



HAL
open science

Inhibiteurs de BRAF dans le traitement du cancer : Contribution à l'étude des mécanismes de résistance et des effets secondaires paradoxaux

Lise Boussemart

► **To cite this version:**

Lise Boussemart. Inhibiteurs de BRAF dans le traitement du cancer : Contribution à l'étude des mécanismes de résistance et des effets secondaires paradoxaux. Cancer. Université Paris Sud - Paris XI, 2014. Français. NNT : 2014PA11T102 . tel-01170626

HAL Id: tel-01170626

<https://theses.hal.science/tel-01170626>

Submitted on 2 Jul 2015

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THESE DE DOCTORAT

Délivré par l'Université Paris XI

Discipline: Cancérologie

Présentée et soutenue par

Lise BOUSSEMART

Le 19 décembre 2014

**Inhibiteurs de BRAF dans le traitement du cancer :
Contribution à l'étude des mécanismes de résistance
et des effets secondaires paradoxaux**

JURY

Pr Eric Solary *Président du Jury*

Pr Gilles Favre *Rapporteur*

Dr Stéphane Ansieau *Rapporteur*

Dr Caroline Robert *Directeur de thèse*

Dr Stéphan Vagner *Directeur de thèse*

École doctorale 418 – Cancérologie – Biologie, Médecine, Santé

Unité de recherche : INSERM U981

Directeurs de Thèse : Dr Caroline Robert et Dr Stéphan Vagner

Remerciements :

Je tiens d'abord à exprimer mes sincères remerciements à :

Monsieur le Professeur Eric Solary, de m'avoir fait l'honneur de présider cette thèse.

Madame le Docteur Caroline Robert et Monsieur le Docteur Stéphan Vagner, d'avoir pris le temps de diriger et encadrer cette thèse, tout au long de ces quatre années.

Monsieur le Professeur Gilles Favre, d'avoir pris le temps de juger ce travail.

Monsieur le Docteur Stéphane Ansieau, pour l'intérêt que vous avez bien voulu porter à ce travail.

Madame le Docteur Gorana Tomasic, je te remercie d'avoir accepté de m'apporter ton expertise en histopathologie dans ce travail et t'en remercie très sincèrement.

Je tiens également à remercier toute l'équipe mélanome de l'U981, Isabelle, Hélène, Nyam, Delphine, Sandrine notamment, pour l'immense aide que vous m'avez apportée au quotidien, dans la bonne humeur, et plus largement tous les membres de l'U981, ainsi que nos collègues du laboratoire de Recherche Translationnelle, qui nous ont apporté leur expertise en biologie moléculaire. J'ai aussi une pensée chaleureuse pour tout l'équipe de Dermatologie, les cliniciens bien-sûr, mais aussi les attachés de recherche clinique, les infirmières, le personnel d'accueil de l'Espace 4, et les secrétaires, en particulier : Sophia, Elodie, Paquita.

Je remercie aussi les patients atteints de mélanome, que j'ai pu accompagner dans leur maladie ces dernières années, ils m'ont aidée à trouver la force de travailler, de chercher, de trouver. Certains sont partis trop tôt, d'autres sont encore là et se battent. Ils m'ont donné de grandes leçons de courage. J'ai une pensée particulière pour Mesdames et Messieurs D. L., L. N., A. D., D. C., P. D., Y. C., L. V., P. S.,... La liste serait bien longue si je pouvais être exhaustive.

Je tiens à remercier mes amis qui m'ont toujours accompagnée, pour leur présence, leurs conseils et leur soutien. Je pense en particulier à Cécile, Karine, Angéline, Nathalie, Sébastien, Clément, Anaïs, Chloé, Brigitte, ...

Enfin, je ne pourrais conclure ces remerciements sans une pensée émue pour ma famille.

Je tiens à remercier très sincèrement :

Mes parents, pour votre écoute, votre patience et tout votre amour.

Mon frère et ma sœur, pour leur soutien. Ma belle-famille pour leurs encouragements.

Mes enfants, pour leurs éclats de rire qui illuminent mes journées.

Et pour finir, Philip, pour ton amour, ton soutien, ta patience, tes conseils... Merci pour toute l'énergie que tu m'as insufflée pour mener à bien ce travail.

Liste des abréviations :

4E-BP : 4E-Binding Protein

ADN : Acide désoxyribonucléique

AMM : Autorisation de mise sur le marché

ARN : Acide ribonucléique

ARNi : Acide ribonucléique interférent

ARNm : Acide ribonucléique messenger

ARNr : Acide ribonucléique ribosomique

ARNt : Acide ribonucléique de transfert

ASO : Oligonucleotides anti-sens

ATP : Adénosine tri-phosphate

BH : Bcl2 homology

CBL : Casitas B-lineage Lymphoma

CBP : Complexe de fixation de la coiffe

CCND1 : Gène codant pour la cycline D1

CDK4 : Cyclin-dependent kinase 4

CDK6 : Cyclin-dependent kinase 4

CDKN2A : Cyclin-dependent kinase 2A

CFC : Syndrome cardio-facio-cutané

CI : Concentration inhibitrice

CP : Carboplatine et paclitaxel

CR : Réponse complète

CRC : Adénocarcinome colorectal

CS : Syndrome de Costello

DISC : Complexe de Signalisation Inducteur de la Mort

DMEM : Dulbecco modified Eagle's minimal essential medium

DMSO : Dimethyl sulfoxyde

DTIC : Dacarbazine

DUSP : DUal Specificity Phosphatase

eEF : Eukaryotic Elongation Factor

EGF: Epidermal Growth Factor

eIF : Eukaryotic Initiation Factor
eRF : Eukaryotic Release Factor
FADD : Fas-Associated Death Domain
FDA : Food and Drug Administration
G4 : G-quadruplexe
HER : Human epidermal growth factor
HGF : Hepatocyte growth factor
HPV : Human papilloma virus
IC : Intervalle de confiance
IGF : Insulin growth factor
IGFR1 : Récepteur du facteur de croissance insuline de type 1
IL : Interleukine
IRES : Internal Ribosomal Entry Site
JNK : jun N-terminal kinase
KI : Kinase inhibitor
MAPK : Mitogen-activated protein kinase
MDR : Résistance multi-drogues
MnK : Mitogen-activated protein kinase (MAPK) interacting signal kinase
mTor : mammalian Target Of Rapamycine
NCT : National Clinical Trial
NF : Neurofibromatose
NLS : Signal de localisation nucléaire
NS : Syndrome de Noonan
NSCLC : Cancer pulmonaire non à petites cellules
NSML : Syndrome de Noonan avec Lentigines multiples
ODC : Ornithine décarboxylase
OIS : Oncogene-Induced Senescence
ORF : Open reading frame
OS : Survie globale (Overall Survival)
PABP : Poly (A) Binding Protein
PARP : Poly ADP ribose polymerase
PCR : Polymerase chain reaction
PDGFR : Récepteur du facteur de croissance dérivé des plaquettes
PFS : Survie sans progression (Progression Free Survival)

PR : Réponse partielle

PTC : Cancer papillaire de la thyroïde

PTEN : Phosphatase and TENsin homolog

PTP : Protéine tyrosine phosphatase

PTPN11 : Protéine tyrosine phosphatase de type non-récepteur 11

RB1 : Rétinoblastome 1

RR : Taux de réponse (Response Rate)

RTK : Récepteur à activité Tyrosine Kinase

S6K : S6 Kinase

SIDA : Syndrome d'immunodéficience acquise

Smac/DIABLO : Second mitochondria-derived activator of caspases / Direct IAP-binding protein with low pI

TGFβ : Transforming growth factor β

Th1 : T helper 1

TRAIL : Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand

UTR: UnTranslated Region

VEGF : Facteur de croissance de l'endothélium vasculaire

VEGFR2 : Récepteur du facteur de croissance de l'endothélium vasculaire 2

VEGFR3 : Récepteur du facteur de croissance de l'endothélium vasculaire 3

VIH : Virus de l'immunodéficience humaine

V-RAF : Virus-induced Rapidly Accelerated Fibrosarcoma

XPA : Xanthoastrocytome pléomorphe anaplasique

Table des matières

I.	Introduction	10
A.	BRAF dans la voie des MAPK.....	10
1.	Rôle de BRAF dans la cellule normale.....	10
2.	Rôle de BRAF dans la cellule cancéreuse	15
3.	Rôle de BRAF dans la sénescence.....	16
4.	Mutations activatrices germinales de la voie des MAPK dans les « rasopathies » 16	
B.	Les inhibiteurs de BRAF et de MEK.....	24
1.	Traitement du mélanome	24
2.	Traitement des autres types de cancers mutés <i>BRAF</i>	32
3.	Traitement des rasopathies.....	38
C.	Les divers mécanismes de résistance aux inhibiteurs de BRAF	38
1.	La résistance primaire	39
2.	La résistance acquise.....	46
D.	Les effets secondaires paradoxaux induits par les inhibiteurs de BRAF	51
1.	Données <i>in vitro</i>	51
2.	Données cliniques	56
E.	Objectifs de cette thèse	57
II.	Résultats 1 : eIF4F comme nouvelle cible thérapeutique située à la convergence de multiples mécanismes de résistance	58
A.	L'initiation de la traduction cap-dépendante comme cible thérapeutique dans le cancer 58	
1.	Rappel sur la traduction des ARNm	58
2.	Définition de l'initiation de la traduction cap-dépendante	60
3.	L'initiation de la traduction cap-dépendante dans le cancer.....	62
4.	Les inhibiteurs de l'initiation de la traduction cap-dépendante	63
B.	Article publié dans Nature 2014 : Identification d'un biomarqueur et de nouveaux inhibiteurs spécifiques.....	79
1.	Article	79
2.	Figures supplémentaires.....	87
C.	Discussion.....	97
1.	Quel est l'effet de l'inhibition de l'initiation de la traduction cap-dépendante sur la synthèse protéique générale ?.....	97
2.	Extrapolation à d'autres contextes de résistance tumorale	98

III.	Résultats 2 : Compréhension des tumeurs paradoxales induites par les inhibiteurs de BRAF: de la clinique au moléculaire	99
A.	Recherche d'une participation HPV à la tumorigénèse	99
B.	Visualisation des dimères BRAF-CRAF dans les tumeurs paradoxales humaines induites par les inhibiteurs de BRAF	101
1.	Texte de l'article	102
2.	Figures.....	113
3.	Tableau.....	117
C.	Discussion.....	121
1.	Le PLA BRAF-CRAF : une preuve de concept, mais un usage en routine à développer	121
2.	Risque de tumeurs secondaires autres que kératinocytaires induites par les inhibiteurs de BRAF.....	122
3.	Identification de patients à risque de développer des tumeurs secondaires	122
4.	Rôle de NF1 dans les tumeurs secondaires paradoxales ?.....	123
5.	Intérêt des « Paradox Breakers ».....	123
IV.	Discussion et perspectives.....	125
A.	Nouvelles perspectives thérapeutiques	125
B.	Parallèle avec le traitement du SIDA	126
V.	Annexes.....	128
A.	Article sur les effets secondaires cutanés du vemurafenib	128
B.	Article sur les tumeurs cutanées induites par le sorafenib.....	136
C.	Article sur la coopération entre le vemurafenib et l'HPV pour induire des tumeurs cutanées	146
VI.	Références	155

I. Introduction

A. *BRAF* dans la voie des *MAPK*

1. Rôle de *BRAF* dans la cellule normale

BRAF est une sérine/thréonine kinase appartenant à la famille des protéines *RAF*, codée par le gène *BRAF*. La famille des protéines *RAF* comporte 3 isoformes: *ARAF*, *BRAF*, et *CRAF*.

Le premier gène *RAF* (*v-Raf*), dénommé ainsi pour « Virus-induced Rapidly Accelerated Fibrosarcoma », a été caractérisé dans un virus de sarcome murin en 1983 par Mark et Rapp¹. Deux ans après sa découverte, son premier homologue humain fonctionnel, *CRAF*, a été cloné à partir de cellules humaines. Le gène *CRAF*, aussi connu sous le nom de *RAF-1*, est composé de 80 626 paires de bases d'ADN (Acide désoxyribonucléique), avec 17 exons sur le chromosome 3p25, codant pour un ARNm (Acide ribonucléique messager) de 3 291 nucléotides et un peptide de 648 acides aminés. Par la suite, les isoformes *ARAF* et *BRAF* ont été caractérisées^{2,3}. Le gène *ARAF* est situé sur le chromosome X p11.4-11.2 et code pour un ARNm de 1821 nucléotides et un peptide de 606 acides aminés. Le gène *BRAF*, situé sur le chromosome 7q34, est composé de 18 exons et code pour un ARNm de 2 949 nucléotides et un peptide de 766 acides aminés.

ARAF, *BRAF* et *CRAF* partagent 3 domaines conservés appelés « CR » (Figure 1), dont le domaine N-terminal CR1, qui contient le domaine de liaison à *RAS* et un domaine riche en cystéine; le domaine CR2, riche en sérine/thréonine et qui contient un domaine de liaison 14-3-3; et le domaine C-terminal CR3, qui possède l'activité kinase et contient un domaine de liaison 14-3-3. Comme dans toutes les protéines kinases, la position de l'ATP (adénosine triphosphate) est déterminée par une boucle fixant le phosphate (boucle-P), très conservée au cours de l'évolution. Il y a 76% d'homologie entre les séquences d'acides aminés de *BRAF* et *CRAF*, et 74% entre *BRAF* et *ARAF*⁴.

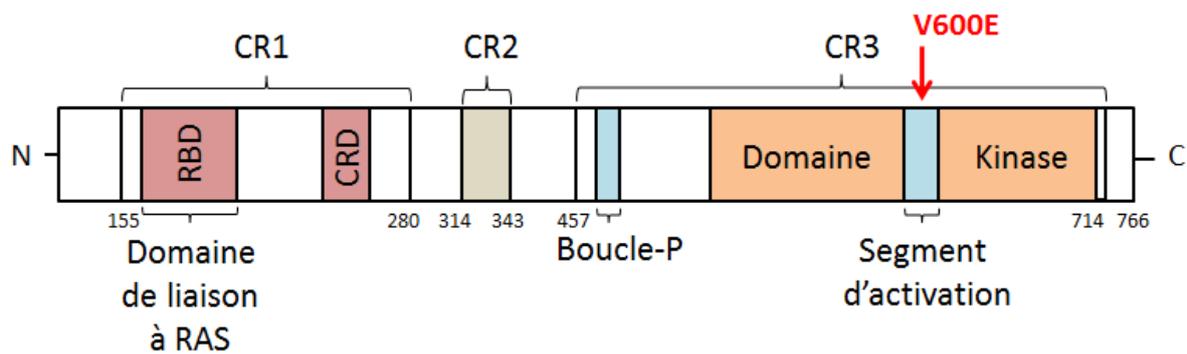


Figure 1: Représentation des 3 domaines structuraux de BRAF. La position de la mutation oncogène V600E est indiquée par une flèche rouge. CR : Conserved region, RBD : RAS binding domain, CRD : Cystein rich domain (D'après Huang T et al., J Hematol Oncol, 2013)

Les protéines RAF sont des enzymes situées dans la cascade de signalisation cellulaire dite des MAP kinases, ou MAPK (Mitogen-activated protein kinases) (Figure 2), une voie intracellulaire essentielle pour la croissance, la différenciation et la survie cellulaires⁵.

Bien que chaque isoforme joue un rôle dans cette voie de signalisation, BRAF est le principal activateur de MEK, la kinase située juste en aval des protéines RAF dans la voie des MAPK. BRAF a un rôle majeur de transduction du signal au sein de la voie des MAPK. Dans une cellule normale, la voie des MAPK transforme les divers stimuli extracellulaires tels que ceux transmis par les récepteurs couplés aux protéines G, les récepteurs de facteurs de croissance, les intégrines ou les récepteurs de cytokines en réponses intracellulaires. Cette grande famille de kinases contient principalement trois sous-familles : les MAPK JNK (*c-jun N-terminal kinase*) et ses trois isoformes JNK1, JNK2 et JNK3 ; les MAPK p38 et les formes α , β , γ , δ et les MAPK ERK avec ERK1, ERK2, ERK3, ERK4, et ERK5. Ces MAPK régulent de façon coordonnée plusieurs processus cellulaires dont la prolifération, la différenciation, la mobilité, la réponse au stress et la survie.

Exprimées de manière ubiquitaire, les MAPK ERK1 et 2 sont rapidement activées à la suite d'une cascade de phosphorylations en réponse à la liaison de facteurs de croissance à leurs récepteurs. Bien que le mode d'activation des récepteurs diffère, les signalisations convergent toutes vers l'activation des protéines RAS. Chez l'humain, trois gènes *RAS* codent pour quatre protéines hautement homologues (85%) de 21 kDa : HRAS, NRAS, KRAS4A et KRAS4B (ces deux dernières étant issues d'un épissage alternatif). Les protéines RAS activées régulent

un réseau complexe d'effecteurs en aval des récepteurs membranaires présents à la surface cellulaire. Sous leur forme active liée au GTP, les protéines RAS recrutent l'une des trois isoformes de RAF (ARAF, BRAF, CRAF). À la membrane, la protéine RAF est activée par un jeu de phosphorylation/déphosphorylation, ce qui modifie sa conformation et dévoile des sites de dimérisation.

Cela permet la formation d'homodimères ou d'hétérodimères tels que les dimères BRAF-CRAF qui sont ceux dont l'activité kinase est la plus puissante⁶. Ces dimères activent à leur tour par phosphorylation les protéines kinases MEK1/2. La présence d'un domaine d'export nucléaire sur les protéines MEK1/2 permet leur localisation cytoplasmique où elles activent par phosphorylation les sérine/thréonine kinases ERK1/2, aussi connues sous le nom de p44/p42 MAPK. Une fois activées, les kinases ERK1/2 se détachent de MEK1/2 et phosphorylent de nombreux substrats membranaires et cytoplasmiques avant de migrer dans le noyau pour y phosphoryler des facteurs de transcription, régulant ainsi l'expression de plusieurs gènes (Figure 2)^{7,8,9,10}.

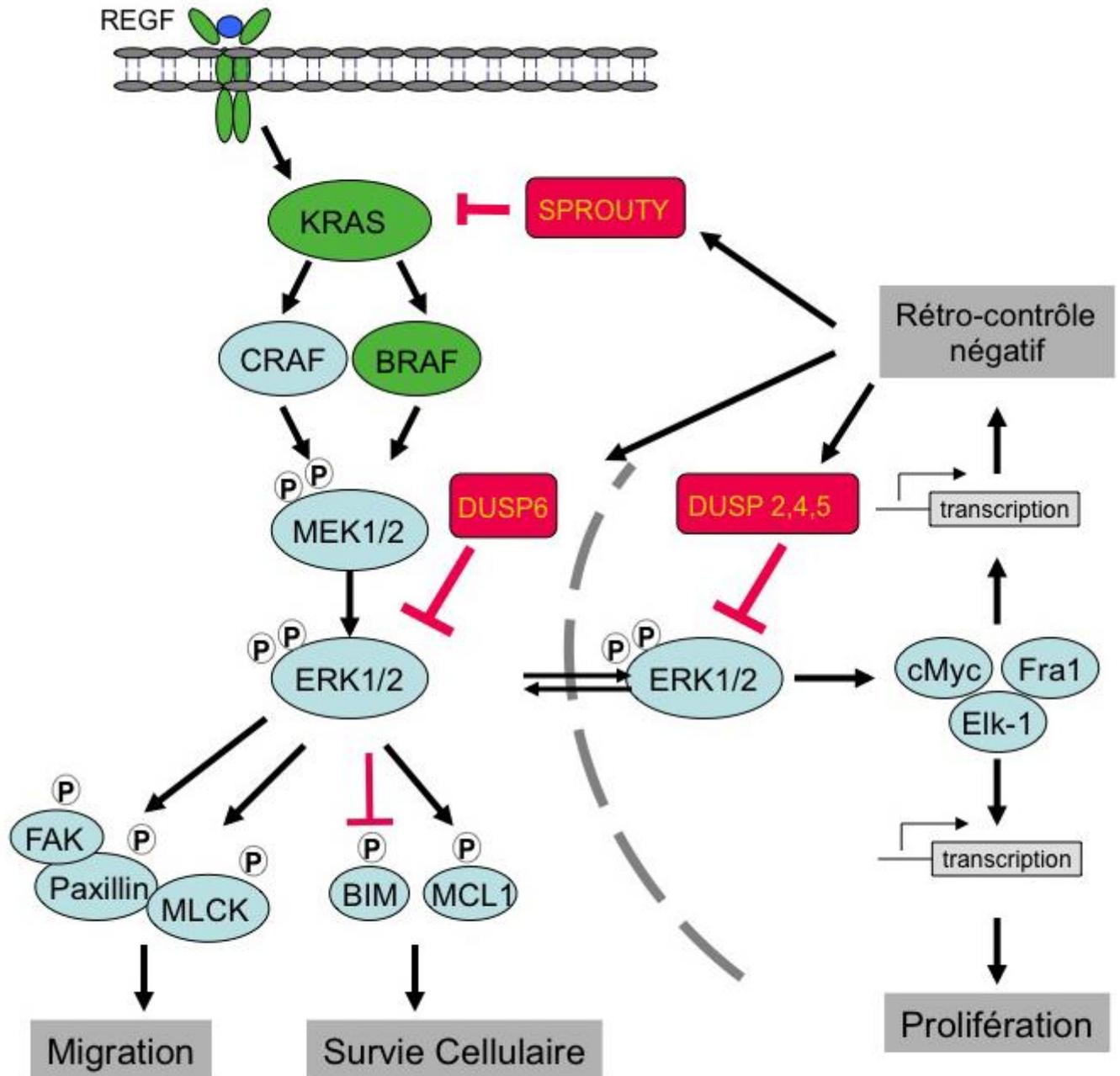


Figure 2: La voie des MAPK et ses fonctions cellulaires.

La voie de signalisation des MAPK est constituée d'un module comprenant les protéines RAS, RAF et MEK, activées de façon séquentielle suite à la stimulation cellulaire par des facteurs de croissance, par exemple l'EGF. La signalisation aboutit à l'activation des MAPK ERK1/2 qui phosphorylent divers substrats membranaires et cytoplasmiques avant d'induire leur translocation nucléaire pour y phosphoryler plusieurs facteurs de transcription. L'activité de ERK1/2 permet ainsi de contrôler différents processus

cellulaires tels que la migration (phosphorylation de FAK, Paxiline et MLCK), la survie cellulaire (phosphorylation de Bim et de Mcl1) et la prolifération (phosphorylation de ELK-1, de cMyc, de Fra-1). Parmi les gènes induits par l'activation de ERK1/2, certains (en rouge), comme ceux codant pour les phosphatases DUSP, vont conduire à la déphosphorylation de ERK1/2 créant ainsi une boucle de rétrocontrôle négatif. Parmi les protéines de la voie des MAPK, KRAS et BRAF (en vert) font fréquemment l'objet de mutations activatrices oncogéniques. (Tiré de Cagnol et al.)

L'activité de ERK1/2 est aussi finement contrôlée par des phosphatases spécifiques qui déphosphorylent les deux résidus thréonine et tyrosine de la boucle d'activation. Ces phosphatases font partie de la famille des DUSP (*Dual Specificity Phosphatase*). Les DUSP ciblant ERK1/2 comprennent DUSP1, DUSP2, DUSP4 et DUSP5 qui possèdent un signal de localisation nucléaire NLS, ainsi que la phosphatase cytoplasmique DUSP6 qui possède un signal d'export nucléaire NES (Figure 2) ^{11,12}.

Ces dernières années, plusieurs études ont démontré que la durée, l'intensité et la localisation cellulaire de l'activité de ERK1/2 permettaient une grande variété, mais aussi une spécificité de réponses cellulaires, aussi bien lors du développement que dans le fonctionnement de l'organisme adulte^{6,8}. Par exemple, il a été clairement établi que l'activation nucléaire soutenue de ces kinases est nécessaire à la prolifération cellulaire^{13,14,15}. Le blocage de l'activation de ERK par l'expression de mutants inactifs ou d'un antisens de ERK1¹⁶ ou par la surexpression de DUSP1¹⁷ inhibe la progression du cycle cellulaire en phase G1. Parallèlement, l'activation constitutive de MEK1 réduit le besoin en facteurs de croissance des fibroblastes et des cellules épithéliales, permet une croissance autonome et induit la formation de tumeurs dans les souris « nude »^{14,18,19}. À l'inverse, dans les cellules PC12²⁰, dans les cellules musculaires²¹ et dans les cellules pré-adipocytaires²², il est maintenant établi qu'une activation plus faible, soutenue et prolongée de ERK est aussi nécessaire à l'induction d'un phénotype différencié. Ainsi, selon le contexte cellulaire (et donc selon les facteurs de transcription qui s'y trouvent) et l'intensité de la stimulation²³, l'activation prolongée de ERK engagerait la cellule soit dans un programme de prolifération soit dans un programme de différenciation. La signalisation de ERK1/2 peut également être impliquée dans le contrôle de la migration cellulaire en phosphorylant les protéines MLCK, FAK, Paxiline²⁴ ou en favorisant l'expression des métalloprotéases^{14,25}.

Enfin, l'activation de ERK1/2 va favoriser la survie cellulaire en contrôlant l'expression des protéines de la famille Bcl-2²⁶ (Figure 2). En conséquence, les anomalies d'expression de RAF ou de l'activité des kinases en aval ont été associées à la formation de plusieurs types de cancers et à différents troubles du développement associant des malformations faciales, des troubles cardiaques et des retards de développement²⁷.

2. Rôle de BRAF dans la cellule cancéreuse

En 2002, la première publication décrivant des mutations somatiques activatrices du gène *BRAF*²⁸ dans les cancers en retrouvait dans 59% des mélanomes, 18% des cancers colorectaux, 11% des gliomes, et 4% des adénocarcinomes pulmonaires et des carcinomes ovariens. Toutes les mutations se trouvaient dans l'exon 11 ou 15 de ces tumeurs, et la mutation V600E était la plus fréquente (initialement décrite comme V599E). Par la suite, des mutations du gène *BRAF* ont été décrites dans des cancers de la thyroïde²⁹, la leucémie à tricholeucocytes³⁰ où elle est retrouvée dans 100% des cas, et le myélome multiple³¹.

La prévalence de la mutation de *BRAF* dans le mélanome a ultérieurement été évaluée entre 40 et 60 % des mélanomes³². Les mutations de *BRAF* sont aussi courantes dans le nævus mélanocytaire bénin (environ 80% des nævus), laissant supposer qu'elles constituent un événement très précoce³³. Les mutations oncogènes de *BRAF* entraînent une augmentation de la fonction kinase, rendant ainsi la voie RAF-MEK-ERK constitutivement active en l'absence de facteurs de croissance spécifiques.

La mutation BRAFV600E, de loin la plus fréquente, affecte de façon importante son activité sérine/thréonine kinase. BRAFV600E a une activité catalytique 500 fois supérieure à la protéine normale. La conjonction des connaissances biochimiques, génétiques et cellulaires associées à la recherche systématique d'inhibiteurs de kinase depuis le début des années 1980 a permis de développer des inhibiteurs spécifiques de la forme mutée de BRAF qui sont maintenant utilisés chez l'homme (voir partie I-B).

3. Rôle de BRAF dans la sénescence

En plus de son rôle oncogène reconnu, la mutation de BRAF V600E est aujourd'hui associée à la « sénescence induite par l'oncogène », dite « OIS » (oncogene-induced senescence). L'OIS est un mécanisme de protection contre les événements oncogéniques récemment identifié^{34,35}. Dans le cadre de l'OIS, l'activation isolée d'un seul oncogène, en l'absence d'autres mutations, induit un arrêt du cycle cellulaire et empêche la prolifération anarchique des cellules. De cette façon, l'OIS assure l'élimination des cellules néoplasiques précoces avant leur entrée en prolifération, réduisant ainsi le risque de transformation en cancer à proprement parler. L'OIS est associée à des caractéristiques moléculaires distinctes, telles que l'expression de p16^{Ink4a}, une protéine suppresseur de tumeur, et l'activation d'un transcriptome de type pro-inflammatoire. En effet, les cellules porteuses de la mutation BRAFV600E produisent une variété de cytokines et chimiokines favorisant la réponse immunitaire de type « T helper 1 » (Th1), dont les effets autocrines et paracrines sont cruciaux pour l'induction et le maintien du phénotype d'OIS³⁶.

4. Mutations activatrices germinales de la voie des MAPK dans les « rasopathies »

Dans le paragraphe I-A-2, nous avons développé le rôle des mutations somatiques activatrices de BRAF dans le cancer. Des mutations de BRAF peuvent aussi être germinales, ce qui donne lieu à un groupe de syndromes génétiques appelés les « rasopathies »³⁷. Les rasopathies regroupent l'ensemble des maladies génétiques secondaires à une mutation germinale de gènes codant pour des protéines impliquées dans la voie des MAPK (RAS, RAF, MEK, mais aussi NF1, SOS1, SHP2, CBL, p120GAP, SHOC2, et SPRED1). Toutes les rasopathies sont représentées dans la figure 3, en rapport avec les protéines de la voie des MAPK pour lesquelles des mutations ont été rapportées. Ces mutations germinales sont à l'origine d'anomalies du développement communes sur le plan phénotypique, bien que certaines spécificités puissent être attribuables à tel ou tel gène affecté. Ainsi, tous les patients partagent, à degrés variables, un retard mental ou des difficultés d'apprentissage, des malformations cardiaques, une dysmorphie faciale, des anomalies cutanées, et, dans certains cas, une prédisposition au cancer.

Il est particulièrement intéressant de connaître la symptomatologie des différentes rasopathies car elle s'apparente aux effets secondaires, notamment cutanés, développés par les patients traités par inhibiteurs de BRAF. Dans les paragraphes suivants, nous allons développer en particulier le syndrome de Noonan, sa variante le syndrome de Noonan avec lentigines multiples, et le syndrome cardio-facio-cutané, qui peuvent être secondaires à des mutations des protéines RAF. Le syndrome de Costello, lié à des mutations activatrices de RAS, sera aussi détaillé en raison de ses caractéristiques cliniques qui rappellent, elles aussi, les effets secondaires paradoxaux des inhibiteurs de BRAF sur la peau. Une synthèse clinique de ces principaux syndromes, associée à la prévalence des mutations respectives rapportées pour chacun, est représentée dans le tableau 1. Mais parmi les rasopathies, il existe aussi la neurofibromatose de type 1, le syndrome de malformation capillaire et de malformation artériovoineuse, et le syndrome Legius.

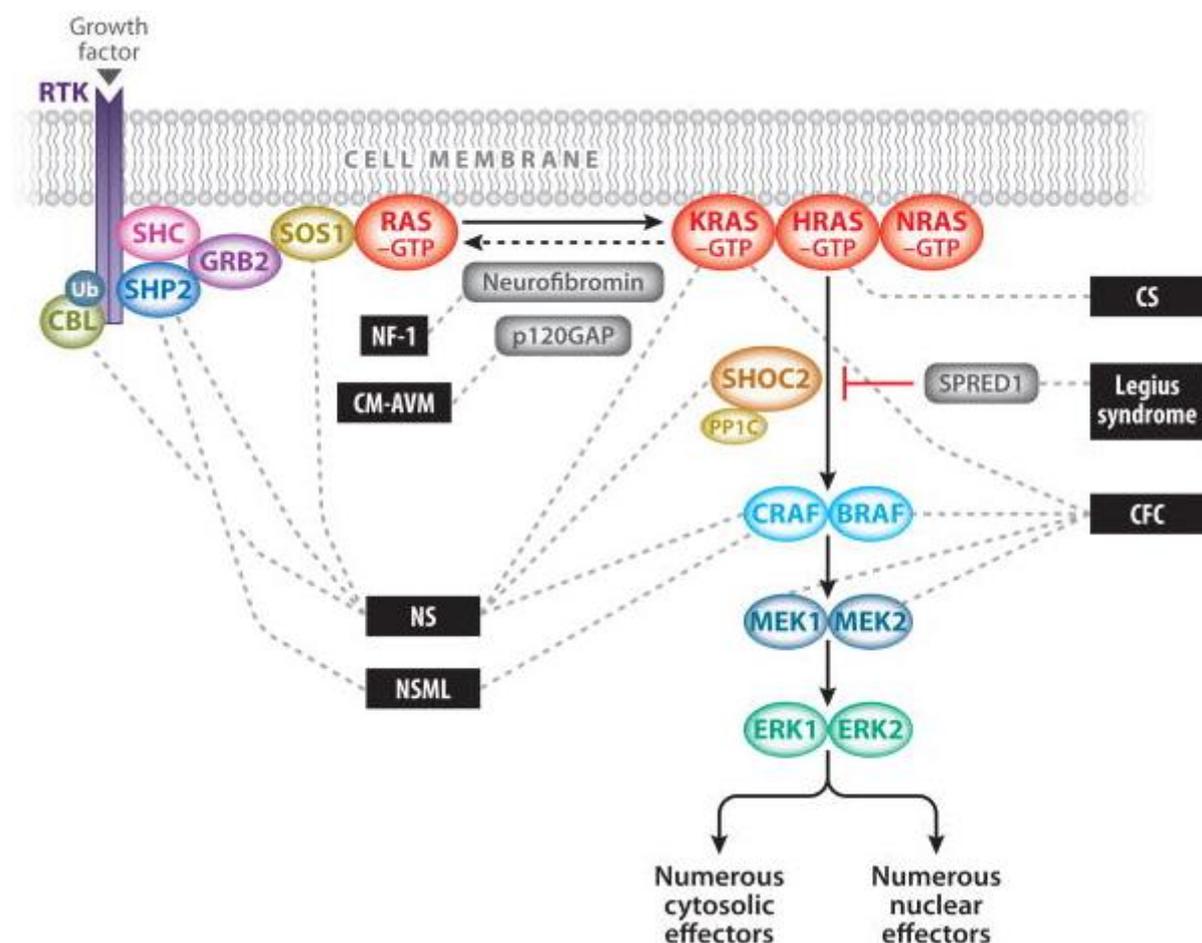


Figure 3 : Les rasopathies sont l'ensemble des maladies génétiques causées par des mutations germinales codant pour des protéines impliquées dans la voie des MAPK. Les protéines concernées sont représentées dans ce schéma avec le syndrome

correspondant indiqué dans les rectangles noirs: NF-1 (Neurofibromatose de type 1), NS (Syndrome de Noonan), NSML (Syndrome de Noonan avec multiples lentigines), CM-AVM (Syndrome de malformation capillaire et de malformation artério-veineuse), CS (Syndrome de Costello), CFC (Syndrome cardio-facio-cutané), et syndrome Legius. (Tiré de la revue de Katherine A. Rauen, Annual Review of Genomics and Human Genetics, 2013)

a. Syndrome de Noonan (NS)

Le NS est une maladie autosomique dominante qui affecte 1 sur 1000 à 2000 nouveau-nés. Il est caractérisé par une dysmorphie cranio-faciale comprenant un front large, un hypertélorisme, des fentes palpébrales bas-oblique, et des oreilles en rotation postérieure. Les autres caractéristiques phénotypiques importantes comprennent des malformations cardiaques, un retard de croissance, des troubles de la coagulation, et un degré variable de retard neurocognitif³⁸. Enfin, les patients atteints de NS ont un risque accru de développer un cancer. À l'heure actuelle, sept gènes ont été associés au NS: *PTPN11*³⁹, *SOS1*^{40,41}, *CRAF*^{42,43}, *KRAS*⁴⁴, *NRAS*⁴⁵, et plus rarement *SHOC2*⁴⁶, et *CBL*^{47,48}. Tous ces gènes font l'objet de mutations hétérozygotes de la lignée germinale et codent pour des protéines associées à la voie des MAPK.

Le gène le plus communément associé au NS est *PTPN11* (Protéine tyrosine phosphatase de type non-récepteur 11), dans environ 50% des cas. SHP2, le produit protéique de *PTPN11*, est composé de domaines SH2 N- et C-terminaux et d'un domaine catalytique « protéine tyrosine phosphatase » (PTP). La plupart des mutations faux-sens rapportées affectent les acides aminés impliqués dans l'interaction entre les domaines N-SH2 et PTP. Des mutations dans cette région perturbent la stabilité de la forme catalytiquement inactive de SHP2, empêchant la protéine de passer de sa conformation active à inactive^{49,50} ce qui a pour conséquence l'activation de la voie des MAPK.

Des mutations faux-sens de *SOS1* sont la deuxième cause la plus fréquemment retrouvée de NS, et représentent environ 15% des cas^{51,52}. *SOS1* code pour la protéine SOS1, facteur d'échange de nucléotide guanine de RAS (Ras GEF), qui permet à RAS de passer de sa forme inactive liée au GDP à sa forme active liée au GTP. La majorité des mutations faux-sens de *SOS1* affectent des codons impliqués dans la stabilisation de la protéine dans sa conformation

inactive. Ces mutations confèrent un gain de fonction SOS1, d'où l'augmentation de la forme active de RAS, et l'activation de la voie des MAPK.

Les mutations activatrices de *KRAS*, *NRAS* ou *CRAF* sont des causes plus rares de NS^{53,54,55}. Les mutations de *CRAF* se regroupent dans deux régions: la région conservée 2 (à proximité de la S259) et la région conservée 3 (autour du segment d'activation). Ces mutations entraînent un gain de fonction de CRAF par la phosphorylation des résidus S259 et S621.

Une autre cause rare de NS est la mutation du gène suppresseur de tumeur *CBL* (Casitas B-lineage Lymphoma). *CBL* code pour une ubiquitine ligase E3 qui régule négativement la voie des MAPK au niveau de l'ubiquitination des RTK (Récepteurs à activité Tyrosine Kinase)⁵⁶. *CBL* médie la liaison de l'ubiquitine avec le RTK activé, qui est nécessaire à l'internalisation du récepteur et sa dégradation. Parce que les mutations de *CBL* réduisent le recyclage des RTK activés, ils ont un effet global d'activation de la voie des MAPK.

b. Syndrome de Noonan avec Lentigines multiples (NSML)

Le NSML (anciennement dénommée syndrome LEOPARD) est une maladie génétique rare à transmission autosomique dominante. Les individus présentent des caractéristiques cranio-faciales de NS associées à de multiples lentigines, des anomalies de l'électrocardiogramme, un hypertélorisme, une sténose de la valve pulmonaire, des anomalies des organes génitaux, un retard de croissance, et une surdité. Le NSML et le NS sont causés par des mutations faux-sens hétérozygotes dans les gènes *PTPN11*^{57, 58} et *CRAF*⁵⁹. Les mutations les plus fréquemment associées au NSML affectent les acides aminés du domaine catalytique PTP de *PTPN11*, et se traduisent par une activité catalytique réduite de SHP2 *in vitro*, ce qui provoque une perte de fonction⁶⁰. Cependant, un modèle *in vivo* chez la drosophile a démontré que l'activité catalytique résiduelle de la protéine SHP2 mutante dans la NSML est suffisante pour produire un phénotype de gain-de-fonction en raison de la dérégulation de la protéine, provoquant une activation continue de la voie des MAPK au cours du développement⁶¹.

c. Syndrome cardio-facio-cutané (CFC)

Le CFC, comme le CS, est rare, et partage beaucoup de caractéristiques phénotypiques avec le NS et le CS. Les patients atteints de CFC ont une dysmorphie faciale rappelant celle du NS, avec une macrocéphalie, un front large, une hypoplasie des arcades sourcilières, des fentes palpébrales bas-obliques avec ptosis, un nez court avec un cartilage déprimé et des narines antéversées, un palais ogival, et des oreilles en rotation postérieure. Des anomalies ectodermiques se présentent sous forme de cheveux clairsemés, bouclés, de sourcils et les cils clairsemés, d'hyperkératose, de kératose pileaire, d'hémangiomes, d'ichtyose, et d'efflorescence naevique⁶². Des anomalies cardiaques similaires à celles du NS et du CS, sont aussi observées. Les anomalies musculo-squelettiques sont fréquentes, tout comme des anomalies oculaires, dont le strabisme, le nystagmus, la myopie, l'hypermétropie et l'astigmatisme. Un retard de croissance est typique dans la petite enfance, de même que les reflux, les vomissements, l'aversion orale, et la constipation. Des anomalies neurologiques sont toujours présentes à degrés variables, et comprennent une hypotonie, un retard moteur, des convulsions, un retard de langage, et / ou des troubles d'apprentissage⁶³.

Quatre gènes ont été associés au CFC: *BRAF*, *MAP2K1* (MEK1), *MAP2K2* (MEK2), et *KRAS*^{64,65}. Des mutations hétérozygotes de *BRAF* sont présentes dans environ 75% des patients atteints de CFC chez qui une mutation a été identifiée. La majorité des mutations de *BRAF* associées au CFC diffèrent de la mutation V600E retrouvée de façon somatique dans les cancers. La majorité des mutations de *BRAF* se trouvent dans le domaine riche en cystéine de l'exon 6 et dans le domaine kinase, avec comme mutation la plus fréquente la Q257R (Figure 4). Des analyses fonctionnelles *in vitro* de ces mutations de *BRAF* ont démontré que la plupart entraînaient une activité kinase accrue; mais il existait quelques protéines mutantes dont l'activité kinase était réduite. Cependant une diminution de l'activité kinase de *BRAF* peut indirectement avoir un rôle activateur de la voie des MAPK par *CRAF*⁶⁶. D'autres études *in vivo* des mutations du CFC ont démontré que les mutations augmentant l'activité kinase de *BRAF*, tout comme celles qui la réduisent, entraînent un phénotype similaire de dérégulation de la voie des MAPK dans un modèle de poisson-zèbre⁶⁷.

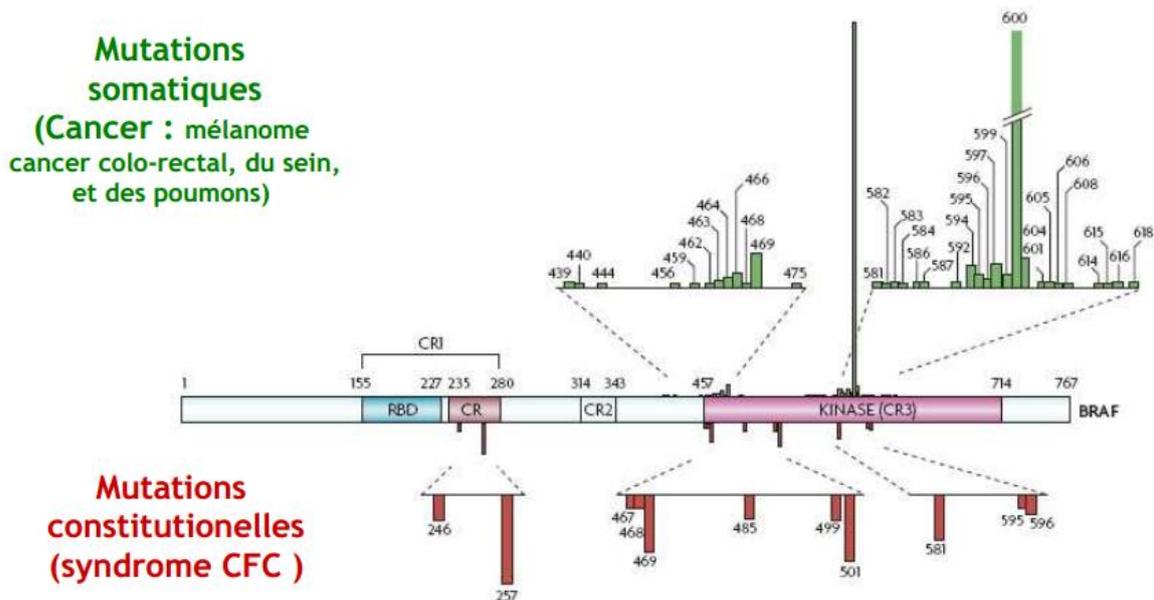


Figure 4 : Localisation des mutations de BRAF identifiées dans les cancers (mutations somatiques), par opposition au syndrome cardio-facio-cutané (mutations germinales). (D'après Schubbert et al., Nature Reviews Cancer 2007)

Des mutations faux-sens hétérozygotes de *MAP2K1* (MEK1) et *MAP2K2* (MEK2) sont présentes dans environ 25% des individus atteints de CFC chez lesquels une mutation causale a été identifiée. MEK1 et MEK2 ont la capacité de phosphoryler et activer ERK1 et ERK2. Les études fonctionnelles des protéines MEK mutantes du CFC ont montré qu'elles sont toutes activatrices.

Le CFC est transmis de manière autosomique dominante, mais la grande majorité des cas résultent d'une mutation dominante *de novo*. Bien que les mutations causant le CFC soient toutes impliquées dans la voie oncogène bien connue des MAPK, il est encore difficile de savoir si les individus avec un CFC sont à un risque accru de tumeurs malignes. Ce risque semble cependant inférieur à celui de la NF-1, du NS, et du CS⁶⁸.

d. Syndrome de Costello (CS)

Le CS est une rasopathie dont beaucoup de caractéristiques sont communes avec les autres syndromes décrits ci-dessus. Les patients atteints du CS présentent une dysmorphie cranio-faciale caractéristique; un retard de croissance, en particulier dans la période néonatale; des anomalies cardiaques, musculo-squelettiques, ectodermiques, et oculaires; une hypotonie; et

un retard neurocognitif variable⁶⁹. Des caractéristiques phénotypiques apparaissent dès la période périnatale avec un hydramnios *in utero*, des naissances prématurées et un poids de naissance augmenté. Les traits du visage sont grossiers et incluent généralement une macrocéphalie avec un front proéminent, un épicanthus, des fissures palpébrales bas-obliques, un nez court avec un cartilage déprimé et une large base, et des oreilles en rotation postérieure avec des reliefs et des lobes épaissis. Les joues peuvent être pleines et la bouche grande aux lèvres charnues. Des manifestations dermatologiques aident au diagnostic clinique, avec une peau douce aux rides marquées, et avec des plis palmo-plantaires profonds. La plupart des individus ont des anomalies cardiaques, comme une cardiomyopathie hypertrophique, des anomalies valvulaires ou septales, et une arythmie⁷⁰. Un retard de croissance et des dysfonctionnements digestifs tels que des reflux, l'aversion orale, et une constipation sont typiques de la petite enfance.

Le CS est causé par des mutations hétérozygotes germinales activatrices de *HRAS*⁷¹. Plus de 80% des sujets sont porteurs de la mutation G12S; la deuxième mutation la plus fréquente étant la mutation G12A.

Ces substitutions provoquent une réduction de l'activité GTPase intrinsèque et GAP-induite, résultant en une activation de RAS⁷². D'autres mutations *HRAS* moins fréquentes peuvent également se produire, ce qui peut entraîner un phénotype atypique. Il est intéressant de noter que les acides aminés 12 et 13, les plus couramment mutés dans le CS, sont également les plus fréquemment mutés dans les cancers RAS-mutés. Tous cancers confondus, les mutations de RAS dans les codons 12, 13 ou 61 sont présentes dans environ 20% des tumeurs⁷³.

Comme dans la plupart des autres rasopathies, les individus avec un CS sont à risque accru de tumeurs bénignes et malignes. Des tumeurs bénignes fréquemment observées dans le CS, et très évocatrices de ce syndrome, sont des papillomes cutanés⁷⁴, qui sont observés dans ~ 72% des individus CS, dès l'enfance. Ces papillomes sont souvent observés sur le nez, bien qu'ils puissent se développer n'importe où sur le corps. Des tumeurs malignes peuvent aussi se développer, comme le rhabdomyosarcome, le carcinome urothélial, et le neuroblastome⁷⁵.

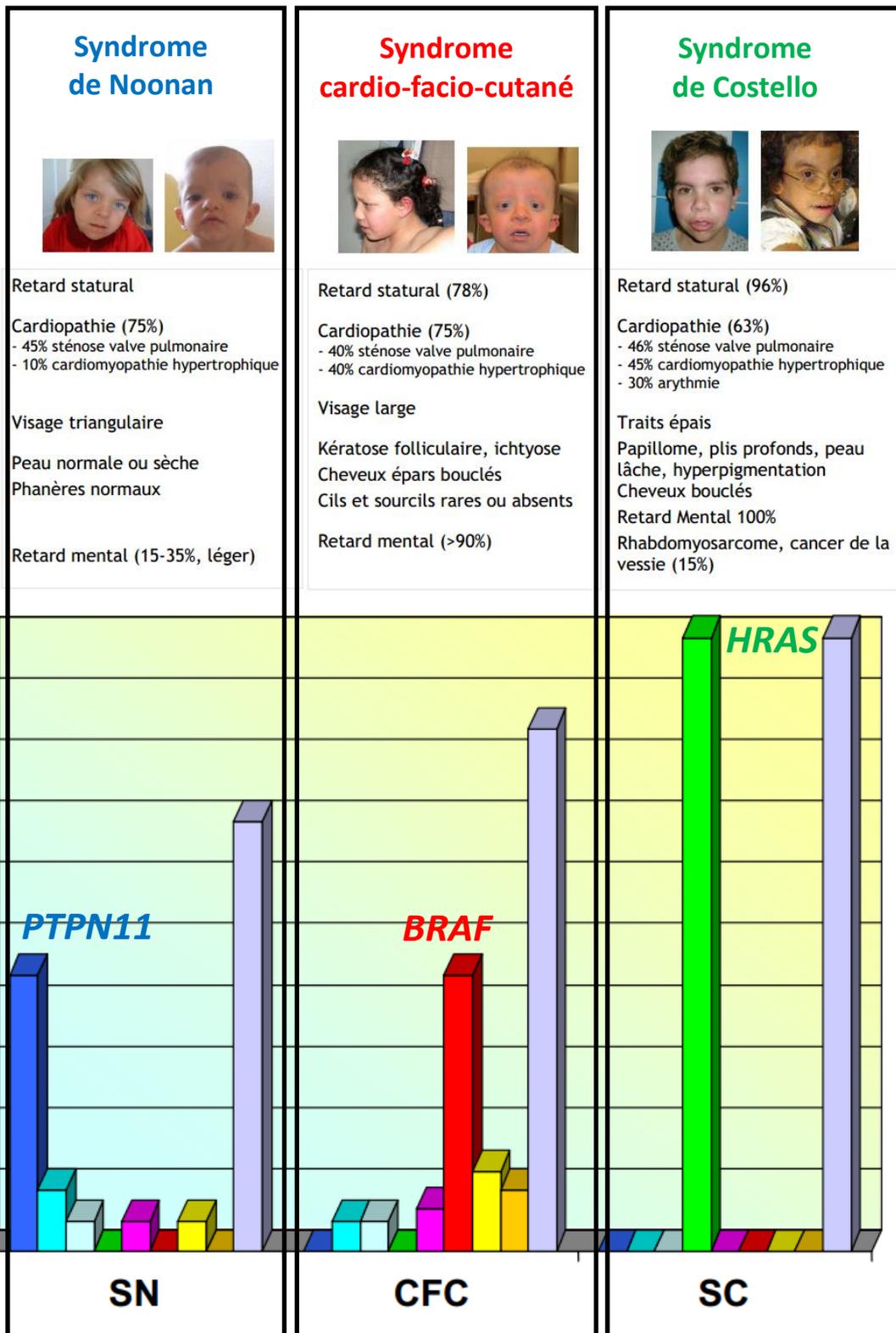


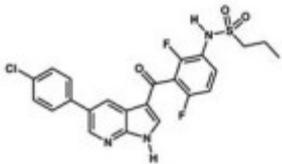
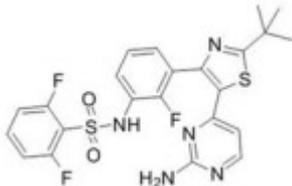
Tableau 1 : Résumé des caractéristiques cliniques des syndromes de Noonan, cardio-facio-cutané et de Costello, avec la fréquence des mutations respectives représentée sous forme de graphe, sous chaque tableau clinique. (D'après le Pr H. Cavé, Service de génétique moléculaire de l'Hôpital Robert Debré, Paris.)

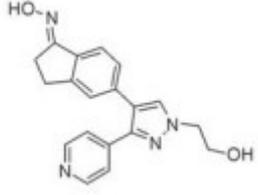
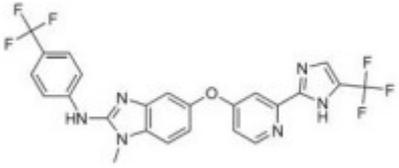
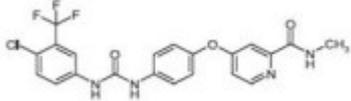
B. Les inhibiteurs de BRAF et de MEK

1. Traitement du mélanome

L'identification de mutations du gène *BRAF* dans les mélanomes a fait naître un grand espoir de pouvoir utiliser des thérapies capables de bloquer la fonction de la protéine BRAF et de pouvoir ainsi découvrir la première thérapie ciblée du mélanome. Deux types d'inhibiteurs de BRAF ont été développés et testés dans le mélanome avancé: **Les inhibiteurs de BRAF de type 1** se lient et inhibent la conformation active de la kinase BRAF, et **les inhibiteurs de BRAF de type 2** se lient à la conformation inactive de la kinase (Tableau 2)⁷⁶.

Tableau 2 : Inhibiteurs de BRAF

Nom de l'inhibiteur	Etat d'avancement clinique
Inhibiteurs de BRAF, de type 1	
Vemurafenib (PLX4032) 	Essais de phase I, II, et III terminés
Dabrafenib (GSK2118436) 	Essais de phase I, II, et III terminés
Encorafenib (LGX818)	Essai de phase I en cours de recrutement (NCT01436656)
GDC0879	Etudes précliniques uniquement ⁷⁷ Pas de développement clinique prévu

	
Inhibiteurs de BRAF, de type 2	
XL281/BMS908662	Essai de phase I terminé ⁷⁸
RAF265 	Essai de phase I terminé ⁷⁹
Sorafenib 	Essais de phase I, II, et III terminés ^{80,81}

Note: Seuls les essais cliniques en monothérapie sont représentés – d'autres essais cliniques d'inhibiteurs de BRAF (vemurafenib, dabrafenib, BMS908662, RAF265, et sorafenib) combinés à d'autres traitements systémiques sont terminés ou en cours.

A- Les inhibiteurs de BRAF non sélectifs (de type 2)

Les premières tentatives ciblant la protéine BRAF mutée avec des inhibiteurs de type 2 n'ont pas réussi à démontrer d'efficacité clinique. Cela pourrait être lié à l'inhibition non sélective de la kinase, qui a entraîné une toxicité significative à des doses bien inférieures à celles requises pour inhiber la voie des MAPK. Ce n'est qu'avec le développement des inhibiteurs plus spécifiques de la protéine BRAF mutée que le bénéfice thérapeutique est apparu.

1°) Sorafenib

Le sorafenib était en cours de développement pour le traitement du cancer du foie et du rein avant même l'identification de mutations du gène *BRAF* dans les mélanomes. Le sorafenib se

lie aux protéines CRAF, BRAF sauvage, et BRAF mutée, avec peu de sélectivité quelle que soit l'isoforme. Il inhibe aussi d'autres kinases, y compris le récepteur du facteur de croissance de l'endothélium vasculaire 2 (VEGFR2), le récepteur du facteur de croissance de l'endothélium vasculaire 3 (VEGFR3), le récepteur du facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGFR), p38 MAPK, FLT, CKIT, FMA et RET⁸².

Les essais cliniques de phase II conduits chez des patients atteints de mélanome métastatique n'ont pas démontré d'efficacité du sorafenib en monothérapie, et les analyses pharmacodynamiques suggèrent que seule une inhibition partielle de la signalisation de BRAF a été obtenue à la dose maximale tolérée⁸³. Malgré cela, un essai de phase I / II dans lequel le sorafenib a été donné en association avec le carboplatine et le paclitaxel (CP) a montré un taux de réponse et une PFS (survie sans progression) allongés par rapport à une chimiothérapie standard chez des patients atteints de mélanome métastatique⁸⁴. Deux essais de phase III randomisés comparant la combinaison de CP et du sorafenib avec celle de CP et du placebo n'ont montré aucun bénéfice pour le bras CP et sorafenib^{85,86}.

A ce jour, aucune étude n'a détecté de corrélation entre le génotype du gène *BRAF* (muté ou sauvage) et la réponse au sorafenib, aussi bien en monothérapie qu'en combinaison avec une chimiothérapie.

2°) RAF265

RAF265 est une autre petite molécule inhibitrice de multiples kinases dont BRAF (sauvage ou muté), CRAF, VEGFR2, et PDGFR, avec une plus grande inhibition vis-à-vis de BRAFV600E et VEGFR2. Contrairement au sorafenib, RAF265 est un inhibiteur plus puissant de BRAF muté que de BRAF sauvage⁸⁷. Des modèles de xénogreffes ont donné des réponses impressionnantes sur des tumeurs à la fois avec ou sans mutation de BRAF⁸⁸, mais un essai de phase I conduit chez des patients atteints de mélanome métastatique BRAFV600- ou BRAF sauvage a été décevant, avec des taux de réponse limités à 16% et 13% respectivement⁸⁹.

B- Les inhibiteurs de BRAF sélectifs (de type 1)

Les résultats les plus prometteurs chez les patients atteints de mélanome BRAFV600- ont été observés avec des médicaments conçus pour cibler sélectivement la forme mutée et activée de la kinase BRAF. Ces inhibiteurs de type 1 se lient au domaine de liaison à l'ATP de BRAF V600-, inhibant ainsi son activité kinase et la voie MAPK en aval, à des doses bien inférieures à la dose maximale tolérée^{90,91}. Deux médicaments, le vemurafenib et le dabrafenib ont obtenu l'AMM (autorisation de mise sur le marché) en France en 2012 et 2013, respectivement, et un troisième est en cours de développement, le LGX818 (encorafenib). Ces inhibiteurs sont associés à des toxicités spécifiques telles que la formation de carcinomes épidermoïdes cutanés secondaires⁹² (sujet traité au chapitre I-D) et le développement rapide de mécanismes de résistance.

1°) Vemurafenib

Le premier inhibiteur sélectif de BRAF à avoir été testé en essais cliniques est le vemurafenib (PLX4032). Huit ans après la découverte et la caractérisation des mutations du gène *BRAF* dans le mélanome, le premier essai clinique de phase I testant le vemurafenib chez 81 patients atteints de mélanome a été mené par Flaherty et al.⁹³ Parmi les 32 patients atteints de mélanome qui ont été traités avec la dose recommandée par la suite en phase II, 24 patients ont connu une réponse partielle (PR) et 2 patients ont eu une réponse complète (CR). En 2011, Chapman et al⁹⁴ ont publié les résultats de l'essai de phase III, randomisé, comparant le vemurafenib à la dacarbazine chez des patients porteurs de la mutation V600E. Cet essai a été interrompu de façon anticipée suite à l'analyse intermédiaire de décembre 2010, qui a mis en évidence une supériorité du vemurafenib à la fois en termes de survie globale (OS) et en PFS. Les taux de réponse (PR ou CR) ont approché 48% dans la cohorte traitée par vemurafenib versus 5% dans la cohorte traitée par dacarbazine. Suite à cette publication, le vemurafenib a été approuvé comme traitement de première intention des patients atteints de mélanome métastatique muté BRAFV600-.

Avec un recul plus important, l'analyse des résultats de cet essai de phase III, a confirmé l'importante différence des taux de OS (13,2 mois [IC à 95%, de 12,0 à 15,0] en faveur du

vemurafenib par rapport aux 9,6 mois [IC 95%, 7.9 à 11.8] de la dacarbazine) avec 55% des patients encore en vie après 12 mois pour le vemurafenib versus 43% pour la dacarbazine⁹⁵.

Dans les essais de phase II et III, le vemurafenib a aussi démontré une efficacité sur des patients porteurs d'une mutation BRAFV600K (n=20, 4% de la population totale de l'étude)⁹⁶. Le taux de réponse semble inférieur à celui des patients porteurs de tumeurs mutées BRAFV600E. Il existe des preuves anecdotiques de l'activité du vemurafenib dans des tumeurs porteuses d'autres mutations de BRAF (y compris BRAFV600R et BRAFV600D), et un essai visant à étudier formellement son activité sur les mélanomes BRAF mutés non V600E est en cours (NCT01586195).

2°) Dabrafenib

Le dabrafenib (GSK2118436) est un inhibiteur réversible, puissant et compétitif de l'adénosine triphosphate qui inhibe sélectivement la kinase BRAFV600E. La concentration du médicament nécessaire pour inhiber 50% de l'activité de kinase de BRAFV600E (CI50) est cinq fois inférieure à celle de BRAF sauvage ou de CRAF⁹⁷. Les études précliniques ont démontré que le dabrafenib inhibait la voie des MAPK dans les cellules de mélanome BRAFV600E, et permettait d'obtenir une régression tumorale de xénogreffes en modèle murin.

Le dabrafenib et le vemurafenib partagent de nombreux attributs, dont leur activité clinique et leur toxicité de classe. Toutefois, des différences entre ces médicaments existent en ce qui concerne l'inhibition des kinases RAF, et la toxicité.

Le vemurafenib et le dabrafenib sont plus sélectifs pour BRAF muté que les autres kinases, y compris BRAF sauvage. Le vemurafenib a une activité similaire pour l'inhibition de CRAF (CI50 48 nM) et BRAFV600E (CI50 31 nM), tandis que dabrafenib inhibe moins CRAF (CI50 5 nM contre 0,6 nM pour BRAFV600E)⁹⁸. Les ratios de CI50 pour CRAF et BRAFV600E par rapport à celui de BRAF sauvage sont 0,5 et 0,3, respectivement, pour le vemurafenib et 0,4 et de 0,05, respectivement, pour le dabrafenib⁹⁹, ce qui indique que le dabrafenib est un inhibiteur de BRAFV600E plus sélectif que le vemurafenib. En outre, le dabrafenib a une activité similaire pour l'inhibition de BRAFV600E et BRAFV600K.

Dans l'essai de phase III randomisé comparant le dabrafenib à la dacarbazine, le dabrafenib a allongé la survie sans progression de façon considérable (5,1 vs 2,7 mois pour la dacarbazine; HR, 0,30; IC 95%, 0,18 à 0,51; P <0,0001)¹⁰⁰. La survie globale n'a pas été analysée en raison d'un cross over possible (c'est-à-dire que les patients randomisés dans le bras dacarbazine avaient la possibilité d'être traités par dabrafenib en cas de progression tumorale sous dacarbazine), mais la tendance observée était malgré tout en faveur du dabrafenib.

3°) Encorafenib

L'encorafenib, ou LGX818, est un inhibiteur de BRAF de type 1 encore en cours d'essais cliniques, à la fois en monothérapie (NCT01436656) et en combinaison avec d'autres thérapies ciblées (NCT01543698). Les études précliniques ont montré que l'encorafenib n'inhibait pas la croissance de plus de 400 lignées cellulaires exprimant BRAF sauvage, mais permettait d'obtenir une diminution forte et prolongée de pMEK (supérieure à 24 heures) dans des modèles murins de xénogreffes de mélanome humain BRAFV600E¹⁰¹.

C- L'association des inhibiteurs de BRAF avec les inhibiteurs de MEK

1°) Trametinib

D'autres thérapies ciblées inhibitrices de MEK ont été étudiées dans le mélanome BRAF muté. Elles ont été conçues pour inhiber la voie des MAPK en aval de BRAF. Le développement des inhibiteurs de MEK a commencé avant celui des inhibiteurs de BRAF, mais ils avaient montré un effet limité dans les premiers essais où le statut BRAF des patients atteints de mélanome était inconnu. Des résultats impressionnants ont été obtenus dans les études plus récentes menées chez des patients atteints de mélanome BRAF muté.

Le trametinib (GSK1120212) est à ce jour l'inhibiteur de MEK le mieux étudié dans le mélanome BRAF muté. Un essai de phase I a montré son activité significative dans le mélanome BRAF muté, avec peu d'activité chez les patients BRAF sauvage¹⁰², tandis qu'un essai de phase II chez des patients mutés BRAF V600E / K avec ou sans traitement inhibiteur de BRAF préalable n'a démontré qu'une efficacité médiocre lorsque le trametinib était

administré après échec d'un inhibiteur de BRAF¹⁰³. Un essai de phase III mené chez des patients ayant reçu au maximum une ligne de traitement a démontré un taux de réponse de 22% et une PFS médiane de 4,8 mois, comparativement à une réponse de 8% et une PFS de 1,4 mois chez les patients traités par chimiothérapie (DTIC ou paclitaxel). Les données de survie globale étaient difficiles à analyser car les patients qui progressaient sous chimiothérapie étaient autorisés à recevoir le tramétinib (cross-over) mais elles montraient tout de même une tendance vers un bénéfice du tramétinib avec un HR de 0,54 (IC 95%, 0,32 à 0,92, P = 0,01). Le taux de survie à 6 mois dans la population en intention de traiter était de 81% dans le groupe tramétinib contre 67% dans le groupe chimiothérapie, malgré le « crossing-over » qui a permis à 47% des patients du groupe chimiothérapie d'être traités par tramétinib après progression de la maladie¹⁰⁴. La toxicité des inhibiteurs de MEK se manifeste par des éruptions cutanées (notamment acnéiformes), de l'hypertension, de la diarrhée, de l'œdème, de l'insuffisance cardiaque, des troubles oculaires rares (choriorétinopathie), et des élévations des enzymes créatine kinases. La plupart des toxicités étaient peu sévères et n'ont pas nécessité d'arrêt du médicament.

Les résultats de l'essai indiquent que le tramétinib n'est pas aussi efficace que le dabrafénib ou le vemurafénib, mais qu'il peut faire preuve d'une certaine activité en monothérapie.

2°) Association dabrafénib et tramétinib

Une stratégie efficace s'appuyant sur l'efficacité du dabrafénib et du tramétinib en monothérapie a été de combiner ces agents (CombiDT), dans le but d'améliorer encore les taux de réponse et de retarder l'apparition de mécanismes de résistance. Comme les deux médicaments ciblent la voie des MAPK, leur combinaison peut éviter, ou du moins, retarder, la résistance acquise impliquant en particulier la réactivation de cette voie. La combinaison des deux médicaments permet aussi de réduire la toxicité de chaque médicament lorsqu'il est administré individuellement (en particulier les toxicités cutanées).

L'essai de phase initiale I / II portant sur des patients atteints de mélanome métastatique BRAFV600E / K comportait plusieurs cohortes¹⁰⁵. Ces cohortes portaient sur l'interaction médicamenteuse (partie A), l'escalade de dose et l'extension de cohorte (partie B), et une grande cohorte randomisée (partie C). Dans la partie C, les patients ont été randomisés 1:1:1

pour CombiDT à une dose de 150 mg 2 fois par jour de dabrafenib et de 1 mg par jour de trametinib, CombiDT à une dose de 150 mg 2 fois par jour de dabrafenib et de 2 mg par jour de trametinib, ou dabrafenib en monothérapie (150 mg 2 fois par jour). L'analyse des données de cette partie C, portant sur les patients randomisés dans le bras combinant inhibiteur de BRAF et inhibiteur de MEK, a mis en évidence un taux de réponse de 76% chez ceux recevant CombiDT à la dose de 150/2, nettement plus élevé que celui des patients recevant le dabrafenib en monothérapie (54%, $p = 0,026$). De plus, la PFS médiane de 9,4 mois chez ceux recevant CombiDT à la dose 150/2 était significativement plus longue que dans le bras dabrafenib seul (5,8 mois; HR, 0,39; P, 0,0001). Ces résultats sont meilleurs que ceux rapportés dans les essais phase III précédents, testant le dabrafenib et le trametinib en monothérapie. En outre, dans la cohorte d'extension de la partie B, les patients présentant une progression de la maladie sous inhibiteur de BRAF, ont bénéficié d'un taux de réponse beaucoup moins élevé, évalué à 19% avec le traitement CombiDT¹⁰⁶. La plupart des toxicités de cette combinaison ont été légères. Notamment, les toxicités cutanées comme l'hyperkératose, les carcinomes épidermoïdes, les kérato-acanthomes, et les éruptions cutanées ont été considérablement réduites, et il semble y avoir aussi une réduction des toxicités propres au trametinib telles que la diarrhée et l'hypertension comparativement aux essais testant le trametinib en monothérapie. La toxicité la plus courante était la fièvre, survenant chez environ 70% des patients (5% de grade 3/4) recevant CombiDT à la dose de 150/2 - beaucoup plus fréquente qu'avec le dabrafenib en monothérapie. Les mécanismes sous-jacents de ces hyperthermies restent mal compris, mais la fièvre survient généralement tôt, souvent sous forme d'un épisode isolé, peut être gérée avec une brève interruption du traitement et dans les cas récurrents une prophylaxie par corticoïdes, ne nécessitant le plus souvent pas de réduction de dose¹⁰⁷. Cette fièvre ne semble pas liée à la charge tumorale ou à la réponse au traitement.

Deux essais de phase III comparant CombiDT à la dose de 150/2 avec le dabrafenib (essai COMBI-d : NCT01584648) ou le vemurafenib (essai COMBI-v : NCT01597908) respectivement en monothérapies ont été conduits et les résultats sont connus^{108,109}. Ils ont montré un bénéfice en termes de taux de réponse (RR), de PFS et de OS : COMBI-d : RR : 67% vs 51%, PFS : 9.3 mois vs 8.8 mois pour le dabrafenib seul (HR : 0.75); COMBI-v : RR : 64% vs 51%, PFS : 11.4 mois vs 7.3 mois pour le vemurafenib seul. L'OS est significativement supérieure à celle du vemu qui est de 17.2 mois mais la médiane pas encore atteinte (HR : 0.69, donc 31% de réduction du risque de mourir). Dans ce dernier essai,

dont l'objectif principal était d'évaluer la survie globale, le bénéfice de survie est significatif avec un HR de 0.69 entre les deux groupes de traitement, la survie globale médiane observée avec le vemurafenib étant de 17.2 mois et celle de la combinaison dabrafenib + trametinib, non encore atteinte à ce jour après 11 mois de suivi médian. Ces résultats vont très probablement conduire au remplacement de la monothérapie par inhibiteur de BRAF au profit de la combinaison d'inhibiteurs de BRAF et de MEK comme traitement de première ligne pour mélanome BRAF muté.

2. Traitement des autres types de cancers mutés *BRAF*

Bien qu'une efficacité théorique des inhibiteurs de BRAF soit attendue dans tout type de cancer porteur de la mutation BRAFV600E, leur efficacité anti-tumorale en pratique est variable d'un type tumoral à l'autre. Les essais cliniques de phase précoce et quelques cas cliniques isolés ont montré des réponses dans le cancer du poumon non à petites cellules muté BRAFV600E, dans le cancer papillaire différencié de la thyroïde (PTC), dans la leucémie à tricholeucocytes et plus récemment dans le Xanthoastrocytome Pléomorphe Anaplasique (PXA). Cependant, aucune différence significative de la survie sans progression n'a été observée dans le cancer colorectal avec le vemurafenib en monothérapie.

a. Adénocarcinome colorectal

L'adénocarcinome colorectal (CRC) est le troisième cancer le plus fréquemment diagnostiqué chez les hommes et les femmes et a conduit à plus de 50 830 décès aux Etats-Unis en 2013¹¹⁰. Son fort taux d'incidence dans les pays industrialisés, favorisé par les nouveaux modes de vie (alimentation, sédentarité, ...), fait de ce cancer un enjeu majeur de santé publique. Des mutations du gène *KRAS* ont été découvertes en 1983 et sont utilisées comme biomarqueur pour prédire la réponse aux anticorps monoclonaux anti-EGFR chez les patients atteints de CRC métastatique^{111,112}. Bien que des mutations du gène *KRAS* soient couramment observées dans les CRC avec une fréquence proche de 40%, des mutations d'autres gènes comme *BRAF*, *PIK3CA*, et *PTEN* ont été décrites¹¹³. En 2002, des mutations de *BRAF* ont été rapportées dans les CRC par Yuen et al¹¹⁴ avec une prévalence de 5,1%. Puis une autre étude a détecté

des mutations de *BRAF* dans 78 des 513 CRC testés (15,2%), et les études de patients atteints de maladie métastatique rapportent une prévalence de 7,9% à 8,7%^{115,116,117}, ces mutations étant localisées presque exclusivement codon 600, comme dans le cancer de la thyroïde et le mélanome, par opposition à l'adénocarcinome pulmonaire. Dans de multiples études, la mutation de *BRAF* est mutuellement exclusive avec les mutations de *KRAS* ou de *PIK3CA*^{118,119}.

