de tumeur : p16^{INK4A} et p14^{ARF} (correspondant à p19^{ARF} chez la souris) (Figure 11A). En fonction de leur localisation, les mutations de *CDKN2A* affectent l'un, l'autre ou les 2 transcrits : les anomalies de l'exon 1α n'affecte que p14^{ARF}, celles de l'exon 1β uniquement p16^{INK4A}, alors que celles de l'exon 2 affectent les 2 protéines (les exons 3 et 4 étant rarement touchés). Bien que des mutations soient retrouvées sur l'intégralité du gène, une majorité d'entre elles est localisée sur l'exon 1α et n'affecte que p16^{INK4A} (Figure 11B). Par ailleurs, l'inactivation concomitante de p16^{INK4A} et p14^{ARF} lors de mutations situées dans l'exon 2 a un effet additionnel (Tsao *et al.*, 2012a).

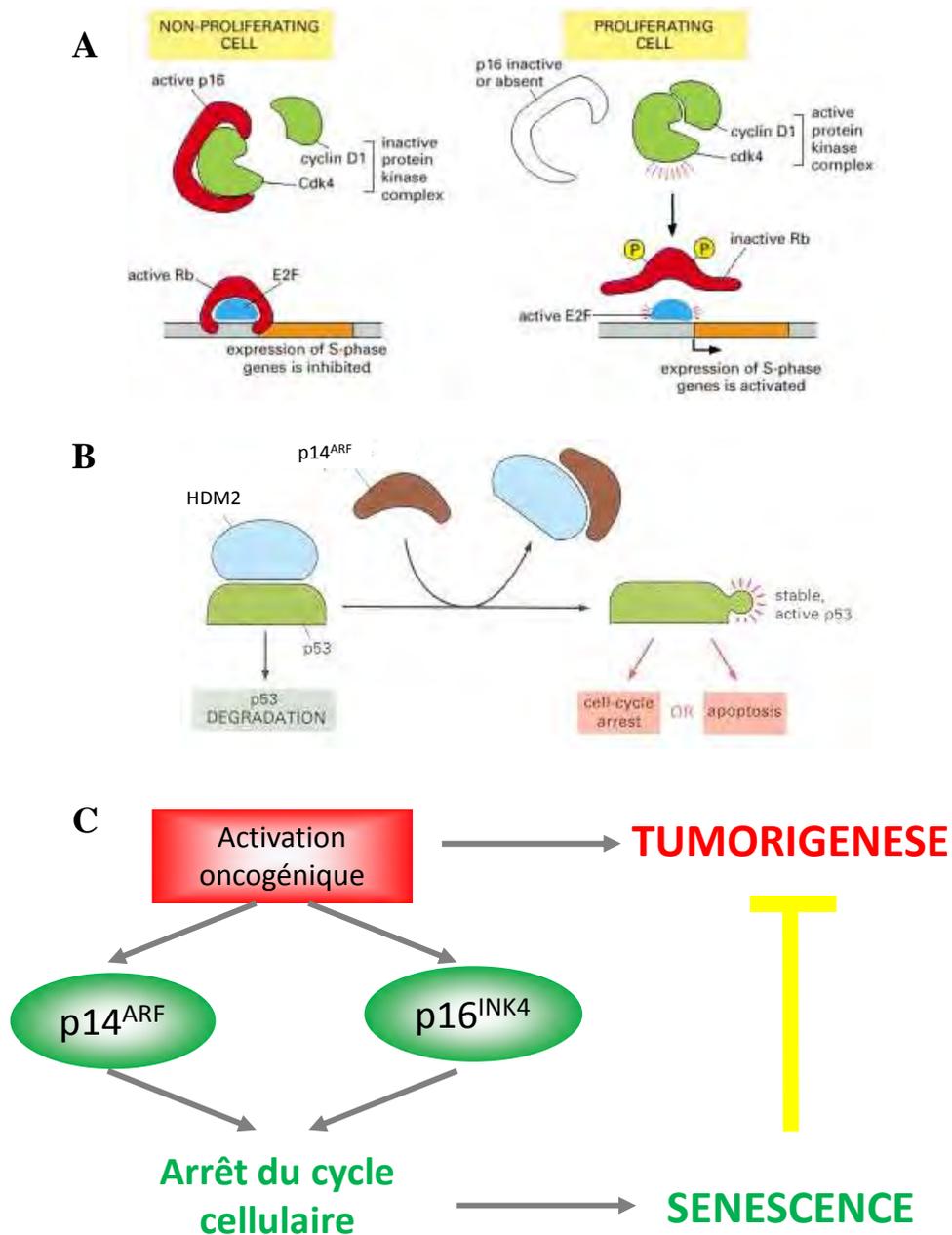


Figure 12 : Implications des protéines codées par le locus *CDKN2A* dans l'arrêt du cycle cellulaire en réponse à des stress oncogéniques

A : Signalisation de la voie $p16^{INK4A}$ / $CDK4-CD_1$ / Rb : Quand elle est présente et fonctionnelle $p16^{INK4A}$ se lie à $CDK4$, entraînant la dissociation du complexe $CDK4-CD_1$, maintenant Rb active liée à $E2F$ et prévenant ainsi l'arrêt du cycle cellulaire en $G1/S$.

B : Signalisation de la voie $p14^{ARF}$ / $HDM2$ / $p53$: Quand elle est présente $p14^{ARF}$ se lie à $HDM2$. $HDM2$ ne pouvant se lier à $p53$ et induire sa dégradation, $p53$ s'accumule dans les cellules entraînant un arrêt du cycle cellulaire et éventuellement l'apoptose.

C : L'induction de $p16^{INK4A}$ et/ou $p14^{ARF}$ suite à l'activation d'oncogènes tels que *Ras* ou *BRAF* induit l'entrée en sénescence des cellules et prévient ainsi la tumorigénèse

(Adapté de Alberts, 2002)

b - Implication de la voie p16^{INK4A}/CDK4/CD1/Rb

La protéine p16^{INK4A} est un suppresseur de tumeur. Elle est en particulier impliquée dans l'arrêt du cycle cellulaire et l'entrée en sénescence.

En conditions physiologiques, p16^{INK4A} n'est pas exprimée dans les tissus à l'âge adulte. En revanche, en réponse à l'activation d'oncogènes, au raccourcissement des télomères, au stress oxydant ou aux dommages à l'ADN, il existe une activation transcriptionnelle de p16^{INK4A} encore mal caractérisée. L'activation d'oncogènes tel que Ras et *BRAF*, induirait l'expression de p16^{INK4A} via les facteurs de transcription Ets-1 et Ets-2. Dans le cas de stress oxydant, ce serait p38 qui jouerait un rôle (Ben-Porath and Weinberg, 2005).

La protéine p16^{INK4A} ainsi induite est alors capable de se lier et ainsi d'inhiber les kinases dépendantes des cyclines 4 et 6 (CDK4 et CDK6). Par la séquestration de CDK4, p16^{INK4A} prévient la formation du complexe CDK4/Cycline D₁ inhibant ainsi la phosphorylation inhibitrice de la protéine du rétinoblastome (Rb) par le complexe. En présence de p16^{INK4A}, la protéine Rb est fixée sur E2F prévenant la transcription des gènes cibles impliqués dans la réplication. Il en résulte un arrêt du cycle cellulaire en phase G1/S qui conduira par la suite à l'entrée des cellules en sénescence (Figure 12A et C). *De facto*, la perte de p16^{INK4A} se traduit par une hyperactivité de CDK4 qui est de ce fait considérée comme une cible thérapeutique d'intérêt.

Au même titre que la perte de p16^{INK4A}, l'activation constitutive de l'onco-protéine CDK4 inhibe l'entrée en sénescence en évitant le contrôle de la transition G1/S. En effet la mutation de *CDK4* affectant l'arginine en position 24 empêche la liaison de ce dernier avec p16^{INK4A} et conduit ainsi à son activation constitutive.

Dans les mélanomes, 3 mécanismes mutuellement exclusifs conduisent à l'inactivation de la voie p16^{INK4A}/CDK4/CD1/Rb:

i - L'inactivation de p16

Plusieurs mécanismes conduisent l'inactivation de p16^{INK4A} tels que les mutations, les délétions et la méthylation du promoteur. Dans une étude intéressant 77 biopsies de mélanomes métastatiques, p16^{INK4A} est retrouvée mutée dans 12% des cas, délétée de manière homozygote dans 23% des cas, délétée de manière hétérozygote dans 45% et son promoteur est méthylé dans 19% des cas. *In fine*, la protéine p16^{INK4A} n'est exprimée que dans 15% des cas (Jonsson *et al.*, 2010). En revanche, dans les mélanomes primaires l'expression de p16^{INK4A} est retrouvée dans 70% des biopsies, suggérant un rôle préférentiel de p16^{INK4A} au cours du processus métastatique. Dans une autre étude ayant déterminé le statut mutationnel de p16^{INK4A} dans 99 couples de mélanomes primaires/métastatiques, 14% des

mélanomes métastatiques sont porteurs de mutations alors que cela ne concernait que 7% des mélanomes primaires (Colombino *et al.*, 2012). Ces données cliniques suggèrent que p16^{INK4A} serait impliquée dans le processus métastatique, nous verrons par la suite que les modèles de souris transgéniques soutiennent cette hypothèse.

ii - L'activation de CDK4

CDK4 est après *CDKN2A* le deuxième gène de par sa pénétrance impliqué dans les prédispositions familiales au mélanome. Il est actuellement estimé que 2% des familles prédisposées aux mélanomes le sont par le fait de mutations de *CDK4* qui affectent systématiquement l'arginine en position 24 (Ward *et al.*, 2012). Dans les mélanomes sporadiques, cette mutation ainsi que des amplifications de *CDK4* sont également retrouvées en particulier dans les mélanomes acrolentigineux et muqueux (Curtin *et al.*, 2005; Tsao *et al.*, 2012b).

iii - Amplification de CCND1

Des amplifications du gène *CCND1* codant pour la cycline D₁, partenaire de *CDK4*, sont également retrouvées dans environ 10% des mélanomes (Curtin *et al.*, 2005; Flaherty *et al.*, 2012a).

iv - Les mutations de Rb

Contrairement à d'autres cancers, les mélanomes sont très rarement porteurs d'anomalies de Rb. Il existe tout de même une susceptibilité au mélanome chez les porteurs de mutations de Rb (Flaherty *et al.*, 2012a).

Si de par leur fréquence, la perte de p16^{INK4A} ou l'activation de *CDK4* semble jouer un rôle crucial dans la mélanomagenèse, ces dernières ne semblent pas être suffisantes et semblent préférentiellement impliquées dans le processus métastatique.

Cette hypothèse est confirmée dans les modèles transgéniques de souris où elles favorisent la tumorigenèse suite à l'exposition à des carcinogènes et coopèrent avec l'activation d'oncogènes tels que Ras. En effet, chez la souris, le knock-in *CDK4*^{R24C} même à l'état homozygote ne conduit pas à l'apparition de mélanomes spontanés. En revanche, en réponse à l'exposition à des carcinogènes tels que l'association DMBA et TPA ou en association avec des mutations de Ras, plus de 50% des souris *CDK4*^{R24C} développent des mélanomes métastatiques (Hacker *et al.*, 2006; Sotillo *et al.*, 2001). De manière tout à fait similaire, les souris *INK4A*^{-/-} ne développent pas spontanément de mélanomes mais

la conjonction d'une telle délétion avec l'activation de Ras, en particulier *NRAS*^{Q61K}, dans les mélanocytes conduit au développement de mélanomes chez plus de 90% des souris en moins d'un an, accompagnés de métastases ganglionnaires, hépatiques et pulmonaires (Ackermann *et al.*, 2005).

L'existence d'une telle coopération chez les patients reste à démontrer. En effet, les résultats des études sur l'association d'anomalies de p16^{INK4A} (mutation/délétion/méthylation) et de mutations *BRAF* ou de *NRAS* sont contradictoires (Colombino *et al.*, 2012; Daniotti *et al.*, 2004; Jonsson *et al.*, 2010).

c - La voie p14^{ARF}/HDM2/p53

Comme p16^{INK4A}, p14^{ARF} est un senseur de l'activation oncogénique, sa transcription est activée notamment en réponse à l'activation de Ras et *MYC*, à la perte de *RB1* et en réponse aux dommages à l'ADN. Lorsque p14^{ARF} est présente, elle se lie à HDM2 prévenant l'ubiquitylation par ce dernier de p53 et donc sa dégradation. L'accumulation de p53 induit alors un arrêt du cycle cellulaire en G2/M, suite à cet arrêt du cycle, la cellule pourra ré-entrer dans le cycle cellulaire après réparation des dommages, entrer en apoptose ou en sénescence. En l'absence de p14^{ARF}, p53 ne peut donc pas correctement jouer son rôle de suppresseur de tumeurs (Figure 12B et C). Chez la souris, p19^{ARF}, l'homologue de p14^{ARF} joue le même rôle en se liant à *mdm2*, l'homologue de *HDM2*.

De manière surprenante, à la différence des autres cancers solides, les mélanomes sont rarement porteurs de mutations *TP53* (moins de 15 % des mélanomes comparé à 70% des cancers du poumon ou 60% pour les cancers du colon)(Flaherty *et al.*, 2012a). Ceci est d'autant plus étonnant que ces mutations sont habituellement associées à une exposition aux UV, dont nous avons vu ci-avant qu'ils sont le seul facteur de risque exogène de mélanome identifié à l'heure actuelle. Cependant, la perte de p14^{ARF} au même titre que les altérations de *HDM2* (surexpression, amplification, mutation activatrice du promoteur) joueraient un rôle équivalent en inhibant la signalisation de p53 (Tsao *et al.*, 2012b).

5 - Les voies spécifiques de contrôle de la différenciation, de la prolifération et de la survie des cellules mélanocytaires

a – MITF

Le premier mutant de *MITF* (Microphthalmia-associated Transcription Factor) a été identifié chez la souris dans les années 50. Les souris *MITF*^{mi/mi} présentaient un microphthalmie ainsi qu'une absence de mélanocytes. Par la suite, le gène correspondant a été cloné en 1993 (Hodgkinson *et al.*, 1993). Ce dernier est composé de 17 exons ainsi que de 9 promoteurs contrôlant l'expression tissu-

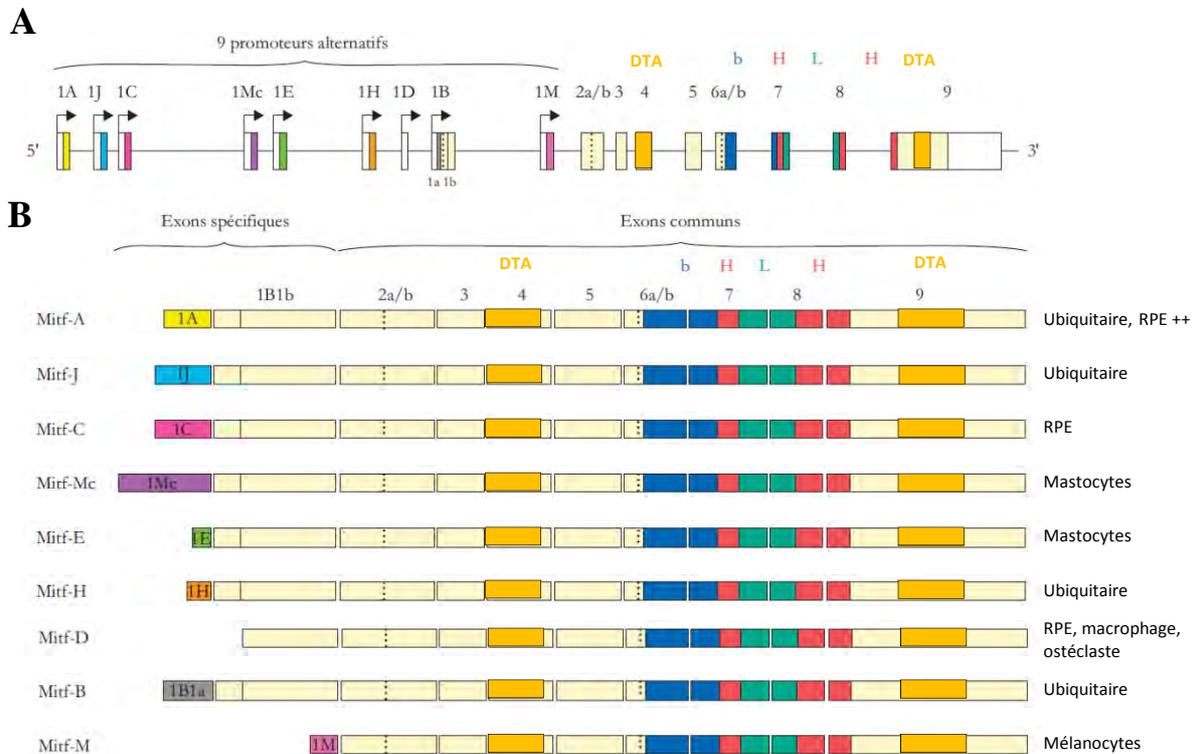


Figure 13 : MITF, un facteur de transcription clé de la lignée mélanocytaire

A: Structure du gène MITF. Le gène MITF est composé de 17 exons et de 9 promoteurs. Les exons 4 et 9 codent pour des Domaines de TransActivation (DTA), les exons 6, 7, 8 et 9 codent pour la structure Hélice(H)/Boucle(B)/Hélice(H) basique(b) constituant la fermeture éclair à leucine.

B: Structure et expression tissulaire préférentielle des différentes isoformes. Les 9 promoteurs alternatifs de MITF conduisent à 9 isoformes dont l'expression varie d'un tissu à l'autre. Pour chacune des isoformes les tissus dans lesquels elles sont préférentiellement exprimées sont indiqués sur le schéma. RPE (Retinal Pigment Epithelium = cellules épithéliale pigmentée de la rétine).

(Adapté de Denat L, 2007 et Levy C., 2006)

spécifique des isoformes correspondantes qui diffèrent par leur premier exon et ont en commun les 8 exons suivants, l'isoforme M étant spécifique des mélanocytes (Figure 13)(Denat and Larue, 2007).

Les isoformes MITF sont des facteurs de transcription de la même famille que Myc possédant une structure de type bHLH-LZ (Hélice-Boucle-Hélice basique à fermeture éclair de leucine). Cette structure est impliquée dans la liaison à l'ADN, sur les boîtes E (CATGTG ou CACGTG) des promoteurs des gènes cibles, de ces facteurs sous forme d'homodimères ou d'hétérodimères incluant alors un autre facteur de transcription de la même famille. Dans les mélanocytes MITF-M se lie sous forme d'un homodimère sur une boîte E étendue dite boîte M (AGTCATGTGCT)(Denat and Larue, 2007).

L'expression de MITF est régulée dans les mélanocytes au niveau transcriptionnel notamment par les voies Wnt/ β -caténine, α -MSH/MC1R/AMPC/CREB, MAPK et par des facteurs de différenciation tels que Sox10 et Pax3.

Au niveau post-traductionnel, MITF peut être phosphorylé sur les sérines 73, 298, 307 et 409. Les sérines 73 et 409 sont phosphorylées via la voie de MAPK par ERK2 et p90RSK en réponse par exemple à la fixation de SCF (Stem-Cell Factor) sur son récepteur c-Kit. La phosphorylation de la sérine 73 jouerait alors un rôle paradoxal augmentant d'une part l'activité transcriptionnelle de MITF mais favorisant d'autre part sa dégradation (Wu *et al.*, 2000). La sérine 298 est quant à elle phosphorylée par GSK-3 β ce qui augmente également l'activité transcriptionnelle de MITF (Takeda *et al.*, 2000). Au contraire, des SUMOylations des lysines 182 et 316 ont également été décrites, leur effet varierait en fonction du gène cible. La SUMOylation de MITF diminuerait son activité sur les promoteurs possédant plusieurs boîtes E mais pas sur les promoteurs possédant une seule de ces séquences (Figure 14A)(Miller, 2004).

S'il est clair que MITF joue un rôle crucial dans la différenciation des cellules mélanocytaires de nombreuses zones d'ombre persistent. En effet, MITF contrôle l'expression d'une pléthore de gènes (Figure 14B) dont la liste exhaustive n'est pas encore clairement établie. D'autre part, la régulation de l'expression de MITF ainsi que ses modifications post-traductionnelles et leurs effets différentiels sur les cibles de MITF restent imprécis. En conséquence, les fonctions vraisemblables de MITF dans la physiologie de la lignée mélanocytaire et le développement des mélanomes seront développées de manière succincte.

Tout d'abord, MITF intervient dans la survie et la différenciation de la lignée mélanocytaire dès le stade de mélanoblaste précurseur de la crête neurale. En effet, en l'absence de MITF, chez la souris, les précurseurs des mélanocytes disparaissent dès le moment où ils quittent la crête neurale lors de la délamination. Par la suite, MITF contrôle l'expression de gènes de différenciation tels que des enzymes synthétisant la mélanine, comme la Tyrosinase (Tyr), TYRP1 ou la tautomérase Dct, ainsi que d'antigènes tels que MLANA/MART1 et SILV/PMEL17/gp100 (Du *et al.*, 2003; Levy *et al.*, 2006). MITF

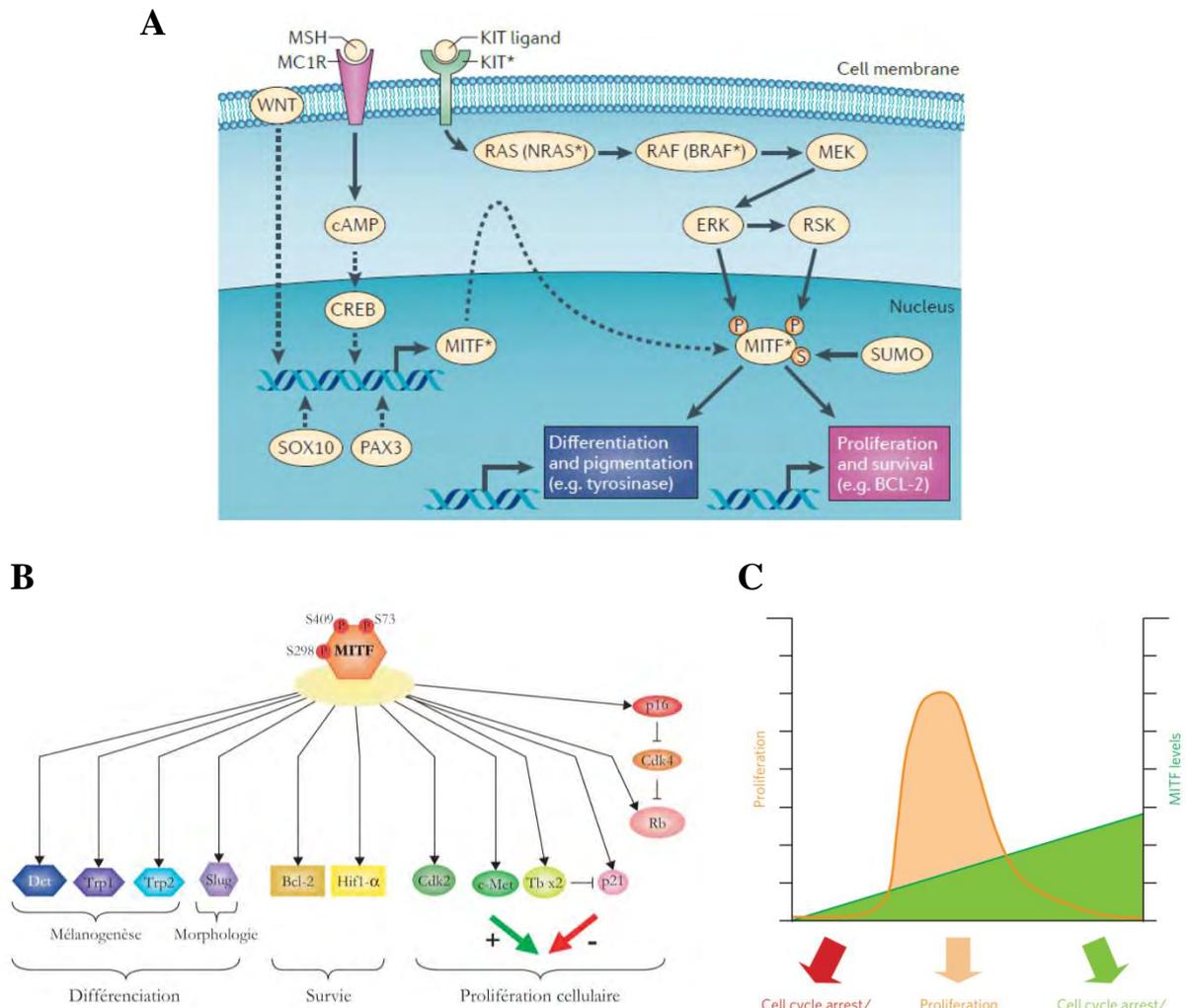


Figure 14 : Rôle paradoxal de MITF dans la prolifération et la survie des mélanocytes et des mélanomes

A: Régulation de MITF. La voie α -MSH/MC1R induit l'expression de MITF en réponse à l'exposition solaire. La voie c-Kit/Ras/Raf/MEK/ERK contrôle l'activité de MITF par phosphorylation. La modification de MITF par SUMOylations participe également à sa régulation. (D'après Chin, 2006)

B: Processus contrôlés par MITF. Via ses nombreux gènes cibles MITF régule la différenciation, la survie et la prolifération des mélanocytes. (D'après Denat, 2007)

C: Illustration de l'hypothèse: « un niveau intermédiaire de MITF permet la survie et la prolifération alors qu'un niveau plus élevé entraîne un arrêt du cycle cellulaire ». Une faible expression de MITF induit l'arrêt du cycle cellulaire et l'apoptose par perte d'expression de facteurs de survie tels que Bcl-2. Lorsque la protéine MITF est fortement exprimée elle induit une différenciation et un arrêt du cycle cellulaire. En conséquence, seul un niveau d'expression intermédiaire favorise la prolifération du fait de l'équilibre entre survie et différenciation. (Adapté de Gray-Schopfe, 2007)

favoriserait également la survie cellulaire en augmentant l'expression de Bcl-2 par liaison directe sur la boîte E de son promoteur (McGill *et al.*, 2002). Enfin, en ce qui concerne la prolifération, MITF jouerait un rôle paradoxal. En effet, il semble à la fois capable d'activer d'une part la transcription de gènes stimulant l'entrée dans le cycle cellulaire comme *CDK2* et d'autre part celle de gènes induisant un arrêt du cycle cellulaire comme p16^{INK4A} et p21 (Figure 14B)(Du *et al.*, 2004; Miller and Mihm Jr, 2006). L'hypothèse la plus probable pour expliquer cet effet paradoxal est l'importance du contexte dans le rôle de MITF. Ce dernier doit être finement modulé selon le niveau d'expression de MITF (faible/moyen/fort) ainsi que les co-facteurs présents.

Dans les mélanomes, divers mécanismes conduisent à des altérations de MITF :

- Des amplifications de *MITF* : Garraway *et al.* ont mis en évidence, pour la première fois en 2005, des amplifications de ce gène dans les mélanomes. Dans cette étude, les amplifications touchaient 10% des mélanomes primaires et 20% des mélanomes métastatiques (Garraway *et al.*, 2005). Ces données ont été depuis confirmées par d'autres groupes (Gast *et al.*, 2010; Ugurel *et al.*, 2007). De plus, ces études ont également suggéré que ces amplifications seraient associées à un mauvais pronostic (Garraway *et al.*, 2005; Ugurel *et al.*, 2007).

- L'activation de la voie MAPK, retrouvées dans près de 90% des mélanomes comme nous le verrons dans le chapitre suivant (partie II), conduit à l'activation de MITF par phosphorylation et à l'augmentation de sa dégradation comme nous l'avons décrit plus haut (Wellbrock *et al.*, 2008).

- La mutation germinale ponctuelle E318K a été identifiée en même temps par 2 équipes en 2011 chez des familles présentant des prédispositions au mélanome. Cette mutation semble avoir une faible pénétrance avec un risque relatif variant entre 2 et 5 selon l'étude. Cette mutation touche un des 2 sites de SUMOylation de MITF et conduit à la perte de la SUMOylation de ce site. Ceci s'accompagnerait d'une augmentation de l'activité transcriptionnelle de MITF pour au moins une partie de ces cibles (Bertolotto *et al.*, 2011; Yokoyama *et al.*, 2011).

S'il existe clairement une augmentation de l'expression et/ou de l'activité de MITF dans les mélanomes suggérant fortement la participation de ce dernier à la tumorigenèse, les mécanismes sous-jacents restent encore mal compris. En effet, il existe un paradoxe entre l'expression de MITF et de ces cibles :

- alors que 80% des mélanomes expriment MITF, l'expression des gènes de différenciation cibles comme *TYR*, *TYRP1*, *DCT* ou *MART1* est très souvent éteinte.
- alors que l'amplification de *MITF* est facteur de mauvais pronostic, une forte expression de MITF et/ou de ces cibles est un facteur de meilleur pronostic (Miller and Mihm Jr, 2006).

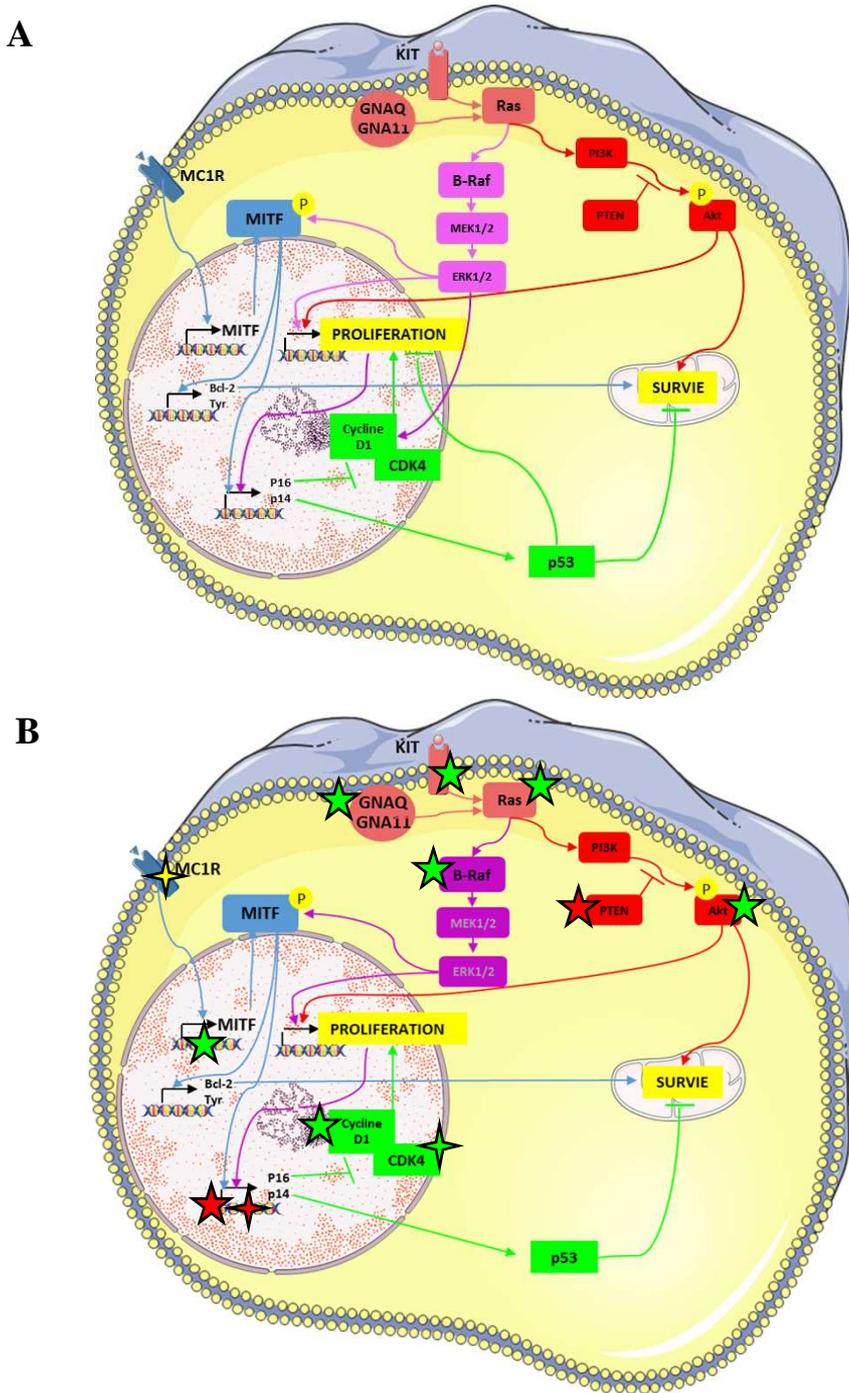


Figure 15 : Voies de signalisation impliquées dans la mélanomagenèse

A : Interrelations entre les différentes voies oncogéniques

B : Mutations retrouvées dans les mélanomes familiaux et sporadiques

- ★ Cible de mutations inactivatrices ou délétions dans les mélanomes sporadiques
- ★ Cible de mutations activatrices ou d'amplifications dans les mélanomes sporadiques
- ★ Cible de mutations inactivatrices ou délétions dans les mélanomes familiaux
- ★ Cible de mutations activatrice ou d'amplifications dans les mélanomes familiaux
- ★ Cible de mutations dans les mélanomes familiaux, dont l'effet est encore mal compris

2 hypothèses pourraient expliquer comment ce paradoxe est contourné au sein des cellules de mélanome et expliquer ainsi la participation de MITF à la tumorigenèse :

- L'expression de MITF doit être intermédiaire assurant l'activation de voies de survie et de prolifération contrôlées par MITF mais insuffisante à l'activation des voies induisant l'arrêt du cycle cellulaire (Figure 14C)
- Les effets de MITF sur le cycle cellulaire sont contrebalancés par d'autres altérations : l'association de mutations de *CDKN2A* inhibe par exemple l'effet de MITF sur l'arrêt du cycle cellulaire (Figure 15)

Dans tous les cas, MITF n'est pas un facteur suffisant à la mélanomagenèse mais il participe vraisemblablement à celle-ci en coopérant avec d'autres altérations comme l'activation de la voie MAPK et/ou la perte de *CDKN2A*.

b - MC1R

Le gène *MC1R* (MélanoCortine 1 Récepteur) code pour le récepteur à l' α -MSH (Melanocyte Stimulating Hormone) qui appartient à la famille des 5 récepteurs à la mélanocortine. Ces récepteurs sont composés de 7 domaines transmembranaires et sont couplés à des protéines G.

En réponse à l'exposition solaire, α -MSH est sécrétée, se fixe sur MC1R et induire ainsi la production d'AMPc. L'AMPc ainsi produit active la transcription de *MITF* suite à la fixation de CREB (cAMP Response Element-Binding protein) sur le promoteur de ce dernier. MITF induit alors l'expression des enzymes impliquées dans la synthèse de l'eumélanine (Miller and Mihm Jr, 2006; Tsao *et al.*, 2012a).

Il existe chez l'Homme de nombreux polymorphismes de *MC1R* : 75 variations non silencieuses sont actuellement répertoriées (Ibrahim and Haluska, 2009). Certains de ces variants sont associés à une moindre activité du récepteur et une absence de synthèse de mélanine en réponse aux UV responsables d'une phototype très clair (phototype 1), d'une absence de photoprotection et augmentant donc le risque de mélanome (Rebecca *et al.*, 2012). Près de 80% des personnes rousses sont porteuses d'un variant déficient de *MC1R* (Tsao *et al.*, 2012a).

Cependant, MC1R interviendrait également dans la mélanomagenèse indépendamment de son rôle dans la détermination du phototype. En effet, certains variants de *MC1R* ne sont pas associés à un phototype clair et augmentent tout de même le risque de mélanome (Kennedy *et al.*, 2001; Raimondi *et al.*, 2008). Le mécanisme en jeu reste à élucider. Les mutations de *MC1R* pourraient coopérer avec celles de *CDKN2A* ou de *BRAF* (Ibrahim and Haluska, 2009).

6 - Conclusions et réflexions sur la carcinogenèse du mélanome

Les voies de signalisation altérées dans les mélanomes semblent relativement spécifiques de ce cancer. Elles sont résumées dans la figure 15. Nous retiendrons à titre d'exemple la faible fréquence des mutations de *TP53* alors que cette dernière dépasse 50% dans les autres cancers.

Par ailleurs, si les voies décrites ci-avant jouent un rôle dans la mélanomagenèse, aucune ne semble suffisante à induire individuellement le développement d'un mélanome. A titre de comparaison, dans des modèles murins transgénique de cancers du poumon, l'expression localisée des formes mutées du récepteur à l'EGF (EGFR), EGFR^{L858R} ou EGFR^{ΔL747-5752}, retrouvées dans les cancers broncho-pulmonaires chez l'Homme suffit à induire le développement d'adénocarcinomes pulmonaires invasifs (Politi, 2006). Dans les mélanomes, il semble que l'association de plusieurs mutations soit nécessaire au développement tumoral, contrairement au cancer bronchique où l'expression d'un seul oncogène, tel que *KRAS*^{G12D} induit le développement d'adénocarcinomes (Fisher, 2001). Chez la souris, l'altération concomitante d'au moins 2 voies est nécessaire au développement des mélanomes (Damsky Jr and Bosenberg, 2010). Il est possible que la souris ne soit pas le meilleur modèle d'étude du mélanome. En effet, de manière spontanée, les souris ne développent que très rarement des mélanomes et la nécessité d'altérations de plusieurs voies pourraient être liée à cette relative résistance. D'autre part, chez la souris, les mélanocytes sont localisés dans le derme et le bulbe pileux alors qu'ils sont retrouvés dans la couche germinative de l'épiderme chez l'Homme. La physiopathologie du mélanome et en particulier celle du stade RGP pourrait donc être très différentes entre l'Homme et la souris.

Cependant des arguments soutiennent l'hypothèse que chez l'Homme d'une telle coopération entre les différentes voies soit également nécessaire à la transformation des mélanocytes :

- Les différentes voies entretiennent des interrelations (Figure 15).
- La transformation de mélanocytes nécessite l'altération de plusieurs voies. Par exemple, Garraway et ses collaborateurs parviennent à transformer des mélanocytes après inactivation de p53, activation de CDK4, hTERT, B-Raf et surexpression de MITF (Garraway *et al.*, 2005).
- Certaines études ont mis en évidence chez l'Homme des profils de mutations fréquents dans les mélanomes (Colombino *et al.*, 2012; Daniotti *et al.*, 2004; Tsao *et al.*, 2004a).
- Enfin, dans le poisson zèbre, autre modèle transgénique fréquemment utilisé, des altérations conjointes de plusieurs voies sont nécessaires. Par exemple, la mutation *BRAF*^{V600E} conduit uniquement à une hyperplasie des cellules mélanocytaires alors qu'en association à la perte de *TP53* des lésions mélanocytaires invasives se développent.

7 - Implication du micro-environnement dans la mélanomagenèse

Une des hypothèses expliquant le fait que l'altération d'une seule voie ne soit pas suffisante à induire l'apparition de mélanomes *in vitro* ou dans des modèles animaux est le rôle que le microenvironnement tumoral est susceptible de jouer dans le développement de ce cancer. En effet, depuis les années 2000, le rôle du microenvironnement dans l'initiation et la progression tumorale a suscité un intérêt grandissant comme le souligne Weinberg dans la seconde édition de sa revue «Hallmark of cancer » datée de 2011 (Hanahan and Weinberg, 2011). L'ensemble des constituants du microenvironnement semble impliqué à des degrés variables selon la nature du cancer : facteurs de croissance, cellules immunes (macrophages, lymphocytes T, cellules NK et cellules présentatrices de l'antigène), fibroblastes des tissus conjonctifs environnants et fibroblastes associés à la tumeur, vaisseaux sanguins et lymphatiques (plus particulièrement les cellules endothéliales) et matrice extracellulaire.

De nombreux travaux et revues émanant en particulier de l'équipe du Pr M. Herlyn soutiennent depuis les années 90 l'hypothèse selon laquelle les mélanomes seraient des tumeurs particulièrement dépendantes du microenvironnement (Herlyn and Shih, 1994; Villanueva and Herlyn, 2008). Ceci pourrait, au moins partiellement, expliquer l'absence de modèles monogéniques de mélanome chez la souris et le poisson zèbre. En effet, chez l'Homme, l'apparition d'un mélanome serait liée à la conjonction de l'acquisition d'une mutation clé et d'altérations conjointes du microenvironnement favorisant l'émergence de la mutation clé. Dans les modèles tumoraux monogéniques murins, l'altération du microenvironnement n'étant pas reproduite, le développement tumoral serait alors inhibé et/ou contrôlé. L'absence de ces altérations du microenvironnement étant compensée par des altérations génétiques supplémentaires dans les modèles de souris transgéniques.

De nombreux travaux tentent de disséquer l'implication du microenvironnement dans la tumorigenèse. Les facteurs cruciaux induisant l'initiation et/ou la promotion tumorale étant, par définition, dépendants du contexte, ils pourraient fortement varier d'une tumeur à une autre et d'un patient à un autre. En effet, des thérapies visant à restaurer l'immunité anti-mélanome ont été développées depuis de nombreuses années (IL-2, TNF, vaccination, et plus récemment anticorps anti-CTLA4 et anti-PD1). Comme nous le verrons dans la partie présentant les traitements (partie I-C-2), force est de constater que si elles démontrent une efficacité remarquable chez certains patients faisant ainsi la preuve de concept, seul un sous-groupe de patients tire un bénéfice de ces thérapies. L'intérêt des thérapies ciblant le microenvironnement restera sûrement limité tant que le rôle respectif des différents éléments du microenvironnement ne sera pas clairement caractérisé et qu'il n'existera pas de biomarqueurs permettant de prédire les groupes de patients répondeurs.

	IMAGE NORMALE	IMAGE SUSPECTE
<p>A COMME ASYMÉTRIE : Grain de beauté de forme ni ronde ni ovale, dont les couleurs et les reliefs ne sont pas régulièrement répartis autour du centre.</p>		
<p>B COMME BORDS IRRÉGULIERS : Bords dentelés, mal délimités.</p>		
<p>C COMME COULEUR NON HOMOGENE : Présence de plusieurs couleurs (noir, bleu, marron, rouge ou blanc).</p>		
<p>D COMME DIAMÈTRE EN AUGMENTATION : En général supérieur à 6 mm.</p>		
<p>E COMME ÉVOLUTION : Toute tache pigmentée qui change d'aspect rapidement (forme, taille, épaisseur, couleur) est un signe d'alerte.</p>		
<p>+ PRINCIPE DU « VILAIN PETIT CANARD » : Il s'agit d'un grain de beauté ou d'une tache qui se démarque des autres.</p>		

Figure 16 : Illustration de la règle ABCDE permettant le dépistage des mélanomes

(D'après la fiche « détection précoce des cancers de la peau » de l'INCA)

C- Prise en charge

1 – Diagnostic

Le diagnostic et le dépistage du mélanome sont probablement parmi les défis les plus importants de la pratique clinique dermatologique.

a - Suspicion clinique de mélanome

Le diagnostic repose dans un premier temps sur l'évaluation clinique d'une lésion pigmentée atypique évoquant un mélanome. Plusieurs règles listant et pondérant les critères d'évocation du mélanome ont été définies par différentes instances nationales et internationales, nous parlerons ici des 2 plus couramment utilisées : la règle ABCDE et les 7 critères de Glasgow.

i – La règle ABCDE

L'évocation de mélanome doit être faite face à une lésion présentant une ou plusieurs des caractéristiques définies par la règle ABCDE (Asymétrie, Bord, Couleur, Diamètre, Evolution). La règle ABCD a été décrite pour la première fois en 1985 par Friedman *et al.* (Friedman *et al.*, 1985) dans l'objectif initial d'améliorer les capacités d'auto-dépistage des patients à risque. Elle a secondairement été complétée en 1998 par Thomas *et al.*, elle est alors devenue règle ABCDE prenant dorénavant en compte l'évolutivité de la lésion (Thomas *et al.*, 1998). Elle est à ce jour toujours utilisée de manière consensuelle par les cliniciens. Elle repose sur les 5 critères suivants (Figure 16) :

- **A**symétrie de la lésion (critère A)
- à **B**ords irréguliers, encochés, polycyclique, nettement délimités par rapport à la peau environnante (critères B)
- de **C**ouleur inhomogène, toutes les nuances chromatiques de la mélanine, du brun clair au noir foncé, pouvant être observées (critères C). De plus, des zones blanches où le pigment a disparu ainsi que des zones rouges inflammatoires ou cicatricielles peuvent également être présentes.
- de **D**iamètre supérieur à 6 mm (critère D)
- **E**volutive dans sa taille (élargissement de la lésion), sa couleur ou son épaisseur (critère E).

ii - Règle en 7 points de Glasgow

Cette règle a été établie en 1989, elle dérive de la règle ABCDE mais prend en compte 7 critères dont certains majeurs et d'autres mineurs et met l'accent sur la notion d'évolutivité de la lésion (MacKie, 1990). La suspicion de mélanome est établie dès lors que la lésion cumule 3 points sachant

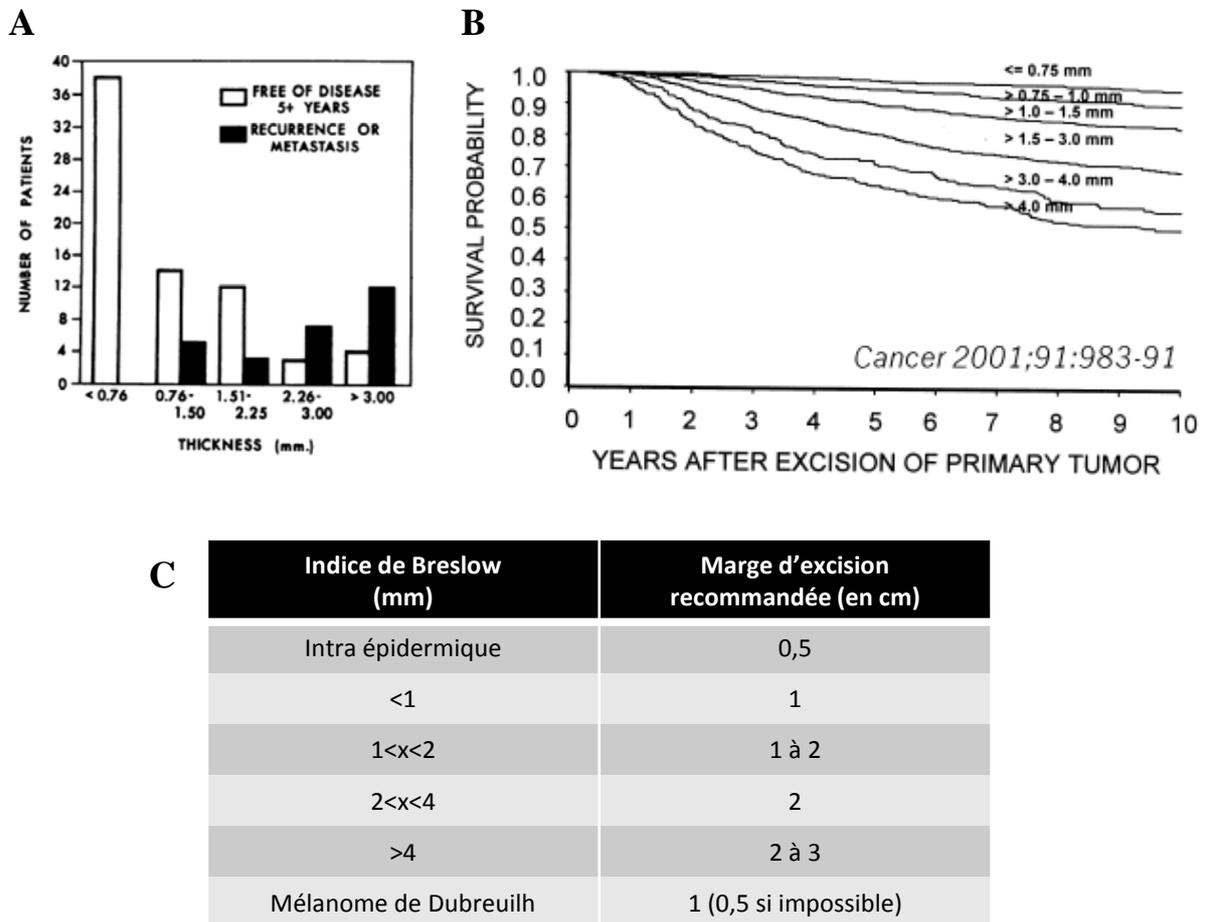


Figure 17 : L'indice de Breslow

A: Mise en évidence pour la première fois par Breslow en 1970 du lien entre l'épaisseur des mélanomes et l'apparition de métastases.
(D'après Breslow, 1970)

B: Courbe de survie en fonction de l'indice de Breslow publiée en 2001.
(D'après Owen, 2001)

C: Marge d'exérèse recommandée en France en fonction de l'indice de Breslow.

que chaque critère majeur compte 2 points et chaque critère mineur pour 1 point. Les critères établis sont les suivants :

- Critères majeurs :
 - Changement de la taille de la lésion, ou apparition d'une nouvelle lésion
 - Changement de la forme de la lésion
 - Changement de la couleur de la lésion

- Critères mineurs :
 - Diamètre supérieur à 7 mm
 - Inflammation
 - Présence d'une ulcération ou d'un saignement
 - Changement de sensibilité au siège de la lésion

La règle ABCDE et la règle de Glasgow servent actuellement principalement de base pour la formation des étudiants en profession de santé et des médecins non-dermatologues. Il a été montré que les dermatologues évaluent cliniquement les lésions pigmentées atypiques selon la « règle du vilain petit canard » (Grob and Bonerandi, 1998) ou selon une méthode dite « globale » basée sur l'expérience clinique du praticien (Gachon *et al.*, 2005; Gaudy-Marqueste *et al.*, 2011). Aucune évaluation clinique ne permet le diagnostic formel qui doit, au moindre doute, être confirmé par examen histopathologique sur la totalité de la tumeur.

iii - Dermoscopie

La suspicion de mélanome établie selon l'une des 2 règles précédentes conduit à l'exérèse de la lésion à des fins d'analyse anatomo-pathologique. Afin d'éviter l'exérèse inutile de lésion bénigne, des techniques d'imagerie permettant une analyse de la structure plus profonde de la lésion ont été développées. La dermoscopie est une technique de microscopie de surface (ou « microscopie en épiluminescence »), elle permet l'observation de la structure interne de l'épiderme, de la jonction dermo-épidermique et des couches superficielles du derme (Wang and Hashemi, 2010).

L'utilisation de cette technique est d'une part limitée par le coût de l'appareillage et par la formation particulière nécessaire aux praticiens qui n'est optimale qu'après 2 ans de formation. Par ailleurs, en dehors de cas très particuliers elle n'apporte pas de certitude diagnostique suffisante pour modifier la pratique thérapeutique si un doute persiste. Pour ces raisons, en dépit de son ancienneté, l'usage de cette procédure n'est à ce jour pas recommandée en routine en France (HAS, 2006).

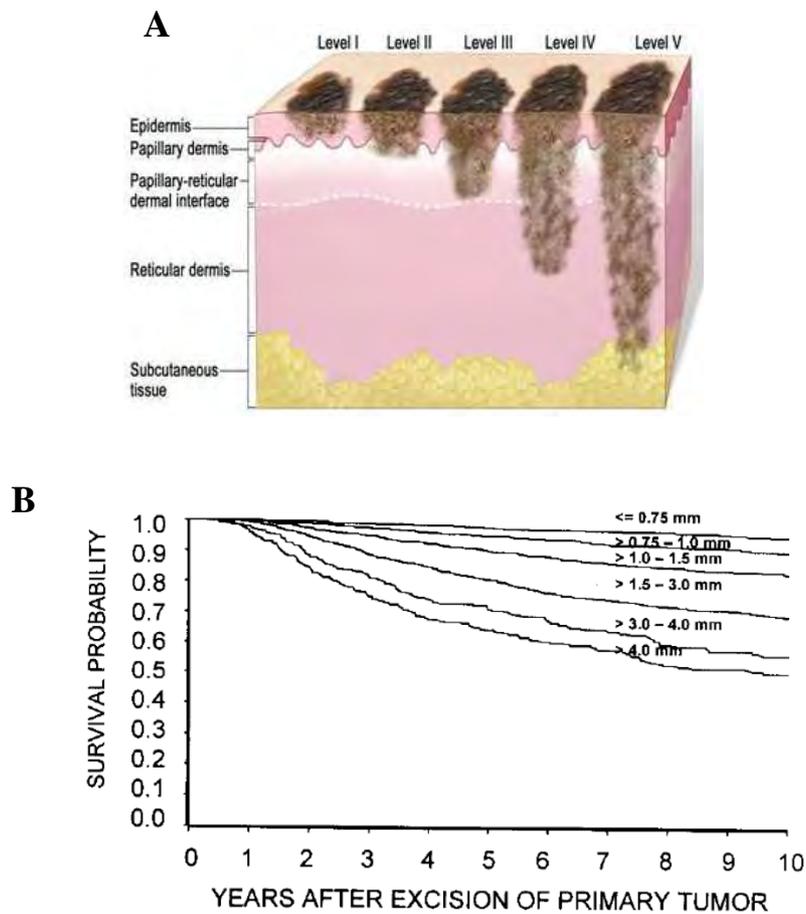


Figure 18 : Le niveau de Clark

A: Illustration de la définition des différents niveaux de Clark
(D'après <http://www.theoncologyinstitute.com/>)

B: Courbe de survie en fonction du niveau de Clark publiée en 2001.
(D'après Owen, 2001)

b - Diagnostic anatomopathologique

Le diagnostic clinique ne permet en fait que de suspecter la malignité d'une lésion pigmentaire et de recommander son exérèse. Le diagnostic sera établi par l'analyse histologique de la pièce d'exérèse par l'anatomopathologiste. L'examen histologique permettra d'affirmer la nature mélanocytaire de la tumeur, sa malignité éventuelle et de déterminer le caractère complet de l'exérèse. Le cas échéant l'anatomopathologiste devra notifier la présence d'une ulcération, mesurer l'indice mitotique ainsi que l'épaisseur de la tumeur (indice de Breslow) et enfin évaluer le niveau d'invasion (niveau de Clark). Ces 2 dernières informations seront particulièrement utiles pour déterminer le stade de la maladie et en conséquence sa prise en charge (HAS, 2012).

i - Indice de Breslow

L'indice de Breslow mesure l'épaisseur maximale en millimètre de la tumeur depuis la couche granuleuse de l'épiderme jusqu'à la cellule tumorale dermique la plus profonde. Le lien entre épaisseur du mélanome et pronostic a été établi pour la première fois en 1970 par Alexander Breslow (Breslow, 1970). Une épaisseur critique de 0,75 mm avait été établie par ce dernier. En deçà de cette épaisseur le risque d'apparition de métastases à 5 ans était quasi-nul alors qu'il augmentait progressivement au-dessus de cette valeur (Figure 17A). A ce jour, cet indice reste le critère pronostic principal du mélanome primaire, il participe à la détermination du stade et permet également de déterminer la taille des marges d'exérèse complémentaires (Figure 17B et C).

ii - Indice de Clark

L'indice de Clark a été défini par Wallace Clark en 1969 (Clark *et al.*, 1969). Il définit 5 stades de mélanome en fonction de l'invasion par le mélanome des tissus sous-jacents (Figure 18):

- Stade I : Le mélanome est confiné dans l'épiderme
- Stade II : Le mélanome a pénétré le derme papillaire, couche située immédiatement au-dessous de l'épiderme.
- Stade III : Le mélanome a totalement traversé le derme papillaire et affecte le derme réticulaire.
- Stade IV : Le mélanome envahit complètement le derme réticulaire.
- Stade V : Le mélanome envahit le tissu adipeux sous-cutané.

Cet indice a été petit à petit abandonné au profit de l'indice de Breslow. En effet, dès 2001 son utilisation n'était recommandée que pour les mélanomes présentant un indice de Breslow inférieur à 1 mm (Balch *et al.*, 2001) ; depuis 2009 son utilisation n'est plus recommandée car il ne constitue en réalité pas un facteur pronostic indépendant des autres facteurs pris en compte pour déterminer le stade de la maladie (Balch *et al.*, 2009). Cependant, cette exclusion de l'indice de Clark de la

Table 1. TNM Staging Categories for Cutaneous Melanoma

Classification	Thickness (mm)	Ulceration Status/Mitoses
T		
Tis	NA	NA
T1	≤ 1.00	a: Without ulceration and mitosis < 1/mm ² b: With ulceration or mitoses ≥ 1/mm ²
T2	1.01-2.00	a: Without ulceration b: With ulceration
T3	2.01-4.00	a: Without ulceration b: With ulceration
T4	> 4.00	a: Without ulceration b: With ulceration
N		
	No. of Metastatic Nodes	Nodal Metastatic Burden
N0	0	NA
N1	1	a: Micrometastasis* b: Macrometastasis†
N2	2-3	a: Micrometastasis* b: Macrometastasis† c: In transit metastases/satellites without metastatic nodes
N3	4+ metastatic nodes, or matted nodes, or in transit metastases/satellites with metastatic nodes	
M		
	Site	Serum LDH
M0	No distant metastases	NA
M1a	Distant skin, subcutaneous, or nodal metastases	Normal
M1b	Lung metastases	Normal
M1c	All other visceral metastases	Normal
	Any distant metastasis	Elevated

Abbreviations: NA, not applicable; LDH, lactate dehydrogenase.
*Micrometastases are diagnosed after sentinel lymph node biopsy.
†Macrometastases are defined as clinically detectable nodal metastases confirmed pathologically.

Table 2. Anatomic Stage Groupings for Cutaneous Melanoma

	Clinical Staging*			Pathologic Staging†			
	T	N	M	T	N	M	
0	Tis	N0	M0	0	Tis	N0	M0
IA	T1a	N0	M0	IA	T1a	N0	M0
IB	T1b	N0	M0	IB	T1b	N0	M0
	T2a	N0	M0		T2a	N0	M0
IIA	T2b	N0	M0	IIA	T2b	N0	M0
	T3a	N0	M0		T3a	N0	M0
IIB	T3b	N0	M0	IIB	T3b	N0	M0
	T4a	N0	M0		T4a	N0	M0
IIC	T4b	N0	M0	IIC	T4b	N0	M0
III	Any T	N > N0	M0	III	T1-4a	N1a	M0
					T1-4a	N2a	M0
					T1-4b	N1a	M0
					T1-4b	N2a	M0
					T1-4a	N1b	M0
					T1-4a	N2b	M0
					T1-4a	N2c	M0
IIIC	Any T	N3	M0	IIIC	T1-4b	N1b	M0
					T1-4b	N2b	M0
					T1-4b	N2c	M0
IV	Any T	Any N	M1	IV	Any T	Any N	M1

*Clinical staging includes microstaging of the primary melanoma and clinical/radiologic evaluation for metastases. By convention, it should be used after complete excision of the primary melanoma with clinical assessment for regional and distant metastases.
†Pathologic staging includes microstaging of the primary melanoma and pathologic information about the regional lymph nodes after partial (ie, sentinel node biopsy) or complete lymphadenectomy. Pathologic stage 0 or stage IA patients are the exception; they do not require pathologic evaluation of their lymph nodes.

Figure 19 : Détermination du grade des mélanomes

Table 1: Méthode de détermination du TNM dans le mélanomes

Table 2: Détermination du grade des mélanomes en fonction de leur TNM

(D'après Balch, 2009)

classification pronostique de l'AJCC est sujette à discussion, et cet indice reste recommandé dans les recommandations européennes de prise en charge du mélanome de l'ESMO de 2011 (Dummer *et al.*, 2012).

La détermination de l'indice de Clark comme celui de Breslow nécessite l'inclusion en paraffine et la découpe de l'intégralité de la tumeur afin de localiser « la cellule » ayant envahi le plus profondément le tissu sous-jacent. Ceci a un impact sur la recherche biomédicale du mélanome, puisque virtuellement aucune tumeur primaire fraîche n'est accessible pour les chercheurs et aucune nouvelle lignée ne peut être établie à partir des tumeurs primaires.

c - Détermination du grade

Sur la base des données de suivi de 17 600 patients dans 13 centres américains de traitement du cancer, l'American Joint Committee on Cancer (AJCC) a établi une classification des mélanomes en stades pronostiques (I à IV) qui prend en compte l'épaisseur et l'ulcération de la tumeur (classification T), le nombre et la taille des adénopathies (classification N), l'existence de métastases à distances et leur localisation (classification M). Un descriptif de cette classification est présenté dans la figure 19. Brièvement, les stades I et II correspondent à des mélanomes sans adénopathies (N0), ni métastases (M0). Les sous-groupes A, B ou C correspondent à des différences d'épaisseur (indice de Breslow) et/ou à la présence d'ulcération. Les stades III et IV correspondent à des mélanomes ayant métastasé respectivement au niveau loco-régional ou à distance (Balch *et al.*, 2001, 2009). Cette classification fait également référence en France (HAS, 2012).

d - Bilan d'extension

Afin de confirmer le stade de la maladie (TNM), le bilan d'extension est pratiqué en fonction du stade pré-déterminé (pTNM) par les premiers examens cliniques et les résultats de l'analyse histologique de la tumeur. Un arbre décisionnel de ces examens est présenté figure 20. Aucun bilan d'extension n'est nécessaire pour les mélanomes *in situ* (T0)(HAS, 2012).

i - Examen clinique complet

Dans tous les cas, le bilan d'extension comprend un examen clinique complet et méticuleux. L'intégralité du revêtement cutané sera inspectée à la recherche d'un 2^{ème} mélanome synchrone, d'un nævus congénital ou atypique. Par ailleurs, les aires ganglionnaires et les organes abdominaux seront palpés à la recherche d'une extension loco-régionale ou systémique.

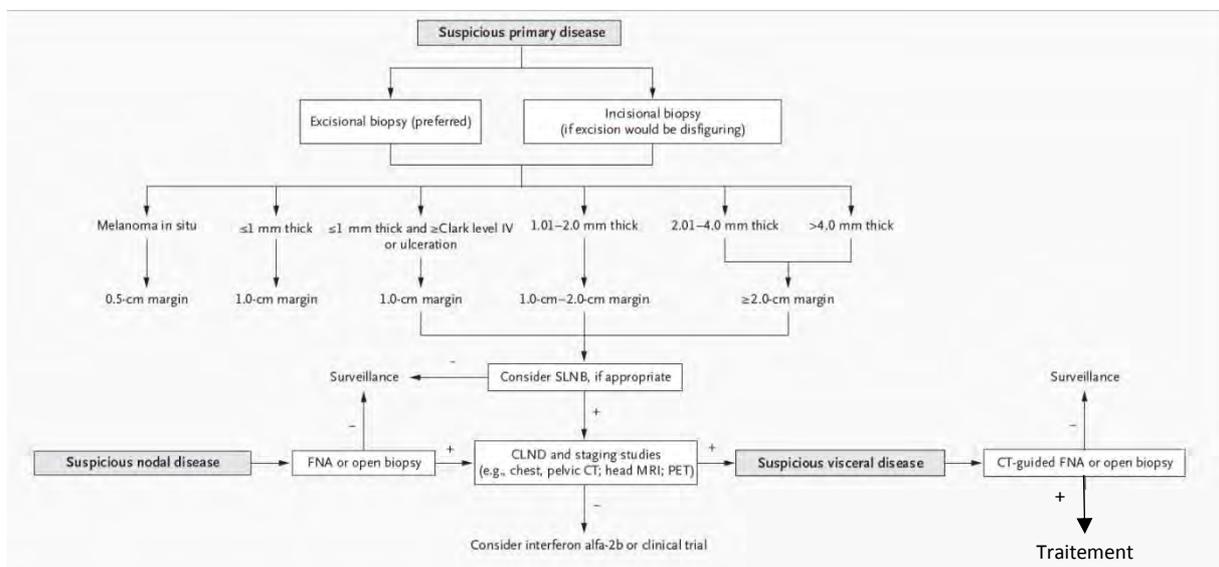


Figure 20 : Arbre décisionnel de prise en charge des mélanomes

SLNB: biopsie du ganglion sentinelle

CLNB: curage ganglionnaire

FNA: biopsie à l'aiguille fine

(D'après Tsao, 2004)

ii - Chirurgie du ganglion sentinelle

Le ganglion sentinelle est le premier ganglion recevant le drainage lymphatique d'une tumeur. La technique de la biopsie du ganglion sentinelle a pour objectif l'identification anatomique de ce(s) ganglion(s) par injection d'un colorant vital (bleu patenté), et son exérèse pour étude anatomopathologique à la recherche de la présence de cellules tumorales (micro-métastases). Cet examen permet d'évaluer de manière plus précise le statut ganglionnaire de l'aire de drainage tout en limitant les risques induits par une chirurgie ganglionnaire plus radicale. En cas de positivité du ou des ganglions sentinelles, un curage ganglionnaire complémentaire sera proposé.

A ce jour, cette technique n'est pas recommandée de manière systématique mais elle est très souvent proposée dans le cadre d'essais clinique à partir du stade IB (Gershenwald and Ross, 2011; HAS, 2012; Lourari *et al.*, 2012; Tsao *et al.*, 2004b). La chirurgie de ganglion sentinelle est actuellement considérée comme une procédure visant à déterminer le stade de la maladie mais n'a montré aucun effet en matière d'amélioration du pronostic de la maladie.

iii - Imagerie

Une échographie loco-régionale de la zone de drainage est recommandée pour les stades II et III à la recherche de métastase loco-régionales en particulier ganglionnaires.

Des TomoDensitoMétries thoraco-abdomino-pelviennes et cérébrales seront pratiquées aux stades IIC et III à la recherche de métastases viscérales.

Enfin, la Tomographie à émission de positron (TEP) au 18F-FDG ne sera pratiquée que chez les stades III du fait du coût d'un tel examen et de la disponibilité des appareils nécessaires.

iiii - Biologie

La biologie n'a que très peu d'indication dans le bilan d'extension et le suivi des mélanomes. En effet à ce jour, aucun marqueur tumoral relevant n'a été identifié. Seule la mesure du taux de LDH, représentatif de la masse, aurait un intérêt pronostique, peu informatif, en cas de métastases (HAS, 2012; Thompson *et al.*, 2005a).

2 - Traitement

a - Chirurgie

i - Exérèse tumorale

L'exérèse complète de la tumeur primaire est le seul traitement curatif du mélanome. L'exérèse permet la confirmation du diagnostic et précise l'épaisseur du mélanome (indice de Breslow). Si le diagnostic est confirmé, une reprise chirurgicale préventive est nécessaire afin de réduire les risques de récurrence loco-régionale (Figure 17C)(Bichakjian *et al.*, 2011). La reprise élargie est guidée par 3 principes : 1- elle réduit le risque de récurrence locale et régionale ; 2- des marges supérieures à 1 cm n'améliorent pas le pronostic pour les mélanomes de moins de 1 mm d'épaisseur ; 3- des marges de plus de 2 cm n'améliorent pas le pronostic pour les mélanomes de plus de 1 mm d'épaisseur.

ii - Curage ganglionnaire

Il est indiqué chez les patients présentant une atteinte ganglionnaire (N+) qu'elle soit clinique (ganglion palpable dont la nature tumorale a été authentifiée par adenectomie ou cytoponction ganglionnaire), établie par imagerie suite à l'échographie loco-régionale ou par positivité du ganglion sentinelle. Il consiste en l'ablation de l'intégralité des ganglions de l'aire drainante. Par exemple, les ganglions axillaires pour une tumeur localisée sur un membre supérieur ou les ganglions inguinaux pour le membre inférieur. Ce dernier peut être réalisé lors du diagnostic initial ou plusieurs mois/années plus tard suite à la détection clinique ou par imagerie d'une atteinte ganglionnaire.

Le curage ganglionnaire systématique est à proscrire du fait de l'absence d'amélioration du pronostic vital et des effets indésirables engendrés en particulier sur le long terme qui peuvent être responsables d'une altération de la qualité de vie pour les patients. L'effet indésirable le plus fréquent est l'apparition d'un lymphœdème, c'est-à-dire une rétention lymphatique par obstacle au drainage dans la région drainée par la chaîne ganglionnaire opérée (HAS, 2012).

iii - Chirurgies des métastases

La chirurgie des métastases est tout particulièrement indiquée pour les métastases loco-régionales (rechute locale, métastases cutanées en transit, métastases du/des ganglions drainants). Suite à une telle prise en charge, 13 à 59% des patients atteindraient une guérison complète (Thompson *et al.*, 2005a).

Dans le cas de métastases viscérales en dehors de la métastase unique vérifiée par imagerie, l'intérêt de leur ablation chirurgicale reste limité même si certaines études suggèrent qu'une telle prise en charge pourrait augmenter la survie (Thompson *et al.*, 2005a).

b - Immunothérapie

Le rôle de l'immunité dans le développement des cancers a été suggéré depuis le XIX^{ème} siècle. Naturellement, le système immunitaire, et en particulier les lymphocytes NK (Natural Killer), identifie les tumeurs comme du soi altéré et l'élimine. Au cours de la carcinogenèse, les tumeurs développent une série de stratégies pour échapper au système immunitaire. Parmi les cancers, le mélanome serait une tumeur très immunogène dans laquelle le rôle de l'immunité est accru. Ceci est notamment mis en évidence par le nombre non-négligeable de régressions spontanées observées chez les patients porteurs de mélanome et ceci même au stade métastatique (Kalialis *et al.*, 2009). De plus, les mélanomes présentent régulièrement un infiltrat de lymphocytes T, la présence de cet infiltrat est un marqueur de bon pronostic montrant ainsi que l'identification de la tumeur par l'immunité en tant que telle et le recrutement des acteurs de l'immunité favorise l'élimination de la maladie (Nikolaou *et al.*, 2012). Enfin, on peut retrouver chez de nombreux patients une immunité (anticorps et/ou lymphocytes T) spécifiquement dirigée contre des marqueurs de différenciation mélanocytaire tel que MAGE-1 ou gp100. De ce fait, l'étude des interactions immunité/tumeur et les stratégies d'immunothérapie se sont surtout focalisées sur le mélanome. L'application des stratégies d'immunothérapie à la prise en charge du mélanome est un concept ancien puisque les premières publications sur ce sujet datent des années 60-70.

Ces dernières stratégies visent à stimuler le système immunitaire du patient afin que ce dernier élimine ou au moins contrôle la tumeur. Cette stimulation peut être faite de manière non spécifique, l'ensemble du système immunitaire est activé ou spécifiquement dirigée contre la tumeur. Historiquement, les stratégies aspécifiques consistent à administrer localement un agent pathogène contre lequel l'hôte a été préalablement vacciné tel que le bacille de Calmette et Guérin (BCG) afin de stimuler localement la mise en place d'une réponse immunitaire. Cette stratégie a notamment été utilisée en routine pour les cancers de la vessie. Plus récemment suite au développement des biotechnologies et à la possibilité d'administrer des protéines purifiées, l'utilisation de cytokines capables de stimuler de manière systémique la réponse immune a été développée. 2 produits ont en particulier obtenu une AMM dans le traitement du mélanome l'interféron α (IFN α) et l'interleukine-2 (IL-2).

Ces stratégies de stimulation du système immunitaire peuvent également être dirigées plus particulièrement contre la tumeur. Par exemple, des stratégies vaccinales ciblant des antigènes

mélanocytaires tel que gp100 ou MAGE-1 ont été développées ainsi que des transferts adoptifs de cellules dendritiques ou de lymphocytes préalablement activés contre les antigènes tumoraux *in vitro*. De nombreux essais cliniques ont été menés mais à ce jour aucun n'a montré d'efficacité thérapeutique suffisante pour conduire à une AMM.

i - Interféron α (IFN α)(ROFERON-A et INTRONA)

Les interférons sont des cytokines physiologiquement produites par le système immunitaire en réponse à des pathogènes tels que les virus ou les bactéries. La sécrétion d'interféron stimule les cellules de l'immunité telles que les lymphocytes NK et les macrophages afin d'augmenter la reconnaissance et l'éradication des pathogènes mais également des cellules tumorales. Ainsi l'administration d'interféron devrait stimuler la reconnaissance des tumeurs par le système immunitaire.

L'AMM de l'IFN α a été octroyé pour la première fois en 1999 par la commission européenne en traitement adjuvant du mélanome avancé. A ce jour, il est toujours utilisé dans les 2 cas suivants :

- Mélanome de stade II (c'est-à-dire sans atteinte ganglionnaire) présentant un indice de Breslow > 1,5 mm : l'IFN α peut être proposé à faible dose (3 MUI - Millions d'Unités Internationales) à raison de 3 injections sous-cutanées 3 fois par semaine pendant 18 mois, protocole dit « Grob ».

- Mélanome de stade III initial ou suite à une récurrence loco-régionale : l'IFN α est alors proposé à forte dose (20 MUI/m² de peau/jour) en perfusion intraveineuse 5 jours sur 7 pendant 1 mois suivi d'une dose un peu plus faible (10 MUI/m²) en sous-cutanée, 3 fois par semaine pendant 11 mois, protocole dit « Kirkwood ». Il est cependant communément admis que 2 sous-populations de patients semblent plus à même de montrer un effet positif de l'interféron : les patients présentant un mélanome primaire ulcéré et ceux présentant une métastase infra-clinique du mélanome (détectée par la procédure du ganglion sentinelle)(Eggermont *et al.*, 2012).

L'administration d'IFN α est responsable d'effets indésirables qui peuvent être relativement sévères, ils sont fonction de la dose, sont généralement plus importants à l'initiation du traitement mais peuvent également beaucoup varier d'un patient à l'autre. Ils peuvent donner lieu à un syndrome pseudo-grippal, des troubles digestifs, une alopécie, une hémato-toxicité, une anorexie ou des affections psychiatriques en particulier des dépressions, des troubles cardiaques, une hépatite cytolytique parfois gravissime (HAS, 2012).

L'efficacité de ces protocoles semble par ailleurs limitée puisqu'ils permettent une augmentation de la survie sans progression mais pas de la survie globale (Thompson *et al.*, 2005a). Pour ces raisons, le rapport bénéfice/risque de l'IFN α est jugé défavorable par plusieurs écoles et la prescription de ce traitement reste le sujet de nombreux débats.

ii – L'interleukine 2 (IL-2)(PROLEUKIN)

L'interleukine 2 (IL-2) est physiologiquement produite par les lymphocytes T CD4 activés ainsi que les lymphocytes NK, elle induit la prolifération et favorise la survie des lymphocytes B, T et NK.

Dès 1985, des essais cliniques évaluant l'intérêt d'injection d'IL-2 chez des patients atteints de mélanomes métastatiques ont été menés conduisant à la délivrance d'une AMM aux USA en 1998 pour le traitement du mélanome métastatique en 2^{ème} ligne après une première ligne de traitement incluant une chimiothérapie. L'IL-2 offre la possibilité d'une rémission complète et durable dans cette maladie, mais seulement dans un faible pourcentage des patients, 6 % de réponse complète et 12 % de réponse partielle d'après les informations mentionnées sur la monographie du Proleukin.

De plus, il est à noter que l'IL-2 induit des effets indésirables sévères de type hémato-toxicité, troubles cardiovasculaires (tachycardie, hypotension) souvent à l'origine d'insuffisances cardiaques aiguës pouvant aller jusqu'au choc cardiogénique, nerveux (anxiété, convulsions, vertiges, céphalées, somnolence), respiratoires (dyspnée, toux), digestifs (anorexie, nausées, vomissements, diarrhées, stomatite), cutanés (érythème, rash, prurit) et rénaux (oligurie) pour les plus fréquents.

La lourdeur du profil d'effets indésirables de l'IL-2 a largement restreint son utilisation qui est restée quasi-exclusivement l'apanage des prises en charges du continent Nord-Américain.

c - Chimiothérapie

La chimiothérapie est indiquée dans les mélanomes métastatiques c'est-à-dire de stade IV ou pour les mélanomes de stade III non résécables (ie : l'intégralité de la tumeur initiale et/ou des atteintes loco-régionales ne peuvent être totalement réséquées). Cependant ces chimiothérapies sont d'une efficacité très limitée. En effet, les mélanomes sont relativement chimio-résistants, ceci serait lié à des voies de résistance à l'apoptose activées de manière intrinsèque au cours de la mélanomagenèse telle que l'expression de Bcl-2 induite par MITF. De ce fait, uniquement 2 molécules de chimiothérapies ont obtenu une AMM dans le mélanome métastatique. La Dacarbazine est prescrite en première ligne en monothérapie en l'absence de métastases cérébrales, la Fotémustine est prescrite en première ligne en cas de métastases cérébrales ou en seconde ligne en cas d'échec de la Dacarbazine. En dehors de ces recommandations il n'existe aucun consensus concernant une deuxième ligne de traitement. En dépit de l'absence d'AMM pour cette indication, le Cisplatine est souvent utilisé en 2^{ème} ou 3^{ème} ligne.

A ce jour, les patients métastatiques sont préférentiellement traités en première ligne avec les thérapies ciblées disponibles si mutation $BRAF^{V600X}$, par Dacarbazine en l'absence de mutation de $BRAF$ ou inclus dans des essais cliniques. Les patients chez qui une mutation $BRAF^{V600}$ n'est pas identifiée

peuvent recevoir l'Ipilimumab (voir ci-après partie I-C-e-i) en seconde ligne. Il n'est actuellement pas possible pour des raisons administratives indépendantes des résultats des études cliniques, de prescrire l'Ipilimumab à un patient porteur d'une mutation *BRAF*^{V600X}.

i - Dacarbazine (DETICENE)

La Dacarbazine est un agent alkylant, il forme des adduits sur l'ADN, bloquant ainsi la progression de la fourche de réplication de l'ADN et inhibant finalement la prolifération cellulaire. Cette molécule a obtenu une AMM pour le mélanome métastatique en 1976.

Trente ans plus tard, la Dacarbazine est encore une des seules molécules indiquées dans le mélanome métastatique malgré une efficacité extrêmement limitée. En effet, une réponse n'est obtenue que pour 5-20% de patients selon les études. La Dacarbazine est indiquée en monochimiothérapie pour les mélanomes de stade III non opérables et les mélanomes de stade IV sans métastases cérébrales. Elle est alors administrée à la dose de 1000 mg/m²/jour par injection intraveineuse toutes les 3 semaines.

Du point de vue des effets indésirables, la Dacarbazine est une chimiothérapie fortement émétisante mais les vomissements sont relativement bien contrôlés par une prémédication à base de sétrons, aprepitant et dexaméthasone. En dehors des vomissements, la Dacarbazine est une chimiothérapie « relativement » bien tolérée d'un point de vue de l'état général, elle n'induit pas d'alopécie mais expose à un risque de thrombopénie.

ii - Fotémustine (MUPHORAN)

C'est un agent alkylant de la famille de nitroso-urées. Il forme au même titre que la Dacarbazine des adduits sur l'ADN et inhibe ainsi la prolifération cellulaire. Il a la particularité contrairement à la Dacarbazine de traverser la barrière hémato-encéphalique.

