



HAL
open science

Étude de l'implication de la protéine matricellaire SPARC et des fibroblastes du microenvironnement lymphatique dans la résistance thérapeutique des mélanomes

Anaïs Pottier

► **To cite this version:**

Anaïs Pottier. Étude de l'implication de la protéine matricellaire SPARC et des fibroblastes du microenvironnement lymphatique dans la résistance thérapeutique des mélanomes. Sciences agricoles. Université Nice Sophia Antipolis, 2015. Français. NNT : 2015NICE4051 . tel-01673808

HAL Id: tel-01673808

<https://theses.hal.science/tel-01673808>

Submitted on 1 Jan 2018

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.

Université Nice Sophia Antipolis,
Faculté des Sciences

Ecole doctorale des Sciences de la Vie et de la Santé (ED n°85)

THESE DE DOCTORAT

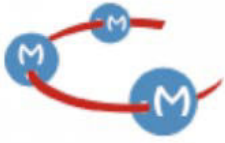
Présentée par Anaïs POTTIER

Pour l'obtention du titre de
Docteur en Sciences de la Vie et de la Santé
Spécialité : Interactions moléculaires et cellulaires

**Etude de l'implication de la protéine matricellulaire SPARC
et des fibroblastes du microenvironnement lymphatique
dans la résistance thérapeutique des mélanomes.**

Thèse soutenue le 8 Septembre 2015, à Nice, devant le jury composé de :

Dr Robert BALLOTTI	Président
Dr Nathalie ANDRIEU-ABADIE	Rapporteur
Dr Nicolas DUMAZ	Rapporteur
Dr Fatima MECHTA-GRIGORIOU	Examineur
Dr Sophie TARTARE-DECKERT	Directeur de thèse



Les travaux de thèse présentés dans ce manuscrit ont été réalisés sous le tutorat scientifique du Docteur Sophie Tartare-Deckert, au sein de l'équipe « Microenvironnement, Signalisation et Cancer », dans l'unité INSERM U1065 dirigée par le Docteur Patrick Auberger, Centre Méditerranéen de Médecine Moléculaire (C3M).

Au cours de mes trois années de thèse, mes recherches ont été financées par une allocation du Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche.



Remerciements

Je remercie les membres de mon jury de thèse pour avoir accepté d'évaluer avec attention mon manuscrit de thèse :

Le **Docteur Nathalie ANDRIEU-ABADIE** et le **Docteur Nicolas DUMAZ** en tant que rapporteurs, le **Docteur Fatima MECHTA-GRIGORIOU** en tant qu'examinatrice, le **Docteur Robert BALLOTTI** en tant que président du jury, et le Docteur **Sophie TARTARE-DECKERT** en tant que directrice de thèse. Merci à chacun d'entre eux pour l'attention qu'ils ont portée à mes travaux de recherche.

Sophie, « la sagesse », cela te va si bien, et quel exemple de réussite tu fais dans le monde de la recherche parmi tous ces hommes ! Je suis admirative. Bien évidemment je te remercie de m'avoir accueillie et guidée durant trois années dans ton équipe, mais je te remercie également pour bien d'autres choses encore :

Merci pour ton enthousiasme, ta passion de la biologie et ton positivisme communicatifs qui m'ont « boostée » ces trois années de thèse. Merci d'avoir été disponible, attentive, encourageante, et re-motivante lorsque j'en ai eu besoin (bug de WB, changement de cellules au bout d'un an de thèse...etc). Malgré tes multiples tâches de directeur de recherche tu as toujours été là pour moi.

Je veux aussi te remercier pour ton écoute, ton soutien et tes encouragements dans ma vie personnelle. Tu m'as félicitée lorsque je t'annonçais que j'attendais, non pas un, mais deux bébés ! Tu m'as encouragée et rassurée sur l'avancement du projet, toujours positive.

J'ai eu bien de la chance de t'avoir comme directrice de thèse à ce moment là encore...

Tu as désormais une belle équipe de recherche et de beaux projets de recherche pour les futures années à venir. Je te souhaite plein de réussite avec la « team 11 », et beaucoup de bonheur avec tes deux hommes. MERCI pour tout !

Marcel, le « fou de la science » ! Tu escalades les falaises périlleuses de la biologie avec une passion impressionnante. Merci pour l'intérêt que tu as porté à mes travaux de recherche durant ces trois ans, et merci pour tous les petits conseils que tu m'as donnés (datas, expérimentations..etc).

Christophe, alias « Mister Girard », quelle chance de t'avoir rencontré durant mon doctorat et quelle belle rencontre. Ton enthousiasme et ta bonne humeur lors de ton arrivée dans l'équipe m'ont beaucoup aidée lors de mon retour de congé maternité. Je tiens à te remercier particulièrement pour ta gentillesse, et ton soutien. Toujours à l'écoute, plein de bons conseils et d'idées de manips, et toujours prêt à m'aider. Toi aussi tu es un chercheur passionné par ce que tu fais et c'est tellement appréciable pour les jeunes doctorants ! Je suis admirative : toujours à fond, organisé, motivé, motivant, appliqué (sauf pour le WB bien sûre... ahah, j'étais obligée...), et sérieux même avec de jeunes doctorantes/master

dissipées... (la frisée, la rousse et la brune!!!). Je te souhaite beaucoup de réussite pour la suite, et surtout plein de bonnes choses avec tes deux jolies « girls » Nadège et Elsa. Promis, je reviendrai manger et papoter avec toi et les autres au self l'année prochaine ! Encore MERCI Girard!

Virginie, je te félicite encore pour l'obtention de ton poste de chercheur ! Avec de la persévérance à en revendre, un boulot en continue, et tes jolis loulous tu y es arrivée.

Tu n'imagines pas comme je suis fan de toi et ta « zen attitude »! Je te remercie pour ta gentillesse et ton aide précieuse pour l'expérimentation. Merci aussi pour tous les moments de partage que nous avons pu avoir sur « la vie » de manière générale et en particulier sur nos loulous respectifs. Je te souhaite tout le bonheur du monde dans ta nouvelle maison avec Eric et tes petits bouts, et une carrière scientifique à venir épanouissante. A bientôt au Bois des Lutins !

Je continue avec la suite de l'équipe 11 :

Moez je te mets 10 sur 10 pour ta gentillesse, ta générosité et tes petites blagues et sarcasmes bien dosés qui m'ont beaucoup fait rire. Merci !

Je te souhaite plein de bonnes choses pour la suite avec ta jolie Marocaine. Et n'oublie pas : pas plus de 4 WB à la fois, sinon, ça ne marche pas !

Rania, merci pour ta gentillesse et les parties de rigolades (« oh punaise ! ») que l'on a pu avoir ensemble avec les autres : ça nous a fait tellement de bien. Je te souhaite bonne chance pour la fin de ta thèse.

Emilien, durant ces trois ans je t'ai toujours vu de bonne humeur, comment fais-tu ?! Merci pour ça, et pour les nombreuses discussions que l'on a pu avoir en salle de culture sur tout et n'importe quoi. Au fait, je ne suis plus en course donc, c'est officiel: tu détiens le record des plus petites membranes de WB ! Chapeau ! Enfin, tu es le prochain sur la liste de soutenance de thèse dans l'équipe, alors je te dis bon courage et te souhaite bonne chance pour la suite.

Aude, voisine de bureau pour les pauses « rugby » et « musique ». Merci pour ton aide pour les RT-qPCR, et pour tes conseils de préparations de solutions. Bonne continuation à toi.

Ilona, on ne se sera pas croisées très longtemps durant ton master, mais j'ai beaucoup apprécié travailler avec toi. Merci pour ton enthousiasme, et ta rigueur expérimentale et, bien sur, pour ta gentillesse. Je te souhaite bonne chance pour la suite.

Enfin, merci à ceux que j'ai croisés ou côtoyés au laboratoire et qui ont également participé chacun à leur façon à l'avancement de ma thèse: **Nina**, merci pour m'avoir transmis l'envie de continuer en thèse avec Sophie et SPARC, et pour m'avoir appris les bases de l'expérimentation en culture cellulaire en 1 semaine avec une pédagogie impressionnante !

Nicholas, je te souhaite plein de bonheur avec Lucie et bonne chance pour la suite de tes études. **Mélanie**, jeune post-doctorante, bonne chance pour la suite au pays du fromage et

du chocolat. **Zied**, merci pour ta joie de vivre et tes blagues qui nous ont beaucoup fait rire au labo, bonne continuation.

Fériel, tu ne croyais quand même pas que j'allais t'oublier?! Durant ton master « médecine » dans notre équipe tu as été mon rayon de soleil au labo, toujours souriante et drôle, quoi qu'il arrive. Merci de t'être autant investie dans le projet « fibroblastes » et « SPARC clinique » malgré tes nombreuses occupations dans le service de dermatologie de l'hôpital ou au cabinet. Toujours prête à re-lancer les manips à n'importe quelle heure, n'importe quel jour. Encore une belle rencontre que j'ai faite durant ma thèse. Ta gaieté, ta bonne humeur, ta générosité n'ont d'égal que ton talent. Une belle carrière t'attend ! Je te souhaite plein de réussite et de bonheur. MERCI FIFI !

Je tiens à remercier encore une fois **Robert Ballotti** qui m'a accueillie dans son laboratoire durant mon stage de master 2, ainsi que les membres de son équipe qui m'ont aidée d'un point de vu expérimental : **Patricia, Karine, et Maryline**.

Je remercie également tous les gens (en espérant en oublier le moins possible...) que j'ai croisés durant ces 3 années au C3M dans les couloirs, au coin café, ou dans les laboratoires pour des manips : **Elodie, Clémence, Barbara, Maeva, Alix, Lilia, Gilbert, Patrick, Arnaud, Guillaume, Fred (c3m), Pascal, Diogo, Fred (archet 1), Grégory, Emilie, Zoulika, Nadia, Jean, Marie...**

Sans oublier les membres des services communs du C3M (gestion (Merci Marie !), laverie, animalerie) sans qui la vie au C3M serait difficile.

Je n'oublie pas de remercier **Joëlle Chabry** qui m'a accueillie dans son équipe de recherche pour mon premier stage en laboratoire de Master 1. Merci Joëlle de m'avoir initiée à l'expérimentation en biologie avec tant de passion et d'enthousiasme, et de m'avoir permis de rapidement prendre de l'autonomie. Merci pour ton pep's inégalable ! J'ai eu de la chance de réaliser ce premier stage avec toi, Nicole, et Sarah dans la bonne humeur et la bonne ambiance. Enfin, je te remercie pour ton soutien, tes encouragements, et pour nos petites discussions post-master 1 qui m'ont souvent bien remonté le moral. Je te souhaite plein de bonheur avec tes trois mecs !

Merci aussi à **Nicole Zsurger** pour sa gentillesse, sa bonne humeur, et pour m'avoir si bien aidé pour mon mémoire de master 1.

Je voudrais ensuite remercier mes amis intra- et extra-C3M :

Nedra ma « coupine » et **Amine** mon « coupain » ! Sur les mêmes bancs de la fac sans jamais se parler ! Puis une première rencontre au c3m, et là... c'est parti ! Pause café, soirée, et tant qu'à faire mariages ! Vous êtes devenus de précieux amis avec qui nous avons (Toni et moi) partagé tant de bons et mémorables moments. Je vous remercie pour votre générosité incroyable, votre gentillesse inestimable et vos sourires que j'aime tellement. Je suis trop contente d'avoir vécu (ou survécu par moments...) ce doctorat intra-c3m avec vous. Je vous souhaite à tous les deux beaucoup de réussite dans vos projets professionnels et personnels à venir, et énormément de bonheur. « Aïchak » !!!

Anouar, mon ami ! Le premier de notre petit groupe de copains à soutenir sa thèse. Encore bravo ! Avec toi, comme avec Nedra et Amine, une belle amitié s'est installée et nous avons partagé tellement d'événements. Membre de la clique master IPMC 2009-2010 avec moi, qu'est-ce que tu as pu me faire rire...Merci ! Merci pour ta « cool attitude », ta sympathie et ta bonne humeur. « Aïchak » !!!

Sandrine, ma copine rigolote du module 1 ! Merci pour ces moments de « râlage » à propos des manips, des gens et autres ! Bonne chance à toi et ton homme pour la suite peut-être au bout du monde, qui sait ?!

Merci à tous mes amis Grassois et autres (Sab et Lilian, Emilie et Joce, Célia et Eliot, Camille et Malki, Jeanne, Laura ...etc) pour les moments de détente, indispensables, passés à vos côtés. Et puis un merci à ma super Marion qui depuis l'Australie est toujours là pour me soutenir et m'encourager.

Enfin, je tiens à remercier **ma famille (trop grande pour citer tout le monde...)** et **belle famille**, pour leur intérêt, leur soutien et leurs encouragements :

Merci à mes grand parents **Albine** et **Claude** pour s'être toujours intéressés à mes études en lisant mes mémoires de master, en me découpant les articles scientifiques dans le journal (mémé) ou encore en vous souciant de l'avancement de mon manuscrit de thèse, et merci pour vos encouragements. Plus largement, merci d'être des grands-parents géniaux, et quelle chance que Cléo et Matteo puissent en profiter !

Merci à ma grande sœur, **Héloïse**, dont j'ai toujours été admirative, en particulier le jour de sa soutenance de thèse de médecine : Hélo, tu n'imagines pas comme j'étais fière et impressionnée! Merci de m'avoir « cocooné » durant nos deux années de co-location à Nice alors même que tu préparais l'internat de médecine, que tu as réussi avec brio... Toujours à te soucier des autres avec tes milles occupations professionnelles et personnelles ! Merci de m'avoir toujours soutenue, plus particulièrement suite à l'arrivée des jumeaux. Je suis tellement heureuse et fière de notre proximité dans la vie quotidienne et familiale. Quelle chance !!!

Merci aussi à **Alphonse**, **Roxane** et **Pauline** pour les moments de détente que j'aime tant, en famille autour d'une grenadine ou menthe à l'eau tous les samedis matin sur la place aux Aires!

Merci à mon petit frère **Nico** ! Merci de m'avoir toujours faite rire quant tu me demandais, il y a encore 1 an à peine, ce que je faisais « en bio ». Avec toi et ton insouciance, j'ai pu avoir ces moments de répit où l'on ne pense plus au boulot et ce n'était pas de trop ! Merci d'être si cool et si gentil, en particulier avec tes neveux et nièces qui t'adorent ! Du haut de tes 1m80 tu es toujours mon petit boubou. Ne changes pas, t'es au top !

Merci à **mes parents**. Il m'est difficile de trouver les mots pour vous exprimer ma reconnaissance. Vous avez toujours été là pour nous trois, Nicolas, Héloïse et moi. Attentifs, généreux, gentils, affectueux, encourageants, admiratifs... Vous m'avez sans cesse poussée et soutenue dans tous mes projets personnels et professionnels, comme ces trois dernières années dans l'avancement de mon travail de thèse et plus particulièrement cette année

alors que je vous annonçais que je changerai de voie après le doctorat. Bref, sans vous je ne serais sûrement pas ce que je suis aujourd'hui. **Papa**, merci pour tes « ce qui m'importe c'est que tu sois heureuse » et pour m'avoir toujours persuadée que j'arriverai à ce que je voudrais ! **Maman**, merci pour ton incroyable capacité à me reconforter et à me soutenir, et merci « Didi » pour ta présence avec « Patéto et Kélo », qui m'a été d'une aide précieuse surtout cette dernière année !

Vous êtes des parents (et grands-parents « CocoDidi ») en or, sachez le !

Le meilleur pour la fin :

Toni, ton soutien infaillible, le meilleur qui soit pour moi, et ton incroyable faculté à me remotiver dans les moments de doute les plus difficiles, m'ont permis d'aller jusqu'au bout de ce doctorat, auquel tu t'es toujours intéressé voire même auquel tu as contribué (réalisation de ce « fichu » sommaire!). Tu es toujours, toujours là pour moi, quoi qu'il arrive, malgré ton boulot et la fatigue accumulée depuis ces deux ans et ça c'est juste énorme. J'admire depuis toujours ton positivisme, ton dynamisme et ton assurance rassurante ! Tu me donnes tout ce dont j'ai besoin depuis le premier jour de notre rencontre. Bref, pour tout ça, je n'ai qu'une chose à te dire : MERCI !!!

Et je n'oublie pas de préciser que c'est avec toi que j'ai réalisé durant mon doctorat la plus belle expérience de biologie (unique, non reproductible mais en « duplicate »!) :

« **Cléo et Matteo** ».

Sans vous trois, j'aurais eu beaucoup de mal à terminer ce doctorat ! Vous n'imaginez pas le bonheur et la motivation que vous m'apportez, et la chance que j'ai de vous avoir tous les jours à mes côtés. Je vous aime.

LISTE DES ABREVIATIONS

ABL	Abelson Leukemia Oncogen Cellular Homolog
ACTH	Adeno CorticoTrophic Hormone
AND	Acide DesoxiriboNucleique
AKT	AKT8 virus oncogene cellular homolog
ALK	Anaplastic lymphoma kinase
AMPC	3', 5' Adénosine Mono-Phosphate cyclique
AMPK	AMP-activated Protein Kinase
ARF	Alternative Reading Frame
ARNm	Acide Ribonucléique messenger
ATM	Ataxia Telangiectasia-Mutated
ATP	Adénosine Triphosphate
ATR	Ataxia Telangiectasia and RAD3-related
BAD	Bcl-2-associated Agonist of the cell Death
BAX	Bcl-2-associated X protein
BCL2	B-Cell Leukemia/Lymphoma 2
BCL-XL	B-cell lymphoma-extra large
BCR	B Cell Receptor
bFGF	basic Fibroblast Growth Factor
BMP	Bone Morphogenic Protein
CAFs	Cancer Associated Fibroblasts
CAM-DR	Cell Adhesion-Mediated Drug Resistance
Caspase	CysteinyI aspartate-specific proteinase
CCL19/21	Chemokine (C-C motif) Ligand 19 / 21
CCN	Cellules de la Crête Neurale
CCND1	Cyclin D1 gene
CCR7	chemokine (C-C motif) Receptor 7
Cdc25	Cell division cycle 25
CDK	Cyclin-Dependant Kinase
CDKN2A	Cyclin-Dependant Kinase Inhibitor 2A
Chk	Chekpoin Kinase
c-MET(HGFR)	Hepatocyte growth factor receptor
c-MYC	v-myc avian myelocytomatosis viral oncogene homolog
CREB	cAMP Responsive Element Binding protein
CSCs	Cellules Souches Cancéreuses
CSD	Chronic Sun Damage
CTCs	Circulating Tumor Cells
CTLA-4	Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4
CTNNB1	Catenin beta 1
CXCL12/ SDF-1	Chemokine (C-X-C motif) Ligand 12/ Stromal cell-Derived Factor-1
CXCR4	chemokine (C-X-C motif) Receptor 4
DUSP	Dual-specificity phosphatase
E2F	Transcription Factor E2
EGF(R)	Epidermal Growth Factor (Receptor)
EMDR	Environment-Mediated Drug Resistance

EMT	Epithelial to Mesenchymal Transition
ERK	Extracellular-signal Regulated Kinase
EZH2	Enhancer of zeste homolog 2
FAK	Focal Adhesion Kinase
FAP	Fibroblast Activation Protein
FGF(R)	Fibroblast Growth Factor (Receptor)
FOXO	Forkhead box O
FRC	Fibroblastic Reticular Cell
GADD45	Growth Arrest and DNA Damage
GDP	Guanosine DiPhosphate
GEF	Guanine-nucleotide Exchange Factor
GNA11	Guanine nucleotide-binding protein subunit alpha-11
GNAQ	Guanine nucleotide-binding protein G
GPCR	G protein-coupled receptor
GRM3	Glutamate Receptor, Metabotropic 3
Grb2	Growth factor receptor-bound protein 2
GSK3β	Glycogen Synthetase Kinase 3 β
GTP	Guanosine triphosphate
HGF	Hepatocyte Growth Factor
HIF	Hypoxia Inductible Factor
IARC	International Agency for Research on Cancer
IFN	Interféron
IGF-1(R)	Insulin-like Growth Factor-1 (Receptor)
IL	Interleukine
ILK	Integrin-Linked Kinase
INK4a	Inhibitor of Kinase a
INCa	Institut National du Cancer
Jun	Janus kinase
JNK	cJUN NH2-terminal Kinase
KDa	KiloDalton
LIF	leukemia inhibitory factor
LMC	Leucémie Myéloïde Chronique
MAF	Melanoma-Associated Fibroblast
MAPK	Mitogen Activated Protein Kinase
MAP3K8	Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 8
Mcl-1	Myeloid cell leukemia-1
MC1-R	Melanocortin receptor 1
MCP-1/CCL2	Monocyte Chemotactic Protein 1/ Chemokine (C-C motif) Ligand 2
MDM2 / 4	Mouse Double Minute 2 / 4
MEC	Matrice ExtraCellulaire
MEK	Mitogen-activate/Extracellular signal-regulated protein Kinase
MET	Mesenchymal to Epithelial Transition
MHC	Major Histocompatibility Complex

MITF	Microphthalmia associated Transcription Factor
MLC	Myosin Light Chain
MMP	Matrix MetalloProteinases
mTOR	mammalian Target Of Rapamycin
αMSH	Melanocyte Stimulating Hormone alpha
NFκB	Nuclear Factor Kappa B
NSCLC	Non-Small-Cell Lung Carcinoma
NTRK1	Neurotrophic Tyrosine Kinase Receptor-1
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
OIS	Oncogene Induced Senescence
OPN	Ostéopontine
p70 S6K	70 KDa Ribosomal protein S6 kinase
p90 RSK/p90S6K	90 KDa Ribosomal protein S6 kinase
PARP	Poly(ADP-ribose) polymerase
PAX6	Paired box domain 6
PD-1	Program Death 1
PD-L1	Program Death Ligan 1
PDGF(R)	Platelet-Derived Growth Factor (Receptor)
PDK1	Phosphoinositide-Dependent Kinase 1
PET	Positron Emission Tomography
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PIP2	Phosphatidylinositol 3,4 diphosphate
PIP3	Phosphatidylinositol 3,4,5 triphosphate
PKA	Protéine Kinase A
PKC	Protéine Kinase C
pRb	protein du rétinoblastome
PTEN	Phosphatase and TENSine homologue
PUMA	p53 Upregulated Modulator of Apoptosis
RAC1	RAs-related C3 botulinum toxin substrate 1
RAF	Rapidly growing Fibrosarcomas
H-RAS	Harvey RAS
K-RAS	Kirsten RAS
N-RAS	neuroblastoma RAS
RGD	Arginine, Glycine, Aspartate
RGP	Radial Growth Phase
Rheb	Ras homolog enriched in brain
RHO	Ras Homolog
ROCK	Rho-associated protein Kinase
ROS	Reactive Oxygen Species
RTK	Récepteur à activité Tyrosine Kinase
RT-PCR	Reverse Transcriptase-polymerase chain reaction
S1P	Sphingosine-1-Phosphate
SCF	Stem Cell Factor
SCID	Severe Combined Immuno Deficiency
SFM-DR	Soluble Factor-Mediated Drug Resistance
shRNA	short hairpin RNA

siRNA	small interfering RNA
SMAD	Small Mothers against Decapentaplegic
Sos	son if sevenless
SP1	Stimulating Protein 1
SPARC	Secreted Protein Acidic and Rich in Cysteine
SPRY	Sprouty
STAT	Signal Transducer and Activator of Transription
SRC	Rous Sarcoma oncogene cellular homolog
α-SMA	alpha Smooth Muscle Actin
TCR	T-Cell Receptor
TEM	Transition Epithélio-Mésenchymateuse
TERT	Telomerase Reverse Transcriptase
TGFβ	Transforming Growth Factor β
TME	Transition Mésenchymo-épithéliale
TN	Ténascine
TNFα	Tumor Necrosis Factor α
TNM	Tumeurs, Nodules, Métastases
TORC2	Transducer Of Regulated CREB protein 2
TSC1/2	Tuberous SCLerosis 1/2
TSP	Thrombospondin
Ub	Ubiquitine
UVs	Ultra-Violets
VCAM-1	Vascular Cell Adhesion molecule-1
VEGF(R)	Vascular Endothelium Growth Factor (Receptor)
VGP	Vertical Growth Phase
Wnt	Wingless
ZEB1/2	Zinc finger E-box-binding homeobox-1/2
ZO	Zonula Adherens

TABLE DES ILLUSTRATIONS

- Tableau 1.** Les différents phototypes cutanés
- Tableau 2.** Facteurs de risque du Mélanome, et comportement à adopter en conséquence.
- Tableau 3.** Les altérations génétiques associées au mélanome.
- Tableau 4.** La classification TNM.
-
- Figure 1.** La peau, un « organe » visible qui fait face au milieu extérieur.
- Figure 2.** Le mélanocyte, producteur du pigment mélanique, dialogue avec les kératinocytes en réponse aux UVs.
- Figure 3.** Modèle de progression tumorale.
- Figure 4.** La voie RTK-RAS impliquée dans le développement et la progression des mélanomes.
- Figure 5.** La voie de signalisation RAF-MAPK kinase-ERK.
- Figure 6.** Activation constitutive des kinases ERKs en présence de l'oncoprotéine BRAF^{V600}.
- Figure 7.** La voie de signalisation PI3K-AKT.
- Figure 8.** Le suppresseur de tumeur p53: « le gardien » du génome de la cellule.
- Figure 9.** Etapes progressives de la mélanomagenèse.
- Figure 10.** Etapes progressives de la transition épithélio-mésenchymateuse.
- Figure 11.** La dissémination métastatique: de la tumeur primaire vers les foyers tumoraux secondaires.
- Figure 12.** Remodelage du stroma au cours de la tumorigenèse.
- Figure 13.** Changement phénotypique des fibroblastes activés.
- Figure 14.** Rôles des fibroblastes activés dans le stroma tumoral.
-
- Figure 15.** Auto-surveillance basée sur la règle de l'«ABCDE ».
- Figure 16.** Modèle d'action de l'administration de traitement par intermittence.
- Figure 17.** Modèle d'action de l'administration de traitement par intermittence.
-
- Figure 18.** L'EMDR repose sur l'interaction entre la tumeur et son stroma.
- Figure 19.** Exemples de mécanismes de résistance innée des mélanomes aux inhibiteurs de BRAF^{V600}: sur-activation des voie RAF-MEK-ERK et PI3K-AKT.
- Figure 20.** Exemples de mécanismes de résistance acquise des mélanomes aux inhibiteurs de BRAF^{V600}.
- Figure 21.** Modèle d'étude de la résistance ERK-indépendante des mélanomes aux inhibiteurs de BRAF^{V600}: les m229-R.
- Figure 22.** Modèle d'étude de la résistance ERK-indépendante et ERK-dépendante des mélanomes aux inhibiteurs de BRAF^{V600}: les 451lu-R.
- Figure 23.** Schématisation de la commutation phénotypique.
-
- Figure 24.** La famille des protéines matricellulaires.
- Figure 25.** Structure tri-modulaire de la protéine SPARC.
- Figure 26.** Les peptides bioactifs de SPARC.
- Figure 27.** Différents modes d'action auto-, para- et intracrine de SPARC.
- Figure 28.** La protéine matricellulaire SPARC, au carrefour de processus clés dans la progression tumorale.

SOMMAIRE

INTRODUCTION	4
I. LE MELANOME CUTANE METASTATIQUE	4
A. UN CANCER CUTANE DEVASTATEUR	4
1. Epidémiologie du Mélanome.	5
a. Le cancer de la peau le plus mortel.	5
b. Les facteurs de risques environnementaux.....	5
c. Les facteurs de risques intrinsèques.	6
2. Le mélanocyte, point de départ du mélanome.	8
a. Le mélanocyte producteur du pigment mélanique : dialogue avec les kératinocytes.....	8
b. Le mélanocyte unité basale du « grain de beauté ».....	10
3. Différents types de Mélanomes.	11
a. Le mélanome superficiel extensif ou SSM (pour Superficial Spreading Melanoma).	11
b. Le mélanome nodulaire.....	11
c. Le mélanome de Dubreuilh ou LMM (pour Lentigo Malignant Melanoma).	11
d. Le mélanome acral-lentigineux ou ALM (pour Acral Lentiginous Melanoma).....	11
e. Les mélanomes des muqueuses et uvéaux (ou choroïdiens) : mélanomes « non- cutanés ». ...	11
B. LE MELANOME : UN CANCER A LARGE STATUT MUTATIONNEL	12
1. L'initiation de la transformation du mélanocyte.....	12
a. Quelques modifications génétiques à l'origine de la transformation du mélanocyte.....	12
b. Passage du mélanocyte au mélanome : collaboration nécessaire de plusieurs acteurs.	17
c. Mélanocyte, exposition solaire et mutation BRAF: un cocktail mélanome-générateur ?.....	18
d. Le mélanome : une tumeur hétérogène en remodelage permanent.	18
2. Une transformation en trois étapes : une progression rapide vers la formation de métastases « robustes ».	19
a. La Phase Radiale de Croissance (RGP) : état de prolifération intense, vers une indépendance de la cellule de mélanome.....	19
b. La phase Verticale de Croissance (VGP) : l'étape critique dans la mélanomagenèse.	20
c. La Phase Métastatique: un mélanome endurci et autonome.....	21
C. LE MELANOME INTEGRE A UN MICROENVIRONNEMENT COMPLEXE	22
1. Un microenvironnement hétérogène.	22
2. Les fibroblastes collaborent avec les cellules tumorales.	23
3. Les fibroblastes de la tumeur primaire : « gardes du corps » des cellules tumorales face aux thérapies.....	25
4. Les fibroblastes et les niches métastatiques.....	25
II. PRISE EN CHARGE DU PATIENT ATTEINT DE MELANOME	27
A. LE DIAGNOSTIC PRECOCE : OPTIMISER LA PRISE EN CHARGE DU MELANOME	27

B.	LA CHIRURGIE : PREMIER TRAITEMENT SYSTEMATIQUE.	28
C.	DE NOUVELLES STRATEGIES DANS LA THERAPIE DES MELANOMES METASTATIQUES : VERS UNE THERAPIE SUR MESURE.	29
1.	Les nouvelles thérapies ciblées.	30
a.	Les inhibiteurs de l'oncogène BRAF ^{V600} pour les mélanomes métastatiques mutés BRAF ^{V600}	30
b.	Les inhibiteurs de MEK à la rescousse des inhibiteurs de BRAF ^{V600}	31
c.	Une nouvelle approche thérapeutique basée sur le concept de « drug-dependency ».....	32
d.	Thérapies pour les mélanomes métastatiques non mutés BRAF ^{V600}	33
2.	L'immunothérapie : en première intention ou comme dernier recours.....	34
a.	Les anti-CTLA4	34
b.	Les anti-PD1 et anti-PDL1.	35
III.	LA RESISTANCE AUX MOLECULES THERAPEUTIQUES.....	38
A.	LA COMPOSANTE INTRINSEQUE AUX CELLULES TUMORALES DE LA RESISTANCE THERAPEUTIQUE.	38
B.	LA COMPOSANTE EXTRINSEQUE DE LA RESISTANCE THERAPEUTIQUE : L'EMDR, UN CONCEPT INDISPENSABLE DANS L'APPREHENSION DU MELANOME.....	38
1.	La SFM-DR.....	39
2.	La CAM-DR.....	40
C.	LA SUREXPRESSON DES RTKS ASSOCIEE A LA RESISTANCE AUX INHIBITEURS DE BRAF ^{V600E}	40
D.	LA RESISTANCE INNEE OU PRIMAIRE AUX INHIBITEURS DE BRAF ^{V600}	41
E.	LA RESISTANCE ACQUISE OU SECONDAIRE AUX INHIBITEURS DE BRAF ^{V600}	45
1.	Résistance ERK-dépendante : réactivation de la voie des MAPKinases.....	45
a.	Mutation de RAS.....	45
b.	Résistance RAF dépendante.	46
c.	Résistance indépendante de la dimérisation des RAFs.	47
2.	Résistance « ERK-indépendante » : hyper-activation de la voie PI3K-AKT.....	47
a.	Surexpression des récepteurs tyrosine-kinase.....	48
b.	Rôle de la kinase AKT.....	49
c.	Modèle d'étude : m229-R. (Figure21)	50
3.	Résistance ERK-dépendante ET indépendante : réactivation de la voie MAPKinase et activation de la voie PI3K-AKT : les cellules 451lu-R comme modèle d'étude.....	51
4.	Le concept de « phenotype switching » : une entrave à l'efficacité des inhibiteurs de la voie RAF-MEK-ERK.	52
IV.	LA PROTEINE MATRICELLULAIRE SPARC : UNE PROTEINE MULTIFONCTIONNELLE DU MICROENVIRONNEMENT.	54
A.	SPARC : LE PROTOTYPE DE LA FAMILLE DES PROTEINES MATRICELLULAIRES.	54
B.	EXPRESSION ET STRUCTURE DE LA PROTEINE SPARC.	55
C.	SPARC EN CONTEXTE PHYSIOLOGIQUE.	56
1.	Invalidation de SPARC chez la souris.	57
2.	SPARC : une protéine antiproliférative, antiadhésive, régulatrice de la MEC.....	57

a.	Mode d'action autocrine et paracrine.....	57
b.	Mode d'action intracrine.....	59
D.	REGULATION DE LA PROTEINE SPARC.....	59
E.	SPARC EN CONTEXTE PATHOLOGIQUE : UNE PROTEINE A DOUBLE FACE IMPLIQUEE DANS DE NOMBREUX CANCERS.	61
1.	Un rôle anti-tumoral.....	62
2.	Un rôle pro-tumoral.	63
F.	ROLE DE SPARC DANS LE MELANOME CUTANE.	65
1.	Etude de l'expression de la protéine SPARC au cours de la progression tumorale.	65
2.	Un acteur clé de la progression tumorale.	66
a.	Initiation des métastases.....	66
b.	SPARC donne l'accès aux cellules de mélanomes aux sites métastatiques.	67
3.	SPARC : un facteur antistress du mélanome.....	69
a.	SPARC et le système immunitaire anti-mélanome.....	69
b.	Rôle autocrine de SPARC : régulation -dépendante du suppresseur de tumeur p53, et survie des cellules de mélanome.	70
4.	SPARC et sensibilité thérapeutique.....	71
a.	SPARC et chimiothérapie.....	71
b.	SPARC et thérapie ciblée.	72
	RESULTATS	73
	CONTEXTE ET OBJECTIFS DE RECHERCHE.....	73
	ARTICLE I.....	74
	DISCUSSION ET PERSPECTIVES	78
1.	SPARC module la sensibilité des lignées cellulaires de mélanomes humaines aux thérapies	79
2.	La voie de signalisation SPARC-AKT est impliquée dans l'acquisition d'une résistance aux inhibiteurs de BRAF ^{V600} par certaines lignées de mélanomes humains.	83
3.	Rôle des fibroblastes des ganglions lymphatiques dans la résistance des mélanomes métastatiques aux thérapies ciblant l'oncogène BRAF ^{V600}	87
4.	SPARC comme nouveau marqueur dans le suivi thérapeutique du mélanome.....	90
	CONCLUSION	92
	REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	92
	ANNEXES	125
	LISTE DES PUBLICATIONS	126

INTRODUCTION

I. LE MELANOME CUTANE METASTATIQUE.

A. UN CANCER CUTANE DEVASTATEUR.

Les cancers figurent parmi les principales causes de mortalité dans le monde. En 2012, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) comptait approximativement 14 millions de nouveaux cas et 8,2 millions de décès liés à la maladie (World Cancer Report 2014, International Agency for Research on Cancer).

Selon l'OMS, un cancer diagnostiqué sur trois est un cancer de la peau. **Ces cancers de la peau, directement liés à l'exposition aux rayonnements ultraviolets solaires (UVA et UVB),** sont représentés par deux catégories: les **carcinomes** et les **mélanomes**.

Les carcinomes sont des cancers cutanés non-mélanocytaires et se développent préférentiellement à partir des kératinocytes. Ils sont les plus fréquents puisqu'ils représentent 95% de l'ensemble des cancers cutanés. Ils surviennent généralement après 50 ans, sur les zones découvertes du corps, et sont le plus souvent dus à une exposition au soleil excessive et chronique.

Parmi les carcinomes on distingue :

- **les carcinomes basocellulaires**, qui représentent 75% des cancers cutanés : ce sont les moins graves car leur évolution est lente et leur développement reste local, ils ne métastasent pas. Ils surviennent généralement sur peau saine, sur des zones découvertes du corps (tête, cou). Il suffit de les retirer chirurgicalement pour en assurer la guérison.
- **les carcinomes épidermoïdes ou spinocellulaires** se développent à partir des couches supérieures de l'épiderme. Ils sont plus rares (15% des cancers cutanés), mais plus agressifs car ils ont la capacité d'envahir les ganglions lymphatiques et de métastaser. Ils restent néanmoins rarement mortels avec seulement 2 à 10% de cas de métastases. Ils peuvent apparaître sur des cicatrices de brûlures ou de plaies chroniques. Ces carcinomes sont facilement guérissables dans la plupart des cas grâce à une détection précoce permettant un traitement chirurgical.

Le mélanome, est le cancer de la peau le plus grave du fait de son potentiel métastatique extrêmement fort. Il se développe au dépend des mélanocytes, cellules pigmentées provenant de l'épiderme, de l'iris ou encore des muqueuses. **Le mélanome cutané** est une tumeur maligne qui se développe à partir des mélanocytes de l'épiderme de la peau. Bien qu'il ne représente qu'une faible proportion des cancers cutanés (environ 5%), **le mélanome est la principale cause de décès par cancer cutané** : si une détection du mélanome à un stade précoce de son développement permet de mettre en place un traitement chirurgical et assure la guérison du patient, lorsqu'il est détecté à un stade avancé, le mélanome est difficile à traiter (cf. §B.2).

1. Epidémiologie du Mélanome.

a. Le cancer de la peau le plus mortel.

Le dernier rapport datant de 2012 de l'Institut National du Cancer (INCa) fait état de la situation du mélanome dans le monde et en France.

Il y a 132 000 cas de mélanomes cutanés enregistrés chaque année dans le monde, soit 15 à 20 fois moins que pour les autres types de cancers cutanés. Cependant, parmi ce type de cancer, le mélanome a la plus forte augmentation annuelle d'incidence, variable selon les pays, estimée entre 3 et 7%. Cette incidence, qui a connu une très forte progression ces 40 dernières années, semble atteindre aujourd'hui un pic. D'autre part, des études réalisées dans l'Union européenne, au Canada, aux États-Unis et en Australie ont observé un ralentissement, voire une stabilisation de l'augmentation du taux d'incidence depuis les années 1990. Néanmoins, des études de cohortes réalisées dans plusieurs pays indiquent que cette augmentation se poursuivra au moins au cours des deux prochaines décennies, avec un **doublément du taux d'incidence**.

En 2012, 11 176 nouveaux cas de mélanomes cutanés ont été estimés en France métropolitaine, plaçant le mélanome au 9^{ème} rang des cancers tous sexes et tout âge confondus. Avec 1672 décès, il se place au 15^e rang des décès par cancer tous sexes confondus. En revanche, chez la femme entre 15 et 29 ans, le mélanome se classe au 1^{er} rang des cancers et au 3^{ème} rang des décès par cancer.

La survenue de ce cancer est tardive puisque entre 70 et 80% des nouveaux cas estimés sont diagnostiqués au-delà de 49 ans (chez la femme et l'homme, respectivement). L'âge médian au diagnostic pour 2012 est estimé à 64 ans chez l'homme et à 61 ans chez la femme.

b. Les facteurs de risques environnementaux.

Les mécanismes moléculaires par lesquels l'action des UVs solaires dicte la genèse du mélanome ne sont pas encore ou peu élucidés.

Néanmoins, à l'exception des mélanomes des paumes et des plantes de pieds (moins de 5% des cas), le mélanome est épidémiologiquement lié aux radiations UVs (Garibyan and Fisher 2010).

Le rôle que joue l'exposition solaire cumulée dans l'apparition du mélanome malin est ambigu : alors que pour le mélanome le plus fréquent, le mélanome superficiel extensif (ou SSM pour Superficial Spreading Melanoma ; cf. partie A.3.), plusieurs études épidémiologiques indiquent une association positive avec des antécédents d'expositions intermittentes et intenses avec coups de soleil, en particulier dans le jeune âge (Whiteman et al. 2001), une exposition chronique et surtout à partir de 50 ans s'associe plutôt avec les mélanomes de la personne âgée tel que le mélanome de Dubreuilh. Cependant, que **l'exposition solaire soit intermittente ou chronique, elle reste un des principaux facteurs de risque du mélanome**.

Les populations de type caucasien sont de loin les plus touchées par la pathologie du mélanome à cause de leur sensibilité aux expositions solaires. De plus, l'incidence du mélanome malin dans les populations blanches augmente généralement lorsque la latitude diminue, l'incidence la plus élevée étant enregistrée en Australie, où les taux annuels sont 10 et 20 fois plus élevés qu'en Europe chez les femmes et les hommes, respectivement. La raison principale est le phototype particulièrement à risque de ces populations (cf. § suivant) associé à une forte exposition solaire. Au contraire, l'Afrique et l'Amérique latine et à plus forte raison

Différents Phototypes	Caractéristiques Individuelles	Réactions au soleil
Phototype I	<ul style="list-style-type: none"> • Peau très blanche • Cheveux roux ou blonds • Yeux bleus/verts • Souvent des taches de rousseur 	<ul style="list-style-type: none"> • Coups de soleil systématiques • Ne bronze jamais, rougit toujours
Phototype II	<ul style="list-style-type: none"> • Peau claire • Cheveux blonds roux à châains • Yeux clairs à bruns • Parfois apparition de taches de rousseur 	<ul style="list-style-type: none"> • Coups de soleil fréquents • Bronze à peine ou très lentement
Phototype III	<ul style="list-style-type: none"> • Peau intermédiaire • Cheveux châains à bruns • Yeux bruns 	<ul style="list-style-type: none"> • Coups de soleil occasionnels • Bronze graduellement
Phototype IV	<ul style="list-style-type: none"> • Peau mate • Cheveux bruns/noirs • Yeux bruns/noirs 	<ul style="list-style-type: none"> • Coups de soleil occasionnels lors d'expositions intenses • Bronze bien
Phototype V	<ul style="list-style-type: none"> • Peau brun foncé • Cheveux noirs • Yeux noirs 	<ul style="list-style-type: none"> • Coups de soleil rares • Bronze beaucoup
Phototype VI	<ul style="list-style-type: none"> • Peau noire • Cheveux noirs • Yeux noirs 	<ul style="list-style-type: none"> • Coups de soleil très exceptionnels

Tableau 1. Les différents phototypes cutanés

D'après la classification de Fitzpatrick et al., 1988

L'Asie sont des pays où l'incidence du mélanome est très faible en raison du phototype peu à risque des populations (Globocan, IARC).

Ces dernières informations, concernant la variation de l'incidence du mélanome en fonction des populations, mettent en évidence le fait que face au soleil, nous ne sommes pas tous égaux : le risque de développer un mélanome est également individuel.

c. Les facteurs de risques intrinsèques.

Certaines personnes sont plus sensibles que d'autres aux rayons UVs en raison de leur moindre capacité à bronzer. La capacité des mélanocytes d'un individu à produire et distribuer les différents pigments mélaniques influence la couleur de sa peau, ses yeux, ses cheveux, conditionne sa vulnérabilité face aux UVs, et par conséquent modifie le risque de développer un mélanome (Bliss et al. 1995). Thomas B. Fitzpatrick a établi en 1988 pour la première fois une classification des individus et de leur capacité à se protéger des UVs en bronzant, en fonction de plusieurs critères (Fitzpatrick 1988). L'ensemble de ces critères constitue **différents phototypes** (Tableau 1). Le mélanome cutané est plus fréquent chez les personnes ayant une peau et des yeux clairs, et des cheveux roux ou blonds (phototypes I ou II) : ces personnes sont incapables de bronzer et n'ont donc pas de protection intrinsèque contre le soleil, contrairement à des individus bruns et mats de peau qui ne prennent jamais de coups de soleil (phototypes III ou IV).

Si dans 75% des cas, le mélanome cutané se développe de novo (c'est-à-dire sur une zone saine de la peau), dans les autres cas (25%) le mélanome cutané se développe à partir de naevus préexistant ou « grain de beauté », et le **nombre élevé (de 50 à 100) de naevi et/ou de naevi atypiques (au moins 2)** est également un facteur de risque important de développer un mélanome cutané (Elwood et al. 1990, Tucker et al. 1997). On distingue deux types de « grain de beauté » ou Neavus : les Neavi Communs ou les Neavi Atypiques (congénitaux ou acquis) :

Les Neavi Communs acquis correspondent à une prolifération mélanocytaire dite bénigne épidermique et/ou dermique et forment une « lésion pigmentée ». Ils apparaissent et croissent pendant les 30 premières années de la vie et représentent l'immense majorité des « grains de beauté » de la surface cutanée. Le risque de transformation maligne des petits Naevi Communs est très faible. Les grands Naevi Congénitaux présents à la naissance d'au moins 6 cm (> 20 cm à l'âge adulte) ou d'apparition précoce dans la vie, ont un risque de transformation relativement élevé. Cependant, ils sont exceptionnels et n'expliquent donc la survenue que de très peu de mélanomes.

Les Naevi Atypiques sont caractérisés par une taille supérieure à 5 mm, accompagnée de la présence d'une composante plane (maculeuse), et d'au moins deux des critères suivants: asymétrie, bords irréguliers, polychromie. On parle alors de **syndrome des naevi atypiques** en présence de naevi en nombre élevé associés à des naevi atypiques multiples. Ces naevi qui ont tendance à se développer tout au long de la vie, sont d'autant plus instables qu'ils sont exposés aux UVs, et entrent donc dans la liste des facteurs de risque important de développer un mélanome cutané.

Les facteurs de risques du Mélanome

- un phototype I ou II
- un nombre élevé de naevi communs, et naevi atypiques en particuliers
- des antécédents d'expositions solaires intenses au cours de l'enfance avec coups de soleil.
- les antécédents familiaux de mélanome
- les antécédents personnels de mélanome, ou autres cancers cutanés

Les sujets à risque doivent être informés et doivent adopter un comportement précautionneux concernant leur « rendez-vous » avec le soleil. Sans oublier que le soleil participe au bien-être physique, moral, et favorise la production de vitamine D, indispensable à l'absorption du calcium par les os, quelques minutes d'exposition par jour suffisent. Il est donc nécessaire, d'une part, d'adopter le bon comportement face à l'exposition solaire, et d'autre part, il est indispensable de fuir les cabines de bronzage à UVs artificiels interdites aux mineurs en France depuis 1997 et fortement déconseillées pour les personnes majeures par l'INCa et le Syndicat National des Dermatologues-Vénérologues (SNDV).

Tableau 2. Facteurs de risque du Mélanome, et comportement à adopter en conséquence.

Les gènes de susceptibilité et les antécédents familiaux.

Comme dans de nombreux autres cancers, plusieurs gènes présentant des mutations ont été identifiés comme gènes de susceptibilité génétique à développer un mélanome: cette partie, non exhaustive, présentera les gènes les mieux décrits à ce jour.

Les critères d'inclusion dans la catégorie des mélanomes familiaux sont définis par l'existence d'au moins un cas de mélanome chez un parent du premier degré ou d'au moins deux cas de mélanome sur trois générations. Environ 10% des mélanomes surviennent dans un contexte de **mélanome familial** (Greene et al. 1985, Lynch et al. 1995) ce qui représente une part importante. Ces patients développent, en moyenne, un mélanome plus précocement et ont un risque plus élevé de mélanomes multiples.

Le gène **CDKN2A** a été le premier gène identifié en 1994 comme étant un gène de prédisposition familiale à développer un mélanome (Hussussian et al. 1994, Kamb et al. 1994). Le gène **CDKN2A** code pour **deux suppresseurs de tumeur** issus d'un épissage alternatif de transcrits, la protéine **p16^{INK4a}** (inhibitor of kinase a) qui contrôle des points clés du cycle cellulaire via l'inhibition des CDK4 et CDK6, et la protéine **p14^{ARF}** (alternative reading fram) qui contrôle la mort cellulaire par apoptose en stabilisant le suppresseur de tumeur p53 via l'inhibition de son régulateur négatif majeur MDM2 (Pomerantz et al. 1998, Serrano et al. 1993). Une mutation germinale¹ désactivatrice sur le chromosome 9p21 fait de **CDKN2A** un **gène de prédisposition dans 20% à 40% des mélanomes** familiaux, selon les critères d'inclusion (Goldstein A. M. et al. 2006). D'autre part, il a été montré que les individus porteurs de la mutation ont un nombre et une densité totale élevés de naevi comparativement à des individus non porteurs au sein d'une même famille (Florell et al. 2004).

L'**oncogène CDK4** est également un gène de prédisposition à développer un mélanome. Il code pour une sous unité catalytique d'une Sérine/Thréonine kinase hétérodimérique directement inhibée par la protéine p16^{INK4a}. Cependant, deux mutations germinales de **CDK4** n'ont été retrouvées que dans un nombre de cas limité de mélanome familial (Puntervoll et al. 2013, Soufir et al. 1998, Zuo et al. 1996).

D'autres variants associées à une susceptibilité héréditaire de développer un mélanome cutané ont été découverts pour des gènes associés au nombre de naevi, à la réponse immunitaire, à la réparation de l'ADN, au métabolisme, au récepteur à la vitamine D (VDR), ou encore à la pigmentation. Ces variants, prévalant dans la population, sont en revanche associés à un faible risque, ou modéré, de mélanome cutané (Udayakumar and Tsao 2009).

C'est le cas de deux gènes associés aux traits de pigmentation et associés à un risque modéré de mélanome cutané :

- Le gène **MC1R** qui code pour le Melanocortin 1 Receptor (MC1R), impliqué dans la pigmentation de la peau, est hautement polymorphique (Rana et al. 1999) et certains de ses variants ont été associés avec le phénotype des personnes rousses (phototype I) (Bastiaens et al. 2001, Valverde et al. 1995). Ces variants RHC (Red Hair Color), comme les autres variants (non-RHC), réduisent la fonction du récepteur dans la synthèse des différents pigments mélaniques (cf. partie A.2.a.).

¹Une mutation germinale est une modification de novo survenant lors de la formation ou de la vie des gamètes destinés à la reproduction d'un individu. Elle peut par conséquent être transmise à la descendance de cet individu, contrairement aux mutations somatiques qui ne touchent jamais les cellules reproductrices.

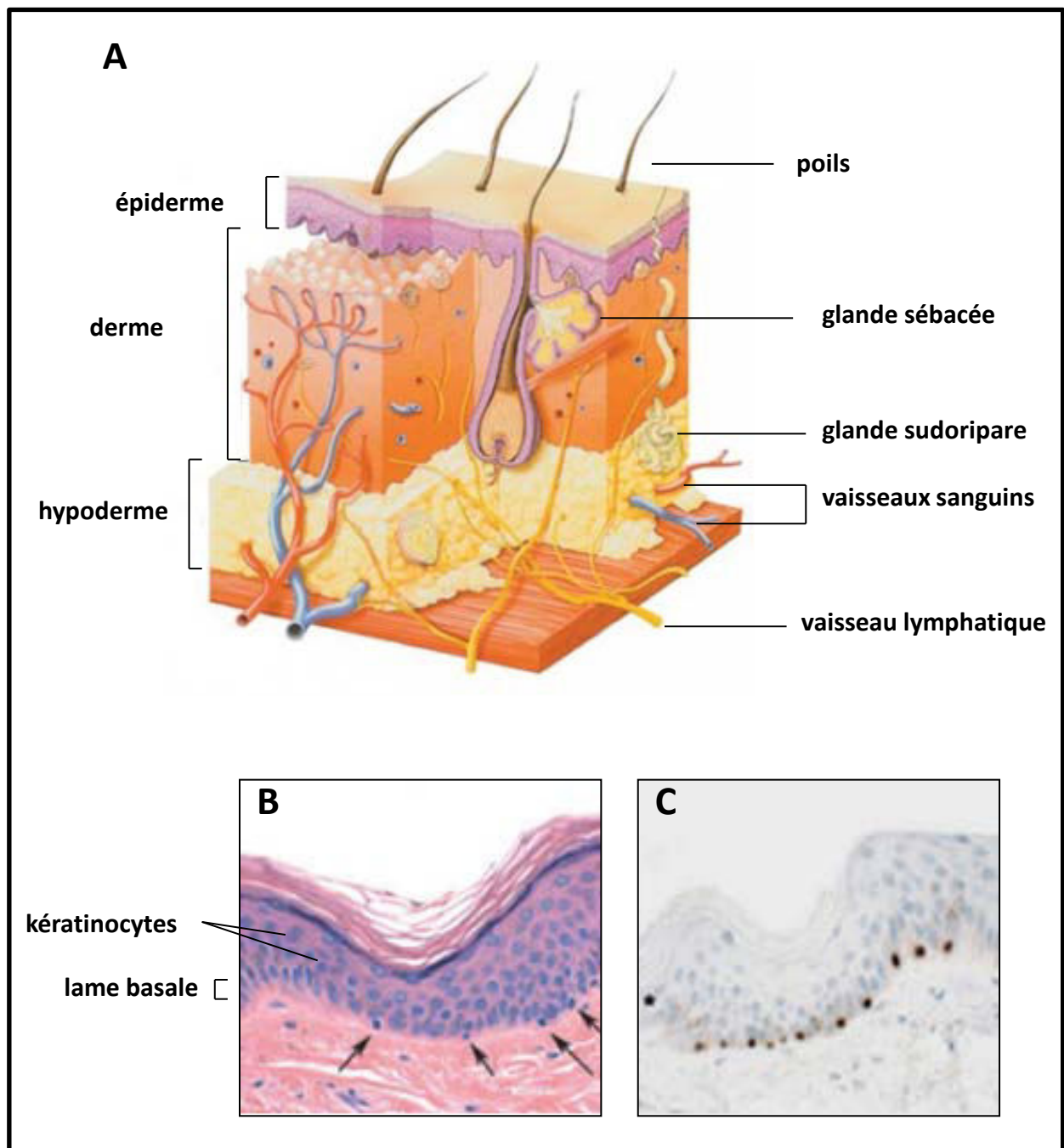


Figure 1. La peau, un « organe » visible qui fait face au milieu extérieur.

(A) Représentation 3D de la peau humaine constituée de trois tissus superposés: l'hypoderme, le derme et l'épiderme.

L'hypoderme, le plus profond, est un tissu adipeux dans lequel on trouve des vaisseaux sanguins et lymphatiques. **Le derme** est un tissu conjonctif de soutien qui contient de nombreux fibroblastes, des capillaires sanguins et lymphatiques, des terminaisons nerveuses, ainsi que des glandes sudoripares et sébacées. C'est la couche de la peau la plus épaisse. **L'épiderme**, le plus externe, est un tissu épithéliale de revêtement qui comprend quatre types cellulaires: les kératinocytes (les plus nombreuses), les mélanocytes, les cellules de Langerhans (cellules dendritiques de la peau, jouant un rôle dans l'immunité) et les cellules de Merkel (rôle de mécano-récepteurs). Il ne contient ni vaisseau sanguin, ni vaisseau lymphatique.

(B) Observation d'une coupe histologique d'épiderme humain au microscope photonique (grossissement x100, coloration à l'hématoxyline-éosine): les flèches pointent les mélanocytes au niveau de la lame basale.

(C) Marquage immuno-histochimique avec un anticorps reconnaissant spécifiquement la protéine MITF (coupe histologique d'épiderme humain, grossissement x100 au microscope photonique). D'après Lin et Fisher, 2007.

Cependant, si quelques variants RHC de *MC1R* sont associés à l'augmentation du risque de mélanome (Palmer et al. 2000, Valverde et al. 1996), pour la majorité des autres variants le risque de mélanome cutané associé est indépendant de la couleur de peau et des cheveux (Bastiaens et al. 2001, Kennedy et al. 2001). De plus, les variants *MC1R* peuvent augmenter la pénétrance des mutants *CDKN2A* (Box et al. 2001, Fargnoli et al. 2010, Goldstein A. M. et al. 2005).

- Le gène *MITF* (microphthalmia-associated transcription factor) est primordial dans la biologie du mélanocyte. Il est le « master gène » de la spécification mélanocytaire lors du développement embryonnaire (Steingrimsson et al. 2004): il contrôle la survie, la prolifération, la différenciation et la migration des mélanocytes (pour revue, (Cheli et al. 2010)), et il participe à la pigmentation de la peau en régulant la transcription d'enzymes de synthèse des mélanines (Ludwig et al. 2004, Yasumoto et al. 1994). Une mutation germinale E318K de *MITF*, altérant son activité transcriptionnelle, a été identifiée et retrouvée plus fréquemment dans des cas de mélanomes familiaux ou de mélanomes primaires multiples (Bertolotto et al. 2011, Yokoyama et al. 2011). Elle serait associée à un phénotype particulier des patients atteints de mélanome qui la portent : une peau très claire, la présence de nombreuses éphélides (« tâches de rousseur ») et de nombreux naevi réticulaires, ainsi que des tumeurs amélaniques (non pigmentées, suite à l'absence de production de mélanines) (Sturm et al. 2014).

Enfin, le risque de mélanome est plus élevé chez les gens ayant des antécédents de cancers cutanés non mélanocytaires et de kératoses solaires, qui sont tous deux des indicateurs d'une exposition cumulée aux UV.

Le Tableau 2 résume les principaux facteurs de risque associés au mélanome.

2. Le mélanocyte, point de départ du mélanome.

a. Le mélanocyte producteur du pigment mélanique : dialogue avec les kératinocytes.

Les mélanocytes sont des cellules pigmentées présentant un phénotype morphologique assez caractéristique, étoilé avec des extensions dendritiques, marque de leur origine embryonnaire : la crête neurale. Ils se localisent principalement dans la peau, mais peuvent également se retrouver dans la choroïde de l'œil (iris), les valves du cœur, la cochlée de l'oreille interne ou encore dans les leptoméniges du cerveau (pie-mère). Dans la peau, les mélanocytes se situent à la jonction entre le derme et l'épiderme (couche la plus superficielle de la peau) au niveau de la couche basale (Figure 1). On dénombre en moyenne de 1000 à 2000 mélanocytes par mm² de peau. Les mélanocytes sont des cellules différenciées et spécialisées dans la production de la mélanine, un pigment qui intervient dans la coloration et la protection de la peau face aux rayons ultraviolets.

La teinte de la peau d'un individu résulte d'un mélange de deux sortes de pigments, les eumélanines et les phaeomélanines. Les pigments mélaniques sont des biopolymères de tyrosine qui résultent d'un processus enzymatique : la mélanogénèse. A partir d'un précurseur commun, la tyrosine, oxydée en dopaquinone par une enzyme appelée tyrosinase, deux voies de synthèse divergent :

- une première voie de synthèse implique les enzymes mélanogéniques TRP1 (gp75) et TRP2 (Dct), à l'origine des eumélanines (eumélanogénèse). Ces pigments sont de couleur noire ou

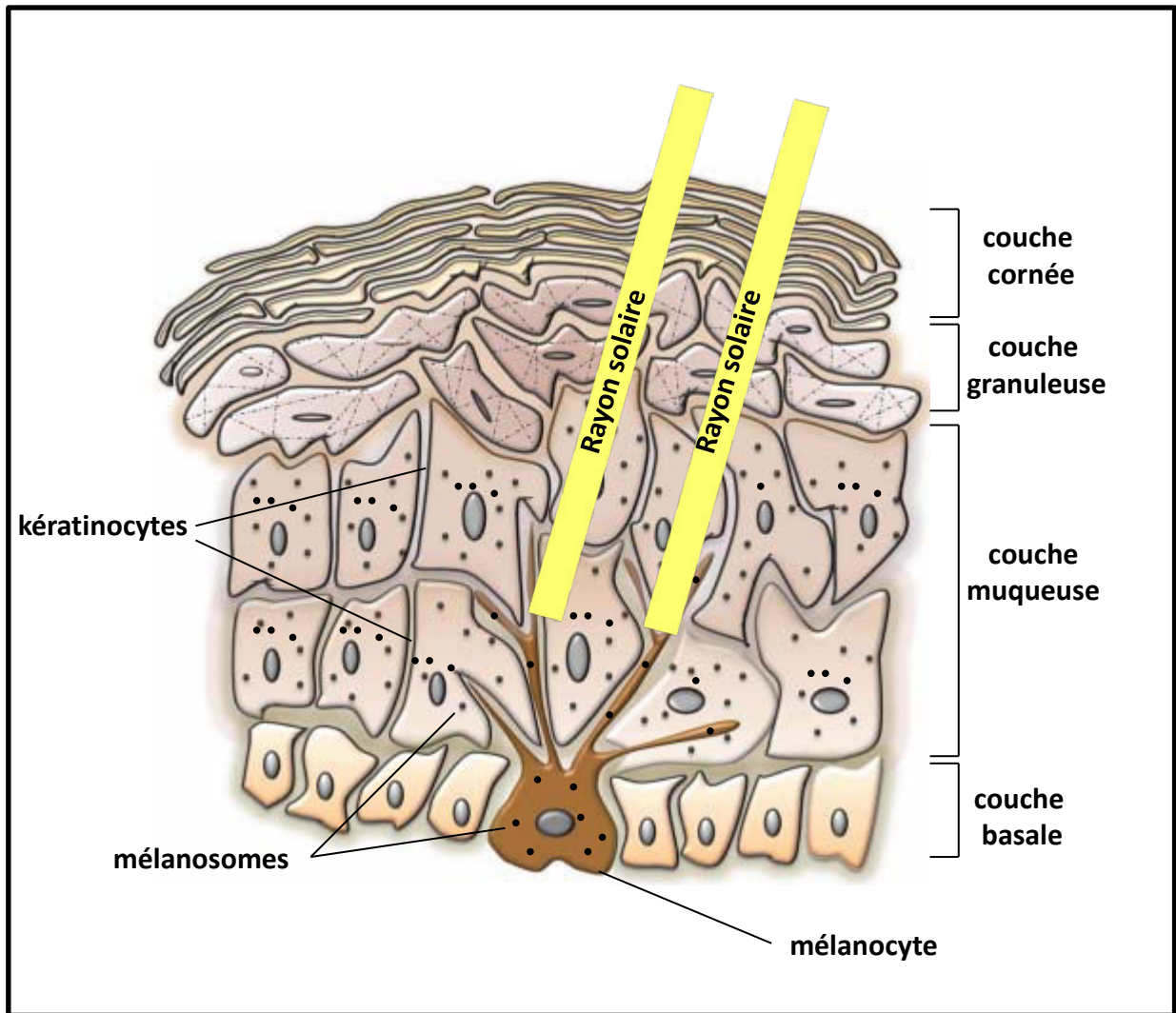


Figure 2. Le mélanocyte, producteur du pigment mélanique, dialogue avec les kératinocytes en réponse aux UVs.

Schéma de l'architecture de l'épiderme humain. Les mélanocytes se situent au niveau de l'assise basale. Leurs prolongements, qui leur confèrent une forme étoilée, permettent l'interaction avec les kératinocytes de la couche muqueuse et le transfert des mélanosomes. Adapté de Natarajan *et al*, 2014.

brune, et absorbent totalement la lumière : ils exercent donc un réel pouvoir photoprotecteur.

- une seconde voie de synthèse implique l'incorporation de dérivés soufrés (cystéine, glutathion), à l'origine des phaeomélanines (phaeomélanogenèse). Ces pigments, au contraire des eumélanines, sont jaunes orangés et n'ont pas ou très peu de pouvoir photoprotecteur, et ont même un fort potentiel mutagène (Ranadive and Menon 1986).

Le mélange des mélanines constitue un film photoprotecteur plus ou moins capable d'absorber les rayons UVs (UVA et UVB dissipés sous forme de chaleur), et son ratio eu/phaeomélanine conditionne le phototype cutané d'un individu et par conséquent sa plus ou moins forte vulnérabilité face à la partie cancérogène du spectre du soleil que sont les UVs, à l'origine de dommages à l'ADN (El Ghissassi et al. 2009).

Dans les mélanocytes, les mélanines s'accumulent dans des vésicules appelées mélanosomes. Grâce à leurs nombreuses dendrites, les mélanocytes sont en étroite communication avec les cellules environnantes de l'épiderme et notamment avec les nombreux kératinocytes environnants dans l'épiderme auxquels ils transfèrent les mélanosomes (Figure 2).

Les kératinocytes représentent 85% de l'épiderme. Ces cellules naissent par division cellulaire au plus profond de l'épiderme, dans la « couche basale ». Elles subissent ensuite un double mouvement, s'aplatissant et remontant peu à peu vers l'extérieur. Arrivées en surface, elles perdent leur noyau et meurent, formant la « couche cornée ». Elles s'éliminent par desquamation. En plus de leur rôle dans la synthèse de kératines importantes pour la cohésion de l'épiderme et son imperméabilité face au milieu extérieur, les kératinocytes jouent un rôle primordial dans la photoprotection de la peau :

- ils redistribuent, d'une part, les mélanosomes issus des mélanocytes chargés de mélanines vers leur pôles apicaux où ces derniers s'agrègent en chapeau supra-nucléaire sur le côté du noyau exposé aux rayons solaires (Byers et al. 2007). Ainsi, les mélanosomes forment un véritable écran solaire interne aux cellules qui protège l'ADN kératinocytaire de la capacité mutagène des rayonnements ultraviolets (pour revue, (Lin J. Y. and Fisher 2007)).
- d'autre part, les kératinocytes participent à la régulation de la synthèse de mélanines par les mélanocytes, en particulier en réponse aux stress UVs, via la synthèse et la sécrétion d'une hormone : l' α MSH (melanocyte stimulating hormone alpha) qui se fixe sur leur récepteurs spécifiques MC1R (melanocortin receptor 1) exprimés par les mélanocytes (Kameyama et al. 1988). Le couplage de ce récepteur à une protéine G se traduit alors par un signal intracellulaire de type Adénylate cyclase-AMPC-PKA-CREB, CREB allant transactiver l'expression du gène *MITF*, évoqué précédemment (Bertolotto et al. 1998). Alors surexprimée, la protéine MITF induit dans le mélanocyte la transcription des gènes de la famille des TYR (*TYROSINASE*, *TRP1*, *TRP2*), impliqués dans la synthèse de mélanine. L'effet ultime de la signalisation de MC1R est le « switch » de la production de phaeomélanines vers la production d'eumélanines.

Finalement, le duo mélanocyte-kératinocyte est primordial pour assurer la photoprotection intrinsèque de la peau d'un individu.

D'autre part, c'est ce couple qui est à l'origine de l'homéostasie mélanocytaire au sein de l'épiderme. Les kératinocytes entrent en jeu dans la fonction de cellules très différenciées des mélanocytes, la mélanogenèse, via la sécrétion d'hormones pro-mélanogéniques (alphaMSH et ACTH), mais participent également à freiner leur prolifération au profit de leur différenciation. En effet, le mélanocyte est finement régulé par son microenvironnement kératinocytaire :

- les adhérences mélanocyte-kératinocyte médiées par la cadhérine E ou les adhérences mélanocyte-matrice constituent un point d'attache fort qui maintient le mélanocyte ancré au sein de son microenvironnement et à la lame basale de l'épiderme (Johnson 1999).
- le bFGF (Halaban et al. 1988), l'HGF (Hirobe et al. 2004), le SCF (Hachiya et al. 2004), ou encore les endothélines 1, 2 et 3 (Imokawa et al. 1997) sont autant de facteurs diffusibles que sécrètent les kératinocytes, et qui induisent au sein du mélanocyte la régulation de protéines du cycle cellulaire via la voie des MAPkinases ERK (cf. partie I.B), ou encore des protéines kinase C (PKC).

b. Le mélanocyte unité basale du « grain de beauté ».

Les Naevi Communs ou « grain de beauté », comme cela a été mentionné précédemment, sont des lésions pigmentées, siège d'une prolifération mélanocytaire bénigne épidermique et/ou dermique. Ces grains de beauté peuvent être congénitaux (rares), mais ils apparaissent et se développent en général au cours de la vie, en particulier lors de l'adolescence. Dans la majorité des cas, ces amas naissant de mélanocytes se stabilisent rapidement car les mélanocytes entrent dans un état de sénescence et s'arrêtent de proliférer. Dans le cas du mélanocyte naevique cette sénescence, est induite par un oncogène (pour revue, (Kaplon et al. 2014)). On parle alors de d'OIS (Oncogene-induced senescence)², un programme de suppression tumorale: en réponse à un stress permanent tel que celui induit par un oncogène³, une cellule est capable d'activer des voies de signalisation dépendantes de gènes suppresseurs de tumeur⁴ qui vont promouvoir un arrêt de la prolifération cellulaire pour compenser l'effet premier de l'oncogène (Serrano et al. 1997).

Les naevi bénins ont été les premières lésions chez l'Homme qui ont permis de mettre en évidence que l'OIS représentait une barrière pour la progression de pathologies (Gray-Schopfer et al. 2006, Michaloglou et al. 2005). Trois différentes études ont montré dans les années 2000 que des formes oncogéniques de BRAF et NRAS sont respectivement retrouvées dans 70% et 10% des naevi communs de manière exclusive (Davies et al. 2002, Pollock et al. 2003, Yazdi et al. 2003). Alors que la présence de mutations oncogéniques de BRAF dans des naevi est associée à un état de prolifération très bas souvent maintenu durant des dizaines d'années (Mooi and Peeper 2006, Pollock et al. 2003), il existe des phénomènes d'échappement. Certains naevi vont réussir à échapper à l'OIS, proliférer, et donner naissance à une lésion de type mélanome : cette progression ne peut avoir lieu qu'en présence d'une ou plusieurs altérations additionnelles qui

²L'OIS est considéré comme un modèle de sénescence prématurée si l'on se réfère à la sénescence classique qui marque la limite de répliation d'une cellule ou « Hayflick limit » (Hayflick, 1965).

³Les oncogènes appartiennent à une catégorie de gènes qui, lorsqu'ils subissent des altérations (mutations, amplification, etc), codent pour des oncoprotéines favorisant la prolifération anormale des cellules et donc la survenue de cancers.

⁴Les gènes suppresseurs de tumeurs appartiennent à une catégorie de gènes codant pour des protéines qui régulent négativement la prolifération cellulaire.

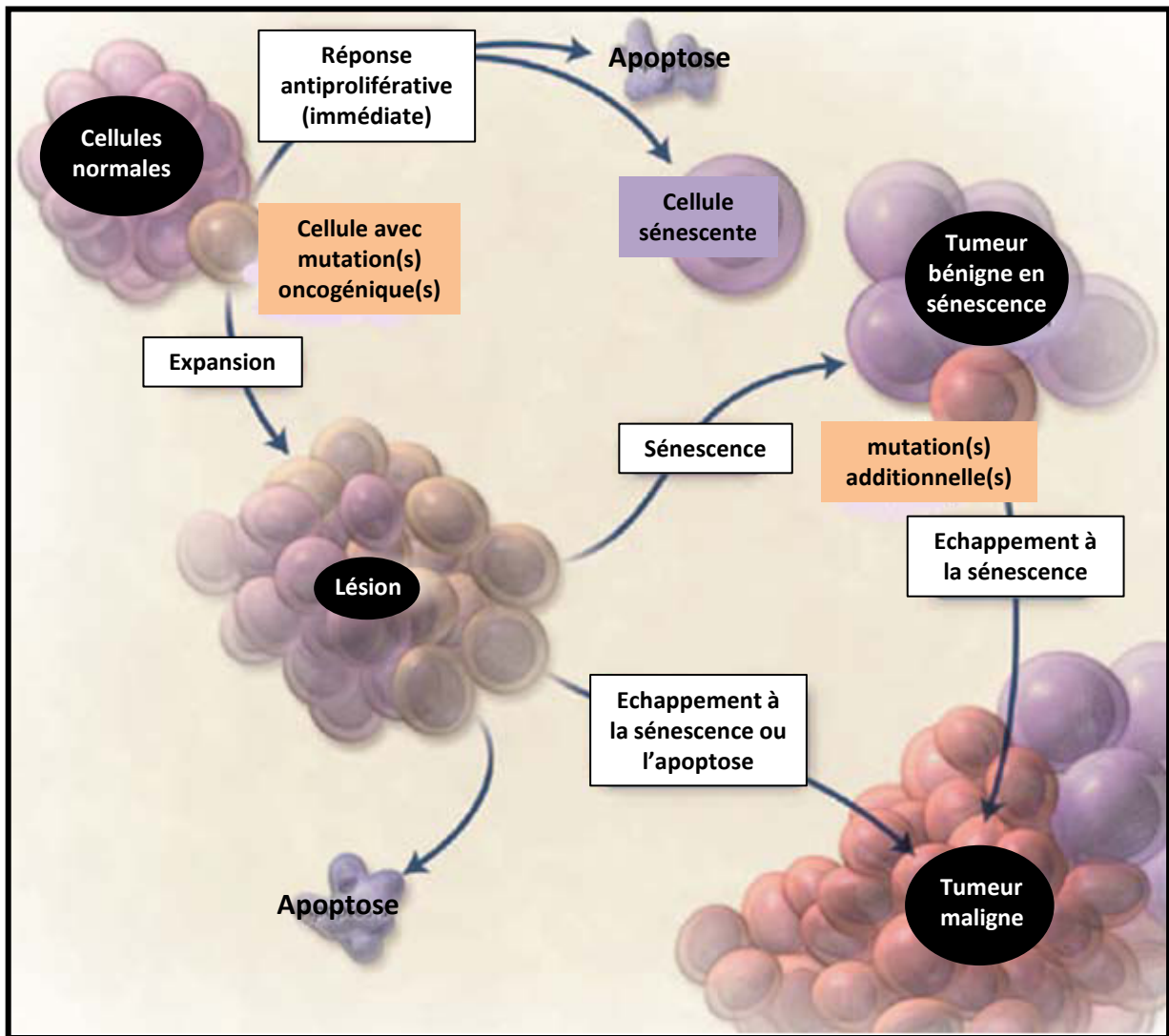


Figure 3. Modèle de progression tumorale.

Après l'acquisition d'une ou plusieurs mutations oncogéniques, les cellules « saines » peuvent s'engager dans deux types de réponses : une réponse antiproliférative (sénescence ou apoptose), ou une réponse hyperproliférative à l'origine de lésion par nécessairement maligne (cas des naevi en sénescence). Au stade de la réponse hyperproliférative les programmes d'apoptose ou de sénescence peuvent encore être activés, mais si ce n'est pas le cas, les cellules continuent de proliférer en même temps qu'elles acquièrent d'autres évènements génétiques et forment alors une lésion maligne. D'après Mooi and Peeper, 2006.

touchent principalement des gènes suppresseurs de tumeur ou oncogènes, et qui abolissent l'OIS des mélanocytes naeviques (Figure 3). Ces évènements sont heureusement rares, et seront décrits par la suite (cf. partie I.C.1.b).