L'expérience clinique des inhibiteurs de *BRAF* dans les CRC suggère des différences de réponses significatives par rapport au mélanome. Kopetz et al.¹²⁰ ont rapporté les résultats d'un essai de phase I testant le vemurafenib chez 21 patients atteints de CRC métastatique, avec 1 PR confirmée sur 19 patients évaluable.

Plusieurs études ont par la suite recherché l'étiologie de cette résistance primaire intrinsèque aux inhibiteurs de *BRAF* chez les patients atteints de CRC. En comparant des lignées cellulaires de CRC *BRAF* mutées par rapport à celles de mélanome, Mao et al.¹²¹ ont observé des niveaux accrus d'activation de PI3K / Akt et des niveaux moindres d'activation de MEK. L'inhibition couplée de *BRAF* et PI3K a permis l'inhibition synergique de la croissance des lignées cellulaires de CRC. Les auteurs ont également rapporté que l'utilisation de la 5-azacytidine (un agent déméthylant) diminue l'expression de phospho-Akt et produit une plus grande inhibition de croissance de toutes les lignées cellulaires de CRC en combinaison avec le vemurafenib par rapport au vemurafenib seul. Prahallad et al.¹²² ont récemment démontré que les lignées cellulaires de CRC mutées *BRAF* traitées par vemurafenib activent EGFR, et l'association du vemurafenib avec un inhibiteur d'EGFR (cetuximab ou gefitinib), produit une inhibition synergique de la croissance des lignées cellulaires et des xénogreffes tumorales sur souris.

En raison de cette expérience clinique décevante des inhibiteurs de *BRAF* en monothérapie dans les CRC, et des données précliniques récentes, des stratégies thérapeutiques combinatoires seront nécessaires pour améliorer les résultats chez les patients atteints de CRC *BRAF*-muté.

Ainsi, des essais cliniques visant à la fois *BRAF* et EGFR sont en cours, dont une étude pilote testant le vemurafenib en association avec le panitumumab (NCT01791309) et une étude de phase I/II combinant le dabrafenib avec ou sans trametinib et le panitumumab

(NCT01750918). Deux essais de phase I/II combinant l'inhibition de la voie PI3K et de BRAF sont en cours, le premier testant l'inhibiteur de BRAF encorafenib avec ou sans l'inhibiteur de PI3K BYL719 associé au panitumumab (NCT01719380), et le second testant le dabrafenib combiné à l'inhibiteur de Akt GSK214795 (NCT01902173).

b. Cancer différencié papillaire de la thyroïde

C'est l'équipe de Kimura et al. qui a été la première à mettre en évidence des mutations du gène *BRAF* dans les cancers différenciés papillaires de la thyroïde¹²³. Ainsi, 28 des 78 patients testés, atteints d'un cancer papillaire de la thyroïde (35,8% des PTC), étaient porteurs de la mutation BRAFV600E indépendamment des mutations *RET* et *RAS*. A l'inverse, aucune mutation de *BRAF* n'a été détectée dans de petites cohortes de cancers folliculaires de la thyroïde ou carcinomes à cellules de Hürthle. Comme dans le mélanome, la majorité des mutations de *BRAF* dans le PTC se produit au niveau du codon 600, bien que de rares mutations aient été décrites dans les codons avoisinants¹²⁴.

La mutation BRAFV600E serait prédictive d'une évolution clinique plus agressive chez les patients atteints de PTC^{125,126,127}. De plus, les mutations de *BRAF* rendraient les tumeurs moins sensibles aux traitements itératifs par iode radioactif en cas de maladie récurrente¹²⁸.

Une large étude rétrospective comportant 1849 patients atteints de PTC a trouvé un taux de mortalité globale augmenté chez les patients porteurs de la mutation V600E (12,87 décès pour 1000 personnes/an; IC 95%, 9,61 à 17,24) par rapport aux patients non porteurs de la mutation (2,52 décès pour 1000 personnes/an; IC 95%, 1,40 à 4,55) avec un HR de 2,66 (IC 95%, 1,30 à 5,43) après ajustement par rapport à l'âge au diagnostic, au sexe, et au centre médical¹²⁹. Toutefois, dans la même étude, lorsque d'autres facteurs associés à un mauvais pronostic, y compris les métastases ganglionnaires, l'invasion extra-thyroïdienne, et les métastases à distance, étaient inclus dans le modèle, la mutation de *BRAF* n'était plus associée à une mortalité accrue.

L'étude préclinique des inhibiteurs de MEK et de BRAF dans des lignées cellulaires de cancer de la thyroïde, et l'expérience clinique de l'utilisation de ces médicaments dans le

mélanome, ont conduit à essais cliniques ciblant la voie des MAPK chez des patients atteints de cancer de la thyroïde^{130,131,132}.

Dans une étude de phase II testant le sorafenib dans le cancer de la thyroïde métastatique, 6 patients sur 41 atteints de PTC ont connu une PR d'une durée médiane de 7,5 mois, alors qu'aucun des 17 patients avec un autre type de cancer de la thyroïde n'a eu de PR¹³³.

Dans l'essai de phase I publié par Falchook et al.⁹¹, 3 patients sur les 9 évaluable et atteints de PTC avec mutation V600E, ont connu une PR sous dabrafenib en escalade de dose.

En 2013, Montero-Conde et al. ont montré que la majorité des lignées cellulaires de cancer de la thyroïde BRAF-mutées sont insensibles au vemurafenib, principalement en raison d'une activation de la signalisation HER2 / HER3 ligand-dépendante, induite par rétroaction¹³⁴.

Des essais cliniques dans les cancers de la thyroïde testent actuellement le dabrafenib avec ou sans trametinib (NCT01723202), le vemurafenib en néoadjuvant chez les patients avec cancer de la thyroïde localement avancé (NCT01709292), et le dabrafenib comme radiosensibilisant à l'iode radioactif pour des patients atteints de cancer de la thyroïde BRAF-muté (NCT01534897).

c. Cancer pulmonaire non à petites cellules (NSCLC)

Contrairement au mélanome, au PTC, et à la leucémie à tricholeucocytes, dans lesquels la plupart des mutations de *BRAF* sont de type V600E, les adénocarcinomes pulmonaires mutés sur *BRAF*, qui représentent 3% des adénocarcinomes bronchiques, peuvent être séparés en 2 groupes, ceux porteurs de la mutation V600E (50% -56,8%) et ceux porteurs d'autres mutations de ce gène (43,2% -50%)^{135,136}. Bien que les mutations V600E phosphorylent directement MEK, les mutations non-V600E de l'exon 11 procurent une activité kinase altérée dépendante de CRAF pour activer MEK et ERK plus en aval¹³⁷. Les mutations de *BRAF* sont généralement mutuellement exclusives avec les mutations fréquentes comme celles d'*EGFR*, *KRAS*, et les réarrangements *EML4-ALK*¹³⁸.

En dehors de l'adénocarcinome pulmonaire, le Réseau de Recherche sur l'Atlas du génome du cancer¹³⁹ a récemment révélé une prévalence de 4% de mutations de *BRAF* dans le carcinome épidermoïde du poumon.

Aucune différence de survie sans progression n'a été mise en évidence après une première ligne de chimiothérapie entre les patients porteurs de la mutation V600E par rapport aux patients sans mutation pilote connue (ni *EGFR*, *KRAS*, *BRAF* ni translocation *EML4-ALK*). De plus, aucune différence de survie sans progression n'a été détectée entre patients V600E et non-V600E.

Néanmoins, des différences de réponse au vemurafenib ont été signalées en fonction du statut V600E (réponse objective chez 1 patient avec mutation V600E et maladie progressive chez un patient non-V600E)^{140,141}. Deux patients avec NSCLC et mutation V600E ont également répondu au dabrafenib¹⁴². Un autre mécanisme visant à inhiber l'activation en aval de *BRAF* chez les patients mutés aussi bien V600E que non-V600E a fait l'objet d'une étude de phase I complète avec le selumetinib, un inhibiteur de MEK1/2, dans des tumeurs solides hors mélanome, *BRAF* mutées (NCT00888134)¹⁴³. Des essais cliniques incluant des patients atteints de NSCLC *BRAF*V600E et non-V600E sont en cours. Le dabrafenib fait l'objet d'un essai clinique international de phase II en cours dans le NSCLC *BRAF*V600E (NCT01336634). Les résultats provisoires ont été présentés récemment et ont révélé un taux de réponse de 54% (7 PR parmi 13 patients évaluables)¹⁴⁴. Le dasatinib, inhibiteur des kinases de la famille SRC, de c-KIT, des récepteurs de l'éphrine, et du PDGFR β , fait aussi l'objet d'un essai de phase II en cours chez les patients avec mutations de *BRAF* non-V600E (NCT01514864).

d. Leucémie à tricholeucocytes

La leucémie à tricholeucocytes est un trouble clonal rare de cellules B caractérisé par une splénomégalie, une pancytopenie, et l'absence d'adénomégalie périphérique.

Les anomalies génétiques sous-jacentes de la leucémie à tricholeucocytes sont restées inconnues jusqu'à ce que Tiacci et al.¹⁴⁵ publient un séquençage « exome entier » de cellules leucémiques comparé à celui des cellules saines du même patient. Ces chercheurs n'ont

identifié que 5 mutations, dont la mutation BRAFV600E. Dans leur première cohorte, 46 patients avec leucémie à tricholeucocytes étaient porteurs de la mutation BRAFV600E en séquençage Sanger. Dans une deuxième cohorte de 62 patients atteints de leucémie à tricholeucocytes, la mutation BRAF V600E a été détectée chez tous les patients¹⁴⁶. Cette hémopathie est ainsi le seul cancer qui est toujours associé la présence d'une mutation V600E de BRAF.

Après cette découverte, Dietrich et al¹⁴⁷ ont traité par vemurafenib une patiente atteinte de leucémie à tricholeucocytes réfractaire au traitement classique. Cette patiente a été traitée pendant 56 jours après escalade de dose jusqu'à un maximum de 1440 mg/jour et une réduction significative de la taille de sa rate a été observée, accompagnée d'une réponse hématologique complète après 43 jours. Six mois après la fin du traitement par vemurafenib, la patiente est restée en rémission complète¹⁴⁸. Un autre cas de patient atteint de leucémie à tricholeucocytes réfractaire, traité par vemurafenib 960 mg deux fois par jour pendant 3 semaines, a récemment été rapporté, avec normalisation des plaquettes et des globules blancs à 5 semaines; cette normalisation a persisté pendant 4 mois après arrêt du traitement¹⁴⁹. Un essai de phase II multicentrique testant le vemurafenib dans le cadre de la leucémie à tricholeucocytes réfractaire est en cours (NCT01711632).

e. Le xanthoastrocytome pléomorphe anaplasique

Le xanthoastrocytome pléomorphe anaplasique (XPA) est une tumeur cérébrale rare qui affecte le plus souvent des enfants et de jeunes adultes.

La mutation de BRAFV600E est retrouvée dans 60% à 65% des XPA de grade OMS 2 et 3¹⁵⁰. En 2014, Lee et al.¹⁵¹ ont publié un cas clinique de XPA muté BRAFV600E traité avec succès par vemurafenib, avec une excellente réponse tumorale. Un essai clinique testant la sécurité et l'efficacité du dabrafenib en association avec le trametinib chez les patients atteints de cancers rares mutés BRAFV600E, y compris les gliomes (NCT02034110), est en cours.

3. Traitement des rasopathies

L'usage des nouvelles thérapies ciblées est aussi en cours d'évaluation dans le traitement des rasopathies, dans le cadre d'essais cliniques, mais concerne surtout les inhibiteurs de MEK. Un essai clinique de phase II dans le syndrome de Noonan (NS) est actuellement en cours de recrutement, pour évaluer l'effet de l'inhibiteur de MEK « MEK162 » (Novartis) sur les adultes atteints de NS et souffrant de cardiomyopathie hypertrophique.

Le principal critère d'évaluation sera le changement d'épaisseur de la paroi ventriculaire gauche déterminée par IRM. Les objectifs sont d'évaluer l'innocuité et la tolérance du traitement par MEK162 administré pendant plus de six mois, d'évaluer la pharmacocinétique et la pharmacodynamie du MEK162, et d'évaluer si l'inhibition de MEK réduira l'hypertrophie cardiaque chez ces patients.

De même, il est envisagé de tester ce type de traitement chez les patients atteints du syndrome de Costello (CS) et du syndrome cardio-facio-cutané (CFC)^{152,153}. Dans des modèles animaux, les inhibiteurs de MEK ont montré des résultats prometteurs dans l'activation germinale de la voie des MAPK^{154,155,156} et ses conséquences sur le développement¹⁵⁷.

C. Les divers mécanismes de résistance aux inhibiteurs de BRAF

Il existe un large spectre de réponses thérapeutiques au dabrafenib et au vemurafenib. Une minorité de patients (3% à 5%) ne répondent pas du tout au traitement selon les critères RECIST (progression de la maladie dès la première évaluation), tandis que quelques-uns (3% à 5%) bénéficient d'une réponse complète et durable. Cependant, la grande majorité des patients ont une réponse tumorale précoce, mais incomplète et hétérogène (fonte tumorale et baisse du métabolisme de la tumeur évalué par tomographie par émission de positons), avec une progression de la maladie après 6 à 12 mois de traitement. Ce phénomène se produit à la fois en raison d'une résistance primaire ou acquise, et de l'hétérogénéité inter et intra-tumorale^{158,159}, ce qui représente un inconvénient majeur de ces inhibiteurs.

À ce jour, il n'existe pas de marqueur biologique permettant de prédire avec certitude la finalité clinique (réponse, survie sans progression et survie globale). Les études évaluant les tissus tumoraux pré-traitement et les tissus tumoraux prélevés au début du traitement (environ 2 semaines après le début du traitement) qui ont évalué de nombreux marqueurs d'activation de la voie des MAPK et d'autres voies de signalisation, ont montré peu de corrélation avec la réponse clinique^{160,161,162,163}. Le meilleur indicateur actuel de résultat est le génotypage du gène *BRAF*, les patients porteurs de la mutation BRAFV600E répondant systématiquement mieux que les patients porteurs d'une autre mutation de *BRAF*, non V600E¹⁶⁴.

1. La résistance primaire

Certaines études réalisées à l'aide de biopsies tumorales pré-traitement et de lignées cellulaires ont mis en évidence des mécanismes de résistance primaire. Ainsi, l'amplification du gène *CCND1* (codant pour la cycline D1)¹⁶⁵, l'expression par les cellules stromales du facteur de croissance des hépatocytes (HGF)¹⁶⁶, une sécrétion autocrine d'interleukine-6 (IL-6)¹⁶⁷, et de faibles niveaux de protéines « BH3-only » et / ou des niveaux élevés de protéines anti-apoptotiques analogues à Bcl-2¹⁶⁸, peuvent jouer un rôle pour conférer une résistance primaire à un inhibiteur de BRAF.

a. Amplification du gène *CCND1*

La cycline D1 régule la prolifération cellulaire par sa capacité à se lier à, et stimuler à la fois, CDK4 et CDK6, conduisant à la phosphorylation de la protéine du rétinoblastome et l'entrée dans le cycle cellulaire. En raison de cette activité, le gène codant pour la cycline D1 (*CCND1*) est considéré comme un oncogène important et est amplifié dans de nombreux types de tumeurs, y compris certains sous-types histologiques de mélanome. *CCND1* est en effet fréquemment amplifié dans le mélanome acral (44%), ainsi que dans le mélanome de Dubreuilh (10%) et les mélanomes superficiels extensifs (6%)¹⁶⁹.

Afin de déterminer si l'augmentation de l'expression de la cycline D1 pourrait causer une résistance au dabrafenib indépendamment du statut mutationnel de *CDK4*, Smalley et al. ont surexprimé la cycline D1 dans une lignée cellulaire sensible aux inhibiteurs de BRAF.

L'augmentation de l'expression de la cycline D1 a réduit l'effet anti-prolifératif du dabrafenib. Ils ont aussi montré que cet effet était renforcé par la co-expression de la cycline D1 et de CDK4, les cellules devenant alors très résistantes au dabrafenib. Ces données indiquaient dès 2008 que l'augmentation de l'expression d'autres composants de la machinerie du cycle cellulaire, telle que l'amplification de *CCND1*, pouvait contribuer à un phénotype de résistance sur un fond BRAFV600E muté. Comme 17% des échantillons de mélanomes mutés BRAFV600E présentent un certain degré d'amplification de *CCND1*, ce pourrait être un important mécanisme de résistance en clinique.

b. Expression d'HGF par les cellules stromales

Straussman et al. ont mis l'accent sur le microenvironnement tumoral en démontrant le rôle des facteurs de croissance sécrétés par les cellules stromales dans la résistance du mélanome au PLX4720 (analogue du vemurafenib). En effet, le facteur de croissance qui restaurait le mieux la prolifération des cellules de mélanome exposées au PLX4720 était l'HGF, dont la liaison à son récepteur MET conduisait à l'activation des voies des MAPK et de PI3K / Akt et confèrait une résistance aux inhibiteurs de BRAF.

Straussman et al. ont alors testé une double inhibition de MEK/BRAFV600E (avec le PD184352, le PLX4720 ou le vemurafenib) et de MET (avec du crizotinib, SU11274 ou un siARN spécifique de MET), ce qui a permis de lever la résistance aux médicaments et de réduire les capacités de la prolifération des lignées cellulaires de mélanome, cette capacité proliférative pouvant être restaurée par un apport d'HGF exogène¹⁷⁰.

Cette combinaison est d'autant plus intéressante que les deux thérapies ciblées utilisées, le vemurafenib et le crizotinib, sont déjà des traitements utilisés à large échelle dans le mélanome et certaines formes de cancers non à petites cellules du poumon, respectivement.

c. Sécrétion autocrine d'IL-6

Sos et al. ont publié en août 2014 un nouveau type de mécanisme de résistance primaire au vemurafenib. Dans un panel de huit lignées cellulaires de différents cancers mutés BRAF, ils ont mis en évidence 3 lignées cellulaires de cancer de la thyroïde dont la sécrétion autocrine d'interleukine-6 (IL-6), contribuait au phénotype de résistance primaire par induction des

voies de signalisation JAK/STAT3 et MAPK. L'inhibition combinée d'IL-6/MAPK permet de surmonter cette résistance primaire aux inhibiteurs de BRAF. Il s'agirait d'une plasticité de signalisation conférant aux cellules BRAFV600- une résistance primaire, par leur capacité à mimer la signalisation oncogène RAS. Sos et al. ont nommé ce phénomène « mimétisme oncogène ».

d. Anomalies de régulation de l'apoptose responsables d'une résistance à la mort cellulaire

La mort cellulaire entraînée par les inhibiteurs de MEK et de BRAF et rendant compte de leur pouvoir anti-néoplasique, s'exerce principalement via la modulation de plusieurs molécules de la cascade apoptotique^{171, 172}. Malheureusement, la surexpression ou l'activation de plusieurs molécules anti-apoptotiques est une caractéristique commune à la plupart des cellules de mélanome, conduisant à une résistance intrinsèque aux traitements inducteurs d'apoptose¹⁷³. En particulier, la résistance aux inhibiteurs de la voie des MAPK pourrait être médiée par de faibles niveaux de protéines « BH3-only » et / ou des niveaux élevés de protéines anti-apoptotiques analogues de Bcl-2.

Dans les cellules tumorales, l'apoptose est régulée par deux principales voies de signalisation: la voie intrinsèque, mitochondrie-dépendante, et la cascade extrinsèque (Figure 5). Leur stimulation conduit au clivage, et donc à l'activation, des caspases effectrices 3 et 7, pour aboutir à la mort cellulaire par apoptose.

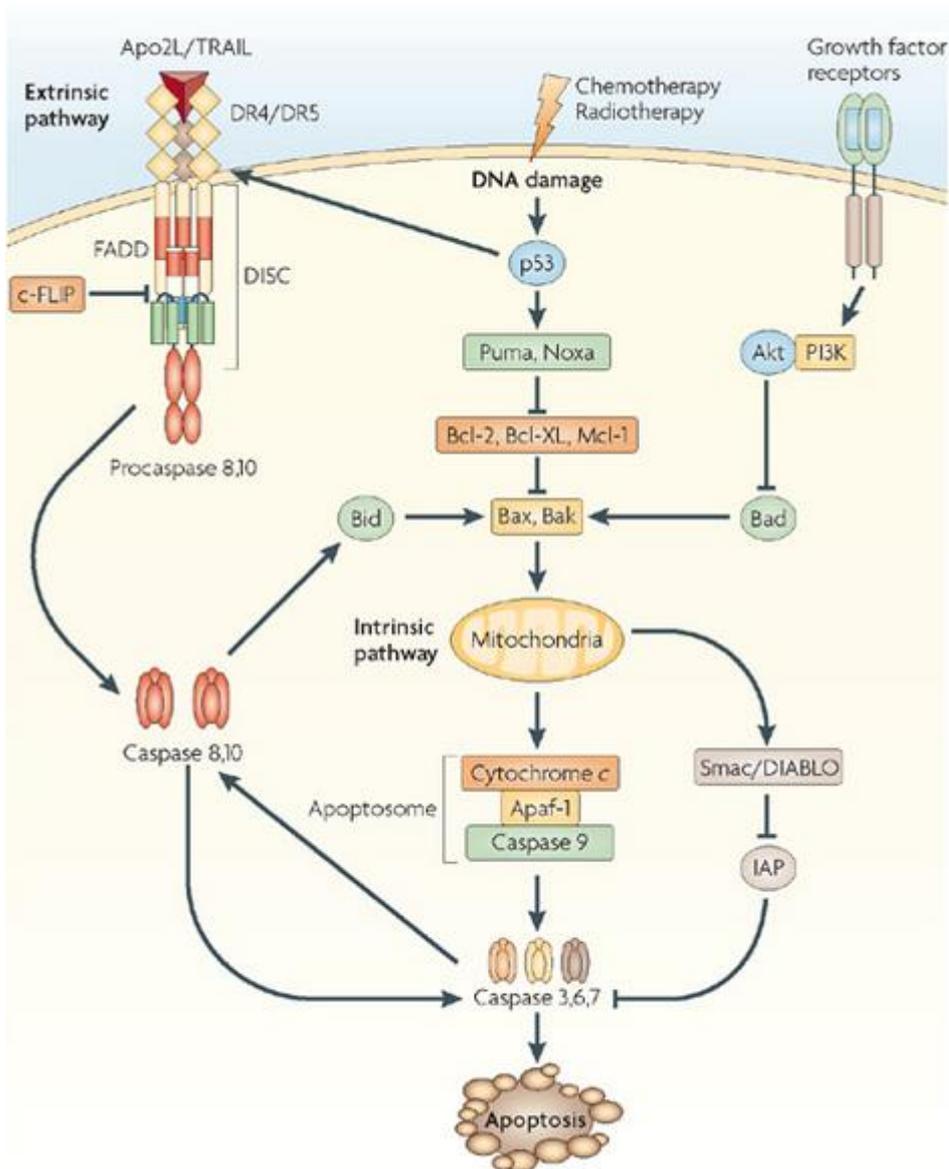


Figure 5 : Représentation des 2 grandes voies de l'apoptose : La voie intrinsèque et la voie extrinsèque.

Voie intrinsèque: le stress cellulaire active la protéine p53. Celle-ci déclenche la voie intrinsèque en augmentant Noxa et Puma, qui à leur tour activent Bax et Bak. A l'inverse, la kinase Akt, en aval de nombreux facteurs de croissance, inhibe cette voie en phosphorylant Bad. Bax et Bak perméabilisent la membrane mitochondriale externe, ce qui entraîne l'efflux du cytochrome c, qui se lie à l'adaptateur Apaf-1 pour recruter la procaspase 9 dans un complexe appelé l'apoptosome. La caspase 9 ainsi activée clive et active les caspases effectrices 3, 6 et 7 pour déclencher l'apoptose. La protéine mitochondriale Smac / DIABLO augmente l'apoptose en se liant aux protéines inhibitrices de l'apoptose (IAP) et en inversant leur action sur plusieurs caspases. **Voie**

extrinsèque: les cellules immunitaires cytotoxiques produisent des ligands pro-apoptotiques tels que Apo2L / TRAIL. Le ligand se lie à ses récepteurs DR4 pro-apoptotiques et / ou DR5 à la surface d'une cellule cible. Cette liaison permet le recrutement de la protéine FADD (Fas-associated death domain) et des procaspases 8 et 10, formant un complexe de signalisation inducteur de la mort (« DISC »). (Tiré d'Avi Ashkenazi, *Nat Rev Drug Discov*, 2008)

La voie intrinsèque de l'apoptose est induite par des événements cellulaires, tels que les dommages de l'ADN, et est médiée par la dépolarisation mitochondriale; ce qui induit la libération dans le cytoplasme du cytochrome c, qui favorise le clivage de la caspase 9, et l'activation subséquente de ses caspases effectrices, et de la protéine pro-apoptotique « Smac / DIABLO » (Second mitochondria-derived activator of caspases / Direct IAP-binding protein with low pI).

Les protéines de la famille Bcl-2 sont un groupe de molécules, liées par leur structure et leur fonction, qui jouent un rôle clé dans la régulation de l'apoptose intrinsèque. Elles contiennent toutes au moins un des 4 domaines « BH » (Bcl-2 Homology) : BH1, BH2, BH3 et/ou BH4 (Figure 6).

Elles comprennent:

a) « les protéines effectrices » (les membres pro-apoptotiques Bax et Bak), qui favorisent la formation de pores mitochondriaux, ce qui permet la libération du cytochrome c et de Smac / DIABLO;

b) les membres anti-apoptotiques (Bcl-2, Bcl-X_L, Mcl-1, Bcl-2-A1 et Bcl-w), qui bloquent l'oligomérisation de Bax et Bak, inhibant ainsi leur activité et protégeant la cellule contre l'apoptose;

c) les régulateurs pro-apoptotiques, contenant seulement le domaine BH3 (les protéines « à BH3 seul » Bim, Bik, Bad, Bid, Bmf, Puma, Noxa et Hrk). Sensibles au stress cellulaire, elles se déplacent vers les mitochondries en réponse aux signaux apoptotiques, et elles permettent la libération de protéines pro-apoptotiques en interagissant avec d'autres membres de la famille Bcl-2¹⁷⁴.

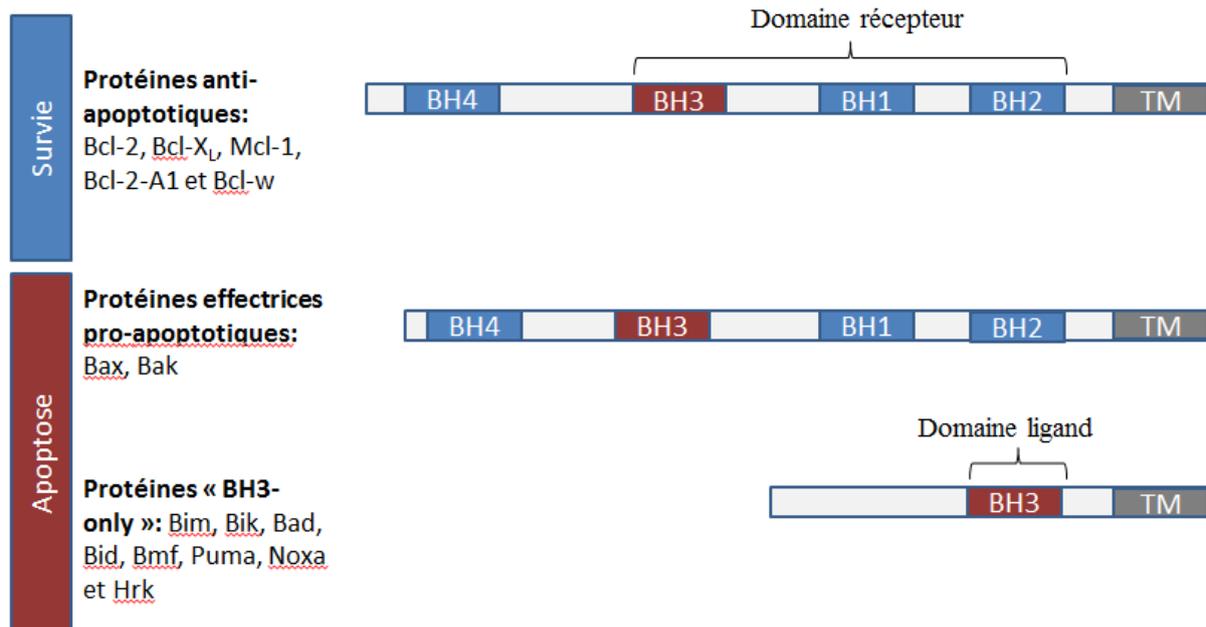


Figure 6 : Les protéines de la famille Bcl-2 se divisent en 3 groupes comprenant les protéines anti-apoptotiques, les protéines pro-apoptotiques effectrices et les protéines pro-apoptotiques « BH3-seul ». Les protéines anti-apoptotiques partagent quatre domaines « BCL-2 homologie » (BH). Leur poche hydrophobe, appelée domaine récepteur, peut se lier au domaine BH3 des protéines pro-apoptotiques. Cela favorise la survie cellulaire en empêchant l'homo-oligomérisation des protéines pro-apoptotiques effectrices. Les protéines ne présentant que le domaine BH3 sont les protéines « BH3-seul ». Ces protéines sont des capteurs de stress cellulaire et des antagonistes naturels des protéines pro-survie. TM : Domaine transmembranaire. (D'après G. Lessene et al., Nature Reviews Drug Discovery, 2008)

Pour surmonter la résistance à l'apoptose, plusieurs groupes ont évalué l'association d'ABT-737 (un BH3-mimétique qui inhibe les protéines Bcl-2, Bcl-X_L et Bcl-w, prometteur pour le traitement de la leucémie, du lymphome et du cancer du poumon à petites cellules^{175,176}) avec des inhibiteurs de MEK (U0126, PD0325901, PD98059, CI-1040) ou de BRAF (PLX4720). Ces combinaisons induisent des niveaux plus élevés d'apoptose caspase-dépendante que ceux observés avec les monothérapies anti-MEK ou anti-BRAF; cet effet étant médié par la translocation de Bmf, ou par l'augmentation de Bim, dépendantes de l'inhibition MEK ou de BRAF, et par le clivage des caspases 9, 3, et de PARP (Poly ADP ribose polymerase)^{177,178}.

L'association du PD0325901 avec ABT-737 a permis d'obtenir une régression tumorale *in vivo*. Mais, alors que la combinaison du PLX4720 avec ABT-737 a permis d'induire l'apoptose dans des lignées cellulaires de mélanome établies à partir de métastases pré-traitement, cet effet a été perdu dans des lignées cellulaires dérivées de métastases de patients ayant développé une résistance à un inhibiteur de BRAF. En outre, l'association du selumetinib avec ABT-263, un BH3-mimétique perturbant les interactions de la protéine Bcl-2 et Bcl-X_L avec des protéines pro-apoptotiques¹⁷⁹, a précipité la mort cellulaire caspase-dépendante dans la lignée cellulaire de mélanome A375¹⁸⁰.

Parce qu'aucun inhibiteur synthétique efficace de Mcl-1 n'est encore disponible, Verhaegen et al. ont utilisé une approche informatique pour générer le TW-37, le premier BH3-mimétique conçu rationnellement pour bloquer Mcl-1, Bcl-X_L et Bcl-2. Le TW-37 a fait preuve d'un effet synergique avec des inhibiteurs de MEK (U0126 ou CI-1040) pour induire l'apoptose et l'activation des caspases initiatrices et effectrices, bien que la mort cellulaire ne soit pas uniquement caspase-dépendante. Fait intéressant, cette association avait une toxicité minimale pour les cellules normales de la peau. Le traitement combiné augmentait la libération du cytochrome c et de Smac / DIABLO par rapport aux monothérapies, et a permis d'induire l'activation de Bax / Bak, la production de ROS et l'activation de p53. Le CI-1040, associé au TW-37, a également bloqué la croissance des tumeurs xénotransplantées chez les souris¹⁸¹.

Il a été montré récemment que Bcl2-A1 est fortement exprimé dans les lignées cellulaires de mélanome et peut conférer une résistance aux inhibiteurs de BRAF, car son inactivation augmente la sensibilité au PLX4720¹⁸². ABT-737 n'ayant aucun effet sur Bcl2-A1, le PLX4720 a été associée à obatocax, un inhibiteur des membres de la famille anti-apoptotique Bcl-2, dont Bcl2-A1. Cette combinaison a eu un effet synergique et a induit l'apoptose dans une lignée cellulaire Bcl2-A1 amplifiée, et une diminution du volume des tumeurs dérivées de cette lignée, xénotransplantées chez les souris, sans toxicité significative¹⁶⁸.

En 2012, Tassi et al. ont montré qu'Apollon, une autre protéine anti-apoptotique, était exprimé dans des cellules de mélanome, et que la mort cellulaire en réponse au PLX4720 ou au PD0325901 était corrélée avec la régulation négative d'Apollon¹⁸³. Le « silencing » d'Apollon par siARN a augmenté l'apoptose en réponse aux médicaments mentionnés ci-

dessus, indépendamment du statut de p53. En fait, le siARN Apollon a induit la diminution de l'expression de Bcl-x, l'augmentation de celle de Bax et de Bad, la dépolarisation mitochondriale et l'activation des caspases 8, 9, 2 et 3¹⁸⁴.

En résumé, les études présentées ci-dessus confirment le rôle crucial des protéines de l'apoptose dans le contrôle de la sensibilité du mélanome aux inhibiteurs de la voie des MAPK et leur rôle important dans les phénomènes de résistance primaires. Ainsi, l'association des inhibiteurs de BRAF ou de MEK, à des composés ciblant spécifiquement les protéines liées à l'apoptose, est-elle une option thérapeutique anti-tumorale très prometteuse.

2. La résistance acquise

Plus d'attention, cependant, a été apportée à la compréhension des mécanismes à l'origine des résistances acquises aux inhibiteurs de BRAF. La comparaison de biopsies tumorales provenant de patients en progression, avec les échantillons pré-traitement correspondants, montre toujours une conservation de la mutation de *BRAF* avec dans la majorité des cas, une réactivation de la voie des MAPK. Cette réactivation peut soit être associée à une augmentation de la dimérisation des protéines RAF, soit être indépendante de cette dimérisation (Figure 7). En l'absence de réactivation de la voie des MAPK, des activations de la voie PI3K / Akt / mTor ou d'autres voies de signalisation ont aussi été décrites.

- a. Résistance acquise par réactivation de ERK, dépendante de l'augmentation de la dimérisation des protéines RAF

Les altérations moléculaires favorisant la dimérisation des protéines RAF induisent une résistance aux inhibiteurs de BRAF. Ces altérations peuvent être secondaires à une activation de RAS, ou peuvent favoriser la dimérisation de RAF indépendamment de RAS. À l'appui de ce modèle, plusieurs groupes ont montré que l'activation en amont de RAF (mutation activatrice de RAS, activation d'un RTK ou perte de NF1) est associée à une résistance vis-à-vis des inhibiteurs de BRAF^{185,186}. En effet, l'acquisition d'une mutation activatrice de NRAS

a été un des premiers mécanismes de résistance acquise aux inhibiteurs de BRAF identifiés dans des lignées cellulaires et les prélèvements cliniques. De même, la perte d'expression de NF1, un régulateur négatif de l'activité de RAS, mime la résistance aux inhibiteurs de BRAF induite par les mutations de RAS dans les lignées cellulaires génétiquement modifiées et les modèles murins de mélanome BRAF-muté¹⁸⁷.

Toutefois, aucune mutation du site de liaison de la drogue à la protéine BRAF (un type de mécanisme de résistance acquise commun pour d'autres thérapies ciblées comme les inhibiteurs de KIT ou d'EGFR^{188,189}) n'a été décrite. Une modification de structure empêchant le vemurafenib d'inhiber puissamment la voie des MAPK a, cependant, été identifiée. Plus précisément, l'expression de variants d'épissage alternatif de BRAF, dépourvus du domaine de liaison à RAS mais conservant leur domaine kinase (par exemple, p61-BRAFV600E ou p61) a été mise en évidence à la fois dans des lignées cellulaires devenues résistantes *in vitro* et dans des tissus tumoraux dérivés de patients ayant développé une résistance au vemurafenib. Ces variants d'épissage du gène BRAF se dimérisent indépendamment de RAS, alors que seuls les monomères BRAFV600E sont sensibles à l'inhibition. Ce modèle de résistance aux inhibiteurs de BRAF est notamment corroboré par le fait que l'introduction d'une mutation empêchant la dimérisation de RAF (mutation R509H) restaure la sensibilité au vemurafenib¹⁹⁰.

Bien que de tels variants d'épissage du gène BRAF n'aient pas été détectés dans les tumeurs de patients naïfs de traitement par vemurafenib, il est possible qu'ils puissent être exprimés dans une petite sous-population de cellules au sein de la tumeur avant le traitement et que l'exposition aux inhibiteurs de BRAF exerce une pression de sélection favorisant tel ou tel variant d'épissage de BRAF au sein de la population tumorale.

La résistance aux inhibiteurs de BRAF peut également résulter de l'expression accrue de BRAF (par amplification du gène BRAF)¹⁹¹ ou de CRAF^{192,193}.

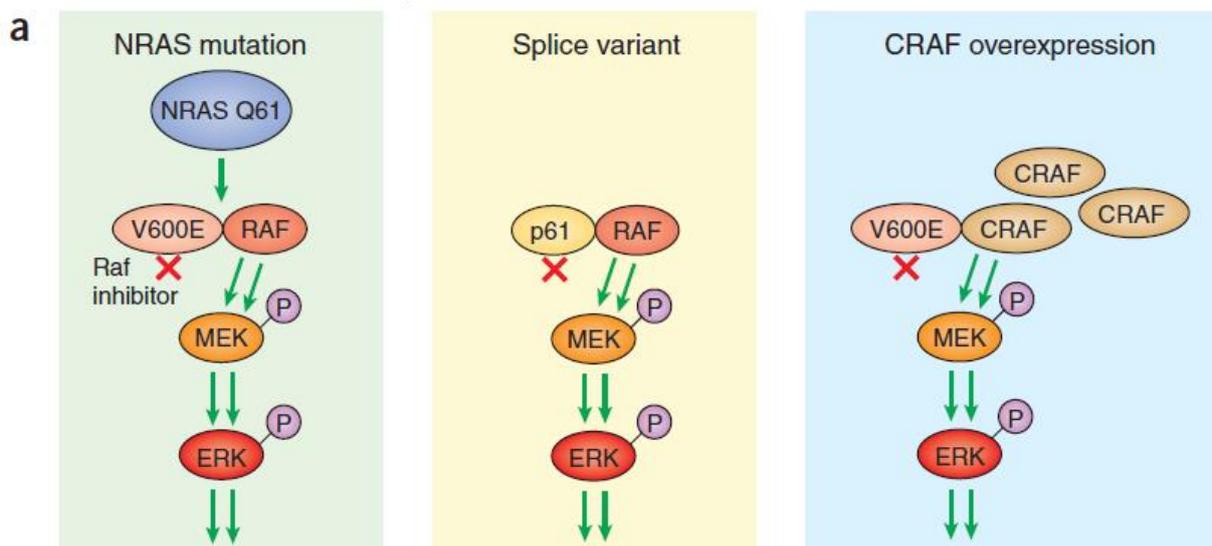
Dans ce contexte, la résistance aux inhibiteurs de BRAF est aussi médiée par une augmentation de dimérisation RAF¹⁹⁴ (Figure 7a).

Enfin, bien que les études de mutagenèse aléatoire aient montré que des mutations dans la boucle P ou dans le site de liaison 14-3-3 de la protéine CRAF puissent conférer une résistance aux inhibiteurs de BRAF, ce type de mutations n'a jamais été mis en évidence dans des prélèvements de patients¹⁹⁵.

- b. Résistance acquise par réactivation de ERK, indépendante de la dimérisation des protéines RAF

Le premier exemple de mécanisme de réactivation de la voie des MAPK, indépendant de RAF, a été identifié par une approche de génomique fonctionnelle. L'expression de la MAPK kinase kinase COT (codée par le gène *MAP3K8* et capable d'activer les protéines MEK) a ainsi été identifiée comme mécanisme de résistance aux inhibiteurs de BRAF¹⁴⁴. Des mutations en aval, dans *MAP2K1*, qui code pour MEK1, ont aussi été rapportées comme responsables de résistance aux inhibiteurs de BRAF (Figure 7b). Plus précisément, les mutants de MEK1 P124L et Q56P se sont révélés pourvoyeurs de résistance au vemurafenib *in vitro* et, à l'aide d'un séquençage de nouvelle génération sur des tumeurs de mélanome de patients avant traitement et après progression de la maladie, l'acquisition d'une mutation MEK1 C121S a été identifiée à l'origine d'une résistance secondaire au vemurafenib¹⁹⁶.

Cependant, les mélanomes dans lesquels coexistent les mutations de BRAFV600E et de MEK1 P124S ou I111S restent sensibles aux inhibiteurs de BRAF, ce qui suggère que toutes les mutations de MEK1 n'atténuent pas la dépendance des cellules tumorales à l'égard de BRAF¹⁹⁷.



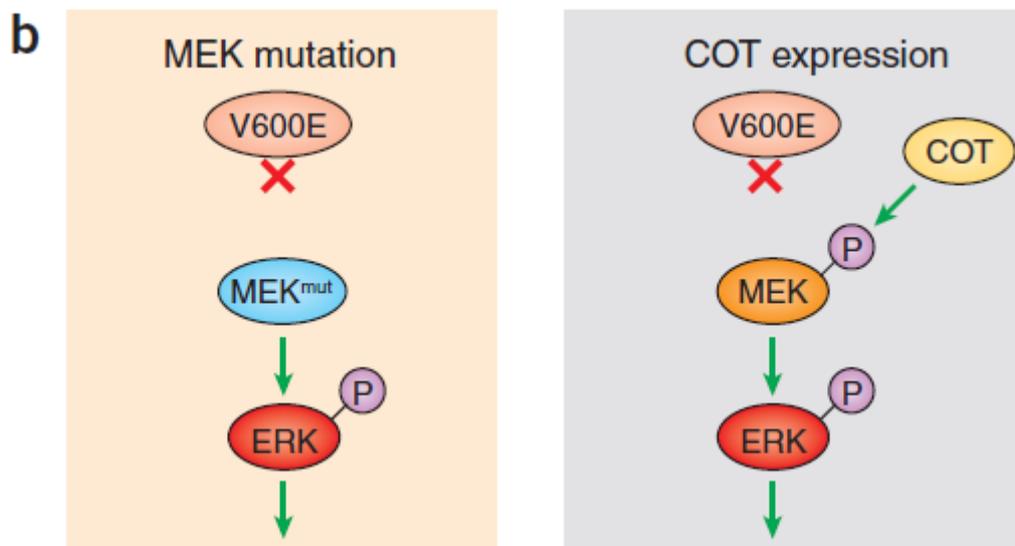


Figure 7 : Mécanismes de résistance aux inhibiteurs de BRAF entraînant une réactivation de la signalisation ERK en dépit de la présence du médicament.

(a) Mécanismes de résistance favorisant la dimérisation de RAF : mutation activatrice de NRAS Q61-, expression de variants d'épissage de BRAF (P61), surexpression de CRAF, perte de NF1 et activation d'un RTK (deux derniers mécanismes non représentés). (b) Mécanismes de résistance indépendants de la dimérisation de RAF : Mutations de MEK en aval ou activation de COT en parallèle. (Tiré de Lito et al., Nature Medicine, 2013)

c. Résistance acquise par activation d'une autre voie que celle des MAPK

Ce type de mécanisme de résistance résulte de la perte de dépendance des cellules tumorales vis-à-vis de la signalisation ERK. Dans ce cas, la résistance se produit malgré une inhibition efficace de la voie des MAPK. Les études précliniques sur des lignées cellulaires de cancers humains montrent que l'activation de la voie PI3K / Akt, résultant de la délétion ou de l'inactivation de PTEN, et l'inactivation de RB1 peuvent abroger ou réduire la dépendance vis-à-vis de BRAF ou de MEK¹⁹⁸.

L'activation de divers RTK est aussi un des mécanismes de résistance aux inhibiteurs BRAF dans le mélanome^{199,200}. Ce peut être la conséquence de l'expression accrue de récepteurs de

facteurs de croissance tels que IGFR1 (récepteur du facteur de croissance insuline de type 1)²⁰¹ et PDGFR beta (récepteur du facteur de croissance dérivé des plaquettes de type beta)¹⁸⁵.

Afin d'étudier ce type de résistance, Wilson et al.²⁰² ont évalué l'effet des ligands de différents RTK sur la sensibilité de différentes lignées cellulaires cancéreuses vis-à-vis du traitement par des inhibiteurs de la voie RTK-RAF-MEK-ERK. L'exposition à tel ou tel ligand a abouti à la réactivation de ERK et / ou l'activation de Akt, alors que la co-inhibition du RTK correspondant a permis de restaurer la sensibilité les cellules aux inhibiteurs RAF.

Plusieurs groupes ont alors évalué l'intérêt de l'inhibition combinée de RAF et de la voie PI3K / Akt / mTOR dans l'amélioration de la réponse anti-tumorale. Des résultats encourageants ont été obtenus avec réduction de la prolifération et de la viabilité des cellules tumorales *in vitro*, et aussi avec altération de la croissance du mélanome *in vivo*, en combinant le vemurafenib avec AZD8055 ou BEZ235²⁰³. Une apoptose plus marquée, par modulation de ses principaux médiateurs (clivage de PARP, activation des caspase 3 et 7, augmentation de Bim et baisse de Bcl-2 et Mcl-1), et par réduction des formes phosphorylées de Akt, S6, MEK et ERK, ont été induites par d'autres combinaisons telles que l'association du dabrafenib et de GSK2126458²⁰⁴; du PLX4720 avec la rapamycine et l'inhibiteur de PI3K PX-866²⁰⁵; du PLX4720 avec le LY294002²⁰⁶; et du vemurafenib avec le MK-2206^{207,208}.

Un effet similaire a été démontré par Boisvert-Adamo et Aplin: cette équipe a contourné la résistance conférée par l'activation de la voie des MAPK en aval et de la voie PI3K / Akt, et a observé une plus forte apoptose, en associant le LY294002 à l'inhibition de BRAF²⁰⁹.

Enfin, un traitement triple par dabrafenib, trametinib et GSK2126458 a permis de réduire la croissance tumorale de façon significative par rapport aux monothérapies et à l'association du dabrafenib et trametinib²¹⁰.

Comme le montrent les données ci-dessus, l'amélioration de l'efficacité anti-cancéreuse obtenue par inhibition combinée de la voie des MAPK et de la voie PI3K / Akt, par rapport aux monothérapies, est encourageante pour la thérapie; c'est pourquoi plusieurs essais cliniques combinant des traitements ciblant ces deux cascades de signalisation sont en cours.

d. Prévalence des différents mécanismes de résistance et hétérogénéité tumorale géographique et temporelle

Fin 2013, Shi et al. ont publié leur étude sur 100 tumeurs provenant de 44 patients ayant développé une résistance acquise à un inhibiteur de BRAF²¹¹. Ils ont montré que la proportion de mélanomes ayant acquis des altérations moléculaires réactivant la voie des MAPK était supérieure (52%) à celles activant la voie PI3K / Akt / mTor (4%). Les 2 voies étaient simultanément activées dans 18% des cas. Au même moment, Van Allen et al. ont publié les résultats de leur séquençage « exome entier » sur une cohorte de 45 patients résistants²¹² : ils ont mis en évidence 31% d'altérations moléculaires réactivant la voie des MAPK, 11% d'altérations activant la voie PI3K / Akt / mTor, et 26% d'altérations activant les 2 voies à la fois. Dans ces 2 études, l'hétérogénéité tumorale était importante, avec la mise en évidence de sous-clones d'échappement aux inhibiteurs de BRAF, géographiquement et temporellement distincts pour un même patient et une même origine tumorale.

Ainsi, chaque mécanisme de résistance décrit ci-dessus pourrait théoriquement être à l'origine d'une résistance innée ou acquise aux inhibiteurs de BRAF, selon qu'il préexiste en début de traitement, dans une minorité ou une majorité de cellules tumorales, ou bien s'il apparaît *de novo* au cours du traitement.

D. Les effets secondaires paradoxaux induits par les inhibiteurs de BRAF

1. Données *in vitro*

Les inhibiteurs de BRAF bloquent la prolifération des cellules BRAFV600- *in vitro* et *in vivo* mais sont étonnamment inefficaces contre les cellules porteuses d'une mutation de RAS, et ne bloquent pas l'activation de ERK dans ces cellules^{213, 214, 215}. Paradoxalement, plusieurs inhibiteurs de BRAF ATP-compétitifs, bien que structurellement différents, peuvent provoquer, au contraire, l'activation de la voie des MAPK.

Cette activation paradoxale de la voie par un inhibiteur de BRAF a été documentée il y a longtemps²¹⁶ et avait alors été présentée comme la conséquence de l'inactivation des boucles de rétroaction négative. Les trois publications sus-citées, de Hatzivassiliou et al., Heidorn et al., et Poulidakos et al., plus récentes (2010), offrent maintenant de nouvelles explications mécanistiques du paradoxe des inhibiteurs de BRAF, basées sur l'homo et l'hétérodimérisation de BRAF et de CRAF, et la reconnaissance de leur rôle dans l'activation de la voie des MAPK²¹⁷. Ce phénomène a été élégamment résumé dans la revue de Gibney et al. parue en 2013 dans Nature Reviews Clinical Oncology.

Les études de cristallographie de BRAF montrent une dimérisation asymétrique^{218,219} (Figure 8), et les mutations qui stabilisent ce dimère asymétrique stimulent la croissance alors que les mutations qui la déstabilisent sont anti-oncogènes (Hatzivassiliou et al.; Heidorn et al.; Rajakulendran et al.). Ainsi, des altérations de la dimérisation des protéines RAF peuvent influencer la signalisation de la voie des MAPK (Figure 8). Les études ont montré que l'activation paradoxale de cette voie par les inhibiteurs de BRAF requérait la liaison de RAS activé à RAF. Les mutations perturbant la liaison RAS/RAF (Heidorn et al.) ou l'expression dominante négative de RAS (Hatzivassiliou et al.) empêchent cette activation paradoxale. Cependant, un mutant CRAF tronqué dans sa portion N-terminale, dont l'activation est indépendante de RAS, était hypersensible à l'activation de ERK médiée par les inhibiteurs de BRAF (Poulidakos et al.). Cela suggère que le paradoxe des inhibiteurs de BRAF n'est possible que dans un "état amorcé" ou pathologique. Cet effet paradoxal explique pourquoi les inhibiteurs de BRAF sont relativement bien tolérés et pourquoi il est déconseillé de les utiliser dans un contexte de tumeurs porteuses d'une mutation activatrice de RAS.

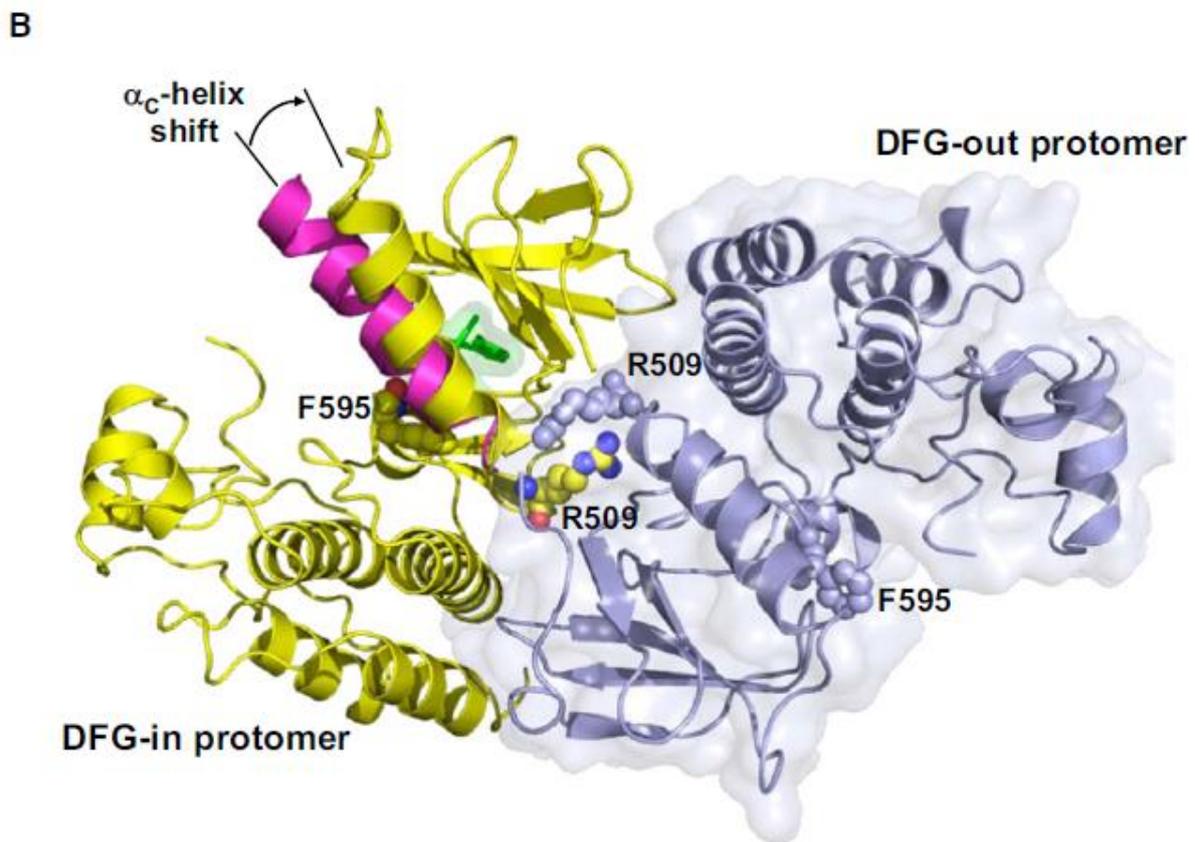
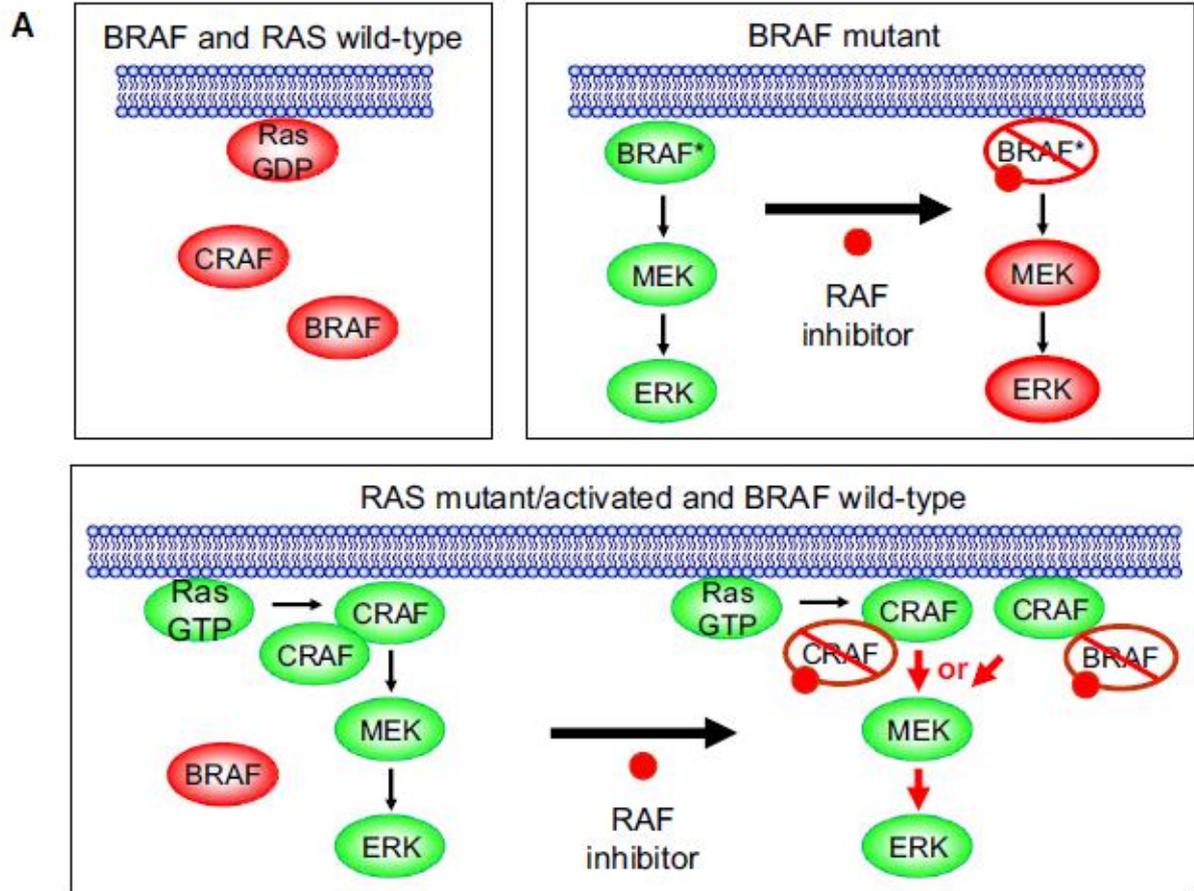


Figure 8 : Conséquences du traitement inhibiteur de BRAF selon le contexte cellulaire

(a) Dans les tumeurs BRAF sauvage où RAS est inactif (figure en haut à gauche), la croissance des cellules tumorales ne dépend pas de RAF-MEK-ERK, et est, par conséquent, insensible aux inhibiteurs de BRAF. Dans les cellules BRAFV600- (figure en haut à droite), les inhibiteurs de BRAF, inhibent puissamment la voie des MAPK. Sans RAS, aucune transactivation de CRAF ne se produit. Dans des cellules tumorales non traitées, où RAS est muté ou activé, RAS recrute CRAF, mais pas BRAF, à la membrane cellulaire, ce qui conduit à l'activation de la voie des MAPK (figure en bas). Ce modèle explique pourquoi une mutation de RAS ou son activation en amont peuvent être un mécanisme de résistance aux inhibiteurs de BRAF dans les cellules tumorales mutées BRAF. Sous traitement par un inhibiteur de RAF où CRAF ne serait que partiellement inactivé, l'activation de MEK par CRAF est facilitée par son recrutement membranaire RAS-GTP-dépendent et/ou la formation d'homo- ou d'hétérodimères de CRAF. Un traitement par inhibiteur de RAF bloquant entièrement toutes les fonctions de RAF éviterait cette transactivation, et résulterait en une inhibition efficace de ERK.

(b) Une interaction moléculaire critique requise pour la transactivation paradoxale de CRAF est la structure en dimères de RAF. La structure tridimensionnelle asymétrique du dimère BRAF est représentée ici (générée par G. Bollag et C. Zhang en utilisant les données publiées par Tsai et al., 2008). Un protomère (jaune) est en conformation DFG-in et l'autre (bleu) est en conformation DFG-out. Le contour de la surface du protomère DFG-out est représenté légèrement ombragé, pour mieux visualiser l'interface dimère. Les mutations R509 de chaque protomère sont indiquées pour situer son importance dans l'ancrage du dimère. Les mutations F595 du motif DFG sont aussi représentées pour montrer leurs différences significatives au sein de la conformation des protomères. (Tiré d'Adrienne Cox et al., Cancer Cell, 2010)

Bien que les trois études aient montré que les inhibiteurs de BRAF pouvaient activer la voie RAF-MEK-ERK dans le cadre de mutations oncogènes de RAS et que l'activation de CRAF était nécessaire, les mécanismes proposés sont différents. Heidorn et al. ont suggéré que l'inactivation sélective de BRAF était capitale, en se basant sur le fait que de faibles doses d'inhibiteurs sélectifs de BRAF (PLX4720 et 885-A) augmentent l'activation de ERK en présence d'une mutation activatrice de NRAS, tandis que cela n'était observé avec l'inhibiteur pan-RAF sorafénib qu'en cas de liaison à CRAF rendue impossible par introduction dans CRAF de la mutation T421N.

En revanche, Hatzivassiliou et al. et Poulidakos et al. ont proposé que la liaison à BRAF n'est pas forcément nécessaire. En effet, leurs expériences de « knockdown » ont montré que l'activation paradoxale de MEK nécessitait CRAF, tandis que le « knockdown » de BRAF ne diminuait pas l'activation paradoxale de la voie des MAPK.

Poulidakos et al. ont aussi montré une corrélation inverse entre l'activation de ERK et la dose de six inhibiteurs de RAF chimiquement distincts, dont le sorafenib. Ils ont suggéré que des doses plus élevées sont nécessaires pour arrêter la signalisation médiée par CRAF, alors que de plus faibles doses peuvent induire l'activation de ERK par défaut de blocage de CRAF, indépendamment de la spécificité d'isoforme RAF. D'autres études seront nécessaires pour comprendre ces divergences.

Les comparaisons entre ces études sont difficiles compte tenu de leur hétérogénéité en termes de composés, doses, et cellules employées. Des résultats contradictoires ont été décrits concernant le rôle des inhibiteurs à petite dose, la localisation membranaire de RAF, la stabilisation/déstabilisation des hétérodimères RAF, le rôle inducteur de RAS, et l'interaction entre RAS et RAF. Il est possible que plusieurs mécanismes différents mènent au même résultat. Ainsi, le PLX4720 (analogue du vemurafenib) a une façon distincte d'interagir avec l'hétérodimère BRAF-CRAF pour aboutir à la translocation de RAF par rapport au 885-A ou au GDC-0879, alors que tous ces inhibiteurs activent MEK de façon paradoxale.

Il reste à comprendre comment les inhibiteurs ATP-compétitifs peuvent se lier à la poche de liaison catalytique à la place de l'ATP et encore activer l'activité kinase de RAF. Poulidakos et al. ont élégamment abordé cette question en utilisant un mutant de CRAF, dépourvu d'activité kinase, qualifié « kinase-dead ». Ils ont montré que les inhibiteurs liés à CRAF « kinase-dead » pouvaient transactiver son partenaire de dimérisation, un CRAF « kinase-compétent » ne pouvant se lier à un inhibiteur de RAF. Peut-être que dans des cellules normales, dans un environnement riche en énergie, propice à la prolifération, de forts taux de RAS-GTP coopèrent pour lier l'ATP à RAF. Dans les cellules cancéreuses, ce processus pourrait procurer un avantage prolifératif.

Ces résultats sont importants dans la conception de la prochaine génération d'inhibiteurs de RAF. Indépendamment du mécanisme, les trois études suggèrent que le blocage de CRAF est important pour éviter d'activer la signalisation ERK dans les cellules RAS mutantes. Un

inhibiteur qui n'induirait pas de dimérisation ou de transactivation de RAF, ou qui inhiberait simultanément les deux partenaires de dimérisation, devrait pouvoir empêcher l'activation paradoxale. L'administration concomitante d'inhibiteurs de BRAF et de MEK peut empêcher, au moins en partie, l'activation de la voie.

2. Données cliniques

Les inhibiteurs de BRAF tels que le vemurafenib et le dabrafenib entraînent une toxicité cutanée chez la plupart des patients traités. Cette toxicité cutanée se traduit par des éruptions maculo-papuleuses, des hyperkératoses palmoplantaires, des panniculites plus rarement, mais surtout par l'apparition de multiples tumeurs kératinocytaires. Ces tumeurs peuvent être bénignes, à type de papillomes verruciformes, de malignité intermédiaire comme des kératoacanthomes, voire malignes, correspondant à d'authentiques carcinomes épidermoïdes. Des tumeurs mélanocytaires ont aussi été décrites : naevus mélanocytaires atypiques et mélanomes. Ces proliférations cellulaires sont liées à l'effet paradoxal qu'ont les inhibiteurs de BRAF dans un contexte BRAF sauvage, décrit dans le paragraphe ID. Au cours de ma thèse, j'ai ainsi publié deux articles parus en 2013, l'un dans *Annals of Oncology*²²⁰, et l'autre dans *JAMA Dermatology*²²¹ (en annexe), décrivant les spécificités cliniques des effets secondaires cutanés des inhibiteurs de BRAF. Les différents types d'effets secondaires, leur fréquence et leur prise en charge y sont développés.

Il est important de souligner à quel point certains effets secondaires des inhibiteurs de BRAF rappellent les symptômes, notamment cutanés, des rasopathies décrites au paragraphe I-A-4. Les cheveux clairsemés, fins, bouclés, les cils et sourcils clairsemés, l'hyperkératose palmo-plantaire, la kératose pilaire, la xérose, et l'efflorescence naevique que présentent les patients traités font partie des symptômes évocateurs de syndrome cardio-facio-cutané (CFC). Quant aux papillomes verruqueux, que développent presque tous les patients sous inhibiteurs de BRAF, ils sont très évocateurs du syndrome de Costello (CS).

Nous sommes là face à un nouveau type de iatrogénie: les thérapies ciblées deviennent si spécifiques d'une protéine donnée qu'elles peuvent causer chez les patients traités des effets secondaires rappelant les symptômes de maladies génétiques très précises.

E. Objectifs de cette thèse

La découverte de l'implication de l'oncogène BRAF et des inhibiteurs de BRAF représente donc une avancée scientifique, médicale et thérapeutique extraordinaire, mais comme nous l'avons expliqué dans l'introduction de cette thèse, le bénéfice thérapeutique de ces médicaments révolutionnaires se heurte à deux obstacles majeurs, à savoir **l'émergence de mécanismes de résistance**, et **l'induction de tumeurs secondaires paradoxales**.

Cette thèse a pour objectif d'étudier ces deux principaux obstacles et d'essayer de proposer des solutions susceptibles de les franchir.

En ce qui concerne le problème des résistances, nous avons exploré l'implication éventuelle de l'initiation de la traduction cap-dépendante dans divers contextes de résistance, acquise ou innée, *in vitro* et *in vivo*, aux inhibiteurs de BRAF. Cette étude, développée dans le chapitre II, a effectivement démontré une implication forte du complexe d'initiation de la traduction cap-dépendante dans différents mécanismes de résistances, et ouvre, selon nous, de nouvelles perspectives thérapeutiques.

Pour aborder le problème des tumeurs paradoxales, nous sommes partis des observations cliniques de patients ayant développé des tumeurs secondaires sous inhibiteurs de BRAF. Après une analyse histologique et moléculaire de ces tumeurs, l'effet de ces inhibiteurs sur les cellules non mutées BRAF, aussi bien *in vitro* qu'*in vivo*, est étudié en détail et traité dans le chapitre III, avec un accent sur la formation de dimères BRAF-CRAF dans ce contexte. Au terme de ce travail, nous pouvons identifier des sous-populations de patients à risque accru de développer des tumeurs secondaires sous traitement par inhibiteurs de BRAF.

Enfin, les perspectives thérapeutiques qu'offrent ces travaux sont développées dans le chapitre IV.

II. Résultats 1 : eIF4F comme nouvelle cible thérapeutique située à la convergence de multiples mécanismes de résistance

A. L'initiation de la traduction cap-dépendante comme cible thérapeutique dans le cancer

1. Rappel sur la traduction des ARNm

Le terme **traduction** désigne l'ensemble des mécanismes qui transforment l'information portée par la séquence d'un ARNm (Acide ribonucléique messenger) en une chaîne polypeptidique. Ainsi, le flux d'information va passer de la forme acide nucléique à la forme protéine selon un code "universel". Le code génétique permet d'attribuer une signification (acide aminé ou arrêt de traduction) à chaque triplet de nucléotides (ou codon) de l'ARNm.

Chez les procaryotes, la transcription et la traduction sont couplées : les ARNm sont traduits en polypeptides au fur et à mesure de leur synthèse. Par contre, chez les eucaryotes, l'ARNm, transcrit et mûri dans le noyau, puis est transféré dans le cytoplasme avant d'être traduit.

Tous les ARNm des eucaryotes sont dotés dans le noyau d'une "coiffe" (ou « cap », en anglais) à leur extrémité 5' (Figure 9). Cette coiffe se compose d'une guanosine méthylée en position N7, reliée au premier nucléotide transcrit par une liaison 5'-5' triphosphate, c'est pourquoi elle est qualifiée de coiffe 7mGTP (7-méthyl guanosine triphosphate). Cette coiffe permet à la fois de stabiliser les ARNm (par protection vis-à-vis d'exonucléases), de les faire exporter du noyau vers le cytoplasme par le « complexe de fixation de la coiffe « CBP », et de les présenter aux protéines initiatrices de la traduction.

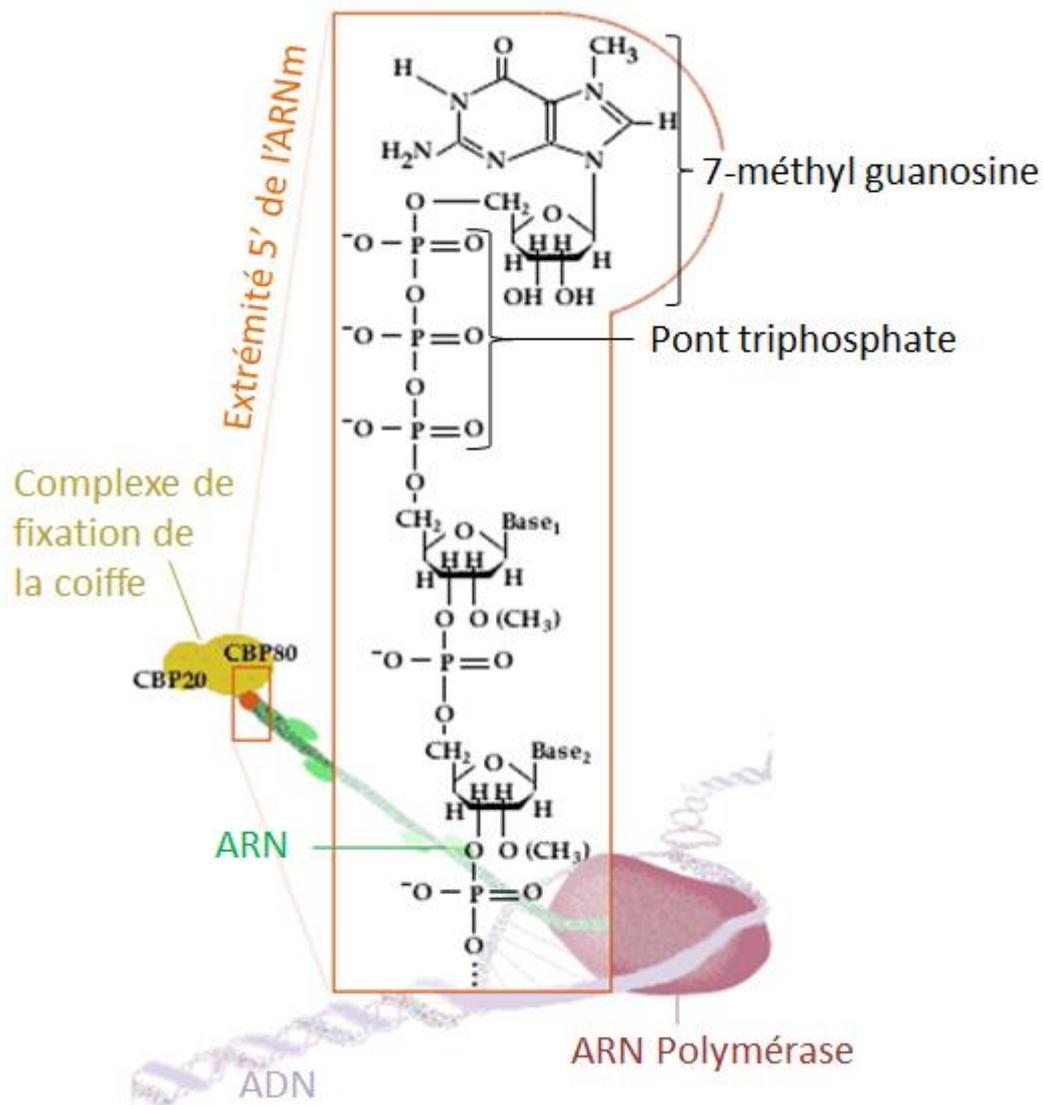


Figure 9 : Représentation de la structure chimique de la coiffe 7-méthyl guanosine triphosphate (7mGTP) des ARNm. Sur cette illustration, sont représentés l'ADN en cours de transcription dans le noyau, par l'ARN polymérase, ainsi que l'ARNm transcrit. L'extrémité 5' de cet ARNm, ici agrandie dans le rectangle orange, est reconnue par le complexe de fixation de la coiffe (CBP) grâce à sa coiffe 7mGTP. La 7-méthyl guanosine est reliée à l'ARN par un pont triphosphate. La méthylation en N7 de la guanosine confère une charge positive à la coiffe. (D'après le site officiel du prix Nobel www.nobelprize.org)

La traduction des ARNm se déroule dans le cytoplasme, au sein des ribosomes, complexes ribonucléiques, qui servent de support à l'assemblage ordonné des acides aminés du

polypeptide codé par chaque ARNm. Cette traduction se déroule en trois étapes qui sont **l'initiation, l'élongation, et la terminaison**. Chaque étape requiert des facteurs de traduction (facteurs d'initiation eIF, facteurs d'élongation eEF, et facteurs de terminaison eRF) qui sont associés de manière transitoire aux ribosomes.