Un essai clinique de phase III a montré la supériorité de la Fotémustine face à la Dacarbazine (Avril *et al.*, 2004). Cependant, en l'absence de métastases cérébrales, la Dacarbazine est généralement préférée. En effet, du fait du peu d'options thérapeutiques disponibles, la Fotémustine est conservée en traitement de réserve qui sera utilisé lors de l'apparition de métastases cérébrales.

Cette chimiothérapie est modérément émétisante et induit une hémato-toxicité, malgré tout elle est assez bien tolérée par la majorité des patients.

iii - Témzolomide (TEMODAL)

C'est une prodrogue du métabolite actif de la Dacarbazine administrable par voie orale, elle présente une meilleure biodisponibilité et est capable de traverser la barrière hémato-encéphalique.

Bien qu'il ne possède pas d'AMM dans cette indication, le Témzolomide est utilisé dans les mélanomes métastatiques avec des atteintes cérébrales et/ou lorsqu'une administration orale semble nécessaire. Un essai clinique de phase III comparatif avec la Dacarbazine n'a cependant pas montré de supériorité du Témzolomide (Middleton *et al.*, 2000).

Son mode d'action et ses effets indésirables sont exactement les mêmes que ceux de la Dacarbazine.

d - Radiothérapie

La radiothérapie est globalement peu utilisée dans le mélanome et peu d'études sérieuses ont été menées sur son efficacité. Elle est généralement prescrite à visée palliative pour les métastases osseuses symptomatiques ou cérébrales non opérables (HAS, 2012). Il est cependant intéressant de noter l'intérêt des procédures de radiothérapie stéréotaxique pour le cas particulier des métastases cérébrales de petite taille (<3cm) en nombre restreint (≤ 3). La radiothérapie permet surtout d'améliorer la qualité de vie des patients en réduisant les symptômes.

e - Thérapies ciblées

Comme nous venons de le voir ci-dessus, entre le début des années 1980 et 2010 très peu de progrès ont été faits dans la prise en charge du mélanome métastatique et aucun nouveau médicament n'a obtenu d'AMM dans cette indication, malgré plus de 4000 essais thérapeutiques différents sur le sujet. Depuis près de 15 ans, l'avènement de thérapies ciblées a largement modifié la prise en charge et le pronostic de nombreux cancers mais aucune n'était jusqu'alors indiquée dans le mélanome. En 2011, 2 thérapies ciblées ont obtenu une AMM européenne et de nombreux autres médicaments sont actuellement en cours d'évaluation.

i - Ipilimumab (YERVOY)

L'Ipilimumab est un anticorps monoclonal bloquant dirigé contre l'antigène 4 des lymphocytes T cytotoxiques (CTLA4). Le CTLA4 est un récepteur membranaire des lymphocytes T CD8 inhibant ces derniers après interaction avec les molécules de co-stimulation B7 exprimées par les cellules présentatrices d'antigène. Le blocage de CTLA4 aurait une activité anti-tumorale via l'augmentation de la production d'interféron, la stimulation de l'expression de molécules de CMH (Complexe Majeur d'Histocompatibilité) de classe I à la surface des tumeurs, l'induction de l'apoptose des cellules tumorales mais également une réduction de l'angiogénèse.

Un essai clinique de phase III a comparé l'Ipilimumab seul ou associé à une vaccination contre le peptide gp100 à la vaccination seule. Cet essai a montré une supériorité en terme de survie globale de l'Ipilimumab par rapport au vaccin seul (10,0 mois pour l'Ipilimumab et 6,4 mois pour la vaccination) mais pas de l'association (10,0 mois *versus* 10,1 mois)(Hodi *et al.*, 2010). Les résultats de cette étude pilote ont été confirmés dans une seconde étude de phase III comparant l'Ipilimumab à la Dacarbazine (Robert *et al.*, 2011a).

Cet essai a conduit à l'obtention d'une AMM européenne en août 2011 avec une indication dans le mélanome métastatique mais uniquement en 2^{ème} ligne. En effet, la Haute Autorité de Santé (HAS) a conclu que ce traitement présentait un service médical rendu important de par la gravité de l'indication et le manque d'alternatives validées. Cependant, l'amélioration du service médical rendu (ASMR) a été jugé mineure de par le faible impact en terme de survie sans progression (HAS, 2011). Actuellement, l'accès de la molécule est restreint, pour des raisons administratives indépendantes des résultats des études de phase III, aux patients dont le mélanome ne présente pas de mutations de *BRAF*.

L'Ipilimumab présente un profil d'effets indésirables complexes, marqué par des manifestations inflammatoires sévères pouvant toucher tous les organes. Ceci conjugué à un coût très élevé et un taux de réponse proche de 30% rendent son utilisation et son positionnement dans la stratégie thérapeutique difficile à préciser et ce d'autant plus qu'il n'existe aucun critère prédictif de la réponse.

ii - Vémurafenib (ZELBORAF)

Le Vémurafenib est un inhibiteur de la forme mutée B-Raf^{V600E}. Ce traitement représente une avancée majeure dans la prise en charge et la compréhension de l'oncogenèse des mélanomes métastatiques. Cette molécule a montré son efficacité dans le traitement des formes métastatiques des mélanomes porteurs d'une mutation *BRAF*^{V600X} (Chapman *et al.*, 2011). Le taux de réponse objective (>30% selon les recommandations RECIST) à ce traitement est proche 50% et le traitement améliore significativement la survie globale des patients, mais la majorité d'entre eux présente un échappement avec un délai médian de 6-8 mois. Nous détaillerons dans le chapitre suivant son mécanisme d'action, son efficacité mais également les résistances à ce dernier.

iii - Thérapie ciblées en cours d'évaluation ou en attente d'AMM

De nombreuses thérapies ciblées sont en cours d'évaluation dans les mélanomes métastatiques, ces dernières sont listées dans la figure 21. Ces dernières ciblent majoritairement les voies de signalisation dont la fonction est altérée dans les mélanomes (décrites dans la partie II-B). Il est à prévoir que l'efficacité de ces inhibiteurs puisse fortement varier en fonction des combinaisons

de mutations présentes dans la tumeur cible. De plus, l'efficacité de ces thérapies pourrait être renforcée par des associations synergiques. Les associations en cours d'évaluation incluant des inhibiteurs de B-Raf ou de MEK sont détaillées dans la chapitre suivant (partie II-C-6) et ce travail doctoral démontre en particulier l'intérêt d'associer des inhibiteurs de B-Raf ou MEK avec des inhibiteurs d'AKT.

3 - Prévention et dépistage

a - Prévention

L'exposition solaire constitue le principal facteur de risque du mélanome en dehors des prédispositions génétiques (phototype, antécédents familiaux, mutations constitutionnelles). Il constitue donc à un facteur de risque évitable majeur. Depuis les années 80, de nombreuses campagnes de communication ont visé à sensibiliser le public aux méfaits du soleil. Ces campagnes se sont focalisées sur les recommandations validées par la HAS afin d'éviter les coups de soleil:

- Eviter les expositions solaires aux heures de fort ensoleillement (entre 12h et 16h en été en France).
- Porter tee-shirt, chapeau et lunette de soleil.
- Se protéger à l'aide de crème solaire.

Nous insisterons ici sur le fait que ce sont majoritairement les coups de soleil dans l'enfance qui augmentent le risque de mélanome, le respect des recommandations ci-dessus est plus particulièrement important pour les enfants.

b - Dépistage

D'après la définition de l'OMS : « Le dépistage a pour objet de déceler les maladies dont sont atteintes les personnes apparemment bien portante ». A ce titre, la pathologie visée par le dépistage et la méthode utilisée pour cela doivent répondre à certains critères :

- Concernant la méthode, cette dernière doit être :
 - Peu invasive
 - Peu coûteuse
 - Sensible et spécifique
- Concernant la pathologie
 - Celle-ci doit être potentiellement dangereuse
 - La prise en charge précoce au stade infra-clinique de cette pathologie doit présenter un intérêt par rapport au traitement de la celle-ci au stade symptomatique.

Le mélanome constitue une pathologie de choix pour être la cible d'un dépistage. En effet, la méthode de dépistage, l'examen clinique par un médecin généraliste ou dermatologue, est non invasive et peu coûteuse. Lorsqu'ils sont diagnostiqués et résectionnés au stade précoce (stade I), les mélanomes n'altèrent pas la survie des patients (survie à 5 ans supérieure à 95%) contrairement aux stades plus avancés.

En France, il existe une « Journée de prévention et dépistage des cancers de la peau » au cours de laquelle les dermatologues se mobilisent gratuitement pour dépister ces cancers. L'impact de cette journée est essentiellement médiatique et a pour objectif de sensibiliser la population générale sur l'intérêt de se soumettre à un examen dermatologique régulier. Cependant l'analyse de l'épidémiologie du mélanome en France incite à émettre l'hypothèse que le dépistage du mélanome pourrait être amélioré par l'implication d'autres professions que les dermatologues, y compris non-médicales. Il a par ailleurs été rapporté que la majorité des cas de mélanome sont dépistés après auto-identification par le patient lui-même d'une lésion jugée comme anormale l'incitant à consulter. L'éducation et la sensibilisation grand-public à l'auto-dépistage semblent également une piste à explorer pour améliorer la qualité du dépistage du mélanome en France.

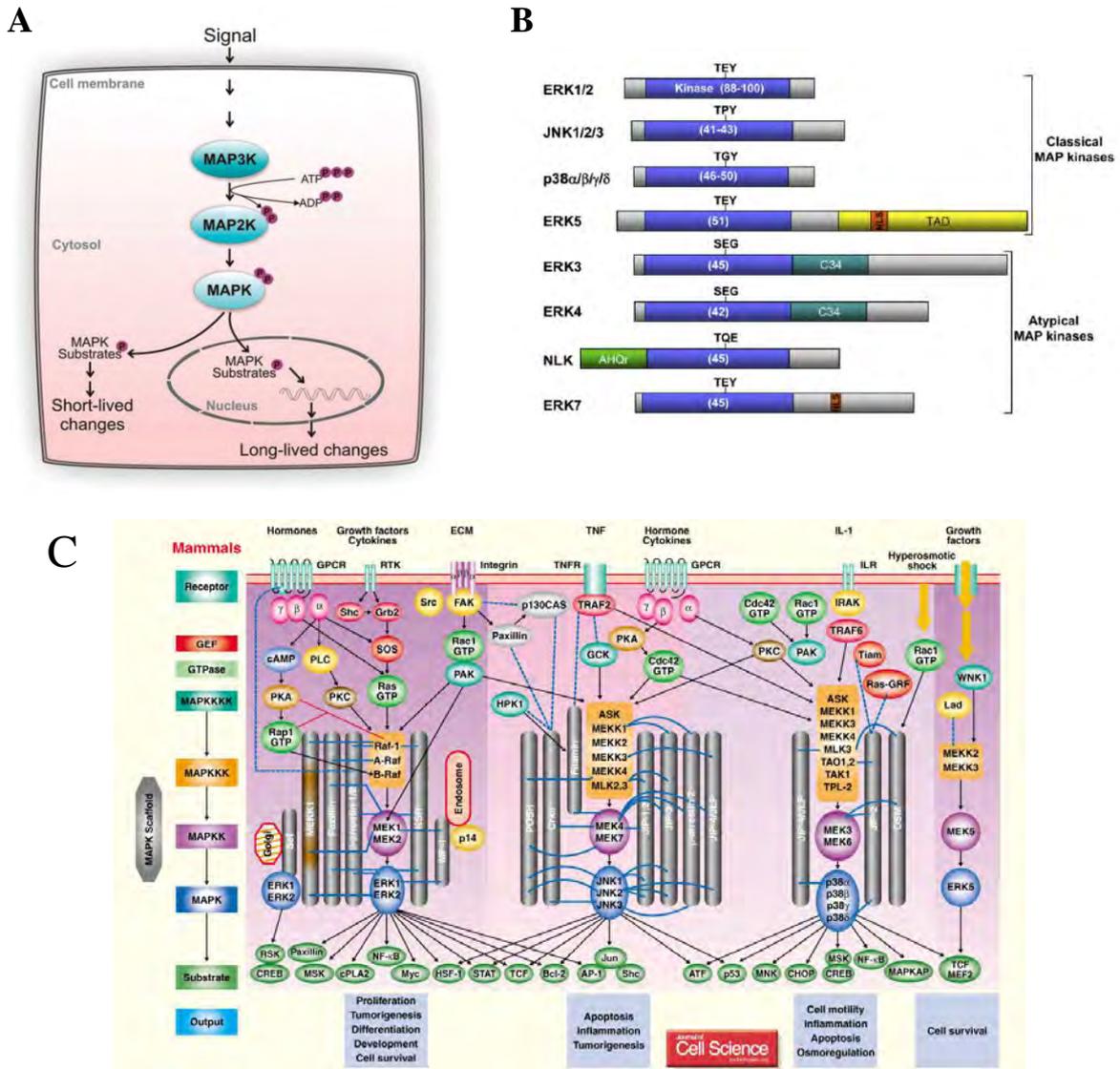


Figure 22 : Les voies de signalisation des MAPKs

A : Schéma générique de la transduction du signal des voies MAPK. En réponse à un signal souvent extracellulaire, une MAPKKK est activée et active alors par phosphorylation une MAPKK. Cette dernière peut dès lors à son tour phosphoryler et activer une MAPK. Finalement, la MAPK assurera ses fonctions par phosphorylation de cibles cytoplasmiques et en modulant la transcription de gène via ses cibles nucléaires.

(D'après Niauxt, 2010)

B: Structure schématique des 14 MAPK humaines.

Les MAPKs sont composées d'un domaine kinase représenté en bleu, contenant une boucle d'activation de 3 résidus spécifiques chacune.

(D'après Coulombe, 2007)

C: Schéma des 5 voies MAPKs connues chez l'Homme.

Pour chacune des voies, sont présentées ses activateurs, ses effecteurs, les protéines d'échafaudage participant à la transduction du signal ainsi que leurs principales fonctions.

(D'après Qi, 2005)

II - La voie Ras/Raf/MEK/ERK, cible thérapeutique majeure dans les mélanomes

A - La voie Ras/Raf/MEK/ERK

1 - Généralités sur les voies MAP Kinases

Les voies de signalisation MAPKs, pour Mitogen-Activated Protein Kinases, correspondent à des voies de transduction du signal extrêmement conservées chez les eucaryotes retrouvées des levures jusqu'à l'Homme. Elles se composent classiquement d'une cascade en 3 étapes incluant 3 kinases, appelées de manière générique : MAPKKK (MAPK Kinase Kinase), MAPKK (MAPK Kinase) également appelé MEK) et MAPK, conduisant à l'activation par phosphorylation de cette dernière (Figure 22A). Cette cascade peut éventuellement être complétée par une 4^{ème} kinase en amont, MAPKKKK, ou en aval, MAPKAPK pour MAPK Activated Protein Kinase. Chez l'Homme, il existe 5 voies différentes faisant intervenir au moins 14 MAPKs, 7 MAPKKs et 14 MAPKKKs. Les 14 MAPKs sont présentées dans la figure 22B ainsi que leur voie de signalisation respective dans la figure 22C (pour revue Coulombe and Meloche, 2007; Plotnikov *et al.*, 2011; Qi, 2005; Roskoski, 2012):

a - ERK1/2

La voie conduisant à l'activation d'ERK1 et d'ERK2 (Extracellular signal-Regulated Kinase) est considérée comme la voie canonique des MAPKs et en l'absence de précision le terme MAPK renvoie à cette voie. Elle a été à ce titre de loin la plus étudiée. Elle permet comme son nom l'indique, Extracellular-signal Regulated Kinase, l'intégration de signaux d'origine extracellulaire tels que les facteurs de croissance. Nous détaillerons ses membres, sa régulation et son rôle dans le mélanome dans les parties suivantes.

b - JNK1/2/3

La voie conduisant à l'activation de Jun N-terminal Kinase (JNK) est également appelée SAPK pour Stress Activated Protein Kinase. Cette voie est activée en réponse à des stress tels que les radiations, les génotoxiques, l'hypoxie, le stress oxydant ou les variations de pression osmotique. MEK4 et MEK7 constituent les MAPKKs spécifiques de cette voie alors qu'un très large nombre de MAPKKKs ont été décrites (Figure 22C). La voie JNK est impliquée en particulier dans l'induction de l'apoptose, le développement de certaines cellules immunitaires, l'activité neuronale et la signalisation de l'insuline.

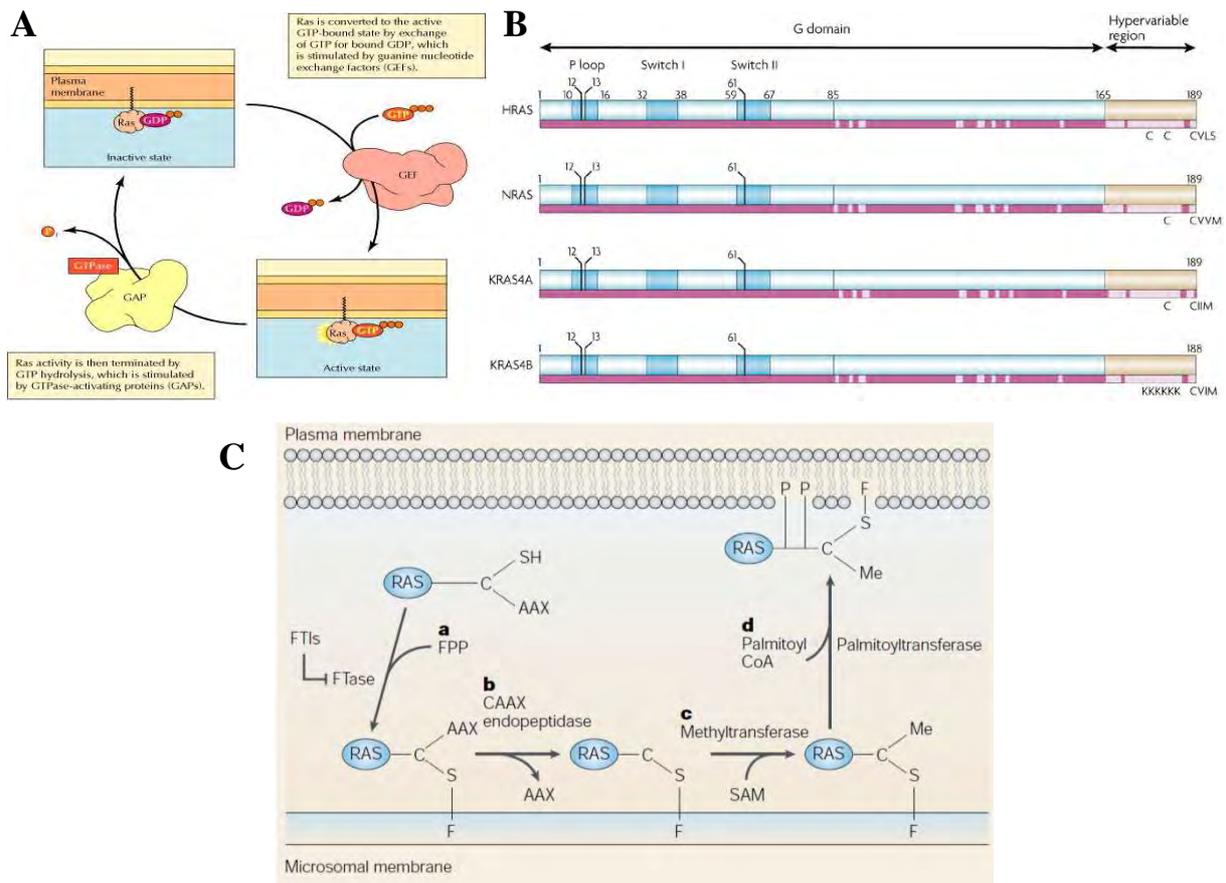


Figure 23 : Les protéines Ras

A : Principe d'activation et d'inactivation des protéines Ras. A l'état inactif, les protéines Ras sont liées au GDP. Leur interaction avec une GEF induit le relargage du GDP qui est remplacé par un GTP activant ainsi la protéine Ras. Au contraire, l'interaction des formes actives avec une GAP augmente l'activité GTPase de la protéine Ras et induit ainsi son inactivation. (D'après Cooper, 2010)

B: Structure des isoformes Ras

Les protéines Ras sont composées d'un domaine G, conservé au sein de la superfamille Ras et d'un domaine hypervariable. Le domaine G comprend la boucle P (Phosphate binding loop) impliquée dans la liaison au GDP et GTP, les switch I et II impliqués dans la liaison aux régulateurs et aux effecteurs des protéines Ras. La région hypervariable quant à elle est impliquée dans les modifications post-traductionnelles (farnésylation et palmitoylation) responsables de la localisation membranaire des protéines Ras. (D'après Schubert, 2007)

C: Modifications post-traductionnelles des protéines Ras

Les farnésyl-transférases (FT) catalysent la fixation d'un farnésyl sur la cystéine de la séquence CAAX terminale, les 3 derniers résidus AAX sont ensuite enlevés par une endopeptidase permettant alors la méthylation par une méthyltransférase du nouveau groupement OH libre. Les protéines Ras ainsi modifiées peuvent s'associer à la membrane où sont ajoutées par une palmitoyltransférase, 2 groupements palmitoyles sur des cystéines situées en amont du farnésyl, permettant la stabilisation de l'interaction avec la membrane. (D'après Dwonward, 2003)

c - p38

La voie p38 comporte 4 MAPKs, p38 α , p38 β , p38 γ et p38 δ , pouvant toutes être activées par la MAPKK MEK6 alors que seules p38 α et p38 β sont activées par MEK3. Elles sont impliquées dans la réponse au stress dont les radiations, les UV, l'hypoxie mais également aux hormones et à certaines cytokines comme l'IL-1 β et le TNF. Cette voie joue notamment un rôle dans l'immunité (inflammation, production de cytokines, maladies auto-immunes), l'angiogenèse, la balance apoptose/survie et la sénescence.

d - ERK5

ERK5 est activée en réponse aux stress et à des signaux mitogènes par les MAPKKs MEKK2 et MEKK3 et la MAPKK MEK5 et induit l'activation de la MAPKAPK, SGK1. Il est à noter qu'ERK5 est également un facteur de transcription capable de se lier par sa région non-catalytique à l'ADN (Figure 22B). Elle est nécessaire au développement du système cardiovasculaire et à l'angiogenèse.

e - Les MAPKs atypiques : ERK3, ERK4, ERK7 et NLK

La 5^{ème} voie correspond aux MAPKs atypiques, en effet ERK3, ERK4 et NLK ne possèdent pas le motif conservé T-X-Y, site classique de leur phosphorylation par les MAPKKs. Les mécanismes qui les régulent ainsi que leurs fonctions ont été peu étudiés et elles restent mal caractérisées et peu comprises.

2 - Présentation des différents membres de la voie Ras/Raf/MEK/ERK

a - Ras

Les protéines de la sous-famille Ras sont sûrement parmi les protéines les plus étudiées en biologie cellulaire depuis la découverte en 1982 de leur implication dans les cancers (pour revue Downward, 2003; Roskoski, 2012a; Young *et al.*, 2009).

Ce sont des protéines G monomériques fonctionnant comme des interrupteurs moléculaires : elles cyclent entre un état actif lié au GTP et un état inactif lié au GDP. Ce cycle est régulé par l'intervention de GTPase-Activating Proteins (GAP) et de Guanine nucléotide Exchange Factors (GEF). Les GEFs stimulent la libération du GDP et favorisent ainsi l'échange du GDP contre un GTP induisant l'activation de la protéine G. Les GAPs en stimulant l'hydrolyse du GTP lié en GDP favorisent le retour à l'état inactif de la GTPase (Figure 23A).

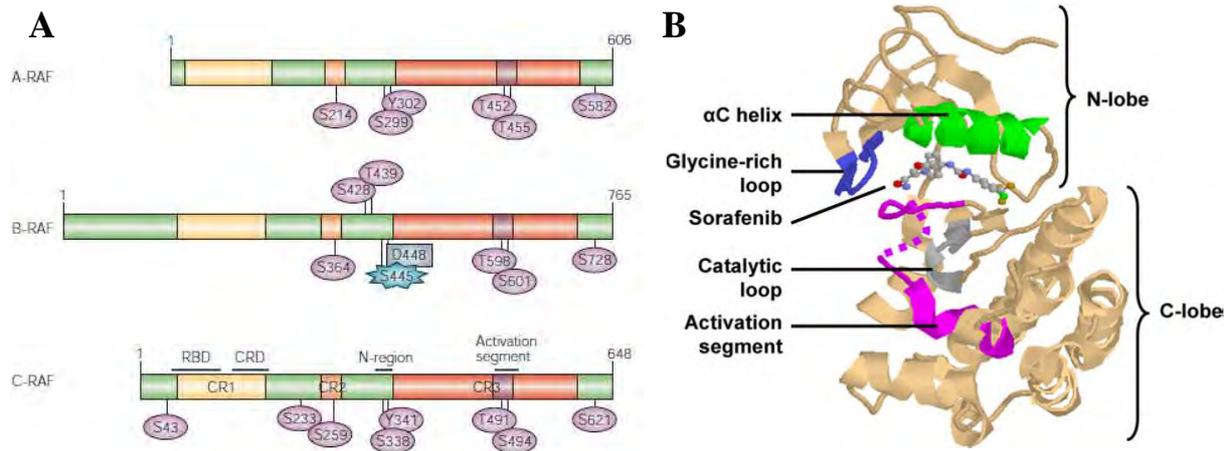


Figure 24 : Les protéines Raf

A : Structure des protéines Raf. Les 3 isoformes A-Raf, B-Raf et C-Raf partagent 3 régions conservées CR1,2 et 3. La région CR1 contient le domaine RBD de liaison à Ras ainsi qu'un domaine CRD riche en cystéine impliqué dans le liaison de la protéine à la membrane plasmique. CR3 contient le domaine catalytique. Les acides aminés indiquent les différents sites de phosphorylation.

(D'après Wellbrock, 2004)

B: Structure tridimensionnelle des protéines Raf. Diagramme de Ribbon illustrant la structure tridimensionnelle de B-Raf co-cristallisée avec un inhibiteur, le Sorafenib. La protéine est composée d'un lobe C et d'un lobe P à l'interface desquels se trouve la poche de liaison à l'ATP correspondant également au site de liaison des inhibiteurs.

(D'après Roskoski, 2010)

Chez l'Homme, 21 gènes constituent la sous-famille Ras. Seuls les 3 membres canoniques, *HRAS*, *NRAS* et *KRAS* impliqués dans les cancers, ont été considérablement étudiés. Ces 3 derniers codent pour 4 protéines fortement homologues N-Ras, H-Ras, K-Ras4A et K-Ras4B, ces 2 dernières étant issues d'un épissage alternatif du même gène (Figure 23B). Ces protéines possèdent à leur extrémité C-terminale une séquence CAAX sur laquelle peut se lier de manière covalente un lipide isoprénoïque, le farnésyl. Cette prénylation permet notamment l'ancrage des protéines Ras aux membranes cellulaires, ancrage stabilisé par le groupement palmitoyl présent chez N-Ras, H-Ras et K-Ras 4A ou par le domaine polybasique C-terminal de K-Ras4Ba. De plus, ces modifications influencent la localisation subcellulaire de ces protéines. En effet, alors que K-Ras n'est retrouvée qu'à la membrane plasmique, H-Ras et N-Ras sont également retrouvées au niveau des membranes intercellulaires (réticulum endoplasmique, appareil de Golgi et endosomes). Ces différences pourraient en partie expliquer la non-redondance des protéines Ras.

En effet, si les mécanismes conduisant à leur activation mais également la transduction du signal en aval semblent identiques, les protéines Ras ne sont clairement pas redondantes. Comme nous le verrons par la suite toutes participent à la carcinogenèse mais chacune à des organes cibles différents. Au niveau embryonnaire, seul le KO de *KRAS* est létal (Malumbres and Barbacid, 2003). Une des hypothèses expliquant leur non-redondance est le fait qu'en réponse à leur activation, les protéines Ras se concentrent dans des nanoclusters qui diffèrent, en particulier par leur composition lipidique et protéique, les protéines d'échafaudage varieraient également (Udell *et al.*, 2010).

b – Raf

Les protéines Raf sont des sérine/thréonine kinases faisant partie des MAPKKKs (pour revue (Roskoski, 2010; Udell *et al.*, 2010; Wellbrock *et al.*, 2004). Chez les mammifères, elles sont codées par 3 gènes homologues *ARAF*, *BRAF* et *CRAF* dont les fonctions ne sont pas redondantes, les KO de chacun de ces gènes étant létal chez la souris. *BRAF* est considéré comme l'ancêtre commun du fait de son homologie avec *DRAF*, seul homologue présent chez la drosophile. Mais *CRAF*, ayant été le premier membre identifié, a été le plus étudié jusqu'à 2002, année de la découverte des mutations de *BRAF* dans les cancers, *BRAF* ayant dès lors repris l'avantage (Davies *et al.*, 2002).

Les protéines Raf sont constituées de 3 régions conservées CR1, 2 et 3 (Figure 24A). Alors que CR3 est porteuse de l'activité kinase, les régions CR1 et CR2 sont impliquées dans la régulation de cette dernière via une interaction intramoléculaire. En effet, à l'état inactif les régions CR1 et CR2 masquent la région CR3 prévenant toute accessibilité au substrat.

Au niveau tri-dimensionnel, les protéines Raf sont constituées de 2 lobes à l'interface desquels se trouve le site catalytique. La position relative des 2 lobes détermine l'état actif/ouvert ou inactif/fermé de la kinase (Figure 24B).

L'activité des protéines Raf est modulée par les nombreuses phosphorylations dont elles sont le siège. A titre d'exemple, A-Raf contient 35 sites de phosphorylation, dont les kinases en jeu mais également les rôles restent obscurs (Roskoski, 2010).

Cinq phosphorylations, S338, Y341, T491, S494 et S621, sont nécessaires à l'activité de C-Raf, Y341 est phosphorylé par Src et permet la phosphorylation subséquente de S338. Pour B-Raf, la S445, équivalent à la S338 de C-Raf, est constitutivement phosphorylée alors que la Y341 est absente, remplacée par un aspartate (D448). De plus, la position S259 de C-Raf, également absente de B-Raf, correspond à une phosphorylation inhibitrice (Figure 24A). En conséquence, l'activation de B-Raf ne nécessite plus que 3 phosphorylations contre 5 phosphorylations et une déphosphorylation pour C-Raf. L'activation de B-Raf est donc facilitée, elle nécessite la conjonction d'un plus petit nombre d'évènements (la phosphorylation par Src n'est plus nécessaire par exemple) expliquant le rôle oncogénique préférentiel de B-Raf par rapport à ses homologues (voir partie II-B-2-a).

Parmi les différences entre les 3 homologues, il est à noter que C-Raf possède des substrats additionnels de MEK1/2. En effet, C-Raf est également capable de phosphoryler NF-κB, Rb et DAB et peut moduler par liaison directe l'activité de ASK, MST-2, Bcl-2, NF-κB et ROCK2.

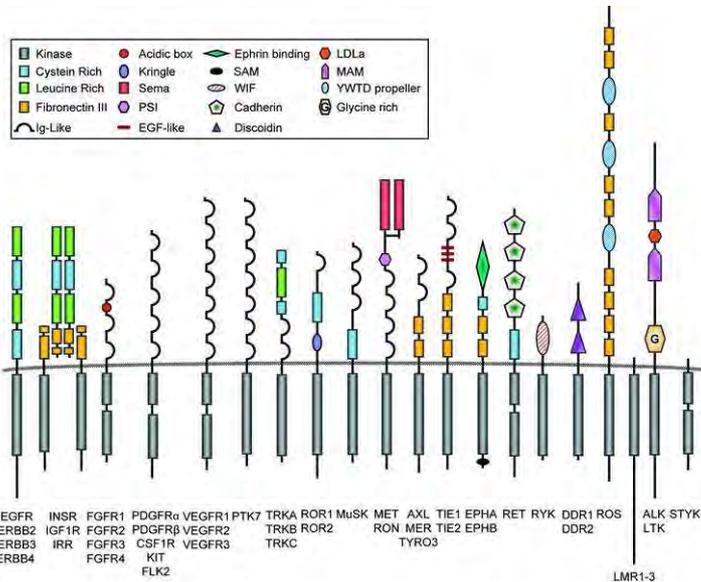
c – MEK1/2

Dans la voie MAPK canonique, le rôle de MAPKK est joué par les protéines MEK1 et MEK2, **MAP kinase/ERK Kinase**, appartenant au petit groupe des kinases ayant une activité tyrosine/thréonine kinase. En effet, elles phosphorylent leurs seuls substrats connus à ce jour, ERK1 et ERK2, respectivement sur les résidus T202/Y204 et T185/Y187 (pour revue Roskoski, 2012b).

Leur activité est modulée par phosphorylation principalement par les protéines Raf lors de la transduction du signal de la voie MAPK mais également par CDK5, MEKK1, Mos, COT et ERK1. En effet, elles sont activées par les protéines Raf par double phosphorylation des S218 et S222 de MEK1 et S222 et S226 de MEK2. Si l'ajout des 2 phosphates est nécessaire la transition de l'état inactif à l'état actif, après activation la déphosphorylation d'un seul résidu n'est pas suffisante à induire la perte totale d'activité. En sus de ces phosphorylations activatrices, MEK1 et MEK2 sont le siège de phosphorylations inhibitrices sur les résidus S212, T286, T292 et T386 par CDK5 et ERK1 participant ainsi au rétrocontrôle négatif de la voie MAPK.

Si, MEK1 et MEK2 ne sont pas totalement redondantes *in vivo* - chez la souris, le KO de MEK1 est létal alors que celui de MEK2 ne conduit à aucun phénotype particulier - leurs différences restent

A



B

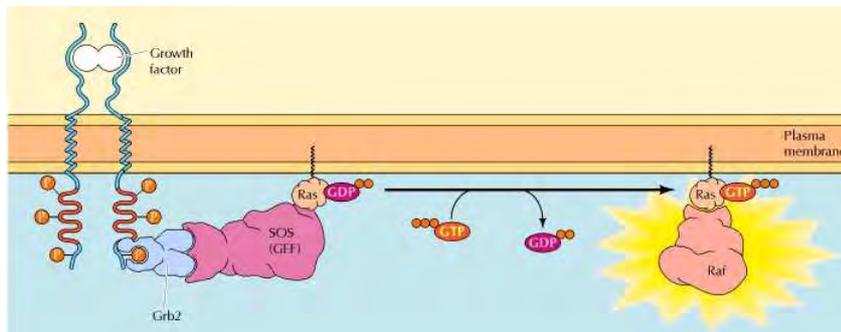


Figure 25 : Les récepteurs à tyrosine kinase, principaux activateurs de Ras

A : La famille des récepteurs à tyrosine kinase.

(D'après Pierotti and Borrello, 2012)

B: Activation de Ras par les RTK.

La fixation du ligand sur un RTK induit sa dimérisation et sa transactivation par phosphorylation. La protéine Grb2 se fixe sur le RTK activé, recrute à la membrane et active la GEF SOS. SOS induit alors l'activation de Ras en favorisant l'échange du GDP/GTP.

(D'après Cooper, 2000)

ténées (Giroux *et al.*, 1999). En effet, elles sont activées dans les mêmes conditions et activent de manière aussi efficace ERK1/2. La principale différence à ce jour, semble être le fait que MEK1 est le siège d'un rétrocontrôle négatif : sa phosphorylation en T292 par ERK1/2 l'inhibe, cette thréonine n'ayant pas d'équivalent sur MEK2 (Brunet and Pages, 1994).

d – ERK1/2

ERK1 et ERK2 constituent les MAPKs canoniques chez l'Homme (pour revue (Roskoski, 2012a)). Ce sont de sérine/thréonine kinases phosphorylant indifféremment ces 2 résidus à condition qu'ils soient suivis d'une proline. Elles sont constituées respectivement de 379 et 360 acides aminés et présentent 85% d'homologie entre elles.

Si elles semblent être totalement équivalentes (tout mécanisme activant l'une d'entre elles activent également l'autre), elles ne sont pas complètement redondantes, au moins *in vivo* durant le développement. En effet, chez la souris alors que le KO d'*ERK2* est létal au niveau embryonnaire, celui d'*ERK1* est viable.

ERK1/2 phosphorylent un très grand nombre de cibles (175 identifiées à ce jour) dont une large part de facteurs de transcription, et interviennent ainsi dans de nombreux processus cellulaires (voir partie II-A-3-g et II-B-1).

3 – La transduction du signal via Ras/Raf/MEK/ERK

a - RTK => Ras

Les RTK constituent une famille d'une cinquantaine de protéines membranaires réparties en une vingtaine de sous-familles en fonction de leur ligand (Figure 25A). Ils sont constitués d'une partie N-terminale extracellulaire impliquée dans la liaison aux ligands, un domaine transmembranaire et un domaine C-terminal intracellulaire porteur de l'activité catalytique.

Le plus souvent, la fixation du ligand sur le domaine extracellulaire entraîne la dimérisation du récepteur induisant l'autophosphorylation des dimères et conduisant à leur activation complète. Des modifications conformationnelles font apparaître des sites d'ancrage de haute affinité qui induisent le recrutement de protéines de signalisation intracellulaire via leur domaine SH2 et SH3 (Src Homology). En fonction du récepteur la combinaison de protéines recrutées varie, assurant ainsi la spécificité de la signalisation induite (Cooper, 2000). La transduction du signal conduit à l'activation de plusieurs voies de signalisation dont la voie MAPK via l'activation de Ras.

L'activation de Ras en réponse aux RTK peut impliquer l'activation d'une GEF ou l'inactivation d'une GAP. Le mécanisme le plus fréquent et le mieux caractérisé fait intervenir la GEF SOS (Son Of

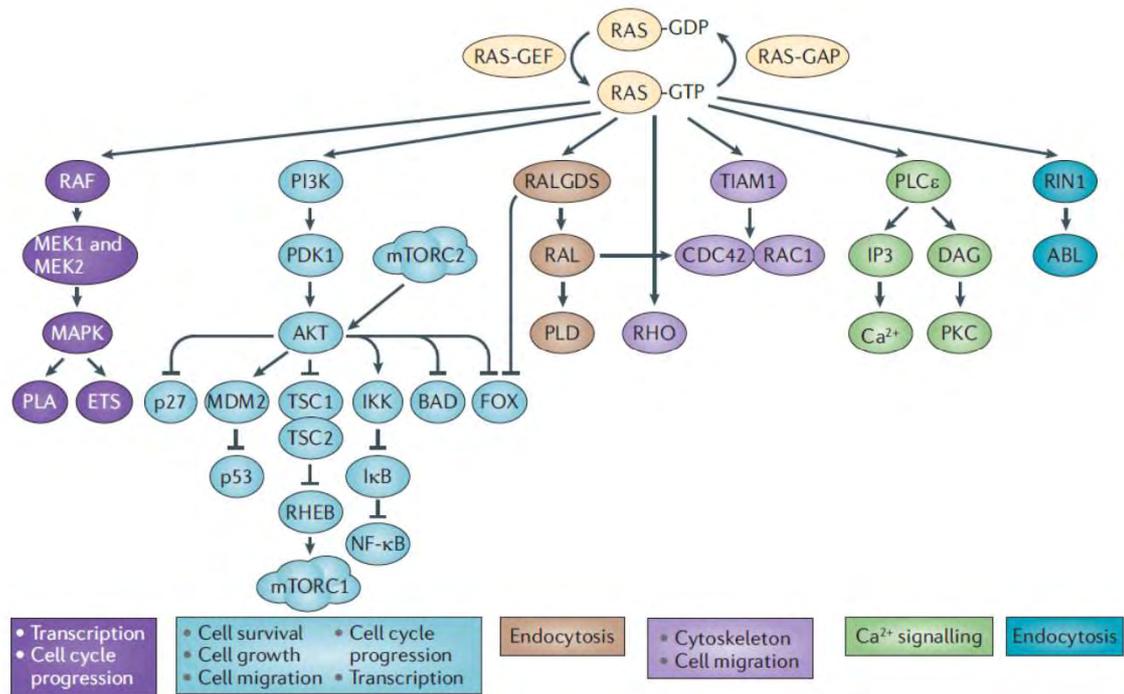


Figure 26 : Les voies de signalisation activées par Ras

Via les nombreuses voies de signalisation qu'elles sont capables d'activer les protéines Ras interviennent dans un grand nombre de processus cellulaires.

(D'après Berndt, 2011)

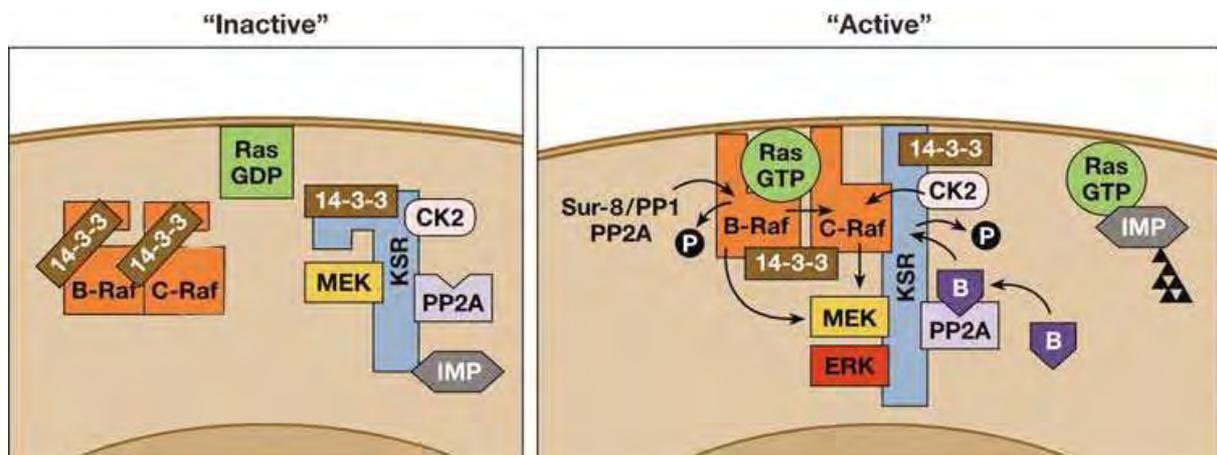


Figure 27 : Transduction du signal par les protéines Raf

A l'état inactif, les protéines Raf sont dans le cytosol, maintenues repliées par la protéine chaperonne 14-3-3 et majoritairement sous forme d'hétérodimères B-Raf/C-Raf. Les protéines MEK sont également cytosoliques et au sein de tétramères incluant 2 protéines MEK et 2 protéines d'échafaudage KSR.

Suite à l'activation de Ras, les hétérodimères Raf sont recrutés à la membrane, l'interaction avec 14-3-3 est modifiée mais toujours existante. Les hétérodimères KSR/MEK se lient aux protéines Raf ainsi activées, conduisant à la phosphorylation activatrice de MEK, au recrutement de ERK ainsi qu'à son activation.

(Adapté de McKay, 2007)

Sevenless). Tout d'abord, l'activation du RTK induit le recrutement de la protéine adaptatrice Grb2 via son domaine SH2, son domaine SH3 est quant à lui impliqué dans le recrutement de la GEF SOS à la membrane plasmique. SOS ainsi localisé à la membrane interagit avec Ras, également membranaire, et induit son activation en favorisant l'échange du GDP lié à Ras inactif contre un GTP (Figure 25B) (Alberts *et al.*; McKay and Morrison, 2007).

Cette activation de Ras induit l'activation de nombreuses voies de signalisation (Figure 26) dont la voie MAPK que nous allons décrire. De plus, il est à noter que Ras peut également être activé de manière beaucoup plus rare par des récepteurs couplés aux protéines G.

b – Ras => Raf

Ras ainsi activée conduit à l'activation des protéines Raf, qui activent alors les MAPKKs MEK1 et MEK2, par un processus multi-étapes pas encore totalement compris. Nous ne décrivons ici que de manière très simpliste le mécanisme supposé (pour revue Roskoski, 2010; Udell *et al.*, 2010; Wellbrock *et al.*, 2004)).

A l'état inactif, les protéines Raf sont retrouvées dans le cytosol dans un état « fermé », les régions CR1 et CR2 sont repliées et masquent la région CR3. Cette conformation inactive est stabilisée par la liaison avec la protéine chaperonne 14-3-3 (Figure 27).

Lorsque Ras est activée, Ras-GTP interagit avec le domaine RBD (Ras Binding Domain) situé dans la région N-terminale CR1 de Raf et induit son recrutement à la membrane. Le domaine CBD (Cystein Rich Domain), également contenu dans la région CR1, stabilise le recrutement de Raf en se liant à la fois à Ras et aux phospholipides membranaires. Parallèlement, la liaison à 14-3-3 est modifiée, cette dernière ne maintient plus la protéine Raf repliée, mais permet la stabilisation de la liaison de cette dernière aux protéines d'échafaudage (scaffold protein) impliquées dans la transduction Raf=>MEK=>ERK. Cette activation induit également une dimérisation des protéines Raf sous forme d'homodimères et/ou d'hétérodimères. L'activation des homodimères B-Raf ne nécessite que l'activation de Ras alors que celle des homodimères C-Raf nécessite en plus l'intervention de Src (Marais *et al.*, 1997). Cependant, les dimères les plus catalytiquement actifs seraient les hétérodimères B-Raf/C-Raf. Dans ce cas de figure, B-Raf conduirait à la transactivation du domaine catalytique de C-Raf indépendamment des modifications post-traductionnelles de sa région régulatrice. La protéine d'échafaudage 14-3-3 serait en revanche nécessaire lors de ce processus (Garnett *et al.*, 2005; Mizutani *et al.*, 2001; Rushworth *et al.*, 2006; Weber *et al.*, 2001).

Cette hétérodimérisation a été extensivement étudiée depuis la découverte par Davies *et al.*, de mutations de B-Raf dans les cancers et la mise en évidence d'une activité paradoxale des inhibiteurs de B-Raf via cette hétérodimérisation (voir partie II-C-3-c)(Davies *et al.*, 2002). En effet, certaines

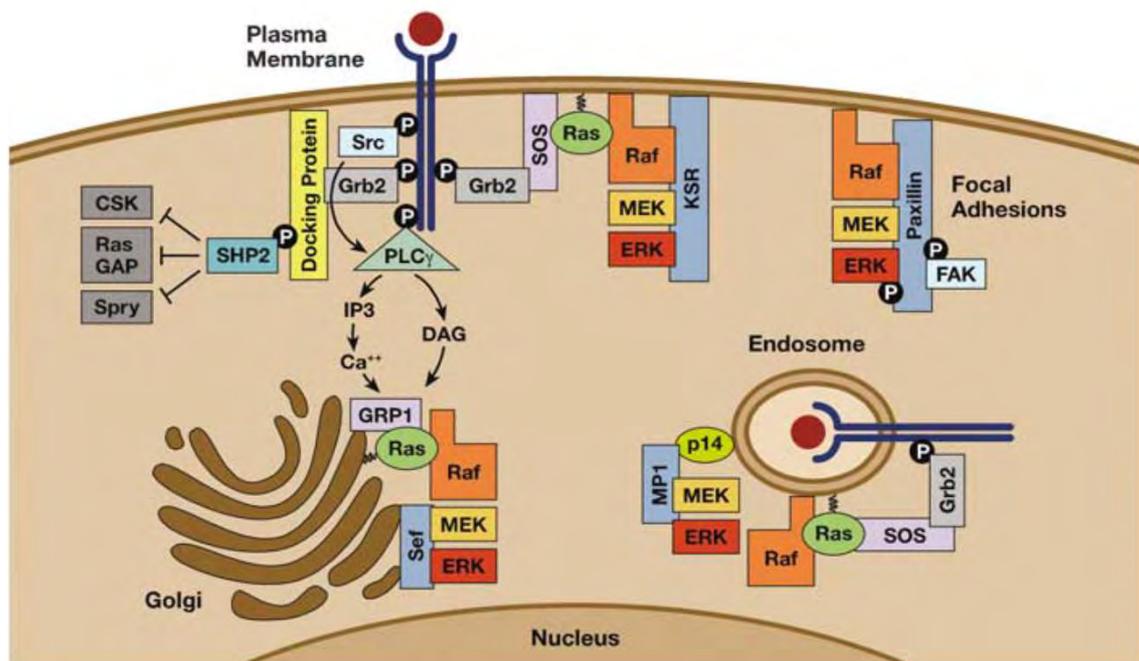


Figure 28 : Protéines d'échaffaudage et transduction du signal de la voie MAPK

Les protéines KSR, Sef et MP1 sont impliquées dans l'activation de ERK en réponse à Ras respectivement à la membrane plasmique, à l'appareil de Golgi et aux endosomes. La paxilline est quant à elle impliquée dans l'activation de ERK au niveau des adhésions focales.

(Adapté de McKay, 2007)

mutations entraînent de manière surprenante une diminution de l'activité catalytique de B-Raf. Cependant, les protéines mutées sont toujours capables d'hétérodimériser avec C-Raf et la mutation rend cette dimérisation indépendante de Ras conduisant la transactivation constitutive de C-Raf (Garnett *et al.*, 2005; Wan *et al.*, 2004).

Enfin, d'autres protéines d'échafaudage que 14-3-3, sont impliquées dans la transduction du signal Raf => MEK telles que les protéines KSR, CNK, IQGAP ou la paxilline et pourraient également intervenir dans la transduction Ras/Raf. Si leur rôle a été démontré chez la drosophile et *C. Elegans*, il reste flou chez les mammifères, elles pourraient en outre déterminer la combinaison de protéines Raf dimérisant.

c - Raf => MEK1/2

A l'état basal, les protéines MEK1/2 sont retrouvées dans le cytoplasme sous forme de dimères liés à des protéines d'échafaudage telles que les protéines KSR (Kinase Suppressor of Ras) formant ainsi des tétramères incluant des homodimères (MEK1/MEK1 ou MEK2/MEK2) ou des hétérodimères (MEK1/MEK2).

Les protéines Raf dimérisées recrutées à la membrane et activées par Ras-GTP (décrit partie II-3-b), induisent via leur extrémité C-terminale, le recrutement à la membrane des tétramères KSR/MEK (Figure 27). Les protéines Raf activent les protéines MEK1/2 par une double phosphorylation sur les sérines en position 218 et 222 pour MEK1 et 222 et 226 pour MEK2.

Les protéines d'échafaudage KSR interviendraient également dans l'activation des protéines MEK et sont strictement nécessaires à l'activation de la voie MAPK par Ras (Therrien *et al.*, 1995; Yu *et al.*, 1998). En effet, les protéines KSR ont une structure proche des protéines Raf et appartiennent à ce titre à la famille des sérine/thréonine kinases. Elles ont été pendant longtemps considérées comme des pseudo-kinases ne portant pas d'activité catalytique car elles sont dépourvues de l'enchaînement conservé His-Arg-Asp (elles présentent à la place l'enchaînement His-Lys-Asp) au début de la boucle d'activation conservée dans les kinases actives. Cependant des articles récents ont montré que les protéines KSR étaient impliquées dans l'activation des protéines MEK via leur phosphorylation sur des sites autres que ceux phosphorylés par les protéines Raf et ceci de manière dépendante des protéines Raf mais indépendamment de leur activité kinase (Brennan *et al.*, 2011; Hu *et al.*, 2011).

Les hétérodimères MEK1/MEK2 sont majoritaires et présentent des fonctions supplémentaires par rapport aux homodimères. D'une part MEK1 est capable de transactiver MEK2 en réponse à la signalisation via les intégrines. D'autre part, MEK1 est le siège d'une phosphorylation inhibitrice par ERK1 impliquée dans le rétrocontrôle négatif de la voie MAPK qui induit l'inactivation de MEK2 au sein des hétérodimères (Catalanotti *et al.*, 2009). Ces fonctions supplémentaires de MEK1 par rapport à

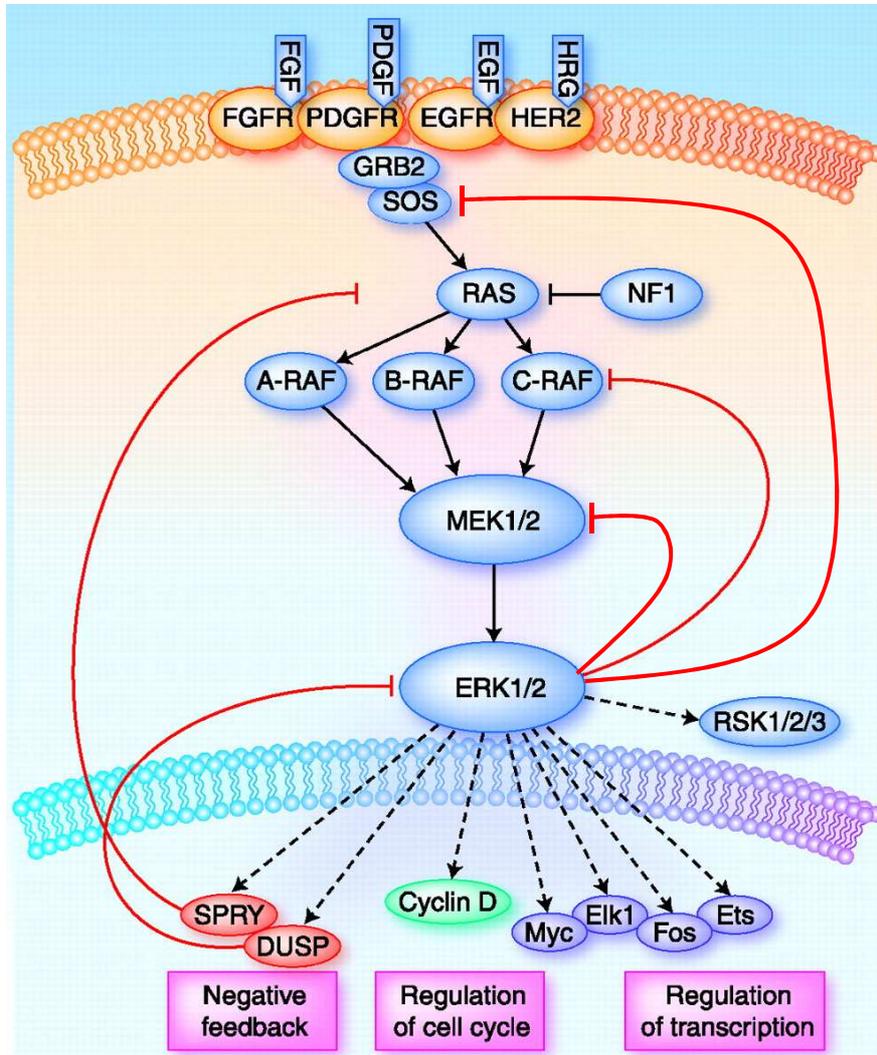


Figure 29 : Rétrocontrôles de la voie MAPK

Les protéines ERK1/2 sont responsables d'un rétrocontrôle négatif direct par phosphorylation inhibitrice de MEK1/2, C-Raf/B-Raf et SOS. Ces dernières induisent également un rétrocontrôle indirect en activant via leurs cibles nucléaires l'expression des protéines DUSPs et SPRYs. Ces dernières inactivent par déphosphorylation respectivement ERK1/2 et Ras.

(Adapté de Pratilas, 2010)

MEK2 pourraient expliquer le rôle essentiel de MEK1 dans le développement de la souris, en effet alors que les KO MEK1 sont létaux, les KO MEK2 sont parfaitement viables (Catalanotti *et al.*, 2009; Roskoski, 2012b).

d - MEK => ERK

Les complexes incluant les protéines activées Raf/MEK ainsi que les protéines d'échafaudage recrutent les protéines ERK1 et ERK2 cytoplasmiques. Cette liaison induit une modification conformationnelle d'ERK découvrant les tyrosines en position 204 pour ERK1 et 187 pour ERK2 qui seront alors phosphorylées par MEK. ERK1 et ERK2 ainsi mono-phosphorylées pourraient se dissocier du complexe puis se réassocier pour être cette fois phosphorylées sur la thréonine, en position 202 sur ERK1 et 185 sur ERK2, voisine de la tyrosine précédente. Cette double phosphorylation conduit à une augmentation de l'activité kinase d'ERK d'un facteur 50 000 *in vitro* (Roskoski, 2012a).

La signalisation en aval peut être faite par des monomères ou des homodimères, les hétérodimères étant instables (Khokhlatchev *et al.*, 1998). De plus, des protéines d'échafaudage pourraient également intervenir. L'affinité des protéines ERK pour leur cible serait ainsi modulée en fonction de leur forme monomérique *versus* dimérique et des protéines d'échafaudage auxquelles elles sont associées. A titre d'exemple, les monomères sont capables de transiter de manière passive entre le noyau et le cytoplasme alors que les dimères nécessitent un transport actif pour entrer dans le noyau (Adachi *et al.*, 1999; Casar *et al.*, 2008; Lidke *et al.*, 2009). Concernant les cibles cytoplasmiques des protéines ERK, la dimérisation et l'intervention de protéines d'échafaudage seraient essentielles et varierait en fonction de la localisation subcellulaire (Figure 28)(Casar *et al.*, 2008, 2009; Kolch, 2005; McKay and Morrison, 2007).

e - Retour à l'état inactif : le rétrocontrôle négatif

L'activation de la voie MAPK doit être régulée temporellement, de multiples mécanismes assurent donc le retour à l'état inactif. L'activation de la voie MAPK induit parallèlement la mise en place de mécanismes de rétrocontrôles négatifs. Plusieurs mécanismes ont été mis évidence dont (Figure 29):

- Les protéines ERK inactivent par phosphorylation les effecteurs de la voie MAPK :
 - o La GEF SOS est phosphorylée par ERK1. Ceci inhibe la liaison du complexe Grb2/SOS aux RTK activés induisant ainsi le découplage entre les RTK et Ras (Buday *et al.*, 1995).
 - o Les protéines B-Raf et C-Raf sont phosphorylées par ERK sur de nombreux sites : S29, S43, S289, S296, S301 et S642 pour C-Raf et S151, S750 ainsi que les T401 et T753 pour B-Raf. Ces dernières entraînent l'inactivation des protéines Raf, la dissociation de

Table 1. MAP kinase phosphatases of the DUSP family

Class	Other Names	Subcellular Localization	Substrate Preference		
			ERK1/2	p38	JNK
<i>Class I</i>					
DUSP1	MKP-1, CL100, erp, 3CH134, hVH1	Nuclear	X	X	X
DUSP2	PAC-1	Nuclear	X	X	
DUSP4	MKP-2, Typ1, Sty8, hVH2	Nuclear	X	X	X
DUSP5	hVH-3, B23	Nuclear	X		
<i>Class II</i>					
DUSP6	MKP-3, Pyst1, rVH6	Cytoplasmic	X		
DUSP7	MKP-X, Pyst2, B59	Cytoplasmic	X		
DUSP9	MKP-4, Pyst3	Cytoplasmic	X	x	
<i>Class III</i>					
DUSP8	M3/6, hVH5, HB5	Cytoplasmic/nuclear		X	X
DUSP10	MKP-5	Cytoplasmic/nuclear		X	X
DUSP16	MKP-7	Cytoplasmic/nuclear		X	X

MAP, mitogen-activated protein; DUSP, dual-specification phosphatase; *Class I*, inducible nuclear MAP kinase phosphatases (MKPs); *Class II*, cytoplasmic extracellular-regulated kinase (ERK)-specific MKPs; *Class III*, MKPs that inactivate stress p38 and c-Jun NH₂ terminal kinase (JNK) MAP kinases; X, preferred substrate; x, some detectable activity toward this kinase.

Figure 30 : Les DUSPs, localisation subcellulaire et spécificité

Les DUSPs sont réparties en 3 classes selon leur localisation subcellulaire. Au sein de chaque classe, la spécificité des DUSPs pour les différentes MAPK, ERK1/2, p38 et JNK, est variable.

(D'après Bermudez, 2010)

dimères et leur relocalisation cytoplasmique (Brummer *et al.*, 2003; Dougherty *et al.*, 2005; Ritt *et al.*, 2009; Rushworth *et al.*, 2006).

- MEK1 est également phosphorylée en position T292, ce qui induit sa propre inactivation ainsi que la transinactivation de MEK2, lorsque elles sont associées en hétérodimères (Brunet and Pages, 1994; Catalanotti *et al.*, 2009; Eblen *et al.*, 2004).
- KSR1 peut également être phosphorylée sur les résidus T260, T274, S320, and S443 induisant sa libération de la membrane (McKay *et al.*, 2009).

- Les DUSP (DUal-Specificity Phosphatases), également appelés MAP Kinase Phosphatases (MKP) inactivent les protéines ERK.

Les DUSPs sont une famille de phosphatases ayant comme leur nom l'indique une double spécificité, elles sont en effet capables de déphosphoryler des tyrosines et des thréonines. Elles ont pour fonction d'inactiver les MAPKs. Chez l'Homme, 10 DUSP catalytiquement actives sont décrites, leur spécificité envers les différentes MAPKs est dépendante de leur localisation subcellulaire (Figure 30). A l'état basal, leur expression est relativement faible, cette dernière est augmentée précocement en réponse à l'activation des MAPKs, notamment par activation transcriptionnelle. De plus l'activité des DUSPs peut être modulée par phosphorylation directe (Bermudez *et al.*, 2010; Owens and Keyse, 2007; Roskoski, 2012a).

- Sprouty dont la transcription est activée via les cibles nucléaires d'ERK1/2 inhibe la transduction entre les RTK et Ras. En effet, les protéines Sprouty séquestrent le complexe Grb2/SOS prévenant aussi l'activation de Ras.

f – Mécanismes physiologiquement contrôlés par la voie MAPK

La voie MAPK contrôle un grand nombre de processus cellulaires, via ses très nombreuses cibles (plus de 150 répertoriées à ce jour), tels que la prolifération, la survie, l'apoptose, la migration, la différenciation... Ces derniers sont notamment déterminés en fonction du contexte cellulaire par la durée de la signalisation et les cibles préférentielles d'ERK. Nous nous contenterons ici de détailler les mécanismes généraux (Figure 22C)(Plotnikov *et al.*, 2011; Roskoski, 2012a).

Le rôle le plus connu des protéines ERK est l'activation de facteurs de transcription dans le noyau. En effet, ERK induit la phosphorylation activatrice de facteurs de transcription qui entraînent la transcription de gènes appelés « gènes de réponse immédiate » et présentant des éléments de réponse au sérum (SRE, Serum Response Element) tels que *FOS* ou *MYC*. Une partie de ces derniers

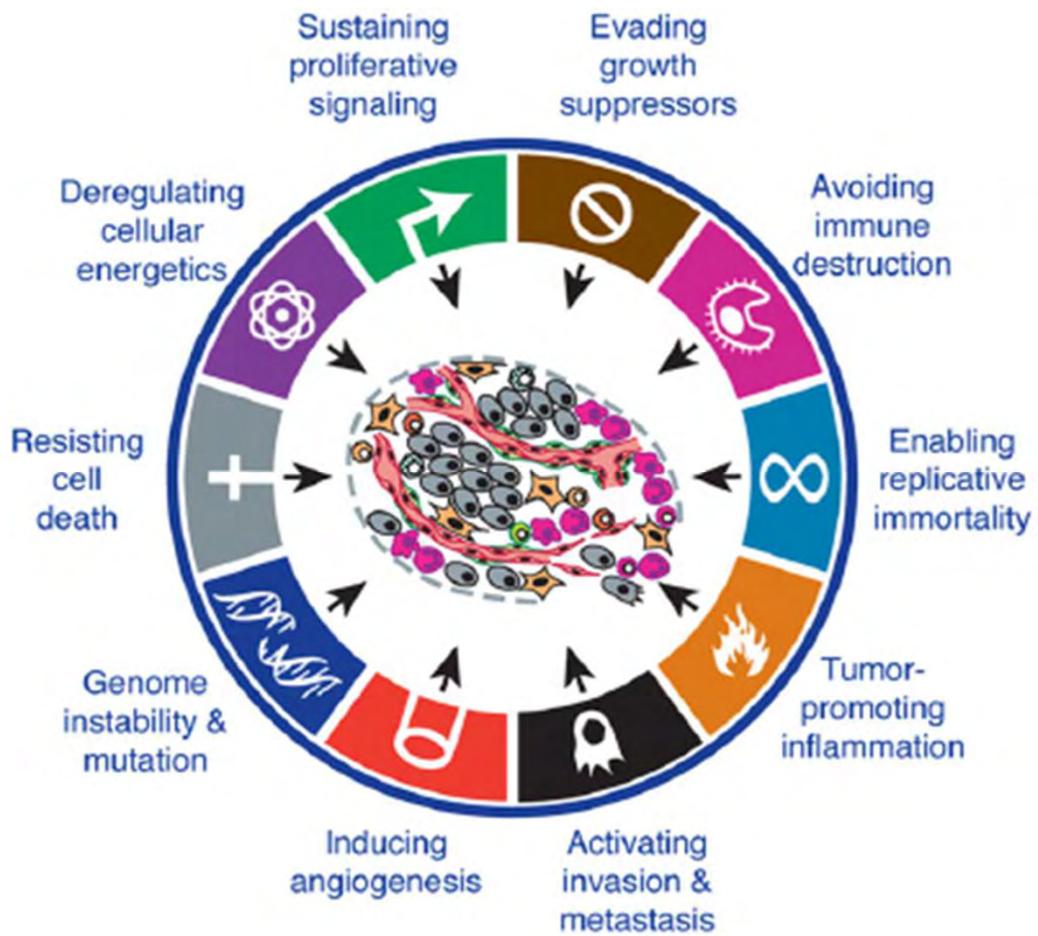


Figure 31 : Les caractéristiques du cancer

(D'après Hanahan et Weinberg, 2011)

étant eux-mêmes des facteurs de transcription, ils peuvent alors induire en cascade la transcription d'autres gènes qualifiés de « gènes de réponse tardive ».

Les protéines ERK1/2 activées sont également capables d'inhiber l'expression de gènes indépendamment de leur activité kinase par liaison directe sur l'ADN. Enfin, elles peuvent également induire des modifications d'expression plus larges via le remodelage de la chromatine. En effet, des interactions entre les protéines ERK1/2 et HDAC4, PARP1 et la topoisomérase 2 ont également été décrites.

Pour finir, les protéines ERK sont également capables de réguler des processus cellulaires indépendamment de leurs fonctions nucléaires. Elles sont, par exemple, capables de moduler l'activité de cibles cytoplasmiques, du cytosquelette, des pores nucléaires, la migration ou la traduction par exemple.

B - La voie MAPK, "driver" de la mélanomagenèse

1 - Rôle de la voie MAPK dans la carcinogenèse

En 2000, les Professeurs D. Hanahan et R.A. Weinberg ont listé dans une revue, faisant référence depuis, les 6 caractéristiques nécessaires à la tumorigenèse (Hanahan and Weinberg, 2000). En 2011, dans une nouvelle édition, ils ont actualisé cette revue et ont étendu cette liste à 10 caractéristiques incluant notamment le rôle du microenvironnement dans l'initiation et la promotion tumorale (Figure 31)(Hanahan and Weinberg, 2011). La voie MAPK est impliquée de manière plus ou moins évidente dans toutes ces caractéristiques (Maurer *et al.*, 2011; Pylayeva-Gupta *et al.*, 2011)

1- Prolifération : auto-suffisance en facteurs de croissance

La voie MAPK est, par essence, une voie contrôlant la prolifération cellulaire en réponse aux signaux mitogènes. Son activation constitutive induit en conséquence la prolifération cellulaire indépendamment de facteurs de croissance. De plus, la voie MAPK induit la production de facteurs de croissance autocrines et paracrines (McCarthy *et al.*, 1995).

2- Echappement aux inhibiteurs de prolifération

De manière physiologique, dans des cellules saines, l'activation de la voie MAPK participe à la différenciation cellulaire. Au contraire, dans le cadre des cellules cancéreuses, elle maintiendrait un état dédifférencié favorisant la prolifération cellulaire. D'autre part, alors que dans les cellules normales, le TGF β induit l'arrêt de la prolifération cellulaire, dans les cellules cancéreuses, la voie

MAPK stimule sa sécrétion qui induit la prolifération cellulaire. Enfin, C-Raf est capable de se lier à Rb et de l'inactiver, prévenant son action de suppresseur de tumeurs (Kinkade *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 1998).

3- Echappement au système immunitaire

La voie MAPK interfère avec la reconnaissance de la tumeur par le système immunitaire. En effet, elle conduit à une diminution de l'expression des récepteurs CMH, de la présentation de peptides antigéniques ainsi que à la sécrétion de cytokines favorisant l'échappement (Lohmann *et al.*, 1996; Sumimoto, 2006). De plus, Ras réduit l'expression de Fas prévenant la lyse des cellules tumorales via Fas/FasL (Gazin *et al.*, 2007).

4- Capacités de réplication infinie

La voie MAPK augmente l'expression de la sous-unité catalytique de la télomérase, hTERT. En effet, il existe sur le promoteur de hTERT des sites de fixation des facteurs de transcription Ets et Myc, respectivement cible directe et indirecte d'ERK1/2 (Dwyer *et al.*, 2007). De plus, il a été montré que l'induction de Myc par la voie MAPK participe à la suppression de la sénescence induite par les oncogènes (Zhuang *et al.*, 2008).

5- Inflammation pro-tumorale

L'activation de la voie MAPK conduit notamment dans les cellules de mélanome à la sécrétion d'Interleukine 6 (IL-6), facteur crucial de l'inflammation (Sumimoto, 2006).

6- Métastases

L'activation de la voie de MAPK favorise le processus métastatique en de nombreux points. Tout d'abord, elle altère l'adhésion intercellulaire et l'architecture des tissus par la diminution d'expression de certaines intégrines et de la cadhérine E via notamment l'expression des répresseurs transcriptionnels Snail et Slug. Ces derniers participent également très fortement au processus d'EMT (Transition Epithélio-Mesenchymateuse) induit par le TFG β dont la sécrétion est stimulée par la voie MAPK. L'invasion est également favorisée par d'autres mécanismes dépendant de la voie MAPK dont l'expression de RhoE/Rnd3, l'extinction de PDE5, la sécrétion de protéases de la matrice cellulaire comme la MMP-9 et la diminution d'inhibiteurs de ces protéases (Arozarena *et al.*, 2011; Beliveau *et al.*, 2010; Klein *et al.*, 2008). Enfin la voie MAPK favorise la survie et l'extravasation des cellules métastatiques dans le flux sanguin (Liang *et al.*, 2007).

7- Stimulation de l'angiogenèse

La voie MAPK stimule l'angiogenèse en induisant l'expression du VEGF, en condition de normoxie via le site AP-2/SP1 de son promoteur et en hypoxie par phosphorylation stabilisatrice de HIF-1 α (Berra *et al.*, 2000).

8- Instabilité Génomique

L'activation oncogénique de la voie MAPK conduit à une hyperprolifération favorisant le stress réplicatif. Or l'activation de cette voie stimule parallèlement les transitions G1/S et G2/M. En l'occurrence, s'il existe des dommages à l'ADN, la rapidité de la transition G2/M induite ne permet pas leur réparation et conduit donc à l'accumulation de dommages à l'ADN. Ainsi, il a été montré que l'activation de la voie MAPK par les mutations de Ras ou de *BRAF* induisent l'accumulation de dommages à l'ADN et l'aneuploidie (Denko *et al.*, 1995, 1994; Kamata and Pritchard, 2011; Mitsutake *et al.*, 2005).

9- Résistance à la mort cellulaire

Le rôle de la voie MAPK dans la résistance à la mort cellulaire et en particulier à l'apoptose a été extensivement étudié et de nombreux mécanismes affectant les membres de la famille Bcl-2 ont été identifiés. Ces derniers incluent l'augmentation de l'expression et la stabilisation de protéines anti-apoptotiques telles que Bcl-2, Bcl-xL, Mcl-1 et/ou la diminution de l'expression et la déstabilisation des protéines pro-apoptique Bim, Bmf et BAD. En outre, la voie MAPK induit également l'expression de HDM2 induisant la dégradation de p53 et prévenant en conséquence son action de suppresseur de tumeur (Balmano and Cook, 2008).

De plus, il est à noter que des fonctions anti-apoptotiques indépendantes de MEK1/2 des kinases B-Raf et C-Raf ont été décrites. En effet, elles seraient capables de phosphoryler la protéine pro-apoptique BAD prévenant ainsi l'apoptose (Polzien *et al.*, 2009). Enfin, C-Raf inhiberait également l'apoptose en inactivant la protéine pro-apoptotique PAR4 et en augmentant l'expression de Bcl-2, ARC et HDM2.

10- Dérégulation épigénétique

Quelques articles ont également décrit l'implication de la voie MAPK dans des dérégulations épigénétiques. Les oncogènes Ras et B-Raf seraient en particulier impliqués dans la méthylation conduisant à l'extinction de gènes anti-tumoraux (Gazin *et al.*, 2007; Nagasaka *et al.*, 2008; Ordway *et al.*, 2004).

Defect or mutation	Tumour type	Frequency (%)
<i>RAS</i> mutation	Pancreas	90 (K)
	Lung adenocarcinoma (non-small-cell)	35 (K)
	Colorectal	45 (K)
	Thyroid (Follicular)	55 (H, K, N)
	Thyroid (Undifferentiated papillary)	60 (H, K, N)
	Seminoma	45 (K, N)
	Melanoma	15 (N)
	Bladder	10 (H)
	Liver	30 (N)
	Kidney	10 (H)
	Myelodysplastic syndrome	40 (N, K)
<i>BRAF</i> mutation	Acute myelogenous leukaemia	30 (N)
	Melanoma	66
<i>EGFR</i> overexpression	Colorectal	12
	Most carcinomas	>50
<i>ERBB2</i> amplification	Breast	30

Tableau 1 : Altérations induisant une hyperactivation de la voie MAPK dans les cancers

H, K et N font référence respectivement à H-Ras, K-Ras et N-Ras
(Adapté de Downward 2002)

	All	SSM	NM	Dubreuilh	Acrolentigineux	Uveal	Muqueux
B-RAF	47	44	33	19	19	9	
N-RAS	18	24	31	20	21	1	
H-RAS		2	3				
K-RAS		3	4				
KIT	8			28	36	3	39
GNAQ						35	
GNA11						36	

Tableau 2 : Mutations induisant une hyperactivation de la voie MAPK dans les mélanomes

(Adapté de Curtin, 2006 et les données de la base COSMIC)

2 - Mutations activant la voie MAPK dans les mélanomes

Des mutations activant la voie des MAPKs sont très souvent retrouvées dans les cancers. Selon les cancers, la cible prépondérante est variable (Tableau 1). Dans le cas des mélanomes, les mutations affectent très souvent *BRAF*, *NRAS*, *KIT* ou *GNAQ* et *GNA11* dans les mélanomes uvéaux. *In fine*, la voie MAPK est hyperactivée suite à ces différentes mutations dans près de 90% des mélanomes suggérant ainsi son rôle-clé dans la melanomagenèse. Néanmoins les cibles préférentiellement mutées varient en fonction du type histologique (Tableau 2).

Malgré tout, cette activation ne semble pas suffisante à l'apparition d'un mélanome et des altérations conjointes d'autres voies de signalisation sont également nécessaires comme celles décrites dans la partie I-B, plus particulièrement p16 et PI3K/Akt.

a – B-Raf et N-Ras, oncogènes clés des mélanomes cutanés SSM et NM

i – B-Raf

Les mutations de *BRAF* ont été, pour la première fois, identifiées dans les cancers et en particulier dans les mélanomes (66% des mélanomes de cette études étaient porteur d'une mutation) en 2002 dans le cadre d'un programme de séquençage de l'intégralité du génome de cellules cancéreuses mené par le Sanger Institute (Davies *et al.*, 2002). Ces dernières touchent certains cancers avec une forte fréquence : les mélanomes (40%), les cancers de la thyroïde (45%) et du colon (32%)(base de données COSMIC). En comparaison, *ARAF* et *CRAF* sont très rarement mutées (moins de 1% des échantillons de la base de données COSMIC).

Dans les mélanomes comme dans les autres cancers, près de 97% des mutations de *BRAF* affectent la valine en position 600 du domaine catalytique. Les autres mutations les plus fréquentes affectent les résidus 466, 469, 594, 597 et 601, mais chacune d'entre elles ne dépasse pas 0,2% des mutations. De manière logique, parmi les mutations répertoriées, la majorité induit une augmentation de l'activité kinase de la protéine B-Raf via l'induction d'une conformation phosphomimétique de la protéine qui est alors constitutivement activée. La mutation V600E conduit à une augmentation de l'activité enzymatique d'un facteur 480 *in vitro* (Wan *et al.*, 2004). De manière plus surprenante, quelques mutations comme les mutations G465A ou G469E conduisent *in vitro* à une perte d'activité (<10% de l'activité de la protéine sauvage). Wan et ses collaborateurs ont montré que malgré cette perte d'activité enzymatique apparente, ces protéines mutées induisaient tout de même après transfection une activation de la voie MAPK *in cellulo* comparée à la transfection de B-Raf sauvage. En effet, ces protéines mutées, sont capables de transactiver fortement C-Raf au sein des hétérodimères B-Raf/C-Raf décrits plus haut (II-A-3-b), ceci expliquant leur pouvoir oncogénique.