Ainsi, la mutation de l'oncogène BRAF ou NRAS est un événement précoce dans le développement du mélanome mais n'est pas suffisante pour l'induire seule. A noter que **le naevus est une étape facultative** dans la transformation maligne du mélanocyte, 75% des mélanomes apparaissant de novo.

3. Différents types de Mélanomes.

Il existe plusieurs types de mélanome, classés selon leur agressivité, leur zone et leur cause d'apparition (Porras and Cockerell 1997, Scolyer et al. 2011).

a. Le mélanome superficiel extensif ou SSM (pour Superficial Spreading Melanoma).

C'est la forme la plus commune de mélanome des populations caucasiennes puisqu'elle correspond à plus de **70 à 80%** des cas détectés. Son développement est souvent lié à des épisodes répétés d'expositions solaires intenses, et intervient dans une moyenne d'âge de 50 ans. Le SSM s'étend horizontalement le long de la base de l'épiderme avant de pénétrer en profondeur dans le derme et l'hypoderme.

b. Le mélanome nodulaire.

C'est la forme de mélanome la plus agressive : il présente une croissance rapide et progresse presque directement en profondeur (très peu de croissance radiale, faible diamètre). Il peut être difficile à diagnostiquer mais des signes tels que l'ulcération et le saignement sont très caractéristiques. Il représente **10 à 20%** des mélanomes des populations caucasiennes, et peut survenir à tout âge.

c. Le mélanome de Dubreuilh ou LMM (pour Lentigo Malignant Melanoma).

C'est une forme de mélanome spécifique des personnes âgées (moyenne d'âge de 80 ans), et des zones de grandes surfaces d'exposition chronique au soleil (visage ou avant-bras). Il s'agit d'une forme plus rare de mélanome (représentant **5%** des mélanomes), et parmi les moins agressifs.

d. Le mélanome acral-lentigineux ou ALM (pour Acral Lentiginous Melanoma).

Il se développe de façon majoritaire dans les paumes des mains, les plantes des pieds, ou encore sous les ongles. Cette forme de mélanome n'est pas liée à l'exposition aux UVs. Il s'agit de la forme de mélanome la plus courante pour les populations asiatiques et africaines avec 35 à 65% des cas, mais ne représente que 5% des mélanomes pour les populations caucasiennes.

e. Les mélanomes des muqueuses et uvéaux (ou choroïdiens) : mélanomes « non-cutanés ».

Ce sont des formes rares de mélanome qui représentent moins de 5 % des cas. Les mélanomes des muqueuses se développent dans la cavité buccale, le vagin, la vulve, le nasopharynx, ou les sinus, et ne sont pas liés à l'exposition solaire. Les mélanomes uvéaux se développent au niveau de l'uvée de l'œil (couche supérieure qui recouvre la rétine et le corps vitré, comprenant la choroïde située à l'arrière, ainsi que le corps ciliaire et l'iris à l'avant), et bien que les mêmes facteurs de risque que les mélanomes cutanés y soient associés (couleur de peau, des yeux, et cheveux : phototype), ils ne sont absolument pas liés à l'exposition solaire !

Gènes	Altérations	Néoplasmes affectés	Gènes	Altérations	Sous types de mélanomes
BRAF (~60%)	mutation (mutuellement exclusive avec celles de NRAS)	mélanome Non CSD , CSD, spitzoïde, naevi acquis	TP53 (10-20%)		mélanome CSD
NRAS (15-30%)	mutation	mélanome acral, des muqueuses, CSD et Non CSD, naevi congénitaux.	PTEN (5-20%)		mélanome Non CSD, acral, mucosal
KIT	mutation, amplification	mélanome acral, des muqueuses, CSD.	CDKN2A(30%) (38%)	mutation délétion	mélanome CSD, acral, mucosal, spitzoïde
GNAQ	mutation	mélanome uvéal	RASEF	Hypermétylation promoteur	
GNA11	mutation	mélanome uvéal	SMARCA4	mutation, délétion	indéterminé
ALK	fusions de kinase	mélanome spitzoïde	NF1	mutation, délétion	mélanome CSD
ROS1	fusions de kinase	mélanome spitzoïde	ARID1/2	mutation, délétion	indéterminé
NTRK1	fusions de kinase	mélanome spitzoïde	BAP1	mutation, délétion	mélanome uvéal
RET	fusions de kinase	mélanome spitzoïde	MMP8	mutation	indéterminé
MITF	amplification	mélanome CSD , Non CSD , acral, spitzoïde, naevi acquis	TRRAP	mutation	indéterminé
AKT3	surexpression	indéterminé	GRIN2A	mutation	indéterminé
CCND1	amplification	mélanome acral, des muqueuses, CSD	SF3B1	mutation	Mélanome uvéal
CDK4	amplification, mutation	mélanome acral, des muqueuses	STK19	mutation	indéterminé
TERT	mutation promoteur, amplification	Indéterminé (pour mutation), mélanome acral (pour amplification)	PPP6C	mutation	indéterminé
RAC1	mutation	indéterminé	PREX2	mutation	indéterminé
EZH2	mutation	indéterminé	GRM3	mutation	indéterminé
CTNNB1	mutation	indéterminé	ERBB4	mutation	indéterminé
MEK1/2	mutation	indéterminé			

Tableau 3. Les altérations génétiques associées au mélanome. D'après Hodis et al, 2012 et Bastian 2015.

CSD= Chronic Sun Damage. Altérations oncogéniques principales en vert; Altérations oncogéniques secondaires gains de fonction en bleu, perte de fonction en rose, aux fonctions inconnues et en cours d'investigation en orange.

B. LE MELANOME : UN CANCER A LARGE STATUT MUTATIONNEL

1. L'initiation de la transformation du mélanocyte.

L'initiation du mélanome (ou mélanomagenèse) est finement orchestrée. Elle met en jeu de multiples changements aberrants en faveur de processus pro-tumoraux, et/ou au contraire, au dépend des processus anti-tumoraux tels que les voies de mort cellulaire ou l'OIS précédemment décrite. Les causes de ces modifications aberrantes sont multiples, et résultent d'altérations de séquences ADN (mutations génétiques) ou d'altération de l'expression des gènes (régulation épigénétique). Les événements génétiques à l'origine du mélanome sont nombreux et complexes. Cette sous-partie a pour objectif de résumer les grandes voies, et les gènes qui les animent (Tableau 3), mis en jeu dans les mélanomes, principalement cutanés.

a. Quelques modifications génétiques à l'origine de la transformation du mélanocyte.

Favoriser les processus pro-tumoraux.

Dans le mélanome l'activation oncogénique prédominante touche l'oncogène RAS et les effecteurs de ses deux grandes voies de signalisation cellulaire impliquées dans la survie et la prolifération : la **voie RAF-MAPK kinase-ERK (RAF-MEK-ERK)** et la **voie PI3K-AKTAKT** (Figure 4). L'importance de ces deux voies est mise en évidence par l'existence d'altérations génétiques qui activent chacune d'entre elles, indépendamment l'une de l'autre. Nous verrons au cours du chapitre III que ces deux voies jouent également un rôle crucial dans les mécanismes de résistances aux thérapies ciblées du mélanome (décrites dans le chapitre II).

La voie RAF-MAPK kinase-ERK (RAF-MEK-ERK).

Cette voie de signalisation est impliquée principalement dans la survie et dans la prolifération cellulaire, mais également dans la différenciation mélanocytaire. Elle est régulée par l'activation des récepteurs tyrosine-kinases et des récepteurs couplés aux protéines G (Wellbrock et al. 2004). L'activation de ces récepteurs par des facteurs de croissance, des cytokines ou encore des hormones, entraîne l'activation des petites protéines G RAS ancrées à la surface interne de la membrane plasmique. Une fois activée, la protéine RAS recrute les protéines de la famille RAF qui forment alors des homo- ou hétéro-dimères, indispensables à leur activation (Farrar et al. 1996, Luo et al. 1996, Rushworth et al. 2006), qui activent à leur tour les protéines MEK1 et MEK2 (pour mitogen-activated protein kinase (MAPK)). Ces dernières MAPKs activent les kinases ERK1 et ERK2 qui transloquent au noyau et régulent la transcription de gènes impliqués dans les voies de signalisation décrites ci-dessus (Figure 5). Ainsi des signaux externes à la cellule sont transduits jusque dans le noyau cellulaire.

Dans les mélanocytes sains, cette voie de signalisation cellulaire est activée suite à l'action de facteurs de croissance tels que le FGF (fibroblast growth factor), le SCF (stem cell factor) ou encore le HGF (hepatocyte growth factor). Dans un contexte physiologique, l'état mitotique des mélanocytes est maintenu à un niveau relativement faible car l'activation de la voie RAF-MEK-ERK par l'un de ces facteurs de croissance reste faible et transitoire.

Dans le contexte pathologique du mélanome, cette voie est hyper-activée: en effet plus de 90% des mélanomes humains présentent une hyper-activation de la kinase ERK (Cohen C. et al. 2002). Une cause fréquente de cette hyper-activation dans le mélanome est la mutation somatique de **l'oncogène RAS** : le premier oncogène à avoir été identifié comme impliqué dans le mélanome

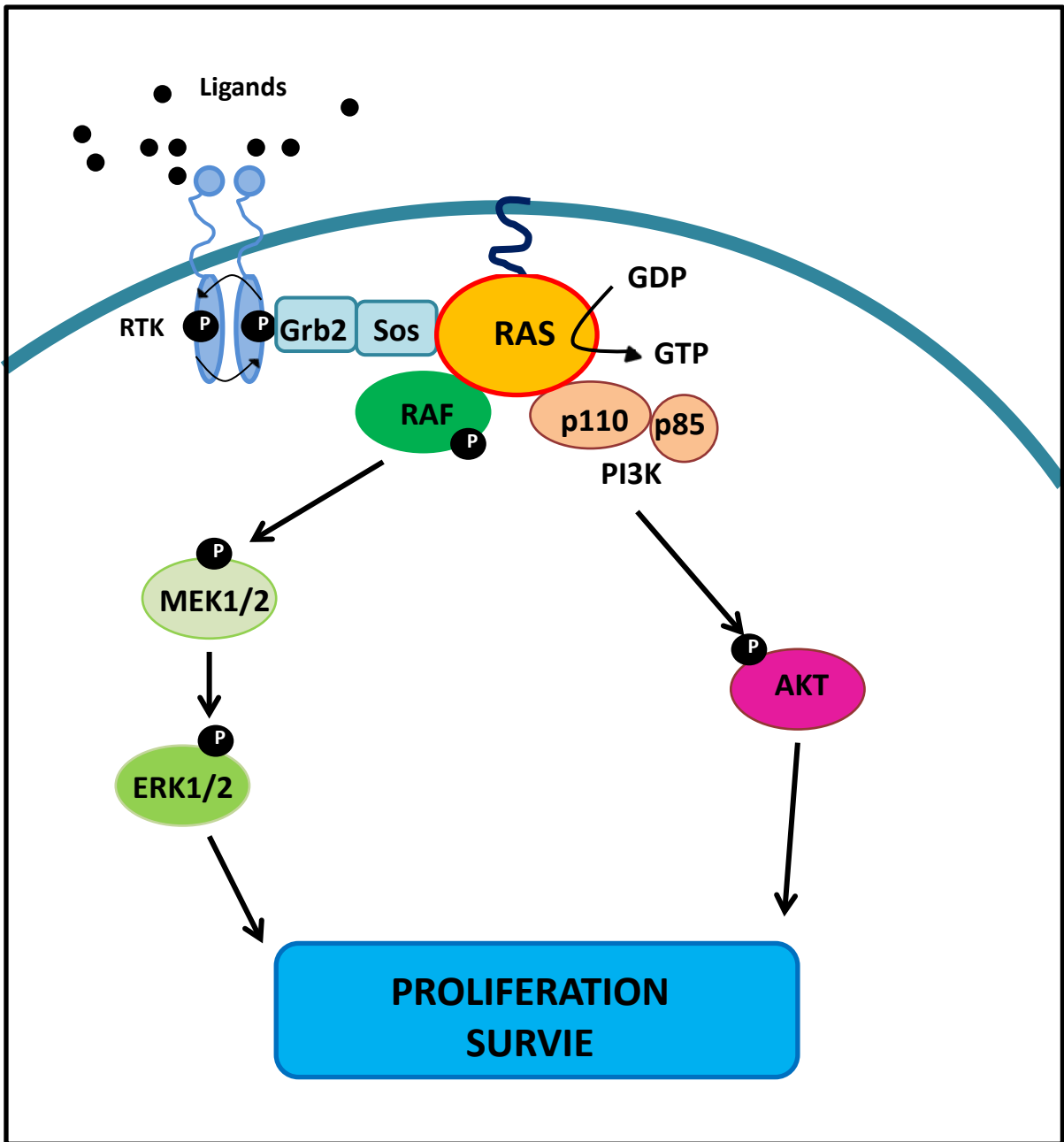


Figure 4. La voie RTK-RAS impliquée dans le développement et la progression des mélanomes.

Dans le mélanome, la sur-activation des récepteurs tyrosine kinase (RTK) par auto-phosphorylation, suite à la fixation de ses ligands, entraîne le recrutement d'une protéine adaptatrice Grb2 qui active Sos. Ce facteur d'échange active alors la GTPase RAS qui peut activer à son tour la PI3K ou les kinases RAFs. Ainsi, la sur-activation du module signalétique RTK-RAS dans le mélanome conduit à l'hyper-activation de la voie RAF-MEK-ERK et à celle de la voie PI3K-AKT. Ces deux voies jouent un rôle clé dans la survie et la prolifération cellulaire en activant la transcription de gènes de survie via des facteurs de transcriptions et en amplifiant les signaux mitochondriaux de survie via la régulation de protéines pro- ou anti-apoptotiques. D'après Castellano *et al* 2011.

(Albino et al. 1984, Padua et al. 1985). Alors que les isoformes KRAS et HRAS sont rarement mutés dans les mélanomes, la **mutation de NRAS** est retrouvée dans **15 à 30% des cas** de mélanome, la plus retrouvée étant la mutation NRASQ61L (substitution d'une glutamine par une leucine) (Brose et al. 2002, Hodis et al. 2012) en particulier dans les mélanomes associés aux expositions solaires chroniques (CSD, pour Chronic Sun Damage) (Whiteman et al. 2011). La seconde cause d'hyper-activation de la voie RAF-MEK-ERK, et la plus fréquente, est la mutation d'un deuxième acteur de cette voie : **l'oncogène BRAF**, un des trois isoformes (avec ARAF et CRAF) du **gène RAF** qui code pour une famille de sérine/thréonine kinases cytoplasmiques régulées par RAS (Avruch et al. 2001, Kolch 2000, Peyssonnaud and Eychene 2001). La **mutation somatique de BRAF** est présente dans un peu plus de 60% des mélanomes les plus communs (mélanomes superficiels extensifs ou SSM, 70 à 80% des mélanomes), à l'instar de la **mutation BRAF^{V600}** (substitution d'une valine par un acide glutamique (V600E, environ 90% des cas), une lysine (V600K, 10-20% des cas), un acide aspartique (V600D), ou encore une arginine (V600R))(Davies et al. 2002). La mutation BRAF^{V600E}, comme les autres mutations V600K/D/R de BRAF, conduit à une activation constitutive de la kinase, capable d'activer les MEKs (et par conséquent les kinases ERK). Cette mutation est également retrouvée dans 30 à 50% des cancers de la thyroïde ou encore dans 10% des cancers colorectaux (Meador and Pao 2015). Dans le mélanome, la résultante de ces mutations BRAF^{V600} est une activation constitutive de la voie RAF-MEK-ERK (Davies et al. 2002, Gray-Schopfer et al. 2005). Cette substitution V600 par un de ces 4 résidus plus volumineux et chargés serait à l'origine de cette activation constitutive (Wan et al. 2004). Une conséquence du niveau élevé des kinases ERKs suite à la mutation BRAF^{V600}, est un rétrocontrôle négatif exacerbé des kinases ERKs sur la signalisation RTK-RAS à différents niveaux : en régulant directement les RTKs (EGFR, MET, etc) ou les RAFs, ou encore via des régulateurs de RAS (SOS1, NF1)(pour revue, (Lito et al. 2013). Ce rétrocontrôle négatif est fréquemment à l'origine d'un niveau faible de la forme RAS active (RAS-GTP) dans les cellules BRAF mutantes (Lito et al. 2012), en accord avec l'activation RAS-indépendante de la voie RAF-MEK-ERK par BRAF^{V600}. Contrairement à CRAF et la forme sauvage de BRAF, l'activité de BRAF^{V600} n'est pas dépendante d'une dimérisation (Poulikakos et al. 2011) ou autrement dit d'une régulation en amont. BRAF^{V600} échappe ainsi au rétrocontrôle négatif des ERKs (Pratilas et al. 2009), et assure l'activation permanente de la signalisation ERK dans les cellules de mélanome, malgré l'existence du rétrocontrôle ERK-dépendant par conséquent amplifié (Figure 6).

Les mutations activatrices de NRAS et BRAF peuvent coexister au sein d'une même tumeur (ou d'un même patient atteint de mélanome), en revanche il a été démontré qu'elles sont exclusives au niveau d'une unique et même cellule (Sensi et al. 2006). Leur coexpression de manière expérimentale *in vitro* montre même un effet létal, suggérant la sélection des cellules simples mutantes (Petti et al. 2006). D'autre part, si les mutations de NRAS et BRAF représentent 80% des mélanomes et que ces derniers sont associés aux effets néfastes des UVs, ces mutations ne sont de manière générale pas liées aux UVs (Albino et al. 1989, Davies et al. 2002, Hocker and Tsao 2007, Hodis et al. 2012).

D'autres gènes sont impliqués dans l'hyper-activation d'ERK mais à moindre fréquence:

Par exemple, dans certains cas la mutation activatrice ou l'amplification du **gène KIT** entraîne l'hyper-activation de la kinase ERK (Willmore-Payne et al. 2005). Le gène *KIT*, codant pour un récepteur de croissance à activité tyrosine-kinase tel que c-KIT (récepteur du SCF) (Goel et al.

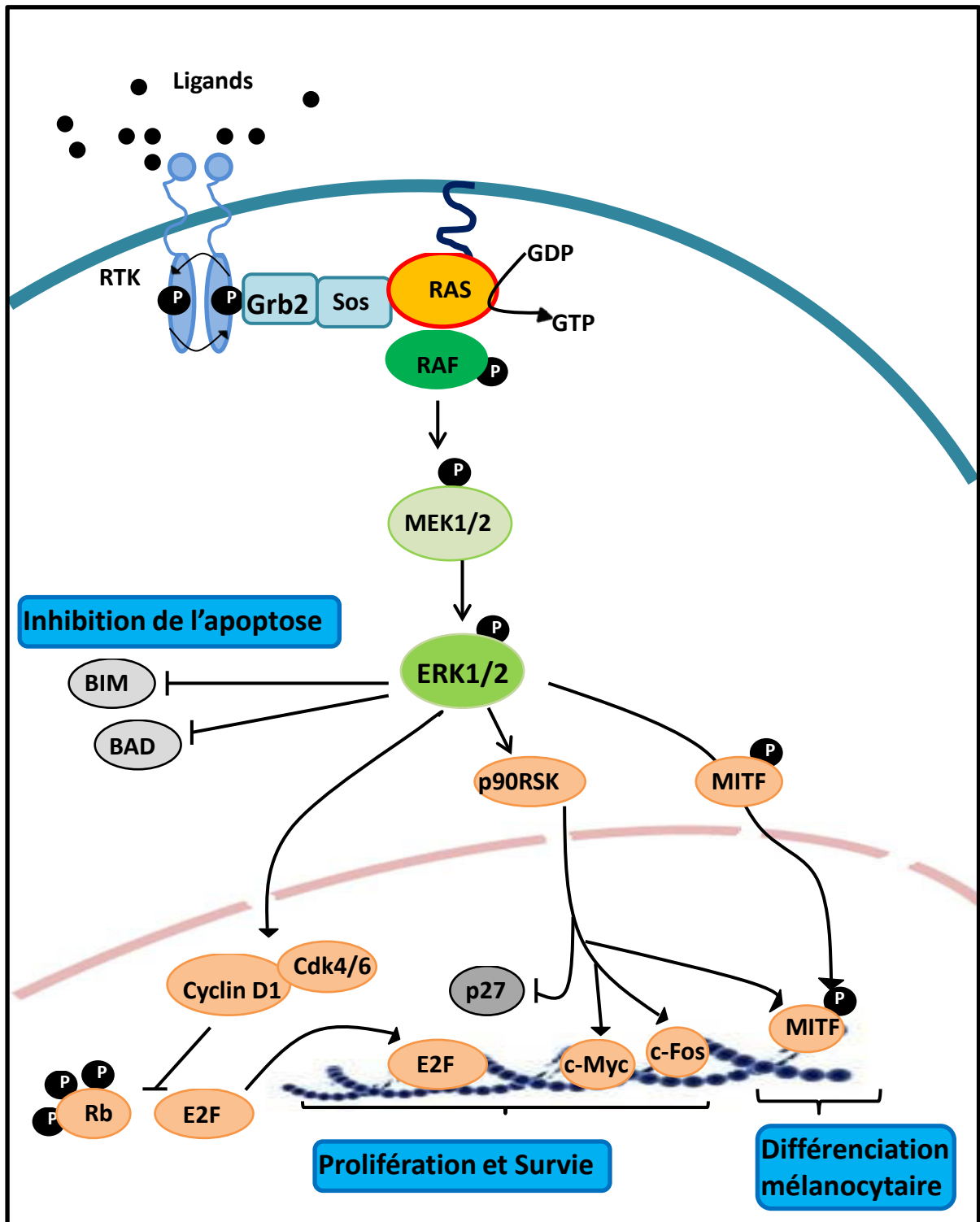


Figure 5. La voie de signalisation RAF-MAPK kinase-ERK.

La voie de signalisation RAF-MAPK kinase-ERK connecte des récepteurs membranaires à la signalisation intracellulaire. L'activation des récepteurs tyrosine kinase (RTK) par leurs ligands conduit à l'activation de RAS qui phosphoryle en cascade les kinases RAF, MEK et ERK. Dans le cytoplasme ERK active des acteurs des programmes de survie, de prolifération, de différenciation (cycline D1, MITF...) et inhibe des acteurs de l'arrêt du cycle cellulaire et de l'apoptose (BIM, p27...). D'après Sullivan et Falherty, 2013; Chin et al 2003.

2006, Tsao et al. 2004), reste peu fréquemment altéré dans le mélanome avec une mutation de *KIT* retrouvée dans moins de 3% des mélanomes. Cependant la mutation ou l'amplification de ce gène *KIT* est caractéristique des mélanomes acraux (36%), muqueux (39%), dans lesquels *BRAF* et *NRAS* sont généralement présents sous leur forme sauvage (Curtin et al. 2006).

Des études sur des fibroblastes sains et des mélanomes suggèrent également le rôle de gènes codant pour des protéines de la famille *RHO*⁵ comme oncogènes dans le mélanome. En effet, une première étude montre l'importance des formes GTP-*RAC1* et GTP-*CDC42* dans la protection des fibroblastes vis-à-vis de l'anoïkis (mort par détachement cellulaire), médiée par l'activation de la voie *PI3K-AKT* puis la voie *RAF-MEK-ERK*; la résistance à l'anoïkis étant un phénomène cellulaire impliqué lors de la transformation des mélanocytes (Fofaria and Srivastava 2014, Goldstein N. B. et al. 2009, Oba-Shinjo et al. 2006).

Deux autres études ont mis en évidence dans deux différentes cohortes de mélanome une mutation activatrice du gène *RAC1* (*RAC1P29S*) représentant la troisième mutation « hot-spot » (point chaud) activatrice après celles des gènes *BRAF* et *NRAS*, et la première mutation « hot-spot » activatrice résultante des dommages induits par les UVB (Hodis et al. 2012, Krauthammer et al. 2012). Une de ces deux études met également en évidence la présence de mutation activatrice du gène *CDC42* (Hodis et al. 2012, Krauthammer et al. 2012).

La voie PI3K-AKT.

Cette voie de signalisation cellulaire régule la prolifération, la survie, la migration, l'invasion ou encore le métabolisme énergétique cellulaire, autant de processus exacerbés dans la cellule tumorale (Hanahan and Weinberg 2011)(Figure 7). La voie *PI3K-AKT* est régulée par la stimulation de récepteurs tyrosine-kinases par des facteurs mitogéniques, ou l'engagement d'autres récepteurs de la matrice tels que les intégrines qui vont recruter la phosphoinositides-3-OH kinase (*PI3K*). La *PI3K* est composée d'une sous unité régulatrice p85 et d'une sous unité catalytique p110. Une fois activée suite à sa liaison directe ou indirecte (via des protéines adaptatrices) aux *RTK* activés par leurs ligands, la sous unité p85 active la sous unité catalytique p110, la *PI3K* étant alors activée. L'activation de la *PI3K* peut également être indépendante de sa sous unité p85 : c'est le cas lorsque des protéines adaptatrices qui lient les *RTKs* activent *RAS* qui, à son tour, active directement la sous unité p110 de la *PI3K* (pour revue, (Castellano and Downward 2011)).

Une fois activée, la *PI3K* phosphoryle les lipides membranaires *PIP₂* (*PtdIns(4,5)P₂*) en *PIP₃* (*PtdIns(3,4,5)P₃*). Les *PIP₃*, en tant que messagers secondaires de la signalisation *PI3K-AKT*, servent de point d'ancrage pour la protéine *AKT* (ou *PKB*) et *PKD1*. La protéine *AKT* est une serine/thréonine kinase dont les substrats sont nombreux et impliqués dans la prolifération, la survie, la migration, l'invasion, la synthèse protéique et le métabolisme énergétique cellulaire. Son recrutement à la membrane par interaction directe avec les *PIP₃* via son domaine PH (plextrin homology) est indispensable à sa complète activation après phosphorylation sur ses résidus Thréonine 308 (*Thr308*) et Sérine 473 (*Ser473*). Dans un premier temps, le résidu *Thr308* est phosphorylé par la kinase dépendante des 3-phosphoinositides *PKD1*. Ensuite, *AKT* est phosphorylée au niveau de son résidu *Ser473* par une kinase *PKD2* telle que *mTORC2* ((Sarbasov et al. 2005) ou *ILK* (McDonald et al. 2008). Au contraire de celle de la *PI3K*, l'intervention d'une lipid-phosphatase *PTEN* (pour phosphate and tensin homologue) empêche l'activation d'*AKT*.

PTEN déphosphoryle les *PIP₃* en *PIP₂*, et prévient ainsi l'interaction d'*AKT* avec les *PIP₃*, nécessaire à son activation (Datta et al. 1999).

⁵ Famille des *RHO GTP-ase* : impliquées dans l'adhésion, la migration et l'invasion cellulaire (Jaffe et al. 2005).

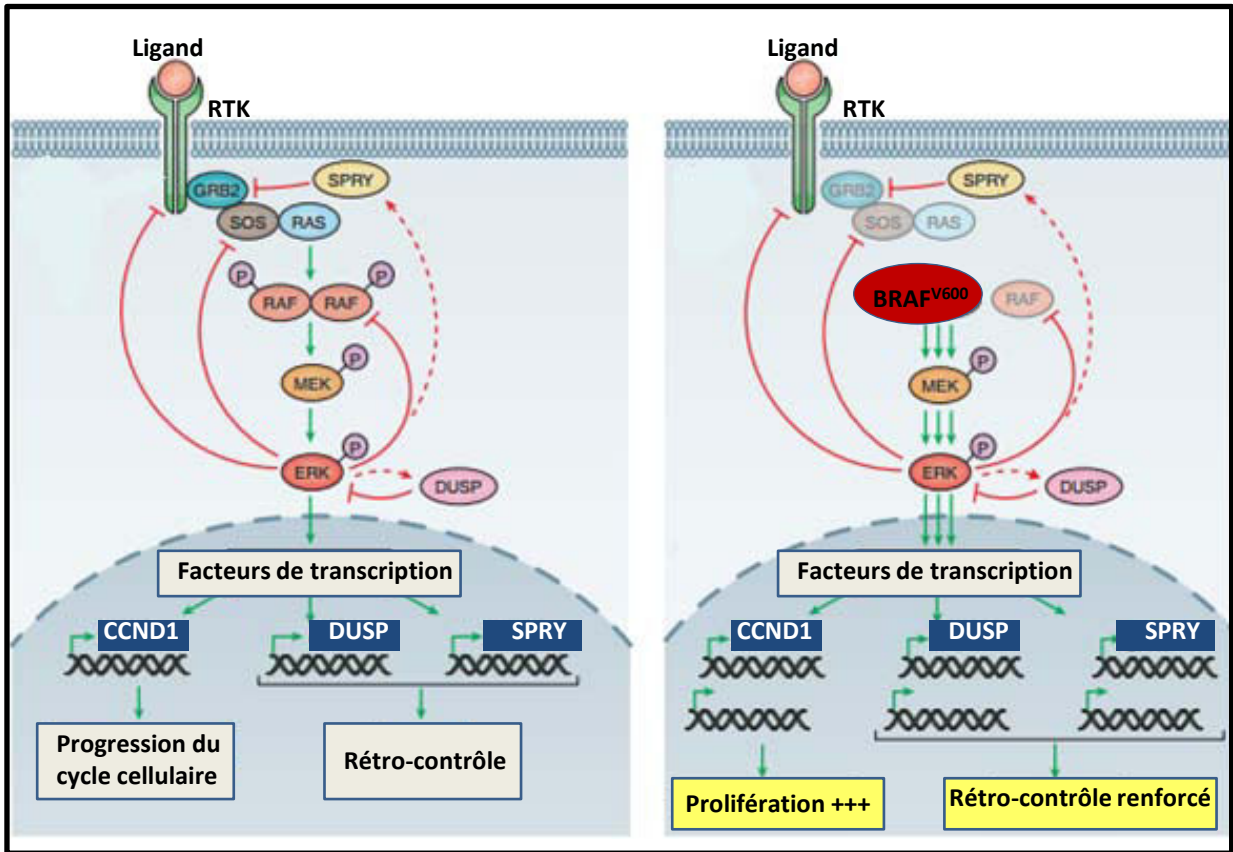


Figure 6. Activation constitutive des kinases ERKs en présence de l'oncoprotéine BRAF^{V600}.

Signalisation ERK en conditions physiologiques ou dans des mélanomes portant la mutation BRAF^{V600}.

(a) Suite à l'activation des RTKs par leurs ligands, la cascade RAS-MEK-ERK est activée. Les kinases ERKs vont activer plusieurs facteurs de transcriptions contrôlant l'expression de gènes impliqués dans la progression du cycle cellulaire (tel que le gène CCND1 codant pour la cyclin D1), et la prolifération cellulaire. Les kinases ERK inactivent directement des acteurs de la signalisation RTK-RAS-RAF par phosphorylation (rétrocontrôle négatif directe), et régulent l'expression de gènes codant pour des protéines (DUSP, une phosphatase spécifique des ERKs, et SPRY, perturbe l'interaction SOS-GRB2) qui interviennent également dans le rétrocontrôle négatif de cette signalisation. (b) Dans les mélanomes portant la mutation BRAF^{V600}, le rétrocontrôle négatif exercé par les kinases ERK, et les protéines qu'elles régulent, est exacerbé suite à l'hyperactivation de la signalisation MEK-ERK. Cependant, les monomères BRAF^{V600} actifs échappent à ce rétrocontrôle: le résultat est un maintien de l'hyperactivation des ERK malgré la suppression de la signalisation RTK-RAS.

D'après Lito et al, 2013.

Comme la voie RAF-MEK-ERK, la voie PI3K-AKT a été retrouvée hyper-activée dans de nombreux cas de mélanome. Cette hyper-activation s'explique par la possibilité d'altérations génétiques de nombreux de ses effecteurs retrouvées dans 41% des mélanomes (Shull et al. 2012) : mutation de la PI3K dans 3% des mélanomes métastatiques (Omholt et al. 2006), perte de fonction de PTEN dans 5% à 20% des mélanomes (Shull et al. 2012, Wu H. et al. 2003), surexpression de la kinase AKT dans plus de 60% des mélanomes (Stahl et al. 2004).

Contrecarrer les processus anti-tumoraux.

L'initiation de la transformation maligne des mélanocytes fait également intervenir des changements aberrants au dépend des processus anti-tumoraux de surveillance dépendants de suppresseurs de tumeur impliqués dans le cycle cellulaire ou la mort cellulaire.

Comme cela a été décrit précédemment (cf. partie A.1.c de ce chapitre), le gène suppresseur de tumeur *CDKN2A* contrôle deux protéines inhibitrices de la prolifération cellulaire : p16^{INK4a} impliquée dans l'entrée en sénescence de la cellule, et p14^{ARF} impliquée dans la mort cellulaire dépendante du suppresseur de tumeur p53. La perte de fonction du locus p16^{INK4a}/ p14^{ARF} est, avec l'altération de la voie RAF-MEK-ERK, un événement signature du mélanome : elle est retrouvée dans 50% des tumeurs primaires et dans presque la totalité des lignées cellulaires de mélanome (Flores et al. 1996, Walker et al. 1998). La **mutation somatique de *CDKN2A*** est retrouvée dans 29% des mélanomes (mutation p16^{INK4a} dans 19% des cas, et mutation de p14^{ARF} dans 12% des cas) (Hodis et al. 2012). De plus, la **mutation de l'oncogène *CDK4***, qui code pour la protéine CDK4 agissant en aval de p16^{INK4a}, entraîne une insensibilité de la protéine à l'action inhibitrice de la protéine p16^{INK4a} ; si les altérations du gène *CDK4* sont beaucoup moins fréquentes (environ 3% des cas) que celles de *CDKN2A*, les patients qui en sont porteurs ont une symptomatologie similaire à ceux qui portent la mutation de *CDKN2A* (Goldstein A. M. et al. 2000).

La fonction oncosuppressive d'acteurs de la voie régulé par *CDKN2A* tels que p53, est également altérée dans le mélanome. La protéine p53, codée par le **gène *TP53***, est indispensable au maintien de l'intégrité de la cellule et de ses composantes : elle est généralement nommée « gardienne du génome ». En effet, dans une cellule normale, en l'absence de stress il n'y a que très peu de p53 due à l'enzyme MDM2, une E3 ubiquitine ligase qui, en se fixant sur p53, induit sa dégradation. Dès lors que la cellule se retrouve en situation de stress (lésions de l'ADN, défauts dans le cycle ou le métabolisme cellulaire, etc.), l'association entre p53 et MDM2 est abolie, ce qui conduit à une augmentation de la quantité de p53 dans la cellule, et à l'activation de la transcription de ses gènes cibles. L'activation des gènes cibles de p53 conduit soit à l'arrêt du cycle cellulaire, qui permet de stimuler les mécanismes de réparation de la cellule, soit à la sénescence, soit à l'apoptose si les dommages subis par la cellule ne peuvent pas être réparés (Figure 8). Ainsi, lorsque le gène *TP53* est muté, l'intégrité cellulaire peut être compromise. Le gène suppresseur de tumeur *TP53* est retrouvé muté dans plus de la moitié des cancers humains tous types confondus (Feki and Irminger-Finger, 2004). Les six mutations « hot-spot » du gène *TP53* se localisent dans la région centrale de liaison à l'ADN, et entraînent une perte de fonction de la protéine se traduisant par l'incapacité de celle-ci à trans-activer ses gènes cibles (Kato S. et al. 2003). Cependant, d'autres mutants plus rares du gène sont à l'origine d'un gain de fonction de la protéine p53 (Cadwell and Zambetti 2001, Kato S. et al. 2003, Soussi and Wiman 2015), associés alors à un potentiel oncogénique de la protéine, et peuvent être à l'origine de propriétés invasives de cellules cancéreuses (Muller P. A. et al. 2009).

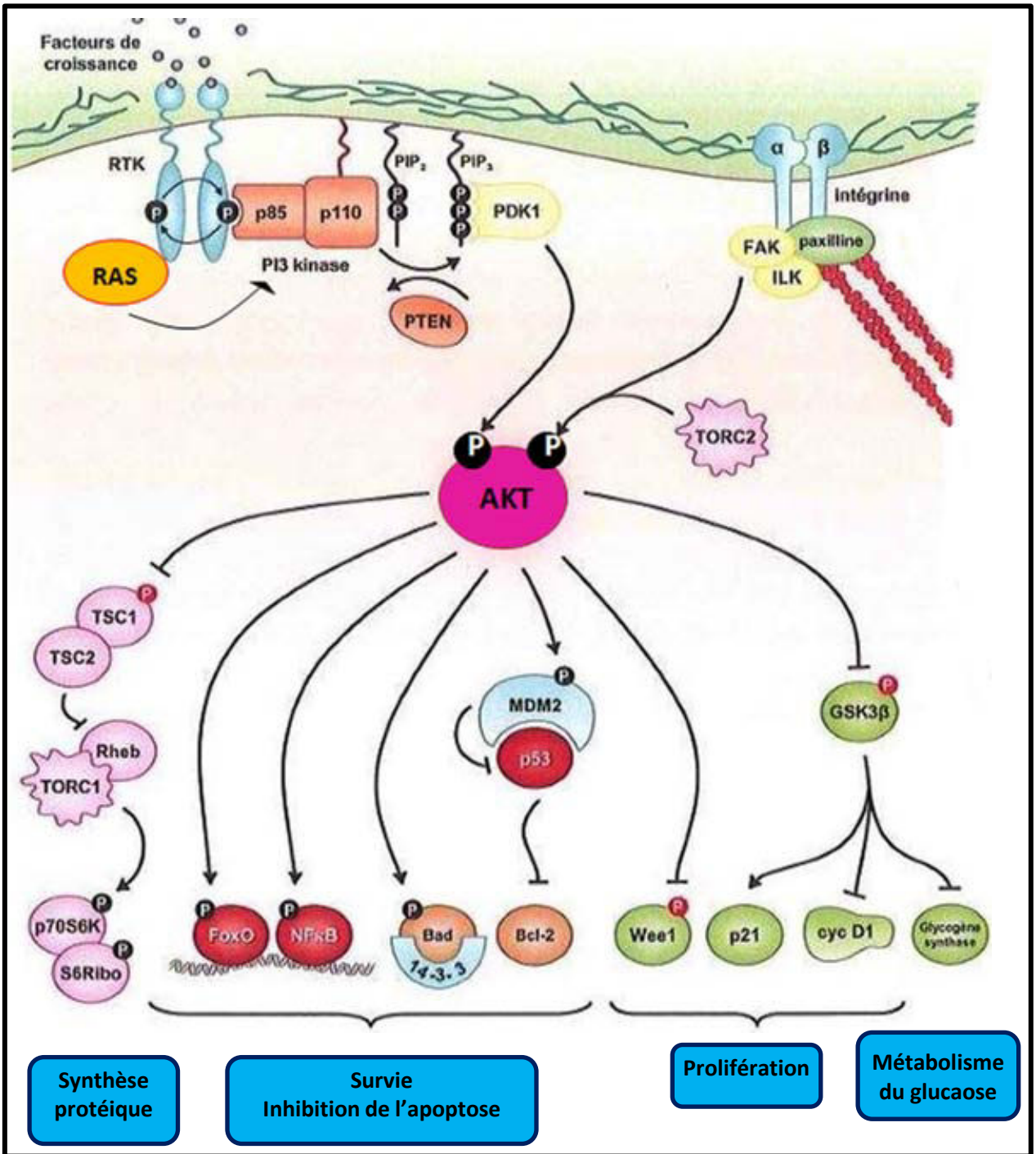


Figure 7. La voie de signalisation PI3K-AKT.

En réponse à l'activation des récepteurs tyrosine kinase (RTKs), la PI3K est activée. Elle convertie alors le phosphatidyl-inositol membranaire PIP₂ en PIP₃. Ce dernier permet le recrutement d'AKT à la membrane, nécessaire à son activation. Une fois activée, la kinase AKT est capable d'activer de nombreuses voie de signalisation qui favorise notamment la survie et la prolifération cellulaire. En activant MDM2 elle conduit à la dégradation du suppresseur de tumeur p53 et favorise la progression du cycle cellulaire et l'activation de facteurs anti-apoptotiques L'activité d'AKT est régulée par la phosphatase PTEN qui inhibe la conversion du PIP₂ en PIP₃ PI3K-dépendante.

D'après Vivanco et al, 2002, adapté par Fenouille N. 2011.

Dans le mélanome, le gène *TP53* n'est pas celui qui est majoritairement retrouvé muté. Cependant, plusieurs études ont montré que des mutations « perte de fonction » du gène *TP53* étaient présentes dans 10 à 20% des mélanomes, seule ou en présence d'autres mutations telles que *BRAF* ou *NRAS* (Albino et al. 1994, Zerp et al. 1999). Lorsque le gène *TP53* n'est pas muté dans le mélanome, la protéine p53 est déstabilisée par l'activation de la voie SPARC-AKT (Fenouille et al. 2011b), ou inactivée par la surexpression de ses régulateurs négatifs MDM2 ou MDM4 (dans une majorité de mélanomes cutanés)(Gembarska et al. 2012, Polsky et al. 2001), ou par des formes mutées de p14^{ARF} ou p16^{INK4a} (Box and Terzian 2008, Sharpless et al. 2001).

L'étude de Hodis et Chin évoquée précédemment, montre que 46% de mutations retrouvées dans les mélanomes (principalement cutanés) sont la signature d'effets mutagènes des UVA et/ou UVB : c'est le cas notamment des trois gènes que nous venons d'aborder : *TP53*, *CDKN2A* et *CDK4* représentent 30 à 50% de « mutations UVs »⁶.

Un gène évoqué précédemment a également son rôle dans la transformation maligne du mélanocyte et plus particulièrement dans l'acquisition du phénotype métastatique : le gène *MITF*, au cœur d'un ensemble de voies de signalisation contrôlant la prolifération, la différenciation, la morphologie et la survie du lignage mélanocytaire. Son niveau d'expression est finement régulé dans la vie du mélanocyte sain, mais également au cours de sa transformation maligne. Ainsi, 10 à 20% des mélanomes cutanés métastatiques présentent une amplification de *MITF* (Garraway et al. 2005).

Enfin, récemment, des études ont montré l'existence de mutations somatiques dans le promoteur du gène codant pour la TERT (pour telomerase revers transcriptase). Ces mutations entraînent une surexpression de l'enzyme dans de nombreuses cellules cancéreuses, dont les cellules de mélanome, qui a pour conséquence « d'immortaliser » ces cellules (Heidenreich et al. 2014).

Pour résumer, si de nombreux gènes sont impliqués dans la transformation maligne du mélanocyte, les études menées jusque là ont permis de montrer que les mélanomes qui se développent en l'absence de *NRAS* présentent presque systématiquement une mutation activatrice de *BRAF*, une altération désactivatrice du suppresseur de tumeur *PTEN*, ou les deux combinées. Dans le même sens, des tumeurs possédant une mutation oncogénique de *NRAS* présentent une forme sauvage de *BRAF* et de *PTEN* (Daniotti et al. 2004, Tsao et al. 2000, Tsao et al. 2004). Ces constats permettent de souligner l'importance de la voie RAF-MEK-ERK comme celle de la voie PI3K-AKT dans le développement d'un mélanome, et suggèrent la nécessité d'une coopération de ces deux voies dans la mélanomagenèse : *BRAF* et la PI3K étant activées toutes deux en aval de la protéine RAS, en présence d'une forme oncogénique de *NRAS* les mutations additionnelles des gènes *BRAF* ou *PTEN* ne sont pas nécessaires parce que les protéines pour lesquelles ils codent sont déjà activées en permanence. Au contraire, dans un contexte *NRAS* sauvage, la mutation de *PTEN* additionnée à celle de *BRAF* est requise pour stimuler la prolifération. Finalement, par sa régulation de RAF et de la PI3K, la mutation oncogénique de RAS transformerait plus efficacement les mélanocytes que celle de *BRAF*. Et pourtant, la mutation de *BRAF* est nettement plus prévalente que celle de RAS dans le mélanome.

⁶Les mutations caractérisées par la substitution d'une base (ou deux) cytosine par une base (ou deux respectivement) thymine (C→T ou CC→TT) au niveau de sites dipyrimidine, est appelée mutation à « signature UV » (Ikehata et al., 2011). Une explication à la moindre proportion des mutations à signature UV pour les oncogènes *NRAS* et *BRAF* serait que ces gènes possèdent moins de sites dipyrimidines, et par conséquent ont une faible probabilité de mutation à signature UV (Hocker et al., 2007).

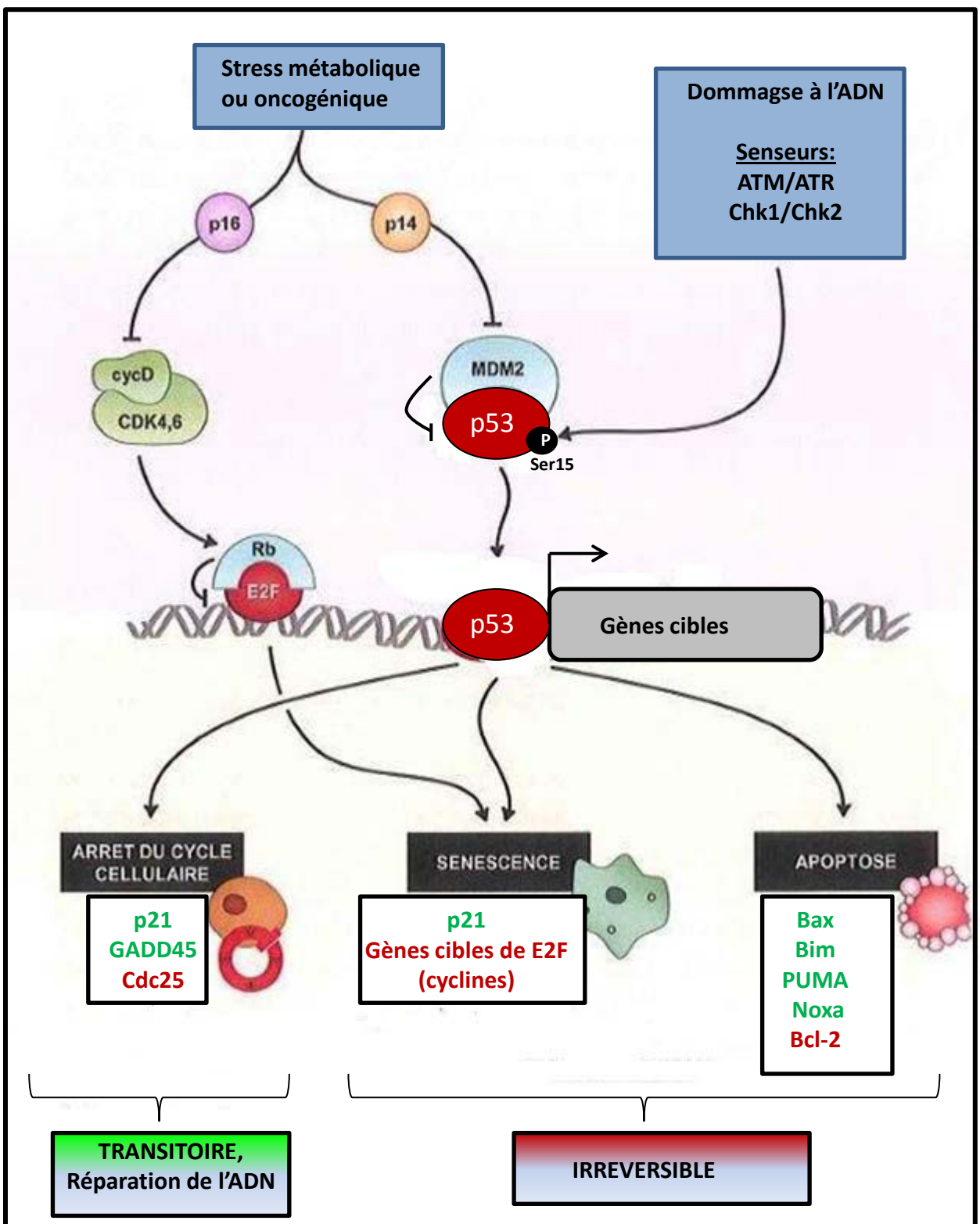


Figure 8. Le suppresseur de tumeur p53: « le gardien » du génome de la cellule.

La protéine p53 est activée lorsque la cellule subit un stress. Une fois activée, elle induit (en vert), ou réprime (en rouge), l'expression de différents gènes cibles impliqués dans le contrôle du cycle et de la survie cellulaire. En fonction de la nature et de l'intensité des dommages cellulaires, p53 allume ainsi des programmes spécifiques conduisant à l'arrêt transitoire ou définitif (sénescence) de la prolifération des cellules lésées, voire à leur mort par apoptose. D'après Yu et Zhang, 2005, adapté par Fenouille N. 2011.

Ceci suggère donc l'existence d'autres pressions génétiques, biologiques, ou environnementales entrant en jeu dans la progression du mélanome préférentiellement dans un contexte BRAF muté plutôt que NRAS muté.

b. Passage du mélanocyte au mélanome : collaboration nécessaire de plusieurs acteurs.

Les études menées jusqu'à aujourd'hui sur le mélanocyte, qu'il soit issu de naevus ou non, ont permis de mettre en évidence l'incapacité du mélanocyte à engendrer un mélanome sous la diction d'une seule aberration cellulaire (génétique ou épigénétique). Aucune des dérégulations d'oncogènes ou suppresseurs de tumeurs impliquées dans la mélanomagenèse décrites en partie précédemment n'est autonome. La transformation maligne précoce du mélanocyte nécessite une addition d'au moins deux événements cellulaires aberrants à l'origine de processus clés de la tumorigénicité : la **perte de contrôle du cycle cellulaire**, l'**insensibilité à la mort cellulaire**, l'échappement à l'état de sénescence, et la **capacité de métastaser**.

Comme cela a été décrit précédemment, les mélanocytes en sénescence induite par l'oncogène BRAF ou NRAS (OIS) qui forment des naevi bénins, réussissent dans certains cas à re-proliférer et progresser vers un mélanome malin. Cet engagement vers l'hyper-prolifération fait suite à la **levée de l'OIS par acquisition d'altération(s) génétique(s) ou épigénétique(s) additionnelle(s)**. Des études suggèrent que l'activation de la voie PI3K-AKT, en particulier dans un contexte de perte de fonction du suppresseur de tumeur PTEN, est un événement requis pour échapper à la sénescence induite par la mutation de BRAF au profit du développement de mélanome (Vredeveld et al. 2012). Une autre étude a montré dans un modèle murin génétiquement modifié que la mutation du gène *NF1* (retrouvée muté dans le mélanome) codant pour la neurofibrine (régulateur négatif de RAS), était capable de supprimer l'OIS dirigé par la mutation du gène BRAF, notamment en modulant l'activation de la voie PI3K-AKT. Cette suppression de l'OIS entraîne l'hyperprolifération des mélanocytes et initie le développement de mélanomes (Maertens et al. 2013). D'autre part, Bosenberg et son équipe ont récemment souligné l'importance et la nécessité de la coopération de plusieurs événements génétiques dans l'activation de la voie PI3K, conduisant à la mélanomagenèse dirigée par la mutation BRAF: l'inactivation combinée des gènes suppresseurs de tumeur *CDKN2A* et *LKB1* (codant pour un inhibiteur de mTORC1) dans des mélanocytes naeviques portant la mutation BRAF^{V600E} conduit au développement de mélanome suite à l'activation d'effecteurs de la voie PI3K tels que mTORC1/2 (régulateurs d'AKT) (Damsky et al. 2015).

En plus des altérations génétiques inactivatrices, les suppresseurs de tumeurs impliqués dans la mélanomagenèse peuvent être la cible d'altérations épigénétiques (Sarkar et al. 2015): la désactivation par répression transcriptionnelle secondaire à l'hyperméthylation du promoteur de nombreux suppresseurs de tumeurs tels que p16^{INK4a} ou p14^{ARF}, a largement été décrite dans le mélanome (Gao L. et al. 2013, Rothhammer and Bosserhoff 2007). Récemment, l'équipe de Peeper a démontré le rôle suffisant de la perte de fonction du gène *RASEF* par hyper-méthylation dans la mélanomagenèse suite à la levée de la sénescence induite par BRAF^{V600E} dans des naevi (Kaplon et al. 2014).

Concernant la mélanomagenèse dite « de novo », la perte de fonction du suppresseur de tumeur p16^{INK4a} est un événement qui s'associe le plus fréquemment à la mutation somatique BRAF^{V600E} (Daniotti et al. 2004, Yang G. et al. 2005); l'hyperactivation de NRAS dans un fond génétique déficient pour p16^{INK4a} permet aussi l'apparition de mélanomes spontanés chez la souris

(Ackermann et al. 2005). Bien que moins fréquente, la combinaison de la mutation activatrice de BRAF avec l'altération désactivatrice des suppresseurs de tumeur PTEN (Daniotti et al. 2004, Tsao et al. 2004) ou p53 (Goel et al. 2009, Yu et al. 2009) reste également redoutable dans la mélanomagenèse *de novo*.

Enfin, la mélanomagenèse dépend également de la coopération du mélanocyte portant une mutation oncogénique avec des acteurs externes tels que le soleil ou encore des cellules environnantes au sein de l'épiderme. Par exemple, les radiations UVs du soleil, en ciblant l'intégrité du gène *TP53*, collaborent avec la mutation BRAF^{V600E} pour favoriser le développement du mélanome (Viros et al. 2014). D'autre part, il a été montré que des fibroblastes de la peau entrant en sénescence pouvaient coopérer, via leur sécrétome, avec les mélanocytes « mutants » pour initier leur transformation et la progression du mélanome (Kim E. et al. 2013).

c. Mélanocyte, exposition solaire et mutation BRAF: un cocktail mélanome-générateur ?

A ce jour, aucune étude n'a permis d'établir clairement une signature UV de la mutation de BRAF. Cela peut sembler paradoxal, étant donné la fréquence la plus élevée de cette mutation dans le mélanome, et le rôle largement démontré de l'exposition intense au soleil dans le développement du mélanome. Néanmoins, depuis la découverte de la mutation de BRAF plusieurs études concourent vers un lien possible entre celle-ci et la carcinogenèse induite par les rayons UVs.

D'une part, la mutation de BRAF est extrêmement rare dans les mélanomes uvéaux et muqueux, non liés à exposition solaire (Cohen Y. et al. 2003, Edwards et al. 2004). D'autre part, il semble que de fortes expositions aux UVs entre 0 et 20 ans soient associées aux mutants BRAF (Curtin et al. 2005, Thomas et al. 2007). En se basant sur de nombreuses précédentes études reliant l'exposition solaire intense et intermittente au risque de mélanome (Kelly J. W. et al. 1994, Noonan et al. 2001, Whiteman et al. 2001), et sur leur propre étude, Bastian et son équipe ont émis l'hypothèse suivante : les mélanocytes au niveau d'une zone de la peau d'un individu qui aurait été exposée de manière intense et intermittente aux UVs, seraient beaucoup plus instables génétiquement et auraient une probabilité plus élevée d'acquérir la mutation BRAF, ou d'hyperproliférer si cette mutation était acquise (Curtin et al. 2005).

d. Le mélanome : une tumeur hétérogène en remodelage permanent.

Un patient atteint de cancer présente en réalité un mélange d'altérations génétiques ou épigénétiques qui s'inscrit dans un continuum spatio-temporel (Aparicio and Caldas 2013, Gerlinger et al. 2012): en effet, différentes tumeurs ou métastases d'un même patient peuvent présenter un statut mutationnel différent. C'est également le cas pour des sous-populations cellulaires au sein même d'une seule tumeur, et ce tout au long de la progression de la maladie, voire du traitement (cf. chapitre III). Il existe en effet au sein d'une même tumeur mélanique une

faible proportion de cellules initiateuses de tumeur⁷ dotées d'un potentiel métastatique et tumorigénique pour maintenir la masse tumorale, qui participent à l'implantation de nouvelles tumeurs, et qui représentent également un réservoir de cellules résistantes aux thérapies (Hoek and Goding 2010).

⁷Les cellules initiateuses de tumeurs possèdent des capacités d'auto-renouvellement au même titre que les autres cellules tumorales, mais peuvent également rester en quiescence pour ensuite régénérer la tumeur (Hoek and Goding 2010).

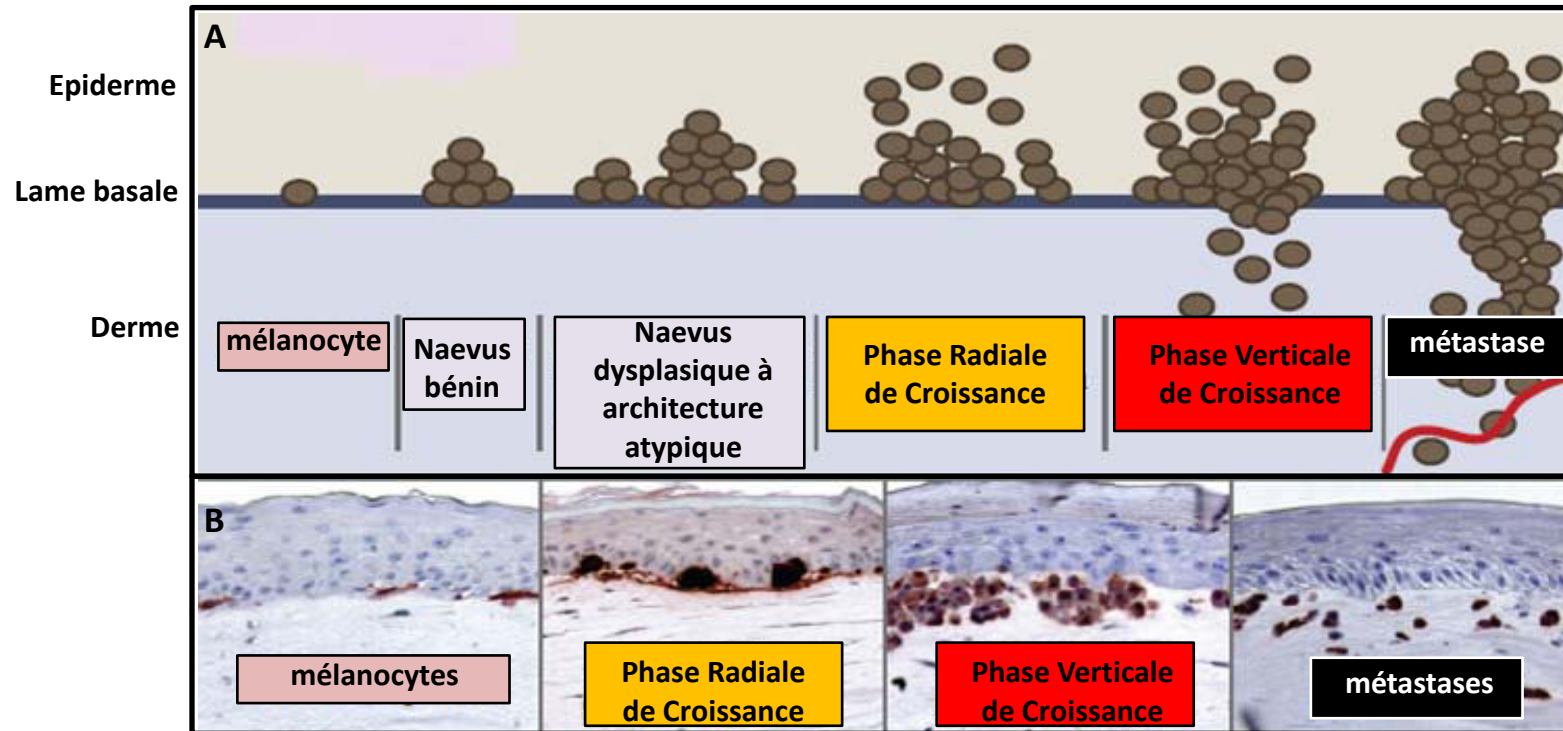


Figure 9. Etapes progressives de la mélanomagenèse.

(A) Au cours des étapes successives de la mélanomagenèse les mélanocytes acquièrent de nouvelles propriétés d'hyperprolifération, puis d'invasion.

(B) Reconstitution de la progression tumorale avec des coupes transversales de biopsies de peau humaine saine, sans et avec naevus, ou avec un mélanome.

D'après Vultur and Herlyn, 2013.

Cette sous-population peut être la conséquence de la transformation tumorale d'une cellule non différenciée (une cellule souche somatique ou encore d'une cellule progénitrice), ou peut également dériver d'une cellule déjà différenciée ayant acquis des caractéristiques souches par le processus de « switch phénotypique » (décrit par la suite) en réactivant des voies de signalisation spécifiques. En permanence présente au sein de la tumeur, cette sous-population cellulaire est soumise à différentes altérations au cours de l'évolution tumorale, et engendre donc différentes sous-populations de cellules de mélanome. D'autre part, l'expression de certains gènes dans certaines cellules en réponse à des stimuli du microenvironnement, et leur expansion clonale par pression de sélection, permet également le remodelage continu de la tumeur.

2. Une transformation en trois étapes : une progression rapide vers la formation de métastases « robustes ».

Pour métastaser, les cellules cancéreuses se détachent de leur site primaire, migrent dans les systèmes circulatoires, s'implantent dans un autre site pour initier la croissance tumorale. Si la transformation maligne des mélanocytes est communément décrite à partir d'observations histopathologiques comme la succession de trois étapes (Bennett 2003, Larue and Beer mann 2007), il est important de noter que tous les mélanomes ne passent pas nécessairement par toutes ces étapes (Figure 9).

a. La Phase Radiale de Croissance (RGP) : état de prolifération intense, vers une indépendance de la cellule de mélanome.

Une fois « transformés », les mélanocytes issus de naevus préexistant ou « de novo » sont capables d'entrer en hyper-prolifération permanente. En effet, suite à l'acquisition d'altérations génétiques et épigénétiques précédemment décrites, ces mélanocytes transformés sont devenus insensibles aux phénomènes de contrôle du cycle cellulaire et deviennent « immortels ». Ces cellules prolifèrent parallèlement à la lame basale, jonction dermo-épidermique, confinées au sein de l'épiderme. Elles sont également capables de s'étendre localement dans le derme sous-jacent sous forme de petits nodules ou de cellules individuelles. Cependant, elles sont incapables de franchir massivement la lame basale pour envahir les couches plus profondes du derme (Herlyn et al. 1985).

A ce stade de développement on parle de mélanome *in situ*, de bon pronostic car son exérèse chirurgicale large suffit généralement à éradiquer la tumeur. De plus, si les mélanomes *in situ* sont en prolifération permanente, ils évoluent généralement très lentement durant plusieurs années (cas des mélanomes superficiels extensifs, les plus fréquents). C'est en particulier le cas du mélanome de Dubreuil (ou Lentigo Malignant Melanoma) dont la RGP peut s'étendre sur 10 à 50ans ! Au contraire, dans le cas du mélanome nodulaire (deuxième plus fréquent) la progression se fait directement dans le derme de manière verticale au détriment de la RGP.

b. La phase Verticale de Croissance (VGP) : l'étape critique dans la mélanomagenèse.

Lors de la transition entre la RGP et la VGP, les mélanocytes transformés peuvent acquérir de nouvelles mutations pro-métastatiques, perdre certains récepteurs et molécules d'adhésion, et produire des facteurs de croissance ayant une action autocrine tels que le bFGF, le HGF, le PDGF, ou encore SPARC, une protéine matricellaire qui fera l'objet du chapitre IV. Ces modifications permettent alors aux mélanocytes transformés d'échapper à la régulation qu'exercent les kératinocytes sur eux dans l'épiderme (Haass et al. 2005). La production de facteurs de croissance leur permet également d'exercer une action paracrine : les cellules de mélanomes stimulent la

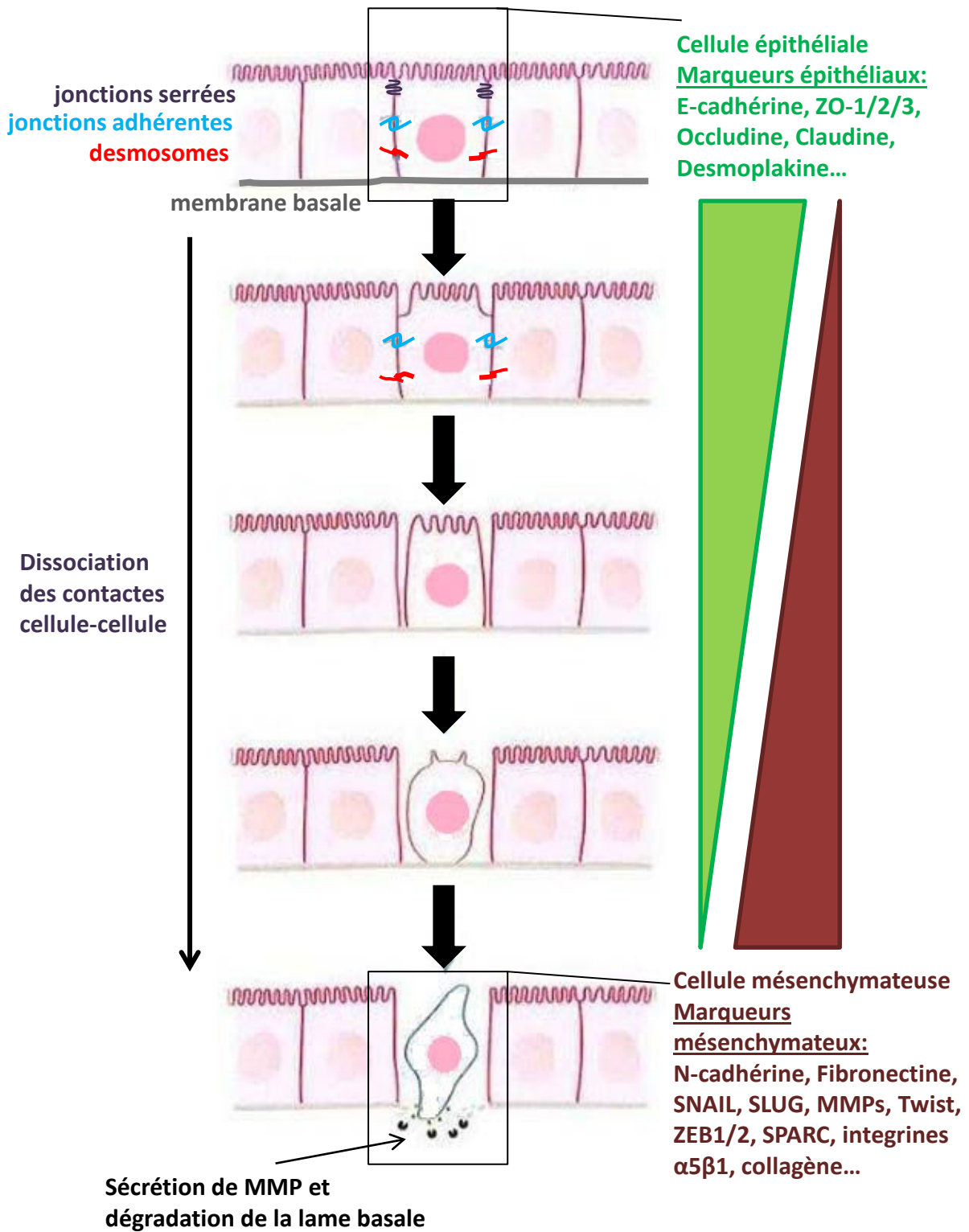


Figure 10. Etapes progressives de la transition épithélio-mésenchymateuse.

Au sein d'un épithélium les cellules sont enchaînées les unes aux autres grâce à plusieurs complexes d'adhésions. Certaines cellules peuvent, en réponse au TGF, se détacher de l'épithélium par rupture de leurs contacts avec les autres cellules épithéliales et la matrice, et perdent leur polarité apico-basale. Elles réorganisent ensuite leur cytosquelette d'actine pour devenir motiles, et allument un programme génétique contrôlé par des facteurs « EMTiques » (SNAIL, SLUG, ZEB) à l'origine d'un « switch » des marqueurs épithéliaux vers des marqueurs mésenchymateux. Alors « transformées » en cellules mésenchymateuses, elles sont capables de dégrader la lame basale et d'envahir les tissus sous-jacents. D'après Thiery et al, 2006.

sécrétion de signaux pro-invasifs par les fibroblastes environnants (pour revue, (Gaggioli et al. 2007)), notamment via la sécrétion de TGF β . Enfin, au cours de la transition RGP/VGP, les mélanocytes peuvent subir différents événements moléculaires (autres que des mutations génétiques) leur permettant d'acquérir la capacité de métastaser. Ces événements, au contraire des mutations génétiques, sont réversibles et sont : la transition épithélio-mésenchymateuse et le « switch » phénotypique.

La Transition Epithélio-Mésenchymateurs (TEM) (Figure 10).

Une TEM est un processus biologique permettant à une cellule épithéliale polarisée, qui interagit normalement avec une membrane basale, de subir de multiples changements la dirigeant vers un phénotype mésenchymateux, incluant la capacité de migration, d'invasion, de résister à la mort par apoptose, et de produire massivement des composants de la matrice extracellulaire (Kalluri and Neilson 2003). Ce processus entre en jeu lors de l'embryogenèse, notamment lors de la migration des précurseurs des mélanocytes depuis la crête neurale vers les organes de résidence des mélanocytes. La TEM se met également en place lors du remodelage des tissus endommagés, et initie le comportement invasif et métastatique des cancers épithéliaux. La TEM se caractérise par une perte d'expression de marqueurs épithéliaux tels que la E-cadhérine ou encore la P-cadhérine, et une augmentation de l'expression de marqueurs mésenchymateux tels que la N-cadhérine, la vimentine, ou encore la fibronectine (Hsu et al. 2000), et de la sécrétion de métalloprotéases (MMPs, impliquées dans la dégradation de la matrice extracellulaire).

Dans les cancers de manière générale, un inducteur majeur de la TEM est la voie du TGF β (Tumor growth factor bêta), un morphogène majeur lors du développement embryonnaire, détourné par la cellule tumorale (Massague 2008). Dans le mélanome, guidé par la réactivation de facteurs de transcription inducteurs de la TEM tels que ZEB1 et TWIST1 (Caramel et al. 2013), un processus réversible similaire à la TEM est observé: on parle alors de **pseudo-TEM**, les mélanocytes n'ayant pas une origine épithéliale. La pseudo-TEM est également régulée par les voies RAF-MEK-ERK, PI3K-AKT, et NF- κ B, cette dernière pouvant être directement régulée par les mutants BRAF (pour revue (Lin K. et al. 2010)). Ainsi, en diminuant l'expression de la E-cadhérine en particulier, les cellules de mélanome parviennent à réduire leurs interactions avec les kératinocytes qui contrôlent leur prolifération et leur comportement dans un contexte physiologique (Hsu et al. 2000). Il a d'ailleurs été démontré que l'inhibition de l'expression du gène *CDH1* (codant pour les E-cadhérines), par méthylation de son promoteur, est un événement requis pour le développement de mélanome (Rothhammer and Bosserhoff 2007). A l'inverse, l'augmentation du niveau d'expression de la N-cadhérine et de protéines associées permet aux cellules de mélanome d'interagir avec les fibroblastes du stroma (Haass et al. 2005, Smalley et al. 2005), ainsi qu'avec les cellules endothéliales constituant la paroi des vaisseaux (Bogenrieder and Herlyn 2002), ce qui leur permet de survivre hors de l'épiderme.

La commutation phénotypique ou « phenotype switching » (détaillée dans le chapitre IV).

Dans le mélanome, des sous-populations cellulaires ont été caractérisées selon leur profil d'expression génique, leur taux de prolifération, et leur degré d'invasivité. Ces différentes caractérisations ont conduit à la distinction de deux phénotypes : le phénotype prolifératif corrélé à des niveaux relativement élevés du facteur de transcription MITF, et le phénotype invasif corrélé à des niveaux bas de MITF (Hoek et al. 2008, Hoek et al. 2006). Le concept de « phénotype switching » se résume au passage d'un état hautement prolifératif et non invasif, à un état peu

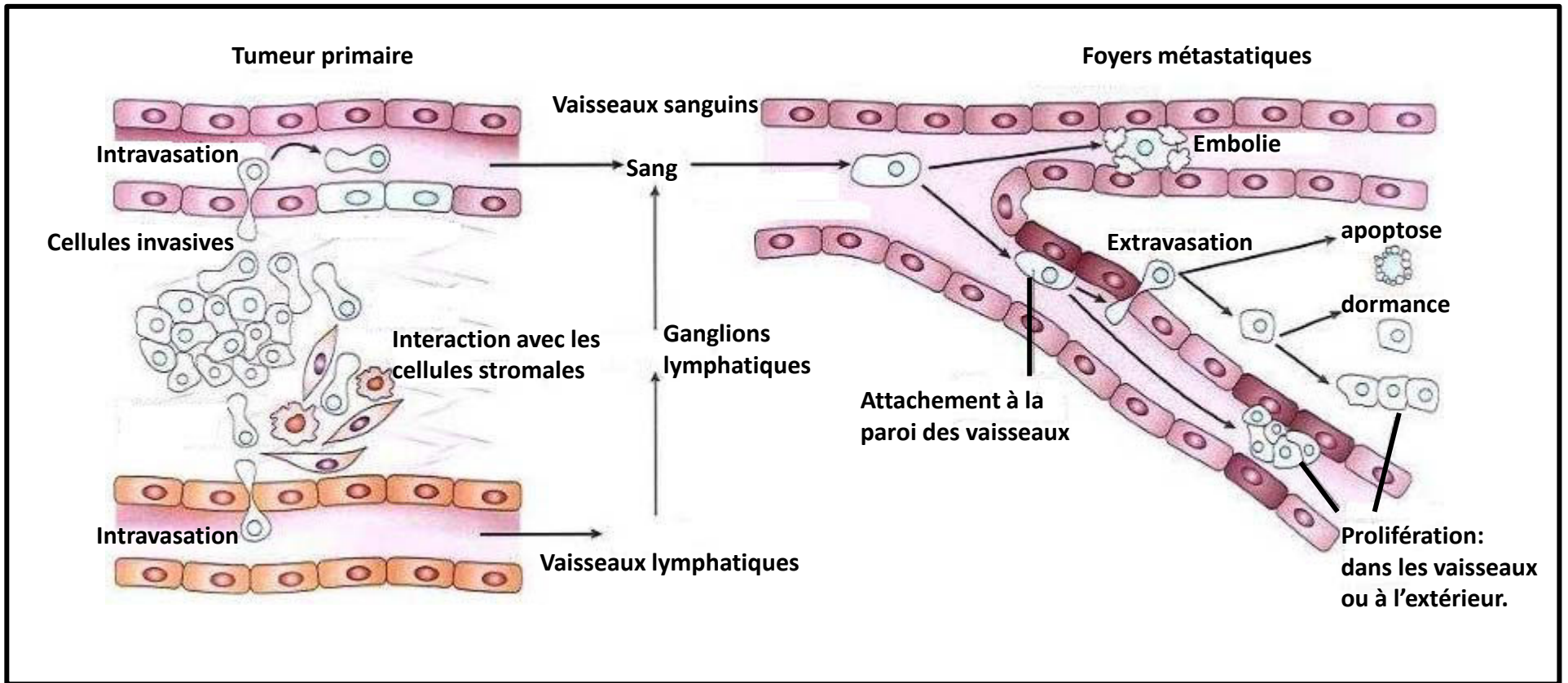


Figure 11. La dissémination métastatique: de la tumeur primaire vers les foyers tumoraux secondaires.