L'étape limitante de la traduction est son initiation. Il existe deux modes d'initiation de la traduction des ARNm : l'initiation de la traduction **cap-dépendante** (ou « dépendante de la coiffe »), qui concerne la majorité des ARNm, et l'initiation de la traduction **cap-indépendante**.

Pour initier la traduction cap-dépendante, le complexe de pré-initiation 43S (S correspondant à l'unité de sédimentation le Svedberg) doit être recruté au niveau de la coiffe de l'ARNm, puis balaie la région 5'UTR (5'UnTranslated Region, c'est-à-dire la portion de l'ARNm placée en amont du codon d'initiation) jusqu'à la reconnaissance du codon d'initiation.

Pour initier la traduction cap-indépendante, le complexe de pré-initiation 43S peut être recruté au niveau de séquences particulières appelées IRES (Internal Ribosomal Entry Site), dans la région 5' de l'ARNm.

Ces modes d'initiation distincts donnent lieu à une régulation post-transcriptionnelle fine des protéines réellement traduites en protéines.

Dans la cellule cancéreuse, la dérégulation de l'initiation de la traduction favorise la synthèse de protéines oncogènes.

2. Définition de l'initiation de la traduction cap-dépendante

Lors de l'initiation de la traduction cap-dépendante, la protéine eIF4E (eukaryotic Initiation Factor 4E) se lie à la coiffe m⁷GTP des ARNm et régule la synthèse protéique en fonction de ses partenaires 4E-BP1 (4E-Binding Protein) et eIF4G (eukaryotic Initiation Factor 4G)^{222,223}. Quand eIF4E est assemblé à la protéine d'échafaudage eIF4G et à l'hélicase eIF4A (eukaryotic Initiation Factor 4A), il forme le complexe « eIF4F » (eukaryotic Initiation Factor 4F), situé à la convergence de la voie des MAPK et de la voie PI3K / Akt / mTor via 4E-

BP1²²⁴. A l'extrémité 3'UTR (3'UnTranslated Region) de l'ARNm, des protéines de liaison poly-A (PABP) se lient à eIF4G, ce qui permet la circularisation et l'activation de l'ARNm (Figure 10).

Le complexe de pré-initiation 43S, composé de la sous-unité ribosomale 40S, du complexe ternaire eIF2 (eIF2, GTP, et Met-ARNt), eIF3, eIF1, eIF1A, et eIF5 rejoint la structure de l'ARN activé (via l'interaction eIF4G et eIF3) et la lecture du 5'UTR jusqu'à la reconnaissance du codon d'initiation AUG se produit, suivie par l'hydrolyse du GTP lié à eIF2 et la libération du GDP lié à eIF2, et de eIF5, eIF3, et eIF1.

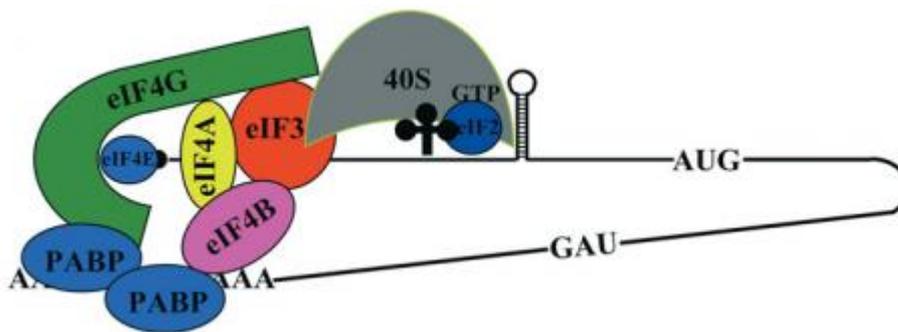


Figure 10 : Recrutement du complexe de pré-initiation 43S au niveau de la coiffe des ARNm.

Le complexe de pré-initiation 43S est recruté au niveau de la coiffe à l'extrémité 5' des ARNm par son interaction avec le complexe eIF4F. La circularisation de l'ARNm est engendrée par la liaison entre eIF4G et PABP (Poly-A Binding Protein) qui est liée à la queue poly A, située à l'extrémité 3' des ARNm. (Tiré de Spriggs et al., Biol Cell, 2008)

L'association ultérieure de la sous-unité ribosomique 60S avec eIF5B lié au GTP conduit à l'hydrolyse du GTP médiée par eIF5B et la libération du GDP lié à eIF5B, et de eIF1, permettant ainsi l'assemblage du complexe 80S, qui est alors prêt pour l'élongation de la traduction.

3. L'initiation de la traduction cap-dépendante dans le cancer

Dans les conditions physiologiques normales, 4E-BP1 régule négativement l'initiation de la traduction en séquestrant eIF4E, qui ne peut pas se lier à son partenaire eIF4G. Dans de nombreux cancers, 4E-BP1 est phosphorylé par l'activation de la voie PI3K / Akt / mTor. La phosphorylation de 4E-BP1 diminue l'affinité de 4E-BP1 pour eIF4E et permet à eIF4E de se lier à eIF4G pour former le complexe eIF4F initiateur de la traduction cap-dépendante^{225,226}.

La formation du complexe eIF4F dépend de la quantité d'eIF4E disponible.

La distinction entre ARNm "forts" et ARNm « faibles » est importante pour comprendre comment s'opère la traduction préférentielle de tel ou tel type d'ARNm. Les ARNm qualifiés de « forts », en raison d'une structure secondaire en 5'UTR relativement simple, sont traduits aisément, alors que les ARNm qualifiés de "faibles", de par leur structure secondaire complexe en 5'UTR, nécessitent une grande quantité de complexes eIF4F actifs pour être traduits (Figure 11).

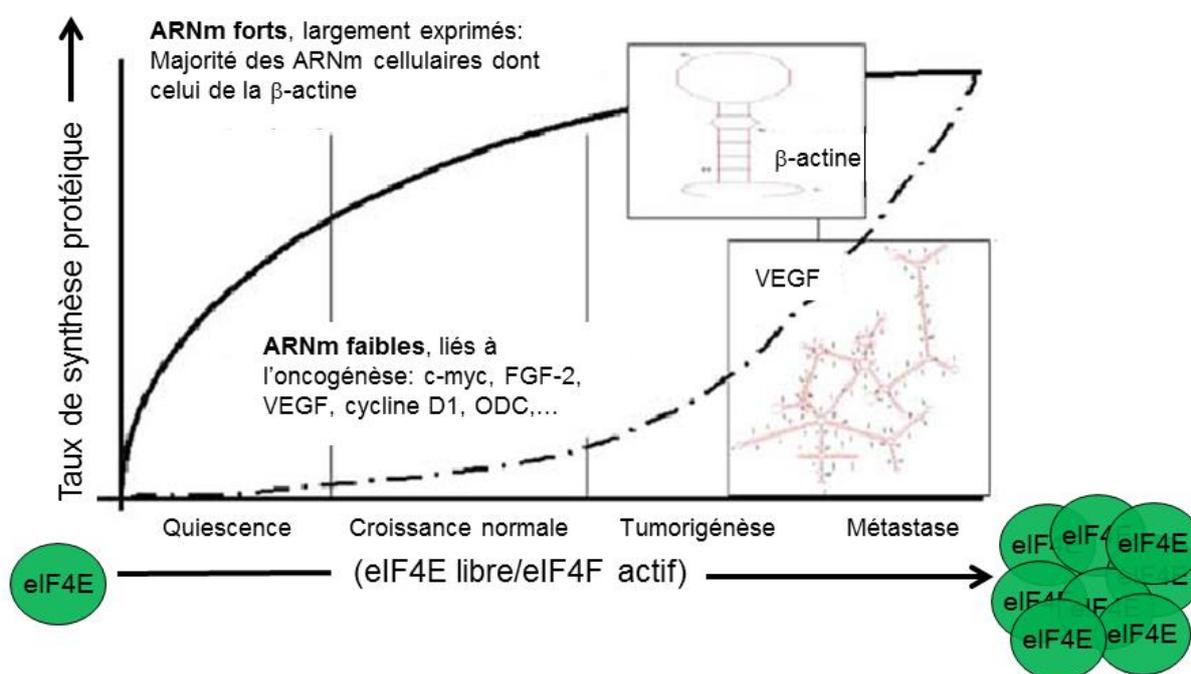


Figure 11 : Représentation du taux de synthèse protéique en fonction du caractère fort ou faible des ARNm (qui dépend de la complexité de la structure de leur coiffe); et en fonction de la phase de croissance de la cellule. Plus eIF4E est présent en grande quantité, plus les ARNm codant pour les protéines liées à l'oncogénèse vont pouvoir être traduites. ODC : Ornithine décarboxylase. (D'après A. De Benedetti et al., Oncogene 2004)

Dans le cancer, l'initiation de la traduction cap-dépendante, médiée par eIF4F, est favorisée soit par une augmentation de l'expression d'eIF4E, soit par l'activation de la voie PI3K / Akt / mTOR, soit par les deux.

Ceci active de façon disproportionnée la traduction de ces ARNm "faibles", dont la plupart codent pour des protéines oncogènes, impliquées dans la croissance et la survie cellulaires, l'angiogenèse, et l'invasion^{227, 228, 229, 230}. Des groupes d'ARNm de différentes voies oncogéniques contribuant à la tumorigenèse sont ainsi sélectivement, et plus efficacement, traduits^{231,232}.

Dans des fibroblastes et des cellules épithéliales primaires, plusieurs études ont montré que la surexpression d'eIF4E est suffisante pour induire une transformation oncogénique^{233,234,235}. De plus, des études portant sur de nombreux types de cancers humains indiquent que les taux tissulaires d'eIF4E sont élevés dans les tumeurs de la prostate, du poumon, du sein, de l'estomac, du côlon, de la peau, ainsi que dans les cancers du système hématopoïétique^{236,237,238,239,240,241,242}, et que l'expression d'eIF4E est corrélée à un mauvais pronostic²⁴³. Ces résultats ont conféré, selon certains, à eIF4E son statut de protéine oncogène. C'est pourquoi la traduction cap-dépendante et/ou eIF4E représentent des cibles intéressantes pour le traitement du cancer.

Avant ce travail de thèse, il n'avait jamais été décrit de mécanisme de résistance au niveau de l'initiation de la traduction dans le mélanome.

4. Les inhibiteurs de l'initiation de la traduction cap-dépendante

Comme alternative à l'inhibition de la voie des MAPK et de PI3K / Akt / mTor en amont de l'étape d'initiation de la traduction cap-dépendante, des approches thérapeutiques ciblant directement le complexe eIF4F dans le cancer ont été envisagées.

Il existe différentes stratégies pour développer des médicaments capables d'empêcher l'activité d'eIF4F:

- **instaurer un phénomène de compétition dans la liaison d'eIF4E à la coiffe m7GTP des ARNm,**
- **empêcher l'interaction eIF4E-eIF4G,**
- **diminuer la production d'eIF4E,**
- **bloquer l'activité d'eIF4A,**
- **inhiber la phosphorylation d'eIF4E.**

Chacune de ces stratégies a montré des résultats prometteurs. Les nombreux composés ciblant la formation ou l'activité du complexe eIF4F, ainsi que leur stade de développement, sont répertoriés dans le Tableau 3.

Tableau 3 : Composés ciblant la formation ou l'activité du complexe eIF4F

Cible	Composé	Laboratoire	Stade de développement
mTORC1	Rapamycin (Sirolimus)	Pfizer	Approuvé par la FDA
	RAD001 (Everolimus)	Novartis	Approuvé par la FDA
	CCI-779 (Temozolimumus)	Pfizer	Approuvé par la FDA
	AP23573 (Ridaforolimus)	Merck/ARIAD	Approuvé par la FDA
TOR-KI	Torin1	N/A	Culture cellulaire <i>ex vivo</i>
	INK128	Intellikine	Phase I
	AZD8055	AstraZeneca	Phase I/II
	AZD2014	AstraZeneca	Phase I
	OSI027	OSI Pharmaceuticals	Phase I
PI3K/TOR-KI	PI-103	N/A	Culture cellulaire <i>ex vivo</i>
	NVPBEZ235	Novartis	Phase I/II
	SF1126	Semafore	Phase I
	GSK2126458	Glaxo Smith Kline	Phase I
	XL765	Exelixis	Phase I/II
	BGT226	Novartis	Phase I/II
	GDC0980	Genetech	Phase I
	PF04691502	Pfizer	Phase I
PKI587	Pfizer	Phase I	
eIF4F	Cap analogs	N/A	Etudes in vitro
	4Ei-1	N/A	Etudes in vitro
	4EGi-1	N/A	Culture cellulaire <i>ex vivo</i>
	4E1RCat	N/A	Modèles précliniques <i>in vivo</i>
	4E2RCat	N/A	Modèles précliniques <i>in vivo</i>
	ISIS-eIF4ERx	Eli Lilly/ISIS	Phase II
	Patéamine A	N/A	Culture cellulaire <i>ex vivo</i>
	DMDA-Pat A	N/A	Modèles précliniques <i>in vivo</i>
	Hippuristanol	N/A	Modèles précliniques <i>in vivo</i>
	Rocaglamides (Silvestrol)	N/A	Modèles précliniques <i>in vivo</i>
Mnk	Cercosporamide	Eli Lilly	Modèles précliniques <i>in vivo</i>
	CGP57380	Novartis	Culture cellulaire <i>ex vivo</i>

Nous allons traiter dans cette partie les composés ciblant le complexe eIF4F directement, par opposition à ceux, plus anciens, ciblant la voie Akt / mTor en amont du complexe.

a. Première stratégie : **instaurer un phénomène de compétition dans la liaison d'eIF4E à la coiffe m7GTP des ARNm**

Cette stratégie vise à faire entrer en compétition des analogues de la coiffe m7GTP des ARNm avec les ARNm intracellulaires afin de les empêcher de se lier à eIF4E et donc d'initier leur propre traduction. Les premiers compétiteurs, décrits il y a plus de 30 ans²⁴⁴, étaient de simples dérivés du m7GDP ou m7GTP. Depuis, plus de 75 analogues ont été synthétisés et testés *in vitro*, mais, pour la plupart, leur usage *in vivo* est limité en raison de leur difficulté à pénétrer la membrane cellulaire et de leur faible stabilité résultant à la fois d'une hydrolyse intracellulaire et extracellulaire^{245,246}.

Parmi ces analogues de la coiffe des ARNm, la ribavirine a l'avantage d'être un traitement déjà utilisé couramment chez l'humain dans le cadre du traitement de l'hépatite C chronique. La séquestration d'eIF4E par la ribavirine dont la structure mime celle du motif 7mG²⁴⁷ induit la diminution et la relocalisation d'eIF4E du noyau au cytoplasme, ce qui était associé à une réponse clinique chez des patients atteints de leucémie myéloïde²⁴⁸.

b. Deuxième stratégie : **empêcher l'interaction eIF4E-eIF4G**

Comme décrit dans le paragraphe II-A-1, l'interaction eIF4E-eIF4G est favorisée dans la plupart des cancers, notamment par activation en amont de la voie PI3K / Akt / mTor, qui augmente la phosphorylation de 4E-BP1. L'utilisation de constructions permettant la synthèse d'une forme non phosphorylable de 4E-BP1 permet de freiner à la fois la prolifération des cellules tumorales *in vitro* et des tumeurs *in vivo* chez les modèles murins, ce qui suggère que des inhibiteurs empêchant la liaison d'eIF4E à eIF4G seraient particulièrement intéressants sur le plan thérapeutique. C'est ainsi que l'équipe de Wagner et al. a identifié un peptide synthétique (eIF4GI-1 ou 4EGi-1) inhibant l'association eIF4E / eIF4G. Ce peptide a permis de bloquer la traduction cap-dépendante, d'améliorer l'association d'eIF4E à 4E-BP1 et a réduit les taux protéiques de c-MYC et de Bcl-xL, en montrant un effet préférentiel sur les cellules transformées, y compris celles de lymphome et de cancer pulmonaire²⁴⁹. Cependant le 4EGi-1 a des propriétés biologiques indépendantes de ses effets sur la traduction cap-dépendante²⁵⁰ et ce manque de spécificité reste limitant.

Plus récemment, Cencic et al. ont aussi identifié des inhibiteurs de l'interaction eIF4E-eIF4G par screening, parmi lesquels les plus puissants étaient les composés 4E1RCat et 4E2RCat²⁵¹.

Le 4E1RCat bloque spécifiquement la traduction cap-dépendante, et est pharmacologiquement actif *in vitro* et *in vivo*. Dans un modèle de lymphome Em-myc chez la souris, le 4E1RCat a amélioré la réponse à la chimiothérapie et prolongé la survie sans tumeur. Cette synergie était probablement liée à la capacité du 4E1RCat à diminuer les taux de Mcl-1, un effet commun à d'autres inhibiteurs de la traduction *in vivo*.

c. Troisième stratégie : diminuer la production d'eIF4E

Cette stratégie vise à diminuer les quantités disponibles d'eIF4E dans la cellule en bloquant sa synthèse, grâce à des oligonucleotides anti-sens (ASO) spécifiques. Les premiers ASO testés avaient l'inconvénient d'être très sensibles aux nucléases de l'environnement, ce qui gênait grandement leur biodisponibilité *in vivo*. Les ASO de seconde génération, dans lesquels ont été rajoutés des groupements phosphates, sont heureusement plus résistants aux nucléases, et par conséquent plus stables dans les tissus. C'est ainsi qu'un ASO spécifique d'eIF4E, « 4E-ASO4 », a réduit efficacement l'expression d'eIF4E (de plus de 80%), ainsi que celle des protéines régulées par eIF4E, et a permis de bloquer la croissance de xénogreffes de cancer prostatique et mammaire sur souris nude²⁵². La réduction de l'expression d'eIF4E semblait ne pas avoir d'effet sur les tissus normaux, suggérant que les tissus cancéreux sont plus sensibles à l'inhibition d'eIF4E que les tissus normaux.

Fin 2011, les résultats du premier essai clinique de phase 1 ciblant eIF4E par l'intermédiaire d'un ASO (LY2275796 ou eIF4ERx) ont été publiés²⁵³. Le traitement consistait en une première injection intraveineuse du LY2275796, 3 jours de suite, puis une injection hebdomadaire, en escalade de dose. La réduction effective des quantités d'eIF4E dans les biopsies tumorales des patients a pu être visualisée par immunohistochimie. Parmi les 30 patients atteints de cancer stade IV traités, 7 ont eu une stabilisation de leur maladie de plus de 6 semaines. Parmi eux, 2 patients ont vu leur maladie stabilisée plus de 3 mois, dont un patient atteint de mélanome. La tolérance clinique était relativement bonne. Le LY2275796 a donc été testé en essai thérapeutique de phase 2 à partir d'octobre 2011, mais les résultats ne sont pas encore connus.

d. Quatrième stratégie : bloquer l'activité d'eIF4A

Cette stratégie de blocage de l'activité d'eIF4A semble assez répandue dans la nature, à en croire l'origine naturelle des composés identifiés comme inhibiteurs d'eIF4A. Parmi eux, on distingue les flavaglines, extraites d'arbres asiatiques, la patéamine A, extraite d'une éponge marine, et l'hippuristanol, extrait d'un corail de l'océan Pacifique. Nous allons détailler chacun de ces inhibiteurs et leurs dérivés synthétiques dans les paragraphes suivants.

➤ Rocaglamide, silvestrol et autres flavaglines

Le premier inhibiteur d'eIF4A à avoir été identifié est le silvestrol, qui appartient à un groupe de composés appelés les flavaglines.

Les flavaglines sont des molécules dérivées du rocaglamide, une substance naturelle extraite d'un arbre du genre *Aglaia Lour*, qui pousse dans les forêts d'Asie du Sud, en Australie et jusqu'en Micronésie (Figure 12). La structure chimique de ce composé (1*H*-2,3,3a,8b-tetrahydrocyclopenta [*b*] benzofurane) a été identifiée par King et al. en 1982²⁵⁴. À ce jour, plus d'une centaine de molécules naturelles apparentées au rocaglamide, les flavaglines, ont été isolées à partir de plus de 30 espèces du genre *Aglaia*²⁵⁵. La plus étudiée des flavaglines est le silvestrol, extrait des fruits et branches d'*Aglaia foveolata*, qui pousse en Indonésie et en Malaisie. Les flavaglines ont en commun dans leur structure chimique des amides d'acide cinnamique et un noyau flavonoïde^{256,257}. Les flavaglines ont des propriétés insecticides^{258,259}, anti-prolifératives^{260, 261, 262} mais aussi antivirales²⁶³, antifongiques²⁶⁴, et anti-inflammatoires^{265,266}.

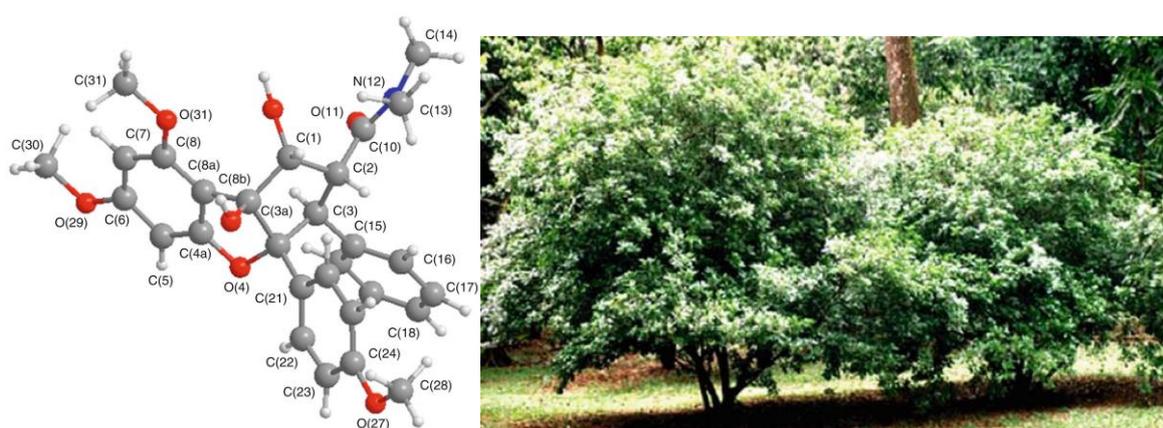


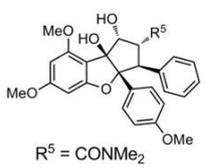
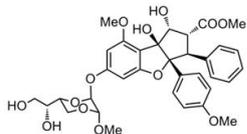
Figure 12 : A gauche, est représentée la structure tridimensionnelle du rocaglamide, obtenue par cristallographie aux rayons X. A droite, une photographie d'un *Aglaia Lour*,

l'arbuste à partir duquel a été isolé en 1982 le rocaglamide, chef de file des flavaglines. (Illustrations tirées de Edaba et al., Prog Chem Org Nat Prod. 2011)

Dès 1982, le rocaglamide a fait preuve de son activité anti-tumorale en augmentant la durée de vie d'un modèle murin de leucémie. Dans cette étude, l'administration du rocaglamide à la dose de 1 mg/kg/j a permis d'allonger la survie des souris traitées de 156% par rapport au groupe de souris témoin. Par la suite, d'autres flavaglines apparentées au rocaglamide ont fait preuve d'une inhibition puissante de la prolifération de différentes lignées de cellules tumorales *in vitro*. Les CI50 des flavaglines varient de 1 à 200 nM en fonction de la lignée cellulaire²⁶⁷. *In vivo*, l'administration de 4'-déméthoxy-3', 4'-méthylènedioxy rocaglate-méthyle²⁶⁸ à 10 mg / kg par voie intrapéritonéale trois fois par semaine a réduit la croissance tumorale de xénogreffes d'une lignée de cancer du sein humain²⁶⁹. De même, le silvestrol, administré à 2,5 mg / kg / injection, par voie intrapéritonéale pendant cinq jours consécutifs, a fait preuve d'une activité anticancéreuse dans de nombreux modèles de cancers murins, notamment du sein et de la prostate et dans des leucémies à cellules B²⁷⁰. Les multiples études ayant testé le silvestrol *in vivo* sont répertoriées dans le Tableau 4.

Les études sus-citées ont ainsi confirmé les activités anticancéreuses des flavaglines, tout en montrant que ces composés n'entraînaient ni toxicité hépatique ni perte de poids chez les souris.

Tableau 4. Activité *in vivo* dans des modèles de cancer murins

Composé	Modèle de cancer murin employé Effets observés (Doses)	Ref
<p>Rocaglamide</p>  <p>R⁵ = CONMe₂</p>	<p>P388 (leucémie)</p> <p>Survie des souris traitées : 156% de la survie des souris-témoins (1 mg/kg/j)</p>	[2]
<p>Silvestrol</p> 	<p>L3.6pl (cancer pancréatique) et RPMI-8226 (myélome)</p> <p>Pas d'effet significatif (0.2 mg/kg i.p., 5 j/semaine = dose maximale tolérée)</p>	[260]

Silvestrol	Eμ-Myc/(myr)Akt (lymphome) Potentialisation des effets de la doxorubicine (inactive sans): survie augmentée de 7 jours (pas d'effet du silvestrol en monothérapie) (0.2 mg/kg i.p./j pendant 5 jours)	[271]
Silvestrol	P388 (leucémie) Survie des souris traitées : 150% de la survie des souris-témoins (2.5 mg/kg i.p./j pendant 5 jours)	[272]
Silvestrol	Lymphome Pten ⁺ /Eμ-Myc Potentialisation des effets de la doxorubicine: survie augmentée de 5 jours (pas d'effet du silvestrol en monothérapie) (0.2 mg/kg i.p./j pendant 5 jours)	[273]
Silvestrol	Lymphome Eμ-Myc/eIF4E Potentialisation des effets de la doxorubicine: survie augmentée de 16 jours (pas d'effet du silvestrol en monothérapie) (0.2 mg/kg i.p./j pendant 5 jours)	[271]
Silvestrol	Leucémie lymphoïde chronique <i>Em-Tcl-1</i> Diminution significative du taux de lymphocytes B (1.5 mg/kg i.p./j pendant 5 jours)	[268]
Silvestrol	Leucémie aigüe lymphoblastique 697 B-ALL Augmentation de la survie de plus de 2 semaines (1.5 mg/kg i.p., 1 jour sur 2)	[268]
Silvestrol	Cancer du sein MDA-MB-231 Nette suppression de la croissance tumorale après plus	[275]

	de 75 jours (0.5 mg/kg i.p./j pendant 8 jours consécutifs)	
Silvestrol	PC-3 (cancer prostatique) Nette suppression de la croissance tumorale après plus de 50 jours (0.5 mg/kg i.p./j pendant 8 jours consécutifs)	[275]
Silvestrol	Leucémie aigüe myéloïde MV4-11 Augmentation de la survie de plus d'un mois 30 % des souris toujours en vie 74 j après la greffe (toutes les souris traitées par le véhicule étaient mortes 31 jours après greffe) (1.5 mg/kg i.p. 1 jour sur 2 pendant 3 semaines)	[271]
Silvestrol	Lymphome E μ -Myc/Tsc2 ^{-/-} /PIM2 Potentialisation des effets de la rapamycine: augmentation de la survie de 6 jours par rapport à la rapamycine seule (0.2 mg/kg i.p./j pendant 7 jours consécutifs)	[274]
Silvestrol	Lymphome du manteau Augmentation de la survie de 2 semaines (1.5 mg/kg i.p. 1 jour sur 2)	[275]

Mais ce n'est qu'en 2008²⁷⁶, à l'aide d'une méthode de screening de petites molécules, que l'activité anti-tumorale de certaines flavaglines (la 1-O-formylaglafoline et le silvestrol²⁷⁷) a été attribuée à leur capacité à interférer avec l'activité d'eIF4A. La 1-O-formylaglafoline et le silvestrol empêchent l'incorporation de la protéine eIF4A libre dans le complexe eIF4F en augmentant sa liaison à l'ARN. La capacité du silvestrol (ou de l'épisilvestrol) à se lier à eIF4A a été confirmée en 2013 par Chambers et al., avec une très haute spécificité²⁷⁸.

L'inhibition de l'initiation de la traduction cap-dépendante qui en résulte, affecte le niveau d'expression des protéines pro et anti-apoptotiques, notamment celles qui ont une demi-vie

courte. Par exemple, une réduction de l'expression de Mcl-1 et de la survivine, des protéines anti-apoptotiques, a été observée dans une lignée cellulaire de cancer du sein MDA-MB-231, d'origine humaine, après exposition au silvestrol²⁷⁹. De plus, une régulation négative de c-FLIP, principal inhibiteur de la caspase-8, a été détectée dans les cellules tumorales traitées par rocaglamide, desméthyl-rocaglamide, 1-Oacetylrocaglamide, et 1-oxo-11,12-methylendioxyrocaglamide²⁸⁰.

Très récemment, en 2014, l'équipe de Wolfe et al.²⁸¹ a démontré dans un modèle de leucémie aigüe lymphoblastique que le silvestrol était particulièrement efficace pour inhiber la traduction des ARNm dont la région 5'UTR est riche en quartets de guanine, capables de former des structures secondaires d'ARN à 4 brins appelées « G-quadruplexes » (ou « G4 », figure 13). Parmi ces ARNm, dont la traduction est très dépendante d'eIF4A et est donc particulièrement sensible au silvestrol, figurent des ARNm codant pour des oncogènes, des facteurs de transcription associés à des « super enhancers » (« amplificateurs »), et des régulateurs épigénétiques.

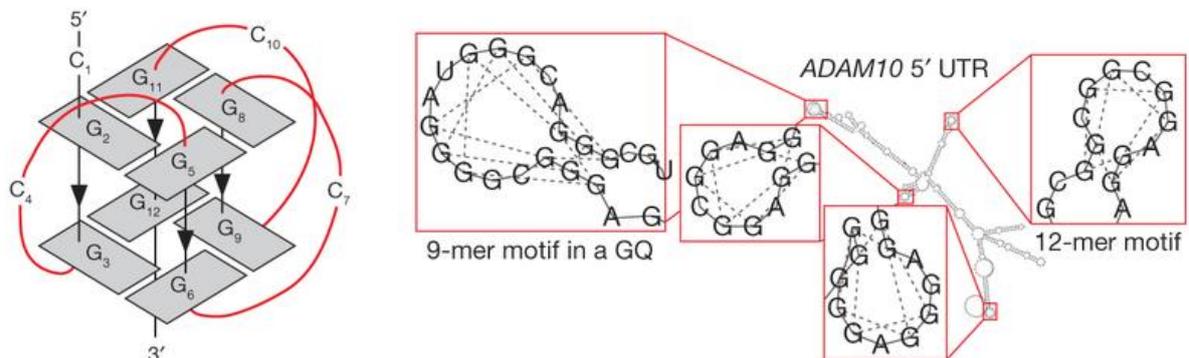


Figure 13 : A gauche, représentation d'une structure secondaire d'ARN en G-quadruplexe. Les nombres indiqués précisent la position des nucléotides impliqués dans cette structure. A droite, mise en évidence des motifs impliqués dans la formation de G-quadruplexes au sein de la région 5'UTR de l'ARNm codant pour la protéine ADAM10. (Tiré de A. Wolfe et al., Nature 2014)

Malgré ces résultats prometteurs, l'usage du silvestrol *in vivo* risque de se heurter à un phénomène de résistance par efflux, médié par la surexpression d'ABCB1/P-glycoprotéine dans certaines tumeurs, comme il a été démontré en 2011 sur un modèle cellulaire de leucémie aigüe lymphoblastique résistant au silvestrol²⁸². Cette résistance acquise au silvestrol a conféré aux cellules une résistance croisée aux autres substrats de la P-glycoprotéine tels

que la vincristine et la romidepsine, il s'agissait donc de ce que l'on appelle « résistance multi-drogues » ou MDR.

➤ Patéamine A et DMDA-Patéamine A

Un autre composé bloquant l'activité d'eIF4A est un produit naturel anti-prolifératif et pro-apoptotique nommé patéamine A, découverte en 1991²⁸³. Il s'agit d'une toxine extraite de l'éponge marine *Mycale henscheli*, que l'on trouve au large des côtes de la Nouvelle-Zélande (Figure 14). La patéamine A stimule la liaison d'eIF4A à l'ARNm. Cela entraîne une séquestration d'eIF4A sur l'ARNm et une réduction de la disponibilité d'eIF4A à se recycler dans le complexe eIF4F²⁸⁴. Plus récemment, en 2009, la patéamine A « des-méthyle, des-amino » (DMDA-PatA), un analogue synthétique simplifié de la patéamine A, a montré une activité anticancéreuse dans deux modèles de xénogreffes de mélanome sur souris nude et une faible cytotoxicité vis-à-vis de fibroblastes humains non transformés²⁸⁵. Il est intéressant de remarquer que ces 2 types de xénogreffes de mélanome, particulièrement sensibles à la DMDA-PatA en monothérapie, sont issues des lignées cellulaires LOX et M14, dont le statut muté BRAFV600E est désormais connu.

Enfin, un avantage non négligeable de la DMDA-PatA, par opposition au silvestrol notamment, est que son activité n'est pas altérée par la résistance multi-drogues liée à l'efflux médié par la P-glycoprotéine.

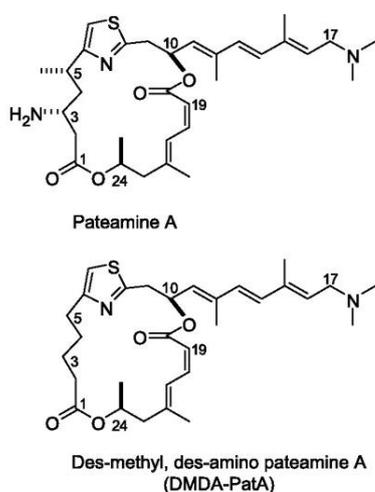


Figure 14 : A gauche, représentation des structures chimiques de la patéamine A et de son analogue synthétique simplifié la DMDA-PatA. A droite, photographie de l'éponge marine *Mycale henscheli* à partir de laquelle est extraite la patéamine A. (D'après G. Kuznestov, *Molecular Cancer Therapeutics*, 2009)

➤ Hippuristanol

Par opposition à la patéamine A et le silvestrol qui bloquent eIF4A en stimulant sa liaison à l'ARNm, l'hippuristanol est un inhibiteur allostérique d'eIF4A qui a un mode d'action inverse: il empêche à la fois eIF4A libre et eIF4A au sein du complexe eIF4F de se lier à l'ARNm, ce qui inhibe l'activité hélicase et ATPase d'eIF4A²⁸⁶, et par conséquent le chargement des ribosomes sur l'ARNm. L'hippuristanol tient son nom du corail dont il est extrait, *l'Isis hippuris*, que l'on trouve dans l'océan Pacifique de l'Ouest, notamment autour des côtes de l'île d'Okinawa, Japon (Figure 15). L'hippuristanol a montré une activité anticancéreuse dans un modèle de leucémie à cellules T de souris adultes²⁸⁷.

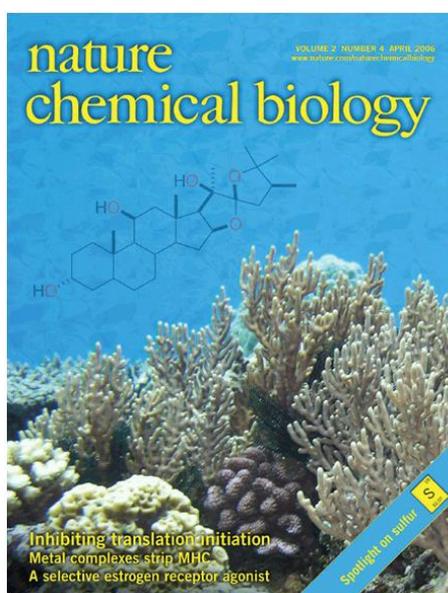


Figure 15 : L'hippuristanol, sa structure chimique ainsi que la photographie du corail dont il est extrait, ont fait la couverture du journal Nature Chemical Biology en 2006, à l'occasion de la publication de l'article de M-E Bordeleau et al. Cette équipe a montré,

après avoir testé un panel d'extraits marins, que l'hippuristanol est un inhibiteur d'eIF4A.

e. Cinquième stratégie : inhiber la phosphorylation d'eIF4E par Mnk

Contrairement à la régulation de l'assemblage 4E-BP1-eIF4E par la voie Akt / mTor, les conséquences biologiques et moléculaires de la phosphorylation d'eIF4E sont moins connues. La protéine eIF4E est phosphorylée sur un résidu unique, la sérine en position 209, par deux kinases: Mnk 1 et 2 (MAP kinase interacting signal kinases 1 et 2)²⁸⁸, qui sont toutes deux activées par la voie des MAPK et par la voie de signalisation p38 en réponse au stress²⁸⁹.

Les hypothèses proposant que cette phosphorylation augmenterait l'affinité d'eIF4E pour la coiffe ou sa stabilité dans le complexe eIF4F n'ont jusqu'à présent donné que peu de résultats concluants. Dans les organismes inférieurs, la phosphorylation d'eIF4E semble indispensable au développement, mais dans des modèles murins, la perte de la phosphorylation d'eIF4E n'a pas entraîné de phénotype particulier²⁹⁰. Cependant, la phosphorylation d'eIF4E apparaît jouer un rôle important dans le cancer : la surexpression ou le « knock-in » du mutant non phosphorylable d'eIF4E S209A retarde la formation de tumeurs^{291,292}, ce qui, dans certains cas, a été attribué à la meilleure capacité de phospho-eIF4E d'augmenter l'expression de Mcl-1²⁹³.

Ceci suggère que des inhibiteurs de Mnk pourraient avoir un potentiel anti-cancéreux. C'est dans cette optique qu'un nouvel inhibiteur de Mnk, le cercosporamide, a été identifié à partir d'un panel de 30 000 molécules testées en réaction avec Mnk1 *in vitro*. Le cercosporamide est plus spécifique de Mnk2 que de Mnk1 (CI50 0,011µM vs CI50 0,116µM, respectivement), est aussi un puissant inhibiteur de Jak3 (CI50 0,031µM), et est biodisponible par voie orale. Il inhibe la phosphorylation d'eIF4E de manière dose-dépendante, bloque la prolifération cellulaire, et induit l'apoptose. Dans des modèles de xénogreffes de cancer colique (HCT116) et de métastases pulmonaires de mélanome B16, le cercosporamide n'a réduit que très modestement la progression et l'incidence tumorale, ce qui pourrait s'expliquer par la re-phosphorylation d'eIF4E observée dans les tissus des souris plus de 4 heures après traitement²⁹⁴.

L'avenir des inhibiteurs de Mnk dépendra en grande partie de l'identification ou non d'un type de cancer particulièrement dépendant de la phosphorylation d'eIF4E.

Enfin, d'autres inhibiteurs de la traduction, ciblant d'autres étapes que son initiation, sont en cours d'étude. Par exemple, le facteur de traduction eIF5A nécessite une modification post-traductionnelle spécifique (hypusination) pour être fonctionnel. Le N1-guanyl-1,7-diaminoheptane (GC7) et le ciclopirox olamine (CPX) sont des inhibiteurs puissants de la désoxyhypusine synthase, qui catalyse l'hypusination d'eIF5A. Le GC7 et le CPX ont fait preuve d'un effet antiprolifératif dans diverses lignées cellulaires^{295,296} et d'une activité antitumorale *in vivo* dans des modèles de cancer du sein, de mélanome, de leucémie, et de myélome^{297,298,299}.

En résumé, l'ensemble des approches thérapeutiques sus-citées, ciblant la traduction des ARNm dans le cancer, sont répertoriées, en regard de leurs cibles respectives, dans la figure 16.

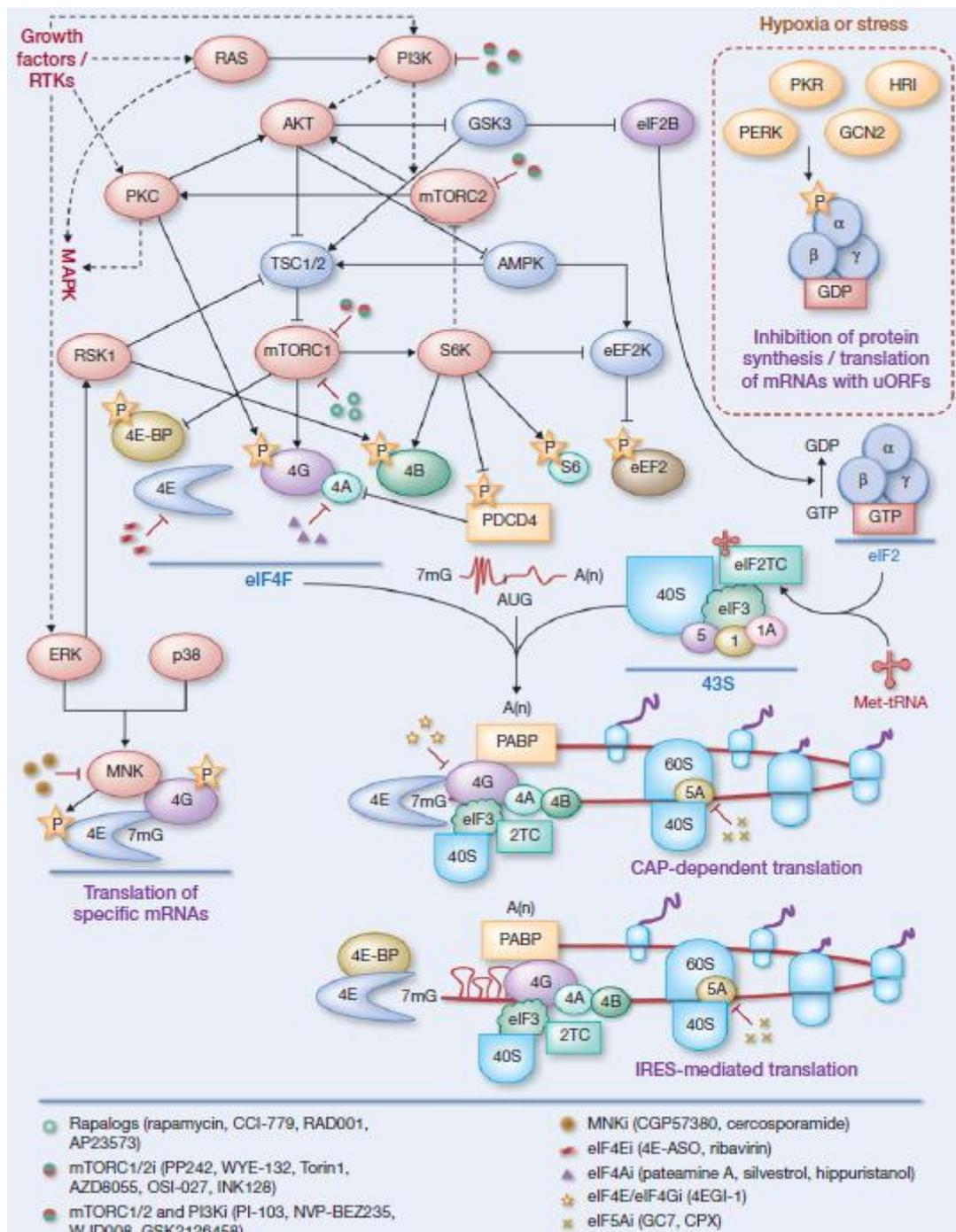


Figure 16: La traduction des ARNm comme cible dans le cancer.

Au cours de la carcinogenèse, la dérégulation des voies de signalisation influence la synthèse des protéines par la modulation de la traduction de différents types d'ARNm. L'activation des RTK, et/ou l'activation des voies oncogènes en aval, telles que celles des MAPK, PI3K / Akt, et PKC, activent la machinerie traductionnelle via mTOR. L'activation de mTORC1 augmente la traduction des ARNm par la phosphorylation des

4EBPs, qui conduit à la libération d'eIF4E. S6K activée phosphoryle la protéine ribosomique S6 et eIF4B, tout en inactivant à la fois eEF2K (régulateur négatif d'eEF2) et PDCD4, un inhibiteur de l'activité hélicase d'eIF4A. Activé par PI3K et par interaction ribosomale, le complexe mTORC2 phosphoryle et active la signalisation Akt et la voie PKC. Le complexe TSC1/2, qui inhibe mTORC1, est régulé négativement par Akt et MAPK / RSK1, et est activé par l'AMPK et GSK3, qui régulent eEF2K et eIF2B, respectivement. eIF2B facilite le recyclage du GDP en GTP sur eIF2. eIF2-GTP et Met-ARNT forment un complexe ternaire (eIF2TC), qui, avec la sous-unité ribosomale 40S et d'autres facteurs d'initiation, va pouvoir former le complexe de pré-initiation 43S. Ce complexe est recruté à l'ARNm lié à eIF4F (via eIF4G-eIF3), pour faciliter la traduction cap-dépendante.

Dans des conditions de stress et / ou d'inhibition d'eIF4F, un mécanisme de traduction cap-indépendante peut entrer en jeu par le recrutement du complexe 43S au codon d'initiation en présence d'une IRES (Internal Ribosomal Entry Site) dans l'ARNm. La stimulation de la voie des MAPK active les Mnks (par ERK et p38), avec l'association PKC-dépendante de Mnk à eIF4G et la phosphorylation d'eIF4E, menant à la traduction d'ARNm spécifiques. L'hypoxie ou le stress induisent la phosphorylation d'eIF2a (via pERK, PKR, GCN2, ou HRI), qui bloque le recyclage du GTP sur eIF2, entraînant une inhibition de la synthèse globale des protéines et la promotion de la traduction d'ARNm spécifiques contenant des uORFs. Les différents inhibiteurs des facteurs de la traduction cités dans le texte et utilisés en clinique ou en préclinique sont représentés. (Tiré de M. Grzmil et al., Cancer Research 2012)

B. Article publié dans Nature 2014 : Identification d'un biomarqueur et de nouveaux inhibiteurs spécifiques

1. Article

eIF4F is a nexus of resistance to anti-BRAF and anti-MEK cancer therapies

Lise Boussemart^{1,2,3*}, H el ene Malka-Mahieu^{1,2*}, Isabelle Girault^{1*}, Delphine Allard¹, Oskar Hemmingsson^{1†}, Gorana Tomasic⁴, Marina Thomas³, Christine Basmadjian⁵, Nigel Ribeiro⁵, Fr ed eric Thuaud⁵, Christina Mateus³, Emilie Routier³, Nyam Kamsu-Kom¹, Sandrine Agoussi¹, Alexander M. Eggermont^{2,3}, Laurent D esaubry⁵, Caroline Robert^{1,2,3} & St eph an Vagner^{1,2,3†}

In BRAF(V600)-mutant tumours, most mechanisms of resistance to drugs that target the BRAF and/or MEK kinases rely on reactivation of the RAS-RAF-MEK-ERK mitogen-activated protein kinase (MAPK) signal transduction pathway, on activation of the alternative, PI(3)K-AKT-mTOR, pathway (which is ERK independent) or on modulation of the caspase-dependent apoptotic cascade¹⁻³. All three pathways converge to regulate the formation of the eIF4F eukaryotic translation initiation complex, which binds to the 7-methylguanylate cap (m⁷G) at the 5' end of messenger RNA, thereby modulating the translation of specific mRNAs^{4,5}. Here we show that the persistent formation of the eIF4F complex, comprising the eIF4E cap-binding protein, the eIF4G scaffolding protein and the eIF4A RNA helicase, is associated with resistance to anti-BRAF, anti-MEK and anti-BRAF plus anti-MEK drug combinations in BRAF(V600)-mutant melanoma, colon and thyroid cancer cell lines. Resistance to treatment and maintenance of eIF4F complex formation is associated with one of three mechanisms: reactivation of MAPK signalling, persistent ERK-independent phosphorylation of the inhibitory eIF4E-binding protein 4EBP1 or increased pro-apoptotic BCL-2-modifying factor (BMF)-dependent degradation of eIF4G. The development of an *in situ* method to detect the eIF4E-eIF4G interactions shows that eIF4F complex formation is decreased in tumours that respond to anti-BRAF therapy and increased in resistant metastases compared to tumours before treatment. Strikingly, inhibiting the eIF4F complex, either by blocking the eIF4E-eIF4G interaction or by targeting eIF4A, synergizes with inhibiting BRAF(V600) to kill the cancer cells. eIF4F not only appears to be an indicator of both innate and acquired resistance but also is a promising therapeutic target. Combinations of drugs targeting BRAF (and/or MEK) and eIF4F may overcome most of the resistance mechanisms arising in BRAF(V600)-mutant cancers.

A plethora of mechanisms of resistance to BRAF(V600) inhibitors have been described, including mutations of *NRAS*, *MAP2K1* and *PIK3CA*, partial deletion of *PTEN*, expression of *BRAF* splice variants, upregulation of PDGFR , IGF-1R, EGFR, HER3 and COT and downregulation of BH3-only proteins (which are pro-apoptotic)^{1-3,6}. By activating the MAPK or the PI(3)K pathway or by modulating the caspase-dependent apoptotic cascade, all of these mechanisms converge on eIF4F-dependent mRNA translation.

To investigate the potential role of eIF4F complex formation in the resistance of BRAF(V600) melanoma to anti-BRAF and anti-MEK compounds, we first tested a panel of human melanoma cell lines (Supplementary Table 1) for their sensitivity to vemurafenib. Two BRAF(V600)-mutated cell lines (Mel624 and A2058) were resistant to vemurafenib compared with other cell lines (for example, A375 and Mel888) in both short-term (Extended Data Fig. 1a) and long-term (Extended Data Fig. 1b) proliferation assays. Similarly to the sensitivity pattern observed *in vitro*,

A375 xenografts were more sensitive to vemurafenib than were Mel624 xenografts (Extended Data Fig. 2a). Determination of the half-maximum inhibitory concentration (IC₅₀) (Extended Data Fig. 1a and Supplementary Table 1), together with long-term proliferation assays (Extended Data Fig. 1c), indicated that these two vemurafenib-resistant cell lines (Mel624 and A2058) were also less sensitive to dabrafenib (another BRAF(V600) inhibitor), PD0325901 and trametinib (both MEK inhibitors), the combination of dabrafenib and trametinib, and CGP 57380 (a MNK inhibitor). To determine the status of the eIF4F complex in these various cell lines, we used a cap-binding assay in which synthetic m⁷GTP-Sepharose beads capture eIF4E and its two binding partners, eIF4G and 4EBP1. We observed that vemurafenib treatment increased the amount of eIF4E-bound 4EBP1 and concomitantly decreased the amount of eIF4E-bound eIF4G in the two sensitive cell lines (A375 and Mel888) (Fig. 1a). Incorporation of [³⁵S]methionine and cysteine and profiling of polysomes showed that this decrease in eIF4F complex formation led to a weak decrease (13%) in translation initiation in the acute phase (3 h) of the response to treatment and to a greater decrease (30%) in protein synthesis after 24 h of treatment (Extended Data Fig. 3a, b). As expected from another study⁷, describing mTOR-dependent translation regulation, the analysis of mRNAs that are differentially recruited to heavy polysomes (Supplementary Table 2) showed that the translation of several mRNAs containing 5' terminal oligopyrimidine (TOP) motifs and encoding many ribosomal proteins and translation factors was inhibited during the acute response to vemurafenib treatment (Extended Data Figs 3c, d and Supplementary Table 2).

Strikingly, the vemurafenib-dependent disruption of the eIF4E-eIF4G complex was not observed in the resistant cell lines (Mel624 and A2058) (Fig. 1a). We further investigated the formation of the eIF4F complex using a proximity ligation assay procedure (Extended Data Fig. 5), and we observed that vemurafenib induced a decrease in eIF4E-eIF4G interaction and an increase in eIF4E-4EBP1 complex formation in vemurafenib-sensitive cell lines (A375 and Mel888) that was not observed in the resistant cell lines (Mel624 and A2058) (Fig. 1b and Extended data Fig. 6a, b). *In vivo* experiments in mice were consistent with these findings, as we also found fewer eIF4E-eIF4G interactions, compared with eIF4E-4EBP1 interactions, in vemurafenib-treated A375 xenografts (sensitive) than in vemurafenib-treated Mel624 xenografts (resistant) (Extended Data Fig. 2b, c). The same correlation between sensitivity to the drugs and the level of activation of the eIF4F complex was observed with dabrafenib, trametinib and combinations of both drugs (Extended Data Fig. 7a, b), extending our observation to anti-MEK agents and anti-BRAF plus anti-MEK combinations⁸.

In parallel, we generated a melanoma cell line with acquired resistance to vemurafenib (Supplementary Table 1) by exposing the Malme-3M cell line, which has the BRAF(V600) mutation, to incremental increases

¹Inserm UMR981, Villejuif F-94805, France. ²Universit  Paris-Sud XI, Kremlin-Bic tre F-94276, France. ³Gustave Roussy, Dermato-Oncology, Villejuif F-94805, France. ⁴Gustave Roussy, Pathology Department, Villejuif F-94805, France. ⁵CNRS-Strasbourg University, UMR7200, Illkirch F-67400, France. [†]Present addresses: Department of Surgical and Perioperative Sciences, Ume  University, Ume  SE-90187, Sweden (O.H.); CNRS UMR3348, Institut Curie, Orsay F-91405, France (S.V.).

*These authors contributed equally to this work.

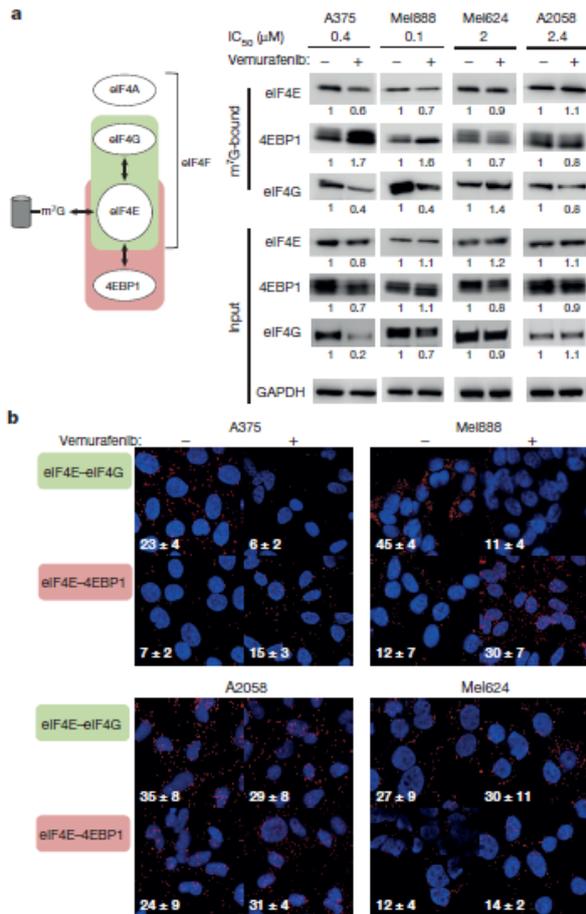


Figure 1 | The formation of the eIF4F translation initiation complex is associated with resistance to BRAF inhibitors. **a**, eIF4F complex formation, as determined using the cap-binding assay in vemurafenib-treated or untreated tumour cell lines. Eluates from beads (m⁷G-bound) and total extracts (input) were analysed by western blotting. The half-maximum inhibitory concentration (IC₅₀) for vemurafenib is indicated (see also Supplementary Table 1). **b**, eIF4E-eIF4G or eIF4E-4EBP1 interactions detected by proximity ligation assay (PLA) in vemurafenib-treated or untreated cell lines. The interactions were visualized as red spots. The white numbers indicate the mean ± s.d. (n = 3).

in vemurafenib concentration over 2 months. Again, vemurafenib induced a decrease in eIF4E-eIF4G interactions and an increase in eIF4E-4EBP1 complex formation in vemurafenib-sensitive Malme-3M cells but not in vemurafenib-resistant Malme-3M (R-Malme-3M) cells (Extended Data Fig. 8a). Finally, this paradigm was not limited to melanoma cell lines: we observed the maintenance of the eIF4F complex in two other cell lines: the colon cancer cell line HT-29, in which resistance is associated with an activating PI(3)K(P449T) mutation⁹ and *EGFR* overexpression¹⁰; and the papillary thyroid cancer cell line BCPAP, in which resistance is linked to *HER3* overexpression¹¹ (Extended Data Fig. 8b).

We next addressed the mechanisms underlying the differences in the sensitivity to vemurafenib in the above-mentioned melanoma cell lines. We observed that R-Malme-3M exhibited a higher ERK phosphorylation level than the sensitive Malme-3M cell line (Fig. 2a). The sustained phosphorylation of ERK was associated with a vemurafenib-dependent increase in BRAF-CRAF dimerization, revealing a mechanism of resistance linked to reactivation of the MAPK pathway (Fig. 2b). Vemurafenib

treatment inhibited ERK phosphorylation in all of the other cell lines tested, including the vemurafenib-resistant cell lines Mel624 and A2058 (Fig. 2c), showing that the differential sensitivity to vemurafenib in these cell lines cannot be explained by the reactivation of the MAPK pathway. The expression and phosphorylation of the main translation initiation factors remained unchanged in vemurafenib-resistant cell lines, except for eIF4G and eIF4B, for which vemurafenib-dependent dephosphorylation was observed (Fig. 2c). However, these dephosphorylations also occurred in vemurafenib-sensitive cell lines and therefore were not correlated with vemurafenib resistance. 4EBP1 was dephosphorylated in the vemurafenib-treated sensitive cell line Mel888 and to a lesser extent in A375. This dephosphorylation is linked to AKT dephosphorylation (Fig. 2c), which does not occur in resistant cell lines. The amounts of eIF4G and eIF4B were decreased in the vemurafenib-treated sensitive A375 cell line (Fig. 2c).

To uncover the mechanisms underlying this decrease, we sought to identify the genes whose expression is altered after vemurafenib treatment in A375 cells compared with Mel624 cells, by using microarrays (Supplementary Table 3). As expected from previous studies^{12,13}, vemurafenib led to the inhibition of expression of genes encoding transcription factors associated with ERK-dependent transformation and genes encoding feedback regulators of ERK signalling, such as members of the dual specificity phosphatase (DUSP) and sprouty (SPRY) gene families (Fig. 2d and Supplementary Table 3). These changes were found in both the sensitive and resistant cell lines, reinforcing the finding that the differential sensitivity of these two cell lines to vemurafenib is independent of the MAPK pathway. We focused on a set of 27 genes that were differentially upregulated in A375 cells, including *BMF* (Fig. 2d), a pro-apoptotic gene that had already been shown to be involved in acquired resistance to PLX4720 (ref. 6), a vemurafenib analogue. Of these 27 genes, *BMF* was the only one that, when knocked down (by short interfering RNA (siRNA)-mediated depletion), led to the relative resistance of A375 cells to vemurafenib (Extended Data Fig. 9a, b). Vemurafenib treatment led to a strong increase in the expression of *BMF* in A375 cells but not in Mel624 cells (Fig. 2e). siRNA-mediated depletion of *BMF* led to decreased vemurafenib-dependent eIF4G cleavage (Fig. 2f) and to increased eIF4F complex formation (Fig. 2g), suggesting that *BMF* is involved in the sensitivity to vemurafenib by acting on the cleavage of eIF4G, which, in turn, affects eIF4F complex formation. In favour of this hypothesis, we found that the cleavage of eIF4G (first observed 45 min after treatment) preceded the disruption of eIF4F (first observed 90 min after treatment) (Extended Data Fig. 6c, d). Thus, in addition to reactivation of the MAPK pathway and/or activation of the PI(3)K-AKT-mTOR pathway, the formation of the eIF4F complex is also an indicator of resistance linked to modulation of apoptotic cascades.

To further support the idea that the formation of the eIF4F complex is involved in sensitivity to vemurafenib, we used the small molecule inhibitor 4EGI-1 (4EGI-1), which disrupts eIF4E-eIF4G interaction¹⁴. 4EGI-1 decreased the eIF4E-eIF4G interaction and, in parallel, increased the eIF4E-4EBP1 interaction in all cell lines tested (Extended Data Fig. 5b). Vemurafenib-resistant cell lines were more sensitive to 4EGI-1 than were vemurafenib-sensitive cell lines (Fig. 3a), suggesting a direct role of the eIF4F complex in proliferation. To examine whether resistance can be reversed by disrupting the eIF4F complex, we explored the effect of the combination of vemurafenib and 4EGI-1 on Mel624 cells and found a clear synergistic effect of these compounds (Fig. 3b). Thus, the formation of the eIF4F complex is directly involved in sensitivity to vemurafenib. Targeting translation initiation may therefore be a strategy to overcome resistance to anti-BRAF and/or anti-MEK compounds. Silvestrol, a naturally occurring member of the flavagline family of compounds, inhibits cap-dependent translation by targeting eIF4A¹⁵⁻¹⁷. However, silvestrol displays poor ADME (absorption, distribution, metabolism and excretion) characteristics and is sensitive to P-glycoprotein-mediated multidrug resistance, which severely hampers its use in *in vivo* studies^{18,19}.

To circumvent this problem, we chose to evaluate a series of synthetic flavagline derivatives (Supplementary Notes) for their capacity

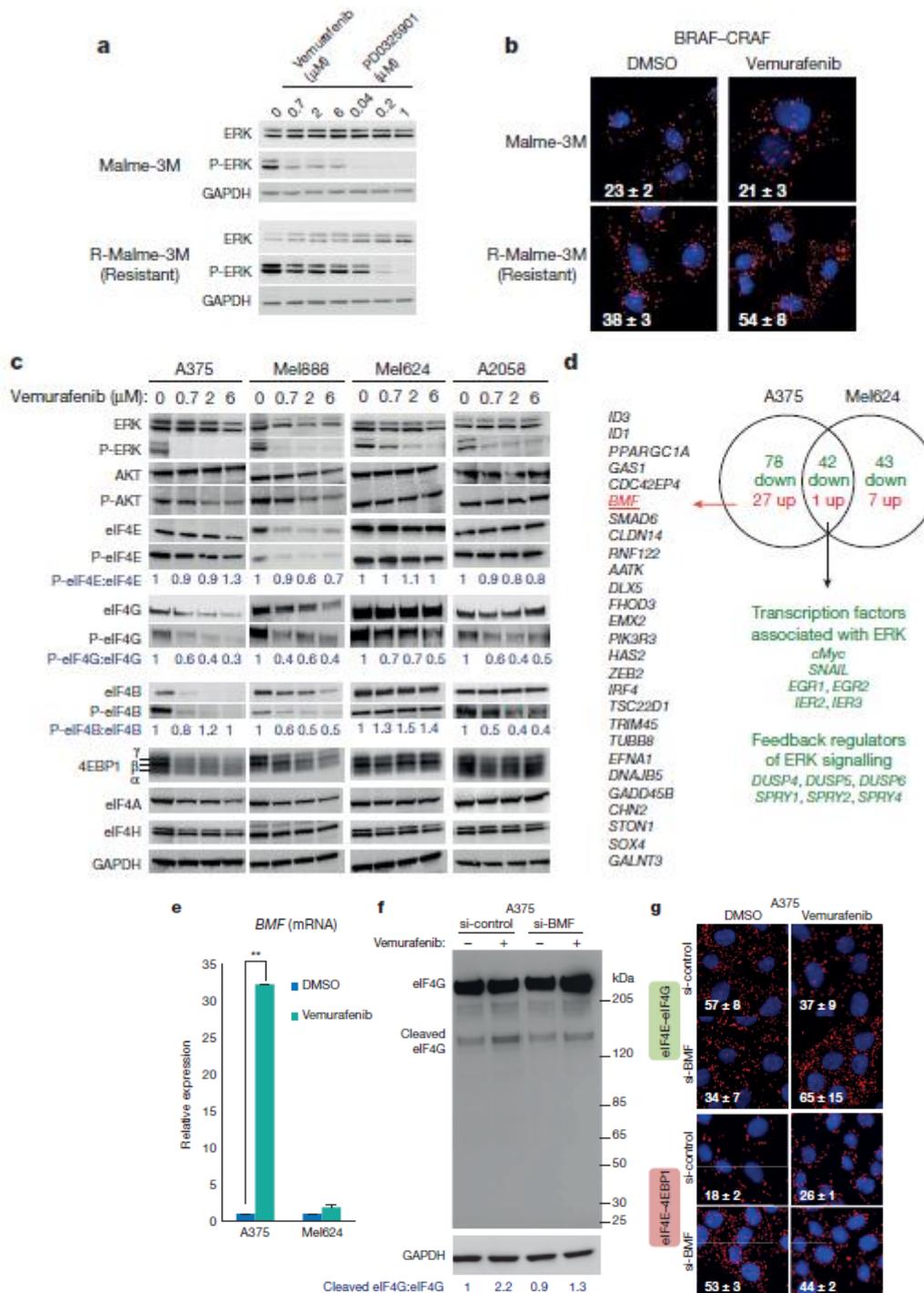


Figure 2 | Identification of mechanisms of resistance associated with persistent eIF4F formation. **a, c,** Western blot analysis with antibodies specific for phosphorylated (P-) or total proteins as indicated. **b,** BRAF-CRAF interaction detected by PLA. The white numbers indicate the mean \pm s.d. ($n = 3$). **d,** Venn diagram showing the overlap of differentially expressed genes in several vemurafenib-treated cell lines. The list of genes on the left represents the 27 genes whose expression was upregulated by vemurafenib in A375 cells but not in Mel624 cells. *EGR*, early growth response; *IER*, immediate early

response. **e,** Expression of *BMF* mRNA (as determined by quantitative reverse transcription PCR (qRT-PCR)) in vemurafenib-treated A375 cells compared with dimethylsulphoxide (DMSO) controls. The data are presented as the mean \pm s.d. ($n = 3$), and differences were assessed with Student's *t*-test (**, $P < 0.01$). **f,** Western blotting analysis of vemurafenib treatment on BMF-depleted A375 cells. si-BMF, *BMF*-directed siRNA; si-control, control siRNA. **g,** eIF4E-eIF4G and eIF4E-4EBP1 interactions detected by PLA. The white numbers are the mean \pm s.d. ($n = 3$).

to inhibit the eIF4F complex, by using a bicistronic luciferase reporter construct (pR-HepC-L) (Fig. 3c). In this assay, translation of the first (LucR) cistron is eIF4F-dependent, while translation of the hepatitis C virus internal ribosome entry site (IRES)-driven second (LucF) cistron is eIF4F-independent. Differential translation of both cistrons, as measured by the ratio of luciferase activities, directly reflects differences in eIF4F activity. Treatment of pR-HepC-L-transfected A375 cells with

silvestrol and several flavaglines (for example, FL3, FL14, FL23 or FL36) led to an increase in the LucF:LucR ratio (Fig. 3d), indicating that those drugs target eIF4F in a specific manner. A structure-function relationship study allowed us to define the best translation inhibitors (Fig. 3e). The ability to inhibit eIF4F-dependent translation correlated with the ability to inhibit cell proliferation (Fig. 3f). Finally, we found that combining vemurafenib and an eIF4A inhibitor, such as FL3, silvestrol or

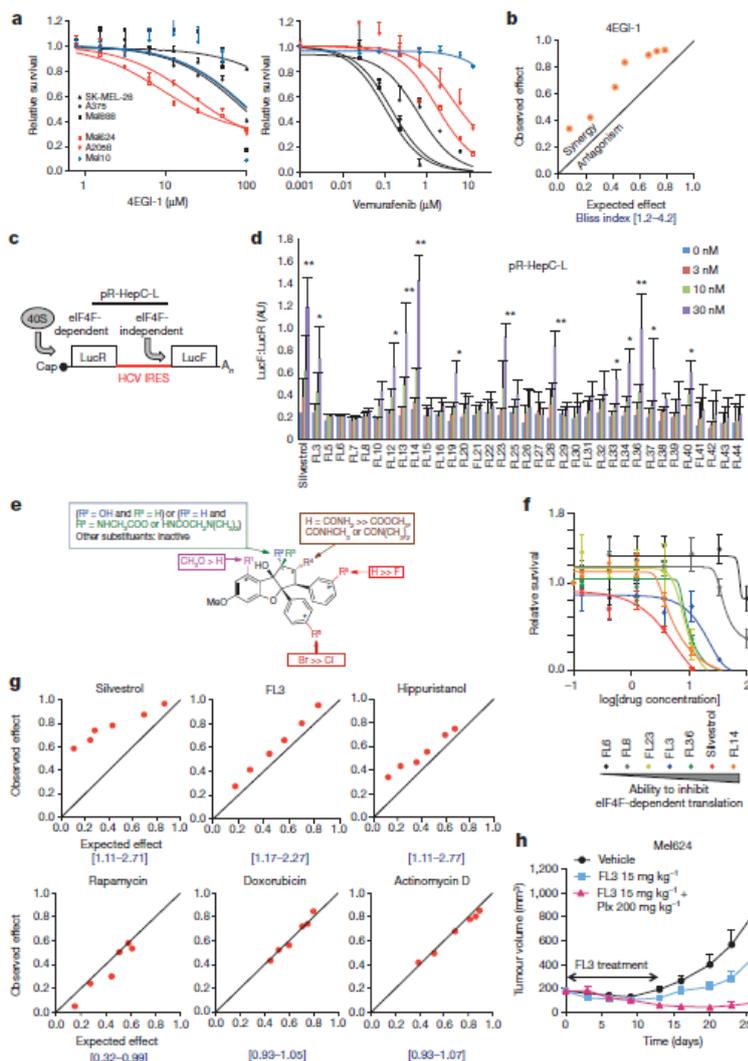


Figure 3 | Flavaglines target eIF4F and synergize with vemurafenib. a, f, Cell proliferation assays. The data are presented as the mean \pm s.d. ($n = 4$). Survival is shown relative to DMSO controls. (The ability to inhibit eIF4F-dependent translation is derived from d.) b, g, Isobologram of the effect of the combination of vemurafenib plus the indicated drugs on Mel624 cells. The Bliss index is shown in square brackets. c, Schematic of the mRNA produced from the pR-HepC-L vector. HCV IRES, hepatitis C virus internal ribosome entry site. d, Ratio of LucF to LucR activity (AU, arbitrary units) in pR-HepC-L-transfected A375 cells treated with flavaglines. The data are presented as the mean \pm s.d. ($n = 4$), and differences were assessed with Student's t -test (*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$). e, Structure-function relationships of the flavaglines. h, Growth of Mel624 xenografts in mice. The data are presented as mean tumour volume + s.e.m. ($n = 6$ mice per group); one-sided Mann-Whitney test, *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$.

hippuristanol⁸, had a synergistic effect on the proliferation of Mel624 cells (Fig. 3g). Interestingly, this synergy was not observed with other chemotherapeutics such as doxorubicin (which intercalates into duplex DNA), actinomycin D (which inhibits RNA synthesis) or rapamycin (which targets mTORC1) (Fig. 3g). Rapamycin is expected to dephosphorylate 4EBP1 and should disrupt the eIF4F complex, which, in turn, should lead to a synergistic effect of vemurafenib and rapamycin. However, we found that rapamycin did not lead to 4EBP1 dephosphorylation in Mel624 cells, explaining the lack of synergy (Extended Data Fig. 9c). Xenograft experiments were then performed with FL3, which was chosen from the flavaglines because of its ability to overcome multidrug resistance and its activity *in vivo*²⁰. The combination of FL3 plus PLX4720 (Plx) given at a moderate dose of 200 mg per kg body weight led to a strong reduction in Mel624 tumour growth (Fig. 3h). The cooperative action of FL3 and Plx was shown by using a low dose of Plx (90 mg per kg body weight), at which no effect on Mel624 tumour growth was observed with Plx alone (Extended Data Fig. 2d).