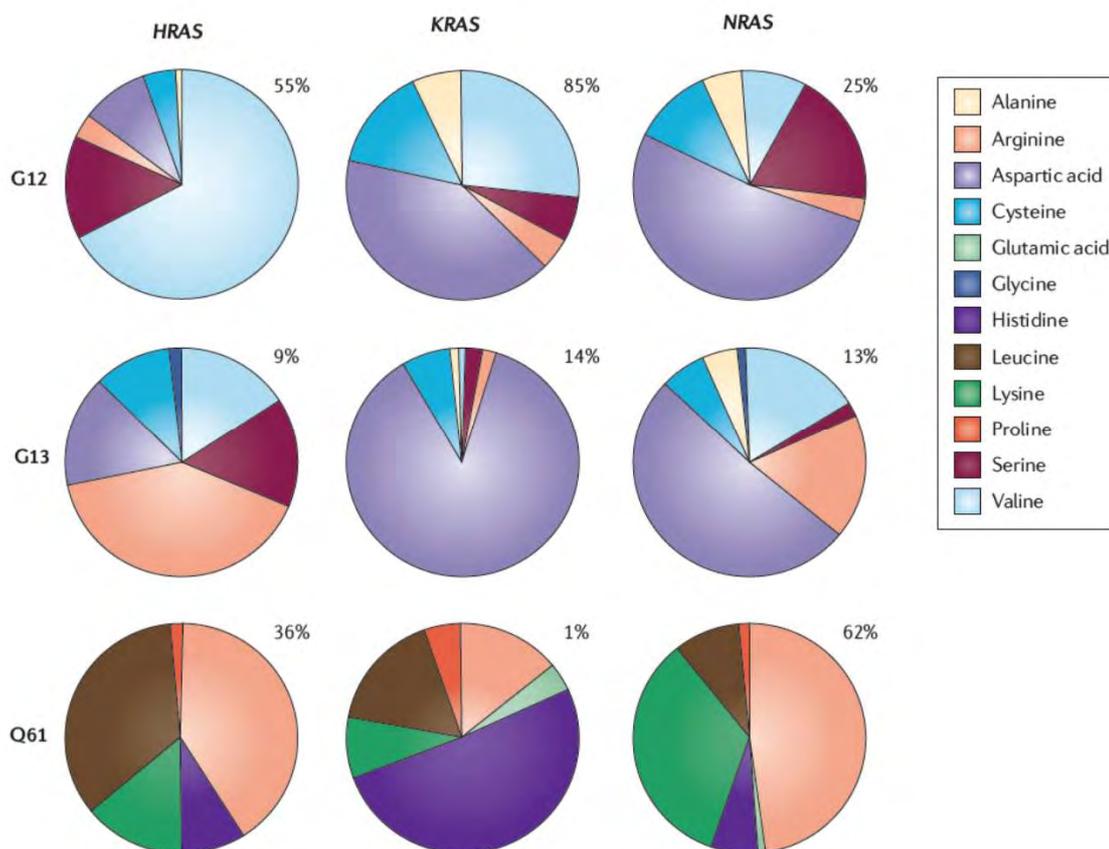


Figure 32 : Fréquence des mutations affectant les position G12, G13 et Q61 des isoformes Ras

(Adapté de Pylayera-Gupta, 2011)

Selon les études, les mutations de B-Raf touchent 40 à 60% des mélanomes avec une large prédominance pour les SSM et concernent à la fois les mélanomes primaires et métastatiques (Curtin *et al.*, 2005; Omholt *et al.*, 2003). Mais les mutations de B-Raf ne sont pas propres au mélanome, elles sont retrouvées de manière extrêmement courante dans les nævus (plus de 80%) (Pollock *et al.*, 2002). Ces données suggèrent, par conséquent, un rôle de B-Raf dans les stades précoces de la carcinogenèse. Cependant, certains auteurs ont constaté que les mutations de B-Raf n'avaient pas la même incidence au sein des mélanomes primaires RGP et VGP (Dong *et al.*, 2003; Greene *et al.*, 2009). En effet ces 2 études dénombrent une plus faible occurrence de ces mutations dans les stades RGP soulignant un rôle plus complexe de B-Raf dans la progression du mélanome.

La fréquence des mutations de *BRAF* a conduit au développement avec succès de thérapies ciblant ces dernières (voir partie II-C),.

ii - N-Ras

Près de 30% des cancers sont porteurs de mutations touchant l'un des 3 oncogènes Ras. 3 résidus sont touchés de manière préférentielle : G12, G13 et Q61. Ces mutations entraînent leur activation constitutive soit par l'inhibition de la liaison entre les protéines Ras et leur GAP (mutations de G12 et G13), soit par la perte de leur activité GTPasique intrinsèque (mutation Q61).

L'incidence de ces 3 mutations ne semble pas être équivalente pour les 3 homologues. En effet alors que N-Ras est préférentiellement mutée sur le résidu 61, K-Ras est presque toujours mutée sur le G12 (Figure 32). De plus, les mutations des 3 homologues ne semblent pas équivalentes selon les organes. Leur fréquence varie fortement en fonction du type de cancer (Tableau 1)(Pylayeva-Gupta *et al.*, 2011):

- *KRAS* est très souvent mutée dans les cancers du pancréas, colorectal ou du poumon
- *NRAS* est mutée dans les mélanomes et les hémopathies
- *HRAS* n'est retrouvée mutée que plus rarement dans les cancers de la tête et du cou et de la vessie.

Le rôle prépondérant d'une ou l'autre des homologues selon l'organe n'est pas encore totalement compris. Ces différences ont été attribuées au moins en partie aux variations d'expressions relatives des homologues selon les organes.

Dans les mélanomes, des mutations de *NRAS* ont été identifiées dans des lignées cellulaires dès 1984 (Rebecca *et al.*, 2012). En effet, ce dernier est muté dans environ 20% des mélanomes alors que ces homologues sont mutés dans moins de 2% des cas (base de données COSMIC). Ses mutations touchent majoritairement le résidu 61 et sont retrouvées de manière préférentielle dans les SSM (Curtin *et al.*, 2005).

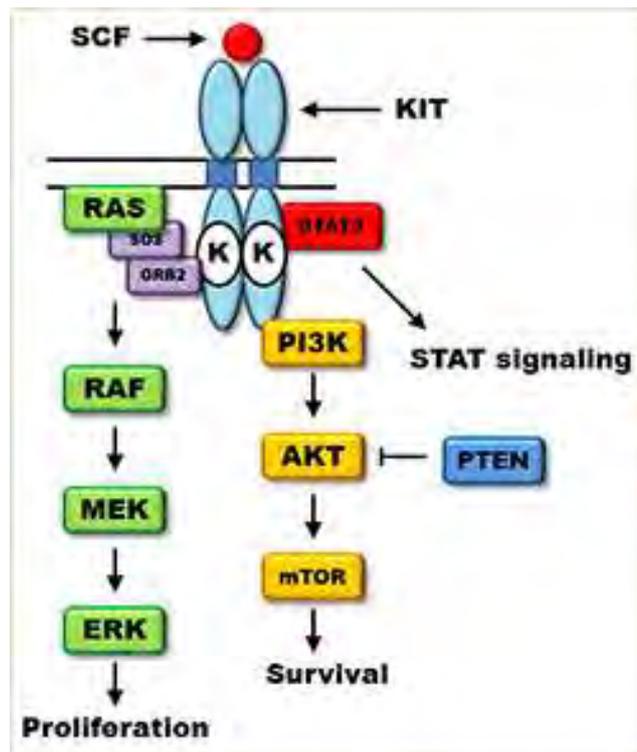


Figure 33 : La voie de signalisation de KIT

KIT est un récepteur à tyrosine kinase physiologiquement activé suite à la rencontre de son ligand SCF, ceci induit l'activation de 3 voies de signalisation: STAT3, PI3K/AKT et MAPK.

(D'après <http://www.mycancergenome.org>)

Dans les mélanomes, *NRAS* jouerait essentiellement un rôle dans les étapes précoces. En effet, il est muté dans de nombreux nævi et en particulier dans les nævi congénitaux, dans les stades RGP et métastatiques (Bauer *et al.*, 2006; Omholt *et al.*, 2003; Ross *et al.*, 2011). Ceci conforte l'hypothèse d'un rôle de *NRAS* dans l'initiation tumorale plutôt que dans la progression.

Cependant, il est à noter qu'une étude récente montre que les mutations de *BRAF* et de *NRAS* sont associées à un plus mauvais pronostic des mélanomes métastatiques (Ekedahl *et al.*, 2013).

Enfin, nous soulignerons que les mutations de *NRAS* et de *BRAF* sont mutuellement exclusives.

iii – Coopération nécessaire avec les autres voies de signalisation

La fréquence élevée des mutations de *BRAF* et de *NRAS* dans les mélanomes SSM et NM souligne leur rôle clé dans ces tumeurs. Cependant, ces mutations sont également retrouvées à une fréquence élevée dans les nævi qui sont des tumeurs bénignes. Ainsi restent donc à identifier les facteurs déterminant l'apparition d'un nævus ou d'un mélanome lors de l'occurrence de ces mutations. La réponse semble résider dans le fait que les cellules mutées dans les nævi entrent en sénescence contrairement aux cellules de mélanome. En effet, dans les nævi, il a été montré que les mutations de *BRAF* sont associées à un arrêt de prolifération et à l'expression des marqueurs de sénescence tels que p16 et la Senescence-Associated beta-galactosidase (SA- β -gal). De plus, il a été montré *in cellulo* que la perte de p16, l'activation de la voie PI3K/AKT ou l'expression de Myc permettait l'échappement à la sénescence en réponse à l'expression de B-Raf muté (Gray-Schopfer *et al.*, 2006; Michaloglou *et al.*, 2005; Zhuang *et al.*, 2008). Cette hypothèse est supportée par des études dans des modèles d'animaux transgéniques.

Chez la souris, Dankort *et al.* ont montré que l'expression de *BRAF*^{V600E} dans les mélanocytes conduit une hyperplasie mélanocytaire formant des lésions semblables aux nævi humains chez 100% des animaux mais aucun animal n'a développé de mélanome même après 75 semaines de suivi. En revanche, en association avec la perte de *PTEN*, qui à elle seule n'induit pas non plus de mélanome, *BRAF*^{V600E} conduit à l'apparition en une dizaine de jours de mélanomes invasifs conduisant à des métastases, nécessitant l'euthanasie des animaux au bout de 25 à 50 jours. Ces résultats confortent l'hypothèse de l'insuffisance de la seule présence de la mutation de *BRAF* pour induire un mélanome et de la nécessité de l'altération conjointe d'autres voies de signalisation (Dankort *et al.*, 2009). Ces données sont cependant à nuancer, en effet, 2 autres études publiées la même année montrent que la seule mutation de *BRAF* peut induire des mélanomes chez les souris mais avec une latence assez longue, 50% des animaux sont atteints au bout d'un an (Dhomen *et al.*, 2009; Goel *et al.*, 2009). Cette différence pourrait être liée à une différence de fond génétique ou de niveau d'expression du transgène en fonction du modèle. Ces études se rejoignent en montrant l'existence d'une coopération entre *BRAF* et l'altération d'autres voies. Par exemple dans l'étude de Dhomen, en l'absence de p16,

l'expression de $BRAF^{V600E}$ induit l'apparition de mélanomes nombreux et beaucoup plus rapidement. Au bout d'un an, 80% des animaux sont touchés démontrant le rôle promoteur de la perte de p16 (Dhomen *et al.*, 2009).

De la même manière, chez le poisson zèbre, l'expression de $BRAF^{V600E}$ induit des hyperproliférations mélanocytaires mais pas de lésions invasives telles que des mélanomes. En comparaison, la perte conjointe de p53 ou la surexpression de MITF conduit à des lésions invasives mimant les mélanomes humains (Lister *et al.*, 2013; Patton *et al.*, 2005).

Il a été montré de manière tout à fait similaire que la mutation $NRAS^{Q61K}$ ne conduisait que rarement à des mélanomes, mais qu'elle coopérait avec les altérations de $CDKN2A$, $TP53$ ou $CDK4$ pour induire des mélanomes dans la quasi-totalité des animaux avec une courte latence (Ackermann *et al.*, 2005; Ferguson *et al.*, 2010)

La nécessité de l'altération conjointe de plusieurs voies semble spécifique des mélanomes. En effet, dans les cancers du poumon, la mutation de $KRAS$ ou de $EGFR$ est suffisante à l'apparition d'adénomes invasifs (Fisher, 2001; Politi, 2006). De plus, dans d'autres organes comme la thyroïde ou le poumon, la mutation $BRAF^{V600E}$ est suffisante à induire la carcinogénèse démontrant que cette caractéristique est bien liée au mélanome et non à la nature des oncogènes B-Raf ou N-Ras (Dankort *et al.*, 2007; Knauf *et al.*, 2005).

c – KIT

KIT est un récepteur à tyrosine kinase appartenant à la famille du PDGFR. La liaison de son ligand, le SCF sur son domaine extramembranaire, composé de 5 motifs de type immunoglobuline, entraîne la dimérisation du récepteur, activant ce dernier et conduisant ainsi à son autophosphorylation et à l'activation des cascades de signalisation MAPK, PI3K/AKT et JAK/STAT (Figure 33). Ce récepteur est impliqué dans le développement de plusieurs types cellulaires dont les mélanocytes et les progéniteurs hématopoïétiques.

L'implication de KIT dans la carcinogénèse a été démontrée dans de nombreux cancers. Des altérations conduisant à une sécrétion autocrine de SCF sont par exemple retrouvées dans les cancers du sein, du poumon à petites cellules et colorectal. De même, des mutations conduisant à une activation constitutive du récepteur KIT , indépendamment de la liaison de son ligand, sont fréquemment associées aux tumeurs stromales gastro-intestinales (GIST)(Ibrahim and Haluska, 2009).

Dans le cas du mélanome, l'implication de KIT est longtemps restée incertaine. Initialement, plusieurs études indépendantes montraient que son expression diminuait au cours de la progression des mélanomes (Natali *et al.*, 1992; Ohashi *et al.*, 1996). Il avait également été montré que le SCF

inhibait la croissance cellulaire et que la ré-expression de *KIT* dans des lignées de mélanome métastatique ne l'exprimant pas, restaurait la sensibilité à l'apoptose induite par SCF (Huang *et al.*, 1996; Zakut *et al.*, 1993). Ces différents travaux soutiennent l'hypothèse que *KIT* jouerait potentiellement un rôle suppresseur de tumeur plutôt que d'oncogène dans le mélanome à la différence des autres cancers. Par la suite, le rôle oncogène de *KIT* a été mis évidence dans les mélanomes en 2005 : la mutation activatrice *KIT^{L576P}* a pour la première fois été identifiée dans des mélanomes et par la suite il a été montré que des mutations activatrices et/ou des amplifications de *KIT* étaient très fréquemment retrouvées dans certains types de mélanomes : les mélanomes muqueux (39%), acraux (42%) et de Dubreuilh (34%) (Curtin *et al.*, 2006).

Du fait de la disponibilité en clinique d'inhibiteurs de c-Kit tel que l'Imatinib et le Sunitib, les travaux précédents ont suscité énormément d'intérêt et ont rapidement conduit à l'utilisation de ces inhibiteurs au cours d'essais cliniques de phase II dans des mélanomes porteurs de mutations de *KIT*. Au cours de ces études des réponses complètes et partielles durables ont été obtenues pour plusieurs patients démontrant l'intérêt thérapeutique de l'inhibition de c-Kit dans des mélanomes porteurs d'anomalies de ce gène. Il semblerait que les patients porteurs des mutations *KIT^{K642E}* et *KIT^{L576P}* et/ou pour lesquels le rapport d'expression entre la forme mutée et sauvage est supérieure à 1 répondent mieux à ces inhibiteurs (Nikolaou *et al.*, 2012). Ces résultats sont actuellement en cours de confirmation dans des essais cliniques de phase III.

d - GNAQ et GNA11

Alors que les mutations décrites ci-dessus conduisent à une activation de la voie MAPK dans les SSM pour *BRAF* et *NRAS* et dans les mélanomes acrolentigineux, muqueux et de Dubreuilh pour *KIT*, ce sont des mutations de *GNAQ* et *GNA11* qui conduisent fréquemment à l'activation de cette voie dans les mélanomes uvéaux.

GNAQ et *GNA11* codent pour des sous-unités α de récepteurs aux protéines G. Les mutations de ces 2 gènes ont été identifiées initialement au cours de travaux se focalisant sur le développement. En effet, les souris porteuses de mutations activatrices de ces protéines développaient une hyperpigmentation diffuse associée à une prolifération importante intra-dermique des mélanocytes. Les mutations *GNAQ^{Q209}* et *GNA11^{R183}* rendent ces protéines constitutivement actives et induisent donc à la fois l'activation de la voie MAPK et PI3K/AKT (Flaherty *et al.*, 2012a).

Du fait de la grande similitude des lésions développées par ces souris avec les nævi humains, des analyses génétiques des loci correspondants ont été menées sur une collection de tumeurs mélanocytaires. Il a ainsi été montré que la mutation *GNAQ^{Q209L}* est présente dans 83% des nævi bleus bénins, 50% des nævi bleus malins, 45% des mélanomes uvéaux primaires et 22% des métastatiques

(Van Raamsdonk *et al.*, 2008). Concernant GNA11, la mutation la plus fréquente affecte l'arginine en position 183 et est retrouvée dans 32% des mélanomes uvéaux primaires et 57% des métastatiques, soulignant son rôle potentiel dans la progression métastatique (Van Raamsdonk *et al.*, 2010). Les mutations de GNAQ et GNA11 étant mutuellement exclusives, au total plus de 80% des mélanomes uvéaux sont porteurs de ces mutations, démontrant le rôle clé de cette voie dans cette pathologie.

3 - Intérêt du ciblage de la voie MAPK

In fine près de 90% des mélanomes portent des mutations conduisant à une activation de la voie MAPK soutenant l'hypothèse que cette voie joue un rôle essentiel dans la mélanomagenèse. La voie MAPK serait un « driver » dans le mélanome au même titre que la translocation Bcr-Abl dans les leucémies myéloïdes chroniques, les amplifications de HER2 dans les cancers du sein ou les mutations de l'EGFR dans les cancers du poumon. Par conséquent, l'inhibition de la voie MAPK pourrait présenter un intérêt thérapeutique au même titre que l'Imatinib, l'Herceptin et les inhibiteurs de l'EGFR. Ce postulat a suscité énormément d'espoir du fait de l'inefficacité des traitements disponibles (voir partie I-C-2) et de l'incidence croissante des mélanomes dans les pays occidentaux (voir partie I-A-4).

a - Preuve de concept

Suite à l'identification des mutations de BRAF et de NRAS, leur rôle a été étudié à l'aide d'ARNs interférents (ARNi). L'inhibition de NRAS ou de BRAF par des ARNi, dans des cellules de mélanome mutées, inhibe la transformation (les cellules ne sont plus capables de clonogénie), induit l'entrée en apoptose et affecte parallèlement leurs capacités migratoires et invasives (Christensen and Gulberg, 2005; Eskandarpour *et al.*, 2005; Klein *et al.*, 2008).

Chez la souris, l'extinction de BRAF^{V600E} ou de NRAS à l'aide de shARN inductibles inhibe la croissance tumorale, induit la régression des tumeurs établies et diminue les métastases pulmonaires après injection intra-veineuse des cellules tumorales (Hoeflich *et al.*, 2006; Kwong *et al.*, 2012; Sharma *et al.*, 2006; Sumimoto *et al.*, 2004).

De plus, les cellules de mélanome mutées BRAF^{V600E} sont particulièrement sensibles aux inhibiteurs de MEK1/2. De manière relativement décevante les cellules de mélanome mutées NRAS semblent peu sensibles (Solit *et al.*, 2005).

Le Sorafenib (BAY 43-9006) est un inhibiteur multi-kinase utilisé en clinique dans les cancers rénaux et les hépatocarcinomes. Parmi ces multiples cibles, cette molécule est capable d'inhiber les protéines Raf, ce qui a très rapidement conduit à des tests précliniques ainsi qu'à des essais cliniques

dans les mélanomes. En effet, *in cellulo*, cet inhibiteur induit la mort des cellules de mélanome mutées *BRAF* (Panka, 2006).

b - Les premiers écueils

i - Les inhibiteurs de farnésyl transférases (FTI) dans le ciblage des protéines Ras mutées

La découverte dans les années 80 du rôle oncogénique des mutations de Ras dans de nombreux cancers ont conduit à la recherche de stratégies visant à inhiber cet oncogène. Malheureusement le ciblage direct Ras activé n'a pu être atteint. Une stratégie visant alors à empêcher la localisation membranaire de Ras et donc son interaction avec ses effecteurs a été développée. En effet, pour être localisée à la membrane plasmique les protéines Ras sont prénylées puis éventuellement palmitoylées (voir partie I-A-2-a). Des inhibiteurs de la prénylation de Ras et en particulier de sa farnésylation ont été développés et ont démontré chez l'animal une certaine efficacité mais ont conduit à un échec cuisant chez l'Homme (Berndt *et al.*, 2011). 3 molécules, le Tipifanib, le Lonafarnib et le BMS-214662, ont été testés au cours d'une quarantaine d'essais de phase I et II en monothérapie et une quinzaine en association avec une chimiothérapie ainsi que 3 essais cliniques de phase III (2 en monothérapie et un en association à la Gemcitabine). Aucun de ces nombreux essais cliniques n'a conduit à des résultats suffisamment probants pour permettre la délivrance d'une AMM. Dans le mélanome, un essai clinique de phase II n'a montré aucun effet (Gajewski *et al.*, 2012).

Cet échec pourrait être lié d'une part au fait qu'en présence d'un FTI N-Ras et K-Ras peuvent être géranyl-géranylée et atteignent tout de même la membrane et leurs effecteurs. D'autre part, ces inhibiteurs semblent être efficaces chez certains patients mais les marqueurs prédictifs de réponse restent à établir. Enfin, les FTI altèrent la fonction des lymphocytes T et pourraient donc contrebalancer l'effet direct sur la tumeur en limitant sa reconnaissance par le système immunitaire (Marks *et al.*, 2007).

ii - Le Sorafenib dans les ciblage des protéines Ras

Le Sorafenib fut le premier inhibiteur de B-Raf disponible. Son intérêt dans la prise en charge du mélanome a surtout été évalué pour son activité multi-kinase et également sa capacité à inhiber C-Raf. 2 essais cliniques de phase III en association à une chimiothérapie n'ont pas montré de bénéfice de l'adjonction du Sorafenib par rapport à la chimiothérapie seule (Flaherty *et al.*, 2012b; Hauschild *et al.*, 2009). Certains essais cliniques de phase I et II ont recherché une relation entre les patients répondeurs et la présence de la mutation B-Raf mais n'ont trouvé aucune corrélation (Eisen *et al.*, 2006; Flaherty *et al.*, 2008; Ott *et al.*, 2010).

Spécificité	Molécule	Compagnie	Stade de développement	Spécificité B-Raf ^{WT} / muté C-Raf			Autres cibles (IC50 < 1 µM)
				B-Raf ^{V600E}	B-Raf ^{wt}	C-Raf	
B-Raf ^{V600E}	PLX4720	Ploxikon Roche	Composé modèle non développé en clinique	13	160	6,7 C-Raf ^{F240Danc} 1830	BRK
	PLX4032		AMM	31	100	28	KHS1, SRMS, ACK1, FGR
	Dabrafenib SB-590885 GSK2118436	GSK	AMM	0,5	12	5	
	CEP-32496	Ambit Teva	Phase I/II NCT01877811	14	36	39	Ab/BCR-Ab11, RET, EPHA2, VEGFR2, VEGFR1, LCK, CKIT
Pan Raf	GDC-0879	Genentech	préclinique	0,19	0,17	0,54	
	RAF265 CHIR-265	Chiron Novartis	Phase II NCT00304525	3-60 nM			VEGFR2
	XL281	Exelixis BMS	Phase I terminée non publiée NCT00451880	6	4,5	2,5	
	AZ628	Astra-Zeneca	préclinique	34	29	100	VEGFR2, DDR2, Lyn, Flt1, FMS
	LGX-818	Novartis	7 essais de phase I ou II Seul et en association	Non disponible			
	ARQ-756 Prodrogue du ARQ-680	ArQule	Phase I NCT01225536	2,7	2,6	7,3	

Tableau 3 : Inhibiteurs de B-Raf en cours de développement

Origine des données:

Tsai, 2008

Amiri, AACR 2006 abstract 4855

Arkenau, 2011

Khazak, 2007

Chen AACR 2011 abstract 3565

James, 2012

http://www.arraybiopharma.com/_documents/Publication/PubAttachment383.pdf

<http://clinicaltrials.gov/>

Cet échec serait lié à une inhibition insuffisante de la cible aux doses utilisées, elles-mêmes limitées par la toxicité de la molécule. Afin de pallier ces problèmes, des inhibiteurs spécifiques de B-Raf et en particulier de sa forme mutée ont été développés.

C - Le Vemurafenib

A la suite de la découverte de la fréquence élevée de mutations de *BRAF* conduisant la substitution de la valine en position 600 par un acide glutamique sur la protéine correspondante (*BRAF^{V600E}*) et de la démonstration de son rôle « driver » dans le mélanome, de nombreuses compagnies pharmaceutiques se sont engagées dans le développement d'inhibiteurs de cet oncogène. A ce jour, de nombreux inhibiteurs sont en développement (Tableau 3). Le premier, à avoir reçu une AMM chez l'Homme, est le Vemurafenib, découvert par Plexxikon et développé en collaboration avec les laboratoires Roche. Le développement du Vemurafenib s'est fait à une vitesse fulgurante : synthétisé au début de l'année 2005, il a été administré pour la première fois chez l'Homme en novembre 2006, l'essai clinique de phase III a débuté en janvier 2010 pour conduire à l'obtention d'une AMM en août 2011 aux Etats-Unis et en février 2012 en Europe (Bollag *et al.*, 2012).

Un deuxième inhibiteur, le Dabrafenib développé par les laboratoires GSK, a également reçu une AMM très récemment en mai 2013.

1 – Conception

La stratégie classique d'identification d'inhibiteurs par les entreprises pharmaceutiques consiste le plus souvent à effectuer un criblage à haut-débit de bibliothèques de plusieurs centaines de milliers de molécules, à la recherche de molécules ayant une forte affinité de liaison/inhibition pour la cible. Puis, à améliorer la spécificité et les propriétés pharmacocinétiques des Hits (molécule présentant une activité au cours d'un test à haut débit) par des étapes d'évolution moléculaire. Cependant cette stratégie n'a pas mené aux résultats escomptés pour B-Raf. L'inhibiteur à ce jour disponible en clinique a été développé par Plexxikon grâce à une stratégie originale.

L'entreprise Plexxikon est spécialisée dans le développement d'inhibiteurs à partir de données structurales. Le principe est d'identifier un squelette moléculaire de petite taille 150 à 350 kDa (généralement appelé « scaffold ») ayant une faible affinité pour la classe de cibles visées puis d'augmenter l'affinité et la spécificité en augmentant au fur et à mesure la taille de l'inhibiteur par substitution. Cette méthode a conduit à l'identification du PLX4720, inhibiteur sélectif de *Braf^{V600E}* publiée en 2008 dans PNAS (Tsai *et al.*, 2008).

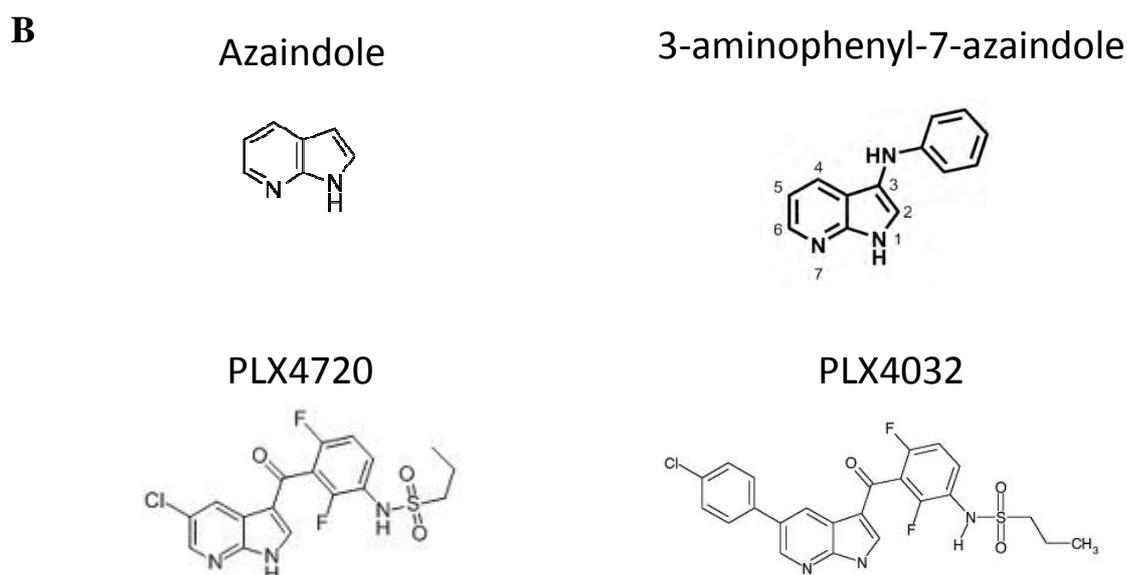
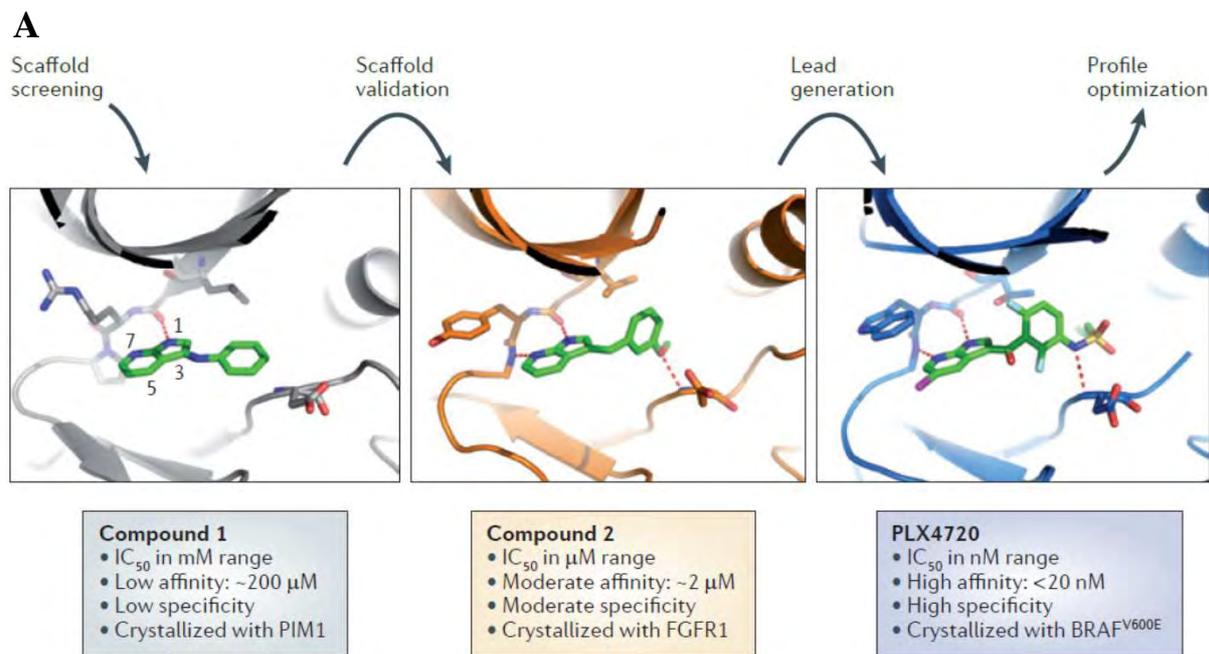


Figure 34 : Découverte du premier inhibiteur de B-Raf autorisé, le Vémurafenib

A : Du scaffold au PLX4720. Identification du scaffold azaindole à partir d'une bibliothèque de scaffold de petite taille co-cristallisée avec la kinase PIM1, validation des composés substitués en position 3 co-cristallisés avec FGFR1, optimisation ayant conduit à la découverte du PLX4720.
(D'après Bollag, 2012)

B : Structure chimique des composés successivement identifiés et ayant conduit à la découverte du Vémurafenib

Brièvement, les conditions de cristallisation de B-Raf n'étant pas totalement optimales, en parallèle de leur mise au point, les premiers criblages ont été réalisés sur d'autres kinases dont la cristallisation était très bien maîtrisée dont PIM1, p38 et CSK. 20 000 composés ont été criblés, 238 sélectionnés et une partie co-cristallisée avec les kinases précédentes, le motif 7-azaindole a été retenu du fait de sa capacité à interagir avec le site de liaison à l'ATP des kinases. Des dérivés mono et bi-substitué du motif 7-azaindole ont été synthétisés, criblés et co-cristallisés dont le 3-aminophenyl-7-azaindole afin de comprendre les interactions nécessaires à la liaison ainsi qu'à l'inhibition des kinases. Par la suite, FGFR1 a été utilisé pour l'optimisation du squelette précédemment identifié conduisant à la synthèse de nouvelles molécules de moyenne affinité ($\approx 2 \mu\text{M}$). Ces derniers ont alors été testés sur la kinase mutée B-Raf^{V600E} et les plus affins ($< 20 \text{ nM}$) ont été co-cristallisés avec leur cible.

A partir de ces données, a été identifiée une série difluoro-phenylsulfonamide présentant une excellente affinité pour B-Raf^{V600E} mais également sélective par rapport aux autres kinases dont B-Raf^{WT}. De nouvelles optimisations à partir des co-cristaux obtenus ont conduit à l'identification du PLX4720. Le PLX4720 inhibe à une IC50 10 fois moindre B-Raf^{V600E} par rapport à la forme sauvage et présente une excellente sélectivité face à plus de 70 kinases. Ces données ont permis la synthèse d'une nouvelle série de composés dont le PLX4032 qui présente de meilleures propriétés pharmacocinétiques d'après les études réalisées chez le chien et le singe. Le PLX4032 a donc été choisi pour le développement pharmaceutique et a été appelé le Vemurafenib pour **V600E mutated BRaf**. La stratégie ayant conduit la découverte du Vemurafenib est présentée en figure 34.

2 – Développement préclinique

a - Caractérisation *in vitro* et *in cellulo*

In vitro, le PLX4720 inhibe la forme mutée B-Raf^{V600E} de manière 10 fois plus efficace que la forme sauvage. Cette spécificité serait due à sa liaison à la forme active B-Raf et donc de manière préférentielle à la forme mutée constitutivement active de B-Raf (Tsai *et al.*, 2008). De manière surprenante, lors de l'évaluation du PLX4720 sur des lignées cellulaires, les lignées mutées B-Raf^{V600E} étaient 100 fois plus sensibles que les sauvages. En effet, les lignées mutées pour B-Raf seraient plus dépendantes de la voie MAPK conduisant ainsi à une amplification de l'effet et de la spécificité de l'inhibiteur. Cet argument est corroboré par la sensibilité également accrue des lignées B-Raf^{V600E} aux inhibiteurs de MEK (Solit *et al.*, 2005).

Plusieurs études ont confirmé la sensibilité particulière d'un large panel de cellules de mélanome porteuses de B-Raf^{V600E} au PLX4720 ainsi qu'à son analogue le PLX4032 (Lee *et al.*, 2010; Sala *et al.*, 2008; Yang *et al.*, 2010). Les effets de ces inhibiteurs sont corrélés à :

- une inhibition de la voie Raf/MEK/ERK objectivée par l'état de phosphorylation de MEK1/2 et ERK1/2
- une inhibition de la prolifération cellulaire associée à un arrêt du cycle en G1 dès 24 h de traitement
- à une diminution de l'expression de la cycline D₁
- à l'entrée en apoptose d'une proportion plus ou moins importante de cellules selon la lignée considérée à partir de 48 h de traitement (Lee *et al.*, 2010; Sala *et al.*, 2008; Tsai *et al.*, 2008; Yang *et al.*, 2010).
- Ces effets sont retrouvés sur des modèles de culture cellulaire plus complexes en 3 dimensions tels que des sphéroïdes et des reconstructions de peau (Lee *et al.*, 2010; Yang *et al.*, 2010).

De plus, le Vemurafenib semble être actif sur les différentes mutations de B-Raf affectant la valine 600, mutations V600K, V600D, V600R, mais pas sur les autres mutations de *BRAF* affectant par exemple l'exon 11 (V465, G466, G469)(Yang *et al.*, 2010). Une publication récente montre qu'il agit sur la mutation L597R (Bahadoran *et al.*, 2013).

Il est à noter que si les premières données de l'article de Tsai *et al.* suggèrent une efficacité de cet inhibiteur dans les lignées porteuses de mutation de *BRAF* quel que soit le type cellulaire (et notamment dans les lignées de colon), il s'est révélé par la suite que seules les lignées de mélanome étaient particulièrement répondeuses. En effet, dans les lignées de thyroïde, le PLX4032 n'induit pas l'apoptose et n'affecte que modérément le cycle cellulaire (Sala *et al.*, 2008). De plus, il a été mis en évidence récemment des voies de rétrocontrôle dans les lignées de colon et de thyroïde prévenant l'efficacité de l'inhibition de la voie MAPK par le PLX4032 (Montero-Conde *et al.*, 2013; Prahallad *et al.*, 2012).

b - Etudes *in vivo*

Chez la souris, le PLX4032 et le PLX4720 sont capables d'induire la régression de tumeurs xenogreffées de cellules mutées *BRAF*. L'étude de Tsai *et al.* montre que le PLX4720 est capable d'induire la régression de tumeurs de colon (Colo205), à la dose de 20 mg/kg/j ainsi que de mélanome (Lu1205) à la dose de 100 mg/kg/2 fois/j (Tsai *et al.*, 2008). L'étude de Yang *et al.* montre quant à elle, la régression de tumeurs issues des lignées LOX, A375 et Colo829 aux doses respectives de 25, 75 et 100 mg/kg/2 fois/j. De manière tout à fait intéressante cette étude montre également qu'à la dose de 75 mg/kg/2 fois/j pendant 10-15 jours, l'éradication de la tumeur était complète chez 80 % des

animaux puisqu'à l'arrêt du traitement ils ne développaient aucun signe tumoral et mourraient de causes naturelles.

Ces études précliniques chez l'animal ont d'une part révélé une bonne biodisponibilité de ces inhibiteurs (en particulier la poudre micro-précipitée pour le PLX4032) et d'autre part montré l'excellent profil de tolérance de la molécule. En effet aucun effet toxique n'a été constaté chez le rat et le chien même à la dose 1000 mg/kg/j (Bollag *et al.*, 2010).

Ces données extrêmement encourageantes ont conduit très rapidement à l'évaluation du PLX4032 chez l'Homme.

c – Vemurafenib et immunité anti-tumorale

Outre son rôle direct sur la prolifération cellulaire et l'apoptose, plusieurs articles publiés en 2013 suggèrent que le Vemurafenib pourrait restaurer la réponse immunitaire anti-tumorale. En effet, plusieurs mécanismes co-existent au sein des mélanomes conduisant à une immunosuppression locale et à une altération de la reconnaissance de la tumeur en tant que telle par le système immunitaire.

Initialement, il a été suggéré que le Vemurafenib altèrerait la réponse immunitaire anti-tumorale limitant l'efficacité de ce dernier (Hooijkaas *et al.*, 2012).

Cependant, des données plus récentes suggèrent au contraire que le Vemurafenib pourrait d'une part conduire à la ré-expression d'antigènes mélanocytaires et des molécules du CMH et d'autre part supprimer les mécanismes d'immunosuppression locale conduisant à une stimulation de l'immunité anti-tumorale (Frederick *et al.*, 2013; Sapkota *et al.*, 2013; Schilling *et al.*, 2013). En soutien à ces publications, Cooper *et al.* ont présenté lors du dernier congrès de l'AACR (Washington, 2013) des données montrant l'apparition d'une population clonale de lymphocytes au sein de biopsies de patients traités au Vemurafenib suggérant très fortement la mise en place d'une réponse immunitaire (Cooper, 2013).

3 - Essais cliniques

a - Phase I / II

La première administration de Vemurafenib chez l'Homme, a eu lieu en novembre 2006 dans le cadre d'un essai clinique de phase I ayant pour objectif primaire d'évaluer la sécurité et le profil pharmacocinétique chez des patients présentant un cancer métastatique avec une préférence pour les mélanomes et comme objectif secondaire d'évaluer la réponse au traitement. Les résultats de cette étude ont été publiés en 2010 (Bollag *et al.*, 2010; Flaherty *et al.*, 2010).

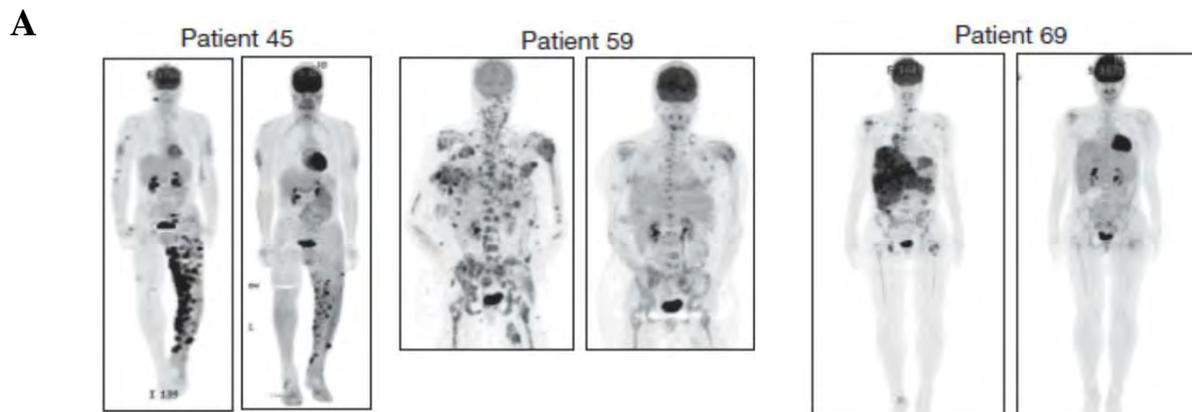


Figure 35 : Illustration de la réponse au Vémrafenib chez des patients atteints d'un mélanome métastatique B-Raf^{V600E}

A : TEP-scan prétraitement et après 2 semaines de traitement par du Vémurafenib. Chaque couple d'image montre la diminution du marquage FDG en TEP-scan après traitement (image de droite) par rapport à l'initiation du traitement (image de gauche). (D'après Bollag, 2010)

B : Réduction de métastases cutanées sous Vemurafenib. Photographie d'un patient atteint de multiples métastases cutanées avant traitement (à gauche) et après 15 semaines de traitement par du Vémurafenib. (Wagle, 2011)

Les premières administrations ont été faites à partir d'une forme cristalline du PLX4032 à des doses de 400 mg à 3200 mg / jour et n'ont révélé aucun effet toxique mais également aucune efficacité. En effet, cette forme avait une très mauvaise biodisponibilité, les concentrations plasmatiques n'augmentaient pas en fonction des doses administrées et la concentration cible n'a jamais pu être atteinte. L'essai clinique a été interrompu et une nouvelle formulation avec une meilleure biodisponibilité a été développée. L'objectif a été atteint avec une forme MBP (Microprecipitated Bulk Powder) qui présente une biodisponibilité 10 fois supérieure que la forme cristalline chez l'Homme et la souris et a permis la reprise de l'essai clinique (Yang *et al.*, 2010).

Au final 55 patients ont été inclus dont 49 porteurs de mélanome métastatique et 3 de cancers papillaires de la thyroïde mutés *BRAF*^{V600E}. Parmi les 16 patients porteurs de mélanome métastatique *BRAF*^{V600E} ayant reçu une dose supérieure à 480 mg / jour, 10 ont eu une réponse partielle et 1 une réponse complète et ceci quel que soit le site métastatique (poumon, foie, os). Cependant à la dose maximale de 2240 mg / jour, 4 patients sur 6 ont présenté des signes de toxicité conduisant au choix de la dose de 1920 mg / jour pour la phase II.

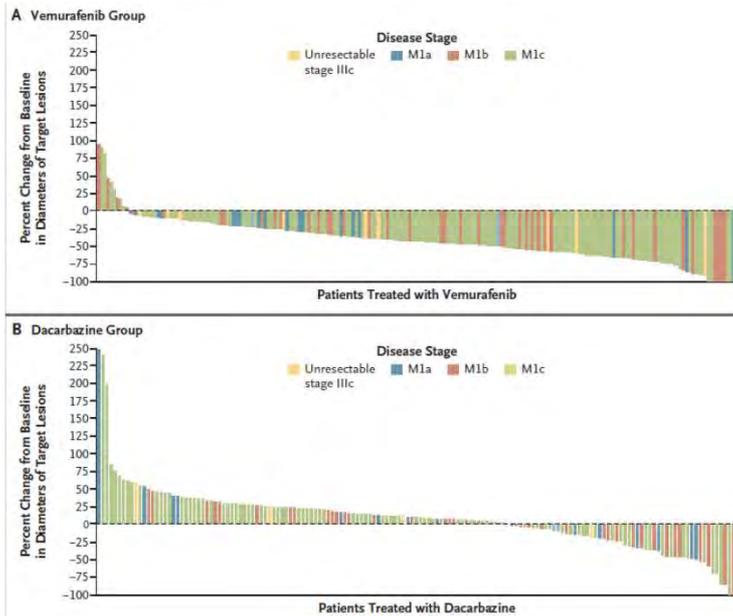
Cet essai clinique a été prolongé par une cohorte d'extension n'incluant que des patients porteurs de mélanome métastatique muté *BRAF*^{V600X}. En effet, aucune réponse n'avait été observée chez les 5 patients non porteurs de cette mutation. Cette deuxième phase a inclus 32 patients dont 24 ont présenté une réponse partielle et 2 une réponse complète. C'est-à-dire que plus de 80% des patients inclus répondaient au traitement, un taux impressionnant au vu des 5 à 20% de réponse généralement observée avec le traitement de référence qu'est la Dacarbazine. La figure 35 illustre les réponses fréquemment observées sous Vemurafenib.

Au cours de cette étude, l'activité de la voie MAPK a été évaluée chez 15 patients sur des biopsies prélevées avant l'initiation du traitement et 15 jours après. Il a été mis en évidence une corrélation entre le niveau de phosphorylation d'ERK cytoplasmique, la concentration plasmatique de PLX4032 et la réponse tumorale. En fait, 80% d'inhibition semble nécessaire à la régression tumorale. Ce taux est supérieur à celui présagé lors des expérimentations chez la souris, en effet avec la lignée de colon Colo205, 50% d'inhibition semblait suffire à induire une régression tumorale.

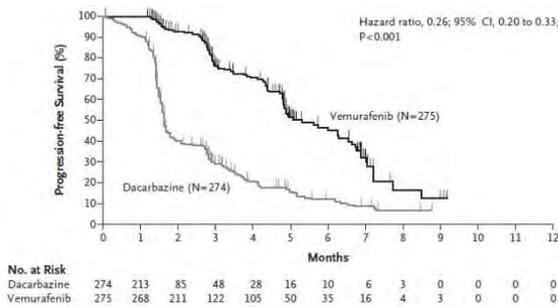
La force de ces résultats a conduit à l'ouverture d'un essai clinique de phase III en parallèle d'un deuxième essai de phase II. Les résultats de ce dernier ont été publiés en 2012 et ont globalement confirmé les résultats précédents avec une nuance sur le taux de réponse, visiblement plus proche de 50% que de 80% (Sosman *et al.*, 2012).

Par ailleurs, au cours de la première phase d'escalade de dose, 3 patients porteurs de cancers papillaires de la thyroïde mutés *BRAF*^{V600E} avaient été inclus, 1 patient a présenté une réponse partielle

A



B



C

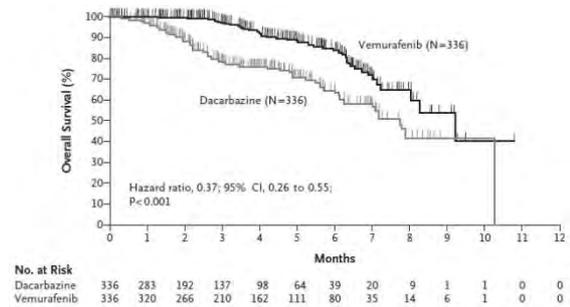


Figure 36 : Résultats de l'essai clinique de phase III ayant conduit à l'AMM du Vemurafenib

A : Meilleure réponse pour chaque patient. Chaque barre représente un patient. Le pourcentage de changement par rapport à l'initiation du traitement représenté en ordonnée est évalué par rapport à la somme des diamètres des différentes lésions.

B et C : Représentation de Kaplan-Meier de la survie sans progression (B) et de la survie globale (C) comparant l'efficacité du Vemurafenib et de la Dacarbazine.

(D'après Chapman, 2011)

et 2 autres ont vu leur maladie stabilisée. Si le PLX4032 semble présenter une certaine efficacité dans ce type de cancers, elle est visiblement beaucoup moins importante que dans le mélanome conduisant au développement de cette molécule en priorité dans ce cancer. A ce jour, un essai clinique de phase II est en cours dans les cancers thyroïdiens (NCT01709292).

b - Phase III

Les essais cliniques précédents ayant démontré l'efficacité du Vemurafenib sur la régression tumorale, l'objectif de cet essai de phase III était de démontrer une augmentation de la survie sans progression et de la survie globale par rapport à la Dacarbazine. Cet essai a inclus 675 patients présentant un mélanome métastatique ou non opérable (stade IIIc et IV) porteur d'une mutation affectant la valine 600 de B-Raf, n'ayant reçu aucun traitement au préalable afin de déterminer l'intérêt de ce traitement dès la première ligne et ne présentant pas de métastases cérébrales (Chapman *et al.*, 2011).

L'efficacité du PLX4032 sur la croissance tumorale a pu être confirmée. Une large majorité des patients ont en effet répondu avec une réponse objective atteignant les critères RECIST (> 30% de régression de la masse tumorale) pour 48% des patients (104 réponses partielles et 2 réponses complètes sur 219 patients) alors que ce taux n'était que de 5% dans le groupe contrôle traité avec la Dacarbazine (Figure 36A).

Concernant la survie sans progression la médiane pour le Vemurafenib est de 5,7 mois versus 1,6 mois pour la Dacarbazine, et lors de l'analyse intermédiaire, la survie globale à 6 mois passait de 64 à 84% (Figure 36B et C).

Ceci a conduit à la délivrance d'une AMM par la FDA en août 2011, accompagnée d'une ATU en France à la même date puis à une AMM européenne en février 2012.

c - Effets indésirables : l'activation paradoxale de la voie MAPK

Le Vemurafenib a montré lors des essais cliniques un bon profil de tolérance, tout particulièrement pour un traitement anti-cancéreux. Les effets indésirables reportés incluent le plus souvent des réactions cutanées (rash, photosensibilité), des arthralgies et de la fatigue, et ont conduit à une diminution de la dose ou à une interruption du traitement chez près de 40% des patients.

De manière beaucoup plus inattendue, près de 20% des patients ont développé des carcinomes cutanés basocellulaires. Ces derniers semblent spécifiquement liés à l'inhibition de B-Raf et non à un effet annexe spécifique au Vemurafenib puisqu'ils ont également été retrouvés avec d'autres inhibiteurs de *BRAF* comme le Sorafenib, le Dabrafenib et le XL281 (Robert *et al.*, 2011b). Leur ablation chirurgicale a confirmé qu'ils étaient bien différenciés et non invasifs. Ils apparaissent de

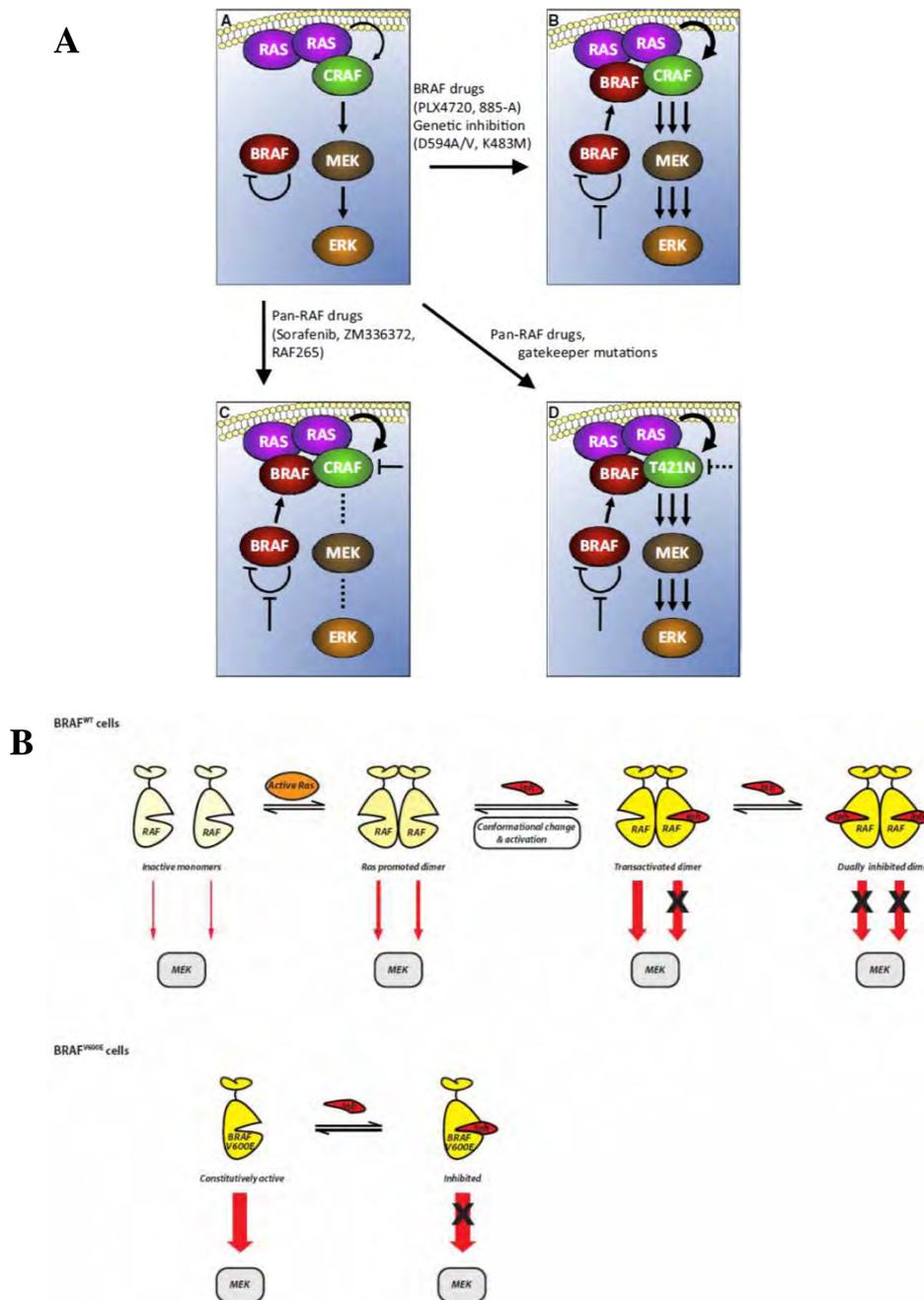


Figure 37 : Mécanisme d'activation paradoxale des inhibiteurs de B-Raf

A : Mécanisme proposé par Heidorn et al. En présence d'une activation de Ras, les inhibiteurs de B-Raf^{V600E} liés à B-Raf^{WT} transactivent C-Raf, au contraire en présence d'inhibiteurs pan-Raf, B-Raf et C-Raf étant liés aux inhibiteurs il n'y a pas d'activation paradoxale.

(D'après Heidorn, 2010)

B : Mécanisme propose par Poulikakos at al. Aux concentrations usuelles, seule une partie des monomères de B-Raf et de C-Raf sont liés aux inhibiteurs, en presence de Ras active les monomères liés aux inhibiteurs se dimérisent avec des monomères non liés et les transactivent.

(D'après Poulikakos, 2010)

manière assez rapide après l'initiation du traitement (environ 2 mois) suggérant l'implication de Vemurafenib dans la promotion de lésions pré-existantes plutôt que dans leur initiation. Il s'avère que les carcinomes cutanés basocellulaires sont effectivement des lésions pré-existantes à l'initiation du traitement et porteuses de mutation de Ras (Oberholzer *et al.*, 2011; Su *et al.*, 2012). Or, il a été montré que le Vemurafenib, ainsi que la majorité des inhibiteurs de B-Raf disponibles (PLX4720/PLX4032, Sorafenib, L-779,450, GW50474, ZM336372, GDC-0589), induisent *in vitro* une activation paradoxale de la voie MAPK dépendante de C-Raf en présence de mutations de Ras. Par ce mécanisme, le Vemurafenib stimule la croissance de ces lésions. Chez la souris, le Vemurafenib stimule également la croissance de lésions induites par des carcinogènes connus pour induire des mutations de Ras tels que l'association DMBA et TPA (Su *et al.*, 2012).

De nombreuses équipes se sont intéressées à la compréhension de cette activation paradoxale. Celle-ci dépendrait de la présence de Ras et de C-Raf, nécessiterait la dimérisation des protéines Raf et pourrait être consécutive à une modification de conformation induite par l'inhibiteur. Cependant, le mécanisme moléculaire exact reste encore mal compris.

Les travaux de Halaban et Heidorn suggèrent que le PLX4032 lié à B-Raf^{WT} induirait une modification de sa conformation. En présence de Ras activé (par mutation ou en réponse à des facteurs de croissance), B-Raf^{WT} lié au PLX4032 serait alors capable de transactiver C-Raf au sein d'hétérodimères et en conséquence activer la voie MAPK (Figure 37A) (Halaban *et al.*, 2010; Heidorn *et al.*, 2010). Dans un tel modèle, les inhibiteurs pan-Raf n'induisent pas d'activation paradoxale.

Les travaux de Poulikakos et Hatzivassiliou suggèrent quant à eux que les inhibiteurs se fixeraient aussi bien à B-Raf^{WT} que sur C-Raf^{WT} (Figure 37B). Cependant, les concentrations usuelles seraient insuffisantes pour que tous les monomères soient liés à l'inhibiteur. En réponse à l'activation de Ras, il s'ensuivrait la formation de dimères dont un seul des monomères serait lié à l'inhibiteur, ce dernier induirait alors la transactivation du monomère non lié à l'inhibiteur (Hatzivassiliou *et al.*, 2010; Poulikakos *et al.*, 2010).

Les schémas proposés dans les publications de Heidorn et Poulikakos sont reproduits dans la figure 37. Le cas du Sorafenib met clairement en évidence les divergences entre les 2 études et en conséquence dans le modèle proposé : alors que selon Heidorn, le Sorafenib n'induit pas d'activation paradoxale, cette dernière est retrouvée dans l'étude de Poulikakos.

A mon sens, la théorie de Poulikakos et Hatzivassiliou semble la plus probable. D'une part, les données biochimiques d'activité du PLX4032 montrent une plus grande affinité pour C-Raf^{WT} que pour B-Raf^{WT} (Tableau 3), il n'y a donc aucune raison que le PLX4032 se fixe préférentiellement sur B-Raf^{WT}. D'autre part, le schéma proposé par Heidorn suggère que les inhibiteurs pan-Raf comme le Sorafenib

n'induirait pas d'activation paradoxale or l'apparition de carcinomes basocellulaires a également été retrouvée chez les patients traités avec cet inhibiteur.

Dans les 4 publications, la prévention de la dimérisation de C-Raf bloque le phénomène. Dans tous les cas, il semble intéressant de rechercher de nouveaux inhibiteurs dépourvus de cet effet. Heidorn propose l'utilisation d'inhibiteurs pan-Raf. Hatzivassiliou montre que l'AZ628, un inhibiteur pan-Raf de la forme inactive de B-Raf et C-Raf stabilisant cette dernière n'entraîne pas ce phénomène. Cependant, ces inhibiteurs pourraient induire une inhibition de la voie MAPK dans les cellules normales ce qui pourrait réduire la dose administrable et en conséquence l'efficacité sur la tumeur. L'idéal serait un inhibiteur spécifique de B-Raf^{V600E} n'induisant pas de modification conformationnelle afin de prévenir toute activation allostérique. Le PLX7904, développé par Plexikon semble remplir un tel cahier des charges (Le *et al.*, 2013).

4 - Résistance

Le Vemurafenib conduit chez la grande majorité des patients à une réponse, cependant il existe des patients résistants d'emblée (résistance primaire). En effet, près de 50% des patients présentent une réponse objective, 45% voient leur maladie stabilisée et 5% des patients (10 patients sur 209 dans l'étude de phase III de Chapman et 18/132 dans l'étude de phase II de Sosman) continuent de voir leur maladie progresser démontrant l'existence de résistances primaires.

De plus, même chez les patients répondeurs, la réponse est de courte durée, en moyenne de 6-8 mois. En effet après une première période de réponse au traitement la quasi-totalité de patients deviennent à terme résistants (résistance secondaire) (Flaherty *et al.*, 2010; Sosman *et al.*, 2012). Alors que pour les autres inhibiteurs de tyrosine kinase sur le marché (Imatinib, Erlotinib, Gefitinib), l'apparition de résistance est très souvent liée à l'apparition sur la cible d'une nouvelle mutation interférant avec la liaison de l'inhibiteur à sa cible (mutation appelée « gatekeeper ») ce mécanisme ne semble pas impliqué dans les résistances secondaires au Vemurafenib. En effet, *in vitro* la mutation de la T529N inhibe la liaison entre B-Raf^{V600E} et le Vemurafenib ou d'autres inhibiteurs de B-Raf comme le Dabrafenib et le RAF265. Cette mutation confère aux cellules l'exprimant une résistance à ces inhibiteurs à la fois *in vitro* et *in vivo* dans des modèles de xenogreffes (Whittaker *et al.*, 2010). Cependant une telle mutation n'a jamais été retrouvée à ce jour chez des patients ni sur des lignées rendues résistantes *in vitro* (Nazarian *et al.*, 2010).

La majorité des mécanismes de résistance au Vemurafenib décrits à ce jour, conduisent à une réactivation ou au maintien de l'activation de la voie MAPK sous Vemurafenib. Effectivement, la comparaison du niveau de phosphorylation d'ERK sur des biopsies prélevées au cours de la phase de

Modèles	Condition	Mécanisme identifié	Stratégie proposée	biblio
A375, LOX, SK-MEL267, SK-MEL28		Levée des rétrocontrôles de la voie MAPK resensibilise les cellules aux facteurs de croissance	Vem + inh MEK Vem + inh HER (Lapatinib, Neratinib)	Lito, 2012
SK-MEL5, G361, SK-MEL28	Co-culture avec des fibroblastes	Activation de MET par le HGF sécrété par les fibroblastes	Vem + Crizotinib	Straussman, 2012
NAE, 624Mel, M14, 928MEI, A375	Ajout de facteurs de croissance au milieu de culture	Activation de MET par le HGF	Vem + inh MET (GDC-0712)	Wilson, 2012
Lignée dérivée de patients	Résistance innée	Amplification de MET	Vem + inh MET	Vergani, 2011
M229, M238	Lignées résistantes générées <i>in vitro</i> (1 µM, 4-6 semaines)	Surexpression de PDGFRβ	Inh PDGFR ou de MEK	Nazarian, 2010
451Lu Mel1617	Lignées résistantes générées <i>in vitro</i> (doses croissantes de SB-590885, 6 mois)	Switch de dépendance vers IGF-1R alors hyperactivé	Inh MEK +PI3K Ou inh MEK +IGF-1R	Villanueva, 2010
A375	Surexpression de kinases	ERBB3		Johannessen, 2010
M249	Lignées résistantes générées <i>in vitro</i> (1 µM, 4-6 semaines)	Mutation de N-Ras	Inh MEK	Nazarian, 2010
A375, UACC62, SK-MEL28	Déplétion par shRNA	Surexpression de NF1		Whittaker, 2013
M14	Lignées rendues résistante <i>in vitro</i> (AZ628)	Surexpression de C-Raf	Inh Raf +HPS90	Montagut, 2008
	Lignées rendues résistantes chez la souris	Amplification de BRAF		Das Thakur, 2013
SK-MEL239	Lignées résistantes générées <i>in vitro</i> 2 µM PLX4032	Epissage alternatif de B-Raf		Poulikakos, 2011
A375	<i>In vitro</i> AZD6422 1,5 uM ou CI-1040 2 µM, 4 semaines	Mutation de MEK1		Emery, 2009
A375, SK-MEL28, Colo-679, WM451Lu, SK-ML5	Surexpression de kinase	Surexpression de COT		Johannessen, 2010
WM793 (VGP) M238 (M)	5 µM	Réactivation MAPK Modulation expression de Bim et Bmf		Shao, 2012

Tableau 4 : Résumé des principaux mécanismes de résistance au Vemurafenib conduisant à une réactivation de la voie MAPK

réponse au traitement puis lors de la rechute montre clairement, sur 9 des 10 paires de biopsies étudiées, que la résistance s'accompagne d'une réactivation de la voie MAPK (Trunzer *et al.*, 2013). De plus, comme nous l'avons vu précédemment (partie II-C-3-a), 80% d'inhibition de la voie MAPK semble nécessaire à une réponse thérapeutique, en conséquence tout mécanisme induisant une réactivation même modérée de la voie peut conduire à une résistance (Bollag *et al.*, 2010; Flaherty *et al.*, 2010).

Plusieurs modèles ont été utilisés dans les études suivantes :

- Lignées cellulaires résistantes d'emblée
- Lignées cellulaires rendues résistantes *in vitro* en les cultivant pendant plusieurs semaines/mois en présence de Vemurafenib (ou d'un autre inhibiteur de B-Raf)
- Lignées dérivées de patients
- Criblage de protéines dont la surexpression ou au contraire l'inhibition modifierait la sensibilité au Vemurafenib.

Ces modèles n'étant pas équivalents, nous nous attacherons à détailler dans quels modèles ont été obtenues les données ainsi que la pertinence clinique des mécanismes mis en évidence. Les mécanismes, les modèles et les stratégies thérapeutiques proposés par chaque article sont résumés dans le tableau 4 et figure 38.

a - Altérations activant des RTKs

i - Les facteurs sécrétés, le HGF

La voie MAPK est une voie de signalisation très régulée et présentent de nombreux rétrocontrôles (voir partie II-A-3-f). En conséquence, l'inhibition de la voie MAPK par le Vemurafenib lève ces inhibitions et conduit à une re-sensibilisation des cellules de mélanome aux facteurs de croissance (Lito *et al.*, 2012).

Une étude de Lito *et al.* a suggéré l'implication du HGF (Hepatocyte Growth Factor) dans la résistance au Vemurafenib, ces données ont été par la suite corroborées par 2 études indépendantes (Straussman *et al.*, 2012; Wilson *et al.*, 2012). D'une part, il a été montré que la co-culture des cellules de mélanome avec des fibroblastes induit une résistance via la sécrétion de HGF par ces derniers et l'activation subséquente de son récepteur MET dans les mélanomes, cette résistance pouvant être prévenue par l'inhibition de MET à l'aide d'un inhibiteur spécifique tel que le Crizotinib (Straussman *et al.*, 2012). D'autre part, l'ajout de HGF dans le milieu de culture rend les cellules plus résistantes au Vemurafenib (Wilson *et al.*, 2012). Enfin, le rôle de la voie HGF/MET dans la résistance est également soutenu par un article de Vergani *et al.* dans lequel des amplifications de *MET* sont retrouvées dans une lignée dérivée de patient présentant une résistance primaire (Vergani *et al.*, 2011).

Ce phénomène semble également exister *in vivo*. L'étude de Straussman *et al.* montre en effet que l'expression du HGF dans les tumeurs est inversement corrélée au pronostic des patients traités et celle de Wilson *et al.* que le taux de HGF plasmatique est inversement corrélé à la survie (Straussman *et al.*, 2012; Wilson *et al.*, 2012). Ces données suggèrent l'implication du HGF dans la résistance primaire.

En outre, le HGF pourrait également intervenir dans la résistance acquise puisque l'étude de Straussman *et al.* montre que son expression est augmentée lors du traitement par le Vemurafenib (Straussman *et al.*, 2012).

ii - Les récepteurs de tyrosine-kinase

L'hyperactivation d'autres RTKs a également été mise en évidence dans les mécanismes de résistance en particulier secondaires. Cela conduit à une réactivation de la voie MAPK mais également de manière fréquente à l'activation de la voie PI3K/AKT.

Il a ainsi été montré que le récepteur β du PDGF (PDGFR β) était surexprimé et hyperactivé dans des lignées cellulaires générées *in vitro* mais également dans 4 tumeurs résistantes sur 11 comparées aux biopsies correspondantes avant traitement (Nazarian *et al.*, 2010).

De manière similaire, l'article de Villanueva *et al.* montre que le récepteur à l'IGF-1 (IGF-1R) est hyperactivé dans une lignée résistante générée *in vitro*, et que l'expression et l'activation de IGF-1R est augmentée dans 2 tumeurs résistantes sur 5 par rapport à la biopsie correspondante avant traitement (Villanueva *et al.*, 2010).

Enfin, l'article de Johannessen *et al.* identifie également des RTKs (AXL, ERBB3/HER3, FGR, CRKL, PRKCE, PRKCH) dont l'expression induit une résistance au Vemurafenib mais aucun des 2 récepteurs précédemment décrits n'est retrouvé (Johannessen *et al.*, 2010). L'implication de HER3 a également été retrouvée dans un article de Fattore *et al.* et dans les travaux de l'équipe du Pr Aplin détaillées plus loin (II-C-4-g)(Abel *et al.*, 2013; Fattore *et al.*, 2013).

Outre leur rôle dans la résistance dans les mélanomes, les RTKs semblent être les acteurs majeurs de la résistance au Vemurafenib d'autres types cellulaires. En effet, les cellules de cancer de la thyroïde et du colon sont moins sensibles que celles de mélanome au Vemurafenib, cette relative résistance semble être causée par l'activation de RTKs via la levée des rétrocontrôles de la voie MAPK : ERBB3 a été mis en cause pour la thyroïde et EGFR pour le colon (Corcoran *et al.*, 2012; Montero-Conde *et al.*, 2013; Prahallad *et al.*, 2012).

b - Activation de Ras

i - Mutations de NRAS

L'acquisition de mutations activatrices de *NRAS* conduit de manière logique à une résistance aux inhibiteurs de B-Raf^{V600E}. En effet, N-Ras active la voie MAPK via la dimérisation de Raf, mécanisme qui n'est pas inhibé par les inhibiteurs tels que le Vemurafenib mais au contraire favorisé via une activation paradoxale de la voie MAPK (voir partie II-C-3-c). Les cellules mutées *NRAS* sont en conséquence résistantes au Vemurafenib et celui-ci induit leur prolifération et favorise ainsi leur émergence.

La première étude montrant que l'acquisition d'une mutation de *NRAS* pouvait participer à la résistance secondaire au Vemurafenib a été publiée en 2010 (Nazarian *et al.*, 2010). La mutation a en effet été identifiée dans une lignée cellulaire rendue résistante *in vitro*. En outre, dans cet article, les faibles concentrations de Vemurafenib induisent la prolifération des cellules résistantes, phénomène décrit dans une autre étude (Das Thakur *et al.*, 2013).

L'étude de Nazarian *et al.* montre que ce mécanisme est également retrouvé en clinique : 2 biopsies sur les 16 analysées étaient porteuses de mutations de *NRAS*. De manière surprenante, alors que ces 2 biopsies étaient issues de 2 sites métastatiques du même patient, elles n'étaient pas porteuses de la même mutation (N-Ras^{Q61K} et N-Ras^{Q61R}) démontrant que la rechute de ce patient était issue de l'émergence de plusieurs clones indépendants. De plus, ces mutations étaient accompagnées d'amplifications de *NRAS*.

L'existence de mutations de *NRAS* dans les biopsies issues de résistances secondaires a été retrouvée dans 2 autres études avec une fréquence aux alentours de 20% (4/19 et 3/13)(Poulidakos *et al.*, 2011; Trunzer *et al.*, 2013).

ii - NF1

NF1 est une GAP de Ras, participant à l'inactivation de ce dernier. La perte de NF1 induit en conséquence une hyperactivation de Ras, il a été démontré que celle-ci pouvait participer à la mélanomagenèse (Maertens *et al.*, 2012).

Une étude menée dans le laboratoire du Pr Garraway, ayant pour objectif d'identifier, à partir du criblage d'une banque de lentivirus codant pour des shARN dirigés contre plus de 16 000 gènes, des gènes dont la perte d'expression induirait une résistance au Vemurafenib, a mis en lumière l'implication de NF1. En effet, dans 3 lignées cellulaires différentes, la perte d'expression de NF1 induit une résistance au Vemurafenib qui reste toutefois moindre que celle induite par la mutation de *NRAS* : l'IC50 est multipliée par 5 à 30 suite à la perte de NF1 alors que ce facteur est proche de 200 pour les mutation de Ras (Whittaker *et al.*, 2013). Une deuxième étude a confirmé ce lien entre perte de NF1

et résistance aux inhibiteurs de B-Raf. Par ailleurs, elle s'accompagne également d'une résistance modérée aux inhibiteurs de MEK (Maertens *et al.*, 2012).

Au niveau clinique, l'étude de Garraway *et al.* a identifié des mutations de *NF1* dans 4 biopsies issues de rechutes sous Vemurafenib (le nombre total de biopsies testées n'étant pas mentionné dans l'article). Parmi ces 4 patients, 1 qui portait une mutation non-sens avant le traitement n'a répondu au traitement que pendant peu de temps (10 semaines). 2 patients portaient dès l'initiation du traitement une mutation silencieuse, pouvant induire l'expression d'une protéine aberrante via un épissage alternatif (non vérifié dans l'étude), ont également répondu au traitement que peu de temps (10 et 12 semaines). Enfin chez le quatrième patient, qui a répondu de manière plus prolongée au traitement (5 mois), une mutation silencieuse mais également potentiellement responsable d'un épissage alternatif est apparue lors de la rechute.

En conclusion, via l'activation de la voie MAPK, NF1 induit une résistance *in cellulo* aux inhibiteurs de B-Raf cependant à ce jour la démonstration *in vivo* de son rôle est ténue et reste néanmoins à confirmer.

c - Altérations touchant les protéines Raf

i - Surexpression de C-Raf

N-Ras est capable via l'activation de C-Raf d'induire une résistance au Vemurafenib. La surexpression de ce dernier peut également être impliquée au même titre.

Dès 2008, un article de Montagut *et al.* mettait en évidence, sur une lignée rendue résistante *in vitro*, le rôle de la surexpression de C-Raf dans la résistance aux inhibiteurs de B-Raf tels que l'AZ628 (Montagut *et al.*, 2008). Par la suite, ce lien a été également retrouvé pour le PLX4032 : d'une part la surexpression de C-Raf induit une résistance et d'autre part l'expression de C-Raf est augmentée dans des lignées rendues résistantes. Sa déplétion restaure également en partie la sensibilité au Vemurafenib (Johannessen *et al.*, 2010; Su *et al.*, 2011). Cependant l'occurrence *in vivo* d'un tel mécanisme n'a pas été démontrée.

ii - Surexpression de B-Raf

2 études ont mis en évidence le rôle de la surexpression de B-Raf, conséquente ou non à une amplification génique, dans la résistance au Vemurafenib mais également aux inhibiteurs de MEK. L'étude de Shi *et al.*, a mis en évidence une amplification de *BRAF* chez 4 patients sur 20 lors de leur rechute (Shi *et al.*, 2012). L'étude de Das Thaskur *et al.* utilise quant à elle des lignées rendues résistantes au Vemurafenib après implantation chez la souris. Elle montre que ces dernières surexpriment B-Raf par rapport aux lignées parentales, une amplification du gène retrouvée dans une

des lignées, tandis que le mécanisme conduisant à cette surexpression dans les autres n'a pas été élucidé (Das Thakur *et al.*, 2013). Enfin, des lignées rendues résistantes *in vitro* présentent également une surexpression de B-Raf (Su *et al.*, 2011).

La surexpression de B-Raf limiterait l'effet de l'inhibiteur via une saturation en cible par rapport à la quantité d'inhibiteur.

iii - Epissage alternatif de B-Raf

L'équipe du Pr Rosen a généré, *in vitro*, des lignées résistantes, 3 clones sur les 5 isolés possédaient 2 formes de la protéine B-Raf^{V600E}, une de taille attendue de 87 kDa ainsi qu'une plus courte de 61 kDa, au niveau de l'ARNm une forme plus courte est également retrouvée (Poulikakos *et al.*, 2011). Dans ces cellules, le Vemurafenib ne modifie plus l'activité de la voie MAPK (ie : pMEK et pERK). En fait la partie tronquée correspond aux domaines RBD et CRD. Leur perte induit la dimérisation indépendamment de l'activation de Ras et active MEK1/2 malgré la présence de l'inhibiteur.

Chez les patients, un ARNm de *BRAF* plus court a été mis en évidence dans 6 biopsies issues de rechute sous Vemurafenib sur les 19 testées. Pour 3 d'entre elles, une biopsie avant traitement était disponible et ne présentait pas ce transcrit. De plus, aucun transcrit court n'a été mis en évidence dans les mélanomes non traités par le Vemurafenib, ni chez les résistants primaires, suggérant l'apparition de cet épissage alternatif lors de la résistance acquise.

d - Activation de MEK indépendamment de B-Raf

i - Mutations de MEK1

MEK1 et MEK2 étant les effecteurs de B-Raf, il semble logique que des mutations activatrices de ces derniers puissent être impliquées dans la résistance au Vemurafenib.

En 2009, une étude d'Emery *et al.*, a identifié *in vitro* de nombreuses mutations de MEK1 rendant les cellules résistantes aux inhibiteurs de MEK (AZD6422 et CI-1040). Parmi les mutations identifiées, celle affectant la P124 est retrouvée chez un patient ayant développé une résistance à l'AZD6422 au cours d'un essai clinique. Cette mutation induit *in vitro* à la fois une résistance aux inhibiteurs de MEK et au Vemurafénib (Emery *et al.*, 2009). L'implication de cette mutation dans la résistance au Vemurafenib n'a pas été retrouvée depuis. Au contraire, l'étude de Trunzer *et al.* retrouve cette mutation chez 7 patients (sur 92) et montre que sa présence n'affecte pas leur réponse au Vemurafenib (Trunzer *et al.*, 2013).

En revanche, les mutations affectant les résidus C121, Q56 et E203 ont été identifiées sur des biopsies issues de résistance secondaire au Vemurafenib. Les biopsies prélevées avant traitement chez

ces mêmes patients avant traitement ne portaient pas de telles mutations, suggérant leur apparition et leur rôle au cours de la résistance secondaire (Poulikakos *et al.*, 2011; Trunzer *et al.*, 2013; Wagle *et al.*, 2011).

ii - Mutation COT (MAP3K8)

COT est une MAPKKK impliquée dans l'activation de la voie JNK mais également ERK1/2. En effet, COT est capable au même titre que les protéines Raf d'activer MEK1/2.

Son implication dans la résistance secondaire au Vemurafenib a été mise en évidence dans le laboratoire du professeur Garraway dans la publication concernant C-Raf et HER3 présentée plus haut (Johannessen *et al.*, 2010). Cette étude visait à identifier des kinases (597 testées) dont la surexpression/hyperactivation pourrait induire une résistance au Vemurafenib. La surexpression de COT induit l'activation de MEK1/2 indépendamment de B-Raf, la voie MAPK reste alors active en présence de Vemurafenib. Chez les patients, une augmentation de l'expression de COT dans les biopsies prélevées lors de la rechute par rapport à celles prélevées lors de la phase de réponse a été retrouvée et ceci chez 2 patients sur les 3 testés (Johannessen *et al.*, 2010).

e - La voie PI3K/AKT et PTEN

Plusieurs articles ont suggéré, en particulier sur la base de données *in vitro*, un lien entre la résistance à l'inhibition de la voie MAPK et l'hyperactivation de la voie PI3K/AKT via notamment la perte de PTEN.