Les cellules invasives de la tumeur primaire peuvent accéder à la circulation générale de l'organisme grâce aux nombreux vaisseaux lymphatiques et/ou sanguins qui irriguent la tumeur primaire (intravasation). Ensuite, ces cellules migrent à travers les vaisseaux sanguins (extravasation) et peuvent s'ancrer et se multiplier au niveau d'un nouveau site de l'organisme pour y développer de nouveaux foyers métastatiques. D'après Sahai 2007.

prolifératif et fortement invasif de la cellule (ce qui est observé lors de la pseudo-TEM), et vice versa lors de l'implantation d'une métastase à distance de la tumeur primaire par la mise en place d'une pseudo-MET (processus inverse à la pseudo-TEM également mis en place par des cellules différenciées pour retrouver un phénotype hautement prolifératif et assurer le maintien d'une population de cellules initiatrices au sein de la tumeur (évoquées précédemment).

Il est important de noter que le commutation phénotypique (ou la TEM), ne semble pas être un phénomène indispensable pour l'invasion cellulaire: il existe des processus d'invasion coopérative entre cellules tumorales et/ou cellules stromales (cf.I.C) « invasives » et « non-invasives » (Chapman A. et al. 2014a, Dimanche-Boitrel et al. 1994, Gaggioli et al. 2007, Hegerfeldt et al. 2002, Thiery 2002).

L'acquisition de propriétés migratoires et invasives des mélanocytes transformés leur permet de dégrader la lame basale de l'épiderme, et d'accéder sous forme de nodules expansifs au derme profond tout en continuant de proliférer verticalement.

D'un point de vu clinique la VGP est très critique : l'épaisseur verticale de la tumeur qui dicte l'évolution vers la phase métastatique va dramatiquement diminuer le pronostic de survie du patient. A ce stade, le patient subit évidemment une exérèse chirurgicale très large et plus profonde (beaucoup plus invasive qu'en RGP), et fait état d'une haute surveillance médicale (détection de premières micro-métastases ganglionnaires, et/ou PET-scan).

c. La Phase Métastatique: un mélanome endurci et autonome.

A ce stade, les cellules de mélanome sont capables de quitter la tumeur primaire, et rejoignent la circulation lymphatique et sanguine pour se disséminer sous forme de métastases locales (en transit), régionales (métastases ganglionnaires), ou à distance (métastases au cerveau, dans le foie, et les poumons) (Figure 11).

Résistance à l'anoïkis.

Dans un contexte normal, les cellules ayant perdu le contact avec la MEC (matrice extracellulaire) ou avec les cellules voisines subissent un processus de mort appelé anoïkis, évoqué précédemment. L'anoïkis est contrôlée par l'activation de la voie intrinsèque de la mort par apoptose, intégrée au niveau de la mitochondrie, faisant intervenir les membres de la famille Bcl-2 (Adams and Cory 2007, Frisch and Screamon 2001). L'insensibilité à l'anoïkis a été décrite comme une caractéristique de la progression oncogénique des cellules épithéliales (Reginato et al. 2005), et suggérée comme associée à la TEM (pour revue, (Gilmore 2005)). La résistance à l'anoïkis permet la survie des cellules tumorales à distance de la tumeur primaire, indispensable à la formation de métastases. Les voies RAF-MEK-ERK et PI3K-AKT sont impliquées dans la résistance des mélanomes à l'anoïkis (Boisvert-Adamo and Aplin 2006). En effet, dans le mélanome ces voies privilégient l'augmentation des voies de survie dépendantes des membres anti-apoptotiques de la famille Bcl-2, au dépend des membres pro-apoptotiques de cette famille. Une première étude a montré que l'expression de mutants NRAS^{Q61L} et BRAF^{V600E} constitutivement actifs dans des mélanocytes, inhibaient l'anoïkis en régulant négativement Bim (Goldstein N. B. et al. 2009), un facteur pro-apoptotique de la famille Bcl-2 et médiateur majeur de l'anoïkis dans les cellules normales (Collins et al. 2005, Marani et al. 2004, Wang P. et al. 2004). Une seconde étude a

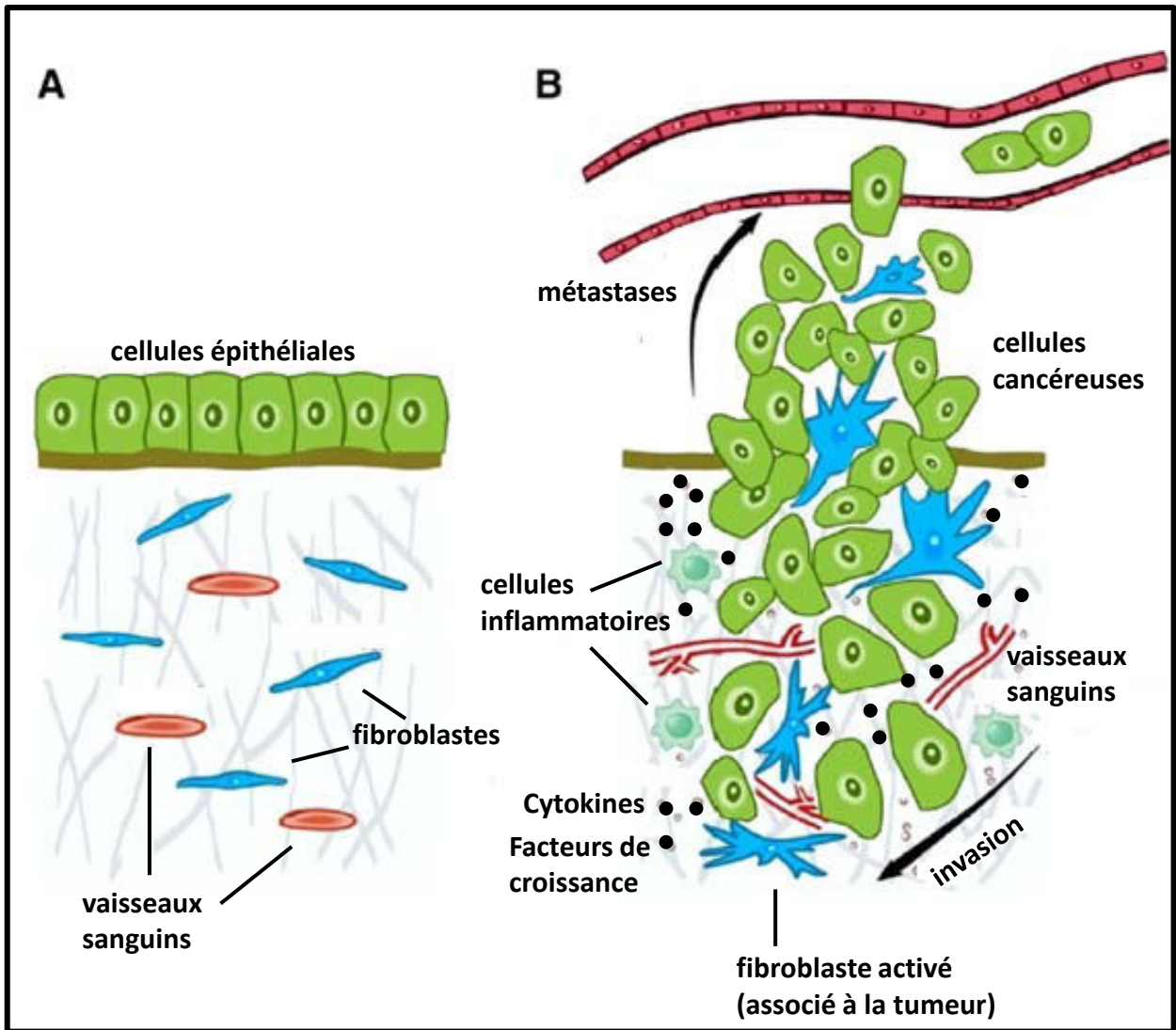


Figure 12. Remodelage du stroma au cours de la tumorigenèse.

(A) Stroma normal: sous-jacent à un arrangement ordonné de cellules épithéliales, il est composé de cellules stromales telles que des fibroblastes quiescents ou encore des cellules endothéliales vasculaires formant les vaisseaux sanguins. (B) Stroma desmoplasique: envahi par les cellules tumorales avec lesquelles il interagit, il est enrichi en fibroblastes activés et cellules inflammatoires qui sécrètent de nombreuses cytokines et facteurs de croissance, et il est fortement irrigué par de nouveaux vaisseaux sanguins. D'après Zhang et al, 2013.

montré l'importance de Mcl-1, un facteur anti-apoptotique de la famille Bcl-2 régulé par la voie RAF-MEK-ERK, dans la résistance à l'anoïkis des mélanomes (Boisvert-Adamo et al. 2009).

Une fois leur potentiel invasif et leur résistance à l'anoïkis acquis, les cellules de mélanome peuvent survivre librement dans la circulation lymphatique et sanguine en vue de se disséminer dans l'organisme. Récemment, il a été montré dans un modèle murin de cancer du pancréas, que les cellules tumorales circulantes dans les vaisseaux sanguins (CTC, pour Circulating Tumor Cells), étaient enrichies de précurseurs de métastase, et sur-exprimaient même des gènes impliqués dans la composition ou l'assemblage de matrice extracellulaire tels que le gène *SPARC* (Ting et al. 2014), suggérant leur capacité à aller reformer de manière autonome de nouvelles tumeurs secondaires, à distance de la tumeur primaire.

Le mélanome en phase métastatique (MP) n'est plus opérable (ou seulement pour les métastases accessibles), et réfractaire aux chimiothérapies et radiothérapies. De nouvelles thérapies plus développées ont récemment vu le jour, et redonnent un élan dans l'espoir de guérir les patients atteints de mélanomes métastatiques. Elles seront détaillées dans la partie II. C.

C. LE MELANOME INTEGRE A UN MICROENVIRONNEMENT COMPLEXE.

L'étude d'une tumeur, quelque soit le cancer, ne peut se faire sans la considération de son lieu de développement, ou plus précisément son microenvironnement. Comme cela va être décrit par la suite, le microenvironnement influence la tumorigénicité des cellules, et les cellules transformées elles-mêmes modifient leur microenvironnement (Joyce and Pollard 2009). Dans le cas du mélanome, la tumeur primaire et les métastases établissent de nombreuses et étroites interactions avec leur microenvironnement. Ces interactions appartiennent à deux phases caractéristiques du développement du mélanome:

- une phase au cours de laquelle le microenvironnement est non permissif : les cellules tumorales sont contenues et contraintes dans leur développement à une prolifération minimale in situ (RGP).
- une seconde phase de bascule au cours de laquelle le microenvironnement devient permissif et coopérateur : le développement tumoral devient rapide, invasif, et métastatique (VGP et MP).

1. Un microenvironnement hétérogène.

Le foyer tumoral regroupe une population hétérogène de cellules, malignes ou non malignes. Le tissu environnant les cellules tumorales est appelé **stroma**. Au sein du microenvironnement tumoral chaque acteur participe à l'altération de l'homéostasie tissulaire en faveur d'un stroma dit « desmoplasique »⁸, et au développement de la tumeur (Bissell and Radisky 2001)(Figure 12).

Parmi ces différents acteurs:

- **les cellules immunitaires**, qui engendrent un contexte inflammatoire indispensable dans la progression tumorale (Coussens and Werb 2002).
- **les vaisseaux sanguins et/ou lymphatiques**, qui assurent l'irrigation de la tumeur puis sa dissémination.

⁸Desmoplasie : modification du stroma vers des caractéristiques de stroma tumoral.

Par exemple, l'infiltration de macrophages produisant des facteurs de croissance et des cytokines pro-inflammatoires (Interleukines) ou inductrices de néo-vaisseaux sanguins (Endothelial growth factors), a été corrélée au stade du mélanome et à l'angiogenèse (Torisu et al. 2000).

- **les fibroblastes**, qui sécrètent des composants de la matrice extracellulaire (MEC), des protéases, et de nombreuses molécules qui modulent l'assemblage de la MEC ou encore le comportement d'autres cellules du microenvironnement.

2. Les fibroblastes collaborent avec les cellules tumorales.

Le rôle pro-tumoral des fibroblastes au niveau de la tumeur primaire, en particulier des fibroblastes associés aux carcinomes (CAFs)⁹, est désormais bien documenté (Bhowmick et al. 2004, De Wever et al. 2004, Kalluri and Zeisberg 2006, Orimo and Weinberg 2006). Les origines de ces CAFs sont diverses : les CAF peuvent dériver de fibroblastes résidents du site tumoral (Quante et al. 2011, Ronnov-Jessen et al. 1995), de cellules souches mésenchymateuses issues de la moelle osseuse (Quante et al. 2011), ou encore de cellules endothéliales (Zeisberg et al. 2007) et bien d'autres types de cellules encore.

De nombreuses études ont mis en évidence le rôle des fibroblastes de la tumeur primaire, ou melanoma-associated fibroblasts (MAF) dans l'initiation et la progression du mélanome (Balsamo et al. 2009, Lee and Herlyn 2007, Wandel et al. 2002). Le sécrétome des fibroblastes en sénescence favorise un microenvironnement cutané pro-oncogénique qui coopère avec les mélanocytes transformés (Kim E. et al. 2013). Ce sécrétome inclut des MMPs, et des interleukines qui vont altérer la différenciation des cellules épithéliales, promouvoir la mobilité des cellules endothéliales, et stimuler la croissance des cellules tumorales (Krtolica et al. 2001, Laberge et al. 2012, Parrinello et al. 2005).

Des modèles de co-culture *in vitro* de cellules de mélanome et de fibroblastes normaux ont montré que les cellules de mélanome entraînent une réponse pro-inflammatoire et pro-invasive des fibroblastes, qui à leur tour vont promouvoir la croissance et la migration des cellules de mélanome en sécrétant des chimiokines et facteurs de croissance (Gallagher et al. 2005, Wandel et al. 2002).

D'autre part, l'action paracrine des cellules de mélanome sur les fibroblastes évoquée précédemment, se traduit par la sécrétion de facteurs solubles qui vont induire la sécrétion de MMPs par des fibroblastes normaux (Gallagher et al. 2005, van den Oord et al. 1997), en particulier de la MMP-2 capable de dégrader le collagène IV, constituant majeur des lames basales (Kurschat et al. 2002), et de la MMP-1 capable de dégrader le collagène I de la matrice interstitielle (Wandel et al. 2002). Une étude plus récente met en évidence et confirme le caractère bidirectionnel de l'interaction fibroblastes-cellules de mélanomes. Cette étude montre *in vitro* et *in vivo* le rôle du S1P¹⁰ sécrété par les cellules de mélanomes dans l'activation de fibroblastes en myofibroblastes, en même temps que son rôle pro-tumoral sur les cellules de mélanome lorsqu'il est sécrété par les fibroblastes (Albinet et al. 2014) : c'est un véritable dialogue qui s'instaure entre les fibroblastes du stroma et les cellules de mélanome.

⁹Activated fibroblasts within desmoplastic lesions that are associated with malignant tumours and often express α -smooth-muscle actin.

¹⁰Le S1P, pour Sphingosine-1-phosphate, est un sphingolipide bioactif. Il peut être présent dans certains cancers, comme second messagers intracellulaire ou ligand des récepteurs S1PR exprimés à la fois dans les cellules tumorales et du stroma. Dans un contexte pathologique comme celui du cancer, il est associé à un rôle oncogénique en promouvant l'angiogenèse, et l'invasion tumorale.

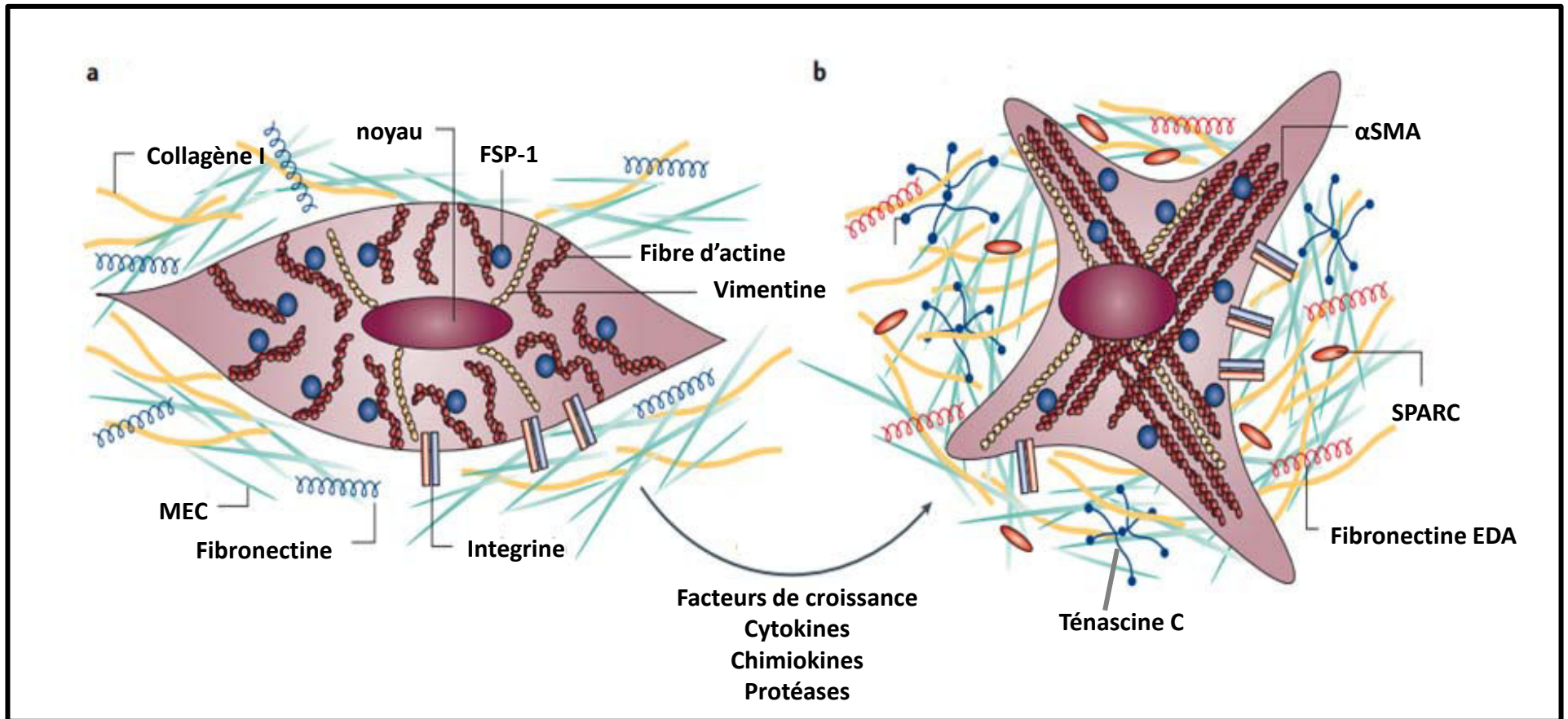


Figure 13. Changement phénotypique des fibroblastes activés.

- (a) Les fibroblastes, à l'aspect fusiforme, se trouvent dans une matrice extracellulaire (MEC) constituée majoritairement de collagène I et de fibronectine et interagissent avec leur microenvironnement via leur récepteurs que sont les intégrines. Ils expriment la protéine FSP-1 (Fibroblast-Spécific Protein 1), marqueur de fibroblastes du tissu sain.
- (b) En présence de facteurs de croissance, de cytokines ou encore de protéases, les fibroblastes peuvent acquérir un phénotype « activé »: ils présentent alors une prolifération accrue, sécrètent en grande quantité des protéines de la MEC telles que la Ténascine C, la fibronectine contenant le domaine EDA important dans le processus de migration cellulaire, ainsi que la protéine SPARC, et expriment notamment et de manière caractéristique l' α SMA. D'après Kalluri et al, 2006.

L'activation des fibroblastes en myofibroblastes se traduit par un changement du phénotype et de l'activité cellulaire (Kalluri and Zeisberg 2006, Ronnov-Jessen et al. 1995)(Figure 13). Ce changement phénotypique est associé à une forte production et sécrétion de fibronectine et de fibres de collagène de type I, à une expression *de novo* d'un marqueur de contractilité des myofibroblastes, l' α SMA (alpha Smooth Muscle Actin)(Ronnov-Jessen et al. 1995, Serini and Gabbiani 1999), à l'expression de la Ténascine C (De Wever et al. 2004), à une sécrétion de facteurs de croissance tel que l'HGF, ou encore à une forte sécrétion de la chimiokine CXCL12 (ou SDF-1 pour stromal cell-derived factor 1)(Orimo et al. 2005).

Une voie majeure de l'activation des CAFs en myofibroblastes lors de la tumorigenèse est la voie TGF β /SMAD qui va promouvoir la contraction du fibroblaste via la régulation de l'expression de l' α SMA, et son dépôt excessif de MEC. La propriété contractile de myofibroblastes induite par le TGF β peut également être médiée par LIF (leucémie inhibitoire factor) indépendamment de l' α SMA (Albregues et al. 2014). Le TGF β est sécrété par les cellules tumorales (Phan S. H. 2008), mais également par d'autres cellules du stroma (Zhang and Liu 2013).

Dans le mélanome, le TGF β sécrété par les cellules tumorales active les fibroblastes environnants qui vont sécréter en abondance de la MEC, à l'origine du remodelage du microenvironnement (Berking et al. 2001).

Le stress hypoxique, présent au sein de la tumeur et dont elle profite (pour revue, (Yeh and Kim 2015)), est également un médiateur de l'activation des CAF : les ROS (reactive oxygen species), produits du stress oxydatif chronique, induisent l'accumulation du facteur de transcription HIF1- α (hypoxia-inducible factor 1 alpha) et de la chimiokine CXCL12 qui contribuent à la conversion des fibroblastes en myofibroblastes capables de promouvoir la progression tumorale (Costa et al. 2014, Toullec et al. 2010). En plus de leurs forts pouvoirs migratoire et invasif (sécrétion de MMP), les myofibroblastes sont capables de remodeler la MEC par contrainte mécanique, créant un réseau sur lequel ils peuvent tracter des cellules cancéreuses (Gaggioli et al. 2007), mais également en sécrétant de nombreuses molécules montrées dans différents cancers comme pro-tumorales, telles que la Ténascine C ou encore SPARC (Secreted protein Acidic and Rich in Cysteine) (décrite dans le chapitre IV)(Kalluri and Zeisberg 2006, Mackie et al. 1987, Robert G. et al. 2006).

Ainsi, le stroma, via ces cellules activées, devient un partenaire actif du développement tumoral. La coopération entre myofibroblastes, macrophages, cellules inflammatoires, cellules endothéliales et cellules cancéreuses concourt à la mise en place d'un microenvironnement pro-tumoral tolérogénique, à la mobilité des cellules de mélanome, à la sécrétion de protéases et facteurs de croissance, ainsi qu'à la néoangiogenèse, autant d'évènements indispensables à la dissémination métastatique (Figure 14).

L'ensemble de ces interactions cellules-cellules et cellules-matrice n'est qu'un détournement du processus physiologique observé lors de la réparation tissulaire (processus limité dans le temps et terminé par la cicatrisation), vers un processus tumoral indéfini : la tumeur représente une lésion qui ne cicatrisera jamais, ouverte à la communication avec l'ensemble de l'organisme grâce à sa vascularisation.

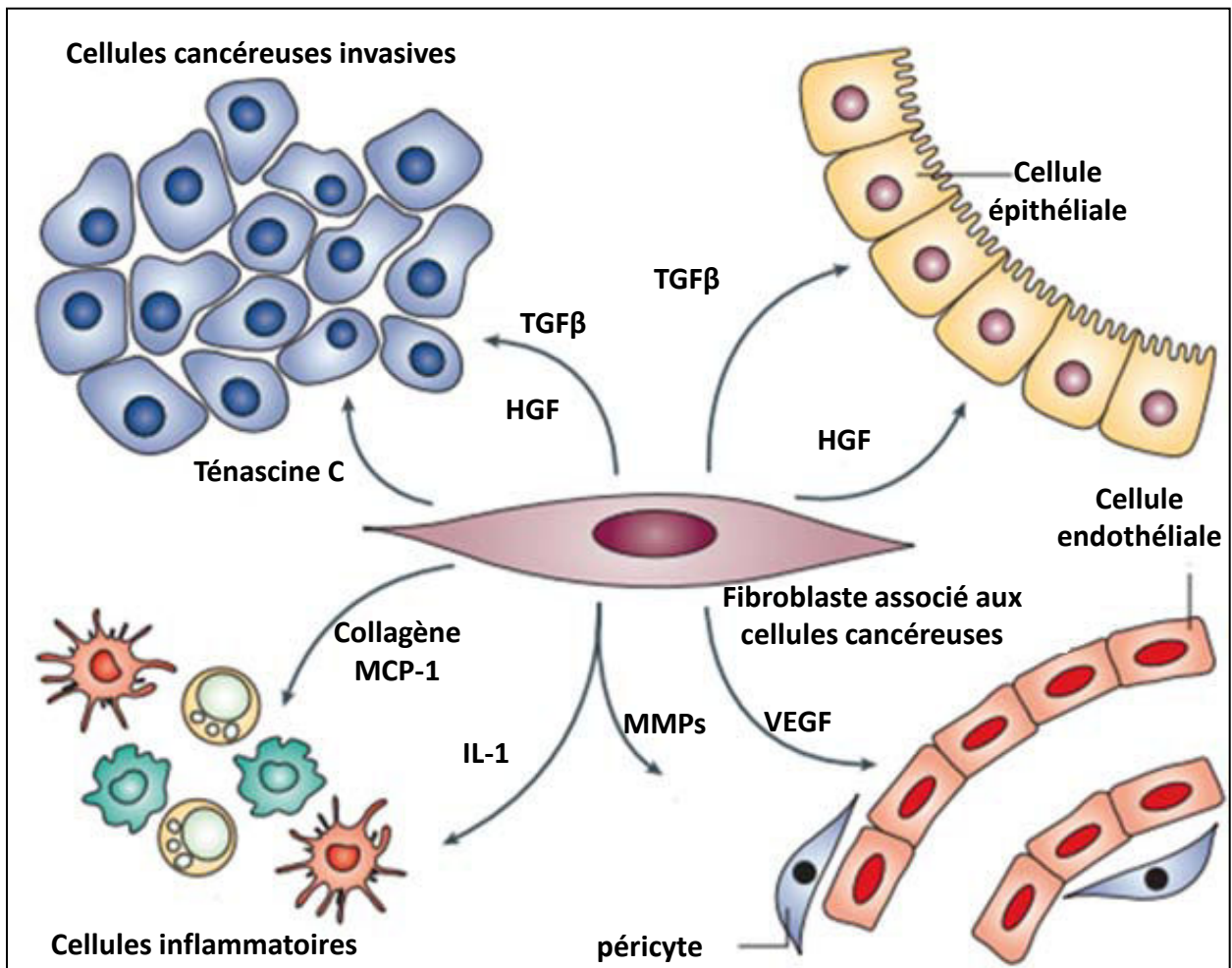


Figure 14. Rôles des fibroblastes activés dans le stroma tumoral.

Au sein de la tumeur, en sécrétant des facteurs de croissance et des chimiokines les fibroblastes activés communiquent avec les cellules cancéreuses, les cellules épithéliales, les cellules endothéliales, les péricytes et les cellules immunitaires (inflammatoires) résidentes:

- par l'intermédiaire de l'expression de novo de la Ténascine C et par l'augmentation de la déposition de collagène, les fibroblastes activés induisent un remodelage de la matrice extracellulaire du microenvironnement tumoral et la rend plus permissive à la progression tumorale.

- en sécrétant des chimiokines (ex: monocyte chemotactic protein 1, MCP1) et des interleukines (ex: IL-1), les fibroblastes activés induisent une réponse inflammatoire.

- en sécrétant des MMPs (métalloprotéases de la matrice) et du VEGF (vascular endothelial growth factor) les fibroblastes activés interagissent avec la microvascularisation de la tumeur.

- en sécrétant du HGF (heptocyte growth factor) ou encore du TGF (tumor growth factor), les fibroblastes activés stimulent la prolifération et l'invasion des cellules cancéreuses, et peuvent promouvoir la résistance thérapeutique de ces cellules.

D'après Kalluri et al, 2006.

3. Les fibroblastes de la tumeur primaire : « gardes du corps » des cellules tumorales face aux thérapies.

Ces dernières années, le rôle du microenvironnement, et plus particulièrement des CAFs, dans la résistance thérapeutique des tumeurs malignes a fait l'objet d'un grand intérêt (McMillin et al. 2010, Ostman 2012, Wilson et al. 2012), et notamment dans le cas des tumeurs épithéliales telles que les tumeurs mammaires (Shekhar et al. 2007), pulmonaires (Wang W. et al. 2009) et autres carcinomes. Les CAFs seraient à l'origine de la formation de « niches de résistance » :

- d'une part, ils contribuent au maintien d'une population de cellules initiatrices de tumeurs résistantes aux thérapies (Beck and Blanpain 2013, Medema and Vermeulen 2011, Nguyen et al. 2012), en sécrétant du HGF ou encore des chimiokines telle que CXCL12.
- d'autre part, en tant que myofibroblastes, ces CAFs sont à l'origine de dépôts accrus de composants de la MEC tels que la fibronectine, le collagène, ou encore des glycosaminoglycanes qui vont densifier la MEC et la rendre physiquement moins accessible par les molécules thérapeutiques (Loeffler et al. 2006, Provenzano et al. 2012).

Une attention particulière se porte désormais sur la compréhension mécanistique de ce rôle des CAFs dont le ciblage représente une nouvelle option thérapeutique dans la prise en charge des cancers. Dans le cas du mélanome, des études antécédentes du laboratoire ont montré que l'HGF stimule la production d'une matrice de fibronectine par les cellules de mélanome en activant la voie RAF-MEK-ERK (Gaggioli et al. 2005). En 2012, il a été mis en évidence que le HGF stromal réactive la voie RAF-MEK-ERK et la voie PI3K-AKT dans les cellules tumorales après activation de son récepteur c-MET, et leur confère une résistance aux inhibiteurs de BRAF (cf. chapitre II) (Straussman et al. 2012). Enfin, les travaux de l'équipe d'E. Sahai ont récemment montré que le traitement des mélanomes par les inhibiteurs de BRAF^{V600} entraîne une modification des fibroblastes au sein de la tumeur primaire et la production d'une MEC plus « tolérante » (ou non-permissive) au traitement (Hirata et al. 2015). Ces études suggèrent un rôle bidirectionnel des CAFs de la tumeur primaire dans la résistance thérapeutique des mélanomes : vers la réactivation de voies intracellulaires de survie des mélanomes sous thérapie, et vers leur coopération avec les cellules de mélanomes, qu'ils stimulent, dans la densification de la MEC pour la rendre non-permissive aux molécules thérapeutiques.

4. Les fibroblastes et les niches métastatiques.

Après avoir quitté la tumeur primaire par accès aux voies circulatoires de l'organisme, les cellules de mélanome se disséminent pour coloniser de nouveaux sites métastatiques. Cette colonisation est assurée par le maintien de la coopération entre cellules tumorales et cellules stromales dans le dépôt et l'assemblage d'une MEC tumorale. La dissémination des cellules de mélanome se fait préférentiellement par la voie lymphatique, comme c'est le cas pour de nombreux autres cancers (Rinderknecht and Detmar 2008). En effet, les ganglions lymphatiques drainants les plus proches de la tumeur primaire représentent la première niche métastatique atteinte par les mélanomes invasifs. Ceci peut s'expliquer par la forte densité de vaisseaux lymphatiques à proximité de la tumeur primaire, et par le potentiel chemo-attractant qu'ils ont vis à vis des cellules de mélanome que n'ont pas ou peu les vaisseaux sanguins. En effet, les cellules de mélanomes métastatiques expriment des récepteurs, CCR7, à la chimiokine lymphatique CCL21 et seraient donc « drainées » préférentiellement vers les « zones lymphatiques » possédant une activité sécrétoire de CCL21 (Shields et al. 2007). Plus généralement, un certain nombre d'études montre que le microenvironnement des sites métastatiques peut moduler le potentiel métastatique des cellules

tumorales (Joyce and Pollard 2009, Psaila and Lyden 2009). Il peut notamment faire intervenir des molécules chemo-attractantes guidant les cellules tumorales exprimant les récepteurs de ces molécules vers le site où elles sont sécrétées (Li Y. M. et al. 2004, Muller A. et al. 2001).

D'autre part, si les CAFs de la tumeur primaire sont reconnus comme partenaires actifs du stroma tumoral, leur rôle dans les ganglions, et plus largement le rôle du microenvironnement lymphatique dans la survie des métastases reste encore très peu décrit dans le mélanome. Une étude a montré que les vaisseaux lymphatiques des sites métastatiques sont capables, via la sécrétion du SDF-1, de promouvoir par chemo-attraction le recrutement de cellules de mélanome exprimant le récepteur du SDF-1, CXCR4, d'autant plus exprimé dans les cellules de mélanome hautement invasives (rappelons que le SDF-1 est également sécrété en abondance par les CAFs) (Kim M. et al. 2010a). Plus récemment, Peinado et al ont mis en évidence le rôle des cellules de mélanomes elles-mêmes dans l'éducation de leur niche métastatique. Les cellules de mélanome invasives sont en effet capables de sécréter des exosomes¹¹ contenant de l'HGF et de les transférer à des progéniteurs de moelle osseuse. Ces exosomes entraînent à la fois une perméabilisation des vaisseaux, mais aussi une reprogrammation des progéniteurs de la moelle. Ces derniers acquièrent un phénotype pro-métastatique, augmentant la vascularisation du site, propice à la colonisation par les cellules tumorales (Peinado et al. 2012). Il est à noter que les exosomes ont également été impliqués dans l'activation des fibroblastes en myofibroblastes via la libération de TGFβ (Webber et al. 2010).

Enfin, si le rôle du microenvironnement métastatique dans la progression des cancers est de mieux en mieux décrit, l'implication des niches métastatiques et en particulier celle de la niche lymphatique des mélanomes dans la résistance thérapeutique reste peu connue et fait désormais l'objet de nouvelles investigations thérapeutiques.

II. PRISE EN CHARGE DU PATIENT ATTEINT DE MELANOME.

A l'heure actuelle, un moyen sûr d'échapper au mélanome est de ne pas le développer! La prévention est donc primordiale lorsque l'on aborde ce cancer. Celle-ci se traduit par l'adoption par chacun d'un comportement exemplaire face à l'exposition solaire en particulier en période estivale ou lors de séjours dans des zones fortement exposées aux rayons solaires (Afrique, Australie, etc.) : pas d'exposition solaire estivale entre 12h et 16h, ni aux heures les plus chaudes tout au long de l'année ; lors d'expositions solaires en dehors de ces heures, application régulière (toutes les 2h) de crème solaire homologuée à indice UVA/UVB d'indice supérieur ou égal à 30 à défaut du port de vêtements légers couvrant pour les peaux les plus claires, port de lunettes et chapeau. Toutes ces précautions doivent être renforcées chez l'enfant, dont l'auto renouvellement des cellules (siège de l'acquisition et transmission de mutations aux cellules naissantes) est d'autant plus actif.

Depuis les 20 dernières années, les comportements ont évolué vers l'adoption de ces recommandations, cependant elles restent encore insuffisamment appliquées.

¹¹Les exosomes sont de microvésicules dérivées de membranes cellulaires, qui transportent de nombreuses molécules. Ils sont impliqués dans la communication entre cellules, et ont été impliqués dans les cancers, notamment en jouant un rôle immunosuppresseur (Clayton et al. 2007).









BÉNIN (PAS INQUIETANT)		MALIN (INQUIETANT)
	<ul style="list-style-type: none"> • A comme Asymétrie Grain de beauté de forme ni ronde ni ovale, dont les couleurs et les reliefs ne sont pas régulièrement répartis autour du centre. 	
	<ul style="list-style-type: none"> • B comme Bords irréguliers Bords déchiquetés, mal délimités. 	
	<ul style="list-style-type: none"> • C comme Couleur non homogène Présence désordonnée de plusieurs couleurs (noir, bleu, marron, rouge ou blanc). 	
	<ul style="list-style-type: none"> • D comme Diamètre Diamètre en augmentation. 	
<ul style="list-style-type: none"> • E comme Évolution Changement rapide de taille, de forme, de couleur ou d'épaisseur. 		

Figure 15. Auto-surveillance basée sur la règle de l'«ABCDE ».

Les sujets à risque de développer un mélanome doivent pratiquer un auto-examen, en plus d'être régulièrement suivis par un dermatologue. Il s'agit, en général tous les 3 mois, de s'observer attentivement la peau nue, de la tête aux pieds, de face et de dos, sans oublier les zones peu visibles (oreilles, ongles, plante des pieds, espaces interdigitaux, organes génitaux...) pour détecter d'éventuelles nouvelles taches pigmentées ou des modifications sur des naevi préexistants en s'aidant de la règle de l'« ABCDE ».

Tiré d'une campagne de prévention de l'Institut National du Cancer, 2011.

A. LE DIAGNOSTIC PRECOCE : OPTIMISER LA PRISE EN CHARGE DU MELANOME

Selon les données américaines (Horner et al., SEER Cancer Statistics Review, 1975-2006, programme SEER), le taux de survie relative à cinq ans dépendant de l'épaisseur de la tumeur est de 98 % au stade localisé, de 61,9 % avec une extension régionale et de 15,3 % au stade métastatique (associé à une moyenne de survie de 6 à 9 mois).

La détection précoce d'un mélanome naissant est donc essentielle et constitue la meilleure chance de guérison à l'heure actuelle¹². Elle repose sur l'initiative individuelle en collaboration avec l'expertise du professionnel de santé qu'est le dermatologue.

Comme s'il laissait volontairement une chance à ses victimes de s'en débarrasser, le mélanome cutané primaire est plus ou moins bien visible à l'œil nu, contrairement à la majorité des autres cancers. **L'auto-surveillance** régulière (tous les 3 mois pour les individus les plus à risque, cf. chapitre I), et **le suivi régulier chez un dermatologue** des grains de beauté préexistants ou naissants (une fois par an pour les personnes présentant un risque, et dès la suspicion d'un mélanome), sont donc des démarches simples et non invasives pour dépister une lésion cutanée qui évolue rapidement et/ou différemment des autres grains de beauté sur la peau.

Le mélanome peut se développer n'importe où sur le corps (y compris le cuir chevelu, les organes génitaux, les espaces interdigitaux ou les orteils).

La principale difficulté réside dans la distinction d'un mélanome, d'un grain de beauté bénin :

- Il s'agit de repérer le grain de beauté différent des autres (principe du « vilain petit canard »). En effet, tous les grains de beauté d'une même personne se ressemblent, celui qui est différent des autres doit donc attirer l'attention.
- Il s'agit également d'être vigilant à tout changement : une nouvelle tache brune qui apparaît *de novo* sur la peau (cas le plus fréquent), ou un grain de beauté qui change d'aspect rapidement (dans sa forme, sa taille, sa couleur ou son épaisseur) doit alerter.

Cette examination corporelle repose sur les critères morphologiques de **la règle ABCDE** qui permettent de mémoriser les signes d'alerte (Figure 15) :

- **A comme Asymétrie** : forme non circulaire, avec deux moitiés qui ne se ressemblent pas.
- **B comme Bords irréguliers**, encochés, polycycliques, mal délimités.
- **C comme Couleur non homogène** : présence de plusieurs couleurs.
- **D comme Diamètre** en augmentation, en général supérieur à 6 mm.
- **E comme Évolution** : toute tache pigmentée qui change d'aspect rapidement (forme, taille, épaisseur, couleur) est un signe d'alerte et doit amener rapidement à consulter un dermatologue.

¹²Le **Syndicat national des dermatologues vénéréologues (SNDV)** organise, tous les ans depuis 1998, une journée nationale de prévention et de dépistage anonyme et gratuit des cancers de la peau. Cette journée, placée sous le haut patronage du ministère chargé de la Santé, bénéficie du soutien de l'Institut National du Cancer.

Classification T			Classification N			Classification M		
	Épaisseur de la tumeur (indice de Breslow)	Paramètres additionnels		Nombre de ganglions lymphatiques affectés	Etendue des métastases dans les ganglions lymphatiques		Type de métastases à distance	Lactate déshydrogénase sérique (LDH)
Tis	Non appliqué	Mélanome <i>in situ</i> , pas d'invasion	No	0	Non appliqué	Mo	Pas de métastases à distance	Non appliqué
T1	≤ 1.0mm	a: pas d'ulcération, pas de mitose b: ulcération ou taux mitotique ≥ 1/mm ²	N1	1	a: micrométastases b: macrométastases	M1a	Peau, tissus sous cutanés, ganglions lymphatiques	normal
T2	1.01-2.0mm	a: pas d'ulcération b: ulcération	N2	2-3	a: micrométastases b: macrométastases c: métastases satellites ou en transit	M1b	poumons	normal
T3	2.01-4.0mm	a: pas d'ulcération b: ulcération	N3	≥ 4, ou métastases satellites ou en transit et ganglions lymphatiques atteints		M1c	Toutes autres métastases à distance N'importe quelles métastases à distance	normal élevé
T4	> 4.0mm	a: pas d'ulcération b: ulcération						

Tableau 4. La classification TNM.

La classification TNM se décompose en trois critères: le critère T, qui tient compte des caractéristiques de la tumeur primaire, le critère N, qui tient compte de la dissémination locale, et le critère M, qui tient compte de la dissémination à distance. D'après Garbe et al, 2010.

La présence d'un ou plusieurs de ces signes ne signifiant pas forcément la présence d'un mélanome, elle justifie cependant de demander un avis médical sans attendre.

Dès qu'un grain de beauté ou une tache pigmentée nouvelle apparaît suspicieux, une biopsie est systématiquement effectuée (par le dermatologue), et fait l'objet d'une **analyse anatomo- et histo-pathologique** complète. Cette analyse permet de confirmer ou d'infirmer le diagnostic de mélanome, et le cas échéant, de préciser le stade de développement de la tumeur. Elle est à l'origine d'une caractérisation complète de la tumeur primaire, basée sur un ensemble de paramètres dont **l'indice de BresLow** qui traduit l'épaisseur maximum comprise entre les cellules superficielles de la couche granuleuse épidermique et la base de la tumeur (cellule maligne la plus profonde) et qui représente le principal facteur de pronostic.

Si le diagnostic de mélanome est établi, d'autres critères sont alors pris en considération chez le patient pour déterminer le stade de la maladie, les plus utilisés par les praticiens étant les critères TNM (Tableau 4):

- le premier critère, le critère T tient compte des caractéristiques de la tumeur primaire (épaisseur et ulcération).
- le deuxième critère, le critère N tient compte de l'atteinte ou non des ganglions lymphatiques et la présence ou non de métastases "en transit".
- le troisième critère, le critère M tient compte de la présence ou non de métastases à distance.

La suite de ce chapitre se concentrera sur la prise en charge des patients atteints de mélanome en France.

B. LA CHIRURGIE : PREMIER TRAITEMENT SYSTEMATIQUE.

C'est l'interprétation de l'analyse anatomo- et histo-pathologique couplée à l'évaluation de ces critères qui conditionnera la direction thérapeutique et l'évaluation du pronostic.

Lorsque la tumeur primaire se présente à un stade précoce de son développement (stade I), le traitement de première intention repose sur une exérèse chirurgicale réalisée le plus souvent sous anesthésie locale. Pour optimiser l'éradication de la tumeur, et en fonction de sa profondeur initiale (BresLow), des marges d'exérèse sont systématiquement prises depuis le centre de la lésion (jusqu'à 3cm pour les BresLow >3mm). Dans ce cas la guérison est possible, n'excluant cependant pas une surveillance régulière du patient pour éviter une récurrence.

Le problème du traitement se pose lorsque les patients présentent des signes de dissémination métastatique rapide. La chirurgie reste systématique pour éradiquer au maximum la tumeur primaire. L'exérèse du ganglion sentinelle n'est pas pratiquée de manière systématique mais est assez fréquente dans le cas de tumeurs profondes. Lors de l'opération, un à deux ganglions lymphatiques drainant le site primaire de la tumeur sont habituellement enlevés. Ils sont ensuite analysés par anatomopathologie. Dans le cas où des micro-métastases sont détectées, le chirurgien procède directement au curage total des ganglions situés dans la zone de drainage du mélanome primaire (pour revues, (Garbe et al. 2010, Testori et al. 2009)). L'exérèse des métastases est également réalisée lorsqu'elles sont accessibles. En cas de métastases trop nombreuses ou trop étendues, la chirurgie n'est plus prioritaire.

Aux stades présentant des signes de dissémination métastatique, dans la majorité des cas la chirurgie est suivie d'une thérapie systématique.

La radiothérapie et de nombreuses chimiothérapies font partie des choix thérapeutiques pour le mélanome : ce dernier y est cependant rapidement et particulièrement résistant.

La radiothérapie est relativement peu utilisée dans le cas du mélanome : elle est prescrite dans le cas de tumeurs primaires, de ganglions lymphatiques envahis par les cellules tumorales, ou lorsque les lésions sont peu ou pas accessibles et donc inopérables : c'est notamment le cas des métastases osseuses et cérébrales. La radiothérapie est en général utilisée de façon palliative pour soulager les symptômes comme par exemple dans le cas de métastases osseuses venant comprimer la moelle épinière.

A l'heure actuelle, parmi les différentes chimiothérapies, la chimiothérapie de référence reste la Dacarbazine (Déticène), un agent alkylant ayant un effet cytostatique non sélectif par arrêt de la croissance cellulaire et l'inhibition de la synthèse d'ADN, ayant obtenu une autorisation de mise sur le marché (AMM) en 1975. Les taux de réponse lui étant associés restent faibles, de l'ordre de 10 %, et sans amélioration de la survie.

C. DE NOUVELLES STRATEGIES DANS LA THERAPIE DES MELANOMES METASTATIQUES : VERS UNE THERAPIE SUR MESURE.

Durant les cinq dernières années, des avancées thérapeutiques majeures ont eu lieu dans la prise en charge du mélanome métastatique: après l'échec des chimiothérapies classiques et autres thérapies trop peu spécifiques (comme le Sorafenib, inhibiteur de multiples kinases RAF et autres kinases), **les thérapies ciblées et l'immunothérapie** ont vu le jour et ont révolutionné la prise en charge des mélanomes métastatiques ou non résecables.

Si désormais la prise en charge des patients atteints de mélanome métastatique peut faire appel à beaucoup plus d'options thérapeutiques, elle est cependant extrêmement complexe pour le corps médical en ce qui concerne le choix de la thérapie optimale (avec l'accord du patient). En effet, ce choix se base sur de nombreuses considérations : l'état général du patient (plus ou moins symptomatique) et son âge, la localisation de la tumeur primaire et/ou des métastases, son statut mutationnel (aujourd'hui très étudié et considéré dans la prise en charge), la taille et le nombre des métastases, le niveau d'agressivité du mélanome de manière générale, ou encore les différents types d'effets secondaires des thérapies. Avec l'avis du patient, ces nombreux « critères » vont conditionner le choix d'une thérapie en première intention, ou d'une autre en seconde intention, un premier traitement ayant échoué imposant une reconsidération de tous ces « critères ». Par exemple, une surveillance simple peut parfois être proposée, notamment chez un patient âgé asymptomatique présentant une maladie peu évolutive.

1. Les nouvelles thérapies ciblées.

Les thérapies ciblées sont capables d'inhiber sélectivement la croissance des cellules de mélanome porteuses de mutations oncogéniques activatrices. Parmi ces nouvelles thérapies et les plus prometteuses : celles qui permettent d'inhiber la signalisation RAF-MEK-ERK dans les mélanomes exprimant les formes mutées V600E et V600K de BRAF, les plus communes.

a. Les inhibiteurs de l'oncogène BRAF^{V600} pour les mélanomes métastatiques mutés BRAF^{V600}.

Les inhibiteurs de BRAF^{V600} agissent sur les cellules de mélanome exprimant les formes mutées BRAF^{V600}, et non pas sur les cellules saines ni les autres cellules tumorales. Le **Vémurafénib** (Zelboraf, PLX4032) et le **Dabrafénib** (Tafinlar, GSK2118436) sont deux inhibiteurs des kinases BRAF^{V600E/K/D/L} et BRAF^{V600E/K} respectivement, agissant comme compétiteur de la fixation activatrice de l'ATP sur la kinase. Cette sélectivité représente une avancée considérable dans la thérapie, mettant sur la touche de nombreux effets secondaires observés sous chimiothérapies (qui touchent toutes les cellules en division, tumorales ou non tumorales).

Les premières évidences sur l'efficacité des inhibiteurs de BRAF^{V600} comme monothérapie des mélanomes métastatiques ont émergé en 2010 (Bollag et al. 2010, Flaherty et al. 2010, Kim T. et al. 2010b). Par la suite, des essais cliniques de phase III ont rapidement montré que le Vémurafénib et le Dabrafénib avaient un bénéfice global supérieur comparativement à la Dacarbazine (chimiothérapie de référence) chez les patients atteints de mélanome métastatique mutés BRAF^{V600}: 50% à 60% de taux de réponse objective (vs. 5 à 15% sous Dacarbazine), une survie globale de l'ordre de 13 mois (vs. 6 à 10 mois sous Dacarbazine), une survie moyenne sans progression de la maladie de 6 à 7 mois (vs. <3 mois sous Dacarbazine), et un taux de survie relatif à un an d'environ 55% (Avril et al. 2004, Bedikian et al. 2006, Chapman P. B. et al. 1999, Chapman P. B. et al. 2011, Hauschild et al. 2012, McArthur et al. 2014, Middleton et al. 2000, Sosman et al. 2012). En France, depuis l'obtention d'une AMM en 2012, le **traitement de première intention d'un mélanome métastatique ou non résecable et porteur de la mutation BRAF^{V600}** est le **Vémurafénib** en monothérapie (recommandation 2013 de l'INCA), ou le **Dabrafénib** qui a obtenu une AMM française fin 2013.

Si les anti-BRAF^{V600} n'ont pas d'effet inhibiteur sur les cellules non tumorales, ni sur les cellules tumorales non mutées BRAF^{V600}, ils peuvent paradoxalement avoir un effet inverse sur la signalisation RAF-MEK-ERK dans ces dernières cellules : en effet, en présence des inhibiteurs de BRAF^{V600}, une activation de la kinase ERK, de la prolifération, et de la migration cellulaire peut être observée dans un contexte tumoral non muté BRAF^{V600}. Cet effet résulte de la trans-activation de dimères sauvages CRAF-CRAF ou CRAF-BRAF dépendante de RAS (ou même de dimères de variants p61BRAFF^{V600E}-p61BRAFF^{V600E}). La drogue se fixe à l'un des monomères pour l'inhiber. Le dimère est alors relocalisé à la membrane où il interagit avec RAS qui va activer le second monomère n'ayant pas fixé la drogue. Au contraire, BRAF^{V600E} existe en tant que monomère et est inhibé par les inhibiteurs BRAF^{V600} (Halaban et al. 2010, Hatzivassiliou et al. 2010, Poulikakos et al. 2010, Poulikakos et al. 2011). La trans-activation de dimères sauvages RAF-RAF peut être à l'origine d'effets secondaires (carcinomes), qui demeurent cependant moins nombreux que dans le cas de thérapies classiques.

Les effets secondaires indésirables les plus fréquents (dans plus de 30% des cas) sous traitement par Vémurafénib ou Dabrafénib sont des arthralgies, des désordres cutanés (hyperkératoses, maladie de Grover), une asthénie, une alopecie, des nausées, ainsi qu'une photosensibilité ou encore le développement de carcinomes épidermoïdes suite à l'apparition de mutation secondaire de NRAS ou de dimères RAF-RAF dans les cellules normales ou tumorales non porteuses de la mutation BRAF^{V600} (pour revues (Anforth et al. 2015, Charles et al. 2014). L'effet secondaire le plus redouté, qui apparait très fréquemment sous traitement Vémurafénib ou Dabrafénib, est le **développement d'une résistance à ces traitements (résistance acquise)**: si les premiers effets de

ces deux molécules peuvent être spectaculaires dans le cas de réponse du patient, et peuvent être dans quelques rares cas à l'origine de la guérison de ce dernier, une résistance acquise s'observe très fréquemment dans un délai de 6 mois, à l'origine d'une récurrence de la maladie pour le patient. Dans le cas d'échec thérapeutique avec l'une de ces deux molécules, il existe heureusement la mise en place de relais thérapeutiques.

Traitement de deuxième intention :

Il est à noter qu'il y a encore **environ 10 à 20% de patients atteints de mélanome métastatique mutés BRAF^{V600} non répondeurs aux Vémurafénib ou Dabrafénib (pour revues, (Charles et al. 2014, Turajlic et al. 2014)**. Ces patients présentent une résistance dite « innée » à ces traitements. Ainsi, en cas de non réponse, un second traitement en deuxième intention peut être envisagé tel qu'une immunothérapie (cf. partie 2. De ce chapitre) ou une chimiothérapie classique.

En cas de réponse dissociée entre les différents sites métastatiques, il peut être discuté de poursuivre le Vémurafénib si un traitement local des lésions ayant progressé ou étant nouvellement apparues est réalisable.

En cas d'échappement agressif au Vémurafénib, la chimiothérapie par Dacarbazine reste le traitement de référence ayant une AMM. La survie médiane étant estimée à moins de 3 mois dans cette situation, il n'est pas recommandé d'administrer de l'Ipilimumab (immunothérapie décrite par la suite dans la 2.a.) au regard de son délai d'action (> 3 mois).

Enfin, en cas de résistance acquise aux inhibiteurs de BRAF^{V600}, et dans le cadre d'essais thérapeutiques uniquement, des combinaisons thérapeutiques peuvent être envisagées : inhibiteurs de BRAF^{V600} et Dacarbazine, inhibiteurs de BRAF^{V600} et immunothérapie, ou encore inhibiteurs de BRAF^{V600} et inhibiteurs des kinases MEKs.

b. Les inhibiteurs de MEK à la rescousse des inhibiteurs de BRAF^{V600}.

Dès lors qu'une résistance aux inhibiteurs de BRAF^{V600} s'établit, dans 70% des cas elle résulte de la réactivation des kinases ERKs (Shi et al. 2014b). Plusieurs études concernant l'association des inhibiteurs de MEK (juste en aval des kinases ERKs dans la signalisation RAF-MEK-ERK) aux inhibiteurs de BRAF^{V600} sont en faveur de l'adoption d'une bithérapie dans le traitement du mélanome muté BRAF^{V600} en deuxième, et même en première intention (Flaherty et al. 2012, Larkin et al. 2014, Long et al. 2014, Villanueva et al. 2010). En effet, cette bithérapie présenterait un triple bénéfice : compenser la résistance acquise aux inhibiteurs de BRAF^{V600}, prévenir l'apparition de nouveaux foyers tumoraux résistants en augmentant l'efficacité des inhibiteurs de BRAF^{V600} via l'inhibition additionnelle de ERK, et réduire l'apparition de lésions cutanées secondaires à l'effet activateur des kinases ERKs par les inhibiteurs de BRAF^{V600} dans les cellules normales ou les cellules tumorales non mutées BRAF^{V600} (pour revue (Chapman P. B. et al. 2014b)). Deux essais cliniques de phases III ont récemment montré un important bénéfice de l'association d'inhibiteurs des kinases MEK aux inhibiteurs de BRAF^{V600} : un premier essai associant le Vémurafénib au **Cobimetinib (GDC-0973, XL-518)**, et un second associant le Dabrafénib au **Trametinib (Mekinist, GSK-1120212)** (Larkin et al. 2014, Long et al. 2014) respectivement). Dans ces deux essais, l'association d'inhibiteurs des kinases MEK aux inhibiteurs de BRAF^{V600} a permis : d'augmenter la moyenne de survie sans progression à 9-10 mois (vs. 6 à 8.8 mois sous inhibiteur de BRAF^{V600} seul), d'augmenter de 10% le taux de survie relative à 6-9 mois, et de diminuer la proportion de carcinomes secondaires au traitement. L'association du Dabrafénib avec le

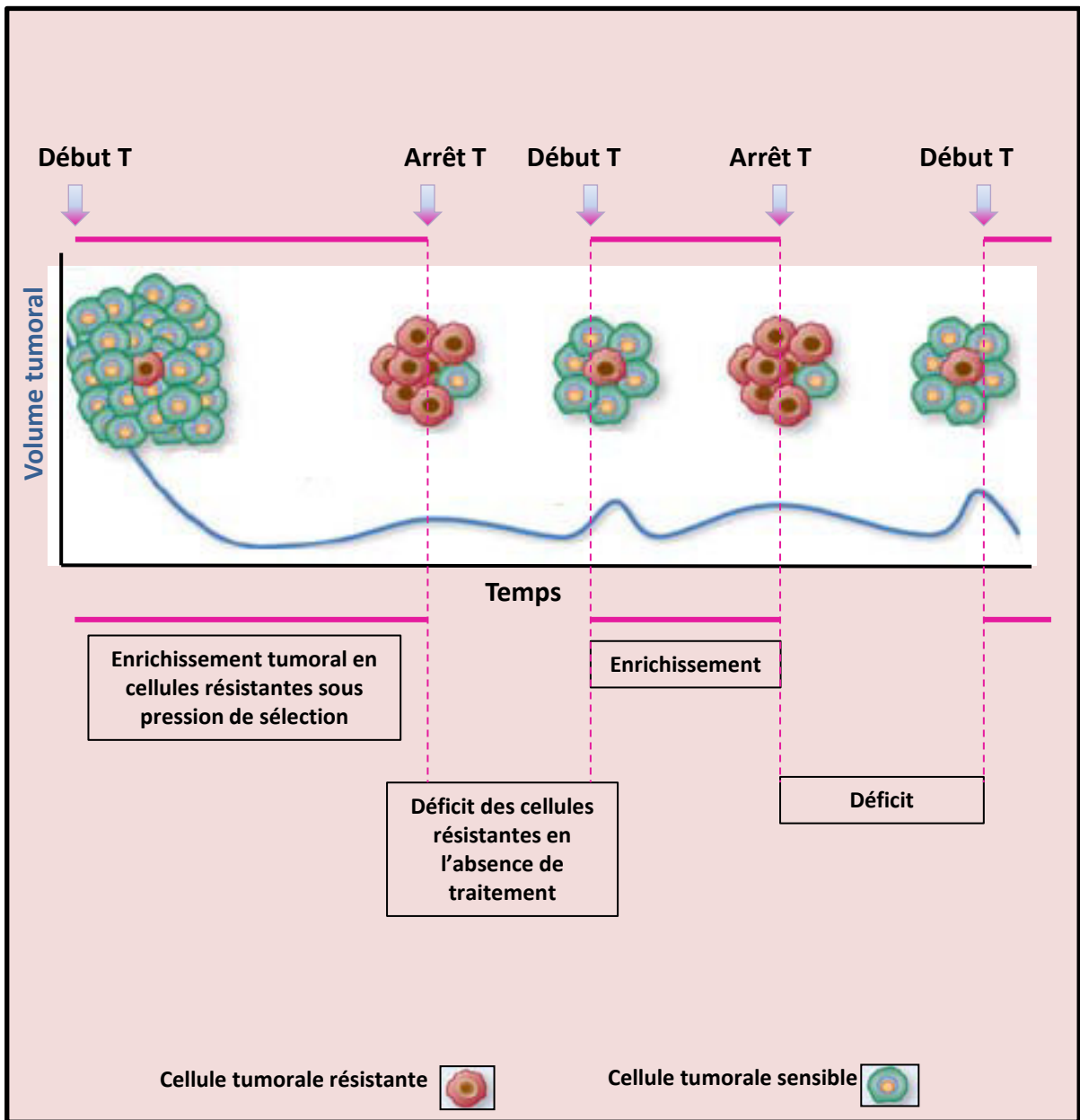


Figure 16. Modèle d'action de l'administration de traitement par intermittence.

Au sein de mélanome naïf (non traités), des cellules résistantes au traitement peuvent pré-exister ou peuvent émerger à partir de la population générale de cellules cancéreuses sous traitement. Avant le traitement la tumeur est majoritairement composée de cellules cancéreuses sensibles, expliquant la régression tumorale dans une majorité de patients. Lorsque le traitement est initié, la tumeur peut alors s'enrichir en cellules résistantes sélectionnées et qui prolifère sous traitement. L'interruption du traitement ne permet plus aux cellules résistantes de s'expandre et conduit à un avantage prolifératif de la population cellulaire sensible au traitement. T= traitement. Des cycles répétés de traitement espacés par des périodes sans traitement pourrait ainsi retarder l'apparition de résistance. D'après Das Thakur et al, 2013.

Trametinib montre en plus une augmentation de la survie globale des patients, comparativement au traitement par Dabrafénib seul (Long et al. 2014, Robert C. et al. 2015a).

Cette approche thérapeutique combinatoire est toujours en cours d'évaluation dans le cadre d'essais cliniques dont les objectifs sont d'augmenter le taux et la durée de réponse avec des profils de tolérance acceptables. À ce jour en France, cette association ne peut donc être proposée en dehors du cadre d'essais thérapeutiques.

Malheureusement, si les réponses cliniques les plus encourageantes dans la thérapie anti-mélanome sont observées chez les patients bénéficiant d'association d'inhibiteurs anti-BRAF^{V600} et anti-MEK, il existe toujours des cas de résistances. Il semblerait que ces résistances à la combinaison d'inhibiteur de MEK et de BRAF^{V600} soient associées avec la réactivation des kinases ERKs, comme cela se produit dans la plupart des cas de résistance acquise aux inhibiteurs de BRAF^{V600} en monothérapie (détaillés dans le chapitre III). Récemment, une étude a détecté une mutation activatrice de MEK2 (Q60P) chez des patients atteints de mélanome métastatique ayant développé une première résistance aux inhibiteurs de BRAF^{V600}, puis une seconde à leur combinaison avec un inhibiteur des MEKs (Wagle et al. 2014). Depuis, des inhibiteurs directs des kinases ERKs sont en cours d'études précliniques pour tenter de contrecarrer ces résistances, mais également pour cibler les mélanomes non mutés BRAF (Wong et al. 2014).

c. Une nouvelle approche thérapeutique basée sur le concept de « drug-dependency ».

Les nombreuses études qui ont porté sur les mécanismes de résistance acquise aux inhibiteurs de BRAF^{V600} qui seront abordés dans le chapitre III, ont fait émerger ces deux dernières années un nouveau concept majeur dans l'utilisation de ces inhibiteurs pour traiter le mélanome: le concept de dépendance à une molécule thérapeutique ou « **drug-dependency** ». En effet, des études ont montré *in vitro* et *in vivo* dans des modèles de xénogreffe que les mélanomes ayant développé une résistance au Vémurafénib deviennent dépendants de celui-ci pour proliférer (Das Thakur and Stuart 2013, Das Thakur et al. 2013) : l'arrêt de l'administration du Vémurafénib entraîne une diminution de la prolifération des lignées cellulaires de mélanome et une régression des tumeurs. Ces observations ont immédiatement guidé les scientifiques vers l'idée suivante: moduler l'intensité de pression de sélection de la thérapie ciblée pour retarder, voir empêcher, l'émergence d'une résistance à cette thérapie, et ce, par le traitement intermittent des patients (Figure 16). Finalement, cette nouvelle option thérapeutique viserait à interrompre l'expansion par pression de sélection des clones résistants naissants, pour prolonger l'effet initial anti-mélanome des inhibiteurs de BRAF^{V600}.

Récemment, dans des modèles de xénogreffe (human melanoma patient-derived xenografts ou PDX), mais également en clinique chez des patients atteints de mélanomes métastatiques porteurs de mutation BRAF^{V600}, il a été observé que l'administration par intermittence plutôt que quotidienne d'inhibiteur de BRAF^{V600} pouvait être effectivement plus efficace, et diminuait la toxicité du traitement (Abdel-Wahab et al. 2014, Das Thakur et al. 2013, Dooley et al. 2014, Mackiewicz-Wysocka et al. 2014). De plus, une étude a identifié un mécanisme de résistance aux inhibiteurs de BRAF^{V600} et aux inhibiteurs de MEK, à caractère réversible, directement dépendant de la présence ou non de ces inhibiteurs. Cette étude montre que la surexpression du récepteur à l'EGF (Epidermal Growth Factor receptor, ou EGFR) par les cellules de mélanome mutées BRAF^{V600} (mécanisme de résistance acquise aux inhibiteurs de BRAF^{V600} ou de MEK qui sera présenté dans le chapitre III), est réversible dès lors que les cellules sont en absence d'inhibiteurs (Sun et al. 2014) : ainsi la mise en place de l'administration intermittente d'inhibiteurs de BRAF^{V600} ou de MEK pour

les patients devenus résistants aux inhibiteurs de BRAF^{V600} ou de MEK serait d'autant plus pertinente pour les patients résistants « EGFR-positifs ».

d. Thérapies pour les mélanomes métastatiques non mutés BRAF^{V600}.

De manière générale, pour les mélanomes ne portant pas de mutation BRAF^{V600}, les options thérapeutiques envisagées se restreignent aux chimiothérapies et/ou aux immunothérapies. Pour les patients atteints de mélanome métastatique ou non résecable non muté BRAF^{V600}, la chimiothérapie de référence en première intention ayant une AMM en France reste la Dacarbazine en monothérapie, et peut également être combinée à l'immunothérapie (Robert C. et al. 2011). Cependant, une étude récente vient de démontrer le bénéfice à utiliser une immunothérapie en première intention plutôt que la Dacarbazine dans le traitement de patients atteints de mélanome métastatique non mutés BRAF. Ces patients traités par du Nivolumab (cf partie 2 de ce chapitre) présentent une augmentation de la survie globale et sans progression comparativement aux patients traités avec de la Dacarbazine, et ont un taux de survie à 1 an de presque 83% contre 42% sous Dacarbazine (Robert C. et al. 2015b). Le Nivolumab sera très prochainement le traitement de première intention pour les patients atteints de mélanome métastatique ou non résecable non muté BRAF^{V600}.

Pour les patients atteints de mélanome porteurs de mutations oncogéniques activatrices de RAS, il n'existe pas encore de thérapie ciblée efficace. Pourtant, ces mutations représentent environ 20% des mélanomes. L'étude de la régulation des voies de signalisation en aval de RAS, telle que la voie RAF-MEK-ERK reste donc d'une importance majeure dans la recherche de cibles potentiellement accessibles à des thérapies ciblées pour les mélanomes mutés RAS. Comme cela a été décrit dans le chapitre I (cf.I.B.1.a.), les isoformes A-, B-, et CRAF sont des kinases activées par RAS, et vont activer à leur tour les kinases MEKs activatrices des kinases ERKs. Le rôle de BRAF et de CRAF est différent selon le contexte cellulaire.

Dans les mélanocytes, l'activation constitutive de la voie de l'AMP cyclique (AMPC) initiée par l' α MSH et impliquée dans la différenciation des mélanocytes (cf.I.A.2.a.), conduit à l'inactivation de CRAF par phosphorylation (Dumaz et al. 2006). C'est alors la kinase BRAF qui est seule responsable de l'activation des kinases MEKs.

Dans le cas du mélanome, le rôle de CRAF dans l'activation des MEKs devient prépondérant dans différentes situations cellulaires : dans les mélanomes portant une mutation BRAF (autre que V600) à l'origine d'une faible activité de la kinase BRAF (Garnett et al. 2005, Wan et al. 2004), dans les mélanomes mutés BRAF^{V600} ayant développé une résistance aux inhibiteurs de BRAF^{V600} suite à un « switch » dans l'activation de MEK par CRAF et plutôt que par BRAF (Villanueva et al. 2010), et enfin dans le cas de mutation RAS et/ou en présence d'une kinase BRAF inactive, entraînant également un « switch » dans l'usage des isoformes RAF par la cellule de mélanome dans l'activation des MEKs au profit de CRAF (Dumaz et al. 2006, Heidorn et al. 2010). Dans ce dernier contexte, une étude a montré l'existence d'une coopération entre la voie RAS-RAF-MEK-ERK et la voie de l'AMPC à l'origine de l'activation constitutive de la kinase ERK dépendante du « switch BRAF vers CRAF ». En effet, dans un contexte NRAS muté, ce « switch » résulte à la fois de l'inhibition de l'interaction BRAF-NRAS suite à la phosphorylation constitutive de BRAF sur son résidu Serine 151 (Ser151) par ERK, et de l'inhibition de la voie de l'AMPC par sur expression d'une protéine impliquée dans la dégradation de l'AMPC (la PDE4, pour phosphodiesterase-4) prévenant ainsi l'inhibition de CRAF (Marquette et al. 2011).

Par ailleurs, une étude a montré que l'inhibition de CRAF pouvait induire la mort par apoptose de cellules de mélanome non mutées BRAF^{V600E} (Smalley et al. 2009). L'ensemble de ces données sur l'implication de CRAF dans l'activation des MEKs dans le mélanome, et notamment le mélanome porteur de mutation RAS, a mis en évidence ces dernières années l'intérêt du ciblage unique, ou en combinaison avec les inhibiteurs de BRAF^{V600}, de la kinase CRAF¹⁴, ou d'acteurs des voies parallèles impliquées dans son activation tels que les phosphodiesterases, en cours d'évaluation dans un autre contexte pathologique que celui du mélanome. Girotti et al ont récemment testé des inhibiteurs « larges » (pan-inhibiteurs) des RAFs et ont montré leur efficacité anti-mélanome sur des cellules de mélanome ou sur des patients résistants aux inhibiteurs de BRAF^{V600} ou de BRAF^{V600}/MEK, mais également sur des mélanomes mutés NRAS (Girotti et al. 2015).

2. L'immunothérapie : en première intention ou comme dernier recours.

Aux progrès apportés par le développement de thérapies ciblées dans le traitement des mélanomes métastatiques ces dernières années, s'ajoutent les importantes avancées de l'immunothérapie. Dans le cas du mélanome, l'immunothérapie vise désormais à déverrouiller la réponse immunitaire. En effet, la cellule tumorale est capable d'échapper à la vigilance du système immunitaire notamment en inhibant l'activation des lymphocytes T (soldats de l'immunité) via l'expression à sa surface de certains ligands des récepteurs des lymphocytes T. L'immunothérapie comme adjuvant à la chirurgie telle que l'administration à haute dose d'IL-2 ou d'IFN (chimiokines) n'ayant pas montré de réelle efficacité sur la régression de la maladie, de nouvelles immunothérapies anticancéreuses ont été mises au point ces 5 dernières années : elles sont capables de cibler les « check points » immunologiques que sont les interactions entre cellules de mélanome et lymphocytes T. Aujourd'hui, deux catégories de médicaments sont étudiées et/ou proposées, leur bénéfice en termes de survie chez les patients atteints de mélanome métastatique ou non résecable ayant été démontré: les **anti-CTLA-4** et les **anti-PD-1/anti-PD-L1**.

a. Les anti-CTLA4

La protéine CTLA-4 (pour Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4) est un récepteur exprimé à la surface des lymphocytes T. Il s'agit d'un compétiteur naturel de CD28, exprimé également par les lymphocytes T, pour la liaison au ligand B7 situé sur la surface des cellules présentatrices d'antigènes et des cellules de mélanome. Lorsque CD28 est lié à la protéine B7, le lymphocyte T est actif. Au contraire, l'activation de CTLA-4 par sa liaison à la protéine B7 a un effet inhibiteur sur le lymphocyte T, et empêche donc une réponse immune efficace (Figure 17).

Par conséquent, l'utilisation d'un anticorps monoclonal anti-CTLA-4 vise à supprimer l'inactivation CTLA-4-B7 dépendante des lymphocytes T par les cellules de mélanomes, et ainsi potentialiser la réponse immunitaire anti tumorale (Robert C. and Ghiringhelli 2009). Il existe deux anticorps monoclonaux ciblant CTLA-4: l'Ipilimumab et le Tremelimumab (qui ne sera pas décrit ici, au profit de l'Ipilimumab en tant qu'immunothérapie de référence).

L'Ipilimumab (Yervoy) en monothérapie ou bithérapie (avec la chimiothérapie) a montré au cours de deux essais thérapeutiques de phase III une augmentation de la survie globale de patients atteints de mélanome métastatique (Hodi et al. 2010, Robert C. et al. 2011).

¹⁴ En régulant la conformation, la stabilité et la fonction des RTKs et des kinases telles que BRAF ou CRAF, la famille des protéines chaperonnes (heat shock protein, (HSP)-90) est impliquée dans le maintien du potentiel malin des cellules cancéreuses (Taipale et al. 2010). Des études ont montré l'effet positif des inhibiteurs de HSP90 sur la dégradation de CRAF dans le mélanome muté BRAF (Montagut et al. 2008, Paraiso et al. 2012).