To evaluate the clinical relevance of the eIF4F complex in patients, we investigated its presence in 16 biopsy specimens (before and during anti-BRAF therapy) from 7 patients with metastatic melanoma (Supplementary

Table 4). Interestingly, sequencing of the tumours that were progressing revealed an acquired PI(3)K(Q546R) mutation in a metastasis from patient 6 (Supplementary Table 5) close to a recently described activating mutation (E545G) in PI(3)K that is associated with acquired resistance². We observed a decrease in eIF4F complex formation (as measured by the ratio of the eIF4E–eIF4G complex to the eIF4E–4EBP1 complex) in three out of four biopsy samples of responding tumours (Fig. 4 and Extended Data Fig. 10) compared with biopsy samples taken before therapy (baseline). By contrast, in all resistant tumours that were progressing under therapy, we found a clear increase in eIF4F complex formation compared with the baseline biopsy samples (Fig. 4 and Extended Data Fig. 10). Interestingly, patient 4 had two metastases with an early mixed response to vemurafenib treatment: one metastasis responding to treatment (meta. 1), and the other resisting treatment (meta. 2). While an increase in eIF4F was found in the resistant metastasis, no change was observed in the responding metastasis (Fig. 4b). Thus, a direct correlation was found between the response to treatment and the formation of eIF4F complexes, illustrating the *in vivo* association between sensitivity to anti-BRAF therapy and inhibition of the eIF4F complex. We found that the increase in eIF4F complex formation was

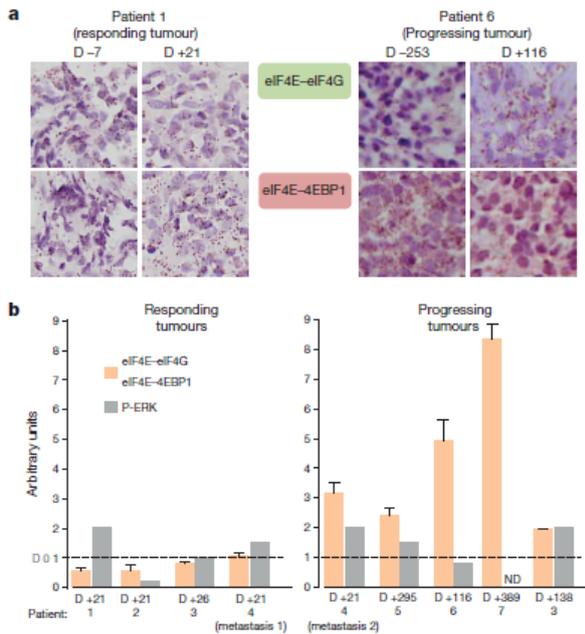


Figure 4 | Formation of the eIF4F complex in patients. **a**, eIF4E–eIF4G and eIF4E–4EBP1 interactions detected by PLA in samples from the indicated patients at the indicated times. The number corresponds to the day (D) of biopsy before (–) or after (+) treatment. Each brown spot represents an interaction. **b**, PLA quantification showing the ratio between the eIF4E–eIF4G interactions per 100 nuclei and the eIF4E–4EBP1 interactions per 100 nuclei, normalized to the same ratio before treatment (D 0) (mean \pm s.d.). Phosphorylated ERK (P-ERK) immunoreactivity was assessed semiquantitatively (grey bars).

more significantly associated with resistance than was the ERK phosphorylation level, which is conventionally investigated to explore resistance (Fig. 4b). This finding confirmed our *in vitro* data showing that the formation of the eIF4F complex was associated with resistance to vemurafenib in both ERK-dependent and ERK-independent resistance mechanisms. Using emerging technologies, such as ribosome profiling²¹, to examine the translation landscape of anti-BRAF and/or anti-MEK-sensitive and -resistant tumour cell lines should pave the way for an in-depth understanding of the contribution of genes that are regulated at the translational level in resistance mechanisms to targeted cancer therapies.

Online Content Methods, along with any additional Extended Data display items and Source Data, are available in the online version of the paper; references unique to these sections appear only in the online paper.

Received 19 December 2013; accepted 10 June 2014.

Published online 27 July 2014.

1. Lito, P., Rosen, N. & Solit, D. B. Tumor adaptation and resistance to RAF inhibitors. *Nature Med.* **19**, 1401–1409 (2013).
2. Shi, H. *et al.* Acquired resistance and clonal evolution in melanoma during BRAF inhibitor therapy. *Cancer Discov.* **4**, 80 (2014).
3. Tentori, L., Lacal, P. M. & Graziani, G. Challenging resistance mechanisms to therapies for metastatic melanoma. *Trends Pharmacol. Sci.* **34**, 656–666 (2013).

4. Blagden, S. P. & Willis, A. E. The biological and therapeutic relevance of mRNA translation in cancer. *Nature Rev. Clin. Oncol.* **8**, 280–291 (2011).
5. Silvera, D., Formenti, S. C. & Schneider, R. J. Translational control in cancer. *Nature Rev. Cancer* **10**, 254–266 (2010).
6. Shao, Y. & Aplin, A. E. BH3-only protein silencing contributes to acquired resistance to PLX4720 in human melanoma. *Cell Death Differ.* **19**, 2029–2039 (2012).
7. Thoreen, C. C. *et al.* A unifying model for mTORC1-mediated regulation of mRNA translation. *Nature* **485**, 109–113 (2012).
8. Cencic, R., Galicia-Vazquez, G. & Pelletier, J. Inhibitors of translation targeting eukaryotic translation initiation factor 4A. *Methods Enzymol.* **511**, 437–461 (2012).
9. Oikonomou, E., Koc, M., Sourkova, V., Andera, L. & Pintzas, A. Selective BRAFV600E inhibitor PLX4720, requires TRAIL assistance to overcome oncogenic PIK3CA resistance. *PLoS ONE* **6**, e21632 (2011).
10. Prahallad, A. *et al.* Unresponsiveness of colon cancer to BRAF(V600E) inhibition through feedback activation of EGFR. *Nature* **483**, 100–103 (2012).
11. Montero-Conde, C. *et al.* 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 (2013).
12. Packer, L. M., East, P., Reis-Filho, J. S. & Marais, R. Identification of direct transcriptional targets of ^{V600E}BRAF/MEK signalling in melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res.* **22**, 785–798 (2009).
13. Pratilas, C. A. *et al.* ^{V600E}BRAF is associated with disabled feedback inhibition of RAF-MEK signaling and elevated transcriptional output of the pathway. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **106**, 4519–4524 (2009).
14. Moerke, N. J. *et al.* Small-molecule inhibition of the interaction between the translation initiation factors eIF4E and eIF4G. *Cell* **128**, 257–267 (2007).
15. Bordeleau, M. E. *et al.* Therapeutic suppression of translation initiation modulates chemosensitivity in a mouse lymphoma model. *J. Clin. Invest.* **118**, 2651–2660 (2008).
16. Cencic, R. *et al.* Synergistic effect of inhibiting translation initiation in combination with cytotoxic agents in acute myelogenous leukemia cells. *Leuk. Res.* **34**, 535–541 (2010).
17. Sadlish, H. *et al.* Evidence for a functionally relevant rocaglamide binding site on the eIF4A–RNA complex. *ACS Chem. Biol.* **8**, 1519–1527 (2013).
18. Gupta, S. V. *et al.* Resistance to the translation initiation inhibitor silvestrol is mediated by ABCB1/P-glycoprotein overexpression in acute lymphoblastic leukemia cells. *AAPS J.* **13**, 357–364 (2011).
19. Liu, T. *et al.* Synthetic silvestrol analogues as potent and selective protein synthesis inhibitors. *J. Med. Chem.* **55**, 8859–8878 (2012).
20. Thuaud, F. *et al.* Synthetic analogue of rocaglamide displays a potent and selective cytotoxicity in cancer cells: involvement of apoptosis inducing factor and caspase-12. *J. Med. Chem.* **52**, 5176–5187 (2009).
21. Ingolia, N. T., Brar, G. A., Rouskin, S., McGeachy, A. M. & Weissman, J. S. The ribosome profiling strategy for monitoring translation *in vivo* by deep sequencing of ribosome-protected mRNA fragments. *Nature Protocols* **7**, 1534–1550 (2012).

Supplementary Information is available in the online version of the paper.

Acknowledgements The authors thank J. Tanaka for providing hippuristanol. We thank the following Gustave Roussy platforms: Imaging and Cytometry Platform IRCIV (S. Salome-Desmoulez), Module de Développement en Pathologie, SIRIC SOCRATE (J. Adam), Translational Research Laboratory and Biobank (M. Breckler and L. Lacroix), Plateforme d'évaluation Préclinique (P. Gonin and K. Ser-le Roux), Genomic Core Facility (N. Pata-Merci) and Bioinformatic Core Facility (G. Meurice). We also thank V. Camara-Clayette for help with ³⁵S experiments, S. Roy for patient data collection and L. Saint Ange for text editing. C.R. and S.V.'s team was supported by Institut National du Cancer (INCA), Association pour la Recherche sur le Cancer (ARC) and Ligue contre le Cancer via an Integrated Research Action Program Melanoma (PAIR Melanome), Cancéropôle Ile de France and Ensemble Contre le Mélanome. L.D. was supported by the Association pour la Recherche sur le Cancer (ARC). We also thank the ARC and AAREC Filia Research for fellowships to N.R. and C.B. O.H. was supported by the Wenner-Gren Foundation and the Swedish Society of Medicine.

Author Contributions L.B., H.M.-M., I.G., D.A., O.H., G.T., C.B., N.R., F.T., N.K.-K., S.A. and L.D. designed and performed experiments and analysed the data. C.M., E.R., M.T. and A.M.E. provided clinical samples and gave advice. S.V. and C.R. supervised all research, wrote the manuscript and are joint senior authors.

Author Information Microarray data have been deposited in the ArrayExpress database under accession number E-MTAB-2607. Reprints and permissions information is available at www.nature.com/reprints. Readers are welcome to comment on the online version of the paper. The authors declare competing financial interests: details are available in the online version of the paper. Correspondence and requests for materials should be addressed to C.R. (caroline.robert@gustaveroussy.fr) or S.V. (stephan.vagner@inserm.fr).

METHODS

Cell lines and reagents. The A375, Mel888, A2058, SK-MEL-28, SK-MEL-5 and Malme-3M melanoma cell lines used in this study were purchased from the ATCC. The Mel624 and Md10 cell lines were a gift from G. Lizee and L. Zitvogel, respectively. The BCPAP thyroid cancer cell line, HT-29 colorectal cancer cell line and MDA-MB-468 breast cancer cell line were gifts from C. Dupuy, S. Chouaib, and C. Nahmias, respectively. Cancer cell lines were maintained at 37 °C and 5% CO₂ in a humidified atmosphere and grown in RPMI 1640, MEM or DMEM growth media supplemented with 10% FBS, 2 mM glutamine, 50 U ml⁻¹ penicillin and 50 mg ml⁻¹ streptomycin (Gibco). The Malme-3M cells were grown in IMDM supplemented with 20% FBS. All cell lines were regularly verified to be mycoplasma-free using a PCR-based test (Biovalley). Genomic DNA was isolated using Genomic-Tips kits (QIAGEN), and the mutational status of *BRAF* (exons 11 and 15) and *NRAS* (exons 2 and 3), and other hotspot genes listed in Supplementary Table 1, was determined by direct sequencing of PCR amplification products.

Cells were treated with *BRAF* inhibitors (vemurafenib and dabrafenib), MEK inhibitors (trametinib and PD0325901), a MNK inhibitor (CGP 57380), an eIF4E-eIF4G interaction inhibitor (4EGI-1), eIF4A inhibitors (flavaglines and hippuristanol), rapamycin, doxorubicin or actinomycin D. All drugs were dissolved in dimethylsulphoxide (DMSO) for *in vitro* studies. Trametinib and dabrafenib were obtained from GlaxoSmithKline, and PLX4720 was obtained from Plexikon, without any financial support.

Proliferation analysis and Bliss index. Cell proliferation was measured using WST-1 reagent (Roche Applied Science). Melanoma cells were plated (5,000 cells per well) in 96-well tissue culture plates. After 24 h, the cells were treated with drugs or DMSO at the indicated concentrations, in triplicate. WST-1 reagent was added to the wells and incubated at 37 °C for 2 h before and after the treatment period of 48 h. The plates were then read at 450 nm on a Victor³ Multilabel Counter model 1420 (Perkin Elmer). Cell proliferation is expressed as percentage of the absorbance compared with mock-treated cells.

To evaluate the effect of vemurafenib in combination with other drugs, we compared the observed and expected responses obtained from combination treatment. The Loewe additivity model was used to predict the combined effect of each drug. The expected effect (E_{exp}) of the combination was estimated from each separate drug effect:

$$E_{exp} = E_{drug1} + E_{drug2} - (E_{drug1} \times E_{drug2}).$$

The observed:expected ratio was calculated according to the Bliss method. In this model, the excess above the predicted Bliss index represents the synergistic effect of the combination treatment. The Bliss index was calculated as the observed: expected ratio, where an index of 1, <0 or >1 indicates additive, antagonistic or synergistic effects, respectively.

Mel624 cells were treated for 48 h before the WST-1 assay with 6 mM 4EGI-1 or 8 nM FL3 and variable doses of vemurafenib, ranging from 25 nM to 12 μM.

Isobolograms represent the correlation between the observed and the expected effects of the combination of two drugs. The upper left region of the figure represents increasing degrees of synergy.

Clonogenic assays. For clonogenic assays, cells were plated at low density (1 × 10³ cells per well in 6-well tissue culture plates) in fresh media. After 24 h, cells were treated with drugs or DMSO at the indicated concentrations, in duplicate. After 14 days, cells were stained with 0.5% (w/v) crystal violet in 70% ethanol, and the number of colonies was counted.

Western blot analysis. Western blot analysis was performed on cell extracts of the indicated cell lines treated for 24 h (Fig. 2a, c) or 3 h (Fig. 2f) with the indicated concentrations of vemurafenib or PD0325901. Immunoblots were performed from whole cell lysate prepared using RIPA Buffer (Cell Signaling Technology) supplemented with dithiothreitol (DTT), phenylmethylsulphonyl fluoride (Sigma), and fresh protease and phosphatase inhibitors (Roche). Cell lysates were quantified for protein content using a bicinchoninic acid (BCA) protein assay kit (Thermo). Protein samples were resolved on NuPAGE 12% Bis-Tris gels with MOPS buffer or 3–8% Tris acetate gels with Tris acetate buffer (Life Technologies) and then transferred to 0.45-μm nitrocellulose membrane (Bio-Rad). After saturation in Tris-buffered saline buffer supplemented with 5% powdered milk, the membranes were incubated with antibodies (diluted at 1:1,000) overnight at 4 °C. Antibodies specific for the following proteins were purchased from Cell Signaling Technology: eIF4G (raised in rabbits, catalogue no. 2498), 4EBP1 (rabbit, clone 53H11, 9644), 4EBP1 phospho-S65 (rabbit, 9451L), eIF4E (rabbit, clone C46H6, 2067), eIF4A1 (rabbit, 2490), eIF4B (rabbit, 3592), eIF4B phospho-S422 (rabbit, 3591), eIF4G phospho-S1108 (rabbit, 2441), eIF4H (rabbit, clone D85F2, 3469), AKT (rabbit, 9272), AKT phospho-S473 (rabbit, clone D9E, 4060), ERK1/2 (rabbit, 9102) and ERK1/2 phospho-T202/Y204 (rabbit, clone 20G11, 4376). The antibody specific for eIF4E phospho-S209 (rabbit, clone EP2151Y, ab76256) was purchased from

Abcam. The antibody specific for GAPDH (mouse, clone 6C5, MAB374) was purchased from Millipore. The antibody specific for β-actin (rabbit, A5060) was purchased from Sigma. Horseradish peroxidase (HRP)-conjugated secondary antibodies were purchased from Sigma. Quantification of the bands was done with ImageJ. In most cases (except Fig. 2f), the displayed images were cropped to focus on the protein of interest.

In Fig. 2f, full-length eIF4G is observed at an apparent molecular weight of 220 kDa. The p120 and p150 fragments represent products from a single caspase-3 cleavage event in the amino-terminal and carboxy-terminal halves of eIF4G, respectively.

Cap-binding assay. eIF4F complex formation using the cap-binding assay was assessed in vemurafenib-treated (6 μM, 24 h) or untreated melanoma cell lines (A375, Mel888, Mel624 and A2058) (Fig. 1a). Cells were washed in cold PBS and lysed by three cycles of freezing at -80 °C and thawing on ice. Protein lysate (50 μg) was diluted in 200 μl 150 mM KCl, 50 mM HEPES, pH 7.5, 2 mM DTT, 0.2% Tween 20 and protease inhibitor cocktail. Lysates were incubated for 3 h with m⁷GTP-Sepharose 4B reconstituted beads (GE Healthcare, A mersham). Eluates and total cell lysates were used for immunoblotting.

Metabolic labelling. A375 cells were plated at 2.5 × 10⁵ cells in 6-well plates and incubated for 24 h. Cells were then treated with vemurafenib (3 or 24 h) or with 100 μg ml⁻¹ cycloheximide (15 min). After washing with methionine/cysteine-free DMEM (Gibco) supplemented with 10% dialysed FBS, cells were incubated with 11 μCi μl⁻¹ EasyTag EXPRESS³⁵S Protein Labeling Mix (Perkin Elmer) in the presence of drugs in methionine/cysteine-free DMEM for 30 min. After washing with PBS, the cells were harvested in RIPA Buffer. The lysates were centrifuged at 12,000 r.p.m. (4 °C) and spotted onto Whatman 3MM filter paper. The proteins were precipitated with cold 10% trichloroacetic acid (TCA) solution for 15 min followed by 5% TCA solution for 10 min. The filters were then washed with 95% ethanol and air dried. The radioactivity was measured by scintillation counting and normalized to protein content.

Proximity ligation assay. Interactions between eIF4E and eIF4G (eIF4E-eIF4G) or eIF4E and 4EBP1 (eIF4E-4EBP1) were detected by *in situ* proximity ligation assay (PLA) in melanoma cell lines treated with 6 μM vemurafenib or untreated (Fig. 1b, 24 h treatment; Fig. 2g, 3 h treatment). The BRAF-CRAF interaction was detected by PLA in the Malme-3M melanoma cell line and its vemurafenib-resistant counterpart (R-Malme-3M) after treatment with vemurafenib (6 μM, 24 h) or no treatment (Fig. 2b). PLAs were performed on both fixed, permeabilized cells and on melanoma tissue sections. Following dewaxing and rehydration of tissue sections, antigen retrieval was performed by heating the slides for 30 min at 95 °C in Tris-EDTA buffer, pH 9. From this point, the tissue sections and the fixed, permeabilized cells were treated identically, and the PLA protocol was followed according to the manufacturers' instructions (Olink Bioscience), with incubation of the primary antibodies at 4 °C overnight. After blocking, the antibodies were used at the following concentrations: for eIF4E (mouse, clone A-10, catalogue number SC-271480, Santa Cruz Biotechnology, 1:200); for eIF4G (rabbit, 2498; Cell Signaling Technology, 1:200); for 4EBP1 (rabbit, clone 53H11, 9644, Cell Signaling Technology, 1:200). PLA minus and PLA plus probes (containing the secondary antibodies conjugated to oligonucleotides) were added and incubated for 1 h at 37 °C. More oligonucleotides were then added and allowed to hybridize to the PLA probes. Ligase was used to join the two hybridized oligonucleotides into a closed circle. The DNA was then amplified (with rolling circle amplification), and detection of the amplicons was carried out using the Brightfield detection kit for chromogenic development or using the Far Red detection kit for fluorescence. Cell nuclei were stained with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI). The sections were mounted with Olink Mounting Medium. The first results were visualized by confocal microscopy (Leica SPE), and the analysis was supported by Velocity software. To improve the sensitivity of the fluorescence detection, we next used a scanner (Olympus VS120) (magnification 20×; 2-ms exposure for the DAPI channel and 300-ms exposure for the Cy5 channel; 1 pixel = 0.32 μm), and the number of PLA signals per cell was counted (more than three fields) by semi-automated image analysis (ImageJ and OlyVIA).

Polysomal fractionation and microarray experiment. Sucrose density gradient centrifugation was used to separate the subpolysomal and the polysomal ribosome fractions. Fifteen minutes before collection, cells were incubated at 37 °C with 100 μg ml⁻¹ cycloheximide added to the culture medium. Next, cells were washed, scraped into ice-cold PBS supplemented with 100 μg ml⁻¹ cycloheximide, centrifuged at 3,000 r.p.m. for 5 min and then collected into 400 μl of LSB buffer (20 mM Tris, pH 7.4, 100 mM NaCl, 3 mM MgCl₂, 0.5 M sucrose, 2.4% Triton X-100, 1 mM DTT, 100 U ml⁻¹ RNasin and 100 μg ml⁻¹ cycloheximide). After homogenization, 400 μl LSB buffer supplemented with 0.2% Triton X-100 and 0.25 M sucrose was added. Samples were centrifuged at 12,000g for 10 min at 4 °C. The resultant supernatant was adjusted to 5 M NaCl and 1 M MgCl₂. The lysates were loaded onto a 15–50% sucrose density gradient and centrifuged in an SW41 rotor at 38,000 r.p.m. for 2 h at 4 °C. Polysomal fractions were monitored and collected using a gradient fractionation system (Isco). Total RNA was extracted from the four heaviest fractions

and the input samples using the TRIzol–chloroform method. Microarray experiments were performed in quadruplicate using Human Gene Expression 8×60 K arrays (Agilent). Microarray data are available in the ArrayExpress database under accession number E-MTAB-2607.

For quantitative reverse transcription PCR (qRT–PCR) experiments, total RNA was extracted by the TRIzol–chloroform method from 300 µl of each fraction (1–16). cDNA was prepared using SuperScript III Reverse Transcriptase (Invitrogen) with random hexamer primers according to the manufacturer's instructions. The same volume of cDNA from each fraction was used to perform qPCR experiments.

RNA extraction and qPCR. Total RNA was extracted using the TRIzol–chloroform extraction method. Samples were digested with DNase I (Turbo DNA free, Ambion). The quality of RNAs was assessed using a Bioanalyzer instrument (Agilent) and then quantified using a NanoDrop 1000 instrument (Thermo Scientific). cDNA was prepared using SuperScript III Reverse Transcriptase with random hexamer primers according to the manufacturer's instructions. Transcript abundance was determined by qPCR using SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) with the primers indicated in Supplementary Table 7. Data were analysed by the three threshold cycle (Ct) comparative method and normalized to the *TBP* gene. Relative expression of *BMF* mRNA (as determined by qRT–PCR) was assessed in vemurafenib-treated (6 µM for 3 h) or control cell lines (Fig. 2e).

RNA interference. Cells were transfected with 20 nM of each siRNA using Lipofectamine RNAiMAX Reagent (Life Technologies) following the supplier's instructions. siRNAs were purchased from Thermo Scientific (ON-TARGETplus SMARTpool technology). The sequences of the siRNAs are shown in Supplementary Table 6.

Dual luciferase reporter assays. Dual luciferase assays were conducted in A375 cells transfected with 50 ng pR–HepC–L bicistronic vector in 96-well plates using Lipofectamine 2000 reagent (Life Technologies) and treated for 16 h with three concentrations of each of the indicated flavaglines (formulae in Supplementary Notes). The lysates were prepared in triplicate with the Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega), and 12 µl firefly and *Renilla* bioluminescence lysates were measured with the GloMax 96 Microplate Luminometer (Promega) ($n = 3$).

Mouse xenograft study. Animals were housed under pathogen-free conditions with food and water *ad libitum*. Experiments were performed in accordance with the CCAC

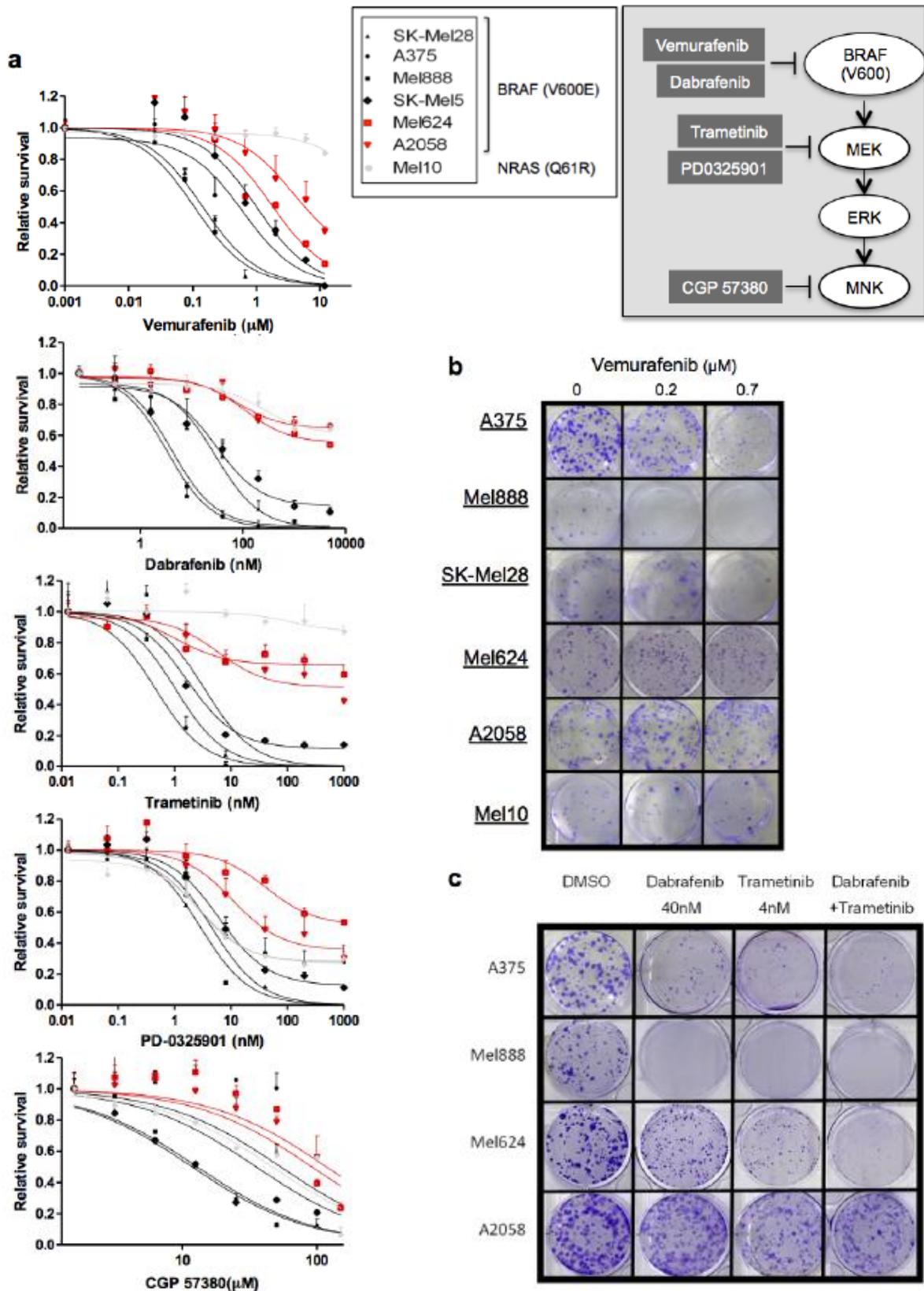
guidelines and approved by the ethical committee of the Plateforme d'évaluation Préclinique of Gustave Roussy. Animals were allocated to experimental groups so that the groups had similar mean tumour volumes at day 0 of treatment. The investigator was not blinded to the group allocation or when assessing the outcome. Female Swiss nude (athymic) mice were purchased from the animal facility of Gustave Roussy. At the age of 6–8 weeks, they were injected subcutaneously in the right flank with 5×10^6 A375 cells in 200 µl PBS or 5×10^6 Mel624 cells in 200 µl PBS and 50% Matrigel (BD Biosciences). When tumours reached an average volume of 100–300 mm³, mice were fed with the control rodent diet or 90 (low dose), 200 (medium dose) or 417 (high dose) mg of the vemurafenib analogue PLX4720 (Plexikon) per kg body weight. FL3 (15 mg per kg body weight) was injected intraperitoneally each day for 13 days. FL3 was dissolved in DMSO to make a 27.5 mg ml⁻¹ stock solution and then diluted in PBS containing 5% Kolliphor (Sigma) just before injection. Tumour growth was monitored twice a week in two dimensions using a digital caliper. Tumour volumes were calculated with the ellipsoid volume formula $L \times w^2 \times 0.5$, where L is length and w is width.

Clinical samples. Patients with metastatic melanoma harbouring a BRAF(V600) mutation were treated with a BRAF inhibitor, vemurafenib or dabrafenib. Patients had received appropriate information and signed an informed consent form authorizing tumour biopsies and molecular studies in the context of an institutional CRB-approved protocol (MSN-08-027). Tumours were biopsied before treatment, at various time points after treatment initiation, as well as on progression.

Notably, patient 4 had a mixed response 21 days after initiation of anti-BRAF treatment (metastasis 1 was responding while metastasis was growing). Patient 3 had a biopsy performed at day 26 during clinical response and at day 138 when relapsing.

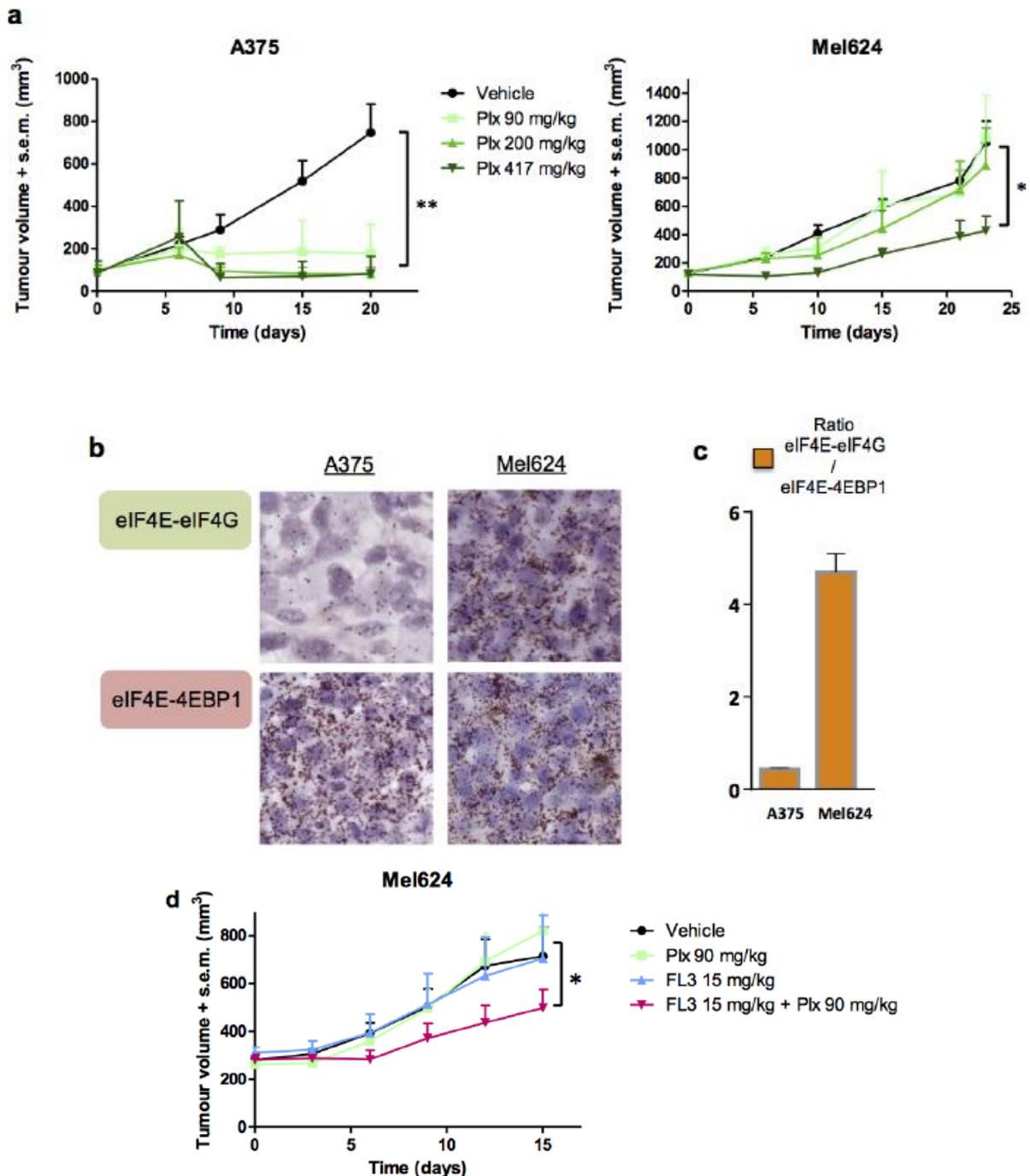
Immunohistochemistry. Deparaffinized tissue sections were treated with Antigen Retrieval Solution (made from citrate buffer, pH 6.0, concentrated 10×, T0050 Diapath). Tissue sections were then incubated with Peroxidase Blocking Solution (S2023, Dako) for 15 min and Protein Block (X0909, Dako) for 20 min. Primary antibody specific for phospho-T202/Y204 ERK1/2 (rabbit, clone 20G11, 4376, Cell Signaling Technology) was applied, and the slides were incubated overnight at 4 °C. Signals were visualized using rabbit HRP-conjugated secondary antibody (K4003, Dako) and a haematoxylin (MHS32, Sigma) counterstain.

2. Figures supplémentaires



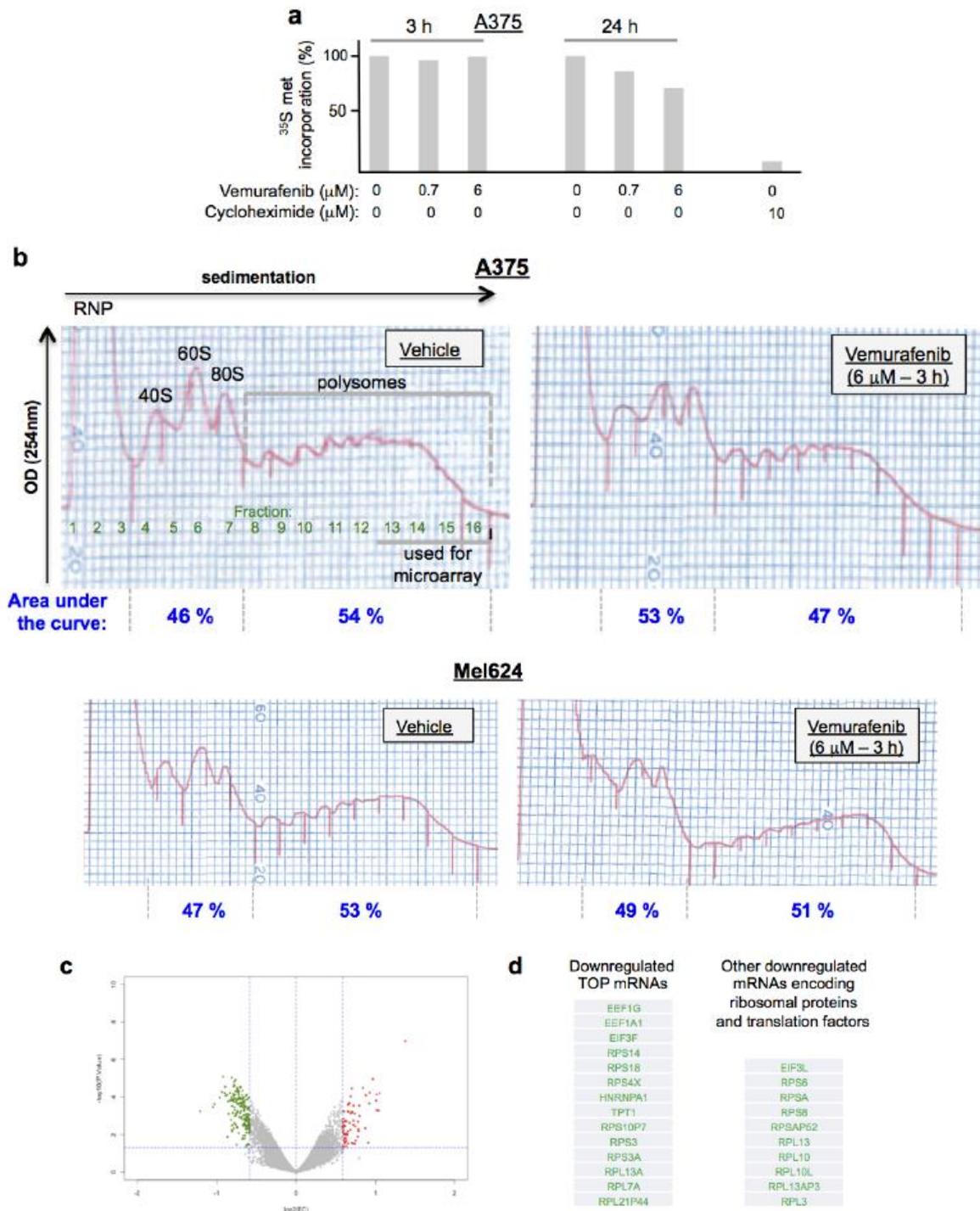
Extended Data Figure 1 | Sensitivity of melanoma cell lines to anti-BRAF, anti-MEK or anti-MNK inhibitors. a, Short-term growth-inhibition assay of the indicated cell lines (SK-MEL-28, A375, Mel888, SK-MEL-5, A2058, Mel624 and Mel10) treated with increasing concentrations of vemurafenib, dabrafenib, PD0325901, trametinib and CGP 57380 for 48 h. The Mel10 cell line does not have a mutated *BRAF* gene and was used as a control

vemurafenib-insensitive cell line. Cell viability was determined using the WST-1 cell proliferation assay. The data are presented as the mean \pm s.d. ($n = 3$). b, c, Long-term colony formation assay of the indicated cell lines. Cells were grown in the absence or presence of vemurafenib (b) or dabrafenib and trametinib (c) at the indicated concentrations for 2 weeks. For each cell line, all dishes were fixed at the same time, stained and photographed.



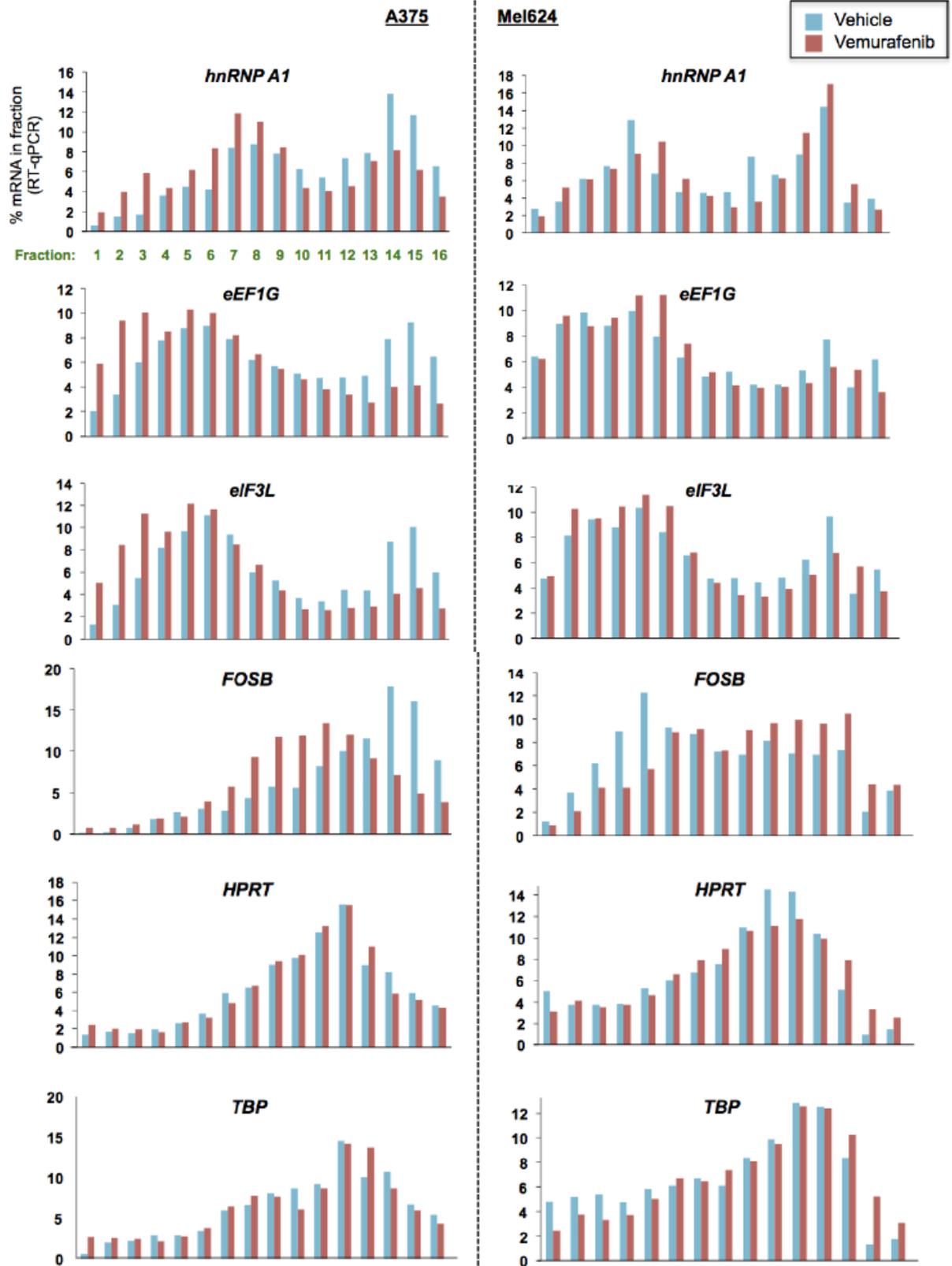
Extended Data Figure 2 | Xenograft study. **a**, Growth of A375 and Mel624 cells as tumour xenografts in nude mice treated with vehicle or increasing concentrations of PLX4720 (Plx). Mean tumour volumes + s.e.m. are shown (vehicle and 200 mg Plx per kg body weight groups of A375- and Mel624-xenografted mice comprised 4 mice; 90 mg and 417 mg Plx per kg body weight groups of A375-xenografted mice comprised 3 mice; 90 mg and 417 mg Plx per kg body weight groups of Mel624-xenografted mice comprised 5 mice). Significance was determined by one-sided Mann-Whitney U test (*, $P < 0.05$; ** $P < 0.01$). **b**, Interactions between eIF4E and eIF4G (eIF4E-eIF4G) or eIF4E and 4EBP1 (eIF4E-4EBP1) detected by *in situ* proximity ligation assay (PLA) in paraffin-embedded tissue sections of A375 and Mel624 xenografts from Plx-treated mice. The interactions were visualized as brown spots.

c, Quantification of the PLA showing the ratio between the number of purple spots corresponding to the eIF4E-eIF4G interaction per 100 nuclei and the number of purple spots corresponding to the eIF4E-4EBP1 interaction per 100 nuclei, normalized to the same ratio before treatment. Error bars, s.d. **d**, Growth of Mel624 cells as tumour xenografts in nude mice treated with vehicle, a low dose of Plx alone, FL3 alone or a combination of Plx and FL3. FL3 treatment was stopped after 13 days. The data are presented as the mean + s.e.m. (Vehicle, 15 mg FL3 per kg body weight, and 90 mg Plx per kg body weight plus 15 mg FL3 per kg body weight groups comprised 6 mice; 90 mg Plx per kg body weight group comprised 3 mice.) Significance was determined by one-sided Mann-Whitney U test (*, $P < 0.05$).



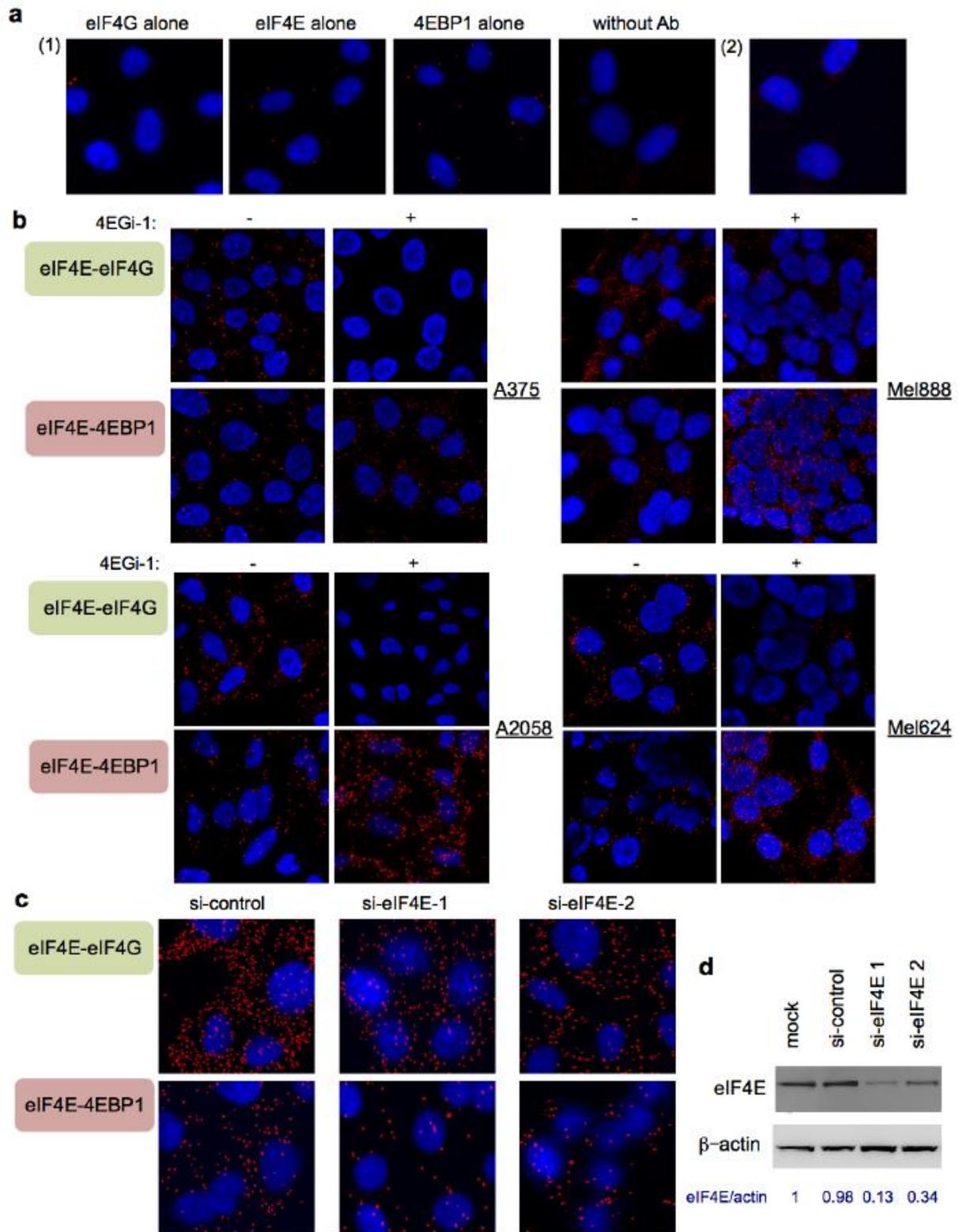
Extended Data Figure 3 | Protein synthesis rates and polysome profiles.
a. Protein synthesis rates were determined in A375 cells treated for the indicated times (3 or 24 h) with vehicle (dimethylsulphoxide (DMSO)) or 0.7 or 6 μM vemurafenib or for 15 min with 10 μM cycloheximide. Cells were then pulsed for 30 min with [³⁵S]Cys/Met, and the incorporation of ³⁵S into proteins was quantified and normalized to the total protein amount. The data are presented as the mean (*n* = 2). **b.** Polysome profiles of A375 and Mel624 cells treated with DMSO or 6 μM vemurafenib for 3 h. The area under the curve was

measured with ImageJ software. OD, optical density; RNP, ribonucleoparticle.
c. Volcano plot showing a subset of 251 mRNAs that were differentially translated between vemurafenib-treated and untreated A375 cells. Of these 251 mRNAs, 73 were overexpressed (red), and 178 were underexpressed (green).
d. A table showing some of the genes that encode mRNAs whose translation is inhibited by vemurafenib in A375 cells (see also Supplementary Table 2). These mRNAs belong to the TOP mRNA class, the members of which contain a TOP motif and/or encode translation factors and ribosomal proteins.



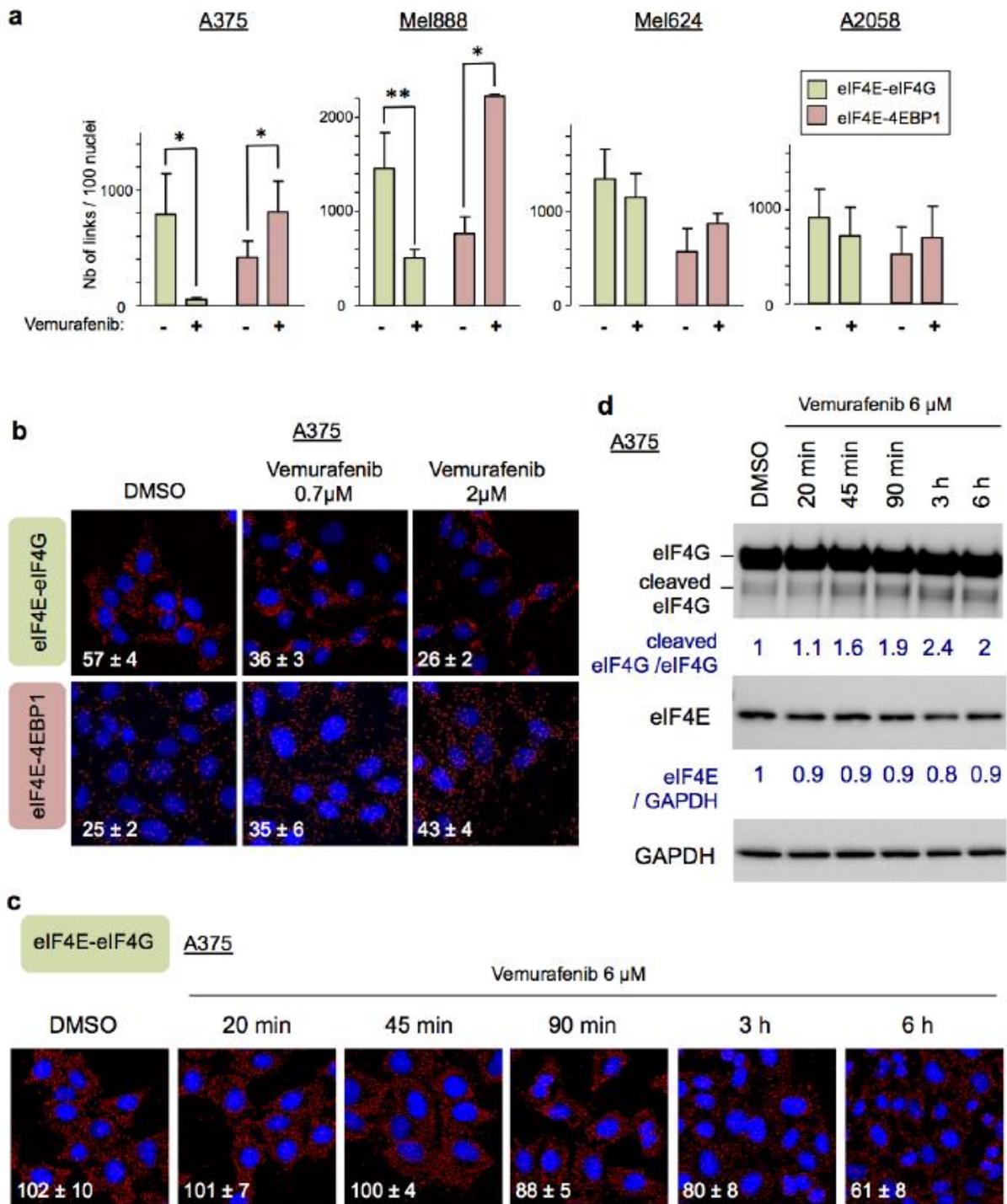
Extended Data Figure 4 | Translation of selected mRNAs in vemurafenib-treated melanoma cell lines. The abundance of *EEF1G*, *HNRNPA1*, *EIF3L*, *FOSB*, *TBP* (control) and *HPRT* (control) transcripts in fractions from

Extended Data Fig. 3b were quantified by quantitative reverse transcription PCR (qRT-PCR). The percentage of each mRNA in each fraction was calculated.



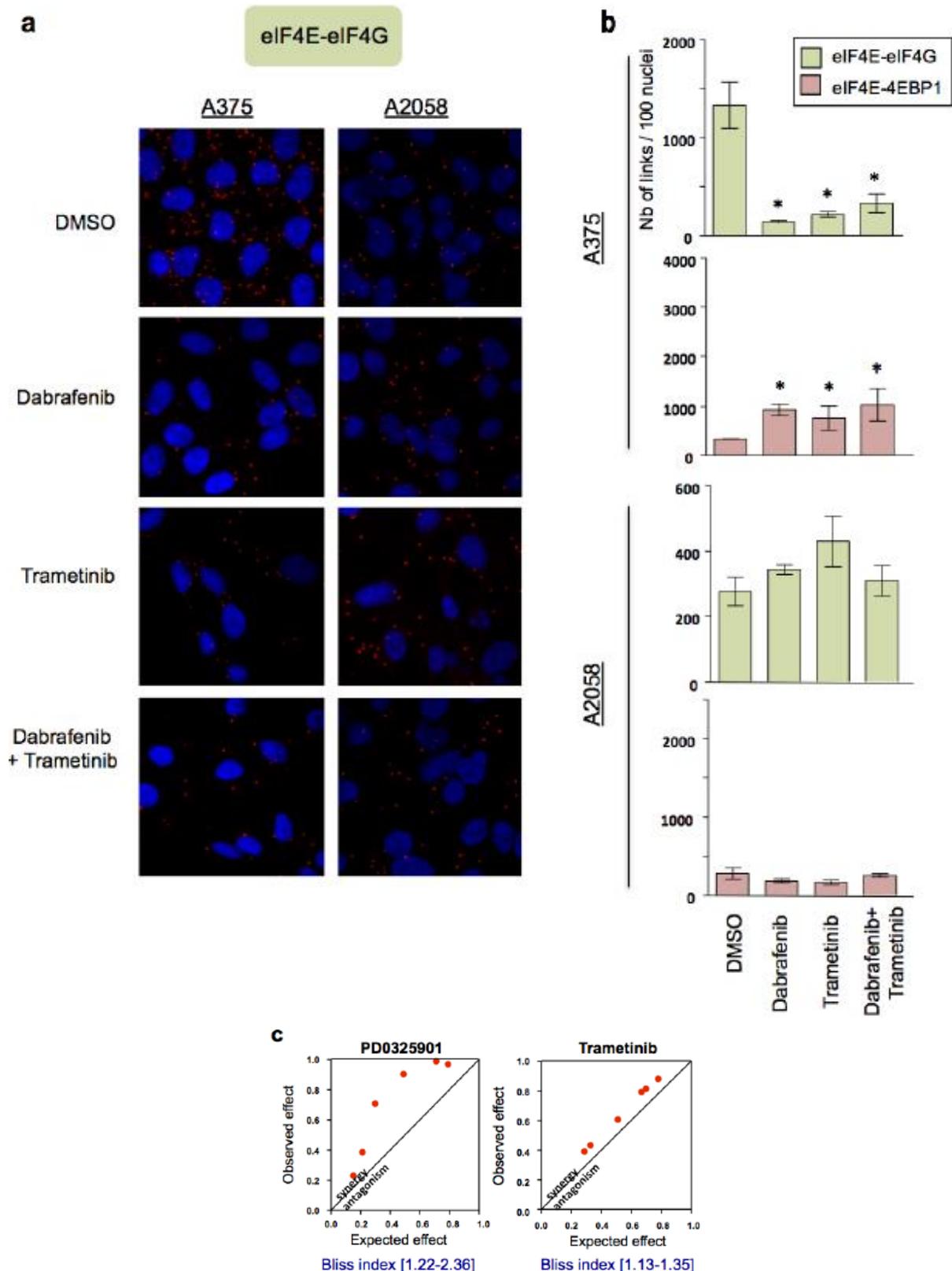
Extended Data Figure 5 | Formation of the eIF4F complex using a PLA procedure. **a**, The specificity of the PLA was evaluated by omitting one of the two primary antibodies or the two primary antibodies and by omitting the minus and plus PLA probes. **b**, The interactions between eIF4E and eIF4G (eIF4E-eIF4G) and eIF4E and 4EBP1 (eIF4E-4EBP1) detected by *in situ* PLA in the indicated cell lines treated for 24 h with the small molecule inhibitor 4EGI-1, which disrupts eIF4E-eIF4G interaction¹⁴. The interactions were

visualized as red fluorescent spots. Cell nuclei were stained with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (blue). **c**, The interactions between eIF4E and eIF4G (eIF4E-eIF4G) or eIF4E and 4EBP1 (eIF4E-4EBP1) detected by *in situ* PLA in siRNA-mediated eIF4E-depleted A375 cells. The interactions were visualized as red fluorescent spots. The cell nuclei were stained with DAPI (blue). **d**, Western blot analysis with antibodies specific for eIF4E and β -actin, to evaluate siRNA-mediated depletion of eIF4E.



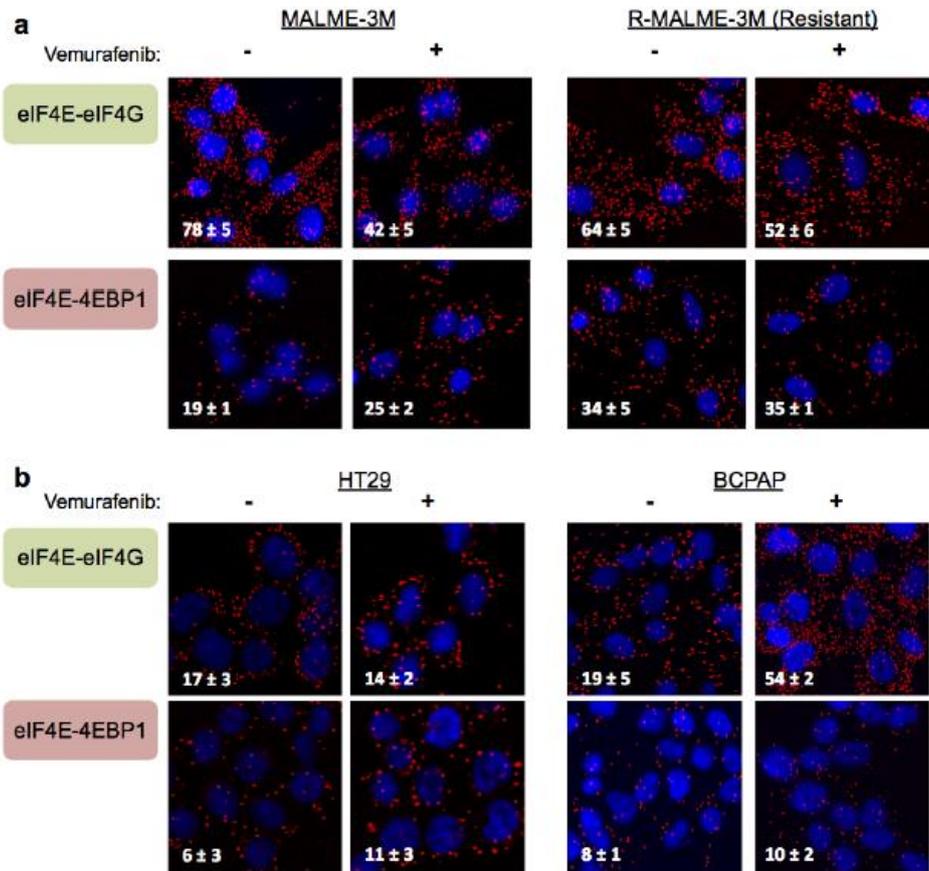
Extended Data Figure 6 | Formation of the eIF4F complex in vemurafenib-treated melanoma cell lines and analysis of eIF4G cleavage. **a**, Quantification of the PLA showing the number of red spots (corresponding to eIF4E-eIF4G or eIF4E-4EBP1 interactions) per 100 nuclei (quantified with Volocity software). The data are presented as the mean \pm s.d. ($n = 3$). Significance was determined by Mann-Whitney U test (*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$). **b**, The interactions between eIF4E and eIF4G (eIF4E-eIF4G) or eIF4E and 4EBP1 (eIF4E-4EBP1) detected by *in situ* PLA in A375 cells treated for 24 h with vemurafenib at the indicated concentrations. The interactions were visualized as red fluorescent spots. The cells were counterstained with DAPI (blue). White

numbers correspond to means, and error bars are derived from three replicates. **c**, Time course of the interactions between eIF4E and eIF4G (eIF4E-eIF4G) detected by *in situ* PLA in response to the treatment of A375 cells with 6 μ M vemurafenib. The interactions were visualized as red fluorescent spots at the indicated times. **d**, A375 cells were treated (or not treated) with 6 μ M vemurafenib and collected at the indicated times for western blot analysis with antibodies specific for eIF4G, eIF4E and GAPDH. The cleaved eIF4G:full-length eIF4G density ratio and the eIF4E:GAPDH density ratio (indicated in blue for each time point) were quantified by densitometric scanning of the blots followed by ImageJ analysis.



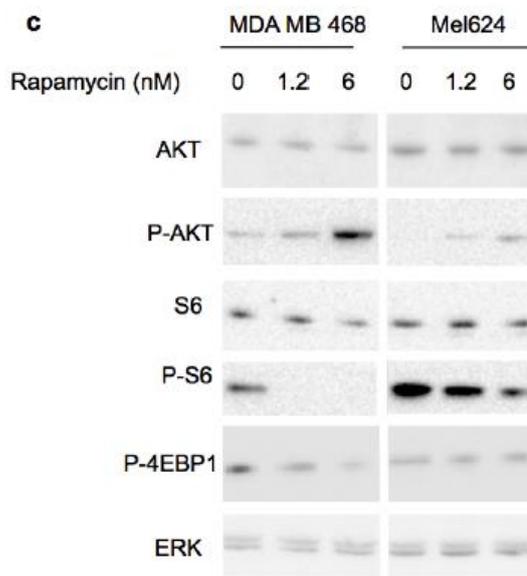
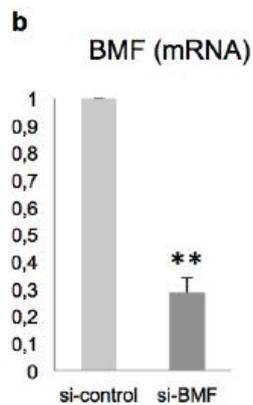
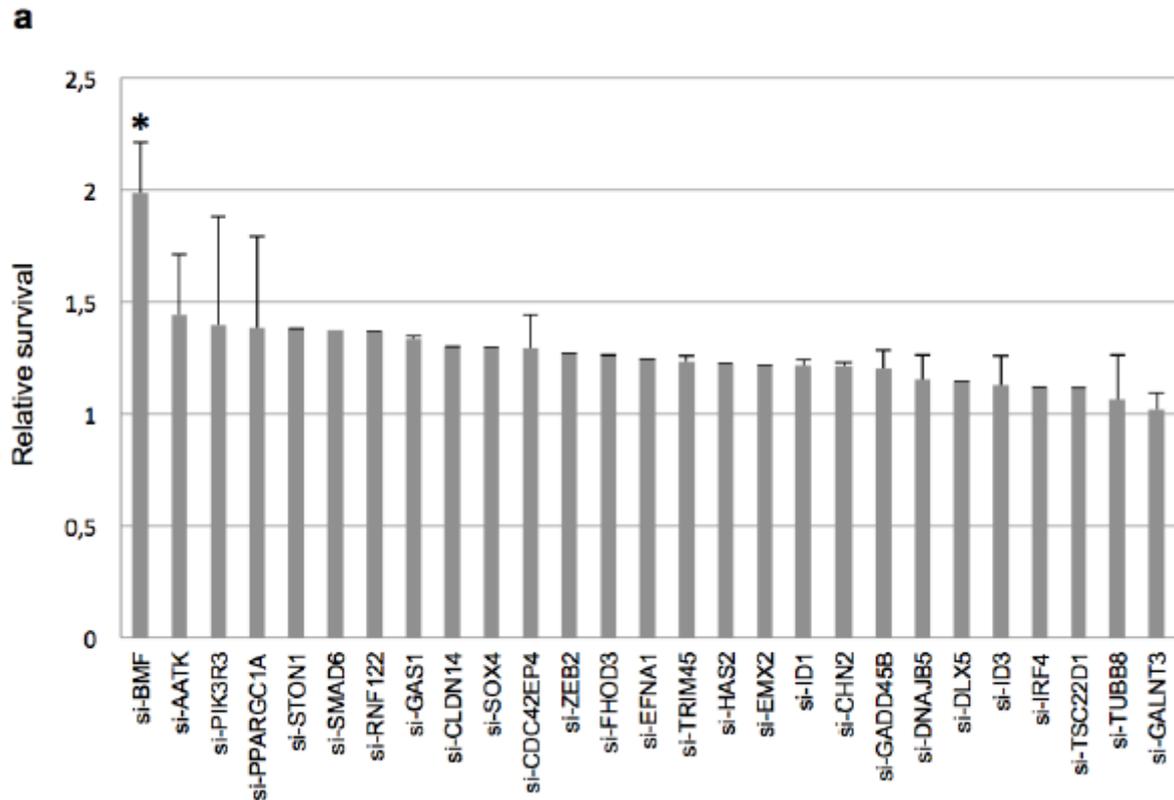
Extended Data Figure 7 | Formation of the eIF4F complex in anti-BRAF and anti-MEK treated melanoma cell lines and analysis of the synergistic effect of FL3 and anti-MEK compounds. a, The interactions between eIF4E and eIF4G (eIF4E-eIF4G) detected by *in situ* PLA in A375 and A2058 cell lines treated for 24h with dabrafenib, trametinib or a combination of dabrafenib and trametinib. The interactions were visualized as red fluorescent spots with confocal microscopy (Leica SPE). Cell nuclei were stained with DAPI (blue). b, Quantification of the PLA results showing the number of red spots (corresponding to the eIF4E-eIF4G or eIF4E-4EBP1 interactions) per 100 nuclei calculated with Volocity software. The data are presented as the

mean \pm s.d. ($n = 3$). Significance was determined by the Mann-Whitney U test (*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$). c, Isobolograms showing the correlation between the observed and expected effects of the combination of MEK inhibitors (such as PD0325901 or trametinib) and FL3 on the Mel624 cell line. The upper left region of the figure represents increasing degrees of synergy. The minimum and maximum Bliss index values are shown as an interval within square brackets under each isobologram. The Bliss index was calculated as the ratio observed:expected, where 1, < 0 or > 1 indicate additive, antagonistic or synergistic effects, respectively.



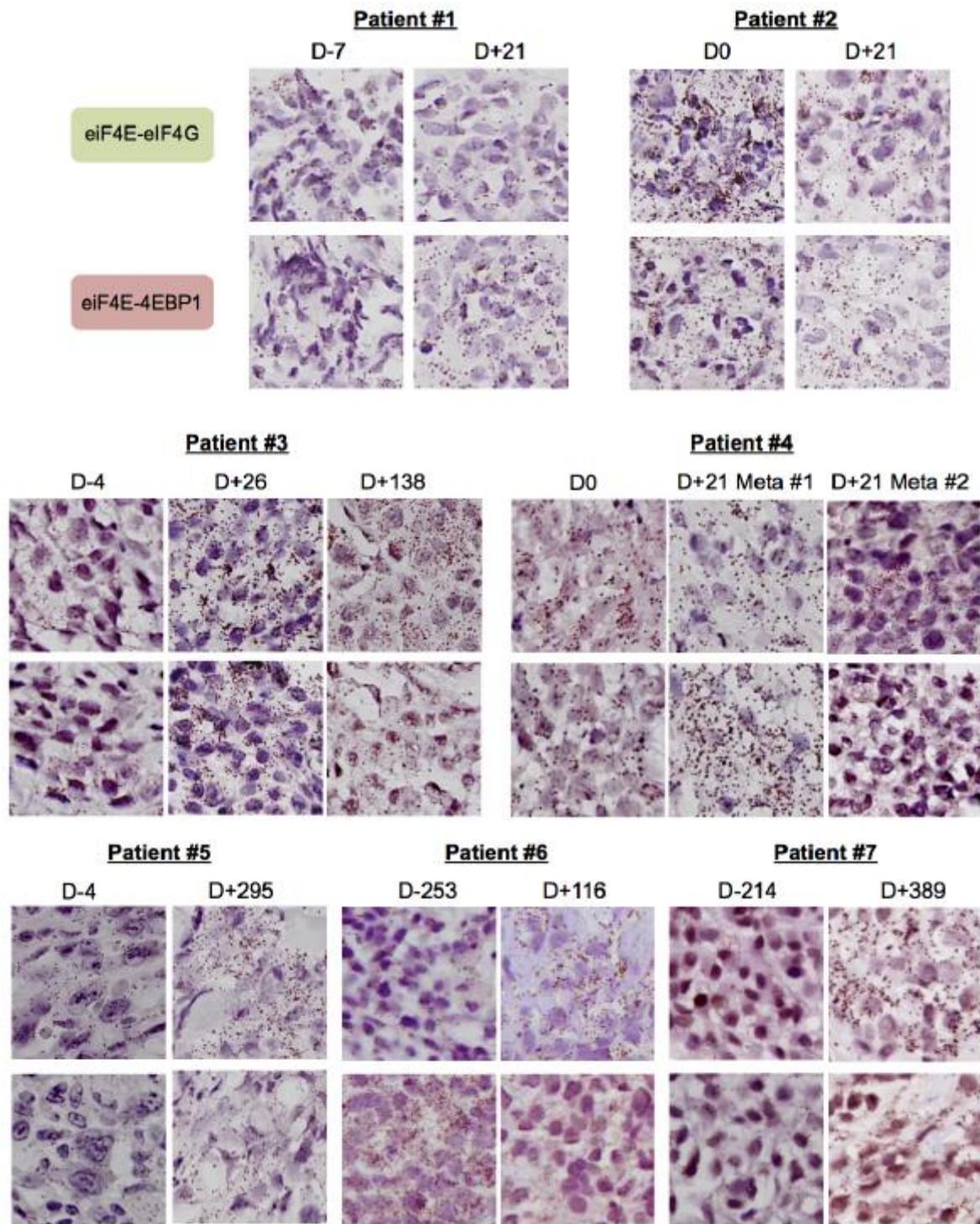
Extended Data Figure 8 | Formation of the eIF4F complex in various vemurafenib-treated cell lines. a, The eIF4E-eIF4G and eIF4E-4EBP1 interactions detected by *in situ* PLA in the Malme-3M melanoma cell line and its vemurafenib-resistant counterpart (R-Malme-3M) after treatment with 6 μ M vemurafenib (24h) or no treatment. The interactions were visualized as red fluorescent spots. Cell nuclei were stained with DAPI (blue). White

numbers correspond to the mean \pm s.d. derived from three replicates quantified with ImageJ. b, The eIF4E-eIF4G and eIF4E-4EBP1 interactions detected by *in situ* PLA in the HT-29 colon cancer cell line and the BCPAP thyroid cancer cell line treated with 6 μ M vemurafenib (24h) or untreated. The interactions were visualized as red fluorescent spots. Cell nuclei were stained with DAPI (blue).