En effet, ces travaux montrent que dans les cellules PTEN+, l'inhibition de la voie MAPK induit l'arrêt du cycle cellulaire et l'apoptose alors que dans les cellules PTEN -, l'inhibition de cette voie n'induit que peu d'apoptose et n'a en conséquence qu'un effet cytostatique (Paraiso *et al.*, 2011; Vergani *et al.*, 2011; Xing *et al.*, 2011). De même, une lignée porteuse d'une mutation activatrice de *AKT3* s'est révélée résistante à l'entrée en apoptose induite par le PLX4720 (Shao and Aplin, 2010). Le défaut d'apoptose semble lié à l'absence d'induction de l'expression de protéines pro-apoptiques telles que Bim ou Bmf en réponse à l'inhibition de la voie MAPK. L'inhibition de la voie PI3K/AKT par des inhibiteurs spécifiques permettant de restaurer la sensibilité à l'inhibition de la voie MAPK (Paraiso *et al.*, 2011).

Au niveau clinique, une étude de Trunzer *et al.* montre que le niveau d'expression de PTEN avant traitement est plus fort chez les patients répondeurs au Vemurafenib que chez les résistants primaires (Trunzer *et al.*, 2013). Cependant parmi les 11 patients n'exprimant pas PTEN, 4 ont tout de même répondu au traitement suggérant que si l'expression de PTEN influence la réponse au Vemurafenib elle ne suffit pas à la prédire. Dans cette étude, l'expression de PTEN n'était pas modifiée

lors du développement de résistance secondaire suggérant un rôle de la perte de PTEN uniquement dans la résistance primaire. Au contraire, une autre étude de Villanueva *et al.* montre au contraire que pour 1 patient sur les 5 étudiés, l'apparition d'une résistance secondaire s'accompagne de la perte homozygote de PTEN (Villanueva *et al.*, 2010).

De plus, les altérations de Ras et des RTKs décrites ci-dessus réactivent la voie MAPK mais activent également la voie PI3K/AKT. En présence d'une hyperactivation de IGF-1R, l'inhibition de la voie MAPK par un inhibiteur de MEK ne restaure pas totalement la sensibilité des cellules, l'association d'un inhibiteur de PI3K est nécessaire, suggérant que l'activation de la voie PI3K/AKT interfère dans la réponse cellulaire à l'inhibition de la voie MAPK (Villanueva *et al.*, 2010).

f - La voie Cycline D₁/RB

Une publication de 2008 montre que les amplifications de *CCND1*, retrouvées dans 15 à 20% des mélanomes mutés *BRAF*, induisent une résistance primaire à un inhibiteur de B-Raf, le SB-590885 (Smalley *et al.*, 2008). De plus, l'étude de Vergani *et al.* a également retrouvé une amplification de *CCND1* dans une lignée cellulaire mutée *BRAF*^{V600E} résistante au PLX4032 (Vergani *et al.*, 2011). Cependant l'existence de ce lien n'a pas été depuis confirmée en clinique.

Par ailleurs, Shao *et al.* ont montré que la perte conjointe de PTEN et Rb induisait une résistance à l'inhibition de la voie MAPK (les inhibiteurs de la voie MAPK n'entraînent même pas d'arrêt de prolifération)(Shao and Aplin, 2010). L'inhibition conjointe des voies MAPK et PI3K/AKT induit alors l'arrêt du cycle cellulaire mais pas l'apoptose.

g – FOXD3, modèle de la résistance adaptative

A côté des mécanismes de résistance primaire et secondaire, se développe également la théorie de mécanismes dit adaptatifs de résistance. Nous définirons comme résistance adaptative un mécanisme d'autorégulation impliquant notamment une modification de la signalisation cellulaire conduisant rapidement (quelques heures) à l'apparition d'une résistance. Ces mécanismes peuvent être directement activés par l'inhibiteur, être la conséquence de voies de rétrocontrôle ou d'activation de voies de compensation.

Brièvement, la voie MAPK contrôle l'expression de nombreux gènes ainsi que l'activité de certaines protéines (voir partie II-A-3-f). L'inhibition de la voie MAPK annule en conséquence ces modifications qui induisent l'effet thérapeutique. Cependant, parmi toutes les cibles de la voie MAPK certaines pourraient avoir une activité paradoxale et participer au contraire à la résistance.

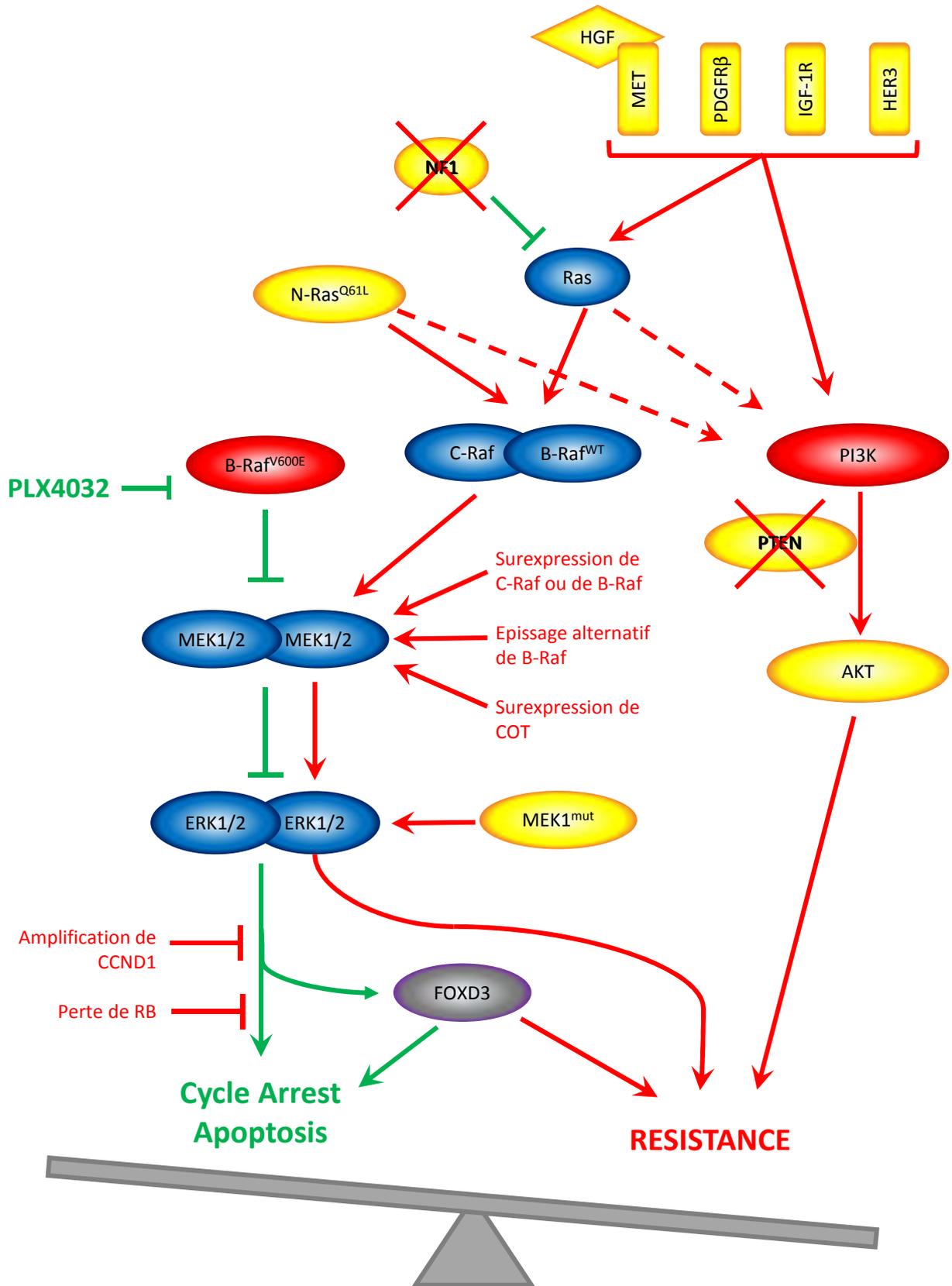


Figure 38 : Schéma représentant les principaux mécanismes de résistance au Vemurafenib

FOXD3, dont la régulation par la voie MAPK et le rôle ont été extensivement étudiés par l'équipe du Pr Aplin, constitue un prototype de facteurs impliqués dans ce phénomène de résistance adaptative. Ils ont initialement montré que la mutation activatrice de *BRAF* augmentait les capacités migratoires et invasives des cellules de mélanome via l'inhibition de l'expression de FOXD3 induisant elle-même une augmentation de l'expression de RhoE/Rnd3. Au contraire, l'inhibition de B-Raf par des inhibiteurs tels que le Vemurafenib altérait la motilité cellulaire via cette voie de signalisation (Katiyar and Aplin, 2011; Klein *et al.*, 2008). De plus, l'induction de FOXD3 sous Vemurafenib induit un arrêt du cycle cellulaire en G1/S accompagné par la perte d'expression de la cycline A et l'induction de p21 (Abel and Aplin, 2010). A ce titre la régulation de FOXD3 par le Vemurafenib participe à la réponse thérapeutique.

Paradoxalement, l'induction de FOXD3 par le Vemurafenib limite l'efficacité de ce dernier en prévenant l'entrée en apoptose. Effectivement, la prévention de son induction sous Vemurafenib potentialise grandement l'entrée en apoptose des cellules en réponse au Vemurafenib (Basile *et al.*, 2011). Le mécanisme par lequel FOXD3 régule l'apoptose n'a cependant pas été identifié et serait indépendant des protéines de la famille de Bcl-2.

Cette équipe a également montré que FOXD3 contrôle l'expression de HER3 en réponse au Vemurafenib : les cellules traitées par le Vemurafenib deviennent alors plus sensible au ligand de HER3, le NRG1 β (Neuregulin 1 β) ce qui conduit *in fine* à une réactivation de la voie MAPK ainsi qu'à l'activation de la voie PI3K/AKT. Cette augmentation d'expression de HER3 a été retrouvée dans des biopsies prélevées sous traitement par rapport aux biopsies prélevées avant traitement chez 1 patient sur 2 traités avec du Vemurafenib et 3 patients sur 9 traités avec du Dabrafenib ou par l'association Dabrafenib/Trametinib (Abel *et al.*, 2013).

h - Bilan concernant les mécanismes de résistance

La majorité des mécanismes décrits ci-dessus, résumés en figure 38, ont été identifiés sur des lignées rendues résistantes *in vitro*. Cependant, on ne sait pas si les mécanismes mis en jeu sont réellement les mêmes *in vivo*. En effet, l'impact du microenvironnement, de l'immunité et l'hétérogénéité tumorale sont totalement exclus de ces modèles. Si certaines altérations identifiées *in vitro* ont ensuite été retrouvées *in vivo*, leur rôle de « driver » ou de « passager » dans la résistance n'est pas élucidé : chacune des altérations ayant été retrouvée dans une proportion importante de biopsies (plus de 20% pour la majorité), il n'est pas exclu que ces altérations co-existent. Dans ce cas-là, la question se pose de savoir quelle est l'altération clé ?

Plusieurs de ces articles se sont efforcés de montrer qu'il était possible de contrer ces résistances par des associations thérapeutiques. Cependant, l'idéal étant de traiter directement les

patients avec l'association synergique afin d'éviter l'émergence de clones résistants, il ne semble pas concevable de traiter les patients d'emblée avec une association de 4 ou 5 composés pour éviter les différentes résistances possibles. Il faudrait donc idéalement, à partir de la biopsie de pré-traitement connaître la probabilité pour chaque patient d'activer l'une ou l'autre des voies de résistance. L'exemple du patient de l'article de Nazarian *et al.* (Nazarian *et al.*, 2010), porteur de 2 mutations distinctes de *NRAS* au niveau de 2 sites métastatiques, montre que d'une part la résistance n'est pas liée à l'émergence d'un seul clone pré-existant et d'autre part que chez un même patient des clones indépendants tendent à mettre en place le même mécanisme de résistance, suggérant que les mécanismes qui sont mis en jeu pourraient être au moins en partie dépendants des caractéristiques intrinsèques de la tumeur ou du patient.

Finalement, afin de déterminer l'existence réelle et l'importance de chacun des mécanismes décrits ainsi que leur co-occurrence, il semble crucial de les étudier dans leur ensemble au sein d'une cohorte conséquente.

Nous nous permettrons de suggérer ici, l'intérêt du développement de combinaisons thérapeutiques induisant une forte létalité au sein de la tumeur. En effet, une stratégie thérapeutique pro-apoptique présente un double avantage d'une part induire une régression tumorale importante et d'autre part éviter l'apparition de résistances qui auraient lieu au cours d'un traitement uniquement cytostatique. Ce travail doctoral débouche sur la proposition d'une combinaison thérapeutique augmentant fortement l'apoptose en réponse au Vémurafenib.

5 - Autres inhibiteurs de la voie MAPK ayant obtenu une AMM ou en cours d'évaluation clinique

Suite à la découverte des mutations de B-Raf en 2002, de nombreuses entreprises pharmaceutiques se sont lancées dans l'identification d'inhibiteurs de B-Raf mais également des effecteurs en aval tel que MEK1/2 et ERK1/2. A ce jour, de nombreux projets sont arrivés à maturité et plusieurs des inhibiteurs identifiés sont évalués chez l'Homme. Nous allons lister ici ces inhibiteurs en essayant de mettre en lumière les avantages et inconvénients de chaque classe.

a – Autre Inhibiteur de B-Raf^{V600E} : le GSK2118436 / Dabrafenib

Le Dabrafenib est un inhibiteur très proche du Vémurafenib. C'est un compétiteur de l'ATP spécifique du mutant de B-Raf et responsable au même titre que le Vémurafenib d'une activation paradoxale de la voie MAPK en réponse à l'activation de Ras. Il a obtenu l'AMM en monothérapie pour les mêmes indications que le Vémurafenib (mélanome métastatique ou non opérable) aux Etats-Unis

et en Europe en mai 2013. Effectivement, un essai clinique de phase III a montré sa supériorité par rapport à la Dacarbazine avec une efficacité et des effets indésirables comparables au Vemurafenib (Hauschild *et al.*, 2012). Aucune étude n'a comparé le Vemurafenib et le Dabrafenib, le Vemurafenib induirait plus de photosensibilité que le Dabrafenib, ce dernier serait donc préféré par les cliniciens chez les patients à risque.

En cas de métastases cérébrales, le Dabrafenib est sûrement à préférer. En effet, il a été montré au cours d'une étude de phase II qu'il conduisait à des réponses chez les patients atteints de métastases cérébrales alors que cette population avait été évincée des essais cliniques de phase III du Vemurafenib et du Dabrafenib (Long *et al.*, 2012).

Enfin, comme nous le verrons dans la partie II-C-6-a, le Dabrafenib a été évalué en association avec un inhibiteur de MEK.

b - Inhibiteurs pan Raf

L'intérêt principal de ces inhibiteurs est leur potentielle activité dans les tumeurs mutées Ras et leur absence d'activité. Cependant, cet intérêt est à nuancer. D'après les hypothèses de Poulikakos détaillées (en partie II-C-3-c et Figure 40B), ces inhibiteurs, utilisés à des concentrations non saturantes, pourraient également induire une activation paradoxale. De plus, étant donné qu'ils ne sont pas spécifiques de la forme mutée, ils altèrent la signalisation de la voie MAPK dans toutes les cellules ce qui pourrait fortement limiter la dose administrable et donc leur efficacité.

Quatre inhibiteurs sont en cours de développement le RAF265, le XL281, le LGX818 et le GDC-0879, les données disponibles pour chacun d'eux sont présentées dans le tableau 3.

c - Inhibiteurs de MEK

Théoriquement, l'intérêt des inhibiteurs de MEK est multiple :

- dans les mélanomes mutés B-Raf ils pourraient éviter les tumeurs cutanées consécutives à l'activité paradoxale des inhibiteurs de B-Raf
- ils devraient également être actifs sur les mélanomes mutés *NRAS* et ceci de manière plus certaine que les inhibiteurs pan-Raf
- ils pourraient contrer les résistances consécutives à la réactivation de la voie MAPK.

Cependant, les données *in vitro* montrent une activité relativement limitée de cette classe d'inhibiteurs dans les mélanomes mutés *NRAS* (Solit *et al.*, 2005). De plus, l'efficacité de ces inhibiteurs devrait être limitée par leur manque de spécificité. En effet, à la différence des inhibiteurs de B-Raf^{V600E}

qui n'affectent pas les cellules normales, les inhibiteurs de MEK altèrent la voie MAPK dans toutes les cellules ce qui pourrait limiter la dose. Sachant que 80% d'inhibition de la voie MAPK est nécessaire à une réponse thérapeutique dans les mélanomes, il est aisé de prédire que les inhibiteurs de MEK seront moins efficaces que ceux de B-Raf.

L'intérêt des inhibiteurs de MEK en cancérologie étant bien plus large que dans les seuls mélanomes, de tels inhibiteurs ont été synthétisés et évalués en clinique depuis de nombreuses années. En effet, depuis le premier inhibiteur décrit dans la littérature en 1995, le PD098059, pas moins de 13 inhibiteurs ont été testés chez l'Homme sur un large panel de cancers. Seul le Trametinib a réussi à obtenir à ce jour une AMM. Nous détaillerons ici le cas du Trametinib autorisé dans les mélanomes métastatiques ainsi que de 3 autres inhibiteurs actuellement en cours d'évaluation (Akinleye *et al.*, 2013).

2 types d'inhibiteurs de MEK existent : les inhibiteurs compétitifs de l'ATP qui viennent se loger dans la poche à ATP et les inhibiteurs allostériques, beaucoup plus nombreux et plus spécifiques, qui se lient sur un site allostérique proche mais distinct du site de liaison à l'ATP et inhibent la liaison de l'ATP.

i – Trametinib

Le Trametinib est inhibiteur allostérique spécifique de MEK1/2 dont l'activité a été montrée *in vitro* et *in vivo* sur des lignées cellulaires porteuses de mutations de *BRAF* et de Ras (Gilmartin *et al.*, 2011).

Le premier essai clinique de phase I a inclus 206 patients dont 97 atteints de mélanomes métastatiques parmi lesquels 36 étaient mutés *BRAF*. Les études pharmacodynamiques ont montré que les mélanomes répondaient mieux à l'inhibiteur puisque ce dernier induisait 60% de diminution de marquage pERK dans les biopsies post-traitement alors que ce taux n'était que de 30% dans les autres cancers inclus dans l'étude (en particulier les cancers du pancréas, du poumon et colorectal) (Infante *et al.*, 2012). De plus, dans les autres cancers aucune corrélation entre la réponse et la présence de mutations de *BRAF* ou de Ras ne semblait apparaître. Au contraire, dans les mélanomes, les réponses pouvaient être corrélées au génotype avec une meilleure réponse pour, dans l'ordre, *BRAF^{mut}/NRAS^{wt}* (3 RC, 10 RP et 15MS pour 36 patients), *BRAF^{wt}/NRAS^{wt}* (4 RP, 15 MS sur 39 patients) et enfin *BRAF^{wt}/NRAS^{mut}* (2 MS sur 7 patients)(Falchook *et al.*, 2012). Les patients porteurs d'une mutation de *BRAF* semblent mieux répondre au Trametinib ce qui a conduit à mener l'essai de phase III dans cette population. Il est à noter que si le Trametinib n'entraîne pas de réponse significative dans l'ensemble des patients *BRAF^{wt}/NRAS^{wt}*, certains d'entre eux présentent une réponse de longue durée (2 patients présentent des réponses de 70 et 110 semaines). Il serait donc judicieux de mieux

caractériser le génome des tumeurs de ces 2 patients afin d'identifier un marqueur prédictif de réponse.

L'essai de phase III ayant conduit à l'obtention de l'AMM a inclus 322 patients dont 204 traités par le Tramétinib et 108 dans le groupe contrôle traités par chimiothérapie (Dacarbazine ou Paclitaxel). L'analyse de cette cohorte montre une amélioration significative de la survie sans progression (4,8 *versus* 1,5 mois), de la survie globale à 6 mois (81 *versus* 67 %), et du taux de réponse atteignant les critères RECIST (22 *versus* 8%). On peut d'ores et déjà remarquer que si le Tramétinib améliore la réponse par rapport aux chimiothérapies, ces résultats sont moins bons que ceux du Vémurafenib et du Dabrafénib (taux de réponse de 48% pour le Vémurafenib et 50% pour le Dabrafénib *versus* 22 % pour le Tramétinib)(Falchok *et al.*, 2012).

Le Tramétinib est également moins bien toléré que les inhibiteurs de B-Raf. Le traitement a dû être interrompu ou réduit suite à des effets indésirables chez 62% des patients contre respectivement 38 et 31% pour le Vémurafenib et le Dabrafénib. Ces effets indésirables sont cutanés (rash, dermatite), des diarrhées, des œdèmes périphériques, de la fatigue, oculaire et cardiaque. Il est cependant à noter qu'aucun carcinome basocellulaire n'a été recensé (Falchok *et al.*, 2012; Infante *et al.*, 2012).

Le Tramétinib a été autorisé en même temps que le Dabrafénib en mai 2013 dans les mêmes indications que le Vémurafenib et le Dabrafénib. La place du Tramétinib en première intention est discutable au vu du taux de réponse moins bon que celui des inhibiteurs de B-Raf. Il pourrait en revanche présenter un intérêt chez certains patients résistants présentant une réactivation de la voie MAPK et chez ceux qui développent un grand nombre de carcinomes basocellulaires sous inhibiteurs de B-Raf. Enfin, il devrait trouver sa place dans les tous prochains mois en association avec le Dabrafénib (voir partie II-C-6-a).

ii – Selumétinib / AZD6422

Le Selumétinib est également un inhibiteur allostérique spécifique de MEK1/2 (Yeh *et al.*, 2007).

Plusieurs essais cliniques de phase II ont été menés dans les mélanomes sans conduire à des résultats probants. Le premier essai en monothérapie *versus* Témzolomide sans critère génétique n'a pas montré d'amélioration de la survie sans progression. Cependant parmi les 6 patients répondeurs, 5 étaient porteurs d'une mutation de *BRAF* (Kirkwood *et al.*, 2011). Les autres essais ont donc été conduits chez des patients porteurs de mutations, mais aucun n'a permis le passage à la phase III. En effet, même en association avec la Dacarbazine, l'ajout du Sélumétinib n'induisait qu'une amélioration modeste de survie sans progression (5.6 *versus* 3 mois) et pas de modification significative de la survie globale (Robert *et al.*, 2013).

Un essai clinique est en revanche toujours en cours dans les mélanomes oculaires, en particulier porteurs de mutation de *GNAQ* et *GNA11*, pathologie dans laquelle le Sélumetinib semble démontrer une efficacité supérieure à la chimiothérapie de référence (Carvajal, 2013).

d - Inhibiteurs d'ERK1/2

Afin de pallier les résistances aux inhibiteurs de MEK1/2, les résistances croisées aux inhibiteurs de MEK et de B-Raf telles que les mutations de *MEK1*, et surtout d'éviter la réactivation de la voie MAPK suite à la levée des rétrocontrôles sur les différents niveaux de la voie MAPK, des inhibiteurs d'ERK1/2 sont actuellement en cours de développement et devraient être d'ici peu évalués chez l'Homme (Morris *et al.*, 2013).

e - Les inhibiteurs de KIT

Les mutations de *KIT* sont retrouvées de manière assez fréquente dans certains types de mélanome (acral, muqueux, Dubreuilh)(voir partie II-B-2-c). Du fait de la disponibilité en clinique d'inhibiteurs de *KIT*, cette découverte s'est rapidement traduite par une évaluation de tels inhibiteurs.

L'Imatinib a été évalué au cours de plusieurs essais de phase I et II dont le dernier en date a conduit à un taux de réponse de 54% chez patients porteurs d'une mutation de *KIT*. De manière surprenante, alors que des patients présentant des amplifications de *KIT* avaient également été inclus dans cet essai, aucun n'a répondu au traitement. Seuls les patients porteurs de mutations juxta-membranaires de *KIT* et dont le rapport d'expression $c\text{-Kit}^{\text{mut}}/c\text{-Kit}^{\text{WT}}$ est supérieur à 1 semblent répondre (Hodi *et al.*, 2013).

De nombreux essais sont actuellement en cours pour évaluer des inhibiteurs plus spécifiques tels que le Nilotinib (NCT01099514, NCT01168050 et NCT01395121), le Dasatinib (NCT00700882 et NCT01092728) et le Sunitinib (NCT00577382).

6 - Intérêts de combinaisons thérapeutiques incluant un inhibiteur de la voie MAPK

Les inhibiteurs de la MAPK, et en particulier les inhibiteurs de B-Raf, constituent une avancée capitale dans la prise en charge du mélanome contre lequel il n'y avait jusqu'à présent aucune thérapie efficace. Cependant, l'efficacité de ces inhibiteurs est limitée chez certains patients par une résistance primaire et surtout par l'apparition de résistances secondaires à plus ou moins court terme chez la majorité des patients. De nombreux travaux, exposés dans la partie II-C-4, se sont intéressés aux

mécanismes de résistance et ont proposé des combinaisons thérapeutiques visant à les limiter. Nous détaillerons ici les combinaisons en cours d'évaluation qui semblent les plus prometteuses.

a - Inhibiteurs de B-Raf et de MEK

L'intérêt évident d'une telle association est d'une part de garder une spécificité contre les cellules cancéreuses et une plus grande activité avec l'inhibiteur de B-Raf et d'autre part, de limiter à la fois les résistances et les effets indésirables conséquents à l'activité paradoxale induite par les inhibiteurs de B-Raf. D'après les données *in vitro* une telle association devrait contrer les résistances liées aux mutations de *NRAS*, de *NF1*, à la surexpression de C-Raf ou B-Raf, aux formes épissées de B-Raf et également à la levée des rétrocontrôles sur la voie MAPK.

L'association des 2 inhibiteurs de GSK présentés plus haut, la Dabrafenib et le Trametinib a été évaluée, seuls les résultats de l'essai de phase I/II comparant l'association au Dabrafenib seul sont publiés à ce jour (Flaherty *et al.*, 2012c). La phase d'escalade de dose n'a pas révélé de toxicité particulière de la combinaison ce qui a permis la conduite de la phase II aux doses recommandées pour les monothérapies correspondantes à savoir 150 mg de Dabrafenib et 2 mg de Trametinib par jour.

Les résultats de cette étude sont sans équivoque en faveur d'une plus grande efficacité de l'association, en effet tous les paramètres suivants sont significativement améliorés : la survie sans progression (9,4 *versus* 5,8 mois), la survie sans progression à un an (41 *versus* 9%), le taux de réponse atteignant les critères RECIST (76 *versus* 54%) et la durée de la réponse (10,5 *versus* 5,6 mois).

Au niveau des effets indésirables, la combinaison réduit l'occurrence de carcinomes basocellulaires (7% *versus* 19%) et de rash mais s'accompagne des effets indésirables associés au Trametinib (dermatite acnéiforme, fatigue, diarrhée,...). Ces effets toxiques conduisent plus souvent à des interruptions du traitement et à des réductions de doses dans le groupe bithérapie que le groupe monothérapie (67 *versus* 28% pour les interruptions et 58 *versus* 19% pour les réductions)

2 essais de phase III sont en cours comparant le Dabrafenib/Trametinib *versus* Dabrafenib (NCT01584648) et Dabrafenib/Trametinib *versus* Vemurafenib (NCT01597908). Ces derniers devraient confirmer les résultats de l'essai de phase I/II étant donné que GSK a d'ores et déjà déposé une demande d'AMM.

Dans la même optique, Genentech a débuté en janvier 2013, un essai de phase III comparant l'association GDC-0973 (inhibiteur de MEK) / Vemurafenib à ce dernier (NCT01689519).

b - Vemurafenib et Ipilimumab

Après plusieurs décennies d'échec dans l'identification de traitement contre ce cancer, le Vemurafenib et l'Ipilimumab ont obtenu une AMM pour le mélanome métastatique à quelques mois d'intervalle. Leur association pourrait être synergique. En effet, d'une part, le Vemurafenib inhibe la prolifération, induit l'apoptose et pourrait potentiellement augmenter la reconnaissance de la tumeur par le système immunitaire (discuté dans la partie II-C-2). D'autre part, l'Ipilimumab en inhibant l'immunosuppression pourrait accroître la reconnaissance de la tumeur et favoriser la mise en place d'une mémoire immune anti-tumorale.

Un essai de phase I a dû être prématurément clos du fait de signes inattendus d'hépatotoxicité. En effet, parmi les 6 patients traités avec les doses recommandées pour les monothérapies, 4 ont vu leurs enzymes hépatiques (ALAT et ASAT) s'élever la ou les premières administrations d'Ipilimumab. Une diminution de la dose de Vemurafenib n'a pas permis de faire disparaître cet effet dans une nouvelle cohorte (Ribas *et al.*, 2013).

Un essai de phase II proposant une administration séquentielle du Vemurafenib et de l'Ipilimumab visant à éviter l'hépatotoxicité décrite est en cours (NCT01689519).

De plus, le Vemurafenib est également évalué en combinaison avec d'autres immunothérapies comme l'interleukine 2, des anticorps anti-PD1 ou des stratégies vaccinales (NCT01683188, NCT01656642, NCT01659151, NCT01754376, NCT01585415).

c – Co-inhibition des voies MAPK et PI3K/AKT

Les voies MAPK et PI3K/AKT sont des voies essentielles dans la carcinogenèse, la voie MAPK contrôlant en particulier la prolifération et la voie PI3K/AKT la survie, la co-inhibition de ces 2 voies devrait être synergique. La co-inhibition de ces 2 voies semble d'autant plus prometteuse dans les mélanomes que :

1) Les altérations de la voie PI3K/AKT sont particulièrement fréquentes (perte de PTEN, mutations de *NRAS*) (voir partie I-B-3 et II-B-2-a-ii),

2) La voie PI3K/AKT pourrait être directement liée à la résistance puisque lorsqu'elle est activée le Vemurafenib serait cytostatique et non plus cytotoxique (voir partie II-C-4-e).

3) Parmi les mécanismes de résistances décrits (voir partie II-C-4), plusieurs conduisent à une activation de la voie PI3K/AKT tels que les mutations de *NRAS* et de *NF1* ainsi que les altérations touchant les RTKs.

4) Plusieurs articles décrivant les mécanismes sus-cités proposaient de les contrer via notamment l'utilisation d'inhibiteurs de PI3K/AKT.

Plusieurs essais cliniques de phase I et II incluant des inhibiteurs de PI3K (BKM120, PX866, SAR260301) en association avec le Vemurafenib sont actuellement en cours (NCT01512251, NCT01616199, NCT01673737). De plus, un essai de phase II chez des patients résistants au Vemurafenib ou au Dabrafenib incluant un inhibiteur de MEK, le Selumetinib et un inhibiteur d'AKT, le MK2206, a été conduit mais les résultats ne sont pas encore publiés. Genentech tente également de développer une combinaison d'inhibiteurs de MEK et de PI3K (GDC-0973 et GDC-0941) actuellement en essai de phase I/II mais non axé sur le mélanome (NCT00996892).

Si une telle association semble extrêmement efficace *in vitro*, et qui plus est nous verrons par la suite que ce travail doctoral a débouché sur la proposition d'une telle association, elle risque d'être limitée chez l'Homme par la toxicité des inhibiteurs de la voie PI3K/AKT. En effet, cette voie de signalisation est essentielle dans bon nombre de processus physiologiques et en particulier dans le métabolisme glucidique (le diabète étant un des effets indésirables majeurs de ces inhibiteurs).

De plus, parmi les multiples inhibiteurs (inhibiteur de TORC1, de TORC1 et 2, de PI3K, de PI3K et TORC ou d'AKT) développés et testés dans les cancers, seuls le Temsirolimus et l'Everolimus ont obtenu une AMM dans les carcinomes rénaux métastatiques. En effet, ces inhibiteurs ne sont pas spécifiques d'une forme mutée, ils affectent donc toutes les cellules et ont en conséquence un index thérapeutique très étroit.

d - Autres combinaisons thérapeutiques

Des inhibiteurs de CDK et de HSP90 sont également en cours d'évaluation en association avec le Vemurafenib (NCT01841463, NCT01657591).

D - Mélanome / MAPK / Vemurafenib, Bilan

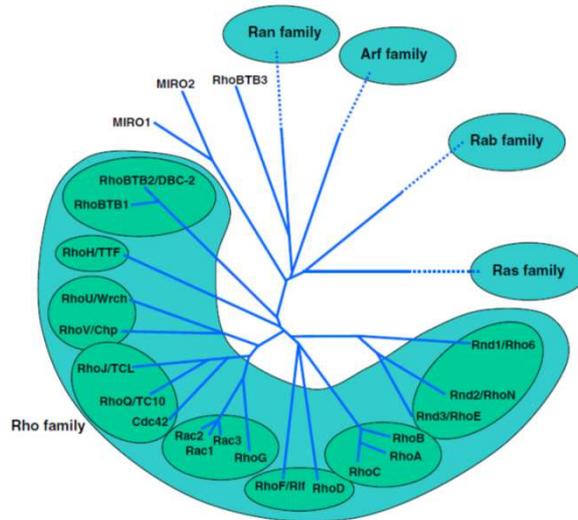
En conclusion, nous avons, dans cette partie, montré l'intérêt mais également souligné les limites du ciblage de la voie MAPK dans le mélanome. Nous retiendrons qu'en dépit des résistances, le Vemurafenib a conduit à des résultats sans précédent dans le mélanome métastatique.

En effet, il est tout à fait exceptionnel d'obtenir chez des patients métastatiques des réponses complètes comme cela est fréquemment observé avec le Vemurafenib. Par ailleurs, le facteur prédictif de réponse que constitue la mutation de *BRAF*^{V600} présente une puissance remarquable puisqu'elle s'accompagne au moins d'une stabilisation de la maladie chez plus de 80% des patients. A ce titre, le Vemurafenib est un exemple enviable et recherché pour d'autres cancers.

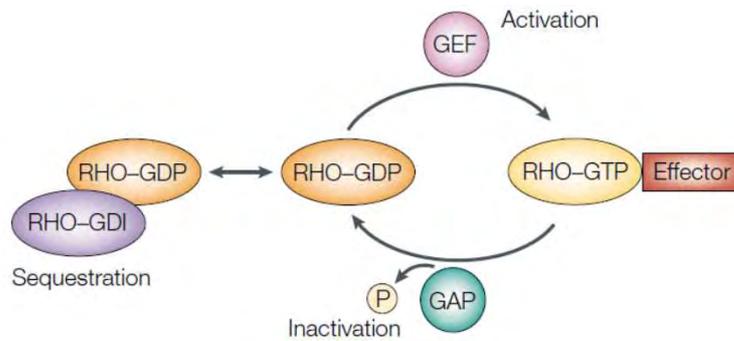
Cependant, nous ne pourrions nous empêcher de nuancer cet engouement, en effet malgré les résultats initiaux impressionnants, *in fine* le Vemurafenib n'augmente que de quelques mois la survie globale ce qui ne peut constituer en soi l'objectif final d'un médicament. On peut espérer que le Vemurafenib démontre son intérêt principal ailleurs dans l'arsenal thérapeutique qu'en monothérapie dans les formes métastatiques. Il pourrait/devoir présenter un plus grand intérêt au cours des stades moins avancés, par exemple en traitement adjuvant comme l'Herceptin dans le cancer du sein, ou au sein de combinaisons thérapeutiques qui devront être personnalisées.

Dans de telles circonstances, il semble crucial de mieux comprendre les mécanismes d'action cellulaire du Vemurafenib et les processus impliqués dans les résistances. De plus, il est également primordial d'identifier les facteurs induisant l'apoptose en réponse au Vemurafenib afin de développer des stratégies thérapeutiques non plus cytostatiques mais cytotoxiques et de se prémunir face aux rechutes et aux résistances.

A



B



C

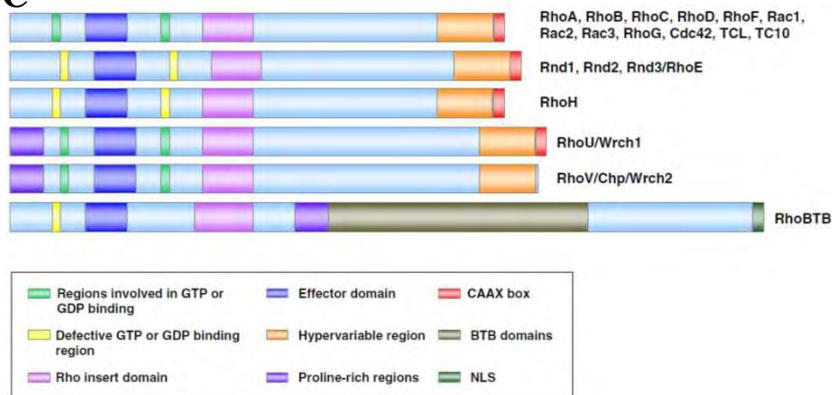


Figure 39 : La famille des RhoGTPases

A : Arbre phylogénique de la superfamille Ras.

B : Régulation de l'activité des RhoGTPases

C: Structure des protéines Rho.

(D'après Vega, 2008 et Sahai, 2002)

III - RhoB, une RhoGTPase atypique impliquée dans la résistance thérapeutique à l'apoptose

A – La famille des RhoGTPases

1 - Généralités

Les RhoGTPases sont une famille de GTPases monomériques constituant avec les familles Ras, Ran, Rab et Arf, la superfamille Ras (Figure 39A). Ce sont, à l'exception des RhoBTB, des protéines de petite taille, 20 à 40 kDa soit 190 à 250 acides aminés. Elles fonctionnent comme des interrupteurs moléculaires en cyclant entre un état actif lié au GTP et un état inactif lié au GDP sur le même principe que celui des protéines Ras, au même titre, leur activité est régulée par des GAP et des GEF mais également par des GDI (Guanine nucleotide Dissociation Inhibitor). Les RhoGDI se lient aux protéines Rho, préférentiellement sous leur forme inactive, masquent leur prényl et les séquestrent dans le cytoplasme (Figure 39B).

Chez l'homme, la famille Rho inclut 20 gènes classés en 4 groupes et 8 sous familles (Figure 39A et B) :

- le groupe I contient les sous-familles Rho (RhoA, RhoB et RhoC), Rnd (Rnd1, Rnd2/RhoN, Rnd3/RhoE) et RhoD/RhoF
- le groupe II, les sous-familles Rac/RhoG (Rac1, Rac2, Rac3 et RhoG), Cdc42/RhoJ/RhoQ et RhoU/RhoV
- le groupe III, la protéine RhoH
- le groupe IV, les protéines RhoBTB1 et RhoBTB2.

La structure des protéines Rho est relativement proche de celle de Ras, elle comprend un domaine GTPasique, des motifs de liaison au GDP et au GTP, un motif de liaison au Mg^{2+} , 2 régions « switch » dont la conformation est modifiée entre la forme active et la forme inactive et impliquées dans les interactions avec les effecteurs et enfin une région hypervariable. Les protéines Rho contiennent également un « Rho insert domain » (Figure 39C).

Si certaines protéines Rho sont ubiquitaires et exprimées à un taux relativement constant dans toutes les cellules, c'est notamment le cas de RhoA, Rac1 et Cdc42, l'expression d'autres membres est tissu-spécifique, par exemple Rac2 et RhoH sont spécifiques des cellules hématopoïétiques. Alors que l'expression de certaines protéines est stable dans le temps, RhoB, RhoG et RhoE sont des gènes de réponse au stress dont l'expression est finement régulée (voir partie III-B-2 pour RhoB). Enfin, leur

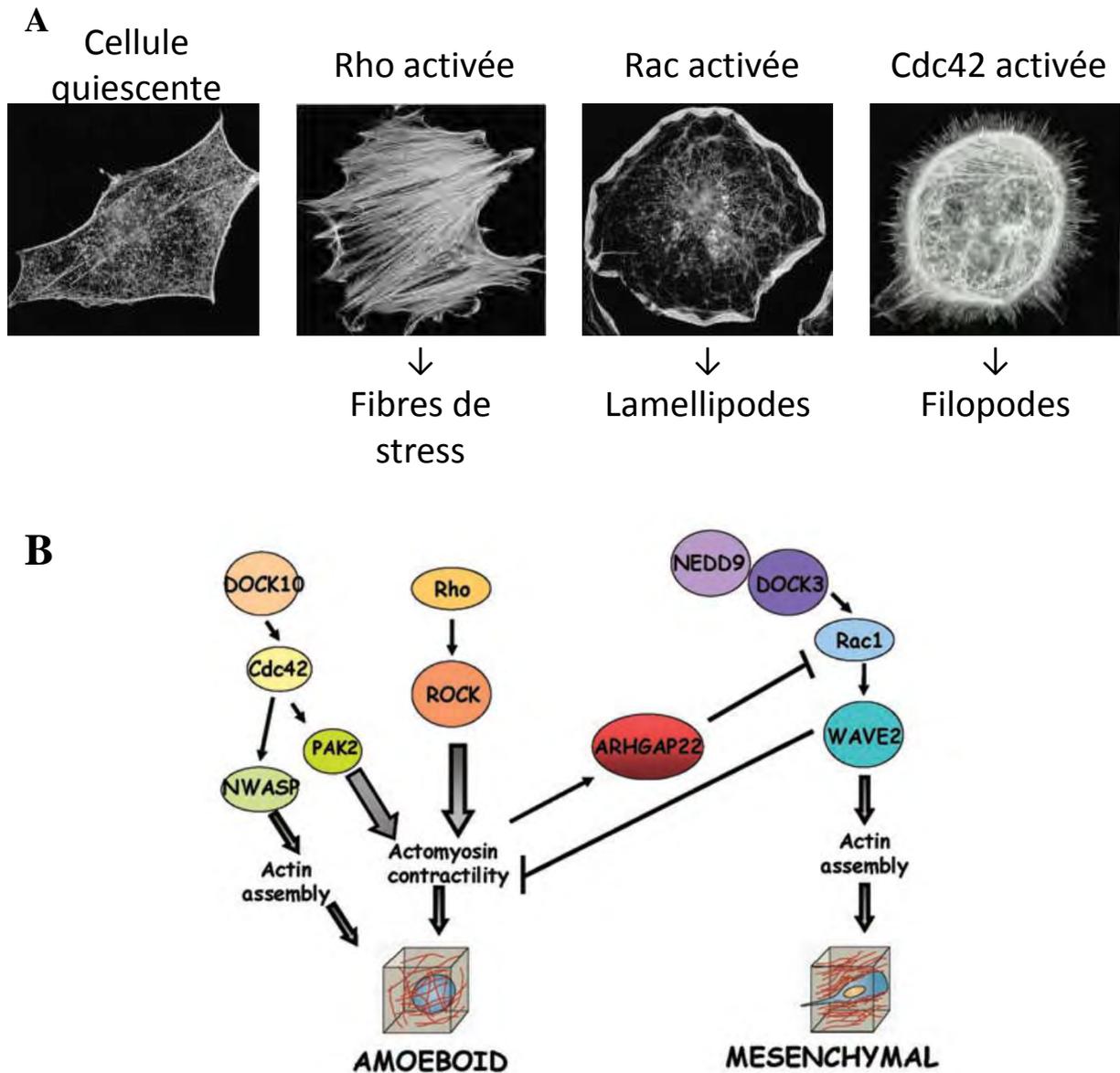


Figure 40 : Activité des RhoGTPases sur la morphologie et la migration cellulaire en 2D et en 3D

A : L'activation des RhoGTPases modifie l'organisation du cytosquelette d'actine et la morphologie cellulaire en 2D.

Immunomarquage du réseau d'actine dans des cellules quiescentes ou suite à la microinjection des protéines Rho, Rac ou Cdc42 activées.

(D'après Alberts, 2002)

B : Régulation de la morphologie cellulaire en 3D, de la migration amœboïde *versus* mesenchymale par les protéines de la famille Rho.

RhoA et Cdc42 favorisent la migration amœboïde alors que Rac favorise la migration mesenchymale. Chacune de voies exerçant un contrôle négatif sur la deuxième.

(D'après Sanz-Moreno, 2009)

localisation subcellulaire est également variée, si elles sont majoritairement retrouvées associées aux membranes, certaines RhoGTPases ont été retrouvées dans le cytoplasme et dans le noyau. Ces différences reflètent la diversité des fonctions assumées par cette famille de protéines.

Les protéines Rho sont principalement connues pour leur rôle dans la régulation du cytosquelette d'actine par lequel elles contrôlent la morphologie, la polarité, l'adhésion et la motilité cellulaire. Cependant leur rôle n'est pas équivalent. En effet, en culture cellulaire classique (en 2 dimensions), RhoA, B et C induisent la formation de fibres de stress qui sont au contraire inhibées par les protéines Rnd1 et 3. Rac1, quant à lui, intervient dans la formation des lamellipodes et Cdc42 des filopodes (Figure 40A)(Etienne-Manneville and Hall, 2002). Au sein d'une matrice extracellulaire en 3 dimensions, Rac1 favorise une morphologie mésenchymale alors que RhoA et Cdc42 induisent une morphologie amœboïde. Ces différents types de morphologies affectent le mode d'invasion. RhoA et Cdc42 stimulent la migration dite amœboïde de cellules isolées et leur survie dans le flux sanguin au cours de la dissémination métastatique alors que Rac1 favorise un mode d'invasion collective associée à une digestion de la matrice extracellulaire (Figure 40B).

Si la régulation du cytosquelette d'actine est la fonction initialement identifiée, de nombreuses autres fonctions ont été découvertes dépendantes ou non du cytosquelette. Les RhoGTPases sont notamment capables de réguler la transcription, le cycle cellulaire, la prolifération, la survie et le trafic vésiculaire dont l'endocytose.

Les RhoGTPases sont impliquées dans plusieurs pathologies et en particulier dans les cancers. A la différence des protéines Ras, les protéines Rho sont très rarement mutées dans les cancers, seules RhoH et plus récemment Rac1 ont été retrouvées mutées (voir partie III-C-2-b pour Rac1). Cependant leur expression et/ou leur activité est très souvent dérégulée et notamment augmentée dans les cancers (Tableau 5). A l'exception de RhoB, présenté en détail partie III-B, la majorité de RhoGTPases sont surexprimées ou suractivées dans les cancers et semblent donc avoir un rôle pro-tumoral. Ces dérégulations peuvent être conséquentes à des altérations géniques de leurs régulateurs. Par exemple, une mutation activatrice de Tiam1, une GEF de Rac1, a été identifiée (Engers *et al.*, 2000) ainsi qu'une fusion de la GEF LARG avec MLL conduisant à l'activation de RhoA ou des délétions homozygotes de DLC-1, GAP de RhoA, RhoB, RhoC et Cdc42, sont également décrites (Kourlas *et al.*, 2000).

Au niveau moléculaire, le rôle des différentes RhoGTPases a été extensivement étudié, en particulier celui de RhoA, Cdc42 et Rac1 et résumé dans de nombreuses revues. Nous nous concentrerons par la suite sur l'implication des RhoGTPases plus spécifiquement dans le mélanome.

RhoGTPase	Altération	Cancer
RhoA	Surexprimé	Hépatocarcinome Vessie Digestifs Gynécologiques Poumon Testicules
RhoB	Sous-exprimé	Cancer du poumon Cancer de la tête et du cou Glioblastome Cancer gastrique
RhoC	Surexpression	Mélanome Poumon Gynécologiques Pancréas Hépatocarcinome Prostate Tête et cou Vessie
RhoG	Surexpression	Sein
Rac1	Surexpression	Sein Gastrique Testicule Prostate
	Hyperactivé	Leucémie myéloïde chronique
	Epissage alternatif (Rac1b)	Colorectal
	Muté	Mélanome
Rac2	Surexprimé	Peau Tête et cou
	Hyperactivé	Leucémie myéloïde chronique
Rac3	Surexprimé ou Hyperactivé	Sein
Cdc42	Surexprimé	Sein Testicule
Rnd1	Surexprimé	Sein
Rnd3/RhoE	Surexprimé	Poumon Pancréas
	Sous-exprimé	Prostate
RhoH	Sous-exprimé Muté	Leucémie Lymphome

Tableau 5 : Altérations des RhoGTPases dans les cancers

(Adapté de Karlsson, 2009)

2 - Implication dans la mélanomagenèse

Les mélanomes sont caractérisés par un très fort pouvoir métastatique qui serait issu de la conjonction de 2 caractéristiques des cellules de mélanome d'une part leurs capacités migratoires et invasives importantes et d'autre part leur plasticité, c'est-à-dire leur capacité à s'adapter et à survivre dans différents environnements. En l'occurrence, les cellules de mélanome ont des capacités de survie relativement exceptionnelles (elles sont radio et chimio-résistantes) et sont capables de s'implanter dans de nombreux sites métastatiques. Ces 2 caractéristiques pourraient être liées à l'origine embryonnaire des mélanocytes, les cellules de la crête neurale étant dotées de capacités migratoires et capables de se différencier en de nombreux types cellulaires.

En tant qu'interrupteurs moléculaires, les RhoGTPases sont capables d'intégrer différents signaux cellulaires et extracellulaires et de contrôler en retour de nombreux processus cellulaires et en particulier la carcinogenèse. Certaines d'entre elles ont été décrites pour participer à ce titre à la mélanomagenèse et à la réponse thérapeutique des mélanomes.

a – RhoC

Le rôle de RhoC dans le mélanome a été révélé en 2000 par un article de Clark *et al.* publié dans Nature. En effet, dans le but d'identifier des marqueurs d'agressivité impliqués dans le processus métastatique, une étude de transcriptomique a comparé l'expression de plus de 7000 gènes de lignées cellulaires parentales peu métastatiques avec celle des lignées correspondantes rendues hautement métastatiques (par passage successif dans la souris), RhoC faisait partie de la vingtaine de gènes ainsi identifiés. Il a également été montré que l'expression de RhoC dans les lignées parentales augmentait leurs capacités métastatiques tandis que son inhibition réduisait celle des lignées métastatiques générées (Clark *et al.*, 2000). Le rôle clé de RhoC dans le processus métastatique a été confirmé par une autre étude (Hakem, 2005). De plus, cet effet semble être au moins en partie dépendant de la voie PI3K/AKT (Ruth *et al.*, 2006). Enfin, il a été montré que l'expression de RhoC augmentait au cours de la progression tumorale dans des biopsies de tumeurs et que l'expression de RhoC était inversement corrélée à la survie des patients (Boone *et al.*, 2009).

b - Rac-1

A la différence de leurs homologues Ras, les RhoGTPases sont rarement mutées dans les cancers, à 2 exceptions près (Rac1 et RhoH). En effet, une mutation de Rac1 conduisant à la substitution de la proline en position 29 par une sérine, a été récemment identifiée par 2 équipes dans des mélanomes (Hodis *et al.*, 2012; Krauthammer *et al.*, 2012). Elle est retrouvée dans 4% des

mélanomes dans l'étude de Hodis et dans 9% dans celle de Krauthammer. De plus, alors qu'elle est absente des tissus sains, elle est retrouvée à la même fréquence dans les mélanomes primaires et métastatiques suggérant un rôle dans les étapes précoces de la mélanomagenèse.

La proline 29 est localisée dans le switch I, domaine impliqué dans la liaison aux nucléotides et aux effecteurs. Sur la base de modélisations informatiques, Hodis *et al.* prédisent que cette mutation stabilise la forme active liée au GTP par rapport à la forme inactive. Krauthammer *et al.* confirment cela par des études biochimiques. De plus, ils montrent que l'expression de la protéine mutée dans des mélanocytes induit l'activation de la voie MAPK et augmente la prolifération et la migration.

Par la suite, il a été montré que cette mutation augmente effectivement la quantité totale de Rac1-GTP dans la cellule. Mais, à la différence des mutations de Ras, la mutation de Rac1 ne s'accompagne pas d'une perte de l'activité GTPasique ou d'une liaison constitutive au GTP. L'augmentation de la forme activée est ici induite par une augmentation de la vitesse d'échange entre le GDP et le GTP (Davis *et al.*, 2013). Le cycle entre la forme active et inactive pourrait en effet être important puisque à la différence de la protéine Rac1^{P29S}, la protéine constitutivement active Rac1^{V12G}, ne semble pas suffisante à induire des mélanomes chez le poisson zèbre. La GEF Tiam1, qui accélère l'échange GDP/GTP, est également retrouvée surexprimée dans les mélanomes humains et chez le poisson zèbre, corroborant l'hypothèse que c'est le cycle entre la forme inactive et active de Rac1 qui est important et non la forme constitutivement active (Dalton *et al.*, 2013). Dans le même esprit, la GEF spécifique de Rac1, PREX2, a été retrouvée mutée dans 14% des mélanomes. L'expression des mutants favorise la tumorigenèse de mélanocytes immortalisés dans la souris Nude. Cependant, les conséquences biochimiques (i.e. : activité vis-à-vis de Rac1) n'ont pas été étudiées (Berger *et al.*, 2012).

De plus, Rac1 participe activement à la plasticité et à l'invasion des cellules de mélanome. En effet, les cellules de mélanome sont capables de rapidement basculer d'un mode de migration amœboïde vers un mode mésenchymal et *vice versa* en fonction du contexte extracellulaire. Cette plasticité s'accompagne d'une commutation de migration dépendante de RhoA et Cdc42 pour le mode amœboïde, vers une migration dépendante de Rac1 dans le mode mésenchymal (Sanz-Moreno *et al.*, 2008). L'activation de Rac1 est alors dépendante de NEDD9 et DOCK3 qui sont exprimés dans les mélanomes alors qu'ils sont normalement décrits pour n'être exprimés que dans les cellules neurales et leurs précurseurs et. L'expression de ces 2 facteurs serait en lien avec l'origine embryonnaire des mélanocytes et la réactivation au cours de la mélanomagenèse de programmes de dédifférenciation (Orgaz and Sanz-Moreno, 2013; Sanz-Moreno and Marshall, 2009).

c - RhoJ

RhoJ appartient avec RhoQ au groupe Cdc42, il était jusqu'à présent essentiellement connu pour son rôle dans la migration des cellules endothéliales et l'angiogenèse (Leszczynska *et al.*, 2011). 2 articles de la même équipe ont récemment montré son rôle dans les mélanomes :

- D'une part, RhoJ participerait à la chimio-résistance : RhoJ active PAK1 qui prévient alors l'activation de CHK1 et ATF2, effecteurs d'ATR, par ce dernier. Il en résulte une survie des cellules en présence de Cisplatine (Ho *et al.*, 2012). De plus, cet article identifie également un rôle similaire de Rnd2 mais dont le mécanisme n'est pas élucidé.
- D'autre part, l'expression de RhoJ dans les cellules de mélanome stimule également via son effecteur PAK1 à leurs capacités invasives et migratoires *in vitro* et *in vivo* (Ho *et al.*, 2013).

d - Rnd3/RhoE

Rnd3/RhoE appartient famille Rnd qui est caractérisée par l'absence d'activité GTPasique. Par conséquent, à la différence des autres protéines Rho, les protéines Rnd ne sont pas des commutateurs moléculaires. Elles sont régulées directement au niveau de leur expression et par phosphorylation pour Rnd3.

Les protéines Rnd sont essentiellement connues pour leur rôle dans les cellules neurales, elles participent en effet à la croissance orientée des axones et des dendrites. De plus, Rnd1 est également exprimée dans le foie et Rnd2 dans les testicules. Au contraire, Rnd3 est exprimée de manière ubiquitaire mais à un faible niveau et plus fortement dans la prostate. Enfin, l'expression de Rnd3 est induite en réponse à l'activation de la voie MAPK, au PDGF, aux UVB et au Cisplatine, ce qui a conduit à la considérer comme un gène de réponse au stress (Chardin, 2006; Riento *et al.*, 2005).

Rnd3 est impliquée dans la migration cellulaire. Elle est induite par la voie MAPK, inactive RhoA en activant p190RhoGAP et en inhibant ROCK-I, effecteur de RhoA, par liaison directe. Cela conduit *in fine* à inhiber la formation des fibres de stress induites par RhoA et à favoriser la migration et l'invasion. Initialement montré dans des cellules MDCK, ce mécanisme est retrouvé dans les cellules de mélanome en réponse à la mutation activatrice de *BRAF* (Guasch *et al.*, 1998; Hansen *et al.*, 2000; Klein and Aplin, 2009; Klein *et al.*, 2008).

De plus, Rnd3 serait également impliquée dans le contrôle du cycle cellulaire et de l'apoptose. D'une part, elle est capable d'inhiber l'entrée en phase S, mécanisme partiellement prévenu par l'expression de cycline D₁ et totalement par celle de Rb (Poch *et al.*, 2007). D'autre part, Rnd3 protège de l'apoptose en réponse aux génotoxiques tels que les UVB et la Camptothécine (Boswell *et al.*, 2006; Ongusaha *et al.*, 2006).

De par son rôle pro-migratoire et anti-apoptotique, RhoE pourrait participer à la tumorigenèse. Il n'est toutefois pas à exclure que son rôle dépende du tissu. En effet, Rnd3 est retrouvée surexprimée dans les cancers du pancréas et bronchiques non à petites cellules. En revanche, il est sous-exprimé dans les cancers de la prostate (Chardin, 2006; Karlsson *et al.*, 2009; Vega and Ridley, 2008). Dans le cas des mélanomes, Rnd3 semble promouvoir la carcinogenèse notamment via son induction par la voie MAPK.

e – RhoA

Les cellules de mélanome présentent de fortes capacités migratoires et sont extrêmement plastiques. Elles sont en particulier capables de migrer indifféremment selon un mode mésenchymal ou amœboïde en fonction du contexte extracellulaire. Ce dernier mode est notamment dépendant de RhoA (Sanz-Moreno *et al.*, 2008). En conséquence, RhoA participerait à la plasticité de ce type cellulaire. En outre, RhoA participerait à la migration induite par la perte de p53 (Gadea *et al.*, 2007).

Enfin, il est suggéré que RhoA pourrait participer à la résistance au Vemurafenib. En effet, ce dernier, via l'inhibition de la voie MAPK, induit la perte d'expression de Rnd3/RhoE levant l'inactivation de RhoA. Cette activation de RhoA serait responsable de la migration et de l'invasion résiduelle sous Vemurafenib (Klein and Higgins, 2011). Cependant dans cet article le taux d'activation de RhoA n'a pas été mesuré.

B - La GTPase RhoB

1 – Généralités

La protéine RhoB est codée par le gène correspondant localisé sur chromosome 2 et ayant la particularité de ne pas contenir d'intron.

Au niveau structural, RhoB est extrêmement proche de ses homologues puisqu'elle présente respectivement 83 et 85% d'homologie de séquence avec RhoA et RhoC, les différences se situant essentiellement dans la région hypervariable C-terminale. Il existe en particulier une différence majeure au niveau de la séquence CAAX impliquée dans la prénylation des petites GTPases. En effet, alors que RhoA et RhoC sont uniquement géranyl-géranyllées, RhoB est également farnésylée (Baron *et al.*, 2000). Ceci pourrait participer à la non-redondance de ces protéines via une localisation subcellulaire différente. Alors que RhoA et RhoC sont majoritairement associées à la membrane plasmique, RhoB est retrouvée à la membrane plasmique mais également au niveau des endosomes tardifs et dans le noyau (Adini, 2003; Lebowitz and Prendergast, 1998; Milia *et al.*, 2005).

Par ailleurs, RhoB présente certaines différences notables par rapport à ses homologues notamment dans les cancers : alors que RhoA et RhoC sont retrouvées surexprimées dans de nombreux cancers (Tableau 5), RhoB est sous-exprimée et jouerait un rôle de suppresseur de tumeurs et/ou de métastases (voir partie III-B-4). De plus, à la différence de ses homologues, *RHOB* est un gène de réponse précoce. En effet, les protéines RhoA et C ainsi que leurs messagers ont des demi-vies relativement longues (> 24 h) et leur expression est stable, ces derniers sont essentiellement régulés au niveau de leur activité. Au contraire, la protéine et le messenger de RhoB ont une demi-vie courte, d'environ 1 h, et leur expression (synthèse et dégradation) est fortement régulée.

2 – Régulation

En tant que gène de réponse précoce, l'expression de *RHOB* est modifiée à différents niveaux et par de très nombreux facteurs tels que les facteurs de croissance (sérum, EGF, PDGF), les hormones (glucocorticoïdes, androgènes, œstrogènes), les différents stress physiques (UVB, chaleur) ou les génotoxiques (rayonnements ionisants, cytotoxiques (5-FU)...). Les différents niveaux de régulation de RhoB seront dans un premier temps détaillés, puis les fonctions de RhoB seront abordées dans la partie suivante.

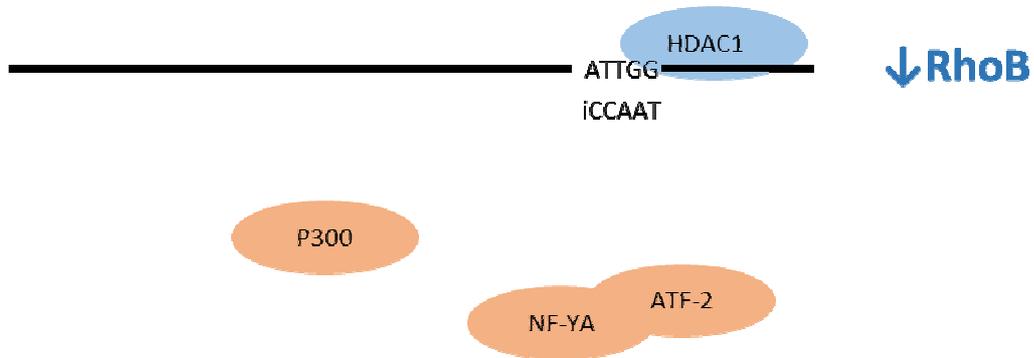
a – Activité transcriptionnelle du promoteur

Le promoteur du gène RhoB présente 97% d'homologie avec celui de la souris et du rat. Il présente 2 séquences CCAAT (la première dans le sens de lecture et la deuxième inversée, appelée en conséquence iCCAAT pour CCAAT inversée), 2 boîtes TATA, des séquences répétées en tandem (VNTR) ainsi que d'autres sites identifiés par bio-informatique : NF- γ , AP2, SP1 et NF- κ B (Figure 41)(Tovar *et al.*, 2003).

i - Activation par les facteurs de croissance

Les facteurs de croissance et les cytokines tels que l'EGF, le sérum, le TGF β et le PDGF induisent l'expression de RhoB au moins en partie via une activation transcriptionnelle directe (souvent plusieurs mécanismes conduisent de manière concomitante et/ou successive à l'induction de RhoB). Ceci a été montré initialement en utilisant l'Actinomycine D et la Cycloheximide : d'une part l'Actinomycine D, un inhibiteur de transcription prévient l'induction du messenger de RhoB par ces facteurs montrant que cette augmentation est liée à une augmentation de la synthèse du messenger et d'autre part, la Cycloheximide n'altère pas cette induction montrant que la synthèse d'aucune protéine intermédiaire

A l'état basal



Sous stress :

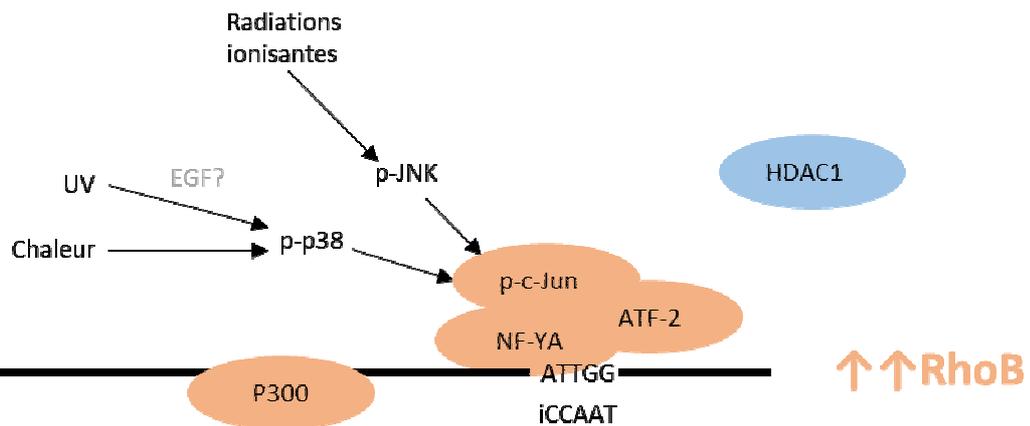


Figure 42 : Mécanisme de régulation transcriptionnelle de RhoB sous stress

A l'état basal, HDAC1 est fixée sur le promoteur de RhoB et maintient son expression faible. Les facteurs NF-Y et ATF2 sont associés entre eux mais pas sur le promoteur

Sous stress, suite à l'activation de p38 ou de JNK, la protéine c-Jun est activée et forme un complexe tripartite avec NF-YA et pATF2. Ce complexe se fixe au niveau de la iCCAAT superposée avec le site NF-Y. Ceci provoque le décrochage de HDAC1 de la iCCAAT et permet la fixation de P300 augmentant alors fortement l'expression de RhoB.

n'est nécessaire (Fritz *et al.*, 1995; Jähner and Hunter, 1991). Des essais luciféras mesurant l'activité du promoteur ont ultérieurement confirmés ces résultats.

Le mécanisme précis conduisant à cette augmentation par les facteurs de croissance n'a été investigué que pour le TGF β . Le promoteur de RhoB est activé par liaison directe de Smad 3 sur la iCCAAT ou sur un site superposé. L'activation de la voie MAPK et la présence de p53 serait nécessaire à ce processus mais le mécanisme exact n'a pas été déterminé (Vasilaki *et al.*, 2010).

ii - Activation par le stress et les thérapies anti-cancéreuses

L'activité du promoteur de RhoB est également induite par une variété de stress génotoxiques ou non tels que la chaleur, les UV, les radiations ionisantes, le 5-FU, les agents alkylants (Ahn *et al.*, 2011; Canguilhem *et al.*, 2005; Fritz and Kaina, 2000, 2001; Jiang *et al.*, 2004a; Kim *et al.*, 2010a, 2010b; Li *et al.*, 2011).

Au niveau mécanistique, il semblerait que ces différents stress induisent l'activation de c-Jun, qui induirait le décrochage de l'Histone DeAcétylase 1 (HDAC1) via l'iCCAAT du promoteur de RhoB. Initialement les travaux de Fritz montraient que l'induction de RhoB sous UV était dépendante de la iCCAAT, d'ATF-2, de NF-YA et d'un 3ième facteur non identifié (Fritz and Kaina, 2001). Par la suite il a été montré que HDAC1 réprimait l'expression de RhoB via cette même iCCAAT (Wang *et al.*, 2003). Enfin, il a été montré qu'en réponse aux UV, ATF-2 et c-Jun se fixaient au niveau de la iCCAAT et/ou de la CCAAT, induisant le décrochage de HDAC1 au profit de P300 (Ahn *et al.*, 2011). Par ailleurs, il a été rapporté que selon le stress, l'activation de c-Jun serait dépendante de p38 (UV et chaleur) ou de JNK (radiations ionisantes, agents alkylants et le NSC12618 dont le mécanisme d'action est inconnu)(Kim *et al.*, 2011, 2010a, 2010b; Li *et al.*, 2011).

D'après, l'analyse des différentes publications, je proposerais le mécanisme suivant :

En réponse au stress, via l'activation de p38, de JNK ou d'autres voies, c-Jun et ATF-2 sont activés. Le complexe tripartite c-Jun, ATF-2 et NF-Y se fixe alors sur le promoteur de RhoB au niveau de la CCAAT et/ou de la iCCAAT. Ceci induit le décrochage de HDAC1 de la iCCAAT, permettant alors la fixation de P300 essentiellement au niveau de la CCAAT. Ceci induirait à la fois la levée de la répression par HDAC1 et l'augmentation d'activité du promoteur (Figure 42).

Nous verrons par la suite que ce travail doctoral a permis de mettre en évidence la régulation de RhoB dans les cellules de mélanome en réponse aux inhibiteurs vraisemblablement par un mécanisme dépendant de c-Jun et de la iCCAAT mais indépendant de p38 et de JNK (Figure 42).

Il est à noter qu'il a été montré que la stimulation de l'activité du promoteur de RhoB par les UV est également dépendante de l'EGF suggérant que l'EGF pourrait agir par le même mécanisme (Canguilhem *et al.*, 2005).

De plus, les inhibiteurs de Farnésyl Transférase (FTI) et de Géranyl-Géranyl Transférase (GGTI) sont également capables, outre leur rôle sur les modifications post-traductionnelles de RhoB, de modifier son expression via son promoteur. Ces inhibiteurs ont initialement été développés afin d'inhiber les protéines Ras en prévenant leur localisation à la membrane plasmique (voir partie II-B-3-b-i), cependant les FTases et les GGTases ayant de nombreuses cibles, ces inhibiteurs altèrent les modifications post-traductionnelles et la localisation de nombreuses protéines. RhoB serait une cible double de ces inhibiteurs puisqu'ils modifient sa prénylation et son expression. Le mécanisme induisant l'expression de RhoB n'est à ce jour pas élucidé il pourrait être conséquent à l'inhibition de Ras et/ou de RhoA qui exercent un contrôle sur l'expression de RhoB. Les données disponibles décrivent, comme pour les stress présentés ci-dessus, un décrochage de HDAC1 du promoteur de RhoB au profit de l'HAT, P300 en réponses aux FTI et GGTI (Delarue *et al.*, 2007).

iv - Inhibition par les oncogènes

L'expression d'oncogènes tels que Ras, EGFR, HER2 (via Ras pour EGFR et HER2) induit la perte d'expression de RhoB par une diminution de l'activité du promoteur de RhoB via un mécanisme dépendant d'AKT, le mécanisme exact et la région du promoteur impliqués n'ayant pas été élucidés (Bousquet *et al.*, 2009; Jiang *et al.*, 2004a, 2004b).

Nous remarquerons que l'activation ponctuelle ou constitutive des oncogènes a un effet opposé : alors que le traitement par l'EGF induit l'expression de RhoB, l'expression constitutive de l'EGFR inhibe cette dernière.

v - Les polymorphismes

L'expression de RhoB pourrait également être modulée d'un individu à l'autre par la présence de polymorphismes.

En effet, le promoteur de RhoB contient des régions répétées en tandem (VNTR) dont le nombre varie d'un individu à l'autre. Cependant le lien entre le nombre de répétitions et l'expression n'est pas clairement établi. Il a été montré que la présence de ces répétitions diminuait l'activité du promoteur mais que cette dernière ne semblait pas être influencée par leur nombre (des répétitions au nombre de 8, 9 ou 11 avait un effet équivalent)(Tovar *et al.*, 2003). Au contraire, Mahr *et al.* montrent que l'activité du promoteur contenant 13 répétitions est plus importante que lorsqu'il n'y

en a que 8. Ceci n'est toutefois retrouvé que dans un des 2 types cellulaires testés (Mahr and Müller-Hilke, 2007).

Des polymorphismes touchant un seul nucléotide (SNP) ont également été décrits. Deux SNPs ont en particulier été identifiés dans le promoteur de RhoB, rs585017 et rs2602160, localisés respectivement à -165 et -1285. Le rs585017 a été identifié par plusieurs équipes et serait un facteur de susceptibilité à l'arthrose du genou (Loughlin *et al.*, 2007; Mahr *et al.*, 2006; Shi *et al.*, 2008). Les travaux de Mahr *et al.* ont montré que RhoB était plus fortement exprimé chez les malades que chez les sujets sains et que l'altération conjointe des rs585017 et rs2602160 augmentait l'activité du promoteur de RhoB (Mahr and Müller-Hilke, 2007), suggérant le SNP rs585017 associé à cette pathologie augmenterait l'activité du promoteur de RhoB.

vi – Facteurs épigénétiques : HDAC1

Outre, la réponse au stress, l'expression de RhoB est également régulée de manière tissu-spécifique, au cours du vieillissement et dans les tumeurs (Mazieres *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2003). (détaillé partie III-B-4-a).

La mé

thylation des promoteurs au niveau d'ilôts CpG est un mécanisme largement répandu de contrôle de l'expression des gènes. Malgré la présence d'ilôts CpG sur le promoteur de RhoB aucune méthylation n'a pu être mise en évidence (Mazières *et al.*, 2007; Yoon *et al.*, 2007).

En revanche, la déacétylation des histones, en particulier par HDAC1, semble être un mécanisme prépondérant de contrôle de l'expression de RhoB dans les tumeurs et au cours du vieillissement (Mazières *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2003; Yoon *et al.*, 2007). Cependant, il existe des divergences selon les articles concernant la région du promoteur impliquée dans ce mécanisme. En effet, alors que l'article de Wang *et al.* montre que l'iCCAAT qui est impliquée dans l'extinction de l'expression de RhoB dans des lignées de cancers pulmonaires, celui de Mazières *et al.* montre que l'ablation de la région VNTR compromet complètement ce mécanisme.

b - Stabilité de l'ARNm

Outre l'activation du promoteur, une augmentation de la quantité d'ARNm peut également conséquente être à la stabilisation de ce dernier. En effet, les UV, l'EGF, les glucocorticoïdes, la chaleur et la Camptothécine augmentent la demi-vie de l'ARNm de RhoB (Canguilhem *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2011; Malcolm *et al.*, 2003; Mamouni *et al.*, submitted; Westmark *et al.*, 2004)

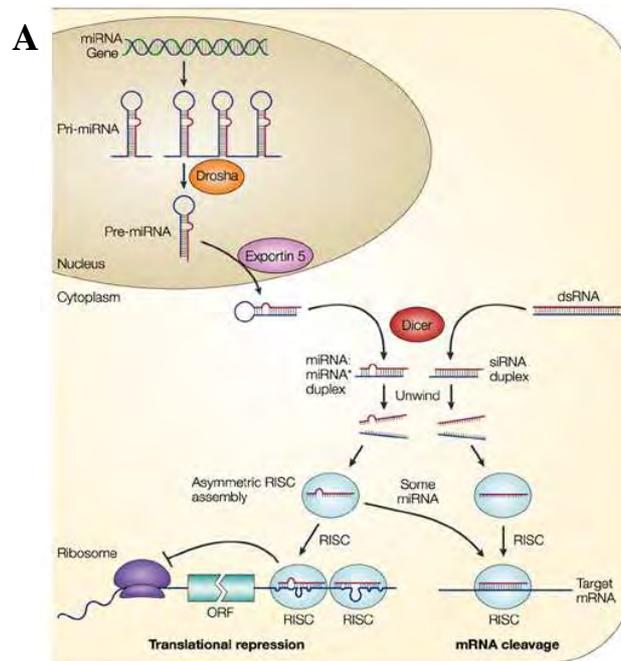


Figure 43 : Régulation de l'expression de RhoB par les miARNs

A: Synthèse, maturation et fonctionnement des miARNs.
 (D'après He, 2004)

B: Sites putatifs de fixation des miARNs sur le 3'UTR de l'ARNm RhoB.
 Les miRNA dont le rôle a été démontré sont encadrés en rouge.
 (D'après Sun, 2010)

L'article de Westmack *et al.* propose une implication de la protéine HuR dans ce mécanisme. En effet, sous UV, la protéine HuR transloque dans le cytoplasme et est capable de se lier à la région 3'UTR du messenger de RhoB (Westmark *et al.*, 2004).

c – Les miARN

Les miARNs ou microARNs sont de petits ARNs (21 à 24 nucléotides). Ils sont transcrits à partir de régions introniques ou non codantes sous forme d'un pri-miARN excisé par Drosha puis exporté dans le cytoplasme où les duplex sont alors dissociés par Dicer. Le miARN ainsi maturé s'hybride plus ou moins parfaitement sur ses ARNm cibles (Figure 43A). Chez les métazoaires, l'hybridation se fait le plus souvent au niveau de la région 3'UTR et conduit à une répression de la traduction et/ou à une dégradation de l'ARNm cible. Une hybridation au niveau du 5'UTR, bien que plus rare, est également décrite et généralement associée à une augmentation de la traduction (Esteller, 2011; Pasquinelli, 2012). Le messenger de RhoB comporte une région 3'UTR relativement longue sur laquelle il existe plusieurs sites putatifs de liaison aux miARNs (Figure 43B).

En outre, l'expression de nombreux miARN est altérée dans les cancers, certains d'entre eux sont surexprimés et participent activement à l'oncogenèse via la modulation de plusieurs de leurs cibles. Ils sont appelés Oncomir.

i - miR-21

Au cours de 3 dernières années, plusieurs articles ont clairement démontré la régulation de l'expression de RhoB par miR-21. Effectivement, l'expression de miR-21 réduit l'expression de l'ARNm et de la protéine RhoB alors qu'un inhibiteur de miR-21 les augmente. L'effet de miR-21 sur RhoB ferait partie intégrante du statut d'Oncomir de miR-21 (Connolly *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2011; Ng *et al.*, 2012; Sabatell *et al.*, 2011).

ii - miR-223

miR-223 est capable via 2 sites de fixation dans le 3'UTR de diminuer l'expression de l'ARNm de RhoB (Rangrez *et al.*, 2012; Sun *et al.*, 2009).

iv – miR-19

Il a été montré au laboratoire que miR-19 coopère avec HuR pour réguler l'activité traductionnelle de l'ARNm de RhoB. En effet, à l'état basal, miR-19 et HuR sont fixés sur 3'UTR de RhoB et maintiennent une expression faible de ce dernier. En réponse aux UV, miR-19 et HuR se détachent de l'ARNm de RhoB, par un mécanisme non élucidé, ce qui permet d'augmenter la traduction de cet

ARNm et ainsi d'augmenter son expression en dépit de l'inhibition de traduction induite par les UV (Glorian *et al.*, 2011).

d - Stabilité de la protéine

Le contrôle de la stabilité de la protéine pourrait également participer à la régulation de RhoB.

Il a été initialement décrit que, en réponse au TGF β , la protéine RhoB était stabilisée dans des cellules Mv1Lu (fibroblaste de poumon de vison) (Engel, 1998).

De plus, la déplétion de RhoA ou de RhoC augmente l'expression protéique de RhoB. Ceci serait lié à une compétition entre les 3 homologues pour la liaison à RhoGDI-1. Lorsque les 3 homologues sont présents, la fraction de RhoB liée à RhoGDI-1 est minime et la protéine RhoB est rapidement dégradée. En l'absence de RhoA et/ou RhoC, une plus grande fraction de RhoB est liée à RhoGDI-1 prévenant sa dégradation, augmentant sa demi-vie et conduisant à son accumulation (Ho *et al.*, 2008).

e – Modification post-traductionnelle

i - Isoprénylation

Les protéines de la superfamille Ras comportent généralement une séquence CAAX C-terminale impliquée dans leur prénylation et leur ancrage à la membrane. Alors que RhoA et RhoC sont exclusivement géranyl-géranylées, la séquence CKVL de RhoB lui permet d'être aussi bien géranyl-géranylée (RhoB-GG) que farnésylée (RhoB-F)(Baron *et al.*, 2000).