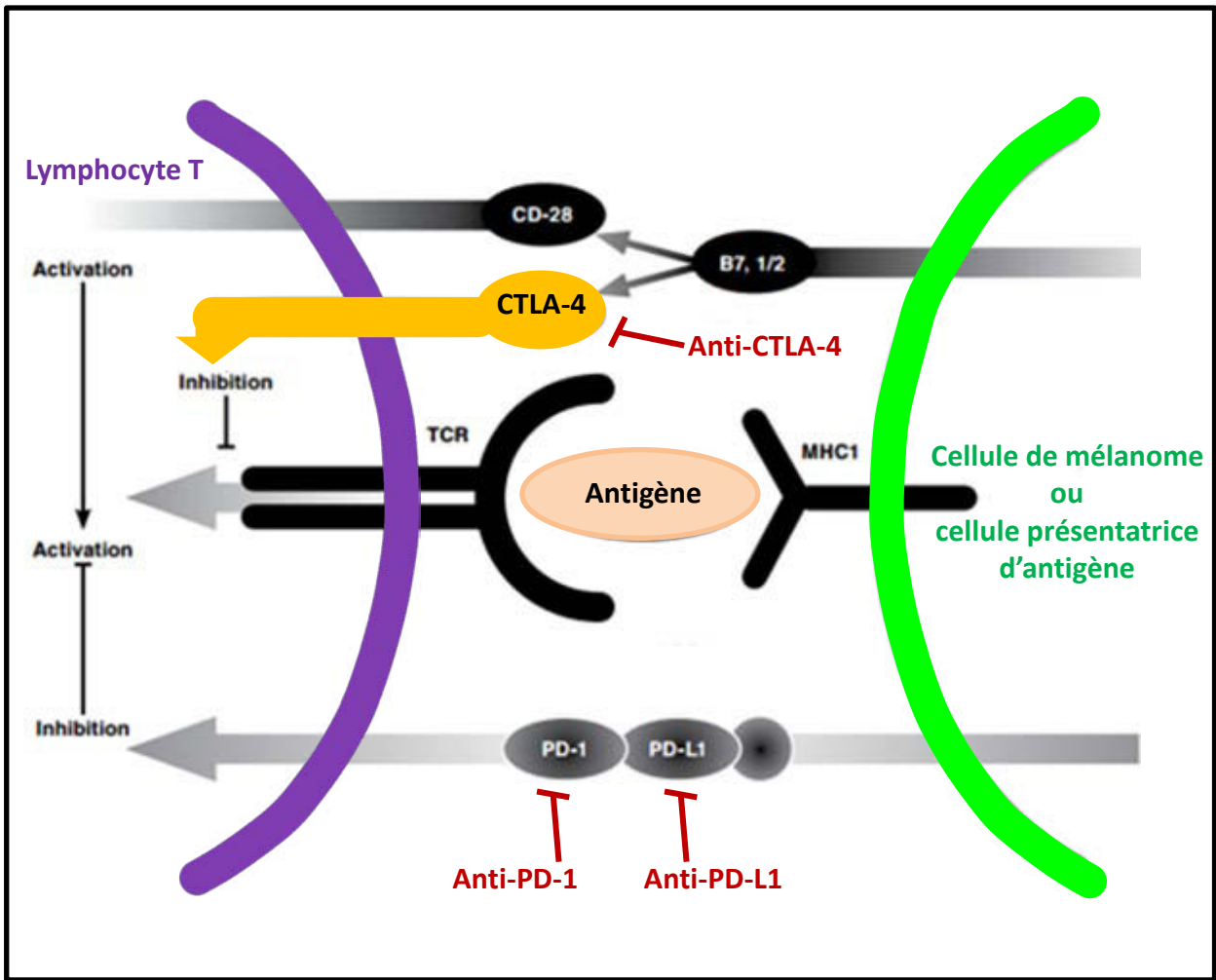


Figure 17. Les immunothérapies: anti-CTLA4 ou anti-PD1/PDL-1.

Le récepteur CTLA-4 à la surface des lymphocytes T agit comme régulateur négatif de leur activité dans la réponse immunitaire anti-tumorale. L'Ipilimumab, un anti-CTLA-4, bloque le récepteur et permet ainsi l'activation des lymphocytes T en rétablissant l'interaction CD28-B7. Cette interaction restaure la prolifération des lymphocytes T et amplifie la réponse immunitaire anti-tumorale.

La liaison de PD-L1, exprimé par les cellules de mélanome, avec son récepteur exprimé à la surface des lymphocytes T entraîne une inhibition de l'activité anti-tumorale de ces dernières.

Tiré de Olszanski et al. 2014

Si cette immunothérapie peut être à l'origine de la guérison du patient dans certains cas, la proportion de patients répondeurs à l'Ipilimumab rapportée par différentes études reste assez faible : inférieure à 10 % (Hodi et al. 2010). Et si quelques études ont établi des liens entre une réponse positive à l'Ipilimumab avec certains paramètres physiologiques (Ji R. R. et al. 2012a, Ku et al. 2010), il n'existe pas actuellement de marqueur biologique prédictif de réponse permettant d'identifier les patients qui répondront à l'Ipilimumab.

Cependant, deux récentes études mettent en évidence des marqueurs de bénéfices au cours du traitement par anti-CTLA-4 ou autre immunothérapie. Une première étude montre l'existence d'une corrélation entre le bagage mutationnel des tumeurs et leur réponse aux anti-CTLA-4. Les tumeurs mélaniques portant de nombreuses mutations présentent des neoépitopes qui vont promouvoir la réponse anti-tumorale activée par les anti-CTLA-4 (Snyder et al. 2014). La seconde étude décrit l'apparition de vitiligo¹⁵ dans quelques cas de patients atteints de mélanome métastatique sous immunothérapie comme un indicateur d'une réponse immunitaire anti mélanome efficace associée à une amélioration de la survie de ces patients (Teulings et al. 2015). L'Ipilimumab a une AMM en traitement de seconde ligne suite à un échappement non agressif d'un mélanome métastatique à un premier traitement, mais également de première ligne depuis 2014 et quel que soit le statut BRAF du patient (le statut BRAF muté étant néanmoins le plus souvent orienté vers le traitement par inhibiteurs BRAF). Le mécanisme d'action retardé de cette immunothérapie (> 3 mois) incite les médecins à la sélection de patients présentant une maladie peu agressive et/ou peu évolutive. Une vigilance particulière doit être apportée sur le recueil des effets secondaires immunologiques très nombreux et potentiellement sévères de ce traitement (prurits, éruptions, diarrhées, colite, etc.).

b. Les anti-PD1 et anti-PDL1.

La protéine PD-1 (pour Programmed cell death protein-1) est un récepteur exprimé par les lymphocytes T. Lorsque ce récepteur est stimulé par la liaison à PD-L1 (B7-H1), l'un de ses ligands exprimé notamment par les cellules de mélanomes (Zou and Chen 2008), il délivre un signal inhibiteur de l'activité anti-tumorale des lymphocytes T (pour revues, (Moreno and Ribas 2015, Zavala and Kalergis 2015))(Figure 17).

Le Nivolumab et le Pembrolizumab sont des anticorps monoclonaux qui se fixent aux récepteurs PD-1 des lymphocytes T. En se fixant aux récepteurs PD-1, ces deux composés empêchent donc leur interaction avec PD-L1, réactivant ainsi les lymphocytes T anti tumoraux. Dans le mélanome, il semblerait que l'efficacité du Nivolumab soit d'autant plus importante que le traitement est associé à l'Ipilimumab (Wolchok et al. 2013). De plus, dans un essai thérapeutique de phase III incluant des patients atteints de mélanome métastatique réfractaires à l'Ipilimumab, le Nivolumab a été associé à un taux de réponse supérieur en comparaison avec un traitement par Dacarbazine¹⁶, et le Pembrolizumab a montré une efficacité notable avec une bonne tolérance des patients atteints de mélanome métastatique réfractaire à l'Ipilimumab dans une étude de phase I (Robert C. et al. 2014).

¹⁵Le vitiligo se manifeste par l'apparition de zones de peau dépigmentée plus ou moins importantes, suite à la disparition progressive des mélanocytes. La production d'anticorps attaquant les mélanocytes par l'individu atteint de vitiligo serait une des causes de leur destruction de ces cellules.

¹⁶Weber JS, Minor D, D'Angelo SP, et al. Phase 3 randomized, open-label study of nivolumab (anti-PD-1; BMS-936558 ONO-4538) versus investigator's choice chemotherapy (IC) in patients with advanced melanoma with prior anti-CTLA 4therapy. Presented at the European Society for Medical Oncology 2014 Congress, Madrid, September 26–30, 2014. abstract.

En France, le Nivolumab et le Pembrolizumab font l'objet d'une ATU de cohorte¹⁷ (autorisation temporaire d'utilisation). Récemment, il a été démontré un bénéfice considérable à utiliser en première intention le Nivolumab pour traiter des patients atteints de mélanome métastatique non mutés BRAF, plutôt que la Dacarbazine (Robert C. et al. 2015b). Depuis, le Nivolumab peut être utilisé chez des patients atteints de mélanome non résecable (stade III) ou métastatique (stade IV) :

- pour les patients ne présentant pas de mutation BRAF^{V600} : en première intention en cas de contre-indication à l'utilisation de l'ipilimumab, ou en seconde intention suite à un échappement au traitement par Ipilimumab.
- pour les patients présentant une mutation BRAF^{V600} ayant échappé au traitement par un inhibiteur BRAF.

Le Pembrolizumab peut être utilisé chez des patients atteints de mélanome non résecable (stade III) ou métastatique (stade IV) en seconde intention après traitement par inhibiteur BRAF pour les patients présentant une mutation BRAF^{V600}, ou après traitement par Ipilimumab pour les patients ne présentant pas de mutation BRAF^{V600}.

Des anticorps dirigés contre le ligand PD-L1 sont également en cours d'évaluation. Des anti-PD-L1 ont montré leur activité en clinique dans différents cancers tel que le mélanome¹⁸ (Brahmer et al. 2012). L'un fait actuellement l'objet d'une investigation quant à son efficacité au cours d'une thérapie le combinant au Dabrafénib et au Tramétinib, ou au Tramétinib seul, chez des patients atteints de mélanome métastatique avec ou sans mutation BRAF^{V600}, respectivement (pour revue, (Moreno and Ribas 2015)).

Les études sur les anti-PD-1 et les anti-PD-L1 prônent l'utilisation prometteuse de ces immunothérapies chez des patients qui n'ont que peu d'options thérapeutiques, dans le cas d'absence de mutation BRAF^{V600} par exemple (Robert C. et al. 2015b), ou qui n'ont pas d'autres alternatives de traitement efficace après avoir reçu un traitement par Ipilimumab ou par thérapie ciblée anti BRAF et/ou anti-MEK en présence d'une mutation BRAF^{V600} (Hamid et al. 2013, Robert C. et al. 2014).

De plus, il semblerait que les inhibiteurs de BRAF^{V600} modulent l'immunité anti-tumorale (Boni et al. 2010, Koya et al. 2012), notamment via l'augmentation de l'expression des ligands PD-L1 (Jiang X. et al. 2013), suggérant l'association des inhibiteurs de BRAF aux immunothérapies anti-PD1/PD-L1. Un premier essai associant Vémurafénib et Ipilimumab (anti-CTLA4) a été écourté, démontrant une trop forte toxicité (Ribas et al. 2013), mais le ciblage de l'immunité anti-tumorale en même temps que celui de la voie activée par la mutation BRAF^{V600} reste une option importante à perfectionner dans la thérapie des mélanomes mutés BRAF^{V600}, peut-être en passant par une immunothérapie anti-PD-1/PDL1.

¹⁷En France, l'utilisation exceptionnelle de spécialités pharmaceutiques ne bénéficiant pas d'une autorisation de mise sur le marché (AMM) et ne faisant pas l'objet d'un essai clinique est conditionnée à l'obtention préalable d'une Autorisation Temporaire d'Utilisation (ATU). Une ATU de cohorte concerne des médicaments dont l'efficacité et la sécurité d'emploi sont fortement présumées, s'adresse à un groupe ou sous-groupe de patients traités et surveillés suivant des critères définis dans un protocole d'utilisation thérapeutique et de recueil d'informations (PUT), et est délivrée à la demande du titulaire des droits d'exploitation, qui a déposé ou s'est engagé à déposer une demande d'AMM dans un délai fixé. (d'après l'Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des produits de santé, ANSEM).

¹⁸Fairman D, Narwal R, Liang M, Robbins PB, Schneider A, Chavez C, Lu H, Pak M, Blake-Haskins A, Vasselli J, Ibrahim RA, Shalabi AM, Roskos L (2014) Pharmacokinetics of MEDI4736, a fully human anti-PDL1 monoclonal antibody, in patients with advanced solid tumors [abstract]. J Clin Oncol (Meeting Abstracts). Segal NH, Antonia SJ, Brahmer JR, Maio M, Blake-Haskins A, Li X, Vasselli J, Ibrahim RA, Lutzky J, Khleif S (2014) Preliminary data from a multi-arm expansion study of MEDI4736, an anti-PD-L1 antibody [abstract]. J Clin Oncol (Meeting Abstracts).

Une complexité s'ajoute à ce large panel de traitements possibles pour le mélanome métastatique: l'hétérogénéité génomique inter- et intra-tumorale individuelle, notamment à l'origine de certains échecs thérapeutiques dans le cadre d'un traitement par inhibiteur de BRAF^{V600} pour les mélanomes concernés. Si l'analyse génomique d'un patient n'est basée que sur un échantillon d'une biopsie réalisée sur une tumeur, on comprend bien que l'hétérogénéité intra- et inter-tumorale peut fausser la stratégie thérapeutique pour ce dernier. Parce que la caractérisation de cette hétérogénéité est de plus en plus accessible (Technique de séquençage de nouvelle génération), sa considération par le corps médical est désormais primordiale dans l'élaboration d'un traitement personnalisé du mélanome.

III. LA RESISTANCE AUX MOLECULES THERAPEUTIQUES.

Ces dernières années, l'impact significatif des nouvelles thérapies ciblant la mutation BRAF^{V600} ou encore MEK sur la survie des patients atteints de mélanome métastatique, s'est avéré révolutionnaire dans la thérapie anti-mélanome. Malheureusement les effets souvent spectaculaires des ces nouvelles thérapies sont rapidement et très fréquemment contrecarrés par l'apparition de mécanismes de résistance aux molécules administrées, ou « drug-resistance ».

La résistance tumorale aux molécules thérapeutiques est indissociable de l'intervention de deux catégories d'acteurs : les acteurs internes aux cellules tumorales représentant la **composante intrinsèque** de la résistance thérapeutique, et les acteurs externes aux cellules tumorales représentant la **composante extrinsèque** de la résistance thérapeutique.

A. LA COMPOSANTE INTRINSEQUE AUX CELLULES TUMORALES DE LA RESISTANCE THERAPEUTIQUE.

Quelle soit innée ou acquise comme cela sera décrit par la suite, la résistance aux inhibiteurs de BRAF^{V600} peut résulter de modifications intracellulaires guidées par des mutations génétiques, génomiques ou épigénétiques de la cellule de mélanome, à l'origine de la réactivation des voies RAF-MEK-ERK et/ou PI3K-AKT sous jacentes de RAS (vues dans le chapitre II). Ces mutations offrent un avantage de survie aux cellules tumorales face à la molécule thérapeutique anti-tumorale : elles sont sélectionnées par pression de sélection imposée par la molécule thérapeutique.

Sélection de clones résistants : il existe des tumeurs de mélanome résistantes, dont la résistance aux drogues peut être la résultante d'une sélection de sous-populations de cellules qui présentent une résistance acquise ou innée. Par exemple, une étude a montré l'existence de cellules initiatrices de tumeurs exprimant fortement les transporteurs ABC (ATP-binding cassette, permettant l'efflux de nombreuses molécules thérapeutiques comme la Dacarbazine ou le Vémurafénib), et qui sont à l'origine de la résistance thérapeutique des tumeurs dont elles font partie intégrante (Chartrain et al. 2012). Un autre exemple s'inscrivant dans l'hétérogénéité tumorale, est celui des sous-clones tumoraux BRAF sauvages et/ou mutés pour NRAS, insensibles aux inhibiteurs de BRAF^{V600} et qui, par expansion plus ou moins rapide au dépend d'autres clones sensibles sous pression de sélection par ces inhibiteurs, conduisent à la résistance acquise (ou innée, si l'expansion de ces clones est rapide) de la tumeur (pour revue, (Charles et al. 2014)).

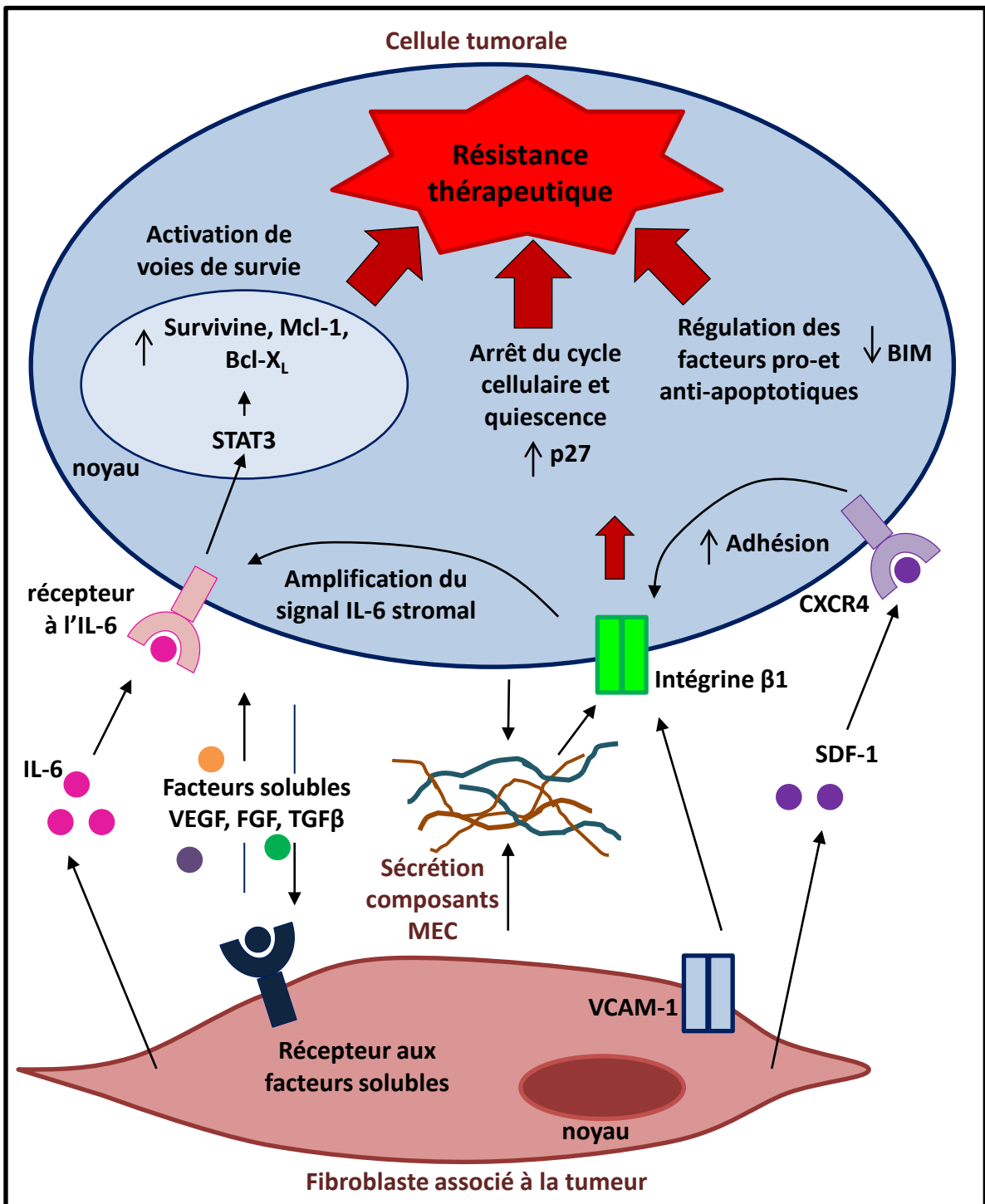


Figure 18. L'EMDR repose sur l'interaction entre la tumeur et son stroma.

Les interactions entre les cellules tumorales et le stroma micro-environnemental procurent aux cellules tumorales une certaine résistance aux traitements. Les cellules tumorales, via leurs intégrines de surface, s'attachent à des composants de la matrice extracellulaire (MEC) sécrétés à la fois par elles-mêmes et les cellules du stroma tels que la fibronectine, ou à des récepteurs exprimés par les cellules stromales tels que VCAM-1. Cette adhésion induit un état de quiescence des cellules tumorales et une régulation des facteurs anti- et pro-apoptotiques qui les rendent moins sensibles aux traitements: c'est la CAM-DR (pour cell adhesion-mediated drug resistance).

Entre les cellules tumorales et le stroma micro-environnemental se met en place une boucle amplificatrice de sécrétion de facteurs solubles induisant une augmentation des facteurs anti-apoptotiques et augmentant la CAM-DR. Cette boucle paracrine est capable de procurer aux cellules tumorales une résistance aux traitements: c'est la SFM-DR (pour soluble factor-mediated drug resistance). D'après Meads et al, 2009.

B. LA COMPOSANTE EXTRINSEQUE DE LA RESISTANCE THERAPEUTIQUE : L'EMDR, UN CONCEPT INDISPENSABLE DANS L'APPREHENSION DU MELANOME.

Comme cela a été abordé dans le chapitre I (cf. partie C), le mélanome, comme d'autres cancers de manière générale, est ancrée au sein d'un microenvironnement, et les nombreuses interactions qu'il met en place avec le stroma tumoral (matrice extracellulaire (MEC) et les cellules non tumorales du microenvironnement favorisent son développement et sa progression. L'identification des différents mécanismes impliqués dans cette interconnexion entre tumeur et stroma microenvironnemental a rapidement suggéré un deuxième rôle de ce dernier dans la résistance thérapeutique. On parle alors de résistance aux molécules thérapeutiques médiée par l'environnement (**EMDR, pour Environment-mediated drug resistance**). **L'EMDR participe à la résistance primaire** aux agents thérapeutiques en protégeant un résidu de cellules tumorales ayant échappé à l'effet initial des ces thérapies, et **contribue au développement de résistance acquise** en exerçant ce rôle protecteur jusqu'à ce que les cellules tumorales aient développé des mécanismes de résistance intrinsèques (pour revue, (Meads et al. 2009)) (Figure 18).

Parmi les mécanismes de l'EMDR, certains peuvent être liés à une interaction indirecte des différentes populations de cellules qui siègent au sein de la tumeur, et sont classés dans la catégorie des résistances médiées par des facteurs solubles (**SFM-DR, pour soluble factor-mediated drug resistance**). D'autres, mettent en jeu l'adhésion des cellules tumorales aux cellules stromales ou aux composants de la MEC, et sont classés dans la catégorie des résistances médiées par l'adhésion cellulaire (**CAM-DR, pour cell adhesion-mediated drug resistance**).

1. La SFM-DR.

Ce type d'interaction met en jeu de nombreux facteurs solubles (cytokines, chimiokines et facteurs de croissance) qui peuvent être sécrétés par l'ensemble des cellules de la tumeur (tumorales et/ou stromales). L'ensemble des facteurs sécrétés est appelé sécrétome.

Des expériences de co-culture de cellules stromales et cancéreuses ont permis de mettre en évidence l'existence d'une connexion indispensable entre des cellules stromales et tumorales dans la résistance thérapeutique: les cellules tumorales éduquent les cellules stromales de manière à ce que ces dernières façonnent en retour un microenvironnement capable de promouvoir la résistance thérapeutique des cellules tumorales. En effet, une fois mises en présence de cellules tumorales (directement en contact, ou indirectement avec un sécrétome cellulaire), les cellules stromales produisent en forte quantité différents facteurs solubles qui vont jouer un rôle important dans la croissance mais également la résistance thérapeutique de la tumeur (pour revues, (Borriello and DeClerck 2014, Meads et al. 2009)). Le SDF-1 (stromal cell-derived factor 1)(Hartmann et al. 2005), l'interleukine 6 (IL-6) (Borsellino et al. 1999), le VEGF (vascular endothelial growth factor) (Carmeliet and Jain 2011), le TNF α (Smith et al. 2014), ou encore le TGF β (transforming growth factor-b)(Singh and Settleman 2010) sont autant de facteurs fortement sécrétés par les cellules stromales associées aux tumeurs et par les cellules tumorales (Allinen et al. 2004, Orimo et al. 2005), ayant été reconnus comme médiateurs de la SFM-DR dans les cancers hématologiques et épithéliaux, mais également dans la CAM-DR en modulant l'expression de récepteur d'adhésion (cf. paragraphe suivant).

Ces dernières années, le sécrétome des cellules tumorales elles-mêmes ou des fibroblastes associés à la tumeur a été impliqué dans la résistance des mélanomes au inhibiteurs de BRAF^{V600}, en particulier par la présence de hauts niveaux d'HGF (Straussman et al. 2012) et de FGF (Liu et al. 2013) dans ce sécrétome.

En 2012, Wilson et al. ont de manière générale mis en évidence l'importance des ligands des récepteurs tyrosine-kinase (RTKs) présents dans le stroma tumoral dans la résistance des mélanomes aux agents ciblant BRAF^{V600}. Ces ligands constituent un réservoir qui alimente et assure l'activation des voies de signalisation impliquées dans la résistance des cellules de mélanomes et initiées par la surexpression de RTKs (décrit dans la suite du chapitre).

Récemment, une étude a montré dans un modèle de xénogreffe de mélanome humain, que le Vémurafénib est à l'origine d'un secrétome particulier des cellules de mélanome faisant suite à l'hyper-activation de la voie PI3K-AKT majoritairement. Ce secrétome de cellules devenues résistantes agit de manière autocrine à la fois sur leur propre croissance et sur leur dissémination métastatique, et favorise la survie de cellules sensibles au Vémurafénib. Cette coopération entre clones résistants et cellules sensibles contribue ainsi à une régression seulement partielle de la tumeur sous Vémurafénib, et par conséquent à la résistance thérapeutique (Obenauf et al. 2015). Dans la partie présentant les résultats de ce travail de thèse, nous verrons que la protéine matricellulaire SPARC, fortement sécrétée par les cellules de mélanome, peut également jouer un rôle dans leur résistance primaire au Vémurafénib.

2. La CAM-DR.

La CAM-DR permet aux cellules tumorales d'être plus ou moins résistantes à l'effet anti tumoral d'une molécule thérapeutique par adhésion aux composants de la MEC (fibronectine, laminine, collagène) (Fridman et al. 1990, Hazlehurst et al. 2000, Sethi et al. 1999), ou aux cellules stromales (Parmar et al. 2011, Shain et al. 2009), via l'expression des intégrines à leur surface. Cette adhésion est un mécanisme majeur de l'EMDR, et est principalement médiée par des mécanismes à l'origine d'une stabilisation de protéines inhibitrices du cycle cellulaire entraînant un état de quiescence, de l'activation des voies de survie, et d'une régulation négative de facteurs pro-apoptotiques (Borriello and DeClerck 2014, Meads et al. 2009).

In vitro et in vivo les intégrines $\beta 1$ ont été impliquées dans la résistance thérapeutique des cancers hématologiques et épithéliaux, qu'elle soit médiée par l'adhésion des cellules tumorales à la MEC (Damiano et al. 1999, Hartmann et al. 2005, Hodgkinson et al. 2006, Hsieh et al. 2013, Yan L. M. et al. 2015), ou aux cellules stromales (Mishra et al. 2006, Mitsiades et al. 2006). L'adhésion des cellules tumorales aux cellules stromales a pour principale conséquence de moduler l'expression tumorale des intégrines et de remodeler la MEC (changement de composition et/ou de l'assemblage de la MEC)(pour revue, (Meads et al. 2009)), les CAFs étant les principaux acteurs de ce remodelage (Gaggioli et al. 2007).

Dans le cas du mélanome, l'adhésion intégrine-dépendante à la fibronectine de la matrice extracellulaire protège les cellules de mélanome de la mort par apoptose induite par la délétion de BRAF (Boisvert-Adamo and Aplin 2006). Une étude mentionnée précédemment a montré qu'en présence d'inhibiteur de BRAF^{V600E} (le PLX4720) les fibroblastes associés aux cellules de mélanome sont activés et produisent une matrice extracellulaire de densité supérieure à celle produite en l'absence d'inhibiteur. Cette MEC enrichie en fibronectine va promouvoir une résistance des cellules de mélanome au PLX4720 via l'augmentation de la voie intégrine $\beta 1$ /FAK/SRC (Hirata et al. 2015).

D'autre part, la mise en évidence de cellules tumorales circulantes dans les vaisseaux sanguins (CTC, pour Circulating Tumor Cells) enrichies de précurseurs de métastase, et sur-exprimant des gènes impliqués dans la composition ou l'assemblage de matrice extracellulaire tel que le gène

codant pour la protéine SPARC (présentée dans le chapitre suivant) (Ting et al. 2014), suggère une possible propagation de la CAM-DR d'un site tumoral à un autre.

C. LA SUREXPRESSON DES RTKS ASSOCIEE A LA RESISTANCE AUX INHIBITEURS DE BRAF^{V600E}.

La **surexpression de divers récepteurs tyrosine-kinase (RTKs)** a été caractérisée par de nombreuses études comme étant à la **base des mécanismes de résistance innée, et acquise** (ERK-dépendent ou ERK-indépendant) aux agents ciblant BRAF^{V600} (Girotti et al. 2013, Nazarian et al. 2010, Straussman et al. 2012, Sun et al. 2014, Villanueva et al. 2010, Wang J. et al. 2015, Wilson et al. 2012). La surexpression des ces RTKs favorise en effet l'activation des voies de survie cellulaire RAS-RAF-MEK-ERK et RAS-PI3K-AKT, déjà requises pour la transformation maligne du mélanocyte, et plusieurs études montrent que le ciblage de ces RTKs par des molécules pharmacologiques peut être efficace pour contrer la résistance des mélanomes aux thérapies ciblées (Miao et al. 2015, Shi et al. 2011). Certains de ces RTKs impliqués dans la résistance aux agents ciblant BRAF^{V600}, tels que le PDGFR ou l'IGF-1R, dont les expressions ont été retrouvées augmentées *in vitro* dans des cellules de mélanome résistantes au Vémurafénib et dans des échantillons de tumeurs issues de patients atteints de mélanome en progression sous Vémurafénib (Nazarian et al. 2010, Villanueva et al. 2010), seront présentés ultérieurement.

Dans la suite de ce chapitre seront décrits différents mécanismes de résistance aux inhibiteurs de BRAF^{V600}. En se basant sur les différents contextes d'étude dans lesquels ces résistances ont été identifiées (avant ou après le début du traitement par exemple), elles seront volontairement classées dans les deux catégories de résistances que sont la résistance innée et la résistance acquise. Cependant, il est important de noter que **chacun de ces mécanismes pourrait finalement être à la base de résistance innée et/ou acquise aux inhibiteurs de BRAF^{V600}**: cela dépend directement du caractère préexistant ou non de ce mécanisme en tout début de thérapie dans une minorité ou une majorité des cellules de la tumeur. En effet, un de ces mécanismes qui serait présent avant tout traitement, mais dans une infime minorité de cellules tumorales et chez un patient ayant répondu objectivement à la thérapie, serait un mécanisme de résistance dite « acquise » (suite à la sélection et l'expansion au cours du traitement de clones résistants de manière innée), alors qu'il serait un mécanisme de résistance dite « innée » s'il avait été détecté avant tout traitement dans une majorité de cellules tumorales chez un patient n'ayant pas présenté de réponse objective à la thérapie.

D'autre part, il existe une relation chronologique entre la résistance innée et la résistance acquise. La résistance innée est le résultat de mutations préexistantes au traitement offrant un avantage de survie aux cellules tumorales face à la molécule thérapeutique anti-tumorale. Ces mutations sont en effet sélectionnées par pression de sélection imposée par la molécule thérapeutique. La résistance innée, si elle ne touche qu'un petit lot de cellules, ne peut être que transitoire si l'effet prolongé du traitement anti-tumoral finit par prendre le dessus. Dans ce cas là, cette minorité de cellules résistantes nécessitent plusieurs mutations additionnelles qui s'inscrivent dans le temps pour renforcer leur résistance innée, et acquérir un phénotype plus solide de résistance, c'est-à-dire une résistance acquise au traitement.

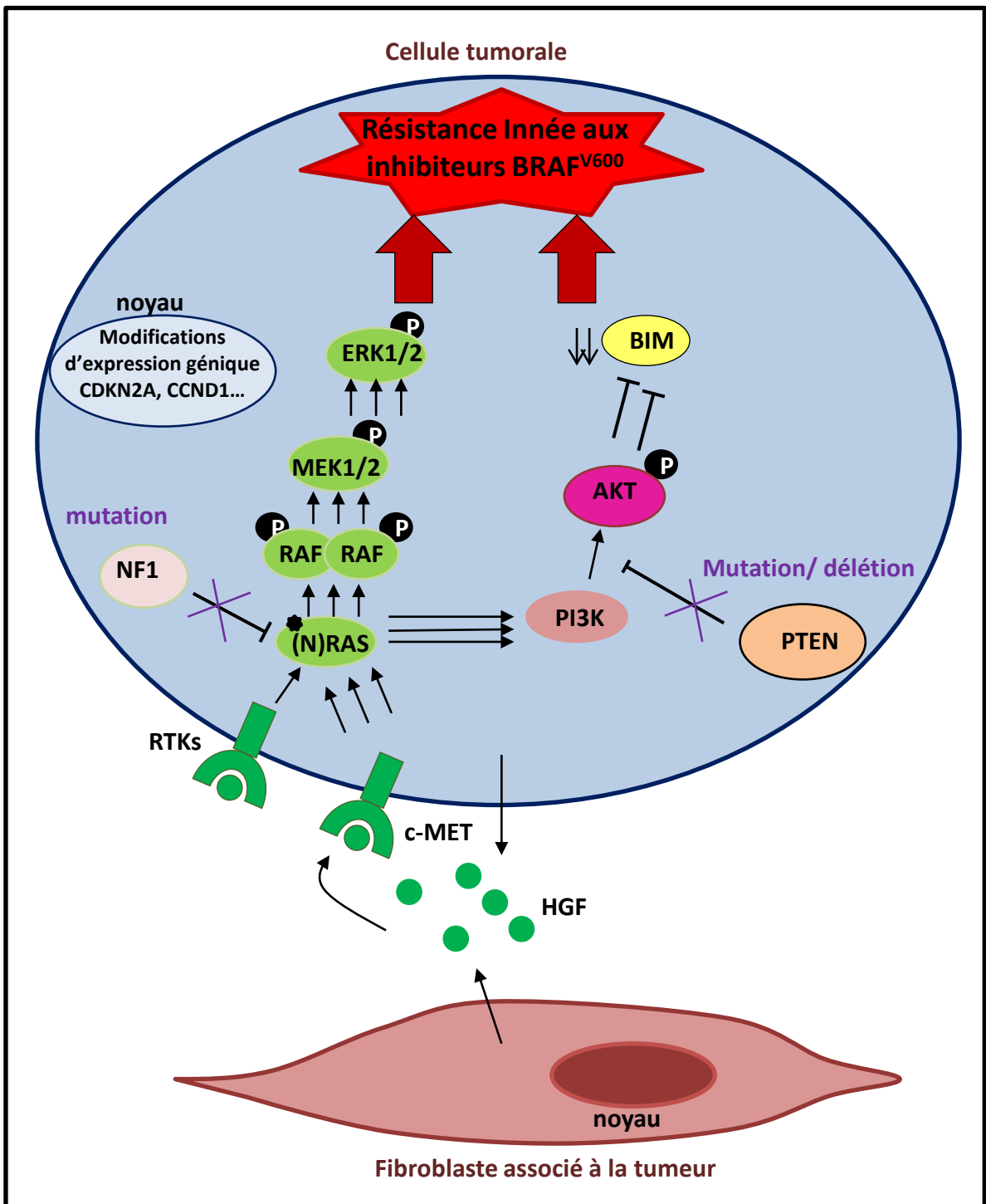


Figure 19. Exemples de mécanismes de résistance innée des mélanomes aux inhibiteurs de BRAF^{V600}: sur-activation des voie RAF-MEK-ERK et PI3K-AKT.

La perte du gène suppresseur de tumeur par délétion ou mutation, ou la surexpression de l'HGF et/ou de son récepteur c-MET entraîne une hyper-activation de la voie PI3K/AKTPTEN. La mutation de NF1 (régulateur négatif de NRAS), ou de NRAS (étoile noire), ou la surexpression de l'HGF et/ou de son récepteur c-MET entraîne une hyper-activation de la voie RAS-RAF-MEK-ERK.

D. LA RESISTANCE INNEE OU PRIMAIRE AUX INHIBITEURS DE BRAF^{V600}.

Comme évoqué précédemment, 10 à 20% des patients porteurs de la mutation BRAF^{V600} sont non-répondeurs aux inhibiteurs de BRAF^{V600}: ils présentent une **résistance innée ou primaire** à ces thérapies (Flaherty et al. 2010, Hauschild et al. 2012, Sosman et al. 2012). La compréhension de ces mécanismes de résistance est d'une importance élémentaire car elle permettrait le dépistage des patients résistants avant même de commencer le traitement par inhibiteurs de BRAF^{V600}, et auxquels d'autres traitements devraient être administrés dès la première intention.

Quelques mécanismes de résistance innée aux inhibiteurs de BRAF^{V600} ont été décrits et sont caractérisés par la réactivation de la voie RAF-MEK-ERK et /ou PI3K-AKT (liste non exhaustive) (Figure 19):

Un premier mécanisme fait intervenir le gène suppresseur de tumeur *PTEN*. Ce dernier est retrouvé muté ou délété dans de nombreux mélanomes, comme cela a précédemment été décrit. La **perte de PTEN** dans des lignées de mélanomes mutées BRAF^{V600E} entraînant l'hyper-activation de la kinase AKT puis la suppression du facteur pro-apoptotique BIM, a été associée à une résistance primaire à l'apoptose engendrée par les inhibiteurs de BRAF^{V600} (Paraiso et al. 2011). De plus, chez les patients atteints de mélanomes métastatiques mutés BRAF^{V600}, la détection de mutation ou de changement du nombre de copies dans le gène *PTEN* a été corrélée à une diminution de la survie sans progression de la maladie sous Dabrafénib (un inhibiteur de BRAF^{V600}) (Nathanson et al. 2013). De ce fait :

- la détermination du statut de *PTEN* en complément de celui de BRAF dans les mélanomes métastatiques ou non résecables, pourrait constituer un biomarqueur prédictif de moindre ou de non réponse aux inhibiteurs de BRAF^{V600}.
- l'association de molécules ciblant la voie PI3K-AKT aux inhibiteurs de BRAF^{V600} permettrait une sensibilisation des mélanomes mutés BRAF^{V600} aux inhibiteurs de BRAF^{V600}, initialement résistants.

En 2012, deux études ont simultanément démontré le rôle de la **surexpression et de la sécrétion du facteur de croissance HGF stromal et tumoral**, et la **surexpression tumorale de son récepteur tyrosine kinase MET** dans la réponse primaire des mélanomes mutés BRAF^{V600E} aux inhibiteurs de BRAF^{V600}. Les auteurs de la première étude ont montré que la surexpression et la sécrétion d'HGF par les cellules de mélanome mutées BRAF^{V600E} atténuent significativement leur sensibilité primaire au Vémurafénib, *via* la réactivation des voies RAF-MEK-ERK et PI3K-AKT suite à l'activation de leurs récepteurs MET également surexprimés. De plus, lors d'un essai clinique réalisé avec des patients atteints de mélanomes mutés BRAF^{V600E} traités avec du Vémurafénib, ils ont pu associer l'augmentation d'HGF plasmatique des patients avec un mauvais pronostic de réponse au Vémurafénib (Wilson et al. 2012). Dans la seconde étude, les auteurs montrent un rôle du HGF identique à celui de la première étude mais cette fois-ci lorsqu'il est sécrété par les cellules stromales associées à la tumeur (fibroblastes notamment) (Straussman et al. 2012). Cette seconde étude montre également, par immuno-histochimie sur coupes de tumeur de patients atteints de mélanome muté BRAF^{V600E} et juste après le début du traitement par inhibiteurs de BRAF^{V600} (ou inhibiteur de BRAF^{V600} couplé à des inhibiteurs de MEK1 ou MEK2), que les patients qui présentent une forte expression d'HGF par les cellules stromales associées à la tumeur et à une forte activation des récepteurs MET (MET phosphorylé) répondent nettement moins bien au traitement que ceux qui n'en expriment pas ou peu.

Plus récemment, Liu et ses collaborateurs ont détecté des niveaux élevés de bFGF2 dans le milieu sécrété par des cellules de mélanome mutées BRAF^{V600E} devenues résistantes au Vémurafénib comparativement à leurs homologues sensibles. Ils ont également observé une induction dose-dépendante du Vémurafénib, de la sécrétion de bFGF2 par des fibroblastes et des kératinocytes. Enfin, ils suggèrent l'implication de cette sécrétion de bFGF2 dans l'activation STAT3-dépendante de PAX3 (un facteur de transcription impliqué dans l'activation du récepteur MET dans le mélanome) dans des cellules de mélanome mutées BRAF^{V600E} résistantes au Vémurafénib (Liu et al. 2013).

Ces études montrent plus largement le rôle des molécules sécrétées dans le microenvironnement tumoral, telles que les facteurs de croissance, dans la régulation adaptative des voies de signalisation de survie des cellules tumorales face aux agents thérapeutiques.

De plus, elles suggèrent deux nouvelles considérations dans l'approche thérapeutique des mélanomes métastatiques ou non résecables mutés BRAF^{V600}:

- l'utilisation du niveau d'expression du récepteur MET ou celui de l'expression du HGF tumoral et/ou stromal comme potentiel biomarqueur prédictif de la non-réponse des patients mutés BRAF^{V600} aux inhibiteurs de BRAF^{V600}.
- l'association d'inhibiteurs de MET ou de l'HGF aux inhibiteurs de BRAF^{V600} dans l'intention de sensibiliser les mélanomes mutés BRAF^{V600} initialement résistants, aux inhibiteurs de BRAF^{V600}.

Nous verrons dans la partie présentant les résultats que l'expression de la protéine matricellaire SPARC, qui peut être aussi bien sécrétée par les cellules stromales que par les cellules tumorales, joue un rôle dans la résistance primaire des mélanomes mutés BRAF^{V600E} au Vémurafénib.

Comme cela a été évoqué dans le chapitre I et sera détaillé dans la partie 4 de ce chapitre, l'expression du gène *MITF* est très hétérogène dans le mélanome. De récentes études ont souligné l'importance et la **complexité de cette hétérogénéité d'expression et d'activité de la protéine MITF dans la réponse innée ou acquise** des mélanomes mutés BRAF^{V600} aux inhibiteurs de BRAF^{V600}. Dans la majorité des lignées de mélanome mutées BRAF^{V600} sensibles aux inhibiteurs de BRAF^{V600} la protéine MITF est très fortement exprimée et a une forte activité transcriptionnelle. Dans ce sens, les groupes du Dr. Peeper et du Dr. Garraway ont récemment montré que l'état d'expression MITF-Low/NF- κ B-High ou MITF-Low/AXL-High des cellules de mélanome mutées BRAF^{V600} procure aux mélanomes une résistance innée aux inhibiteurs de BRAF^{V600}, et peut également conduire à l'acquisition de résistance des mélanomes sous inhibiteurs de BRAF^{V600} (Konieczkowski et al. 2014, Muller J. et al. 2014). Néanmoins, ces mêmes groupes ont montré que des clones exprimant fortement MITF ont également été détectés sur biopsies de patients devenus résistants au Vémurafénib, en même temps que des clones MITF-Low (Muller J. et al. 2014), et que l'induction d'acteurs du programme du lignage mélanocytaire, dont MITF, induisait une résistance à l'inhibition de BRAF^{V600} (Johannessen et al. 2013). Enfin, une amplification du gène *MITF* a été retrouvée chez des patients ayant rechuté après une thérapie par inhibiteurs BRAF^{V600} (ou inhibiteurs de MEK), suggérant que sous inhibition de BRAF^{V600}, MITF procure un avantage sélectif de survie aux cellules de mélanome (Van Allen et al. 2014). Ainsi, les mélanomes sont capables de moduler leur expression du facteur MITF, ce dernier étant capable de procurer

une résistance aux inhibiteurs de BRAF^{V600} quel que soit son niveau d'expression. Une explication plausible à cela serait liée à la capacité des cellules de mélanome à réaliser un « switch » phénotypique dépendant de MITF (décrit par la suite dans la partie D.4 de ce chapitre) (Kim H. and Ronai 2015) : en passant d'un état « MITF High » (forte expression de MITF) associé à la prolifération cellulaire, à un état « MITF Low » (faible expression de MITF) associé au phénotype invasif et chimiorésistant des cellules de mélanomes, et vis-versa, les cellules de mélanome sont *in fine* résistantes aux inhibiteurs de BRAF^{V600} (à l'exception d'une hyper-expression de MITF) (Hoek and Goding 2010, Saez-Ayala et al. 2013).

Ainsi, l'impact différentiel d'MITF dans la résistance innée et acquise aux agents ciblant BRAF^{V600} s'ajoute aux nombreuses oppositions ayant été rapportées par différentes études quant à l'implication générale de MITF dans le mélanome (évoquées précédemment). Elle souligne la complexité de l'engagement signalétique des cellules selon leur niveau d'expression et/ou d'activation de ce facteur de transcription, lui-même dépendant du contexte (présence ou absence de drogues par exemple).

Plusieurs études ont montré l'implication d'autres gènes, déjà impliqués dans le développement du mélanome, dans la résistance primaire des mélanomes mutés BRAF^{V600}, et suggèrent que le statut de ces gènes puisse être utilisé comme marqueur de prédiction d'une résistance innée aux inhibiteurs de BRAF^{V600}. Par exemple :

- **l'amplification du gène CCND1**, codant pour la cycline D1 impliquée sous la kinase ERK dans la progression du cycle cellulaire, serait d'après Smalley et ses collaborateurs retrouvée chez 17% de patients atteints de mélanome métastatique mutés BRAF^{V600E} ayant montré une résistance innée à un inhibiteur de BRAF^{V600}, le SB590885 (équivalent du Dabrafénib) (Smalley et al. 2008). Elle a été corrélée à une diminution de la survie sans progression de patients atteints de mélanome métastatique muté BRAF^{V600}, sous Dabrafénib (Nathanson et al. 2013).
- **des mutations « perte de fonction » du gène NF1** (évoqué dans le chapitre I, partie B.1.b.) entraînent une résistance primaire RAS-dépendante au Vémurafénib (Whittaker et al. 2013). Une autre étude a montré que la mutation de NF1 ou sa suppression étaient retrouvées dans les mélanomes portant une mutation BRAF, avec laquelle elle coopère et désensibilise ces mélanomes aux inhibiteurs de BRAF^{V600}. De plus, elle montre que la suppression de NF1 dans des lignées de mélanomes diminue leur sensibilité aux inhibiteurs de BRAF^{V600}, et que l'expression tumorale de NF1 peut être perdue progressivement chez les patients suite à leur traitement par inhibiteurs de BRAF^{V600} (Maertens et al. 2013), suggérant également son rôle dans l'acquisition d'une résistance à ces inhibiteurs.
- une **diminution du nombre de copies du gène CDKN2A** a été corrélée à une diminution de la survie sans progression de patients atteints de mélanome métastatique mutés BRAF^{V600}, sous Dabrafénib (Nathanson et al. 2013).
- **la mutation RAC1P29S** confère *in vitro* une résistance innée au Vémurafénib et au Dabrafénib (Watson et al. 2014).

Enfin, les travaux des Docteurs Robert et Vagner ont récemment mis en évidence l'importance du complexe d'initiation de la traduction des ARN messagers, eIF4F, dans la résistance innée et acquise aux inhibiteurs de BRAF et/ou de MEK des mélanomes, mais également des cancers du colon et de la thyroïde, deux cancers présentant également et fréquemment la mutation V600E de

Mutation activatrice de NRAS, de BRAF, de MEK ou variant de BRAF

Hétérogénéité avec un contingent BRAF sauvage

Réactivation de la voie MEK-ERK impliquant COT

Surexpression des récepteurs tyrosine kinase

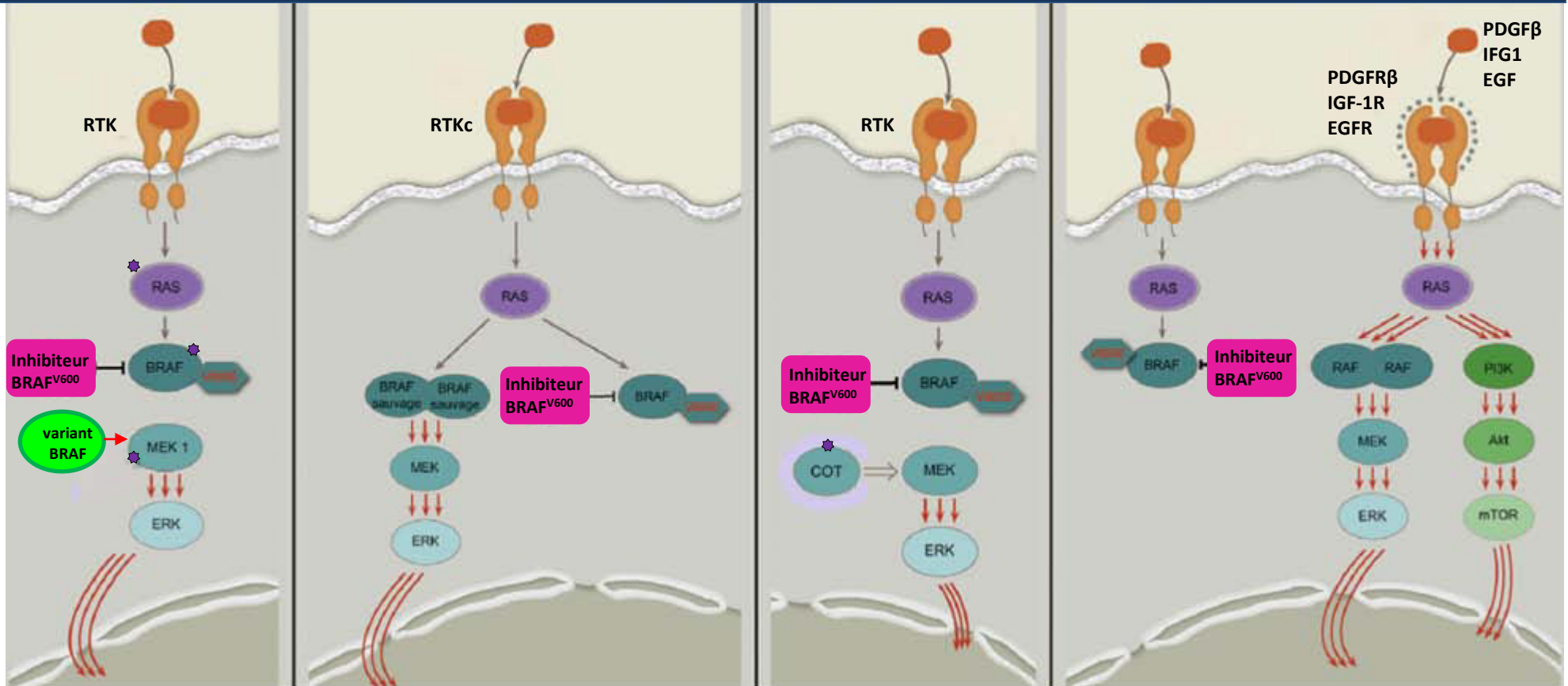


Figure 20. Exemples de mécanismes de résistance acquise des mélanomes aux inhibiteurs de BRAF^{V600}.

(A) Mutations activatrices de NRAS ou MEK, ou mutation secondaire ou variant de de BRAF^{V600}.

(B) Hétérogénéité tumorale avec un contingent BRAF sauvage.

(C) Mutation de COT en aval des RAF et réactivation des MEKs.

(D) Surexpression des récepteurs tyrosine kinase (RTK) (représentée par des astérisques grises).

Les mutations sont représentées par une astérisque violette. D'après Charles et al, 2014.

BRAF (Boussemart et al. 2014). Ils ont effet montré qu'au cours du traitement par des anti-BRAF la formation du complexe eIF4F diminue dans les cellules de mélanome sensibles à ce traitement *in vitro* et *in vivo*, ce qui n'est pas le cas dans les cellules de mélanome résistantes initialement aux anti-BRAF ou qui le sont devenues ; de même, la formation de ce complexe est retrouvée diminuée au niveau de tumeurs issues de patients atteints de mélanome mutés BRAF^{V600} répondant aux thérapies anti-BRAF, alors qu'elle est augmentée suite à l'initiation du traitement par anti-BRAF dans des tumeurs résistantes en progression sous ce traitement. Ces travaux proposent le complexe eIF4F comme un nouvel indicateur de la réponse innée et acquise aux thérapies anti-BRAF, mais également comme cible thérapeutique potentiel puisque qu'ils montrent également que le co-ciblage de BRAF et de eIF4F permet de diminuer de façon synergique la survie des mélanomes.

E. LA RESISTANCE ACQUISE OU SECONDAIRE AUX INHIBITEURS DE BRAF^{V600}.

On parle en général de résistance acquise dans le cas où le patient traité par inhibiteur de BRAF^{V600} présente une rechute dans la progression de son mélanome, consécutive au développement des mécanismes de résistance, et faisant suite à une réponse objective initiale au traitement. Les résistances acquises ne peuvent donc pas être détectées avant l'initiation du traitement.

Sous inhibiteurs de BRAF^{V600}, les mécanismes de résistance ont été nombreux à être caractérisés ces dernières années et seront détaillés dans cette partie. Ils touchent principalement la voie RAF-MEK-ERK et/ou PI3K-AKT, toutes deux directement sous la régulation RTKs (Figure 20). La **réactivation des kinases ERKs** et/ou **l'hyper-activation de la kinase AKT** sont retrouvées dans 70% et 22% des mélanomes en progression sous thérapie ciblée, respectivement (Shi et al. 2014b).

L'hétérogénéité tumorale intervient également dans la résistance secondaire: dans un contexte tumoral hétérogène avec des cellules BRAF sauvages ou NRAS mutées, l'effet activateur de la voie RAF-MEK-ERK par les inhibiteurs de BRAF^{V600} sur ces cellules (décrit dans le chapitre II partie C.1.a.) favorise la croissance et la prolifération de ces sous-clones par pression de sélection (Beazley-Long et al. 2015). De ce fait, cela conduit à l'acquisition d'une résistance globale de la tumeur aux inhibiteurs de BRAF^{V600}. Cette résistance peut également être considérée comme primaire dès lors que la proportion de ces cellules insensibles et leur vitesse d'expansion est importante.

L'identification de mécanismes de résistance acquise, souligne le pouvoir adaptatif de la cellule de mélanome vers la survie cellulaire malgré l'inhibition de BRAF^{V600}. Cette capacité d'adaptation fait intervenir des mutations secondaires à celle de BRAF, des modifications épigénétiques (composante intrinsèque de la résistance), mais également des modifications dans l'intercommunication des cellules tumorales avec leur microenvironnement (composante extrinsèque de la résistance).

Il est à noter que certains des mécanismes très précoces de résistance acquise peuvent être associés à une résistance innée. Par exemple, qu'elle soit adaptative ou innée, l'hyper-activation précoce de la voie PI3K-AKT au cours du traitement par inhibiteurs de BRAF^{V600} contribue à l'émergence préférentielle de clones résistants et donc à la survie du mélanome sous thérapie ciblée (Shi et al. 2014a).

1. Résistance ERK-dépendante : réactivation de la voie des MAPKinases.

La résistance dite « ERK-dépendante », qui représente la majorité des résistances aux inhibiteurs de BRAF^{V600}, fait référence aux formes de résistance faisant intervenir des modifications dans la voie RAS-RAF-MEK-ERK à l'origine d'une réactivation des kinases ERK sous inhibiteurs de BRAF^{V600}.

a. Mutation de RAS.

Les **mutations activatrices de NRAS** (telle que G12D/R, G13 et **Q61K/R/L**) font partie des premiers mécanismes de résistance acquise aux agents ciblant BRAF^{V600} décrits en 2010 (Nazarian et al. 2010). En effet, alors que chacune de ces mutations est mutuellement exclusive avec la mutation BRAFV600 dans les mélanomes, chacune d'entre elles peut en revanche co-exister avec BRAF^{V600} sous Vémurafénib (McMahon 2011). Ces mutations sont à l'origine d'une activation constitutive de la voie RAF-MEK-ERK cette fois-ci dépendante de CRAF et non plus de BRAF, comme cela a été décrit dans le chapitre II (cf. partie C.1.d.). Des mutations de KRAS moins fréquentes ont également été détectées (Shi et al. 2014b, Su et al. 2012).

b. Résistance RAF dépendante.

Récemment, une **mutation de BRAF, secondaire à la mutation V600E** a été identifiée : une mutation substitutive L505H dans le domaine à activité kinase de BRAF^{V600E}. Présentant une plus forte activité kinase que la forme BRAF^{V600E} et entraînant un changement de la fixation du Vémurafénib au niveau de la poche de liaison à l'ATP, elle est capable *in vitro* d'induire une résistance au Vémurafénib ainsi qu'aux inhibiteurs de MEK (Wagenaar et al. 2014). Une seconde étude a également montré la présence de cette mutation dans une lignée de mélanome dérivée de patient avant traitement par Vémurafénib, confirmant le rôle potentiel de cette mutation dans la résistance acquise et/ou innée au Vémurafénib (Choi et al. 2014). Enfin, une étude sur des échantillons dérivés de biopsies de patients atteints de mélanomes mutés BRAF^{V600} devenus résistants au Vémurafénib, a également confirmé la présence et l'importance de la mutation secondaire L505H dans l'acquisition de résistance au Vémurafénib (Hoogstraat et al. 2014).

Alors que dans le cas de la leucémie myéloïde chronique, la résistance à l'Imatinib (inhibiteur de la tyrosine kinase BCR-ABL) s'explique généralement par l'apparition de mutation ponctuelle substitutive dans l'oncoprotéine BCR-ABL (Hochhaus et al. 2007), dans le cas du mélanome la mutation secondaire de BRAF n'est pas le mécanisme principal associé à la résistance aux inhibiteurs de BRAF^{V600}. En effet, la résistance des mélanomes aux thérapies ciblant l'oncoprotéine BRAF^{V600} fait généralement suite à l'activation ou réactivation de voies de survie, comme nous allons le décrire par la suite.

Rapidement après l'émergence de premiers cas de résistance au traitement par inhibiteurs de BRAF^{V600}, l'expression de variant de BRAF (par épissage alternatif) a été mise en évidence à la fois *in vitro* dans des lignées résistantes de mélanomes, et *in vivo* dans des tissus tumoraux issus de patients atteints de mélanomes et devenus résistants au Vémurafénib (Poulikakos et al. 2011): **un variant p61-BRAFV600E** dépourvu de son domaine de liaison à RAS mais ayant cependant gardé la capacité de dimériser et d'activer la signalisation MEK-ERK malgré la présence d'inhibiteurs de BRAF^{V600E}.

D'autre part, des mécanismes de résistance acquise aux agents ciblant BRAF^{V600} résultant de **l'augmentation du niveau d'expression de BRAF^{V600E}** (due à une amplification de BRAF^{V600E} détectée dans 20% des patients devenus résistants) (Shi et al. 2012), ou **de CRAF** (due par exemple

à un « switch BRAF vers CRAF ») (Montagut et al. 2008, Villanueva et al. 2010) ont également été décrits. Leur conséquence étant une augmentation de dimérisation des RAF et donc une moindre efficacité des inhibiteurs de BRAF^{V600}.

Enfin, dans le chapitre I a été décrit l'existence du rétrocontrôle négatif dépendant des kinases ERKs à l'origine du niveau faible de la forme RAS active dans les cellules mutées BRAF^{V600} (cf. partie B.1.a.). La conséquence d'un faible niveau de RAS actif est une faible proportion de dimères RAF qui échappent à l'effet inactivant des inhibiteurs de BRAF^{V600}. En revanche, en présence d'inhibiteurs de BRAF^{V600} l'inhibition des kinases ERKs, et par conséquent la diminution du rétrocontrôle qu'elles exercent, conduit à la réactivation de RAS et à la formation de dimères RAF résistants aux inhibiteurs de BRAF^{V600}, et à la réactivation des ERKs (Lito et al. 2012). Ce mécanisme dépendant de la présence d'agents ciblant BRAF^{V600} s'ajoute à la liste des mécanismes d'acquisition de résistance aux inhibiteurs de BRAF^{V600}.

Ainsi, l'ensemble de ces mécanismes (à l'exception de la mutation secondaire de BRAF qui « resensibilise la kinase au Vémurafénib) vise à **favoriser la dimérisation des RAFs pour réactiver les kinases MEKs et ERKs** sous inhibiteurs de BRAF^{V600}. Il existe également des mécanismes de résistance mettant en jeu des altérations de la signalisation en aval des RAFs.

c. Résistance indépendante de la dimérisation des RAFs.

Des **mutations des kinases MEKs** en aval de RAF, absentes avant tout traitement, confèrent une résistance aux inhibiteurs de BRAF^{V600} : les mutations C121S (Wagle et al. 2011), Q56P et E203K (Trunzer et al. 2013) de MEK1 confèrent une résistance aux inhibiteurs de BRAF^{V600}, et la mutation Q60P de MEK2 associée à une amplification de BRAF confère également une résistance aux inhibiteurs de BRAF^{V600} (Villanueva et al. 2013). Plus récemment, Wagle et al. ont montré que la mutation Q60P de MEK2 conférait également une résistance à la combinaison d'inhibiteurs de BRAF^{V600} et de MEK (Wagle et al. 2014).

En 2010 Johannessen et al. ont montré le rôle de **la protéine kinase COT (ou TPL2, MAP3K8)** dans la résistance innée de lignées de mélanome aux inhibiteurs de BRAF^{V600}, mais également dans la résistance acquise de patients atteints de mélanome sous traitement par inhibiteurs de BRAF^{V600} ou de MEK. La protéine COT active la signalisation MEK-ERK indépendamment des kinases RAFs. Cette étude montre que la forme oncogénique de BRAF diminue drastiquement le niveau d'expression de COT dans les mélanocytes, et montre qu'à l'inverse, son inhibition par le Vémurafénib augmente de manière dose-dépendante son expression in vitro dans des cellules de mélanome mutées BRAF^{V600} (Johannessen et al. 2010). Plus récemment, Marusiak et al ont montré l'implication des MLK1-4 (mixed lineage kinases) dans la réactivation de la signalisation MEK/ERK et la survie des cellules de mélanome en présence d'inhibiteurs de RAF, et ont retrouvé une surexpression de ces kinases dans des tumeurs ayant développé une résistance à ces inhibiteurs (Marusiak et al. 2014).

Suite à la découverte de ces multiples mécanismes de résistance ERK-dépendante, une nouvelle stratégie thérapeutique a été proposée : le ciblage des kinases MEKs, concomitant à celui de BRAF^{V600} (Flaherty et al. 2012).

2. Résistance « ERK-indépendante » : hyper-activation de la voie PI3K-AKT.

Les résistances dites « ERK-indépendantes » diminuent la dépendance cellulaire à la signalisation RAS-RAF-MEK-ERK. Autrement dit, ces formes de résistance sont à l'origine de la survie et de la prolifération cellulaire quel que soit le niveau d'activation des kinases ERK sous inhibiteurs de BRAF^{V600}. **L'activation de la voie de survie PI3K-AKT** comme alternative dans la résistance acquise aux inhibiteurs de BRAF^{V600} a rapidement été suggérée suite à l'identification de résistances dues à la surexpression de récepteurs tyrosine-kinase (Nazarian et al. 2010, Villanueva et al. 2010) et ou de la kinase (Shao and Aplin 2010).

A noter qu'un modèle d'étude de résistance au Vémurafénib a également identifié la voie PI3K-AKT comme impliquée dans un mécanisme de résistance « MEK-indépendant » (Jiang C. C. et al. 2011): les cellules de mélanomes résistantes après sélection au Vémurafénib présentent une activation de ERK maintenue en présence du Vémurafénib, ou d'inhibiteur de MEK, mais qui est en revanche perdue en présence d'inhibiteurs de la voie PI3K-AKT. Ce mécanisme pourrait en fait être classé comme sous catégorie des résistances ERK-dépendantes.

a. Surexpression des récepteurs tyrosine-kinase.

L'importante expression tumorale de divers RTKs, mais également la forte production de leurs ligands par les cellules tumorales et par le stroma environnant, favorisent la signalisation de survie des cellules tumorales (pour revue, (Wilson et al. 2012)). Dans le mélanome, la surexpression de RTKs peut être à l'origine d'une résistance acquise aux inhibiteurs de BRAF^{V600}, indépendamment de la réactivation des kinases ERK :

Pour exemple, en 2010, Nazarian et al. ont démontré in vitro et in vivo le rôle de la **surexpression du récepteur au PDGF de type *béta*** (PDGFR β , pour platelet-derived growth factor receptor) dans l'acquisition d'une résistance des mélanomes au Vémurafénib. Dans cette étude il montre, dans un contexte BRAF^{V600} muté, une augmentation de l'expression de la protéine PDGFR β et de son messenger, ainsi qu'une induction de son activation aussi bien dans des lignées de mélanomes rendues résistantes au Vémurafénib (exemple des cellules m229-R, présentées par la suite) qu'au sein de tumeurs biopsiées sur des patients atteints de mélanome devenus résistants au Vémurafénib. De plus, la surexpression du PDGFR β dans des lignées de mélanome initialement sensibles au Vémurafénib, est suffisante pour leur procurer une résistance à ce dernier (Nazarian et al. 2010). Cette même étude a identifié la mutation de NRAS à l'origine de résistance acquise aux agents ciblant BRAF^{V600} (vu précédemment), et a démontré l'exclusivité de celle-ci ou de la surexpression de PDGFR β comme mécanisme de résistance au Vémurafénib: ceci souligne plus largement la capacité des RTKs à prendre de manière autonome le relais de la voie RAS-RAF-MEK-ERK dans le maintien de la survie cellulaire sous thérapie ciblée.

Des études ont rapidement suggéré l'implication de la voie PI3K-AKT dans cette résistance PDGFR β -dépendante. En effet, dans les mêmes lignées et cellules dérivées de patients obtenues par Nazarian et al. et dont la résistance au Vémurafénib est PDGFR β -dépendante, Shi et al. ont montré une augmentation de la forme active d'AKT, directement régulée par la surexpression et l'activation de PDGFR β . De plus, l'inhibition combinée de BRAF^{V600} (ou de MEK) et de la voie RTK-PI3K-AKT entraîne une diminution de croissance (ou la mort cellulaire, respectivement) de ces cellules (Shi et al. 2011). Enfin, il a récemment été mis en évidence que le traitement de ces cellules de mélanome par du Vémurafénib entraînait une activation précoce de la kinase AKT suite à la surexpression de RTKs tels que le PDGFR β ou encore l'EGFR (EGFR, pour epidermal-growth-factor receptor (Shi et al. 2014a).

Un second exemple de l'implication des RTKs dans l'acquisition de résistance acquise aux agents ciblant BRAF^{V600} est justement celui du **récepteur à l'EGF**. Dans le cancer du colon muté BRAF^{V600E} dans 10% des cas, sous inhibiteurs de BRAF^{V600E} l'EGFR échappe au rétrocontrôle négatif des kinases ERK. Il est ainsi fortement activé et conduit à une réactivation de la voie RAF-MEK-ERK: fortement exprimés dans ce cancer, ces RTKs confèrent ainsi une résistance innée aux inhibiteurs de BRAF^{V600E} (Corcoran et al. 2012, Prahallad et al. 2012). Dans le cas du mélanome, les cellules tumorales n'expriment que faiblement l'EGFR (Real et al. 1986) et ne sont pas sensibles à cette réactivation de l'EGFR (Meador and Pao 2015)). Alors que l'expression ectopique de l'EGFR dans un modèle cellulaire de mélanome exprimant BRAF^{V600E} conduit à un ralentissement de leur prolifération (Sun et al. 2014), il a été mis en évidence une surexpression de l'EGFR dans des lignées de mélanome mutées BRAF^{V600} et des biopsies tumorales de patients en progression sous inhibiteurs de BRAF^{V600} (Girotti et al. 2013, Sun et al. 2014, Wang J. et al. 2015): ainsi, en présence d'inhibiteurs de BRAF^{V600}, l'expression de l'EGFR procure un avantage sélectif aux cellules de mélanome mutées BRAF^{V600}. Deux mécanismes ont été décrits dans deux modèles d'étude différents, à l'origine de cette surexpression : un premier modèle cellulaire a décrit sous inhibiteurs de BRAF^{V600} uniquement (mécanisme réversible évoqué précédemment) une activation de la signalisation du TGFβ (pour tumor-growth-factor) associée à une faible expression du gène SRY (sex determining region Y)-box 10 (SOX10) (Sun et al. 2014) ; un second modèle cellulaire a décrit une déméthylation du promoteur du gène codant pour l'EGFR, retrouvée également dans des biopsies de patients (Wang J. et al. 2015). De plus, le ciblage de ce RTK ou d'une voie suractivée dans ce dernier contexte, combiné à celui de BRAF^{V600}, est capable de bloquer la prolifération des cellules de mélanome mutées BRAF^{V600}, soulignant l'implication de la surexpression de l'EGFR dans l'acquisition d'une résistance aux agents ciblant BRAF^{V600} (Girotti et al. 2013).

La surexpression d'autres RTKs tels que l'IGF-1R (insulin-growth-factor-1-receptor) et AXL (Muller J. et al. 2014), ou encore le « switch » des RTKs ROR1 vers les RTKs ROR2 (Receptor tyrosine kinase-like orphan receptor 2) (O'Connell et al. 2013), ont également été impliqués dans l'acquisition d'une résistance aux agents ciblant BRAF^{V600}.

b. Rôle de la kinase AKT.

Si des mutations « gain de fonction » des isoformes AKT1 ou AKT3 ont pu être identifiées sur des tumeurs de patients atteints de mélanome muté BRAF^{V600} devenus résistants au Vémurafénib, cela reste peut fréquent (Shi et al. 2014b).

En revanche, l'hyper-activation adaptative précoce d'AKT, observée en clinique sur des tumeurs de patients sous Vémurafénib (Shi et al. 2014a), représente la majeure partie des mécanismes à l'origine de résistance acquise faisant intervenir la voie PI3K-AKT (dans 22% des cas) (seule ou en coopération avec la voie RAF-MEK-ERK). En 2010, il a été mis en évidence l'implication de la protéine AKT3 (isoforme la plus activée dans le mélanome (Stahl et al. 2004)) dans la résistance innée et acquise à l'apoptose induite par le Vémurafénib. En effet, dans un modèle cellulaire en trois dimensions, l'expression d'une forme constitutivement active d'AKT3 empêche la surexpression de facteurs pro-apoptotiques, et la déplétion de facteurs anti-apoptotiques induites par le Vémurafénib. Ainsi, l'activation constitutive d'AKT3 protège les cellules de mélanome contre la mort engendrée par le Vémurafénib et ce, de manière indépendante d'une réactivation des kinases ERK. De plus, le niveau d'activation d'AKT3 de différentes lignées de mélanome

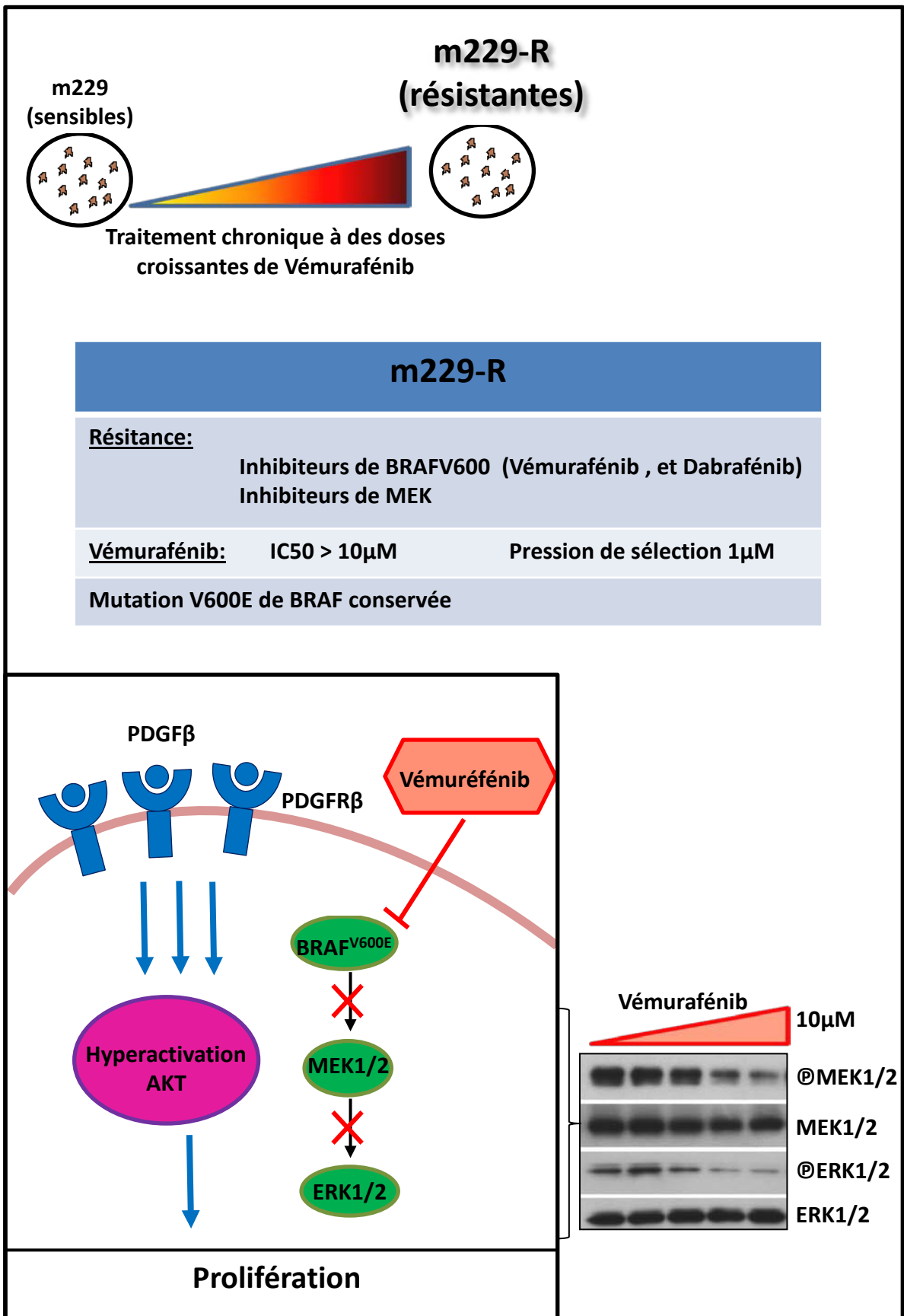


Figure 21. Modèle d'étude de la résistance ERK-indépendante des mélanomes aux inhibiteurs de BRAF^{V600}: les m229-R.

D'après Nazarian et al, 2010, et Shi et al, 2011.

mutées BRAF^{V600} est corrélé à la résistance innée au Vémurafénib (Shao and Aplin 2010). L'activation basale d'AKT, ou induite sous inhibiteur des MEKs, est également responsable d'une résistance acquise à l'inhibition des MEKs (Gopal et al. 2010).

D'autre part, alors que le Vémurafénib peut conduire à une régression importante des métastases extra-cérébrales, il n'a pas d'impact efficace sur les métastases cérébrales. L'échappement des métastases cérébrales au traitement par Vémurafénib (du en partie à une difficulté d'accès de la molécule à cause de la barrière hémato-encéphalique) contribue donc à une certaine forme de résistance acquise au Vémurafénib. A partir de ces observations cliniques, il a été montré *in vitro* et sur des tumeurs cérébrales de patients, une hyper-activation de la kinase AKT au niveau des métastases cérébrales faisant intervenir des facteurs du stroma cérébral. De plus, *in vitro*, l'inhibition de la voie PI3K-AKT est capable de resensibiliser des cellules de mélanome isolées à partir de métastases cérébrales résistantes au Vémurafénib. Cette étude montre un intérêt particulier à cibler la voie PI3K-AKT en même temps que BRAF^{V600} pour initier et/ou prolonger la réponse anti tumorale des agents ciblant dans le cas de patients atteints de mélanome ayant des métastases cérébrales (Niessner et al. 2013).