Extended Data Figure 9 | Involvement of BMF in relative resistance to vemurafenib and analysis of rapamycin effects on AKT, S6 and 4EBP1 phosphorylation. **a**, Relative proliferation of A375 cells after siRNA-mediated depletion of 27 mRNAs associated with the result in Fig. 2d. The data are presented as the mean \pm s.d. ($n = 3$). Significance was determined by Student's t -test (*, $P < 0.05$). **b**, Relative expression of *BMF* mRNA (as determined by

qRT-PCR) after siRNA-mediated depletion of *BMF* (si-BMF) in A375 cells. Data are presented as the mean \pm s.d. ($n = 3$). Significance was determined by Student's t -test (**, $P < 0.01$). **c**, Western blot analysis with antibodies specific for phosphorylated (P-) and/or total AKT, S6, 4EBP1 and ERK1/2 (ERK) on cell extracts of the MDA-MB-468 breast cancer and Mel624 melanoma cell lines treated for 24 h with the indicated concentrations of rapamycin.



Extended Data Figure 10 | Formation of the eIF4F complex in each of the tumour samples from seven patients. The eIF4E-eIF4G and eIF4E-4EBP1 interactions detected by *in situ* PLA in tumour samples collected from each

patient (patient 1 to 7), before and during vemurafenib or dabrafenib treatment. Each brown spot represents an interaction.

C. Discussion

Dans ce travail, nous avons identifié un nouveau biomarqueur de résistance aux inhibiteurs de BRAF, visualisable par PLA. Pour optimiser la réponse tumorale aux thérapies ciblées, qui constituent un traitement de choix des mélanomes métastatiques mutés, et dont l'indication ne cesse de s'étendre à d'autres cancers, nous proposons d'y associer un inhibiteur de l'initiation de la traduction cap-dépendante.

1. Quel est l'effet de l'inhibition de l'initiation de la traduction cap-dépendante sur la synthèse protéique générale ?

Une question légitime, fréquemment soulevée lors de la présentation de nos résultats, aussi bien à l'occasion de séminaires que lors de la soumission de l'article au journal Nature, était de savoir comment prouver que nos modèles résistants au vemurafenib, résistaient bien par l'intermédiaire du maintien de l'initiation de la traduction cap-dépendante, par opposition à une inhibition de toute la synthèse protéique dans les cellules sensibles. Pour répondre à cette question, l'expérience d'incorporation de méthionine ³⁵S, dont les résultats sont présentés dans la figure supplémentaire 3a (Hélène Malka-Mahieu), a été d'un intérêt majeur. Cette expérience a ainsi montré que l'incorporation de méthionine ³⁵S n'était pas affectée après 3 heures d'exposition au vemurafenib, mais diminuait après 24 heures de traitement. Or les régulations traductionnelles fines observées par RTq PCR, sur la quantité des différents ARNm testés, en cours de traduction dans les fractions de polysomes, ont bel et bien été observées dès 3 heures de traitement (Figure supplémentaire 4). Nous avons ainsi démontré que l'initiation de la traduction de certains ARNm était différentiellement régulée selon la sensibilité ou la résistance de nos cellules par rapport au vemurafenib.

Pour aller plus loin dans l'exploration de la régulation de la traduction dans ce contexte, il reste plusieurs domaines à explorer. Premièrement, il serait intéressant d'étudier les conséquences fonctionnelles des variations traductionnelles de tel ou tel ARNm, par exemple en termes d'apoptose, d'invasion, de migration ou d'angiogenèse.

Deuxièmement, comme nous l'avons fait sous vemurafenib, nous pourrions aussi étudier les régulations traductionnelles fines par RTq PCR, sur la quantité d'ARNm en cours de

traduction dans les fractions de polysomes, après exposition aux flavaglines, seules ou en synergie avec le vemurafenib. Dans notre article, l'extraction des polysomes en fonction de leur densité était suivie d'une RTq PCR de chaque fraction obtenue. Dans la même optique, une méthode plus moderne et plus sensible que celle que nous avons utilisée ici serait de réaliser un « ribosome profiling ». Le « ribosome profiling », technique développée en 2009 par Nick Ingolia et Jonathan Weissman, a l'avantage de définir avec une très haute résolution (au nucléotide près) les fragments d'ARNm en cours de traduction³⁰⁰. Un « ribosome profiling » de nos lignées sensibles et résistantes, avec ou sans vemurafenib, et/ou avec ou sans flavaglines, nous apportera des informations très précises sur la traduction effectivement en cours dans chacune des conditions, tous ARNm confondus.

Dans ce travail de thèse, nous avons testé sur nos modèles de mélanome résistants aux inhibiteurs de BRAF les flavaglines synthétisées par l'équipe du Dr Laurent Désaubry à l'université de Strasbourg. Celui-ci a en effet pu nous fournir des quantités suffisantes de flavaglines pour montrer leur efficacité *in vivo*. Cependant il existe de nombreux autres inhibiteurs de l'initiation de la traduction cap-dépendante, décrits dans le paragraphe II-A-4. Il reste nécessaire de comparer l'efficacité de nos flavaglines avec celle des autres inhibiteurs connus. En ce sens, l'avancée technologique que représente le « ribosome profiling » devrait permettre de comparer tous ces inhibiteurs, afin de choisir celui dont les effets traductionnels seront les plus spécifiques et adaptés à l'effet anti-tumoral recherché.

2. Extrapolation à d'autres contextes de résistance tumorale

Il est probable que la synergie observée entre les flavaglines et les inhibiteurs de BRAF, démontrée dans notre article, soit aussi retrouvée entre les flavaglines et les inhibiteurs de MEK, dans le contexte des cancers porteurs d'une mutation oncogénique de *RAS*. Il s'agirait alors d'une autre combinaison thérapeutique applicable aux mélanomes mutés *NRAS* bien-sûr (20% des mélanomes environ), mais aussi à d'autres types de cancers. Ce nouveau projet est en cours dans notre équipe de recherche.

Plus largement, l'intérêt de coupler les flavaglines aux inhibiteurs de RTK, et/ou aux inhibiteurs de la voie PI3K / Akt / mTor utilisés dans divers cancers, pourrait être étudié dans un second temps.

Enfin, il existe un autre type de traitement face auquel le mélanome est particulièrement résistant : la radiothérapie³⁰¹. Il serait donc particulièrement intéressant d'étudier l'état du complexe eIF4F dans les cellules de mélanome exposées à de la radiothérapie, par exemple aux doses de 2 et 5 Gy, couramment utilisées sur des cultures cellulaires *in vitro*. En 2012, Badura et al. ont montré que la réponse aux dommages à l'ADN induite par les rayons ionisants, dans les cellules de cancer du sein, dépend de la traduction sélective de certains ARNm, régulée par les taux d'eIF4G1³⁰². L'augmentation de l'expression d'eIF4G1 dans ces cellules augmentait préférentiellement la traduction d'ARNm impliqués dans la survie cellulaire et la réponse aux dommages à l'ADN, en limitant l'autophagie et l'apoptose. Il est donc possible que la radiorésistance classique du mélanome soit elle aussi liée au maintien de la traduction cap-dépendante. Dans ce contexte, la technique de PLA des complexes eIF4E / eIF4G et eIF4E / 4E-BP1, pourrait aussi être utilisée comme biomarqueur de résistance, et les inhibiteurs de l'initiation de la traduction cap-dépendante pourraient alors aider à sensibiliser les cellules de mélanome à la radiothérapie.

III. Résultats 2 : Compréhension des tumeurs paradoxales induites par les inhibiteurs de BRAF: de la clinique au moléculaire

A. Recherche d'une participation HPV à la tumorigénèse

En raison de la similitude clinique et histologique entre les tumeurs cutanées induites par les inhibiteurs de BRAF et les verrues classiques secondaires aux Human Papilloma Virus (HPV), nous avons collaboré avec l'équipe du Dr Michel Favre de l'Institut Pasteur, afin d'évaluer la prévalence du virus HPV dans ces tumeurs.

En effet, en microscopie optique, la présence de cellules de type « koïlocytes » dans les tumeurs paradoxales est évocatrice d'une participation HPV (Figure 17). Ce type de cellules avec des noyaux hyperchromatiques entourés d'un halo clair périnucléaire était fréquemment observé par le Dr Gorana Tomasic, anatomo-pathologiste dans notre institut, dans les zones

d'hyperplasie épidermique avec épaissement de la couche granuleuse, comme il est communément observé dans les verrues virales.

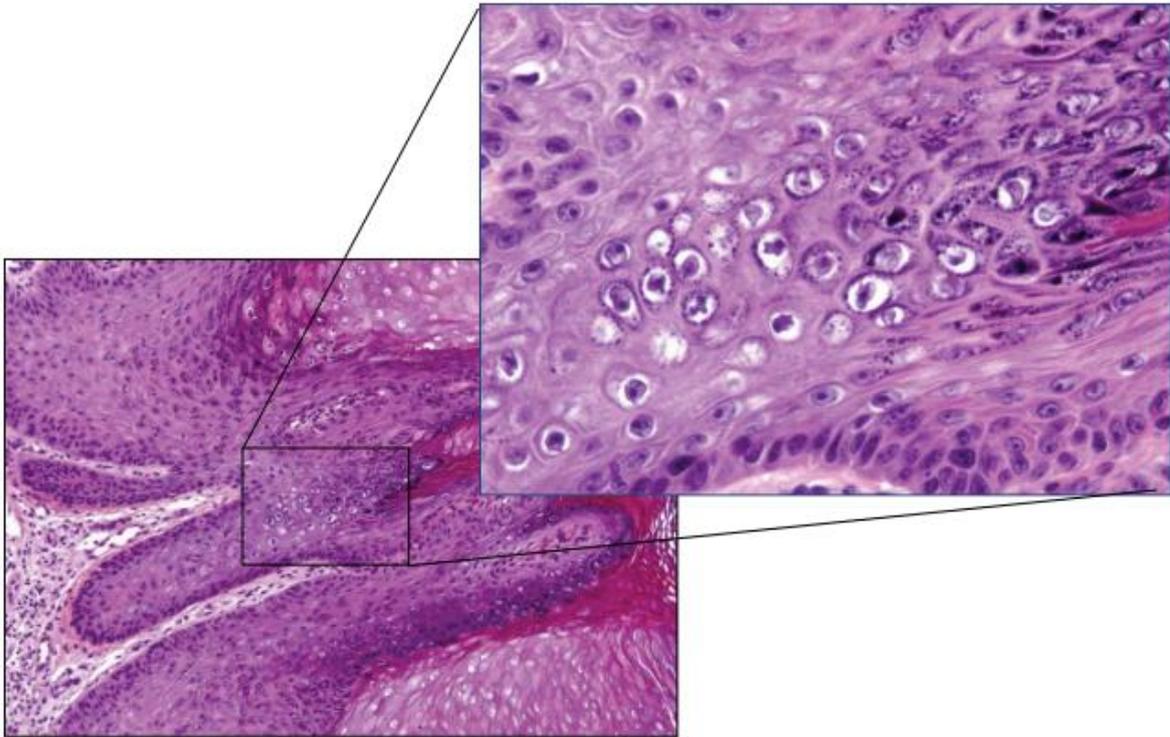


Figure 17 : Visualisation de cellules à type de « koilocytes » dans un papillome verruqueux induit par le vemurafenib (agrandissement x10 à gauche et x40 à droite)

Les résultats de recherche d'HPV ont été publiés en collaboration avec l'équipe du Dr Darrin Stuart, de Novartis, dans le journal *Cancer Research* en 2014³⁰³ (voir manuscrit en annexe C). Nous avons ainsi testé 62 lésions cutanées bénignes et malignes. Huit de ces lésions (13%) étaient porteuses d'un des 6 types d'HPV 9, 32, 38, 49, 80, et 100, ce qui montre que l'HPV pourrait contribuer à la tumorigénèse dans une minorité de cas. Dans 4 cas, nous disposions d'échantillons de peau normale du même patient, dans laquelle il n'a pas été retrouvé d'ADN d'HPV. Pour un patient, 2 HPV de types différents ont été mis en évidence dans 2 tumeurs distinctes (HPV9 et 49) alors que 3 autres tumeurs du même patient étaient dépourvues d'HPV. Étonnamment, le marquage p16, communément associé aux carcinomes épidermoïdes du col de l'utérus induits par l'HPV, était focalement positif dans 56% des tumeurs HPV négatives.

Plusieurs autres études publiées en parallèle^{304,305} ont finalement confirmé la faible prévalence d'HPV dans les tumeurs secondaires aux inhibiteurs de BRAF, suggérant que ces inhibiteurs induisent des proliférations kératinocytaires mimant des lésions induites par les HPV, sans nécessairement la présence d'HPV. Il est aussi possible que d'autres microorganismes que les HPV, que nous ne savons pas encore mettre en évidence, soient impliqués.

B. Visualisation des dimères BRAF-CRAF dans les tumeurs paradoxales humaines induites par les inhibiteurs de BRAF

Parmi nos patients traités par inhibiteurs de BRAF, nombre d'entre eux ont présenté des tumeurs cutanées, mais aussi extra-cutanées. Nous avons réalisé une étude approfondie, histologique, et moléculaire de ces tumeurs ; et en particulier, nous avons développé une méthode permettant de visualiser les dimères BRAF-CRAF impliqués dans l'effet activateur paradoxal des inhibiteurs de BRAF, comme nous avons déjà pu les visualiser auparavant *in vitro* sur des lignées cellulaires exposées au sorafenib (Annexe B). Ci-dessous le manuscrit de l'article en cours de soumission.

1. Texte de l'article

Emergence and progression of skin and extra cutaneous tumors with BRAF-inhibitors

L. Boussemart^{1,2#}, I. Girault^{2#}, C. Mateus¹, E. Routier¹, H. Malka-Mahieu², O. Hemmingsson², N. Kamsu-Kom², M. Thomas¹, G. Tomasic³, S. Agoussi², M. Breckler⁴, M. Laporte⁴, L. Lacroix^{2,4}, A. M. Eggermont¹, A. Cavalcanti⁵, J. Adam^{2,7}, M. Favre⁶, S. Vagner², C. Robert^{1,2}

¹ Department of Medical Oncology, Gustave Roussy, Villejuif, France

² Inserm U981, Gustave Roussy, Paris-Sud University, Villejuif, France

³ Department of Pathology, Gustave Roussy, Villejuif, France

⁴ Translational Research Laboratory, Villejuif, France

⁵ Department of Surgery, Gustave Roussy, Villejuif, France

⁶ Human Papilloma Virus Unit, Institut Pasteur, Paris, France

⁷ Module de Développement en Pathologie, SIRICSOCRATE, Gustave Roussy, Villejuif, France

Co-first-authors

Corresponding author: Caroline ROBERT, Department of Medical Oncology, Gustave Roussy, 114 rue Edouard Vaillant, 94800 Villejuif, France

Phone : 00 33 1 42 11 42 10

FAX : 00 33 1 42 11 50 02

Email : caroline.robert@igr.fr

Caroline Robert is consultant for Roche, GSK, BMS, Novartis, MSD.

Alexander Eggermont is consultant for BMS, MSD, GSK.

The other authors declare no conflict of interest and there was no funding for this study.

Summary

Background: BRAF-inhibitors, have demonstrated a clinical benefit in patients with V600-mutated metastatic melanoma but are associated with an increased risk of developing skin tumors via a paradoxical activation of the MAPK pathway, particularly in the presence of a *RAS* mutation.

Methods: We performed a clinical, pathological and molecular study of 73 cutaneous and extra-cutaneous tumors that emerged or progressed among 31 patients treated with a BRAF-inhibitor, in comparison with 64 spontaneous control tumors.

Results: We identified 36 verrucous papillomas, 22 keratoacanthomas/squamous cell carcinomas (SCC), 1 lymph node metastasis of a formerly excised SCC, 5 melanomas, 2 transformed congenital melanocytic nevi, 3 basal cell carcinomas, and 4 extra-cutaneous carcinomas. The MAPK pathway was activated in the 57 tumors that could be evaluated for ERK-phosphorylation. Oncogenic *RAS* mutations were found in 58% of the 66 evaluable samples. The dimerization between BRAF and CRAF proteins could be visualized directly in the patients' tumor samples, using a proximity ligation assay. The heterodimers were significantly associated with the anti-BRAF treatment, as it was also clearly demonstrated in an *in-vitro* model. Combination of anti-BRAF with an anti-MEK agent was able to significantly decrease the formation of the BRAF-CRAF dimers and the resulting MAPK pathway activation *in vitro*.

Conclusion:

Anti-BRAF agents can promote skin as well as extra-cutaneous tumors through the formation of BRAF-CRAF dimers that could be visualized *in vivo* for the first time. This data leads to the identification of a subpopulation of patients who are at high risk of developing secondary tumors when treated with BRAF-inhibitors.

Key words: Melanoma, vemurafenib-dabrafenib, skin tumors, keratoacanthomas, MAPK pathway, BRAF, CRAF

Manuscript:

Introduction

Activating *BRAF* mutations occur in ~7% of human malignancies and in ~40-60% of melanomas³⁰⁶. Specific *BRAF* inhibitors, vemurafenib and dabrafenib are now standard of care for patients with *BRAF*^{V600-} metastatic melanoma, inducing objective tumor responses in 50-60% of the patients and significantly prolonging their overall survival compared to previous standard chemotherapy dacarbazine^{307,308}. However, *BRAF* inhibitors have two major drawbacks: First their action is limited in time, and most of the patients develop secondary resistances in 6 to 8 months. Second, they are associated with the emergence of multiple skin benign and malignant tumors: papillomas, keratoacanthomas (KA), squamous cell carcinomas (SCCs) as well as atypical pigmented nevi and even new melanomas³⁰⁹. These rather unexpected adverse events had already been reported with the use of a previous less potent and less selective RAF inhibitor, sorafenib³¹⁰. This latter, which is mostly used for its anti-KIT and antiangiogenic (anti-VEGFR) properties is also a weak pan-RAF inhibitor. Prospective study of the skin of patients treated with sorafenib revealed, in addition to the changes linked to the blockade of VEGF receptors, worrisome skin tumors that were not observed with other VEGFR inhibitors that do not target RAF proteins, like sunitinib for example. The hypothesis that keratinocyte and melanocytic skin tumors arising with sorafenib were linked to the anti-RAF effect of the drug was therefore raised. This hypothesis was confirmed *in vitro* on keratinocytes which showed, in the presence of sorafenib, a paradoxical activation of the MAPK pathway *via* CRAF activation and the formation of *BRAF*-CRAF heterodimers^{311,312,313}. As it could be expected from these data, more potent and more selective *BRAF*-inhibitors vemurafenib and dabrafenib, that became available some years later, displayed, in addition to their antitumor action on *BRAF*^{V600-} melanoma cells, a higher incidence of new skin tumors, arising in up to 15 to 20% of the patients. These secondary tumors frequently harbor a *RAS* mutation, in 30 to 70% of the cases depending of the series. In line with these findings, *in vivo* data using a murine model of *RAS*-mediated skin carcinogenesis showed that vemurafenib accelerated the growth of tumors harboring *RAS* mutations^{314,315,316,317,318}. These results were also in accordance with previous *in vitro* data obtained on melanoma cell lines harboring *NRAS* mutation but wild-type for *BRAF*, in which it was found that the MAPK pathway was paradoxically activated instead of being inhibited

by BRAF-inhibitors. In these models, the signal was transduced via CRAF, itself transactivated by its dimerization with BRAF.

Having established that the cells that were RAS^{mut} and $BRAF^{wt}$ had an increased risk of transformation, and because it was already known that RAS mutation can occur in various benign tumors from diverse tissues and organs, the worrisome question of the potential induction of extra-cutaneous cancer transformation was logically raised. Very recently, the report of a patient with an $NRAS^{mut}$ myelomonocytic leukemia³¹⁹ seemingly aggravated by vemurafenib was the first of these dreaded cases.

We report a series of skin and extra-cutaneous tumors arising or progressing rapidly under BRAF inhibitor. These cases were screened for a panel of relevant somatic mutations and the level of ERK phosphorylation. The mechanism of reactivation of the MAPK pathway leading to ERK phosphorylation was explored by the development of a new test allowing the visualization, for the first time, on patients' tumor specimens, of the dimerization of BRAF and CRAF.

Our results confirm the pro-oncogenic potential of BRAF-inhibitors and the underlying role of RAS mutations. They have a practical consequence concerning the upfront identification and management of a subpopulation of patients at risk in whom BRAF-inhibitors should not be given without great caution.

Material and methods

Patients: All patients had a metastatic non-resectable $BRAF^{V600-}$ melanoma except one patient who had a $BRAF^{V600E}$ anaplastic pleomorphic xanthoastrocytoma. They were treated with 960 mg twice a day of vemurafenib (N=27) or 150 mg twice a day of dabrafenib (N=3) for at least 20 days. Patients were treated in the context of BRIM-3 (NCT01006980) or VE-BASKET (NCT 01524978) clinical trials, or according of the EMA authorization and they all gave a written informed consent for molecular analyses of their biopsied specimens (IRB# 08-027).

Analyses on patients' tumor specimens: Seventy-three tumors samples originating from 31 patients treated with BRAF-inhibitors were analyzed (Table 1). To be able to evaluate the effect of the treatment on their healthy-looking skin, 6 of those 31 patients, plus 3 additional patients who never developed any secondary tumor (patient #9, 10 and 15), agreed to undergo

a healthy skin biopsy, before and/or after the initiation of BRAF-inhibitor treatment, which enabled us to study 16 additional “normal skin” specimens before and/or after treatment. A series of control tumors were also analyzed as controls: 13 verrucous papillomas, 13 KA or SCCs, 10 vulvar SCCs, 10 urothelial carcinomas, 10 *NRAS*^{mut} melanomas, 7 melanocytic congenital nevi, originating from 63 patients who were not treated with BRAF-inhibitor. Samples were cut into 4µm sections, formalin-fixed, paraffin-embedded and stained with hematoxylin and eosin. Samples were stained immunochemically for phospho-ERK protein (monoclonal 20G11, Cell signaling technology, Boston, MA). The keratinocytes in epidermis could be used as an internal positive control.

Genotyping: Genetic analysis of clinical specimens was performed on 119 evaluable samples because 12 biopsies were too small to allow DNA extraction. Those included 57 samples from patients treated with a BRAF-inhibitor, and 62 control spontaneous tumors. Genomic DNA was extracted from 10 to 20-µm-thick paraffin-embedded unstained slides of each skin lesion using DNeasy Blood and tissue kit (QIAGEN, Hilden, Germany) according to the manufacturer’s instructions. Genomic analysis was performed using Ion Torrent PGM. The following genes were included in the analysis: *HRAS*, *KRAS*, *NRAS*, *NF1*, *NF2*, *RAC1*, *BRAF*, *MAP2K1*, *MAP2K2*, *AKT1*, *AKT2*, *AKT3*, *PI3KCA*, *PIK3R1*, *MET*, *MITF*, *MLL3*, *NFE2L2*, *NOTCH1*, *NOTCH2*, *PDGFRA*, *PTEN*, *RET*, *ROS1*, *STK11*, *TGFBR1*, *TP53*, *ALK*, *CDKN2A*, *CTNNB1*, *EZH2*, *ABL1*, *CDK4*, *EGFR*, *ERBB2*, *FGFR1*, *FGFR2*, *FGFR3*, *FGFR4*, *GNA11*, *GNAQ*, *IDH1*, *IDH2*, *KIT*, *FLT3*, *JAK2*, and *KIT*.

Cell culture: SK-Mel2 and MEL10 melanoma cell lines were cultured in EMEM and in DMEM (Invitrogen), respectively, containing 10% fetal calf serum (FCS; Perbio) and antibiotics (penicillin/streptomycin; Invitrogen). Vemurafenib used for cell treatment was purchased from Selleckchem and dissolved in DMSO. All cell lines were regularly verified to be mycoplasma-free using a PCR based test (Biovalley, France). Genomic DNA was isolated using Genomic Tips kits (Qiagen), and the same genomic analysis as described above was performed using Ion Torrent PGM to confirm the presence of the *NRAS*^{Q61R} mutation in both cell lines.

Protein expression: Cells were lysed in RIPA lysis buffer (Cell Signaling) supplemented with dithiothreitol, phenylmethanesulfonyl fluoride (Sigma) and fresh protease and phosphatase inhibitors (Roche). The proteins were separated by SDS-PAGE and Western blot

analysis was performed according to standard protocols using Erk1/2 (rabbit, 9102), and Erk1/2 phospho Thr202/Tyr204 (rabbit, clone 20G11, 4376) antibodies purchased from Cell Signaling and GAPDH (mouse, clone 6C5, MAB374) antibody purchased from Millipore.

Proximity Ligation Assay (PLA): Cells were grown on glass cover slips, treated with DMSO or vemurafenib, fixed with methanol and permeabilized with acetone. For PLA on fixed tissue samples, following dewaxing and rehydrating of tissue sections, antigen retrieval was performed by heating the slides for 30 min at 95 °C in TE buffer, pH 9. From this point, the tissue sections and the cell lines were treated identically according to the manufacturer's instructions (Olink Biosciences) using BRAF (F7) and CRAF (C12) antibodies, with incubation at 4°C overnight. PLA minus and PLA plus probes (containing the secondary antibodies conjugated with oligonucleotides) were added and incubated 1 h at 37°C. Afterwards, further oligonucleotides were added, and allowed to hybridise to the PLA probes, and ligase joined the two hybridised oligonucleotides to a closed circle. The DNA was then amplified (rolling circle amplification), and detection of the amplicons was carried out using the 'Brighfield detection kit' for the chromogenic revelation or using the 'far Red detection Kit' for the fluorescence revelation. The sections were mounted with Olink mounting media. Results can be visualized by confocal microscopy (SPE (leica)) or a scanner (Olympus VS120).

Statistical analysis: Statistical analysis used are a nonparametric, nonappaired test of two unmatched groups (Mann Withney) or more than two (Anova one way).

Results:

Patients and Tumors: Between 2010 and 2014, 73 tumors originating from 31 patients, that were considered to have emerged or significantly progressed during treatment with vemurafenib (N=28) or dabrafenib (N=3) were studied (Table 1). The majority of these 73 tumors, were classical and frequently described cutaneous keratinocytic benign, borderline of malignant tumors: 36 verrucous papillomas, 22 KA or cutaneous SCCs. However, 11 tumors were more atypical. Five tumors were *de novo* melanomas, which have also been reported during the course of BRAF inhibitor treatment but much less frequently than keratinocytic tumors³²⁰. Two samples were congenital melanocytic nevi (CMN) that underwent atypical

transformation under treatment (patients #2 and #30, fig. 1D-F). Four tumors were mucosal carcinomas: one vulvar (patient #32), one gingival (patient #23) and one lingual SCCs (patient #33, fig. 1A-C), and one urothelial carcinoma (patient #20).

The majority of these tumors were not present, at least not clinically or radiologically, before initiation of BRAF inhibitors. For 2 patients, there was already, before initiation of the treatment a precursor benign lesion under the form of a CMN (patients #2 and #30). For 2 other patients, there was a pre-existing lesion: a small urothelial nodular lesion that was present on the initial CT scan but that progressed significantly under anti-BRAF therapy (patient #20, fig. 1G-I), and the second patient presented an aggressive lymph node relapse of a previously treated cutaneous squamous cell carcinoma of the lip (patient #6, fig. 1J,K,M).

Genotyping of the tumors compared to control tumors (unrelated to BRAF inhibitor treatment): Oncogenic *RAS* mutations were found in both benign and malignant tumors in BRAF-inhibitor treated patients. *HRAS* mutations on codons 12 or 13 were found in 38% of the 34 evaluable verrucous papillomas and 62% of the 21 evaluable KA/SCC. *KRAS* mutations were found in 21% of the verrucous papillomas but none of the KA/SCC. All the mutations found in each sample by next generation sequencing among the screened genes are reported in table 1. *PTEN* deletions were found in 3% of the verrucous papillomas, whereas *CDKN2A* mutations were found in 5% of the KA/SCC. Similar mutations were found in our control series of control verrucous papillomas and KA/SCC, except for isolated *PIK3CA* mutations that were exclusively found (18%) in spontaneous KA/SCC. *NRAS*^{Q61-} mutation was found in 40% of the secondary melanomas, in one of the 2 transformed CMN, and in 57% of 7 control CMN. A *KRAS*^{G12V} mutation was found in the urothelial carcinoma and a *HRAS*^{G13V} mutation was found in the vulvar carcinoma, both induced by vemurafenib. By contrast, only 2 among the 10 control urothelial carcinomas used as controls harbored a *RAS* mutation, while no *RAS* mutation was found among the 10 control vulvar carcinomas. Similarly, the lingual SCC harbored a *HRAS*^{G12S} mutation. Patient #6 carried a germinal *CDKN2A*^{H66fs} mutation that was logically found in the lymph node relapse of a formerly excised lip SCC that rapidly progressed under treatment. Interestingly, this patient developed numerous other primary in situ cutaneous SCC under vemurafenib as shown in Fig. 1L.

Study of the formation of BRAF/CRAF dimers *in vitro*: To further investigate the mechanism underlying the paradoxical activation of the MAPK pathway following anti-BRAF treatment in a *RAS*-mutated context *in vitro*, we used two melanoma cell lines BRAF-

wt harboring an activating *NRAS*^{Q61R} mutation exposed or not to vemurafenib. Since the paradoxical effect of anti-BRAF treatment on the MAPK pathway is thought to be related to BRAF-CRAF heterodimerization, we looked for this BRAF-CRAF complex formation *in vitro* using a sensitive proximity ligation assay (PLA). This assay consists in detecting two proteins (here BRAF and CRAF) with two primary antibodies raised in different species. A pair of oligonucleotide-labeled secondary antibodies generates a signal when the two target proteins are bound in close proximity. We indeed observed an induction of the formation of BRAF-CRAF heterodimers (Fig. 2A) associated with an increased ERK-phosphorylation in vemurafenib-treated cells (Fig. 2B). This paradoxical induction of ERK phosphorylation was impaired by exposing cells to vemurafenib in combination with a MEK inhibitor such as trametinib or PD 0325901 (Fig. 2B).

Molecular study of ERK, BRAF and CRAF in tumor samples: To further explore this mechanism of activation of the MAPK pathway *in vivo*, we looked for ERK phosphorylation in 57 keratinocytic tumors excised from patients undergoing BRAF inhibitor treatment. High phosphorylation of ERK was observed in all tumors (data not shown). We then performed a similar BRAF-CRAF PLA on formalin fixed paraffin embedded tissue with chromogenic detection. BRAF-CRAF dimers could be visualized in 100% of the samples. To evaluate the influence of BRAF treatment in the occurrence of BRAF-CRAF dimers, we compared the numbers of dimers in tumors from anti-BRAF treated patients with control tumors from patients not treated with BRAF-inhibitor (Fig. 3A) and we found that there were a significantly higher number of BRAF-CRAF interactions in BRAF-inhibitor induced tumors. In normal skin, BRAF-CRAF complex formation was not increased in patients receiving anti-BRAF therapy compared with normal control skin (Fig. 3B).

In order to evaluate association between *RAS* mutations and BRAF-CRAF heterodimers, we differentially analyzed the BRAF-CRAF PLA score in *RAS* mutant and *RAS*-wt keratinocytic tumors with their BRAF-inhibitor-free control series according to their *RAS* status. We observed that the BRAF-CRAF PLA score was significantly increased by BRAF-inhibitor treatment independently of *RAS* mutational status (Fig. 3C).

We then looked for the presence of BRAF-CRAF dimers in the non keratinocytic tumor samples developed under BRAF-inhibitors such as the mucosal and melanocytic tumors. Although our sample number was small, we compared each BRAF-CRAF PLA rate with a group of BRAF-inhibitor-free control tumors. Interestingly, the vulvar SCC (patient #32) and

a transformed CMN (patient #2) presented a much higher rate of BRAF-CRAF dimers in comparison with the BRAF inhibitor-free control tumors (Fig. 4). Among *NRAS* mutant melanomas and urothelial carcinomas, the increase in BRAF-CRAF dimerization was not as clear.

Discussion

Beside their indubitable benefit in terms of response rate and overall survival for patients with metastatic melanoma harboring a BRAFV600E mutation, BRAF inhibitors were known to have a major drawback which is the induction of a spectrum of cutaneous benign, borderline and malignant tumors. Until recently, only skin tumors had been reported and none of them had been aggressive or became metastatic. A close dermatologic follow-up of the patients was advised and seems sufficient to detect any new suspicious lesion and excise it. One of the mechanisms leading to the initiation of secondary tumors was found to rely on a paradoxical activation of the pathway due to CRAF activation in the context of dimerization between BRAF and CRAF in the presence of a *RAS* mutation. Because this somatic genetic context, i.e. *BRAF*^{wt}, *RAS*^{mut} can be found in many organs in premalignant tumors, like colon polyps for example, emergence of extra-cutaneous tumors is in theory possible, and the recent report of the aggravation of a *RAS*^{mut} leukemia under anti-BRAF agent was the first illustration of this dreaded event¹⁴. Now we definitely show here that the skin is not the only target of the cancer promoting effect of BRAF inhibitors. Indeed, we have observed mucosal tumors, both oral and genital, as well as rapid progression of an urothelial tumor.

In terms of skin tumors we report the first case of transformation of a *NRAS*^{mut} CMN. And one patient, with a germinal mutation of *CDKN2A* presented a rapid and aggressive metastatic relapse of a previously resected cutaneous SCC, together with an efflorescence of cutaneous in situ SCCs. For this latter patient, we cannot definitely conclude that the treatment with BRAF inhibitor induced the relapse, but this is a reasonable hypothesis since *CDKN2A* is known to be a negative regulator of CDK4 and cyclin D1, that can cause resistance to dabrafenib³²¹.

We have confirmed that all the tumors induced or promoted by BRAF inhibitors have a high level of ERK phosphorylation, with a high frequency of *RAS* mutations, in more than 50% of

the cases. In particular, one transformed CMN, the vulvar and the urothelial carcinomas all harbored a *RAS* mutation. Concerning the exact mechanism underlying this paradoxical pathway activation, we could, for the first time in human samples visualize a physical interaction between BRAF and CRAF, using a specific biological assay, the PLA which could also reveal the induction of the BRAF-CRAF complex formation *in vitro* in two *BRAF*^{wt}/*NRAS*^{mut} cell lines associated with increased ERK phosphorylation. The rate of BRAF-CRAF dimers was significantly increased by BRAF inhibitors both in the *RAS*^{mut} and *RAS*^{wt} secondary tumors. It is possible that, in the absence of *RAS* mutation, other unidentified mutations involving the MAPK pathway could be involved. These data have major clinical and therapeutic implications because they lead to the identification of a subpopulation of patients who are at high risk of developing or favoring the progression of a tumor when treated with anti-BRAF.

First, CMN commonly observed in about 1 to 6% of newborns³²² frequently harbor *NRAS* mutations (50% to 80% for the largest lesions). The highest degree of caution is thus recommended before initiating anti-BRAF^{V600-} therapies in patients presenting with this type of benign lesion because of the major risk of transformation. *RAS* mutations are frequent among premalignant congenital or acquired premalignant lesions like verruco-sebaceous nevi or colon polyps for respective examples. In these contexts, BRAF-inhibitors could be deleterious and promote *RAS*^{mut} tumor progression. There are also some rare genetic backgrounds like the Costello syndrome that have a constitutional activation of a *RAS* protein, and for whom, in theory, the risk of developing a secondary tumor is important. Because of this critical risk of promotion of external as well as internal cancers, patients should benefit from regular clinical examination, including the genital areas and a tumor biopsy should be performed every time there is any doubt between a progressing metastasis and a new primary tumor visualized on follow-up CT scans.

In order to potently inhibit mutant *BRAF* cells without inducing any paradoxical activation, non-paradox-inducing RAF inhibitors termed paradox-breakers such as PLX7904 are under development and have yielded promising results *in vitro*³²³. The combination of anti-BRAF and anti-MEK agents is in active development and has recently shown a benefit over anti-BRAF agent alone in term of rate and duration of response. This combination seems to be devoid of paradoxical MAPK activation *in vitro* and patients treated with it are less prone to develop neoplastic skin tumors, found in less than 10% of the cases^{324,325}.

Both vemurafenib as a single agent and the combination of dabrafenib and trametinib (anti-BRAF and anti-MEK agents) are presently evaluated in the adjuvant settings, in patients who

have had a complete resection of melanoma lymph node metastases and are thus at high risk of metastatic relapse. Our data and results clearly are in favor of the combination treatment in this adjuvant setting, from a safety point of view. However, whether the effect of MEK inhibition in vivo is of sufficient magnitude to entirely abrogate the risk of BRAF-inhibitor-mediated oncogenesis in all settings would appear unlikely, in light of the recent case report of the activation of a presumably dormant *KRAS*^{mut} metastatic colon cancer occurring under the combination of dabrafenib and trametinib³²⁶.

We are awaiting the availability of new treatments devoid of the paradoxical effect. In the meantime, it is of paramount importance that clinicians be alerted to this risk of paradoxical oncogenesis and to the identification of patients at high risk of developing such paradoxical adverse events.

2. Figures

Figure 1

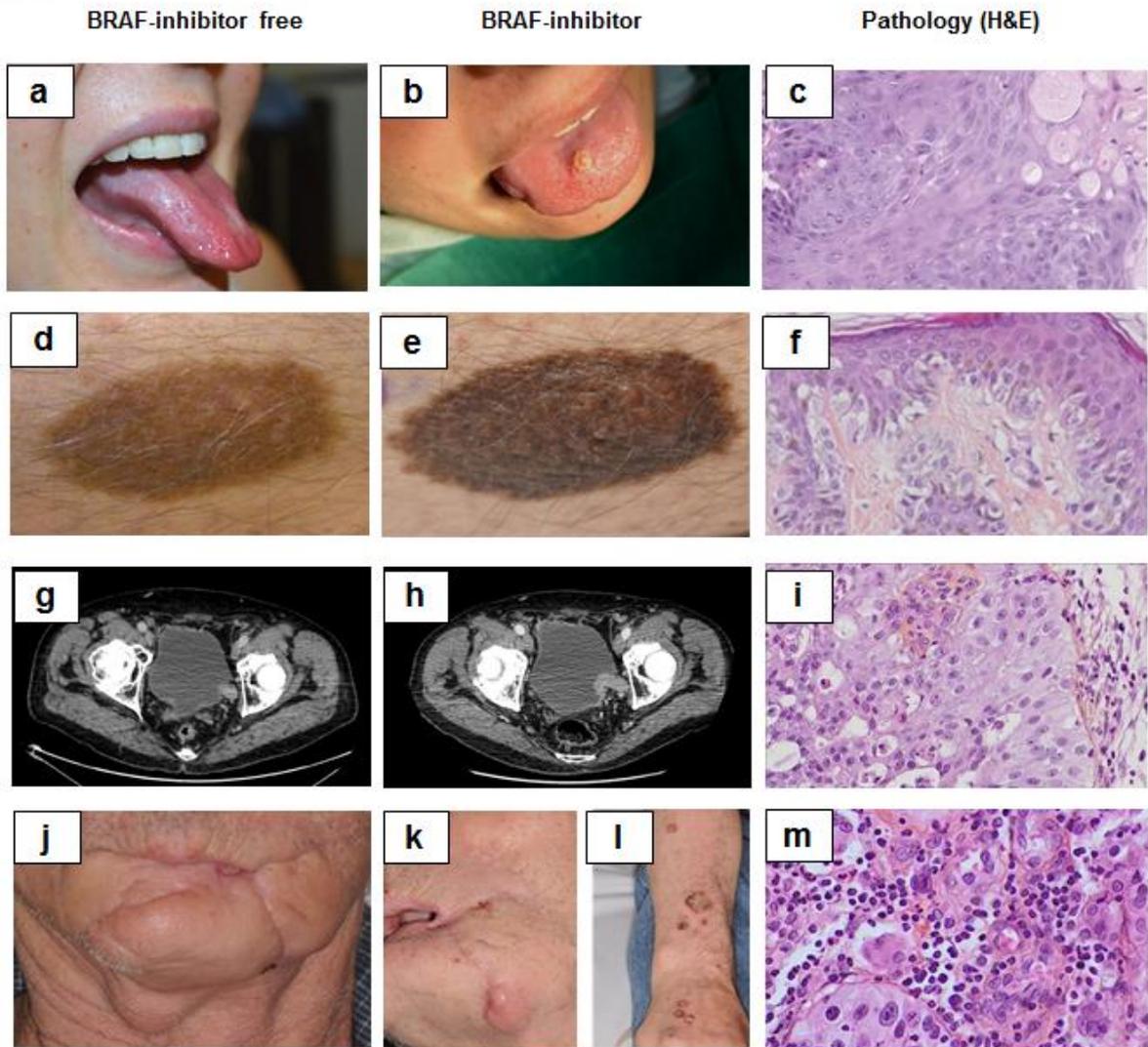


Figure 2

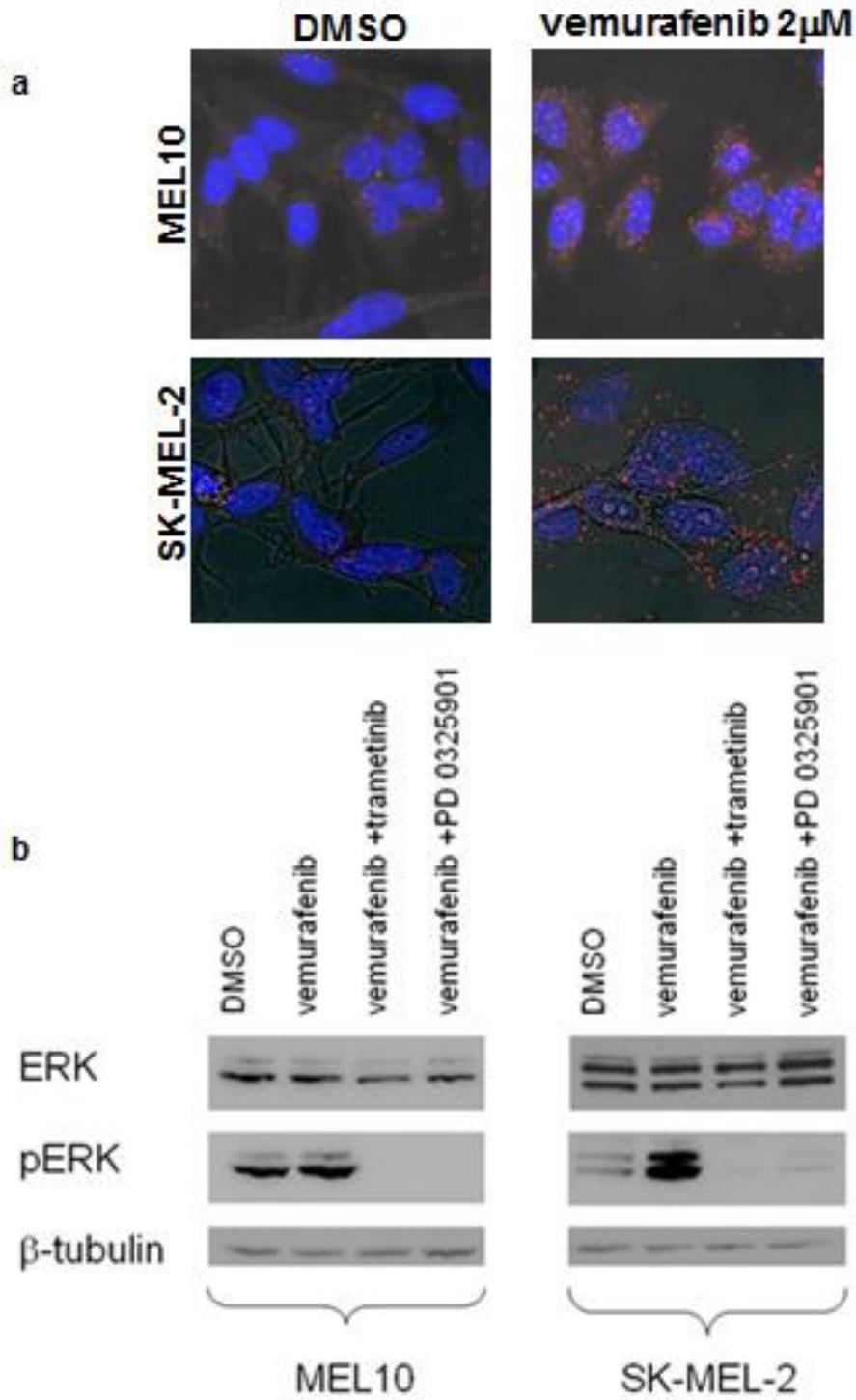


Figure 3

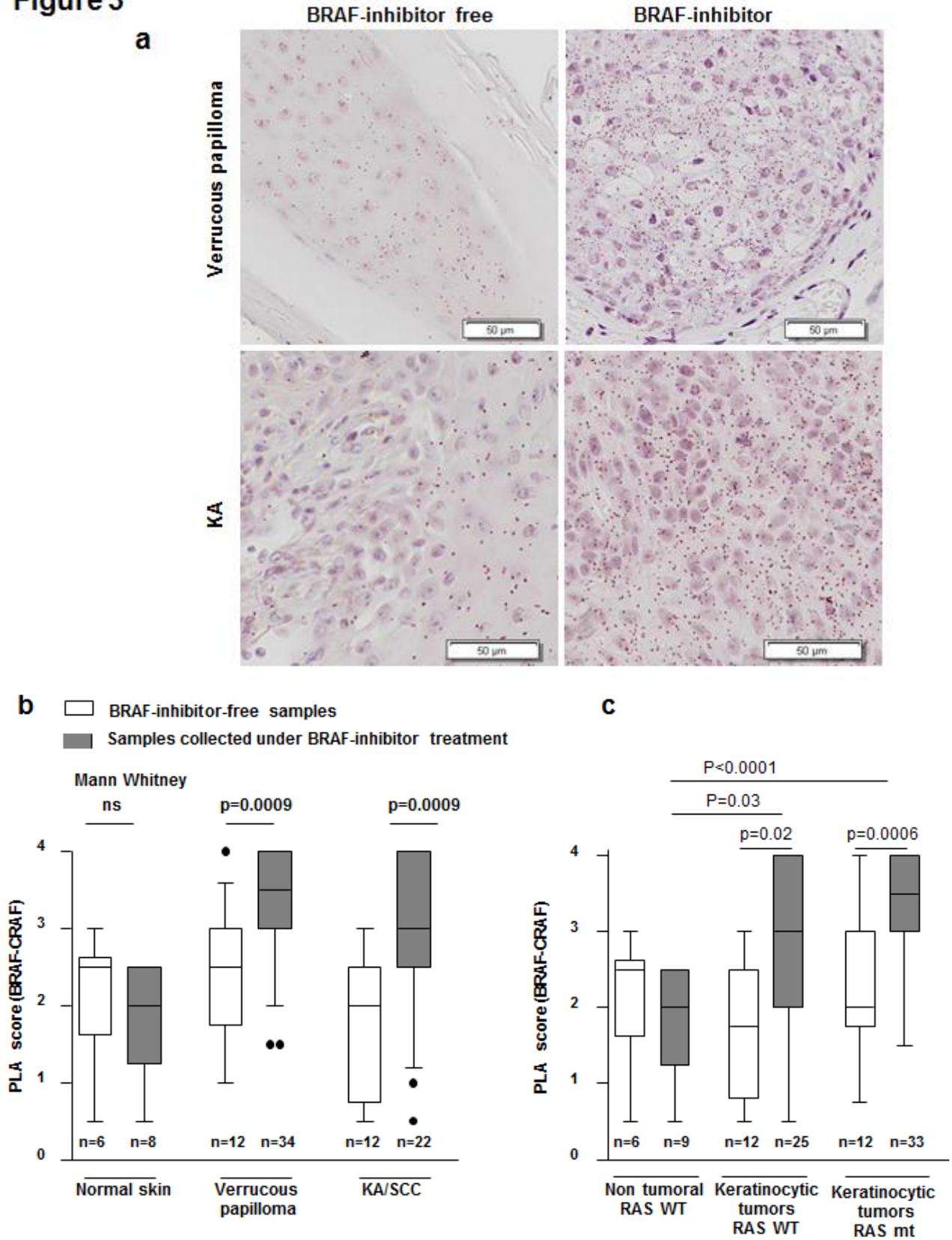
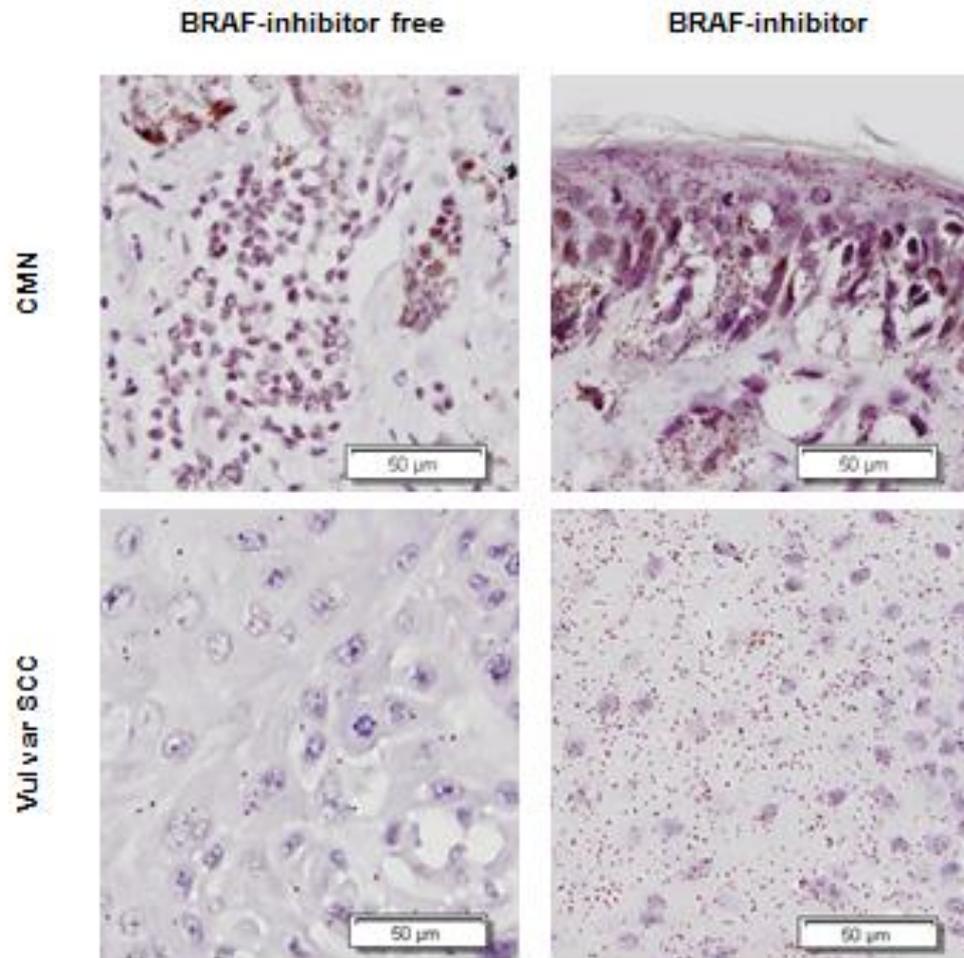


Figure 4



3. Tableau

Table 1.

Patient #	Histology	Treatment	Day of excision	Mutational status	BRAF-CRAF score
Biospies from patients treated with BRAF inhibitors					
1	Normal skin	None	0	TGFBR1 V153I	2,5
1	Normal skin	Dabrafenib	21	TGFBR1 V153I	1,5
1	Invasive cuSCC	Dabrafenib	46	TGFBR1 V153I and A202V	4
1	Verrucous papilloma	Dabrafenib	46	TGFBR1 V153I, PIK3CA E545K and E542K	4
2	Verrucous papilloma	Vemurafenib	290	wt	4
2	Transformed CMN Breslow 0,6mm	Vemurafenib	220	NRAS Q61K	3
3	Normal skin	None	0	wt	2
3	Normal skin	Vemurafenib	21	wt	2,5
3	Verrucous papilloma	Vemurafenib	55	KRAS G12D	4
4	SSM Breslow 0,3mm	Vemurafenib	56	wt	2,5
5	Invasive cuSCC	Vemurafenib	56	HRAS G12C	3,5
5	Verrucous papilloma	Vemurafenib	56	HRAS G12V	3
5	cuSCC	Vemurafenib	56	HRAS G12D	3
5	Verrucous papilloma	Vemurafenib	56	wt	3,5
5	Verrucous papilloma	Vemurafenib	134	wt	4
5	Verrucous papilloma	Vemurafenib	134	KRAS G12C	3
5	Verrucous papilloma	Vemurafenib	134	wt	1,5
6	cuSCC lymph node relapse	Vemurafenib	60	nd	nd
7	Micro-invasive cuSCC	Vemurafenib	63	wt	2
7	Verrucous papilloma	Vemurafenib	105	wt	4
8	Normal skin	None	0	wt	3
8	Normal skin	Vemurafenib	21	wt	2
8	Verrucous papilloma	Vemurafenib	50	KRAS G12V	4
8	Verrucous papilloma	Vemurafenib	50	KRAS G12V	4
9	Normal skin	None	0	wt	2,5
9	Normal skin	Vemurafenib	13	wt	2,5
10	Seborrheic keratosis	Vemurafenib	18	HRAS Q61L	2
10	Normal skin	Vemurafenib	18	wt	2,5
11	Verrucous papilloma	Vemurafenib	75	PTEN del exon 8	2,5
12	Verrucous papilloma	Vemurafenib	185	HRAS G12D G115E	4
13	Maculo-papular dermatitis	Vemurafenib	14	wt	1
13	Verrucous papilloma	Vemurafenib	21	HRAS G12D	3
13	Verrucous papilloma	Vemurafenib	21	wt	2
13	Verrucous papilloma	Vemurafenib	21	nd	2
13	KA	Vemurafenib	168	wt	3
13	SSM	Vemurafenib	84	nd	nd
14	Verrucous papilloma	Vemurafenib	60	KRAS G12D	4
15	Normal skin	None	0	wt	0,5
15	Normal skin	Vemurafenib	21	wt	0,5
16	Micro-invasive cuSCC	Vemurafenib	88	wt	2,5
16	cuSCC	Vemurafenib	109	wt	1
16	Verrucous papilloma	Vemurafenib	63	HRAS Q61L	1,5
16	Panniculitis	Vemurafenib	106	wt	2
17	Verrucous papilloma	Dabrafenib	197	HRAS Q61L	3
18	Verrucous papilloma	Vemurafenib	20	nd	3,5

19	Verrucous papilloma	Vemurafenib	168	wt	2,5
20	Urothelial carcinoma (low grade)	Vemurafenib	55	KRAS G12V	2,5
21	Verrucous papilloma	Dabrafenib	30	KRAS G13R	2
22	SSM in situ	Vemurafenib	208	nd	3
23	KA	Vemurafenib	32	HRAS G12D, EGFR Q701H	3,5
23	KA	Vemurafenib	32	HRAS G12D, PIK3CA E542K	3,5
23	Gingival in situ SCC	Vemurafenib	117	nd	nd
23	KA	Vemurafenib	56	HRAS G12D	3
23	Verrucous papilloma	Vemurafenib	96	wt	3
23	Micro-invasive cuSCC	Vemurafenib	154	CDKN2A P114L	3
24	Normal skin	None	0	wt	nd
24	Normal skin	Vemurafenib	21	wt	nd
24	Verrucous papilloma	Vemurafenib	55	wt	4
24	Micro-invasive cuSCC	Vemurafenib	94	PTEN del exon8	4
25	cuSCC	Vemurafenib	56	wt	2,5
25	Verrucous papilloma	Vemurafenib	56	wt	3
25	Verrucous papilloma	Vemurafenib	56	HRAS G115E, CDKN2A L30F	3
25	Verrucous papilloma	Vemurafenib	56	HRAS G13V	2
25	Verrucous papilloma	Vemurafenib	115	wt	3
26	Verrucous papilloma	Vemurafenib	63	wt	4
26	Normal skin	Vemurafenib	98	wt	1,5
26	Pilar dystrophy	Vemurafenib	7	nd	2,5
26	KA	Vemurafenib	63	nd	3
27	Normal skin	None	0	wt	2,5
27	Normal skin	Vemurafenib	28	wt	2,5
27	KA	Vemurafenib	58	HRAS G12D	4
27	KA	Vemurafenib	58	HRAS Q61L	3
27	KA	Vemurafenib	57	HRAS G12D, TGFB1 G52E	4
27	cuSCC	Vemurafenib	84	HRAS G12D	3
27	cuSCC	Vemurafenib	84	HRAS G12D	3,5
27	Verrucous papilloma	Vemurafenib	84	KRAS G12D	3,5
27	cuSCC	Vemurafenib	84	HRAS Q61L, PI3KCA E545K	4
27	KA	Vemurafenib	56	HRAS Q61L	4
28	Invasive BCC	Vemurafenib	21	KIT G658E	0,5
28	BCC	Vemurafenib	42	KIT D572N	0,5
28	BCC	Vemurafenib	75	KIT H790Y	0,5
29	Verrucous papilloma	Vemurafenib	105	HRAS Q61L	2,5
29	Verrucous papilloma	Vemurafenib	187	HRAS Q61L	nd
29	Verrucous papilloma	Vemurafenib	208	HRAS Q61L	3,5
29	KA	Vemurafenib	64	HRAS Q61L, PI3KCA H1047R	3,5
29	Verrucous papilloma	Vemurafenib	64	HRAS Q61L	4
29	Verrucous papilloma	Vemurafenib	154	HRAS Q61L	4
30	Transformed CMN Breslow 0,37mm	Vemurafenib	222	wt	0,5
31	SSM Clark II	Vemurafenib	59	NRAS Q61K	3
31	SSM in situ	Vemurafenib	59	wt	2,5
32	Vulvar invasive SCC	Vemurafenib	83	HRAS G13V	4
33	Lingual SCC	Vemurafenib	210	HRAS G12S	nd
34	Verrucous papilloma	Vemurafenib	15	HRAS Q61R, PI3KCA E542K	3
Spontaneous KA/SCCs					
35	KA	None		wt	3
36	KA	None		wt	2,5
37	KA	None		HRAS Q61L	2
38	KA	None		nd	nd
39	KA	None		wt	0,5

40	KA	None		HRAS A146V, CDKN2A V51I	0,75
41	KA	None		wt	2
42	cuSCC	None		PIK3CA E542K	3
43	KA	None		HRAS Q61L	2
44	KA	None		wt	0,5
45	KA	None		PIK3CA E545K	0,75
46	KA	None		HRAS G13V	1,5
6	cuSCC	None		CDKN2A H66fs	1,5
Spontaneous verrucous papillomas					
47	Verrucous papilloma	None		HRAS Q61R	3
48	Verrucous papilloma	None		HRAS G12D	2,5
49	Verrucous papilloma	None		HRAS Q61R	3
50	Verrucous papilloma	None		wt	2,5
51	Verrucous papilloma	None		HRASG13D, PI3KCA E545K	2
52	Verrucous papilloma	None		HRAS Q61R	4
53	Verrucous papilloma	None		HRAS G12D, PI3KCA E542K	1
54	Verrucous papilloma	None		wt	1
55	Verrucous papilloma	None		wt	2,5
56	Verrucous papilloma	None		HRAS G12D, TP53 R249W	2,5
57	Verrucous papilloma	None		KRAS G12D	2
58	Verrucous papilloma	None		wt	1,5
59	Verrucous papilloma	None		HRAS G12D, PI3KCA E545K	nd
Spontaneous CMNs					
60	CMN	None		NRAS Q61R	0
61	CMN	None		wt	0
62	CMN	None		NRAS Q61R	0
63	CMN	None		BRAF V600E	0
64	CMN	None		NRAS Q61K	0
65	CMN	None		BRAF V600E	0
66	CMN	None		NRAS Q61K	0
Spontaneous urothelial carcinomas					
67	Urothelial carcinoma	None		BRAF G464E, HRAS Q61R	3
68	Urothelial carcinoma	None		PIK3CA E542K, BRAF K601E	3
69	Urothelial carcinoma	None		wt	2,5
70	Urothelial carcinoma	None		wt	2,5
71	Urothelial carcinoma	None		wt	3,5
72	Urothelial carcinoma	None		FGFR3 S249C	2
73	Urothelial carcinoma	None		PI3KCA E545K, E81K, FGFR3 S249C, ERBB2 L755S	3
74	Urothelial carcinoma	None		KRAS G12D, PI3KCA E542K	3
75	Urothelial carcinoma	None		FGFR3 R248C	2,5
76	Urothelial carcinoma	None		PIK3CA E545K, FGFR3 S249C	2
NRAS mutated melanomas					
77	NRAS mutant melanoma	None		NRAS Q61K	3
78	NRAS mutant melanoma	None		NRAS Q61K	nd
79	NRAS mutant melanoma	None		NRAS Q61K	nd
80	NRAS mutant melanoma	None		NRAS Q61R, MLL3D348N	2,75
81	NRAS mutant melanoma	None		NRAS Q61K	nd
82	NRAS mutant melanoma	None		NRAS Q61L, FGFR2 R251Q	3
83	NRAS mutant melanoma	None		NRAS Q61L, CDKN2A W110X	4
84	NRAS mutant melanoma	None		NRAS Q61R	2,75
85	NRAS mutant melanoma	None		NRAS Q61K	3,5
86	NRAS mutant melanoma	None		NRAS Q61K	3,5

Spontaneous vulvar SCCs					
87	Invasive vulvar SCC	None		wt	2,25
88	Invasive vulvar SCC	None		CDKN2A L63fs	0,5
89	Invasive vulvar SCC	None		PTEN E40*	1
90	Invasive vulvar SCC	None		wt	3
91	Invasive vulvar SCC	None		wt	0,5
92	Invasive vulvar SCC	None		wt	0
93	Invasive vulvar SCC	None		wt	0,5
94	Invasive vulvar SCC	None		IDH2 R140Q	2,5
95	Invasive vulvar SCC	None		CDKN2A H83Y	2,5
96	Invasive vulvar SCC	None		PIK3CA E545K, CDKN2A Q50R	2

C. Discussion

1. Le PLA BRAF-CRAF : une preuve de concept, mais un usage en routine à développer

Au cours de ce travail, nous avons pu visualiser pour la première fois les dimères BRAF-CRAF dans des tumeurs humaines par PLA. Ces dimères, impliqués dans l'effet paradoxal inducteur de la voie des MAPK des inhibiteurs de BRAF, se forment aussi de façon physiologique en cas d'activation de RAS. Il était donc primordial non seulement de visualiser ces dimères dans les tumeurs secondaires des patients traités, mais aussi de les quantifier (avec un score de PLA établi par le Dr Gorana Tomasic), et de comparer leur prévalence dans les cellules par rapport à celle des tumeurs contrôles (c'est-à-dire non induites par un inhibiteur de BRAF) de même type.

Nous avons ainsi pu démontrer que, non seulement ces dimères existent dans les tumeurs secondaires, mais aussi que leur nombre est augmenté significativement par les inhibiteurs de BRAF, et ce indépendamment du statut mutationnel *RAS* des tumeurs.

Il est à noter cependant que les dimères BRAF-CRAF sont présents en nombre important de façon physiologique dans l'épiderme normal, et ce taux de base déjà relativement élevé explique peut-être pourquoi la plupart des tumeurs secondaires décrites sont cutanées. Cette présence de dimères BRAF-CRAF dans l'épiderme normal nous a permis d'avoir un témoin positif interne dans chaque lame de PLA sur tumeur cutanée étudiée. La technique de PLA sur prélèvements fixés en paraffine est encore relativement nouvelle et devrait permettre à l'avenir de mieux comprendre de multiples voies de signalisations impliquées dans le cancer. Le PLA étant une technique coûteuse aussi bien en temps qu'en argent, une plateforme d'anatomo-pathologie dédiée à la recherche (Dr Julien Adam), vise actuellement à automatiser cette technique de PLA dans notre institut.

2. Risque de tumeurs secondaires autres que kératinocytaires induites par les inhibiteurs de BRAF

Le deuxième message important véhiculé par ce travail concerne l'induction par les inhibiteurs de BRAF de tumeurs secondaires autres que kératinocytaires, telles que des mélanomes (cela avait déjà été décrit, mais nous insistons en plus sur le risque jamais décrit de transformation de naevus congénitaux), et des tumeurs muqueuses vulvaire, linguale, gingivale, urothéliale... Il s'agit d'un risque encore méconnu, et à propos duquel la communauté médicale doit être alertée. Cela est particulièrement important dans le contexte d'utilisation des anti-BRAF en monothérapie, en traitement adjuvant, chez les patients ayant un risque important de récurrence de leur mélanome. Effectivement, on n'accepte pas le même niveau de risque dans une situation adjuvante que chez un patient ayant un mélanome métastatique.

3. Identification de patients à risque de développer des tumeurs secondaires

De par la fréquence élevée (50-80%) des mutations du gène *NRAS* dans les naevus congénitaux, qui sont observés chez 1 à 6% des nouveaux-nés³²², il est important de connaître le risque de transformation maligne de ce type de naevus sous inhibiteurs de BRAF, à cause de l'activation paradoxale de la voie des MAPK qu'ils induisent. De même, en théorie, toute tumeur considérée comme bénigne mais classiquement porteuse d'une mutation de *RAS*, comme par exemple les hamartomes verruco-sébacés et les polypes intestinaux, doit faire l'objet d'une surveillance particulière en cas d'exposition à un inhibiteur de BRAF.

A fortiori, en cas de mutation germinale activatrice de la voie des MAPK (comme dans les rasopathies décrites au paragraphe I-A-4) ou en cas de mutation germinale de *CDKN2A* (comme dans 25 à 40% des mélanomes héréditaires), le risque oncogène global devrait être nettement accru sous inhibiteur de BRAF, ce qui inciterait à proposer d'autres alternatives thérapeutiques en premières lignes de traitement.

4. Rôle de NF1 dans les tumeurs secondaires paradoxales ?

Du fait de la description récente d'un mécanisme de résistance aux inhibiteurs de BRAF par perte de NF1 (voir paragraphe I-C-2-a ci-dessus), nous avons lancé le séquençage de ce gène dans nos tumeurs secondaires et nous avons retrouvé 7% de mutations pathogènes connues de *NF1*. Ces résultats préliminaires ont donné lieu à la mise en route de nouvelles expériences *in vitro* actuellement en cours, quant au rôle favorisant éventuel de ces mutations de *NF1* sur une augmentation des dimères BRAF-CRAF et sur l'activation subséquente de la voie des MAPK en aval. Si cette hypothèse venait à être confirmée, cela signifierait aussi que les patients porteurs d'une mutation de *NF1* germinale seraient particulièrement à risque de développer des tumeurs secondaires sous inhibiteur de BRAF. Ces mutations germinales sont à l'origine de la neurofibromatose de type 1, la maladie autosomique dominante la plus fréquente (1 naissance sur 3000 à 5000), qui appartient au groupe des rasopathies décrites au paragraphe I-A-3. Les personnes atteintes de NF1 étant plus à risque de développer des tumeurs malignes que la population générale, aussi bien dans l'enfance qu'à l'âge adulte, une exposition aux inhibiteurs de BRAF devrait en théorie augmenter ce risque.

L'identification de ces nouvelles populations à risque, particulièrement sensibles à l'effet paradoxal des inhibiteurs de BRAF en monothérapie, permettrait dans un second temps de leur proposer des thérapeutiques plus adaptées (immunothérapie, inhibiteurs de MEK...).

5. Intérêt des « Paradox Breakers »

De nouveaux inhibiteurs de BRAF appelés « Paradox Breakers » sont en cours de développement, afin de pouvoir proposer aux patients des inhibiteurs de BRAF dépourvus de l'effet paradoxal inducteur de tumeurs secondaires.

L'un des premiers inhibiteurs de BRAF de ce nouveau genre est le PLX7904 ou PB-04³²⁷, dont l'analogue utilisable en clinique est le PLX8394 ou PB-03. Ce type d'inhibiteurs pourrait être proposé en traitement de première ligne, afin de diminuer l'incidence de tumeurs cutanées secondaires observée actuellement avec le vemurafenib, le dabrafenib et l'encorafenib utilisés en clinique. Les autres effets secondaires cutanés mimant les symptômes

des « RASopathies » (maladies génétiques liées à une activation congénitale de RAS) devraient eux aussi disparaître en l'absence d'effet paradoxal de ces nouveaux inhibiteurs de BRAF (hyperkératoses des paumes et plantes, alopecie partielle avec cheveux fins et bouclés, efflorescence naevique etc...).

L'autre avantage attendu serait une réduction de la fréquence de mutations secondaires de *NRAS* conduisant à une résistance acquise.

Cela nous amène à une autre indication potentielle de ce type d'inhibiteurs améliorés : les patients traités par vemurafenib (par exemple) et dont les tumeurs progresseraient en raison de l'acquisition d'une mutation activatrice de *NRAS*. Ces patients pourraient répondre à nouveau sur le plan tumoral en remplaçant le vemurafenib par ces nouvelles molécules dépourvues d'effet paradoxal.

Ainsi, Basile et al. ont-ils récemment démontré que leur modèle de cellules résistantes au vemurafenib par épissage alternatif de BRAF était sensible aussi bien au PLX7904 qu'au PLX8394³²⁸.

IV. Discussion et perspectives

A. *Nouvelles perspectives thérapeutiques*

Les mécanismes de résistance aux thérapies ciblées restent un défi majeur en oncologie. La résistance peut être de deux types:

- une résistance intrinsèque dès le début du traitement (résistance innée ou de novo)
- une résistance acquise, résultant de la sélection progressive de clones variants résistants.

La résistance aux médicaments anticancéreux est étudiée depuis les années 1960³²⁹, mais a pris de l'ampleur après l'avènement des thérapies ciblées et du séquençage haut débit. Le ciblage sélectif des voies de signalisation activées s'est avéré efficace, mais les réponses observées sous monothérapie ne sont généralement ni complètes, ni durables.

Une meilleure compréhension des mécanismes entrant en jeu, comme discutés dans cette thèse, est nécessaire pour élaborer des stratégies pour surmonter la résistance aux thérapies ciblées.

Pour résoudre ce problème, des efforts importants sont actuellement en cours pour :

- 1°) développer de meilleurs médicaments ou des combinaisons de médicaments plus efficaces pour mieux bloquer la signalisation oncogénique,
- 2°) développer des tests non invasifs pour surveiller la réponse aux médicaments et guetter l'émergence de clones résistants.

Jusqu'à présent, les cliniciens « attendaient » que la résistance aux médicaments se développe et proposaient ensuite un traitement de deuxième ligne.

Nous entrons maintenant dans une ère où nous devrions être capables d'anticiper la « plasticité » de la cellule cancéreuse, par une meilleure compréhension des mécanismes de résistance, et de développer des thérapies de combinaisons rationnelles et personnalisées. Si

nous ne parvenons pas à anticiper le ou les types de résistance que le cancer emploiera, nous serons du moins en mesure de les détecter très précocement par des approches de diagnostic non invasif.

Dans ce travail de thèse, nous avons ainsi identifié un nouveau biomarqueur de résistance aux inhibiteurs de BRAF et de MEK, visualisable par PLA. Ce PLA permet de mettre en évidence le maintien du complexe eIF4F dans les cellules *in vitro*, dans les prélèvements tumoraux de patients, et peut-être dans un avenir proche dans leurs cellules tumorales circulantes. Cela permettrait de repérer la résistance de façon précoce et non invasive, pour proposer une combinaison de traitement adaptée, avant la résistance macroscopique.

B. Parallèle avec le traitement du SIDA

Les diverses associations de thérapies ciblées anti-cancéreuses proposées plus haut ne vont pas sans rappeler l'optimisation de la prise en charge thérapeutique de l'infection par le VIH (Virus de l'Immunodéficience Humaine) ces trente dernières années.

Alors que les premiers patients souffrant du SIDA et traités en monothérapie par AZT à partir de 1986 récidivaient dans les mois suivant l'introduction du traitement, il serait inconcevable de nos jours de traiter un patient séropositif avec une monothérapie. La multiplication des cibles thérapeutiques simultanées permet en effet de diminuer le risque d'émergence de clone résistant, aussi bien dans le contexte du VIH que dans le contexte du cancer. Le VIH et la cellule cancéreuse partagent en effet une grande instabilité/plasticité génétique facilitant l'acquisition de mécanismes de résistance face à une pression de sélection donnée. Pour le traitement du SIDA, il a fallu attendre 1994 pour pouvoir offrir aux patients une bithérapie, puis 1996 pour la trithérapie, plus efficaces.