Le rôle différentiel de RhoB-F et RhoB-GG a été étudié par surexpression de formes mutées sur la boîte CAAX étant uniquement farnésylée ou géranyl-géranylée. Les 2 formes auraient des localisations cellulaires différentes, alors que Rho-GG est retrouvée au niveau des endosomes, RhoB-F est à la membrane plasmique (Milia *et al.*, 2005; Wherlock, 2004). Ces 2 formes auraient également comme nous le verrons par la suite des fonctions différentes en particulier dans la régulation de la balance apoptose/survie (voir partie III-C).

ii - Palmitoylation

L'ancrage membranaire des protéines Rho nécessite, en plus de la prénylation, soit une palmitoylation ou une région polybasique C-terminale. Alors que RhoA et RhoC possèdent une telle région, RhoB est palmitoylée sur 2 cystéines situées en position 189 et 192 juste en amont de la cystéine prénylée en position 193. Cette palmitoylation joue un rôle crucial dans la localisation et la fonction de RhoB (Michaelson *et al.*, 2001; Wang, 2005).

iii - Phosphorylation

Il a été décrit au laboratoire que RhoB pouvait être phosphorylée en position S185 par la Caséine Kinase 1 (CK1). Cette phosphorylation augmente la fraction liée au GDP et interfère avec les fonctions de RhoB sur le cytosquelette d'actine et le trafic de l'EGFR (Tillemont *et al.*, 2008).

f - Activité de la protéine

Outre leur action sur l'expression totale de RhoB, la majorité des stress décrits dans les paragraphes précédents pour augmenter l'expression de RhoB induisent également une augmentation de la fraction active. C'est notamment le cas des UV, de l'EGF, de la Camptothécine ou du TGF β (Canguilhem *et al.*, 2005; Mamouni *et al.*, submitted; Vardouli *et al.*, 2008). L'hypoxie induit également une activation de RhoB (Skuli *et al.*, 2006).

Si la régulation de l'activité de RhoGTPases dont RhoB par les GEF, les GAP et le GDI est décrite *in vitro* et *in vivo*, peu d'études ont essayé de déterminer quel régulateur était spécifiquement impliqué en réponse à chacun des stress cités. La GEF Vav2 serait impliqué dans l'activation de RhoB par le TGF β , l'EGF et le LPA (Gampel and Mellor, 2002; Papadimitriou *et al.*, 2011).

Dans un tel contexte, seule une description succincte des régulateurs connus de RhoB suit. Du fait de la forte homologie au sein des protéines Rho, les régulateurs semblent peu spécifiques au moins *in vitro*. *In cellulo*, une plus grande spécificité pourrait être consécutive aux différences de localisations subcellulaires des protéines Rho et des régulateurs.

i - GEF de RhoB :

A ce jour, XPLN, Vav2, GEF10, Net-1 et Ect-2 ont été décrites pour être capables de réguler RhoB :

- **XPLN**, également appelée ArhGEF3, a été décrite pour être très spécifique de RhoA et RhoB, elle n'aurait aucune activité sur RhoC, Rac1 et Cdc42 (Arthur, 2002).

- **Vav2** est une RhoGEF peu spécifique puisqu'elle aussi bien capable *in vitro* d'activer RhoA, RhoB, RhoC, Cdc42, Rac1 ou RhoG (Arthur, 2002). Vav2 a été impliquée dans l'activation de RhoB en réponse à l'EGF et au TGF β (Papadimitriou *et al.*, 2011; Srougi and Burrridge, 2011).

- **GEF10/ARHGEF10** est une protéine relativement peu étudiée elle est capable *in vitro* d'activer RhoA, B et C mais son activité serait prédominante pour RhoB (Mohl *et al.*, 2006).

- Un article de Srougi a montré que **Ect-2** et **Net-1** étaient capables d'activer RhoB en réponse aux dommages à l'ADN (Srougi and Burrridge, 2011).

Effecteur	Spécificité	Fonctions	Références
ROCK-I et II	RhoA, B et C	Contraction cellulaire via le système Acto-Myosine	Narumiya, 2009
mDia1	RhoA, B, C	Polymérisation linéaire des filaments d'actine Stabilisation des microtubules	Narumiya, 2009 Ridley, 2013
mDia2 et 3	RhoA, B, C Cdc42, Rac1		
PKN (PRK1 et PRK2)	RhoB	Recrutement aux endosomes Trafic de l'EGFR Transcription	Mellor 1998 Wheeler, 2004
Rophilin-2 / p76RBE	RhoB	Recrutement aux endosomes	Mircescu, 2002 Wheeler, 2004 Steuve, 2006
Citron Kinase	RhoA et C RhoB	Cytokinèse	Sahai, 2002 Madaule, 1995
MAP1A/LC2	RhoB	Trafic de l'EGFR	Lajoie-Mazenc, 2008
PDK1	RhoB	Recrutement aux endosomes	Flynn, 2000
DB1	RhoB	Facteur de transcription	Lebowitz and Prendergast, 1998
FMNL2 et 3	RhoC		Kitzing, 2010 Ridley, 2013
Daam1	RhoA, C et Cdc42		Higashi et al., 2008
TNFAIP1	RhoB	Apoptose induite par le TNF α	Kim et al., 2009
PP2A	RhoB		Lee et al., 2007

Tableau 6 : Effecteurs de RhoB

ii - GAP

Peu de travaux se sont intéressés aux RhoGAPs de RhoB. Seules 2 GAPs, DLC-1 et p190RhoGAP, communes avec RhoA et C, sont décrites dans la littérature pour réguler RhoB (Kim *et al.*, 2009b; Kusama *et al.*, 2006; Liao and Lo, 2008).

iii - GDI

Chez l'Homme, 3 RhoGDI, RhoGDI-1, 2 et 3, sont décrites (Garcia-Mata *et al.*, 2011). Des publications montrent que RhoGDI-1, initialement dénommée RhoB p20 GDI, et RhoGDI-3 interagiraient avec RhoB (Isomura *et al.*, 1991; Michaelson *et al.*, 2001; Zalcmann *et al.*, 1996). Cependant dans les 2 cas, ces résultats ont été contredits (Bilodeau *et al.*, 1999; Brunet *et al.*, 2002).

3 - Signalisation et rôles cellulaires de RhoB

a - Les effecteurs

Il n'existe pas de domaines conservés permettant d'identifier les effecteurs des protéines Rho d'après leur séquence. Ils ont été identifiés par chromatographie d'affinité ou double-hybride. Ces effecteurs interagissant au niveau des switch I et II qui présentent une très forte homologie au sein de la famille Rho, nombre d'entre eux sont communs à plusieurs groupes de la famille Rho. La nature de l'acide aminé en position 40, acide glutamique pour le groupe RhoA *versus* acide aspartique pour les groupes Cdc42 et Rac, jouerait un rôle dans leur distinction par les effecteurs (Bishop and Hall, 2000).

Au sein de la sous-famille Rho, la spécificité des effecteurs est mal caractérisée. Les différences de fonctions entre RhoB et ses homologues pourraient être liées d'une part à la substitution entre une glutamine et un acide glutamique en position 209 et d'autre part aux différences de localisations subcellulaires. A titre d'exemple, PKN est capable *in vitro* d'interagir avec les 3 homologues alors qu'*in cellulo* seul RhoB co-localise avec PKN (Wheeler and Ridley, 2004).

Les principaux effecteurs décrits pour RhoB ainsi que leurs fonctions sont mentionnés dans le tableau 6.

b - Fonctions cellulaires

i - Cytosquelette d'actine

La régulation du cytosquelette d'actine est une des caractéristiques communes à la majeure partie des membres de la famille Rho. Au sein du groupe RhoA, les 3 homologues sont redondants et leur surexpression induit, via l'activation de ROCK, la formation de fibres de stress. Les formes farnésylées ou géranyl-géranylées de RhoB semblent pareillement impliquées (Allal *et al.*, 2002).

Effet sur la migration	Modèles cellulaires	Facteurs stimulant la migration	Références
-	Cellules pulmonaires		Bousquet, 2009
	Cellules endothéliales		Sabatel, 2011
	Cellules d'hépatocarcinome		Connolly, 2010
	Cellules musculaire lisse	Glucose	Chen, 2006
	NIH-3T3/Ras et cellules de prostate		Jiang, 2004
	Macrophage		Wheeler, 2007
	Cellules de cancer gastrique		Zhou, 2011
+	Cellules de cancers prostate et de sein	uPAR	Alfano, 2012
	Macrophage	PDGF	Huang, 2011
	HaCaT	TGF β	Vasilaki, 2010
	Prostate		Yoneda, 2010

Tableau 7 : Rôle de RhoB dans la migration cellulaire

ii - Trafic cellulaire

Du fait de sa localisation aux endosomes, RhoB participe de manière prépondérante au trafic vésiculaire (Fernandez-Borja, 2005). Il a été montré que RhoB participe de manière cruciale au trafic de l'EGFR mais également à celui d'AKT, de PDGFR, de SRC, de CXCR2, de la transferrine et des IgA (Adini, 2003; Gampel *et al.*, 1999; Huang *et al.*, 2007; Neel *et al.*, 2007; Rondanino *et al.*, 2007).

iii - Cycle cellulaire

RhoB semble participer au contrôle de la transition G1/S. Effectivement, l'expression de RhoB est régulée au cours du cycle cellulaire. Elle est en particulier stimulée lors de la transition G1/S et atteint un pic en phase S (Zalcman *et al.*, 1995). D'autre part, alors que les GGTIs induisent un arrêt du cycle en G1, ce dernier est contrecarré par l'expression de RhoB-F (Allal *et al.*, 2002). De plus, RhoB induit l'expression de p21^{WAF} confirmant l'implication de RhoB dans cette transition.

iv - Transcription

RhoB participe également à la modulation de l'expression de plusieurs gènes.

Tout d'abord, il participe à la transcription induite en réponse au sérum. Cette fonction serait dépendante de PRK et indépendante de la prénylation (Lebowitz, 1997; Zeng *et al.*, 2003). De plus, RhoB réprime l'expression du récepteur II du TGF β , T β R-II, via le site AP-1 de son promoteur (Adnane, 2001). L'expression de l'interleukine 3 (IL-3) est également réprimée par RhoB, son interaction avec DB-1 induirait la perte d'activité transcriptionnelle de ce dernier (Lebowitz and Prendergast, 1998).

Ensuite, RhoB pourrait induire l'expression de p21^{WAF}. Cet effet n'est cependant pas systématiquement retrouvé en fonction du type cellulaire (Allal *et al.*, 2002; Du *et al.*, 1999).

Enfin, RhoB régule l'activité transcriptionnelle de NF- κ B sur ses cibles (voir partie III-C-2-b).

v - Adhérence / migration

RhoB participe aux capacités de migration et d'invasion cellulaire, cependant selon les publications un rôle pro-migratoire ou au contraire anti-migratoire lui est attribué (Tableau 7). L'activité de RhoB sur la migration pourrait dépendre du type cellulaire et surtout du mécanisme induisant la migration.

En revanche, il apparaît clairement que l'expression de RhoB modifie les capacités d'adhésion de cellules et en particulier l'expression des intégrines. Plusieurs publications ainsi que des travaux du laboratoire ont montré que la perte d'expression de RhoB diminue l'expression de l'intégrine β_1

(Bousquet *et al.*, in preparation; Liu *et al.*, 2001b; Vega *et al.*, 2012). De manière surprenante ce mécanisme semble indépendant de l'effet de RhoB sur la migration. En effet, il est observé aussi bien dans des cellules de prostate dans lesquelles la déplétion de RhoB par ARNi diminue la migration que dans des cellules pulmonaires dans lesquelles la perte d'expression de RhoB augmente au contraire la migration (Bousquet *et al.*, in preparation; Vega *et al.*, 2012).

vi - Réponse au stress:

Comme nous l'avons vu précédemment (partie III-B-2), l'expression de RhoB est induite en réponse aux stress, RhoB joue alors un rôle clé dans la réponse à ce stress et en particulier dans le contrôle de la balance apoptose/survie (voir partie III-C).

vii - Embryogenèse

Enfin, RhoB joue un rôle crucial dans la biologie des mélanocytes puisqu'au cours de l'embryogenèse, RhoB est strictement nécessaire à la migration et donc la différenciation des cellules de la crête neurale (Henderson *et al.*, 2000; Liu and Jessell, 1998).

4 - Oncogenèse:

Initialement les travaux de Prendergast suggéraient un rôle pro-tumoral de RhoB (Lebowitz, 1997). Longtemps controversé, il est admis à ce jour que *RHOB* est plutôt un gène suppresseur de tumeurs et /ou de métastases (Huang and Prendergast, 2006).

a - Expression dans les tumeurs

Initialement montrée sur des lignées cellulaires par microarray (Wang *et al.*, 2003), puis confirmée sur des biopsies, l'expression de RhoB est très fréquemment diminuée dans les tumeurs dans de nombreux cancers tels que les cancers du poumon (Mazieres *et al.*, 2004; Sato *et al.*, 2007), gastriques (Zhou *et al.*, 2011), de la tête et du cou ((Adnane *et al.*, 2002), de la vessie (Kamai *et al.*, 2003; Volanis *et al.*, 2011), du sein hormonaux indépendants (Médale-Giamarchi *et al.*, 2013) et les glioblastomes (Forget *et al.*, 2002).

Les mécanismes conduisant à cette perte d'expression sont encore mal caractérisés. Ils pourraient notamment faire intervenir les mécanismes décrits plus haut (partie III-B-2-a-vi et III-B-2-c) impliquant HDAC1 et les miARNs ciblant RhoB. De plus, des délétions du chromosome 2 affectant *RHOB* ont également été décrites dans les cancers pulmonaires (Sato *et al.*, 2007). Dans cette étude,

près de 30% des biopsies analysées présentent une délétion homozygote et 20% une perte hétérozygote.

b – Mécanismes conduisant à l'oncogenèse

Par la suite, de nombreux travaux ont visé à déterminer la fonction de cette perte d'expression dans l'oncogenèse. Les différentes caractéristiques tumorales dans lesquelles RhoB intervient sont développées ci-dessous.

i - Prolifération cellulaire

Tout d'abord, l'effet de RhoB sur la prolifération semble variable en fonction des lignées cellulaires.

La surexpression de RhoB induit une diminution de la prolifération des fibroblastes murins NIH-3T3 transformées par Ras (Jiang *et al.*, 2004a), les cellules de cancers humains pulmonaires A549 (Jiang *et al.*, 2004a; Mazieres *et al.*, 2004), gastriques (Zhou *et al.*, 2011), ovariens (Couderc *et al.*, 2008) et thyroïdiens (Marlow *et al.*, 2010). De la même manière, Liu *et al.* observent une prolifération plus importante des MEFs (Fibroblastes embryonnaires murins) *RHOB*^{-/-} transformés par Ras et E1A (Liu *et al.*, 2001b).

Cet effet pourrait dépendre de la présence de Ras puisqu'il n'est pas retrouvé dans les cellules NIH-3T3 non transformées ni dans les cellules épithéliales bronchiques BEAS-2B (Bousquet *et al.*, 2009; Mazières *et al.*, 2005). De plus, il serait induit pour la forme sauvage et géranyl-géranylée mais la forme farnésylée stimulerait au contraire la prolifération (Mazières *et al.*, 2005).

ii - Transformation

L'activité de RhoB sur la transformation a été évaluée selon les articles de 2 manières soit par la formation de colonies après un très faible ensemencement soit par la capacité à proliférer et à former des colonies en absence d'ancrage lorsque les cellules sont ensemencées sur de l'agar mou.

Le premier modèle a permis de montrer que la ré-expression de RhoB diminue les capacités à former de colonies des cellules tumorales A549 ainsi que celles des cellules NIH-3T3 transformées par Ras, EGFR, ERBB2 ou SRC (Jiang *et al.*, 2004a; Mazieres *et al.*, 2004).

Concernant le rôle respectif des formes farnésylées et géranyl-géranylées, les publications sont contradictoires. En effet, Chen *et al.* avaient initialement montré sur un panel de lignées cellulaires tumorales humaines (Panc-1, Hela, C-33A, Saos-2) que l'expression de RhoB sauvage, farnésylée ou géranylgéranylée prévenait de manière équivalente la transformation à l'aide des 2 modèles présentés

ci-dessus (Chen *et al.*, 2000). Au contraire, il a été montré au laboratoire que la forme farnésylée augmentait le nombre de clones dans les modèles d'agar mou (Mazières *et al.*, 2005).

iv – Adhésion / Migration / Invasion

RhoB influence les capacités d'adhésion, de migration et d'invasion cellulaire et participe à ce titre à la progression tumorale. Cela a en particulier été montré au laboratoire dans un modèle de cellules pulmonaires en culture et chez l'animal (Bousquet *et al.*, 2009).

v - Instabilité génomique

Au sein des tumeurs, la perte de RhoB pourrait participer à l'instabilité génomique. En effet, il a été montré au laboratoire que RhoB participait *in cellulo* à la réponse et à la réparation des dommages à l'ADN (Mamouni *et al.*, submitted). Ces résultats semblent pertinents *in vivo* puisque les tumeurs cutanées développées par des souris *RHOB*^{-/-} présentent un marquage plus important pour γ -H₂AX et 53BP1 signalant les cassures de l'ADN (Meyer *et al.*, 2013).

vi - Modèles murins

Les modèles de xénogreffes de lignées cancéreuses humaines, notamment pulmonaires, ovariennes et pancréatiques, chez la souris Nude ont clairement montré que la surexpression de RhoB inhibait la croissance tumorale (Beliveau *et al.*, 2010; Couderc *et al.*, 2008; Mazieres *et al.*, 2004).

De plus, la surexpression de RhoB réduit les métastases pulmonaires chez la souris Nude après injection des cellules tumorales dans la veine caudale alors qu'au contraire la déplétion de RhoB favorise ce processus (Bousquet *et al.*, 2009; Jiang *et al.*, 2004b).

Enfin, des modèles transgéniques ont montré que les souris transgéniques *RHOB*^{-/-} sont plus sensibles aux carcinogènes. L'association tumorigénique, DMBA et TPA, induit en effet un plus grand nombre de tumeurs chez ces dernières (Liu *et al.*, 2001b). De la même manière, en réponse à une exposition chronique aux UV, les souris *RHOB*^{-/-} développent des tumeurs plus agressives (Meyer *et al.*, 2013). Elles développent également un plus grand nombre de tumeurs pulmonaires suite à l'exposition à l'uréthane, un carcinogène pulmonaire (Bousquet, données non publiées).

vii – Réponse thérapeutique

Enfin, la protéine RhoB est impliquée dans la réponse aux stress dont les génotoxiques largement utilisés dans le traitement des cancers. A ce titre, elle participe à la réponse à ces thérapeutiques mais également à d'autres stratégies thérapeutiques tels que les FTI et les thérapies ciblées.

Role	Stress	Cellules	Modulation de RhoB par le stress	Stratégie de modulation de RhoB	Mécanisme	Référence
Variable selon le stress	Apoptose : alkylants (MMS, Cisplatine, Tréo, MNNG, Mafosfomaide), H2O2, IR Survie : Doxorubicin, Survie ou sens effet UV	NIH-3T3	Protéine induite par les alkylants	Surexpression stable		Fritz, 2000
Apoptose	FTI	MEF / H-Ras/E1A	Induction RhoB-GG	+/- vs +/-	FTI induisent l'apoptose en présence de Ras et de RhoB	Liu, 2000
Apoptose	5-FU	NIH-3T3 / H-Ras A549	ND	Surexpression transitoire		Jiang, 2004
Apoptose	5-FU	NIH-3T3 / Ras			RhoB ^{wt} et RhoB-GG mais pas RhoB-F	Mazières, 2005
Variable selon les cellules	Cisplatine	Survie : Hep-2 Sans effet : HeLa, MeWo, MCF-7, SW480, RT-112		siRNA	Diminution de l'accumulation cellulaire de Cisplatine	Cimbora-Zovko, 2010
Survie	UV	HaCat Souris	Augmentation activité, protéine, ARNm	siRNA -/- vs +/-	pEGFR => RhoB => pEGFR => pAkt1 => pGSK3β => Bcl-2	Canguilhem 2005 Glorian, 2011 Meyer 2013
Survie	Radiations ionisantes	NIH-3T3 HeLa U87		Surexpression stable/inductible de RhoB ^{N19} ou V14	24kDa FGF => RhoB-F-GTP/DNA-PK => Survie	Ader, 2002 Ader, 2002 Ader, 2003 Delmas, 2002
		NIH-3T3		Surexpression stable RhoB ^{V14} et RhoB-F		Milia J, 2005
		U87	RhoB-GTP induit	siRNA	Integrine => ILK => RhoB-GTP	Monferran, 2008
Apoptose	Doxorubicine, Taxol Radiations ionisantes	MEF / Ras		+/- vs +/-	NB: pas de diff avec stauro et Na/Azide	Liu, 2001
Survie	Toxine de <i>Clostridium sordellii</i>	MEF / Ras		+/- vs +/-		Huelsenbeck, 2012
Apoptose	UV	Jurkat		siRNA	P38 => C-Jun => RhoB => ?	Ahn, 2011
Apoptose	Radiations ionisantes	lymphocytes			JNK => (C-Jun) => RhoB	Kim, 2010
Apoptose	LBA2 (?)	HCT-116			JNK => HAT/HDAC1 => RhoB	Kim, 2010,
Apoptose	NSC12618	NUGC-3			JNK => C-Jun => RhoB	Kim, 2011
Survie	chaleur	A549		p38	NF-κB	Li, 2011
Apoptose	basal	HeLa		Surexpression transitoire et siRNA	RhoB => TNFAIP1 => JNK	Kim, 2009
Variable selon les drogues	Apoptose : FTI, Romidepsine Sans effet : GGTI, Survie : Lovastatine, Staurosporine	Lignées ATC		siRNA		Marlow, 2010
Apoptose	Agoniste de PPARγ Inhibiteur HDAC			siRNA	PPARγ/HDACi => RhoB => p21	Marlow, 2009
Apoptose	Radiations ionisantes	MCF-7		shRhoB	shRhoB augmentent la survie Ect2/Net-1 active RhoB => JNK=> Bim => apoptose	Srougi, 2011
Apoptose	basal	Lignées gastriques		Surexpression stable		Zhou, 2011
Survie	basal	Cellules endothéliale		siRNA, RhoBN19	RhoB => AKT	Adini, 2003

Tableau 8 : RhoB exerce un rôle contradictoire sur la balance apoptose/survie, revue de la littérature.

C – RhoB, acteur majeur de la réponse aux thérapies anti-cancéreuses

1 - Implication de RhoB dans le contrôle de la balance apoptose / survie

De nombreux articles ont montré que RhoB régule la balance apoptose/survie de manière constitutive et en réponse aux stress. Ce rôle bien que souvent drastique, est extrêmement ambigu. En effet, selon les stress, le type cellulaire et la stratégie de modulation de RhoB, ce dernier peut jouer un rôle pro-apoptotique ou au contraire anti-apoptotique. Les données décrites dans la littérature sont résumées dans le tableau 8 et ne seront cités ici que quelques exemples mettant en lumière ce rôle paradoxal.

Au sein des mêmes cellules, les articles de Fritz *et al.* et de Marlow *et al.* montrent clairement que RhoB peut jouer un rôle pro ou au contraire anti-apoptotique, en fonction du stress appliqué aux cellules (Fritz and Kaina, 2000; Marlow *et al.*, 2010). Par exemple, dans l'article de Fritz alors que RhoB joue un rôle pro-apoptotique en réponse aux agents alkylants tels que le MMS et le Mafosfamide, il devient pro-survie en présence de Doxorubine.

En réponse aux UV, alors que plusieurs articles du laboratoire montrent que RhoB favorise la survie (Canguilhem *et al.*, 2005; Glorian *et al.*, 2011; Meyer *et al.*, 2013), les articles de Fritz & Kaina et d'Ahn *et al.* montrent que RhoB induit au contraire l'apoptose. Cependant de manière surprenante dans l'article de Fritz & Kaina, RhoB augmente le nombre de cellules en subG1 sans modifier la prolifération) (Ahn *et al.*, 2011; Fritz and Kaina, 2000).

De même, l'implication de RhoB dans la réponse aux radiations ionisantes est extrêmement controversée. Quatre articles émanant de quatre équipes différentes montrent que RhoB jouerait un rôle pro-apoptotique. Les modèles utilisés comprennent des MEFs *RHOB*^{-/-}, des NIH-3T3 surexprimant RhoB, des lymphocytes et des MCF-7 déplétées pour RhoB respectivement à l'aide de ARNi et de shARN (Fritz and Kaina, 2000; Kim *et al.*, 2010a; Liu *et al.*, 2001a; Srougi and Burrige, 2011).

Au contraire, plusieurs articles de l'équipe des Drs Toulas et Cohen-Jonathan montrent que RhoB, en particulier les mutants activés ou farnésylés, serait impliqué dans la radio-résistance (Ader *et al.*, 2002a, 2003; Milia *et al.*, 2005). Ces articles utilisent de clones NIH-3T3 surexprimant la forme sauvage ou les différents mutants RhoB-WT/RhoB-F/RhoB-GG ou RhoB^{N19}/RhoB^{V14}. Si une partie de ces différences peuvent être mises sur le compte des modèles différents utilisés, en revanche les articles de Milia *et al.* et Fritz & Kaina utilisant le même modèle, NIH-3T3 surexprimant de manière stable RhoB^{WT}, montre des résultats contradictoires (Fritz and Kaina, 2000; Milia *et al.*, 2005).

2 - Voie de signalisation contrôlant la balance apoptose/survie en aval de RhoB

Si le rôle de RhoB dans la balance apoptose/survie reste encore mal compris, les mécanismes impliqués le sont tout autant. Les quatre voies de signalisation cellulaire décrites sont présentées ci-dessous.

a - La voie Akt

Plusieurs articles ont montré que l'activité d'AKT, en particulier d'AKT1, était régulée par RhoB. Cependant, le sens de cette régulation est variable selon les articles. D'une part, les travaux de Mazières *et al.*, Bousquet *et al.*, Liu *et al.*, Ng *et al.*, Chen *et al.* et Alfano *et al.* montrent que RhoB^{WT}, et dans certains articles RhoB-GG mais pas RhoB-F, inhibent l'activation d'AKT et en particulier celle d'AKT1 (Alfano *et al.*, 2012; Bousquet *et al.*, 2009; Chen *et al.*, 2000, 2000; Liu and Prendergast, 2000; Mazières *et al.*, 2005; Ng *et al.*, 2012). D'autre part, les travaux de Alfano *et al.*, Skuli *et al.*, Canguilhem *et al.* et Adani *et al.* montrent que RhoB, en particulier activé, induit au contraire l'activation d'AKT (Adini, 2003; Alfano *et al.*, 2012; Canguilhem *et al.*, 2005; Meyer *et al.*, 2013; Skuli *et al.*, 2006). En outre, les travaux d'Adini *et al.* montrent que RhoB interviendrait dans la localisation nucléaire d'AKT.

Ainsi, selon le contexte cellulaire et le stress, la présence de RhoB conduirait à l'activation ou au contraire à l'inhibition de la voie AKT. Ce paradoxe est parfaitement illustré par l'article de Kazerounian *et al.*. Alors que dans des cellules cancéreuses mammaires, la perte de RhoB augmente l'activation d'AKT, dans des cellules endothéliales, la perte de RhoB est au contraire associée à une perte d'activation d'AKT (Kazerounian *et al.*, 2012). Ce rôle paradoxal sur l'activation d'AKT pourrait au moins en partie expliquer le rôle ambigu de RhoB dans la balance apoptose/survie.

Dans tous les cas, les mécanismes par lesquels RhoB régule l'activité d'AKT restent à ce jour non élucidés, quelques hypothèses sont présentées ici:

- PRK1/PKN :

A la différence de ses homologues, RhoB est capable d'interagir avec les 2 sérine-thréonine kinases appartenant à la famille PKC, PRK1 (PKN) et PRK2. Cette liaison pourrait jouer un rôle clé dans l'activation d'AKT en présence de RhoB. En effet, la liaison RhoB/PRK1 permet le recrutement de PDK1 aux endosomes (Flynn *et al.*, 2000; Gampel *et al.*, 1999; Mellor *et al.*, 1998). Or, PDK1 est nécessaire à l'activation d'AKT par les PI3K. RhoB via le recrutement de PDK1 à la membrane pourrait donc favoriser l'activation d'AKT.

- PP2A :

La Protéine Phosphatase 2 (PP2A) est une sérine/thréonine phosphatase ubiquitaire active sur un très grand nombre de substrats tels que les protéines Raf, MEK, AKT, H2AX, ATM, DNA-PK, Chk-2... PP2A fonctionne sous forme d'un trimère incluant une sous-unité structurale A (PPP2R1A ou B), une sous-unité régulatrice B (12 sous-unités décrites) et enfin une sous-unité catalytique C (PPP2CA ou PPP2CB)(Westermarck and Hahn, 2008).

Lors d'une étude protéomique, RhoB a été co-immunoprécipitée avec la sous-unité catalytique de PP2A (Lee *et al.*, 2007). Depuis il a été montré au laboratoire que la déplétion de RhoB par siARN diminuait l'activité catalytique de PP2A (Bousquet *et al.*, in preparation; Mamouni *et al.*, submitted). Ces travaux suggèrent que la présence de RhoB s'accompagnerait d'une augmentation de l'activité de PP2A qui pourrait inhiber AKT.

Ces 2 hypothèses soutiennent le rôle paradoxal de RhoB sur l'activité d'AKT. Alors que l'interaction de RhoB avec PRK1 favorise l'activation d'AKT, celle de RhoB avec PP2A conduit au contraire à une inhibition d'AKT. Dans un tel contexte, ces hypothèses restent à prouver aussi bien au niveau biochimique que dans le contexte cellulaire de réponse à un stress. Les facteurs influençant la balance entre ces 2 voies antagonistes sont également à déterminer.

b – La voie NF-κB

RhoB régulerait également la balance apoptose/survie via la régulation de l'activité transcriptionnelle de NF-κB (Nuclear Factor-kappa B). Son rôle est ici aussi complexe.

Le facteur de transcription NF-κB est largement connu pour son rôle anti-apoptotique en réponse aux stress. En condition basale, il est séquestré dans le cytoplasme par les inhibiteurs IκB. En réponse au stress, NF-κB est libéré des complexes inhibiteurs, transloque dans le noyau et active la transcription de nombreuses cytokines et de facteurs pro-survie tels que les membres de la famille Bcl-2.

Tout d'abord, les travaux de Fritz & Kaina montrent que dans des cellules NIH-3T3, la surexpression de RhoB inhibe l'activité transcriptionnelle de NF-κB et favorise alors l'apoptose en réponse aux agents alkylants (Fritz, 2001). En accord avec ce travail, l'article de Chen *et al.* montre dans des cellules de cancer ovarien HO-8910 que RhoB inhibe l'activité transcriptionnelle dépendante de NF-κB en réponse aux glucocorticoïdes. Une inhibition de la prolifération est également observée (Chen *et al.*, 2006). Les travaux de Mazieres *et al.* montrent enfin dans des cellules NIH-3T3 que seule la forme géranyl-géranylée de RhoB est impliquée dans ce mécanisme (Mazières *et al.*, 2005).

Cependant, les travaux de Li *et al.* montrent au contraire que RhoB augmente l'activité transcriptionnelle de NF- κ B favorisant la survie des cellules en réponse à la chaleur dans A549 (Li *et al.*, 2011).

Finalement, l'article de Rodriguez *et al.* montre que la forme activée, farnésylée et palmitoylée de RhoB augmente l'activité transcriptionnelle NF- κ B par un mécanisme dépendant de ROCK-I. Cet article explique au moins en partie les données contradictoires présentées précédemment. En effet, dans cet article l'effet de la surexpression de RhoB sur l'activité transcriptionnelle de NF- κ B est variable selon les cellules : alors qu'elle augmente dans les cellules 293T, HeLa, COS-7 et T47D, elle diminue dans les cellules NIH-3T3 en accord avec les données de Fritz *et al.*. Par ailleurs, la forme géranyl-géranylée a très peu d'effet comparée à la forme farnésylée en accord avec l'article de Mazières *et al.*.

L'hypothèse la plus probable est que selon le type cellulaire et les conditions, le rapport entre les formes farnésylées ou géranyl-géranylées de RhoB pourrait varier et conduire à une inhibition de l'activité transcriptionnelle de NF- κ B quand la forme géranyl-géranylée est majoritaire ou au contraire une activation quand c'est la forme farnésylée. Cette hypothèse est en accord avec l'activité plutôt pro-survie de la forme farnésylée et pro-apoptotique de la forme géranyl-géranylée et pourrait finalement expliquer l'activité également ambiguë de RhoB sur la survie.

c - La voie JNK

L'activation de JNK en aval de RhoB au cours de l'apoptose induite par ce dernier a été montrée par 2 articles. D'une part, l'article de Srougi *et al.* montre qu'en réponse à l'irradiation de cellules MCF-7, en présence de RhoB, JNK est activée et les cellules entrent alors en apoptose. Cette dernière pouvant être prévenue par un shARN dirigé contre RhoB (Srougi and Burridge, 2011). D'autre part, un article de Kim *et al.* montre que l'apoptose induite par la surexpression de RhoB dans des cellules HeLa est associée à une activation de JNK et qu'un inhibiteur de JNK prévient cette apoptose (Kim *et al.*, 2009a).

d - La Cyclin B₁

Dans les MEF *RHOB*^{+/-}, le traitement par un FTI induit l'apoptose alors qu'il n'a pas d'effet dans les MEF *RHOB*^{-/-} (Tableau 8). Les travaux de Kamasani *et al.* ont mis en évidence à l'aide d'un microarray une différence d'expression de la cycline B₁. Alors que dans les MEF *RHOB*^{+/-}, les FTIs réprime l'expression de la cycline B₁, cette dernière est maintenue dans les MEF *RHOB*^{-/-} (Kamasani *et al.*, 2003, 2004). Selon cet article, les FTIs induiraient l'apoptose via l'accumulation de la forme géranyl-géranylée de RhoB et la perte d'expression de la cycline B₁ subséquente.

3 - Réponse aux thérapies ciblées

Même si son rôle dans la balance apoptose/survie est ambigu et encore mal compris, il est clair que RhoB peut influencer la réponse aux cytotoxiques couramment utilisés en cancérologie tels que les radiations ionisantes, 5-FU, Taxol ou les agents alkylants. Cependant, RhoB pourrait également intervenir dans la réponse aux thérapies ciblées visant des oncogènes. En effet, l'expression de RhoB est réprimée par plusieurs oncogènes tels que Ras, EGFR ou ERBB3 (partie III-B-2-a-iii). L'inhibition de ces derniers pourrait donc en retour moduler l'expression de RhoB. L'existence d'une telle modulation mais également son rôle dans la réponse thérapeutique restent à déterminer. A ce jour les données sur ce sujet sont en effet extrêmement fragmentaires.

Les seules données disponibles dans la littérature montrent que dans des lignées de cancers ovariens, la combinaison d'Ixabepilone, un analogue de l'Epothilone stabilisant les microtubules et du Sunitinib, un inhibiteur multi-kinase ciblant entre autres le PDGR, le VEGFR et KIT, a un effet synergique et induit l'expression de RhoB. Cette dernière joue un rôle essentiel dans la réponse puisque son inhibition prévient complètement l'apoptose induite par cette combinaison (Vishnu *et al.*, 2012).

De plus, il a été montré au laboratoire que l'expression RhoB influence la sensibilité de cellules de cancers pulmonaires à un inhibiteur de l'EGFR, l'Erlotinib. En effet, les cellules exprimant fortement RhoB sont plus résistantes. La surexpression de RhoB dans des lignées sensibles, ayant une faible expression basale de RhoB, diminue également leur sensibilité. Cet effet serait dépendant de AKT : alors qu'en l'absence de RhoB, l'Erlotinib induit une perte de l'activation d'AKT, en présence de RhoB cette dernière est maintenue (Marty *et al.*, en préparation).

Dans un tel contexte, ce travail doctoral vise à établir l'implication de RhoB dans la réponse aux thérapies ciblées actuellement utilisées dans les mélanomes à savoir les inhibiteurs de B-Raf et de MEK.

Résultats

Introduction

Au cours des 20 dernières années, le développement des thérapies ciblées a permis une amélioration substantielle de la prise en charge et de la guérison des cancers. La compréhension des mécanismes de la carcinogenèse a permis de mettre en lumière le rôle clé des altérations moléculaires conduisant à l'activation d'oncogènes tels que Ras, *EGFR*, *KIT*, *HER2* dans le développement, la prolifération et la survie des cellules tumorales. Ceci a conduit au développement de stratégies thérapeutiques visant à inhiber ces oncogènes, à l'aide par exemple de petites molécules chimiques ou d'anticorps qui ont démontré leur efficacité dans certains cancers tels que les cancers mammaires, bronchiques ou les leucémies myéloïdes chroniques.

En revanche, les mélanomes métastatiques sont restés pendant plusieurs décennies, face un vide thérapeutique : seules les cytotoxiques, Dacarbazine et Fotémustine, étaient autorisés alors même qu'ils ne conduisaient qu'à une réponse chez 5 à 20 % des patients. Au cours des 3 dernières années, la prise en charge de cette pathologie a été révolutionnée ; pour la première fois en 30 ans pas moins de 4 traitements (Vemurafenib, Dabrafenib, Trametinib, Ipilimumab) ont été autorisés dans les mélanomes métastatiques.

Le développement du Vemurafenib, du Dabrafenib et du Trametinib a fait suite à la découverte en 2002 de la mutation *BRAF*^{V600E} dans une forte proportion de mélanomes (Davies *et al.*, 2002). Le Vemurafenib est le premier de ces inhibiteurs à avoir été évalué chez l'Homme, il a démontré une activité sans précédent dans cette pathologie avec près de 80% de patients répondeurs dont une régression complète pour certains d'entre eux (Chapman *et al.*, 2011). Cependant malgré ces réponses, l'amélioration de la survie globale reste décevante, car des résistances apparaissent rapidement après quelques semaines à quelques mois de traitement. S'il a été montré que ces résistances pouvaient être liées à la réactivation de la voie MAPK, elles restent encore mal comprises.

Les RhoGTPases sont des interrupteurs moléculaires contrôlant de nombreux processus cellulaires impliqués dans la carcinogenèse et dont le rôle a été caractérisé dans de nombreux cancers. En 2009, à l'initiation de cette thèse, peu de choses étaient connues sur leur implication dans la mélanomagenèse. Or, les RhoGTPases, via leurs multiples fonctions cellulaires, pourraient participer à la progression tumorale, à la radio- et chimio-résistance ainsi qu'à la réponse aux thérapies ciblées. Cette hypothèse a été récemment validée par une publication montrant l'implication de RhoJ dans la résistance à la Dacarbazine (Ho *et al.*, 2012).

Dans un tel contexte, l'objectif premier de ce travail a été de déterminer si les RhoGTPases étaient impliquées dans la réponse ou la résistance au Vemurafenib. Afin de répondre à cette question, nous avons dans un premier temps analysé l'expression de 20 RhoGTPases en réponse au Vemurafenib dans 2 lignées cellulaires de mélanome porteuses d'une mutation activatrice de *BRAF*. Cette étude a montré que l'expression des ARNm de RhoB, Rac1b, RhoJ et RhoQ était significativement modifiée dans les 2 lignées cellulaires testées. Le rôle connu de RhoB dans la progression tumorale et surtout dans la balance apoptose/survie, nous a conduits à focaliser la suite de nos travaux sur ce dernier.

Nous nous sommes dès lors efforcés de caractériser cette induction, de définir les mécanismes moléculaires mis en jeu et enfin d'en établir sa fonction.

Nous avons ainsi montré que RhoB est induit suite à l'activation de c-Jun et diminue la sensibilité au Vemurafenib via l'activation d'AKT. Dans l'optique d'augmenter l'efficacité du Vemurafenib en prévenant l'activation d'une telle voie de signalisation, nous avons proposé de combiner au Vemurafenib un inhibiteur d'AKT. Cette combinaison s'est révélée fortement synergique *in cellulo* et est en cours de validation dans des modèles de xenogreffes chez la souris Nude.

Article en préparation

c-Jun/RhoB/AKT signaling pathway triggers Vemurafenib resistance in melanoma cells.

Short Title: RhoB triggers melanoma resistance

Keywords: Melanoma, Vemurafenib, MAPK, Resistance, RhoB, AKT

Audrey Delmas^{1,2,3}, Julia, Chérier^{1,2,3}, Magdalena Pohorecka^{1,2,3}, Claire Médale-Giamarchi^{1,2,3}, Anne Casanova³, Anne-Françoise Tilkin-Mariame^{1,2,3}, Ariel Savina⁴, Anne Pradines^{1,2,3} and Gilles Favre^{1,2,3}

¹Inserm, UMR 1037-CRCT, Toulouse, France

²Université Paul Sabatier, Toulouse, France

³Department of Biopathology, Institut Claudius Regaud, Toulouse, France

⁴Roche, Boulogne-Billancourt, France

Correspondance: Gilles Favre, INSERM UMR 1037, Département de Biologie Clinique, Institut Claudius Régaud, 20-24 Rue du Pont Saint Pierre, 31052 Toulouse Cedex, France. E-mail: favre.gilles@claudiusregaud.fr

ABSTRACT

Melanoma treatment recently met a breakthrough with the approval of Vemurafenib (PLX4032) which demonstrated an unprecedented 80% response rate in clinical trials among patients with B-Raf^{V600E} melanomas. However, efficiency of the treatment is limited by rapid relapse. The Ras/Raf/MEK/ERK (MAPK) pathway regulates the expression of many genes which can mediate therapeutic response but also resistance, such as RhoGTPases. RhoGTPases are small GTPases acting as molecular switches involved in many cellular processes highly relevant in oncogenesis and therapeutic response like proliferation, apoptosis, adhesion, migration, invasion etc... In addition, these proteins are tightly regulated by many signaling pathways. As a consequence, we postulated that RhoGTPases could be modulated through MAPK inhibition by PLX4032 and participate through their cellular effects to therapeutic efficiency and/or resistance.

To test our hypothesis, we analyzed the mRNA expression of the 18 RhoGTPases members in two *BRAF* mutated melanoma cell lines, WM266-4 and A375, in response to inhibition of the MAPK pathway by PLX4032. We observed that the RhoB mRNA was increased by PLX4032 treatment. We first demonstrated that this effect was specific to MAPK pathway inhibition and was found in a large panel of *BRAF* mutated melanoma cell lines. In addition, MEK inhibitors also upregulated RhoB expression in *BRAF* wild-type melanoma cells harboring *NRAS*, *KRAS* or *KIT* mutations, suggesting that inhibiting MAPK pathway is critical for RhoB expression modulation. It is also noteworthy that this modulation is strictly cell type dependent, as it was not observed in *BRAF* mutated non-melanoma cells as colon carcinoma cells.

Then, we demonstrated that this RhoB expression upregulation was linked to a late transcriptional activation of the RhoB promoter depending on its iCCAAT box and on PLX4032-induced c-Jun.

To investigate the function of RhoB in cellular responses to B-Raf and MEK inhibitors, its induction was suppressed using RNA interference. This resulted in a higher sensitivity to PLX4032 and AZD6244. Also, the blockade of RhoB induction led to a significant increase of caspase-dependent apoptosis as shown by the increase of the subG1 population, TUNEL positive cells, caspase 3 and PARP cleavage. So, we concluded that PLX4032-induced RhoB triggered resistance to PLX4032-induced apoptosis.

Finally, we demonstrated that RhoB modulated PLX4032 response through AKT activity regulation. Indeed PLX4032-induced RhoB maintained a high AKT activity level leading to cell survival. Moreover combination of B-Raf and AKT inhibitor was demonstrated to be strongly synergistic.

Our findings show that the c-Jun/RhoB/AKT signaling axis is involved in PLX4032 response and we propose synthetic lethal association of MAPK and AKT inhibitors in order to increase apoptotic response and therapeutic efficiency.

INTRODUCTION

The hypothesis of melanoma addiction to the Raf/MEK/ERK pathway, namely MAPK pathway, has emerged with the discovery of a high-rate of activating B-Raf^{V600E} mutation in melanoma cell lines and primary tumors in 2002 (Davies *et al.*, 2002). Evidence of melanoma dependency on the MAPK pathway have then accumulated and its inhibition has emerged as a therapeutic target of particular interest (Smalley, 2003; Tuveson *et al.*, 2003). B-Raf and MEK revealed to be druggable targets and since then small inhibitors have been developed (Baines *et al.*, 2000; Smalley *et al.*, 2007; Tsai *et al.*, 2008). The first-in-class specific B-Raf inhibitor tested on human, Vemurafenib (PLX4032), led to unprecedented response for 80% patients in a phase III clinical trial (Chapman *et al.*, 2011; Sosman *et al.*, 2012). However, improvement of disease-free survival and global survival was disappointingly weak. In fact, during the first weeks of treatment, tumors generally regressed drastically, but after a few months patients became resistant to PLX4032 and tumor progression abolished all hope of substantial survival improvement (Finn *et al.*, 2012).

Intensive investigations are currently conducted to understand these resistances and several mechanisms have been described principally on the basis of *in vitro* generation of resistant cell lines. Most of them reactivate the MAPK pathway by acquisition of mutation of Ras (Nazarian *et al.*, 2010), MEK (Wagle *et al.*, 2011), over-expression of COT (Johannessen *et al.*, 2010) or C-Raf or upregulation of growth factor receptor signaling like FGFR3, EGFR, PDGFR β (Lito *et al.*, 2012a; Nazarian *et al.*, 2010; Yadav *et al.*, 2012). Other research focused on PLX4032-induced cell death showed that Bcl-2 family members as Bcl-xl, Noxa or Bim could also be involved in resistance (Shao and Aplin, 2012).

The MAPK pathway controls the expression of a wide range of genes. Some of them mediate the therapeutic efficiency as RhoE/Rnd3 which impede melanoma cell invasion in response to PLX4032 (Klein and Higgins, 2011). We hypothesis that MAPK pathway inhibition induces modulation of gene expression triggering adaptive cellular response leading to cell resistance. This hypothesis is supported by two examples: the transcription factor FOXD3 or the pro-apoptotic BH3-only protein which are induced or downregulated respectively following PLX4032 treatment and then prevent cell death

(Basile and Aplin, 2012; Basile *et al.*, 2011). Hence MAPK inhibition can regulate *per se* the expression of resistance factors.

RhoGTPases are regulated by many cell signaling pathways such as MAPK and control many cellular functions including survival/apoptosis balance that may impact cell response to MAPK inhibition. Inter-regulations between RhoGTPases and MAPK pathway have already been described (Fang *et al.*, 2012; Makrodouli *et al.*, 2011) and, several members of the RhoGTPase family have been linked to apoptosis inhibition to both chemotherapies and targeted therapies. For example, RhoJ mediates melanoma cell resistance to dacarbazine (Ho *et al.*, 2012a), Rac1 is involved in breast cancer cell response to Trastuzumab (Zhao *et al.*, 2011) and RhoE/Rnd3 enhances multidrug resistance in gastric cancer cells (Li *et al.*, 2009).

These previous results led us to investigate the role of RhoGTPases in melanoma cells resistance to PLX4032. With a RT-qPCR screening, we found out that RhoB expression is induced by PLX4032 *BRAF* mutant melanoma cells. RhoB is largely known to be modulated in response to anticancer therapy and to control tumor cell response to ionizing radiation and cytotoxic drugs (Fritz and Kaina, 2000; Jiang *et al.*, 2004a; Mazières *et al.*, 2005; Milia *et al.*, 2005). RhoB may also be involved in the response to targeted therapy as described by Vishnu and colleagues in ovarian cells (Vishnu *et al.*, 2012). In this article, we investigate the molecular mechanism of RhoB induction by PLX4032 and its role in the pharmacological response.

RESULTS

PLX4032 induces RhoB in mutant B-Raf melanoma cells.

In order to determine whether RhoGTPases are directly modulated by PLX4032, we first analyzed mRNA expression of the RhoGTPase family members (except, RhoBTB1 and RhoBTB2), after 48 hours of treatment on two metastatic melanoma cell lines, A375 and WM266-4 harboring B-Raf^{V600E} and B-Raf^{V600D} mutation, respectively. While RhoG and RhoH were not detected in both cell lines, and RhoV only in A375, the expression of several RhoGTPases was significantly modulated by PLX4032, such as Rac1b, RhoB, RhoJ and RhoQ (Figure 1A and B). Amongst these RhoGTPases, RhoB was the most strongly induced by a factor of 5.7 ± 1.2 in WM266-4 (Figure 1A) and 2.0 ± 0.3 in A375 (Figure 1B). This induction was found at the protein level in a same extent, 4.5 ± 0.5 for WM266-4 and 1.9 ± 0.2 for A375 in the two cells lines (Figure 1C). The increase of RhoB protein in response to PLX4032 treatment was also observed in six other melanoma cell lines representative of melanoma progression (RGP-VGP to metastatic) (Figure 1D). Interestingly, this induction was found in cell lines issued from different stages of the disease of a same patient, on the one hand WM115 (VGP), WM266-4 (skin metastasis) and WM239A (lymph node metastasis) and in the other hand in WM983A (VGP) and WM983B (lymph node metastasis) (Figure 1C and D).

Since RhoB has been described to be induced during apoptosis, this induction could be linked to PLX4032-induced apoptosis. However, inhibition of apoptosis by the caspase inhibitor Z-VAD-FMK did not interfere with RhoB induction by PLX4032 (Figure S1).

The induction of RhoB was dose- and time-dependent (Figure 1E and F). The induction of RhoB started at 0.1 μ M of PLX4032, and reached a plateau at 0.5 μ M consistently with pERK inhibition. Although the inhibition of ERK phosphorylation was observed 2 hours after PLX4032 addition, the induction of RhoB was delayed and started after 24 hours both at the protein level (Figure 1F) and at the mRNA level (Figure S2). In contrast, the expression of RhoB close homologs, RhoA and RhoC was unchanged (Figure 1F and S2). Interestingly removal of PLX4032 after 48 hours of treatment did not lead to a return of RhoB to its basal levels. After a first step of decrease 48 hours after drug removal, RhoB expression was maintained during at least 96 hours whereas ERK is reactivated (Figure 1G). The delay of the

induction and the persistence of this one sustained the hypothesis that RhoB induction could be linked to an adaptive mechanism of melanoma cells following PLX4032 treatment.

PLX4032 induced RhoB through MAPK inhibition

To assess that RhoB induction did not result from an off-target effect of PLX4032, B-Raf was inhibited with either RNA interference or a second B-Raf^{V600E} inhibitor, SB590885 which is chemically unrelated to PLX4032 (Figure 2A and B). In all cases, RhoB was still induced attesting that B-Raf inhibition increases RhoB expression.

While Raf kinases mainly trigger their effects through the MEK/ERK pathway, MEK-independent effects have also been described (Polzien *et al.*, 2009). To determine whether PLX4032-induced RhoB is dependent on MEK signaling, the effect of two MEK inhibitors was analyzed. As shown in Figure 2B, AZD6244 as well as AS703026 treatment led to a significant increase of RhoB expression comparable to those induced by B-Raf inhibitors, indicating that PLX4032 induces RhoB through a MEK-dependent mechanism (Figure 2B).

In melanomas, dysregulation of the MAPK pathway occurs frequently due to activating mutations in the *BRAF* gene — almost 50% of melanomas harbor mutations in *BRAF* — but also in *NRAS* (18%), *KIT* (9%), *HRAS* (2%) or *KRAS* (2%) genes (COSMIC database). We assessed whether RhoB could be modulated in wild type *BRAF* melanoma cells harboring mutations of *NRAS* (WM1346 and SK-MEL2), *KIT* (WM3211) or *KRAS* (WM1791C). As expected PLX4032 did not inhibit MAPK signaling in these four cell lines, as shown by the maintenance of ERK phosphorylation and had no effect on RhoB expression. In contrast, the MEK inhibitor, AZD6422, by inhibiting MAPK signaling and consequently ERK phosphorylation, also induced RhoB expression (Figure 2C).

RhoB induction appears as a common feature of MAPK inhibition in melanoma cells. In contrast, in B-Raf^{V600E} colon cancer cells, efficient inhibition of MAPK signaling with PLX4032 or AZD6422 did not potently affect RhoB expression even at a higher dose (5 μ M) than the one used for melanoma cells (Figure 2D). Consequently, RhoB modulation by MAPK signaling did not seem to be an universal mechanism but would be a special feature of melanoma cells.

RhoB is induced by transcriptional activation through PLX4032-induced c-Jun

Next we investigated the molecular mechanisms driving RhoB induction by PLX4032. RhoB mRNA stabilization has been previously reported in response to UV (Canguilhem, 2005; Westmark *et al.*, 2004). To decipher if the increase of RhoB mRNA (Figure S2) was linked to its stabilization, we measured mRNA half-life using a transcription inhibitor, Actinomycin D. No significant modification of RhoB mRNA half-life was observed (Figure 3A). Then, promoter activity was analyzed using a luciferase reporter gene assay system. As shown in Figure 3B, a 2 to 3-fold increase of the RhoB promoter activity was obtained following 24 h of PLX4032 treatment. Next, we were interested in identifying the transcription factor which mediates PLX4032 response of the RhoB promoter. Since the effect of PLX4032 on RhoB was not found in non-melanoma cells (Figure 2D), we first looked at the melanocyte lineage-specific factor, MITF. On the one hand its expression was not drastically modified by PLX4032 treatment and on the other hand its depletion by RNA interference did not affect RhoB expression (Figure S3A and B).

As PLX4032 modifies strongly cell shape (Figure S3C, (Klein and Higgins, 2011)) and RhoB promoter contains E-Boxes which are targets of EMT transcriptional modulators, the expression of these latter was analyzed. Snail was rapidly down-regulated following ERK phosphorylation inhibition by PLX4032. In contrast Slug and ZEB-1 expression decreased only 24 hours after treatment, simultaneously to RhoB induction (Figure S3D). But neither Slug nor ZEB1 depletion by RNA interference modified RhoB level (Figure S3E).

Next to address first the promoter region and then the transcriptional regulator involved in RhoB induction by PLX4032, we performed luciferase assays with plasmid constructions including various RhoB promoter lengths. PLX4032 increased the RhoB transcriptional activity of all constructions leading to the conclusion that the - 45 shorter construct, containing only the TATA boxes and inverted CCAAT box (iCCAAT), is sufficient for PLX4032 induction of RhoB (Figure 3C). To decipher if the iCCAAT sequence is necessary for RhoB induction, we mutated it and analyzed the resulting activity. As shown in Figure 3D mutations of the iCCAAT strongly impeded basal RhoB promoter activity and reduced the promoter response to PLX4032 indicating that this box is involved in induction of RhoB following PLX4032 treatment.

This iCCAAT has been described to mediate RhoB expression in response to stress in a c-Jun-dependent manner (Ahn *et al.*, 2011; Kim *et al.*, 2011, 2010a). To test the c-Jun involvement, the expression of total and phosphorylated c-Jun was analyzed after PLX4032 treatment. In fact, both forms of c-Jun were strongly increased by PLX4032 treatment (Figure 3E). A kinetic analysis showed a progressive induction of total and phosphorylated c-Jun during PLX4032 treatment, with a slight increase beginning after 2 h and a stronger increase after 24 h concomitant to RhoB induction (Figure 3F). As for RhoB, after 48 hours of treatment, removal of PLX4032 did not lead to a return to basal level of total and phosphorylated c-Jun expression which were maintained over at least 96 hours (Figure S4D).

Finally, to ascertain the involvement of c-Jun in RhoB induction, we prevent c-Jun induction by RNA interference. As shown in Figure 3G and S5B, c-Jun depletion reduced induction of RhoB expression by PLX4032.

JNK and p38 have been described in the literature to be responsible for c-Jun induction (Ahn *et al.*, 2011; Kim *et al.*, 2010b). However, after PLX4032 treatment, phosphorylated p38 and JNK are reduced (Figure S4A). In addition, a JNK inhibitor, SP600125, as well as p38 inhibitors, SB203580 and BIRB796, did not prevent PLX4032-induced c-Jun nor RhoB (Figure S4B and C).

Overall these data indicated that PLX4032 induced RhoB expression through c-Jun expression and phosphorylation by a mechanism JNK- and p38-independent.

Depletion of induced RhoB sensitizes melanoma cells to MAPK inhibitor through apoptosis induction

To determine the functional role of RhoB induction in the cell response to inhibition of the MAPK signaling, RhoB induction was prevented by RNA interference (Figure S5A).

Following RhoB downregulation, the IC₅₀ of PLX4032 was significantly reduced in melanoma cells harboring B-Raf mutations, A375 and WM266-4, while no effect was observed in the SK-MEL2 cells, harboring WT B-Raf insensitive to PLX4032 (Figure 4A, B and C and Table S1). In contrast when the MEK inhibitor AZD6422 was used, RhoB depletion sensitized A375, WM266-4 but also SK-MEL2 cells (Figure 4D, E and F and Table S1). RhoB siRNA also increased WM266-4 response to the combination of B-Raf and MEK inhibitors (Figure 4G).

In addition, depletion of c-Jun also sensitized WM266-4 cells to PLX4032 (Figure 4H and S5B, C), this effect was in part prevented by RhoB re-expression (Figure 4H and S5D).

In order to define how RhoB modified cell sensibility to PLX4032, we assayed apoptosis markers after co-depletion of MAPK and RhoB.

RhoB siRNA increased apoptotic features in response to PLX4032 in WM266-4 and A375 cells as shown by subG1 and TUNEL assays (Figure 5A, B and S6A, B). Moreover, that was associated with an increase of PARP and caspase 3 cleavage, showing that RhoB depletion increased apoptosis in response to PLX4032 (Figure 5C and S6C). Z-VAD-FMK, a pan caspase inhibitor prevented PLX4032-induced PARP and caspase 3 cleavage (Figure 5D) and also DNA fragmentation (Figure 5E) in the presence of RhoB siRNA indicating the involvement of caspases.

Here, we demonstrated that c-Jun/RhoB pathway induction by MAPK inhibitors could be involved in melanoma resistance to those inhibitors as co-inhibition of MAPK and c-Jun/RhoB pathway potentiated apoptosis induction.

RhoB modulates response to PLX4032 through AKT pathway.

Lastly, we examined the molecular mechanisms controlled by RhoB in response to PLX4032. It has been previously shown that RhoB modulates AKT pathway (Canguilhem, 2005; Kazerounian *et al.*, 2012; Meyer *et al.*, 2013; Skuli *et al.*, 2006) and that AKT is a crucial player in the apoptosis/survival balance. Thus we analyzed AKT phosphorylation following RhoB siRNA and PLX4032 treatment. As previously shown (Chen *et al.*, 2012), PLX4032 slightly induced phosphorylated/total AKT ratio (Figure 6A and B). More interestingly, RhoB siRNA completely prevented induction of AKT phosphorylation during PLX4032 treatment (Figure 6A and B). In parallel, AKT inhibition by G-594 or MK2206 amplified PLX4032 effect on cell viability and apoptosis as shown by PARP cleavage (Figure 6C and S7). In order to determine, if combination of PI3K/AKT and B-Raf inhibitors displayed additive or synergistic effect. Co-treatment was performed and combination index established. All three AKT/PI3K pathway inhibitors demonstrated for all tested doses a significant synergistic effect when combined with PLX4032 (Figure 6D).

So, RhoB inhibition could increase cell death in response to PLX4032 through downregulation of the survival AKT pathway. To ascertain this hypothesis, we rescued phosphorylated AKT by expressing the myristoylated and constitutively active AKT-myr protein. AKT-myr strongly induced phosphorylated AKT and completely prevented RhoB siRNA sensitization to PLX4032 (Figure 6E and S8 and Table S2).

In conclusion, we demonstrated that PLX4032 induced RhoB expression via c-Jun, which controls apoptotic response through AKT activity modulation.

DISCUSSION

In this study, we show that inhibition of mutated B-Raf in melanoma cells by chemicals or RNA interference activates the c-Jun/RhoB/AKT signaling axis, leading to cell survival and to impaired Vemurafenib cellular response. Moreover, the simultaneous inhibition of c-Jun, RhoB or AKT and mutated B-Raf induces a strong apoptotic response of melanoma cells, while each of the treatment *per se* has little or no effect on cell death. Our results clearly characterize a synthetic lethal interaction between B-Raf inhibitors and inhibition of the c-Jun/RhoB/AKT signaling pathway and lead to propose the combination Vemurafenib with AKT inhibitors to improve the treatment of B-Raf mutated melanomas and to limit acquired resistance.

The main mechanism of acquired resistance described to date is the molecular alterations leading to MAPK reactivation or the parallel activation of other signaling pathways such as PI3K/AKT pathway. Here we describe an adaptive mechanism by which MAPK inhibitor treated cells modify their signaling network, by activating the c-Jun/RhoB/AKT signaling axis, to counteract Vemurafenib-induced cell death. This pathway is not only a relevant target for increasing cell death and thus the efficacy of Vemurafenib therapy but could assist in controlling disease relapse by avoiding the occurrence of secondary mutations.

PLX4032 cellular response includes modification of gene expression resulting from the blockade of MEK/ERK signaling pathway. We show that the expression of 5 members of the Rho GTPase family is regulated in response to Vemurafenib. First we confirm the down regulation of Rnd3 expression (Klein *et al.*, 2008) and put on light the PLX4032-induced expression of RhoJ, RhoQ, RhoV and RhoU. While nothing is known on the role of RhoQ, RhoU and RhoV on melanomagenesis, RhoJ has been demonstrated to participate to chemoresistance through DNA repair control (Ho *et al.*, 2012b) and modulate metastasis potential in melanoma (Ho *et al.*, 2013). Of interest is the PLX4032-induced Rac1b downregulation suggesting that Rac1b and B-Raf cooperate in melanomagenesis as previously described in colorectal cancer (Matos *et al.*, 2008). Rho GTPases have been involved in melanoma cell plasticity in migration and invasion, while RhoA and Cdc42 appears to be important in amoeboid contractile forms of cell movement; Rac signaling is required for elongated-protrusive movement (Sanz-Moreno *et al.*,

2008). However we did not observed any modification of expression of these RhoGTPases after PLX4032 exposure suggesting that they could participate to cell response by the protein activation.

We focused on RhoB as we have previously reported its role in lung carcinogenesis (Bousquet *et al.*, 2009; Mazieres *et al.*, 2004) and as RhoB is involved cell stress response (Canguilhem, 2005; Kim *et al.*, 2011, 2010a; Li *et al.*, 2011). RhoB acts as a tumor suppressor against carcinogenesis mediated by receptor tyrosine kinases and their downstream effectors evidenced by the fact that in one hand EGFR, ErbB2, and Ras, induce RhoB downregulation and on the other hand that RhoB re-expression in cancer cells reverse the tumoral phenotype (Chen *et al.*, 2000; Couderc *et al.*, 2008; Jiang *et al.*, 2004a; Mazières *et al.*, 2005; Mazieres *et al.*, 2004). We recently demonstrated that RhoB is downregulated by K-Ras^{V12} in lung cancer cell lines and shown that AKT is critical to the RhoB loss-induced invasion (Bousquet *et al.*, 2009). Here we shown that mutated B-Raf and probably mutated N-Ras, since we show a MEK inhibitors-induced RhoB expression in N-Ras driven cells, should cause also a drastic decrease of RhoB expression (Fig 2C). By contrast to Jiang *et al.* (Jiang *et al.*, 2004b) that found that RhoB downregulation in cancer is due to AKT in non-melanoma cell lines, we clearly demonstrated that in melanoma cell lines Raf/MEK/ERK but not AKT pathway is responsible of the mutant Raf-induced RhoB downregulation (Figure 6C and S7). It is likely that the mechanism cells use to downregulate RhoB is related to cell type and/or cell context. To reinforce this hypothesis, we recently shown (unpublished data) that AKT activity control RhoB down regulation in EGFR mutant bearing lung cancer cell lines. Whatever the mechanism by which RhoB is downregulated, our results suggest that reduced RhoB expression is one of the critical events leading to oncogenesis in melanomas.

We observed a slight ERK phosphorylation rebound under PLX4032 as described by Rosen group (Lito *et al.*, 2012b) (Figure 1F) that may suggest that PLX4032-induced RhoB expression could be attributed to ERK reactivation as we have previously shown that RhoB expression is induced via EGFR/MEK/ERK pathway in keratinocytes (Canguilhem, 2005; Meyer *et al.*, 2013). However MEK inhibitor treatment induced RhoB expression demonstrating that Vemurafenib-induced RhoB expression could not be related to the ERK reactivation.

We show here that PLX4032-induced activation of RhoB expression is highly dependent on PLX4032-induced c-Jun expression showing that c-Jun is critical for RhoB expression. It has been demonstrated

that iCCAAT is critical for UVB induced-RhoB expression through displacing HDAC1 by a protein complex including ATF2 and NF-Y (Ahn *et al.*, 2011; Fritz, 1997). In this model c-Jun is associated to the ATF2/NF-Y complex to induce HDAC1 removal and to favor P300 binding that triggers RhoB expression. In stress conditions c-Jun was described to be phosphorylated following JNK and p38 activation (Ahn *et al.*, 2011; Kim *et al.*, 2010b) while in our model JNK and 38 are not responsible of c-Jun phosphorylation and expression in PLX4032 treated cells. Our results demonstrate the key role of c-Jun in the expression of RhoB and the importance of this pathway in cell survival following cellular treatment.

PLX4032 induces cell proliferation inhibition and inhibits cell migration but has a weak effect on apoptosis on the tested melanoma cells, WM-266-4 and A375. But PLX4032-induced cell death seems to occur in some highly sensitive cells (Paraiso *et al.*, 2011; Søndergaard *et al.*, 2010).

Our results suggest that blocking MAPK signaling induces the expression of genes of which the function is to increase cell survival. We demonstrated here that c-Jun/RhoB/AKT signaling axis is critical to maintain cell survival in the presence of MAPK inhibitors. The induction of RhoB is expected to play a key role in PLX4032 apoptotic response as RhoB/AKT pathway has previously been shown to control cell survival in stress condition. Indeed, we (Canguilhem, 2005; Meyer *et al.*, 2013) and others (Fritz and Kaina, 2001; Li *et al.*, 2011) have demonstrated that genotoxic treatments upregulate RhoB expression and concomitantly AKT activation, resulting in cell survival. Here we show that RhoB/AKT signaling is critical for PLX4032-induced caspase dependent apoptosis suggesting that RhoB/AKT axis as a common adaptive mechanism to cell injury. It has previously been shown that AKT is activated in PLX4032-treated PTEN negative melanoma (Paraiso *et al.*, 2011) and has been involved in resistance of melanoma.

The combination of PI3K/AKT inhibitors with Vemurafenib to improve melanoma treatment has been recently proposed, however the molecular rational of this combination was not clearly established. Here we demonstrate that AKT is critical for cell survival after PLX4032 treatment and decipher the mechanisms of its activation. We also show that AKT inhibition is *per se* not able to induce cell death but lead to synthetic lethal interaction with B-Raf inhibition.

In conclusion, we demonstrated that PLX4032 induces a cell adaptive response including gene expression of the c-Jun/RhoB/AKT signaling axis to prevent cell apoptosis potentially promoting cell resistance. These results bring the rational to treat patient in combination between B-Raf and AKT inhibitors and clinical trials must be launch to evaluate the improvement of this combination in melanoma patients.

MATERIAL AND METHODS

Cell culture and reagents

WM115, WM266-4, A375, SK-MEL28 and SK-MEL2 were purchased from ATCC; WM35, WM983A, WM983B, WM239A and WM3211 from the Coriell Institute and WM1346 from the Wistar Institute. WM115, WM266-4, A375 and SK-MEL28 were cultured in DMEM supplemented with 10% FBS, SK-MEL2 in RPMI-1640 with 10% FBS, WM35, WM983A, WM983B, WM3211 and WM1346 in MCDB153 medium with 20% Leibovitz L-15 medium, 2% FBS, 5 µg/mL insulin and 1.68 mM CaCl₂. Cell lines were authenticated for mutations in *BRAF* and *NRAS* by sequencing within the time frame of the experiments

PLX4032, SB590885, AZD6244, AS703026 and MK2206 were purchased from Selleck Chemicals, Z-VAD-FMK and Actinomycin D from Sigma-Aldrich, LY294002 from Calbiochem, Calpeptin from Santa Cruz Biotechnology, G-594 was kindly provided by Roche.

Transfection:

RNA interference was achieved by transfecting siRNA (20 nM except for c-Jun 40 nM) with Oligofectamine (Invitrogen) in OptiMEM (Invitrogen) according to manufacturer instructions. After 6 h, transfection medium was replaced by growth medium with inhibitor when required. siRNA sequences are mentioned in Table S3.

For co-transfection with pCMV6-CTRL or pCMV6-AKT-myr, 10.000 were seeded in 96-wells, transfected the following day with 10 µg of plasmid, 20 nM of siRNA and 0,025 µL of Lipofectamine 2000 in OptiMEM. 4 hours after transfection, medium was replaced and cells treated for an additional 72 h with PLX4032. pCMV6-AKT-myr plasmid was kindly gifted by Pr Franke.

Adenovirus transduction:

Replication-defective (Δ E1, E3) adenoviral vectors expressing RhoB under the transcriptional control of the CMV promoter were constructed with the Adeasy System (Qbiogen, Illkirch, France) as described previously (Couderc 2008). Following siRNA transfection, the transfection medium was directly

replaced by transduction medium containing adenovirus (M.O.I. = 25) supplemented with 20 µg/mL polybrene (Sigma-Alrich) and incubated for 4 h. Medium was then replaced by usual culture medium containing indicated concentrations of PLX4032.

Cell proliferation assay:

Six hours following siRNA transfection, cells were treated with or without the inhibitors at the indicated concentrations for 72 hours. Relative number of viable cells were then measured by incubating cells with MTS reagent (CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay from Promega) as recommended by manufacturer followed by the reading of absorbance at 492 nm.

Relative survival in the presence of the inhibitor was normalized to the untreated control after background corrections. The results are expressed as the mean of triplicates values of three independent experiments. Curves drawing and statistical analysis were performed with Prism (GraphPad).

Western blot analysis:

Cell extracts were separated on SDS-PAGE and electro-transferred onto PVDF membranes. Blots were probed with primary antibodies against RhoB, RhoA, B-Raf, MITF, ERK1/2 from Santa Cruz Biotechnology; RhoC, p-ERK (T202/Y204), p-AKT (S473), panAKT, Snail, Slug, ZEB1, PARP, Cleaved Caspase 3, total Caspase 3, c-Jun, p-c-Jun (S63), c-Jun, p-p38 (T180/Y182), p38, pJNK (T183/Y185), JNK from Cell Signaling Technology or actin from Chemicon. Detection was performed using peroxidase-conjugated secondary antibodies and chemi-luminescence detection kit (ECL, Pierce). Quantification were done on either scanned autoradiographs with ImageJ software or with ImageLab software (BioRad).

Quantitative real-time reverse transcription–PCR:

Total RNA was isolated by RNeasy kit (Qiagen) according to the manufacturer's instructions, then reverse-transcribed using iScript cDNA synthesis kit (Bio-Rad). Quantitative real-time PCR was performed with a CFX96 detection system (Bio-Rad) using iQ SYBR Green Supermix (Bio-Rad). Primers sequences are detailed in Table S4.

Study of RhoB Promoter Activity:

The previously described pGL3-RhoB plasmids containing different lengths of RhoB promoter sequence upstream of the Firefly luciferase gene into pGL3 luciferase reporter vector (Tovar *et al.*, 2003) were co-transfected with pRL-CMV vector (Promega) as an internal control with Lipofectamine 2000 (Invitrogen). 6 hours later, transfection medium was replaced by growth medium containing or not 2 μM PLX4032. After an incubation of 24 hours, Firefly and Renilla luciferase activities were measured with Dual-Luciferase Reporter Assay (Promega) according to manufacturer instructions.

The iCCAAT of the shorter construct (-45) was mutated using QuikChange® Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene) following manufacturer. The obtained constructs were sequenced to ensure successful mutagenesis. The plasmids were co-transfected with pRL-CMV using Lipofectamine 2000, then cells were treated with PLX4032 1 μM for 48 h before luciferase assays.

Apoptosis analysis:

DNA fragmentation was detected by a modified TUNEL procedure using the ApopTag® Fluorescein *In Situ* Apoptosis Detection Kit (Millipore). Briefly, after 72 hours of treatment, cells were harvested fixed in 3.7 % formaldehyde in PBS, cytopspined on coated slides, fixed with iced ethanol:acetic acid (2:1) for 5 minutes and stained according to manufacturer instructions. Positives cells were counted by fluorescence microscopy.

Cell cycle analysis:

After 72 h of treatment, cells were harvested and fixed in 75% ethanol at 4°C during 8 hours. Fixed cells were treated with 200 $\mu\text{g/ml}$ RNase in PBS 0.1% Tween 20 at 37°C during 30 minutes. Then cells were stained with 15 $\mu\text{g/ml}$ of propidium iodide for 15 min before cytometry analysis on a FACSCalibur™ (Becton Dickinson). Percentages of subG1 cells were calculated using FlowJo software.

LEGENDS

Figure 1 : PLX4032 leads to induction of RhoB expression

A and B : RT-qPCR of expressed RhoGTPases in WM266-4 and A375 in response to treatment with PLX4032, 1 μ M, 48 h. Graphs represents average of three independent experiments normalized by actin mRNA level.

C : Western blot of WM266-4 treated or not with PLX4032, 1 μ M, 48 h. Graph represents quantification of three independent experiments normalized by actin.

D : Western blot of RhoB in various melanoma cell lines treated by PLX4032, 1 μ M, 48 h.

E : Dose-response western blot of RhoB expression in WM266-4 cells in response to the treatment with the indicated concentration of PLX4032 during 48 hours.

F : Time-response western blot of RhoA, RhoB and RhoC in WM266-4 cells in response to 1 μ M PLX4032 treatment.

G : WM266-4 cells were treated with PLX4032, 1 μ M, 48 h, then PLX4032 was removed and cells cultured for the indicated additional time in normal medium.

Figure 2: B-Raf/MEK/ERK pathway inhibition induces RhoB in melanoma cells

A : Western blot of WM266-4 transfected with siRNA targeting B-Raf (20 nM for 72 h).

B : Western blot of WM266-4 treated for 48 h with 1 μ M of B-Raf inhibitors (PLX4032 or SB59088500) or MEK inhibitors (AZD6422 or AS703026).

C : Western blot of wild-type B-Raf melanoma cell lines untreated (D) or treated with 1 μ M PLX4032 (P) or AZD6422 (A) for 48 h.

D : Western blot of B-Raf^{V600E} mutated colon cell lines treated with PLX4032 or AZD6422 at the indicated dose during 48 h.

Figure 3 : RhoB is induced by PLX4032 through transcriptional activation in a iCCAAT and c-Jun dependent pathway.

A : After 48h of PLX4032 1 μ M, RhoB mRNA half-life was measured using the transcription inhibitor Actinomycin D (5 μ g / mL), mRNA level was normalized by the long half-life actin mRNA (one representative experiment).

B, C and D: Luciferase assay of WM266-4 co-transfected with RhoB-promoter-firefly luciferase construct and pRL-CMV and treated with PLX4032 (2 μ M, 24 h for B and C and 1 μ M for 48h for D). Means of three independent experiments.

E : Western blot of WM266-4 cells treated with PLX4032 1 μ M for 48h.

F : Western blot of WM266-4 cells treated for the indicated time with PLX4032 1 μ M

G : Western blot of WM266-4 transfected with siRNA targeting c-Jun 40nM and treated with PLX4032 1 μ M, 48h.

Figure 4 :

A, B, C, D, E and F: WM266-4, A375 or SK-MEL2 were transfected with siRNA CTRL or targeting RhoB and then treated with increasing concentration of PLX4032 or AZD6422. After 72 h, viability was assayed and dose-response analyzed.

G : WM266-4 were transfected with siRNA CTRL or targeting RhoB and then treated with PLX4032 (1 μ M) or/and AZD6422 PLX4032 (1 μ M). After 72 h, viability was assayed and dose-response analyzed.

H: WM266-4 transfected with CTRL or c-Jun siRNA, transduced with adenovirus control (AdGFP) or expressing RhoB (AdRhoB) and treated with PLX4032. Viability was measured 72 h later and dose-response analyzed.

Figure 5:

A, B and C: WM266-4 cells transfected with siRNA control or targeting RhoB and treated with PLX4032 2 μ M, 72h. Cells were analyzed for cell cycle by FACS and subG1 was quantified (A) or label for TUNEL assay (B) or lysate for western blot.

D and E: WM266-4 cells transfected with siRNA control or targeting RhoB and treated with PLX4032 2 μ M, 72h and Z-VAD-FMK (25 μ M). Then cells were lysate for western blot of label for cell cycle analysis by FACS and subG1 quantified.

Figure 6:

A and B: WM266-4 cells transfected with siRNA control or targeting RhoB and treated with PLX4032 2 μ M, 72h. Cells were analyzed for western blot. A is a representative experiment and B quantification of 5 independent experiments.

C : Western blot of WM266-4 treated with PLX4032 1 μ M and/or G-594 1 μ M for 48 h.

D : WM266-4 were treated with equal indicated concentration of PI3K/AKT inhibitors (LY294002, MK-2206 or G594) and PLX4032, survival was measured 72 hours later. Combination index (CI) were calculated with Compusys.

E : WM266-4 were co-transfected with siRNA CTRL or RhoB and plasmid CTRL or encoding AKT-myr, treated with PLX4032 and viability assayed 72 h later.