Enfin, dans leur étude, Shi et al mettent en évidence une sensibilité différentielle des mélanomes mutés BRAF^{V600} à l'inhibition d'AKT, directement corrélée au niveau basal d'activité de la kinase, et modulable par l'inhibition de BRAF^{V600} (Shi et al. 2014a).

- les mélanomes mutés BRAF^{V600} qui ont une perte d'activité de PTEN (régulateur négatif de l'activation d'AKT), ont par conséquent un niveau basal d'activation d'AKT élevé dont ils sont dépendants (à l'origine d'une résistance innée au Vémurafénib, vu précédemment). Ils sont alors très sensibles à l'inhibition d'AKT avant tout traitement par Vémurafénib.
- les mélanomes mutés BRAF^{V600} qui présentent une activité de PTEN, ont un niveau basal d'activation d'AKT modéré, voir bas. Ils sont initialement dépendants de l'activation d'ERK pour survivre et proliférer. Ils sont sensibles au Vémurafénib et peu sensibles à l'inhibition d'AKT dont ils ne dépendent pas en terme de survie. Néanmoins, dès l'initiation du traitement par Vémurafénib, ces mélanomes acquièrent un niveau d'activité d'AKT plus élevé, dont ils deviennent dépendants au dépend de la kinase ERK, et qui est à l'origine d'une résistance acquise au Vémurafénib.

Finalement, les auteurs de cette étude font ressortir un intérêt considérable à co-inhiber la voie RAF-MEK-ERK et la voie PI3K-AKT, et par conséquent empêcher ou contrer le « switch » d'une survie ERK-dépendante vers une survie AKT-dépendante pour optimiser la réponse anti tumorale des agents ciblant BRAF^{V600}.

c. Modèle d'étude : m229-R. (Figure21)

La lignée de mélanome m229-R fait partie de l'ensemble des nombreuses lignées de mélanome ayant été rendues *in vitro* résistantes aux inhibiteurs de BRAF^{V600} à partir de lignées parentales considérées sensibles à ces inhibiteurs (Sondergaard et al. 2010). Pour obtenir ces lignées résistantes, les lignées parentales mutées BRAF^{V600} ont été traitées avec une première et faible dose d'inhibiteur de BRAF^{V600} puis, au cours des passages des cellules survivantes en présence de l'inhibiteur, avec des doses croissantes : ce protocole permet de sélectionner au fur et à mesure des clones de cellules qui résistent à chacune des doses d'inhibiteur utilisées. Une fois les clones

résistants isolés, ils sont entretenus à une dose adaptée et choisie pour leur prolifération optimale : elles sont entretenues sous pression de sélection permanente.

Les clones m229-R ont été générés et caractérisés par Roger Lo et ses collaborateurs (Nazarian et al. 2010). Ils ont une **IC50 supérieure à 10µM** de PLX4032 (Vémurafénib) (IC50, concentration inhibant la croissance de 50% des cellules) et sont entretenus sous **pression de sélection à 1µM de PLX4032**, alors que les cellules m229 parentales ont une IC50 de 0.2µM. Autrement dit, pour obtenir une diminution de croissance de 50% des cellules m229-R, il faut une dose de PLX4032 plus de 50 fois plus élevée que pour les m229 parentales. Les m229-R ont conservé la **mutation V600E de BRAF** ainsi que la **sensibilité de la kinase mutée au PLX4032**, vérifiée par la diminution dose-dépendante de la phosphorylation des MEKs et des ERKs sous PLX4032. Ces dernières caractérisations ont permis d'exclure dans ce cas là, la résistance par sélection de clones BRAF WT qui auraient « profité » de l'effet activateur du Vémurafénib. Les m229-R sont résistantes à l'effet antiprolifératif du PLX4032 mais également à celui des inhibiteurs des MEKs, bien que leurs kinases MEKs et ERKs en aval de BRAF^{V600} soient toujours sensibles à l'effet premier inactivateur de ces inhibiteurs.

Ces cellules **sur-expriment différents ARN messagers de RTKs**, dont ceux de l'EGFR et le **PDGFRβ** qui sont également surexprimés au niveau protéique. Le PDGFR est cependant le seul RTK surexprimé (ARN messenger et protéine) et présentant une forte activation ; il a été identifié comme **mécanisme principal de résistance acquise au PLX4032** de ces cellules (décrit précédemment, (Nazarian et al. 2010). Ces cellules expriment par ailleurs très peu la protéine RAS, mais expriment fortement la **forme active de la protéine AKT** ainsi que des hauts niveaux protéiques d'ERK activée comparativement à leur lignée parentale (Shi et al. 2011). Alors que l'activation d'AKT est contrôlée par l'expression et l'activation de PDGFRβ et participe donc à la résistance acquise des m229-R, celle de ERK semblerait plutôt être le résultat d'autres processus adaptatifs suite à la présence prolongée de Vémurafénib, n'ayant pas d'influence sur la survie de ces cellules sous PLX4032 (perte du rétrocontrôle négatif par ERK sur la signalisation MEK-ERK évoquée dans le chapitre I par exemple)(Pratilas et al. 2009, Shi et al. 2011).

3. Résistance ERK-dépendante ET indépendante : réactivation de la voie MAPKinase et activation de la voie PI3K-AKT : les cellules 451lu-R comme modèle d'étude.

L'existence d'une hétérogénéité des tumeurs de mélanome, couplée à la caractérisation de multiples mécanismes de résistance acquise, suggèrent l'acquisition concomitante possible de plusieurs de ces mécanismes au sein des tumeurs d'un même patient et/ou d'une même tumeur. Shi et al., ont récemment montré dans une étude portant sur 44 patients atteints de mélanome métastatique ayant développé une résistance au Vémurafénib ou au Dabrafénib, que chez au moins 20% des patients atteints de mélanome, au moins deux mécanismes de résistance aux inhibiteurs de BRAF^{V600} différents étaient détectés au sein d'un même patient. De plus, parmi ces 20% de patients, 88% présentaient les différents mécanismes de résistance identifiés appartenant aux deux catégories présentées précédemment (résistance ERK-dépendante, résistance ERK-indépendante ou PI3K-AKTdépendante) (Shi et al. 2014b).

Par conséquent, ceci sous entend une grande complexité dans le choix du traitement en seconde intention pour ces patients là.

Modèle d'étude : 451lu-R (Figure 22).

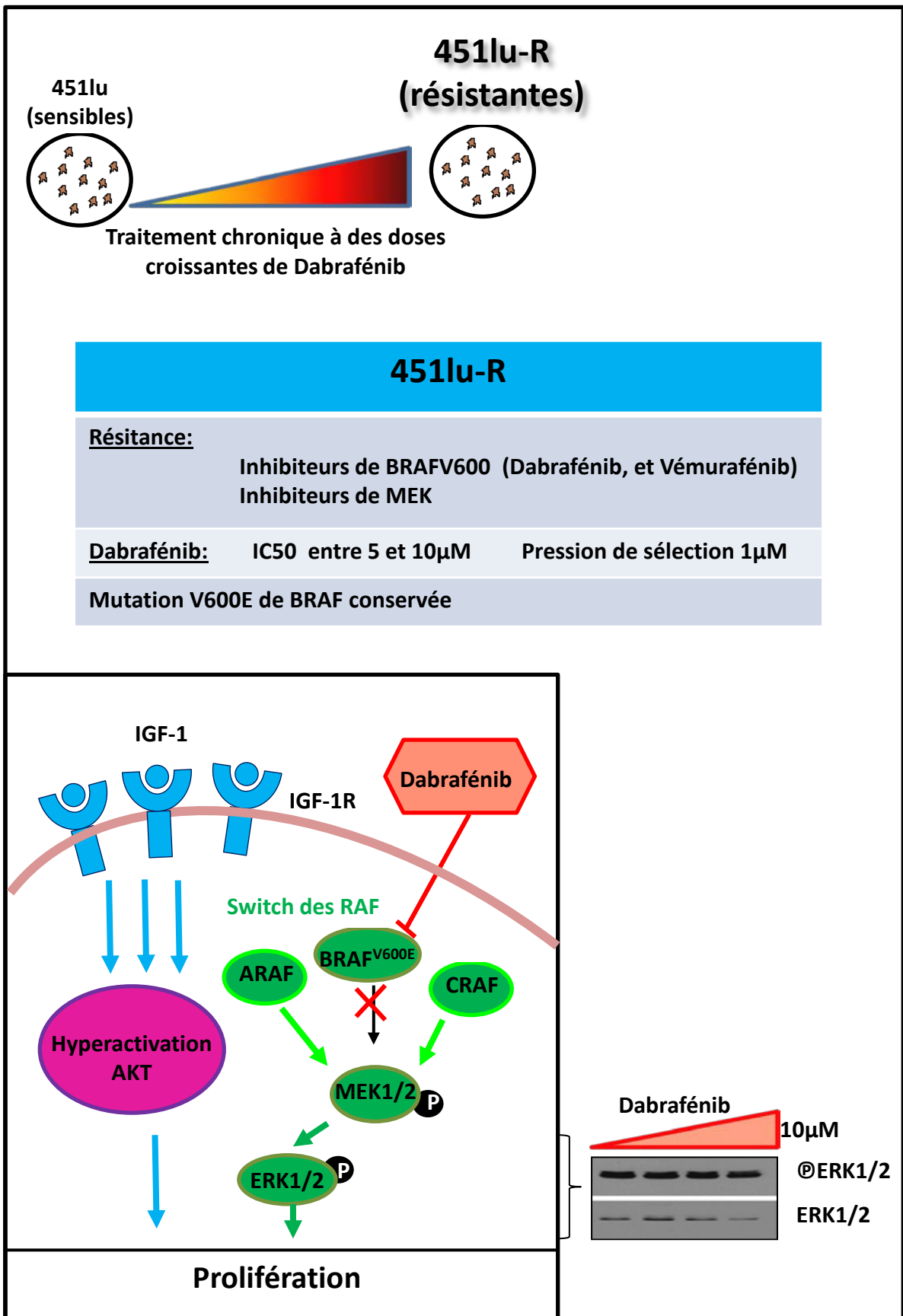


Figure 22. Modèle d'étude de la résistance ERK-indépendante et ERK-dépendante des mélanomes aux inhibiteurs de BRAF^{V600}: les 451lu-R.

D'après Villanueva et al, 2010

Les différents clones 451lu-R, comme les m229-R, sont mutés BRAF^{V600E} et résistants aux inhibiteurs de BRAF^{V600}. Ils ont été générés *in vitro* par l'équipe de Meenhard Herlyn en 2010, par traitement chronique de la lignée parentale 451lu avec des doses croissantes de SB590885 (Dabrafénib) (Villanueva et al. 2010). Ces clones ont une **IC50 comprise entre 5 et 10µM** de SB590885, et sont entretenus sous **pression de sélection** à 1µM de SB590885. A cette concentration de 1µM de SB590885, la prolifération des 451lu-R n'est pas affectée 72h post-traitement, alors que les cellules 451lu parentales (qui ont une IC50 de 0.1µM de SB590885) voient leur cycle cellulaire arrêté en phase G0/G1 dès 24h de traitement, et commencent à mourir 72h post-traitement (accumulation d'une population cellulaire en phase subG1).

Les clones 451lu-R ont conservé la **mutation V600E de BRAF**. Cependant, dans ces cellules résistantes, la **phosphorylation des kinases MEKs et ERKs est maintenue** au-delà de 10µM d'inhibiteur de BRAF^{V600E} suggérant un **mécanisme de résistance ERK-dépendant**. En effet, dans leur étude Herlyn et son équipe ont montré que cette réactivation de MEK et de ERK était le résultat de l'existence d'un « **switch** » entre les trois isoformes de RAF (A,B,CRAF) assurant l'activation de la voie MEK-ERK, l'expression de CRAF étant même augmentée sous inhibition de BRAF^{V600E} alors qu'elle diminue dans les 451lu parentales en présence du SB590885 (Villanueva et al. 2010). Néanmoins, alors que l'utilisation d'inhibiteurs des kinases MEKs entraîne un arrêt du cycle cellulaire en phase G0/G1 à la fois dans les 451lu et dans les 451lu-R, elle ne permet pas d'induire la mort des 451lu-R comme c'est le cas pour les 451lu parentales. Ces dernières observations démontrant un effet cytostatique et non cytotoxique de l'inhibition de la voie MEK-ERK dans les 451lu-R, ont donc fait suggérer aux auteurs **l'existence d'un second mécanisme alternatif aux « switch » des isoformes de RAF, impliqué dans la survie des 451lu-R sous SB590885**.

Ils ont ainsi étudié le profil de phosphorylation des RTKs dans les 451lu-R comparativement aux 451lu parentales. Ce profil apparait différent pour plusieurs RTKs (IGF-1R, EGFR, et autres) dans les cellules parentales ou résistantes, en revanche, seule l'inhibition du récepteur à l'IGF1 (IGF-1R, pour insulin-growth-factor-1-receptor) est capable de diminuer la viabilité des cellules résistantes. De plus, les auteurs ont montré une **surexpression de l'IGF-1R** à la surface des 451lu-R sous une forme active maintenue sous inhibiteur de BRAF^{V600E}, comparativement aux 451lu parentales. Cette surexpression d'IGF-1R actif dans les 451lu-R est à l'origine de **l'activation d'AKT** (elle n'a pas d'effet sur celle de MEK ou d'ERK). Enfin, alors que l'inhibition de MEK est limitée à un effet cytostatique dans les 451lu-R, la combinaison d'un inhibiteur de la voie IGF-1R-PI3K-AKT avec un inhibiteur de MEK fait basculer ce premier effet vers un effet cytotoxique pour les 451lu-R.

Ce modèle d'étude de résistance acquise aux agents ciblant BRAF^{V600} via deux mécanismes différents et concomitants a **souligné le rôle coopérateur de la voie de survie PI3K-AKT avec la voie RAF-MEK-ERK pour assurer et renforcer la résistance thérapeutique sous inhibiteurs BRAF^{V600}**. Il a également souligné la difficulté rencontrée par le corps médical à contrecarrer la résistance aux agents ciblant BRAF^{V600}, et il a participé à la mise en évidence de la nécessité d'une stratégie combinatoire pour le succès d'une thérapie anti-mélanome.

4. Le concept de « phenotype switching » : une entrave à l'efficacité des inhibiteurs de la voie RAF-MEK-ERK.

En réponse au microenvironnement, et plus particulièrement en réponse à l'hypoxie environnementale (O'Connell et al. 2013, Widmer et al. 2013), les cellules de mélanome sont

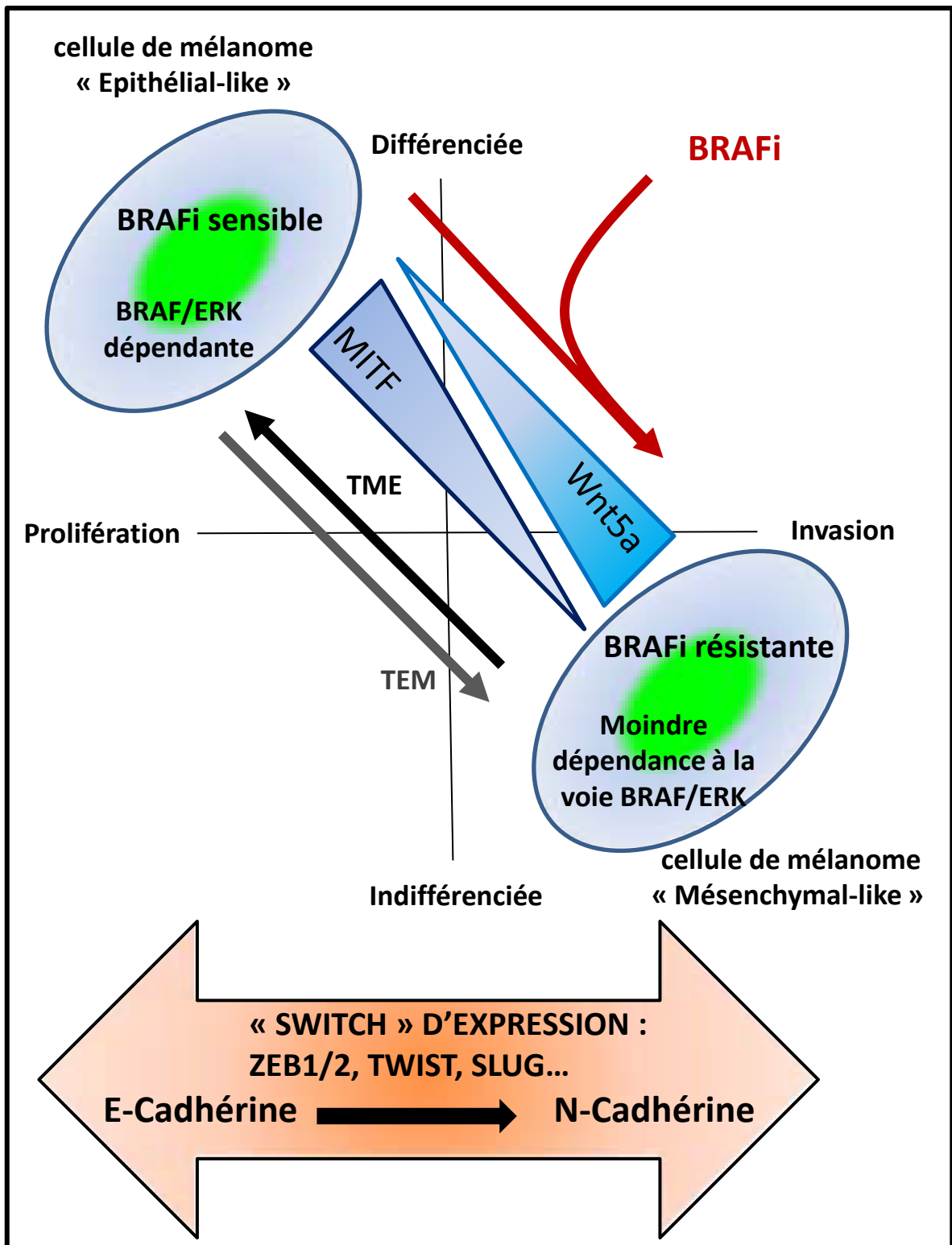


Figure 23. Schématisation de la commutation phénotypique.

La commutation phénotypique ou « pseudo-TEM » confère aux cellules de mélanome des propriétés invasives. Elle est également impliquée dans la résistance des mélanomes métastatiques portant la mutation BRAF^{V600} aux inhibiteurs de BRAF^{V600} (BRAFi).

Adapté de Li et al, 2015 et Kemper et al, 2014

capables, de passer d'un état prolifératif à un état invasif, et vice versa, indépendamment de leur « statut BRAF » (Eichhoff et al. 2010, Hoek 2009, Hoek and Goding 2010, Hoek et al. 2008). Ces dernières années, le « switch » phénotypique des cellules prolifératives vers un état invasif, a été identifié comme un phénomène contribuant à la résistance thérapeutique des mélanomes aux inhibiteurs de BRAF^{V600} (Figure 23).

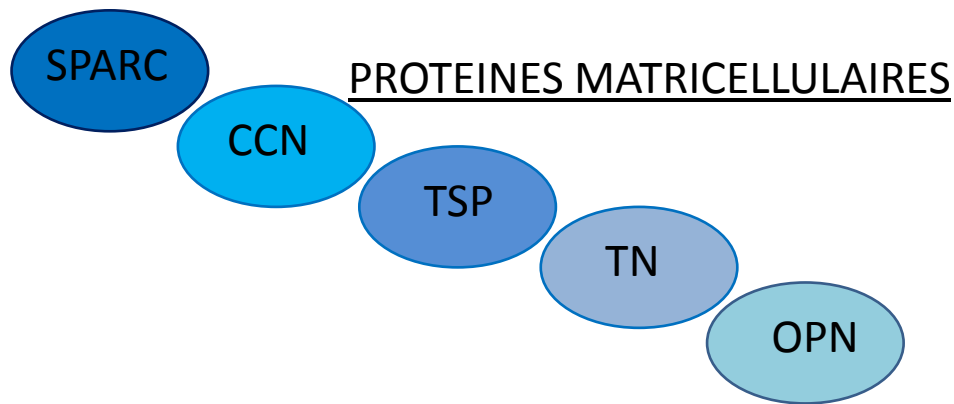
D'une part, il assure une hétérogénéité tumorale, source de résistance thérapeutique évoquée précédemment. D'autre part, des études ont montré que l'inhibition de la voie RAF-MEK induit le switch de cellules de mélanome prolifératives vers un état invasif et que l'inhibition de BRAF^{V600} dans un modèle murin de mélanome induit la formation de métastases des cellules résistantes à cette inhibition (Sanchez-Laorden et al. 2014, Zipser et al. 2011), associant ainsi invasion et résistance thérapeutique.

La signature proliférative ou invasive des cellules de mélanome est principalement dictée par leur niveau d'expression du facteur de transcription MITF, lui-même régulé négativement par le facteur de transcription Brn2 (Goodall et al. 2008) (« Brn2-High /MITF-Low » phénotype invasif, « Brn2-Low/MITF-High » phénotype prolifératif), bien qu'elle implique également leur niveau d'activation de la voie Wnt/ β caténine. En effet, l'interruption de la signalisation Wnt/ β caténine par exemple par l'augmentation de l'un de ses inhibiteurs, WNT5a (Hoek et al. 2008, Weeraratna et al. 2002), conduit les cellules de mélanome vers un état invasif (Hoek et al. 2006, O'Connell et al. 2013) ; l'augmentation de WNT5A ayant également été associée à la résistance des mélanomes aux inhibiteurs de BRAF^{V600} via l'activation de la kinase AKT (Anastas et al. 2014).

Comme cela a été évoqué dans les chapitres précédents, le facteur de transcription MITF joue un rôle complexe dans le mélanome, directement dépendant de son niveau d'expression et d'activation:

- de très hauts niveaux d'expression de MITF bloquent la prolifération cellulaire et par conséquent la progression tumorale (Carreira et al. 2005, Loercher et al. 2005), et 10 à 20% des mélanomes cutanés métastatiques présentent une amplification de MITF (Garraway et al. 2005).
- des niveaux d'expression modérés de MITF favorise la prolifération des cellules de mélanome et ont été associés à l'acquisition d'une résistance aux agents ciblant BRAF^{V600} (cf. partie D de ce chapitre).
- enfin, les cellules qui n'expriment pas ou très peu MITF présentent des propriétés invasives (Carreira et al. 2006) et sont également résistantes aux inhibiteurs de BRAF^{V600} (cf. partie D de ce chapitre). De plus, une faible activité de MITF conduit à un arrêt du cycle cellulaire dépendant du régulateur de cycle p27Kip1 (hautement exprimé par les mélanomes primaires invasifs (Bales et al. 1999), une réorganisation du cytosquelette d'actine ainsi qu'à une augmentation de l'expression de métalloprotéases, compatibles avec une augmentation de l'invasivité de ces cellules (Carreira et al. 2006).

Ces différentes propriétés cellulaires dépendantes du « statut MITF » ont conduit ces dernières années à associer trois phénotypes possibles à la cellule de mélanome : un phénotype de **différenciation (pour les « High MITF »)**, de **prolifération (pour les « moderate MITF »)** et un phénotype **d'invasion (pour les « Low MITF »)**, ces deux derniers phénotypes étant associés à une



Famille SPARC (Secreted protein acidic and rich in cysteine)

SPARC (ou BM-40, Ostéonectine)
 Hevin (ou SPARC-like, Mast9, Ecm, SC1, PIG33)
 SPOCK1 (ou Testican1, proteoglycan-1, Tcn1 (SPARC/Osteonectine, CWCV and Kazal-like domains)
 SPOCK2 (ou Testican2, Gcap26)
 SPOCK3 (ou Testican3)
 SMOC1 (ou SPARC-related modular calcium binding)
 SMOC2

Famille CCN (CYR61, CTGF, Nov)

CCN1 (ou CYR61 (Cysteine-rich, angiogenic inducer 1), CEF10, IGFBP-rP 4, bIG-M1, IGFBP10)
 CCN2 (ou CTGF (Connective tissue growth factor), bIG-M&, FISP12, IGFBP-rp 2, Hcs24, IGFBP8, HNGF- 0.8, ecogenin)
 CCN3 (ou NOV (Nephroblastoma overexpressed), IGFBP-rP 3, IGFBP9)
 CCN4 (ou WISP-1, ELM1)
 CCN5 (ou WISP-2, rCOP-1, CTGFL, CTGF-3, HIC)
 CCN6 (ou WISP-3)

Famille TSP (Thrombospondines)

TSP1
 TSP2
 TSP3
 TSP4
 TSP5 (ou EPD1 (Epiphyseal dysplasia 1), COMP (cartilage oligomeric matrix protein)

Famille TN (Ténascine)

TN-C (ou Hexabrachion)
 TN-R
 TN-W
 TN-X
 TN-Y

Famille OPN (Ostéopontine)

OPN (ou SPPP1 (Secreted phosphoprotein 1), BSPI (Bone sialoprotein I), ETA-1 (Early T-lymphocyte activation 1)

Figure 24. La famille des protéines matricellulaires.

D'après Sage et al, 2008.

à une résistance innée ou acquise aux inhibiteurs de BRAF^{V600} (Carreira et al. 2006, Konieczkowski et al. 2014, Muller J. et al. 2014).

Le « phenotype switching » représente désormais une véritable cible thérapeutique car il a un double impact sur la progression tumorale :

- d'une part, en leur procurant une certaine résistance aux inhibiteurs de la voie RAF-MEK, il permet aux cellules de mélanome d'accumuler des altérations génétiques et épigénétiques additionnelles en vue d'un retour à un état prolifératif plus robuste face à ces inhibiteurs (pour revue, (Kemper et al. 2014)). Une étude a d'ailleurs argumenté l'intérêt du ciblage de ce phénomène de « switch » phénotypique (Saez-Ayala et al. 2013). Dans cette étude, à l'aide de méthotrexate, les auteurs induisent dans des cellules de mélanome l'augmentation du niveau d'expression de MITF, associée à une expression de gènes Tyrosinase spécifique des mélanocytes, pour les forcer à entrer dans un état de prolifération et de différenciation: la conséquence est une sensibilisation de ces cellules à une drogue dont le mécanisme d'action anti-mélanome est dépendant des tyrosinases (Saez-Ayala et al. 2013).
- d'autre part, il est à l'origine d'une exacerbation du potentiel invasif du mélanome sous inhibiteur de BRAF^{V600}, et par conséquent de la rechute fulgurante des patients suite à l'acquisition d'une résistance.

Ainsi, le « phenotype switching » représente une entrave à l'efficacité des thérapies ciblées.

IV. LA PROTEINE MATRICELLAIRE SPARC : UNE PROTEINE MULTIFONCTIONNELLE DU MICROENVIRONNEMENT.

Initialement nommée **ostéonectine**, la protéine SPARC a été isolée pour la première fois en 1981 dans un contexte physiologique, comme le principal composant non-collagénique de l'os, où elle contrôle le dépôt de calcium (cristaux d'hydroxyapatite) et la minéralisation de la matrice osseuse, une fois fixée aux fibres de collagène (Terminé et al. 1981). Trois ans plus tard, cette même protéine a été purifiée dans le surnageant de cellules endothéliales vasculaires qui avaient subi un stress de culture suite à une dissociation tissulaire. Suite à la caractérisation de ses propriétés physico-chimiques, elle a été nommée SPARC, pour **Secreted Protein Acidic and Rich in Cysteine** (Mason et al. 1986, Sage H. et al. 1984). Enfin, elle a également été isolée dans un contexte pathologique à partir de tumeurs murines EHS (pour Engelbreth-Holm-Swarm), utilisées comme modèles expérimentaux pour établir la composition protéique des membranes basales. Une fois les extraits tumoraux EHS déposés sur gel, une protéine sortant à 40 kilodalton (kDa) s'est révélée majoritairement représentée. Elle a été référencée comme la protéine BM-40, pour **basement membrane 40** (Dziadek et al. 1986).

A. SPARC : LE PROTOTYPE DE LA FAMILLE DES PROTEINES MATRICELLAIRES.

La protéine SPARC est le prototype d'une famille fonctionnelle de protéines micro-environnementales : la famille des protéines matricellulaires. Les protéines de cette famille sont de structures différentes mais de fonctions analogues : présentes dans les tissus de l'organisme en remodelage ou en réparation suite à une blessure, elles jouent le rôle **d'adaptateurs matricellulaires** (Bornstein 2009, Bornstein and Sage 2002) en modulant par exemple la minéralisation et la composition en protéases ou cellules inflammatoires du tissu, ou encore en modulant sa vascularisation (Bai et al. 2010, Hsia and Schwarzbauer 2005, Sullivan and Sage 2004,

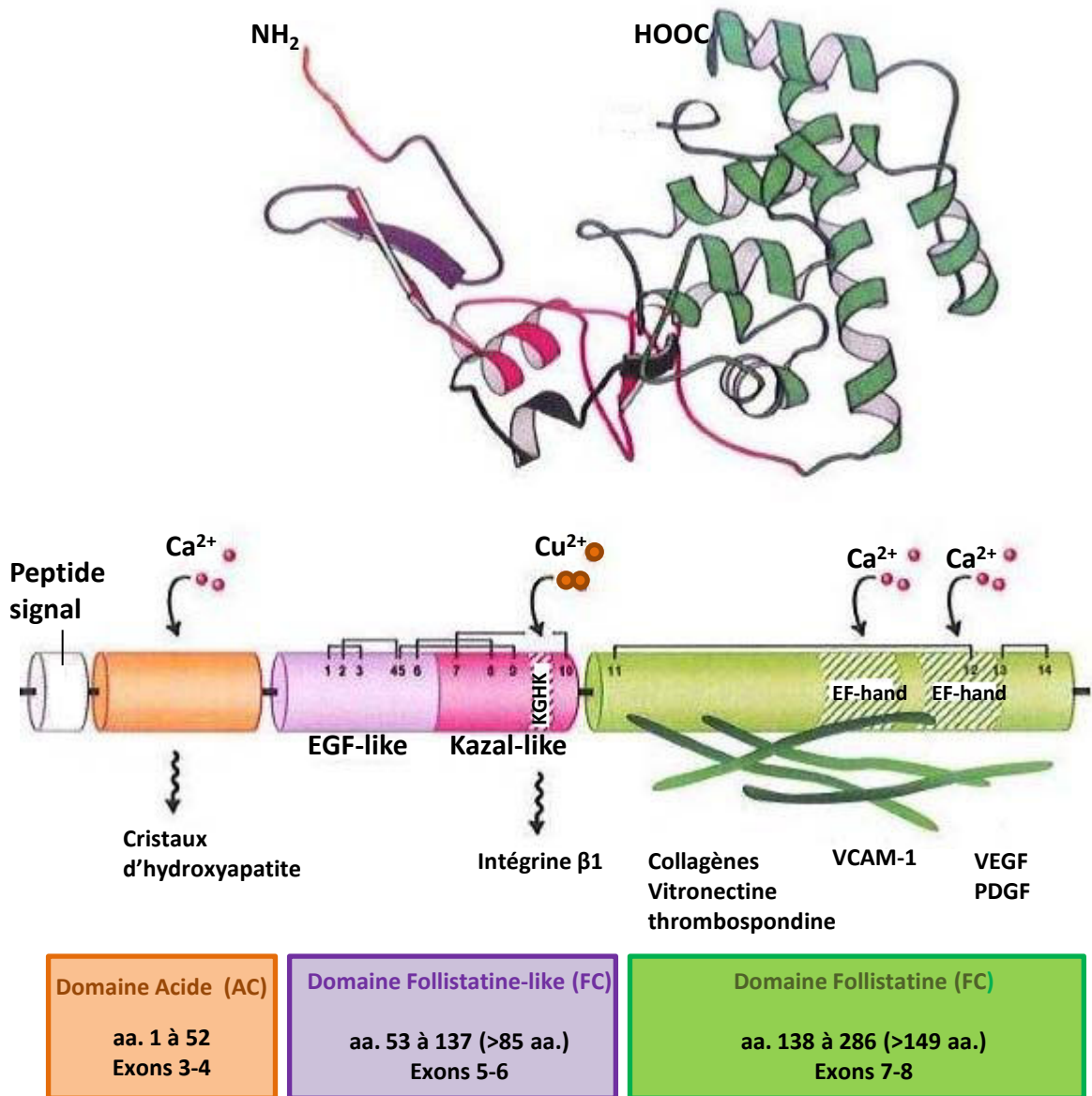


Figure 25. Structure tri-modulaire de la protéine SPARC.

La protéine SPARC s'organise en trois domaines fonctionnels: le domaine acide (AC) en orange, le domaine follistatine-like (module EGF-like en violet, module Kazal-like en rose), et le domaine de liaison au calcium extracellulaire en vert. Le peptide signal (en blanc) est éliminé lors du *processing* de SPARC avant sécrétion de la protéine dans le milieu extracellulaire. Les ponts dissulfures sont représentés par les crochets noirs.

aa. pour acide aminé.

D'après Sage et al, 2000, adapté par Fenouille N. 2011.

Yang Z. et al. 2000). Contrairement aux fibres de collagène ou autres constituants présents en permanence pour structurer la MEC, elles sont induites transitoirement au sein des tissus : elles n'ont pas de contribution directe dans la composition structurale de la MEC, mais arbitrent les différentes interactions entre cellules et MEC, et réorganisent ainsi l'homéostasie tissulaire. Elles sont réparties selon **5 sous-groupes**: la **famille SPARC**, la **familles CCN** (pour CYR61, CTGF, Nov), la **famille des TSP** (pour Trombospondines), la **famille des TN** (pour Ténascines), et **l'ostéopontine** (Clark and Sage 2008) (Figure 24). Ces protéines font partie de l'ensemble des protéines de la matrice extracellulaire, le **matrisome**, c'est en particulier le cas de la protéine SPARC (Hynes and Naba 2012, Naba et al. 2012).

Dans les tissus adultes à l'état stable, ces protéines sont exprimées à un niveau relativement faible (à l'exception de la protéine SPARC fortement exprimée au niveau de l'os). En revanche, elles sont rapidement produites en grandes quantité lors du remodelage du tissu que ce soit dans le cas de la cicatrisation suite à une lésion tissulaire ou encore lors du développement d'un cancer. Lorsqu'elles sont produites dans un contexte tumoral par les cellules stromales et/ou cancéreuses, les protéines matricellulaires peuvent exercer de nombreuses fonctions qui vont contribuer à l'installation et au maintien d'un état inflammatoire basal requis pour le développement et la progression tumorale (Sangaletti and Colombo 2008): elles peuvent en effet réguler l'adhésion ou la migration cellulaire, l'infiltration de la tumeur par des cellules immunitaires pro-inflammatoires, les facteurs de croissance, le dépôt de la MEC, l'angiogenèse, ainsi que la prolifération et la survie cellulaire (pour revue, (Chiodoni et al. 2010)). Il est à noter que la fonction propre de chacune de ces protéines peut être différente, dépendant à la fois du contexte et des conditions d'homéostasie du tissu dans lequel elles sont exprimées, mais aussi de leur origine tumorale ou stromale (cf. partie D de ce chapitre) (pour revue, (Chiodoni et al. 2010)).

B. EXPRESSION ET STRUCTURE DE LA PROTEINE SPARC.

La protéine SPARC est codée par le gène *SPARC* présent sur le chromosome 5 chez l'Homme. Ce gène contient un unique site *start* (dans lequel se trouve le promoteur minimal) qui initie la transcription des ARNs messagers de SPARC. Deux transcrits ont été identifiés : un **transcrit de 2,2 kilo base (kb)** (le plus fréquent), et un **transcrit de 3 kb** ((Delany and Canalis 1998, Swaroop et al. 1988), tous deux très stables dans la cellule (durée de demi-vie supérieure à 24h) (Delany and Canalis 1998).

La protéine SPARC est synthétisée à partir de ces transcrits sous forme de protéine immature . Elle subit ensuite un **clivage de son peptide signal pour être sécrétée dans le milieu extérieur** par les cellules sous une forme mature de 286 acides aminés, où elle s'associe à la MEC et à la surface des cellules. Une fois dans la MEC, SPARC peut subir une protéolyse de manière à libérer des peptides bioactifs (voir ci-dessous). D'un poids moléculaire théorique égal à 32kDa, la protéine SPARC sécrétée migre sur gel à un poids supérieur (42kDa) car elle est hautement glycosylée (Kaufmann et al. 2004) : SPARC appartient à la catégorie des glycoprotéines.

La glycoprotéine SPARC mature s'organise en trois domaines fonctionnels (Figure 25): un domaine amino-terminal (N-terminal) acide (**domaine AC**), un domaine homologue à la Follistatine-like (**domaine FS**), un domaine carboxy-terminal (C-terminal) de liaison au calcium extracellulaire (**domaine EC**).

	Région ciblée	Effets biologiques				Références
		Remodelage MEC	Adhésion/étalement	migration	prolifération	
Peptide 1.1 (4-23)	Région AC N-term Ca ²⁺ low affinity	↗Activité MMP-2 Cancer du sein	↘ étalement cellules endothéliales fibroblastes cellules musculaires lisses.		arrêt progression cycle cellulaire cellules endothéliales.	Lane TF, 1990 Gilles C, 1998 Phan E, 2007
Peptide 2.1 (54-73)	Module EGF-like Auto-repliement		rupture Adhésions Focale cellules endothéliales fibroblastes.		arrêt entrée en phase S cellules endothéliales.	Funk SE, 1993 Funk SE, 1991 Murphy-Ullrich JE, 1995 Phan E, 2007
Peptide FS-E (54-75)	Module EGF-like Auto-repliement		↘ migration cellules endothéliales. peptide anti-angiogénique validé <i>in vivo</i> (neuroblastome).			Chlenski A, 2004
Peptide Z-1 (50-85) Clivage MMP3	Module EGF-like				effet bi-phasique sur les cellules endothéliales: ↘densité vasculaire à faible conc°. ↗ densité vasculaire à forte conc°.	Sage EH, 2003
Peptide FS-K (83-106)	Module Kazal-like				↘prolifération cellules endothéliales	Chlenski A, 2004
Peptide 2.3 (103-130)	Module Kazal-like Motif KGHK	↗Sécrétion composants ECM			↗ prolifération cellules endothéliales fibroblastes.	Lane TF, 1994 Phan E, 2007
Peptide 3.2 (154-173)	Hélice de liaison au collagène	↗Synthèse MMPs				Shankavaram, UT, 1997 Tremble PM, 1993 Phan E, 2007
Peptide 4.2 (254-273)	Motif EGF-hand Ca ²⁺ high affinity	↗Sécrétion composants ECM	rupture Adhésions Focale cellules endothéliales fibroblastes.	↘migration cellules endothéliales	↘ prolifération cellules endothéliales. bloque action VEGF,bFGF,PDGF	Lane TF, 1994 Phan E, 2007

Figure 26. Les peptides bioactifs de SPARC.

La protéine SPARC peut subir une protéolyse ménagée par différentes enzymes matricielles (cathépsines, métalloprotéases) pour libérer plusieurs peptides biologiquement actifs. Les peptides Z-1, Z-2, Z-3 sont issus du clivage de SPARC humaine par la MMP-3. Ils existent également des peptides synthétiques de SPARC (peptides FS-E, FS-K, et murins 1.1 à 4.2). Tous ces peptides peuvent moduler le comportement des cellules au sein du microenvironnement. La partie orange du tableau comprends les peptides mimétiques de régions du domaine AC de SPARC; la partie violette du tableau comprends les peptides mimétiques de régions du domaine FS-like de SPARC; la partie verte du tableau comprends les peptides mimétiques de régions du domaine EC de SPARC; D'après Chlenski et al, 2010.

Domaine AC. Le domaine amino-terminal de SPARC est riche en résidus acides (acide aspartique et acide glutamique) qui forment une hélice α . Ce domaine peut fixer les ions Ca^{2+} (calcium) avec une faible affinité comparativement au domaine EC (Maurer et al. 1992). Ce domaine est très peu conservé parmi les membres de la famille SPARC.

Domaine FS. C'est le domaine intermédiaire de SPARC homologue à la Follistatine (inhibiteur des membres de la famille du TGF). Il contient 10 résidus cystéines s'engageant dans 5 ponts disulfures qui rigidifient sa structure tri-dimensionnelle. Le domaine FS est constitué de deux sous modules protéiques : le **module Kazal-like** très hydrophobe qui est formé d'hélices α et de feuillets β et qui contient un motif KGHK de liaison aux ions Cu^{2+} (cuivre), et le **module EGF-like** formé de deux feuillets β et liant les protéoglycans matriciels.

Domaine EC. Situé au niveau carboxy-terminal de la protéine SPARC, ce domaine est hautement conservé parmi les protéines matricielles de la famille SPARC, et en est la caractéristique. Il est constitué de deux motifs EF-hand associés à un domaine de structure globulaire (longue hélice compactée par des ponts disulfures) qui lie le calcium extracellulaire avec une très forte affinité (Hohenester et al. 1996, Maurer et al. 1992).

L'étude de l'effet de différents **peptides mimétiques de régions spécifiques de SPARC** a permis d'identifier la fonctionnalité de chacun de ces trois domaines. Ces peptides ont été **synthétisés** (Chlenski et al. 2004, Lane and Sage 1990), ou **générés par protéolyse de la protéine SPARC** en peptides bioactifs notamment par la MMP-3 (Sage E. H. et al. 2003) (Figure 26).

Par exemple :

- le **domaine AC** est capable d'inhiber l'étalement des cellules endothéliales vasculaires (Lane and Sage 1990), de perturber la progression du cycle cellulaire des cellules endothéliales (Phan E. et al. 2007), et de potentialiser l'activité protéolytique de la MMP-2 dans les cellules épithéliales mammaires (Gilles et al. 1998).
- le **domaine FS**, via son module EGF-like permet d'inhiber la migration des cellules endothéliales vasculaires compromettant ainsi l'angiogenèse, de perturber les points d'adhésion focales des cellules endothéliales entraînant leur dé-adhésion à la MEC (Murphy-Ullrich et al. 1995). Via son module Kazal-like, le domaine FS de SPARC module la prolifération des cellules endothéliales (rôle stimulateur du cycle cellulaire des cellules endothéliales et de l'angiogenèse via le motif KGHK de fixation au cuivre (Lane et al. 1994), ou rôle inhibiteur), favorise la sécrétion de composants de la MEC (Chlenski et al. 2004, Lane and Sage 1994, Phan E. et al. 2007), et permet à SPARC de se lier aux intégrines $\beta 1$ pour activer ILK et la kinase pour promouvoir la survie de cellules épithéliales de la rétine (Weaver et al. 2008).
- le **domaine EC**, perturbe les points d'adhésion focale, diminue la migration et la prolifération des cellules endothéliales, augmente la sécrétion de composants de la MEC, ainsi que celle des MMPs par les fibroblastes et les monocytes (Lane and Sage 1994, Phan E. et al. 2007, Shankavaram et al. 1997, Tremble et al. 1993), et bloque les effets mitogéniques des facteurs de croissances VEGF, bFGF, PDGF sur plusieurs types cellulaires (Kupprion et al. 1998). C'est via ce domaine que la protéine SPARC est capable de se lier au collagène de la MEC (Giudici

et al. 2008, Hohenester et al. 2008, Maurer et al. 1995) et au récepteur membranaire des cellules endothéliales vasculaires, VCAM-1, (Tichet et al. 2015).

Les effets biologiques de la protéine SPARC sur les cellules en culture (cf. 2.) sont pour la plupart médiés par le **domaine EC, considéré donc comme domaine bioactif de la protéine SPARC.**

C. SPARC EN CONTEXTE PHYSIOLOGIQUE.

Dans un contexte physiologique, la protéine SPARC est exprimée dans les tissus en remodelage: au cours du **développement embryonnaire**, dans les **tissus adultes dont le remodelage de la MEC est fréquent**, tels que l'os, l'intestin, les ovaires, les testicules, le derme, les systèmes vasculaire et hématopoïétique, le tissu adipeux, les glandes mammaires (Bradshaw and Sage 2001, Vernon and Sage 1989), ou encore **durant la cicatrisation** de tissus endommagés (Reed et al. 1993). Dans ces trois différents contextes, SPARC agit comme régulateur du remodelage tissulaire.

1. Invalidation de SPARC chez la souris.

Plusieurs modèles KO de SPARC ont été générés de manière à mieux appréhender *in vivo* les fonctions de la protéine SPARC. Alors que le KO de SPARC chez le ver *C.elegans* ou chez la drosophile *D. Melanogaster* entraîne précocement la mort de l'embryon (Martinek et al. 2008, Schwarzbauer and Spencer 1993), les souris SPARC^{-/-} sont viables (Gilmour et al. 1998). Cependant ces souris présentent un phénotype généralisé de vieillissement des tissus :

La peau. Les souris SPARC^{-/-} présentent un derme aminci suite à un dépôt et à un assemblage insuffisant du collagène I trop fin, à l'origine d'une moindre résistance de la peau en terme de tension (Bradshaw et al. 2003b). Caractéristique des souris SPARC^{-/-}, la queue en « tire-bouchon » résulte d'une altération de la fibrillogénèse.

L'os et le tissu adipeux. Les souris SPARC^{-/-} souffrent d'ostéopénie suite à une diminution du nombre d'ostéoblastes (cellules synthétisant la composante non minérale de l'os, à 90% constitué de collagène de type I) (Delany et al. 2000). Normalement, SPARC régule positivement la différenciation des ostéoblastes: SPARC engage les cellules de la moelle osseuse vers la différenciation ostéoblastique au dépend de la différenciation des adipocytes (adipogenèse) (Nie and Sage 2009). En absence de SPARC, la balance s'inverse vers une différenciation des adipocytes. Ainsi, alors que les souris SPARC^{-/-} présentent une perte de masse osseuse, leur poids ne diminue pas car l'accumulation de graisse par les adipocytes plus nombreux compense cette perte en terme de masse (Bradshaw et al. 2003a).

Le cœur. Les souris SPARC^{-/-} présentent un risque plus important d'arrêt cardiaque suite à un infarctus du myocarde : elles présentent une difficulté de cicatrisation, avec une zone d'infarctie à tissu cicatriciel désorganisé, et avec une matrice collagénique immature (Schellings et al. 2009).

Les yeux. Des l'âge de six mois, les souris SPARC^{-/-} développent des cataractes suite à un dépôt anormal de collagène IV au niveau du cristallin (Yan Q. et al. 2002). De plus, les cellules épithéliales du cristallin de ces souris meurent prématurément car elles ne sont plus protégées du stress (UVs, production d'espèces réactives à l'oxygène, etc.) (Weaver et al. 2008).

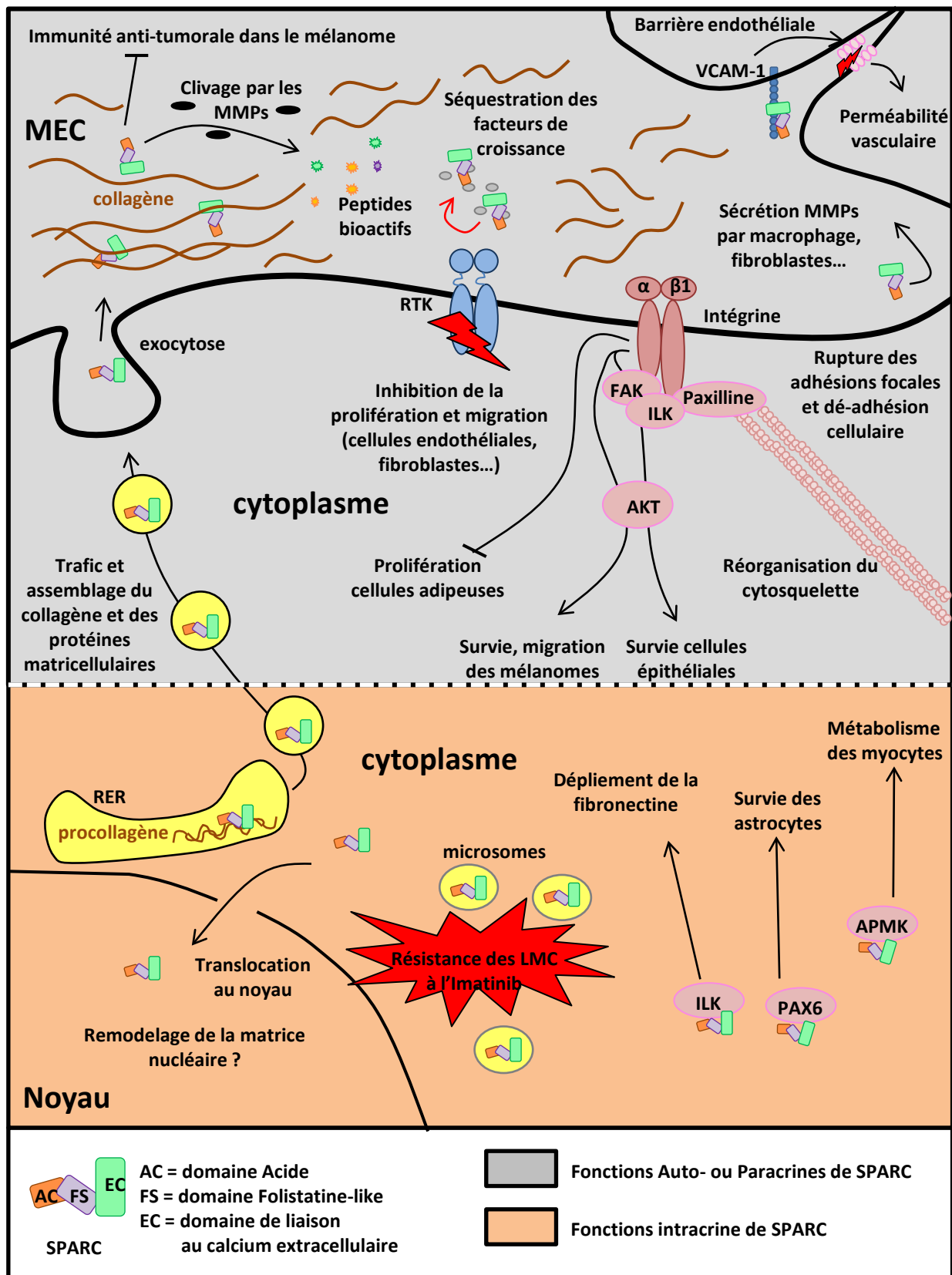


Figure 27. Différents modes d'action auto-, para- et intracrine de SPARC.

2. SPARC : une protéine antiproliférative, antiadhésive, régulatrice de la MEC.

a. Mode d'action autocrine et paracrine.

La protéine matricellulaire SPARC sécrétée et ses formes clivées actives (peptides évoqués précédemment) sont des adaptateurs multifonctionnels de l'homéostasie tissulaire. Elles peuvent agir depuis l'extérieur cellulaire sur les cellules qui les sécrètent (action autocrine) ainsi que sur les cellules voisines (action paracrine).

En interagissant directement avec les composants de la MEC et en s'associant à la surface des cellules, la protéine SPARC sécrétée peut ainsi réguler le comportement des cellules, que ce soit en terme de prolifération, de migration, d'invasion, ou encore de production de molécules sécrétées (facteurs de croissance, composants de la MEC, etc) (Sage H. et al. 1989a, Sage H. et al. 1989b) (Figure 27):

SPARC dans l'assemblage et le remodelage de la MEC. SPARC se lie directement aux composants de la MEC comme le collagène, la laminine ou encore la fibronectine. En effet, la protéine SPARC est capable de lier le collagène via son domaine EC de manière dépendante de la présence de calcium. Selon son état de glycosylation, SPARC se lie préférentiellement au collagène I, III, IV ou V (Maurer et al. 1995, Sasaki et al. 1998). Lorsque SPARC est fixée au collagène, elle agit à la façon d'une protéine chaperonne et module l'assemblage des différentes fibres de collagène.

De plus, SPARC influence la sécrétion de MMPs par différents types cellulaires (fibroblastes résidents du tissu, macrophages infiltrant les tissus, ou encore monocytes du sang périphérique) ainsi que leur activation, qui vont participer activement au remodelage de la MEC (Fujita et al. 2002, McClung et al. 2007, Shankavaram et al. 1997, Tremble et al. 1993). Au niveau de l'os, SPARC module la balance entre production et dégradation de la MEC osseuse en faveur d'une production et d'une consolidation de celle-ci : elle inhibe les ostéoclastes (cellules de l'os ayant un rôle de digestion de la MEC osseuse) (Machado do Reis et al. 2008), favorise la différenciation et la survie des ostéoblastes (Delany et al. 2003). Capable de fixer l'hydroxyapatite (composant minéral de la MEC)(Romberg et al. 1985) et le collagène, SPARC participe à la minéralisation de la MEC en liant ces composants (Termine et al. 1981). D'autre part, dans la MEC osseuse SPARC intervient dans l'assemblage des fibres de collagène en se fixant directement au collagène de type I et V (Bellahcene and Castronovo 1995).

SPARC et les facteurs de croissance, un rôle antiprolifératif. SPARC peut réguler de nombreux facteurs de croissance impliqués dans l'angiogenèse ou dans le remodelage tissulaire (par interaction directe, ou modulation indirecte de leur action ou de leur sécrétion) (pour revue, (Arnold and Brekken 2009) :

Au niveau des reins, SPARC maintient la balance entre prolifération cellulaire et dépôt de la MEC. Elle favorise la sécrétion de collagène I par les cellules mésangiales, et limite leur prolifération par augmentation de la sécrétion de TGF β (Francki et al. 1999). La protéine SPARC est également capable d'inhiber la prolifération IGF-1-dépendante de ces mêmes cellules mésangiales des glomérules rénaux (Francki et al. 2003).

D'autre part, elle module le comportement prolifératif, migratoire et d'adhésion d'autres types cellulaires tels que les cellules endothéliales, épithéliales, les fibroblastes et autres. Elle bloque la migration des cellules endothéliales induite par le bFGF (Hasselaar and Sage 1992). De plus, elle inhibe leur prolifération et favorise la différenciation des myoblastes dans les muscles

squelettiques en bloquant indirectement l'autophosphorylation (induite par le bFGF) du récepteur au bFGF (Motamed et al. 2003). En interagissant directement avec le VEGF ou le PDGF via son domaine EC, SPARC empêche la fixation de ces deux facteurs de croissance à leur récepteur cellulaire, et bloque ainsi la prolifération des cellules endothéliales (Kupprion et al. 1998) ou des fibroblastes dermiques (Raines et al. 1992), respectivement. Elle inhibe également la prolifération des cellules épithéliales en stimulant la signalisation TGF β dépendante (Schiemann et al. 2003). Enfin, en interagissant avec les intégrines β 1, SPARC peut promouvoir la survie de cellules épithéliales ou inhiber la prolifération de cellules adipeuses stromales (Nie and Sage 2009, Nie et al. 2008, Weaver et al. 2008).

SPARC une molécule antiadhésive.

D'une part, SPARC peut agir sur les membranes cellulaires pour que les cellules adoptent un état d'adhésion intermédiaire leur autorisant de se déplacer au sein de la MEC (Murphy-Ullrich 2001). *In vitro* et *in vivo*, des études ont montré qu'en présence de SPARC les cellules endothéliales vasculaires et les fibroblastes sont capables de réorganiser leur cytosquelette d'actine, de dissocier leur adhésions focales à la MEC, ou encore de privilégier une voie de signalisation dépendante de protéines kinases, et ainsi de se détacher de leur substrat (Bornstein and Sage 2002, Lane and Sage 1990, Motamed and Sage 1998, Murphy-Ullrich et al. 1995). Elle a également été impliquée dans des défauts d'adhésion de cellules épithéliales (Weaver et al. 2006).

D'autre part, SPARC peut intervenir dans la déstabilisation des barrières cellulaires. Par exemple, dans un contexte inflammatoire, sécrétée par les leucocytes actifs et en se liant au récepteur membranaire VCAM-1 des cellules de l'endothélium vasculaire, SPARC déstabilise les jonctions occlusives, entraîne la formation de « trous » dans la monocouche des cellules endothéliales (perméabilise ainsi l'endothélium), et favorise l'extravasation (sortie des vaisseaux sanguins vers les tissus) des leucocytes actifs (Goldblum et al. 1994, Kelly K. A. et al. 2007). De plus, en tant que régulateur négatif de la formation des synapses et sécrétée par les astrocytes dans le système nerveux central, SPARC compense l'implication opposée de l'Hevin (une autre protéine de la famille SPARC, sécrétée également par les astrocytes) dans cette formation et contrôle ainsi la formation, la maturation, ainsi que la plasticité des synapses (Kucukdereli et al. 2011).

b. Mode d'action intracrine.

La protéine SPARC peut agir directement à l'intérieur de la cellule : on parle de communication intracrine (Figure 27). En effet, elle peut se lier directement à plusieurs partenaires intracellulaires. Par exemple, en interagissant directement avec la protéine ILK¹⁹ (pour, integrin-linked kinase), SPARC favorise le dépliement de la fibronectine, indispensable à l'assemblage de cette dernière dans la MEC (Barker et al. 2005). Dans les astrocytes, en se liant à Pax6, elle régule leur survie dépendante de p53 (Tripathi and Mishra 2010). Elle régule également le métabolisme glucidique des myocytes en liant directement la 5'adenosine-monophosphate-activated protein kinase (AMPK)²⁰ (Song et al. 2010).

D'autre part, si la protéine SPARC présente un marquage cellulaire ponctiforme caractéristique des protéines sécrétées incluant le réticulum endoplasmique rugueux (RER), l'appareil de Golgi et les vésicules de sécrétion, elle est également un composant de la matrice nucléaire (Gooden et al. 1999). Il a été proposé que SPARC participe au remodelage de cette matrice nucléaire ayant lieu

¹⁹ ILK est une protéine qui se lie au domaine intracellulaire des intégrines, elles mêmes en interaction avec la fibronectine matricielle. ILK est un médiateur intracellulaire des signaux cellulaires engendrés par l'accrochage des cellules à leur MEC.

²⁰ L'AMPK est une enzyme clé de l'homéostasie énergétique des cellules.

lors de chacune des divisions cellulaires, au même titre que dans la MEC.

Enfin, la séquestration de SPARC dans le REG ou dans la fraction microsomale peut être à l'origine de situations pathologiques telles que la pseudocondroplasie (maladie affectant le développement osseux) (Hecht and Sage 2006) ou l'acquisition d'une résistance des cellules de leucémie myéloïde chronique (LMC) à l'imatinib (traitement de référence de cette pathologie hématologique) (Fenouille et al. 2010), respectivement.

D. REGULATION DE LA PROTEINE SPARC.

Comme cela a été décrit précédemment, en tant que protéine matricellulaire, SPARC n'est exprimée et sécrétée que transitoirement au sein de la MEC pour assurer l'homéostasie tissulaire. Elle peut cependant être dérégulée dans certains tissus en situation pathologique : tissus cancéreux ou tissus obèses. Dans ce contexte là, l'expression de SPARC reflète alors une perte de l'homéostasie tissulaire.

De manière plus générale, le profil d'expression de SPARC correspond à une régulation spatio-temporelle (cf. partie C). L'expression de SPARC est principalement régulée par des mécanismes transcriptionnels mettant en jeu différents facteurs de transcription, facteurs de croissances, et voies de signalisation activés par un stress. Elle peut également être modulée par des microARNs (à court terme), ou par méthylation de son promoteur (à long terme).

Régulation du niveau d'ARN messagers de SPARC.

Le **TGF β** est le principal inducteur de SPARC, tant au niveau protéique qu'au niveau des ARN messagers. En effet, dans différents types de fibroblastes humains, des « preosteoblasts-like cells de rat », des cellules de pulpe dentaire humaine (la pulpe est la partie la plus interne de la dent et regroupe différents types cellulaires) ou encore dans des chondrocytes, le TGF est capable de stimuler la production d'ARNm de SPARC (pour revue, (Shiba et al. 1998). SPARC étant également capable d'activer l'expression du TGF β (décrit précédemment) (Francki et al. 1999, Francki et al. 2004, Schiemann et al. 2003), cette co-régulation entre SPARC et le TGF β est à l'origine d'une boucle autonome d'amplification lors des processus de remodelage tissulaire.

Au contraire, d'autres facteurs de croissance, comme l'EGF, le PDGF, le bFGF, ou le TNF diminuent la production d'ARNm de SPARC dans différentes cellules de pulpe dentaire humaine (Shiba et al. 1998). C'est également le cas de la cytokine IL-1.

Récemment, une étude a mis en évidence dans un modèle de cancer du pancréas la possible régulation transcriptionnelle du gène *SPARC* par TP53INP1 (Tumor protein 53 induced nuclear protein 1), un gène suppresseur de tumeur. Retrouvée inactivée précocement dans les lésions tumorales pancréatiques, la protéine TP53INP1 réprime la transcription de *SPARC* lorsqu'elle est exprimée dans des lignées cellulaires cancéreuses pancréatiques et inhibe ainsi leur capacité migratoire (Seux et al. 2011).

Enfin, la transcription du gène *SPARC* peut être réprimée par les membres de la famille AP-1 (famille de facteurs de transcription tels que c-Jun, D-jun, c-Fos et de nombreux autres facteurs). En effet, la surexpression de c-Jun ou v-Jun empêche l'expression tissulaire de SPARC dans les embryons de poulet et de rat transformés par ces deux oncoprotéines (Kraemer et al. 1999, Mettouchi et al. 1994, Vial et al. 2000). Il a été montré que la répression transcriptionnelle de SPARC par v-Jun est indirecte, puisqu'elle faite intervenir un complexe activateur de la transcription contenant les deux facteurs SP1 et SP3, se fixant dans une région du promoteur du

gène SPARC: ce facteur v-Jun agit en tant que co-répresseur de SP1 et SP3 : il s'y fixe et bloque leur activité transcriptionnelle (Chamboredon et al. 2003).

Dans un contexte pathologique, c-jun joue un rôle opposé : dans des cellules cancéreuses mammaires, ce facteur augmente l'activation du promoteur de SPARC et par conséquent la synthèse des transcrits de SPARC (Briggs et al. 2002). Cette activation du promoteur est aussi indirecte, et serait médiée par les facteurs SP1 et 3.

Régulation de la stabilité des ARN messagers de SPARC et de son activité.

Comme cela a été mentionné précédemment, les deux transcrits issus de la transcription du gène SPARC sont très stables avec une demi-vie supérieure à 24h. Néanmoins, dans les ostéoblastes, ces ARNm peuvent être déstabilisés par le bFGF (Delany and Canalis 1998). De plus, une étude en 2009 a mis en évidence une régulation de SPARC par des microARN au cours de la différenciation des ostéoblastes : les ARNm SPARC sont dégradés par les microARN miR-29, régulateurs de protéines du microenvironnement, qui se fixent au niveau de la région 3'UTR (Kapinas et al. 2009). Dans des cellules de carcinome du sein, la régulation positive de SPARC par les intégrines $\beta 4$ résulte de la diminution des miR-29 (Gerson et al. 2012). Récemment, un autre microARN, miR-203, a été impliqué dans la régulation de l'activité pro-métastatique de SPARC dans les carcinomes à cellules squameuses du cou et de la tête (Benaich et al. 2014).

Activation de l'expression de SPARC par les facteurs de croissance.

Dans certains types cellulaires, SPARC peut être induite par des facteurs de croissance. Par exemple, dans des chondrocytes de lapin, il a été montré que l'expression de la protéine SPARC est induite à la fois par le PDGF et l'IGF-1 qui contrôlent la synthèse du cartilage (Chandrasekhar et al. 1994). Dans le tissu adipeux obèse, son expression par les adipocytes est stimulée *in vivo* par l'insuline (Tartare-Deckert et al. 2001). Dans des cellules endothéliales vasculaires, le VEGF induit SPARC (Kato Y. et al. 2001). Comme cela a été décrit précédemment, dans ces mêmes cellules, SPARC est capable d'inhiber l'effet mitogénique du VEGF, et par conséquent de limiter l'angiogenèse. Cette co-régulation entre SPARC et le VEGF permet donc de limiter les processus d'angiogenèse au processus de remodelage tissulaire.

Dégradation de la protéine SPARC. Dans un contexte inflammatoire, la protéine SPARC peut interagir avec le récepteur Stabilin-1 (Clever-1) qui va réguler la protéine matricellulaire. Ce récepteur intervient dans l'élimination des déchets lipoprotéiques et glycosylés accumulés dans les tissus, via leur endocytose : c'est un récepteur « poubelle » (Kzhyshkowska and Krusell 2009). De plus, ce récepteur est exprimé à la surface des macrophages infiltrant le site d'inflammation. Ces macrophages une fois activés sont alors capables de réguler, par le processus d'endocytose dépendant du récepteur Stabilin-1, la concentration de SPARC disponible dans l'espace extracellulaire : le récepteur internalise SPARC et l'adresse vers la voie de dégradation endosomale (David et al. 2012, Kzhyshkowska et al. 2006).

Régulation épigénétique de SPARC. Comme cela sera décrit par la suite, SPARC peut aussi bien jouer le rôle d'oncoprotéine, que celui de suppresseur de tumeur, selon le type de cancer. Dans la plupart des cancers pour lesquels SPARC représente un suppresseur de tumeur, les cellules tumorales sont capables d'hypermétyler le promoteur de SPARC au niveau d'un îlot CpG proximal pour maintenir la protéine sous silence (cf. partie D). L'expression de SPARC dans ces cellules

tumorales peut être restaurée par un agent déméthylant (le 5-aza-2'-doxycytidine) (Cheetham et al. 2008, Fenouille et al. 2010, Sato et al. 2003, Socha et al. 2009).

En résumé, étant dépendante du contexte cellulaire et physiopathologique, cette régulation spatio-temporelle de l'expression de SPARC reste complexe.

E. SPARC EN CONTEXTE PATHOLOGIQUE : UNE PROTEINE A DOUBLE FACE IMPLIQUEE DANS DE NOMBREUX CANCERS.

Une tumeur peut être associée à une lésion en remodelage permanent qui ne cicatrisera jamais. Or, comme cela a été mentionné précédemment, SPARC est un acteur essentiel dans le processus de cicatrisation. Il n'est donc pas surprenant de retrouver des altérations de l'expression de cette protéine dans de nombreux cancers (pour revue, (Arnold and Brekken 2009)). De plus, la capacité de SPARC à promouvoir ou inhiber la progression tumorale dépend du type cellulaire la sécrétant, du contexte microenvironnemental et du stade d'évolution de la tumeur. En effet, SPARC peut-être exprimée et sécrétée par les cellules tumorales mais également par les cellules stromales infiltrant la tumeur (macrophages), ou activées (fibroblastes et cellules endothéliales). Contexte- et cellule- dépendantes, les études démontrant les rôles de SPARC dans le cancer ont souvent mis en évidence des situations contradictoires.

Cette partie, volontairement non exhaustive, a pour objectif de mettre en évidence le double potentiel de SPARC contexte- et cellule-dépendant.

1. Un rôle anti-tumoral.

Potentiel antitumoral du SPARC tumoral.

La protéine SPARC a été retrouvée réprimée dans certaines cellules tumorales. En effet, son expression est le plus souvent perdue suite à une hyperméthylation de son promoteur.

La perte de l'expression de SPARC par hyperméthylation de son promoteur semble conférer à certaines cellules cancéreuses concernées un avantage prolifératif et de survie (Nagaraju and El-Rayes 2013).

Cancer de l'ovaire. Dans ce cancer, le promoteur de SPARC a été retrouvé hyperméthylé dans la plupart des cellules cancéreuses testées *in vitro* et sur de nombreux échantillons de tumeurs de patients (Niskakoski et al. 2014, Socha et al. 2009). La décroissance du niveau d'expression de SPARC dans les cellules cancéreuses ovariennes est corrélée à la progression tumorale (Socha et al. 2009). De plus, il a été montré que la réintroduction de SPARC dans ces cellules inhibe leur prolifération *in vitro* et la tumorigénicité *in vivo* par induction de l'apoptose (Mok et al. 1996, Socha et al. 2009, Yiu et al. 2001).

Cancer du pancréas. La méthylation du promoteur de SPARC est souvent retrouvée à des stades précoces dans les cellules cancéreuses pancréatiques²¹ et pourrait être un marqueur de diagnostic de ce cancer (Gao J. et al. 2010, Infante et al. 2007, Sato et al. 2003). Le traitement de cellules cancéreuses pancréatiques par du SPARC exogène supprime leur croissance. A l'inverse, la suppression de l'expression endogène de SPARC par technique d'interférence à l'ARN augmente la croissance de lignées cellulaires de cancer du pancréas, confirmant ainsi le potentiel suppresseur de tumeur de SPARC (pour revue, (Neuzillet et al. 2013)).

²¹En 2007, l'étude d'Infante et al a montré que sur 229 adénocarcinomes ductaux pancréatiques, 84% étaient positifs pour le marquage immunohistochimique de SPARC. Néanmoins, parmi ces 84% de tumeurs « SPARC-positives », 52% sont SPARC-positives via l'expression de SPARC par le stroma et non par les cellules cancéreuses ; et le profil « SPARC-positif » des cellules cancéreuses n'est présent que dans moins d'un tiers des cas (Infante et al. 2007).

Cancer colorectal. La méthylation du promoteur de SPARC a été retrouvée dans 71% des lignées cellulaires de cancer colorectal, et dans 80 à 100% des adénocarcinomes colorectaux, corrélée à un très mauvais pronostic (Cheetham et al. 2008, Yang E. et al. 2007).

Potentiel antitumoral du SPARC stromal.

Neuroblastome. Dans le cas des neuroblastomes, SPARC a un effet anti-tumoral lorsqu'elle est sécrétée par les cellules de Schwann qui infiltrent la tumeur. En effet, le SPARC stromale va empêcher la néoangiogenèse au sein de la tumeur et compromettre sa progression (Chlenski et al. 2004).

Carcinome pulmonaire. L'implantation de cellules cancéreuses de carcinome pulmonaire de Lewis en sous-cutané dans un modèle murin SPARC^{-/-} a permis d'identifier un potentiel anti-tumoral du SPARC stromale dans le cancer du poumon: en effet, la croissance des cellules cancéreuses de poumon est accélérée en absence de SPARC dans le stroma (Brekken et al. 2003).

2. Un rôle pro-tumoral.

Des niveaux élevés de SPARC ont été mis en évidence dans de nombreux cancers agressifs (pour revue, (Arnold and Brekken 2009) et ont été corrélés à un mauvais pronostic en clinique (Chlenski and Cohn 2010, Clark and Sage 2008, Podhajcer et al. 2008): révélant ainsi le potentiel oncogénique de la protéine SPARC.

Potentiel tumorigénique de SPARC dans les tumeurs.

Cancer du sein. Dans les cellules de carcinome ductal mammaire, l'expression de SPARC est initiée (comparativement à un tissu contrôle sain) et augmente avec la progression tumorale vers des stades plus avancés associée (Bellahcene and Castronovo 1995, Bergamaschi et al. 2008). Elle est associée à un mauvais pronostic pour les patientes (Jones et al. 2004, Nagai et al. 2011). Dans ce contexte tumoral, des études ont montré l'implication de SPARC dans l'initiation des métastases. *In vitro*, SPARC est capable d'induire l'activation de la MMP-2 dans des lignées cellulaires invasives de cancer du sein (Gilles et al. 1998). Dans un modèle murin de métastases pulmonaires de cellules cancéreuses mammaires, Minn et al ont observé une expression de SPARC augmentée au niveau des sites métastatiques, et ont démontré que SPARC confère un potentiel métastatique à ces cellules (Minn et al. 2005).

Gliome. Dans les gliomes, SPARC est également retrouvée surexprimée dans les cellules tumorales, indépendamment du stade de la maladie. Une étude a suggéré l'implication des cellules immunitaires dans cette surexpression: en effet, cette étude montre qu'une population de macrophage positive pour le récepteur Stabilin-1 (capable de dégrader SPARC, comme cela a été mentionné précédemment) disparaît précocement dans la progression tumorale du gliome (David et al. 2012). De plus, *in vitro* et *in vivo*, des études ont pu montrer qu'en activant la kinase AKT, via les kinases ILK et FAK, SPARC est capable de promouvoir la survie et l'invasion des cellules de gliome (Golembieski et al. 1999, Schultz et al. 2002, Shi et al. 2007, Shi et al. 2004). Au contraire, la suppression de SPARC par technique d'interférence à l'ARN (siRNA) dans des cellules de gliome, empêche leur dissémination cérébrale *in vivo* dans un modèle murin (Seno et al. 2009, Shi et al. 2007). Récemment, notre laboratoire a montré l'implication de SPARC dans la migration trans-endothéliale des cellules de gliome (Tichet et al. 2015).

Cancer du poumon (Non-small cell lung cancers (NSCLC)). Les cellules cancéreuses des NSCLC montrent elles aussi une augmentation du niveau d'expression de la protéine SPARC

comparativement aux cellules contrôles de poumons sains (Amatschek et al. 2004, Siddiq et al. 2004). L'expression de SPARC dans ce contexte semble dépendre de celle du suppresseur de tumeur KLF4. En effet, KLF4 n'est pas exprimée dans le cancer du poumon, mais son expression ectopique au sein de lignées cellulaires de cancer de poumon réprime l'expression de SPARC et inhibe ainsi l'invasivité de ces cellules (Zhou et al. 2010). De plus, ces cellules sont capables d'induire la forte expression de SPARC par les fibroblastes du stroma environnant, leur procurant également un potentiel pro-tumoral (vu ci-dessus) (Fromigue et al. 2003).

Le mélanome fait également parti des cancers dans lesquels la surexpression de SPARC a été associée à une progression tumorale. Le potentiel de SPARC dans ce cancer sera détaillé dans la partie suivante (partie E).

Potentiel oncogénique du SPARC stromale.

Dans le cas du **cancer du poumon (NSCLC)**, l'expression de SPARC par les cellules stromales associées à la tumeur a été corrélée à des marqueurs pro-tumoraux tels que l'hypoxie et l'acidose, ainsi qu'à un mauvais pronostic pour les patients (Koukourakis et al. 2003).

Dans le **carcinome mammaire**, l'expression de SPARC est retrouvée augmentée dans les cellules stromales *in situ* lors de la progression invasive du carcinome primaire (Parker et al. 2004). De plus, dans un modèle murin de carcinome mammaire, Sangaletti et al montrent que:

- SPARC joue un rôle déterminant dans la déposition de collagène IV et l'assemblage du stroma, d'autant plus lorsqu'il était produit par les leucocytes du stroma tumoral (Sangaletti et al. 2003).
- La protéine SPARC sécrétée par les macrophages est capable d'induire la formation de métastases spontanées *in vivo*, via les intégrines (Sangaletti et al. 2008).