Aujourd'hui, les patients séropositifs ont à disposition de multiples classes de médicaments ciblant les diverses étapes de réplication du virus, avec de moins en moins d'effets secondaires, et des comprimés associant jusqu'à 4 types de molécules à la fois (le Stribild* associe emtricitabine / fumarate de ténofovir disoproxil / elvitégravir / cobicistat et est

disponible en France depuis mars 2014). A l'aide des multiples essais cliniques d'envergure internationale, il est probable que nous soyons aujourd'hui à l'aube de l'efflorescence thérapeutique du cancer comme cela a été le cas pour le traitement du SIDA, et que des combinaisons thérapeutiques efficaces et personnalisées seront disponibles plus rapidement. Cela devrait permettre à moyen terme de transformer le cancer en maladie chronique, avec de nouvelles perspectives d'avenir pour les patients mais aussi un suivi au long cours qu'il va falloir assurer du côté des structures de soin.

Concrètement, dans les cancers BRAF mutés, l'association des inhibiteurs de BRAF aux inhibiteurs de MEK est celle qui semble la plus proche, mais d'autres thérapies ciblant des molécules en aval (comme nos inhibiteurs de la traduction cap-dépendante) ou dans les voies oncogéniques parallèles sont en cours d'étude. De même, au-delà de la cellule cancéreuse à proprement parler, de nouvelles thérapies ciblées visant à stimuler les cellules immunitaires, sont particulièrement prometteuses, notamment les molécules anti PD-1, et des associations thérapeutiques simultanées ou séquentielles sont à prévoir dans les années à venir.

V. Annexes

A. Article sur les effets secondaires cutanés du vemurafenib

Annals of Oncology 24: 1691–1697, 2013
doi:10.1093/annonc/mdt015
Published online 13 February 2013

Prospective study of cutaneous side-effects associated with the BRAF inhibitor vemurafenib: a study of 42 patients

L. Boussemart^{1,2}, E. Routier¹, C. Mateus¹, K. Opletalova¹, G. Sebille¹, N. Kamsu-Kom², M. Thomas¹, S. Vagner², M. Favre³, G. Tomasic⁴, J. Wechsler¹, L. Lacroix² & C. Robert^{1,2}

¹Department of Medical Oncology; ²Inserm, U981, Institut Gustave Roussy, Villejuif; ³Papillomavirus Unit, Inserm, U190, Institut Pasteur, Paris; ⁴Department of Pathology, Institut Gustave Roussy, Villejuif, France

Received 3 October 2012; revised 16 December 2012; accepted 20 December 2012

Background: BRAF inhibitors are being developed for the treatment of metastatic melanoma harboring a V600E mutation. The use of vemurafenib significantly increases progression-free survival (PFS) and overall survival (OS) in this population of patients, but is associated with numerous adverse skin reactions.

Patients and methods: We carried out a systematic dermatologic study of 42 patients treated with vemurafenib. We collected detailed dermatologic symptoms, photos and biopsy specimens of the skin lesions which enabled us to classify the side-effects. The management and evolution of the skin symptoms are also reported.

Results: All patients presented with at least one adverse skin reaction. The most common cutaneous side-effects consisted in verrucous papillomas (79%) and hand-foot skin reaction (60%). Other common cutaneous toxic effects were a diffuse hyperkeratotic perifollicular rash (55%), photosensitivity (52%) and alopecia (45%). Epidermoid cysts (33%) and eruptive nevi (10%) were also observed. Keratoacanthomas (KA) and squamous cell carcinoma (SCC) occurred in 14% and 26% of the patients, respectively.

Conclusions: These cutaneous side-effects are cause of concern due to their intrinsic potential for malignancy or because of their impact on patients' quality of life. Management of this skin toxicity relies on symptomatic measures and sun photoprotection.

Key words: BRAF inhibitor, melanoma, side-effects, squamous cell carcinoma-targeted therapy, vemurafenib

introduction

New anticancer therapies targeting various kinases implicated in cancer onset or progression are now commonly used and they improve the prognosis of several cancers.

Activating B-RAF (V600E) (also known as BRAF) kinase mutations occur in ~7% of human malignancies and ~60% of

melanomas [1]. A novel class I RAF-selective inhibitor, vemurafenib, demonstrated an unprecedented 60% antitumor response rate among patients with BRAF(V600E)-positive melanomas, but vemurafenib is not devoid of side-effects. Among the most intriguing of these side-effects are skin neoplasms originating from keratinocytes that occur following treatment with BRAF inhibitors (vemurafenib and dabrafenib), as previously observed with sorafenib, a multikinase inhibitor and a pan-RAF inhibitor [2].

In this study, we prospectively followed up 42 patients undergoing vemurafenib treatment either in the context of

*Correspondence to: Dr C. Robert, Department of Medical Oncology, Institut Gustave Roussy, 114 rue Edouard Vallant, 94800 Villejuif, France. Tel: +33-1-42-11-42-10, Fax: +33-1-42-11-50-02; E-mail: caroline.robert@igr.fr

BRIM3 (13 patients), an open phase III clinical study comparing vemurafenib with dacarbazine as the first systemic therapy in patients with metastatic melanoma [3] or in patients receiving vemurafenib in a compassionate use program (29 patients from December 2010 until March 2012). All of these patients developed adverse skin reactions and the spectrum of skin symptoms was akin to that recently described with dabrafenib [4], suggesting that they result from a class effect.

patients and methods

Between March 2010 and March 2012, 42 patients (25 men and 17 women) with a mean age of 53 years (range 28–86 years) who were treated with vemurafenib underwent a dermatologic evaluation and photography every 3 weeks. Detailed descriptions of clinical and pathological features as well as characterization of the severity and evolution of these cutaneous effects were undertaken. Data were collected at each clinic visit during this study. Patients were questioned about skin symptoms and skin events. The dermatologic examination was carried out, at baseline and every 3 weeks, by dermatologists familiar with vemurafenib and its potential adverse effects.

Cutaneous lesions occurring during therapy were photographed and biopsied for pathological examination in willing patients. Cutaneous reactions were classified according to the National Cancer Institute's Common Toxicity Criteria 4.02, 2009.

We included all consecutive patients enrolled in the vemurafenib arm of the BRIM 3 study in our center as well as 29 patients receiving the drug through compassionate use. Forty-one patients had a stage IV melanoma and one patient, stage IIIC disease. Patient clinical characteristics are shown in Table 1. Vemurafenib was given orally at an initial dose of 960 mg bid. Patients were not taking any immunosuppressive or photosensitivity-inducing drug. No patient had a history of papilloma, keratoacanthoma (KA) or SCC.

Skin punch biopsies (4 mm) were carried out before treatment in seven patients, and under treatment in 18 patients. Immunohistochemical analysis of all biopsy specimens was carried out with the anti-p16 antibody (mouse anti-human p16^{INK4a} antibody, CINtec Histology Kit 9511) according to the manufacturer's instructions.

results

The diverse cutaneous symptoms which occurred in each patient under vemurafenib are reported in Table 2. All patients experienced at least one cutaneous side-effect.

Both benign and malignant skin tumors occurred during vemurafenib therapy, but the most common cutaneous side-effect consisted in the appearance of benign verrucous papillomas (33 patients, 79%) with a mean time to onset of 35 days (7–100). Verrucous papillomas exhibited polypoid lesions with a verrucous and hyperkeratotic surface (Figure 1A). They were observed essentially on the face and the trunk, but also on the limbs. They usually measured between 3 and 5 mm. An efflorescence of those papillomas occurred in about half of the patients, who developed from 4 to 20 papillomas. An efflorescence of nevi was also observed in four patients at a mean time to onset of 81 days (52–130 days), as described before under sorafenib [5].

Cystic lesions presenting as milia cysts on the face were seen in 13 patients (31%) and occurred after a mean time to onset

of 48 days (21–83 days). Epidermoid cysts were observed in 14 patients (33%), with a mean time to onset of 108 days (7–253).

Regarding borderline or malignant skin tumors, one patient (patient 1) developed a second primary melanoma on the trunk, which was diagnosed after 84 days of treatment. It was a second superficial spreading melanoma, with a Breslow index of 0.34 mm. Six patients (14%) developed a KA with a mean time to onset of 77 days (27–172) and microinvasive squamous cell carcinoma (SCC) arose in 11 patients (26%) at a mean time to onset of 111 days (50–515). The KA and the SCC were localized on diverse areas such as the face, neck, trunk or thigh. One SCC developed on the vulva. All these tumors were simply excised, and none required vemurafenib dose modification. Atypical keratinocytes corresponding to koilocyte-like cells were present in the stratum granulosum in several skin lesions: 66% of papillomas, but also in some KAs (50%) and SCC (16%) (Figure 1B and C).

Because both clinical appearance and presence of koilocytes suggested that human papillomaviruses (HPVs) might be involved in this process, we carried out immunostaining for P16 in 17 skin tumors from our patients: 9 papillomas, 2 KAs and 6 SCC. P16 is a tumor suppressor gene product that is overexpressed in most cervical carcinomas and dysplasias associated with HPV infection [6]. Among the 17 tumors tested, 11 (65%) were positive for p16: 5 papillomas, 2 KAs and 4 SCC (Figure 2).

Another common cutaneous side-effect consisted in the hand-foot skin reaction (25 patients, 60%) (Figure 3), predominantly on the soles (the reaction was graded 1 and 2 in 22 and 3 patients, respectively). The hyperkeratosis typically presented as yellowish, painful, hyperkeratotic plaques localized on the pressure points on the sole of the foot (heels and metatarsals). We did not observe any bullous lesions occurring during those hand-foot skin reactions, and those symptoms did not affect the patient's ability to walk. The mean time to onset was 61 days (8–300) and patients were treated with urea-based cream (10%–30% of urea). The hyperkeratosis on the palms and soles was similar to that described under sorafenib treatment [7]. No paronychia was observed.

Mucosal hyperkeratosis was also observed in two patients: vulvar hyperkeratosis (patient 9) and gum hyperkeratosis (patient 2, supplementary Figure S1, available at *Annals of Oncology* online).

Half of the patients suffered from photosensitivity, particularly those treated with vemurafenib during summer time. This cutaneous photosensitivity consisted in eruptions arising on sun-exposed areas of the skin: the face, ears, dorsal forearms and the 'v'-area of the neck and upper chest (Figure 4). Sixteen patients exhibited grade 1 photosensitivity with simple erythema covering <10% of the body surface area, four patients experienced grade 2 photosensitivity with tender erythema covering 10%–30% of the body surface area and two patients developed grade 3 photosensitivity with blistering. Photosensitivity prevention involving maximal sun avoidance in addition to protective clothing and sunscreen photoprotection, even for minimal sun exposure, was advised for all patients. Nevertheless, photoprotection counseling did not always prevent photosensitivity reactions.

Among the 22 patients who developed photosensitivity, six also suffered from cheilitis, predominantly on the lower lip in

Table 1. Clinical characteristics of each patient

S No.	Sex	Age, years	Photosensitivity	Follicular rash	HFSR	Nipple HK	Cysts/milia	Papiloma/warts	KA/SCC	Nevi	Xerosis	Panniculitis	Hair modification	Miscellaneous
1	F	58	x	x	x			X	x				x	Lower lip cheilitis, second melanoma, one actinic keratosis
2	M	55	x	x	x		x	X						Lower lip cheilitis, Darier's disease flare-up, gingival hyperkeratosis
3	F	59	x	x			x	X	x	x			x	Grade 2 alopecia, >20 verrucous papillomas
4	M	80	x					X						>10 verrucous papillomas
5	F	57	x	x	x	x	x	X	x	x			x	Grade 2 alopecia, HFSR grade 2, frontal and vulvar milia, lower lip cheilitis, five verrucous papillomas, two SCC, one actinic keratosis
6	F	48			x		x	X		x	x		x	Lower lip cheilitis, thinner and slower hair growth, two verrucous papillomas
7	M	41	x	x						x	x			Maculopapular exanthema, cheilitis
8	M	54	x	x					x				x	Slower hair growth followed by grade 1 alopecia, lower lip cheilitis, 2 BCC
9	F	44	x	x		x	x	X	x			x	x	Frontal milia, bitemporal effluvium, slower body hair growth, vulvar leucoplasia, panniculitis, two SCC
10	M	42	x	x						x				Atopic dermatitis improvement
11	M	70	x	x		x	x	X	x	x			x	Follicular hyperkeratotic rash with pilar dystrophy, HFSR grade 2, 4 verrucous papilloma
12	M	60		x		x				x	x			Follicular hyperkeratotic rash with pilar dystrophy, pruritus
13	M	42	x	x			x							Rash with pilar dystrophy and cysts
14	M	29		x										Facial erythema, radiodermatitis
15	F	37	x							x				
16	F	37	x	x			x	X		x				Urticaria
17	M	39	x	x										
18	M	54	x					X	x				x	Maculopapular rash, facial erythema
19	M	44					x	X						Milia, verrucous papilloma
20	M	50	x										x	
21	F	65	x	x		x	x	X	x	x			x	Maculopapular rash, facial and vulvar erythema
22	F	57			x		x	X		x		x		Maculopapular rash, facial and feet oedema, HFSR grade 2
23	F	66	x				x	X		x				Maculopapular rash, facial milia
24	M	86						X		x				
25	F	34	x	x		x	x	X					x	Thinner hair, panniculitis
26	M	74	x			x		X						
27	M	71				x		X					x	Thinner hair, radiodermatitis
28	M	55				x				x			x	Thinner hair, pruritus
29	M	59		x				X	x					Two invasive SCC
30	M	39		x										
31	M	49		x	x			X						
32	F	58			x			X						
33	F	26			x		x	X				x		Panniculitis
34	M	84		x	x		x	X	x	x				
35	M	54		x	x			X		x				
36	M	51						X	x					Invasive SCC
37	F	49		x	x			X					x	
38	F	70			x			X	x			x	x	Inflammatory seborrheic keratosis, panniculitis, five SCC, three KA
39	M	43	x					X		x				Grade 3 photosensitivity
40	F	31		x	x			X				x	x	Panniculitis
41	M	50			x			X						
42	F	70			x			X	x				x	Vulvar invasive SCC

five of them. This grade 1 cheilitis emerged after a mean time to onset of 32 days (7–41). It did not lead to a dose reduction in any patient, and usually resolved spontaneously within a week or two.

Twenty-three of the 42 patients (55%) also developed an skin rash consisting in grade 1 or 2 erythematous, hyperkeratotic follicular papules, arising after a mean time to onset of 32 days (7–80), predominantly on the back of the arms and on the front of the thighs (supplementary Figure S2, available at *Annals of Oncology* online). When carried out on these lesions, skin biopsies revealed pilar dystrophy or folliculitis. This hyperkeratotic perifollicular rash was associated with grade 1 bilateral yellowish nipple hyperkeratosis in five patients (supplementary Figure S3, available at *Annals of Oncology* online).

Altered hair growth was observed in 19 patients (45%). At a mean interval of 2 months (20–150 days), 12 patients noted slower and thinner growth of scalp hair, while 7 other patients

exhibited real alopecia (five grade 1 and two grade 2). It was usually associated with slower body hair growth. These changes in hair growth did not lead to a dose reduction in any patient. Interestingly, this alopecia was spontaneously reversible within 6 months of treatment with thinner hair growth despite continued treatment (supplementary Figure S4, available at *Annals of Oncology* online).

Grade 1 xerosis was not uncommon as it affected 14 patients (33%), with a mean time to onset of 57 days (2–180). The xerosis was sometimes associated with mild pruritus. It was easily improved with the use of emollient creams. Interestingly, one patient diagnosed as having atopic dermatitis for years before vemurafenib treatment, experienced greatly improved eczema symptoms within the first week until the fifth month of treatment.

Moderate erythema of the face was reported in seven patients (17%) with a mean time to onset of 62 days (10–140 days), and was associated with photosensitivity in six of those seven patients. The facial drug reaction appeared as a homogeneous, slightly erythematous facial eruption associated with superficial desquamation. Lesions usually involved the mediofacial area and spared the periorbital area, as previously described with sorafenib [5].

Six patients (14%) developed panniculitis of the lower extremities with a mean time to onset of 78 days (9–240). Alpha-1 antitrypsin deficiency and Weber–Christian disease were ruled out due to normal alpha-1 antitrypsin and pancreatic enzyme levels.

Two patients developed a relatively severe radiodermatitis, with severe erythema associated with vesicular or bullous lesions restricted to the irradiated area. Those eruptions resolved within a week with daily use of topical steroids (supplementary Figure S5, available at *Annals of Oncology* online).

Within 3 weeks of treatment, one patient also had a rash reminiscent of Darier's disease, with typical clinical and pathological characteristics of this condition [8]: he presented with a flare-up of greasy, scaly papules on the back, associated with gingival lesions, and the skin biopsy specimens revealed typical abnormal intra-keratinocyte adhesion typical of Darier's disease.

Table 2. Cutaneous symptoms reported among our 42 patients, classified in the order of decreasing frequency

Cutaneous symptoms	N	Prevalence (%)	Start day
Verrucous papilloma	33	79	35 (7–100)
Hand-foot skin reaction	25	60	61 (8–300)
Hyperkeratotic follicular rash	23	55	32 (7–80)
Photosensitivity	22	52	47 (2–166)
Hair growth modification	19	45	61 (20–150)
Xerosis	14	33	57 (2–180)
Cystic lesion	14	33	108 (7–253)
Milia	13	31	48 (21–83)
SCC	11	26	111 (50–515)
Facial erythema	7	17	62 (10–140)
Cheilitis	6	14	32 (7–41)
Panniculitis	6	14	78 (9–240)
Keratoacanthoma (KA)	6	14	77 (27–172)
Nipple hyperkeratosis	5	12	76 (30–120)
Naevi efflorescence	4	10	81 (52–130)
Severe radiodermatitis	2	5	34 (13–55)

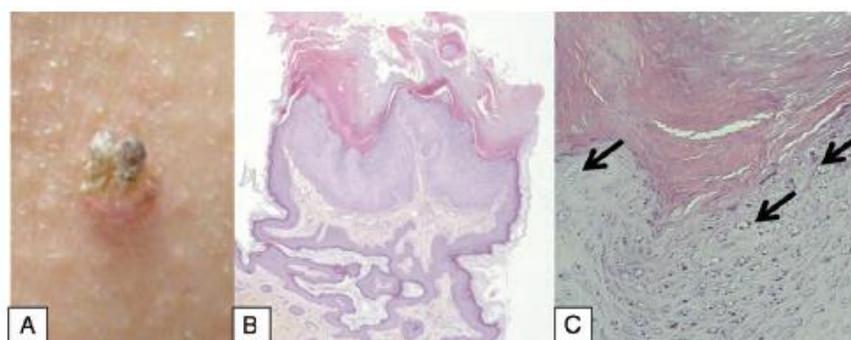


Figure 1. (A) A typical verrucous papilloma observed on the trunk of a patient 3 treated with vemurafenib for 42 days. Note the associated follicular hyperkeratosis of the surrounding skin. (B and C) Histological section of a verrucous papilloma (hematoxylin–eosin, original magnification B \times 2.5 and C \times 20). Note the perinuclear clear spaces in the superficial layers of the epidermis visible at high magnification, mimicking HPV-altered koilocytes. 341 \times 136 mm (96 \times 96 DPI).

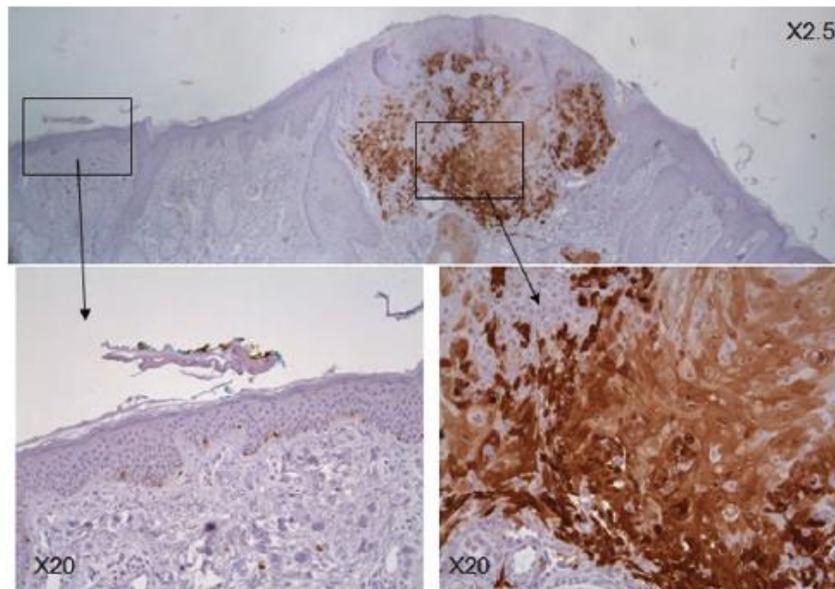


Figure 2. Strong P16 immunostaining of a microinvasive SCC resected 109 days after the start of vemurafenib therapy (patient 9). 162 × 114 mm (96 × 96 DPI).



Figure 3. Bilateral hyperkeratosis of the soles in patient 2 after 2 months of vemurafenib. 114 × 151 mm (96 × 96 DPI).

discussion

This is the first and largest prospective study of skin side-effects occurring during vemurafenib therapy. The main finding resulting from this study is that, in a prospective setting, with patients being examined by a dermatologist, all



Figure 4. Photosensitivity after 40 days of treatment with vemurafenib (patient 9) 255 × 153 mm (96 × 96 DPI).

patients developed at least one cutaneous side-effect. This signifies that the reports of cutaneous side-effects documented by oncologists frequently underestimate the true frequency of these adverse events. Thirty-two patients (76%) developed a rash, either secondary to photosensitivity, or a perifollicular hyperkeratotic rash. Compared with that observed with cetuximab (a monoclonal antibody against EGFR), this perifollicular eruption was more hyperkeratotic than acneiform, and predominantly localized on the limbs. Exacerbation of hyperkeratosis was also clearly visible on the hands, feet or nipples in 27 patients (64%). This keratinocyte proliferation, which can also be involved in the formation of papillomas, KA and SCC, could be attributed to the ability of vemurafenib to paradoxically activate the Mitogen-Activated Protein (MAP) Kinase (MAPK) pathway in cells devoid of a BRAF mutation, as previously demonstrated *in vitro* [9] and *in*

in vivo [10]. The skin tumors observed in our study occurred at a similar frequency to that described in the large pivotal phase III study BRIM-3 with respect to SCC and KA [3] although it was found to be much less frequent in a large series of patients receiving vemurafenib in the context of an extended access program (<5%) [11]. However, it can be suspected that dermatology follow-up is less strict in the latter study and that the real incidence of these skin proliferations might have been underestimated. In 2008, our team described similar but less frequent SCC, cysts, milia, and palmo-plantar hyperkeratosis among patients undergoing treatment with sorafenib, a pan-RAF inhibitor [2]. The cellular proliferation of wild-type cells in the skin could also explain the eruptive nevi phenomenon observed in our study (10% of our patients) and under sorafenib therapy through a similar pathway [12].

As it has also been reported by others, one of our patients developed a second melanoma under vemurafenib [13, 14]. The possibility of malignant melanocytic proliferation under vemurafenib could also be explained by paradoxical activation of the MAPK pathway in wt-BRAF melanocytes. Indeed, any patient undergoing vemurafenib treatment may develop BRAF wild-type (wt) nevi that could paradoxically degenerate under this targeted therapy. Until now, there was no clear demonstration that melanoma occurring under vemurafenib therapy could be due to the transformation of a RAS mutated pigmented naevus, but it is also possible that somatic events distinct from a RAS mutation could be involved. This risk should be particularly acknowledged, as vemurafenib is currently being evaluated as an adjuvant therapy.

Additional somatic events, namely oncogene mutations or papillomavirus infection, might be cofactors of paradoxical cell proliferation facilitated by BRAF inhibitors in the context of wt-BRAF. Indeed, we and others demonstrated a high frequency of ras, TGF- β -receptor or p53 oncogenic mutation in skin tumors among patients treated with BRAF inhibitors [11, 12, 15]. BRAF-specific inhibitors like vemurafenib and dabrafenib induce verrucous papillomas more frequently than sorafenib. The presence of koilocytes and p16-positive keratinocytes in some of the lesions presented by our patients suggests a potential role for HPV in at least a subset of these tumors. This is highlighted by the occurrence in one of our patients of an invasive SCC of the vulva, 12 weeks after vemurafenib initiation. We are presently carrying out further investigations to evaluate the causative role of these viruses in the emergence of epithelial tumors.

Although it is difficult to draw conclusions based on a series of 42 patients, patients who experienced the most severe skin toxicity did not seem to have enjoyed longer survival as reported with EGFR inhibitors [16, 17]. Fortunately, none of these skin symptoms led to the interruption of therapy as long as the metastatic melanoma continued to respond.

Most of the cutaneous symptoms appearing under vemurafenib were improved with symptomatic treatment. Proper identification and treatment of vemurafenib-induced skin toxicity help to improve the quality of life in patients with cancer, thereby promoting compliance with antineoplastic treatment and consequently prolonging survival.

Prevention should consist of clearly informing the patients about the side effects before initiating therapy. The patients

should be alerted to the likelihood of these skin adverse events and should receive advice regarding effective photoprotection. As Dummer et al. recently demonstrated, this effect is mediated by ultraviolet A radiation (UVA) part of the solar UV spectrum [18] and should be explained to each patient, recommending the use of broadband UV-sunscreen including UVA rays as well as UV-dense clothing regardless of daylight and season, as UVA penetrates glass.

Most the SCC we diagnosed were resected at a microinvasive stage, thus rendering the risk of metastasis minimal. It is nevertheless critical to carefully and completely examine the skin of patients under vemurafenib at each consultation, every month at least, and to ask the patient to promptly report any new skin lesion in order to avoid the development of more invasive SCC. Because of our hypothesis that papillomaviruses might act as cofactors in the occurrence of some skin and genital tumors in this context, we recommend an oral and genital examination as well as a pap smear test before initiating anti-BRAF therapy.

We do not know whether this paradoxical proliferative effect is limited to skin cells or whether it would affect other cells in the body. That is why a stringent follow-up is required when using these drugs, particularly if they are given to patients with a long-life expectancy, in an adjuvant setting.

Additional BRAF inhibitors are being developed, and a phase III trial evaluating dabrafenib was recently presented, with a similar efficacy in terms of progression-free survival (PFS), and a very close spectrum of skin adverse events, although the latter drug seems to be devoid of photosensitivity effects [19]. As vemurafenib and other BRAF inhibitors are being increasingly prescribed, it is important to clearly signal their numerous adverse skin reactions, their nature, how they evolve but also how to prevent and treat them. Thus, the skin adverse reactions reported and detailed here are likely to represent a class effect rather than molecule-specific manifestations.

Hopefully, in the near future, the proliferative cutaneous side-effects of BRAF inhibitors might at least be partially annihilated by combining BRAF-specific targeted therapy with anti-MEK drugs, which block the MAPK pathway downstream of BRAF. Indeed, the preliminary clinical studies have suggested that anti-MEK-targeted therapy does not induce any proliferative skin symptoms such as SCC and KA seen under anti-RAF drugs [20, 21]. Thus, the anti-BRAF and anti-MEK combination could not only increase the treatment efficacy but also prevent the emergence of secondary tumors observed under anti-BRAF treatment.

acknowledgements

The authors would like to thank the patients for enabling them to present these cases to a scientific audience in the form of an article. The authors thank Loma Saint Ange for editing.

disclosure

CR is a consultant for Roche, GSK, BMS, Novartis. The other authors have declared no conflicts of interest and there were no funds for this study.

references

- Davies H, Bignell GR, Cox C et al. Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature* 2002; 417(6892): 949–954.
- Arnault JP, Wechsler J, Escudier B et al. Keratoacanthomas and squamous cell carcinomas in patients receiving sorafenib. *J Clin Oncol* 2009; 27(23): e59–e61.
- Chapman PB, Hauschild A, Robert C et al. Improved survival with vemurafenib in melanoma with BRAF V600E mutation. *N Engl J Med* 2011; 364(26): 2507–2516.
- Hong S, Hong S, Han SB. Overcoming metastatic melanoma with BRAF inhibitors. *Arch Pharm Res* 2011; 34(5): 699–701.
- Kong HH, Sibaud V, Chanco Turner ML et al. Sorafenib-induced eruptive melanocytic lesions. *Arch Dermatol* 2008; 144(6): 820–822.
- Tsoumpou I, Arbyn M, Kyrgiou M et al. p16(INK4a) immunostaining in cytological and histological specimens from the uterine cervix: a systematic review and meta-analysis. *Cancer Treat Rev* 2009; 35(3): 210–220.
- Autier J, Escudier B, Wechsler J et al. Prospective study of the cutaneous adverse effects of sorafenib, a novel multikinase inhibitor. *Arch Dermatol* 2008; 144(7): 886–892.
- Szigei R, Kellermayr R. Autosomal-dominant calcium ATPase disorders. *J Invest Dermatol* 2006; 126(11): 2370–2376.
- Hatzivassiliou G, Song K, Yen I et al. RAF inhibitors prime wild-type RAF to activate the MAPK pathway and enhance growth. *Nature* 2010; 464(7287): 431–435.
- Su F, Vros A, Milagre C et al. RAS mutations in cutaneous squamous-cell carcinomas in patients treated with BRAF inhibitors. *N Engl J Med* 2012; 366(3): 207–215.
- Blank C, Dei Vecchio M, Ascierto PA et al. Personal communication, ESMO 2012.
- Arnault JP, Mateus C, Escudier B et al. Skin tumors induced by sorafenib; paradoxical RAS–RAF pathway activation and oncogenic mutations of HRAS, TP53, and TGFBR1. *Clin Cancer Res* 2012; 18(1): 263–272.
- Zimmer L, Hillen U, Livingstone E et al. Atypical melanocytic proliferations and new primary melanomas in patients with advanced melanoma undergoing selective BRAF inhibition. *J Clin Oncol* 2012; 30(19): 2375–2383.
- Dalle S, Poulalhon N, Thomas L. Vemurafenib in melanoma with BRAF V600E mutation. *N Engl J Med* 2011; 365(15): 1448–1449.
- Oberholzer PA, Kee D, Dziunycz P et al. RAS mutations are associated with the development of cutaneous squamous cell tumors in patients treated with RAF inhibitors. *J Clin Oncol* 2012; 30(3): 316–321.
- Saltz LB, Mempel NJ, Loehrer PJ, Sr et al. Phase II trial of cetuximab in patients with refractory colorectal cancer that expresses the epidermal growth factor receptor [abstract]. *J Clin Oncol* 2004; 22: 1201–1208.
- Cunningham D, Humblet Y, Siena S et al. Cetuximab monotherapy and cetuximab plus irinotecan in irinotecan-refractory metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med* 2004; 351: 337–345.
- Dummer R, Rinderknecht J, Goldinger SM. Ultraviolet A and photosensitivity during vemurafenib therapy. *N Engl J Med* 2012; 366(5): 480–481.
- Hauschild A, Grob JJ, Demidov LV et al. Dabrafenib in BRAF-mutated metastatic melanoma: a multicentre, open-label, phase 3 randomised controlled trial. *Lancet* 2012; 380(9839): 358–365.
- Flaherty KT, Robert C, Hersey P et al. Improved survival with MEK inhibition in BRAF-mutated melanoma. *N Engl J Med* 2012; 367(2): 107–114.
- Falchook GS, Lewis KD, Infante JR et al. Activity of the oral MEK inhibitor trametinib in patients with advanced melanoma: a phase 1 dose-escalation trial. *Lancet Oncol* 2012; 13(8): 782–789.

Skin Tumors Induced by Sorafenib; Paradoxical RAS–RAF Pathway Activation and Oncogenic Mutations of *HRAS*, *TP53*, and *TGFBR1*

Jean Philippe Arnault¹, Christine Mateus¹, Bernard Escudier¹, Gorana Tomasic², Janine Wechsler¹, Emilie Hollville¹, Jean-Charles Soria^{1,3}, David Malka¹, Alain Sarasin⁴, Magalie Larcher⁵, Jocelyne André⁶, Nyam Kamsu-Kom³, Lise Boussemart^{1,3}, Ludovic Lacroix³, Alain Spatz⁷, Alexander M. Eggermont¹, Sabine Druilleme⁵, Stephan Vagner³, Alain Eychène⁵, Nicolas Dumaz⁶, and Caroline Robert^{1,3}

Abstract

Purpose: The emergence of skin tumors in patients treated with sorafenib or with more recent BRAF inhibitors is an intriguing and potentially serious event. We carried out a clinical, pathologic, and molecular study of skin lesions occurring in patients receiving sorafenib.

Experimental Design: Thirty-one skin lesions from patients receiving sorafenib were characterized clinically and pathologically. DNA extracted from the lesions was screened for mutation hot spots of *HRAS*, *NRAS*, *KRAS*, *TP53*, *EGFR*, *BRAF*, *AKT1*, *PI3KCA*, *TGFBR1*, and *PTEN*. Biological effect of sorafenib was studied *in vivo* in normal skin specimen and *in vitro* on cultured keratinocytes.

Results: We observed a continuous spectrum of lesions: from benign to more inflammatory and proliferative lesions, all seemingly initiated in the hair follicles. Eight oncogenic *HRAS*, *TGFBR1*, and *TP53* mutations were found in 2 benign lesions, 3 keratoacanthomas (KA) and 3 KA-like squamous cell carcinoma (SCC). Six of them correspond to the typical UV signature. Treatment with sorafenib led to an increased keratinocyte proliferation and a tendency toward increased mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway activation in normal skin.

Sorafenib induced BRAF–CRAF dimerization in cultured keratinocytes and activated CRAF with a dose-dependent effect on MAP-kinase pathway activation and on keratinocyte proliferation.

Conclusion: Sorafenib induces keratinocyte proliferation *in vivo* and a time- and dose-dependent activation of the MAP kinase pathway *in vitro*. It is associated with a spectrum of lesions ranging from benign follicular cystic lesions to KA-like SCC. Additional and potentially preexisting somatic genetic events, like UV-induced mutations, might influence the evolution of benign lesions to more proliferative and malignant tumors. *Clin Cancer Res*; 18(1); 263–72. ©2011 AACR.

Introduction

BRAF is the most frequently mutated protein kinase in human cancer (1) and is the target of several anticancer

drugs. The potency and the specificity of BRAF inhibitors available on the market or under clinical development are variable. Sorafenib (Nexavar, Bayer/Onyx) is a pan-RAF inhibitor which also blocks VEGF receptors (VEGFR)-2, -3, platelet-derived growth factor receptor- β , fms-like tyrosine kinase 3 (FLT3), and KIT. Conversely, vemurafenib (Plexikon/Roche) or GSK2118436 (GlaxoSmithKline) are highly selective and very potent BRAF inhibitors. These latter drugs have a low IC₅₀ for mutated oncogenic BRAF and are less active on wild-type BRAF (wtBRAF) and other RAF kinases. The clinical activities of these inhibitors also differ from one another. Selective BRAF inhibitors like vemurafenib and GSK2118436 are efficient against tumors harboring *BRAF* mutations and dependent on the RAF/MEK/ERK (mitogen-activated protein (MAP)/extracellular signal-regulated (ERK; MEK) kinase) pathway. Melanoma with V600E *BRAF* mutation is a case in point (2). Sorafenib activity is not linked to the presence of a *BRAF* mutation in the tumor and is more likely due to its antiangiogenic effect. Sorafenib is efficient and has been approved for the

Authors' Affiliations: Departments of ¹Medical Oncology and ²Pathology; ³INSERM U981; ⁴CNRS UMR 8200, Institute Gustave Roussy, Villejuif; ⁵INSERM U1021 - CNRS UMR 3347, Institute Curie, Orsay; ⁶INSERM, U976, Univ Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité, UMR5976, Paris, France; and ⁷Department of Pathology, McGill University, Montreal, Canada

Note: Supplementary data for this article are available at Clinical Cancer Research Online (<http://clincancerres.aacrjournals.org/>).

J.P. Arnault, C. Mateus, N. Dumaz, and C. Robert contributed equally to the work.

Corresponding Author: Caroline Robert, Department of Medical Oncology, Dermatology Unit and INSERM U981, Gustave Roussy Institute, Villejuif, France. Phone: 33-6-85-54-29-71; Fax: 33-1-42-11-50-02; E-mail: caroline.robert@igr.fr

doi: 10.1158/1078-0432.CCR-11-1344

©2011 American Association for Cancer Research.

Translational Relevance

Skin tumors appearing during the course of RAF inhibitors–based therapy is an intriguing and potentially serious adverse effect of these new drugs. We carried out a detailed clinical, pathologic, and molecular study of skin tumors in patients treated with sorafenib. In parallel, we studied the effect of sorafenib on normal keratinocytes *in vivo* in normal skin samples and *in vitro*. This translational study showed that the RAF inhibitor sorafenib induces a time- and dose-dependent paradoxical activation of the MAP kinase pathway in keratinocytes, leading to cell proliferation and associated with the emergence of benign (follicular cystic lesions), borderline (keratoacanthomas), and malignant (squamous cell carcinomas) tumors. Additional somatic events like oncogene mutations, possibly induced by UV rays exposure, might influence the evolution of benign lesions to malignant tumors. Understanding the mechanisms underlying this phenomenon is a first and mandatory step toward treatment and prevention of this worrisome side effect of our new targeted therapies.

treatment of metastatic renal carcinoma (3, 4) and advanced hepatocellular carcinoma (4) independently of the mutational status of *BRAF*.

In spite of their variability in terms of *BRAF* selectivity and clinical activity, all 3 RAF inhibitors are associated with one and the same intriguing cutaneous side effect which is the emergence of borderline squamous cell neoplasms. Indeed, we and others have reported single or multiple cutaneous keratoacanthomas (KA) and squamous cell carcinomas (SCC) during treatment with sorafenib (5–9). These paradoxical keratinocyte proliferations arise in 6% to 7% of patients (5–10). The induction of KA and SCC is even more frequent with vemurafenib and GSK2118436 and has been described in 15% to 25% of the patients (2, 10).

We undertook a translational research in the aim of understanding the mechanisms of these skin cancer inductions. We first conducted a detailed clinical, pathologic, and molecular study of the skin neoplasms arising in patients treated with sorafenib. We then looked at the biological effects of sorafenib *in vivo* on normal skin samples from patients treated with sorafenib or a placebo. In parallel, we analyzed the effect of sorafenib *in vitro* on cultured keratinocytes. We found that sorafenib exposure was associated with increased mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway activation and keratinocyte proliferation *ex vivo* and *in vivo*. Sorafenib induced dose-dependent *BRAF*/*CRAF* dimerization associated with strong activation of *CRAF* in cultured keratinocytes. Finally, oncogenic mutations in *HRAS*, *TGFBR1*, and *TP53* were detected in several benign or malignant skin tumors. Altogether, our results suggest that sorafenib induces a continuous spectrum of keratinocyte changes and proliferation via the paradoxical activation

of the MAPK pathway in keratinocytes associated with *BRAF*/*CRAF* heterodimerization and subsequent *CRAF* activation. Additional events such as a *HRAS* mutation or *EGFR* activation giving rise to MAPK pathway coactivation might be required for full transformation of keratinocytes.

Materials and Methods

Patients and skin samples

Thirty-one skin lesions diagnosed as follicular cystic skin lesions, perforating folliculitis (PF), KA, or SCC originating from 17 patients treated with sorafenib from 2005 to 2010 were studied.

For each patient, the tumor type, duration of sorafenib therapy before the emergence of the skin tumor, and the clinical description of the skin lesions are reported. Four-micrometer sections from formalin-fixed, paraffin-embedded biopsy samples of skin lesions were stained with hematoxylin and eosin and independently read by 2 pathologists.

Normal skin samples from patients included in the TARGET study, evaluating sorafenib versus a placebo in patients with renal cell cancer were also studied (3). Normal skin biopsy samples were collected from the forearms of patients who received sorafenib or a placebo for 6 weeks.

Each skin sample was cut into 4- μ m sections, formalin-fixed, paraffin-embedded, and stained with hematoxylin and eosin. A section from each case was analyzed immunohistochemically for Ki-67 (monoclonal MIB-1; Dako) and phospho-ERK protein (monoclonal 20G11; Cell Signaling Technology). Slides were deparaffinized and treated with an alcohol gradient to absolute ethanol. Endogenous peroxidase activity was blocked with the Peroxidase-Blocking Solution (Dako; S2001). Antigen retrieval was achieved with Target Retrieval Solution (Dako). Primary antibody was applied at 1:100 dilution and incubated at 4°C for 1 hour. Anti-mouse immunoglobulin G with the Dako EnVision System (horseradish peroxidase) was employed according to the manufacturer's instructions.

DNA isolation and mutation detection on biopsy specimens of skin lesions

Genomic DNA was extracted from 10- to 20- μ m thick paraffin-embedded unstained slides of each skin lesion with the DNeasy Blood and Tissue Kit (QIAGEN) according to the manufacturer's instructions. We analyzed full coding sequences of 70 exons including oncogenic mutational hot spots corresponding to *AKT1* (NM_005163.2) exon 4, *BRAF* (NM_004333.4) exons 11 and 15, *EGFR* (NM_005228.3) exons 18 to 21, *HRAS* (NM_005343.2) exons 2 and 3, *KRAS* (NM_033360.2) exons 2 and 3, *NRAS* (NM_002524.3) exon 2 and 3, *PIK3CA* (NM_006218.2) exons 10 and 21, *PTEN* (NM_000314.4) exons 1 to 9, *TP53* (NM_000546.4) exons 2 and 11, and *TGFBR1* (NM_004612.2) exons 2, 4, 6, and 7.

Sequences were analyzed by Sanger direct sequencing conducted after PCR amplification of target exons. Sequencing reactions were carried out by the BigDye Terminator

Cycle Sequencing Kit software according to the manufacturer's recommendations (Applied Biosystems). The primer sequences are available upon request. Sequencing reactions were analyzed on a 48-capillary 3730 DNA Analyzer. Sequence reading and alignment were carried out with SeqScape software (Applied Biosystems). All detected mutations were confirmed following at least 1 independent PCR reaction.

In vitro experiment with HaCat keratinocytes

Cell culture. HaCat keratinocytes were cultured in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (Invitrogen) containing 10% fetal calf serum (Perbio) and antibiotics (penicillin/streptomycin; Invitrogen). Cellular proliferation was evaluated by the CellTiter Assay (Promega). Sorafenib and PD153035 used for cell treatment was purchased from Alexis Biochemicals and dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO).

Protein expression. Cells were lysed in 50 mmol/L Tris (pH 7.5), 150 mmol/L NaCl, 0.5% NP40, 5 mmol/L NaF, 2 mmol/L Na₃VO₄, 10 µg/mL leupeptin, and 10 µg/mL aprotinin. For immunoprecipitation, samples were incubated with 1 µg BRAF (clones F-7 or H145; Santa Cruz) or CRAF (clone C12; Santa Cruz or clone 53/c-Raf-1; BD Transduction Laboratories) antibodies for 1 hour and immunoprecipitated by protein G-Sepharose (GE Healthcare) for 1 hour at 4°C. The immune complexes were washed 3 times with lysis buffer, proteins were separated by SDS-PAGE, and Western blot analysis was conducted according to standard protocols with the following antibodies: BRAF (F7 or H145); CRAF (C12 or 53/c-Raf-1); phospho-ERK (MAPK-YT; Sigma) and ERK (Upstate/Millipore); MCL1 (Abcam), EGFR, and phospho-EGFR (Cell Signaling); and Actin (Abcam).

Kinase assay. CRAF was immunoprecipitated from cellular extract and its activity toward MEK measured *in vitro*. Briefly, immunoprecipitated CRAF was incubated with 5 µg of purified GST-MEK in 30 mmol/L Tris (pH 7.5), 100 µmol/L EDTA, 10 mmol/L MgCl₂, 0.1% Triton X-100, 5 mmol/L NaF, 1 mmol/L ATP, 0.3% β-mercaptoethanol for 30 minutes at 30°C. The reaction was stopped by adding Laemmli buffer and analyzed by SDS-PAGE with the phospho-MEK (Cell Signaling Technology) and CRAF antibody. Phosphorylated MEK and CRAF were visualized and quantified by fluorescence on an Odyssey imaging system.

Proximity ligation assay. HaCat cells were grown on glass cover slips, treated with DMSO or sorafenib, fixed with methanol, and permeabilized with acetone. The proximity ligation assay (PLA) was conducted according to the manufacturer's instructions (Olink) with B-Raf (F7) and C-Raf (C12) antibodies.

RNA interference. HaCat cells were transfected with an siRNA control or targeting BRAF or CRAF as previously described (11).

Statistics. Simple univariate descriptive statistics were used to compare the population, using the *t* test with a 5% significance level.

Results

Clinical and pathologic characterization of skin lesions

The gender, age, cancer type, daily dose of sorafenib, time interval between the start of sorafenib therapy and the first skin symptom, the number and types of lesions as well as the skin sites involved are detailed in Table 1.

Various clinical aspects were observed but all patients developed small cystic follicular lesions that most frequently affected the face and also sometimes other parts of the skin such as the buttocks, axilla, or inguinal areas (Table 1). They occurred 3 to 5 months after the initiation of sorafenib. Cysts on the face were dominantly noninflammatory millimetric small and white lesions. Inflammatory cystic lesions exhibited erythematous hyperkeratotic papules, with a central, cone-shaped plug.

Lesions clinically suggestive of perforating folliculitis, meaning a more inflammatory infiltrate with a keratotic appearance occurred mostly on the buttocks and the upper part of the limbs (patients # 7, 11, 12, 13, and 14).

Patients 1 to 11 developed at least one lesion characteristic of KA or of KA-like SCC. Clinically, they were fast-growing firm, round nodules with a central crateriform keratotic zone. Three of these patients had multiple skin lesions (patients # 4, 6, and 7) occurring 1 to 9 months after the initiation of sorafenib.

A total of 22 lesions were excised and the pathologic examination with hematoxylin and eosin staining revealed a spectrum of lesions (Fig. 1): (i) noninflammatory cystic hair follicles, (ii) cystic folliculitis and perforating folliculitis with rupture of the hair follicle wall and perifollicular infiltrates, (iii) KA defined as a crateriform epidermal neoplasm limited by sharp beaks with no cytologic atypia nor invasion, (iv) crateriform KA-like SCC defined as crateriform epidermal neoplasms with irregular budding borders, cytologic atypia, and invasive nests (Fig. 1). Lymphatic metastatic emboli were seen in one SCC (patient #8).

Patient #7 developed the entire spectrum of the skin lesions that were observed: noninflammatory facial cysts, cystic folliculitis, perforating folliculitis, multiple KA, and SCC that emerged 3 to 5 months, respectively, after the initiation of sorafenib. Sorafenib was stopped due to cutaneous intolerance at the request of the patient after 24 months even though it was still effective against the progression of the renal cell carcinoma. All of her skin lesions, including skin tumors disappeared over a 4-month period following sorafenib interruption.

Oncogenic mutations

Eight oncogenic mutations were found in benign and malignant tumors. Three *HRAS* mutations on codon 12 or 13 were found in 3 lesions: 1 KA, 1 KA-like SCC, and 1 case of benign perforating folliculitis (Table 1). *TP53* was also found to be mutated in 3 lesions: 1 KA, 1 *in-situ* SCC, and 1 (?) case of perforating folliculitis (exons 8 and 5). Moreover 2 missense mutations of *TGFBRI* were observed in 1 KA (c.1120G>A; p.Gly374Arg) and in 1 *in-situ* SCC (c.248C>T; Pro83Leu; Table 1). Those *TGFBRI* mutations are somatic

Table 1. Patients and cutaneous lesions characteristics

Patient	Gender (M, male; F, female)	Age	Cancer	Delay months	Lesions	Site	Mutation	Cystic lesions
1	M	65	RCC	6	1 KA	Nose	TGFBR1-P83L	Face
2	M	49	RCC	9	1 KA	Thigh	WT	Face
3	M	44	RCC	3	1 KA	Cheek	TP53-G293R	Face
4	F	76	RCC	7	1 KA	Forearm	WT	Axillary, genitals
					Cystic folliculitis	Axilla	WT	
						Vulva	NT	
					1 <i>in situ</i> SCC	Cheek	TP53-C277F	
5	M	70	RCC	5	1 KA	Forearm	NT	Face
6	F	74	HCC	4	1 KA	Cheek	WT	Face
					1 KA	Cheek	WT	
					1 KA	Elbow	HRAS-G13V	
7	F	69	RCC	3	1 KA-like SCC	Palms	HRAS-G13R	Face, buttocks
						Dorsal hand	WT	
					Multiple KAs	Neck	WT	
						Torso	WT	
					PF	Buttocks	WT	
8	M	51	MM	4	1 KA-like SCC	Cheek	WT	Face
9	M	79	RCC	6	1 KA-like SCC	Back	WT	Face
10	M	46	RCC	3	1 KA-like SCC	Nose	TGFBR1-G374R	Face
					Cystic folliculitis	Nose	WT	
11	M	57	RCC	5	PF	Buttocks	WT	Face, buttocks
					Cystic folliculitis	Face	WT	
					1 KA	Elbow	WT	
12	F	60	RCC	3	PF	Buttocks	TP53-R181H	Face, buttocks
13	F	41	MM	1	PF	Buttocks	NT	Face, buttocks
14	M	62	RCC	2	PF	Legs	WT	Face, buttocks
					PF	Neck	HRAS-G12S+G12D	
15	F	41	MM	3	Multiple cystic folliculitis	Buttocks	WT	Face, buttocks
16	M		RCC	2	Multiple cystic folliculitis	Thigh and trunk	NT	Legs, trunk buttocks
17	M	50	RCC	1	Multiple cystic folliculitis	Face	WT	Face, buttocks

■ UV signature.

..... Non-UV induced.

Details of the mutated sequences:

TP53-R181H for mutation in exon 5 of TP53 (NM_000546.6) encoded c.542G>A; p.Arg181His.

TP53-C277F for mutation in exon 8 of TP53 (NM_000546.6) encoded c.830G>T; p.Cys277Phe.

TP53-G293R for mutation in exon 8 of TP53 (NM_000546.6) encoded c.877G>A; p.Gly293Arg.

HRAS-G13V for mutation in exon 2 of HRAS (NM_005343.2) encoded c.38G>T; p.Gly13Val.

HRAS-G13R for mutation in exon 2 of HRAS (NM_005343.2) encoded c.37G>C; p.Gly13Arg.

HRAS-G12S+G12D for double mutation in exon 2 of HRAS (NM_005343.2) encoded c.34G>A and c.35G>A; p.Gly12Ser and p.Gly12ASP.

TGFBR1-P83L for mutation in exon 2 of TGFBR1 (NM_004612.2) encoded c.248C>T; p.Pro83Leu.

TGFBR1-G374R for a mutation in exon 6 of TGFBR1 (NM_004612.2) encoded c.1120G>A; p.Gly374Arg.

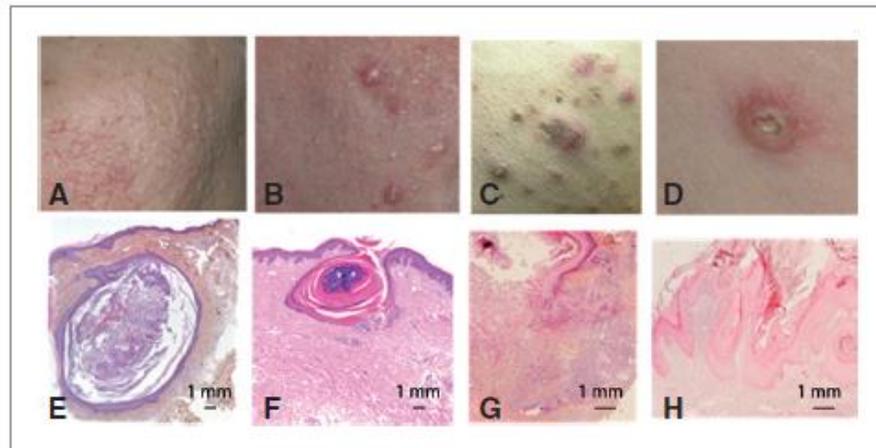
Delay (month): Interval in months between the initiation of sorafenib and the emergence of the first skin lesion.

Abbreviations: WT, wild type; NT, not tested.

mutations because they were not present in other samples for the same patient. No additional mutation of the screened exons of *BRAF*, *NRAS*, *KRAS*, *AKT1*, *PI3KCA*,

PTEN, nor *EGFR* genes was found in any of the other malignant or benign lesions. Six of these mutations are known to be typically UV induced (Table 1; refs. 13, 14).

Figure 1. Clinical and pathologic spectrum of skin lesions. Noninflammatory cystic follicular lesions (A and E), inflamed follicular cysts: folliculitis with onset of perforation (B and F), perforating folliculitis (C and G), and keratoacanthoma (D and H).



Normal skin biopsy specimens

The results of the immunostaining of normal skin samples with Ki-67 and pERK for patients treated with sorafenib or a placebo are shown in Fig. 2.

Ki-67 staining was found in the nucleus of a few scattered basal cells in nontreated patients whereas it was found in the nucleus of 1 to 2 whole layers or multiple heaps of basal cells in patients treated with sorafenib (Fig. 2A). Ki-67-stained cells were counted by 2 independent pathologists in 3 representative fields of each specimen (15). There was a significant difference between the numbers of Ki-67-positive keratinocytes in the 2 populations of patients with more proliferating cells in the sorafenib-treated group than in the placebo-treated patients (Rank test, $P = 0.03$; Fig. 2B).

We also found a tendency for increased phosphorylation of ERK in normal skin of sorafenib-treated patients compared with normal skin of placebo-treated patients. A strong positive p-ERK staining was found in 7 out of 11 normal skin samples from sorafenib-treated patients (64%), whereas only 2 out of 8 samples from placebo-treated patients (25%) showed positive, albeit weak and focal p-ERK staining (Fig. 2C and D; $P = 0.1$, Fisher exact test). The lack of statistical significance might be due here to the small number of specimen.

In vitro results on HaCat keratinocytes

We first used sequencing to verify that HaCat cells did not harbor an oncogenic mutation in any of the RAS genes (*HRAS*, *KRAS*, and *NRAS*; data not shown).

HaCat cells were treated with increasing amounts of sorafenib, and BRAF-CRAF heterodimerization was evaluated by coimmunoprecipitation experiments. We did not detect any heterodimers in DMSO-treated cells, whereas sorafenib induced BRAF-CRAF heterodimers in a dose-dependent manner in keratinocytes (Fig. 3A). As BRAF-CRAF heterodimerization was previously shown to activate CRAF, we measured CRAF kinase activity in keratinocytes treated with increasing doses of sorafenib. Of note, sorafenib is a reversible inhibitor and therefore was no longer

present during the *in vitro* kinase assay. Treatment of HaCat cells with sorafenib stimulated CRAF activity in a dose-dependent manner (Fig. 3B), which paralleled the dimerization of BRAF with CRAF (Fig. 3A), confirming that dimerization activates CRAF in keratinocytes. To analyze the biological effect of sorafenib-induced CRAF activation on the MAPK pathway, we measured ERK phosphorylation in response to sorafenib in a time course experiment. Sorafenib transiently activated ERK at 1, 3, and 10 $\mu\text{mol/L}$, attaining a maximum after 15 minutes (Fig. 4A). A more pronounced effect was observed with the lower doses of sorafenib. To analyze the biological consequence of ERK activation, we measured the proliferation rate of HaCat cells treated with increasing doses of sorafenib. Cellular proliferation was increased with the low dose (1 $\mu\text{mol/L}$) of sorafenib. Proliferation was inhibited with higher doses of sorafenib (3 and 10 $\mu\text{mol/L}$; Fig. 4B).

To determine whether this dual effect on cell proliferation could be explained by the action of sorafenib on the antiapoptotic molecule MCL1, MCL1 expression was studied as a function of sorafenib concentration. We found that MCL1 expression decreased with higher sorafenib concentrations, (3 and 10 $\mu\text{mol/L}$), whereas 1 $\mu\text{mol/L}$ of sorafenib did not influence MCL1 expression (Fig. 4C). To test whether sorafenib-induced heterodimerization could be detected *in situ*, we used a PLA. In this assay, a pair of oligonucleotide-labeled secondary antibodies (PLA probes) generates a signal only when they have bound in close proximity, thus allowing the detection of protein-protein interaction *in situ*. HaCat cells were treated or not with sorafenib and fixed. BRAF-CRAF heterodimerization was visualized by PLA with a combination of a CRAF and a BRAF antibody. Figure 5 shows that sorafenib-induced BRAF-CRAF heterodimerization can be directly detected in keratinocytes.

RNA interference confirmed the specificity of the PLA signal as inhibition of BRAF or CRAF expression with siRNA strongly diminished the PLA signal induced by sorafenib (Supplementary Fig. S1).

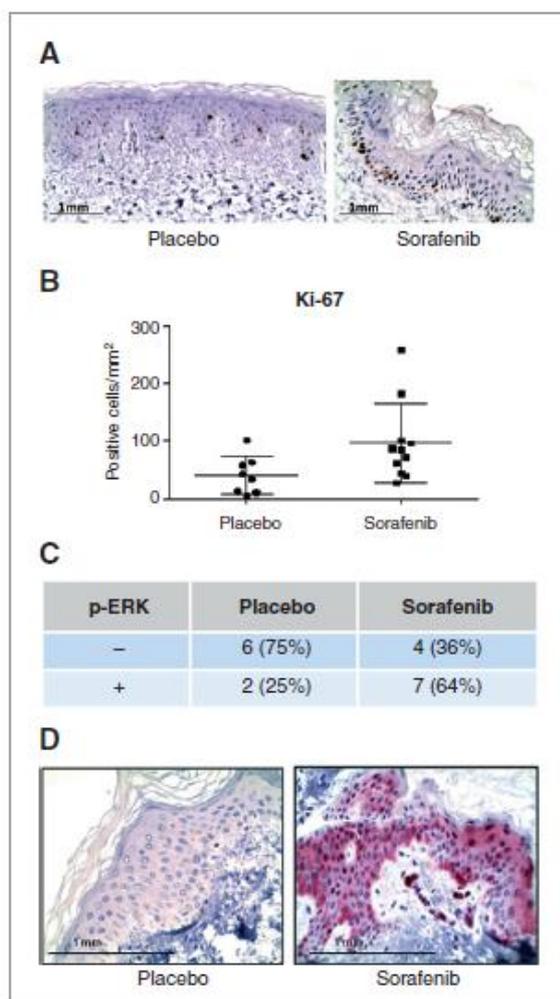


Figure 2. Normal skin biopsies of patients treated with sorafenib or placebo. A, Ki-67 immunostaining on normal skin specimen from a placebo-treated patient (left) and a sorafenib-treated patient (right). B, dot graph showing the mean numbers of Ki-67-positive keratinocyte nuclei in 3 representative fields of normal skin samples in placebo- and sorafenib-treated patients. C, numbers and ratios of normal skin specimen expressing p-ERK in the epidermis among the patients treated with placebo or sorafenib for renal cell cancer. D, example of immunostaining results in a placebo-treated patient (left) and a sorafenib-treated patient (right).

Discussion

Targeted anticancer agents are associated with frequent and diverse cutaneous side effects. The description and study of these skin manifestations is of critical importance. Indeed, they frequently have an adverse impact on the patient's quality of life and understanding their underlying mechanisms is certainly the best way to treat these skin manifestations in addition to offering new perspectives on skin biology (5, 6, 12–14).

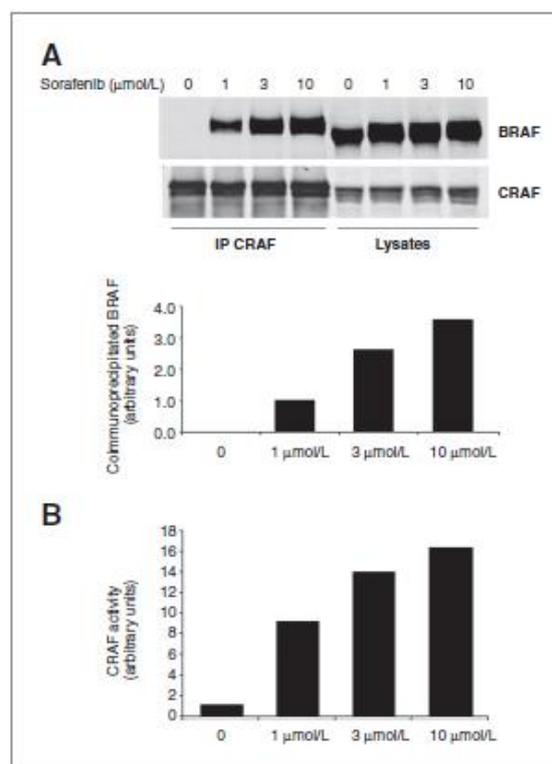


Figure 3. Sorafenib induces BRAF-CRAF dimerization and CRAF activation in HaCat keratinocytes. HaCat cells were treated with DMSO (0) and increasing doses of sorafenib (1, 3, or 10 μmol/L) for 4 hours and lysed. A, CRAF was immunoprecipitated and probed for BRAF and CRAF. Quantification is shown below the blot. B, CRAF was immunoprecipitated and its kinase activity against MEK measured *in vitro*. Similar results were obtained in 3 independent experiments.

Our earlier observations of skin manifestations induced by targeted agents had led us to formulate the hypothesis that sorafenib-induced KA and skin SCC were due to its effect on RAF kinases. Indeed, these side effects were not seen after blockade of VEGFR, KIT, FLT3, or PDGFR, the other sorafenib targets (5, 12). Our hypothesis was further corroborated by the description of KA and SCC occurring with more specific BRAF inhibitors, vemurafenib and GSK2118436 (2, 15).

In this work, we present a series of 31 skin lesions occurring in 17 patients treated with sorafenib 1 to 9 months after the beginning of the therapy. The lesions were benign and borderline or malignant skin tumors which might seem paradoxical because they occurred while under therapy with an antiproliferative agent.

The entity KA as a distinct tumor at the crossroad between benign and malignant tumors has been debated for decades. KA is a rapidly growing keratotic and crateriform tumor, very similar clinically and pathologically to well-differentiated SCC (16). It is characterized by frequent spontaneous resolution and originates from hair follicles (17). For some authors, it is considered to be low-grade SCC (18). KAs can

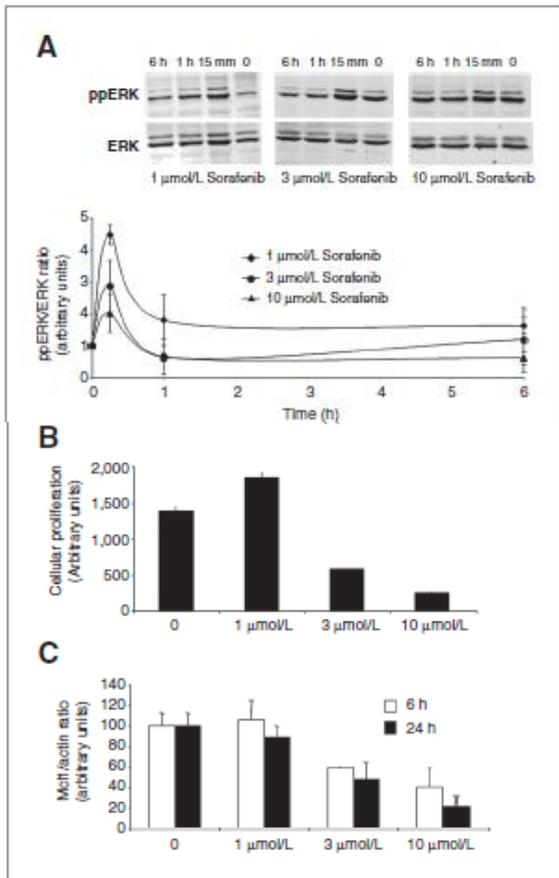


Figure 4. Effect of sorafenib on ERK phosphorylation, cell proliferation, and MCL1 expression in HaCat keratinocytes. A, HaCat cells were treated with DMSO (0) or with increasing doses of sorafenib (1, 3, or 10 $\mu\text{mol/L}$) for the indicated time and lysed. Lysates were probed for phosphorylated ERK (ppERK) and total ERK. The ratio ppERK/ERK is shown on the graph which represents the mean \pm SD of 3 independent experiments. B, proliferation of HaCat cells treated with DMSO (0) an increasing dose of sorafenib for 3 days was measured using the Cell Titer assay. The graph represents the mean of 2 experiments in triplicate. C, lysates from (A) were probed for MCL1 and actin. The ratio MCL1/actin was calculated for the indicated dose of sorafenib after 6 or 24 hours of treatment. Graphs represent the mean \pm SD of 2 experiments.

be observed sporadically, mostly on sun-exposed areas, or in the context of genetic diseases, for example, the multiple self-healing squamous epithelioma (MSSE) also called Ferguson-Smith disease (19). Our pathologic classification between KA and SCC depended on the existence of cytologic atypia, invasive nests or lymphatic metastatic embols. When any of these signs were seen, we classified the crateriform epidermal neoplasms limited by sharp beaks as KA-like SCCs. When neither atypia nor invasion was associated with the crateriform lesion, they were considered as KAs.

The first hypothesis that we put forward following our clinical and pathologic studies of these tumors was that they seemed to belong to a common spectrum of lesions with the possibility of transition from benign lesions, that is, from a

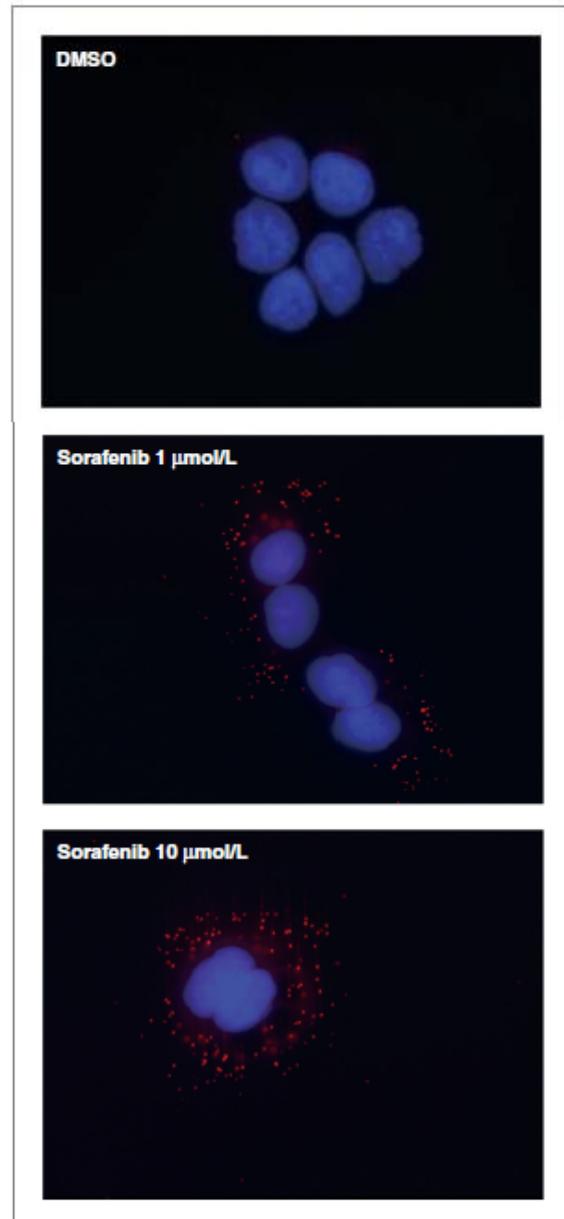


Figure 5. PLA showing BRAF-CRAF dimerization induced by sorafenib in keratinocytes *in vitro*. Sorafenib induces HaCat cells grown on coverslip where treated with DMSO, 1 or 10 $\mu\text{mol/L}$ of sorafenib for 4 hours and fixed. BRAF-CRAF heterodimerization was visualized as red dots by PLA and detected with a fluorescent microscope; cell nuclei were stained with DAPI. Each dot represents 1 BRAF-CRAF complex.

cystic more or less inflammatory lesion to KA and SCC. This "continuity" hypothesis is based on several observations. First, several of our patients had associated benign and malignant tumors. All of them had several benign cystic lesions, in addition to the lesions that were biopsied and studied (Table 1). One patient, in particular, developed the

complete spectrum of lesions, that is, follicular cysts, perforating folliculitis, KAs, and KA-like SCC (patient # 7). Furthermore, all SCCs were crateriform in shape, resembling KA. We did not observe other clinical subtypes of SCC such as Bowen disease or classic sun-induced, ulcerated, or nodular forms of SCC.

Second, all of these lesions seemed to have developed at the expense of or around hair follicles. Follicular dystrophic lesions and perforating folliculitis are obviously follicular lesions and relics of hair follicles were indeed observed in every biopsy sample. Follicular ontogeny for KA is also well documented (20). The microscopically lamellar structure as well as the type of cytokeratins found in KA suggest that they are hair follicle-derived tumors (21). Thus, our first hypothesis is that all these proliferative epidermal lesions could represent various steps of a same generic process initiated by RAF inhibition in the skin and particularly targeting follicular keratinocytes.

To explore the biological effect of sorafenib on normal skin *in vivo*, we studied normal skin samples of patients treated with sorafenib or a placebo. Our results showed a significant increase in keratinocyte proliferation and no decrease of ERK phosphorylation, but, on the contrary, a clear tendency to an increase of ERK phosphorylation levels in the skin after treatment with sorafenib. We now have preliminary data on normal skin samples from patients treated with vemurafenib (before treatment and at day 21) showing similar results (data not shown).

These results, which at first glance might seem highly improbable, are in fact in line with recent published data showing that BRAF inhibitors induce activation instead of inhibition of the RAF/MEK/ERK pathway in wtBRAF cells (22–24). The proposed mechanisms underlying the activation of the pathway by a RAF inhibitor imply dimerization of RAF proteins and homodimerization (BRAF–BRAF) or heterodimerization (BRAF–CRAF). Binding of the RAF inhibitor enhances signaling via CRAF engaged in dimerization with BRAF (23). In a second model, binding of the inhibitor induces transactivation of the second element of the homo- or heterodimer (22). In both models, this activation requires wtBRAF together with an additional activation signal of the pathway, as is the case with RAS or EGFR activation. To understand whether this effect could explain keratinocyte proliferation in response to sorafenib, we used HaCat keratinocytes to see whether we could reproduce these results in an *in vitro* system. We showed that sorafenib indeed regulates the activation of the MAPK pathway and cellular proliferation in keratinocytes in a dose- and time-dependent manner with an increase of both parameters when the dose of sorafenib was low (1 $\mu\text{mol/L}$). For higher sorafenib concentrations (3 and 10 $\mu\text{mol/L}$), the effect on ERK phosphorylation was transient and disappeared after 1 hour and the effect on proliferation was rather inhibitory. This is in line with the transactivation model (22) in which RAF inhibitors activate ERK signaling at low concentrations but inhibit it at higher concentrations in wtBRAF cells. The decreased effect of higher concentrations of sorafenib on ERK phosphorylation could be explained by

the direct binding and inhibiting activity of the drug on CRAF. As sorafenib has been previously shown to regulate the expression of the antiapoptotic MCL1 molecule (25, 26), we explored the effect of various doses of sorafenib on MCL1 expression. We found that the regulation of MCL1 expression was dependent on sorafenib concentration with inhibited MCL1 expression at higher drug doses. This effect of high doses (3 and 10 $\mu\text{mol/L}$) of sorafenib on MCL1 expression could explain that, although sorafenib activated ERK at all doses tested, it inhibits cell proliferation at higher doses. Thus, the complex action of sorafenib on the activation of the MAPK kinase pathway and on cell proliferation is dose dependent and results from the combined effects of the drug on RAF kinase inhibition on the one hand and on the control of apoptosis via MCL1 regulation on the other hand. We were able to detect the formation of BRAF–CRAF dimers *in vitro* by coimmunoprecipitation and directly in cells by PLA for all sorafenib concentrations tested. This dimerization-induced CRAF activation in keratinocytes can explain MAPK activation at least at a low sorafenib concentration which might be the case in the skin. Indeed, the plasma sorafenib concentration in clinical therapeutic use ranges from 3 to 6 mg/L (6.5 to 13 $\mu\text{mol/L}$) but the drug concentration in the skin is probably much lower than in plasma due to high protein binding (27). In most experimental cell lines models used, RAS activation seems required for RAF dimerization. We show here that RAS is not mutated in the HaCat keratinocytes and is rarely mutated in our biopsy specimen, however, it is possible that RAS is activated by upstream signaling like EGFR activation, which is very frequently observed in the skin. Indeed, we showed that when EGFR activity was inhibited with PD153035 in HaCat cells, sorafenib could not induce RAF heterodimerization anymore (Supplementary Fig. S2). This result shows that activation of the pathway upstream of RAF, presumably including RAS activation, is necessary for sorafenib-induced RAF dimerization in keratinocytes. Our data are, therefore, consistent with models from the literature stating that drug-induced RAF dimerization requires RAS activation either through oncogenic mutation or through RTK activation.