REFERENCES

- Ahn, J., Choi, J.-H., Won, M., Kang, C.-M., Gyun, M.-R., Park, H.-M., Kim, C.-H., and Chung, K.-S. (2011). The activation of p38 MAPK primarily contributes to UV-induced RhoB expression by recruiting the c-Jun and p300 to the distal CCAAT box of the RhoB promoter. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *409*, 211–216.
- Baines, P., Fisher, J., Truran, L., Davies, E., Hallett, M., Hoy, T., and Burnett, A.K. (2000). The MEK inhibitor, PD98059, reduces survival but does not block acute myeloid leukemia blast maturation in vitro. *Eur. J. Haematol.* *64*, 211–218.
- Basile, K.J., and Aplin, A.E. (2012). Downregulation of Noxa by RAF/MEK inhibition counteracts cell death response in mutant B-RAF melanoma cells. *Am. J. Cancer Res.* *2*, 726–735.
- Basile, K.J., Abel, E.V., and Aplin, A.E. (2011). Adaptive upregulation of FOXD3 and resistance to PLX4032/4720-induced cell death in mutant B-RAF melanoma cells. *Oncogene* *31*, 2471–2479.
- Bousquet, E., Mazières, J., Privat, M., Rizzati, V., Casanova, A., Ledoux, A., Mery, E., Couderc, B., Favre, G., and Pradines, A. (2009). Loss of RhoB expression promotes migration and invasion of human bronchial cells via activation of AKT1. *Cancer Res.* *69*, 6092–6099.
- Canguilhem, B. (2005). RhoB Protects Human Keratinocytes from UVB-induced Apoptosis through Epidermal Growth Factor Receptor Signaling. *J. Biol. Chem.* *280*, 43257–43263.
- Chapman, P.B., Hauschild, A., Robert, C., Haanen, J.B., Ascierto, P., Larkin, J., Dummer, R., Garbe, C., Testori, A., and Maio, M. (2011). Improved survival with vemurafenib in melanoma with BRAF V600E mutation. *N. Engl. J. Med.* *364*, 2507–2516.
- Chen, B., Tardell, C., Higgins, B., Packman, K., Boylan, J.F., and Niu, H. (2012). BRAFV600E Negatively Regulates the AKT Pathway in Melanoma Cell Lines. *PLoS ONE* *7*, e42598.
- Chen, Z., Sun, J., Pradines, A., Favre, G., Adnane, J., and Sebti, S.M. (2000). Both farnesylated and geranylgeranylated RhoB inhibit malignant transformation and suppress human tumor growth in nude mice. *J. Biol. Chem.* *275*, 17974–17978.
- Couderc, B., Pradines, A., Rafii, A., Golzio, M., Deviers, A., Allal, C., Berg, D., Penary, M., Teissie, J., and Favre, G. (2008). In vivo restoration of RhoB expression leads to ovarian tumor regression. *Cancer Gene Ther.* *15*, 456–464.
- 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.
- Fang, W. Bin, Jokar, I., Zou, A., Lambert, D., Dendukuri, P., and Cheng, N. (2012). CCL2/CCR2 Chemokine Signaling Coordinates Survival and Motility of Breast Cancer Cells through Smad3 Protein- and p42/44 Mitogen-activated Protein Kinase (MAPK)-dependent Mechanisms. *J. Biol. Chem.* *287*, 36593–36608.
- Finn, L., Markovic, S.N., and Joseph, R.W. (2012). Therapy for metastatic melanoma: the past, present, and future. *BMC Med.* *10*, 23.
- Fritz, G. (1997). rhoB Encoding a UV-inducible Ras-related Small GTP-binding Protein Is Regulated by GTPases of the Rho Family and Independent of JNK, ERK, and p38 MAP Kinase. *J. Biol. Chem.* *272*, 30637–30644.

Fritz, G., and Kaina, B. (2000). Ras-Related GTPase RhoB Forces Alkylation-Induced Apoptotic Cell Death. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 268, 784–789.

Fritz, G., and Kaina, B. (2001). Transcriptional activation of the small GTPase gene rhoB by genotoxic stress is regulated via a CCAAT element. *Nucleic Acids Res.* 29, 792–798.

Ho, H., Aruri, J., Kapadia, R., Mehr, H., White, M.A., and Ganesan, A.K. (2012a). RhoJ and Pak Kinases Regulate Melanoma Chemoresistance by Suppressing Pathways that Sense DNA Damage. *Cancer Res.* 72, 5516–5528.

Ho, H., Aruri, J., Kapadia, R., Mehr, H., White, M. a, and Ganesan, A.K. (2012b). RhoJ and Pak Kinases Regulate Melanoma Chemoresistance by Suppressing Pathways that Sense DNA Damage. *Cancer Res.* 5516–5528.

Ho, H., Soto Hopkin, A., Kapadia, R., Vasudeva, P., Schilling, J., and Ganesan, A.K. (2013). RhoJ modulates melanoma invasion by altering actin cytoskeletal dynamics. *Pigment Cell Melanoma Res.* 26, 218–225.

Jiang, K., Delarue, F.L., and Sebti, S.M. (2004a). EGFR, ErbB2 and Ras but not Src suppress RhoB expression while ectopic expression of RhoB antagonizes oncogene-mediated transformation. *Oncogene* 23, 1136–1145.

Jiang, K., Delarue, F.L., and Sebti, S.M. (2004b). EGFR, ErbB2 and Ras but not Src suppress RhoB expression while ectopic expression of RhoB antagonizes oncogene-mediated transformation. *Oncogene* 23, 1136–1145.

Johannessen, C.M., Boehm, J.S., Kim, S.Y., Thomas, S.R., Wardwell, L., Johnson, L.A., Emery, C.M., Stransky, N., Cogdill, A.P., Barretina, J., *et al.* (2010). COT drives resistance to RAF inhibition through MAP kinase pathway reactivation. *Nature* 468, 968–972.

Kazerounian, S., Gerald, D., Huang, M., Chin, Y.R., Udayakumar, D., Zheng, N., O'Donnell, R.K., Perruzzi, C., Mangiante, L., Pourat, J., *et al.* (2012). RhoB Differentially Controls Akt Function in Tumor Cells and Stromal Endothelial Cells during Breast Tumorigenesis. *Cancer Res.* 73, 50–61.

Kim, B.-K., Kim, H.M., Chung, K.-S., Kim, D.-M., Park, S.-K., Song, A., Won, K.-J., Lee, K., Oh, Y.-K., Lee, K., *et al.* (2011). Upregulation of RhoB via c-Jun N-terminal kinase signaling induces apoptosis of the human gastric carcinoma NUGC-3 cells treated with NSC12618. *Carcinogenesis* 32, 254–261.

Kim, C.-H., Won, M., Choi, C.-H., Ahn, J., Kim, B.-K., Song, K.-B., Kang, C.-M., and Chung, K.-S. (2010a). Increase of RhoB in γ -radiation-induced apoptosis is regulated by c-Jun N-terminal kinase in Jurkat T cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 391, 1182–1186.

Kim, D.-M., Won, M., Chung, C.-S., Kim, S., Yim, H.J., Jung, S.-H., and Jeong, S. (2010b). JNK-mediated transcriptional upregulation of RhoB is critical for apoptosis of HCT-116 colon cancer cells by a novel diarylsulfonylurea derivative. *Apoptosis* 15, 1540–1548.

Klein, R.M., and Higgins, P.J. (2011). A switch in RND3-RHOA signaling is critical for melanoma cell invasion following mutant-BRAF inhibition. *Mol. Cancer* 10, 114.

Klein, R.M., Spofford, L.S., Abel, E. V, Ortiz, A., and Aplin, A.E. (2008). B-RAF regulation of Rnd3 participates in actin cytoskeletal and focal adhesion organization. *Mol. Biol. Cell* 19, 498–508.

Li, K., Lu, Y., Liang, J., Luo, G., Ren, G., Wang, X., and Fan, D. (2009). RhoE enhances multidrug resistance of gastric cancer cells by suppressing Bax. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 379, 212–216.

- Li, Y.-D., Liu, Y.-P., Cao, D.-M., Yan, Y.-M., Hou, Y.-N., Zhao, J.-Y., Yang, R., Xia, Z.-F., and Lu, J. (2011). Induction of small G protein RhoB by non-genotoxic stress inhibits apoptosis and activates NF- κ B. *J. Cell. Physiol.* 226, 729–738.
- Lito, P., Pratilas, C.A., Joseph, E.W., Tadi, M., Halilovic, E., Zubrowski, M., Huang, A., Wong, W.L., Callahan, M.K., Merghoub, T., *et al.* (2012a). Relief of Profound Feedback Inhibition of Mitogenic Signaling by RAF Inhibitors Attenuates Their Activity in BRAFV600E Melanomas. *Cancer Cell* 22, 668–682.
- Lito, P., Pratilas, C.A., Joseph, E.W., Tadi, M., Halilovic, E., Zubrowski, M., Huang, A., Wong, W.L., Callahan, M.K., Merghoub, T., *et al.* (2012b). Relief of Profound Feedback Inhibition of Mitogenic Signaling by RAF Inhibitors Attenuates Their Activity in BRAFV600E Melanomas. *Cancer Cell* 22, 668–682.
- Makrodouli, E., Oikonomou, E., Koc, M., Andera, L., Sasazuki, T., Shirasawa, S., and Pintzas, A. (2011). BRAF and RAS oncogenes regulate Rho GTPase pathways to mediate migration and invasion properties in human colon cancer cells: a comparative study. *Mol. Cancer* 10, 118.
- Matos, P., Oliveira, C., Velho, S., Gonçalves, V., da Costa, L.T., Moyer, M.P., Seruca, R., and Jordan, P. (2008). B-Raf(V600E) cooperates with alternative spliced Rac1b to sustain colorectal cancer cell survival. *Gastroenterology* 135, 899–906.
- Mazieres, J., Antonia, T., Daste, G., Muro-Cacho, C., Berchery, D., Tillement, V., Pradines, A., Sebti, S., and Favre, G. (2004). Loss of RhoB expression in human lung cancer progression. *Clin. Cancer Res.* 10, 2742–2750.
- Mazières, J., Tillement, V., Allal, C., Clanet, C., Bobin, L., Chen, Z., Sebti, S.M., Favre, G., and Pradines, A. (2005). Geranylgeranylated, but not farnesylated, RhoB suppresses Ras transformation of NIH-3T3 cells. *Exp. Cell Res.* 304, 354–364.
- Meyer, N., Peyret-Lacombe, A., Canguilhem, B., Médale-Giamarchi, C., Mamouni, K., Cristini, A., Monferran, S., Lamant, L., Filleron, T., Pradines, A., *et al.* (2013). RhoB Promotes Cancer Initiation by Protecting Keratinocytes from UVB-Induced Apoptosis but Limits Tumor Aggressiveness. *J. Invest. Dermatol.*
- Milia, J., Teyssier, F., Dalenc, F., Ader, I., Delmas, C., Pradines, A., Lajoie-Mazenc, I., Baron, R., Bonnet, J., Cohen-Jonathan, E., *et al.* (2005). Farnesylated RhoB inhibits radiation-induced mitotic cell death and controls radiation-induced centrosome overduplication. *Cell Death Differ.* 12, 492–501.
- Nazarian, R., Shi, H., Wang, Q., Kong, X., Koya, R.C., Lee, H., Chen, Z., Lee, M.-K., Attar, N., Sazegar, H., *et al.* (2010). Melanomas acquire resistance to B-RAF(V600E) inhibition by RTK or N-RAS upregulation. *Nature* 468, 973–977.
- Paraiso, K.H.T., Xiang, Y., Rebecca, V.W., Abel, E.V., Chen, Y.A., Munko, A.C., Wood, E., Fedorenko, I.V., Sondak, V.K., Anderson, A.R.A., *et al.* (2011). PTEN Loss Confers BRAF Inhibitor Resistance to Melanoma Cells through the Suppression of BIM Expression. *Cancer Res.* 71, 2750–2760.
- Polzien, L., Baljuls, A., Rennefahrt, U.E.E., Fischer, A., Schmitz, W., Zahedi, R.P., Sickmann, A., Metz, R., Albert, S., Benz, R., *et al.* (2009). Identification of Novel *In Vivo* Phosphorylation Sites of the Human Proapoptotic Protein BAD: PORE-FORMING ACTIVITY OF BAD IS REGULATED BY PHOSPHORYLATION. *J. Biol. Chem.* 284, 28004–28020.
- Sanz-Moreno, V., Gadea, G., Ahn, J., Paterson, H., Marra, P., Pinner, S., Sahai, E., and Marshall, C.J. (2008). Rac activation and inactivation control plasticity of tumor cell movement. *Cell* 135, 510–523.

- Shao, Y., and Aplin, A.E. (2012). BH3-only protein silencing contributes to acquired resistance to PLX4720 in human melanoma. *Cell Death Differ.* *19*, 2029–2039.
- Skuli, N., Monferran, S., Delmas, C., Lajoie-Mazenc, I., Favre, G., Toulas, C., and Cohen-Jonathan-Moyal, E. (2006). Activation of RhoB by hypoxia controls hypoxia-inducible factor-1alpha stabilization through glycogen synthase kinase-3 in U87 glioblastoma cells. *Cancer Res.* *66*, 482–489.
- Smalley, K.S.M. (2003). A pivotal role for ERK in the oncogenic behaviour of malignant melanoma? *Int. J. Cancer J. Int. Cancer* *104*, 527–532.
- Smalley, K.S.M., Contractor, R., Haass, N.K., Lee, J.T., Nathanson, K.L., Medina, C.A., Flaherty, K.T., and Herlyn, M. (2007). Ki67 expression levels are a better marker of reduced melanoma growth following MEK inhibitor treatment than phospho-ERK levels. *Br. J. Cancer* *96*, 445–449.
- Søndergaard, J.N., Nazarian, R., Wang, Q., Guo, D., Hsueh, T., Mok, S., Sazegar, H., MacConaill, L.E., Barretina, J.G., and Kehoe, S.M. (2010). Differential sensitivity of melanoma cell lines with BRAFV600E mutation to the specific Raf inhibitor PLX4032.
- Sosman, J.A., Kim, K.B., Schuchter, L., Gonzalez, R., Pavlick, A.C., Weber, J.S., McArthur, G.A., Hutson, T.E., Moschos, S.J., and Flaherty, K.T. (2012). Survival in BRAF V600-mutant advanced melanoma treated with vemurafenib. *N. Engl. J. Med.* *366*, 707–714.
- Tovar, D., Faye, J.-C., and Favre, G. (2003). Cloning of the human RHOB gene promoter: characterization of a VNTR sequence that affects transcriptional activity. *Genomics* *81*, 525–530.
- Tsai, J., Lee, J.T., Wang, W., Zhang, J., Cho, H., Mamo, S., Bremer, R., Gillette, S., Kong, J., Haass, N.K., *et al.* (2008). Discovery of a selective inhibitor of oncogenic B-Raf kinase with potent antimelanoma activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *105*, 3041–3046.
- Tuveson, D.A., Weber, B.L., and Herlyn, M. (2003). BRAF as a potential therapeutic target in melanoma and other malignancies. *Cancer Cell* *4*, 95–98.
- Vishnu, P., Colon-Otero, G., Kennedy, G.T., Marlow, L.A., Kennedy, W.P., Wu, K.J., Santoso, J.T., and Copland, J.A. (2012). RhoB mediates antitumor synergy of combined ixabepilone and sunitinib in human ovarian serous cancer. *Gynecol. Oncol.* *124*, 589–597.
- Wagle, N., Emery, C., Berger, M.F., Davis, M.J., Sawyer, A., Pochanard, P., Kehoe, S.M., Johannessen, C.M., Macconnaill, L.E., Hahn, W.C., *et al.* (2011). Dissecting therapeutic resistance to RAF inhibition in melanoma by tumor genomic profiling. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* *29*, 3085–3096.
- Westmark, C.J., Bartleson, V.B., and Malter, J.S. (2004). RhoB mRNA is stabilized by HuR after UV light. *Oncogene* *24*, 502–511.
- Yadav, V., Zhang, X., Liu, J., Estrem, S., Li, S., Gong, X.-Q., Buchanan, S., Henry, J.R., Starling, J.J., and Peng, S.-B. (2012). Reactivation of mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway by FGF receptor 3 (FGFR3)/Ras mediates resistance to vemurafenib in human B-RAF V600E mutant melanoma. *J. Biol. Chem.* *287*, 28087–28098.
- Zhao, Y., Wang, Z., Jiang, Y., and Yang, C. (2011). Inactivation of Rac1 reduces Trastuzumab resistance in PTEN deficient and insulin-like growth factor I receptor overexpressing human breast cancer SKBR3 cells. *Cancer Lett.* *313*, 54–63.

Figure 1

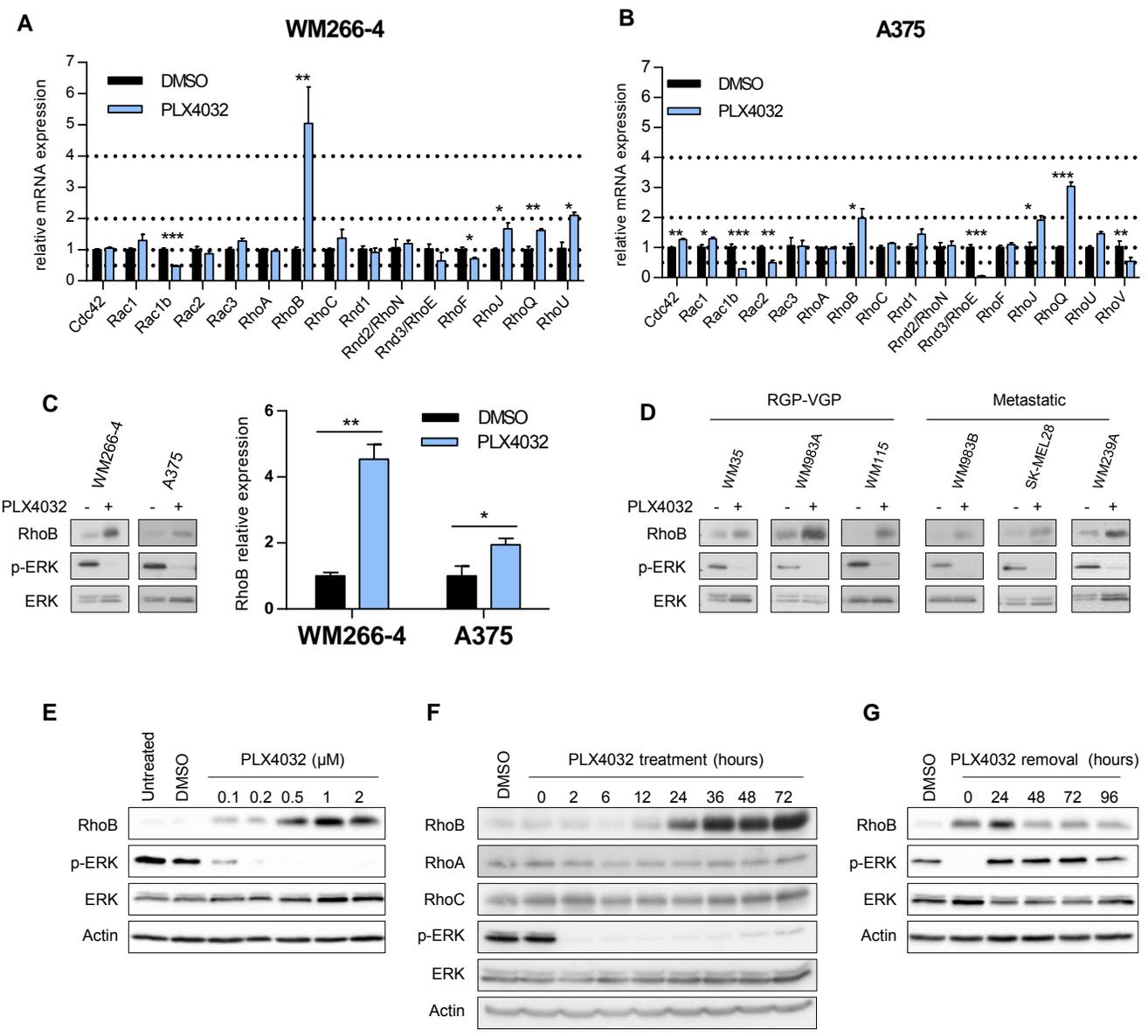


Figure 2

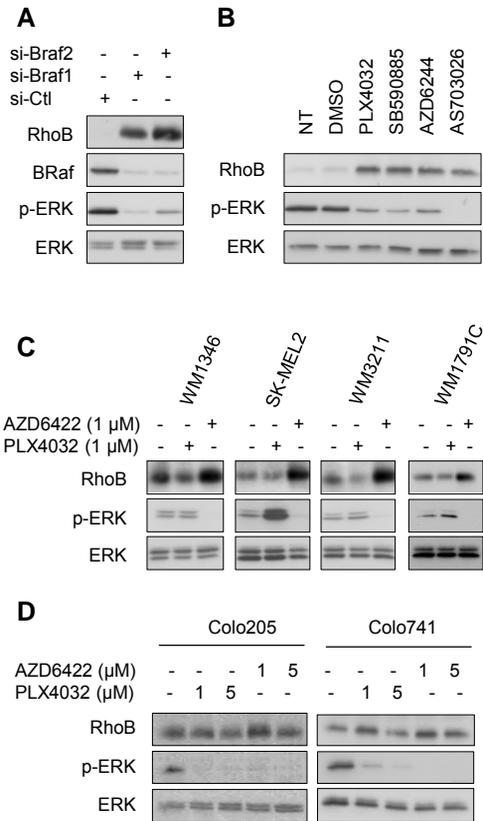


Figure 3

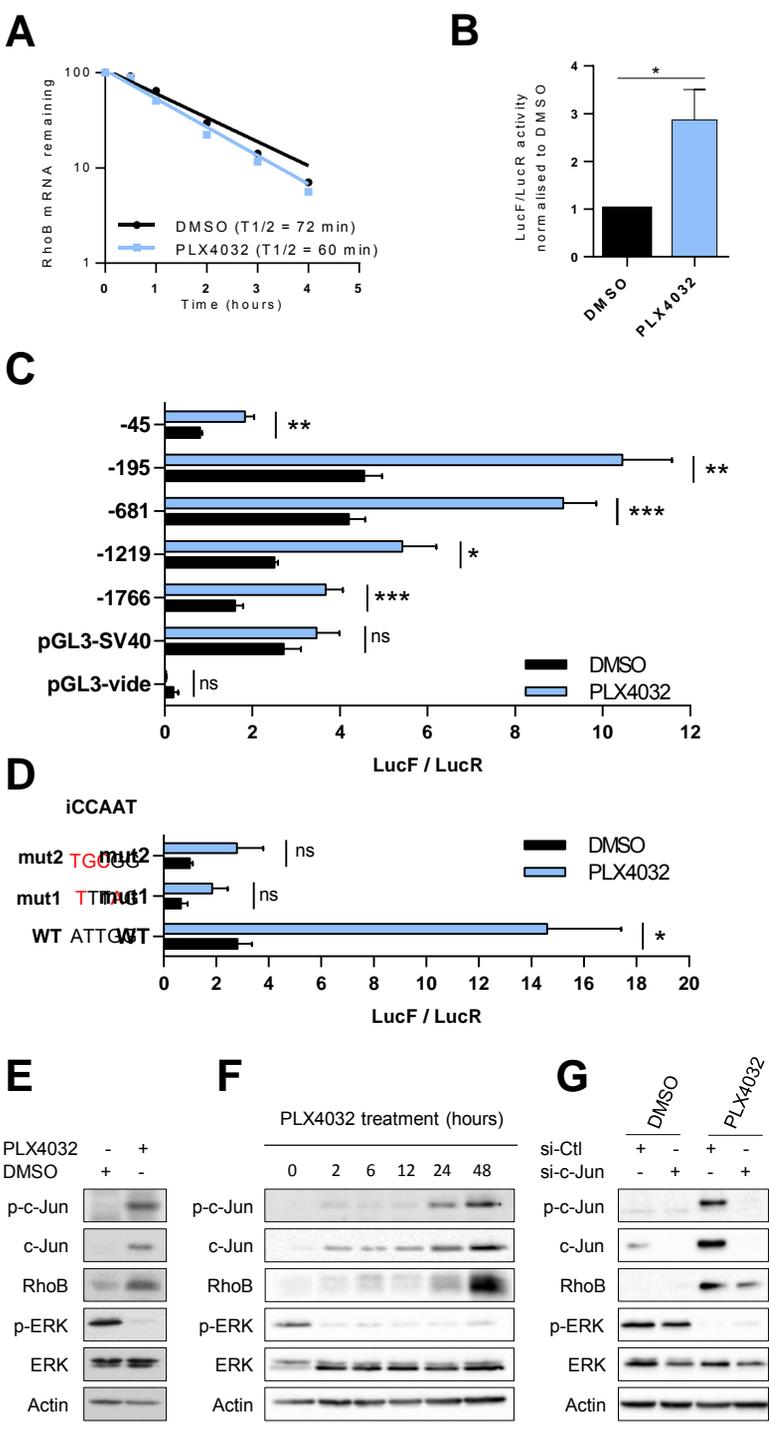


Figure 4

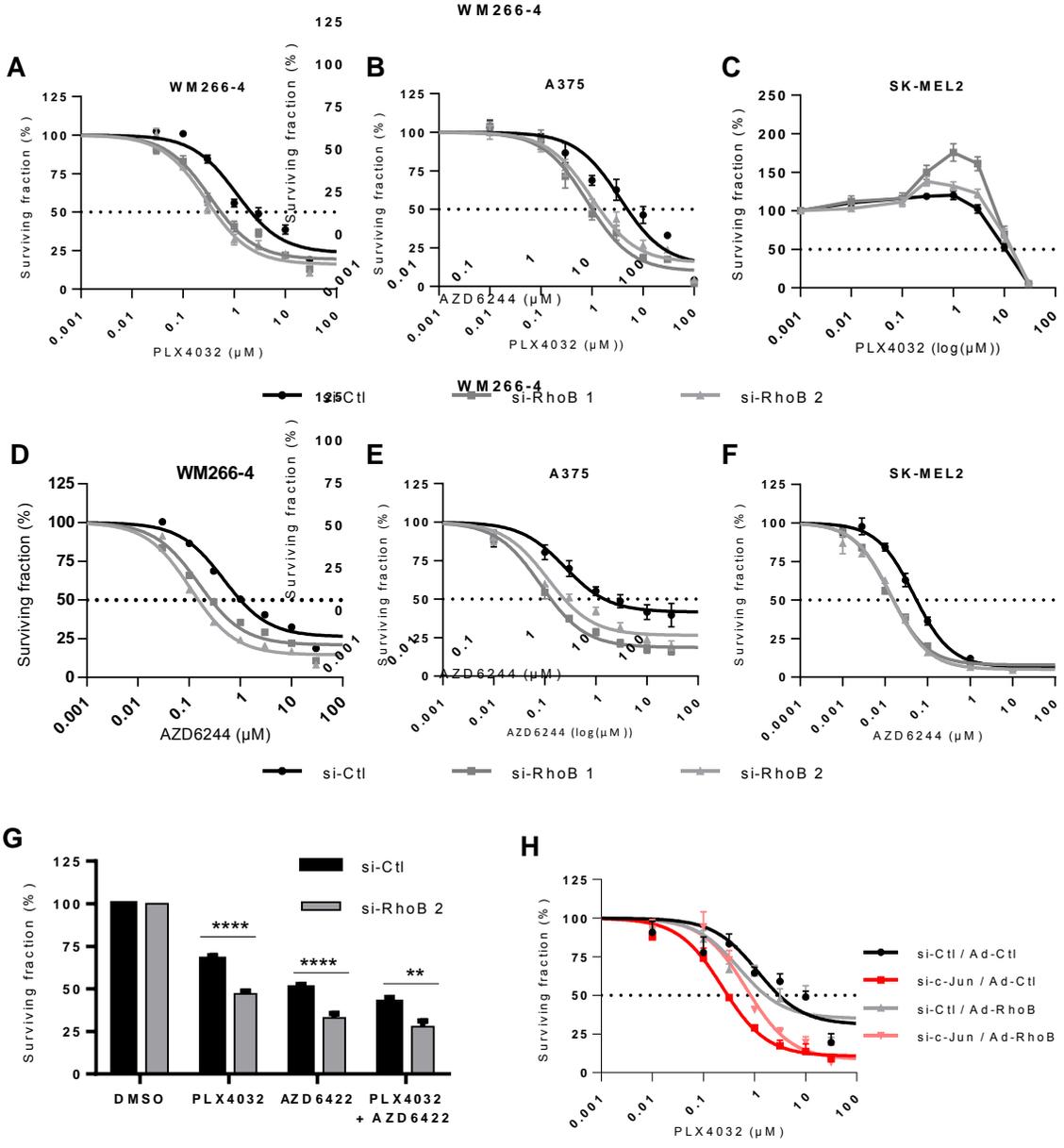


Figure 5

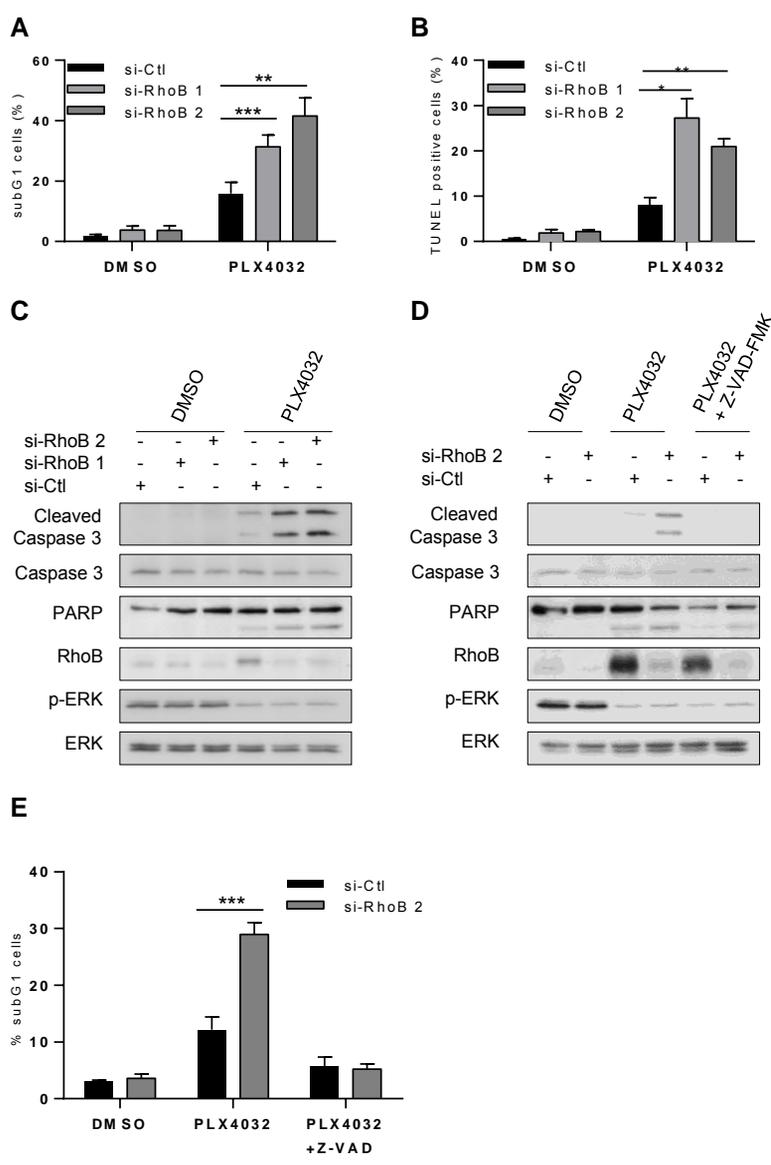


Figure 6

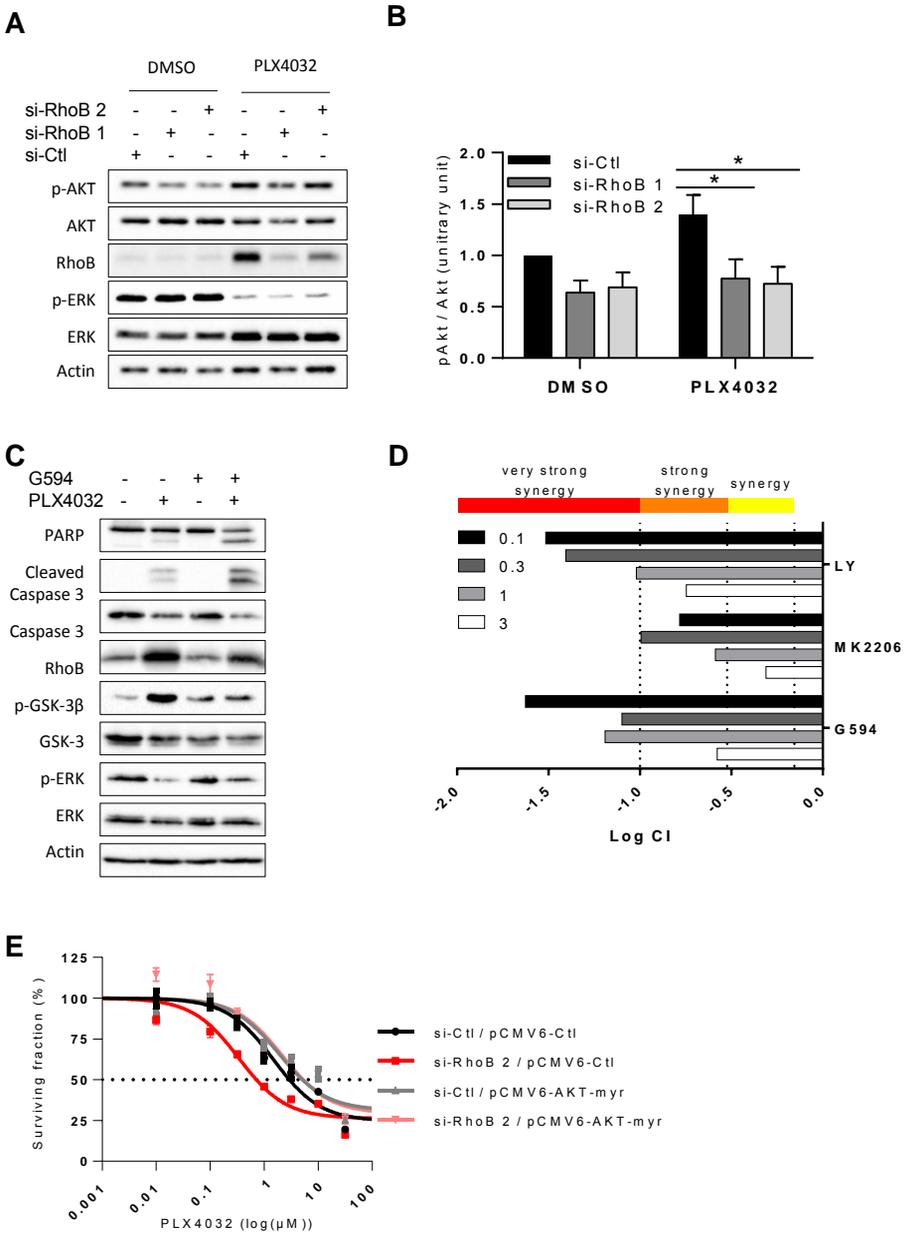


Figure S1:

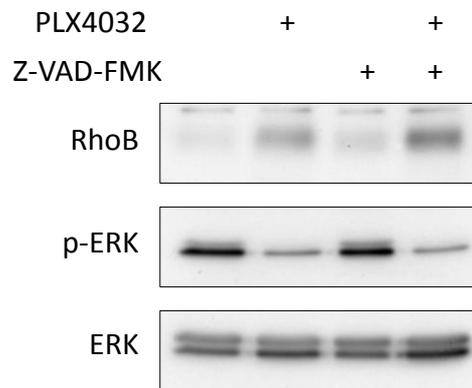


Figure S2:

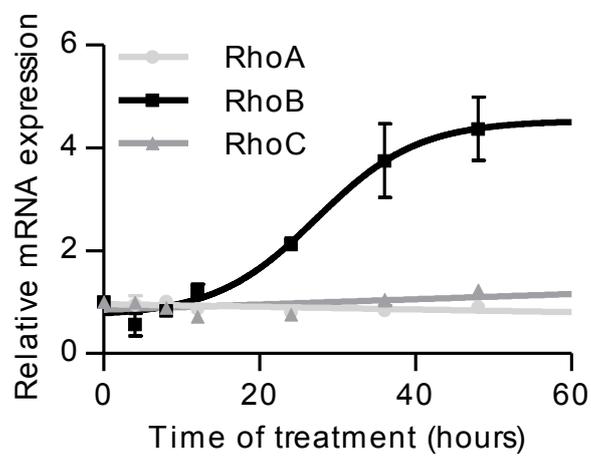


Figure S3 :

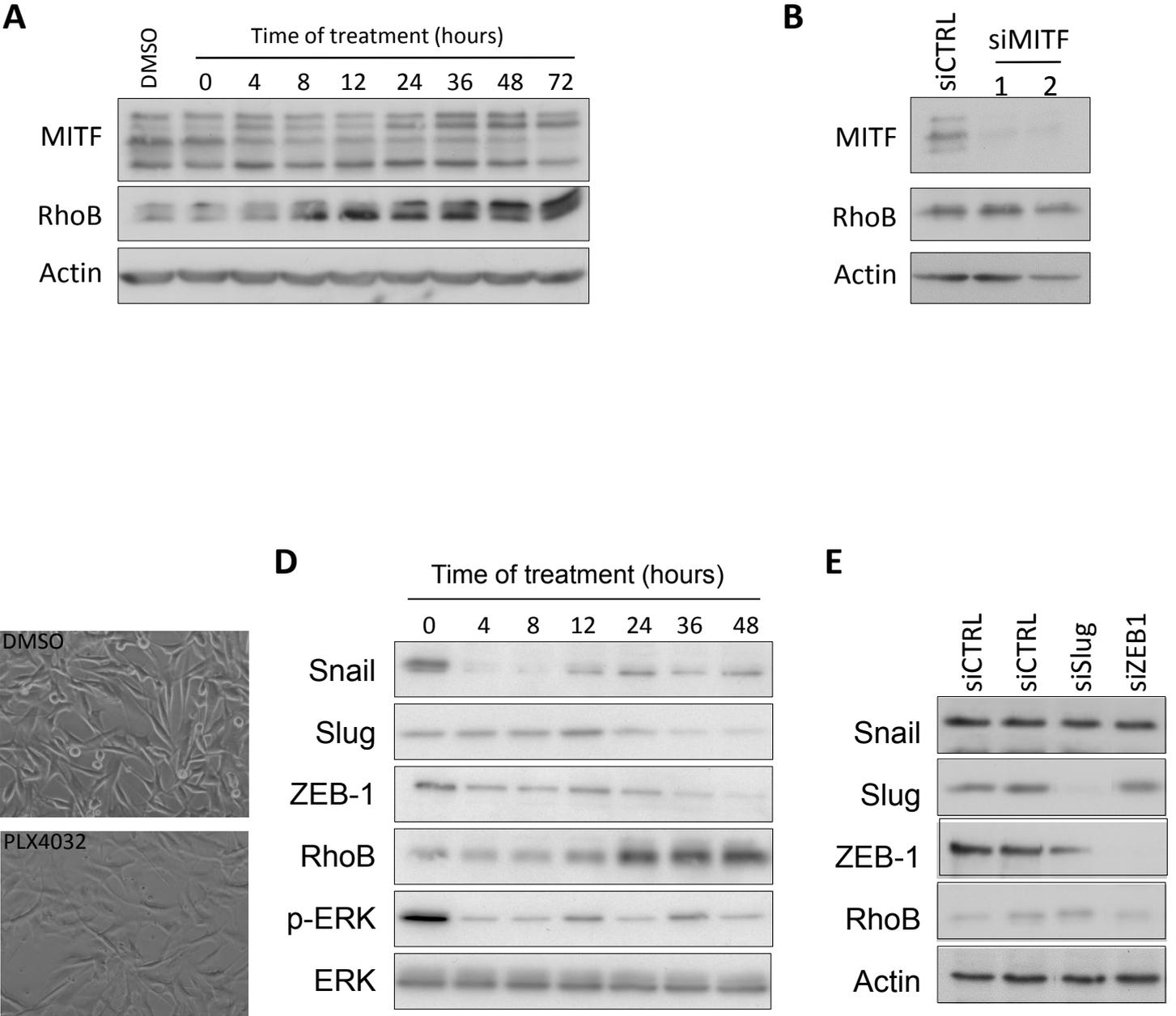


Figure S4 :

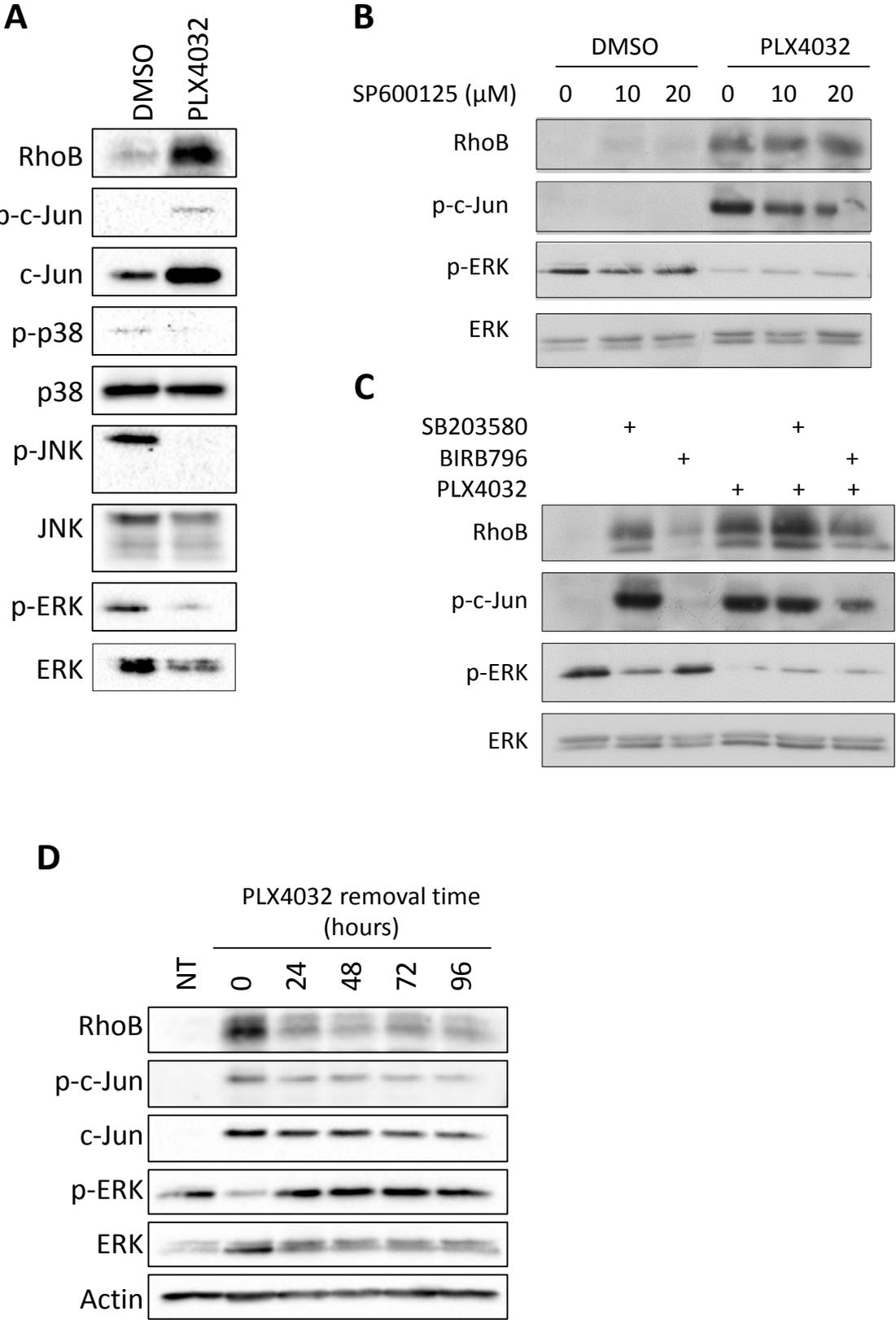
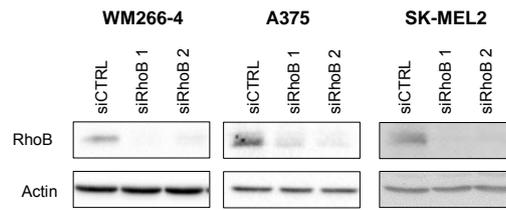
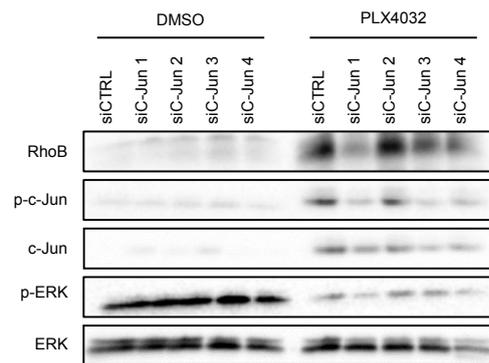


Figure S5 :

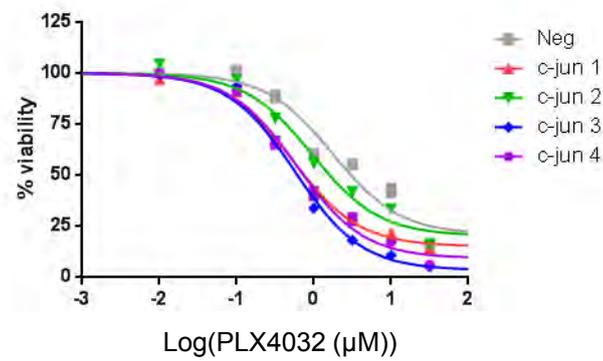
A



B



C



D

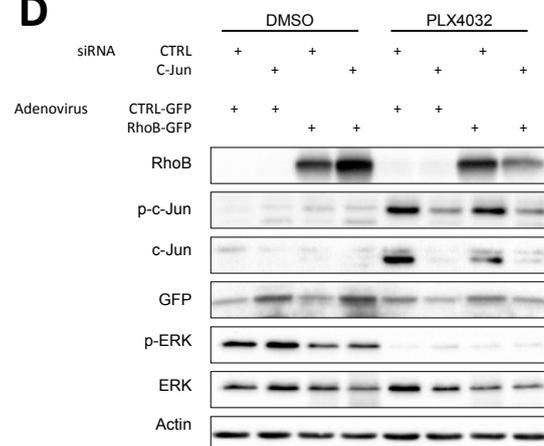


Figure S6:

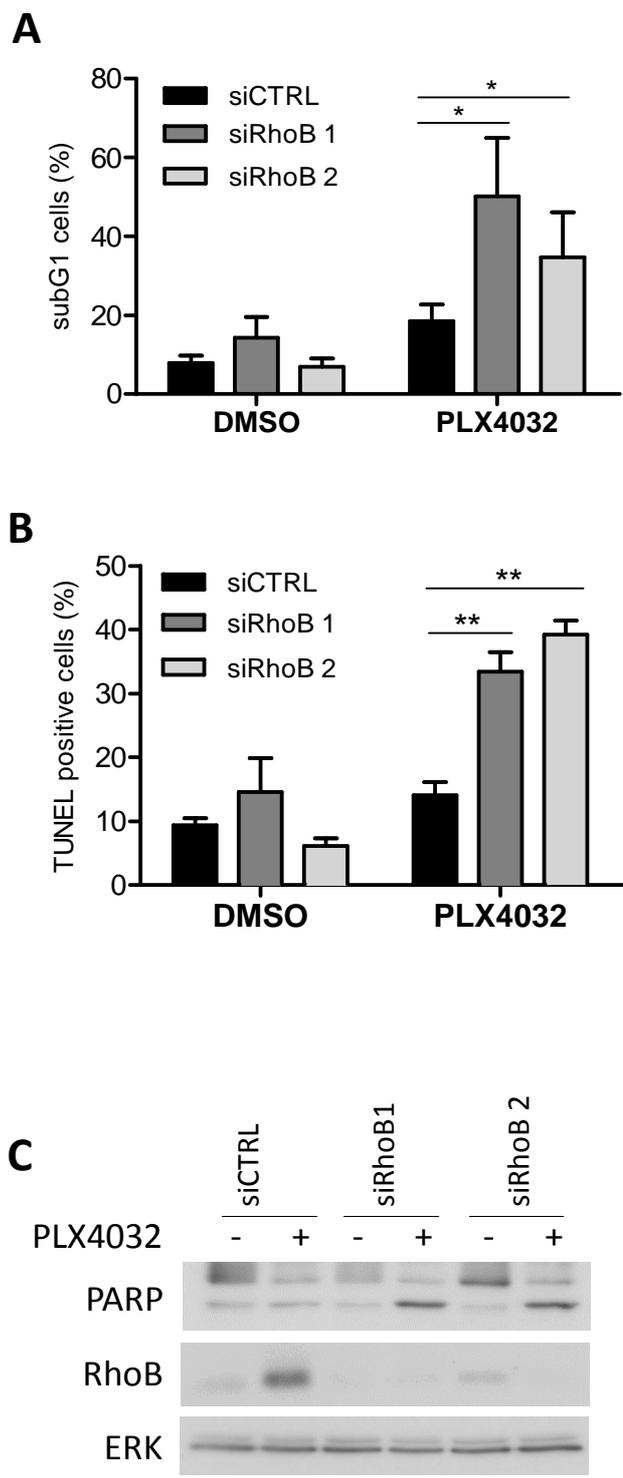


Figure S7:

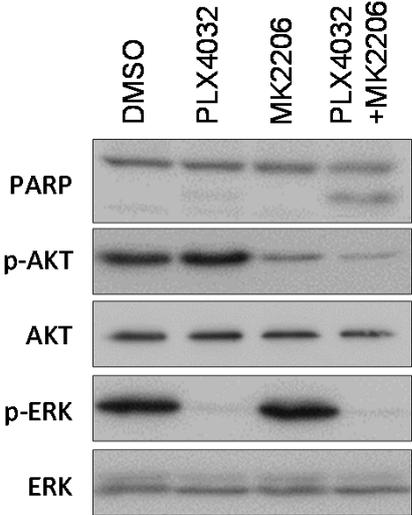


Figure S8:

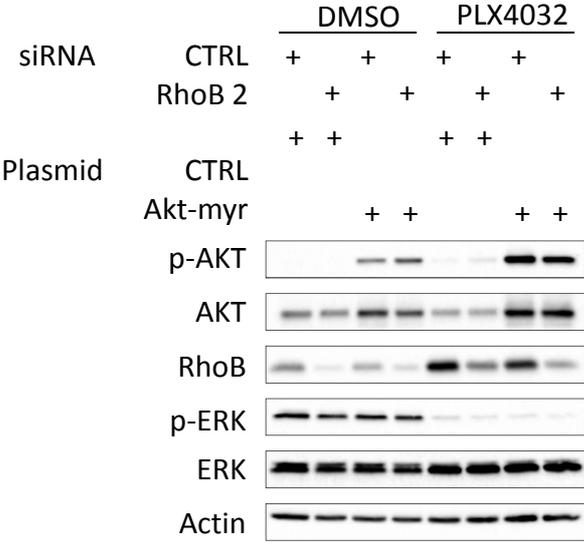


Table S1:

Cell line	Drug	siRNA	logIC50	IC50 (μ M)	P-value compared to CTRL siRNA
WM266-4	PLX4032	CTRL	0,053 \pm 0,063	1,13	
		RhoB 1	- 0,471 \pm 0,056	0,338	<0,0001
		RhoB 2	- 0,551 \pm 0,051	0,281	<0,0001
	AZD6422	CTRL	- 0,448 \pm 0,053	0,357	
		RhoB 1	- 0,842 \pm 0,040	0,144	<0,0001
		RhoB 2	- 0,710 \pm 0,064	0,195	<0,005
A375	PLX4032	CTRL	0,475 \pm 0,088	2,983	
		RhoB 1	- 0,087 \pm 0,064	0,819	<0,0001
		RhoB 2	- 0,055 \pm 0,053	0,277	<0,0001
	AZD6422	CTRL	- 0,609 \pm 0,132	0,246	
		RhoB 1	- 1,083 \pm 0,055	0,083	<0,005
		RhoB 2	- 0,945 \pm 0,070	0,114	<0,005
SK-MEL2	AZD6422	CTRL	- 1,324 \pm 0,044	0,047	
		RhoB 1	- 1,886 \pm 0,032	0,013	<0,0001
		RhoB 2	- 1,855 \pm 0,045	0,014	<0,0001

Table S2:

siRNA	Plasmid	logIC50	IC50 (μ M)	P-value compared to CTRL siRNA
CTRL	pCMV6-CTRL	0,174 \pm 0,071	1,492	<0,0001
RhoB 2	pCMV6-CTRL	- 0,468 \pm 0,061	0,3407	
CTRL	pCMV6-Akt-myr	0,2818 \pm 0,099	1,913	NS
RhoB 2	pCMV6-Akt-myr	0,340 \pm 0,120	2,189	

Table S3: siRNA sequences

	Sequence / reference	Provider
si-Ctl	SR-CL000-005	Eurogentec
si-RhoB 1	GGCAUUCUCUAAAAGCUAUG-TT	Eurogentec
si-RhoB 2	GCUAAGAUGGUGUUUUUA-TT	Eurogentec
si-Slug	GCAGACAGGUCAAUCUGA-TT	Ambion (4390824)
si-Snail 1	GGUGUGACUACUAUGCAA-TT	Eurogentec
si-Snail 2	GCGAGCUGCAGGACUCUAA-TT	Eurogentec
si-ZEB 1	UGAUCAGCCUAAUCUGCA-TT	Eurogentec
si-ZEB 2	Smart-pool L-006564-01-0005	Thermo-Fisher
si-MITF 1	AGCAGUACCUUUCUACCAC-TT	Eurogentec
si-MITF 2	CUCCUGUCCAGCCAACCUU-TT	Eurogentec
si-c-Jun	SMARTpool 1 : UGGAACGACCUUCAUGA 2 : UAACGCAGCAGUUGCAAAC 3 : GAGCGGACCUUAUGGCUAC 4 : ZZGUCAUGAACCACGUUAA	Thermo Scientific

Table S4: RT-qPCR primer sequences

Gene	Sequence	Reverse sequence
RhoA	TGGAAGATGGCATAACCTGTC	AACTGGTGGCTCCTCTGG
RhoB	TTGTGCCTGTCCTAGAAGTG	CAAGTGTGGTCAGAATGCTAC
RhoC	TGTCATCCTCATGTGCTTCTC	GTGCTCGTCTTGCCTCAG
RhoD	GATTGGAGCCTGTGACCTAC	GTAATCCGCCGCCAGAAG
RhoE/Rnd3	CCTGCTCCTCTCGCTCTC	TCTGGCTGGCTCTTCTCTC
RhoF	CAGACAGACCTCACGACAG	GAGTTCCAGAATGTTCCAAGAG
RhoG	CCGCTCTCACTTCTTCTC	ACCACCACGCACTTGATG
RhoH	TTCACCTCCGAGACCTTCC	GCCACAGAGTAGCACATCAG
RhoJ	QuantiTect Primer Assay (Qiagen)	
RhoQ	TATGCCAACGACGCCTTC	GCCGTGTCATAGAGTCCTAG
RhoV	CATAGCAAGTAGTAGGCAGGAG	TCAGAGTGGGCAGTTAGAGG
RhoU	CGGTGGTGTCTGTGGATG	GAAGATGTCTGTGTTGGTGTAG
Rnd1	GCAAGTGTTAGCGAAGGATTG	GCAGAGTGGACGGACATTATC
RhoN/Rnd2	QuantiTect Primer Assay (Qiagen)	
Cdc42	GTCAAGTATGTGGAGTGTCTG	CACCTGCGGCTCTTCTTC
Rac1	AGAACACCGAGCACTGAAC	ACGCATCTGAGAACTACATAGG CCTATGTAGTTCTCAGATGCGT
Rac1b	TACGGTAAGGATATAACCTCCC	ACCTCAGGATACCATCTTTGC GCAAAGATGGTATCCTGAGGT
Rac2	GGACAGCAAGCCAGTGAAC	GGAGAAGCAGATGAGGAAGAC
Rac3	GTGATGGTGGACGGGAAAC	CACTTGGCACGAACTTCTC
Actin	TCCCTGGAGAAGAGCTACGA	AGGAAGGAAGGCTGGAAGAG

Résultats complémentaires

Activation de RhoB sous Vemurafenib

L'article en préparation montre qu'en réponse au Vemurafenib, l'expression de RhoB est fortement induite, résultat de son activation transcriptionnelle. En revanche le statut d'activation de RhoB n'a pas été caractérisé dans cette étude. Or, de nombreux stress connus pour induire l'expression de RhoB augmentent également son niveau d'activation. Nous citerons à titre d'exemple les UV et la Camptothécine (Canguilhem *et al.*, 2005; Mamouni *et al.*, submitted).

Afin d'analyser le niveau d'activation de RhoB en réponse au Vemurafenib, un anticorps recombinant anti-pan-Rho activées développé au laboratoire a été utilisé (Keller, données non publiées). Après 48 h de traitement par le PLX4032, le taux des formes totale et activée de RhoB est respectivement augmenté d'un facteur 5 et 10 (Figure I). Suggérant que parallèlement à l'augmentation de son expression, RhoB est activé avec une augmentation d'un facteur 2 du rapport forme activée/forme totale. De plus, la quantification des formes actives de RhoA et RhoC montre que la forme active de RhoA est également augmentée d'un facteur de 2 alors que celle de RhoC reste stable.

Les formes actives de RhoA et RhoB sont augmentées toutes 2 d'un facteur proche de 2 suggérant qu'un même régulateur pourrait en être la cause. Il pourrait correspondre à une RhoGAP ou une RhoGEF commune à RhoA et B mais ne reconnaissant pas RhoC. XPLN, GEF spécifique de RhoA et B apparaît comme un candidat potentiel. Ces données sont issues d'une seule expérience préliminaire et devront être confirmées.

Mécanisme de mort cellulaire

Nous avons montré dans l'article en préparation présenté ci-avant que la prévention de l'induction de RhoB sous PLX4032 induisait l'apoptose via la diminution de l'activation d'AKT. Dans le but d'identifier les acteurs moléculaires impliqués dans cette apoptose, nous avons dans un premier temps analysé l'expression des membres de la famille Bcl-2.

Nous nous sommes en particulier intéressés aux protéines pro-survie Bcl-2, Bcl-xL et aux protéines pro-apoptotiques Bax et Bim. Ces protéines apparaissent comme des candidats particulièrement pertinents car d'une part il a été montré dans des kératinocytes que RhoB favorisait la survie via AKT en modulant le ratio Bax/Bcl-2 (Meyer *et al.*, 2013), d'autre part que la perte Bim-EL pouvait être impliquée dans la résistance à l'apoptose en réponse au Vemurafenib (Shao and Aplin,

2012) et enfin que Bcl-xL pouvait participer à la limitation de l'efficacité des inhibiteurs de la voie MAPK (Corcoran *et al.*, 2013).

L'expression de Bcl-2 et de Bcl-xL n'est modifiée ni par le PLX4032, ni par la déplétion de RhoB (Figure II-A). Concernant Bim, sous PLX4032, une augmentation des 3 formes EL, S et L peut être observée, mais qui n'est pas modulée par la déplétion de RhoB. Enfin, l'expression de la forme conventionnelle de Bax de 21 kDa n'est pas modifiée, cependant, une forme plus courte de 18 kDa est présente lorsque les voies MAPK et RhoB sont conjointement inhibées (Figure II-A).

Cette forme de 18 kDa semble jouer un rôle pro-apoptotique : la forme tronquée ayant perdu le domaine impliqué dans la liaison de Bax à Bcl-2 et Bcl-xL, ne serait alors plus neutralisée par Bcl-2 et Bcl-xL et induirait donc l'apoptose. 2 mécanismes de génération de cette forme tronquée ont été décrits dans la littérature (Figure II-B). Selon le premier, Bax serait clivé par les calpaïnes, elles-mêmes activées en réponse au stress et induirait alors le relargage du cytochrome C depuis la mitochondrie, activant les caspases conduisant *in fine* à l'apoptose (Cao *et al.*, 2003). Selon le deuxième, Bax serait clivé par les caspases et participerait seulement au phénomène d'amplification du signal apoptotique (Choi *et al.*, 2001).

Dans notre cas, l'utilisation d'un inhibiteur de calpaïnes, la Calpeptine n'a permis de prévenir ni le clivage de Bax, ni l'induction de l'apoptose illustrée par le clivage de la caspase 3 et de PARP (Figure II-C). De plus, la mesure par cytométrie de l'activité enzymatique des calpaïnes n'a pas montré de modification de cette dernière en présence d'un ARNi dirigé contre RhoB par rapport au contrôle (Figure II-D). Finalement, l'utilisation du Z-VAD-FMK, inhibiteur de caspases, permet de diminuer à la fois le clivage de PARP et de Bax démontrant que dans ce cas de figure Bax est clivé en aval de caspase (Figure II-E).

Afin d'élargir le spectre de effecteurs de l'apoptose, un profil d'expression protéique de ces derniers a été réalisé à l'aide d'un kit commercial. Les quantifications sont présentées dans le tableau I. Nous noterons que l'expression de SMAC/Diablo, HO-1, c-IAP1 ainsi que celle de la forme phosphorylée de Rad17 sont modifiées entre la condition PLX4032/siCTRL et PLX4032/siRhoB. L'expression de HO-1 et de c-IAP1 a été analysée ensuite par western blot. Cependant, nous ne sommes pas parvenus à détecter HO-1 et aucune différence n'a été observée avec c-IAP1 (données non montrées) mettant en cause la validité des résultats de cette expérience.

La voie de signalisation précise par laquelle la voie AKT contrôle l'apoptose sous PLX4032 dans les cellules de mélanomes reste donc à établir.

Exploration des autres fonctions de RhoB dans la réponse au Vemurafenib

Migration et Invasion

L'article ci-avant s'est focalisé sur le rôle de l'induction de RhoB sous PLX4032 dans la survie cellulaire. Cependant, l'inhibition de la voie MAPK dans les cellules de mélanome, outre son rôle sur la survie et la prolifération, est également capable d'inhiber la migration et l'invasion (Bousquet *et al.*, 2009). Les RhoGTPases, et en particulier RhoB, intervenant également dans ces processus, nous avons voulu déterminer si l'induction de RhoB participait à l'activité anti-migratoire et anti-invasive du PLX4032.

Nous avons observé que la déplétion de RhoB augmente l'activité anti-migratoire du PLX4032. Ceci pourrait suggérer que l'induction de RhoB sous PLX4032 s'oppose à l'activité anti-migratoire du PLX4032 (Figure III-A). Cependant, étant donné que la déplétion de RhoB augmente la sensibilité des cellules au PLX4032, il n'est pas exclu que cet effet soit simplement lié au différentiel du nombre de cellules.

Concernant, l'invasion, dans des modèles de chambre de Boyden, nous avons observé que contrairement aux résultats publiés par le laboratoire dans un modèle de cellules pulmonaires (Bousquet *et al.*, 2009), la déplétion de RhoB inhibe très fortement l'invasion dans les cellules WM266-4. Quant au PLX4032, il inhibe totalement l'invasion et l'ARNi dirigé contre RhoB ne modifie par cet effet (Figure III-B).

De la même manière, dans des modèles de sphéroïdes inclus en matrice les ARNi dirigés contre RhoB diminuent l'invasion et augmentent l'effet anti-invasif du PLX4032 (Figure III-C et D).

Le PLX4032 inhibe fortement la migration et l'invasion. Cependant, du fait de l'activité de RhoB sur la prolifération, il est difficile de conclure sur son rôle dans l'activité anti-migratoire et anti-invasive propre du PLX4032.

Mitose

Au cours des analyses de cycle cellulaire présentées dans l'article, nous avons pu constater que le traitement par le PLX4032 induisait une forte proportion de cellules binuclées. Cette observation a été faite par FACS et en immunofluorescence (Figure IV-A). Ce phénomène semble extrêmement original et n'a jamais été décrit dans la littérature.

Or des travaux du laboratoire ont montré que RhoB, en particulier la forme farnésylée, prévenait la mort post-mitotique en réponse aux radiations ionisantes en prévenant la surduplication des centrosomes. De plus, des données récentes du laboratoire suggèrent que RhoB pourrait également participer à la cytokinèse et notamment compenser les défauts de cytokinèse induits par la Blebbistatine (Gence *et al.*, données non publiées). Par conséquent, ces résultats laissent supposer que RhoB pourrait intervenir en réponse au PLX4032 dans la binucléation précédemment présentée et/ou dans la réponse cellulaire à ce processus.

Cependant la déplétion de RhoB ne modifie pas le taux de binucléation suggérant que RhoB n'intervient pas dans ce phénomène (Figure IV).

Ces résultats démontrent un effet inattendu et non décrit du Vemurafenib qui pourrait intervenir dans la réponse thérapeutique de ce dernier. De plus amples investigations sur ce phénomène semblent intéressantes à conduire.

RhoB peut-il constituer un biomarqueur prédictif de réponse au Vemurafenib ?

Les résultats présentés dans l'article montrent que RhoB est impliqué dans la réponse cellulaire au PLX4032. Il nous est apparu intéressant de déterminer si RhoB joue également un rôle chez les patients et en particulier s'il peut constituer un biomarqueur prédictif de réponse. En effet, certains patients sont résistants d'emblée au Vemurafenib, il serait judicieux de pouvoir les identifier initialement afin de leur proposer un autre traitement alternatif tel que l'Ipilimumab ou une inclusion dans un protocole d'essai clinique. De plus, au sein des patients répondeurs, il existe une grande hétérogénéité sur la durée de cette réponse. Dans ce cas aussi, il pourrait être intéressant de pouvoir identifier les patients répondeurs de courte durée afin qu'ils puissent suivre un autre traitement ou une association thérapeutique plus efficace sur la durée.

Nous avons montré dans l'article que l'induction de RhoB sous PLX4032 était responsable d'une atténuation de la réponse cellulaire. A ce titre, une expression constitutive forte pourrait également être à l'origine d'une moindre réponse.

Afin de tester l'hypothèse d'une corrélation entre l'expression de RhoB et la réponse cellulaire, nous avons analysé sur un panel de lignées cellulaires de mélanome métastatique porteuses de mutation de *BRAF*^{V600X}, l'expression de RhoB avant et après traitement et déterminé leur IC50 vis-à-vis du PLX4032. Les résultats sont présentés dans la figure V-A à C.

Comme l'indique la Figure V-D à F, l'expression constitutive de RhoB est corrélée avec l'IC50 des lignées cellulaires testées. Un fort taux basal induit une résistance au PLX4032. En revanche l'expression après traitement et le facteur d'induction ne semblent pas être corrélés à la réponse.

Une analyse de l'expression de RhoB au sein d'une petite cohorte de patients est actuellement en cours à la recherche d'une telle corrélation.

Les résultats présentés dans l'article montrent que l'induction de RhoB sous PLX4032 est impliquée dans la résistance à ce dernier. Nous avons souhaité déterminer ici si une forte expression de RhoB était directement en lien avec la résistance montrée dans les corrélations présentées-ci dessus. Pour cela la sensibilité au PLX4032 en réponse à l'inhibition de RhoB a été mesurée dans la lignée 501mel exprimant très fortement RhoB, n'induisant pas RhoB en réponse au PLX4032 et présentant une IC50 > 5 mM. Bien que la déplétion de RhoB soit efficace, aucun effet de cette dernière n'a pu être cependant observé sur la sensibilité au PLX4032 (Figure VI). Ainsi dans la lignée cellulaire testée nous n'avons pas pu montrer que la seule déplétion de RhoB pouvait re-sensibiliser ces cellules.

Par conséquent, ces résultats montrent que l'expression constitutive pourrait constituer un marqueur prédictif de réponse indépendamment de son rôle propre. Ces résultats sont bien entendu à confirmer sur un plus large panel de lignées cellulaires et sur une cohorte de patients. Ce dernier point est actuellement en cours d'étude.

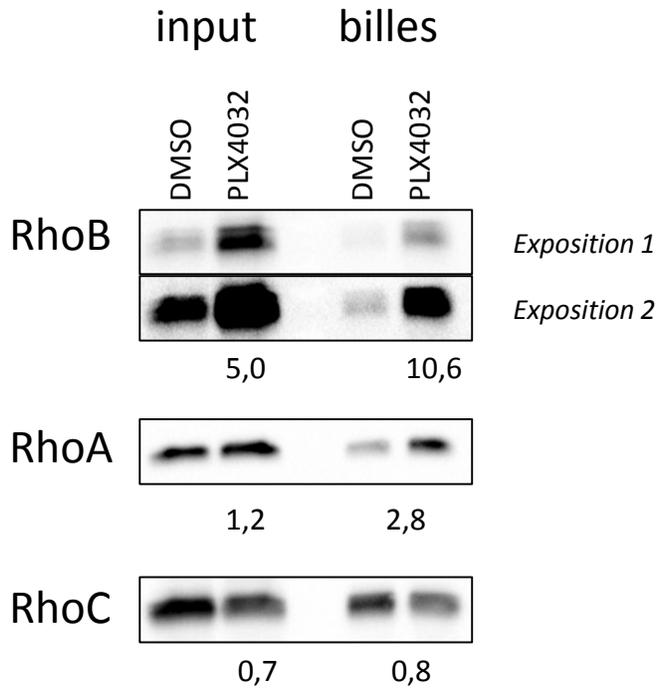


Figure I: Immunoprécipitation des Rho-GTP

Les cellules WM266-4 ont été traitées ou non par du PLX4032 à 1 μ M pendant 48 h. Les lysats ont été mis en contact avec un anticorps synthétique H12 spécifique des protéines Rho liées au GTP. Après lavage, les billes, ainsi que du lysat total ont été déposés sur gel d'acrylamide et révélée par western blot.

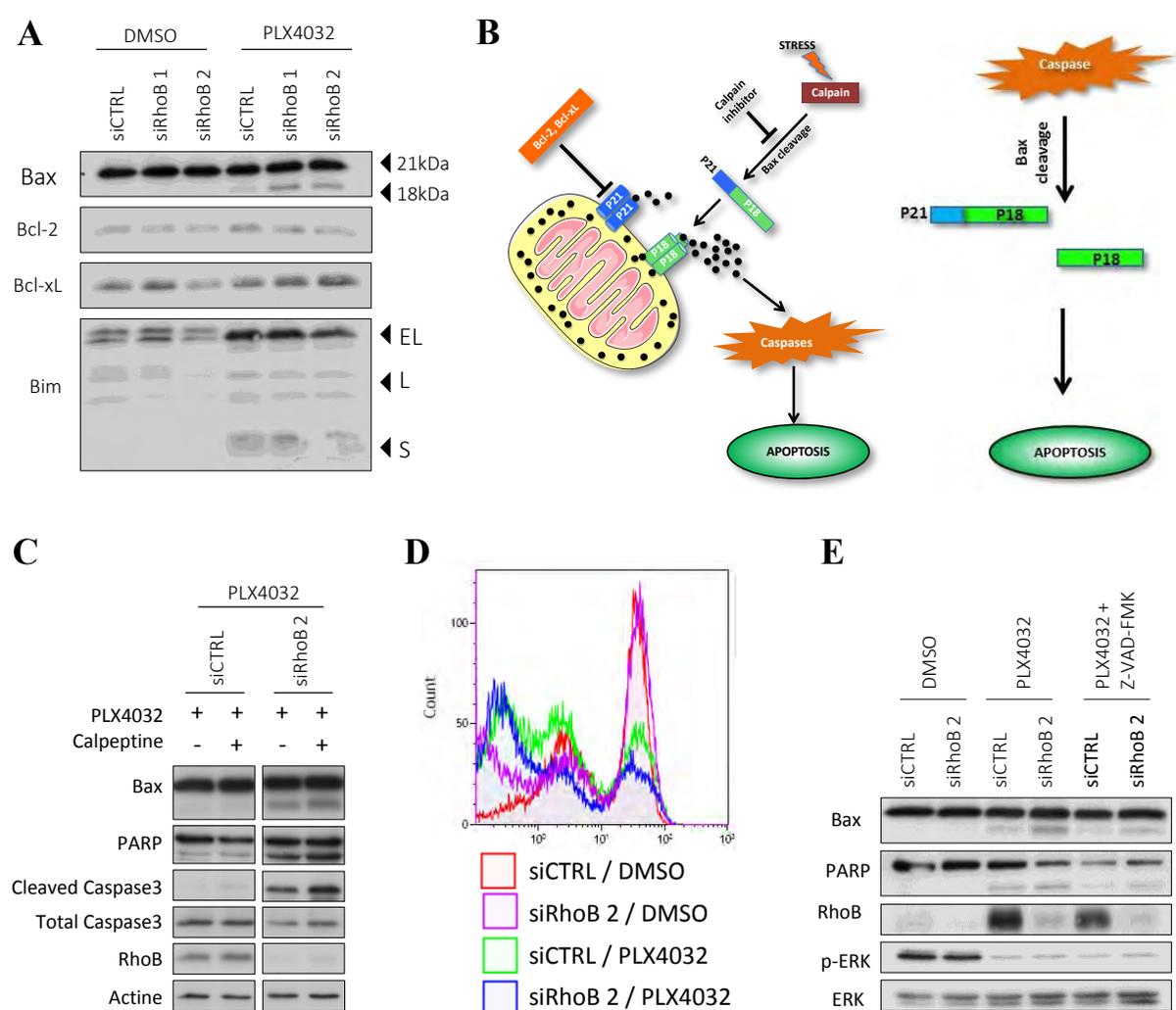


Figure II : Implication des membres de la famille de Bcl-2 et en particulier de Bax dans l'apoptose induite sous PLX4032 par la déplétion de RhoB

A: Les cellules WM266-4 ont été transfectées avec des ARNi ciblant RhoB ou un ARNi contrôle puis traitées ou non avec 2 μ M de PLX4032 pendant 72 h. Les lysats cellulaires obtenus ont été analysés par western blot

B: Mécanisme de clivage de Bax décrit dans la littérature (Adapté de Cao, 2003 et Choi, 2001)

C: Les cellules WM266-4 transfectées avec un ARNi contrôle ou ciblant RhoB sont traitées avec 2 μ M de PLX4032 additionné ou non de 25 μ M de Calpeptine. Après 72 h, les lysats cellulaires obtenus ont été analysés par western blot.

D: Les cellules WM266-4 transfectées avec un ARNi contrôle ou ciblant RhoB, ont été traitées ou non avec 2 μ M de PLX4032. Après 72h, les cellules ont été incubées pendant une 1h avec un substrat fluorogénique des calpaïnes, le t-BOC, puis analysées par cytométrie en flux

E: Western blot des cellules WM266-4 transfectées avec un ARNi contrôle ou ciblant RhoB puis traitées ou non avec 2 μ M de PLX4032 et du Z-VAD-FMK 50 μ M, 72 h

Protéine	DMSO		PLX4032	
	siCTRL	siRhoB 2	siCTRL	siRhoB 2
Bad	1,00	0,99	0,90	0,88
Bax	1,00	0,98	0,94	0,94
Bcl-2	1,00	0,87	0,84	0,93
Caspase 3 totale	1,00	0,97	0,93	0,91
Caspase 3 clivée	1,00	0,96	0,87	0,91
Catalase	1,00	1,02	0,91	0,92
c-IAP1	1,00	0,94	1,00	0,64
c-IAP2	1,00	0,98	1,02	1,03
Claspin	1,00	0,99	0,74	0,75
Clusterin	1,00	1,03	1,07	1,12
Cytochrome c	1,00	0,94	1,34	1,24
TRAIL R1	1,00	0,89	0,79	0,79
TRAIL R2	1,00	0,76	0,61	0,68
FADD	1,00	0,92	0,90	0,83
FAS	1,00	0,78	1,07	0,91
HIF-1α	1,00	1,07	1,05	1,11
HO-1	1,00	0,98	2,09	1,13
HO-2	1,00	0,96	0,89	0,69
HSP27	1,00	1,06	1,03	0,87
HSP60	1,00	1,01	1,00	0,96
HSP70	1,00	1,02	1,05	0,91
HTRA2	1,00	0,93	1,06	0,94
Livin	1,00	0,88	0,53	0,42
PON2	1,00	0,85	0,80	0,76
P21	1,00	2,02	0,96	1,12
p27	1,00	1,01	1,37	1,30
P53-p(S15)	1,00	0,96	1,04	1,03
P53-p(s46)	1,00	1,06	1,18	1,22
P53—(s392)	1,00	1,14	1,40	1,26
Rad17-P	1,00	1,12	1,55	1,04
SMAC/Diablo	1,00	1,01	1,18	0,82
Claspin	1,00	0,68	0,59	0,49
TNF	1,00	0,95	1,19	1,12
XIAP	1,00	0,81	0,77	0,74

Tableau I : Profil d'expression protéique de marqueur apoptotique

Les cellules WM266-4 ont été transfectées avec un ARNi contrôle ou ciblant RhoB puis traitées ou non avec 2 μM PLX4032 pendant 72h.

Les cellules ont ensuite été lysées et les lysats incubés avec les membranes d'immuno-array (R&D) puis ces dernières ont été révélées par chemiluminescence et les spots quantifiés par analyse d'image.

Les ratios de chaque condition par rapport à la condition siCTRL/DMSO sont reportés dans le tableau et en rouge sont indiqués les facteurs pour lesquels la différence entre les condition siCTRL / PLX4032 et siRhoB / PLX4032 est supérieure à 50% et en orange ceux pour lesquels elle est supérieure à 25%

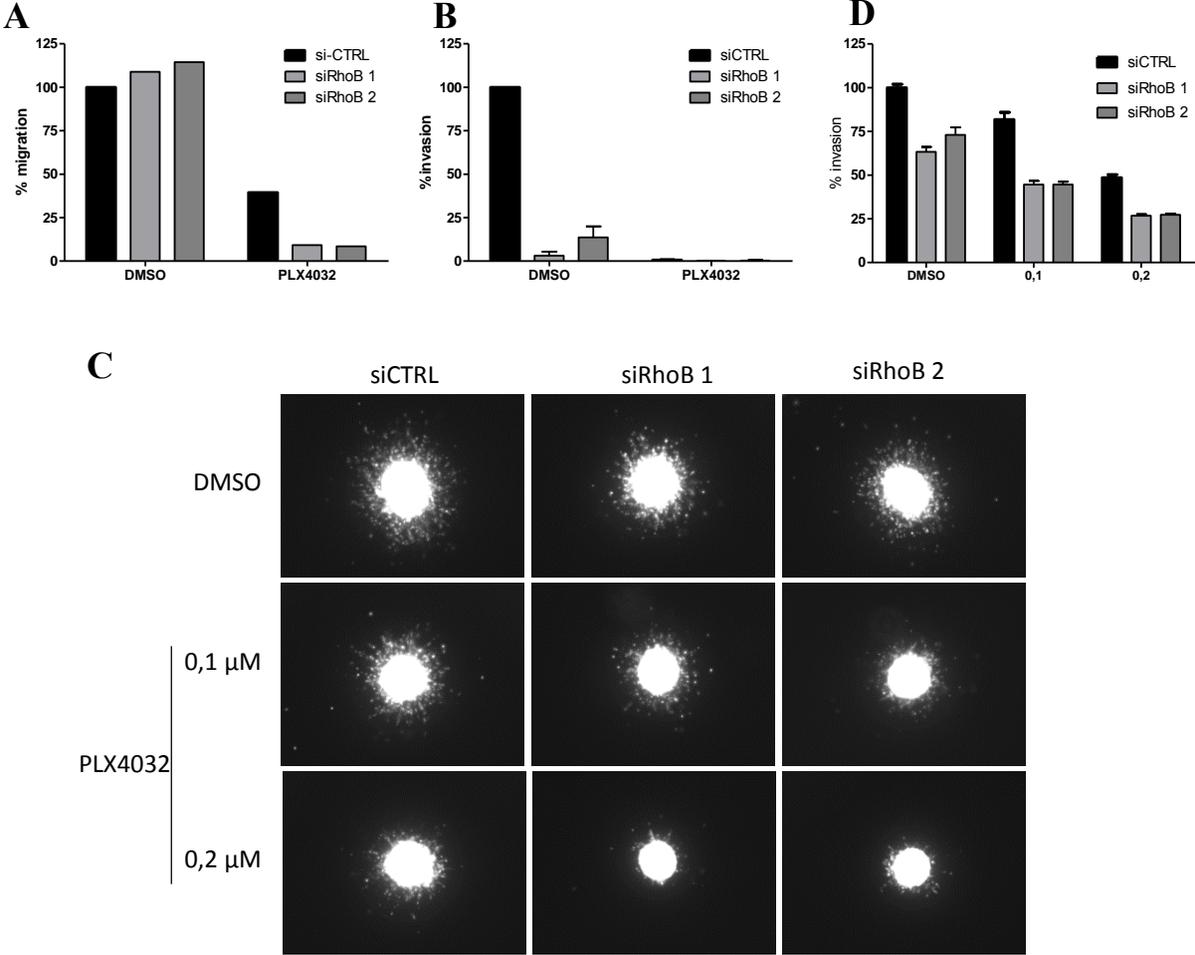


Figure III : Rôle de l'induction de RhoB sous PLX4032 dans la migration et l'invasion cellulaires

A et B : Capacités de migration (A) et d'invasion (B) des cellules WM266-4 préalablement transfectées avec des ARNi ciblant RhoB et traitées ou non avec du PLX4032 48 h, évaluées en chambre de Boyden coatées (B) ou non (A) avec du matrigel.