Enfin, alors que l'expression tumorale de SPARC est en majorité épigénétiquement diminuée dans les cellules tumorales du pancréas (cf. 1.), lorsque SPARC est exprimée et sécrétée par les fibroblastes péri-tumoraux, elle est associée à un mauvais pronostic pour les patients atteints de **cancer du pancréas** (Infante et al. 2007). Les cellules cancéreuses pancréatiques sont en fait capables d'induire l'expression et la sécrétion de SPARC stromale par les fibroblastes. Des études ayant évalué le niveau d'expression d'ARNm de SPARC dans des échantillons de tissus issus d'adénocarcinomes pancréatiques (contenant des cellules cancéreuses et leur stroma), ont montré qu'un haut niveau d'ARNm de SPARC est associé à un mauvais pronostic pour le patient (Miyoshi et al. 2010, Podhajcer et al. 2008). De plus, un agent anticancéreux, l'Ukrain (UK), est capable d'inhiber la prolifération et le potentiel invasif des cellules cancéreuses de pancréas *in vitro* : il entraîne la surexpression de SPARC intracellulaire, et inhibe sa sécrétion et celle des MMP-2 et 9 dans le milieu extérieur (associé au stroma), empêchant ainsi le remodelage de la MEC indispensable à l'invasion des cellules (Funel et al. 2010). Ceci conforte l'idée d'un rôle prépondérant du SPARC stromale pro-tumoral via son action sur le remodelage du stroma plutôt que celui du SPARC tumoral (dont l'expression est réprimée) dans le cancer du pancréas.

Cet exemple parmi les cancers dans lesquels SPARC est différemment exprimée dans les populations stromale et tumorale (pour revue, (Arnold and Brekken 2009), souligne le double potentiel de SPARC au sein d'une même tumeur.

En résumé, ces différentes et nombreuses études ont permis de rapidement mettre en évidence le potentiel double de SPARC en situation pathologique telle que le cancer : à l'origine d'une progression tumorale ou au contraire d'un effet anti tumoral, ce potentiel dépend du contexte tumoral et du type cellulaire produisant SPARC, mais reste difficile à expliquer. Deux études ont néanmoins proposé une explication possible, faisant intervenir des récepteurs cellulaires et des facteurs de croissance (Arnold and Brekken 2009, Chiodoni et al. 2010). En effet, les intégrines $\beta 1$, $\beta 3$ et $\beta 5$ ainsi que différents facteurs de croissance ont été identifiés comme médiateurs des effets de SPARC dans différents contextes physiopathologiques. Néanmoins, une même intégrine peut intervenir dans différents effets cellulaires de SPARC (parfois opposés) selon le facteur de croissance avec lequel elle interagit. Via les intégrines $\beta 3$ et $\beta 5$, SPARC peut promouvoir l'adhésion des cellules cancéreuses de prostate à l'os en activant une boucle autocrine dépendante du VEGF (Byzova et al. 2000, De et al. 2003), alors qu'elle inhibe l'adhésion, la prolifération et l'invasion des cellules cancéreuses ovariennes en diminuant l'expression et le regroupement de ces mêmes intégrines (ainsi que les intégrines $\beta 1$) à la surface membranaire des cellules, et leur voie de signalisation dépendante de l'EFG (Said et al. 2007). De plus, SPARC induit la migration des cellules de carcinome mammaire via les intégrines $\beta 5$ (Sangaletti et al. 2008). D'autre part, en se liant aux intégrines $\beta 1$, SPARC peut aussi activer la kinase AKT via celle d'ILK et promouvoir la survie des cellules épithéliales de rétine ou des cellules de gliome (mentionné précédemment) (Shi et al. 2007, Shi et al. 2004, Weaver et al. 2008).

Ainsi, une possible explication du double potentiel de SPARC contexte- et cellule-dépendant serait la variation d'un répertoire cellulaire d'intégrines et la disponibilité des différents facteurs de croissance associés dans des contextes donnés (Arnold and Brekken 2009, Chiodoni et al. 2010) .

Il est à noter que SPARC est également impliquée dans d'autres contextes pathologiques que le cancer, tels que celui de la fibrose impliquée dans de nombreuses maladies (Atorrasagasti et al. 2013, Sangaletti et al. 2011, Tripodo et al. 2012), ou celui de l'obésité et du diabète (Kos and Wilding 2010, Tartare-Deckert et al. 2001), des niveaux élevés de SPARC ayant d'ailleurs été retrouvés dans le plasma de patients nouvellement diagnostiqués pour un diabète de type II (Wu D. et al. 2011).

F. ROLE DE SPARC DANS LE MELANOME CUTANE.

1. Etude de l'expression de la protéine SPARC au cours de la progression tumorale.

C'est en 1997 que Ledda et al, ont pour la première fois mis en évidence la surexpression de la protéine SPARC dans des lignées cellulaires de mélanomes humains ainsi que dans des échantillons de mélanomes métastatiques humains, ou de tumeur mélaniques ayant progressé dans des modèles murins. Des hauts niveaux de SPARC ont été détectés par immunohistochimie dans 100% des mélanomes primaires et métastatiques.

De plus, après avoir observé une absence totale de SPARC dans les mélanocytes, détecté des niveaux modérés de SPARC dans les de naevi naissants (16%) et dans la plupart des naevi dysplasiques (plus de 90%), les auteurs de cette étude ont associé l'expression de la protéine SPARC à la croissance et la progression du mélanome (Ledda F. et al. 1997a).

D'autres auteurs ont ensuite confirmé ces observations en étudiant le niveau d'expression de SPARC dans différents variants métastatiques de mélanomes murins: les variants fortement métastatiques les plus agressifs présentent une expression et une sécrétion de SPARC augmentée comparativement aux variants moins agressifs (Kato Y. et al. 2000, Rumpler et al. 2003).

L'expression de SPARC a rapidement été considérée comme :

- un **marqueur de mauvais pronostic du mélanome**: en effet, son expression étant corrélée à la progression du mélanome en terme d'invasivité et d'agressivité, SPARC est associée à un mauvais pronostic vital des patients atteints de mélanome cutanés (Alonso et al. 2007, Massi et al. 1999, Robert G. et al. 2006, Tichet et al. 2015).
- un **marqueur de diagnostic du mélanome** : des niveaux élevés de SPARC ont été détectés dans le sérum de patients atteints de mélanome comparativement à des individus contrôles (Ikuta et al. 2005, Tichet et al. 2015), et ce dosage sérique de SPARC s'est révélé efficace dans la détection d'environ 30% de patients atteints de mélanome, même à un stade précoce de la maladie (Ikuta et al. 2005).

Enfin, la protéine SPARC sécrétée par les cellules cancéreuses serait à elle seule responsable de la formation et de la croissance tumorale. En effet, la surexpression forcée de SPARC par les fibroblastes tumoraux ne modifie pas *in vivo* la croissance des tumeurs xénogreffées (modèle murin où les cellules de mélanomes ont été co-injectées avec les fibroblastes). De plus, en l'absence de SPARC, ces cellules de mélanome injectées sont rapidement rejetées, alors qu'elles augmentent la densité vasculaire, le dépôt de collagène ou encore le recrutement de fibroblastes lorsqu'elles surexpriment la protéine SPARC (Prada et al. 2007). Au laboratoire, Fenouille et al ont montré que l'absence de SPARC perturbe considérablement la prolifération des cellules de mélanome *in vitro*, et freine la croissance de tumeurs implantées chez la souris Nude *in vivo*. L'absence de SPARC entraîne une accumulation du suppresseur de tumeur p53 qui induit p21^{Cip/Waf1} (un inhibiteur du cycle cellulaire) et bloque les cellules de mélanome dans leur cycle lors de la transition de la phase G2 à la phase M dans un premier temps, puis induit leur mort dans un second temps (Fenouille et al. 2011a).

2. Un acteur clé de la progression tumorale.

a. Initiation des métastases.

Comme cela a été décrit dans le cancer du sein ou encore dans les gliomes, la protéine SPARC (tumorale ou stromale) potentialise le processus métastatique en remodelant la MEC et en modifiant les interactions des cellules cancéreuses avec celle-ci (Minn et al. 2005, Sangaletti et al. 2008, Seno et al. 2009). Dans le mélanome, plusieurs études ont démontré l'importance de la protéine SPARC dans l'acquisition de propriétés migratoires et invasives des cellules de mélanome, et par conséquent dans le processus métastatique (Ledda M. F. et al. 1997b, Robert G. et al. 2006, Smit et al. 2007, Sosa et al. 2007), confirmant les premiers travaux de Ledda et al, en 1997 sur le rôle de SPARC dans le mélanome : la suppression de l'expression de la protéine SPARC dans les cellules humaines de mélanome est à l'origine d'une diminution de leur capacité d'invasion *in vitro*, et abolit leur potentiel tumorigénique *in vivo* (Ledda M. F. et al. 1997b).

SPARC, un inducteur de la transition de type épithélio-mésenchymateuse (TEM) dans le mélanome.

Comme cela a été décrit dans le chapitre I, la TEM initie le comportement invasif et métastatique des cancers épithéliaux associée à une perte d'expression de marqueurs épithéliaux (E-cadhérine) et à l'augmentation de l'expression de marqueurs mésenchymateux (N-cadhérine, sécrétion de métalloprotéases). Dans le mélanome, la TEM permet aux cellules de la tumeur primaire de se détacher des kératinocytes environnants via la perte d'expression de la E-cadhérine, et d'interagir

via l'expression de la N-cadhérine avec les fibroblastes du stroma et les cellules endothéliales (constituant la paroi des vaisseaux) pour s'extraire de l'épiderme. Autrement dit, la TEM est impliquée dans la transition de la phase radiale vers la phase verticale de croissance.

En 2002, il a été mis en évidence l'induction de l'expression de la protéine SPARC dans des cellules de mélanome qui transitent entre RGP et VGP suite à l'expression forcée des intégrines $\beta 3$ (surexprimées dans les mélanomes devenus invasifs (Kuphal et al. 2005a)) (Sturm et al. 2002), suggérant l'implication de la protéine SPARC dans la TEM, et notamment dans le contexte du mélanome.

Pour tester cette hypothèse, en 2006, Robert et al ont surexprimé la protéine SPARC par une approche adénovirale dans des mélanocytes qui ne l'expriment normalement pas. Ainsi, ils ont montré que l'expression de SPARC dans ces mélanocytes est suffisante pour induire leur TEM, marquée par la répression de la E- et P-cadhérine et l'induction de la fibronectine et de la vimentine, ainsi que pour leur procurer un phénotype agressif : les mélanocytes « transformés » sont alors capables de migrer à travers une membrane poreuse, et capables de sécréter des MMP-2 et 9 pour dégrader une matrice artificielle de collagène *in vitro* (Robert G. et al. 2006). De plus, la surexpression de SPARC et la répression de la E-cadhérine sont associées à l'expression de SNAIL (Robert G. et al. 2006), un facteur de transcription impliqué dans la TEM (Cano et al. 2000). Cette nouvelle capacité d'invasion des mélanocytes via la surexpression ectopique de SPARC a ensuite été confirmée par d'autres auteurs (Smit et al. 2007). En 2007, une équipe de recherche a démontré dans des carcinomes mammaires que SPARC est capable de réprimer l'expression de la E-cadhérine en induisant celle du facteur de transcription SNAIL (Lien et al. 2007). Auparavant, ce même facteur de transcription a été identifié par analyses pangénomiques comme inducteur de la TEM dans les cellules de mélanome (Kuphal et al. 2005b) et dans le cancer du sein (Olmeda et al. 2007) via l'activation de SPARC. Ainsi, la TEM régulerait les niveaux d'expression de SPARC par l'intermédiaire de SNAIL, et en retour, SPARC maintiendrait le processus de TEM via la régulation de SNAIL.

Par la suite, le laboratoire a démontré que l'activité pro-invasive et inductrice de SPARC sur la TEM dépendait de l'activation de la voie de signalisation d'AKT et d'un second facteur de transcription important dans le processus de TEM, SLUG. En effet, Fenouille et al, ont montré que SPARC active la kinase AKT (par phosphorylation de son résidu sérine 473), qui à son tour induit l'expression de SLUG. Capable d'activer la TEM au cours de la migration des mélanoblastes (précurseurs des mélanocytes) de la crête neurale vers l'épiderme *in situ*, la protéine SLUG est également capable de réactiver ce programme et favoriser la dissémination métastatique des cellules de mélanome. De plus, l'utilisation d'un inhibiteur pharmacologique d'AKT permet d'inhiber l'induction de ce facteur de transcription, et d'inhiber les capacités invasives des cellules de mélanomes *in vitro*. Au contraire, la surexpression d'une forme constitutivement active d'AKT (mutant myristoylé d'AKT, capable d'être fixé en permanence à la membrane plasmique, site d'activation de la kinase) dans ces cellules maintient le niveau d'expression de SLUG en l'absence de la protéine SPARC (Fenouille et al. 2012).

b. SPARC donne l'accès aux cellules de mélanomes aux sites métastatiques.

Ayant acquis des propriétés migratoires et invasives, les cellules de mélanome sont alors capables d'envahir le derme sous-jacent, puis d'entrer dans le système lymphatique ou sanguin pour se disséminer à travers l'organisme : c'est l'**intravasation**. Les cellules cancéreuses peuvent entrer

dans la circulation existante, soit via les vaisseaux existants, soit par de nouveaux vaisseaux dont elles induisent la formation : on parle alors de néoangiogenèse (vaisseaux sanguins) ou de lymphangiogenèse (vaisseaux lymphatiques) tumorales. Pour réguler ces deux processus, les cellules cancéreuses et/ou stromales sécrètent de nombreuses molécules régulatrices qui vont signaler via des récepteurs exprimés par les cellules endothéliales. Par exemple, le VEGF-A (*Vascular endothelial growth factor A*), le VEGF-C, ou le VEGF-D induisent la lymphangiogenèse (Tammela and Alitalo, 2010), alors que la TSP-1 (*Thrombospondin-1*) l'inhibe (Kazerounian et al., 2008).

SPARC et angiogenèse tumorale.

Comme cela a été mentionné précédemment dans ce chapitre (cf. dans partie C.2.a et D.1.), SPARC inhibe *in vitro* l'angiogenèse via son domaine EC, et agit en tant que facteur anti-angiogénique dans les neuroblastomes via son module EGF-like (domaine FS) *in vivo*.

Au contraire, SPARC a été détectée dans les nouveaux vaisseaux de la membrane chorioallantoïdienne d'embryon de poulet (Iruela-Arispe et al. 1995). Dans le mélanome, la surexpression de la protéine SPARC conduit à l'hyper-vascularisation des tumeurs chez la souris *Nude* (Prada et al. 2007). Deux peptides issus de la protéolyse ménagée de SPARC par la MMP-3 stimulent également l'angiogenèse : le peptide Z-1 contenant le motif KGHK de liaison au cuivre, qui active la prolifération des cellules endothéliales, et le peptide Z-2 qui active leur migration (Sage E. H. et al. 2003). De plus, SPARC a été retrouvée clivée dans des échantillons de mélanomes humains (Ledda F. et al. 1997a). Ainsi, selon sa spécificité de clivage, SPARC pourrait agir à la fois en tant que facteur anti- et pro-angiogénique.

Une fois dans la circulation, les cellules cancéreuses ayant survécu sortent ensuite des vaisseaux vers le parenchyme d'un organe : c'est l'**extravasation**. L'extravasation regroupe plusieurs étapes qui aboutissent à l'émigration de cellules du flux circulatoire vers les tissus : la chemo-attraction entre cellules endothéliales et cellules émigrantes, l'arrêt de ces dernières au site d'extravasation ou « *rolling* », l'adhérence des cellules émigrantes à l'endothélium, l'induction de la perméabilité endothéliale, et la transmigration para- ou trans-cellulaire (toutes les étapes n'étant pas nécessairement présentes). Le modèle d'extravasation le mieux décrit est celui des leucocytes qui émigrent depuis les vaisseaux sanguins vers les tissus lésés (tissus inflammatoires, infectés ou blessés) : c'est la diapédèse. Dans le cas des cellules cancéreuses, les intégrines qu'elles expriment jouent un rôle important dans leur adhésion aux cellules endothéliales, et dans leur transmigration. En effet, les intégrines $\alpha 4\beta 1$ exprimées par de nombreux cancers, en particulier le mélanome et les sarcomes, interagissent avec le récepteur VCAM-1 à la surface des cellules endothéliales. Des études *in vitro* et *in vivo* ont montré que cette interaction était impliquée dans les mécanismes de transmigration de cellules de mélanome (Garofalo et al. 1995, Klemke et al. 2007), et que l'expression des intégrines $\alpha v\beta 3$ par les cellules de mélanome était nécessaire à leur adhérence à l'endothélium via la molécule L1-CAM exprimée par ce dernier, et à leur transmigration (Voura et al. 2001).

Comme cela a été mentionné précédemment (cf. partie C.2.a.), la protéine SPARC joue un rôle dans la perméabilisation de l'endothélium vasculaire dans un contexte d'inflammation contrôlé, via sa liaison au récepteur VCAM-1 exprimé par les cellules endothéliales : elle favorise l'extravasation des leucocytes. Très récemment, ce rôle dans la perméabilisation vasculaire a été

mis en évidence également dans le contexte pathologique qu'est celui du mélanome métastatique : notre laboratoire a montré l'implication de l'interaction de SPARC avec la molécule VCAM-1 exprimée par les cellules endothéliales vasculaires dans la perméabilisation de l'endothélium vasculaire, l'extravasation des cellules de mélanome, et la formation de métastases pulmonaires (Tichet et al. 2015). En effet, l'extinction de SPARC dans des cellules de mélanome par une approche d'interférence à l'ARN, inhibe *in vitro* les capacités de transmigration des cellules de mélanome métastatique à travers une monocouche de cellules endothéliales, et inhibe leur extravasation au poumon dans un modèle murin de métastases aux poumons, suite à une diminution de la perméabilité de l'endothélium vasculaire. Ce processus dépend de l'interaction de SPARC avec la molécule d'adhérence vasculaire VCAM-1: en effet, l'utilisation d'anticorps bloquant VCAM-1 bloque la perméabilisation de monocouche de cellules endothéliales ainsi que celle de l'endothélium vasculaire pulmonaire toutes deux induites par SPARC, et bloque ainsi la transmigration et l'extravasation des cellules de mélanome, *in vitro* et *in vivo* respectivement. La liaison de SPARC à VCAM-1 entraîne un remodelage du cytosquelette des cellules endothéliales vasculaires, dépendant de la voie des kinases SRC et de la voie p38 MAPK (Mitogen-activated protein kinase), qui se contractent et forment ainsi des ouvertures dans l'endothélium vasculaire.

3. SPARC : un facteur antistress du mélanome.

Comme évoqué précédemment, l'identification de SPARC s'est faite dans un contexte de culture « stressant » pour des cellules endothéliales vasculaires : ces dernières ayant été dissociées à partir d'une aorte de bovin ont été mises en culture et ont alors sécrété SPARC dans leur milieu de culture (Sage H. et al. 1984). L'expression de SPARC *in vitro* par des cellules non tumorales peut également être le résultat de stress faisant suite à une privation de sérum dans le milieu de culture cellulaire, à un choc thermique, ou encore à une faible densité cellulaire (Sage H. et al. 1984, Shiba et al. 1998). Dans un contexte de cellules non-tumorales SPARC peut donc limiter la prolifération et la migration, deux propriétés exacerbées par les cellules qui dégénèrent vers un comportement de cellule tumorale.

Cependant, la protéine SPARC s'est vu attribuer un rôle pro-prolifératif et pro-invasif dans un tout autre contexte, celui des cancers associés à une surexpression de la protéine SPARC (décrits précédemment), soulignant ainsi l'existence de l'action double de SPARC selon le contexte tissulaire. De plus, dans ce contexte, l'expression de SPARC fait encore suite à un stress environnemental, mais cette fois-ci SPARC agit en tant que facteur anti-stress en faveur de la croissance de la tumeur.

a. SPARC et le système immunitaire anti-mélanome.

Le rôle de la protéine SPARC dans l'immunosuppression a été suggérée suite à différentes études menées sur les souris SPARC^{-/-} (décrites en partie précédemment). En effet, dans ces souris, il a été observé que les cellules de Langherans (présentatrices d'antigène) envahissent plus rapidement les nœuds lymphatiques drainants des zones cutanées sensibilisées par un antigène, où l'activation des lymphocytes T (« tueurs ») se retrouve exacerbée (Sangaletti et al. 2005). De ce fait, les souris SPARC^{-/-} ne développent pas spontanément de cancers. De plus, dans un modèle d'irradiation chronique aux UVs, les souris SPARC^{-/-} présentent moins de carcinomes cutanés épidermoïdes comparées aux souris contrôle (Aycock et al. 2004), et des tumeurs mammaires implantées dans des souris SPARC^{-/-} régressent spontanément suite à l'infiltration massive de cellules inflammatoires (macrophage, granulocytes polynucléaires) (Sangaletti et al. 2003). De même, dans des souris Nude, les xénogreffes de cellules de mélanome invalidées pour SPARC par

interférence à l'ARN, sont rejetées suite à l'infiltration de granulocytes polynucléaires (Alvarez et al. 2005, Ledda M. F. et al. 1997b, Prada et al. 2007).

Ainsi, dans le cas du mélanome comme dans d'autres cancers, SPARC permet l'évasion tumorale face au système immunitaire en déjouant celui-ci.

b. Rôle autocrine de SPARC : régulation -dépendante du suppresseur de tumeur p53, et survie des cellules de mélanome.

De nombreuses études menées en contexte physiologique (cellules épithéliales, cf. partie B de ce chapitre) ou pathologique (gliome cf. partie D.2 de ce chapitre, fibrose pulmonaire) et utilisant un approche par perte de fonction, ont démontré un rôle anti-stress de SPARC. Depuis l'extérieur des cellules, SPARC est capable de réguler des voies canoniques de signalisation intracellulaire (PI3K-AKT, Wnt/ β -caténine) en interagissant avec les intégrines qui activent en aval des médiateurs tels qu'ILK et FAK (Bergamaschi et al. 2008, Chang et al. 2010, Shi et al. 2007, Shi et al. 2004, Weaver et al. 2008).

Comme mentionné précédemment, dans les cellules de mélanome, SPARC semble réguler les niveaux d'expression du suppresseur de tumeur p53 pour favoriser la prolifération cellulaire. Le laboratoire s'est alors intéressé plus précisément à l'impact de cette régulation de p53 par SPARC dans la survie des cellules de mélanome face au stress.

Fenouille et al, ont alors démontré qu'après 5-6 jours d'extinction de SPARC par deux approches complémentaires d'interférence à l'ARN (transitoire par siRNA, ou stable et conditionnelle par un système inductible à la doxycycline), les cellules de mélanome meurent par apoptose dépendante de l'activation de caspase initiateur (caspase 9) puis effectrice (caspase 3) *in vitro*. La caspase 3 effectrice est également retrouvée activée dans les tumeurs délétées pour SPARC *in vivo*. Rapidement stabilisée en l'absence de SPARC, la protéine p53 est capable d'induire l'expression du facteur pro-apoptotique BAX qui transloque vers la membrane mitochondriale pour la perméabiliser et libérer le cytochrome C indispensable à l'activation des caspases. L'invalidation de p53 *in vitro* par siARN prévient cette apoptose cellulaire induite par l'extinction de SPARC (Fenouille et al. 2011b).

Cette étude a également montré que la stabilisation protéique de p53 en l'absence de SPARC est associée à la diminution du niveau de phosphorylation de l'ubiquitine ligase MDM2, elle-même faisant suite à la diminution de la phosphorylation activatrice d'AKT. L'expression d'une forme constitutivement active d'AKT permet de protéger les cellules de mélanome de l'apoptose induite suite à la déplétion de SPARC. Dans un autre sens, l'expression ectopique de SPARC stimule la phosphorylation d'AKT et de sa cible MDM2 dans les cellules de mélanome, et favorise ainsi la dégradation de p53 et la survie cellulaire. A noter que si, dans les cellules de mélanome, l'extinction de SPARC diminue l'activation de p53, en revanche elle n'affecte pas celle des kinases ERKs, n'a donc pas d'impact sur la voie de survie RAF-MEK-ERK. Enfin, cette étude a montré que la surexpression de SPARC dans les cellules de mélanome les rend insensibles aux points de contrôle médiés par p53 : les cellules de mélanomes qui sur-expriment SPARC sont, par exemple, résistantes aux effets cytotoxiques de l'actinomycine D (un antibiotique ayant des propriétés anticancéreuses : anti-mitotique, agent intercalant de l'ADN) dépendants de p53 (Fenouille et al. 2011b).

Ainsi, dans le mélanome, en inactivant le système p53 dans les cellules cancéreuses, SPARC agit comme facteur anti-stress et garantit la survie de ces cellules ainsi que leur prolifération, en particulier lorsqu'elles évoluent en condition de stress. Récemment, une étude a confirmé la capacité de SPARC à réguler négativement p53 dans les cellules de leucémie myéloïde aiguë : l'extinction de SPARC entraîne l'arrêt du cycle cellulaire et l'apoptose de ces cellules via l'augmentation p53 (Nian et al. 2014).

4. SPARC et sensibilité thérapeutique.

a. SPARC et chimiothérapie.

Cancer du colon, du sein ou du pancréas. Des études ont montré que les cellules humaines de cancer du colon résistantes à la chimiothérapie, régulent négativement l'expression de la protéine SPARC via l'hyperméthylation de son promoteur (Cheetham et al. 2008, Tai et al. 2005). De plus, il a été démontré que la réexpression de SPARC par l'utilisation de l'agent déméthylant 5Aza-dC, ou l'administration de SPARC exogène, restaure la sensibilité à la chimiothérapie dans des lignées cellulaires cancéreuses coliques *in vitro*, et dans des modèles de xénogreffes tumorales *in vivo*, entraînant une régression tumorale (Cheetham et al. 2008, Taghizadeh et al. 2007, Tai et al. 2005). SPARC a un effet sensibilisateur aux chimiothérapies dans le cancer du colon, mais également dans les cancers du sein ou du pancréas chimio-résistants. Dans ces trois types de cancer, il a été montré *in vitro* et *in vivo* que cet effet résulte de la capacité de SPARC à interagir, via son domaine N-terminal, avec un complexe protéique : SPARC perturbe l'interaction du facteur anti-apoptotique Bcl-2 avec la caspase 8 pro-apoptotique, et libère ainsi cette dernière qui initie la cascade apoptotique. Ainsi, dans ces cancers, SPARC va promouvoir la voie de l'apoptose dans les cellules cancéreuses résistantes et les re-sensibiliser aux chimiothérapies. De plus, un peptide synthétique de 51 acides aminés mimétique d'une partie du domaine N-terminal de SPARC a montré une efficacité similaire à celle de la protéine SPARC dans cette re-sensibilisation (Rahman et al. 2011).

Cancer du sein et du pancréas. La résultante de l'expression stromale et tumorale de SPARC dans de nombreux cancers du sein ou du pancréas est une surexpression de la protéine et un effet pro-tumoral (cf. partie D.2.). Cependant, des hauts niveaux de SPARC dans ces deux types de cancer ont été associés à une meilleure réponse primaire aux chimiothérapies (Azim et al. 2013, Lindner et al. 2015, Neesse et al. 2014b). De plus, dans le cancer du pancréas, la plus forte sensibilité des tumeurs exprimant de hauts niveaux de SPARC au Nab-Paclitaxel, une drogue chimiothérapeutique couplée à de l'albumine, résiderait dans le fait que SPARC soit une protéine qui se lie à l'albumine (en plus de sa capacité à promouvoir l'apoptose via son domaine N-terminal): de hauts niveaux d'expression de SPARC dans la tumeur permettraient donc d'y accumuler la drogue par liaison à l'albumine (Neesse et al. 2014a, Neesse et al. 2014b). Ainsi, dans le contexte bien précis de surexpression de SPARC dans le cancer du sein et du pancréas, l'expression de SPARC pourrait être utilisée en tant que marqueur prédictif d'une réponse anti-tumorale, et devrait guider le choix thérapeutique vers l'utilisation d'une drogue chimiothérapeutique couplée à l'albumine.

Mélanome. A l'inverse de ce qui a pu être décrit ci-dessus dans le cancer du sein ou du pancréas, des études menées au laboratoire sur des lignées cellulaires de mélanomes humains montrent l'implication de SPARC dans la désensibilisation cellulaire face à différentes chimiothérapies. En

effet, l'expression ectopique de SPARC dans des cellules de mélanome les désensibilise à l'effet cytotoxique de l'Actinomycine D dépendant de la stabilisation de p53 (Fenouille et al. 2011b), et diminue fortement leur sensibilité face à l'effet antiprolifératif de la Dacarbazine (Pottier et al. 2015, article n°1). De plus, Nardin et al ont montré que chez des patients atteints de mélanome, le traitement par Dacarbazine est capable de moduler positivement l'expression de la protéine SPARC au niveau des tumeurs initialement répondeuses (Nardin et al. 2011) ; le traitement par Dacarbazine ayant un effet antitumoral relativement court (dans le cas d'une réponse initiale du patient à cette chimiothérapie, la survie moyenne sans progression de la maladie est inférieure à 3 mois), ceci suggère que la surexpression progressive de SPARC au cours du traitement puisse ensuite participer à l'acquisition progressive d'une résistance à cette chimiothérapie.

b. SPARC et thérapie ciblée.

Leucémie Myéloïde Chronique (LMC). La LMC est un syndrome myéloprolifératif malin qui se caractérise par une production excessive et persistante de globules blancs (ou leucocytes) au sein de la moelle osseuse. Cette maladie est liée à l'acquisition de l'oncogène BCR-ABL, codant pour une tyrosine kinase constitutivement active, elle même responsable de la production accrue des globules blancs. La prise en charge thérapeutique de la leucémie myéloïde chronique a été révolutionnée par l'administration de thérapies ciblant la tyrosine kinase en question: l'Imatinib (Glivec®), un inhibiteur sélectif de BCR-ABL, est la thérapie anti-LMC de référence. Bien que l'Imatinib soit très efficace (les personnes atteintes de LMC mènent une vie quasiment normale sous Imatinib ou autres thérapies ciblant BCR-ABL), certains patients peuvent développer des résistances à ce composé (pour revue, (An et al. 2010)).

A partir de clones résistants à l'Imatinib (IM-R) dérivés d'une lignée leucémique K562 (IM-S), le groupe du Dr. Patrick Auberger a identifié une liste de 30 gènes surexprimés dans les cellules IM-R comparativement aux cellules IM-S (Grosso et al. 2009). Parmi ces gènes, le gène codant pour la protéine SPARC, dont la surexpression protéique dans les cellules IM-R a été validée par notre laboratoire en collaboration avec le groupe du Docteur Auberger. De plus, des niveaux élevés d'ARN messagers de SPARC ont été détectés dans le sang de patients après un an de traitement par Imatinib. Dans ce contexte, l'extinction de SPARC par interférence à l'ARN est suffisante pour re-sensibiliser les cellules IM-R à l'Imatinib, alors que son expression ectopique dans les IM-S les protège partiellement de l'apoptose induite sous Imatinib. Cet effet protecteur de SPARC sur les cellules leucémiques K562 faces à l'Imatinib, est propre à la protéine intracellulaire et non sécrétée. En effet, SPARC n'est pas sécrétée dans le surnageant de culture des K562, mais est retenue dans la fraction microsomale. De plus, la transfection d'un mutant de SPARC délétée de son peptide signal protège les cellules K562 (IM-S) des effets cytotoxiques de l'Imatinib, avec la même efficacité que la forme sauvage (Fenouille et al. 2010).

Enfin, une approche fonctionnelle a permis de montrer que l'expression de SPARC dans les cellules IM-R résulte d'une déméthylation partielle de son promoteur, maintenu sous silence par hyperméthylation dans les cellules IM-S. A nouveau exprimée dans ces cellules IM-R, SPARC est ensuite stimulée au niveau post-traductionnel par le module Fyn/ERK, qui est hyperactivé dans les cellules IM-R.

Ainsi, la protéine SPARC possède un rôle intracrine dans la LMC, capable de désensibiliser les cellules de LMC à l'Imatinib.

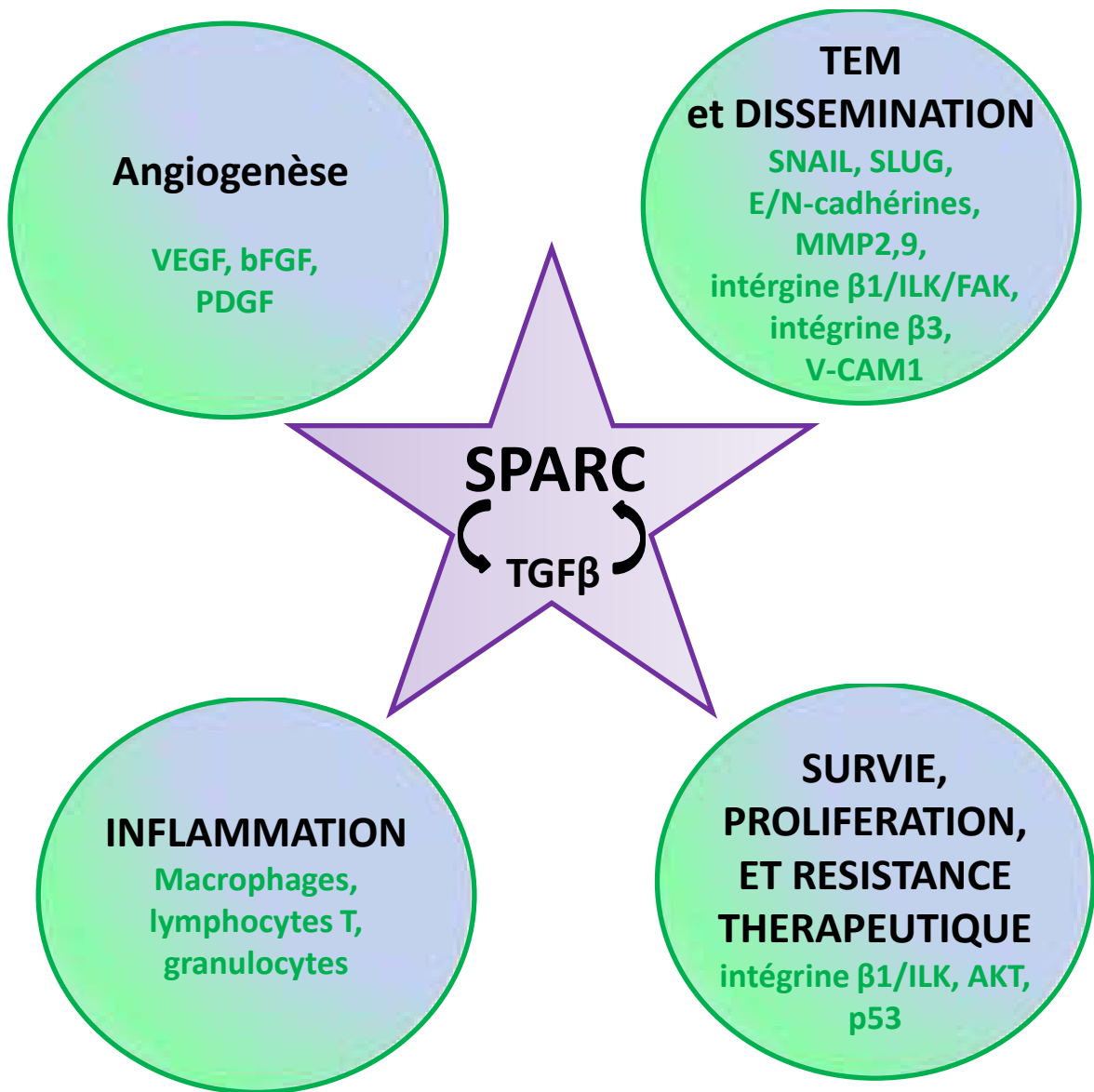


Figure 28. La protéine matricellulaire SPARC, au carrefour de processus clés dans la progression tumorale.

Tiré et adapté de Podhajcer et al, 2008.

En résumé, présente dans les cellules ou à l'interface entre les cellules de la tumeur et leur stroma, la protéine matricellulaire SPARC peut orchestrer de nombreux processus clés dans la progression tumorale en particulier dans le cas du mélanome (Figure 28).

RESULTATS

CONTEXTE ET OBJECTIFS DE RECHERCHE.

Le mélanome cutané métastatique dérive de la transformation maligne des mélanocytes et représente le cancer de la peau le plus redouté : une fois le stade métastatique atteint, le pronostic vital des patients est sombre d'autant plus que le mélanome est particulièrement chimo- et radio-résistant. Cependant, suite à la découverte de la prévalence de la mutation BRAF^{V600} dans plus de 50% des patients atteints de mélanome, la mise au point de thérapies ciblant la protéine BRAF^{V600}, ou d'autres acteurs de la voie RAF-MEK-ERK, a considérablement amélioré la prise en charge des patients. Ces nouvelles thérapies ont démontré un bénéfice important en terme de survie globale et sans progression des patients, et sont même dans certains cas à l'origine d'une guérison complète. Malheureusement, le succès de ces thérapies est très fréquemment interrompu par l'apparition de résistances thérapeutiques.

Si de nombreuses altérations génomiques de la cellule tumorale ont rapidement été détectées et tenues responsables de ces résistances, le microenvironnement de la tumeur a également été mis en cause.

Dans ce contexte nous nous sommes intéressés à la protéine micro-environnementale SPARC surexprimée et sécrétée dans les mélanomes, en particulier les mélanomes métastatiques, et qui est capable d'arbitrer les interactions entre les cellules cancéreuses et leur stroma durant le développement et la progression du mélanome.

En effet, les travaux de notre laboratoire, ainsi que ceux exposés dans la littérature, montrent que lorsque la protéine SPARC est sécrétée par les cellules de mélanome, elle peut agir de manière paracrine au sein du microenvironnement sur les cellules voisines, ou bien de manière autocrine sur les cellules de mélanome elles-mêmes.

- SPARC a un effet immunosuppresseur et pro-angiogénique. Au laboratoire de récents travaux ont permis de montrer un nouveau rôle paracrine de SPARC dans la promotion du processus métastatique via la perméabilisation des vaisseaux sanguins (Tichet et al. 2015).
- En activant les facteurs de transcription SNAIL et SLUG, SPARC initie des étapes précoces de la progression tumorale, telle que la TEM, en réprimant l'expression des E-cadhérines et favorise le processus métastatique (Fenouille et al. 2012, Robert G. et al. 2006, Smit et al. 2007). D'autre part, le laboratoire a également montré que SPARC contrôle la prolifération et la survie des cellules de mélanome *in vitro* et *in vivo* en favorisant l'activation de la voie AKT et la déstabilisation du suppresseur de tumeur p53 (Fenouille et al. 2011a, Fenouille et al. 2011b).

Cependant, si SPARC est un régulateur négatif de systèmes de surveillance anti-tumoral, face aux thérapies anti-mélanome sa contribution reste inconnue. Au cours de nos travaux nous avons donc investigué le potentiel de SPARC dans la résistance thérapeutique des mélanomes aux chimiothérapies et principalement aux thérapies ciblant la voie BRAF-MEK-ERK, ainsi que le rôle des fibroblastes de la niche lymphatique métastatique.

ARTICLE I

Increase of SPARC through autocrine tumor cell production contributes to therapeutic resistance in melanoma

Anaïs Pottier^{1,2}, Ilona Berestjuk^{1,2}, Fériel Boukari^{1,2,3}, Christophe Girard^{1,2}, Virginie Prod'homme^{1,2}, Nina Fenouille^{1,2}, Henri Montaudie^{2,3}, Olivier Andréani^{2,4}, Jean-Philippe Lacour^{2,3}, Marcel Deckert^{1,2}, and Sophie Tartare-Deckert^{1,2,5}

¹INSERM, U1065, Centre Méditerranéen de Médecine Moléculaire (C3M), Microenvironnement, Signalisation et Cancer, Nice, France.

²Université de Nice Sophia Antipolis, Faculté de Médecine, Nice, France.

³Centre Hospitalier Universitaire (CHU) de Nice, Service de Dermatologie, Nice, France.

⁴CHU de Nice, Hôpital Archet 2, Service d'Imagerie Médicale, Nice, France

⁵Corresponding author. Mailing address: INSERM Unité 1065, 151 Route de Saint-Antoine de Ginestière, BP 2 3194, 06204 Nice Cedex 3, France. Phone: +33 489 064310. Fax: +33 489 064221. E-mail: tartare@unice.fr

L'objectif de ce travail a été d'évaluer la contribution de la protéine SPARC, facteur de prolifération et de survie dans le mélanome, dans la résistance thérapeutique innée et acquise des mélanomes.

Dans un premier temps, nous avons évalué l'impact de la modulation du niveau d'expression protéique de SPARC par des approches « gain » de fonction (surexpression de SPARC), ou « perte » de fonction (siARN et shARN), sur la prolifération et la survie de lignées cellulaires de mélanomes mutées BRAF^{V600} traitées par chimiothérapie, inhibiteurs de BRAF^{V600}, ou par inhibiteurs de MEK.

D'une part, nous avons montré que l'expression ectopique de SPARC diminue la sensibilité des cellules de mélanome mel501 à la Dacarbazine, aux inhibiteurs de BRAF^{V600} et aux inhibiteurs de MEK, les protégeant des effets antiprolifératifs de ces thérapies. En présence d'inhibiteurs de BRAF^{V600} elle promeut l'expression de régulateurs d'entrée en phase S du cycle cellulaire favorisant la progression de ce dernier, l'expression de marqueurs de survie, et conduit à la prolifération des cellules de mélanome. Contrairement aux cellules mel501-CTRL, sous Vémurafénib ou Dabrafenib, les mel501-SPARC maintiennent l'expression de la kinase cdk6 et de la Survivine et limitent celle de l'inhibiteur p27.

D'autre part, la forte expression et sécrétion endogène de SPARC procure aux cellules de mélanomes une résistance innée aux thérapies anti-mélanomes (chimiothérapies et thérapies ciblées). Les cellules 1205lu qui ont de hauts niveaux d'expression et de sécrétion endogènes de SPARC échappent aux effets anti-prolifératifs de la Dacarbazine, des inhibiteurs de BRAF^{V600} ou de MEK, au contraire des cellules mel501 ayant un niveau faible d'expression et de sécrétion endogène de SPARC, qui y sont sensibles. De plus, la résistance innée au Vémurafénib des cellules 1205lu est transmissible aux cellules sensibles mel501 via leur sécrétome, et dépendante de l'expression de SPARC par ces cellules.

A l'inverse, l'extinction de SPARC par interférence à l'ARN sensibilise les cellules de mélanome à l'effet du Vémurafénib en induisant leur mort par apoptose. Nous avons mis en évidence que, sous Vémurafénib, l'expression du facteur pro-apoptotique BAX, de celle de la

forme active de la caspase 3 et de son substrat clivé, PARP, sont augmentées, et que celle de la Survivine est diminuée dans les cellules de mélanome délétées de SPARC. Nous avons également montré que le suppresseur de tumeur p53 est un médiateur de l'amplification des effets antiprolifératifs et cytotoxiques du Vémurafénib dans les cellules éteintes pour SPARC : son extinction par siARN empêche l'augmentation de l'activation de la caspase 3 et prévient la mort de ces cellules par apoptose, et les cellules de mélanomes mutées pour p53 sont insensibles aux effets de l'extinction de SPARC combinée à l'inhibition de BRAF.

Dans un second temps, nous avons étudié la contribution du module signalétique SPARC/AKT, impliqué dans la prolifération et la survie des mélanomes, dans l'acquisition d'une résistance aux inhibiteurs de BRAF^{V600}. Nous avons mis en évidence la surexpression protéique de SPARC dans 3 lignées de mélanomes devenues expérimentalement résistantes aux inhibiteurs de BRAF^{V600} par traitement chronique sur 4 étudiées et montré que l'hyperactivation de kinase AKT dans ces cellules est en partie dépendante de l'expression de SPARC. De plus, nous avons montré que l'extinction de SPARC dans ces cellules résistantes peut suffire à les resensibiliser à l'effet cytotoxique du Vémurafénib, ou peut induire leur mort par apoptose lorsqu'elle est combinée à un inhibiteur de MEK. En effet, l'extinction de SPARC combinée à l'inhibition de BRAF^{V600} ou de MEK entraîne l'augmentation du facteur pro-apoptotique BAX et induit la mort par apoptose des cellules ayant acquis une résistance aux inhibiteurs de BRAF^{V600}. En absence de SPARC, les cellules m229R redeviennent sensibles au Vémurafénib suite à l'inactivation de la kinase AKT; l'expression d'un mutant constitutivement actif d'AKT permet de protéger les cellules de l'apoptose induite par la déplétion de SPARC couplée à l'inhibition de BRAF^{V600}.

Enfin, dans une étude clinique, chez des patients atteints de mélanomes métastatiques mutés BRAF^{V600} sous thérapies ciblant la voie RAF-MEK-ERK, nous avons évalué l'évolution de la quantité du SPARC sérique au cours du traitement en parallèle des critères RECIST 1.1 (pour, Response Evaluation Criteria in Solid Tumors) et de la réponse thérapeutique globale de ces patients. Cette étude nous a permis de montrer sur quatre patients qu'il existe une corrélation entre le niveau de la protéine SPARC sérique et la réponse globale au traitement mis en place : chez deux patients le niveau sérique de SPARC se stabilise de manière concomitante à la stabilisation de la maladie du patient ou à sa rémission complète sous thérapie; chez deux autres patients l'augmentation du niveau de SPARC sérique au cours du traitement est associée à une progression de la maladie ou à une récurrence. De plus, nous avons pu remarquer que le niveau de SPARC sérique n'est pas nécessairement corrélé au RECIST 1.1. En revanche, l'augmentation du SPARC sérique peut être associée directement à l'apparition de nouvelles métastases cérébrales, signe de progression ou de récurrence du mélanome, et constitue un marqueur de réponse thérapeutique indépendant du critère RECIST 1.1. Ainsi, notre étude suggère le dosage non invasif et économique du SPARC sérique comme indicateur potentiel pertinent de la réponse thérapeutique ou de l'éventuelle rechute individuelle des patients atteints de mélanomes métastatiques mutés BRAF^{V600} sous thérapies ciblant la voie RAF-MEK-ERK.

Nos résultats montrent ainsi:

- que la protéine SPARC confère un avantage sélectif aux cellules de mélanome face aux thérapies, et en particulier face au Vémurafénib, en régulant négativement le suppresseur de tumeur p53. Elle participe à la résistance innée des mélanomes à ces thérapies.

- que la surexpression de la protéine SPARC est un nouveau déterminant potentiel de la résistance acquise des mélanomes aux inhibiteurs de BRAF^{V600}, et que le ciblage de cette protéine pourrait être une stratégie efficace d'optimisation de l'effet de ces inhibiteurs dans le mélanome.
- que le suivi individuel du SPARC sérique, en parallèle de l'évaluation de l'état général des patients atteints de mélanomes mutés BRAF^{V600} sous thérapies ciblant la voie RAF-MEK-ERK, constitue un nouvel indicateur potentiel de la réponse thérapeutique des mélanomes mutés BRAF^{V600}.

Abstract

Tumor resistance to anticancer drugs is one of the major obstacles to successful therapy of advanced melanoma. Drug resistance might be caused by both tumor cell intrinsic properties and factors within the tumor microenvironment. Secreted protein Acidic and Rich in Cysteine (SPARC)/osteonectin is a matricellular protein with unique properties in the melanoma microenvironment. Elevated tumor-secreted SPARC has been linked to enhanced metastasis and poor clinical outcome and we previously showed that autocrine SPARC confers survival advantage through AKT activation and suppression of p53-dependent apoptosis in melanoma cells. Here we address whether aberrant SPARC signaling contributes to therapeutic resistance of melanomas. Endogenous or ectopic high levels of SPARC protected BRAFV600E mutated melanoma cells from the anti-proliferative effect of BRAF inhibitors (BRAFi) Vemurafenib and Dabrafenib. Also, overexpression of SPARC in melanoma cells attenuated their sensitivity to the MEK inhibitor Trametinib and to Dacarbazine-induced cytotoxicity. Upon BRAFi exposure, SPARC overexpressing cells retained the ability to progress into the cell cycle through modulation of CDK6 and p27 expression and increased levels of survivin compared to control cells. Conversely, targeting SPARC by RNAi cooperated with inhibiting BRAFV600E to kill melanoma cells in a p53 dependent manner. Strikingly, marked elevation of SPARC was observed in different models of acquired BRAFi resistance along with increasing phosphorylated AKT, which was partially reversed upon SPARC depletion by siRNA. SPARC knockdown overcame acquired BRAFi resistance through reduction of AKT activity and sensitized drug-resistant melanoma cells to apoptosis initiated by MEK inhibition. In a clinical setting we measured serum SPARC in 4 patients with BRAF-mutant melanomas receiving anti-BRAF or combined anti-BRAF and anti-MEK therapy before and during the course of treatment and showed that circulating SPARC levels correlate with clinical response. Our results support a role for elevated SPARC expression in therapeutic resistance of melanomas and emphasize the interest of targeting SPARC signaling pathway to improve the efficacy of targeted therapies. This study highlights a novel mechanism by which a tumor-secreted factor modulates therapeutic responses of BRAF-mutant melanoma cells, with possible implications as a drug response biomarker.

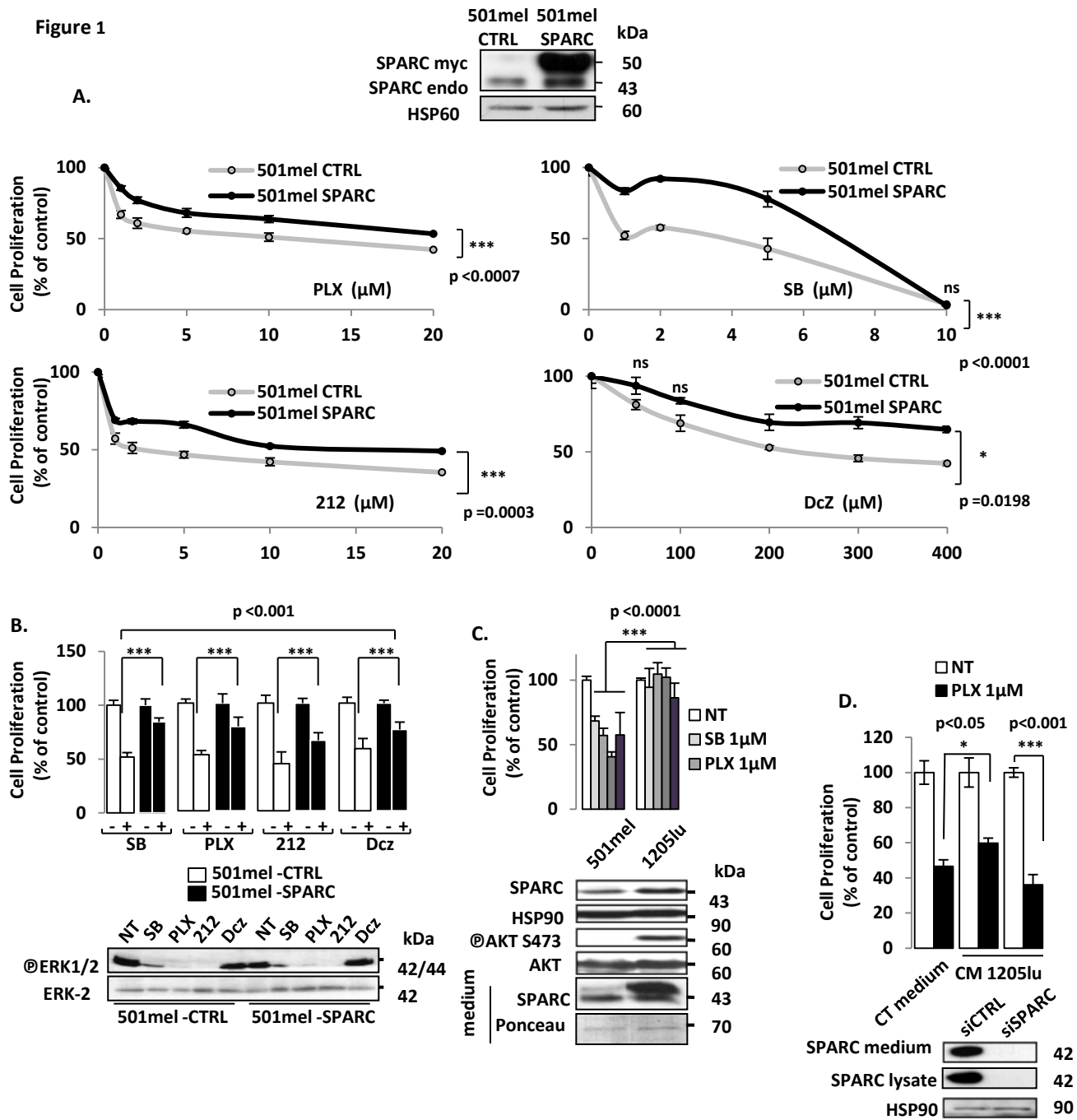


Figure 1. Ectopic or endogenous expression of SPARC protects melanoma cells from anti-proliferative effects of anti-melanoma therapies.

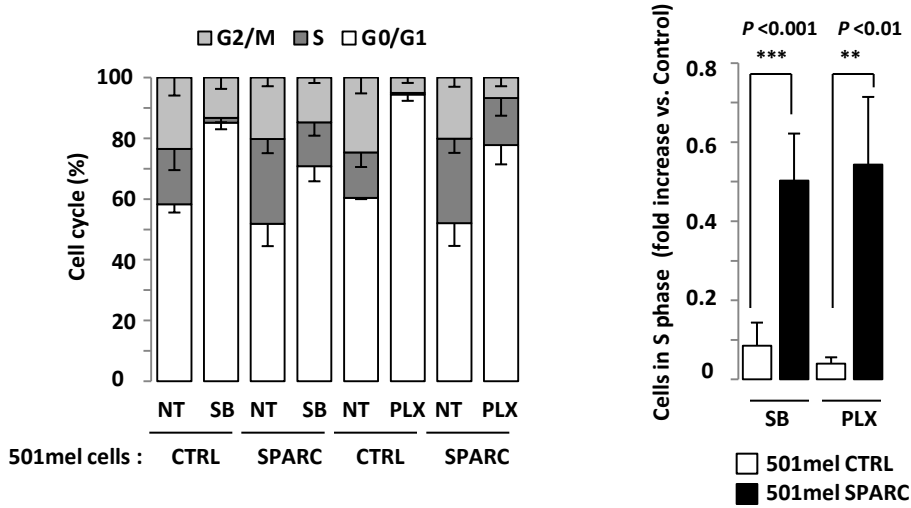
(A) 501mel cells overexpressing myc-tagged human SPARC (501mel SPARC) or carrying an empty expression cassette of pcDNA3 vector (501mel CTRL) were incubated with increasing doses of V^{600E} BRAF inhibitors Vemurafenib (PLX) or Dabrafenib (SB), MEK inhibitor Trametinib (212) or chemotherapeutic alkylating agent Dacarbazine (DcZ) for 72h. Cell proliferation was measured by a XTT colorimetric assay. Results are expressed in percent of control (100%) as the mean \pm s.e.m. of triplicate wells. Representative of three independent experiments performed in triplicate. P values were determined by two-way ANOVA followed by Bonferroni post tests. The inset shows the immunoblot analysis of endogenous and myc-tagged SPARC levels. HSP60 was used as loading control. (B) 501mel SPARC or 501mel CTRL were incubated with 1 μM of V^{600E} BRAF inhibitors (PLX or SB), 1 μM of MEK inhibitor (212) or with 200 μM of alkylating agent (DcZ) for 72h. Columns, mean of three independent experiments performed in triplicate; error bars, s.e.m. P values were determined by two-way ANOVA followed by Bonferroni post tests. Immunoblot analysis showing phospho-ERK1/2 expression level in protein lysates after the indicated treatments is shown. ERK-2 was used as loading control. (C) SPARC-high 1205lu cells and SPARC-low 501mel cells were untreated (NT) or treated with 1 μM of V^{600E} BRAF inhibitors (PLX or SB) or MEK inhibitor (212), or with 50 μM of alkylating agent (DcZ) for 72h. Results are expressed in percent of control (100%) as the mean \pm s.e.m. of triplicate wells. Representative of three independent experiments performed in triplicate. P values were determined by two-way ANOVA followed by Bonferroni post tests. Immunoblot analysis showing SPARC production in cell lysates and culture supernatants (medium) is shown. The AKT and phospho-AKT (S473) analyses were included. HSP60 and Ponceau staining were used as loading controls. (D) 501mel cells were incubated 48h with medium or conditioned medium (CM) from SPARC-high 1205lu cells depleted or not for SPARC by siRNA. Cells were then untreated (NT) or treated with 1 μM of Vemurafenib (PLX) for 72h. Cell proliferation was measured by a XTT colorimetric assay. Results are expressed in percent of control (100%). Columns, mean of three independent experiments performed in triplicate; error bars, s.e.m. P values were determined by two-way ANOVA followed by Bonferroni post tests.

L'expression ectopique ou endogène de SPARC protège les cellules de mélanome des effets anti-prolifératifs des thérapies anti-mélanome.

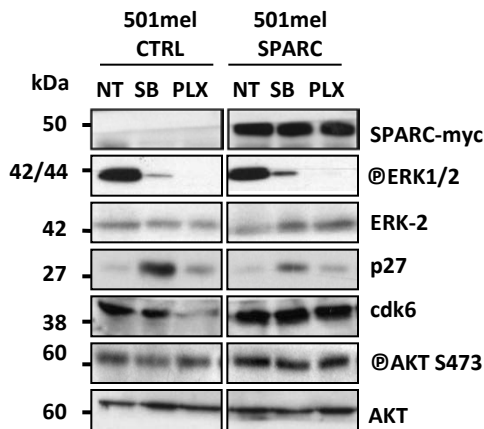
Pour investiguer le rôle de SPARC dans la résistance thérapeutique des mélanomes nous avons commencé par évaluer l'impact de l'expression ectopique ou endogène de SPARC sur la prolifération cellulaire sous thérapies anti-mélanome (chimiothérapie : Dacarbazine ; inhibiteurs de BRAF^{V600} : Vémurafénib ou Dabrafénib ; inhibiteur de MEK : Tramétinib). Nous avons exposé d'une part, des clones de cellules de mélanome mel501 surexprimant stablement la protéine SPARC (mel501-SPARC) en parallèle des clones contrôle (mel501-CTRL), et d'autre part, différentes lignées de cellules de mélanomes exprimant et sécrétant peu ou fortement SPARC (mel501 : « Low-SPARC » ; 1205lu : « High-SPARC ») à des thérapies anti-mélanomes. Après 72h d'exposition à des doses croissantes de molécules thérapeutiques, l'expression ectopique de SPARC conduit à une augmentation significative de la prolifération des cellules mel501 mesurée par test XTT comparativement aux mel501-CTRL, traduisant une diminution de la sensibilité thérapeutique des mel501-SPARC (Figure 1A et 1B). De même, après 72h de traitement par 1 μ M de Vémurafénib/Dabrafénib, de Tramétinib, ou par 200 μ M de Dacarbazine, la surexpression et sécrétion endogène des cellules 1205lu leur confère une protection vis-à-vis de l'effet anti-prolifératif de ces thérapies, alors que les cellules « Low-SPARC » subissent une diminution de prolifération de 30 à 60% à des doses identiques de traitement (Figure 1C). Afin d'évaluer l'éventuelle transmissibilité de la protection cellulaire face aux inhibiteurs de BRAF^{V600} des cellules « High-SPARC », nous avons réalisé une expérience de transfert de milieu conditionné de cellules « High-SPARC » sur cellules « Low-SPARC » traitées au Vémurafénib (1 μ M). Après 48h de culture en présence du milieu conditionné (CM) des cellules 1205lu « High-SPARC », les cellules mel501 « Low-SPARC » restent sensibles à la baisse de prolifération induite par le Vémurafénib, mais dans une moindre mesure que lorsqu'elles sont en présence de milieu de culture classique (Medium): sous 1 μ M de Vémurafénib, en présence de milieu conditionné de cellules « High-SPARC » la prolifération des mel501 diminue de 40% contre 53% en présence de milieu de culture (Figure 1D). De plus, lorsque les cellules 1205lu ont préalablement été transfectées avec des siARN dirigés contre la protéine SPARC, le milieu conditionné de ces cellules « High-SPARC » n'est plus capable de procurer une protection partielle aux mel501 « Low-SPARC » en présence de Vémurafénib (Figure 1D). Ces résultats montrent que la résistance innée des cellules « High-SPARC » au Vémurafénib est transmissible aux cellules « Low-SPARC » et que ce transfert de protection cellulaire est dépendant de l'expression cellulaire de SPARC. Ils suggèrent le rôle du SPARC sécrété dans le caractère transmissible de la résistance au Vémurafénib.

Figure 2

A.



B.



C.

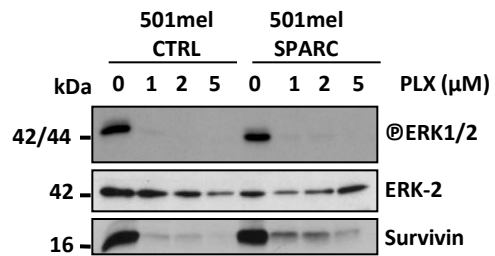


Figure 2. Ectopic expression of SPARC protects 501mel cells from G0/G1 cell cycle arrest induced by V^{600E} BRAF inhibitors.

(A) Cell cycle distribution of 501mel cells expressing myc-tagged human SPARC (cl.SPARC) or carrying an empty expression cassette of pcDNA3 vector (cl CTRL) after treatment with $1\mu\text{M}$ of V^{600E} BRAF inhibitors (PLX or SB) for 72h. Cell cycle profiles were analyzed for DNA content by flow cytometry of Propidium Iodide-stained cells. *Left*, histograms represent the percentage of cells in different phases of the cell cycle. *Right*, histograms represent cells in the S phase population and are expressed in fold increase vs. control. *Columns*, mean of three independent experiments; *error bars*, s.e.m. *P* values were determined by two-way ANOVA followed by Bonferroni post tests. **(B)** Protein lysates from the resulting cells were analyzed for the expression of cell cycle modulators, phospho-ERK1/2 and phospho-AKT by immunoblot using the indicated antibodies. **(C)** 501mel cells were incubated with increasing doses of the V^{600E} BRAF inhibitor Vemurafenib (PLX) for 72h. Total ERK-2 expression and levels of phospho-ERK1/2 as well as expression of the survival factor Survivin were analyzed by immunoblotting.

L'expression ectopique de SPARC protège les cellules mel501 de l'arrêt du cycle cellulaire induit par les inhibiteurs de BRAF^{V600}.

Pour caractériser l'effet protecteur de l'expression ectopique de SPARC dans les cellules de mélanome face aux inhibiteurs de BRAF^{V600} nous avons étudié le cycle cellulaire des mel501-SPARC et mel501-CTRL en présence de 1µM de Vémurafénib ou de Dabrafénib. Comme le montre la Figure 2A, après 72h de traitement la population de cellules mel501-CTRL arrêtées en phase G0/G1 du cycle cellulaire est augmentée significativement, confirmant l'effet cytostatique des inhibiteurs de BRAF^{V600} sur ces cellules. En revanche, les cellules mel501-SPARC sont moins sensibles à cet arrêt du cycle cellulaire, et progressent vers la phase S du cycle pour assurer leur prolifération: en présence de Dabrafénib ou de Vémurafénib l'accumulation des mel501-SPARC en phase G0/G1 est moindre que dans le cas des mel501-CTRL, au profit d'une augmentation de la proportion cellulaire en phase S du cycle (Figure 2A et 2B). Suite à l'analyse du profil d'expression protéique des cellules mel501-CTRL et mel501-SPARC nous avons pu observer que l'expression ectopique de SPARC prévient en partie l'augmentation de l'inhibiteur du cycle cellulaire p27 et la diminution de la kinase cdk6 promotrice de la transition G1/S, toutes deux induites par les inhibiteurs de BRAF^{V600} (Figure 2B). Ceci confirme que SPARC désensibilise les cellules de mélanome à l'effet cytostatique des inhibiteurs de BRAF^{V600}. De plus, alors que la protéine de survie Survivine diminue fortement dans les mel501-CTRL à des doses croissantes de Vémurafénib, son maintien dans les mel501-SPARC suggère également un rôle de SPARC dans la résistance à l'effet cytotoxique du Vémurafénib (Figure 2C).

Figure 3

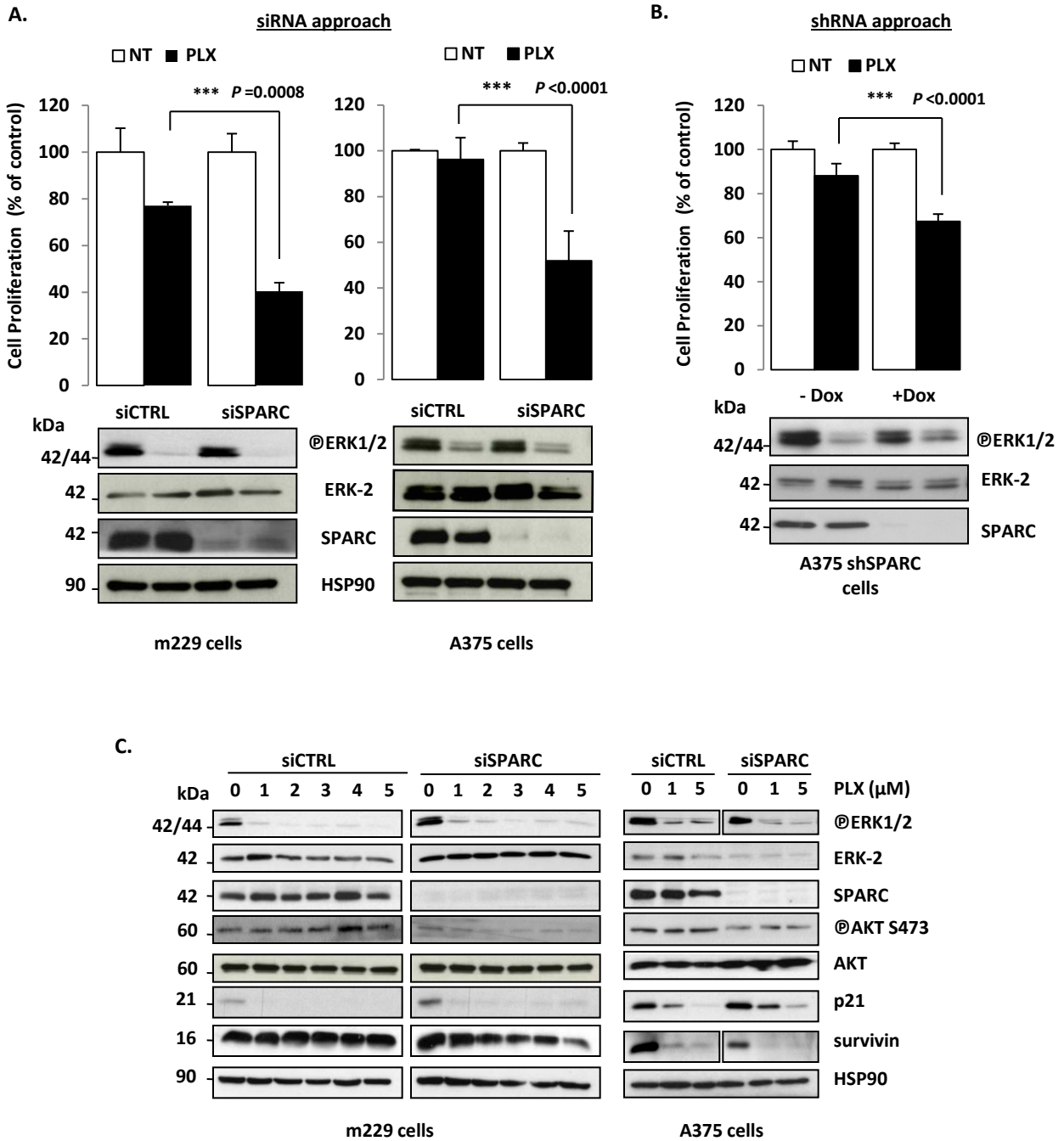


Figure 3. Depletion of SPARC by RNA interference sensitizes melanoma cells to the anti-proliferative effect of Vemurafenib . (A) A375 and m229 cells were transfected with 50nM of control siRNA (siCTRL) or SPARC siRNA (siSPARC) for 3 days, then treated or not (NT) with 5μM of Vemurafenib (PLX) during 24h. Cell proliferation was measured by a XTT colorimetric assay. Results are expressed in percent of control (100%) as the mean ± s.e.m. of duplicate wells. Representative of two independent experiments. *P* values were determined by two-way ANOVA followed by Bonferroni post tests. The Immunoblots show SPARC depletion in melanoma cells as well as total ERK-2 expression and phospho-ERK1/2 levels. (B) A375 TRex cells stably expressing a doxycycline-inducible SPARC shRNA (shSPARC) were treated with 2μM of Doxycycline (Dox) for 4 days and then treated or not (NT) with 5μM of Vemurafenib (PLX) during 24h. Cell proliferation was measured by a XTT colorimetric assay. Results are expressed in percent of control (100%) as the mean ± s.e.m. of triplicate wells. Representative of two independent experiments. *P* values were determined by two-way ANOVA followed by Bonferroni post tests. The Immunoblot shows SPARC depletion after 4 days of Doxycycline treatment as well as total ERK-2 expression and phospho-ERK1/2 levels. (C) m229 and A375 cells were transfected 3 days with 50nM siCTRL or siSPARC followed by treatment with various concentrations of Vemurafenib (PLX) for 24h. Protein lysates were immunoblotted with the indicated antibodies.

L'extinction de l'expression de SPARC par interférence à l'ARN sensibilise les cellules de mélanome aux effets anti-prolifératifs du Vémurafénib.

Pour continuer l'investigation du rôle de SPARC dans la résistance thérapeutique des mélanomes nous avons ensuite utilisé une seconde approche « perte de fonction » sur des cellules de mélanome exprimant fortement SPARC. Le traitement des cellules A375 et m229 avec des siARN ou shARN dirigés contre SPARC (siSPARC ; shSPARC) augmente l'effet anti-prolifératif du Vémurafénib mesuré par test XTT sur ces cellules (Figure 3A et 3B). L'analyse du profil d'expression protéique de ces cellules montre d'une part, l'efficacité d'extinction de SPARC par siARN ou shARN après 4 jours et d'autre part, que l'absence de SPARC couplée à des doses croissantes de Vémurafénib est à l'origine d'un effet additif sur la diminution de la Survivine (Figure 3C).

Figure 4

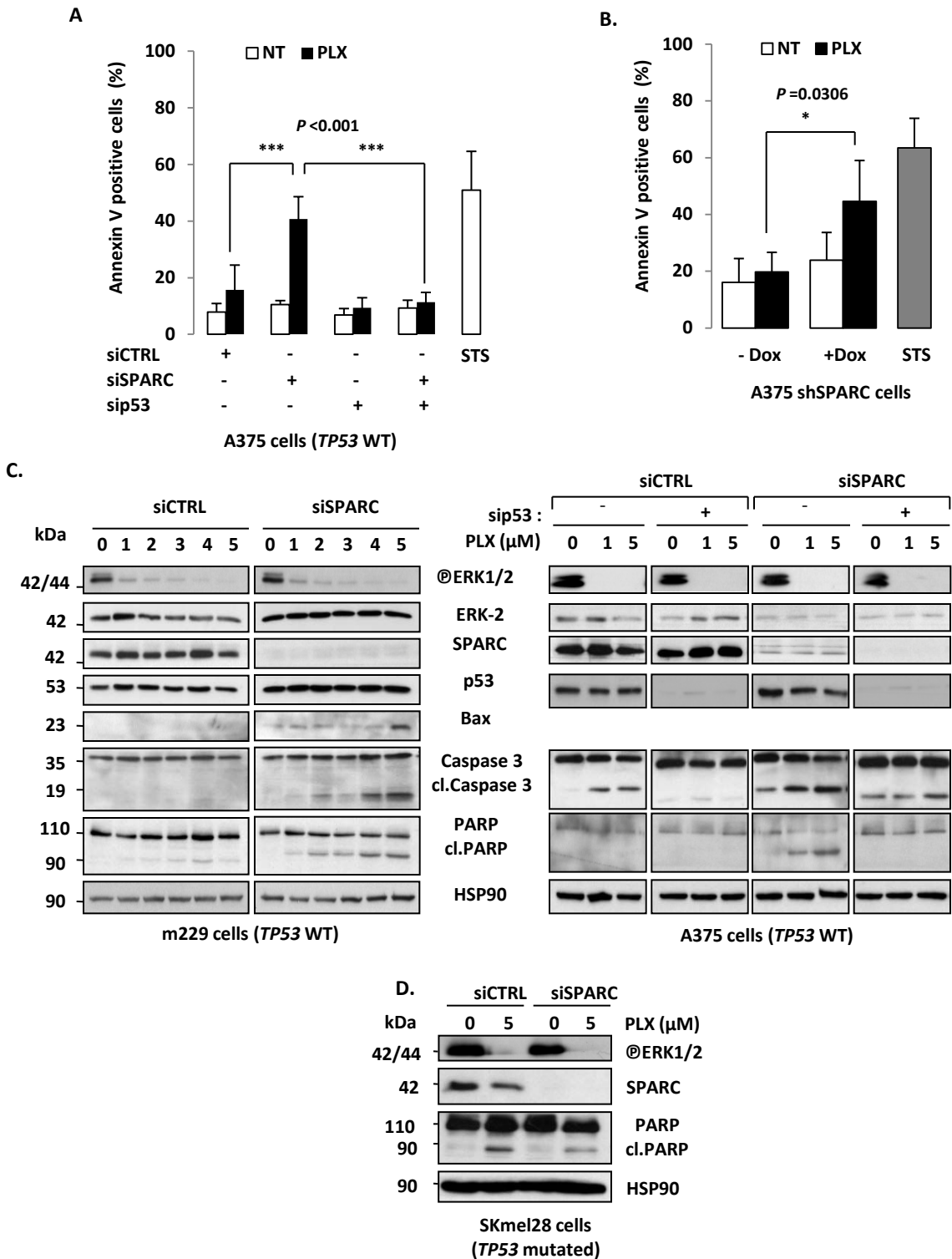


Figure 4. Combination of SPARC depletion and Vemurafenib sensitizes melanoma cells to p53-dependent apoptosis.