Thus, the model we propose is as follows: BRAF wild-type skin keratinocytes submitted to low sorafenib concentrations activate the MAP kinase pathway via BRAF–CRAF dimerization sparking off CRAF activation which in turn leads to keratinocyte proliferation. Additional events could then precipitate the proliferation and transformation process. In accordance with this model, we found oncogenic mutations (3 HRAS and 3 TP53 mutations and 2 TGFBR1) in benign and malignant skin lesions. Sporadic KA and SC, besides the use of RAF inhibitors, are known to harbor oncogenic RAS and TP53 mutations (30–34). RAS mutations are reported in 30% of KA (HRAS) and in 12 to 46% of 22% of SCC (mostly HRAS; refs. 30–32, 34). Furthermore, TGFBR1 mutations similar to the ones we found in our patients tumors have recently been shown to be germinal mutations directly involved in an autosomal genodermatosis characterized by the occurrence of multiple KAS, the

MSSE also known as Ferguson Smith disease (19). Patient 10 had 2 lesions screened for mutations, one KA-like SCC with a *TGFBR1* mutation (Pro83Leu) and benign cystic folliculitis that did not harbor any mutation, meaning that the *TGFBR1* mutation was somatic and not germinal (Table 1).

The lesions presented by patients with MSSE are clinically and pathologically very similar to lesions presented in the context of RAF inhibitor treatment suggesting an effect of these drugs on the TGF β /TGFBR signaling pathway that warrants further exploration.

Six of the mutations found in our samples are known to be potentially UV induced (patients # 1, 3, 4, 6, 10, and 14), either located on typical UV-sensitive dipyrimidine sites (patients #1, 3, 6, 10, and 14) or on an ACA sequence known to give rise to a mutagenic photoproduct (patient #4; refs. 35, 36). Oncogenic events such as *TP53* mutations are found in normal skin keratinocytes on sun-exposed areas (37). Indeed, a recent paper showed that intermittently sun-exposed skin contained an extensive number of intact cells with *TP53* mutations, with an estimated annual rate of 35,000 new persistent *TP53* mutations per individual (38). In accordance with this hypothesis, the 6 lesions that were harboring mutations with UV signature were located on sun-exposed areas, whereas, the 2 remaining mutations (patients #7 and 12) were found on nonexposed skin areas (palm and buttocks; Table 1). Thus, sorafenib-induced skin tumor might result from the combined effect of paradoxical MAP kinase pathway activation and coexisting or even preexisting oncogenic mutations that could have been generated by UV rays action on normal skin.

Altogether, the fact that we found oncogenic *TP53*, *TGFBR1*, and *RAS* mutations with a UV signature suggests that it is probably a wise move to advise patients receiving sorafenib or other RAF inhibitors to use efficient photoprotective measures.

The fact that we did not find oncogenic mutations in the other malignant lesions could be due to the existence of other mutations that we did not look for or by alternate ways of activating the MAP kinase pathway such as EGFR activation. Indeed, EGFR can also be activated in the skin by various stimuli such as physiologic sun exposure or wound healing (28, 29), and its activation is sufficient to promote RAF dimerization in keratinocytes treated with sorafenib (Supplementary Fig. S2).

It is possible that sun-induced RAF or *TP53* mutation or EGFR activation were present in the keratinocyte prior to BRAF inhibition and could have led to keratinocyte transformation in the presence of sorafenib. In some of our samples, a mutational event existing prior to malignant transformation is supported by the fact that we found oncogenic mutations of *HRAS* and *TP53* in 2 benign cystic lesions.

References

- Greenman C, Stephens P, Smith R, Dalgleish GL, Hunter C, Bignell G, et al. Patterns of somatic mutation in human cancer genomes. *Nature* 2007;446:153–8.
- Flaherty KT, Puzanov I, Kim KB, Ribas A, McArthur GA, Sosman JA, et al. Inhibition of mutated, activated BRAF in metastatic melanoma. *N Engl J Med* 2010;363:809–19.

Recently, oncogenic *RAS* mutations, (mostly *HRAS*) were found at a higher frequency in 71% of 21 KA and SCC induced by vemurafenib, suggesting that *RAS* involvement might be more preeminent than other oncogenes in the ontogeny of vemurafenib-induced tumors (39). In conclusion, we propose a model in which paradoxical ERK activation by RAF inhibitors in the skin induces changes in keratinocyte biology with activation of the MAK pathway and cell proliferation associated with a spectrum of skin lesions ranging from more or less inflammatory benign follicular cystic lesions to KA-like SCC. Additional and maybe preexisting somatic genetic events might influence the evolution of the benign lesions to more proliferative and malignant tumors. The fact that these skin lesions occur more frequently with more potent and specific BRAF inhibitors than with the pan-RAF inhibitor sorafenib could result from the differential effect of these drugs on CRAF or from various bioavailabilities of the drugs in the skin. These findings have other important clinical implications. They also suggest that the use of RAF inhibitors might be pointless and even deleterious in normal tissues especially in cells harboring a *RAS* mutation, as it can be found in lung and colon tissue, for example (40, 41). Indeed, we cannot exclude the hypothesis that RAF inhibitors could promote cell transformation and/or proliferation in these wtBRAF cells with *RAS* activation and lead to internal tumors. Fortunately, such events have not been reported so far.

Altogether, the effect of RAF inhibitors in the skin illustrates the complexity and the variety of the consequences of the systemic blockade of a universal pathway like the MAPK pathway and reminds us that efficient targeted therapies always have off-target effects that need to be very carefully evaluated and monitored.

Disclosure of Potential Conflicts of Interest

C. Robert is participating in advisory boards for Roche and GlaxoSmithKline. J.C. Soria is a consultant for Roche and Bayer. B. Escudier is a consultant for Bayer, Pfizer, GlaxoSmithKline, and Novartis. D. Malica is a consultant for Roche. No potential conflicts of interest were disclosed by the other authors.

Acknowledgments

The authors thank Loma Saint Ange for editing.

Grant Support

This work was partly supported by the Institut National du Cancer (INCA 2007-1-PL7) for C. Robert, N. Dumaz, and A. Eychene.

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked *advertisement* in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

Received May 26, 2011; revised September 30, 2011; accepted October 27, 2011; published OnlineFirst November 17, 2011.

3. Escudier B, Eisen T, Stadler WM, Szczylik C, Oudard S, Siebels M, et al. Sorafenib in advanced clear-cell renal-cell carcinoma. *N Engl J Med* 2007;356:125–34.
4. Escudier B, Eisen T, Stadler WM, Szczylik C, Oudard S, Staehler M, et al. Sorafenib for treatment of renal cell carcinoma: final efficacy and safety results of the phase III treatment approaches in renal cancer global evaluation trial. *J Clin Oncol* 2009;27:3312–8.
5. Amault JP, Wechsler J, Escudier B, Spatz A, Tomasic G, Sibaud V, et al. Keratoacanthomas and squamous cell carcinomas in patients receiving sorafenib. *J Clin Oncol* 2009;27:e59–61.
6. Autier J, Escudier B, Wechsler J, Spatz A, Robert C. Prospective study of the cutaneous adverse effects of sorafenib, a novel multikinase inhibitor. *Arch Dermatol* 2008;144:886–92.
7. Hong DS, Reddy SB, Prieto VG, Wright JJ, Tannir NM, Cohen PR, et al. Multiple squamous cell carcinomas of the skin after therapy with sorafenib combined with tipifarnib. *Arch Dermatol* 2008;144:779–82.
8. Dubauskas Z, Kunishige J, Prieto VG, Jonasch E, Hwu P, Tannir NM. Cutaneous squamous cell carcinoma and inflammation of actinic keratoses associated with sorafenib. *Clin Genitourin Cancer* 2009;7:20–3.
9. Kong HH, Cowen EW, Azad NS, Dahut W, Gutierrez M, Turner ML. Keratoacanthomas associated with sorafenib therapy. *J Am Acad Dermatol* 2007;56:171–2.
10. Robert C, Amault J-P, Mateus C. RAF inhibition and induction of cutaneous squamous cell carcinoma. *Curr Opin Oncol* 2011;23:177–82.
11. Dumaz N, Hayward R, Martin J, Ogilvie L, Hedley D, Curtin JA, et al. In melanoma, RAS mutations are accompanied by switching signaling from BRAF to CRAF and disrupted cyclic AMP signaling. *Cancer Res* 2006;66:9483–91.
12. Robert C, Soria JC, Spatz A, Le Cesne A, Malka D, Pautier P, et al. Cutaneous side-effects of kinase inhibitors and blocking antibodies. *Lancet Oncol* 2005;6:491–500.
13. Robert C, Spatz A, Faivre S, Armand J-P, Raymond E. Tyrosine kinase inhibition and grey hair. *Lancet* 2003;361:1056.
14. Robert C, Faivre S, Raymond E, Armand J-P, Escudier B. Subungual splinter hemorrhages: a clinical window to inhibition of vascular endothelial growth factor receptors? *Ann Intern Med* 2005;143:313–4.
15. Keefe RD, Long G, Arkenau HT, Brown MP, Millward M, O'Day S, et al. Selective inhibition of oncogenic BRAF V600E/K/D by GSK2118436: evidence of clinical activity in subjects with metastatic melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res* 2010;23:912.
16. Cribier B, Asch P, Grosshans E. Differentiating squamous cell carcinoma from keratoacanthoma using histopathological criteria. Is it possible? A study of 296 cases. *Dermatology* 1999;199:208–12.
17. Kossard S, Tan K-B, Choy C. Keratoacanthoma and infundibulocystic squamous cell carcinoma. *Am J Dermatopathol* 2008;30:127–34.
18. Hodak E, Jones RE, Ackerman AB. Solitary keratoacanthoma is a squamous-cell carcinoma: three examples with metastases. *Am J Dermatopathol* 1993;15:332–42; discussion 343–352.
19. Goudie DR, D'Alessandro M, Merriman B, Lee H, Szeverényi I, Avery S, et al. Multiple self-healing squamous epithelioma is caused by a disease-specific spectrum of mutations in TGFBR1. *Nat Genet* 2011;43:365–9.
20. Kossard S, Tan K-B, Choy C. Keratoacanthoma and infundibulocystic squamous cell carcinoma. *Am J Dermatopathol* 2008;30:127–34.
21. Yoshikawa K, Katagata Y, Kondo S. Relative amounts of keratin 17 are higher than those of keratin 16 in hair-follicle-derived tumors in comparison with nonfollicular epithelial skin tumors. *J Invest Dermatol* 1995;104:396–400.
22. Poulikakos PI, Zhang C, Bollag G, Shokat KM, Rosen N. RAF inhibitors transactivate RAF dimers and ERK signalling in cells with wild-type BRAF. *Nature* 2010;464:427–30.
23. Heidom SJ, Milagre C, Whittaker S, Noury A, Niculescu-Duvas I, Dhomen N, et al. Kinase-dead BRAF and oncogenic RAS cooperate to drive tumor progression through CRAF. *Cell* 2010;140:209–21.
24. Hatzivassiliou G, Song K, Yen I, Brandhuber BJ, Anderson DJ, Alvarado R, et al. RAF inhibitors prime wild-type RAF to activate the MAPK pathway and enhance growth. *Nature* 2010;464:431–5.
25. Kim S-H, Ricci MS, El-Deiry WS. Mcl-1: a gateway to TRAIL sensitization. *Cancer Res* 2008;68:2062–4.
26. Ricci MS, Kim SH, Ogi K, Plastaras JP, Ling J, Wang W, et al. Reduction of TRAIL-induced Mcl-1 and cIAP2 by c-Myc or sorafenib sensitizes resistant human cancer cells to TRAIL-induced death. *Cancer Cell* 2007;12:66–80.
27. Strumberg D, Voliotis D, Moeller JG, Hilger RA, Richtig H, Kredtke S, et al. Results of phase I pharmacokinetic and pharmacodynamic studies of the Raf kinase inhibitor BAY 43-9006 in patients with solid tumors. *Int J Clin Pharmacol Ther* 2002;40:580–1.
28. Monslow J, Sato N, Mack JA, Maytin EV. Wounding-induced synthesis of hyaluronic acid in organotypic epidermal cultures requires the release of heparin-binding egf and activation of the EGFR. *J Invest Dermatol* 2009;129:2046–58.
29. Katiyar SK. A single physiologic dose of ultraviolet light exposure to human skin *in vivo* induces phosphorylation of epidermal growth factor receptor. *Int J Oncol* 2001;19:459–64.
30. Pierceall WE, Goldberg LH, Tainsky MA, Mukhopadhyay T, Ananthaswamy HN. Ras gene mutation and amplification in human non-melanoma skin cancers. *Mol Carcinog* 1991;4:196–202.
31. Pierceall WE, Mukhopadhyay T, Goldberg LH, Ananthaswamy HN. Mutations in the p53 tumor suppressor gene in human cutaneous squamous cell carcinomas. *Mol Carcinog* 1991;4:445–9.
32. Spencer JM, Kahn SM, Jiang W, DeLeo VA, Weinstein IB. Activated ras genes occur in human actinic keratoses, premalignant precursors to squamous cell carcinomas. *Arch Dermatol* 1995;131:796–800.
33. Suk JD, Park WS, Kim D-K. Low rates of somatic p53 mutations in keratoacanthomas. *J Dermatol Sci* 2009;53:72–3.
34. Corominas M, Kamino H, Leon J, Pellicer A. Oncogene activation in human benign tumors of the skin (keratoacanthomas): is HRAS involved in differentiation as well as proliferation? *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989;86:6372–6.
35. Bourre F, Lichtenberger A, Sarasin A. Comparison of spontaneous and ultraviolet-induced mutagenesis on naked SV40 DNA and SV40 virus. *Mutat Res* 1991;250:49–53.
36. Bourre F, Renault G, Sarasin A. Sequence effect on alkali-sensitive sites in UV-irradiated SV40 DNA. *Nucleic Acids Res* 1987;15:8861–75.
37. Ling G, Persson A, Berne B, Uhlén M, Lundeberg J, Pontén F. Persistent p53 mutations in single cells from normal human skin. *Am J Pathol* 2001;159:1247–53.
38. Ståhl PL, Stranneheim H, Asplund A, Berglund L, Pontén F, Lundeberg J. Sun-induced nonsynonymous p53 mutations are extensively accumulated and tolerated in normal appearing human skin. *J Invest Dermatol* 2011;131:504–8.
39. Lacouture ME, Chapman PB, Ribas A, Sosman JA, McArthur GA, Flaherty K, et al. Presence of frequent underlying RAS mutations in cutaneous squamous cell carcinomas and keratoacanthomas (cSCC/KA) that develop in patients during vemurafenib therapy. *J Clin Oncol* 2011;29:8520.
40. Parsons BL, Marchant-Mirois KE, DeLongchamp RR, Verkleer TL, Patterson TA, McKinzie PB, et al. ACB-PCR quantification of K-RAS codon 12 GAT and GTT mutant fraction in colon tumor and non-tumor tissue. *Cancer Invest* 2010;28:364–75.
41. Keohavong P, Mady HH, Gao WM, Siegfried JM, Luketich JD, Melhem MF. Topographic analysis of K-ras mutations in histologically normal lung tissues and tumours of lung cancer patients. *Br J Cancer* 2001;85:235–41.

C. Article sur la coopération entre le vemurafenib et l'HPV pour induire des tumeurs cutanées

Vemurafenib Cooperates with HPV to Promote Initiation of Cutaneous Tumors

Matthew Holderfield¹, Edward Lorenzana¹, Ben Weisburd¹, Lisa Lomovasky¹, Lise Boussemaert³, Ludovic Lacroix^{4,5}, Gorana Tomasic^{4,5,6}, Michel Favre⁷, Stephan Vagner⁶, Caroline Robert³, Majid Ghoddusi¹, Dylan Daniel¹, Nancy Pryer¹, Frank McCormick², and Darrin Stuart¹

Abstract

Treatment with RAF inhibitors such as vemurafenib causes the development of cutaneous squamous cell carcinomas (cSCC) or keratoacanthomas as a side effect in 18% to 30% of patients. It is known that RAF inhibitors activate the mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway and stimulate growth of RAS-mutated cells, possibly accounting for up to 60% of cSCC or keratoacanthoma lesions with RAS mutations, but other contributing events are obscure. To identify such events, we evaluated tumors from patients treated with vemurafenib for the presence of human papilloma virus (HPV) DNA and identified 13% to be positive. Using a transgenic murine model of HPV-driven cSCC (K14-HPV16 mice), we conducted a functional test to determine whether administration of RAF inhibitors could promote cSCC in HPV-infected tissues. Vemurafenib treatment elevated MAPK markers and increased cSCC incidence from 22% to 70% in this model. Furthermore, 55% of the cSCCs arising in vemurafenib-treated mice exhibited a wild-type Ras genotype, consistent with the frequency observed in human patients. Our results argue that HPV cooperates with vemurafenib to promote tumorigenesis, in either the presence or absence of RAS mutations. *Cancer Res*; 74(8): 2238–45. ©2014 AACR

Introduction

Nearly 50% of melanomas harbor a single activating Valine to Glutamic acid point mutation of the BRAF kinase (1). Constitutive BRAF activation leads to phosphorylation of the downstream effectors MAP-ERK kinase (MEK), then extracellular signal-regulated kinase (ERK), which in turn activates transcription factors that promote proliferation of cancer cells. Phase II and phase III clinical trial results in BRAF^{V600E}-mutated melanoma patients treated with the RAF inhibitor, vemurafenib, demonstrated improved survival and dramatic reduction in tumor burden (2, 3). Among the most common side effects is the emergence of nonmelanocytic cutaneous tumors, including cutaneous squamous cell carcinomas (cSCC), keratoacanthomas, and verrucous papillomas (2–5). Preclinical data demonstrate that RAF inhibitors paradoxically stimulate ERK phosphorylation in RAS-mutated cancer cells (6–9) through allosteric and catalytic mechanisms that relieve the auto-inhibition of wild-type RAF kinase (10). It is therefore

hypothesized that paradoxical activation of the mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway induces cSCC and keratoacanthomas tumorigenesis in patients treated with RAF inhibitors.

Several groups have described the genetics of keratoacanthomas and cSCC induced by RAF inhibitors. Most notably 18% to 60% of the clinical biopsies harbor a RAS mutation (11–13), and treatment with a vemurafenib analogue (PLX-4720) also decrease tumor latency in a mouse model for *Hras*-driven cSCC (13). However, 40% to 82% of keratoacanthomas and cSCCs from RAF inhibitor-treated patients are RAS wild-type, suggesting that accelerated oncogenesis of RAS-mutated cells is not the only mechanism involved. Among the other mutated genes identified in cutaneous lesions from RAF inhibitor-treated patients are *FGFR3*, *TGFBRI*, *MYC*, *PIK3CA*, and tumor suppressors *TP53*, *CDKN2A*, and *VHL* (4, 11). Although *FGFR3* and *TGFBRI* mutations may lead to RAS activation and therefore hyperactivate the MAPK pathway in response to RAF inhibitors, it is unclear how critical RAS-activating oncogenes are to vemurafenib-induced cSCC. Furthermore, the role of other drivers, such as infectious agents like human papilloma virus (HPV), has not been carefully examined. Therefore, we used a transgenic mouse model that expresses the HPV16 early genes from the keratin 14 promoter (K14-HPV16) to evaluate the relationship between vemurafenib treatment and HPV in driving cSCC (14).

Materials and Methods

HPV screening of clinical biopsies

Cellular DNA was extracted from biopsies of cutaneous lesions or normal skin. HPV types were identified using

Authors' Affiliations: ¹Novartis Institutes for Biomedical Research, Emeryville; ²UCSF Helen Diller Family Comprehensive Cancer Center, San Francisco, California; ³Dermatology Unit and INSERM U 981; ⁴Department of Medical Biology and Pathology; ⁵Laboratory and Biobank; ⁶INSERM U 981, Institut Gustave Roussy, Villejuif Paris-Sud; and ⁷Unité de Génétique, Papillomavirus et Cancer Humain, Institut Pasteur, Paris, France

Note: Supplementary data for this article are available at Cancer Research Online (<http://cancerres.aacrjournals.org/>).

Corresponding Author: Darrin Stuart, Novartis Institutes for Biomedical Research, 4560 Horton Street MS 4.3, Emeryville, CA 94608-2916. Phone: 510-923-8095; Fax: 510-923-3360; E-mail: darrin.stuart@novartis.com

doi: 10.1158/0008-5472.CAN-13-1065-T

©2014 American Association for Cancer Research.

consensus FAP59/64 primers as described (15). Samples were also analyzed by a nested PCR method with two sets of degenerate primers (CP65/CP70 and CP66/CP69) located in the L1 open reading frame as described (16). Amplimers were sequenced and the HPV genotype was identified by comparison of sample sequence with Genbank database.

RAS genotyping of clinical biopsies

Genomic DNA was extracted from 10 to 20- μ m thick paraffin-embedded unstained slides of each skin lesion and full coding sequences of *HRAS* (NM_005343.2) exons 2 and 3, *KRAS* (NM_033360.2) and exons 2 and 3, *NRAS* (NM_002524.3). Sequences were analyzed by Sanger direct sequencing performed after PCR amplification of target exons. Sequencing reactions were carried out using the BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit software according to the manufacturer's recommendations (Applied Biosystems). Sequencing reactions were analyzed on a 48-capillary 3730 DNA Analyzer. Sequence reading and alignment were performed with SeqScape software (Applied Biosystems).

Tissue culture

Proliferation of A375, SW620 (from ATCC), and GTL-16 cells (from S. Giordano, Cancer Research and Treatment, Turin, Italy) was measured by Cell Titer-Glo (Promega) and Rat-1 cells (from J. Gorski, University of Wisconsin, Madison, WI) were grown in soft agar suspension. pERK quantification by sandwich immunoassay (MSD). All cell lines were routinely inspected for morphologic changes and tested mycoplasma negative. A375, SW620, and GTL-16 were also inspected for DNA copy number and gene expression changes as previously described (17). Primary antibodies used for immunoblot analyses: MEK, ERK, pMEK, pERK (Cell Signaling Technology, 9122, 9102, 9121, and 9101, respectively).

Mice

FVB.Cg-Tg (KRT-14-HPV16) mice were obtained from Jackson Laboratories. Unless otherwise stated, mice 6 months old that had not yet developed cSCC received 15, 30, or 60 mg/kg once daily for 60 days of vemurafenib by oral gavage. For inhibitor combination studies, mice were given 3 mg/kg PD0325901 administered twice daily in addition to 60 mg/kg vemurafenib daily. Because cSCC most frequently occur on the ears or chest in this model, these tissues were collected from every mouse (in addition to any tumor present, regardless of location) and frozen in liquid nitrogen for PCR analysis or formalin fixed and paraffin embedded for histology. Non-transgenic littermates were used as negative controls. *Dusp6* mRNA expression levels were quantified by quantitative PCR (qPCR) from RNA in the collected tissues (Qiagen fibrous tissue RNA collection kit; Ambion cDNA synthesis kit). *Dusp6* mRNA was normalized to 18s rRNA (Applied Biosystems: Mm00518185_m1 and 4319413E).

Mouse histology

Tissues were formalin fixed and paraffin embedded. Sections were stained with hematoxylin and eosin or anti-pERK antibody (Cell Signaling Technology 9121). Slides were ran-

domized and blinded before histology scores determined by a pathologist. Skin and tumor samples were ranked as normal, premalignant, or malignant cSCC (Fig. 3B). Premalignant histology included moderate to severe hyperplasia, dysplasia, and hyperkeratosis. K14-HPV16 cSCCs are marked by keratin "pearls" of invasive well-differentiated squamous carcinoma (WDSC) occurring primarily on the ventral surface of the ear, or by a keratin cap containing heterogeneous regions of moderate to poorly differentiated squamous carcinoma (M/PDSC) occurring primarily on the chest and trunk. Malignant phenotypes included any M/PDSC, WDSC, and keratoacanthoma-like lesions.

Ras genotyping of mouse K14-HPV16 cSCC

Genomic DNA was collected from nine cSCCs and one nontumor skin sample from untreated K14-HPV16 mice, and nine cSCCs and one nontumor skin sample from K14-HPV16 mice treated with 60 mg/kg vemurafenib. A total of 100 bp \times 2 paired end sequencing (Illumina) was performed after mouse exome capture (Agilent). Sequences were aligned to the MM9 genome using bwa v0.6.1 (18) and processed according to GATK v2 (19) best practices by running the IndelRealigner, MarkDuplicates, and TableRecalibration tools per sample, and using dbSNP (20) for known variants. The GATK UnifiedGenotyper (18) was then used to call variants on all 20 samples together with nondefault options -dcov 1000 and -rf MappingQualityZero. Called single-nucleotide polymorphisms (SNP) and INDELs were hard filtered with the GATK VariantFiltration tool using criteria Fisher Strand (FS) > 80.0, Hypopolymer Run (HRun) > 5, Quality by Depth (QD) < 2.0, root mean square of the Mapping Quality (MQ) < 30.0.

Results

Vemurafenib paradoxically activates the MAPK pathway in RAF wild-type epidermis

To determine whether clinically relevant exposures to vemurafenib are sufficient to activate the MAPK pathway and promote cSCC tumorigenesis *in vivo*, nontransgenic FVB/N mice were treated with 60 mg/kg vemurafenib (equivalent to the phase III dose; ref. 2) for 60 days. Although none of the mice treated developed spontaneous tumors, subtle evidence of elevated MAPK activity was observed in epithelial tissues. A modest increase in nuclear phosphorylated ERK staining was observed in nonglandular gastric epithelium (Supplementary Fig. S2) and epidermis (Fig. 1A). Because transcriptional targets of the MAPK pathway are often a more sensitive marker for ERK activity (21), *Dusp6* mRNA levels were measured by qPCR and were found to be increased 3-fold in skin from vemurafenib-treated mice (Fig. 1B), demonstrating that vemurafenib paradoxically activates the MAPK pathway in genetically wild-type mouse epidermis, but is insufficient for cSCC tumorigenesis.

Vemurafenib paradoxically activates the MAPK pathway in RAF/RAS wild-type cells

Having observed elevated MAPK markers in vemurafenib-treated mice, we wished to test whether a RAS oncogene is

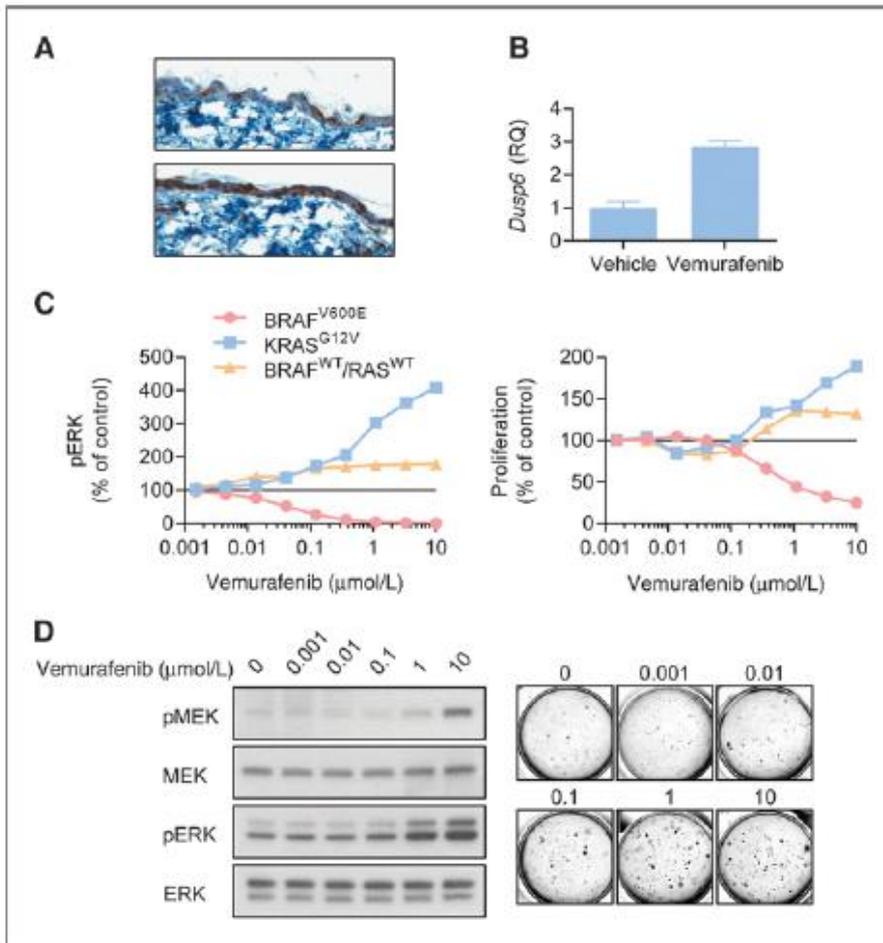


Figure 1. Vemurafenib activates the MAPK pathway in RAF wild-type tissues *in vivo* and RAF wild-type cells *in vitro*. A, FVB/N mice were treated with vehicle control or 60 mg/kg vemurafenib for 60 days. Skin from the ventral trunk was collected 10 hours after the last drug administration. Formalin-fixed, paraffin-embedded sections were stained for phospho-ERK. B, RNA was also collected from frozen skin and *Dusp6* mRNA was quantified by qPCR ($P = 0.004$, Student *t* test). C, A375 (BRAF^{V600E}), SW620 (KRAS^{G12V}), and GTL-16 (BRAF^{WT}/RAS^{WT}) cells treated with the indicated doses of vemurafenib, pERK levels were measured 4 hours after treatment and proliferation measured after 5 days. Data expressed as a percentage of DMSO-treated cells. D, RAT-1 fibroblasts were treated with the indicated doses of vemurafenib for 1 hour. pMEK, MEK, pERK, and ERK protein levels shown by immunoblot analysis. RAT-1 fibroblasts were grown in soft agar suspension and treated with vemurafenib and bright field images were taken after 7 days of growth.

required for vemurafenib to promote tumorigenesis. To test this *in vitro*, three cancer cell lines with different *RAS/RAF* mutations were treated with vemurafenib. Although vemurafenib effectively inhibited ERK phosphorylation and proliferation of *BRAF*-mutated cells, ERK phosphorylation was stimulated and proliferation increased in *RAS/RAF* wild-type cells, though to markedly higher levels in the *KRAS*-mutated cell (Fig. 1C). High doses of vemurafenib similarly increased ERK phosphorylation and induced anchorage-independent growth of *RAS/RAF* wild-type Rat-1 fibroblasts (Fig. 1D), demonstrating that vemurafenib treatment is sufficient to activate the MAPK pathway and promote a transformation phenotype. However, the magnitude of activation may be dependent upon the underlying genetics, and vemurafenib-induced activation seems to be particularly exaggerated in *RAS*-mutated cells.

A subset of cutaneous lesions from vemurafenib-treated patients are HPV-positive and *RAS* wild-type

Given these observations, we hypothesized that paradoxical activation of the MAPK pathway by RAF inhibitor treatment may promote cSCC tumorigenesis only in the presence of preexisting genetic lesions. Several common tumor suppressor

mutations have been identified in cSCCs from patients treated with RAF inhibitors, including *TP53*, *CDKN2A*, and *VHL* (4, 11). In addition to host mutations, the contribution of viral oncogenes has also been implicated in cSCC tumorigenesis. The majority of non-melanocytic lesions occurring in vemurafenib-treated patients include several benign skin lesions with strong associations with HPV, including venereal warts and verrucous papillomas (5), which strongly implicates a role for HPV. Although the frequency is low, expression of HPV capsid protein has been observed in one cSCC from a patient treated with the RAF inhibitor dabrafenib (22), and HPV DNA was observed in a separate case study (23).

To determine whether an HPV infection may contribute to cutaneous tumor initiation in patients treated with vemurafenib, 62 benign or malignant cutaneous lesions from 44 patients were collected and tested for the presence of HPV DNA. Eight of the lesions (13%) tested positive for one of six HPV types (Fig. 2), indicating that HPV may contribute in a subset of cases. Because HPV can also be found on normal skin and may be considered commensal with human tissue, we tested several tumors from the same patients, including normal skin samples when possible. In four cases, patients with

Figure 2. Frequency of *RAS* mutation and HPV status in vemurafenib-induced cutaneous tumors. A, cutaneous lesions from patients treated with vemurafenib. Frequency of HPV and *RAS* mutations by histologic type. B, co-occurrence of *HRAS* or *KRAS* mutation and HPV type for each tumor sample.

A

Histology	N	HPV ⁺	<i>HRAS</i> mut	<i>KRAS</i> mut
Verrucous papilloma	33	3 (9%)	–	5 (15%)
Keratoacanthoma	9	1 (11%)	5 (56%)	–
Squamous cell carcinoma	13	2 (15%)	–	–
Basal cell carcinoma	3	1 (33%)	–	–
Dermatitis	3	1 (33%)	–	–
Seborrheic keratosis	1	–	–	–
Total	62	8 (13%)	5 (8%)	5 (8%)

B

Lesion	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	...	62
<i>RAS</i> mut	K	K	K	K	K	H	H	H	H	H									
HPV type										9	9	32	38	38	49	80	100		

HPV-positive tumors also had additional skin tumors or normal skin samples that were HPV negative. In one patient, two different HPV types (HPV9 and 49) were found in two distinct skin tumors, whereas three additional tumors from the same patient were negative for HPV DNA. Additional indirect evidence of a viral contribution was observed in several HPV-negative tumors. Koilocyte-like cells were observed in papillated epidermal hyperplasia with a thickening of the granular layer, as commonly seen in viral warts (Supplementary Fig. S1).

Because *RAS* mutations frequently occur in vemurafenib-induced patient tumors, each tumor was also genotyped for *HRAS*, *KRAS*, and *NRAS* mutations. As shown in Fig. 2A, 10 (16%) *RAS* mutations (5 *HRAS* and 5 *KRAS* mutations) were identified, which is approximately equivalent to the frequency of HPV-positive tissues. Although HPV DNA did not seem to associate with any histologic category, *HRAS* mutations were only observed in keratoacanthomas and *KRAS* mutations were exclusive to verrucous papillomas. Interestingly, co-occurrence of a *RAS* mutation and HPV was only observed for one *HRAS*-mutated keratoacanthoma (Fig. 2B), suggesting that if HPV infection contributes to tumor initiation in vemurafenib-treated patients, it primarily occurs independent of *RAS* mutations.

Vemurafenib promotes Ras wild-type tumorigenesis in K14-HPV16 mice

To test whether vemurafenib can promote cSCC tumorigenesis in HPV-infected keratinocytes, we used a transgenic mouse model that expresses the HPV16 early genes from the keratin 14 promoter (K14-HPV16; ref. 14). These mice exhibit epidermal hyperplasia, hyperkeratosis, and many develop cSCCs and keratoacanthoma-like tumors. To our knowledge, no mutations have been described in spontaneous K14-HPV16 cSCCs. Tumor-free mice between 5 and 7 months old were treated daily with vemurafenib and tumor volume was monitored for 60 days. Activation of the MAPK pathway in epidermis was both time and dose dependent. Low doses (15 and 30 mg/kg) of vemurafenib moderately increased dermal *Dusp6* expression only at early time points, whereas 60 mg/kg showed sustained increase in *Dusp6* expression at 12 and even 24 hours after treatment (Fig. 3A). Neither the 15 nor 30 mg/kg cohort significantly changed the frequency of

cSCC and/or premalignant phenotypes. However, the frequency of cSCC was significantly increased from 22% in vehicle-treated mice to 70% in the 60 mg/kg vemurafenib cohort (Fig. 3B and C).

To test for the presence of *Ras* oncogenes, cSCCs were collected from both vemurafenib-treated and untreated K14-HPV16 mice and genomic exons were sequenced. Somewhat surprisingly, 100% (9/9) of vemurafenib naïve tumors sequenced carried an activating *Ras* mutation, eight of which were *Kras* mutated, and 1 *Hras* (Q61L) mutated (Fig. 3D), suggesting that a *Ras* oncogene is required for cSCC in this model. However, only 44% (4/9) of the cSCCs from vemurafenib-treated mice were *Ras* mutated (Fig. 3D), suggesting that the increase in cSCC frequency is due to an increase of *Ras* wild-type tumors. Tumors from both vehicle- and vemurafenib-treated mice were also stained for ERK phosphorylation, and areas of every tumor stained positive (Supplementary Fig. S3), suggesting that K14-HPV16 cSCC requires ERK activation. However, no other *Ras* activating mutations and no other known oncogenes were observed in the vemurafenib-treated, *Ras* wild-type tumors. Nor did any set of mutations distinguish *Ras* wild-type cSCC from *Ras*-mutated or vehicle-treated cSCC.

K14-HPV16 cSCC is MEK dependent

These sequencing data suggest that the requirement for a *Ras* mutation in K14-HPV16 cSCC is bypassed by vemurafenib treatment. Conceivably, cSCC in this model requires the MAPK pathway activation, which occurs frequently through a *Ras* mutation, but can also occur through paradoxical activation of ERK signaling in vemurafenib-treated mice. If correct, then blockade of the MAPK pathway downstream of RAF should prevent the increased incidence of cSCC caused by vemurafenib. Consistent with this hypothesis, cotreatment of a RAF and MEK inhibitor in clinical trials reduced the frequency of squamous cancers compared with RAF inhibitor treatment alone (24). To test whether this is also true for K14-HPV16 cSCC, mice were treated with a combination of vemurafenib and a MEK inhibitor, PD0325901. *Dusp6* mRNA expression was elevated in vemurafenib-treated skin, and reduced to background levels by PD0325901 (Fig. 4A), showing that 3 mg/kg PD0325901 is sufficient to prevent any paradoxical

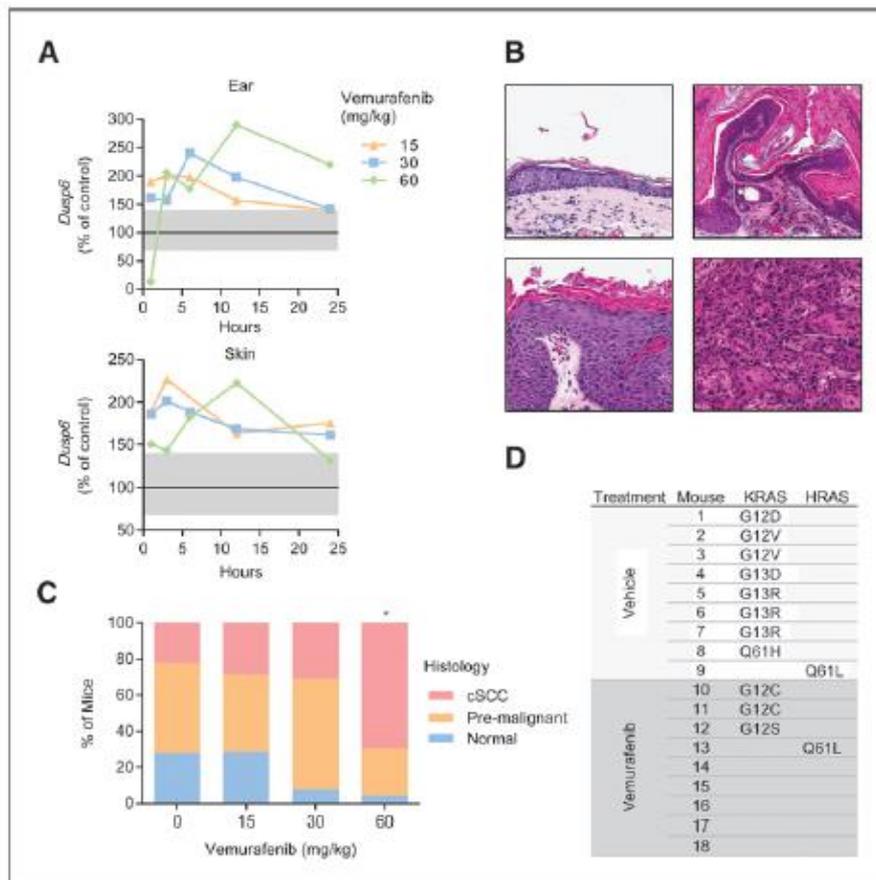


Figure 3. Vemurafenib increases incidence of RAS wild-type cSCC. A, time-course of *Dusp6* mRNA levels from ear and ventral trunk skin from K14-HPV16 mice treated with the indicated dose of vemurafenib, expressed as % of a vehicle-treated control. Each data point represents a single animal. Range of *Dusp6* expression for 5 vehicle-treated mice shaded in gray. B, representative samples of the histologic scoring used. Normal (top left) skin from K14-HPV16 mice is slightly hyperplastic; moderate to severe hyperplasia (bottom left) and dysplastic (top right) tissues were classified as "pre-malignant" and invasive carcinomas (bottom right) were classified as cSCC. C, frequency of histologic scoring for each treatment cohort ($n = 18, 14, 13,$ and 23 for cohorts $0, 15, 30,$ and 60 mg/kg vemurafenib respectively; 60 day endpoint; *, $P = 0.006$, Fisher exact test). D, RAS mutation status for cSCC tumor samples from mice treated with vehicle control or 60 mg/kg vemurafenib. No NRAS mutations were observed.

MAPK activation caused by vemurafenib. Mice treated with PD0325901 also had reduced hyperkeratosis and improved grooming (Supplementary Fig. S4). Concomitant treatment of 60 mg/kg vemurafenib and 3 mg/kg PD0325901 also significantly reduced the frequency of cSCC from 70% in vemurafenib-treated mice to 17% in vemurafenib + PD0325901-treated mice (Fig. 4B). However, none of the mice treated with PD0325901 as a single agent developed cSCCs during the study, suggesting that MEK inhibition prevents cSCC tumor initiation in K14-HPV16 mice.

To test whether MEK activity is required for tumor maintenance, mice with established spontaneous cSCC were treated with PD0325901 for 2 weeks and tumor volume was monitored. There were five of eight partial responses (PR) and two complete responses (CR) in the 3 mg/kg cohort, and all of the mice treated with 10 mg/kg PD0325901 showed a complete response after 2 weeks (Fig. 5A and B and Supplementary Fig. S4). Both cohorts had reduced pERK staining within the tumor, though pERK partially returned after 5 hours in tumors treated with 3 mg/kg, yet remained suppressed in tumors treated with 10 mg/kg (Fig. 5C), suggesting that the higher response rate is due to sustained MEK inhibition. Together, these results strongly indicate that MEK activity is required for cSCC tumor maintenance.

Discussion

Although it is known that RAF inhibitors accelerate RAS-mutant tumor growth, it is unclear why roughly 40% to 80% of cSCCs from patients treated with vemurafenib are RAS wild-type (11, 13). In the present study, vemurafenib not only increased the incidence and accelerated tumorigenesis, but also clearly induced *Ras* wild-type cSCC in K14-HPV16 mice (Fig. 3C and D). This suggests that vemurafenib is required for initiation of cSCC in *Ras* wild-type cells, and may then explain the emergence of *Ras* wild-type cSCC in RAF inhibitor-treated patients. Also consistent with the clinical observations (24), cotreatment with the MEK inhibitor PD0325901 prevented vemurafenib-induced cSCC (Fig. 4B). Moreover, treatment of established cSCC with PD0325901 caused tumor regression (Fig. 5), demonstrating that MAPK activity is not only required for initiation, but also for cSCC maintenance. However, it is important to note that vemurafenib-induced cSCC was only observed in K14-HPV16 transgenic mice, and not in HPV negative, nontransgenic littermates. Therefore, treatment with vemurafenib alone, although sufficient to paradoxically activate the MAPK pathway in mouse dermis, and necessary for *Ras* wild-type tumorigenesis in K14-HPV16 mice, was not sufficient to initiate cSCC. Clearly loss of tumor suppressor

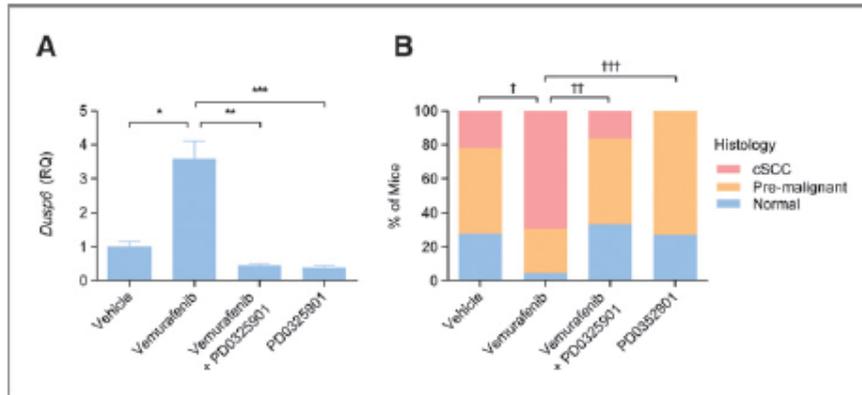


Figure 4. Cotreatment with PD0325901 prevents vemurafenib-induced cSCC. Mice were treated with 60 mg/kg vemurafenib daily, 3 mg/kg PD0325901 twice daily, 60 mg/kg vemurafenib daily + 3 mg/kg PD0325901 twice daily, or vehicle control. A, skin from mice was collected 10 hours after treatment and Dusp6 mRNA levels were measured by qPCR (*, $P = 0.006$; **, $P = 0.002$; ***, $P = 0.002$, $n = 4$, Student t test). B, frequency of histologic scoring ($n = 18, 23, 12$, and 11 for vehicle, vemurafenib, PD0325901, and vemurafenib + PD0325901 cohorts, respectively; †, $P = 0.007$; ††, $P = 0.006$; †††, $P = 0.0006$, χ^2 test).

function is a minimum requirement for vemurafenib-induced cSCC.

HPV has been linked to cancer progression for decades due to the transformation potential of HPV oncogenes. HPV has been observed in both mucosal and cutaneous tumors, though the mechanism of oncogenesis likely differs. Cervical and head and neck cancers are clearly linked to α -HPV genotypes, which exhibit mucosal tropism, whereas β -HPVs are more frequently

associated with cutaneous disease. Although the mechanism of transformation for β -HPV is not fully understood, transgenic mouse studies demonstrate that keratinocyte-specific expression of either the HPV8 (β -HPV) or HPV16 (α -HPV) genes can promote cSCC in the FVB/N background (14, 25). In addition, although expression of HPV transcripts can be seen in established cervical cancers, expression of HPV genes is often undetectable even in cSCC from HPV-positive patients (26),

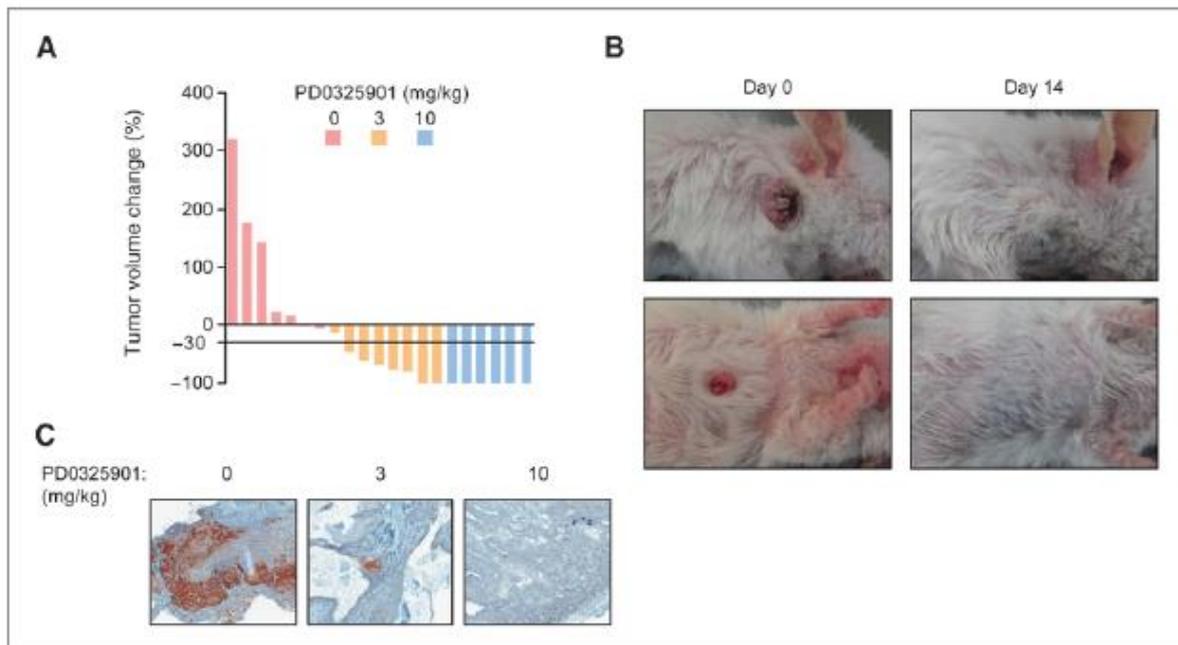


Figure 5. K14-HPV16 cSCCs are MEK dependent. Mice harboring spontaneous cSCC were treated with PD0325901 twice daily for 2 weeks. Tumor volume was measured at start and end of study. A, waterfall plot of tumor response to PD0325901, data expressed as % change of tumor volume after 2 weeks of treatment (horizontal line shows $PR \geq 30\%$; $CR = 100\%$). B, representative images of tumor responses before and after 2 weeks of treatment with 10 mg/kg PD0325901. C, representative images for pERK staining of cSCCs 5 hours after treatment with vehicle 3 mg/kg PD0325901 or 10 mg/kg PD0325901 ($n = 3$ for each condition).

indicating that HPV does not play an active role in cSCC tumor maintenance. Data presented here demonstrate that a subsequent *Ras* mutation is also required for HPV16-driven tumorigenesis in the K14-HPV16 model (Fig. 3D). These data are consistent with the function of HPV16 E6 and E7 oncogenes, which target P53 and pRB tumor suppressors to prevent the DNA damage response, and implicate HPV in cSCC initiation rather than tumor maintenance. Although it is unclear whether β -HPV initiate transformation through a similar mechanism, 27% (6/22) of cSCC from K14-HPV8 transgenic mice develop a spontaneous *Hras* mutation (27), compared with 11% (1/9) in the HPV16 model (Fig. 3D). Further investigation in β -HPV models may therefore reveal common mechanisms of oncogenesis.

These data therefore elucidate a synergy between premalignant, HPV-infected tissues, and paradoxical MAPK activation in patients treated with RAF inhibitors. HPV oncoproteins likely promote tumor initiation by increasing the frequency of premalignant mutations, whereas paradoxical activation of the MAPK pathway promotes both initiation and maintenance in patients treated with RAF inhibitors. Because most of the human population tests positive for cutaneous HPV (28), the majority of patients treated with RAF inhibitors are likely susceptible. Although only 18% to 30% of patients treated develop cSCC and/or keratoacanthoma (2, 3), these figures may underrepresent the frequency of RAF inhibitor-induced tumorigenesis. In a separate study of 42 patients, 100% presented with at least one adverse skin reaction, and the most common events were verrucous papillomas (79%; ref. 5). Patients who develop cutaneous tumors frequently acquire multiple primary lesions, which can affect entire limbs or chest (29, 30), a phenotype consistent with an infectious disease. Furthermore, the pathology of tumors is also not limited to cSCC and keratoacanthoma. Cases of pilaris-like eruptions, acantholytic dyskeratosis, verrucous keratosis, cystic lesions, papules, verrucous papillomas, and basal cell carcinomas

have been documented (29–33) but were not reported as adverse events in the clinical trials (2, 3). The diversity of cutaneous lesions observed in patients treated with RAF inhibitors may also reflect the presence of multiple oncoviruses, including Merkel cell polyomavirus (23), or multiple unrecognized HPV genotypes that each require MAPK activation for tumorigenesis. Disruption of ERK activation in these tissues by combining MEK and RAF inhibitors therefore seems to be an effective strategy to treat BRAF^{V600E}-mutant melanomas, and to prevent spontaneous cutaneous tumors concurrently.

Disclosure of Potential Conflicts of Interest

M. Holderfield is a senior scientist at Frederick National Laboratory for Cancer Research, Leidos Biomedical Research, and a postdoctoral researcher at the Helen Diller Family Comprehensive Cancer Center. D. Stuart has ownership interests (including patents) in Novartis. C. Robert is a consultant/advisory board member for Roche, GSK, BMS, Merck, and Novartis. N. Pryer has ownership interest (including patents) in Novartis. F. McCormick is a coleader of the National RAS Project at Frederick National Laboratory. No potential conflicts of interest were disclosed by the other authors.

Authors' Contributions

Conception and design: M. Holderfield, D. Daniel, D. Stuart

Development of methodology: M. Holderfield, E. Lorenzana, L. Lacroix, M. Ghoddusi, D. Stuart

Acquisition of data (provided animals, acquired and managed patients, provided facilities, etc.): M. Holderfield, E. Lorenzana, L. Lomovasky, I. Boussemart, L. Lacroix, M. Favre, C. Robert, M. Ghoddusi, D. Daniel, N. Pryer, D. Stuart

Analysis and interpretation of data (e.g., statistical analysis, biostatistics, computational analysis): M. Holderfield, B. Weisburd, I. Boussemart, L. Lacroix, G. Tomasic, M. Favre, C. Robert, M. Ghoddusi, D. Daniel, D. Stuart

Writing, review, and/or revision of the manuscript: M. Holderfield, E. Lorenzana, L. Boussemart, S. Vagner, C. Robert, M. Ghoddusi, D. Daniel, N. Pryer, F. McCormick, D. Stuart

Administrative, technical, or material support (i.e., reporting or organizing data, constructing databases): M. Holderfield, M. Ghoddusi

Study supervision: M. Holderfield, N. Pryer, F. McCormick, D. Stuart

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked *advertisement* in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

Received April 22, 2013; revised December 19, 2013; accepted January 10, 2014; published OnlineFirst February 12, 2014.

References

- Davies H, Bignell GR, Cox C, Stephens P, Edkins S, Clegg S, et al. Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature* 2002;417:949–54.
- Chapman PB, Hauschild A, Robert C, Haanen JB, Ascierto P, Larkin J, et al. Improved survival with vemurafenib in melanoma with BRAF V600E mutation. *N Engl J Med* 2011;364:2507–16.
- Flaherty KT, Puzanov I, Kim KB, Ribas A, McArthur GA, Sosman JA, et al. Inhibition of mutated, activated BRAF in metastatic melanoma. *N Engl J Med* 2010;363:809–19.
- Arnault JP, Wechsler J, Escudier B, Spatz A, Tomasic G, Sibaud V, et al. Keratoacanthomas and squamous cell carcinomas in patients receiving sorafenib. *J Clin Oncol* 2009;27:e59–e61.
- Boussemart L, Routier E, Mateus C, Opletalova K, Sebille G, Kamsukom N, et al. Prospective study of cutaneous side-effects associated with the BRAF inhibitor vemurafenib: a study of 42 patients. *Ann Oncol* 2013;24:1691–7.
- Hatzivassiliou G, Song K, Yen I, Brandhuber BJ, Anderson DJ, Alvarado R, et al. RAF inhibitors prime wild-type RAF to activate the MAPK pathway and enhance growth. *Nature* 2010;464:431–5.
- Carnahan J, Beltran PJ, Babij C, Le Q, Rose MJ, Vonderfecht S, et al. Selective and potent Raf inhibitors paradoxically stimulate normal cell proliferation and tumor growth. *Mol Cancer Ther* 2010;9:2399–410.
- Heldrom SJ, Milagre C, Whittaker S, Noury A, Niculescu-Duvas I, Dhomen N, et al. Kinase-dead BRAF and oncogenic RAS cooperate to drive tumor progression through CRAF. *Cell* 2010;140:209–21.
- Poulikakos PI, Zhang C, Bollag G, Shokat KM, Rosen N. RAF inhibitors transactivate RAF dimers and ERK signalling in cells with wild-type BRAF. *Nature* 2010;464:427–30.
- Holderfield M, Merritt H, Chan J, Wallroth M, Tandeske L, Zhai H, et al. RAF Inhibitors Activate the MAPK Pathway by Relieving Inhibitory Autophosphorylation. *Cancer Cell* 2013;23:594–602.
- Oberholzer PA, Kee D, Dziunycz P, Sucker A, Kamsukom N, Jones R, et al. RAS mutations are associated with the development of cutaneous squamous cell tumors in patients treated with RAF inhibitors. *J Clin Oncol* 2012;30:316–21.
- Arnault JP, Matus C, Escudier B, Tomasic G, Wechsler J, Holville E, et al. Skin tumors induced by sorafenib: paradoxical RAS-RAF pathway activation and oncogenic mutations of HRAS, TP53, and TGFBR1. *Clin Cancer Res* 2012;18:263–72.
- Su F, Vros A, Milagre C, Trunzer K, Bollag G, Spleiss O, et al. RAS mutations in cutaneous squamous-cell carcinomas in patients treated with BRAF inhibitors. *N Engl J Med* 2012;366:207–15.

14. Coussens LM, Hanahan D, Arbeit JM. Genetic predisposition and parameters of malignant progression in K14-HPV16 transgenic mice. *Am J Pathol* 1996;149:1899-917.
15. Forslund O, Antonsson A, Nordin P, Stenquist B, Hansson BG. A broad range of human papillomavirus types detected with a general PCR method suitable for analysis of cutaneous tumours and normal skin. *J Gen Virol* 1999;80:2437-43.
16. Favre M, Orth G, Majewski S, Baloul S, Pura A, Jablonska S. Psoriasis: a possible reservoir for human papillomavirus type 5, the virus associated with skin carcinomas of epidermodysplasia verruciformis. *J Invest Dermatol* 1998;110:311-7.
17. Barretina J, Caponigro G, Stransky N, Venkatesan K, Margolin AA, Kim S, et al. The Cancer Cell Line Encyclopedia enables predictive modelling of anticancer drug sensitivity. *Nature* 2012;483:603-7.
18. Li H, Durbin R. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics* 2009;25:1754-60.
19. Depristo MA, Banks E, Poplin R, Garimella KV, Maguire JR, Hartl C, et al. A framework for variation discovery and genotyping using next-generation DNA sequencing data. *Nat Genet* 2011;43:491-8.
20. Sherry ST, Ward MH, Kholodov M, Baker J, Phan L, Smigielski EM, et al. dbSNP: the NCBI database of genetic variation. *Nucleic Acids Res* 2001;29:308-11.
21. Pratilas CA, Taylor BS, Ye Q, Viale A, Sander C, Solit DB, et al. (V600E) BRAF is associated with disabled feedback inhibition of RAF-MEK signaling and elevated transcriptional output of the pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009;106:4519-24.
22. Anforth RM, Blumett TC, Kefford RF, Sharma R, Scolyer RA, Kossard S, et al. Cutaneous manifestations of dabrafenib (GSK2118436): a selective inhibitor of mutant BRAF in patients with metastatic melanoma. *Br J Dermatol* 2012;167:1153-60.
23. Falchook GS, Rady P, Hymes S, Nguyen HP, Tyring SK, Prieto VG, et al. Merkel cell polyomavirus and HPV-17 associated with cutaneous squamous cell carcinoma arising in a patient with melanoma treated with the BRAF inhibitor dabrafenib. *JAMA Dermatol* 2013;149:322-6.
24. Flaherty KT, Infante JR, Daud A, Gonzalez R, Kefford RF, Sosman J, et al. Combined BRAF and MEK inhibition in melanoma with BRAF V600 mutations. *N Engl J Med* 2012;367:1694-703.
25. Schaper ID, Marcuzzi GP, Weissenborn SJ, Kasper HU, Dries V, Smyth N, et al. Development of skin tumors in mice transgenic for early genes of human papillomavirus type 8. *Cancer Res* 2005;65:1394-400.
26. Aron ST, Ruby JG, Dybbro E, Ganem D, Derisi JL. Transcriptome sequencing demonstrates that human papillomavirus is not active in cutaneous squamous cell carcinoma. *J Invest Dermatol* 2011;131:1745-53.
27. Marcuzzi GP, Hufbauer M, Kasper HU, Weissenborn SJ, Smola S, Pfister H. Spontaneous tumour development in human papillomavirus type 8 E6 transgenic mice and rapid induction by UV-light exposure and wounding. *J Gen Virol* 2009;90:2855-64.
28. Aldabagh B, Angeles JG, Cardones AR, Aron ST. Cutaneous Squamous Cell Carcinoma and Human Papillomavirus: Is There an Association? *Dermatol Surg* 2012;39:1-23.
29. Chu EY, Wanat KA, Miller CJ, Amaravadi RK, Fecher LA, Brose MS, et al. Diverse cutaneous side effects associated with BRAF inhibitor therapy: A clinicopathologic study. *J Am Acad Dermatol* 2012;67:1265-72.
30. Huang V, Hepper D, Anadkat M, Comellus L. Cutaneous toxic effects associated with vemurafenib and inhibition of the BRAF pathway. *Arch Dermatol* 2012;148:628-33.
31. Mattel PL, Alora-Pall MB, Kraft S, Lawrence DP, Flaherty KT, Kimball AB. Cutaneous effects of BRAF inhibitor therapy: a case series. *Ann Oncol* 2012;24:530-7.
32. Anforth R, Fernandez-Penas P, Long GV. Cutaneous toxicities of RAF inhibitors. *Lancet Oncol* 2013;14:e11-e18.
33. Ascierto PA, Bastholt L, Hersey PF, Cinat GF, Eggemont AM, Hauschild A, et al. Side Effects and Toxicities of Targeted Therapies in Stage IV Melanoma. *Am J Ther* 2013 Oct 31. [Epub ahead of print].

VI. Références

- ¹ Mark GE, Rapp UR: Primary structure of v-raf: relatedness to the src family of oncogenes. *Science*.1984; 224(4646):285–289.
- ² Roskoski R Jr: RAF protein-serine/threonine kinases: structure and regulation. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010; 399(3):313–317.
- ³ Zebisch A, Troppmair J: Back to the roots: the remarkable RAF oncogene story. *Cell Mol Life Sci*. 2006; 63(11):1314–1330.
- ⁴ Ikawa S, Fukui M, Ueyama Y, Tamaoki N, Yamamoto T, Toyoshima K: B-raf, a new member of the raf family, is activated by DNA rearrangement. *Mol Cell Biol*. 1988; 8(6):2651–2654
- ⁵ Avruch J. MAP kinase pathways: the first twenty years. *Biochim Biophys Acta*. 2007; 1773:1150-60.
- ⁶ Rushworth LK, Hindley AD, O'Neill E, Kolch W. Regulation and role of Raf-1/B-Raf heterodimerization. *Mol Cell Biol*. 2006; Mar;26(6):2262-72.
- ⁷ Ramos JW. The regulation of extracellular signal-regulated kinase (ERK) in mammalian cells. *Int J Biochem Cell Biol*. 2008; 40: 2707-19.
- ⁸ Vakiani E, Solit DB. KRAS and BRAF: drug targets and predictive biomarkers. *J Pathol*. 2011; 223:219-29.
- ⁹ Velho S, Haigis KM. Regulation of homeostasis and oncogenesis in the intestinal epithelium by Ras. *Exp Cell Res*. 2011; 317: 2732-9.
- ¹⁰ Santarpia L, Lippman SM, El-Naggar AK. Targeting the MAPK-RAS-RAF signaling pathway in cancer therapy. *Expert Opin Ther Targets*. 2012; 16: 103-19.

-
- ¹¹ Cagnol S, Rivard N. Oncogenic KRAS and BRAF activation of the MEK/ERK signaling pathway promotes expression of dual-specificity phosphatase 4 (DUSP4/MKP2) resulting in nuclear ERK1/2 inhibition. *Oncogene*. 2013 ;32(5):564-76.
- ¹² Owens DM, Keyse SM. Differential regulation of MAP kinase signalling by dual-specificity protein phosphatases. *Oncogene*. 2007; 26: 3203-13.
- ¹³ Chambard JC, Lefloch R, Pouyssegur J, Lenormand P. ERK implication in cell cycle regulation. *Biochim Biophys Acta*. 2007; 1773: 1299-310.
- ¹⁴ Meloche S, Pouyssegur J. The ERK1/2 mitogen-activated protein kinase pathway as a master regulator of the G1- to S-phase transition. *Oncogene*. 2007; 26: 3227-39.
- ¹⁵ Lemieux E, Bergeron S, Durand V, et al. Constitutively active MEK1 is sufficient to induce epithelial-to-mesenchymal transition in intestinal epithelial cells and to promote tumor invasion and metastasis. *Int J Cancer*. 2009; 125: 1575-86.
- ¹⁶ Pages G, Lenormand P, L'Allemain G, et al. Mitogen-activated protein kinases p42mapk and p44mapk are required for fibroblast proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993; 90: 8319-23.
- ¹⁷ Brondello JM, McKenzie FR, Sun H, et al. Constitutive MAP kinase phosphatase (MKP-1) expression blocks G1 specific gene transcription and S-phase entry in fibroblasts. *Oncogene*. 1995; 10: 1895-904.
- ¹⁸ Brunet A, Pages G, Pouyssegur J. Constitutively active mutants of MAP kinase kinase (MEK1) induce growth factor-relaxation and oncogenicity when expressed in fibroblasts. *Oncogene*. 1994; 9: 3379-87.
- ¹⁹ Boucher MJ, Jean D, Vezina A, Rivard N. Dual role of MEK/ERK signaling in senescence and transformation of intestinal epithelial cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2004; 286: G736-46.

-
- ²⁰ Cowley S, Paterson H, Kemp P, Marshall CJ. Activation of MAP kinase kinase is necessary and sufficient for PC12 differentiation and for transformation of NIH 3T3 cells. *Cell*. 1994; 77: 841-52.
- ²¹ Sarbassov DD, Jones LG, Peterson CA. Extracellular signal-regulated kinase-1 and -2 respond differently to mitogenic and differentiative signaling pathways in myoblasts. *Mol Endocrinol*. 1997; 11: 2038-47.
- ²² Font de Mora J, Porrás A, Ahn N, Santos E. Mitogen-activated protein kinase activation is not necessary for, but antagonizes, 3T3-L1 adipocytic differentiation. *Mol Cell Biol*. 1997; 17: 6068-75.
- ²³ Marshall CJ. Specificity of receptor tyrosine kinase signaling: transient versus sustained extracellular signal-regulated kinase activation. *Cell*. 1995; 80: 179-85.
- ²⁴ Huang C, Jacobson K, Schaller MD. MAP kinases and cell migration. *J Cell Sci*. 2004; 117: 4619-28.
- ²⁵ Voisin L, Julien C, Duhamel S, et al. Activation of MEK1 or MEK2 isoform is sufficient to fully transform intestinal epithelial cells and induce the formation of metastatic tumors. *BMC Cancer*. 2008; 8: 337.
- ²⁶ Balmanno K, Cook SJ. Tumour cell survival signalling by the ERK1/2 pathway. *Cell Death Differ*. 2009; 16: 368-77.
- ²⁷ Kim EK, Choi EJ. Pathological roles of MAPK signaling pathways in human diseases. *Biochim Biophys Acta*. 2010; 1802: 396-405.
- ²⁸ Davies H, Bignell GR, Cox C, et al. Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature*. 2002; 417:949-54.

-
- ²⁹ Kimura ET, Nikiforova MN, Zhu Z, et al. High prevalence of BRAF mutations in thyroid cancer: genetic evidence for constitutive activation of the RET/PTC-RAS-BRAF signaling pathway in papillary thyroid carcinoma. *Cancer Res.* 2003;63(7):1454-1457.
- ³⁰ Tiacci E, Trifonov V, Schiavoni G, et al. BRAF mutations in hairy-cell leukemia. *N Engl J Med.* 2011;364(24):2305-2315.
- ³¹ Andrulis M, Lehnert N, Capper D, et al. Targeting the BRAF V600E mutation in multiple myeloma. *Cancer Discov.* 2013;3(8):862-869.
- ³² Flaherty K.T., et al. Inhibition of Mutated, Activated BRAF in Metastatic Melanoma. *The New England Journal of Medicine*, 2010; vol.363 no. 9: 809-819
- ³³ Pollock PM, Harper UL, Hansen, KS, et al. High frequency of BRAF mutations in nevi. *Nature Genetics.* 2003; 33:19-20.
- ³⁴ Mooi WJ, Peeper DS. Oncogene-induced cell senescence—halting on the road to cancer. *N Engl J Med.* 2006 ; 355:1037–46.
- ³⁵ Michaloglou C, Vredeveld LCW, Soengas MS, Denoyelle C, Kuilman T, van der Horst CMAM, et al. BRAF E600-associated senescence-like cell cycle arrest of human naevi. *Nature.* 2005; 436(7051):720–4.
- ³⁶ Kuilman T, Michaloglou C, Vredeveld LCW, Douma S, Van Doorn R, Desmet CJ, et al. Oncogene-induced senescence relayed by an interleukin-dependent inflammatory network. *Cell.* 2008 ; 133:1019–31.
- ³⁷ Rauen KA. The RASopathies. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 2013;14:355-69.
- ³⁸ Romano AA, Allanson JE, Dahlgren J, Gelb BD, Hall B, et al. Noonan syndrome: clinical features, diagnosis, and management guidelines. *Pediatrics.* 2010; 126:746–59.

-
- ³⁹ Tartaglia M, Mehler EL, Goldberg R, Zampino G, Brunner HG, et al. Mutations in PTPN11, encoding the protein tyrosine phosphatase SHP-2, cause Noonan syndrome. *Nat Genet.* 2001; 29:465–68.
- ⁴⁰ Roberts AE, Araki T, Swanson KD, Montgomery KT, Schiripo TA, et al. Germline gain-of-function mutations in SOS1 cause Noonan syndrome. *Nat Genet.* 2007; 39:70–74.
- ⁴¹ Tartaglia M, Pennacchio LA, Zhao C, Yadav KK, Fodale V, et al. Gain-of-function SOS1 mutations cause a distinctive form of Noonan syndrome. *Nat Genet.* 2007; 39:75–79.
- ⁴² Pandit B, Sarkozy A, Pennacchio LA, Carta C, Oishi K, et al. Gain-of-function RAF1 mutations cause Noonan and LEOPARD syndromes with hypertrophic cardiomyopathy. *Nat Genet.* 2007; 39:1007–12.
- ⁴³ Razzaque MA, Nishizawa T, Komoike Y, Yagi H, Furutani M, et al. Germline gain-of-function mutations in RAF1 cause Noonan syndrome. *Nat Genet.* 2007; 39:1013–17.
- ⁴⁴ Schubbert S, Zenker M, Rowe SL, Boll S, Klein C, et al. Germline KRAS mutations cause Noonan syndrome. *Nat Genet.* 2006; 38:331–36.
- ⁴⁵ Cirstea IC, Kutsche K, Dvorsky R, Gremer L, Carta C, et al. A restricted spectrum of NRAS mutations causes Noonan syndrome. *Nat Genet.* 2010; 42:27–29.
- ⁴⁶ Cordeddu V, Di Schiavi E, Pennacchio LA, Ma'ayan A, Sarkozy A, et al. Mutation of SHOC2 promotes aberrant protein N-myristoylation and causes Noonan-like syndrome with loose anagen hair. *Nat Genet.* 2009; 41:1022–26.
- ⁴⁷ Martinelli S, De Luca A, Stellacci E, Rossi C, Checquolo S, et al. Heterozygous germline mutations in the CBL tumor-suppressor gene cause a Noonan syndrome-like phenotype. *Am J Hum Genet.* 2010; 87:250–57.