C et D : Invasion des sphéroides de cellules WM266-4 transfectées avec des ARNi ciblant RhoB ou contrôle inclus en matrice de collagène (D) et quantification correspondantes ©.

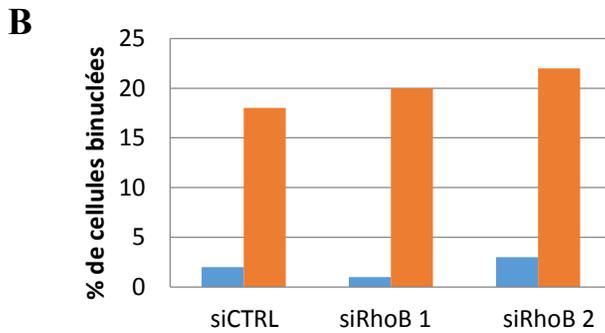
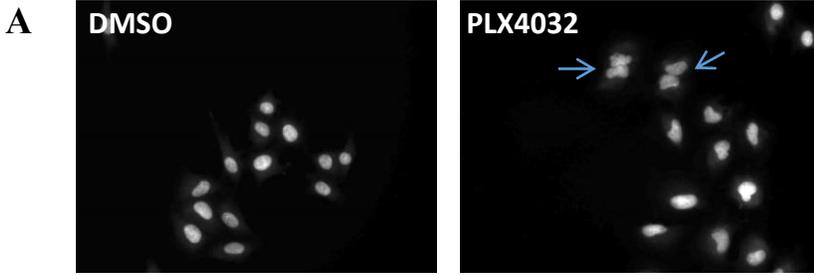


Figure IV : Le PLX4032 induit la binucléation des cellules indépendamment de l'induction de RhoB

Les cellules WM266-4 transfectées avec un ARNi ciblant RhoB ou contrôle traitées ou non avec 2 μ M de PLX4032 pendant 72 h, colorées avec du DAPI, ont été observées par microscopie à fluorescence (A) et le nombre de cellules binucléées a été quantifié (B). Les flèches montrent des exemples de cellules binucléées.

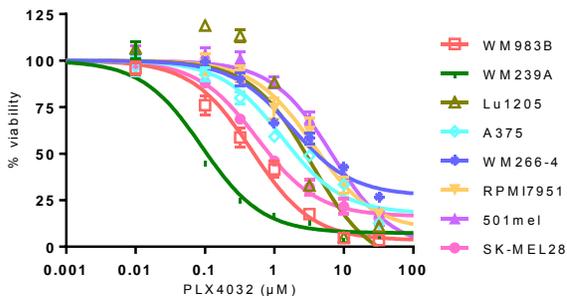
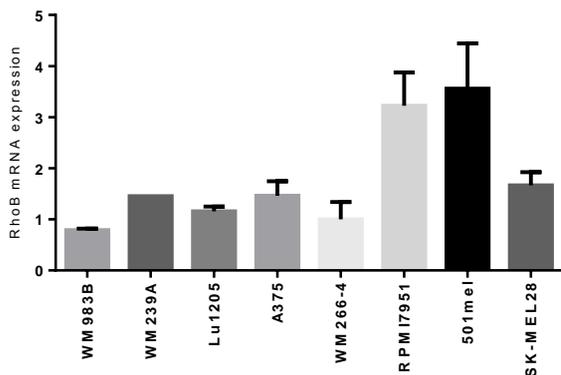
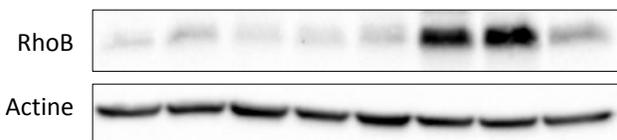
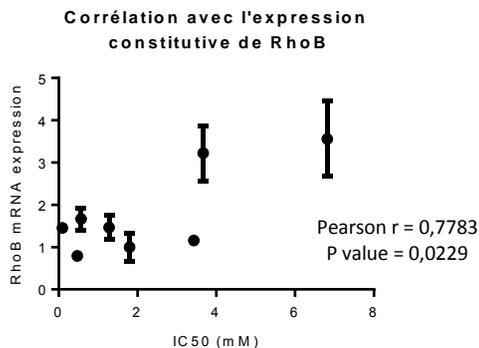
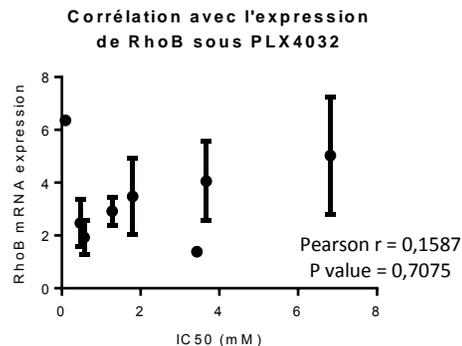
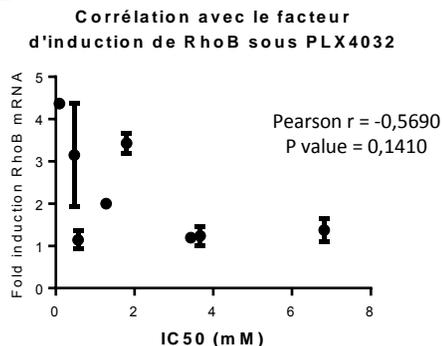
A**B****C****D****E****F**

Figure V : Corrélation entre l'expression de RhoB et la sensibilité au PLX4032 dans des lignées cellulaires de mélanomes métastatiques porteurs de mutations *BRAF*^{V600X}

A : Mesure de l'IC₅₀ du PLX4032 de lignées de mélanome par MTS suite à 72 h de traitement

B et C : Expression de RhoB dans les lignées de mélanomes analysées par RT-qPCR (B) et western blot (C).

D, E, F : Corrélation entre l'IC₅₀ du PLX4032 et l'expression RhoB constitutive ou après traitement par du PLX4032 (1 μM, 48 h) mesurée par RT-qPCR.

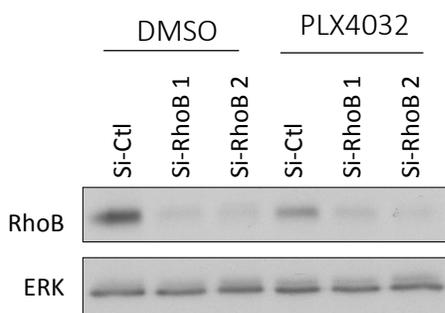
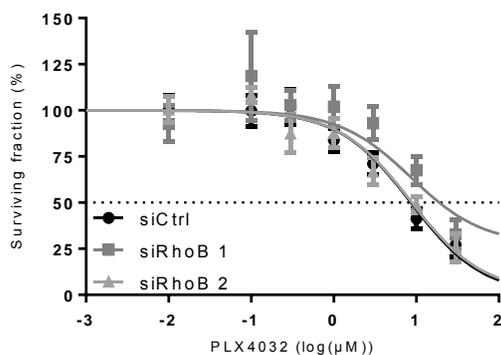
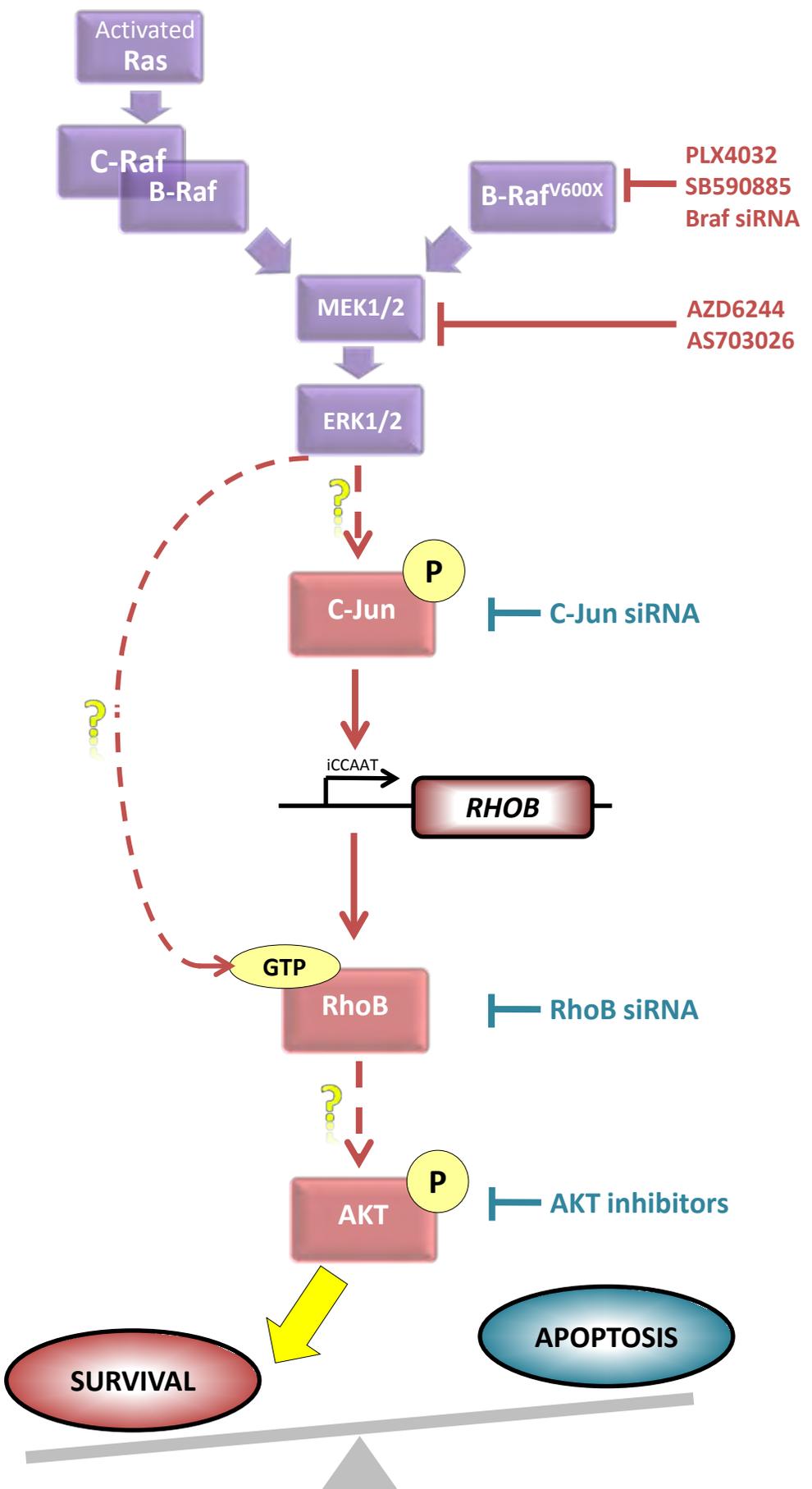
A**B**

Figure VI : Réponse des cellules 501mel au PLX4032 et à la déplétion de RhoB

A : Western blot des cellules 501mel transfectées avec un ARNi contrôle ou des ARNi ciblant RhoB puis traitées ou non avec 2 μM de PLX4032 pendant 72h.

B: Les cellules 501mel transfectées avec un ARNi contrôle ou des ARNi ciblant RhoB ont été traitées 72h avec différentes concentrations de PLX4032 puis la viabilité a été mesurée par MTS.



Discussion

Au cours de ces travaux nous avons mis en évidence, l'activation de la voie c-Jun/RhoB/AKT en réponse à l'inhibition de la voie Ras/Raf/MEK/ERK dans les cellules de mélanome. Cette dernière participe à la survie cellulaire et potentiellement à la résistance aux inhibiteurs de la voie MAPK utilisés en clinique tel que le Vemurafenib, le Dabrafenib et le Trametinib. La voie de signalisation identifiée est présentée dans le schéma ci-contre.

L'activation de RhoA et RhoB en réponse au Vemurafenib

Nos résultats montrent qu'en réponse au Vemurafenib l'expression de RhoB est induite par une activation transcriptionnelle. Cette induction s'accompagne également d'une augmentation de sa forme activée.

Le mécanisme conduisant à cette activation n'a pas été élucidé. Cependant, XPLN pourrait entrer en jeu. En effet, l'activité de RhoA et RhoB mais pas de RhoC est également augmentée en réponse au Vemurafenib, or XPLN est une GEF commune à RhoA et RhoB ne reconnaissant pas RhoC (Arthur, 2002).

Nos données sur l'activation de RhoA en réponse au Vemurafenib rejoignent l'article de Klein & Higgins (Klein and Higgins, 2011). Cet article montre en effet que si l'expression de RhoA n'est pas modifiée en réponse au Vemurafenib elle joue un rôle dans la migration résiduelle sous Vemurafenib et potentiellement la résistance à ce dernier. Cela pourrait être expliqué par une augmentation de son activité en réponse au Vemurafenib comme le montre nos données.

Le contrôle de l'expression de RhoB par c-Jun

En réponse au Vemurafenib, les facteurs d'induction de la protéine, de l'ARNm et de l'activité du promoteur sont comparables (facteur proche de 2 à 24h et atteignant 5 après 48 h de traitement) suggérant que l'activation transcriptionnelle est le seul facteur en cause. Cela semble assez surprenant car le plus souvent plusieurs mécanismes coopèrent pour induire RhoB en réponse au stress. Par exemple, en réponse aux UV, il y a une activation transcriptionnelle, une stabilisation du messager et une augmentation de la traduction (Canguilhem *et al.*, 2005; Glorian *et al.*, 2011).

Au niveau de l'activation transcriptionnelle, il a été montré que les facteurs c-Jun, ATF-2 et NF-YA sont impliqués dans l'induction de RhoB sous stress en particulier en réponse aux UV (Ahn *et al.*,

2011). Ces derniers se fixeraient au niveau des séquences CCAAT (pATF2 surtout sur la iCCAAT, c-Jun sur les 2 CCAAT et P300 au niveau de la CCAAT), induirait le décrochage de HDAC1 permettant le recrutement de P300 et la surexpression de RhoB. Dans cet article, le raccourcissement du promoteur de RhoB induit une diminution progressive de l'induction suggérant que la séquence iCCAAT ne serait pas la seule requise. Au contraire un article précédent, montrait que sous UV, l'induction de RhoB impliquait également NF-YA, ATF-2 et un autre facteur non identifié (dont nous pouvons, à juste titre, supposer qu'il s'agirait de c-Jun) mais dépendait uniquement de la iCCAAT (Fritz and Kaina, 2001).

Dans notre cas, seule l'iCCAAT semble jouer un rôle étant donné qu'un même facteur d'induction est retrouvé avec toutes les constructions utilisées et seule la mutation de l'iCCAAT la prévient. Cependant la mutation de l'iCCAAT ne prévient que de manière partielle l'augmentation de l'activité du promoteur en réponse au Vemurafenib. Ceci pourrait suggérer qu'une autre séquence soit impliquée, bien qu'aucun site de régulation ne soit décrit sur le petit fragment de promoteur responsable de l'augmentation résiduelle d'activité en réponse au Vemurafenib.

De plus, afin d'attester que la réponse au Vemurafenib induit le même mécanisme que celui décrit plus haut, des analyses de ChiP seraient nécessaires pour prouver la fixation de c-Jun sur le promoteur de RhoB ainsi que l'échange entre HDAC1 et P300. Nous avons tenté de montrer que l'Histone Acétyl Trasférase (HAT) P300 était impliquée dans l'induction de RhoB à l'aide d'inhibiteurs de P300 (Garcinol et Curcumin). Cependant aucun effet sur l'induction de RhoB n'a pu être mis en évidence (données non montrées). Par ailleurs les inhibiteurs de HAT disponibles sont peu spécifiques, ont une faible solubilité et nous ne disposons pas de moyen technique pour s'assurer de leur action sur la cible. Il aurait été plus judicieux d'utiliser un ARNi.

Néanmoins, nous ne pouvons nous empêcher de souligner que l'induction de RhoB n'est que partiellement prévenu par l'ARNi dirigé contre c-Jun suggérant par conséquent que d'autres facteurs pourraient intervenir.

Enfin, l'effet de l'ARNi de c-Jun sur la sensibilité au PLX4032 est plus fort que celui de l'ARNi de RhoB et la surexpression de RhoB ne prévient que partiellement l'effet de l'ARNi c-Jun suggérant que la sensibilité induite par la déplétion de c-Jun ferait intervenir des facteurs supplémentaires. En effet, c-Jun contrôle l'expression de nombreux gènes en particulier via les sites AP-1. Etant donné l'effet majeur de l'ARNi c-Jun sur la sensibilité au PLX4032, il semblerait pertinent de mieux comprendre à la fois son mécanisme d'induction mais également les voies autres que celles de RhoB par lesquelles il intervient dans la réponse PLX4032.

En conclusion, nos travaux ont montré l'implication de l'iCCAAT du promoteur de RhoB ainsi que de c-Jun dans l'induction de RhoB en réponse au PLX4032. Cependant, plusieurs zones d'ombres persistent et des expériences supplémentaires seraient nécessaires afin de déterminer le mécanisme moléculaire exact. En effet, il a été décrit que l'induction de RhoB en réponse au TGF β faisait intervenir

la fixation de Smad3 sur l'iCCAAT ou une séquence superposée (Vasilaki *et al.*, 2010). Bien qu'il n'ait pas été décrit à ce jour de modulation de la voie du TGF β en réponse au PLX4032, une telle altération n'est pas à exclure, et Smad3 pourrait alors participer à la modulation de RhoB dans la réponse au PLX4032.

L'activation de c-Jun en réponse au Vemurafenib

Alors que l'activation d'ERK est plutôt décrite pour activer c-Jun (Lopez-Bergami, 2011; Lopez-Bergami *et al.*, 2007; Meng and Xia, 2011), nos travaux mettent en évidence que l'inhibition de la voie MAPK par le Vemurafenib provoque l'induction de c-Jun. Ceci semble assez inattendu, néanmoins une étude de transcriptomique réalisée dans l'équipe du Pr Marais a mis en évidence l'induction de c-Jun en réponse à au moins 24 h d'inhibition de la voie MAPK dans des cellules de mélanomes par des inhibiteurs de B-Raf ou de MEK (Packer *et al.*, 2009). Ces données sont disponibles dans les informations fournies en ligne en complément de l'article mais ne sont absolument pas commentées. De plus, un poster présenté au congrès de l'AACR en 2013, mettait également en évidence par une étude de protéomique l'induction de la forme totale et phosphorylée de c-Jun en réponse à au moins 24 h d'inhibition de la voie MAPK dans des cellules de mélanomes (Fallahi-Sichani *et al.*, 2013). Ces 2 études soutiennent ainsi nos données.

Le mécanisme conduisant à l'activation de c-Jun observée dans notre travail reste à déterminer. Les voies MAPKs non canoniques, JNK et plus épisodiquement p38, ont été décrites pour activer c-Jun en particulier au cours de processus conduisant à l'induction de RhoB (Ahn *et al.*, 2011; Kim *et al.*, 2010b). Cependant dans le contexte de ces travaux, JNK et p38 ne semblent pas impliquées. En effet, le traitement des cellules par le PLX4032 n'induit pas l'activation de ces MAPKs et aurait au contraire tendance à les inhiber. De plus l'utilisation d'inhibiteurs de ces kinases ne prévient pas l'induction de c-Jun. Si initialement nous avons émis l'hypothèse de l'implication de rétrocontrôles croisés entre les voies MAPKs pouvant en particulier faire intervenir les DUSPs, cette hypothèse est invalidée par l'absence de lien avec p38 et JNK.

En dehors de JNK, peu de voies alternatives d'activation de c-Jun ont été décrites. Un article décrit l'activation de c-Jun dans des cellules de mélanome en réponse à la surexpression de RhoC mais non à celle de RhoA ou de RhoB (Spangler *et al.*, 2012). Dans nos travaux ni l'expression ni l'activation de RhoC ne sont modifiées éliminant l'hypothèse que c-Jun serait induit par la modulation de RhoC.

Visiblement il existe 2 mécanismes parallèles conduisant d'une part à l'induction de la forme totale et d'autre part à celle de la forme activée de c-Jun. En effet, nous avons observé que l'augmentation de l'expression de c-Jun totale est détectable dès 2 h alors que celle de la forme activée n'est manifeste que plus tardivement (après 24 h). Or le mécanisme de régulation de c-Jun habituellement décrit correspond à une activation de c-Jun qui, via un rétrocontrôle positif sur son

propre promoteur, induit son expression par activation transcriptionnelle (Meng and Xia, 2011). Dans nos travaux, le mécanisme est vraisemblablement différent étant donné que l'augmentation de la forme totale précède celle de la forme activée et reste à élucider.

Les microARNs pourraient intervenir. D'une part, l'inhibition de la voie MAPK dans des cellules de mélanomes mutées *BRAF* modifie l'expression de nombreux microARNs (Couts *et al.*, 2012). D'autre part, plusieurs microARNs ont été décrits pour réguler l'expression de c-Jun comme les miR-125b et miR-155 (Kappelmann *et al.*, 2012; Song *et al.*, 2012a). Toutefois aucun de ces microARNs n'est retrouvé dans l'étude précédente.

La voie RhoB / AKT

Dans le modèle proposé, RhoB via l'activation d'AKT participe à la survie des cellules en réponse au PLX4032. Comme cela a été détaillé dans la revue bibliographique, RhoB peut être pro ou anti-apoptotique et dans les 2 cas, l'implication d'AKT et de NF- κ B a été décrite. La voie NF- κ B n'a pas tout été étudiée au cours de ces travaux. En revanche la voie AKT semble résumer l'intégralité de l'effet de la déplétion de RhoB sur la sensibilité au PLX4032. L'expression d'AKT-myr, mutant myristoylé d'AKT et constitutivement actif, prévient complètement la sensibilité induite par l'ARNi de RhoB. Cependant, il n'est pas à exclure l'existence d'autres mécanismes totalement masqués lors des expériences de ré-expression du fait de la forte surexpression d'AKT-myr dans le modèle utilisé.

Si la régulation de la voie AKT par RhoB a déjà été décrite, le mécanisme en jeu reste à déterminer. Comme cela été présenté dans la revue bibliographie, PP2A et/ou PKN pourraient intervenir. A ce jour, nous n'avons aucun argument nous permettant de prédire quelle voie pourrait être impliquée.

Induction de l'apoptose via l'inhibition d'AKT

Nos travaux montrent sans équivoque que l'inhibition conjointe de la voie MAPK et d'AKT présente une activité synergique *in cellulo*. Alors que d'une part les inhibiteurs d'AKT ont peu d'effet sur la prolifération et aucun sur l'apoptose (illustré par l'absence de clivage de PARP) et que d'autre part le PLX4032 n'induit qu'une apoptose très modérée, il existe une forte létalité en réponse à l'association. Ces travaux soutiennent l'intérêt de l'évaluation d'une telle association thérapeutique chez les patients.

Cependant, nous ne sommes pas parvenus à déterminer le mécanisme moléculaire d'induction de l'apoptose. En effet, si l'implication des caspases ne fait aucun doute, les effecteurs précis par lesquels l'inhibition d'AKT active les caspases restent inconnus. Le profil d'expression des effecteurs de l'apoptose que nous avons réalisé n'a été que peu informatif. En effet, seuls 4 marqueurs peu

pertinents étaient modifiés, et apparaissent peu fiables puisque après analyse par western blot, aucune variation d'expression n'a pu être retrouvée.

La voie PI3K/AKT contrôle de nombreuses voies de signalisation pouvant influencer la survie, le mécanisme le plus couramment décrit correspondant à l'inhibition de la protéine pro-apoptotique BAD consécutive à sa phosphorylation directe par AKT (Liu *et al.*, 2009). Cependant, les cellules WM266-4 utilisées pour la majeure partie de l'article ne semblent pas exprimer BAD. En effet, aucun des différents anticorps dirigés contre la forme totale et la forme phosphorylée que nous avons testés en western blot n'a révélé de bande. Ces résultats semblent donc mettre en doute l'implication de BAD dans notre cas de figure.

De manière surprenante, l'analyse des cellules avec de l'annexine/PI et l'analyse du potentiel mitochondrial n'ont montré aucune différence (données non montrées). Cependant ceci pourrait être lié à la durée de l'expérience et au fait que la mesure n'a pas été réalisée au temps optimum. En effet, la mort cellulaire est significative à partir de 72 h, c'est en conséquence un mécanisme lent et différent de ceux couramment étudiés avec ces techniques. Toutefois, il n'est pas à exclure que l'apoptose soit induite via un mécanisme original. Cette hypothèse est en particulier soutenue par la présence du clivage de Bax rarement décrit dans la littérature.

Dans tous les cas, à ce jour le mécanisme précis par lequel la perte d'activation d'AKT induit la mort cellulaire reste à définir. L'élucidation de cette voie pourrait déboucher sur la découverte d'une cible thérapeutique plus spécifique qu'AKT. En effet, nous ne pourrions nous empêcher de rappeler que la protéine AKT est au centre d'une voie de signalisation ubiquitaire impliquée dans de nombreux processus cellulaires. Par conséquent, l'index thérapeutique des inhibiteurs d'AKT, en cours de développement, pourrait être étroit et ainsi limiter les doses administrables et donc l'efficacité.

Le Vemurafenib induit une reprogrammation génétique

Au cours de ces travaux nous avons pu montrer qu'en réponse au Vemurafenib, l'expression de nombreux gènes était modifiée dont c-Jun, RhoB, Rac1b, RhoJ, RhoQ, Rnd3/RhoE, Snail, Slug et ZEB1. Dans la majorité des cas la modulation est tardive (à partir de 24 heures), suggérant qu'elle est indirecte.

Nos résultats sont soutenus par l'étude de transcriptomique, menée dans l'équipe du Pr Marais, montrant qu'un grand nombre de gènes sont modulés en réponse à une inhibition de longue durée de la voie MAPK (Packer *et al.*, 2009). En réponse au PLX4720, analogue structural du PLX4032, l'expression de seulement 21 gènes est modifiée après 2 h, de 102 après 6 h et de 346 après 24 h de traitement. Ces données suggèrent que le Vemurafenib induirait une vaste reprogrammation de l'expression génique au sein des cellules de mélanomes. La part de chaque voie de signalisation ainsi modulée dans la réponse ou la résistance thérapeutique reste à définir. Une part non négligeable

d'entre elles pourrait limiter la réponse thérapeutique comme cela est le cas pour la voie c-Jun/RhoB/AKT identifiée dans ces travaux ou FOXD3 comme cela a été montré par les travaux de l'équipe du Pr Aplin (Abel *et al.*, 2013; Basile *et al.*, 2011).

Nous noterons cependant que parmi les gènes que nous avons identifiés seuls c-Jun, Rnd3/RhoE et ZEB1 sont retrouvés dans l'étude de transcriptomique. Cela pourrait être lié à un manque de significativité à 24 h alors que la majorité nos résultats ont été obtenus à 48 h (en particulier, l'expression des ARNm des RhoGTPases). A titre d'exemple pour RhoB, à 24 h l'induction n'a pas encore atteint son maximum. D'autre part, concernant Snail et Slug notre étude a été faite au niveau protéique, la régulation pourrait n'avoir lieu qu'au niveau protéique expliquant l'absence de ces facteurs dans l'étude de transcriptomique. Un poster présenté à l'AACR concernait une étude de protéomique après 6, 24 et 48 h de traitement, il pourra être intéressant de confronter nos données dès lors que ces résultats seront publiés (Fallahi-Sichani *et al.*, 2013).

Importance de l'induction de l'apoptose dans la réponse thérapeutique

L'induction de l'apoptose spécifiquement dans les cellules cancéreuses apparaît comme le Graal en pharmacologie anti-cancéreuse. En effet, l'avantage d'un traitement cytotoxique par rapport à un traitement cytostatique est d'une part la régression tumorale (qui n'est peut-être pas strictement nécessaire dans un contexte de thérapie adjuvante par exemple) et d'autre part la prévention de l'émergence de résistance. Si par essence, les chimiothérapies conventionnelles permettent d'induire l'apoptose, elles ne sont absolument pas spécifiques. Au contraire, si les thérapies ciblées atteignent cet objectif de spécificité, elles sont le plus souvent uniquement cytostatiques et ne parviennent pas à l'élimination complète de la tumeur. Nous citerons l'exemple de l'Imatinib, qui en dépit de réponse hématologique et cytogénétique, rapide et complète, doit être administré à vie suggérant que l'intégralité des cellules leucémiques n'est pas éradiquée mais uniquement mise en dormance.

Dans un tel contexte des stratégies de létalité synthétique ont été développées. Le principe étant d'associer 2 drogues ayant séparément peu ou pas d'effet cytotoxique et dont la combinaison deviendrait fortement cytotoxique. Ce travail doctoral débouche sur la proposition d'une telle combinaison dans le cadre du mélanome. En effet, le PLX4032 n'a qu'un effet modéré *in vitro* sur l'apoptose alors que l'inhibition conjointe de la voie c-Jun/RhoB/AKT augmente fortement cette apoptose. En conséquence outre une augmentation de la réponse, la combinaison avec un inhibiteur d'AKT pourrait prévenir l'apparition de résistance d'autant plus que de nombreux mécanismes de résistance active la voie PI3K/AKT.

RhoB, biomarqueur prédictif de réponse thérapeutique ?

Afin d'améliorer la prise en charge, l'idéal serait de disposer d'un marqueur prédictif de réponse dans l'optique de faire bénéficier aux patients résistants ou faible répondeurs par exemple d'une combinaison thérapeutique. Dans ce but, nous avons cherché à déterminer si une expression forte de RhoB pouvait être un marqueur prédictif de mauvaise réponse au Vemurafenib. Nous avons pu montrer qu'il existait une corrélation entre l'expression de RhoB et une moindre sensibilité. Des marquages sont actuellement en cours sur des biopsies d'une petite cohorte de patients afin de déterminer si une telle corrélation est retrouvée.

Cependant au niveau mécanistique, la déplétion de RhoB dans des cellules résistantes exprimant fortement RhoB ne les sensibilise pas suggérant que si l'expression de RhoB est potentiellement corrélée à la réponse cela pourrait être indépendant de la fonction propre de RhoB et donc du mécanisme mis en évidence dans l'article. Ces résultats doivent tout de même être nuancés, d'une part une seule lignée résistante a été testée, et d'autre part cette lignée possède d'après la base de donnée COSMIC une mutation de la β -caténine. De ce fait, cette lignée pourrait être peu dépendante de la voie MAPK, raison pour laquelle la déplétion de RhoB ne permettrait pas de la resensibiliser. Dans tous les cas ces données sont à confirmer sur un plus large panel de lignées cellulaires.

Conclusions & Perspectives

Au cours de ce travail doctoral, nous avons mis en évidence l'activation de la voie c-Jun/RhoB/AKT en réponse à l'inhibition de la voie MAPK par le Vemurafenib dans les cellules de mélanomes. Si plusieurs zones d'ombre persistent sur le mécanisme moléculaire exact en jeu, il apparaît évident que cette voie pourrait jouer un rôle crucial dans la réponse thérapeutique au Vemurafenib. Effectivement, elle limite l'activité cytotoxique du Vemurafenib sur des cultures cellulaires. En conséquence, nous avons proposé d'associer au Vemurafenib un inhibiteur d'AKT et montrer que cette association était fortement synergique et conduisait à une létalité synthétique.

L'activation de cette voie ainsi que l'activité synergique de l'association proposée restent à démontrer *in vivo*. Une expérimentation chez la souris Nude porteuse de tumeurs de mélanome xenogreffées doit être réalisée dans les semaines à venir afin de valider cette synergie. Des essais cliniques de phase I/II associant le Vemurafenib à un inhibiteur d'AKT sont actuellement en cours. Ils ont vraisemblablement été développés sur une base empirique et nos travaux amènent des arguments moléculaires justifiant pleinement leur développement.

De plus, des effets inattendus du PLX4032 ont été mis en évidence (modulation d'expression de nombreux gènes dont c-Jun, plusieurs RhoGTPases et des facteurs impliqués dans l'EMT) démontrant que le mécanisme d'action de ce dernier est finalement assez mal caractérisé. Afin de mieux comprendre les résistances au Vemurafenib mais également la réponse thérapeutique (en particulier dans l'optique des pouvoir les transposer dans d'autres cancers), il apparaît crucial de complètement déterminer les mécanismes en jeu au niveau moléculaire, cellulaire et de la tumeur dans sa globalité (en particulier le rôle du microenvironnement).

En outre, les mécanismes de résistance pourraient varier en fonction des patients, dans un tel contexte l'identification de facteurs déterminant de la réponse thérapeutique devrait idéalement conduire une personnalisation de la prise en charge via la proposition de combinaisons thérapeutiques spécifiquement adaptés à chaque patient. Nos résultats préliminaires corrélant l'expression de RhoB et la résistance au Vemurafenib sur des lignées cellulaires, pourraient participer, s'ils étaient confirmés sur des biopsies, à cette personnalisation.

(Huelsenbeck *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 2001a; Marlow *et al.*, 2009)

(Ader *et al.*, 2002b; Cimbora-Zovko *et al.*, 2010; Huang *et al.*, 2011; Monferran *et al.*, 2008; Yoneda *et al.*, 2010)

(Narumiya *et al.*, 2009; Ridley, 2013; Sahai and Marshall, 2002)(Lajoie-Mazenc *et al.*, 2008; Madaule *et al.*, 1995)

(Kitzing *et al.*, 2010; Mircescu *et al.*, 2002; Steuve *et al.*, 2006)

Bibliographie

Abel, E.V., and Aplin, A.E. (2010). FOXD3 Is a Mutant B-RAF-Regulated Inhibitor of G1-S Progression in Melanoma Cells. *Cancer Res.* *70*, 2891–2900.

Abel, E.V., Basile, K.J., Kugel, C.H., Witkiewicz, A.K., Le, K., Amaravadi, R.K., Karakousis, G.C., Xu, X., Xu, W., Schuchter, L.M., *et al.* (2013). Melanoma adapts to RAF/MEK inhibitors through FOXD3-mediated upregulation of ERBB3. *J. Clin. Invest.* *123*, 2155–2168.

Ackermann, J., Fruttschi, M., Kaloulis, K., McKee, T., Trumpp, A., and Beermann, F. (2005). Metastasizing melanoma formation caused by expression of activated N-RasQ61K on an INK4a-deficient background. *Cancer Res.* *65*, 4005–4011.

Adachi, M., Fukuda, M., and Nishida, E. (1999). Two co-existing mechanisms for nuclear import of MAP kinase: passive diffusion of a monomer and active transport of a dimer. *EMBO J.* *18*, 5347–5358.

Ader, I., Toulas, C., Dalenc, F., Delmas, C., Bonnet, J., Cohen-Jonathan, E., and Favre, G. (2002a). RhoB controls the 24 kDa FGF-2-induced radioresistance in HeLa cells by preventing post-mitotic cell death. *Oncogene* *21*, 5998–6006.

Ader, I., Muller, C., Bonnet, J., Favre, G., Cohen-Jonathan, E., Salles, B., and Toulas, C. (2002b). The radioprotective effect of the 24 kDa FGF-2 isoform in HeLa cells is related to an increased expression and activity of the DNA dependent protein kinase (DNA-PK) catalytic subunit. *Oncogene* *21*, 6471–6479.

Ader, I., Delmas, C., Bonnet, J., Rochaix, P., Favre, G., Toulas, C., and Cohen-Jonathan-Moyal, E. (2003). Inhibition of Rho pathways induces radiosensitization and oxygenation in human glioblastoma xenografts. *Oncogene* *22*, 8861–8869.

Adini, I. (2003). RhoB controls Akt trafficking and stage-specific survival of endothelial cells during vascular development. *Genes Dev.* *17*, 2721–2732.

Adnane, J. (2001). RhoB, Not RhoA, Represses the Transcription of the Transforming Growth Factor beta Type II Receptor by a Mechanism Involving Activator Protein 1. *J. Biol. Chem.* *277*, 8500–8507.

Adnane, J., Muro-Cacho, C., Mathews, L., Sebti, S.M., and Muñoz-Antonia, T. (2002). Suppression of rho B expression in invasive carcinoma from head and neck cancer patients. *Clin. Cancer Res.* *8*, 2225–2232.

Aguissa-Touré, A.-H., and Li, G. (2011). Genetic alterations of PTEN in human melanoma. *Cell. Mol. Life Sci.* *69*, 1475–1491.

Ahn, J., Choi, J.-H., Won, M., Kang, C.-M., Gyun, M.-R., Park, H.-M., Kim, C.-H., and Chung, K.-S. (2011). The activation of p38 MAPK primarily contributes to UV-induced RhoB expression by recruiting the c-

Jun and p300 to the distal CCAAT box of the RhoB promoter. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **409**, 211–216.

Akinleye, A., Furqan, M., Mukhi, N., Ravella, P., and Liu, D. (2013). MEK and the inhibitors: from bench to bedside. *J Hematol Oncol* **6**, 27.

Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., and Walter, P. Signaling through Enzyme-Linked Cell-Surface Receptors. In *Molecular Biology of the Cell*, (New York: Garland Science),.

Alexandrov, L.B., Nik-Zainal, S., Wedge, D.C., Aparicio, S.A.J.R., Behjati, S., Biankin, A.V., Bignell, G.R., Bolli, N., Borg, A., Børresen-Dale, A.-L., *et al.* (2013). Signatures of mutational processes in human cancer. *Nature* **500**, 415–421.

Alfano, D., Ragno, P., Stoppelli, M.P., and Ridley, A.J. (2012). RhoB regulates uPAR signalling. *J. Cell Sci.* **125**, 2369–2380.

Allal, C., Pradines, A., Hamilton, A.D., Sebti, S.M., and Favre, G. (2002). Farnesylated RhoB prevents cell cycle arrest and actin cytoskeleton disruption caused by the geranylgeranyltransferase I inhibitor GGTI-298. *Cell Cycle* **1**, 430–437.

Armstrong, B.K., and Kricker, a (2001). The epidemiology of UV induced skin cancer. *J. Photochem. Photobiol. B* **63**, 8–18.

Arozarena, I., Sanchez-Laorden, B., Packer, L., Hidalgo-Carcedo, C., Hayward, R., Viros, A., Sahai, E., and Marais, R. (2011). Oncogenic BRAF induces melanoma cell invasion by downregulating the cGMP-specific phosphodiesterase PDE5A. *Cancer Cell* **19**, 45–57.

Arthur, W.T. (2002). XPLN, a Guanine Nucleotide Exchange Factor for RhoA and RhoB, But Not RhoC. *J. Biol. Chem.* **277**, 42964–42972.

Avril, M.F., Aamdal, S., Grob, J.J., Hauschild, A., Mohr, P., Bonerandi, J.J., Weichenthal, M., Neuber, K., Bieber, T., Gilde, K., *et al.* (2004). Fotemustine compared with dacarbazine in patients with disseminated malignant melanoma: a phase III study. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **22**, 1118–1125.

Bahadoran, P., Allegra, M., Le Duff, F., Long-Mira, E., Hofman, P., Giaccherio, D., Passeron, T., Lacour, J.-P., and Ballotti, R. (2013). Major clinical response to a BRAF inhibitor in a patient with a BRAF L597R-mutated melanoma. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **31**, e324–326.

Balch, C.M., Buzaid, a C., Soong, S.J., Atkins, M.B., Cascinelli, N., Coit, D.G., Fleming, I.D., Gershenwald, J.E., Houghton, a, Kirkwood, J.M., *et al.* (2001). Final version of the American Joint Committee on Cancer staging system for cutaneous melanoma. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **19**, 3635–3648.

Balch, C.M., Gershenwald, J.E., Soong, S.-J., Thompson, J.F., Atkins, M.B., Byrd, D.R., Buzaid, A.C., Cochran, A.J., Coit, D.G., Ding, S., *et al.* (2009). Final version of 2009 AJCC melanoma staging and classification. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **27**, 6199–6206.

Balmano, K., and Cook, S.J. (2008). Tumour cell survival signalling by the ERK1/2 pathway. *Cell Death Differ.* **16**, 368–377.

Baron, R., Fourcade, E., Lajoie-Mazenc, I., Allal, C., Couderc, B., Barbaras, R., Favre, G., Faye, J.C., and Pradines, A. (2000). RhoB prenylation is driven by the three carboxyl-terminal amino acids of the

protein: evidenced in vivo by an anti-farnesyl cysteine antibody. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *97*, 11626–11631.

Basile, K.J., Abel, E.V., and Aplin, A.E. (2011). Adaptive upregulation of FOXD3 and resistance to PLX4032/4720-induced cell death in mutant B-RAF melanoma cells. *Oncogene* *31*, 2471–2479.

Bauer, J., Curtin, J.A., Pinkel, D., and Bastian, B.C. (2006). Congenital melanocytic nevi frequently harbor NRAS mutations but no BRAF mutations. *J. Invest. Dermatol.* *127*, 179–182.

Beliveau, A., Mott, J.D., Lo, A., Chen, E.I., Koller, A.A., Yaswen, P., Muschler, J., and Bissell, M.J. (2010). Raf-induced MMP9 disrupts tissue architecture of human breast cells in three-dimensional culture and is necessary for tumor growth in vivo. *Genes Dev.* *24*, 2800–2811.

Belot, A., Grosclaude, P., Bossard, N., Jouglu, E., Benhamou, E., Delafosse, P., Guizard, A.-V., Molinié, F., Danzon, A., and Bara, S. (2008). Cancer incidence and mortality in France over the period 1980–2005. *Rev. Épidémiologie Santé Publique* *56*, 159–175.

Berger, M.F., Hodis, E., Heffernan, T.P., Deribe, Y.L., Lawrence, M.S., Protopopov, A., Ivanova, E., Watson, I.R., Nickerson, E., Ghosh, P., *et al.* (2012). Melanoma genome sequencing reveals frequent PREX2 mutations. *Nature*.

Bermudez, O., Pages, G., and Gimond, C. (2010). The dual-specificity MAP kinase phosphatases: critical roles in development and cancer. *AJP Cell Physiol.* *299*, C189–C202.

Berndt, N., Hamilton, A.D., and Sebti, S.M. (2011). Targeting protein prenylation for cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer* *11*, 775–791.

Berra, E., Milanini, J., Richard, D.E., Le Gall, M., Viñals, F., Gothié, E., Roux, D., Pagès, G., and Pouyssegur, J. (2000). Signaling angiogenesis via p42/p44 MAP kinase and hypoxia. *Biochem. Pharmacol.* *60*, 1171–1178.

Bertolotto, C., Lesueur, F., Giuliano, S., Strub, T., de Lichy, M., Bille, K., Dessen, P., d' Hayer, B., Mohamdi, H., Remenieras, A., *et al.* (2011). A SUMOylation-defective MITF germline mutation predisposes to melanoma and renal carcinoma. *Nature* *480*, 94–98.

Bichakjian, C.K., Halpern, A.C., Johnson, T.M., Foote Hood, A., Grichnik, J.M., Swetter, S.M., Tsao, H., Barbosa, V.H., Chuang, T.-Y., Duvic, M., *et al.* (2011). Guidelines of care for the management of primary cutaneous melanoma. *American Academy of Dermatology. J. Am. Acad. Dermatol.* *65*, 1032–1047.

Bilodeau, D., Lamy, S., Desrosiers, R.R., Gingras, D., and Béliveau, R. (1999). Regulation of Rho protein binding to membranes by rhoGDI: inhibition of releasing activity by physiological ionic conditions. *Biochem. Cell Biol. Biochim. Biol. Cell.* *77*, 59–69.

Birck, A., Ahrenkiel, V., Zeuthen, J., Hou-Jensen, K., and Guldborg, P. (2000). Mutation and allelic loss of the PTEN/MMAC1 gene in primary and metastatic melanoma biopsies. *J. Invest. Dermatol.* *114*, 277–280.

Bishop, A., and Hall, A. (2000). Rho GTPases and their effector proteins. *Biochem J* *348*, 241–255.

Bishop, D.T., Demenais, F., Goldstein, A.M., Bergman, W., Bishop, J.N., Bressac-de Paillerets, B., Chompret, A., Ghiorzo, P., Gruis, N., and Hansson, J. (2002). Geographical variation in the penetrance of CDKN2A mutations for melanoma. *J. Natl. Cancer Inst.* *94*, 894–903.

- Bollag, G., Hirth, P., Tsai, J., Zhang, J., Ibrahim, P.N., Cho, H., Spevak, W., Zhang, C., Zhang, Y., Habets, G., *et al.* (2010). Clinical efficacy of a RAF inhibitor needs broad target blockade in BRAF-mutant melanoma. *Nature* *467*, 596–599.
- Bollag, G., Tsai, J., Zhang, J., Zhang, C., Ibrahim, P., Nolop, K., and Hirth, P. (2012). Vemurafenib: the first drug approved for BRAF-mutant cancer. *Nat. Rev. Drug Discov.* *11*, 873–886.
- Boone, B., Van Gele, M., Lambert, J., Haspelslagh, M., and Brochez, L. (2009). The role of RhoC in growth and metastatic capacity of melanoma. *J. Cutan. Pathol.* *36*, 629–636.
- Boswell, S.A., Ongusaha, P.P., Nghiem, P., and Lee, S.W. (2006). The Protective Role of a Small GTPase RhoE against UVB-induced DNA Damage in Keratinocytes. *J. Biol. Chem.* *282*, 4850–4858.
- Bousquet, E., Calvayrac, O., Mazieres, J., Favre, G., and Pradines, A. (in preparation). RhoB regulates amoeboid/mesenchymal transition via regulation of PP2A in non small cell lung cancer cells.
- Bousquet, E., Mazieres, J., Privat, M., Rizzati, V., Casanova, A., Ledoux, A., Mery, E., Couderc, B., Favre, G., and Pradines, A. (2009). Loss of RhoB Expression Promotes Migration and Invasion of Human Bronchial Cells Via Activation of AKT1. *Cancer Res.* *69*, 6092–6099.
- Brennan, D.F., Dar, A.C., Hertz, N.T., Chao, W.C.H., Burlingame, A.L., Shokat, K.M., and Barford, D. (2011). A Raf-induced allosteric transition of KSR stimulates phosphorylation of MEK. *Nature* *472*, 366–369.
- Breslow, A. (1970). Thickness, cross-sectional areas and depth of invasion in the prognosis of cutaneous melanoma. *Ann. Surg.* *172*, 902–908.
- Brummer, T., Naegele, H., Reth, M., and Misawa, Y. (2003). Identification of novel ERK-mediated feedback phosphorylation sites at the C-terminus of B-Raf. *Oncogene* *22*, 8823–8834.
- Brunet, A., and Pages, G. (1994). Growth factor-stimulated MAP kinase induces rapid retrophosphorylation and inhibition of MAP kinase kinase (MEK1). *FEBS Lett.* *346*, 299–303.
- Brunet, N., Morin, A., and Olofsson, B. (2002). RhoGDI-3 regulates RhoG and targets this protein to the Golgi complex through its unique N-terminal domain. *Traffic Cph. Den.* *3*, 342–357.
- Buday, L., Warne, P.H., and Downward, J. (1995). Downregulation of the Ras activation pathway by MAP kinase phosphorylation of Sos. *Oncogene* *11*, 1327–1331.
- Canguilhem, B., Pradines, A., Baudouin, C., Boby, C., Lajoie-Mazenc, I., Charveron, M., and Favre, G. (2005). RhoB protects human keratinocytes from UVB-induced apoptosis through epidermal growth factor receptor signaling. *J. Biol. Chem.* *280*, 43257–43263.
- Cao, X., Deng, X., and May, W.S. (2003). Cleavage of Bax to p18 Bax accelerates stress-induced apoptosis, and a cathepsin-like protease may rapidly degrade p18 Bax. *Blood* *102*, 2605–2614.
- Carvajal, R.D. (2013). Phase II study of selumetinib (sel) versus temozolomide (TMZ) in *gnaq/Gna11* (Gq/11) mutant (mut) uveal melanoma (UM). (Chicago, IL).
- Casar, B., Pinto, A., and Crespo, P. (2008). Essential Role of ERK Dimers in the Activation of Cytoplasmic but Not Nuclear Substrates by ERK-Scaffold Complexes. *Mol. Cell* *31*, 708–721.

- Casar, B., Pinto, A., and Crespo, P. (2009). ERK dimers and scaffold proteins: unexpected partners for a forgotten (cytoplasmic) task. *Cell Cycle* 8, 1007–1013.
- Catalanotti, F., Reyes, G., Jesenberger, V., Galabova-Kovacs, G., de Matos Simoes, R., Carugo, O., and Baccarini, M. (2009). A Mek1–Mek2 heterodimer determines the strength and duration of the Erk signal. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 16, 294–303.
- Chapman, P.B., Hauschild, A., Robert, C., Haanen, J.B., Ascierto, P., Larkin, J., Dummer, R., Garbe, C., Testori, A., Maio, M., *et al.* (2011a). Improved survival with vemurafenib in melanoma with BRAF V600E mutation. *N. Engl. J. Med.* 364, 2507–2516.
- Chapman, P.B., Hauschild, A., Robert, C., Haanen, J.B., Ascierto, P., Larkin, J., Dummer, R., Garbe, C., Testori, A., and Maio, M. (2011b). Improved survival with vemurafenib in melanoma with BRAF V600E mutation. *N. Engl. J. Med.* 364, 2507–2516.
- Chardin, P. (2006). Function and regulation of Rnd proteins. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 7, 54–62.
- Chen, S.T., Geller, A.C., and Tsao, H. (2013). Update on the Epidemiology of Melanoma. *Curr. Dermatol. Reports* 2, 24–34.
- Chen, Y.-X., Li, Z.-B., Diao, F., Cao, D.-M., Fu, C.-C., and Lu, J. (2006). Up-regulation of RhoB by glucocorticoids and its effects on the cell proliferation and NF- κ B transcriptional activity. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 101, 179–187.
- Chen, Z., Sun, J., Pradines, A., Favre, G., Adnane, J., and Sebti, S.M. (2000). Both farnesylated and geranylgeranylated RhoB inhibit malignant transformation and suppress human tumor growth in nude mice. *J. Biol. Chem.* 275, 17974–17978.
- Cheung, M., Sharma, A., Madhunapantula, S.V., and Robertson, G.P. (2008). Akt3 and mutant V600E-BRAF cooperate to promote early melanoma development. *Cancer Res.* 68, 3429–3439.
- Choi, W.S., Lee, E.H., Chung, C.W., Jung, Y.K., Jin, B.K., Kim, S.U., Oh, T.H., Saido, T.C., and Oh, Y.J. (2001). Cleavage of Bax is mediated by caspase-dependent or -independent calpain activation in dopaminergic neuronal cells: protective role of Bcl-2. *J. Neurochem.* 77, 1531–1541.
- Christensen, C., and Guldborg, P. (2005). Growth factors rescue cutaneous melanoma cells from apoptosis induced by knockdown of mutated (V600E) B-RAF. *Oncogene* 24, 6292–6302.
- Cimbora-Zovko, T., Fritz, G., Mikac, N., and Osmak, M. (2010). Downregulation of RhoB GTPase confers resistance to cisplatin in human laryngeal carcinoma cells. *Cancer Lett.* 295, 182–190.
- Clark, E.A., Golub, T.R., Lander, E.S., and Hynes, R.O. (2000). Genomic analysis of metastasis reveals an essential role for RhoC. *Nature* 406, 532–535.
- Clark, W.H., From, L., Bernardino, E.A., and Mihm, M.C. (1969). The Histogenesis and Biologic Behavior of Primary Human Malignant Melanomas of the Skin. *Cancer Res* 29, 705–727.
- Clark, W.H., Jr, Elder, D.E., Guerry, D., 4th, Epstein, M.N., Greene, M.H., and Van Horn, M. (1984). A study of tumor progression: the precursor lesions of superficial spreading and nodular melanoma. *Hum. Pathol.* 15, 1147–1165.

- Colombino, M., Capone, M., Lissia, A., Cossu, A., Rubino, C., De Giorgi, V., Massi, D., Fonsatti, E., Staibano, S., Nappi, O., *et al.* (2012). BRAF/NRAS Mutation Frequencies Among Primary Tumors and Metastases in Patients With Melanoma. *J. Clin. Oncol.* *30*, 2522–2529.
- Connolly, E.C., Van Doorslaer, K., Rogler, L.E., and Rogler, C.E. (2010). Overexpression of miR-21 Promotes an In vitro Metastatic Phenotype by Targeting the Tumor Suppressor RHOB. *Mol. Cancer Res.* *8*, 691–700.
- Cooper, G.M. (2000). Functions of Cell Surface Receptors. In *The Cell: a Molecular Approach*, (Washington, D.C.; Sunderland, Mass.: ASM Press ; Sinauer Associates),.
- Cooper, Z.A. (2013). BRAF inhibition is associated with increased clonality of tumor infiltrating lymphocytes (Washington, D.C.).
- Corcoran, R.B., Ebi, H., Turke, A.B., Coffee, E.M., Nishino, M., Cogdill, A.P., Brown, R.D., Della Pelle, P., Dias-Santagata, D., Hung, K.E., *et al.* (2012). EGFR-Mediated Reactivation of MAPK Signaling Contributes to Insensitivity of BRAF-Mutant Colorectal Cancers to RAF Inhibition with Vemurafenib. *Cancer Discov.* *2*, 227–235.
- Corcoran, R.B., Cheng, K.A., Hata, A.N., Faber, A.C., Ebi, H., Coffee, E.M., Greninger, P., Brown, R.D., Godfrey, J.T., Cohoon, T.J., *et al.* (2013). Synthetic Lethal Interaction of Combined BCL-XL and MEK Inhibition Promotes Tumor Regressions in KRAS Mutant Cancer Models. *Cancer Cell* *23*, 121–128.
- Couderc, B., Pradines, A., Rafii, A., Golzio, M., Deviers, A., Allal, C., Berg, D., Penary, M., Teissie, J., and Favre, G. (2008). In vivo restoration of RhoB expression leads to ovarian tumor regression. *Cancer Gene Ther.* *15*, 456–464.
- Coulombe, P., and Meloche, S. (2007). Atypical mitogen-activated protein kinases: Structure, regulation and functions. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.* *1773*, 1376–1387.
- Couts, K.L., Anderson, E.M., Gross, M.M., Sullivan, K., and Ahn, N.G. (2012). Oncogenic B-Raf signaling in melanoma cells controls a network of microRNAs with combinatorial functions. *Oncogene* *32*, 1959–1970.
- Curtin, J.A., Fridlyand, J., Kageshita, T., Patel, H.N., Busam, K.J., Kutzner, H., Cho, K.-H., Aiba, S., Bröcker, E.-B., and LeBoit, P.E. (2005). Distinct sets of genetic alterations in melanoma. *N. Engl. J. Med.* *353*, 2135–2147.
- Curtin, J.A., Busam, K., Pinkel, D., and Bastian, B.C. (2006). Somatic Activation of KIT in Distinct Subtypes of Melanoma. *J. Clin. Oncol.* *24*, 4340–4346.
- Dahl, C., and Guldberg, P. (2007). The genome and epigenome of malignant melanoma. *Apmis* *115*, 1161–1176.
- Dalton, L.E., Kamarashev, J., Ramirez, I.B.-R., White, G., Malliri, A., and Hurlstone, A. (2013). Constitutive Rac Activation Is Not Sufficient to Initiate Melanocyte Neoplasia but Accelerates Malignant Progression. *J. Invest. Dermatol.*
- Damsky Jr, W.E., and Bosenberg, M. (2010). Mouse melanoma models and cell lines. *Pigment Cell Melanoma Res.* *23*, 853–859.

- Daniotti, M., Oggionni, M., Ranzani, T., Vallacchi, V., Campi, V., Di Stasi, D., Torre, G.D., Perrone, F., Luoni, C., Suardi, S., *et al.* (2004). BRAF alterations are associated with complex mutational profiles in malignant melanoma. *Oncogene* 23, 5968–5977.
- Dankort, D., Filenova, E., Collado, M., Serrano, M., Jones, K., and McMahon, M. (2007). A new mouse model to explore the initiation, progression, and therapy of BRAFV600E-induced lung tumors. *Genes Dev.* 21, 379–384.
- Dankort, D., Curley, D.P., Cartledge, R.A., Nelson, B., Karnezis, A.N., Damsky Jr, W.E., You, M.J., DePinho, R.A., McMahon, M., and Bosenberg, M. (2009). BrafV600E cooperates with Pten loss to induce metastatic melanoma. *Nat. Genet.* 41, 544–552.
- Davies, H., Bignell, G.R., Cox, C., Stephens, P., Edkins, S., Clegg, S., Teague, J., Woffendin, H., Garnett, M.J., and Bottomley, W. (2002). Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature* 417, 949–954.
- Davies, M.A., Stemke-Hale, K., Tellez, C., Calderone, T.L., Deng, W., Prieto, V.G., Lazar, A.J.F., Gershenwald, J.E., and Mills, G.B. (2008). A novel AKT3 mutation in melanoma tumours and cell lines. *Br. J. Cancer* 99, 1265–1268.
- Davis, M.J., Ha, B.H., Holman, E.C., Halaban, R., Schlessinger, J., and Boggon, T.J. (2013). RAC1P29S is a spontaneously activating cancer-associated GTPase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 110, 912–917.
- Delarue, F.L., Adnane, J., Joshi, B., Blaskovich, M.A., Wang, D.A., Hawker, J., Bizouarn, F., Ohkanda, J., Zhu, K., and Hamilton, A.D. (2007). Farnesyltransferase and geranylgeranyltransferase I inhibitors upregulate RhoB expression by HDAC1 dissociation, HAT association and histone acetylation of the RhoB promoter. *Oncogene* 26, 633–640.
- Denat, L., and Larue, L. (2007). Le mélanome malin cutané et le rôle de la protéine paradoxale Microphthalmia transcription factor. *Bull. Cancer (Paris)* 94, 81–92.
- Denko, N., Stringer, J., Wani, M., and Stambrook, P. (1995). Mitotic and post mitotic consequences of genomic instability induced by oncogenic Ha-ras. *Somat. Cell Mol. Genet.* 21, 241–253.
- Denko, N.C., Giaccia, A.J., Stringer, J.R., and Stambrook, P.J. (1994). The human Ha-ras oncogene induces genomic instability in murine fibroblasts within one cell cycle. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91, 5124–5128.
- Dhomen, N., Reis-Filho, J.S., da Rocha Dias, S., Hayward, R., Savage, K., Delmas, V., Larue, L., Pritchard, C., and Marais, R. (2009). Oncogenic Braf Induces Melanocyte Senescence and Melanoma in Mice. *Cancer Cell* 15, 294–303.
- Dong, J., Phelps, R.G., Qiao, R., Yao, S., Benard, O., Ronai, Z., and Aaronson, S.A. (2003). BRAF oncogenic mutations correlate with progression rather than initiation of human melanoma. *Cancer Res.* 63, 3883–3885.
- Dougherty, M.K., Müller, J., Ritt, D.A., Zhou, M., Zhou, X.Z., Copeland, T.D., Conrads, T.P., Veenstra, T.D., Lu, K.P., and Morrison, D.K. (2005). Regulation of Raf-1 by Direct Feedback Phosphorylation. *Mol. Cell* 17, 215–224.
- Downward, J. (2003). Targeting RAS signalling pathways in cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer* 3, 11–22.

- Du, J., Miller, A.J., Widlund, H.R., Horstmann, M.A., Ramaswamy, S., and Fisher, D.E. (2003). MLANA/MART1 and SILV/PMEL17/GP100 are transcriptionally regulated by MITF in melanocytes and melanoma. *Am. J. Pathol.* *163*, 333–343.
- Du, J., Widlund, H.R., Horstmann, M.A., Ramaswamy, S., Ross, K., Huber, W.E., Nishimura, E.K., Golub, T.R., and Fisher, D.E. (2004). Critical role of CDK2 for melanoma growth linked to its melanocyte-specific transcriptional regulation by MITF. *Cancer Cell* *6*, 565–576.
- Du, W., Lebowitz, P.F., and Prendergast, G.C. (1999). Cell growth inhibition by farnesyltransferase inhibitors is mediated by gain of geranylgeranylated RhoB. *Mol. Cell. Biol.* *19*, 1831–1840.
- Dummer, R., Hauschild, A., Guggenheim, M., Keilholz, U., and Pentheroudakis, G. (2012). Cutaneous melanoma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol. ESMO 23 Suppl 7*, vii86–91.
- Dwyer, J., Li, H., Xu, D., and Liu, J.-P. (2007). Transcriptional Regulation of Telomerase Activity: Roles of the the Ets Transcription Factor Family. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* *1114*, 36–47.
- Eblen, S.T., Slack-Davis, J.K., Tarcsafalvi, A., Parsons, J.T., Weber, M.J., and Catling, A.D. (2004). Mitogen-Activated Protein Kinase Feedback Phosphorylation Regulates MEK1 Complex Formation and Activation during Cellular Adhesion. *Mol. Cell. Biol.* *24*, 2308–2317.
- Eggermont, A.M.M., Suci, S., Testori, A., Kruit, W.H., Marsden, J., Punt, C.J., Santinami, M., Salès, F., Schadendorf, D., Patel, P., *et al.* (2012). Ulceration and stage are predictive of interferon efficacy in melanoma: Results of the phase III adjuvant trials EORTC 18952 and EORTC 18991. *Eur. J. Cancer* *48*, 218–225.
- Eisen, T., Ahmad, T., Flaherty, K.T., Gore, M., Kaye, S., Marais, R., Gibbens, I., Hackett, S., James, M., Schuchter, L.M., *et al.* (2006). Sorafenib in advanced melanoma: a Phase II randomised discontinuation trial analysis. *Br. J. Cancer* *95*, 581–586.
- Ekedahl, H., Cirenajwis, H., Harbst, K., Carneiro, A., Nielsen, K., Olsson, H., Lundgren, L., Ingvar, C., and Jönsson, G. (2013). The clinical significance of BRAF and NRAS mutations in a clinic-based metastatic melanoma cohort. *Br. J. Dermatol.*
- Emery, C.M., Vijayendran, K.G., Zipser, M.C., Sawyer, A.M., Niu, L., Kim, J.J., Hatton, C., Chopra, R., Oberholzer, P.A., and Karpova, M.B. (2009). MEK1 mutations confer resistance to MEK and B-RAF inhibition. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *106*, 20411–20416.
- Engel, M.E. (1998). RhoB Is Stabilized by Transforming Growth Factor beta and Antagonizes Transcriptional Activation. *J. Biol. Chem.* *273*, 9921–9926.
- Engers, R., Zwaka, T.P., Gohr, L., Weber, A., Gerharz, C.-D., and Gabbert, H.E. (2000). Tiam1 mutations in human renal-cell carcinomas. *Int. J. Cancer* *88*, 369–376.
- Eskandarpour, M., Kiaii, S., Zhu, C., Castro, J., Sakko, A.J., and Hansson, J. (2005). Suppression of oncogenic NRAS by RNA interference induces apoptosis of human melanoma cells. *Int. J. Cancer* *115*, 65–73.
- Esteller, M. (2011). Non-coding RNAs in human disease. *Nat. Rev. Genet.* *12*, 861–874.
- Etienne-Manneville, S., and Hall, A. (2002). Rho GTPases in cell biology. *Nature* *420*, 629–635.

Falchook, G.S., Lewis, K.D., Infante, J.R., Gordon, M.S., Vogelzang, N.J., DeMarini, D.J., Sun, P., Moy, C., Szabo, S.A., and Roadcap, L.T. (2012). Activity of the oral MEK inhibitor trametinib in patients with advanced melanoma: a phase 1 dose-escalation trial. *Lancet Oncol.*

Fallahi-Sichani, M., Moerke, N.J., Dastur, A., Benes, C.H., and Sorger, P.K. (2013). A systems biology approach to understanding differential phenotypic outcome of BRAF(V600E) inhibition in melanoma cells (Washington, DC).

Fattore, L., Marra, E., Pisanu, M.E., Noto, A., de Vitis, C., Belleudi, F., Aurisicchio, L., Mancini, R., Torrisi, M.R., and Ascierto, P.A. (2013). Activation of an early feedback survival loop involving phospho-ErbB3 is a general response of melanoma cells to RAF/MEK inhibition and is abrogated by anti-ErbB3 antibodies. *J. Transl. Med.* *11*, 180.

Ferguson, B., Konrad Muller, H., Handoko, H.Y., Khosrotehrani, K., Beermann, F., Hacker, E., Peter Soyer, H., Bosenberg, M., and Walker, G.J. (2010). Differential roles of the pRb and Arf/p53 pathways in murine naevus and melanoma genesis. *Pigment Cell Melanoma Res.* *23*, 771–780.

Fernandez-Borja, M. (2005). RhoB regulates endosome transport by promoting actin assembly on endosomal membranes through Dia1. *J. Cell Sci.* *118*, 2661–2670.

Fisher, G.H. (2001). Induction and apoptotic regression of lung adenocarcinomas by regulation of a K-Ras transgene in the presence and absence of tumor suppressor genes. *Genes Dev.* *15*, 3249–3262.

Flaherty, K.T., Schiller, J., Schuchter, L.M., Liu, G., Tuveson, D.A., Redlinger, M., Lathia, C., Xia, C., Petrenciuc, O., Hingorani, S.R., *et al.* (2008). A Phase I Trial of the Oral, Multikinase Inhibitor Sorafenib in Combination with Carboplatin and Paclitaxel. *Clin. Cancer Res.* *14*, 4836–4842.

Flaherty, K.T., Puzanov, I., Kim, K.B., Ribas, A., McArthur, G.A., Sosman, J.A., O'Dwyer, P.J., Lee, R.J., Grippo, J.F., and Nolop, K. (2010). Inhibition of mutated, activated BRAF in metastatic melanoma. *N. Engl. J. Med.* *363*, 809–819.

Flaherty, K.T., Hodi, F.S., and Fisher, D.E. (2012a). From genes to drugs: targeted strategies for melanoma. *Nat. Rev. Cancer* *12*, 349–361.

Flaherty, K.T., Lee, S.J., Zhao, F., Schuchter, L.M., Flaherty, L., Kefford, R., Atkins, M.B., Leming, P., and Kirkwood, J.M. (2012b). Phase III Trial of Carboplatin and Paclitaxel With or Without Sorafenib in Metastatic Melanoma. *J. Clin. Oncol.* *31*, 373–379.

Flaherty, K.T., Infante, J.R., Daud, A., Gonzalez, R., Kefford, R.F., Sosman, J., Hamid, O., Schuchter, L., Cebon, J., Ibrahim, N., *et al.* (2012c). Combined BRAF and MEK Inhibition in Melanoma with BRAF V600 Mutations. *N. Engl. J. Med.* *367*, 1694–1703.

Flynn, P., Mellor, H., Casamassima, A., and Parker, P.J. (2000). Rho GTPase control of protein kinase C-related protein kinase activation by 3-phosphoinositide-dependent protein kinase. *J. Biol. Chem.* *275*, 11064–11070.

Forget, M.-A., Desrosiers, R.R., Del, M., Mouldjian, R., Shedid, D., Berthelet, F., and Béliveau, R. (2002). The expression of rho proteins decreases with human brain tumor progression: potential tumor markers. *Clin. Exp. Metastasis* *19*, 9–15.

Frederick, D.T., Piris, A., Cogdill, A.P., Cooper, Z.A., Lezcano, C., Ferrone, C.R., Mitra, D., Boni, A., Newton, L.P., Liu, C., *et al.* (2013). BRAF Inhibition Is Associated with Enhanced Melanoma Antigen

Expression and a More Favorable Tumor Microenvironment in Patients with Metastatic Melanoma. *Clin. Cancer Res.* *19*, 1225–1231.

Friedman, R.J., Rigel, D.S., and Kopf, A.W. (1985). Early Detection of Malignant Melanoma: The Role of Physician Examination and Self-Examination of the Skin. *CA. Cancer J. Clin.* *35*, 130–151.

Fritz, G. (2001). Ras-related GTPase RhoB Represses NF-kappa B Signaling. *J. Biol. Chem.* *276*, 3115–3122.

Fritz, G., and Kaina, B. (2000). Ras-Related GTPase RhoB Forces Alkylation-Induced Apoptotic Cell Death. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *268*, 784–789.

Fritz, G., and Kaina, B. (2001). Transcriptional activation of the small GTPase gene rhoB by genotoxic stress is regulated via a CCAAT element. *Nucleic Acids Res.* *29*, 792–798.

Fritz, G., Kaina, B., and Aktories, K. (1995). The ras-related small GTP-binding protein RhoB is immediate-early inducible by DNA damaging treatments. *J. Biol. Chem.* *270*, 25172–25177.

Gachon, J., Beaulieu, P., Sei, J.F., Gouvernet, J., Claudel, J.P., Lemaitre, M., Richard, M.A., and Grob, J.J. (2005). First prospective study of the recognition process of melanoma in dermatological practice. *Arch. Dermatol.* *141*, 434–438.

Gadea, G., de Toledo, M., Anguille, C., and Roux, P. (2007). Loss of p53 promotes RhoA ROCK-dependent cell migration and invasion in 3D matrices. *J. Cell Biol.* *178*, 23–30.

Gajewski, T.F., Salama, A.K., Niedzwiecki, D., Johnson, J., Linette, G., Bucher, C., Blaskovich, M.A., Sebt, S.M., and Haluska, F. (2012). Phase II study of the farnesyltransferase inhibitor R115777 in advanced melanoma (CALGB 500104). *J. Transl. Med.* *10*, 246.

Gampel, A., and Mellor, H. (2002). Small interfering RNAs as a tool to assign Rho GTPase exchange-factor function in vivo. *Biochem J* *366*, 393–398.

Gampel, A., Parker, P.J., and Mellor, H. (1999). Regulation of epidermal growth factor receptor traffic by the small GTPase rhoB. *Curr. Biol.* *9*, 955–958.

Gandini, S., Sera, F., Cattaruzza, M.S., Pasquini, P., Abeni, D., Boyle, P., and Melchi, C.F. (2005). Meta-analysis of risk factors for cutaneous melanoma: I. Common and atypical naevi. *Eur. J. Cancer Oxf. Engl.* *1990 41*, 28–44.

Garcia-Mata, R., Boulter, E., and Burridge, K. (2011). The “invisible hand”: regulation of RHO GTPases by RHOGDIs. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *12*, 493–504.

Garnett, M.J., Rana, S., Paterson, H., Barford, D., and Marais, R. (2005). Wild-Type and Mutant B-RAF Activate C-RAF through Distinct Mechanisms Involving Heterodimerization. *Mol. Cell* *20*, 963–969.

Garraway, L.A., Widlund, H.R., Rubin, M.A., Getz, G., Berger, A.J., Ramaswamy, S., Beroukhi, R., Milner, D.A., Granter, S.R., Du, J., *et al.* (2005). Integrative genomic analyses identify MITF as a lineage survival oncogene amplified in malignant melanoma. *Nature* *436*, 117–122.

Gast, A., Scherer, D., Chen, B., Bloethner, S., Melchert, S., Sucker, A., Hemminki, K., Schadendorf, D., and Kumar, R. (2010). Somatic alterations in the melanoma genome: A high-resolution array-based comparative genomic hybridization study. *Genes. Chromosomes Cancer* *49*, 733–745.

- Gaudy-Marqueste, C., Dubois, M., Richard, M.-A., Bonnelye, G., and Grob, J.-J. (2011). Cognitive training with photographs as a new concept in an education campaign for self-detection of melanoma: a pilot study in the community. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol. JEADV* 25, 1099–1103.
- Gazin, C., Wajapeyee, N., Gobeil, S., Virbasius, C.-M., and Green, M.R. (2007). An elaborate pathway required for Ras-mediated epigenetic silencing. *Nature* 449, 1073–1077.
- Gershenwald, J.E., and Ross, M.I. (2011). Sentinel-lymph-node biopsy for cutaneous melanoma. *N. Engl. J. Med.* 364, 1738–1745.
- Gilmartin, A.G., Bleam, M.R., Groy, A., Moss, K.G., Minthorn, E.A., Kulkarni, S.G., Rominger, C.M., Erskine, S., Fisher, K.E., Yang, J., *et al.* (2011). GSK1120212 (JTP-74057) Is an Inhibitor of MEK Activity and Activation with Favorable Pharmacokinetic Properties for Sustained In Vivo Pathway Inhibition. *Clin. Cancer Res.* 17, 989–1000.
- Giroux, S., Tremblay, M., Bernard, D., Cardin-Girard, J.F., Aubry, S., Larouche, L., Rousseau, S., Huot, J., Landry, J., and Jeannotte, L. (1999). Embryonic death of Mek1-deficient mice reveals a role for this kinase in angiogenesis in the labyrinthine region of the placenta. *Curr. Biol.* 9, 369–376.
- Glorian, V., Maillot, G., Poles, S., Iacovoni, J.S., Favre, G., and Vagner, S. (2011). HuR-dependent loading of miRNA RISC to the mRNA encoding the Ras-related small GTPase RhoB controls its translation during UV-induced apoptosis. *Cell Death Differ.* 18, 1692–1701.
- Goel, V.K., Lazar, A.J.F., Warneke, C.L., Redston, M.S., and Haluska, F.G. (2006). Examination of Mutations in BRAF, NRAS, and PTEN in Primary Cutaneous Melanoma. *J. Invest. Dermatol.* 126, 154–160.
- Goel, V.K., Ibrahim, N., Jiang, G., Singhal, M., Fee, S., Flotte, T., Westmoreland, S., Haluska, F.S., Hinds, P.W., and Haluska, F.G. (2009). Melanocytic nevus-like hyperplasia and melanoma in transgenic BRAFV600E mice. *Oncogene* 28, 2289–2298.
- Goldstein, A.M. (2004). Familial melanoma, pancreatic cancer and germline CDKN2A mutations. *Hum. Mutat.* 23, 630–630.
- Govindarajan, B., Sligh, J.E., Vincent, B.J., Li, M., Canter, J.A., Nickoloff, B.J., Rodenburg, R.J., Smeitink, J.A., Oberley, L., Zhang, Y., *et al.* (2007). Overexpression of Akt converts radial growth melanoma to vertical growth melanoma. *J. Clin. Invest.* 117, 719–729.
- Gray-Schopfer, V.C., Cheong, S.C., Chong, H., Chow, J., Moss, T., Abdel-Malek, Z.A., Marais, R., Wynford-Thomas, D., and Bennett, D.C. (2006). Cellular senescence in naevi and immortalisation in melanoma: a role for p16? *Br. J. Cancer* 95, 496–505.
- Greene, V.R., Johnson, M.M., Grimm, E.A., and Ellerhorst, J.A. (2009). Frequencies of NRAS and BRAF mutations increase from the radial to the vertical growth phase in cutaneous melanoma. *J. Invest. Dermatol.* 129, 1483–1488.
- Grob, J.J., and Bonerandi, J.J. (1998). The “ugly duckling” sign: identification of the common characteristics of nevi in an individual as a basis for melanoma screening. *Arch. Dermatol.* 134, 103–104.
- Guasch, R.M., Scambler, P., Jones, G.E., and Ridley, A.J. (1998). RhoE regulates actin cytoskeleton organization and cell migration. *Mol. Cell. Biol.* 18, 4761–4771.

- Guldberg, P., Straten, P., Birck, A., Ahrenkiel, V., Kirkin, A.F., and Zeuthen, J. (1997). Disruption of the MMAC1/PTEN gene by deletion or mutation is a frequent event in malignant melanoma. *Cancer Res.* *57*, 3660–3663.
- Hacker, E., Muller, H.K., Irwin, N., Gabrielli, B., Lincoln, D., Pavey, S., Powell, M.B., Malumbres, M., Barbacid, M., and Hayward, N. (2006). Spontaneous and UV Radiation-Induced Multiple Metastatic Melanomas in Cdk4R24C/R24C/TPras Mice. *Cancer Res.* *66*, 2946–2952.
- Hakem, A. (2005). RhoC is dispensable for embryogenesis and tumor initiation but essential for metastasis. *Genes Dev.* *19*, 1974–1979.
- Halaban, R., Zhang, W., Bacchiocchi, A., Cheng, E., Parisi, F., Ariyan, S., Krauthammer, M., McCusker, J.P., Kluger, Y., and Sznol, M. (2010). PLX4032, a selective BRAFV600E kinase inhibitor, activates the ERK pathway and enhances cell migration and proliferation of BRAFWT melanoma cells: PLX4032 activates BRAFWT melanoma cells. *Pigment Cell Melanoma Res.* *23*, 190–200.
- Hall, H.I., Miller, D.R., Rogers, J.D., and Bewerse, B. (1999). Update on the incidence and mortality from melanoma in the United States. *J. Am. Acad. Dermatol.* *40*, 35–42.
- Haluska, F.G. (2006). Genetic Alterations in Signaling Pathways in Melanoma. *Clin. Cancer Res.* *12*, 2301s–2307s.
- Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* *100*, 57–70.
- Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2011). Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* *144*, 646–674.
- Hansen, S.H., Zegers, M.M.P., Woodrow, M., Rodriguez-Viciana, P., Chardin, P., Mostov, K.E., and McMahon, M. (2000). Induced Expression of Rnd3 Is Associated with Transformation of Polarized Epithelial Cells by the Raf-MEK-Extracellular Signal-Regulated Kinase Pathway. *Mol. Cell. Biol.* *20*, 9364–9375.
- HAS (2011). RAPPORT D'ÉVALUATION.
- HAS (2012). Guide ALD - Mélanome cutané.
- HAS, H.A. de S. (2006). rapport_strategie_de_diagnostic_precoce_du_melanome.pdf (Objet application/pdf).
- Hatzivassiliou, G., Song, K., Yen, I., Brandhuber, B.J., Anderson, D.J., Alvarado, R., Ludlam, M.J.C., Stokoe, D., Gloor, S.L., Vigers, G., *et al.* (2010). RAF inhibitors prime wild-type RAF to activate the MAPK pathway and enhance growth. *Nature* *464*, 431–435.
- Hauschild, A., Agarwala, S.S., Trefzer, U., Hogg, D., Robert, C., Hersey, P., Eggermont, A., Grabbe, S., Gonzalez, R., and Gille, J. (2009). Results of a phase III, randomized, placebo-controlled study of sorafenib in combination with carboplatin and paclitaxel as second-line treatment in patients with unresectable stage III or stage IV melanoma. *J. Clin. Oncol.* *27*, 2823–2830.
- Hauschild, A., Grob, J.-J., Demidov, L.V., Jouary, T., Gutzmer, R., Millward, M., Rutkowski, P., Blank, C.U., Miller Jr, W.H., and Kaempgen, E. (2012). Dabrafenib in BRAF-mutated metastatic melanoma: a multicentre, open-label, phase 3 randomised controlled trial. *The Lancet* *380*, 358–365.