(A) A375 cells (*TP53* wt) were transfected 3 days with control siRNA (siCTRL), SPARC siRNA (siSPARC), p53 siRNA (sip53) alone or in combination at final concentration of 50nM followed by treatment with 5 μ M of Vemurafenib (PLX) for 24h. Cell apoptosis was analyzed by flow cytometric analysis of Annexin V and 7-AAD staining. Results are expressed as percentage of Annexin V-positive /7-AAD-negative cells (apoptotic population). Treatment with Staurosporine (STS) for 8h served as a positive control of apoptosis. Columns, mean of four independent experiments; error bars, s.e.m. *P* values were determined by two-way ANOVA followed by Bonferroni post tests. (B) After 4 days of 2 μ M Doxycycline (Dox) treatment, A375shSPARC cells were treated or not (NT) with 5 μ M of Vemurafenib (PLX) for 24h. Cell apoptosis was analyzed by flow cytometric analysis as described above. (C) m229 and A375 cells (*TP53* wt) were transfected 3 days with siCTRL or siSPARC alone or in combination with sip53 (left panel) at final concentration of 50nM followed by treatment with various concentrations of Vemurafenib (PLX) for 24h. Protein lysates were analyzed by immunoblot. Detection of Caspase 3 and PARP cleavage (cl.) was used as markers for apoptotic cell death. (D) *TP53* mutated SKmel28 cells were transfected with 50nM of siCTRL or siSPARC for 2 days, and then treated with 5 μ M of Vemurafenib (PLX) for 24h. Protein lysates were analyzed by immunoblot using the indicated antibodies. HSP90 was used as loading control.

La combinaison de l'extinction de l'expression de SPARC et du Vémurafénib sensibilise les cellules de mélanome à l'apoptose dépendante du suppresseur de tumeur p53.

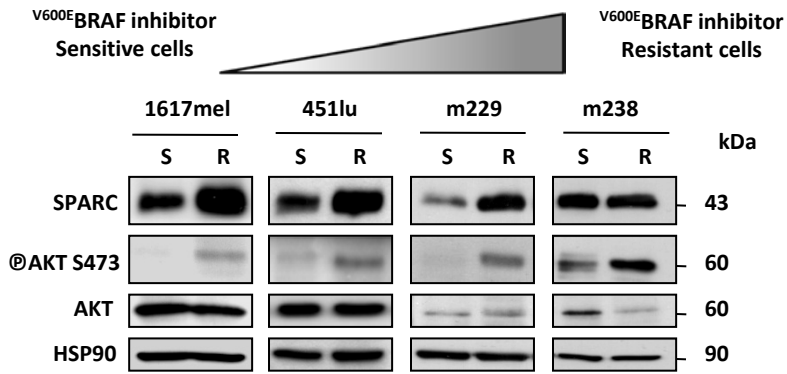
Afin d'évaluer cette fois-ci le rôle de SPARC dans la résistance des mélanomes à l'effet cytotoxique des inhibiteurs de BRAF^{V600}, nous avons éteint l'expression de SPARC par interférence à l'ARN (siARN ou shARN) dans les cellules A375 ou m229 avant de les traiter avec du Vémurafénib, puis après marquage des cellules à l'Annexine-V nous avons analysé la mort par apoptose en cytométrie de flux (Figure 4A et 4B). Le traitement à la staurosporine sert de contrôle positif pour l'apoptose. L'analyse de la fluorescence sortante des cellules A375 exprimant SPARC (A375-siCTRL) montrent que l'exposition des A375 à une dose de 5µM de Vémurafénib durant 24h n'est pas suffisante pour induire une augmentation significative de la population cellulaire en apoptose (Annexin-V positives) (Figure 4A et 4B). De même, comme nous l'avons montré dans une précédente étude (Fenouille et al., 2011), au bout de 4 jours d'extinction de SPARC par siARN ou shARN il n'y a pas d'apparition de population apoptotique (Figure 4A et 4B). En revanche, les Figures 4A et 4B montrent clairement que l'extinction de SPARC au bout de 4 jours permet l'apparition d'une population importante de cellules apoptotiques (environ 40% de la population cellulaire totale) à une même dose de 5µM de Vémurafénib durant 24h : l'extinction de SPARC sensibilise les A375 au Vémurafénib conduisant à un effet cytotoxique plutôt que cytotatique. L'analyse du profil d'expression protéique des cellules m229 et A375 traitées 24h à des doses croissantes de Vémurafénib 3 jours post-transfection avec les siSPARC montre une augmentation dose dépendante du facteur pro-apoptotique BAX, de la caspase 3 clivée effectrice de l'apoptose et du clivage de son substrat PARP, et confirme l'effet sensibilisateur de l'extinction de SPARC à l'apoptose des cellules de mélanomes traitées par Vémurafénib (Figure 4C).

Comme nous l'avons montré dans une précédente étude (Fenouille et al., 2011), le suppresseur de tumeur p53, dont une des principales fonctions est d'induire les processus mitochondriaux de mort apoptotique, est surexprimé dans les cellules de mélanome suite à la délétion de SPARC par siARN durant 4 jours (Figure 4C). Si son niveau d'expression n'est pas augmenté de surcroît en présence de Vémurafénib, la variation des niveaux d'expression de certaines de ses cibles telles que BAX (Figure 4C) et la Survivine (Figure 3C) induite par les siSPARC l'est d'autant plus, suggérant une augmentation de l'activité de p53 suite au traitement par Vémurafénib des cellules de mélanome délétées de SPARC. Afin de voir si l'absence de p53 était capable de prévenir l'effet cytotoxique sur les cellules de mélanome de la combinaison de l'extinction de SPARC et de l'inhibition de BRAF^{V600}, nous avons éteint l'expression de p53 par interférence à l'ARN (siARN) dans les cellules A375 délétées de SPARC et traitées au Vémurafénib. Dans les cellules traitées au Vémurafénib, l'extinction simultanée de SPARC et de p53 durant 4 jours prévient en partie l'activation de la caspase 3 et prévient la dégradation de PARP induites par l'extinction seule de SPARC couplée au Vémurafénib (Figure 4C). En accord avec cette observation, la délétion de p53 combinée à celle de SPARC prévient l'apparition de la population cellulaire positive à l'Annexine-V induite par le Vémurafénib dans les cellules de mélanome délétées de SPARC (Figure 4A), indiquant que l'apoptose résultant de la combinaison des siSPARC au Vémurafénib est dépendante de p53. Nous avons confirmé l'importance de p53 dans ce processus apoptotique au cours d'une expérience couplant l'extinction de SPARC au Vémurafénib dans des cellules de mélanomes SKmel28 exprimant une forme mutée de p53. L'extinction de SPARC dans les SKmel28 traitées au Vémurafénib n'a pas d'influence sur le clivage de PARP observé dans les SKmel28 exprimant SPARC et sous Vémurafénib (Figure 4D). Ces cellules résistent à l'effet sensibilisateur à l'apoptose de la combinaison des siSPARC au Vémurafénib.

Figure 5

A.

Chronic treatment with increasing concentrations of Dabrafenib (SB-590885) or Vemurafenib (PLX-4032)



B.

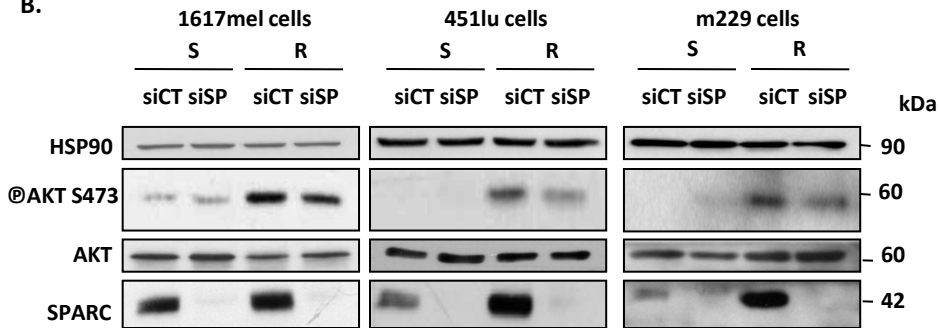


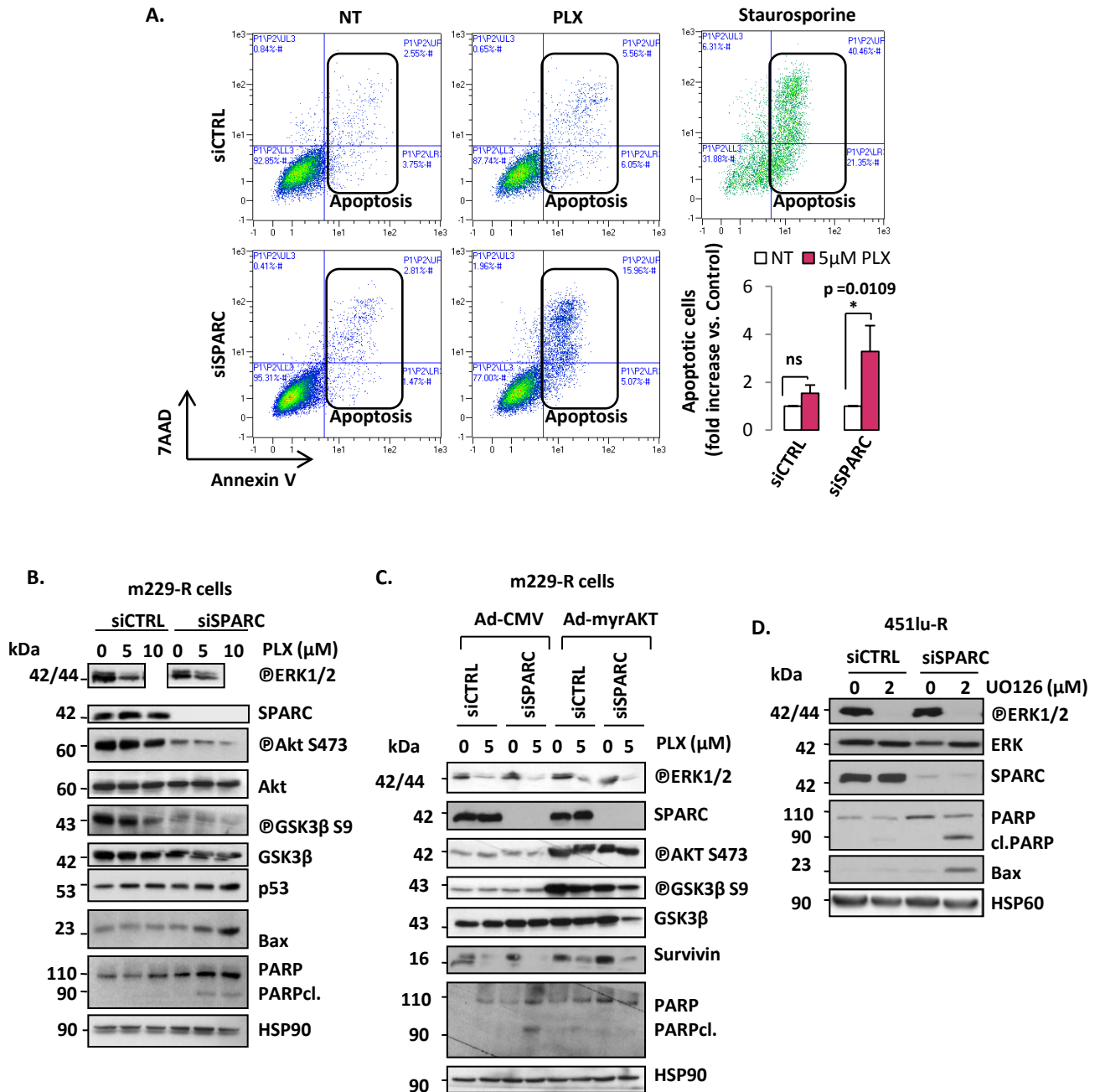
Figure 5. SPARC contributes to AKT activation in ^{V600E}BRAF inhibitor resistant cells.

(A) Schematic representation of generation of drug resistant ^{V600E}BRAF melanoma cells. The four sensitive/resistant cell line pairs were analyzed by immunoblot analysis for SPARC expression, total AKT expression and phospho-AKT levels. HSP90 was used as loading control. (B) 1617mel, 451lu and m229 sensitive (S) or resistant (R) cells were transfected with 50nM of control (siCT) or SPARC siRNA (siSP) for 4 days, then protein expression profile of SPARC and phospho-AKT (S473) was analyzed by immunoblot. HSP90 was used as loading control.

SPARC contribue à l'activation d'AKT dans les cellules de mélanomes devenues résistantes aux inhibiteurs de BRAF^{V600}.

Dans le mélanome, les précédentes études du laboratoire ont montré que SPARC assure un rôle pro-tumoral et pro-invasif de manière dépendante de l'activation de la kinase AKT (Fenouille et al. 2011b, Fenouille et al. 2012). Nous nous sommes interrogés quant au rôle de la régulation d'AKT dépendante de SPARC dans la résistance thérapeutique. Par analyse du profil d'expression protéique de quatre paires de lignées de mélanomes sensibles (451lu, mel1617, m229, m238) ou ayant acquis une résistance aux inhibiteurs de BRAF^{V600} (451lu-R, mel1617-R, m229-R, m238-R), nous avons montré que de manière concomitante la protéine SPARC est surexprimée et la kinase AKT hyperactivée dans trois lignées résistantes (451lu-R, mel1617-R, m229-R) sur quatre comparativement à leurs lignées parentales sensibles respectives (Figure 5A). L'un des mécanismes de résistance de ces trois lignées résistantes est l'hyperactivation d'AKT médiée en partie par la surexpression de récepteurs tyrosine kinase (IGFR ou PDGFR) (Nazarian et al., 2010 ; Shi et al., 2011 ; Villanueva et al., 2010). Après avoir éteint l'expression de SPARC par interférence à l'ARN dans les 451lu-R, mel161-R et m229-R, nous avons montré que la surexpression de SPARC dans ces cellules contribue également à l'hyperactivation d'AKT : l'extinction de SPARC diminue en partie la phosphorylation activatrice sur la sérine 473 d'AKT dans ces trois lignées (Figure 5B).

Figure 6



La combinaison de l'extinction SPARC et de l'inhibition de BRAF^{V600} ou de MEK induit la mort par apoptose des cellules de mélanome résistantes aux inhibiteurs de BRAF^{V600} via l'inactivation de la kinase AKT.

Nous nous sommes ensuite demandés si l'inhibition du module signalétique SPARC/AKT, hyperactivé dans les cellules de mélanomes ayant acquis une résistance aux inhibiteurs de BRAF^{V600}, était capable de les resensibiliser à l'apoptose. Nous avons éteint l'expression de SPARC par interférence à l'ARN dans les cellules m229-R, nous les avons traitées avec une dose sub-létale de Vémurafénib, puis les cellules ont été marquées par de l'Annexine-V et analysées en cytométrie de flux. Le traitement à la staurosporine sert de contrôle positif pour l'apoptose. L'analyse de la fluorescence sortante de ces cellules montre qu'au bout de 4 jours d'extinction de SPARC ou de 48h d'inhibition de BRAF^{V600} seule, aucune population apoptotique (positive à l'Annexine-V) n'est significativement observée (Figure 6A). En revanche, l'extinction de SPARC concomitante à un traitement au Vémurafénib est capable d'induire l'apparition d'une population marquée à l'Annexine-V représentant 21% de la population totale (Figure 5A). Les m229-R invalidées pour SPARC redeviennent sensibles à l'effet cytotoxique du Vémurafénib.

De plus, pour évaluer l'implication d'AKT dans la résistance en partie SPARC-dépendant de ces cellules au Vémurafénib, nous nous sommes demandés si une forme constitutivement active d'AKT pouvait contrecarrer l'effet cytotoxique de l'extinction de SPARC couplée au Vémurafénib. Les cellules m229-R transfectées avec des siARN contrôles ou dirigés contre SPARC ont été infectées avec des adénovirus contrôles (Ad-CMV) ou exprimant AKT-myristoylé (Ad-myrAKT). L'expression de myrAKT induit une phosphorylation de l'un de ses substrats, GSK3 β , et l'expression de la Survivine, indiquant l'activation de la signalisation AKT (Figure 6C). Lorsque la forme constitutivement active d'AKT est exprimée dans les cellules m229-R délétées de SPARC et traitées au Vémurafénib, le clivage de PARP n'est plus observé et l'expression de la Survivine est en partie restaurée, comparée à ce qui est observé dans les m229-R délétées de SPARC traitées au Vémurafénib exprimant une forme sauvage d'AKT (Figure 6C). Ceci indique que l'activation constitutive d'AKT dans les cellules de mélanome procure une protection face à l'apoptose induite par la combinaison de l'extinction de SPARC et l'inhibition de BRAF^{V600}. Ces résultats montrent que l'extinction de SPARC est capable de contourner la résistance acquise des cellules de mélanome aux inhibiteurs de BRAF^{V600} en inhibant l'activité de la kinase AKT.

Les cellules 451lu-R étant capables de mettre en place un mécanisme de résistance aux inhibiteurs de BRAF^{V600} dépendant de la réactivation des kinases ERK en plus d'un mécanisme ERK-indépendant (hyperactivation d'AKT) (Villanueva et al., 2010), l'extinction de SPARC dans ces cellules n'est pas suffisante pour les sensibiliser à l'apoptose sous Dabrafénib (non montré). Nous avons donc évalué l'impact de l'extinction de SPARC sur la sensibilité de ces cellules aux inhibiteurs des MEK. L'analyse du profil d'expression des 451lu-R délétées de SPARC durant 3 jours et traitées avec une dose sub-létale d'inhibiteur de MEK durant 24h montre que l'extinction de SPARC sensibilise ces cellules à l'apoptose sous inhibition de MEK, marquée par l'apparition de l'expression du facteur pro-apoptotique BAX et de PARP clivé (Figure 6D).

Figure 7

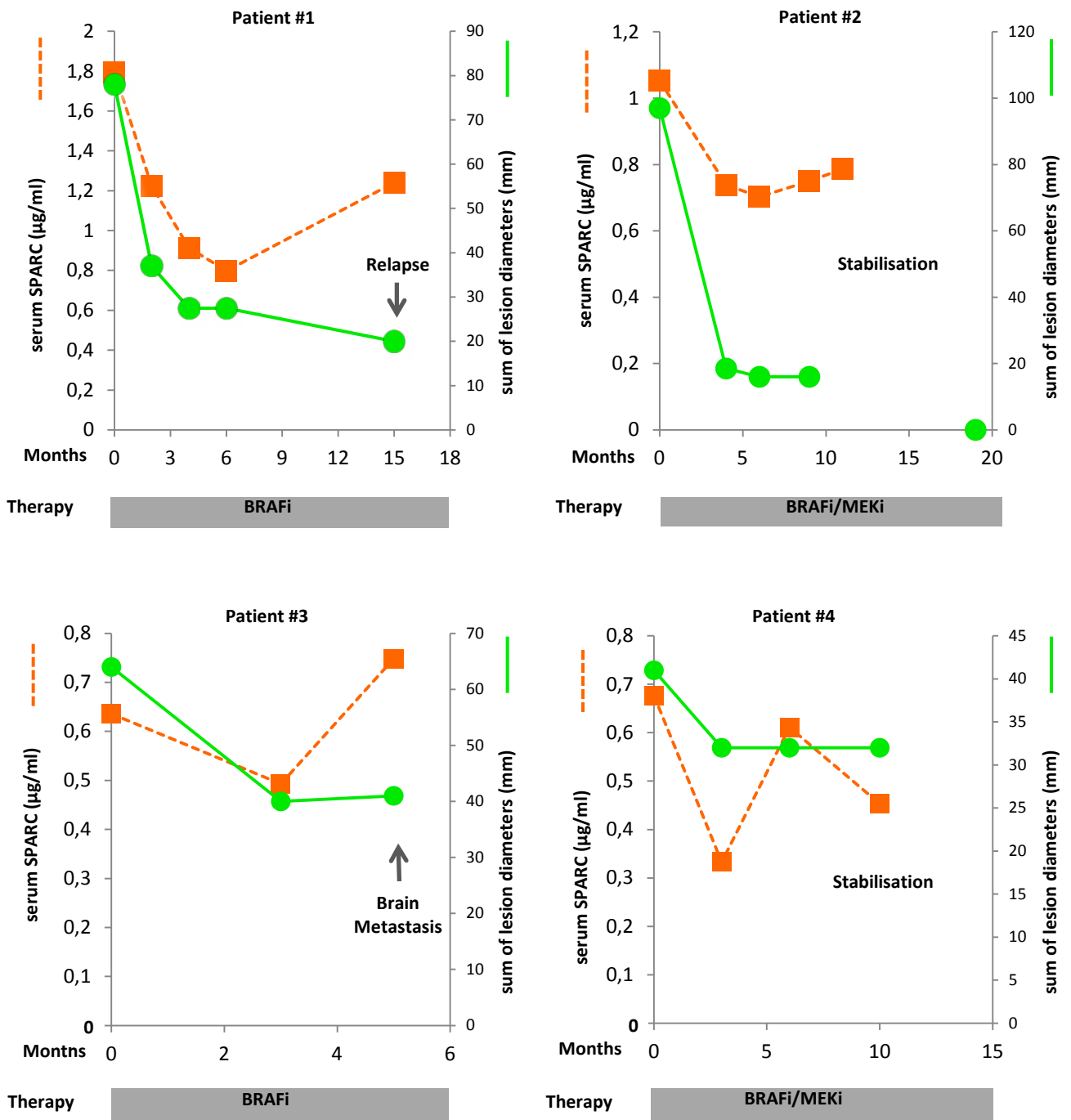


Figure 7. Circulating SPARC levels correlate with therapeutic response to targeted therapies in patients with melanoma.

Levels of SPARC in the serum of patients with metastatic ^{V600E}BRAF melanoma who were receiving targeted anti-BRAF therapy (Patients 1 and 2) or anti-BRAF and anti-MEK combined therapy (Patients 3 and 4). *Green curve*, sum of lesion diameters according to RECIST 1.1 criteria; *orange curve*, SPARC levels quantified by ELISA.

Les niveaux de SPARC circulant des patients atteints de mélanomes mutés BRAF^{V600} corrélient avec leur réponse thérapeutique aux thérapies ciblées.

De précédentes études ont montré l'existence d'une corrélation positive entre les niveaux d'expression de SPARC des cellules de mélanome ou les niveaux de SPARC sériques et la progression du mélanome vers des stades métastatiques de mauvais pronostic (Massi et al., 1999 ; Ikuta et al., 2015 ; Alonso et al., 2007 ; Tichet et al., 2015). Nous nous sommes alors demandés si il existait une corrélation entre les niveaux de SPARC sériques des patients atteints de mélanomes mutés BRAF^{V600} et la réponse thérapeutique de ces derniers durant leur traitement par thérapies ciblant la voie RAF-MEK-ERK. En collaboration avec le service de dermatologie de Nice, nous avons mesuré le SPARC sérique, calculé la somme lésionnelle des patients (selon le critère RECIST 1.1), et évalué l'état général de 4 patients atteints de mélanomes mutés BRAF^{V600} avant et pendant leur thérapie par un anti-BRAF ou une combinaison d'un anti-BRAF et d'un anti-MEK. D'après les résultats de ce suivi thérapeutique, et dans un premier temps lors de la réponse initiale positive des 4 patients aux thérapies, l'évolution du niveau du SPARC sérique suit parfaitement celle de la somme lésionnelle : diminution des deux paramètres mesurés (Figure 7). Dans un deuxième temps, au bout de quelques mois de traitements, les niveaux de SPARC sériques du patient 1 (entre 6 et 15 mois) et du patient 3 (entre 3 et 5 mois) augmentent indépendamment de l'évolution de la somme lésionnelle (Figure 7). Cette augmentation est associée à une rechute des patients (par évaluation de leur état général : présence de néo-métastases par exemple), et n'est en revanche pas observée (avec une stabilisation) chez le patient 2 et le patient 4 dont l'état général reste stable après une réponse initiale positive au traitement (Figure 7). Ces résultats montrent que les niveaux de SPARC circulant sont corrélés à la réponse globale des patients et suggèrent SPARC comme un possible bio-marqueur de réponse aux thérapies ciblant la voie RAF-MEK-ERK.

**DISCUSSION
ET PERSPECTIVES**

DISCUSSION ET PERSPECTIVES.

Le cancer est une maladie qui repose sur la rupture de l'homéostasie cellulaire, et plus largement l'homéostasie tissulaire. En effet, les tumeurs ne sont pas des « unités malades » isolées dans l'organisme, mais elles sont au contraire intégrées à ce dernier: les tumeurs apparaissent comme des réseaux d'interactions complexes entre les cellules malignes et leur microenvironnement. Une des conséquences de cette « intégration tumorale » peut être la résistance au « stress », au sens large du terme: comme c'est le cas pour les cellules saines de l'organisme, la tumeur peut bénéficier des nombreux mécanismes de protection contre les agressions extérieures mis en place par l'organisme, mais elle est également capable d'éduquer son microenvironnement pour le « forcer » à la protéger et créer des niches de résistance.

Au cours de ma thèse, je me suis intéressée au rôle que pouvait jouer le microenvironnement tumoral des mélanomes, et en particulier la protéine matricellulaire SPARC, dans la résistance des mélanomes aux thérapies ciblant l'oncogène BRAF^{V600}.

La protéine matricellulaire SPARC est une glycoprotéine exprimée et sécrétée par les cellules des tissus en remodelage : tissus embryonnaires, tissus osseux, derme, tissus cicatriciels, ou encore tissus tumoraux. Dans le contexte du cancer, la protéine SPARC est exprimée par les cellules stromales et/ou cancéreuses, et régule les interactions entre cellules et/ou entre cellules et matrice. De cette manière, la protéine SPARC est très souvent impliquée dans le développement et l'invasion tumorale, l'échappement tumoral, la formation et la dissémination métastatique, ou encore dans l'angiogenèse. Son expression est augmentée dans plusieurs cancers solides agressifs tels que le mélanome ou encore le cancer du sein et les gliomes. L'ensemble de ces observations font de SPARC un protagoniste majeur des régulations microenvironnementales au sein de ces tumeurs.

Dans le cas du mélanome, les données de la littérature mettent en évidence l'implication du niveau d'expression de SPARC dans la progression du cancer vers les stades métastatiques, et par conséquent son implication dans la variabilité du pronostic vital des patients (Alonso et al. 2007, Massi et al. 1999, Robert G. et al. 2006, Tichet et al. 2015). Lorsque la protéine SPARC est sécrétée par les cellules de mélanome, elle peut agir de manière paracrine dans le microenvironnement tumoral. En interaction avec les cellules immunitaires et les cellules endothéliales vasculaires elle est capable d'avoir un effet immunosuppresseur, pro-angiogénique, ou encore pro-métastatique en perméabilisant les vaisseaux sanguins (Alvarez et al. 2005, Prada et al. 2007, Sage E. H. et al. 2003, Sangaletti et al. 2003, Sangaletti et al. 2005, Tichet et al. 2015). Elle peut également agir de manière autocrine sur les cellules de mélanome : les études menées dans notre laboratoire montrent ainsi que SPARC contrôle la prolifération et la survie des cellules de mélanome *in vitro* et *in vivo* en favorisant l'activation de la voie AKT et la déstabilisation du suppresseur de tumeur p53 (Fenouille et al. 2011a, Fenouille et al. 2011b). D'autre part, les études de notre laboratoire et d'autres groupes de recherche montrent qu'en activant les facteurs de transcription SNAIL et SLUG, SPARC initie des étapes précoces de la progression tumorale, telle que la TEM, en réprimant l'expression des E-cadhérines (nécessaires à la rétention des mélanocytes dans l'épiderme), et favorise le processus métastatique (Fenouille et al. 2012, Robert G. et al. 2006, Smit et al. 2007). Ainsi, la protéine SPARC est un médiateur à la fois de la survie et du phénotype invasif du mélanome.

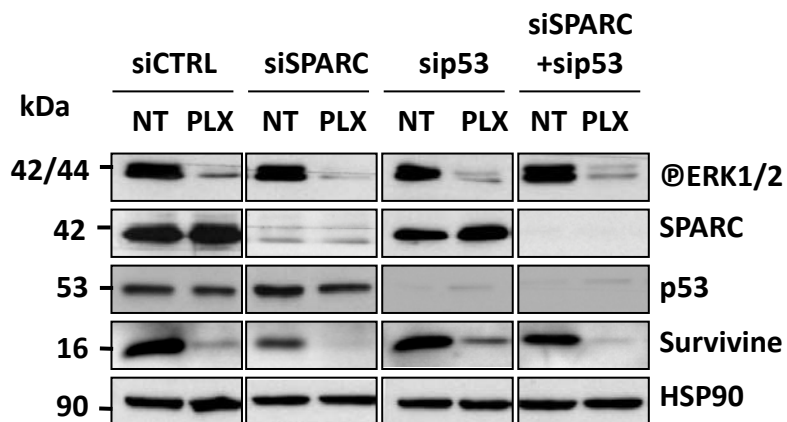
Cependant, si l'expression aberrante de la protéine SPARC est très souvent retrouvée dans les mélanomes, sa contribution en tant que « facteur de survie » aux thérapies anti-mélanome reste inconnue.

1. SPARC module la sensibilité des lignées cellulaires de mélanomes humaines aux thérapies.

Que ce soit dans le cancer du colon, du sein, du pancréas, ou encore dans la leucémie myéloïde chronique (LMC), l'implication de la protéine SPARC dans la chimiorésistance a été rapportée par différentes études (Azim et al. 2013, Cheetham et al. 2008, Fenouille et al. 2010, Lindner et al. 2015, Neesse et al. 2014a, Tai et al. 2005). Une forte expression de SPARC (suite à la déméthylation forcée du promoteur du gène SPARC dans le cancer du colon, ou endogènes dans les cancers du sein ou du pancréas) sensibilisent les cellules cancéreuses à la mort sous chimiothérapie, via l'activation de la cascade apoptotique initiée par la caspase 8 (Rahman et al. 2011). Au contraire, dans la LMC la réexpression de la protéine SPARC, suite à une déméthylation partielle du promoteur de SPARC, est impliquée dans la désensibilisation des cellules de LMC à l'Imatinib, une thérapie ciblant l'oncoprotéine BCR-ABL (Fenouille et al. 2010).

Mes travaux de thèse montrent qu'une forte expression de SPARC (endogène ou ectopique) dans des lignées cellulaires de mélanomes mutées BRAF^{V600} confère *in vitro* une résistance innée aux effets antiprolifératifs de la Dacarbazine (chimiothérapie classique) et des inhibiteurs de BRAF^{V600} ou de MEK. En effet, l'expression ectopique de SPARC dans la lignée cellulaire de mélanome mel501 diminue fortement sa sensibilité à la Dacarbazine, au PLX4032, au SB590885, et au GSK1120212: ceci se traduit au cours d'un test de prolifération cellulaire par une augmentation de plus de la moitié de l'IC50 des mel501 surexprimant stablement SPARC (mel501-SPARC) comparativement aux mel501 parentales (mel501-CTRL), pour chacune des drogues utilisées. Il faut cependant noter que les lignées mel501-CTRL et mel501-SPARC ont intégré un plasmide d'expression contenant d'une part une cassette d'expression de résistance à la puromycine, et d'autre part une cassette d'expression vide ou contenant la séquence codant pour la protéine SPARC étiquetée-Myc, et ont été sélectionnées pour leur résistance à la puromycine. Cette résistance à la puromycine sous entend l'existence de modifications intracellulaires acquises, augmentant préférentiellement des voies de survie. Ceci explique sans doute les IC50 relativement élevées des mel501-CTRL pour les différentes drogues comparativement aux mel501 d'origine n'ayant subi aucune manipulation génétique et considérées comme sensibles à ces drogues.

L'étude signalétique de la surexpression ectopique de SPARC dans la lignée cellulaire de mélanome mel501 montre une augmentation limitée de l'expression protéique de p27 (inhibiteur du cycle cellulaire) induite par le PLX4032, un maintien de l'expression de la Survivine (protéine de survie dont le gène est une cible de p53) et de la CDK6 (impliquée dans la progression de la phase G1 du cycle cellulaire), et la progression des cellules dans leur cycle malgré la présence du Vémurafénib (Figure 1 de l'article n°1). Au contraire, l'extinction de SPARC par interférence à l'ARN (siARN) dans des lignées cellulaires de mélanome augmente l'expression du facteur pro-apoptotique BAX cible de p53, accroît la diminution de l'expression de la Survivine (une autre cible de p53) induite par le Vémurafénib, et sensibilise ainsi les cellules à l'effet antiprolifératif et cytotoxique du PLX4032 (Figure 3 et 4 de l'article n°1) et de la Dacarbazine (résultat non montré).



A375

Figure D1 : L'extinction de SPARC dans les cellules de mélanome A375 diminue l'expression protéique de la Survivine de manière dépendante de p53.

Les cellules de mélanome A375 ont été transfectées avec des siARN contrôles (siCTRL) ou des siARN dirigés contre SPARC (siSPARC) et/ou des siARN dirigés contre p53 (sip53) durant 3 jours, puis ont été traitées 24h avec 1 μ M de PLX4032. Le profil d'expression de la protéine Survivine a été suivi par western blot. (NT= non traité)

Dans la littérature, SPARC a récemment été décrite comme capable de protéger des cellules cancéreuses gastriques vis-à-vis d'une drogue ayant la capacité d'induire la mort de plusieurs types de cellules cancéreuses, la bufalin (Wang Y. et al. 2014). Dans ce contexte, SPARC prévient l'arrêt du cycle cellulaire et l'activation de la voie intrinsèque de l'apoptose induits par la bufalin, et active des voies de signalisation impliquées dans la prolifération cellulaire incluant la voie AKT. En effet, les cellules cancéreuses gastriques exprimant fortement SPARC augmentent leur ratio Bcl2/BAX et résistent mieux à l'effet cytotoxique de la bufalin par rapport aux cellules qui expriment peu SPARC. Cette résistance est en revanche reversée par l'extinction de SPARC par siARN (Li A. et al. 2015).

SPARC désensibilise les cellules de mélanome aux inhibiteurs de BRAF^{V600} en régulant le suppresseur de tumeur p53.

Si la protéine suppresseur de tumeur p53 n'est pas majoritairement retrouvée mutée dans les mélanomes, ces derniers mettent fréquemment en place des mécanismes de répression de son activité ou de son expression (Albino et al. 1994, Zerp et al. 1999). Au laboratoire, de précédentes études ont montré que les cellules qui surexpriment SPARC sont capables de réguler négativement p53 et deviennent ainsi résistantes aux effets cytotoxiques de l'actinomycine D dont le mode d'action est complètement dépendant de p53 (Fenouille et al. 2011a, Fenouille et al. 2011b).

Pendant ma thèse j'ai révélé l'implication de l'activité du suppresseur de tumeur p53, induite par l'extinction de SPARC, dans la potentialisation des effets antiprolifératifs et cytotoxiques du Vémurafénib, par une approche fonctionnelle. L'utilisation de siRNA dirigés contre les ARNm de p53 prévient l'optimisation des effets antiprolifératifs et pro-apoptotiques du Vémurafénib par l'extinction de SPARC dans les lignées cellulaires de mélanome exprimant une forme sauvage de la protéine p53. De plus, l'extinction de SPARC dans des cellules de mélanome exprimant une forme mutée inactivée de p53 n'a aucun impact sur l'effet antiprolifératif et cytotoxique du Vémurafénib.

Mes résultats confirment les précédents travaux du laboratoire: la stabilisation protéique de p53 fait suite à l'extinction de SPARC, associée à la diminution de la phosphorylation d'AKT, et induit l'expression de BAX, de la caspase 3 active, mais également la diminution de la Survivine dans les cellules de mélanome (Fenouille et al, 2011 et Figure D1). Néanmoins, dans un contexte de stress induit par le Vémurafénib, il semblerait que SPARC soit capable de réguler seulement l'activité transcriptionnelle de p53, pour potentialiser l'effet du Vémurafénib. En effet, l'expression de gènes cibles de p53, tels que la *Survivine*, et l'activation de la caspase 3, toutes deux modulées par le Vémurafénib seul (indépendamment de p53 pour la Survivine), sont d'autant plus perturbées suite à l'extinction de SPARC, sans que le niveau d'expression de p53 ne soit lui-même affecté (figure 4 de l'article n°1 et Figure D1) : l'extinction de SPARC dans les cellules de mélanome traitées au Vémurafénib augmente l'activation de la caspase 3, et la diminution de l'expression de la Survivine.

Mes travaux, couplés à ceux précédemment menés au laboratoire, me permettent de proposer le modèle suivant dans les cellules de mélanome : les cellules qui surexpriment SPARC assurent leur prolifération et leur survie en régulant les niveaux protéiques de p53 ; face à un stress induit par des agents thérapeutiques, SPARC limite l'expression de facteurs pro-apoptotiques et favorise celle de facteurs pro-survie en régulant préférentiellement l'activité transcriptionnelle de p53.

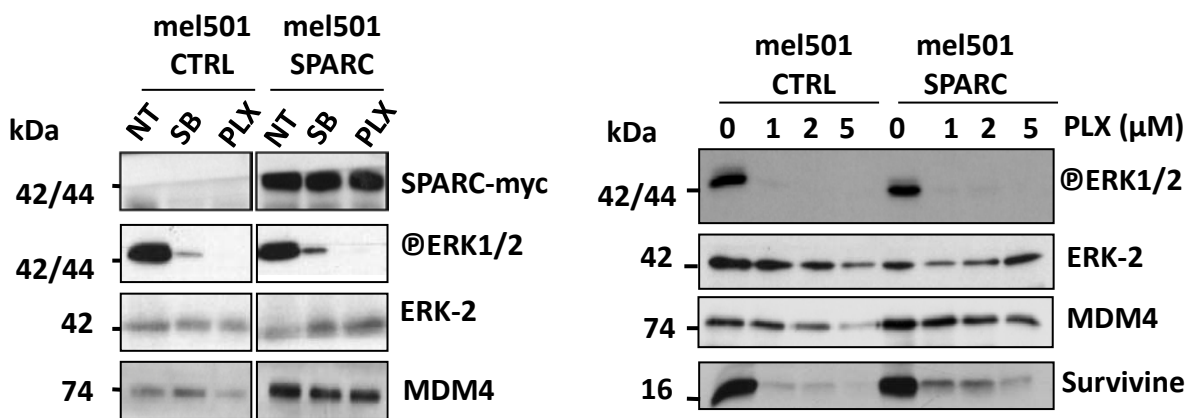


Figure D2: Effet de la surexpression de SPARC sur l'expression de MDM4 et l'une de ses cibles, la Survivine, dans les mel501 sous traitement anti-BRAF^{V600} Vemurafenib.

Les cellules de mélanome contrôles (mel501-CTRL) ou surexprimant stablement SPARC (mel501-SPARC) ont été traitées avec 1, 2 ou 5 μM de PLX4032, ou 1 μM de SB590885 durant 72h. Les niveaux d'expression de MDM4 et de la Survivine ont ensuite été visualisés par western blot.

Au contraire, l'extinction de la protéine SPARC active p53 et optimise l'effet cytotoxique du Vémurafénib sur les cellules de mélanome, et les sensibilise à cet agent thérapeutique.

Des études préliminaires au laboratoire, et des études tirées de la littérature, nous laissent suggérer l'implication de MDM4 dans la régulation de l'activité pro-apoptotique de p53 par SPARC dans ce contexte. En effet, dans la littérature, la protéine MDM4 a été décrite comme un antagoniste de la fonction pro-apoptotique de p53 favorisant la survie des mélanomes métastatiques et a été retrouvée surexprimée dans 65% des mélanomes de stade I à IV. D'autre part, l'inhibition de l'interaction de MDM4 avec p53 est capable de sensibiliser les cellules de mélanome aux effets cytotoxiques des chimiothérapies et des thérapies ciblant l'oncogène BRAF^{V600E} (Gembarska et al. 2012). Au laboratoire, mes résultats préliminaires indiquent que la surexpression ectopique de SPARC entraîne une augmentation de l'expression de MDM4, maintenue sous Vémurafénib, et associée à une expression de la Survivine (Figure D2). A l'inverse l'expression de MDM4 est perturbée suite à l'extinction de SPARC dans les cellules de mélanome (résultat non montré).

La restauration de la fonction de p53 comme mécanisme efficace pour sensibiliser les mélanomes aux inhibiteurs de la voie BRAF-MEK-ERK et prévenir la résistance à ces inhibiteurs a été validée par différentes études de la littérature (Gembarska et al. 2012, Ji Z. et al. 2012b, Ji Z. et al. 2013, Posch et al. 2015). En 2013, Ji et al ont montré que le ciblage pharmacologique combiné de BRAF^{V600} et d'un des régulateurs de p53, MDM2, est capable d'induire l'apoptose p53-dépendante et de supprimer la viabilité des mélanomes *in vitro* et *in vivo*. Cette étude suggère que cet effet synergique de l'inhibition de MDM2 et de BRAF^{V600} est médié par la diminution de l'expression de l'une des cibles de p53, la Survivine, dont la déplétion mime l'effet de la combinaison de l'inhibition de MDM2 et de BRAF^{V600} (Ji Z. et al. 2013). L'implication de p53 dans la sensibilisation des mélanomes aux thérapies ciblées a également été observé dans le contexte des mélanomes mutés NRAS : dans ces mélanomes, Poschs et al ont récemment montré que l'effet anti-tumoral de la combinaison de l'inhibition de MEK et de la protéine Polo-like kinase 1 (Plk1, un régulateur de la mitose surexprimé dans de nombreux mélanomes mutés NRAS) est médié par la protéine p53 (Posch et al. 2015).

Ainsi, en accord avec la littérature, nos travaux soulignent l'intérêt particulier de la réactivation de p53 comme approche efficace et complémentaire aux thérapies ciblées dans le traitement des mélanomes métastatiques.

SPARC intracellulaire et/ou SPARC sécrétée ?

Mes travaux ne permettent pas encore déterminer si le rôle de SPARC dans la désensibilisation des cellules de mélanome face aux thérapies anti-cancéreuses est dû à la protéine sécrétée et/ou intracellulaire. Cependant, mes résultats montrent que les cellules 1205lu présentant un haut niveau d'expression et de sécrétion endogène de SPARC (« High SPARC ») sont plus résistantes aux thérapies anti-mélanome que des cellules mel501 qui ont un niveau faible d'expression et de sécrétion endogène de SPARC (« Low SPARC »). Mes résultats montrent également que le sécrétome de ces cellules « High SPARC » est capable de procurer une protection partielle aux cellules « Low SPARC » au Vémurafénib, et que cette protection est perdue lorsque les cellules « High SPARC » ont été délétées de SPARC avant la production de leur sécrétome (Figure 2 de l'article n°1). Mes résultats suggèrent donc que la résistance innée au Vémurafénib médiée par la

surexpression de SPARC est transmissible aux autres cellules de mélanomes via le sécrétome des cellules résistantes, et que cette transmission de résistance est dépendante de l'expression de SPARC par ces cellules. Ces résultats sont en accord avec une étude récente qui montre que les cellules de mélanome résistantes au Vémurafénib produisent un sécrétome capable de favoriser leur propre croissance et leur propre dissémination métastatique, mais également capable d'agir sur les cellules de mélanome sensibles pour favoriser leur survie face au Vémurafénib (Obenauf et al. 2015).

Nos hypothèses sont donc les suivantes : dans les cellules résistantes au Vémurafénib, la protéine SPARC peut, soit être sécrétée pour conférer une résistance aux cellules sensibles vis-à-vis de cet agent en activant des voies de survie, soit/et stimuler la sécrétion de facteurs de survie qui vont protéger les cellules sensibles du Vémurafénib.

Dans le cas où SPARC serait sécrétée pour conférer une résistance au Vémurafénib aux cellules de mélanome voisines, comme tout facteur sécrété, SPARC pourrait exercer son rôle autocrine via des récepteurs membranaires. La littérature a décrit l'interaction de SPARC avec différents récepteurs (intégrines $\beta 1$, VCAM-1, ou encore Stabilin-1) dans plusieurs effets cellulaires (Kzhyshkowska et al. 2006, Shi et al. 2007, Shi et al. 2004, Tichet et al. 2015, Weaver et al. 2008). En particulier, son interaction avec les intégrines $\beta 1$ a été impliquée dans la survie de cellules épithéliales de rétine face à différents stress (milieu sans sérum, drogue) (Weaver et al. 2008). Lors d'expériences préliminaires nous avons pu observer que dans les cellules de mélanome l'effet de l'extinction des intégrines $\beta 1$ par siARN ou de leur inhibition via un anticorps bloquant est semblable à celui engendré par l'extinction de SPARC (résultats non montrés), et suggèrent que les intégrines $\beta 1$ peuvent être des médiateurs des effets autocrines de SPARC dans la survie des mélanomes.

D'autre part, il est important de noter que les 1205lu sont des cellules de mélanome qui n'expriment plus PTEN, et que cette perte d'expression a été décrite comme un des mécanismes de résistance innée aux inhibiteurs de BRAF^{V600} suite à l'hyperactivation d'AKT et la diminution du facteur pro-apoptotique BIM, notamment dans les 1205lu (Paraiso et al. 2011). Cependant, la transmissibilité SPARC-dépendante de la résistance au Vémurafénib des cellules 1205lu « High SPARC » aux cellules mel501 « Low SPARC » que nous avons montrée (Figure 1D de l'article n°1) et l'importance du module SPARC/AKT dans la survie des mélanomes (Fenouille et al. 2011b) suggèrent que le statut PTEN n'est pas seul à dicter le degré de sensibilité des mélanomes au Vémurafénib, le niveau d'expression de SPARC étant également impliqué.

De plus, cette contribution de SPARC dans la résistance innée au Vémurafénib est indépendante du statut d'expression de PTEN par les cellules de mélanome, puisque les mel501-SPARC qui expriment PTEN sont elles aussi plus résistantes au Vémurafénib que les mel501-CTRL. Il serait intéressant d'évaluer l'impact de l'expression de SPARC sur celle de BIM dans un contexte PTEN sauvage.

Plus largement, ces résultats nous permettent d'inscrire SPARC comme nouvel acteur intervenant dans l'hétérogénéité des réponses de patients atteints de mélanome aux inhibiteurs de BRAF^{V600}.

Ainsi, il semblerait que la protéine SPARC, en plus d'assurer le développement et la croissance des mélanomes, soit capable d'activer et maintenir des voies de survie, et d'inactiver les systèmes de

surveillance anti-cancer médiés par p53 en condition de stress thérapeutique pour protéger les cellules de mélanomes des thérapies ciblées anti-mélanome.

L'étude *in vivo* de l'impact de l'expression de SPARC sur la sensibilité aux thérapies anti-mélanome s'est avérée difficile. D'une part, l'extinction de SPARC par siARN dans les lignées de mélanomes humains entraîne leur mort au bout de 5 à 6 jours, ne permettant donc pas la formation de tumeurs. D'autre part, lors d'expériences préliminaires antérieures du laboratoire, chez la souris Nude (immunodéficente) nous avons observé que la xéno greffe de cellules mel501-CTRL n'induit pas le développement de tumeurs. En revanche, j'ai pu observer lors d'expériences préliminaires que les mêmes cellules mel501-CTRL sont capables de former des tumeurs chez la souris *NOD-SCID* (immunodéprimée) et que les cellules mel501-SPARC forment des tumeurs plus volumineuses que les mel501-CTRL dans ce modèle (résultat non montré). Ainsi, l'étude *in vivo* du rôle de SPARC dans la sensibilité aux thérapies anti-mélanome sera prochainement investiguée *in vivo* chez la souris *NOD-SCID*, dans un modèle de xéno greffe de cellules mel501-CTRL et mel501-SPARC après traitement par différentes thérapies anti-mélanome.

Suite à la mise en évidence de l'implication de l'expression de SPARC dans la résistance innée des lignées de mélanomes aux thérapies anti-mélanome, et au Vémurafénib en particulier, je me suis ensuite demandé si la protéine SPARC, en tant que facteur anti-stress des cellules de mélanome, pouvait également jouer un rôle dans l'acquisition d'une résistance aux thérapies ciblant l'oncogène BRAF^{V600}.

2. La voie de signalisation SPARC-AKT est impliquée dans l'acquisition d'une résistance aux inhibiteurs de BRAF^{V600} par certaines lignées de mélanomes humains.

Ces cinq dernières années les nouvelles options thérapeutiques, telles que l'inhibition sélective de l'oncoprotéine BRAF^{V600} avec le Vémurafénib ou le Dabrafénib, ont révolutionné la prise en charge des patients atteints de mélanome métastatique portant la mutation BRAF^{V600} (les plus fréquents). Cependant, alors que 30% des patients éligibles pour ces traitements y sont insensibles (résistance innée), les individus qui y répondent voient leur masse tumorale diminuer rapidement (en quelques semaines) mais sont malheureusement fréquemment victimes d'une rechute faisant suite à l'acquisition d'une résistance secondaire à ces thérapies. Dans la littérature, de nombreux mécanismes de résistance acquise au Vémurafénib ou au Dabrafénib ont été décrits, et ont été en partie expliqués par l'activation de voies de survie alternatives et/ou additives à la voie RAF-MEK-ERK, telle que la voie PI3K-AKT (Lito et al. 2013, Shi et al. 2014b). Par conséquent, les recherches actuelles s'orientent vers l'identification d'une combinaison thérapeutique efficace, ciblant à la fois BRAF^{V600} et une autre protéine intervenant dans ces voies de survie (Corcoran et al. 2011, Niessner et al. 2013). De nombreuses études ont identifié plusieurs acteurs de la voie PI3K-AKT, ou des régulateurs de cette voie (IGF1-R, PDGFR β , mTORC2, AKT3...), dont le co-ciblage par des molécules pharmaceutiques ou des siARN avec celui de BRAF^{V600} prévient ou supprime la résistance acquise aux thérapies ciblées de certains mélanomes BRAF^{V600} (Greger et al. 2012, Nazarian et al. 2010, Villanueva et al. 2010). Testées *in vitro* (sur des lignées cellulaires de mélanome mutées BRAF^{V600}) ou *in vivo* sur la souris (modèles de xéno greffe de cellules de mélanomes humains mutées BRAF^{V600}), les combinaisons du Vémurafénib avec d'autres molécules thérapeutiques ont également fait l'objet d'essais cliniques (Nikolaou et al. 2012). Cependant, l'expression ubiquitaire de la majorité des cibles de ces molécules thérapeutiques chez l'Homme limite en clinique le bénéfice de leur combinaison avec les inhibiteurs de BRAF^{V600} observé *in vitro*.

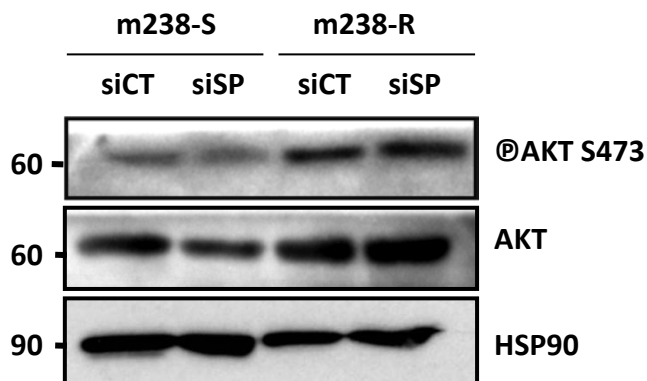


Figure D3: L'hyper-activation de la kinase AKT dans les m238-R est indépendante de l'expression protéique de SPARC.

Les cellules de mélanomes m238 sensibles (m238-S) ou devenues résistantes (m238-R) au PLX4032 ont été transfectées 3 jours avec des siARN contrôles (siCTRL) ou dirigés contre SPARC (siSPARC). Le niveau protéique et de phosphorylation activatrice de la kinase AKT sur son résidu Sérine 473 ont été visualisés par western blot.

➤ **Le module SPARC/AKT participe à la résistance ERK-indépendante des cellules 451lu-R, mel1617-R et m229-R.**

Les précédentes études du laboratoire ont montré que dans le mélanome, SPARC assure son rôle de facteur pro-tumoral et invasif de manière dépendante de l'activation de la kinase AKT (Fenouille et al. 2011b, Fenouille et al. 2012). Dans la continuité de ces études, j'ai observé que la protéine SPARC était surexprimée dans trois lignées (451lu-R, mel1617-R, m229-R) sur quatre ayant acquis *in vitro* une résistance aux inhibiteurs de BRAF^{V600} (451lu-R, mel1617-R, m229-R, m238-R) et que la kinase AKT était hyperactivée dans ces quatre lignées résistantes comparativement à leurs lignées parentales sensibles respectives (Figure 5A de l'article n°1).

La littérature montre que, si les lignées 451lu-R et mel1617-R possèdent en plus un mécanisme de résistance ERK-dépendant, les quatre lignées résistantes aux inhibiteurs de BRAF^{V600} (451lu-R, mel1617-R, m229-R et m238-R) ont développé un mécanisme de résistance ERK-indépendant se traduisant par l'hyperactivation de la kinase AKT (Nazarian et al. 2010, Shi et al. 2011, Villanueva et al. 2010). Dans ces quatre lignées résistantes, l'hyperactivation de la kinase AKT est, en partie, expliquée par la surexpression de récepteurs tyrosine-kinase (IGF1-R dans les cas de 451lu-R et mel1617-R (Villanueva et al. 2010), et PDGFRβ dans le cas des m238-R et m229-R (Nazarian et al. 2010)). Mes travaux montrent que la surexpression de SPARC contribue également à l'hyperactivation d'AKT dans trois de ces quatre lignées résistantes. En effet, mes résultats montrent que l'extinction de SPARC diminue la phosphorylation activatrice d'AKT dans les lignées 451lu-R, mel1617-R et m229-R (Figure 5B de l'article n°1).

➤ **La surexpression de SPARC comme mécanisme alternatif à celle du PDGFRβ dans l'hyperactivation d'AKT dans les 229-R.**

Si dans les cellules parentales m229 la surexpression du PDGFRβ augmente la phosphorylation activatrice d'AKT, l'extinction du PDGFRβ dans les cellules m229-R entraîne paradoxalement une augmentation de la phosphorylation d'AKT, suggérant l'existence d'un mécanisme de compensation pour maintenir l'hyperactivation de la kinase AKT (Shi et al. 2011), et suggérant une limite d'efficacité d'une thérapie qui combinerait inhibiteurs de BRAF^{V600} et inhibiteurs du PDGFRβ. De plus, alors que la surexpression du PDGFRβ augmente la phosphorylation activatrice d'AKT dans les m238 parentales (comme dans les m229), l'extinction du PDGFRβ dans les 238-R entraîne une diminution de la phosphorylation d'AKT, soulignant l'absence de ce mécanisme de compensation suggéré dans les m229-R (Shi et al. 2011). De manière intéressante, nos travaux montrent que, contrairement à ce que nous observons dans les m229-R, l'extinction de la protéine SPARC par interférence à l'ARN n'a pas d'effet sur la kinase AKT hyperactivée dans les m238-R (Figure D3). Ceci montre que dans les m238-R, dont le niveau d'expression protéique de SPARC n'est pas augmenté comparativement à leur lignée parentale, le mécanisme ERK-indépendant à l'origine de l'hyperactivation d'AKT est indépendant de la protéine SPARC. En revanche, nos résultats sur les m229-R suggèrent que la protéine SPARC est capable de prendre le relais dans l'hyperactivation d'AKT en l'absence du PDGFRβ, représentant ainsi une entrave à la stratégie thérapeutique combinant l'inhibition de BRAF^{V600} et celle de la voie PDGFRβ-AKT.

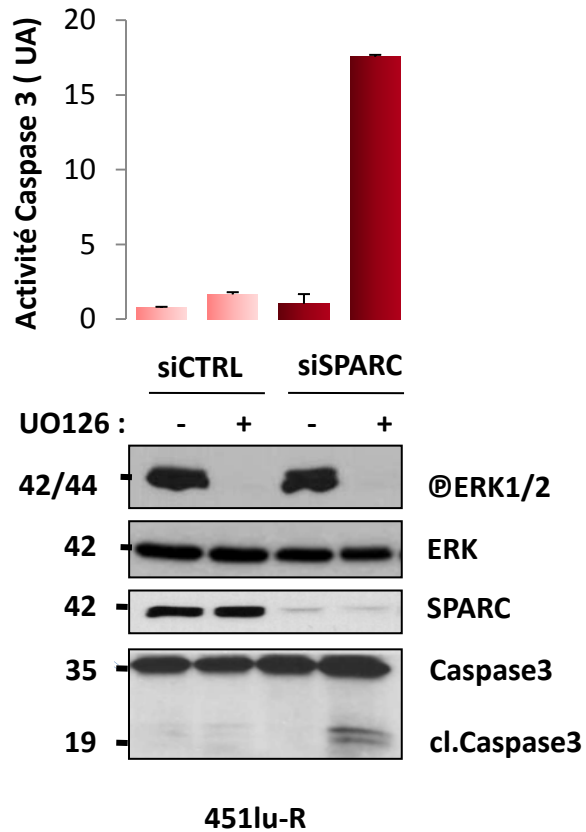


Figure D4: L'extinction de SPARC active la caspase 3 dans les cellules de mélanome 451lu-R traitées par un inhibiteur de MEK.

Les cellules de mélanome 451lu devenues résistantes au Dabrafénib (SB590885) (451lu-R) ont été transfectées 3 jours avec des siARN contrôles (siCTRL) ou dirigés contre SPARC (siSPARC), puis traitées 24h avec 2µM de UO126 (inhibiteur de MEK). L'activité de la caspase 3 effectrice de l'apoptose a été mesurée par un « essai caspase fluorimétrique » .

- **La combinaison du ciblage de la protéine SPARC avec les thérapies ciblées comme stratégie efficace pour induire la mort des cellules de mélanome devenues résistantes aux inhibiteurs de BRAF^{V600}.**

Après avoir mis en évidence que la protéine SPARC est surexprimée dans les cellules 451lu-R, les mel1617-R et les m229-R, nous avons montré *in vitro* que son extinction est suffisante pour induire la mort de ces cellules en présence d'inhibiteurs de BRAF^{V600} ou de MEK :

Dans le cas des lignées 451lu-R et mel1617-R, l'extinction seule de SPARC est insuffisante pour les resensibiliser au Vémurafénib (résultat non montré), en concordance avec le fait que ces lignées aient un mécanisme de résistance ERK-dépendant en plus d'un mécanisme de résistance ERK-indépendant. Par contre, dans ces lignées, l'extinction de SPARC potentialise et « transforme » l'effet cytostatique de l'inhibition de MEK en un effet cytotoxique: en l'absence de SPARC l'inhibition de MEK augmente l'expression protéique de BAX et de la caspase 3 (dont l'activité est augmentée), et induit la mort par apoptose de ces lignées résistantes (Figure 6 de l'article n°1, et Figure D4).

Dans le cas de la lignée résistante m229-R, dont le mécanisme de résistance est ERK-indépendant, l'utilisation de siARN dirigés contre les ARNm de SPARC suffit à les resensibiliser aux effets cytotoxiques du Vémurafénib. En effet, alors que l'ajout d'une dose de 5µM de PLX4032 durant 48h n'a aucun effet cytotoxique sur les m229-R exprimant SPARC, il induit l'apoptose des cellules m229-R invalidées pour SPARC.

Il est important de noter que les m229-R sont beaucoup moins sensibles à l'extinction de SPARC seule que les lignées A375 ou 1205lu sur lesquelles le rôle de la voie SPARC-AKT a été démontré au laboratoire. En effet, nous observons qu'après 7j de transfection (temps limite de stabilité de nos siARN) les m229-R ne meurent pas, contrairement aux A375 et 1205lu qui meurent 5 à 6 jours post-transfection (résultat non montré). Ces observations suggèrent donc que, si SPARC est capable de prendre le relais dans l'activation d'AKT et la survie des m229-R face au Vémurafénib lorsque la voie PDGFR-AKT est compromise (vu précédemment), elle est à son tour relayée par un autre mécanisme lorsque son expression est perturbée (ce mécanisme étant probablement la sur-activation de la voie PDGFR-AKT).

- **L'extinction de SPARC est capable de resensibiliser des cellules de mélanome devenues résistantes au Vémurafénib en désactivant la kinase AKT.**

Nous avons ensuite mis en évidence que la capacité de SPARC à désensibiliser les m229-R à l'effet cytotoxique du Vémurafénib est dépendante de l'activation de la kinase AKT: la surexpression adénovirale d'une forme constitutivement active d'AKT restaure la résistance au Vémurafénib dans les m229-R délétées pour SPARC (Article n°1). La présence de SPARC dans les m229-R en tant qu'activateur de la signalisation AKT semble donc indispensable dans le mécanisme de résistance au Vémurafénib ERK-indépendant des m229-R.

Nous avons également constaté que, dans cette lignée résistante, l'implication du module signalétique SPARC/AKT dans la résistance au Vémurafénib n'est pas dépendante de p53 (résultat non montré). Cela est en accord avec la moindre sensibilité des m229-R à l'extinction de SPARC évoquée précédemment, marquée par l'absence de l'augmentation d'expression de p53 et de certaines de cibles, et par l'absence d'apoptose (Figure 6 de l'article n°1), comparativement à ce

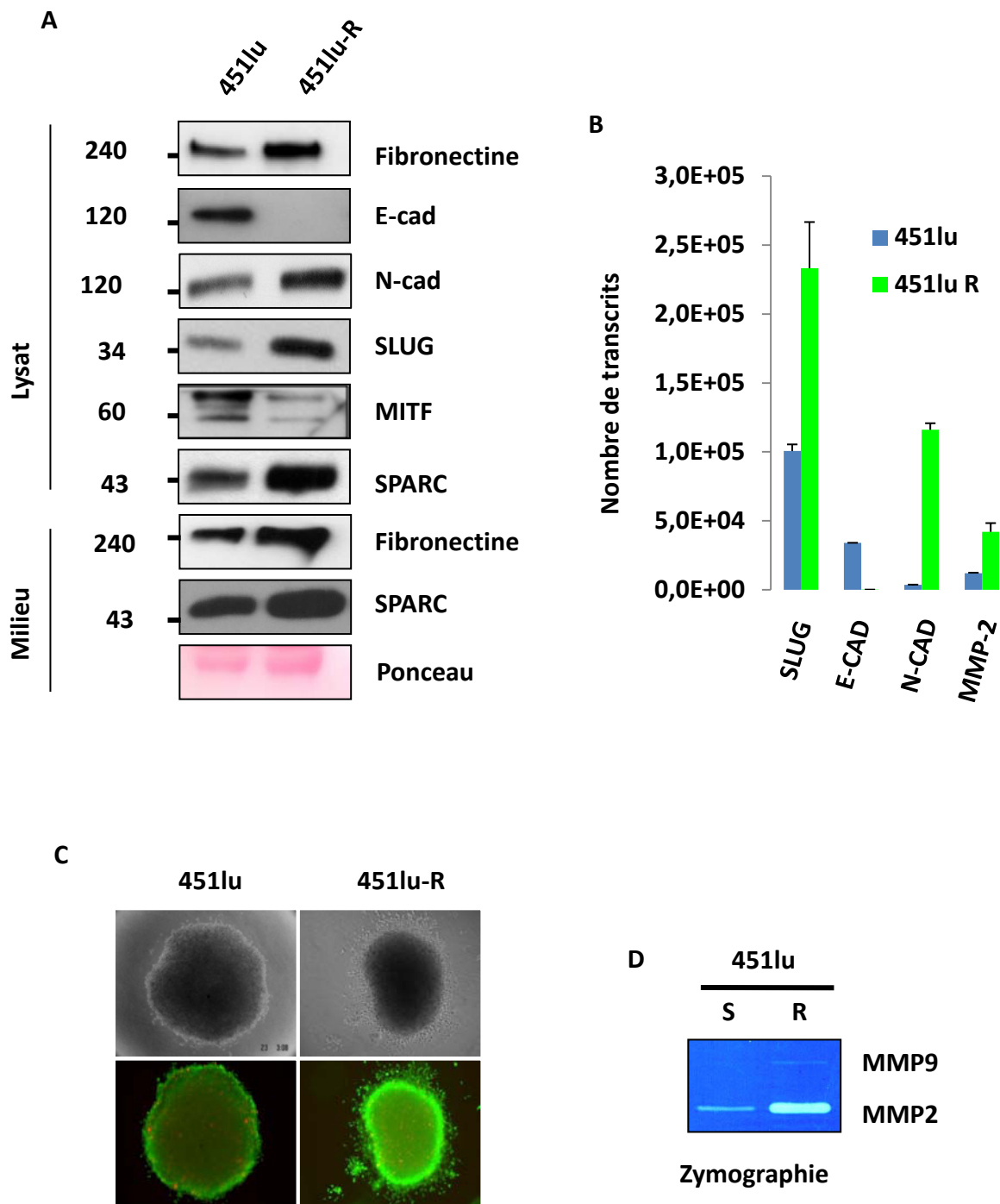


Figure D5: Phénotype invasif des cellules de mélanome 451lu devenues résistantes au Dabrafénib (SB-590885) (451lu-R).

(A) (B) Le profil d'expression de marqueurs de la commutation phénotypique et de la transition de type épithélio-mésenchymateuse a été analysé dans les cellules de mélanomes 451lu devenues résistantes au SB590885 (451lu-R), comparativement à leur lignée parentale sensible (451lu), par western blot et par RT-qPCR. **(C)** Capacités d'invasion en 3D des cellules 451lu-R comparativement aux cellules 451lu-S. Des sphéroïdes de cellules 451lu-R ou 451lu-S ont été incluses dans une matrice de collagène, et la capacité des cellules à dégrader cette matrice pour envahir le système en 3D a été évalué par photographie 4 jours post-inclusion des sphéroïdes dans la matrice. La visualisation des cellules vivantes (en vert) et morte (en rouge) s'est faite par un marquage « Live/dead ».

(D) Détection des métalloprotéases actives dans le milieu conditionné des cellules 451lu-R et des cellules 451lu-S, par zymographie.

qui a été décrit dans les lignées de mélanome « sensibles » aux inhibiteurs de BRAF^{V600} déplétées de SPARC (A375 ou 1205lu) (Fenouille et al. 2011b).

SPARC intracellulaire et/ou sécrétée ?

Comme cela a été discuté précédemment, dans le cas de la résistance innée au Vémurafénib nos résultats laissent penser que les cellules de mélanome « High SPARC » peuvent transmettre leur résistance aux Vémurafénib aux cellules sensibles via la protéine SPARC sécrétée et/ou intracellulaire.

Dans le cas de la résistance acquise au Vémurafénib des m229-R, des résultats préliminaires suggèrent que le sécrétome des cellules résistantes n'est pas capable de transmettre une résistance aux cellules sensibles face au Vémurafénib, à court terme. En effet, après avoir mis en culture des cellules m229 sensibles au Vémurafénib en présence de milieu conditionné de m229-R résistantes durant 72h, aucune protection vis-à-vis de l'effet antiprolifératif du Vémurafénib n'est observée (résultat non montré). Cette observation nous laisse également penser que dans la résistance acquise au Vémurafénib la protéine SPARC n'est pas impliquée lorsqu'elle est sécrétée. SPARC aurait un rôle intracellulaire dans l'acquisition d'une résistance au Vémurafénib, même si les cellules de mélanome continuent à la sécréter. D'après les données de la littérature sur la protéine SPARC, cette hypothèse est tout à fait envisageable. En effet, capable d'interagir directement avec des acteurs intracellulaires (Song et al. 2010, Tripathi and Mishra 2010), SPARC peut moduler la chimiorésistance de certains cancers tels que la LMC, les cancers du sein, du pancréas ou du colon avec un rôle intracrine (Fenouille et al. 2010, Rahman et al. 2011, Tang and Tai 2007).

Finalement, nos résultats soulignent l'importance de la voie de survie AKT dans la résistance acquise et innée des mélanomes aux inhibiteurs de BRAF^{V600} mise en évidence dans la littérature (Paraiso et al. 2011, Shi et al. 2014a, Shi et al. 2014b), et permettent d'ajouter la protéine SPARC, en tant que facteur microenvironnemental de pro-survie, à la listes des régulateurs clés (RTKs, PTEN, etc) de cette voie dans la résistance thérapeutique des mélanomes.

➤ SPARC, invasion et résistance thérapeutique ?

De précédentes études du laboratoire (Fenouille and Tartare-Deckert, résultats non publiés) et de la littérature ont montré que les cellules de mélanome étaient capables de moduler l'expression de SPARC pour acquérir un phénotype de plus en plus invasif au cours de la progression tumorale des mélanomes (Alonso et al. 2007, Fenouille et al. 2012, Sturm et al. 2002, Tichet et al. 2015).

Au cours de nos recherches, nous avons pu constater que les lignées de mélanome 451lu-R, mel1617-R et 229-R ayant acquis, *in vitro*, une résistance aux thérapies ciblant l'oncogène BRAF^{V600} et surexprimant SPARC comparativement à leur lignées parentales, présentaient un phénotype invasif. En effet, comme le montre la Figure D5, comparativement à leur lignée parentale, les 451lu-R présentent une augmentation de l'expression de marqueurs mésenchymateux dont SLUG (effecteur de SPARC dans l'induction de capacités migratoires et invasives des mélanomes), ainsi qu'un « switch » de cadhérines de la E vers la N indiquant l'acquisition d'une TEM, et sont dotées de capacité d'invasion *in vitro* et *in vivo* (résultat non montré) que les cellules 451lu parentales ne possèdent pas. D'autre part, les lignées 451lu-R, mel1617-R et 229-R montrent une diminution de l'expression protéique de MITF comparativement à leurs lignées parentales.

Ces résultats sont en accord avec la littérature, puisqu'en effet, ces dernières années plusieurs groupes de recherche ont associé la résistance des mélanomes aux inhibiteurs de BRAF^{V600} à l'adoption d'un phénotype invasif du mélanome (Anastas et al. 2014, Kemper et al. 2014, Muller J. et al. 2014, Sanchez-Laorden et al. 2014). En particulier, la variation d'expression de *MITF* joue un rôle prépondérant dans la survie et la progression des mélanomes vers des stades métastatiques face aux thérapies ciblant BRAF^{V600}. L'état cellulaire « MITF Low » est associé à l'acquisition par les mélanomes d'un phénotype de « cellules initiateurs de tumeurs » et de résistance aux thérapies ((Cheli et al. 2011, Konieczkowski et al. 2014, Muller J. et al. 2014). De plus, après injection à des souris d'une lignée B16 de cellules de mélanome (voie intraveineuse), l'élimination d'une population cellulaire « MITF Low » (existante chez cette lignée B16) par action d'un agent pharmacologique diminue le développement de métastases dans ces souris (Cheli et al. 2011). Cette dernière étude, menée par le Dr. Ballotti en collaboration avec le Dr. Tartare-Deckert, a également montré que l'extinction de MITF par interférence à l'ARN, ou l'hypoxie, dans les cellules de mélanome est associée à un phénotype mésenchymateux, marqué notamment par l'augmentation de l'expression et de la sécrétion de la protéine SPARC et de SNAIL (un second effecteur de SPARC dans l'induction de capacités migratoires et invasives des mélanomes) (Cheli et al. 2011). D'autre part, au laboratoire nous avons pu observer que les cellules mel501 SPARC, plus résistantes au Vémurafénib que les mel501 CTRL, sont devenues plus invasives et métastatiques que les mel501 CTRL (Fenouille et al. 2012, Tichet et al. 2015). Ainsi, compte tenu de nos travaux et de la littérature, SPARC pourrait être associée au « switch » phénotypique MITF-dépendant à l'origine du phénotype invasif et résistant aux thérapies des mélanomes métastatiques.

3. Rôle des fibroblastes des ganglions lymphatiques dans la résistance des mélanomes métastatiques aux thérapies ciblant l'oncogène BRAF^{V600}.

Comme les autres cancers, le mélanome se développe et évolue au sein d'un microenvironnement dynamique. Au sein de ce microenvironnement tumoral, les cellules de mélanomes peuvent interagir avec de nombreuses cellules stromales (cellules immunitaires, cellules endothéliales, fibroblastes, etc) mais également avec les composants de la matrice extracellulaire (MEC). Cette MEC est en majorité produite et remodelée par les fibroblastes infiltrant, en masse, la tumeur (MAF, Melanoma-Associated fibroblast). La MEC comprend de nombreuses molécules impliquées dans sa structure, dans l'adhésion cellulaire, dans son remodelage, ou encore dictant ses propriétés physicochimiques (collagène, fibronectine, acide hyaluronique, élastine, SPARC, etc) (Mouw et al. 2014). Récemment, le groupe du Dr. Sahai a montré, qu'à côté du rôle des facteurs solubles du microenvironnement dans la résistance thérapeutique des mélanomes (Straussman et al. 2012), le remodelage de la MEC vers une MEC plus « rigide » (en terme de tension mécanique) conduit à la résistance des cellules de mélanome face au Vémurafénib. De plus, ce groupe montre que ce remodelage matriciel est supporté par des MAFs issus de tumeurs primaires (MAF dermiques), hyper-activés sous traitement au Vémurafénib (Hirata et al. 2015). Le stroma environnant les cellules de mélanome peut donc avoir un rôle prépondérant dans la résistance de ces cellules face aux inhibiteurs de BRAF^{V600}.

Dans le mélanome, le microenvironnement lymphatique semble jouer un rôle primordial dans la progression tumorale. Premiers sites d'arrivée des métastases, et riches en facteurs inflammatoires, les ganglions lymphatiques représentent une niche métastatique permissive aux cellules de mélanomes. Cependant, le rôle de cette niche lymphatique, et plus particulièrement

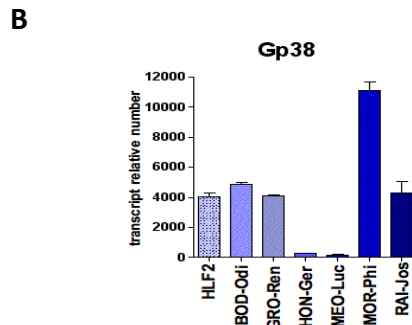
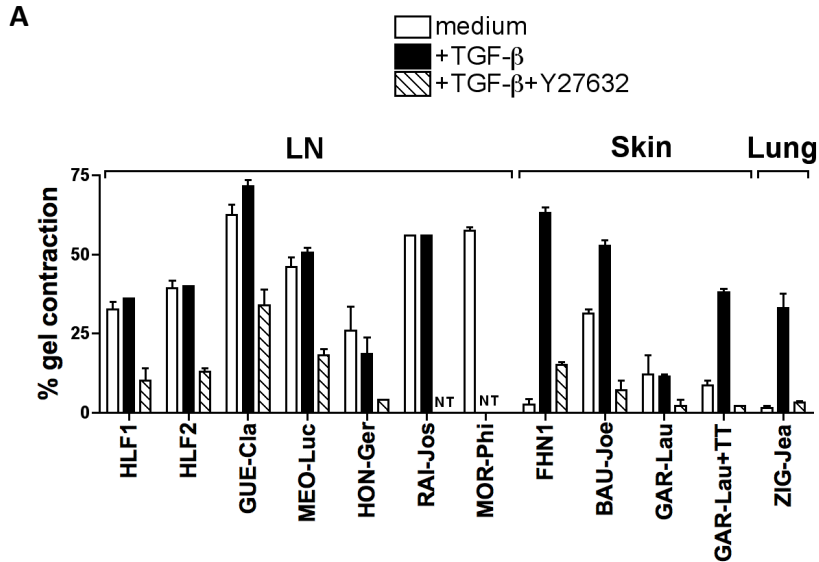


Figure D6: Phénotype contractile TGF β indépendant des fibroblastes ganglionnaires.