-
- ⁴⁸ Niemeyer CM, Kang MW, Shin DH, Furlan I, Erlacher M, et al. Germline CBL mutations cause developmental abnormalities and predispose to juvenile myelomonocytic leukemia. *Nat Genet.* 2010; 42:794–800.
- ⁴⁹ Keilhack H, David FS, McGregor M, Cantley LC, Neel BG. Diverse biochemical properties of Shp2 mutants: implications for disease phenotypes. *J Biol Chem.* 2005; 280:30984–93.
- ⁵⁰ Tartaglia M, Martinelli S, Stella L, Bocchinfuso G, Flex E, et al. Diversity and functional consequences of germline and somatic PTPN11 mutations in human disease. *Am J Hum Genet.* 2006; 78:279–90.
- ⁵¹ Roberts AE, Araki T, Swanson KD, Montgomery KT, Schiripo TA, et al. Germline gain-of-function mutations in SOS1 cause Noonan syndrome. *Nat Genet.* 2007; 39:70–74.
- ⁵² Tartaglia M, Pennacchio LA, Zhao C, Yadav KK, Fodale V, et al. Gain-of-function SOS1 mutations cause a distinctive form of Noonan syndrome. *Nat Genet.* 2007; 39:75–79.
- ⁵³ Schubbert S, Zenker M, Rowe SL, Boll S, Klein C, et al. Germline KRAS mutations cause Noonan syndrome. *Nat Genet.* 2006; 38:331–36.
- ⁵⁴ Pandit B, Sarkozy A, Pennacchio LA, Carta C, Oishi K, et al. Gain-of-function RAF1 mutations cause Noonan and LEOPARD syndromes with hypertrophic cardiomyopathy. *Nat Genet.* 2007; 39:1007–12.
- ⁵⁵ Razzaque MA, Nishizawa T, Komoike Y, Yagi H, Furutani M, et al. Germline gain-of-function mutations in RAF1 cause Noonan syndrome. *Nat Genet.* 2007; 39:1013–17.
- ⁵⁶ Dikic I, Schmidt MH. Malfunctions within the Cbl interactome uncouple receptor tyrosine kinases from destructive transport. *Eur J Cell Biol.* 2007; 86:505–12.
- ⁵⁷ Digilio MC, Conti E, Sarkozy A, Mingarelli R, Dottorini T, et al. Grouping of multiple-lentigines/LEOPARD and Noonan syndromes on the PTPN11 gene. *Am J Hum Genet.* 2002; 71:389–94.

-
- ⁵⁸ Legius E, Schrandt-Stumpel C, Schollen E, Pulles-Heintzberger C, Gewillig M, Fryns JP. PTPN11 mutations in LEOPARD syndrome. *J Med Genet.* 2002; 39:571–74.
- ⁵⁹ Pandit B, Sarkozy A, Pennacchio LA, Carta C, Oishi K, et al. Gain-of-function RAF1 mutations cause Noonan and LEOPARD syndromes with hypertrophic cardiomyopathy. *Nat Genet.* 2007; 39:1007–12.
- ⁶⁰ Kontaridis MI, Swanson KD, David FS, Barford D, Neel BG. PTPN11 (Shp2) mutations in LEOPARD syndrome have dominant negative, not activating, effects. *J Biol Chem.* 2006; 281:6785–92.
- ⁶¹ Oishi K, Zhang H, Gault WJ, Wang CJ, Tan CC, et al. Phosphatase-defective LEOPARD syndrome mutations in PTPN11 gene have gain-of-function effects during *Drosophila* development. *Hum Mol Genet.* 2009; 18:193–201.
- ⁶² Siegel DH, McKenzie J, Frieden IJ, Rauen KA. Dermatological findings in 61 mutation-positive individuals with cardiofaciocutaneous syndrome. *Br J Dermatol.* 2011; 164:521–29.
- ⁶³ Yoon G, Rosenberg J, Blaser S, Rauen KA. Neurological complications of cardio-facio-cutaneous syndrome. *Dev Med Child Neurol.* 2007; 49:894–99.
- ⁶⁴ Niihori T, Aoki Y, Narumi Y, Neri G, Cavé H, et al. Germline KRAS and BRAF mutations in cardio-facio-cutaneous syndrome. *Nat Genet.* 2006; 38:294–96.
- ⁶⁵ Rodriguez-Viciana P, Tetsu O, Tidyman WE, Estep AL, Conger BA, et al. Germline mutations in genes within the MAPK pathway cause cardio-facio-cutaneous syndrome. *Science.* 2006; 311:1287–90.
- ⁶⁶ Heidorn SJ, Milagre C, Whittaker S, Nourry A, Niculescu-Duvas I, et al. Kinase-dead BRAF and oncogenic RAS cooperate to drive tumor progression through CRAF. *Cell.* 2010; 140:209–21.

-
- ⁶⁷ Anastasaki C, Estep AL, Marais R, Rauen KA, Patton EE. Kinase-activating and kinase-impaired cardio-facio-cutaneous syndrome alleles have activity during zebrafish development and are sensitive to small molecule inhibitors. *Hum Mol Genet.* 2009; 18:2543–54.
- ⁶⁸ Kratz CP, Rapisuwon S, Reed H, Hasle H, Rosenberg PS. Cancer in Noonan, Costello, cardiofaciocutaneous and LEOPARD syndromes. *Am J Med Genet C.* 2011; 157C:83–89.
- ⁶⁹ Rauen KA. HRAS and the Costello syndrome. *Clin Genet.* 2007; 71:101–8.
- ⁷⁰ Lin AE, Alexander ME, Colan SD, Kerr B, Rauen KA, et al. Clinical, pathological, and molecular analyses of cardiovascular abnormalities in Costello syndrome: a Ras/MAPK pathway syndrome. *Am J Med Genet A.* 2011; 155A:486–507.
- ⁷¹ Aoki Y, Niihori T, Kawame H, Kurosawa K, Ohashi H, et al. Germline mutations in HRAS protooncogene cause Costello syndrome. *Nat Genet.* 2005; 37:1038–40.
- ⁷² Gibbs JB, Sigal IS, Poe M, Scolnick EM. Intrinsic GTPase activity distinguishes normal and oncogenic ras p21 molecules. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1984; 81:5704–8.
- ⁷³ Bos JL. ras oncogenes in human cancer: a review. *Cancer Res.* 1989; 49:4682–89.
- ⁷⁴ Siegel DH, Mann JA, Krol AL, Rauen KA. Dermatological phenotype in Costello syndrome: consequences of Ras dysregulation in development. *Br J Dermatol.* 2011; 164:521–29.
- ⁷⁵ Gripp KW. Tumor predisposition in Costello syndrome. *Am J Med Genet C.* 2005; 137C:72–77.
- ⁷⁶ Zhang J, Yang PL, Gray NS. Targeting cancer with small molecule kinase inhibitors. *Nat Rev Cancer.* 2009;9(1):28–39.
- ⁷⁷ Hoeflich KP, Herter S, Tien J, et al. Antitumor efficacy of the novel RAF inhibitor GDC-0879 is predicted by BRAFV600E mutational status and sustained extracellular signal-

regulated kinase/mitogen-activated protein kinase pathway suppression. *Cancer Res.* 2009;69(7):3042–3051.

⁷⁸ Schwartz GK, Robertson S, Shen A, et al. A phase I study of XL281, a selective oral RAF kinase inhibitor, in patients with advanced solid tumors [abstract]. *J Clin Oncol.* 2009;27(15 Suppl):Abstract 3513.

⁷⁹ Sharfman WH, Hodi FS, Lawrence DP, et al. Results from the first-in-human (FIH) phase I study of the oral RAF inhibitor RAF265 administered daily to patients with advanced cutaneous melanoma [abstract]. *J Clin Oncol.* 2011;29(15 Suppl):Abstract 8508.

⁸⁰ Eisen T, Ahmad T, Flaherty KT, et al. Sorafenib in advanced melanoma: a phase II randomised discontinuation trial analysis. *Br J Cancer.* 2006;95(5):581–586.

⁸¹ Ott PA, Hamilton A, Min C, et al. A phase II trial of sorafenib in metastatic melanoma with tissue correlates. *PLoS One.* 2010;5(12):e15588.

⁸² Wilhelm SM, Carter C, Tang L, et al. BAY 43-9006 exhibits broad spectrum oral antitumor activity and targets the RAF/MEK/ERK pathway and receptor tyrosine kinases involved in tumor progression and angiogenesis. *Cancer Res.* 2004; 64(19):7099–7109.

⁸³ Flaherty KT, Redlinger M, Schuchter LM, Lathia CD, Weber BL, O'Dwyer PJ. Phase I/II, pharmacokinetic and pharmacodynamic trial of BAY 43-9006 alone in patients with metastatic melanoma [abstract]. *J Clin Oncol.* 2005; 23(16 Suppl):Abstract 3037.

⁸⁴ Flaherty KT, Schiller J, Schuchter LM, et al. A phase I trial of the oral, multikinase inhibitor sorafenib in combination with carboplatin and paclitaxel. *Clin Cancer Res.* 2008; 14(15):4836–4842.

⁸⁵ Hauschild A, Agarwala SS, Trefzer U, et al. 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.* 2009; 27(17): 2823–2830.

⁸⁶ Flaherty KT, Lee SJ, Schuchter LM, et al. Final results of E2603: a double-blind, randomized phase III trial comparing carboplatin (C)/paclitaxel (P) with or without sorafenib (S) in metastatic melanoma. *J Clin Oncol*. 2010; 28(15 Suppl):Abstract 8511.

⁸⁷ Stuart DD, Aardalen KM, Lorenzana EG, et al. Characterization of a novel RAF kinase inhibitor that causes target dependent tumor regression in human melanoma xenografts expressing mutant B-RAF [abstract 4856]. Proceedings of the 97th Annual Meeting of the American Association for Cancer Research; April 5, 2006; Washington, DC. Philadelphia, PA: American Association for Cancer Research; 2006.

⁸⁸ Su Y, Vilgelm AE, Kelley MC, et al. RAF265 inhibits the growth of advanced human melanoma tumors. *Clin Cancer Res*. 2012;18(8): 2184–2198.

⁸⁹ Sharfman WH, Hodi FS, Lawrence DP, et al. Results from the first-in-human (FIH) phase I study of the oral RAF inhibitor RAF265 administered daily to patients with advanced cutaneous melanoma. *J Clin Oncol*. 2011;29(15 Suppl):Abstract 8508.

⁹⁰ Bollag G, Hirth P, Tsai J, et al. Clinical efficacy of a RAF inhibitor needs broad target blockade in BRAF-mutant melanoma. *Nature*. 2010; 467(7315):596–599.

⁹¹ Falchook GS, Long GV, Kurzrock R, et al. Dabrafenib in patients with melanoma, untreated brain metastases, and other solid tumours: a phase 1 dose-escalation trial. *Lancet*. 2012; 379(9829):1893–1901.

⁹² Anforth R, Fernandez-Peñas P, Long GV. Cutaneous toxicities of RAF inhibitors. *Lancet Oncol*. 2013 ; 14(1):2045(12)70413-8. Review.

⁹³ Flaherty KT, Puzanov I, Kim KB, et al. Inhibition of mutated, activated BRAF in metastatic melanoma. *N Engl J Med*. 2010; 363(9):809-819.

-
- ⁹⁴ Chapman PB, Hauschild A, Robert C, et al; BRIM-3 Study Group. Improved survival with vemurafenib in melanoma with BRAF V600E mutation. *N Engl J Med.* 2011; 364(26):2507-2516.
- ⁹⁵ McArthur GA, Chapman PB, Robert C, et al. Safety and efficacy of vemurafenib in BRAF(V600E) and BRAF(V600K) mutation-positive melanoma (BRIM-3): extended follow-up of a phase 3, randomised, open-label study. *Lancet Oncol.* 2014;15(3):323-32.
- ⁹⁶ Sosman JA, Kim KB, Schuchter L, et al. Survival in BRAF V600-mutant advanced melanoma treated with vemurafenib. *N Engl J Med.* 2012;366(8):707–714.
- ⁹⁷ Laquerre S, Arnone M, Moss K, et al. A selective RAF kinase inhibitor induces cell death and tumor regression of human cancer cell lines encoding B-RAFV600E mutation [abstract]. *Mol Cancer Ther.* 2009; 8(12 Suppl 1):Abstract B88.
- ⁹⁸ Bollag G, Hirth P, Tsai J, et al. Clinical efficacy of a RAF inhibitor needs broad target blockade in BRAF-mutant melanoma. *Nature.* 2010; 467(7315):596–599.
- ⁹⁹ Kefford R, Arkenau H, Brown MP, et al. Phase I/II study of GSK2118436, a selective inhibitor of oncogenic mutant BRAF kinase, in patients with metastatic melanoma and other solid tumors [abstract]. *J Clin Oncol.* 2010;28(15 Suppl):S611, Abstract 8503.
- ¹⁰⁰ Hauschild A, Grob JJ, Demidov LV, et al. Dabrafenib in BRAF-mutated metastatic melanoma: a multicentre, open-label, phase 3 randomised controlled trial. *Lancet.* 2012; 380(9839):358-365.
- ¹⁰¹ Stuart D, Li N, Poon DJ, et al. Preclinical profile of LGX818: A potent and selective RAF kinase inhibitor. *Cancer Res.* 2012; 6(Apr 25 supplement):3790.
- ¹⁰² Falchook GS, Lewis KD, Infante JR, et al. Activity of the oral MEK inhibitor trametinib in patients with advanced melanoma: a phase 1 dose-escalation trial. *Lancet Oncol.* 2012; 13(8):782–789.

¹⁰³ Kim KB, Lewis KD, Pavlick AC, et al. A phase II study of the MEK1/MEK2 inhibitor GSK1120212 in metastatic BRAF-V600E or K mutant cutaneous melanoma patients previously treated with or without a BRAF inhibitor [abstract]. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2011; 24:1021, Abstract LBA1021–1023.

¹⁰⁴ Flaherty KT, Robert C, Hersey P, et al; METRIC Study Group. Improved survival with MEK inhibition in BRAF-mutated melanoma. *N Engl J Med.* 2012; 367(2):107–114.

¹⁰⁵ Flaherty KT, Infante JR, Daud A, et al. Combined BRAF and MEK inhibition in melanoma with BRAF V600 mutations. *N Engl J Med.* 2012;367(18):1694–1703.

¹⁰⁶ Flaherty K, Infante JR, Falchook GS, et al. Phase I/II expansion cohort of BRAF inhibitor GSK2118436 + MEK inhibitor GSK1120212 in patients with BRAF mutant metastatic melanoma who progressed on a prior BRAF inhibitor [abstract]. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2011; 24:1022, Abstract LBA1021–1024.

¹⁰⁷ Lee CI, Menzies AM, Haydu L, Clements A, Kefford R, Long GV. Correlates of fever in patients (pts) receiving combined dabrafenib (GSK2118436) plus trametinib (GSK1120212) for V600 BRAF-mutant metastatic melanoma (MM). *J Clin Oncol.* 2012; 30(15 Suppl):Abstract e19011.

¹⁰⁸ Long GV, Stroyakovskiy D, Gogas H, et al. Combined BRAF and MEK Inhibition versus BRAF Inhibition Alone in Melanoma. *N Engl J Med.* 2014 Sep 29. [Epub ahead of print]

¹⁰⁹ Robert C et al. *N Engl J Med.* 2014; in press.

¹¹⁰ Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2013. *CA Cancer J Clin.* 2013; 63(1):11-30.

¹¹¹ Feinberg AP, Vogelstein B, Droller MJ, et al. Mutation affecting the 12th amino acid of the c-Ha-ras oncogene product occurs infrequently in human cancer. *Science.* 1983; 220(4602):1175-1177.

¹¹² Karapetis CS, Khambata-Ford S, Jonker DJ, et al. K-ras mutations and benefit from cetuximab in advanced colorectal cancer. *N Engl J Med*. 2008; 359(17):1757-1765.

¹¹³ De Roock W, De Vriendt V, Normanno N, et al. KRAS, BRAF, PIK3CA, and PTEN mutations: implications for targeted therapies in metastatic colorectal cancer. *Lancet Oncol*. 2011; 12(6):594-603.

¹¹⁴ Yuen ST, Davies H, Chan TL, et al. Similarity of the phenotypic patterns associated with BRAF and KRAS mutations in colorectal neoplasia. *Cancer Res*. 2002; 62(22):6451-6455.

¹¹⁵ Richman SD, Seymour MT, Chambers P, et al. KRAS and BRAF mutations in advanced colorectal cancer are associated with poor prognosis but do not preclude benefit from oxaliplatin or irinotecan: results from the MRC FOCUS trial. *J Clin Oncol*. 2009; 27(35):5931-5937.

¹¹⁶ Tol J, Nagtegaal ID, Punt CJ. BRAF mutation in metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med*. 2009; 361(1):98-99.

¹¹⁷ Vaughn CP, Zobell SD, Furtado LV, et al. Frequency of KRAS, BRAF, and NRAS mutations in colorectal cancer. *Genes Chromosomes Cancer*. 2011; 50(5):307-312.

¹¹⁸ Simi L, Pratesi N, Vignoli M, et al. High-resolution melting analysis for rapid detection of KRAS, BRAF, and PIK3CA gene mutations in colorectal cancer. *Am J Clin Pathol*. 2008; 130(2):247-253.

¹¹⁹ Tian S, Simon I, Moreno V, et al. A combined oncogenic pathway signature of BRAF, KRAS and PI3KCA mutation improves colorectal cancer classification and cetuximab treatment prediction. *Gut*. 2013; 62(4):540-549.

¹²⁰ Kopetz S, Desai J, Chan E, et al. PLX4032 in metastatic colorectal cancer patients with mutant BRAF tumors. Paper presented at: American Society of Clinical Oncology Annual Meeting, June 4–8, 2010, Chicago, IL.

¹²¹ Mao M, Tian F, Mariadason JM, et al. Resistance to BRAF inhibition in BRAF-mutant colon cancer can be overcome with PI3K inhibition or demethylating agents. *Clin Cancer Res.* 2013; 19(3):657-667.

¹²² Prahallad A, Sun C, Huang S, et al. Unresponsiveness of colon cancer to BRAF(V600E) inhibition through feedback activation of EGFR. *Nature.* 2012; 483(7387):100-103.

¹²³ Kimura ET, Nikiforova MN, Zhu Z, et al. High prevalence of BRAF mutations in thyroid cancer: genetic evidence for constitutive activation of the RET/PTC-RAS-BRAF signaling pathway in papillary thyroid carcinoma. *Cancer Res.* 2003; 63(7):1454-1457.

¹²⁴ Hou P, Liu D, Xing M. Functional characterization of the T1799-1801del and A1799-1816ins BRAF mutations in papillary thyroid cancer. *Cell Cycle.* 2007;6(3):377-379.

¹²⁵ Kim TH, Park YJ, Lim JA, et al. The association of the BRAF(V600E) mutation with prognostic factors and poor clinical outcome in papillary thyroid cancer: a meta-analysis. *Cancer.* 2012; 118(7):1764-1773.

¹²⁶ Xing M. BRAF mutation in papillary thyroid cancer: pathogenic role, molecular bases, and clinical implications. *Endocr Rev.* 2007; 28(7):742-762.

¹²⁷ Xing M, Westra WH, Tufano RP, et al. BRAF mutation predicts a poorer clinical prognosis for papillary thyroid cancer. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005; 90(12):6373-6379.

¹²⁸ Riesco-Eizaguirre G, Gutierrez-Martinez P, Garcia-Cabezas MA, et al. The oncogene BRAF V600E is associated with a high risk of recurrence and less differentiated papillary thyroid carcinoma due to the impairment of Na⁺/I⁻ targeting to the membrane. *Endocr Relat Cancer.* 2006; 13(1):257-269.

¹²⁹ Xing M, Alzahrani AS, Carson KA, et al. Association between BRAF V600E mutation and mortality in patients with papillary thyroid cancer. *JAMA.* 2013; 309(14):1493-1501.

¹³⁰ Ball DW, Jin N, Rosen DM, et al. Selective growth inhibition in BRAF mutant thyroid cancer by the mitogen-activated protein kinase kinase 1/2 inhibitor AZD6244. *J Clin Endocrinol Metab.* 2007; 92(12):4712-4718.

¹³¹ Liu D, Xing M. Potent inhibition of thyroid cancer cells by the MEK inhibitor PD0325901 and its potentiation by suppression of the PI3K and NF-kappaB pathways. *Thyroid.* 2008; 18(8):853-864.

¹³² Xing J, Liu R, Xing M, et al. The BRAFT1799A mutation confers sensitivity of thyroid cancer cells to the BRAFV600E inhibitor PLX4032 (RG7204). *Biochem Biophys Res Commun.* 2011; 404(4):958-962.

¹³³ Kloos RT, Ringel MD, Knopp MV, et al. Phase II trial of sorafenib in metastatic thyroid cancer. *J Clin Oncol.* 2009; 27(10):1675-1684.

¹³⁴ Montero-Conde C, Ruiz-Llorente S, Dominguez JM, Knauf JA, Viale A, Sherman EJ, Ryder M, Ghossein RA, Rosen N, Fagin JA. Relief of feedback inhibition of HER3 transcription by RAF and MEK inhibitors attenuates their antitumor effects in BRAF-mutant thyroid carcinomas. *Cancer Discov.* 2013 May; 3(5):520-33.

¹³⁵ Cardarella S, Ogino A, Nishino M, et al. Clinical, pathologic, and biologic features associated with BRAF mutations in non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res.* 2013; 19(16):4532-4540.

¹³⁶ Marchetti A, Felicioni L, Malatesta S, et al. Clinical features and outcome of patients with non-small-cell lung cancer harboring BRAF mutations. *J Clin Oncol.* 2011; 29(26):3574-3579.

¹³⁷ Wan PT, Garnett MJ, Roe SM, et al. Mechanism of activation of the RAF-ERK signaling pathway by oncogenic mutations of B-RAF. *Cell.* 2004; 116(6):855-867.

¹³⁸ Paik PK, Arcila ME, Fara M, et al. Clinical characteristics of patients with lung adenocarcinomas harboring BRAF mutations. *J Clin Oncol.* 2011; 29(15):2046-2051.

-
- ¹³⁹ Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive genomic characterization of squamous cell lung cancers. *Nature*. 2012; 489(7417): 519-525.
- ¹⁴⁰ Gautschi O, Pauli C, Strobel K, et al. A patient with BRAF V600E lung adenocarcinoma responding to vemurafenib. *J Thorac Oncol*. 2012; 7(10):e23-24.
- ¹⁴¹ Gautschi O, Peters S, Zoete V, et al. Lung adenocarcinoma with BRAF G469L mutation refractory to vemurafenib. *Lung Cancer*. 2013; 82(2):365-367.
- ¹⁴² Rudin CM, Hong K, Streit M. Molecular characterization of acquired resistance to the BRAF inhibitor dabrafenib in a patient with BRAF-mutant non-small-cell lung cancer. *J Thorac Oncol*. 2013; 8(5):e41-42.
- ¹⁴³ Pratilas CA, Hanrahan AJ, Halilovic E, et al. Genetic predictors of MEK dependence in non-small cell lung cancer. *Cancer Res*. 2008; 68(22): 9375-9383.
- ¹⁴⁴ Planchard D, Mazieres J, Riely G, et al. Interim Results of phase II study BRF113928 of dabrafenib in BRAF V600E mutation-positive non-small cell lung cancer. Paper presented at: American Society of Clinical Oncology Annual Meeting, May 31–June 4, 2013, Chicago, IL.
- ¹⁴⁵ Tiacci E, Trifonov V, Schiavoni G, et al. BRAF mutations in hairy-cell leukemia. *N Engl J Med*. 2011; 364(24):2305-2315.
- ¹⁴⁶ Arcaini L, Zibellini S, Boveri E, et al. The BRAF V600E mutation in hairy cell leukemia and other mature B-cell neoplasms. *Blood*. 2012; 119(1):188-191.
- ¹⁴⁷ Dietrich S, Glimm H, Andrulis M, et al. BRAF inhibition in refractory hairy-cell leukemia. *N Engl J Med*. 2012; 366(21):2038-2040.
- ¹⁴⁸ Dietrich S, Hullein J, Hundemer M, et al. Continued response off treatment after BRAF inhibition in refractory hairy cell leukemia. *J Clin Oncol*. 2013; 31(19):e300-303.

¹⁴⁹ Munoz J, Schlette E, Kurzrock R. Rapid response to vemurafenib in a heavily pretreated patient with hairy cell leukemia and a BRAF mutation. *J Clin Oncol.* 2013; 31(20):e351-352.

¹⁵⁰ Dias-Santagata D, Lam Q, Vernovsky K, et al: BRAF V600E mutations are common in pleomorphic xanthoastrocytoma: Diagnostic and therapeutic implications. *PLoS One.* 2011 ; 6:e17948

¹⁵¹ Lee EQ, Ruland S, LeBoeuf NR, Wen PY, Santagata S. Successful Treatment of a Progressive BRAF V600E-Mutated Anaplastic Pleomorphic Xanthoastrocytoma With Vemurafenib Monotherapy. *J Clin Oncol.* 2014; pii: JCO.2013.51.1766.

¹⁵² Rauen KA, Banerjee A, Bishop WR, Lauchle JO, McCormick F, et al. Costello and cardio-faciocutaneous syndromes: moving toward clinical trials in RASopathies. *Am J Med Genet C.* 2011; 157C:136–46.

¹⁵³ Rauen KA, Schoyer L, McCormick F, Lin AE, Allanson JE, et al. Proceedings from the 2009 genetic syndromes of the Ras/MAPK pathway: from bedside to bench and back. *Am J Med Genet A.* 2010; 152A:4–24.

¹⁵⁴ Chen PC, Wakimoto H, Conner D, Araki T, Yuan T, et al. Activation of multiple signaling pathways causes developmental defects in mice with a Noonan syndrome–associated *Sos1* mutation. *J Clin Invest.* 2010; 120:4353–65.

¹⁵⁵ Shukla V, Coumoul X, Wang RH, Kim HS, Deng CX. RNA interference and inhibition of MEK-ERK signaling prevent abnormal skeletal phenotypes in a mouse model of craniosynostosis. *Nat Genet.* 2007; 39:1145–50.

¹⁵⁶ Wang Y, Kim E, Wang X, Novitsch BG, Yoshikawa K, et al. ERK inhibition rescues defects in fate specification of *Nf1*-deficient neural progenitors and brain abnormalities. *Cell.* 2012; 150:816–30.

¹⁵⁷ Anastasaki C, Rauen KA, Patton EE. Continual low-level MEK inhibition ameliorates cardio-faciocutaneous phenotypes in zebrafish. *Dis Models Mech.* 2012; 5:546–52.

¹⁵⁸ Wilmott JS, Tembe V, Howle JR, et al. Intratumoral molecular heterogeneity in a BRAF-mutant, BRAF inhibitor-resistant melanoma: a case illustrating the challenges for personalized medicine. *Mol Cancer Ther.* 2012; 11(12):2704-8.

¹⁵⁹ Rebecca VW, Smalley KS. Tumor heterogeneity and strategies to overcome kinase inhibitor resistance in cancer: lessons from melanoma. *Expert Opin Investig Drugs.* 2011; 20(2):137–140.

¹⁶⁰ Wilmott JS, Long GV, Howle JR, et al. Selective BRAF inhibitors induce marked T-cell infiltration into human metastatic melanoma. *Clin Cancer Res.* 2012;18(5):1386–1394.

¹⁶¹ Sosman JA, Pavlick AC, Schuchter LM, et al. Analysis of molecular mechanisms of response and resistance to vemurafenib (vem) in BRAFV600E melanoma. *J Clin Oncol.* 2012; 30(15 Suppl):Abstract 8503.

¹⁶² McArthur GA, Ribas A, Chapman PB, et al. Molecular analyses from a phase I trial of vemurafenib to study mechanism of action (MOA) and resistance in repeated biopsies from BRAF mutation-positive metastatic melanoma patients (pts). *J Clin Oncol.* 2011;29(15 Suppl):Abstract 8502.

¹⁶³ Nathanson KL, Martin A, Letrero R, et al. Tumor genetic analyses of patients with metastatic melanoma treated with the BRAF inhibitor GSK2118436 (GSK436). *J Clin Oncol.* 2011; 29(15 Suppl):Abstract 8501.

¹⁶⁴ Trefzer U, Minor DR, Ribas A, et al. BREAK-2: a phase IIA trial of the selective BRAF kinase inhibitor GSK2118436 in patients with BRAF (V600E/K)-positive metastatic melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2011; 24:1020, Abstract LBA1021–1021.

¹⁶⁵ Smalley KS, Lioni M, Dalla Palma M, et al. Increased cyclin D1 expression can mediate BRAF inhibitor resistance in BRAF V600E-mutated melanomas. *Mol Cancer Ther.* 2008;7(9):2876–2883.

-
- ¹⁶⁶ Straussman R, Morikawa T, Shee K, et al. Tumour micro-environment elicits innate resistance to RAF inhibitors through HGF secretion. *Nature*. 2012; 487(7408):500–504.
- ¹⁶⁷ Sos ML, Levin RS, Gordan JD, Oses-Prieto JA, Webber JT, Salt M, Hann B, Burlingame AL, McCormick F, Bandyopadhyay S, Shokat KM. Oncogene Mimicry as a Mechanism of Primary Resistance to BRAF Inhibitors. *Cell Rep*. 2014; 8(4):1037-48.
- ¹⁶⁸ Haq R, Yokoyama S, Hawryluk EB, et al: BCL2A1 is a lineage-specific antiapoptotic melanoma oncogene that confers resistance to BRAF inhibition. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2013; 110: 4321-4326.
- ¹⁶⁹ Sauter ER, Yeo UC, von Stemm A, et al. Cyclin D1 is a candidate oncogene in cutaneous melanoma. *Cancer Res* 2002; 62:3200–6.
- ¹⁷⁰ Vergani E, Vallacchi V, Frigerio S, et al: Identification of MET and SRC activation in melanoma cell lines showing primary resistance to PLX4032. *Neoplasia*. 2011; 13: 1132-1142.
- ¹⁷¹ Cragg MS, Jansen ES, Cook M, Harris C, Strasser A and Scott CL: Treatment of B-RAF mutant human tumor cells with a MEK inhibitor requires Bim and is enhanced by a BH3 mimetic. *J Clin Invest*. 2008; 118: 3651-3659.
- ¹⁷² Jiang CC, Lai F, Tay KH, et al: Apoptosis of human melanoma cells induced by inhibition of B-RAFFV600E involves preferential splicing of bimS. *Cell Death Dis*. 2010; 1: e69.
- ¹⁷³ Hartman ML and Czyz M: Anti-apoptotic proteins on guard of melanoma cell survival. *Cancer Lett*. 2013; 331: 24-34.
- ¹⁷⁴ Wang X: The expanding role of mitochondria in apoptosis. *Genes Dev*. 2001; 15: 2922-2933.
- ¹⁷⁵ Oltersdorf T, Elmore SW, Shoemaker AR, et al: An inhibitor of Bcl-2 family proteins induces regression of solid tumours. *Nature*. 2005; 435: 677-681.

-
- ¹⁷⁶ Hann CL, Daniel VC, Sugar EA, et al: Therapeutic efficacy of ABT-737, a selective inhibitor of BCL-2, in small cell lung cancer. *Cancer Res.* 2008; 68: 2321-2328.
- ¹⁷⁷ Wroblewski D, Mijatov B, Mohana-Kumaran N, et al: The BH3-mimetic ABT-737 sensitizes human melanoma cells to apoptosis induced by selective BRAF inhibitors but does not reverse acquired resistance. *Carcinogenesis.* 2013; 34: 237-247.
- ¹⁷⁸ VanBrocklin MW, Verhaegen M, Soengas MS and Holmen SL: Mitogen-activated protein kinase inhibition induces translocation of Bmf to promote apoptosis in melanoma. *Cancer Res.* 2009; 69: 1985-1994.
- ¹⁷⁹ Tse C, Shoemaker AR, Adickes J, et al: ABT-263: a potent and orally bioavailable Bcl-2 family inhibitor. *Cancer Res.* 2008; 68: 3421-3428.
- ¹⁸⁰ Sale MJ and Cook SJ: The BH3 mimetic ABT-263 synergizes with the MEK1/2 inhibitor selumetinib/AZD6244 to promote BIM-dependent tumour cell death and inhibit acquired resistance. *Biochem J.* 2013; 450: 285-294.
- ¹⁸¹ Verhaegen M, Bauer JA, Martin de la Vega C, et al: A novel BH3 mimetic reveals a mitogen-activated protein kinase-dependent mechanism of melanoma cell death controlled by p53 and reactive oxygen species. *Cancer Res.* 2006; 66: 11348-11359.
- ¹⁸² Senft D, Berking C, Graf SA, Kammerbauer C, Ruzicka T and Besch R: Selective induction of cell death in melanoma cell lines through targeting of Mcl-1 and A1. *PLoS One.* 2012; 7: e30821.
- ¹⁸³ Tassi E, Zanon M, Vegetti C, et al: Role of Apollon in human melanoma resistance to antitumor agents that activate the intrinsic or the extrinsic apoptosis pathways. *Clin Cancer Res.* 2012; 18: 3316-3327.
- ¹⁸⁴ Tassi E, Zanon M, Vegetti C, et al: Role of Apollon in human melanoma resistance to antitumor agents that activate the intrinsic or the extrinsic apoptosis pathways. *Clin Cancer Res.* 2012; 18: 3316-3327.

-
- ¹⁸⁵ Nazarian R, Shi H, Wang Q, et al. Melanomas acquire resistance to B-RAF(V600E) inhibition by RTK or N-RAS upregulation. *Nature*. 2010; 468(7326):973–977.
- ¹⁸⁶ Maertens, O. et al. Elucidating distinct roles for NF1 in melanomagenesis. *Cancer Discov*. 2013; 3, 338–349.
- ¹⁸⁷ Whittaker, S.R. et al. A genome-scale RNA interference screen implicates NF1 loss in resistance to RAF inhibition. *Cancer Discov*. 2013; 3, 350–362.
- ¹⁸⁸ Gramza AW, Corless CL, Heinrich MC. Resistance to tyrosine kinase inhibitors in gastrointestinal stromal tumors. *Clin Cancer Res*. 2009; 15(24):7510–7518.
- ¹⁸⁹ Nguyen KS, Kobayashi S, Costa DB. Acquired resistance to epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors in non-small-cell lung cancers dependent on the epidermal growth factor receptor pathway. *Clin Lung Cancer*. 2009; 10(4):281–289.
- ¹⁹⁰ Poulikakos, P.I. et al. RAF inhibitor resistance is mediated by dimerization of aberrantly spliced BRAF(V600E). *Nature*. 2011 ; 480, 387–390.
- ¹⁹¹ Shi, H. et al. Melanoma whole-exome sequencing identifies _{V600E}B-RAF amplification-mediated acquired B-RAF inhibitor resistance. *Nat. Commun*. 2012; 3, 724.
- ¹⁹² Montagut, C. et al. Elevated CRAF as a potential mechanism of acquired resistance to BRAF inhibition in melanoma. *Cancer Res*. 2008 ; 68, 4853–4861.
- ¹⁹³ Johannessen, C.M. et al. COT drives resistance to RAF inhibition through MAP kinase pathway reactivation. *Nature*. 2010 ; 468, 968–972.
- ¹⁹⁴ Rajakulendran, T., Sahmi, M., Lefrancois, M., Sicheri, F. & Therrien, M. A dimerization-dependent mechanism drives RAF catalytic activation. *Nature*. 2009; 461, 542–545.

¹⁹⁵ Antony, R., Emery, C.M., Sawyer, A.M. & Garraway, L.A. C-RAF mutations confer resistance to RAF inhibitors. *Cancer Res.* 2013; 73, 4840–4851.

¹⁹⁶ Wagle, N. et al. Dissecting therapeutic resistance to RAF inhibition in melanoma by tumor genomic profiling. *J. Clin. Oncol.* 2011; 29, 3085–3096.

¹⁹⁷ Shi, H. et al. Preexisting MEK1 exon 3 mutations in V600E/KBRAF melanomas do not confer resistance to BRAF inhibitors. *Cancer Discov.* 2012; 2, 414–424.

¹⁹⁸ Xing, F. et al. Concurrent loss of the PTEN and RB1 tumor suppressors attenuates RAF dependence in melanomas harboring (V600E)BRAF. *Oncogene.* 2012; 31, 446–457.

¹⁹⁹ Lito, P. et al. Relief of profound feedback inhibition of mitogenic signaling by RAF inhibitors attenuates their activity in BRAFV600E melanomas. *Cancer Cell.* 2012; 22, 668–682.

²⁰⁰ Girotti, M.R. et al. Inhibiting EGF receptor or SRC family kinase signaling overcomes BRAF inhibitor resistance in melanoma. *Cancer Discov.* 2013 ; 3, 158–167.

²⁰¹ Villanueva J, Vultur A, Lee JT, et al. 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.* 2010;18(6):683–695.

²⁰² Wilson, T.R. et al. Widespread potential for growth-factor–driven resistance to anticancer kinase inhibitors. *Nature.* 2012 ; 487, 505–509.

²⁰³ Shi H, Kong X, Ribas A and Lo RS: Combinatorial treatments that overcome PDGFRbeta-driven resistance of melanoma cells to V600EB-RAF inhibition. *Cancer Res.* 2011; 71: 5067-5074.

²⁰⁴ Greger JG, Eastman SD, Zhang V, et al: Combinations of BRAF, MEK, and PI3K/mTOR inhibitors overcome acquired resistance to the BRAF inhibitor GSK2118436 dabrafenib, mediated by NRAS or MEK mutations. *Mol Cancer Ther.* 2012; 11: 909-920.

²⁰⁵ Deng W, Gopal YN, Scott A, Chen G, Woodman SE and Davies MA: Role and therapeutic potential of PI3K-mTOR signaling in de novo resistance to BRAF inhibition. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2012; 25: 248-258.

²⁰⁶ Jiang CC, Lai F, Thorne RF, et al: MEK-independent survival of B-RAFV600E melanoma cells selected for resistance to apoptosis induced by the RAF inhibitor PLX4720. *Clin Cancer Res.* 2011; 17: 721-730.

²⁰⁷ Su F, Bradley WD, Wang Q, et al: Resistance to selective BRAF inhibition can be mediated by modest upstream pathway activation. *Cancer Res.* 2012; 72: 969-978.

²⁰⁸ Held MA, Langdon CG, Platt JT, et al: Genotype-selective combination therapies for melanoma identified by high-throughput drug screening. *Cancer Discov.* 2013; 3: 52-67.

²⁰⁹ Boisvert-Adamo K and Aplin AE: B-RAF and PI-3 kinase signaling protect melanoma cells from anoikis. *Oncogene.* 2006; 25: 4848-4856.

²¹⁰ Villanueva J, Infante JR, Krepler C, et al: Concurrent MEK2 mutation and BRAF amplification confer resistance to BRAF and MEK inhibitors in melanoma. *Cell Rep.* 2013; 4: 1090-1099.

²¹¹ Shi H, Hugo W, Kong X, Hong A, Koya RC, Moriceau G, Chodon T, Guo R, Johnson DB, Dahlman KB, Kelley MC, Kefford RF, Chmielowski B, Glaspy JA, Sosman JA, van Baren N, Long GV, Ribas A, Lo RS. Acquired resistance and clonal evolution in melanoma during BRAF inhibitor therapy. *Cancer Discov.* 2014; 4(1):80-93.

²¹² Van Allen EM, Wagle N, Sucker A, Treacy DJ, Johannessen CM, Goetz EM, Place CS, Taylor-Weiner A, Whittaker S, Kryukov GV, Hodis E, Rosenberg M, McKenna A, Cibulskis K, Farlow D, Zimmer L, Hillen U, Gutzmer R, Goldinger SM, Ugurel S, Gogas HJ, Egberts F, Berking C, Trefzer U, Loquai C, Weide B, Hassel JC, Gabriel SB, Carter

SL, Getz G, Garraway LA, Schadendorf D; Dermatologic Cooperative Oncology Group of Germany (DeCOG). The genetic landscape of clinical resistance to RAF inhibition in metastatic melanoma. *Cancer Discov.* 2014; 4(1):94-109.

²¹³ Hatzivassiliou G, Song K, Yen I, Brandhuber BJ, Anderson DJ, Alvarado R, Ludlam MJ, Stokoe D, Gloor SL, Vigers G, Morales T, Aliagas I, Liu B, Sideris S, Hoeflich KP, Jaiswal BS, Seshagiri S, Koeppen H, Belvin M, Friedman LS, Malek S. RAF inhibitors prime wild-type RAF to activate the MAPK pathway and enhance growth. *Nature.* 2010; 464(7287):431-5

²¹⁴ Heidorn SJ, Milagre C, Whittaker S, Nourry A, Niculescu-Duvas I, Dhomen N, Hussain J, Reis-Filho JS, Springer CJ, Pritchard C, Marais R. Kinase-dead BRAF and oncogenic RAS cooperate to drive tumor progression through CRAF. *Cell.* 2010; 140(2):209-21.

²¹⁵ Poulikakos PI, Zhang C, Bollag G, Shokat KM, Rosen N. RAF inhibitors transactivate RAF dimers and ERK signalling in cells with wild-type BRAF. *Nature.* 2010; 464(7287):427-30.

²¹⁶ Hall-Jackson CA, Evers PA, Cohen P, Goedert M, Boyle FT, Hewitt N, Plant H, Hedge P. Paradoxical activation of Raf by a novel Raf inhibitor. *Chem Biol.* 1999; 6(8):559-68.

²¹⁷ Rajakulendran T, Sahmi M, Lefrançois M, Sicheri F, Therrien M. A dimerization-dependent mechanism drives RAF catalytic activation. *Nature.* 2009; 461(7263):542-5.

²¹⁸ Tsai J, Lee JT, Wang W, Zhang J, Cho H, Mamo S, Bremer R, Gillette S, Kong J, Haass NK, Sproesser K, Li L, Smalley KS, Fong D, Zhu YL, Marimuthu A, Nguyen H, Lam B, Liu J, Cheung I, Rice J, Suzuki Y, Luu C, Settachatgul C, Shellooe R, Cantwell J, Kim SH, Schlessinger J, Zhang KY, West BL, Powell B, Habets G, Zhang C, Ibrahim PN, Hirth P, Artis DR, Herlyn M, Bollag G. Discovery of a selective inhibitor of oncogenic B-Raf kinase with potent antimelanoma activity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008; 105(8):3041-6.

-
- ²¹⁹ Wan PT, Garnett MJ, Roe SM, Lee S, Niculescu-Duvaz D, Good VM, Jones CM, Marshall CJ, Springer CJ, Barford D, Marais R; Cancer Genome Project. Mechanism of activation of the RAF-ERK signaling pathway by oncogenic mutations of B-RAF. *Cell*. 2004; 116(6):855-67.
- ²²⁰ Boussemart L, Routier E, Mateus C, Opletalova K, Sebille G, Kamsu-Kom N, Thomas M, Vagner S, Favre M, Tomasic G, Wechsler J, Lacroix L, Robert C. Prospective study of cutaneous side-effects associated with the BRAF inhibitor vemurafenib: a study of 42 patients. *Ann Oncol*. 2013; 24(6):1691-7.
- ²²¹ Boussemart L, Boivin C, Claveau J, Tao YG, Tomasic G, Routier E, Mateus C, Deutsch E, Robert C. Vemurafenib and radiosensitization. *JAMA Dermatol*. 2013; 149(7):855-7.
- ²²² Sonenberg N, Hinnebusch AG. Regulation of translation initiation in eukaryotes: mechanisms and biological targets. *Cell*. 2009; 136:731–45.
- ²²³ Jackson RJ, Hellen CU, Pestova TV. The mechanism of eukaryotic translation initiation and principles of its regulation. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2010; 11:113–27.
- ²²⁴ Zindy P, et al. Formation of the eIF4F translation-initiation complex determines sensitivity to anticancer drugs targeting the EGFR and HER2 receptors. *Cancer Res*. 2011; 71(12):4068-73.
- ²²⁵ Silvera D, Formenti SC, Schneider RJ. Translational control in cancer. *Nat Rev Cancer*. 2010; 10: 254-266.
- ²²⁶ Thumma SC, Kratzke RA. Translational control: a target for cancer therapy. *Cancer Lett*. 2007; 258: 1-8.
- ²²⁷ Mamane Y, Petroulakis E, Martineau Y, Sato TA, Larsson O, Rajasekhar VK, et al. Epigenetic activation of a subset of mRNAs by eIF4E explains its effects on cell proliferation. *PLoS ONE*. 2007; 2:e242.

-
- ²²⁸ Larsson O, Li S, Issaenko OA, Avdulov S, Peterson M, Smith K, et al. Eukaryotic translation initiation factor 4E induced progression of primary human mammary epithelial cells along the cancer pathway is associated with targeted translational deregulation of oncogenic drivers and inhibitors. *Cancer Res.* 2007; 67:6814–24.
- ²²⁹ Chung J, Bachelder RE, Lipscomb EA, Shaw LM, Mercurio AM. Integrin (alpha 6 beta 4) regulation of eIF-4E activity and VEGF translation: a survival mechanism for carcinoma cells. *J Cell Biol.* 2002; 158:165–74.
- ²³⁰ Furic L, Rong L, Larsson O, Koumakpayi IH, Yoshida K, Brueschke A, et al. eIF4E phosphorylation promotes tumorigenesis and is associated with prostate cancer progression. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2010; 107:14134–9.
- ²³¹ Hsieh AC, Ruggero D. Targeting eukaryotic translation initiation factor 4E (eIF4E) in cancer. *Clin Cancer Res.* 2010 ; 16: 4914-4920.
- ²³² Polunovsky VA, Bitterman PB. The cap-dependent translation apparatus integrates and amplifies cancer pathways. *RNA Biol.* 2006; 3:10-17.
- ²³³ Smith MR, Jaramillo M, Liu YL, Dever TE, Merrick WC, Kung HF, et al. Translation initiation factors induce DNA synthesis and transform NIH 3T3 cells. *New Biol.* 1990; 2:648–54.
- ²³⁴ Lazaris-Karatzas A, Montine KS, Sonenberg N. Malignant transformation by a eukaryotic initiation factor subunit that binds to mRNA 5' cap. *Nature.* 1990; 345: 544-547.
- ²³⁵ Avdulov S, Li S, Michalek V, Burrichter D, Peterson M et al. Activation of translation complex eIF4F is essential for the genesis and maintenance of the malignant phenotype in human mammary epithelial cells. *Cancer Cell.* 2004; 5: 553-563.

²³⁶ Graff JR, Konicek BW, Lynch RL, Dumstorf CA, Dowless MS et al. eIF4E activation is commonly elevated in advanced human prostate cancers and significantly related to reduced patient survival. *Cancer Res.* 2009; 69: 3866-3873.

²³⁷ Jacobson BA, Alter MD, Kratzke MG, Frizelle SP, Zhang Y et al. Repression of cap-dependent translation attenuates the transformed phenotype in non-small cell lung cancer both in vitro and in vivo. *Cancer Res.* 2006; 66: 4256-4262.

²³⁸ Coleman LJ, Peter MB, Teall TJ, Brannan RA, Hanby AM et al. Combined analysis of eIF4E and 4E-binding protein expression predicts breast cancer survival and estimates eIF4E activity. *Br J Cancer.* 2009; 100: 1393-1399.

²³⁹ Chen CN, Hsieh FJ, Cheng YM, Lee PH, Chang KJ. Expression of eukaryotic initiation factor 4E in gastric adenocarcinoma and its association with clinical outcome. *J Surg Oncol.* 2004; 86: 22-27.

²⁴⁰ Rosenwald IB, Chen JJ, Wang S, Savas L, London IM et al. Upregulation of protein synthesis initiation factor eIF-4E is an early event during colon carcinogenesis. *Oncogene.* 1999; 18: 2507-2517.

²⁴¹ Salehi Z, Mashayekhi F, Shahosseini F. Significance of eIF4E expression in skin squamous cell carcinoma. *Cell Biol Int.* 2007; 31: 1400-1404.

²⁴² Wang S, Rosenwald IB, Hutzler MJ, Pihan GA, Savas L et al. Expression of the eukaryotic translation initiation factors 4E and 2alpha in non-Hodgkin's lymphomas. *Am J Pathol.* 1999; 155: 247-255.

²⁴³ De Benedetti A, Graff JR. eIF-4E expression and its role in malignancies and metastases. *Oncogene.* 2004; 23:3189–99.

²⁴⁴ Hickey ED, Weber LA, Baglioni C, Kim CH, Sarma RH. A relation between inhibition of protein synthesis and conformation of 50-phosphorylated 7-methylguanosine derivatives. *J Mol Biol.* 1977; 109: 173–183.

-
- ²⁴⁵ Wagner CR, Iyer VV, McIntee EJ. Pronucleotides: Toward the in vivo delivery of antiviral and anticancer nucleotides. *Med Res Rev.* 2000; 20: 417–451.
- ²⁴⁶ Jemielity J, Kowalska J, Rydzik AM, Darzynkiewicz E. Synthetic mRNA cap analogs with a modified triphosphate bridge—Synthesis, applications and prospects. *New J Chem.* 2010; 34: 829–844.
- ²⁴⁷ Kentsis A, Topisirovic I, Culjkovic B, Shao L, Borden KL. Ribavirin suppresses eIF4E-mediated oncogenic transformation by physical mimicry of the 7-methyl guanosine mRNA cap. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004; 101:18105–10.
- ²⁴⁸ Assouline S, Culjkovic B, Cocolakis E, Rousseau C, Beslu N, Amri A, et al. Molecular targeting of the oncogene eIF4E in acute myeloid leukemia (AML): a proof-of-principle clinical trial with ribavirin. *Blood.* 2009; 114:257–60.
- ²⁴⁹ Moerke NJ, Aktas H, Chen H, Cantel S, Reibarkh MY, Fahmy A, et al. Small-molecule inhibition of the interaction between the translation initiation factors eIF4E and eIF4G. *Cell.* 2007; 128:257–67.
- ²⁵⁰ Fan S, Li Y, Yue P, Khuri FR, Sun SY. The eIF4E/eIF4G interaction inhibitor 4EGI-1 augments TRAIL-mediated apoptosis through c-FLIP down-regulation and DR5 induction independent of inhibition of cap-dependent protein translation. *Neoplasia.* 2010; 12: 346–356.
- ²⁵¹ Cencic R, Hall DR, Robert F, Du Y, Min J, Li L, Qui M, Lewis I, Kurtkaya S, Dingleline R, et al.. Reversing chemoresistance by small molecule inhibition of the translation initiation complex eIF4F. *Proc Natl Acad Sci.* 2011; 108: 1046–1051.
- ²⁵² Graff JR, Konicek BW, Vincent TM, Lynch RL, Monteith D, Weir SN, et al. Therapeutic suppression of translation initiation factor eIF4E expression reduces tumor growth without toxicity. *J Clin Invest.* 2007; 117:2638–48.

-
- ²⁵³ Hong DS, Kurzrock R, Oh Y, Wheler J, Naing A, Brail L, Callies S, André V, Kadam SK, Nasir A, Holzer TR, Meric-Bernstam F, Fishman M, Simon G. A phase 1 dose escalation, pharmacokinetic, and pharmacodynamic evaluation of eIF-4E antisense oligonucleotide LY2275796 in patients with advanced cancer. *Clin Cancer Res.* 2011; 17(20):6582-91.
- ²⁵⁴ King ML, Chiang C-C, Ling H-C, Fujita E, Ochiai M, McPhail AT. X-Ray Crystal Structure of Rocaglamide, a Novel Antileukemic 1H-Cyclopenta[b]benzofuran from *Aglaia elliptifolia*. *J Chem Soc Chem Commun.* 1982:1150.
- ²⁵⁵ Proksch P, Edrada RA, Ebel R, Bohnenstengel FI, Nugroho BW. Chemistry and Biological Activity of Rocaglamide Derivatives and Related Compounds in *Aglaia* species (Meliaceae). *Curr Org Chem.* 2001; 5:923.
- ²⁵⁶ Nugroho BW, Edrada RA, Wray V, Witte L, Bringmann G, Gehling M, Proksch P. An Insecticidal Rocaglamide Derivative and Related Compounds from *Aglaia odorata* (Meliaceae). *Phytochemistry.* 1999; 51:367.
- ²⁵⁷ Bacher M, Hofer O, Brader G, Vajrodaya S, Greger H. Thapsakins: Possible Biogenetic Intermediates towards Insecticidal Cyclopenta[b]benzofurans from *Aglaia edulis*. *Phytochemistry.* 1999; 52:253.
- ²⁵⁸ Brader G, Vajrodaya S, Greger H, Bacher M, Kalchhauser H, Hofer O. Bisamides, Lignans, Triterpenes, and Insecticidal Cyclopenta[b]benzofurans from *Aglaia* Species. *J Nat Prod.* 1998; 61:1482.
- ²⁵⁹ Greger H, Pacher T, Brem B, Bacher M, Hofer O. Insecticidal Flavaglines and Other Compounds from Fijian *Aglaia* Species. *Phytochemistry.* 2001; 57:57.
- ²⁶⁰ Hayashi N, Lee K-H, Hall IH, McPhail AT, Huang H-C. Structure and Stereochemistry of (-)- Odorinol, an Antileukemic Diamide from *Aglaia odorata*. *Phytochemistry.* 1982; 21:2371.

-
- ²⁶¹ Cui B, Chai H, Santisuk T, Reutrakul V, Farnsworth NR, Cordell GA, Pezzuto JM, Kinghorn AD. Novel Cytotoxic 1H-Cyclopenta[b]benzofuran Lignans from *Aglaia elliptica*. *Tetrahedron*. 1997; 53:17625.
- ²⁶² Zhu JY, Giaisi M, Köhler R, Müller WW, Mühleisen A, Proksch P, Krammer PH, Li-Weber M. Rocaglamide Sensitizes Leukemic T Cells to Activation-Induced Cell Death by Differential Regulation of CD95L and c-FLIP Expression. *Cell Death Differen.* 2009; 16:1289.
- ²⁶³ Saifah E, Suttisri R, Shamsub S, Pengsuparp T, Lipipum V. Bisamides from *Aglaia edulis*. *Phytochemistry*. 1999; 52:1085.
- ²⁶⁴ Engelmeier D, Hadacek F, Pacher T, Vajrodaya S, Greger H. Cyclopenta[b] benzofurans from *Aglaia* Species with Pronounced Antifungal Activity against Rice Blast Fungus (*Pyricularia grisea*). *J Agric Food Chem*. 2000; 48:1400.
- ²⁶⁵ Baumann B, Bohnenstengel F, Siegmund D, Wajant H, Weber C, Herr I, Debatin K-M, Proksch P, Wirth T. Rocaglamide Derivatives are Potent Inhibitors of NF- κ B Activation in T-Cells. *J Biol Chem*. 2002; 277:44791.
- ²⁶⁶ Proksch P, Giaisi M, Treiber MK, Palfi K, Merling A, Spring H, Krammer PH, Li-Weber M. Rocaglamide Derivatives are Immunosuppressive Phytochemicals that Target NF-AT Activity in T cells. *J Immunol*. 2005; 174:7075.
- ²⁶⁷ Kim S, Salim AA, Swanson SM, Kinghorn AD. Potential of Cyclopenta[b]benzofurans from *Aglaia* Species in Cancer Chemotherapy. *Anticancer Agents Med Chem*. 2006; 6:319.
- ²⁶⁸ Pointinger S, Promdang S, Vajrodaya S, Pannell CM, Hofer O, Mereiter K, Greger H. Silvaglins and Related 2,3-Secodammarane Derivatives – Unusual Types of Triterpenes from *Aglaia silvestris*. *Phytochemistry*. 2008; 69:2696.

-
- ²⁶⁹ Lee SK, Cui B, Mehta RR, Kinghorn AD, Pezzuto JM. Cytostatic Mechanism and Antitumor Potential of Novel 1H-Cyclopenta[b]benzofuran Lignans Isolated From *Aglaia elliptica*. *Chem Biol Interact*. 1998; 115:215.
- ²⁷⁰ Lucas DM, Edwards RB, Lozanski G, West DA, Shin JD, Vargo MA, et al. The novel plant-derived agent silvestrol has B-cell selective activity in chronic lymphocytic leukemia and acute lymphoblastic leukemia in vitro and in vivo. *Blood*. 2009;113:4656–66.
- ²⁷¹ Rodrigo CM, Cencic R, Roche SP, Pelletier J, Porco JA. Synthesis of rocaglamide hydroxamates and related compounds as eukaryotic translation inhibitors: synthetic and biological studies. *J Med Chem*. 2012; 55(1), 558-562.
- ²⁷² Hwang BY, Su BN, Chai H et al. Silvestrol and episilvestrol, potential anticancer rocaglate derivatives from *Aglaia silvestris*. *J Org Chem*. 2004; 69(10), 3350-3358.
- ²⁷³ Alachkar H, Santhanam R, Harb JG et al. Silvestrol exhibits significant in vivo and in vitro antileukemic activities and inhibits FLT3 and miR-155 expressions in acute myeloid leukemia. *J Hematol Oncol*. 2013; 6, 21.
- ²⁷⁴ Schatz JH, Oricchio E, Wolfe AL et al. Targeting cap-dependent translation blocks converging survival signals by AKT and PIM kinases in lymphoma. *J Exp Med*. 2011; 208(9), 1799-1807.
- ²⁷⁵ Alinari L, Prince CJ, Edwards RB et al. Dual Targeting of the Cyclin/Rb/E2F and Mitochondrial Pathways in Mantle Cell Lymphoma with the Translation Inhibitor Silvestrol. *Clin Cancer Res*. 2012; 18(17), 4600-4611.
- ²⁷⁶ Bordeleau ME, Robert F, Gerard B, Lindqvist L, Chen SM, Wendel HG, Brem B, Greger H, Lowe SW, Porco JA Jr, Pelletier J. Therapeutic Suppression of Translation Initiation Modulates Chemosensitivity in a Mouse Lymphoma Model. *J Clin Invest*. 2008; 8:2651.

-
- ²⁷⁷ Greger H, Hofer M, Teichmann K, Schinnerl J, Pannell CM, Vajrodaya S, Hofer O. Amide-Esters from *Aglaia tenuicaulis* – First Representatives of a Class of Compounds Structurally Related to Bisamides and Flavaglines. *Phytochemistry*. 2008; 69:928.
- ²⁷⁸ Chambers JM, Lindqvist LM, Webb A, Huang DC, Savage GP, Rizzacasa MA. Synthesis of biotinylated episilvestrol: highly selective targeting of the translation factors eIF4A/II. *Org Lett*. 2013;15(6):1406-9.
- ²⁷⁹ Cencic R, Carrier M, Galicia-Vazquez G, Bordeleau ME, Sukarieh R, Bourdeau A, Brem B, Teodoro JG, Greger H, Tremblay ML, Porco JA Jr, Pelletier J. Antitumor Activity and Mechanism of Action of the Cyclopenta[b]benzofuran, Silvestrol. *PLoS One*. 2009; 4:e5223.
- ²⁸⁰ Bleumink M, Kohler R, Giaisi M, Proksch P, Krammer PH, Li-Weber M. Rocaglamide Breaks TRAIL Resistance in HTLV-1-associated Adult T-cell Leukemia/Lymphoma by Translational Suppression of c-FLIP Expression. *Cell Death Differ*. 2011; 18:362.
- ²⁸¹ Wolfe AL, Singh K, Zhong Y, Drewe P, Rajasekhar VK, Sanghvi VR, Mavrakis KJ, Jiang M, Roderick JE, Van der Meulen J, Schatz JH, Rodrigo CM, Zhao C, Rondou P, de Stanchina E, Teruya-Feldstein J, Kelliher MA, Speleman F, Porco JA Jr, Pelletier J, Räsch G, Wendel HG. RNA G-quadruplexes cause eIF4A-dependent oncogene translation in cancer. *Nature*. 2014; 513(7516):65-70.
- ²⁸² Gupta SV, Sass EJ, Davis ME, Edwards RB, Lozanski G, Heerema NA, Lehman A, Zhang X, Jarjoura D, Byrd JC, Pan L, Chan KK, Kinghorn AD, Phelps MA, Grever MR, Lucas DM. Resistance to the translation initiation inhibitor silvestrol is mediated by ABCB1/P-glycoprotein overexpression in acute lymphoblastic leukemia cells. *AAPS J*. 2011;13(3):357-64.
- ²⁸³ Northcote PT, Blunt JW, Munro MHG. Pateamine: a potent cytotoxin from the New Zealand marine sponge, *Mycale* sp. *Tetrahedron Lett*. 1991;32:6411–4.

²⁸⁴Bordeleau ME, Cencic R, Lindqvist L, Oberer M, Northcote P, Wagner G, et al. RNA-mediated sequestration of the RNA helicase eIF4A by Pateamine A inhibits translation initiation. *Chem Biol.* 2006; 13: 1287–95.

²⁸⁵Kuznetsov G, Xu Q, Rudolph-Owen L, Tendyke K, Liu J, Towle M, et al. Potent in vitro and in vivo anticancer activities of des-methyl, des-amino pateamine A, a synthetic analogue of marine natural product pateamine A. *Mol Cancer Ther.* 2009; 8:1250–60.

²⁸⁶ Bordeleau ME, Mori A, Oberer M, Lindqvist L, Chard LS, Higa T, et al. Functional characterization of IRESes by an inhibitor of the RNA helicase eIF4A. *Nat Chem Biol.* 2006; 2:213–20.

²⁸⁷Tsumuraya T, Ishikawa C, Machijima Y, Nakachi S, Senba M, Tanaka J, et al. Effects of hippuristanol, an inhibitor of eIF4A, on adult T-cell leukemia. *Biochem Pharmacol.* 2011; 81:713–22.

²⁸⁸ Pyronnet S, Imataka H, Gingras AC, Fukunaga R, Hunter T, Sonenberg N. Human eukaryotic translation initiation factor 4G (eIF4G) recruits mnk1 to phosphorylate eIF4E. *EMBO J.* 1999; 18: 270–279.

²⁸⁹ Buxade M, Parra-Palau JL, Proud CG. The Mnks: MAP kinase-interacting kinases (MAP kinase signal-integrating kinases). *Front Biosci.* 2008 ; 13: 5359–5373.

²⁹⁰ Ueda T, Watanabe-Fukunaga R, Fukuyama H, Nagata S, Fukunaga R. Mnk2 and Mnk1 are essential for constitutive and inducible phosphorylation of eukaryotic initiation factor 4E but not for cell growth or development. *Mol Cell Biol.* 2004; 24: 6539–6549.

²⁹¹ Topisirovic I, Ruiz-Gutierrez M, Borden KL. Phosphorylation of the eukaryotic translation initiation factor eIF4E contributes to its transformation and mRNA transport activities. *Cancer Res.* 2004; 64: 8639–8642.

²⁹² Furic L, Rong L, Larsson O, Koumakpayi IH, Yoshida K, Brueschke A, Petroulakis E, Robichaud N, Pollak M, Gaboury LA, et al. eIF4E phosphorylation promotes tumorigenesis

and is associated with prostate cancer progression. *Proc Natl Acad Sci.* 2010; 107: 14134–14139.

²⁹³ Wendel HG, Silva RL, Malina A, Mills JR, Zhu H, Ueda T, Watanabe-Fukunaga R, Fukunaga R, Teruya-Feldstein J, Pelletier J, et al. Dissecting eIF4E action in tumorigenesis. *Genes Dev.* 2007; 21: 3232–3237.

²⁹⁴ Konicek BW, Stephens JR, McNulty AM, Robichaud N, Peery RB, Dumstorf CA, Dowless MS, Iversen P, Parsons SH, Ellis KE, et al. Therapeutic inhibition of MAP kinase interacting kinase blocks eukaryotic initiation factor 4E phosphorylation and suppresses outgrowth of experimental lung metastases. *Cancer Res.* 2011; 71: 1849–1857.

²⁹⁵ Shi XP, Yin KC, Ahern J, Davis LJ, Stern AM, Waxman L. Effects of N1- guanyl-1,7-diaminoheptane, an inhibitor of deoxyhypusine synthase, on the growth of tumorigenic cell lines in culture. *Biochim Biophys Acta.* 1996; 1310:119–26.

²⁹⁶ Clement PM, Hanauske-Abel HM, Wolff EC, Kleinman HK, Park MH. The antifungal drug ciclopirox inhibits deoxyhypusine and proline hydroxylation, endothelial cell growth and angiogenesis in vitro. *Int J Cancer.* 2002; 100:491–8.

²⁹⁷ Zhou H, Shen T, Luo Y, Liu L, Chen W, Xu B, et al. The antitumor activity of the fungicide ciclopirox. *Int J Cancer.* 2010; 127:2467–77.

²⁹⁸ Jasiulionis MG, Luchessi AD, Moreira AG, Souza PP, Suenaga AP, Correa M, et al. Inhibition of eukaryotic translation initiation factor 5A (eIF5A) hypusination impairs melanoma growth. *Cell Biochem Funct.* 2007; 25:109–14.

²⁹⁹ Eberhard Y, McDermott SP, Wang X, Gronda M, Venugopal A, Wood TE, et al. Chelation of intracellular iron with the antifungal agent ciclopirox olamine induces cell death in leukemia and myeloma cells. *Blood.* 2009; 114:3064–73.

-
- ³⁰⁰ Ingolia NT, Ghaemmaghami S, Newman JR, Weissman JS. Genome-wide analysis in vivo of translation with nucleotide resolution using ribosome profiling. *Science*. 2009; 324(5924):218-23.
- ³⁰¹ Harwood AR, Cummings BJ. Radiotherapy for malignant melanoma: a re-appraisal. *Cancer Treat Rev*. 1981; 8(4):271-82.
- ³⁰² Badura M, Braunstein S, Zavadil J, Schneider RJ. DNA damage and eIF4G1 in breast cancer cells reprogram translation for survival and DNA repair mRNAs. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012; 109(46):18767-72.
- ³⁰³ Holderfield M, Lorenzana E, Weisburd B, Lomovasky L, Boussemart L, Lacroix L, Tomasic G, Favre M, Vagner S, Robert C, Ghodducci M, Daniel D, Pryer N, McCormick F, Stuart D. Vemurafenib cooperates with HPV to promote initiation of cutaneous tumors. *Cancer Res*. 2014; 74(8):2238-45.
- ³⁰⁴ Ganzenmueller T, Hage E, Yakushko Y, Kluba J, Woltemate S, Schacht V, Schulz TF, Gutzmer R. No human virus sequences detected by next-generation sequencing in benign verrucous skin tumors occurring in BRAF-inhibitor-treated patients. *Exp Dermatol*. 2013; 22(11):725-9.
- ³⁰⁵ Anforth RM, Blumetti TC, Kefford RF, Sharma R, Scolyer RA, Kossard S, Long GV, Fernandez-Peñas P. Cutaneous manifestations of dabrafenib (GSK2118436): a selective inhibitor of mutant BRAF in patients with metastatic melanoma. *Br J Dermatol*. 2012; 167(5):1153-60.
- ³⁰⁶ Davies H, Bignell GR, Cox C, et al. Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature*. 2002; 417(6892):949-54.
- ³⁰⁷ Chapman PB, Hauschild A, Robert C, et al. Improved Survival with Vemurafenib in Melanoma with BRAF V600E Mutation. *N Engl J Med*. 2011; 364(26):2507-16.

-
- ³⁰⁸ McArthur GA, Chapman PB, Robert C, et al. Safety and efficacy of vemurafenib in BRAF(V600E) and BRAF(V600K) mutation-positive melanoma (BRIM-3): extended follow-up of a phase 3, randomised, open-label study. *Lancet Oncol.* 2014; 15(3):323-32.
- ³⁰⁹ Boussemart L, Routier E, Mateus C, et al. Prospective study of cutaneous side-effects associated with the BRAF inhibitor vemurafenib: a study of 42 patients. *Ann Oncol.* 2013; 24(6):1691-7.
- ³¹⁰ Autier J, Escudier B, Wechsler J, et al. Prospective study of the cutaneous adverse effects of sorafenib, a novel multikinase inhibitor. *Arch Dermatol.* 2008; 144(7):886-92.
- ³¹¹ Wan PT, Garnett MJ, Roe SM, et al. Mechanism of activation of the RAF-ERK signaling pathway by oncogenic mutations of B-RAF. *Cell.* 2004; 116(6):855-867.
- ³¹² Arnault JP, Wechsler J, Escudier B, et al. Keratoacanthomas and squamous cell carcinomas in patients receiving sorafenib. *J Clin Oncol.* 2009; 27(23):e59-61.
- ³¹³ Arnault JP, Mateus C, Escudier B, et al. Skin tumors induced by sorafenib; paradoxical RAS-RAF pathway activation and oncogenic mutations of HRAS, TP53, and TGFBR1. *Clin Cancer Res.* 2012; 18(1):263-72.
- ³¹⁴ Cox AD, Der CJ. The raf inhibitor paradox: unexpected consequences of targeted drugs. *Cancer Cell.* 2010; 17(3):221-3.
- ³¹⁵ Hatzivassiliou G, Song K, Yen I, et al. RAF inhibitors prime wild-type RAF to activate the MAPK pathway and enhance growth. *Nature.* 2010; 464(7287):431-5.
- ³¹⁶ Halaban R, Zhang W, Bacchiocchi A, et al. PLX4032, a selective BRAF(V600E) kinase inhibitor, activates the ERK pathway and enhances cell migration and proliferation of BRAF melanoma cells. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2010; 23(2):190-200.
- ³¹⁷ Su F, Viros A, Milagre C, et al. RAS mutations in cutaneous squamous-cell carcinomas in patients treated with BRAF inhibitors. *N Engl J Med.* 2012; 366(3):207-15.

-
- ³¹⁸ Oberholzer PA, Kee D, Dziunycz P, et al. RAS mutations are associated with the development of cutaneous squamous cell tumors in patients treated with RAF inhibitors. *J Clin Oncol.* 2012; 30(3):316-21.
- ³¹⁹ Callahan MK, Rampal R, Harding JJ, et al. Progression of RAS-mutant leukemia during RAF inhibitor treatment. *N Engl J Med.* 2012; 367(24):2316-21.
- ³²⁰ Dalle S, Poulalhon N, Debarbieux S, et al. Second primary melanomas on treatment with vemurafenib. *Br J Dermatol.* 2013; 168(4):887-8.
- ³²¹ Smalley KS, Lioni M, Dalla Palma M, et al. Increased cyclin D1 expression can mediate BRAF inhibitor resistance in BRAF V600E-mutated melanomas. *Mol Cancer Ther.* 2008; 7(9):2876-83.
- ³²² Ingordo V, Gentile C, Iannazzone SS, Cusano F, Naldi L. Congenital melanocytic nevus: an epidemiologic study in Italy. *Dermatology.* 2007; 214(3):227-30.
- ³²³ Le K, Blomain E, Rodeck U and Aplin AE. Selective RAF inhibitor impairs ERK1/2 phosphorylation and growth in mutant NRAS, vemurafenib-resistant melanoma cells. *Pigment Cell Melanoma Res. Pigment Cell Melanoma Res.* 2013; 26(4):509-17.
- ³²⁴ Flaherty KT, Robert C, Hersey P, et al; METRIC Study Group. Improved survival with MEK inhibition in BRAF-mutated melanoma. *N Engl J Med.* 2012; 367(2):107-14.
- ³²⁵ Falchook GS, Lewis KD, Infante JR, et al. Activity of the oral MEK inhibitor trametinib in patients with advanced melanoma: a phase 1 dose-escalation trial. *Lancet Oncol.* 2012; 13(8):782-9.
- ³²⁶ Andrews MC, Behren A, Chionh F, et al. BRAF inhibitor-driven tumor proliferation in a KRAS-mutated colon carcinoma is not overcome by MEK1/2 inhibition. *J Clin Oncol.* 2013; 31(35):e448-51.

³²⁷ Le K, Blomain E, Rodeck U and Aplin AE. Selective RAF inhibitor impairs ERK1/2 phosphorylation and growth in mutant NRAS, vemurafenib-resistant melanoma cells. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2013; 26(4):509-17.

³²⁸ Basile KJ, Le K, Hartsough EJ, Aplin AE. Inhibition of mutant BRAF splice variant signaling by next-generation, selective RAF inhibitors. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2014; 27(3):479-84.

³²⁹ Brockman RW. Mechanisms of resistance to anticancer agents. *Adv Cancer Res.* 1963; 7:129-234.