- Heidorn, S.J., Milagre, C., Whittaker, S., Nourry, A., Niculescu-Duvas, I., Dhomen, N., Hussain, J., Reis-Filho, J.S., Springer, C.J., Pritchard, C., *et al.* (2010). Kinase-Dead BRAF and Oncogenic RAS Cooperate to Drive Tumor Progression through CRAF. *Cell* *140*, 209–221.
- Henderson, D.J., Ybot-Gonzalez, P., and Copp, A.J. (2000). RhoB is expressed in migrating neural crest and endocardial cushions of the developing mouse embryo. *Mech. Dev.* *95*, 211–214.
- Herlyn, M., and Shih, I.M. (1994). Interactions of melanocytes and melanoma cells with the microenvironment. *Pigment Cell Res. Spons. Eur. Soc. Pigment Cell Res. Int. Pigment Cell Soc.* *7*, 81–88.
- Hers, I., Vincent, E.E., and Tavaré, J.M. (2011). Akt signalling in health and disease. *Cell. Signal.* *23*, 1515–1527.
- Ho, H., Aruri, J., Kapadia, R., Mehr, H., White, M.A., and Ganesan, A.K. (2012). RhoJ Regulates Melanoma Chemoresistance by Suppressing Pathways That Sense DNA Damage. *Cancer Res.* *72*, 5516–5528.
- Ho, H., Soto Hopkin, A., Kapadia, R., Vasudeva, P., Schilling, J., and Ganesan, A.K. (2013). RhoJ modulates melanoma invasion by altering actin cytoskeletal dynamics. *Pigment Cell Melanoma Res.* *26*, 218–225.
- Ho, T.T.G., Merajver, S.D., Lapierre, C.M., Nusgens, B.V., and Deroanne, C.F. (2008). RhoA-GDP Regulates RhoB Protein Stability: POTENTIAL INVOLVEMENT OF RhoGDI. *J. Biol. Chem.* *283*, 21588–21598.
- Hoath, S.B., and Leahy, D.G. (2003). The organization of human epidermis: functional epidermal units and phi proportionality. *J. Invest. Dermatol.* *121*, 1440–1446.
- Hodgkinson, C.A., Moore, K.J., Nakayama, A., Steingrímsson, E., Copeland, N.G., Jenkins, N.A., and Arnheiter, H. (1993). Mutations at the mouse microphthalmia locus are associated with defects in a gene encoding a novel basic-helix-loop-helix-zipper protein. *Cell* *74*, 395–404.
- Hodi, F.S., O’Day, S.J., McDermott, D.F., Weber, R.W., Sosman, J.A., Haanen, J.B., Gonzalez, R., Robert, C., Schadendorf, D., and Hassel, J.C. (2010). Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. *N. Engl. J. Med.* *363*, 711–723.
- Hodi, F.S., Corless, C.L., Giobbie-Hurder, A., Fletcher, J.A., Zhu, M., Marino-Enriquez, A., Friedlander, P., Gonzalez, R., Weber, J.S., Gajewski, T.F., *et al.* (2013). Imatinib for Melanomas Harboring Mutationally Activated or Amplified KIT Arising on Mucosal, Acral, and Chronically Sun-Damaged Skin. *J. Clin. Oncol.*
- Hodis, E., Watson, I.R., Kryukov, G.V., Arold, S.T., Imielinski, M., Theurillat, J.-P., Nickerson, E., Auclair, D., Li, L., Place, C., *et al.* (2012). A Landscape of Driver Mutations in Melanoma. *Cell* *150*, 251–263.
- Hoeflich, K.P., Gray, D.C., Eby, M.T., Tien, J.Y., Wong, L., Bower, J., Gogineni, A., Zha, J., Cole, M.J., and Stern, H.M. (2006). Oncogenic BRAF is required for tumor growth and maintenance in melanoma models. *Cancer Res.* *66*, 999–1006.
- Hooijkaas, A., Gadiot, J., Morrow, M., Stewart, R., Schumacher, T., and Blank, C.U. (2012). Selective BRAF inhibition decreases tumor-resident lymphocyte frequencies in a mouse model of human melanoma. *Oncolimmunology* *1*, 609–617.

Hu, J., Yu, H., Kornev, A.P., Zhao, J., Filbert, E.L., Taylor, S.S., and Shaw, A.S. (2011). Mutation that blocks ATP binding creates a pseudokinase stabilizing the scaffolding function of kinase suppressor of Ras, CRAF and BRAF. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *108*, 6067–6072.

Huang, M., and Prendergast, G.C. (2006). RhoB in cancer suppression.

Huang, M., DuHadaway, J.B., Prendergast, G.C., and Laury-Kleintop, L.D. (2007). RhoB Regulates PDGFR- Trafficking and Signaling in Vascular Smooth Muscle Cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* *27*, 2597–2605.

Huang, M., Satchell, L., DuHadaway, J.B., Prendergast, G.C., and Laury-Kleintop, L.D. (2011). RhoB links PDGF signaling to cell migration by coordinating activation and localization of Cdc42 and Rac. *J. Cell. Biochem.* *112*, 1572–1584.

Huang, S., Luca, M., Gutman, M., McConkey, D.J., Langley, K.E., Lyman, S.D., and Bar-Eli, M. (1996). Enforced c-KIT expression renders highly metastatic human melanoma cells susceptible to stem cell factor-induced apoptosis and inhibits their tumorigenic and metastatic potential. *Oncogene* *13*, 2339–2347.

Huelsenbeck, J., May, M., Schulz, F., Schelle, I., Ronkina, N., Hohenegger, M., Fritz, G., Just, I., Gerhard, R., and Genth, H. (2012). Cytoprotective effect of the small GTPase RhoB expressed upon treatment of fibroblasts with the Ras-glucosylating *Clostridium sordellii* lethal toxin. *FEBS Lett.* *586*, 3665–3673.

Hussussian, C.J., Struewing, J.P., Goldstein, A.M., Higgins, P.A.T., Ally, D.S., Sheahan, M.D., Clark, W.H., Tucker, M.A., and Dracopoli, N.C. (1994). Germline p16 mutations in familial melanoma - Nature Genetics. *Nat. Genet.* *8*, 15–21.

Ibrahim, N., and Haluska, F.G. (2009a). Molecular pathogenesis of cutaneous melanocytic neoplasms. *Annu. Rev. Pathol.* *4*, 551–579.

Ibrahim, N., and Haluska, F.G. (2009b). Molecular Pathogenesis of Cutaneous Melanocytic Neoplasms. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* *4*, 551–579.

Infante, J.R., Fecher, L.A., Falchook, G.S., Nallapareddy, S., Gordon, M.S., Becerra, C., DeMarini, D.J., Cox, D.S., Xu, Y., and Morris, S.R. (2012). Safety, pharmacokinetic, pharmacodynamic, and efficacy data for the oral MEK inhibitor trametinib: a phase 1 dose-escalation trial. *Lancet Oncol.*

INVS Liste des registres qualifiés au 1er janvier 2013 / Comité national des registres / Espace professionnels / Accueil.

Isomura, M., Kikuchi, A., Ohga, N., and Takai, Y. (1991). Regulation of binding of rhoB p20 to membranes by its specific regulatory protein, GDP dissociation inhibitor. *Oncogene* *6*, 119–124.

Jähner, D., and Hunter, T. (1991). The ras-related gene rhoB is an immediate-early gene inducible by v-Fps, epidermal growth factor, and platelet-derived growth factor in rat fibroblasts. *Mol. Cell. Biol.* *11*, 3682–3690.

Jiang, K., Delarue, F.L., and Sebti, S.M. (2004a). EGFR, ErbB2 and Ras but not Src suppress RhoB expression while ectopic expression of RhoB antagonizes oncogene-mediated transformation. *Oncogene* *23*, 1136–1145.

Jiang, K., Sun, J., Cheng, J., Djeu, J.Y., Wei, S., and Sebti, S. (2004b). Akt Mediates Ras Downregulation of RhoB, a Suppressor of Transformation, Invasion, and Metastasis. *Mol. Cell. Biol.* *24*, 5565–5576.

- Johannessen, C.M., Boehm, J.S., Kim, S.Y., Thomas, S.R., Wardwell, L., Johnson, L.A., Emery, C.M., Stransky, N., Cogdill, A.P., Barretina, J., *et al.* (2010). COT drives resistance to RAF inhibition through MAP kinase pathway reactivation. *Nature* 468, 968–972.
- Jonsson, A., Tuominen, R., Grafström, E., Hansson, J., and Egyhazi, S. (2010). High Frequency of p16INK4A Promoter Methylation in NRAS-Mutated Cutaneous Melanoma. *J. Invest. Dermatol.* 130, 2809–2817.
- Jovanovic, P., Mihajlovic, M., Djordjevic-Jocic, J., Vlajkovic, S., Cekic, S., and Stefanovic, V. (2013). Ocular melanoma: an overview of the current status. *Int J Clin Exp Pathol* 6, 1230–1244.
- Kalialis, L.V., Drzewiecki, K.T., and Klyver, H. (2009). Spontaneous regression of metastases from melanoma: review of the literature. *Melanoma Res.* 19, 275–282.
- Kamai, T., Tsujii, T., Arai, K., Takagi, K., Asami, H., Ito, Y., and Oshima, H. (2003). Significant association of Rho/ROCK pathway with invasion and metastasis of bladder cancer. *Clin. Cancer Res.* 9, 2632–2641.
- Kamasani, U., Liu, A., and Prendergast, G.C. (2003). Genetic response to farnesyltransferase inhibitors: proapoptotic targets of RhoB. *Cancer Biol. Ther.* 2, 273–280.
- Kamasani, U., Huang, M., DuHadaway, J.B., Prochownik, E.V., Donover, P.S., and Prendergast, G.C. (2004). Cyclin B1 is a critical target of RhoB in the cell suicide program triggered by farnesyl transferase inhibition. *Cancer Res.* 64, 8389–8396.
- Kamata, T., and Pritchard, C. (2011). Mechanisms of aneuploidy induction by RAS and RAF oncogenes. *Am. J. Cancer Res.* 1, 955.
- Kappelmann, M., Kuphal, S., Meister, G., Vardimon, L., and Bosserhoff, A.-K. (2012). MicroRNA miR-125b controls melanoma progression by direct regulation of c-Jun protein expression. *Oncogene* 32, 2984–2991.
- Karlsson, R., Pedersen, E.D., Wang, Z., and Brakebusch, C. (2009). Rho GTPase function in tumorigenesis. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Rev. Cancer* 1796, 91–98.
- Katiyar, P., and Aplin, A.E. (2011). FOXD3 Regulates Migration Properties and Rnd3 Expression in Melanoma Cells. *Mol. Cancer Res.* 9, 545–552.
- Kazerounian, S., Gerald, D., Huang, M., Chin, Y.R., Udayakumar, D., Zheng, N., O'Donnell, R.K., Perruzzi, C., Mangiante, L., Pourat, J., *et al.* (2012). RhoB Differentially Controls Akt Function in Tumor Cells and Stromal Endothelial Cells during Breast Tumorigenesis. *Cancer Res.* 73, 50–61.
- Kennedy, C., ter Huurne, J., Berkhout, M., Gruis, N., Bastiaens, M., Bergman, W., Willemze, R., and Bavinck, J.N.B. (2001). Melanocortin 1 receptor (MC1R) gene variants are associated with an increased risk for cutaneous melanoma which is largely independent of skin type and hair color. *J. Invest. Dermatol.* 117, 294–300.
- Khokhlatchev, A.V., Canagarajah, B., Wilsbacher, J., Robinson, M., Atkinson, M., Goldsmith, E., and Cobb, M.H. (1998). Phosphorylation of the MAP kinase ERK2 promotes its homodimerization and nuclear translocation. *Cell* 93, 605–615.
- Kim, B.-K., Kim, H.M., Chung, K.-S., Kim, D.-M., Park, S.-K., Song, A., Won, K.-J., Lee, K., Oh, Y.-K., Lee, K., *et al.* (2011). Upregulation of RhoB via c-Jun N-terminal kinase signaling induces apoptosis of the human gastric carcinoma NUGC-3 cells treated with NSC12618. *Carcinogenesis* 32, 254–261.

- Kim, C.-H., Won, M., Choi, C.-H., Ahn, J., Kim, B.-K., Song, K.-B., Kang, C.-M., and Chung, K.-S. (2010a). Increase of RhoB in γ -radiation-induced apoptosis is regulated by c-Jun N-terminal kinase in Jurkat T cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *391*, 1182–1186.
- Kim, D.-M., Chung, K.-S., Choi, S.-J., Jung, Y.-J., Park, S.-K., Han, G.-H., Ha, J.-S., Song, K.-B., Choi, N.-S., Kim, H.-M., *et al.* (2009a). RhoB induces apoptosis via direct interaction with TNFAIP1 in HeLa cells. *Int. J. Cancer J. Int. Cancer* *125*, 2520–2527.
- Kim, D.-M., Won, M., Chung, C.-S., Kim, S., Yim, H.J., Jung, S.-H., and Jeong, S. (2010b). JNK-mediated transcriptional upregulation of RhoB is critical for apoptosis of HCT-116 colon cancer cells by a novel diarylsulfonylurea derivative. *Apoptosis* *15*, 1540–1548.
- Kim, T.Y., Vigil, D., Der, C.J., and Juliano, R.L. (2009b). Role of DLC-1, a tumor suppressor protein with RhoGAP activity, in regulation of the cytoskeleton and cell motility. *Cancer Metastasis Rev.* *28*, 77–83.
- Kinkade, R., Dasgupta, P., Carie, A., Pernazza, D., Carless, M., Pillai, S., Lawrence, N., Sebti, S.M., and Chellappan, S. (2008). A small molecule disruptor of Rb/Raf-1 interaction inhibits cell proliferation, angiogenesis, and growth of human tumor xenografts in nude mice. *Cancer Res.* *68*, 3810–3818.
- Kirkwood, J.M., Bastholt, L., Robert, C., Sosman, J., Larkin, J., Hersey, P., Middleton, M., Cantarini, M., Zazulina, V., Kemsley, K., *et al.* (2011). Phase II, Open-Label, Randomized Trial of the MEK1/2 Inhibitor Selumetinib as Monotherapy versus Temozolomide in Patients with Advanced Melanoma. *Clin. Cancer Res.* *18*, 555–567.
- Kitzing, T.M., Wang, Y., Pertz, O., Copeland, J.W., and Grosse, R. (2010). Formin-like 2 drives amoeboid invasive cell motility downstream of RhoC. *Oncogene* *29*, 2441–2448.
- Klein, R.M., and Aplin, A.E. (2009). Rnd3 Regulation of the Actin Cytoskeleton Promotes Melanoma Migration and Invasive Outgrowth in Three Dimensions. *Cancer Res.* *69*, 2224–2233.
- Klein, R.M., and Higgins, P.J. (2011). A switch in RND3-RHOA signaling is critical for melanoma cell invasion following mutant-BRAF inhibition. *Mol. Cancer* *10*, 114.
- Klein, R.M., Spofford, L.S., Abel, E.V., Ortiz, A., and Aplin, A.E. (2008). B-RAF regulation of Rnd3 participates in actin cytoskeletal and focal adhesion organization. *Mol. Biol. Cell* *19*, 498–508.
- Knauf, J.A., Ma, X., Smith, E.P., Zhang, L., Mitsutake, N., Liao, X.-H., Refetoff, S., Nikiforov, Y.E., and Fagin, J.A. (2005). Targeted expression of BRAFV600E in thyroid cells of transgenic mice results in papillary thyroid cancers that undergo dedifferentiation. *Cancer Res.* *65*, 4238–4245.
- Kolch, W. (2005). Coordinating ERK/MAPK signalling through scaffolds and inhibitors. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *6*, 827–837.
- Kourlas, P.J., Strout, M.P., Becknell, B., Veronese, M.L., Croce, C.M., Theil, K.S., Krahe, R., Ruutu, T., Knuutila, S., and Bloomfield, C.D. (2000). Identification of a gene at 11q23 encoding a guanine nucleotide exchange factor: evidence for its fusion with MLL in acute myeloid leukemia. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *97*, 2145–2150.
- Krauthammer, M., Kong, Y., Ha, B.H., Evans, P., Bacchiocchi, A., McCusker, J.P., Cheng, E., Davis, M.J., Goh, G., Choi, M., *et al.* (2012). Exome sequencing identifies recurrent somatic RAC1 mutations in melanoma. *Nat. Genet.* *44*, 1006–1014.

- Kusama, T., Mukai, M., Endo, H., Ishikawa, O., Tatsuta, M., Nakamura, H., and Inoue, M. (2006). Inactivation of Rho GTPases by p190 RhoGAP reduces human pancreatic cancer cell invasion and metastasis. *Cancer Sci.* *97*, 848–853.
- Kwong, L.N., Costello, J.C., Liu, H., Jiang, S., Helms, T.L., Langsdorf, A.E., Jakubosky, D., Genovese, G., Muller, F.L., Jeong, J.H., *et al.* (2012). Oncogenic NRAS signaling differentially regulates survival and proliferation in melanoma. *Nat. Med.* *18*, 1503–1510.
- Lajoie-Mazenc, I., Tovar, D., Penary, M., Lortal, B., Allart, S., Favard, C., Brihoum, M., Pradines, A., and Favre, G. (2008). MAP1A light chain-2 interacts with GTP-RhoB to control epidermal growth factor (EGF)-dependent EGF receptor signaling. *J. Biol. Chem.* *283*, 4155–4164.
- Lathtz, C., Stranzenbach, R., Fiedler, E., Helmbokd, P., and Dammann, R.H. (2009). Methylation of PTEN as a Prognostic Factor in Malignant Melanoma of the Skin. *J. Invest. Dermatol.* *130*, 620–622.
- Le, K., Blomain, E.S., Rodeck, U., and Aplin, A.E. (2013). Selective RAF inhibitor impairs ERK1/2 phosphorylation and growth in mutant NRAS, vemurafenib-resistant melanoma cells. *Pigment Cell Melanoma Res.* *26*, 509–517.
- Lebowitz, P.F. (1997). Prenylation of RhoB Is Required for Its Cell Transforming Function but Not Its Ability to Activate Serum Response Element-dependent Transcription. *J. Biol. Chem.* *272*, 16093–16095.
- Lebowitz, P.F., and Prendergast, G.C. (1998). Functional interaction between RhoB and the transcription factor DB1. *Cell Adhes. Commun.* *6*, 277–287.
- Lee, J.T., Li, L., Brafford, P.A., van den Eijnden, M., Halloran, M.B., Sproesser, K., Haass, N.K., Smalley, K.S.M., Tsai, J., Bollag, G., *et al.* (2010). PLX4032, a potent inhibitor of the B-Raf V600E oncogene, selectively inhibits V600E-positive melanomas: PLX4032, a potent inhibitor of the B-Raf V600E oncogene. *Pigment Cell Melanoma Res.* *23*, 820–827.
- Lee, W.-J., Kim, D.-U., Lee, M.-Y., and Choi, K.-Y. (2007). Identification of proteins interacting with the catalytic subunit of PP2A by proteomics. *PROTEOMICS* *7*, 206–214.
- Leszczynska, K., Kaur, S., Wilson, E., Bicknell, R., and Heath, V.L. (2011). The role of RhoJ in endothelial cell biology and angiogenesis. *Biochem. Soc. Trans.* *39*, 1606–1611.
- Levy, C., Khaled, M., and Fisher, D.E. (2006). MITF: master regulator of melanocyte development and melanoma oncogene. *Trends Mol. Med.* *12*, 406–414.
- Li, Y.-D., Liu, Y.-P., Cao, D.-M., Yan, Y.-M., Hou, Y.-N., Zhao, J.-Y., Yang, R., Xia, Z.-F., and Lu, J. (2011). Induction of small G protein RhoB by non-genotoxic stress inhibits apoptosis and activates NF- κ B. *J. Cell. Physiol.* *226*, 729–738.
- Liang, S., Sharma, A., Peng, H.-H., Robertson, G., and Dong, C. (2007). Targeting mutant (V600E) B-Raf in melanoma interrupts immunoediting of leukocyte functions and melanoma extravasation. *Cancer Res.* *67*, 5814–5820.
- Liao, Y.-C., and Lo, S.H. (2008). Deleted in liver cancer-1 (DLC-1): a tumor suppressor not just for liver. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* *40*, 843–847.

- Lidke, D.S., Huang, F., Post, J.N., Rieger, B., Wilsbacher, J., Thomas, J.L., Pouyssegur, J., Jovin, T.M., and Lenormand, P. (2009). ERK Nuclear Translocation Is Dimerization-independent but Controlled by the Rate of Phosphorylation. *J. Biol. Chem.* **285**, 3092–3102.
- Lister, J.A., Capper, A., Zeng, Z., Mathers, M.E., Richardson, J., Paranthaman, K., Jackson, I.J., and Patton, E.E. (2013). A Conditional Zebrafish MITF Mutation Reveals MITF levels are Critical for Melanoma Promotion Versus Regression in vivo. *J. Invest. Dermatol.*
- Lito, P., Pratilas, C.A., Joseph, E.W., Tadi, M., Halilovic, E., Zubrowski, M., Huang, A., Wong, W.L., Callahan, M.K., Merghoub, T., *et al.* (2012). Relief of Profound Feedback Inhibition of Mitogenic Signaling by RAF Inhibitors Attenuates Their Activity in BRAFV600E Melanomas. *Cancer Cell* **22**, 668–682.
- Liu, A., and Prendergast, G.C. (2000). Geranylgeranylated RhoB is sufficient to mediate tissue-specific suppression of Akt kinase activity by farnesyltransferase inhibitors. *FEBS Lett.* **481**, 205–208.
- Liu, J.-P., and Jessell, T.M. (1998). A role for rhoB in the delamination of neural crest cells from the dorsal neural tube. *Development* **125**, 5055–5067.
- Liu, A., Cerniglia, G.J., Bernhard, E.J., and Prendergast, G.C. (2001a). RhoB is required to mediate apoptosis in neoplastically transformed cells after DNA damage. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **98**, 6192–6197.
- Liu, A.-X., Rane, N., Liu, J.-P., and Prendergast, G.C. (2001b). RhoB Is Dispensable for Mouse Development, but It Modifies Susceptibility to Tumor Formation as Well as Cell Adhesion and Growth Factor Signaling in Transformed Cells. *Mol. Cell. Biol.* **21**, 6906–6912.
- Liu, M., Tang, Q., Qiu, M., Lang, N., Li, M., Zheng, Y., and Bi, F. (2011). miR-21 targets the tumor suppressor RhoB and regulates proliferation, invasion and apoptosis in colorectal cancer cells. *FEBS Lett.* **585**, 2998–3005.
- Liu, P., Cheng, H., Roberts, T.M., and Zhao, J.J. (2009). Targeting the phosphoinositide 3-kinase pathway in cancer. *Nat. Rev. Drug Discov.* **8**, 627–644.
- Lohmann, S., Wollscheid, U., Huber, C., and Seliger, B. (1996). Multiple levels of MHC class I down-regulation by ras oncogenes. *Scand. J. Immunol.* **43**, 537–544.
- Long, G.V., Trefzer, U., Davies, M.A., Keefe, R.F., Ascierto, P.A., Chapman, P.B., Puzanov, I., Hauschild, A., Robert, C., and Algazi, A. (2012). Dabrafenib in patients with Val600Glu or Val600Lys BRAF-mutant melanoma metastatic to the brain (BREAK-MB): a multicentre, open-label, phase 2 trial. *Lancet Oncol.*
- Lopez-Bergami, P. (2011). The role of mitogen- and stress-activated protein kinase pathways in melanoma: The role of MAPK pathways in melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res.* **24**, 902–921.
- Lopez-Bergami, P., Huang, C., Goydos, J.S., Yip, D., Bar-Eli, M., Herlyn, M., Smalley, K.S.M., Mahale, A., Eroshkin, A., Aaronson, S., *et al.* (2007). Rewired ERK-JNK Signaling Pathways in Melanoma. *Cancer Cell* **11**, 447–460.
- Loughlin, J., Meulenbelt, I., Min, J., Mustafa, Z., Sinsheimer, J.S., Carr, A., and Slagboom, P.E. (2007). Genetic association analysis of RHOB and TXNDC3 in osteoarthritis. *Am. J. Hum. Genet.* **80**, 383–386; author reply 386–387.
- Lourari, S., Paul, C., Gouraud, P.-A., Tavitian, S., Viraben, R., Leccia, M.-T., Saiag, P., Lebbe, C., and Meyer, N. (2012). Sentinel lymph node biopsy for melanoma is becoming a consensus: a national

- survey of French centres involved in melanoma care in 2008. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol. JEADV* 26, 1230–1235.
- Mackie, R.M. (1990). Clinical recognition of early invasive malignant melanoma. *BMJ* 301, 1005–1006.
- Madaule, P., Furuyashiki, T., Reid, T., Ishizaki, T., Watanabe, G., Morii, N., and Narumiya, S. (1995). A novel partner for the GTP-bound forms of rho and rac. *FEBS Lett.* 377, 243–248.
- Maertens, O., Johnson, B., Hollstein, P., Frederick, D.T., Cooper, Z.A., Messiaen, L., Bronson, R.T., McMahon, M., Granter, S., Flaherty, K., *et al.* (2012). Elucidating Distinct Roles for NF1 in Melanomagenesis. *Cancer Discov.* 3, 338–349.
- Mahr, S., and Müller-Hilke, B. (2007). Transcriptional activity of the RHOB gene is influenced by regulatory polymorphisms in its promoter region. *Genomic Med.* 1, 125–128.
- Mahr, S., Burmester, G.-R., Hilke, D., Göbel, U., Grützkau, A., Häupl, T., Hauschild, M., Koczan, D., Krenn, V., Neidel, J., *et al.* (2006). Cis- and trans-acting gene regulation is associated with osteoarthritis. *Am. J. Hum. Genet.* 78, 793–803.
- Malcolm, T., Ettehadieh, E., and Sadowski, I. (2003). Mitogen-responsive expression of RhoB is regulated by RNA stability. *Oncogene* 22, 6142–6150.
- Malumbres, M., and Barbacid, M. (2003). RAS oncogenes: the first 30 years. *Nat. Rev. Cancer* 3, 459–465.
- Mamouni, K., Cristini, A., Guirouilh-Barbat, J., Monferran, S., Lemarié, A., Faye, J.-C., Lopez, B.S., Favre, G., and Sordet, O. (submitted). Chk2-dependent induction of RhoB facilitates γ -H2AX dephosphorylation and DNA double-strand break repair.
- Marais, R., Light, Y., Paterson, H.F., Mason, C.S., and Marshall, C.J. (1997). Differential regulation of Raf-1, A-Raf, and B-Raf by oncogenic ras and tyrosine kinases. *J. Biol. Chem.* 272, 4378–4383.
- Marks, R.E., Ho, A.W., Robbel, C., Kuna, T., Berk, S., and Gajewski, T.F. (2007). Farnesyltransferase inhibitors inhibit T-cell cytokine production at the posttranscriptional level. *Blood* 110, 1982–1988.
- Marlow, L.A., Reynolds, L.A., Cleland, A.S., Cooper, S.J., Gumz, M.L., Kurakata, S., Fujiwara, K., Zhang, Y., Sebo, T., Grant, C., *et al.* (2009). Reactivation of Suppressed RhoB is a Critical Step for the Inhibition of Anaplastic Thyroid Cancer Growth. *Cancer Res.* 69, 1536–1544.
- Marlow, L.A., D’Innocenzi, J., Zhang, Y., Rohl, S.D., Cooper, S.J., Sebo, T., Grant, C., Mclver, B., Kasperbauer, J.L., Wadsworth, J.T., *et al.* (2010). Detailed Molecular Fingerprinting of Four New Anaplastic Thyroid Carcinoma Cell Lines and Their Use for Verification of RhoB as a Molecular Therapeutic Target. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 95, 5338–5347.
- Maurer, G., Tarkowski, B., and Baccarini, M. (2011). Raf kinases in cancer—roles and therapeutic opportunities. *Oncogene* 30, 3477–3488.
- Mazieres, J., Antonia, T., Daste, G., Muro-Cacho, C., Berchery, D., Tillement, V., Pradines, A., Sebti, S., and Favre, G. (2004). Loss of RhoB expression in human lung cancer progression. *Clin. Cancer Res.* 10, 2742–2750.

- Mazières, J., Tillement, V., Allal, C., Clanet, C., Bobin, L., Chen, Z., Sebti, S.M., Favre, G., and Pradines, A. (2005). Geranylgeranylated, but not farnesylated, RhoB suppresses Ras transformation of NIH-3T3 cells. *Exp. Cell Res.* *304*, 354–364.
- Mazières, J., Tovar, D., He, B., Nieto-Acosta, J., Marty-Detraves, C., Clanet, C., Pradines, A., Jablons, D., and Favre, G. (2007). Epigenetic regulation of RhoB loss of expression in lung cancer. *BMC Cancer* *7*, 220.
- McCarthy, S.A., Samuels, M.L., Pritchard, C.A., Abraham, J.A., and McMahon, M. (1995). Rapid induction of heparin-binding epidermal growth factor/diphtheria toxin receptor expression by Raf and Ras oncogenes. *Genes Dev.* *9*, 1953–1964.
- McGill, G.G., Horstmann, M., Widlund, H.R., Du, J., Motyckova, G., Nishimura, E.K., Lin, Y.-L., Ramaswamy, S., Avery, W., and Ding, H.-F. (2002). Bcl2 regulation by the melanocyte master regulator Mitf modulates lineage survival and melanoma cell viability. *Cell* *109*, 707–718.
- McKay, M.M., and Morrison, D.K. (2007). Integrating signals from RTKs to ERK/MAPK. *Oncogene* *26*, 3113–3121.
- McKay, M.M., Ritt, D.A., and Morrison, D.K. (2009). Signaling dynamics of the KSR1 scaffold complex. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *106*, 11022–11027.
- Médale-Giamarchi, C., Lajoie-Mazenc, I., Malissein, E., Meunier, E., Couderc, B., Bergé, Y., Filleron, T., Keller, L., Marty, C., and Lacroix-Triki, M. (2013). RhoB modifies estrogen responses in breast cancer cells by influencing expression of the estrogen receptor. *Breast Cancer Res.* *15*, R6.
- Mélissopoulos, A., and Levacher, C. (1998). *La peau: structure et physiologie* (Paris; Cachan: Tec & Doc Lavoisier ; Editions Médicales internationales).
- Mellor, H., Flynn, P., Nobes, C.D., Hall, A., and Parker, P.J. (1998). PRK1 is targeted to endosomes by the small GTPase, RhoB. *J. Biol. Chem.* *273*, 4811–4814.
- Meng, Q., and Xia, Y. (2011). c-Jun, at the crossroad of the signaling network. *Protein Cell* *2*, 889–898.
- Meyer, N., Peyret-Lacombe, A., Canguilhem, B., Médale-Giamarchi, C., Mamouni, K., Cristini, A., Monferran, S., Lamant, L., Filleron, T., Pradines, A., *et al.* (2013). RhoB Promotes Cancer Initiation by Protecting Keratinocytes from UVB-Induced Apoptosis but Limits Tumor Aggressiveness. *J. Invest. Dermatol.*
- Michaelson, D., Silletti, J., Murphy, G., D'Eustachio, P., Rush, M., and Philips, M.R. (2001). Differential localization of Rho GTPases in live cells: regulation by hypervariable regions and RhoGDI binding. *J. Cell Biol.* *152*, 111–126.
- Michaloglou, C., Vredeveld, L.C.W., Soengas, M.S., Denoyelle, C., Kuilman, T., van der Horst, C.M.A.M., Majoor, D.M., Shay, J.W., Mooi, W.J., and Peeper, D.S. (2005). BRAFE600-associated senescence-like cell cycle arrest of human naevi. *Nature* *436*, 720–724.
- Micheli, A., Mugno, E., Krogh, V., Quinn, M.J., Coleman, M., Hakulinen, T., Gatta, G., Berrino, F., Capocaccia, R., and the EUROPREVAL Working Group (2002). Cancer prevalence in European registry areas. *Ann. Oncol.* *13*, 840–865.

- Middleton, M.R., Grob, J.J., Aaronson, N., Fierlbeck, G., Tilgen, W., Seiter, S., Gore, M., Aamdal, S., Cebon, J., Coates, A., *et al.* (2000). Randomized Phase III Study of Temozolomide Versus Dacarbazine in the Treatment of Patients With Advanced Metastatic Malignant Melanoma. *J Clin Oncol* *18*, 158–.
- Milia, J., Teyssier, F., Dalenc, F., Ader, I., Delmas, C., Pradines, A., Lajoie-Mazenc, I., Baron, R., Bonnet, J., Cohen-Jonathan, E., *et al.* (2005). Farnesylated RhoB inhibits radiation-induced mitotic cell death and controls radiation-induced centrosome overduplication. *Cell Death Differ.* *12*, 492–501.
- Miller, A.J. (2004). SUMOylation of MITF and its related family members TFE3 and TFEB. *J. Biol. Chem.*
- Miller, A.J., and Mihm Jr, M.C. (2006). Melanoma. *N. Engl. J. Med.* *355*, 51–65.
- Mircescu, H., Steuve, S., Savonet, V., Degraef, C., Mellor, H., Dumont, J.E., Maenhaut, C., and Pirson, I. (2002). Identification and characterization of a novel activated RhoB binding protein containing a PDZ domain whose expression is specifically modulated in thyroid cells by cAMP. *Eur. J. Biochem. FEBS* *269*, 6241–6249.
- Mitsutake, N., Knauf, J.A., Mitsutake, S., Mesa, C., Zhang, L., and Fagin, J.A. (2005). Conditional BRAFV600E expression induces DNA synthesis, apoptosis, dedifferentiation, and chromosomal instability in thyroid PCCL3 cells. *Cancer Res.* *65*, 2465–2473.
- Mizutani, S., Inouye, K., Koide, H., and Kaziro, Y. (2001). Involvement of B-Raf in Ras-induced Raf-1 activation. *FEBS Lett.* *507*, 295–298.
- Mohl, M., Winkler, S., Wieland, T., and Lutz, S. (2006). Gef10—the third member of a Rho-specific guanine nucleotide exchange factor subfamily with unusual protein architecture. *Naunyn. Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* *373*, 333–341.
- Monferran, S., Skuli, N., Delmas, C., Favre, G., Bonnet, J., Cohen-Jonathan-Moyal, E., and Toulas, C. (2008). Alphasbeta3 and alphasbeta5 integrins control glioma cell response to ionising radiation through ILK and RhoB. *Int. J. Cancer J. Int. Cancer* *123*, 357–364.
- Montagut, C., Sharma, S.V., Shioda, T., McDermott, U., Ulman, M., Ulkus, L.E., Dias-Santagata, D., Stubbs, H., Lee, D.Y., and Singh, A. (2008). Elevated CRAF as a potential mechanism of acquired resistance to BRAF inhibition in melanoma. *Cancer Res.* *68*, 4853–4861.
- Montero-Conde, C., Ruiz-Llorente, S., Dominguez, J.M., Knauf, J.A., Viale, A., Sherman, E.J., Ryder, M., Ghossein, R.A., Rosen, N., and Fagin, J.A. (2013). Relief of Feedback Inhibition of HER3 Transcription by RAF and MEK Inhibitors Attenuates Their Antitumor Effects in BRAF-Mutant Thyroid Carcinomas. *Cancer Discov.* *3*, 520–533.
- Morris, E.J., Jha, S., Restaino, C.R., Dayananth, P., Zhu, H., Cooper, A., Carr, D., Deng, Y., Jin, W., Black, S., *et al.* (2013). Discovery of a Novel ERK Inhibitor with Activity in Models of Acquired Resistance to BRAF and MEK Inhibitors. *Cancer Discov.* *3*, 742–750.
- Nagasaka, T., Koi, M., Kloor, M., Gebert, J., Vilkin, A., Nishida, N., Shin, S.K., Sasamoto, H., Tanaka, N., Matsubara, N., *et al.* (2008). Mutations in Both KRAS and BRAF May Contribute to the Methylator Phenotype in Colon Cancer. *Gastroenterology* *134*, 1950–1960.e1.
- Narumiya, S., Tanji, M., and Ishizaki, T. (2009). Rho signaling, ROCK and mDia1, in transformation, metastasis and invasion. *Cancer Metastasis Rev.* *28*, 65–76.

- Natali, P.G., Nicotra, M.R., Winkler, A.B., Cavaliere, R., Bigotti, A., and Ullrich, A. (1992). Progression of human cutaneous melanoma is associated with loss of expression of c-kit proto-oncogene receptor. *Int. J. Cancer* *52*, 197–201.
- Nazarian, R., Shi, H., Wang, Q., Kong, X., Koya, R.C., Lee, H., Chen, Z., Lee, M.-K., Attar, N., Sazegar, H., *et al.* (2010). Melanomas acquire resistance to B-RAF(V600E) inhibition by RTK or N-RAS upregulation. *Nature* *468*, 973–977.
- Neel, N.F., Lapierre, L.A., Goldenring, J.R., and Richmond, A. (2007). RhoB plays an essential role in CXCR2 sorting decisions. *J. Cell Sci.* *120*, 1559–1571.
- Ng, R., Song, G., Roll, G.R., Frandsen, N.M., and Willenbring, H. (2012). A microRNA-21 surge facilitates rapid cyclin D1 translation and cell cycle progression in mouse liver regeneration. *J. Clin. Invest.* *122*, 1097–1108.
- Nguyen, D.X., Bos, P.D., and Massagué, J. (2009). Metastasis: from dissemination to organ-specific colonization. *Nat. Rev. Cancer* *9*, 274–284.
- Nikolaou, V.A., Stratigos, Alexander J., Flaherty, Keith T., and Tsao, Hensin (2012). Melanoma: New Insights and New Therapies. *J. Invest. Dermatol.* *132*, 854–863.
- Oberholzer, P.A., Kee, D., Dziunycz, P., Sucker, A., Kamsukom, N., Jones, R., Roden, C., Chalk, C.J., Ardlie, K., Palescandolo, E., *et al.* (2011). RAS Mutations Are Associated With the Development of Cutaneous Squamous Cell Tumors in Patients Treated With RAF Inhibitors. *J. Clin. Oncol.* *30*, 316–321.
- Ohashi, A., Funasaka, Y., Ueda, M., and Ichihashi, M. (1996). c-KIT receptor expression in cutaneous malignant melanoma and benign melanotic naevi. *Melanoma Res.* *6*, 25–30.
- Omholt, K., Platz, A., Kanter, L., Ringborg, U., and Hansson, J. (2003). NRAS and BRAF mutations arise early during melanoma pathogenesis and are preserved throughout tumor progression. *Clin. Cancer Res.* *9*, 6483–6488.
- Ongusaha, P.P., Kim, H.-G., Boswell, S.A., Ridley, A.J., Der, C.J., Dotto, G.P., Kim, Y.-B., Aaronson, S.A., and Lee, S.W. (2006). RhoE Is a Pro-Survival p53 Target Gene that Inhibits ROCK I-Mediated Apoptosis in Response to Genotoxic Stress. *Curr. Biol.* *16*, 2466–2472.
- Ordway, J.M., Williams, K., and Curran, T. (2004). Transcription repression in oncogenic transformation: common targets of epigenetic repression in cells transformed by Fos, Ras or Dnmt1. *Oncogene* *23*, 3737–3748.
- Orgaz, J.L., and Sanz-Moreno, V. (2013). Emerging molecular targets in melanoma invasion and metastasis. *Pigment Cell Melanoma Res.* *26*, 39–57.
- Ott, P.A., Hamilton, A., Min, C., Safarzadeh-Amiri, S., Goldberg, L., Yoon, J., Yee, H., Buckley, M., Christos, P.J., Wright, J.J., *et al.* (2010). A Phase II Trial of Sorafenib in Metastatic Melanoma with Tissue Correlates. *PLoS ONE* *5*, e15588.
- Owens, D.M., and Keyse, S.M. (2007). Differential regulation of MAP kinase signalling by dual-specificity protein phosphatases. *Oncogene* *26*, 3203–3213.
- Packer, L.M., East, P., Reis-Filho, J.S., and Marais, R. (2009). Identification of direct transcriptional targets of (V600E)BRAF/MEK signalling in melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res.* *22*, 785–798.

- Panka, D.J. (2006). The Raf Inhibitor BAY 43-9006 (Sorafenib) Induces Caspase-Independent Apoptosis in Melanoma Cells. *Cancer Res.* *66*, 1611–1619.
- Papadimitriou, E., Kardassis, D., Moustakas, A., and Stournaras, C. (2011). TGF β -induced early activation of the small GTPase RhoA is Smad2/3-independent and involves Src and the guanine nucleotide exchange factor Vav2. *Cell. Physiol. Biochem. Int. J. Exp. Cell. Physiol. Biochem. Pharmacol.* *28*, 229–238.
- Paraiso, K.H.T., Xiang, Y., Rebecca, V.W., Abel, E.V., Chen, Y.A., Munko, A.C., Wood, E., Fedorenko, I.V., Sondak, V.K., Anderson, A.R.A., *et al.* (2011). PTEN Loss Confers BRAF Inhibitor Resistance to Melanoma Cells through the Suppression of BIM Expression. *Cancer Res.* *71*, 2750–2760.
- Parmiter, A.H., Balabann, G., Clark, W.H., and Nowell, P. (1988). Possible involvement of the chromosome region 10q24→q26 in early stages of melanocytic neoplasia. *Cancer Genet. Cytogenet.* *30*, 313–317.
- Pasquinelli, A.E. (2012). MicroRNAs and their targets: recognition, regulation and an emerging reciprocal relationship. *Nat. Rev. Genet.*
- Patton, E.E., Widlund, H.R., Kutok, J.L., Kopani, K.R., Amatruda, J.F., Murphey, R.D., Berghmans, S., Mayhall, E.A., Traver, D., and Fletcher, C.D. (2005). BRAF mutations are sufficient to promote nevi formation and cooperate with p53 in the genesis of melanoma. *Curr. Biol.* *15*, 249–254.
- Plotnikov, A., Zehorai, E., Procaccia, S., and Seger, R. (2011). The MAPK cascades: Signaling components, nuclear roles and mechanisms of nuclear translocation. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.* *1813*, 1619–1633.
- Poch, E., Miñambres, R., Mocholí, E., Ivorra, C., Pérez-Aragó, A., Guerri, C., Pérez-Roger, I., and Guasch, R.M. (2007). RhoE interferes with Rb inactivation and regulates the proliferation and survival of the U87 human glioblastoma cell line. *Exp. Cell Res.* *313*, 719–731.
- Politi, K. (2006). Lung adenocarcinomas induced in mice by mutant EGF receptors found in human lung cancers respond to a tyrosine kinase inhibitor or to down-regulation of the receptors. *Genes Dev.* *20*, 1496–1510.
- Pollock, P.M., Harper, U.L., Hansen, K.S., Yudt, L.M., Stark, M., Robbins, C.M., Moses, T.Y., Hostetter, G., Wagner, U., Kakareka, J., *et al.* (2002). High frequency of BRAF mutations in nevi. *Nat. Genet.* *33*, 19–20.
- Polzien, L., Baljuls, A., Rennefahrt, U.E.E., Fischer, A., Schmitz, W., Zahedi, R.P., Sickmann, A., Metz, R., Albert, S., Benz, R., *et al.* (2009). Identification of Novel *In Vivo* Phosphorylation Sites of the Human Proapoptotic Protein BAD: PORE-FORMING ACTIVITY OF BAD IS REGULATED BY PHOSPHORYLATION. *J. Biol. Chem.* *284*, 28004–28020.
- Ben-Porath, I., and Weinberg, R.A. (2005). The signals and pathways activating cellular senescence. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* *37*, 961–976.
- Porras, B.H., and Cockerell, C.J. (1997). Cutaneous malignant melanoma: classification and clinical diagnosis. *Semin. Cutan. Med. Surg.* *16*, 88–96.
- Poulikakos, P.I., Zhang, C., Bollag, G., Shokat, K.M., and Rosen, N. (2010). RAF inhibitors transactivate RAF dimers and ERK signalling in cells with wild-type BRAF. *Nature* *464*, 427–430.

Poulikakos, P.I., Persaud, Y., Janakiraman, M., Kong, X., Ng, C., Moriceau, G., Shi, H., Atefi, M., Titz, B., Gabay, M.T., *et al.* (2011). RAF inhibitor resistance is mediated by dimerization of aberrantly spliced BRAF(V600E). *Nature* *480*, 387–390.

Prahallad, A., Sun, C., Huang, S., Di Nicolantonio, F., Salazar, R., Zecchin, D., Beijersbergen, R.L., Bardelli, A., and Bernards, R. (2012). Unresponsiveness of colon cancer to BRAF(V600E) inhibition through feedback activation of EGFR. *Nature* *483*, 100–103.

Pylayeva-Gupta, Y., Grabocka, E., and Bar-Sagi, D. (2011). RAS oncogenes: weaving a tumorigenic web. *Nat. Rev. Cancer* *11*, 761–774.

Qi, M. (2005). MAP kinase pathways. *J. Cell Sci.* *118*, 3569–3572.

Van Raamsdonk, C.D., Bezrookove, V., Green, G., Bauer, J., Gaugler, L., O'Brien, J.M., Simpson, E.M., Barsh, G.S., and Bastian, B.C. (2008). Frequent somatic mutations of GNAQ in uveal melanoma and blue naevi. *Nature* *457*, 599–602.

Van Raamsdonk, C.D., Griewank, K.G., Crosby, M.B., Garrido, M.C., Vemula, S., Wiesner, T., Obenaus, A.C., Wackernagel, W., Green, G., and Bouvier, N. (2010). Mutations in GNA11 in uveal melanoma. *N. Engl. J. Med.* *363*, 2191–2199.

Raimondi, S., Sera, F., Gandini, S., Iodice, S., Caini, S., Maisonneuve, P., and Fargnoli, M.C. (2008). MC1R variants, melanoma and red hair color phenotype: A meta-analysis. *Int. J. Cancer* *122*, 2753–2760.

Rangrez, A.Y., M'Baya-Moutoula, E., Metzinger-Le Meuth, V., Hénaut, L., Djelouat, M.S. el I., Benchitrit, J., Massy, Z.A., and Metzinger, L. (2012). Inorganic Phosphate Accelerates the Migration of Vascular Smooth Muscle Cells: Evidence for the Involvement of miR-223. *PLoS ONE* *7*, e47807.

Rebecca, V.W., Sondak, V.K., and Smalley, K.S.M. (2012). A brief history of melanoma. *Melanoma Res.* *22*, 114–122.

Ribas, A., Hodi, F.S., Callahan, M., Konto, C., and Wolchok, J. (2013). Hepatotoxicity with combination of vemurafenib and ipilimumab. *N. Engl. J. Med.* *368*, 1365–1366.

Ridley, A.J. (2013). RhoA, RhoB and RhoC have different roles in cancer cell migration: RHOA, RHOB AND RHOC HAVE DIFFERENT ROLES IN CANCER CELL MIGRATION. *J. Microsc.* *251*, 242–249.

Riento, K., Villalonga, P., Garg, R., and Ridley, A. (2005). Function and regulation of RhoE. *Biochem. Soc. Trans.* *33*, 649–651.

Ritt, D.A., Monson, D.M., Specht, S.I., and Morrison, D.K. (2009). Impact of Feedback Phosphorylation and Raf Heterodimerization on Normal and Mutant B-Raf Signaling. *Mol. Cell. Biol.* *30*, 806–819.

Robert, C., Thomas, L., Bondarenko, I., O'Day, S., M D, J.W., Garbe, C., Lebbe, C., Baurain, J.-F., Testori, A., Grob, J.-J., *et al.* (2011a). Ipilimumab plus Dacarbazine for Previously Untreated Metastatic Melanoma. *N. Engl. J. Med.*

Robert, C., Arnault, J.-P., and Mateus, C. (2011b). RAF inhibition and induction of cutaneous squamous cell carcinoma: *Curr. Opin. Oncol.* *23*, 177–182.

Robert, C., Dummer, R., Gutzmer, R., Lorigan, P., Kim, K.B., Nyakas, M., Arance, A., Liskay, G., Schadendorf, D., and Cantarini, M. (2013). Selumetinib plus dacarbazine versus placebo plus

dacarbazine as first-line treatment for BRAF-mutant metastatic melanoma: a phase 2 double-blind randomised study. *Lancet Oncol.*

Rogers, H.W., Weinstock, M.A., Harris, A.R., Hinckley, M.R., Feldman, S.R., Fleischer, A.B., and Coldiron, B.M. (2010). Incidence estimate of nonmelanoma skin cancer in the United States, 2006. *Arch. Dermatol.* *146*, 283.

Rondanino, C., Rojas, R., Ruiz, W.G., Wang, E., Hughey, R.P., Dunn, K.W., and Apodaca, G. (2007). RhoB-Dependent Modulation of Postendocytic Traffic in Polarized Madin-Darby Canine Kidney Cells. *Traffic* *8*, 932–949.

Roskoski, R. (2010). RAF protein-serine/threonine kinases: Structure and regulation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *399*, 313–317.

Roskoski, R. (2012a). ERK1/2 MAP kinases: Structure, function, and regulation. *Pharmacol. Res.* *66*, 105–143.

Roskoski, R. (2012b). MEK1/2 dual-specificity protein kinases: Structure and regulation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *417*, 5–10.

Ross, A.L., Sanchez, M.I., and Grichnik, J.M. (2011). Molecular Nevogenesis. *Dermatol. Res. Pr.* *2011*, 1–9.

Rushworth, L.K., Hindley, A.D., O'Neill, E., and Kolch, W. (2006). Regulation and Role of Raf-1/B-Raf Heterodimerization. *Mol. Cell. Biol.* *26*, 2262–2272.

Ruth, M.C., Xu, Y., Maxwell, I.H., Ahn, N.G., Norris, D.A., and Shellman, Y.G. (2006). RhoC promotes human melanoma invasion in a PI3K/Akt-dependent pathway. *J. Invest. Dermatol.* *126*, 862–868.

Sabatel, C., Malvaux, L., Bovy, N., Deroanne, C., Lambert, V., Gonzalez, M.-L.A., Colige, A., Rakic, J.-M., Noël, A., Martial, J.A., *et al.* (2011). MicroRNA-21 Exhibits Antiangiogenic Function by Targeting RhoB Expression in Endothelial Cells. *PLoS ONE* *6*, e16979.

Sahai, E., and Marshall, C.J. (2002). RHO-GTPASES AND CANCER. *Nat. Rev. Cancer* *2*, 133–142.

Sala, E., Mologni, L., Truffa, S., Gaetano, C., Bollag, G.E., and Gambacorti-Passerini, C. (2008). BRAF Silencing by Short Hairpin RNA or Chemical Blockade by PLX4032 Leads to Different Responses in Melanoma and Thyroid Carcinoma Cells. *Mol. Cancer Res.* *6*, 751–759.

Sanz-Moreno, V., and Marshall, C.J. (2009). Rho-GTPase signaling drives melanoma cell plasticity. *Cell Cycle* *8*, 1484–1487.

Sanz-Moreno, V., Gadea, G., Ahn, J., Paterson, H., Marra, P., Pinner, S., Sahai, E., and Marshall, C.J. (2008). Rac Activation and Inactivation Control Plasticity of Tumor Cell Movement. *Cell* *135*, 510–523.

Sapkota, B., Hill, C.E., and Pollack, B.P. (2013). Vemurafenib enhances MHC induction in BRAFV600E homozygous melanoma cells. *OncolImmunology* *2*, e22890.

Sato, N., Fukui, T., Taniguchi, T., Yokoyama, T., Kondo, M., Nagasaka, T., Goto, Y., Gao, W., Ueda, Y., Yokoi, K., *et al.* (2007). RhoB is frequently downregulated in non-small-cell lung cancer and resides in the 2p24 homozygous deletion region of a lung cancer cell line. *Int. J. Cancer* *120*, 543–551.

Schilling, B., Sucker, A., Griewank, K., Zhao, F., Weide, B., Görgens, A., Giebel, B., Schadendorf, D., and Paschen, A. (2013). Vemurafenib reverses immunosuppression by myeloid derived suppressor cells: Vemurafenib and MDSCs in melanoma. *Int. J. Cancer* *133*, 1653–1663.

Scolyer, R.A., Long, G.V., and Thompson, J.F. (2011). Evolving concepts in melanoma classification and their relevance to multidisciplinary melanoma patient care. *Mol. Oncol.* *5*, 124–136.

Shao, Y., and Aplin, A.E. (2010). Akt3-Mediated Resistance to Apoptosis in B-RAF-Targeted Melanoma Cells. *Cancer Res.* *70*, 6670–6681.

Shao, Y., and Aplin, A.E. (2012). BH3-only protein silencing contributes to acquired resistance to PLX4720 in human melanoma. *Cell Death Differ.* *19*, 2029–2039.

Sharma, A., Tran, M.A., Liang, S., Sharma, A.K., Amin, S., Smith, C.D., Dong, C., and Robertson, G.P. (2006). Targeting mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase in the mutant (V600E) B-Raf signaling cascade effectively inhibits melanoma lung metastases. *Cancer Res.* *66*, 8200–8209.

Shi, D., Nakamura, T., Nakajima, M., Dai, J., Qin, J., Ni, H., Xu, Y., Yao, C., Wei, J., and Liu, B. (2008). Association of single-nucleotide polymorphisms in RHOB and TXNDC3 with knee osteoarthritis susceptibility: two case-control studies in East Asian populations and a meta-analysis. *Arthritis Res. Ther.* *10*, R54.

Shi, H., Moriceau, G., Kong, X., Lee, M.-K., Lee, H., Koya, R.C., Ng, C., Chodon, T., Scolyer, R.A., Dahlman, K.B., *et al.* (2012). Melanoma whole-exome sequencing identifies V600EB-RAF amplification-mediated acquired B-RAF inhibitor resistance. *Nat. Commun.* *3*, 724.

Shull, A.Y., Latham-Schwark, A., Ramasamy, P., Leskoske, K., Oroian, D., Birtwistle, M.R., and Buckhaults, P.J. (2012). Novel Somatic Mutations to PI3K Pathway Genes in Metastatic Melanoma. *PLoS ONE* *7*, e43369.

Skuli, N., Monferran, S., Delmas, C., Lajoie-Mazenc, I., Favre, G., Toulas, C., and Cohen-Jonathan-Moyal, E. (2006). Activation of RhoB by hypoxia controls hypoxia-inducible factor-1alpha stabilization through glycogen synthase kinase-3 in U87 glioblastoma cells. *Cancer Res.* *66*, 482–489.

Smalley, K.S., Lioni, M., Dalla Palma, M., Xiao, M., Desai, B., Egyhazi, S., Hansson, J., Wu, H., King, A.J., and Van Belle, P. (2008). Increased cyclin D1 expression can mediate BRAF inhibitor resistance in BRAF V600E-mutated melanomas. *Mol. Cancer Ther.* *7*, 2876–2883.

Solit, D.B., Garraway, L.A., Pratilas, C.A., Sawai, A., Getz, G., Basso, A., Ye, Q., Lobo, J.M., She, Y., Osman, I., *et al.* (2005). BRAF mutation predicts sensitivity to MEK inhibition. *Nature* *439*, 358–362.

Song, J., Liu, P., Yang, Z., Li, L., Su, H., Lu, N., and Peng, Z. (2012a). MiR-155 negatively regulates c-Jun expression at the post-transcriptional level in human dermal fibroblasts in vitro: implications in UVA irradiation-induced photoaging. *Cell. Physiol. Biochem.* *29*, 331–340.

Song, M.S., Salmena, L., and Pandolfi, P.P. (2012b). The functions and regulation of the PTEN tumour suppressor. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*

Sosman, J.A., Kim, K.B., Schuchter, L., Gonzalez, R., Pavlick, A.C., Weber, J.S., McArthur, G.A., Hutson, T.E., Moschos, S.J., and Flaherty, K.T. (2012). Survival in BRAF V600-mutant advanced melanoma treated with vemurafenib. *N. Engl. J. Med.* *366*, 707–714.

- Sotillo, R., García, J.F., Ortega, S., Martín, J., Dubus, P., Barbacid, M., and Malumbres, M. (2001). Invasive melanoma in Cdk4-targeted mice. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *98*, 13312–13317.
- Spangler, B., Kappelmann, M., Schitteck, B., Meierjohann, S., Vardimon, L., Bosserhoff, A.K., and Kuphal, S. (2012). ETS-1/RhoC signaling regulates the transcription factor c-Jun in melanoma. *Int. J. Cancer* *130*, 2801–2811.
- Srougi, M.C., and Burrige, K. (2011). The Nuclear Guanine Nucleotide Exchange Factors Ect2 and Net1 Regulate RhoB-Mediated Cell Death after DNA Damage. *PLoS ONE* *6*, e17108.
- Stahl, J.M., Sharma, A., Cheung, M., Zimmerman, M., Cheng, J.Q., Bosenberg, M.W., Kester, M., Sandirasegarane, L., and Robertson, G.P. (2004). Deregulated Akt3 activity promotes development of malignant melanoma. *Cancer Res.* *64*, 7002–7010.
- Steuve, S., Devosse, T., Lauwers, E., Vanderwinden, J.-M., André, B., Courtoy, P.J., and Pirson, I. (2006). RhoGDI-2 is targeted to late-endosomal structures of the vesicular machinery in the presence of activated RhoB. *Exp. Cell Res.* *312*, 3981–3989.
- Stewart, A.L., Mhashilkar, A.M., Yang, X.H., Ekmekcioglu, S., Saito, Y., Sieger, K., Schrock, R., Onishi, E., Mumm, J.B., Zumstein, L., *et al.* (2002). PI3 kinase blockade by Ad-PTEN inhibits invasion and induces apoptosis in RGP and metastatic melanoma cells. *Mol Med* *8*, 451–461.
- Straussman, R., Morikawa, T., Shee, K., Barzily-Rokni, M., Qian, Z.R., Du, J., Davis, A., Mongare, M.M., Gould, J., Frederick, D.T., *et al.* (2012). Tumour micro-environment elicits innate resistance to RAF inhibitors through HGF secretion. *Nature* *487*, 500–504.
- Su, F., Bradley, W.D., Wang, Q., Yang, H., Xu, L., Higgins, B., Kolinsky, K., Packman, K., Kim, M.J., Trunzer, K., *et al.* (2011). Resistance to Selective BRAF Inhibition Can Be Mediated by Modest Upstream Pathway Activation. *Cancer Res.* *72*, 969–978.
- Su, F., Viros, A., Milagre, C., Trunzer, K., Bollag, G., Spleiss, O., Reis-Filho, J.S., Kong, X., Koya, R.C., and Flaherty, K.T. (2012). RAS mutations in cutaneous squamous-cell carcinomas in patients treated with BRAF inhibitors. *N. Engl. J. Med.* *366*, 207–215.
- Sumimoto, H. (2006). The BRAF-MAPK signaling pathway is essential for cancer-immune evasion in human melanoma cells. *J. Exp. Med.* *203*, 1651–1656.
- Sumimoto, H., Miyagishi, M., Miyoshi, H., Yamagata, S., Shimizu, A., Taira, K., and Kawakami, Y. (2004). Inhibition of growth and invasive ability of melanoma by inactivation of mutated BRAF with lentivirus-mediated RNA interference. *Oncogene* *23*, 6031–6039.
- Sun, G., Li, H., and Rossi, J.J. (2009). Sequence context outside the target region influences the effectiveness of miR-223 target sites in the RhoB 3'UTR. *Nucleic Acids Res.* *38*, 239–252.
- Takeda, K., Takemoto, C., Kobayashi, I., Watanabe, A., Nobukuni, Y., Fisher, D.E., and Tachibana, M. (2000). Ser298 of MITF, a mutation site in Waardenburg syndrome type 2, is a phosphorylation site with functional significance. *Hum Mol Genet* *9*, 125–132.
- Das Thakur, M., Salangsang, F., Landman, A.S., Sellers, W.R., Pryer, N.K., Levesque, M.P., Dummer, R., McMahon, M., and Stuart, D.D. (2013). Modelling vemurafenib resistance in melanoma reveals a strategy to forestall drug resistance. *Nature* *494*, 251–255.

- Therrien, M., Chang, H.C., Solomon, N.M., Karim, F.D., Wassarman, D.A., and Rubin, G.M. (1995). KSR, a novel protein kinase required for RAS signal transduction. *Cell* 83, 879–888.
- Thomas, L., Tranchand, P., Berard, F., Secchi, T., Colin, C., and Moulin, G. (1998). Semiological value of ABCDE criteria in the diagnosis of cutaneous pigmented tumors. *Dermatol. Basel Switz.* 197, 11–17.
- Thompson, J.F., Scolyer, R.A., and Kefford, R.F. (2005a). Cutaneous melanoma. *Lancet* 365, 687–701.
- Thompson, J.F., Scolyer, R.A., and Kefford, R.K. (2005b). Cutaneous melanoma. *The Lancet* 365, 687–701.
- Tillement, V., Lajoie-Mazenc, I., Casanova, A., Froment, C., Penary, M., Tovar, D., Marquez, R., Monsarrat, B., Favre, G., and Pradines, A. (2008). Phosphorylation of RhoB by CK1 impedes actin stress fiber organization and epidermal growth factor receptor stabilization. *Exp. Cell Res.* 314, 2811–2821.
- Tovar, D., Faye, J.-C., and Favre, G. (2003). Cloning of the human RHOB gene promoter: characterization of a VNTR sequence that affects transcriptional activity. *Genomics* 81, 525–530.
- Trunzer, K., Pavlick, A.C., Schuchter, L., Gonzalez, R., McArthur, G.A., Hutson, T.E., Moschos, S.J., Flaherty, K.T., Kim, K.B., Weber, J.S., *et al.* (2013). Pharmacodynamic Effects and Mechanisms of Resistance to Vemurafenib in Patients With Metastatic Melanoma. *J. Clin. Oncol.* 31, 1767–1774.
- Tsai, J., Lee, J.T., Wang, W., Zhang, J., Cho, H., Mamo, S., Bremer, R., Gillette, S., Kong, J., and Haass, N.K. (2008). Discovery of a selective inhibitor of oncogenic B-Raf kinase with potent antimelanoma activity. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 105, 3041–3046.
- Tsao, H., Goel, V., Wu, H., Yang, G., and Haluska, F.G. (2004a). Genetic interaction between NRAS and BRAF mutations and PTEN/MMAC1 inactivation in melanoma. *J. Invest. Dermatol.* 122, 337–341.
- Tsao, H., Atkins, M.B., and Sober, A.J. (2004b). Management of cutaneous melanoma. *N. Engl. J. Med.* 351, 998–1012.
- Tsao, H., Chin, L., Garraway, L.A., and Fisher, D.E. (2012a). Melanoma: from mutations to medicine. *Genes Dev.* 26, 1131–1155.
- Tsao, H., Chin, L., Garraway, L.A., and Fisher, D.E. (2012b). Melanoma: from mutations to medicine. *Genes Dev.* 26, 1131–1155.
- Udell, C.M., Rajakulendran, T., Sicheri, F., and Therrien, M. (2010). Mechanistic principles of RAF kinase signaling. *Cell. Mol. Life Sci.* 68, 553–565.
- Ugurel, S., Houben, R., Schrama, D., Voigt, H., Zapatka, M., Schadendorf, D., Brocker, E.B., and Becker, J.C. (2007). Microphthalmia-Associated Transcription Factor Gene Amplification in Metastatic Melanoma Is a Prognostic Marker for Patient Survival, But Not a Predictive Marker for Chemosensitivity and Chemotherapy Response. *Clin. Cancer Res.* 13, 6344–6350.
- Vardouli, L., Vasilaki, E., Papadimitriou, E., Kardassis, D., and Stournaras, C. (2008). A novel mechanism of TGF β -induced actin reorganization mediated by Smad proteins and Rho GTPases: Rho GTPases/Smad proteins in TGF β -induced actin reorganization. *FEBS J.* 275, 4074–4087.
- Vasilaki, E., Papadimitriou, E., Tajadura, V., Ridley, A.J., Stournaras, C., and Kardassis, D. (2010). Transcriptional regulation of the small GTPase RhoB gene by TGF β -induced signaling pathways. *FASEB J.* 24, 891–905.

- Vega, F.M., and Ridley, A.J. (2008). Rho GTPases in cancer cell biology. *FEBS Lett.* *582*, 2093–2101.
- Vega, F.M., Colomba, A., Reymond, N., Thomas, M., and Ridley, A.J. (2012). RhoB regulates cell migration through altered focal adhesion dynamics. *Open Biol.* *2*, 120076–120076.
- Vergani, E., Vallacchi, V., Frigerio, S., Deho, P., Mondellini, P., Perego, P., Cassinelli, G., Lanzi, C., Testi, M.A., and Rivoltini, L. (2011). Identification of MET and SRC activation in melanoma cell lines showing primary resistance to PLX4032. *Neoplasia New York NY* *13*, 1132.
- Villanueva, J., and Herlyn, M. (2008). Melanoma and the tumor microenvironment. *Curr. Oncol. Rep.* *10*, 439–446.
- Villanueva, J., Vultur, A., Lee, J.T., Somasundaram, R., Fukunaga-Kalabis, M., Cipolla, A.K., Wubbenhorst, B., Xu, X., Gimotty, P.A., Kee, D., *et al.* (2010). Acquired Resistance to BRAF Inhibitors Mediated by a RAF Kinase Switch in Melanoma Can Be Overcome by Cotargeting MEK and IGF-1R/PI3K. *Cancer Cell* *18*, 683–695.
- Vishnu, P., Colon-Otero, G., Kennedy, G.T., Marlow, L.A., Kennedy, W.P., Wu, K.J., Santoso, J.T., and Copland, J.A. (2012). RhoB mediates antitumor synergy of combined ixabepilone and sunitinib in human ovarian serous cancer. *Gynecol. Oncol.* *124*, 589–597.
- Vivanco, L., and Sawyers, C.L. (2002). The phosphatidylinositol 3-Kinase–AKT pathway in human cancer. *Nat. Rev. Cancer* *2*, 489–501.
- Vogelstein, B., Papadopoulos, N., Velculescu, V.E., Zhou, S., Diaz, L.A., and Kinzler, K.W. (2013). Cancer Genome Landscapes. *Science* *339*, 1546–1558.
- Volanis, D., Zaravinos, A., Kadiyska, T., Delakas, D., Zoumpourlis, V., and Spandidos, D.A. (2011). Expression profile of Rho kinases in urinary bladder cancer. *J. BUON Off. J. Balk. Union Oncol.* *16*, 511–521.
- Wagle, N., Emery, C., Berger, M.F., Davis, M.J., Sawyer, A., Pochanard, P., Kehoe, S.M., Johannessen, C.M., MacConaill, L.E., Hahn, W.C., *et al.* (2011). Dissecting Therapeutic Resistance to RAF Inhibition in Melanoma by Tumor Genomic Profiling. *J. Clin. Oncol.* *29*, 3085–3096.
- Wan, P.T., Garnett, M.J., Roe, S.M., Lee, S., Niculescu-Duvaz, D., Good, V.M., Jones, C.M., Marshall, C.J., Springer, C.J., and Barford, D. (2004). Mechanism of activation of the RAF-ERK signaling pathway by oncogenic mutations of B-RAF. *Cell* *116*, 855–867.
- Wang, D.-A. (2005). Palmitoylated Cysteine 192 Is Required for RhoB Tumor-suppressive and Apoptotic Activities. *J. Biol. Chem.* *280*, 19243–19249.
- Wang, S.Q., and Hashemi, P. (2010). Noninvasive Imaging Technologies in the Diagnosis of Melanoma. *Semin. Cutan. Med. Surg.* *29*, 174–184.
- Wang, S., Ghosh, R.N., and Chellappan, S.P. (1998). Raf-1 physically interacts with Rb and regulates its function: a link between mitogenic signaling and cell cycle regulation. *Mol. Cell. Biol.* *18*, 7487–7498.
- Wang, S., Yan-Neale, Y., Fischer, D., Zeremski, M., Cai, R., Zhu, J., Asselbergs, F., Hampton, G., and Cohen, D. (2003). Histone deacetylase 1 represses the small GTPase RhoB expression in human nonsmall lung carcinoma cell line. *Oncogene* *22*, 6204–6213.

- Ward, K.A., Lazovich, D., and Hordinsky, M.K. (2012). Germline melanoma susceptibility and prognostic genes: A review of the literature. *J. Am. Acad. Dermatol.* *67*, 1055–1067.
- Weber, C.K., Slupsky, J.R., Kalmes, H.A., and Rapp, U.R. (2001). Active Ras induces heterodimerization of cRaf and BRaf. *Cancer Res.* *61*, 3595–3598.
- Weiss, R.A., and Vogt, P.K. (2011). 100 years of Rous sarcoma virus. *J. Exp. Med.* *208*, 2351–2355.
- Wellbrock, C., Karasarides, M., and Marais, R. (2004). The RAF proteins take centre stage. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *5*, 875–885.
- Wellbrock, C., Rana, S., Paterson, H., Pickersgill, H., Brummelkamp, T., and Marais, R. (2008). Oncogenic BRAF Regulates Melanoma Proliferation through the Lineage Specific Factor MITF. *PLoS ONE* *3*, e2734.
- Westermarck, J., and Hahn, W.C. (2008). Multiple pathways regulated by the tumor suppressor PP2A in transformation. *Trends Mol. Med.* *14*, 152–160.
- Westmark, C.J., Bartleson, V.B., and Malter, J.S. (2004). RhoB mRNA is stabilized by HuR after UV light. *Oncogene* *24*, 502–511.
- Wheeler, A., and Ridley, A. (2004). Why three Rho proteins? RhoA, RhoB, RhoC, and cell motility. *Exp. Cell Res.* *301*, 43–49.
- Wherlock, M. (2004). Farnesyltransferase inhibitors disrupt EGF receptor traffic through modulation of the RhoB GTPase. *J. Cell Sci.* *117*, 3221–3231.
- Whittaker, S., Kirk, R., Hayward, R., Zambon, A., Viros, A., Cantarino, N., Affolter, A., Nourry, A., Niculescu-Duvaz, D., Springer, C., *et al.* (2010). Gatekeeper Mutations Mediate Resistance to BRAF-Targeted Therapies. *Sci. Transl. Med.* *2*, 35ra41–35ra41.
- Whittaker, S.R., Theurillat, J.-P., Van Allen, E., Wagle, N., Hsiao, J., Cowley, G.S., Schadendorf, D., Root, D.E., and Garraway, L.A. (2013). A Genome-Scale RNA Interference Screen Implicates NF1 Loss in Resistance to RAF Inhibition. *Cancer Discov.* *3*, 350–362.
- Wilson, T.R., Fridlyand, J., Yan, Y., Penuel, E., Burton, L., Chan, E., Peng, J., Lin, E., Wang, Y., Sosman, J., *et al.* (2012). Widespread potential for growth-factor-driven resistance to anticancer kinase inhibitors. *Nature* *487*, 505–509.
- Wu, M., Hemesath, T.J., Takemoto, C.M., Horstmann, M.A., Wells, A.G., Price, E.R., Fisher, D.Z., and Fisher, D.E. (2000). c-Kit triggers dual phosphorylations, which couple activation and degradation of the essential melanocyte factor Mi. *Genes Dev.* *14*, 301.
- Xing, F., Persaud, Y., Pratilas, C.A., Taylor, B.S., Janakiraman, M., She, Q.B., Gallardo, H., Liu, C., Merghoub, T., and Hefter, B. (2011). Concurrent loss of the PTEN and RB1 tumor suppressors attenuates RAF dependence in melanomas harboring V600EBRAF. *Oncogene* *31*, 446–457.
- Yang, H., Higgins, B., Kolinsky, K., Packman, K., Go, Z., Iyer, R., Kolis, S., Zhao, S., Lee, R., Grippo, J.F., *et al.* (2010). RG7204 (PLX4032), a Selective BRAFV600E Inhibitor, Displays Potent Antitumor Activity in Preclinical Melanoma Models. *Cancer Res.* *70*, 5518–5527.
- Yeh, T.C., Marsh, V., Bernat, B.A., Ballard, J., Colwell, H., Evans, R.J., Parry, J., Smith, D., Brandhuber, B.J., Gross, S., *et al.* (2007). Biological Characterization of ARRY-142886 (AZD6244), a Potent, Highly Selective Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase 1/2 Inhibitor. *Clin. Cancer Res.* *13*, 1576–1583.

Yokoyama, S., Woods, S.L., Boyle, G.M., Aoude, L.G., MacGregor, S., Zismann, V., Gartside, M., Cust, A.E., Haq, R., Harland, M., *et al.* (2011). A novel recurrent mutation in MITF predisposes to familial and sporadic melanoma. *Nature* 480, 99–103.

Yoneda, M., Hirokawa, Y.S., Ohashi, A., Uchida, K., Kami, D., Watanabe, M., Yokoi, T., Shiraishi, T., and Wakusawa, S. (2010). RhoB enhances migration and MMP1 expression of prostate cancer DU145. *Exp. Mol. Pathol.* 88, 90–95.

Yoon, Y.S., Choo, J.H., Yoo, T., Kang, K., and Chung, J.H. (2007). RhoB is epigenetically regulated in an age- and tissue-specific manner. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 362, 164–169.

Young, A., Lyons, J., Miller, A.L., Phan, V.T., Alarcón, I.R., and McCormick, F. (2009). Chapter 1 Ras Signaling and Therapies. In *Advances in Cancer Research*, (Elsevier), pp. 1–17.

Yu, W., Fantl, W.J., Harrowe, G., and Williams, L.T. (1998). Regulation of the MAP kinase pathway by mammalian Ksr through direct interaction with MEK and ERK. *Curr. Biol.* 8, 56–64.

Zakut, R., Perlis, R., Eliyahu, S., Yarden, Y., Givol, D., Lyman, S.D., and Halaban, R. (1993). KIT ligand (mast cell growth factor) inhibits the growth of KIT-expressing melanoma cells. *Oncogene* 8, 2221–2229.

Zalcman, G., Closson, V., Linarès-Cruz, G., Lerebours, F., Honoré, N., Tavitian, A., and Olofsson, B. (1995). Regulation of Ras-related RhoB protein expression during the cell cycle. *Oncogene* 10, 1935–1945.

Zalcman, G., Closson, V., Camonis, J., Honoré, N., Rousseau-Merck, M.F., Tavitian, A., and Olofsson, B. (1996). RhoGDI-3 is a new GDP dissociation inhibitor (GDI). Identification of a non-cytosolic GDI protein interacting with the small GTP-binding proteins RhoB and RhoG. *J. Biol. Chem.* 271, 30366–30374.

Zeng, P.-Y., Rane, N., Du, W., Chintapalli, J., and Prendergast, G.C. (2003). Role for RhoB and PRK in the suppression of epithelial cell transformation by farnesyltransferase inhibitors. *Oncogene* 22, 1124–1134.

Zhou, J., Zhu, Y., Zhang, G., Liu, N., Sun, L., Liu, M., Qiu, M., Luo, D., Tang, Q., Liao, Z., *et al.* (2011). A distinct role of RhoB in gastric cancer suppression. *Int. J. Cancer* 128, 1057–1068.

Zhuang, D., Mannava, S., Grachtchouk, V., Tang, W.H., Patil, S., Wawrzyniak, J.A., Berman, A.E., Giordano, T.J., Prochownik, E.V., and Soengas, M.S. (2008). C-MYC overexpression is required for continuous suppression of oncogene-induced senescence in melanoma cells. *Oncogene* 27, 6623–6634.

Bases de données:

COSMIC : <http://cancer.sanger.ac.uk/cancergenome/projects/cosmic/>

NCI : <http://www.cancer.gov/clinicaltrials>

RESUME en français

La prise en charge des mélanomes métastatique a été révolutionnée il y a quelques mois par la mise sur le marché du Vemurafenib, un inhibiteur de la forme de mutée de B-Raf présente chez près de 50% de patients atteints de mélanomes métastatiques. Le Vemurafenib conduit en effet à une réponse chez 80% des patients porteurs d'une telle altération dont des réponses complètes. Cependant, l'amélioration en termes de survie est limitée par l'apparition rapide de résistances encore mal comprises. Cette thèse a permis de mettre en évidence un mécanisme original de résistance. Dans des lignées cellulaires de mélanome, l'inhibition de la voie Raf/MEK/ERK par le Vemurafenib induit l'expression et l'activation de c-Jun, induisant l'expression de RhoB qui active alors la voie AKT favorisant la survie des cellules traitées par le Vemurafenib. L'inhibition de l'activation de cette voie avec un inhibiteur d'AKT augmente fortement et de manière synergique la mort cellulaire consécutive au traitement par le Vemurafenib. L'évaluation de la combinaison Vemurafenib/inhibiteur d'AKT chez les patients pourrait améliorer l'efficacité du traitement en prévenant l'apparition de résistances.

Titre et résumé en Anglais :

c-Jun/RhoB/AKT signaling pathway involvement in melanoma cells resistance to Vemurafenib

Metastatic melanoma treatment met a breakthrough a few months ago with FDA and EMEA approval of Vemurafenib, a small inhibitor targeting B-Raf mutations harbored by around 50% of patients. Vemurafenib leads to objective responses in 80% of patients with some complete responses. However, survival benefits are limited by rapid appearance of resistances still misunderstood. This project leads to the identification of a new original resistance mechanism. In melanoma cell lines, inhibition of the Raf/MEK/ERK pathway by Vemurafenib induces c-Jun expression and activation leading to RhoB expression and subsequently AKT activation. Finally, c-Jun/RhoB/AKT pathway activation favors cell survival in response to Vemurafenib. Inhibition of this pathway with and AKT inhibitors synergically increases cell death in response to Vemurafenib. This work argues for the clinical evaluation of a therapeutic combination including Vemurafenib and an AKT inhibitor in order to increase treatment efficiency and to prevent resistance appearance.

DISCIPLINE administrative : Pharmacie

MOTS-CLES :

Mélanome, Vemurafenib, Résistance, RhoB, c-Jun, AKT

INTITULE ET ADRESSE DE L'UFR OU DU LABORATOIRE :

**INSERM
Centre de Recherche en Cancérologie de Toulouse UMR1037
Equipe 3 : RhoGTPases et progression tumorale
20-24 rue du pont St Pierre
31052 Toulouse cedex 3**

Directeur de thèse : Professeur FAVRE Gilles