(A) L'activité contractile des fibroblastes lymphatiques (Fibroblastes réticulaires de ganglion (HLF2) ou MAFs (Melanoma Associated Fibroblasts) de ganglion), de fibroblastes dermiques (fibroblastes de peau humaine (Skin-FHN) ou MAFs dermiques) a été évaluée par un test de contraction sur gel. Des fibroblastes pulmonaires (CAF (Carcinoma Associated Fibroblasts) pulmonaires) obtenus par une collaboration avec le Dr Gaggioli (IRCAN) ont été également analysés en contrôle. Les fibroblastes sont insérés dans un gel (matrigel+collagène) en présence ou non de TGF β et/ou d'un inhibiteur de ROCK (Y27632), puis à la fin de l'expérience le pourcentage de rétractation du gel est calculé par rapport à la surface initiale du gel. (B) Le profil d'expression des fibroblastes lymphatiques a été analysé par RT-qPCR.

des fibroblastes qui y résident et s'associent au mélanome, dans la survie et résistance thérapeutique des mélanomes est peu exploré.

Dans l'organisme, les ganglions sont les sites où se rencontrent et interagissent les lymphocytes T (LT) et les cellules présentatrices d'antigène (DC, pour dendritic cell) pour initier la réponse immunitaire adaptative (Junt et al. 2008, Katakai et al. 2004)). Cette interaction entre LT et DC a pour support un réseau matriciel réticulé permettant à la fois la migration des LTs et des DCs, et la filtration et le transport de la lymphe dans les ganglions (Katakai et al. 2004). Ce réseau est produit, agencé, maintenu et remodelé par les FRCs (pour, fibroblastic reticular cells), fibroblastes résidents des ganglions. La caractéristique majeure de ces FRCs, qui les différencie des autres fibroblastes, est leur capacité à contracter spontanément le collagène de la MEC. De ce fait, les ganglions présentent un réseau matriciel sous tension mécanique. Cependant, dans un contexte d'infection ou d'inflammation, les FRCs induisent un relâchement réversible du tissu ganglionnaire à l'origine de l'augmentation du volume des ganglions (également due à l'infiltration et la prolifération de lymphocytes et au remodelage vasculaire). Récemment, deux études ont montré que cette élasticité ganglionnaire médiée par les FRCs est régulée par l'interaction de ces derniers avec les DCs (Acton et al. 2014, Astarita et al. 2015). Ainsi, dans un contexte « au repos » (sans infection ou inflammation) les FRCs sont capables de contracter une matrice de collagène via leur forte expression de la glycoprotéine transmembranaire Podoplanine (PDPN, ou gp38) qui induit une contraction « actine-myosine ». En revanche, dans un contexte d'infection ou d'inflammation, les DCs qui infiltrent les ganglions interagissent directement avec les FRCs via l'expression du récepteur de la PDPN, CLEC-2 (pour, C-type lectin receptor), et perturbent ainsi l'activité contractile des FRCs PDPN-dépendante, ce qui a pour conséquence un relâchement du tissu ganglionnaire (Acton et al. 2014, Astarita et al. 2015).

Si le rôle des FRCs ganglionnaires dans la réponse immunitaire commence à être bien caractérisé, leur rôle dans la survie et la résistance thérapeutique des mélanomes au niveau des ganglions n'est pas connu.

Au laboratoire nous avons donc investigué l'implication de ces FRCs (HLF, pour Human Lymphatic Fibroblast), mais également celui des MAFs ganglionnaires (Melanoma-Associated Fibroblast) en tant que cellules dérivées en partie des FRCs résidents, dans la résistance des mélanomes à l'inhibition de BRAF^{V600}.

Dans un premier temps nos études préliminaires ont révélé un profil général des MAFs ganglionnaires (issus de biopsies de métastases ganglionnaires de patients), très proche de celui des FRC/HLF (pour Human Lymphatic Fibroblast), mais considérablement différent de celui des MAFs dermiques (issus de biopsies de métastases dermiques). En effet, comme les FRC/HLF, les MAFs ganglionnaires sont capables de contracter une matrice artificielle composée de matrigel et de collagène (Figure D6A). Cette capacité contractile des FRC/HLF et des MAFs est perdue en présence d'un inhibiteur de la kinase ROCK, montrant la dépendance à cette kinase pour l'activité contractile des fibroblastes, comme il a été montré pour les CAFs (Carcinoma Associated fibroblast) (Albregues et al. 2014, Sanz-Moreno et al. 2011). En revanche, contrairement aux fibroblastes dermiques ou aux CAFs pulmonaires qui nécessitent la présence du TGF β pour acquérir la propriété contractile caractéristique des myofibroblastes (fibroblastes activés), les fibroblastes ganglionnaires FRC/HLF ou MAFs sont capables de contracter la matrice artificielle en l'absence du morphogène (Figure D6A). La gp38 ayant été décrite comme intervenant dans la contraction de FRCs, nous avons analysé le profil d'expression des ARNm de 6 populations de

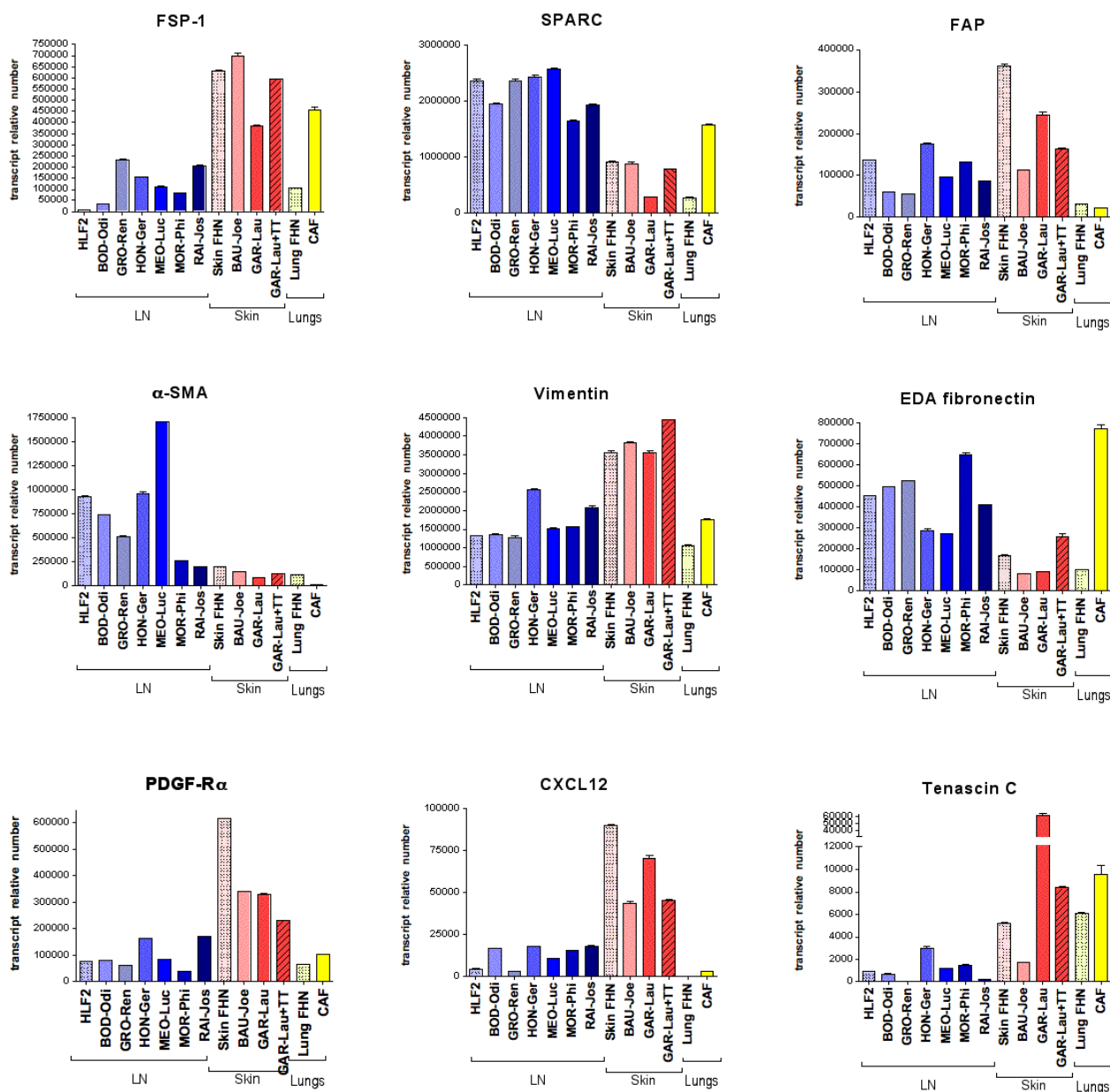


Figure D7: Contraste du profil d'expression de différents marqueurs entre fibroblastes ganglionnaires et fibroblastes dermiques.

Les RT-qPCR ont été réalisées sur des ARNm extraits à partir de fibroblastes lymphatiques (Fibroblastes réticulaires de ganglion (HLF2) ou MAFs (Melanoma Associated Fibroblasts) de ganglion), de fibroblastes dermiques (fibroblastes de peau humaine (Skin-FHN) ou MAFs dermiques), ou de fibroblastes pulmonaires (fibroblastes de poumon (Lung-FHN) ou CAFs (Carcinoma Associated Fibroblasts) pulmonaires).

MAFs ganglionnaires par RT-qPCR. Nous avons alors observé que 4 d'entre elles expriment effectivement la gp38, cependant les deux populations restantes MEO-Luc et HON-Ger ne l'expriment presque pas alors qu'elles sont capables dotées de capacités contractiles importantes (Figure D6B). Une étude de la capacité contractile des MAFs dans des conditions de délétion de la gp38 par siARN nous permettrait ainsi de préciser l'importance de la gp38 dans la propriété contractile des fibroblastes ganglionnaires. Une analyse transcriptomique nous permettrait d'autre part d'identifier des marqueurs caractéristiques de ces MAFs ganglionnaires.

Après analyse par RT-qPCR, nous avons constaté que le profil d'expression des ARNm de ces MAFs ganglionnaires est inversé par rapport à celui des fibroblastes dermiques ou pulmonaires pour de nombreux marqueurs (Figure D7). De plus, les MAFs ganglionnaires comme les FRC/HLF surexpriment certains marqueurs des fibroblastes activés tels que l' α SMA, l'EDA-fibronectine qui favorise le déplacement cellulaire lorsqu'elle est présente dans la MEC, ou encore la protéine SPARC (Figure D7).

Ces résultats montrent que les fibroblastes ganglionnaires possèdent plusieurs propriétés des fibroblastes activés isolés de foyers tumoraux.

Nous avons donc ensuite évalué l'impact que pouvaient avoir ces fibroblastes ganglionnaires dans la résistance des cellules de mélanome au Vémurafénib.

Pour ce faire, nous avons « modélisé », *in vitro*, une matrice 3D générée par des fibroblastes (Fibroblast-Derived Matrix, FDM) lymphatiques (HLF et MAF) (Figure D8A) selon le protocole de (Beacham et al. 2007). Comme le montre la Figure D8B, ces FDM présentent un réseau fibrillaire dense de collagène et de fibronectine. Deux jours après avoir cultivé des cellules de mélanome plus ou moins sensibles au Vémurafénib sur ces FDM nous avons observé que les cellules adoptent alors une morphologie différente de celle qu'elles peuvent avoir sur des boîtes de culture plastique « classiquement » utilisées : sur FDM, elles adoptent une morphologie plus allongée et une forme anisotrope, alors que la culture sur plastique (associée à une forte rigidité) leur impose une polarité artificielle et une forme aléatoire non orientée (Figure D8C).

Nous avons ensuite montré que, face aux effets antiprolifératifs du Vémurafénib, la FDM des HLF et des MAF confère une résistance aux cellules de mélanome ayant adhéré à cette FDM en maintenant leur capacité à progresser dans leur cycle cellulaire : sous PLX4032 (Vémurafénib), l'adhérence des cellules mel501 et 1205lu à ces FDM prévient l'inhibition des kinases ERKs (maintien de la phosphorylation activatrice des ERKs), la diminution de l'expression de la Cycline D1, et l'induction de p27 (inhibiteur du cycle cellulaire), induites sous PLX4032 dans ces mêmes cellules lorsqu'elles sont cultivées sur boîte de plastique (Figure D8D). Ce travail est actuellement poursuivi dans l'équipe, et une analyse du cycle cellulaire et de la prolifération des cellules cultivées sur FDM confirme la protection que confère les matrices aux cellules de mélanome face aux effets anti-prolifératifs du Vémurafénib (résultats non montrés).

Ainsi, il semble que les fibroblastes de ganglions, sains ou associés au mélanome, sécrètent une MEC permissive à la CAM-DR (Cell Adhesion-Mediated Drug Resistance) des mélanomes. A noter que les fibroblastes ganglionnaires expriment fortement la protéine matricielle SPARC (Figure D7), dont nous avons montré le rôle dans la résistance des mélanomes au Vémurafénib lorsqu'elle est produite par les cellules de mélanome. Il n'est donc pas exclu que la résistance au Vémurafénib apportée par les FDM de ces fibroblastes aux cellules de mélanome soit en partie conférée par le SPARC fibroblastique matriciel. De plus, l'importance de la protéine SPARC dans l'assemblage de la MEC (Chlenski and Cohn 2010, Clark and Sage 2008) nous laisse suggérer que le

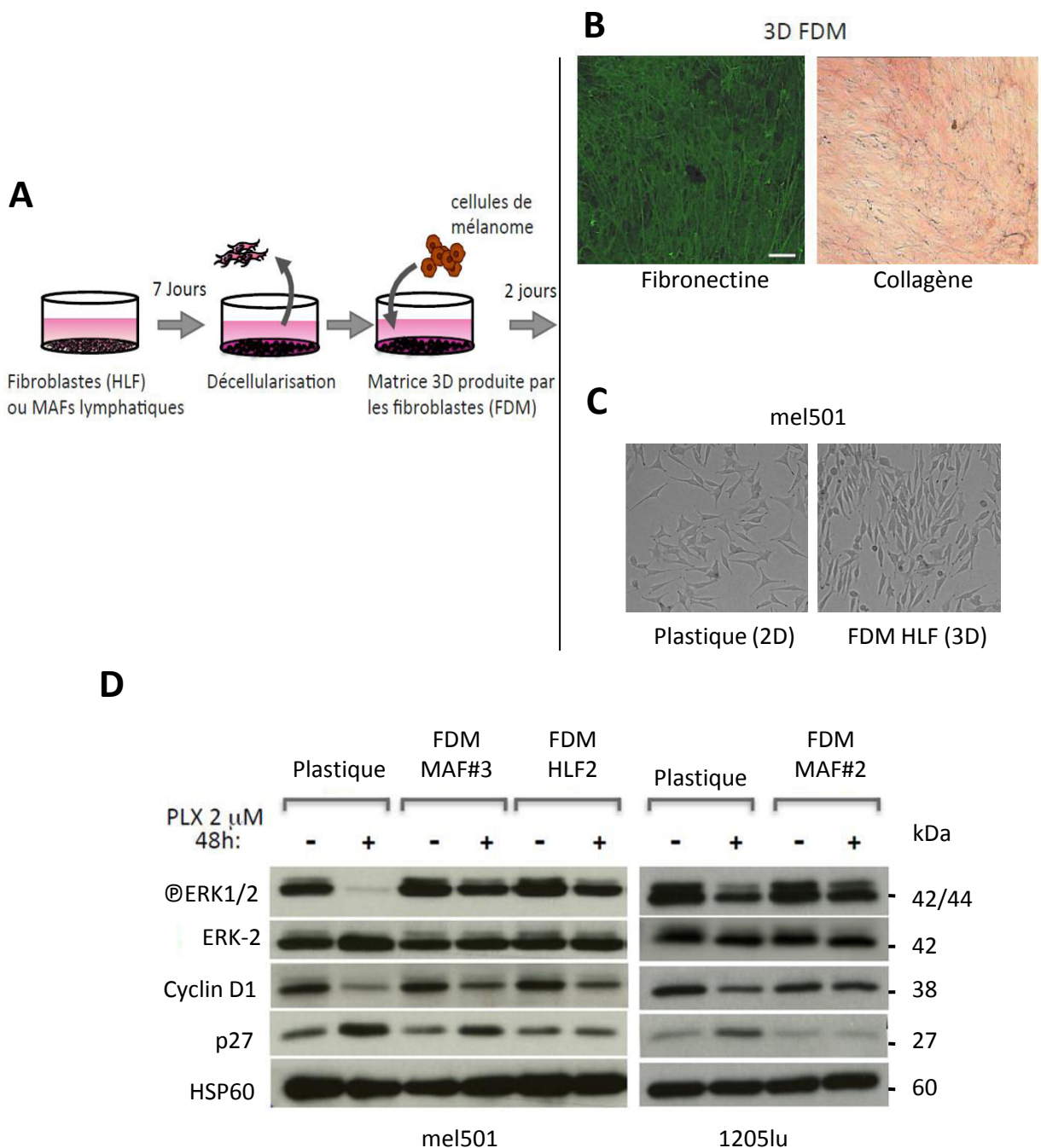


Figure D8: Face au Vemurafenib, la matrice 3D générée par des fibroblastes ganglionnaires confère une protection aux cellules de mélanome « Low-SPARC » (mel501) et « High-SPARC » (1205lu).

(A) Schéma expérimental de production de matrice de fibroblastes (FDM, pour Fibroblast-Derived Matrix) à partir de fibroblastes réticulaires de ganglions lymphatique (HLF, pour Human Lymphatic Fibroblast) ou de MAF (pour Melanoma-Associated Fibroblast) isolés à partir de biopsies de métastases lymphatiques de mélanome. (B) Analyse des FDM produites. Marquage par immunofluorescence des fibres de fibronectine et coloration des fibres de collagène (types I et III) au Sirius Red. (C) Morphologie des cellules 501mel cultivées 2 jours sur plastique ou sur FDM. (D) Les cellules de mélanome 501mel ou 1205lu ont été cultivées sur plastique ou sur différentes FDM et traitées ou non avec 2 μ M de PLX4032 pendant 48h. La phosphorylation des kinases ERKs et les niveaux de l'inhibiteur du cycle p27 et de la cycline D1 ont ensuite été analysés par western blot.

SPARC fibroblastique est aussi impliqué, indirectement, dans la résistance FDM-dépendante conférée par les fibroblastes ganglionnaires aux cellules de mélanome face au Vémurafénib. Par conséquent, des expériences similaires à celle que nous avons réalisées mais avec une approche d'extinction de la protéine SPARC fibroblastique nous permettraient d'investiguer le rôle de SPARC dans la résistance thérapeutique des mélanomes au niveau du foyer métastatique ganglionnaire.

4. SPARC comme nouveau marqueur dans le suivi thérapeutique du mélanome.

Les recherches menées sur l'implication de SPARC dans les cancers montrent que cet adaptateur entre les cellules cancéreuses et leur stroma peut être une cible thérapeutique de choix dans de nombreux cancers tels que le cancer du sein, du pancréas, du poumon, ou encore le mélanome. Le développement de peptides mimétiques et compétiteurs de SPARC, ou d'anticorps monoclonaux « bloquants », ciblant spécifiquement les interactions entre SPARC et ses partenaires (en particulier au sein de la tumeur), est encore aujourd'hui un défi pour la recherche fondamentale (Chlenski et al. 2004, Chlenski et al. 2010, Tai and Tang 2008, Weaver et al. 2008), qui se révélera difficile à transposer en clinique chez les patients.

La protéine SPARC circule dans le système sanguin, et est facilement dosable sur échantillons de sang (Tichet et al. 2015). Compte tenu de l'échelle de variation de la valeur du SPARC sanguin directement liée à l'état général des individus atteints de mélanome comme à celui d'individus sains, la protéine SPARC ne peut constituer un marqueur prédictif fiable de la réponse primaire du patient aux thérapies anti-mélanome (chimiothérapies et thérapies ciblant la voie RAF-MEK-ERK).

Cependant, en collaboration avec le service de dermatologie et le service de radiologie de l'hôpital de l'Archet de Nice, l'évaluation parallèle de l'évolution du SPARC sérique, des critères RECIST 1.1 (pour, Response Evaluation Criteria in Solid Tumors)²², et de la réponse thérapeutique globale de plusieurs patients atteints de mélanomes métastatiques mutés BRAF^{V600} sous thérapies ciblant la voie RAF-MEK-ERK, nous a permis de suggérer l'utilisation du dosage sérique de SPARC dans le suivi thérapeutique de ces patients. En effet, sur quatre patients atteints de mélanomes métastatiques mutés BRAF^{V600} et recevant une ou plusieurs thérapies ciblant la voie RAF-MEK-ERK, nous avons mis en évidence une corrélation entre le niveau de la protéine SPARC sérique et la réponse globale au traitement mis en place : la stabilisation du niveau sérique de SPARC est associée à une stabilisation de la maladie ou une réponse complète du patient sous thérapie (cas du patient 2 et du patient 4), alors qu'une augmentation de son niveau est associée à une progression ou rechute du mélanome sous traitement (cas du patient 1 et du patient 3) (Figure 7 de l'article n°1). A noter que la variation du niveau sérique de SPARC ne suit pas nécessairement celle du RECIST 1.1 mais peut indiquer l'apparition de métastases cérébrales (cas du patient 3).

Ainsi, un dosage non invasif et économique du SPARC sérique pourrait représenter un indicateur de la réponse thérapeutique ou de l'éventuelle rechute individuelle des patients atteints de mélanomes métastatiques mutés BRAF^{V600} sous thérapies ciblant la voie RAF-MEK-ERK, et ce, indépendamment des critères RECIST.

²² En 2000, les organismes européen, américain et canadien de recherche sur le cancer ont défini les critères RECIST pour évaluer l'efficacité des thérapies anticancéreuses en se basant sur la mesure de la taille des lésions tumorales (dans le cas des tumeurs solides uniquement). Ces critères sont basés sur la mesure du plus grand diamètre des lésions tumorales d'un patient, distinguant alors deux types de lésions : les lésions cibles, dont le plus grand diamètre est ≥ 10 mm et dont les limites sont suffisamment bien définies pour que leur mesure soit considérée comme fiable (la somme

totale des plus grandes longueurs de toutes les lésions « cibles » choisies est calculée et sert de référence), et les lésions « non cibles », trop petites (< 10 mm) ou dont la mesure est considérée comme non fiable car les limites sont difficiles à définir. A l'aide de ces critères, les cliniciens dressent une liste exhaustive des lésions avant le début du traitement, qu'elles soient primitives ou secondaires. Ces lésions sont ensuite suivies sur les examens ultérieurs afin de déterminer si elles répondent, ou non, au traitement. Lors des examens de suivi du patient, la réponse globale au traitement sera définie par l'évolution des critères RECIST mais également par l'apparition ou non de nouvelles lésions dont les critères RECIST ne tiennent pas compte; d'où la possibilité d'observer une progression de la maladie d'un patient, malgré une stabilisation ou une diminution de son RECIST. C'est le cas du patient 1 et du patient 3, alors que leur RECIST n'a cessé de diminuer ou s'est stabilisé au cours du traitement, ils ont malheureusement fini par rechuter (décès du patient 3, et progression de la maladie chez le patient 1). A eux seuls, les critères RECIST ne peuvent renseigner la réponse globale du patient à un traitement.

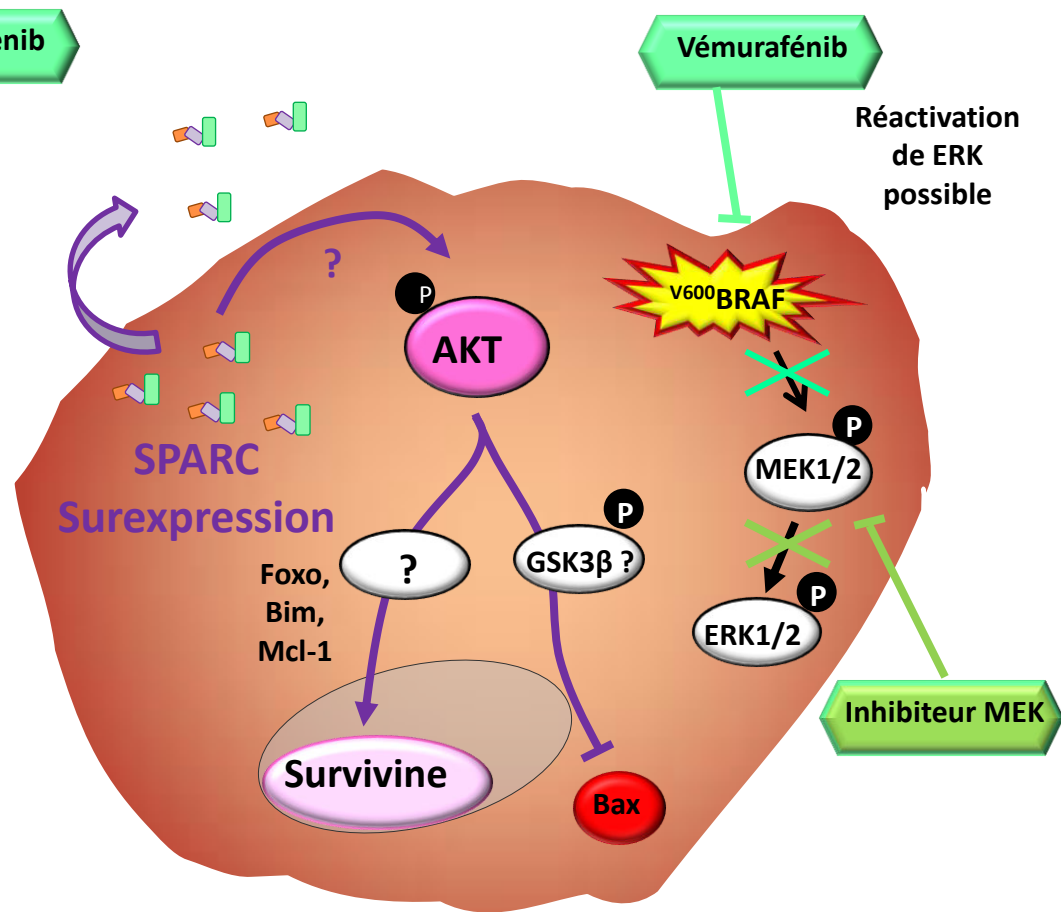
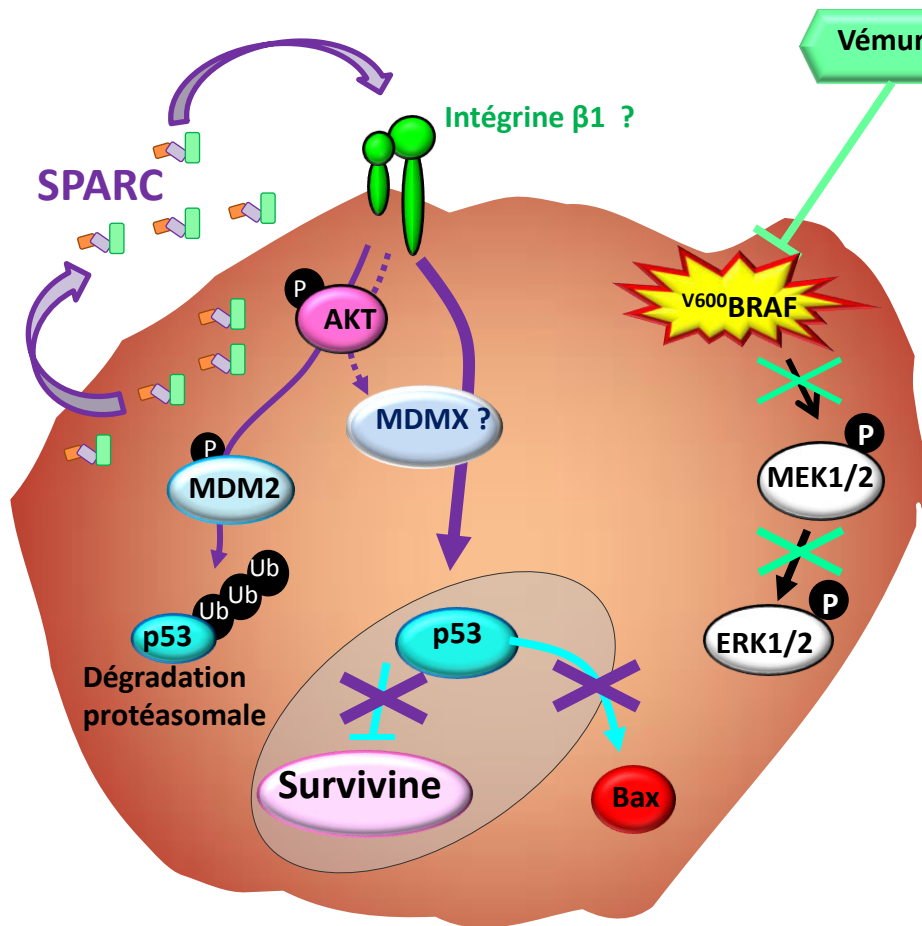


Schéma de conclusion : Mécanismes d'action SPARC-dépendants dans la résistance INNEE ou ACQUISE aux inhibiteurs de BRAF^{V600}.

CONCLUSION

Mes travaux de thèse ont permis de mettre en évidence un nouveau rôle de la protéine matricellulaire SPARC dans la résistance innée et acquise des mélanomes aux thérapies ciblant BRAF^{V600}. Nous avons également montré l'importance du microenvironnement lymphatique, en particulier des fibroblastes (fibroblastes réticulaires résidents et fibroblastes associés aux métastases ganglionnaires de mélanome), dans cette résistance.

D'une part, mes travaux montrent que le niveau d'expression protéique de SPARC est capable de moduler *in vitro* la sensibilité des cellules de mélanomes aux chimiothérapies et aux thérapies ciblant la voie BRAF^{V600}/MEK en régulant le suppresseur de tumeur p53 : en particulier, une forte expression de SPARC (endogène ou ectopique) confère une protection aux cellules de mélanome contre les effets antiprolifératifs et cytotoxiques du Vémurafénib, et cette protection SPARC-dépendante peut être transmise aux cellules de mélanome sensibles. De plus, nos travaux réalisés en collaboration avec le centre hospitalier universitaire de l'Archet à Nice montrent une corrélation entre les niveaux sériques de SPARC des patients atteints de mélanome avec leur évolution clinique sous traitement (inhibiteurs de la voie BRAF^{V600}/MEK).

D'autre part, mes travaux nous ont permis d'identifier la surexpression protéique de SPARC comme nouvel évènement inducteur de l'activation de la voie AKT associé à l'acquisition d'une résistance aux Vémurafénib ou au Dabrafénib.

Enfin, à travers l'étude préliminaire des propriétés des fibroblastes lymphatiques et de leur influence sur le comportement des cellules de mélanome face au Vémurafénib, nous avons pu montrer pour la première fois l'importance de la composante matricielle de la niche lymphatique dans la résistance thérapeutique des mélanomes métastatiques.

Ces travaux soulignent le rôle du microenvironnement dans la résistance innée ou acquise des mélanomes aux thérapies ciblées et, en particulier, nous permettent de proposer la protéine SPARC comme nouveau marqueur de suivi thérapeutique, et comme cible thérapeutique potentielle à l'interface des cellules tumorales avec leur stroma.

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

Abdel-Wahab O, et al. 2014. Efficacy of intermittent combined RAF and MEK inhibition in a patient with concurrent BRAF- and NRAS-mutant malignancies. *Cancer Discov* 4: 538-545.

Ackermann J, Fruttschi M, Kaloulis K, McKee T, Trumpp A, Beermann F. 2005. Metastasizing melanoma formation caused by expression of activated N-RasQ61K on an INK4a-deficient background. *Cancer Res* 65: 4005-4011.

Acton SE, et al. 2014. Dendritic cells control fibroblastic reticular network tension and lymph node expansion. *Nature* 514: 498-502.

Adams JM, Cory S. 2007. Bcl-2-regulated apoptosis: mechanism and therapeutic potential. *Curr Opin Immunol* 19: 488-496.

Albinet V, Bats ML, Huwiler A, Rochaix P, Chevreau C, Segui B, Levade T, Andrieu-Abadie N. 2014. Dual role of sphingosine kinase-1 in promoting the differentiation of dermal fibroblasts and the dissemination of melanoma cells. *Oncogene* 33: 3364-3373.

Albino AP, Le Strange R, Oliff AI, Furth ME, Old LJ. 1984. Transforming ras genes from human melanoma: a manifestation of tumour heterogeneity? *Nature* 308: 69-72.

Albino AP, Nanus DM, Mentle IR, Cordon-Cardo C, McNutt NS, Bressler J, Andreeff M. 1989. Analysis of ras oncogenes in malignant melanoma and precursor lesions: correlation of point mutations with differentiation phenotype. *Oncogene* 4: 1363-1374.

Albino AP, Vidal MJ, McNutt NS, Shea CR, Prieto VG, Nanus DM, Palmer JM, Hayward NK. 1994. Mutation and expression of the p53 gene in human malignant melanoma. *Melanoma Res* 4: 35-45.

Albregues J, Bourget I, Pons C, Butet V, Hofman P, Tartare-Deckert S, Feral CC, Meneguzzi G, Gaggioli C. 2014. LIF mediates proinvasive activation of stromal fibroblasts in cancer. *Cell Rep* 7: 1664-1678.

Allinen M, et al. 2004. Molecular characterization of the tumor microenvironment in breast cancer. *Cancer Cell* 6: 17-32.

Alonso SR, et al. 2007. A high-throughput study in melanoma identifies epithelial-mesenchymal transition as a major determinant of metastasis. *Cancer Res* 67: 3450-3460.

Alvarez MJ, Prada F, Salvatierra E, Bravo AI, Lutzky VP, Carbone C, Pitossi FJ, Chuluyan HE, Podhajcer OL. 2005. Secreted protein acidic and rich in cysteine produced by human melanoma cells modulates polymorphonuclear leukocyte recruitment and antitumor cytotoxic capacity. *Cancer Res* 65: 5123-5132.

Amatschek S, et al. 2004. Tissue-wide expression profiling using cDNA subtraction and microarrays to identify tumor-specific genes. *Cancer Res* 64: 844-856.

An X, Tiwari AK, Sun Y, Ding PR, Ashby CR, Jr., Chen ZS. 2010. BCR-ABL tyrosine kinase inhibitors in the treatment of Philadelphia chromosome positive chronic myeloid leukemia: a review. *Leuk Res* 34: 1255-1268.

Anastas JN, et al. 2014. WNT5A enhances resistance of melanoma cells to targeted BRAF inhibitors. *J Clin Invest* 124: 2877-2890.

Anforth R, Carlos G, Clements A, Kefford R, Fernandez-Penas P. 2015. Cutaneous adverse events in patients treated with BRAF inhibitor-based therapies for metastatic melanoma for longer than 52 weeks. *Br J Dermatol* 172: 239-243.

Aparicio S, Caldas C. 2013. The implications of clonal genome evolution for cancer medicine. *N Engl J Med* 368: 842-851.

- Arnold SA, Brekken RA. 2009. SPARC: a matricellular regulator of tumorigenesis. *J Cell Commun Signal* 3: 255-273.
- Astarita JL, et al. 2015. The CLEC-2-podoplanin axis controls the contractility of fibroblastic reticular cells and lymph node microarchitecture. *Nat Immunol* 16: 75-84.
- Atorrasagasti C, et al. 2013. Lack of the matricellular protein SPARC (secreted protein, acidic and rich in cysteine) attenuates liver fibrogenesis in mice. *PLoS One* 8: e54962.
- Avril MF, et al. 2004. Fotemustine compared with dacarbazine in patients with disseminated malignant melanoma: a phase III study. *J Clin Oncol* 22: 1118-1125.
- Avruch J, Khokhlatchev A, Kyriakis JM, Luo Z, Tzivion G, Vavvas D, Zhang XF. 2001. Ras activation of the Raf kinase: tyrosine kinase recruitment of the MAP kinase cascade. *Recent Prog Horm Res* 56: 127-155.
- Aycock RL, Bradshaw AC, Sage EH, Starcher B. 2004. Development of UV-induced squamous cell carcinomas is suppressed in the absence of SPARC. *J Invest Dermatol* 123: 592-599.
- Azim HA, Jr., Singhal S, Ignatiadis M, Desmedt C, Fumagalli D, Veys I, Larsimont D, Piccart M, Michiels S, Sotiriou C. 2013. Association between SPARC mRNA expression, prognosis and response to neoadjuvant chemotherapy in early breast cancer: a pooled in-silico analysis. *PLoS One* 8: e62451.
- Bai T, Chen CC, Lau LF. 2010. Matricellular protein CCN1 activates a proinflammatory genetic program in murine macrophages. *J Immunol* 184: 3223-3232.
- Bales ES, et al. 1999. High levels of expression of p27KIP1 and cyclin E in invasive primary malignant melanomas. *J Invest Dermatol* 113: 1039-1046.
- Balsamo M, et al. 2009. Melanoma-associated fibroblasts modulate NK cell phenotype and antitumor cytotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 20847-20852.
- Barker TH, et al. 2005. SPARC regulates extracellular matrix organization through its modulation of integrin-linked kinase activity. *J Biol Chem* 280: 36483-36493.
- Bastiaens MT, ter Huurne JA, Kielich C, Gruis NA, Westendorp RG, Vermeer BJ, Bavinck JN. 2001. Melanocortin-1 receptor gene variants determine the risk of nonmelanoma skin cancer independently of fair skin and red hair. *Am J Hum Genet* 68: 884-894.
- Beacham DA, Amatangelo MD, Cukierman E. 2007. Preparation of extracellular matrices produced by cultured and primary fibroblasts. *Curr Protoc Cell Biol* Chapter 10: Unit 10 19.
- Beazley-Long N, Gaston K, Harper SJ, Orlando A, Bates DO. 2015. Novel mechanisms of resistance to vemurafenib in melanoma - V600E B-Raf reversion and switching VEGF-A splice isoform expression. *Am J Cancer Res* 5: 433-441.
- Beck B, Blanpain C. 2013. Unravelling cancer stem cell potential. *Nat Rev Cancer* 13: 727-738.
- Bedikian AY, et al. 2006. Bcl-2 antisense (oblimersen sodium) plus dacarbazine in patients with advanced melanoma: the Oblimersen Melanoma Study Group. *J Clin Oncol* 24: 4738-4745.
- Bellahcene A, Castronovo V. 1995. Increased expression of osteonectin and osteopontin, two bone matrix proteins, in human breast cancer. *Am J Pathol* 146: 95-100.
- Benaich N, Woodhouse S, Goldie SJ, Mishra A, Quist SR, Watt FM. 2014. Rewiring of an epithelial differentiation factor, miR-203, to inhibit human squamous cell carcinoma metastasis. *Cell Rep* 9: 104-117.

Bennett DC. 2003. Human melanocyte senescence and melanoma susceptibility genes. *Oncogene* 22: 3063-3069.

Bergamaschi A, et al. 2008. Extracellular matrix signature identifies breast cancer subgroups with different clinical outcome. *J Pathol* 214: 357-367.

Berking C, Takemoto R, Schaidler H, Showe L, Satyamoorthy K, Robbins P, Herlyn M. 2001. Transforming growth factor-beta1 increases survival of human melanoma through stroma remodeling. *Cancer Res* 61: 8306-8316.

Bertolotto C, Abbe P, Hemesath TJ, Bille K, Fisher DE, Ortonne JP, Ballotti R. 1998. Microphthalmia gene product as a signal transducer in cAMP-induced differentiation of melanocytes. *J Cell Biol* 142: 827-835.

Bertolotto C, et al. 2011. A SUMOylation-defective MITF germline mutation predisposes to melanoma and renal carcinoma. *Nature* 480: 94-98.

Bhowmick NA, Neilson EG, Moses HL. 2004. Stromal fibroblasts in cancer initiation and progression. *Nature* 432: 332-337.

Bissell MJ, Radisky D. 2001. Putting tumours in context. *Nat Rev Cancer* 1: 46-54.

Bliss JM, et al. 1995. Risk of cutaneous melanoma associated with pigmentation characteristics and freckling: systematic overview of 10 case-control studies. The International Melanoma Analysis Group (IMAGE). *Int J Cancer* 62: 367-376.

Bogenrieder T, Herlyn M. 2002. Cell-surface proteolysis, growth factor activation and intercellular communication in the progression of melanoma. *Crit Rev Oncol Hematol* 44: 1-15.

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

Boisvert-Adamo K, Longmate W, Abel EV, Aplin AE. 2009. Mcl-1 is required for melanoma cell resistance to anoikis. *Mol Cancer Res* 7: 549-556.

Bollag G, et al. 2010. Clinical efficacy of a RAF inhibitor needs broad target blockade in BRAF-mutant melanoma. *Nature* 467: 596-599.

Boni A, et al. 2010. Selective BRAFV600E inhibition enhances T-cell recognition of melanoma without affecting lymphocyte function. *Cancer Res* 70: 5213-5219.

Bornstein P. 2009. Matricellular proteins: an overview. *J Cell Commun Signal* 3: 163-165.

Bornstein P, Sage EH. 2002. Matricellular proteins: extracellular modulators of cell function. *Curr Opin Cell Biol* 14: 608-616.

Borriello L, DeClerck YA. 2014. [Tumor microenvironment and therapeutic resistance process]. *Med Sci (Paris)* 30: 445-451.

Borsellino N, Bonavida B, Ciliberto G, Toniatti C, Travali S, D'Alessandro N. 1999. Blocking signaling through the Gp130 receptor chain by interleukin-6 and oncostatin M inhibits PC-3 cell growth and sensitizes the tumor cells to etoposide and cisplatin-mediated cytotoxicity. *Cancer* 85: 134-144.

Boussemart L, et al. 2014. eIF4F is a nexus of resistance to anti-BRAF and anti-MEK cancer therapies. *Nature* 513: 105-109.

Box NF, Terzian T. 2008. The role of p53 in pigmentation, tanning and melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res* 21: 525-533.

Box NF, Duffy DL, Chen W, Stark M, Martin NG, Sturm RA, Hayward NK. 2001. MC1R genotype modifies risk of melanoma in families segregating CDKN2A mutations. *Am J Hum Genet* 69: 765-773.

Bradshaw AD, Sage EH. 2001. SPARC, a matricellular protein that functions in cellular differentiation and tissue response to injury. *J Clin Invest* 107: 1049-1054.

Bradshaw AD, Graves DC, Motamed K, Sage EH. 2003a. SPARC-null mice exhibit increased adiposity without significant differences in overall body weight. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 6045-6050.

Bradshaw AD, Puolakkainen P, Dasgupta J, Davidson JM, Wight TN, Helene Sage E. 2003b. SPARC-null mice display abnormalities in the dermis characterized by decreased collagen fibril diameter and reduced tensile strength. *J Invest Dermatol* 120: 949-955.

Brahmer JR, et al. 2012. Safety and activity of anti-PD-L1 antibody in patients with advanced cancer. *N Engl J Med* 366: 2455-2465.

Brekken RA, Puolakkainen P, Graves DC, Workman G, Lubkin SR, Sage EH. 2003. Enhanced growth of tumors in SPARC null mice is associated with changes in the ECM. *J Clin Invest* 111: 487-495.

Briggs J, Chamboredon S, Castellazzi M, Kerry JA, Bos TJ. 2002. Transcriptional upregulation of SPARC, in response to c-Jun overexpression, contributes to increased motility and invasion of MCF7 breast cancer cells. *Oncogene* 21: 7077-7091.

Brose MS, et al. 2002. BRAF and RAS mutations in human lung cancer and melanoma. *Cancer Res* 62: 6997-7000.

Byers HR, Dykstra SG, Boissel SJ. 2007. Requirement of dynactin p150(Glued) subunit for the functional integrity of the keratinocyte microparasol. *J Invest Dermatol* 127: 1736-1744.

Byzova TV, Goldman CK, Pampori N, Thomas KA, Bett A, Shattil SJ, Plow EF. 2000. A mechanism for modulation of cellular responses to VEGF: activation of the integrins. *Mol Cell* 6: 851-860.

Cadwell C, Zambetti GP. 2001. The effects of wild-type p53 tumor suppressor activity and mutant p53 gain-of-function on cell growth. *Gene* 277: 15-30.

Cano A, Perez-Moreno MA, Rodrigo I, Locascio A, Blanco MJ, del Barrio MG, Portillo F, Nieto MA. 2000. The transcription factor snail controls epithelial-mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression. *Nat Cell Biol* 2: 76-83.

Caramel J, et al. 2013. A switch in the expression of embryonic EMT-inducers drives the development of malignant melanoma. *Cancer Cell* 24: 466-480.

Carmeliet P, Jain RK. 2011. Principles and mechanisms of vessel normalization for cancer and other angiogenic diseases. *Nat Rev Drug Discov* 10: 417-427.

Carreira S, Goodall J, Aksan I, La Rocca SA, Galibert MD, Denat L, Larue L, Goding CR. 2005. Mitf cooperates with Rb1 and activates p21Cip1 expression to regulate cell cycle progression. *Nature* 433: 764-769.

Carreira S, Goodall J, Denat L, Rodriguez M, Nuciforo P, Hoek KS, Testori A, Larue L, Goding CR. 2006. Mitf regulation of Dia1 controls melanoma proliferation and invasiveness. *Genes Dev* 20: 3426-3439.

Castellano E, Downward J. 2011. RAS Interaction with PI3K: More Than Just Another Effector Pathway. *Genes Cancer* 2: 261-274.

- Chamboredon S, Briggs J, Vial E, Hurault J, Galvagni F, Oliviero S, Bos T, Castellazzi M. 2003. v-Jun downregulates the SPARC target gene by binding to the proximal promoter indirectly through Sp1/3. *Oncogene* 22: 4047-4061.
- Chandrasekhar S, Harvey AK, Johnson MG, Becker GW. 1994. Osteonectin/SPARC is a product of articular chondrocytes/cartilage and is regulated by cytokines and growth factors. *Biochim Biophys Acta* 1221: 7-14.
- Chang W, Wei K, Jacobs SS, Upadhyay D, Weill D, Rosen GD. 2010. SPARC suppresses apoptosis of idiopathic pulmonary fibrosis fibroblasts through constitutive activation of beta-catenin. *J Biol Chem* 285: 8196-8206.
- Chapman A, Fernandez del Ama L, Ferguson J, Kamarashev J, Wellbrock C, Hurlstone A. 2014a. Heterogeneous tumor subpopulations cooperate to drive invasion. *Cell Rep* 8: 688-695.
- Chapman PB, Solit DB, Rosen N. 2014b. Combination of RAF and MEK inhibition for the treatment of BRAF-mutated melanoma: feedback is not encouraged. *Cancer Cell* 26: 603-604.
- Chapman PB, et al. 1999. Phase III multicenter randomized trial of the Dartmouth regimen versus dacarbazine in patients with metastatic melanoma. *J Clin Oncol* 17: 2745-2751.
- Chapman PB, et al. 2011. Improved survival with vemurafenib in melanoma with BRAF V600E mutation. *N Engl J Med* 364: 2507-2516.
- Charles J, Martel C, de Fraipont F, Leccia MT, Robert C, Busser B. 2014. [Mechanisms of resistance to anti-BRAF treatments]. *Ann Dermatol Venereol* 141: 671-681.
- Chartrain M, Rioud J, Stennevin A, Vandenberghe I, Gomes B, Lamant L, Meyer N, Gairin JE, Guilbaud N, Annereau JP. 2012. Melanoma chemotherapy leads to the selection of ABCB5-expressing cells. *PLoS One* 7: e36762.
- Cheetham S, Tang MJ, Mesak F, Kennecke H, Owen D, Tai IT. 2008. SPARC promoter hypermethylation in colorectal cancers can be reversed by 5-Aza-2'deoxyctidine to increase SPARC expression and improve therapy response. *Br J Cancer* 98: 1810-1819.
- Cheli Y, Ohanna M, Ballotti R, Bertolotto C. 2010. Fifteen-year quest for microphthalmia-associated transcription factor target genes. *Pigment Cell Melanoma Res* 23: 27-40.
- Cheli Y, Giuliano S, Botton T, Rocchi S, Hofman V, Hofman P, Bahadoran P, Bertolotto C, Ballotti R. 2011. Mitf is the key molecular switch between mouse or human melanoma initiating cells and their differentiated progeny. *Oncogene* 30: 2307-2318.
- Chiodoni C, Colombo MP, Sangaletti S. 2010. Matricellular proteins: from homeostasis to inflammation, cancer, and metastasis. *Cancer Metastasis Rev* 29: 295-307.
- Chlenski A, Cohn SL. 2010. Modulation of matrix remodeling by SPARC in neoplastic progression. *Semin Cell Dev Biol* 21: 55-65.
- Chlenski A, Liu S, Baker LJ, Yang Q, Tian Y, Salwen HR, Cohn SL. 2004. Neuroblastoma angiogenesis is inhibited with a folded synthetic molecule corresponding to the epidermal growth factor-like module of the follistatin domain of SPARC. *Cancer Res* 64: 7420-7425.
- Choi J, et al. 2014. Identification of PLX4032-resistance mechanisms and implications for novel RAF inhibitors. *Pigment Cell Melanoma Res* 27: 253-262.
- Clark CJ, Sage EH. 2008. A prototypic matricellular protein in the tumor microenvironment--where there's SPARC, there's fire. *J Cell Biochem* 104: 721-732.

Clayton A, Mitchell JP, Court J, Mason MD, Tabi Z. 2007. Human tumor-derived exosomes selectively impair lymphocyte responses to interleukin-2. *Cancer Res* 67: 7458-7466.

Cohen C, Zavala-Pompa A, Sequeira JH, Shoji M, Sexton DG, Cotsonis G, Cerimele F, Govindarajan B, Macaron N, Arbiser JL. 2002. Mitogen-activated protein kinase activation is an early event in melanoma progression. *Clin Cancer Res* 8: 3728-3733.

Cohen Y, Goldenberg-Cohen N, Parrella P, Chowers I, Merbs SL, Pe'er J, Sidransky D. 2003. Lack of BRAF mutation in primary uveal melanoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44: 2876-2878.

Collins NL, Reginato MJ, Paulus JK, Sgroi DC, Labaer J, Brugge JS. 2005. G1/S cell cycle arrest provides anoikis resistance through Erk-mediated Bim suppression. *Mol Cell Biol* 25: 5282-5291.

Corcoran RB, Settleman J, Engelman JA. 2011. Potential therapeutic strategies to overcome acquired resistance to BRAF or MEK inhibitors in BRAF mutant cancers. *Oncotarget* 2: 336-346.

Corcoran RB, et al. 2012. EGFR-mediated re-activation of MAPK signaling contributes to insensitivity of BRAF mutant colorectal cancers to RAF inhibition with vemurafenib. *Cancer Discov* 2: 227-235.

Costa A, Scholer-Dahirel A, Mechta-Grigoriou F. 2014. The role of reactive oxygen species and metabolism on cancer cells and their microenvironment. *Semin Cancer Biol* 25: 23-32.

Coussens LM, Werb Z. 2002. Inflammation and cancer. *Nature* 420: 860-867.

Curtin JA, Busam K, Pinkel D, Bastian BC. 2006. Somatic activation of KIT in distinct subtypes of melanoma. *J Clin Oncol* 24: 4340-4346.

Curtin JA, et al. 2005. Distinct sets of genetic alterations in melanoma. *N Engl J Med* 353: 2135-2147.

Damiano JS, Cress AE, Hazlehurst LA, Shtil AA, Dalton WS. 1999. Cell adhesion mediated drug resistance (CAM-DR): role of integrins and resistance to apoptosis in human myeloma cell lines. *Blood* 93: 1658-1667.

Damsky W, et al. 2015. mTORC1 Activation Blocks Braf(V600E)-Induced Growth Arrest but Is Insufficient for Melanoma Formation. *Cancer Cell* 27: 41-56.

Daniotti M, et al. 2004. BRAF alterations are associated with complex mutational profiles in malignant melanoma. *Oncogene* 23: 5968-5977.

Das Thakur M, Stuart DD. 2013. The evolution of melanoma resistance reveals therapeutic opportunities. *Cancer Res* 73: 6106-6110.

Das Thakur M, Salangsang F, Landman AS, Sellers WR, Pryer NK, Levesque MP, Dummer R, McMahon M, Stuart DD. 2013. Modelling vemurafenib resistance in melanoma reveals a strategy to forestall drug resistance. *Nature* 494: 251-255.

Datta SR, Brunet A, Greenberg ME. 1999. Cellular survival: a play in three Acts. *Genes Dev* 13: 2905-2927.

David C, Nance JP, Hubbard J, Hsu M, Binder D, Wilson EH. 2012. Stabilin-1 expression in tumor associated macrophages. *Brain Res* 1481: 71-78.

Davies H, et al. 2002. Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature* 417: 949-954.

De S, Chen J, Narizhneva NV, Heston W, Brainard J, Sage EH, Byzova TV. 2003. Molecular pathway for cancer metastasis to bone. *J Biol Chem* 278: 39044-39050.

- De Wever O, Nguyen QD, Van Hoorde L, Bracke M, Bruyneel E, Gespach C, Mareel M. 2004. Tenascin-C and SF/HGF produced by myofibroblasts in vitro provide convergent pro-invasive signals to human colon cancer cells through RhoA and Rac. *FASEB J* 18: 1016-1018.
- Delany AM, Canalis E. 1998. Basic fibroblast growth factor destabilizes osteonectin mRNA in osteoblasts. *Am J Physiol* 274: C734-740.
- Delany AM, Kalajzic I, Bradshaw AD, Sage EH, Canalis E. 2003. Osteonectin-null mutation compromises osteoblast formation, maturation, and survival. *Endocrinology* 144: 2588-2596.
- Delany AM, Amling M, Priemel M, Howe C, Baron R, Canalis E. 2000. Osteopenia and decreased bone formation in osteonectin-deficient mice. *J Clin Invest* 105: 915-923.
- Dimanche-Boitrel MT, Vakaet L, Jr., Pujuguet P, Chauffert B, Martin MS, Hammann A, Van Roy F, Mareel M, Martin F. 1994. In vivo and in vitro invasiveness of a rat colon-cancer cell line maintaining E-cadherin expression: an enhancing role of tumor-associated myofibroblasts. *Int J Cancer* 56: 512-521.
- Dooley AJ, Gupta A, Bhattacharyya M, Middleton MR. 2014. Intermittent dosing with vemurafenib in BRAF V600E-mutant melanoma: review of a case series. *Ther Adv Med Oncol* 6: 262-266.
- Dumaz N, Hayward R, Martin J, Ogilvie L, Hedley D, Curtin JA, Bastian BC, Springer C, Marais R. 2006. In melanoma, RAS mutations are accompanied by switching signaling from BRAF to CRAF and disrupted cyclic AMP signaling. *Cancer Res* 66: 9483-9491.
- Dziadek M, Paulsson M, Aumailley M, Timpl R. 1986. Purification and tissue distribution of a small protein (BM-40) extracted from a basement membrane tumor. *Eur J Biochem* 161: 455-464.
- Edwards RH, et al. 2004. Absence of BRAF mutations in UV-protected mucosal melanomas. *J Med Genet* 41: 270-272.
- Eichhoff OM, Zipser MC, Xu M, Weeraratna AT, Mihic D, Dummer R, Hoek KS. 2010. The immunohistochemistry of invasive and proliferative phenotype switching in melanoma: a case report. *Melanoma Res* 20: 349-355.
- El Ghissassi F, et al. 2009. A review of human carcinogens--part D: radiation. *Lancet Oncol* 10: 751-752.
- Elwood JM, Whitehead SM, Davison J, Stewart M, Galt M. 1990. Malignant melanoma in England: risks associated with naevi, freckles, social class, hair colour, and sunburn. *Int J Epidemiol* 19: 801-810.
- Fargnoli MC, Gandini S, Peris K, Maisonneuve P, Raimondi S. 2010. MC1R variants increase melanoma risk in families with CDKN2A mutations: a meta-analysis. *Eur J Cancer* 46: 1413-1420.
- Farrar MA, Alberol-Ila J, Perlmutter RM. 1996. Activation of the Raf-1 kinase cascade by coumermycin-induced dimerization. *Nature* 383: 178-181.
- Fenouille N, Robert G, Tichet M, Puissant A, Dufies M, Rocchi S, Ortonne JP, Deckert M, Ballotti R, Tartare-Deckert S. 2011a. The p53/p21Cip1/Waf1 pathway mediates the effects of SPARC on melanoma cell cycle progression. *Pigment Cell Melanoma Res* 24: 219-232.
- Fenouille N, et al. 2011b. SPARC functions as an anti-stress factor by inactivating p53 through Akt-mediated MDM2 phosphorylation to promote melanoma cell survival. *Oncogene* 30: 4887-4900.
- Fenouille N, et al. 2010. Persistent activation of the Fyn/ERK kinase signaling axis mediates imatinib resistance in chronic myelogenous leukemia cells through upregulation of intracellular SPARC. *Cancer Res* 70: 9659-9670.

- Fenouille N, et al. 2012. The epithelial-mesenchymal transition (EMT) regulatory factor SLUG (SNAI2) is a downstream target of SPARC and AKT in promoting melanoma cell invasion. *PLoS One* 7: e40378.
- Fitzpatrick TB. 1988. The validity and practicality of sun-reactive skin types I through VI. *Arch Dermatol* 124: 869-871.
- Flaherty KT, et al. 2010. Inhibition of mutated, activated BRAF in metastatic melanoma. *N Engl J Med* 363: 809-819.
- Flaherty KT, et al. 2012. Combined BRAF and MEK inhibition in melanoma with BRAF V600 mutations. *N Engl J Med* 367: 1694-1703.
- Florell SR, et al. 2004. Longitudinal assessment of the nevus phenotype in a melanoma kindred. *J Invest Dermatol* 123: 576-582.
- Flores JF, et al. 1996. Loss of the p16INK4a and p15INK4b genes, as well as neighboring 9p21 markers, in sporadic melanoma. *Cancer Res* 56: 5023-5032.
- Fofaria NM, Srivastava SK. 2014. Critical role of STAT3 in melanoma metastasis through anoikis resistance. *Oncotarget* 5: 7051-7064.
- Francki A, Bradshaw AD, Bassuk JA, Howe CC, Couser WG, Sage EH. 1999. SPARC regulates the expression of collagen type I and transforming growth factor-beta1 in mesangial cells. *J Biol Chem* 274: 32145-32152.
- Francki A, McClure TD, Brekken RA, Motamed K, Murri C, Wang T, Sage EH. 2004. SPARC regulates TGF-beta1-dependent signaling in primary glomerular mesangial cells. *J Cell Biochem* 91: 915-925.
- Francki A, Motamed K, McClure TD, Kaya M, Murri C, Blake DJ, Carbon JG, Sage EH. 2003. SPARC regulates cell cycle progression in mesangial cells via its inhibition of IGF-dependent signaling. *J Cell Biochem* 88: 802-811.
- Fridman R, Giaccone G, Kanemoto T, Martin GR, Gazdar AF, Mulshine JL. 1990. Reconstituted basement membrane (matrigel) and laminin can enhance the tumorigenicity and the drug resistance of small cell lung cancer cell lines. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87: 6698-6702.
- Frisch SM, Screaton RA. 2001. Anoikis mechanisms. *Curr Opin Cell Biol* 13: 555-562.
- Fromigue O, et al. 2003. Gene expression profiling of normal human pulmonary fibroblasts following coculture with non-small-cell lung cancer cells reveals alterations related to matrix degradation, angiogenesis, cell growth and survival. *Oncogene* 22: 8487-8497.
- Fujita T, Shiba H, Sakata M, Uchida Y, Nakamura S, Kurihara H. 2002. SPARC stimulates the synthesis of OPG/OCIF, MMP-2 and DNA in human periodontal ligament cells. *J Oral Pathol Med* 31: 345-352.
- Funel N, et al. 2010. Ukrain affects pancreas cancer cell phenotype in vitro by targeting MMP-9 and intra-/extracellular SPARC expression. *Pancreatology* 10: 545-552.
- Gaggioli C, Hooper S, Hidalgo-Carcedo C, Grosse R, Marshall JF, Harrington K, Sahai E. 2007. Fibroblast-led collective invasion of carcinoma cells with differing roles for RhoGTPases in leading and following cells. *Nat Cell Biol* 9: 1392-1400.
- Gaggioli C, Deckert M, Robert G, Abbe P, Batoz M, Ehrenguber MU, Ortonne JP, Ballotti R, Tartare-Deckert S. 2005. HGF induces fibronectin matrix synthesis in melanoma cells through MAP kinase-dependent signaling pathway and induction of Egr-1. *Oncogene* 24: 1423-1433.

Gallagher PG, Bao Y, Prorock A, Zigrino P, Nischt R, Politi V, Mauch C, Dragulev B, Fox JW. 2005. Gene expression profiling reveals cross-talk between melanoma and fibroblasts: implications for host-tumor interactions in metastasis. *Cancer Res* 65: 4134-4146.

Gao J, Song J, Huang H, Li Z, Du Y, Cao J, Li M, Lv S, Lin H, Gong Y. 2010. Methylation of the SPARC gene promoter and its clinical implication in pancreatic cancer. *J Exp Clin Cancer Res* 29: 28.

Gao L, et al. 2013. Genome-wide promoter methylation analysis identifies epigenetic silencing of MAPK13 in primary cutaneous melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res* 26: 542-554.

Garbe C, et al. 2010. Diagnosis and treatment of melanoma: European consensus-based interdisciplinary guideline. *Eur J Cancer* 46: 270-283.

Garibyan L, Fisher DE. 2010. How sunlight causes melanoma. *Curr Oncol Rep* 12: 319-326.

Garnett MJ, Rana S, Paterson H, Barford D, Marais R. 2005. Wild-type and mutant B-RAF activate C-RAF through distinct mechanisms involving heterodimerization. *Mol Cell* 20: 963-969.

Garofalo A, et al. 1995. Involvement of the very late antigen 4 integrin on melanoma in interleukin 1-augmented experimental metastases. *Cancer Res* 55: 414-419.

Garraway LA, et al. 2005. Integrative genomic analyses identify MITF as a lineage survival oncogene amplified in malignant melanoma. *Nature* 436: 117-122.

Gembarska A, et al. 2012. MDM4 is a key therapeutic target in cutaneous melanoma. *Nat Med* 18: 1239-1247.

Gerlinger M, et al. 2012. Intratumor heterogeneity and branched evolution revealed by multiregion sequencing. *N Engl J Med* 366: 883-892.

Gerson KD, Shearstone JR, Maddula VS, Seligmann BE, Mercurio AM. 2012. Integrin beta4 regulates SPARC protein to promote invasion. *J Biol Chem* 287: 9835-9844.

Gilles C, Bassuk JA, Pulyaeva H, Sage EH, Foidart JM, Thompson EW. 1998. SPARC/osteonectin induces matrix metalloproteinase 2 activation in human breast cancer cell lines. *Cancer Res* 58: 5529-5536.

Gilmore AP. 2005. Anoikis. *Cell Death Differ* 12 Suppl 2: 1473-1477.

Gilmour DT, Lyon GJ, Carlton MB, Sanes JR, Cunningham JM, Anderson JR, Hogan BL, Evans MJ, Colledge WH. 1998. Mice deficient for the secreted glycoprotein SPARC/osteonectin/BM40 develop normally but show severe age-onset cataract formation and disruption of the lens. *EMBO J* 17: 1860-1870.

Girotti MR, et al. 2013. Inhibiting EGF receptor or SRC family kinase signaling overcomes BRAF inhibitor resistance in melanoma. *Cancer Discov* 3: 158-167.

Girotti MR, et al. 2015. Paradox-breaking RAF inhibitors that also target SRC are effective in drug-resistant BRAF mutant melanoma. *Cancer Cell* 27: 85-96.

Giudici C, Raynal N, Wiedemann H, Cabral WA, Marini JC, Timpl R, Bachinger HP, Farndale RW, Sasaki T, Tenni R. 2008. Mapping of SPARC/BM-40/osteonectin-binding sites on fibrillar collagens. *J Biol Chem* 283: 19551-19560.

Goel VK, Lazar AJ, Warneke CL, Redston MS, Haluska FG. 2006. Examination of mutations in BRAF, NRAS, and PTEN in primary cutaneous melanoma. *J Invest Dermatol* 126: 154-160.

Goel VK, Ibrahim N, Jiang G, Singhal M, Fee S, Flotte T, Westmoreland S, Haluska FS, Hinds PW, Haluska FG. 2009. Melanocytic nevus-like hyperplasia and melanoma in transgenic BRAFV600E mice. *Oncogene* 28: 2289-2298.

Goldblum SE, Ding X, Funk SE, Sage EH. 1994. SPARC (secreted protein acidic and rich in cysteine) regulates endothelial cell shape and barrier function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 3448-3452.

Goldstein AM, Struewing JP, Chidambaram A, Fraser MC, Tucker MA. 2000. Genotype-phenotype relationships in U.S. melanoma-prone families with CDKN2A and CDK4 mutations. *J Natl Cancer Inst* 92: 1006-1010.

Goldstein AM, Landi MT, Tsang S, Fraser MC, Munroe DJ, Tucker MA. 2005. Association of MC1R variants and risk of melanoma in melanoma-prone families with CDKN2A mutations. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 14: 2208-2212.

Goldstein AM, et al. 2006. High-risk melanoma susceptibility genes and pancreatic cancer, neural system tumors, and uveal melanoma across GenoMEL. *Cancer Res* 66: 9818-9828.

Goldstein NB, Johannes WU, Gadeliya AV, Green MR, Fujita M, Norris DA, Shellman YG. 2009. Active N-Ras and B-Raf inhibit anoikis by downregulating Bim expression in melanocytic cells. *J Invest Dermatol* 129: 432-437.

Golembieski WA, Ge S, Nelson K, Mikkelsen T, Rempel SA. 1999. Increased SPARC expression promotes U87 glioblastoma invasion in vitro. *Int J Dev Neurosci* 17: 463-472.

Goodall J, Carreira S, Denat L, Kobi D, Davidson I, Nuciforo P, Sturm RA, Larue L, Goding CR. 2008. Brn-2 represses microphthalmia-associated transcription factor expression and marks a distinct subpopulation of microphthalmia-associated transcription factor-negative melanoma cells. *Cancer Res* 68: 7788-7794.

Gooden MD, Vernon RB, Bassuk JA, Sage EH. 1999. Cell cycle-dependent nuclear location of the matricellular protein SPARC: association with the nuclear matrix. *J Cell Biochem* 74: 152-167.

Gopal YN, Deng W, Woodman SE, Komurov K, Ram P, Smith PD, Davies MA. 2010. Basal and treatment-induced activation of AKT mediates resistance to cell death by AZD6244 (ARRY-142886) in Braf-mutant human cutaneous melanoma cells. *Cancer Res* 70: 8736-8747.

Gray-Schopfer VC, da Rocha Dias S, Marais R. 2005. The role of B-RAF in melanoma. *Cancer Metastasis Rev* 24: 165-183.

Gray-Schopfer VC, Cheong SC, Chong H, Chow J, Moss T, Abdel-Malek ZA, Marais R, Wynford-Thomas D, Bennett DC. 2006. Cellular senescence in naevi and immortalisation in melanoma: a role for p16? *Br J Cancer* 95: 496-505.

Greene MH, Clark WH, Jr., Tucker MA, Kraemer KH, Elder DE, Fraser MC. 1985. High risk of malignant melanoma in melanoma-prone families with dysplastic nevi. *Ann Intern Med* 102: 458-465.

Greger JG, Eastman SD, Zhang V, Bleam MR, Hughes AM, Smitheman KN, Dickerson SH, Laquerre SG, Liu L, Gilmer TM. 2012. 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* 11: 909-920.

Grosso S, et al. 2009. Gene expression profiling of imatinib and PD166326-resistant CML cell lines identifies Fyn as a gene associated with resistance to BCR-ABL inhibitors. *Mol Cancer Ther* 8: 1924-1933.

Haass NK, Smalley KS, Li L, Herlyn M. 2005. Adhesion, migration and communication in melanocytes and melanoma. *Pigment Cell Res* 18: 150-159.

Hachiya A, Kobayashi A, Yoshida Y, Kitahara T, Takema Y, Imokawa G. 2004. Biphasic expression of two paracrine melanogenic cytokines, stem cell factor and endothelin-1, in ultraviolet B-induced human melanogenesis. *Am J Pathol* 165: 2099-2109.

Halaban R, Langdon R, Birchall N, Cuono C, Baird A, Scott G, Moellmann G, McGuire J. 1988. Basic fibroblast growth factor from human keratinocytes is a natural mitogen for melanocytes. *J Cell Biol* 107: 1611-1619.

Halaban R, Zhang W, Bacchiocchi A, Cheng E, Parisi F, Ariyan S, Krauthammer M, McCusker JP, Kluger Y, Sznol M. 2010. 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* 23: 190-200.

Hamid O, et al. 2013. Safety and tumor responses with lambrolizumab (anti-PD-1) in melanoma. *N Engl J Med* 369: 134-144.

Hanahan D, Weinberg RA. 2011. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144: 646-674.

Hartmann TN, Burger JA, Glodek A, Fujii N, Burger M. 2005. CXCR4 chemokine receptor and integrin signaling co-operate in mediating adhesion and chemoresistance in small cell lung cancer (SCLC) cells. *Oncogene* 24: 4462-4471.

Hasselaar P, Sage EH. 1992. SPARC antagonizes the effect of basic fibroblast growth factor on the migration of bovine aortic endothelial cells. *J Cell Biochem* 49: 272-283.

Hatzivassiliou G, et al. 2010. RAF inhibitors prime wild-type RAF to activate the MAPK pathway and enhance growth. *Nature* 464: 431-435.

Hauschild A, et al. 2012. Dabrafenib in BRAF-mutated metastatic melanoma: a multicentre, open-label, phase 3 randomised controlled trial. *Lancet* 380: 358-365.

Hazlehurst LA, Damiano JS, Buyuksal I, Pledger WJ, Dalton WS. 2000. Adhesion to fibronectin via beta1 integrins regulates p27kip1 levels and contributes to cell adhesion mediated drug resistance (CAM-DR). *Oncogene* 19: 4319-4327.

Hecht JT, Sage EH. 2006. Retention of the matricellular protein SPARC in the endoplasmic reticulum of chondrocytes from patients with pseudoachondroplasia. *J Histochem Cytochem* 54: 269-274.

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

Heidenreich B, Rachakonda PS, Hemminki K, Kumar R. 2014. TERT promoter mutations in cancer development. *Curr Opin Genet Dev* 24: 30-37.

Heidorn SJ, et al. 2010. Kinase-dead BRAF and oncogenic RAS cooperate to drive tumor progression through CRAF. *Cell* 140: 209-221.

Herlyn M, et al. 1985. Primary melanoma cells of the vertical growth phase: similarities to metastatic cells. *J Natl Cancer Inst* 74: 283-289.

Hirata E, Girotti MR, Viros A, Hooper S, Spencer-Dene B, Matsuda M, Larkin J, Marais R, Sahai E. 2015. Intravital Imaging Reveals How BRAF Inhibition Generates Drug-Tolerant Microenvironments with High Integrin beta1/FAK Signaling. *Cancer Cell* 27: 574-588.

Hirobe T, Osawa M, Nishikawa S. 2004. Hepatocyte growth factor controls the proliferation of cultured epidermal melanoblasts and melanocytes from newborn mice. *Pigment Cell Res* 17: 51-61.

Hochhaus A, Erben P, Ernst T, Mueller MC. 2007. Resistance to targeted therapy in chronic myelogenous leukemia. *Semin Hematol* 44: S15-24.

Hocker T, Tsao H. 2007. Ultraviolet radiation and melanoma: a systematic review and analysis of reported sequence variants. *Hum Mutat* 28: 578-588.

Hodi FS, et al. 2010. Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. *N Engl J Med* 363: 711-723.

Hodis E, et al. 2012. A landscape of driver mutations in melanoma. *Cell* 150: 251-263.

Hodkinson PS, Elliott T, Wong WS, Rintoul RC, Mackinnon AC, Haslett C, Sethi T. 2006. ECM overrides DNA damage-induced cell cycle arrest and apoptosis in small-cell lung cancer cells through beta1 integrin-dependent activation of PI3-kinase. *Cell Death Differ* 13: 1776-1788.

Hoek KS. 2009. Melanoma progression, gene expression and DNA microarrays. *G Ital Dermatol Venereol* 144: 39-49.

Hoek KS, Goding CR. 2010. Cancer stem cells versus phenotype-switching in melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res* 23: 746-759.

Hoek KS, Eichhoff OM, Schlegel NC, Dobbeling U, Kobert N, Schaerer L, Hemmi S, Dummer R. 2008. In vivo switching of human melanoma cells between proliferative and invasive states. *Cancer Res* 68: 650-656.

Hoek KS, et al. 2006. Metastatic potential of melanomas defined by specific gene expression profiles with no BRAF signature. *Pigment Cell Res* 19: 290-302.

Hohenester E, Sasaki T, Giudici C, Farndale RW, Bachinger HP. 2008. Structural basis of sequence-specific collagen recognition by SPARC. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 18273-18277.

Hohenester E, Maurer P, Hohenadl C, Timpl R, Jansonius JN, Engel J. 1996. Structure of a novel extracellular Ca(2+)-binding module in BM-40. *Nat Struct Biol* 3: 67-73.

Hoogstraat M, et al. 2014. Detailed imaging and genetic analysis reveal a secondary BRAF resistance mutation and extensive inpatient heterogeneity in metastatic BRAF mutant melanoma patients treated with vemurafenib. *Pigment Cell Melanoma Res*.

Hsia HC, Schwarzbauer JE. 2005. Meet the tenascins: multifunctional and mysterious. *J Biol Chem* 280: 26641-26644.

Hsieh YT, et al. 2013. Integrin alpha4 blockade sensitizes drug resistant pre-B acute lymphoblastic leukemia to chemotherapy. *Blood* 121: 1814-1818.

Hsu MY, Meier FE, Nesbit M, Hsu JY, Van Belle P, Elder DE, Herlyn M. 2000. E-cadherin expression in melanoma cells restores keratinocyte-mediated growth control and down-regulates expression of invasion-related adhesion receptors. *Am J Pathol* 156: 1515-1525.

Hussussian CJ, Struewing JP, Goldstein AM, Higgins PA, Ally DS, Sheahan MD, Clark WH, Jr., Tucker MA, Dracopoli NC. 1994. Germline p16 mutations in familial melanoma. *Nat Genet* 8: 15-21.

Hynes RO, Naba A. 2012. Overview of the matrisome--an inventory of extracellular matrix constituents and functions. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 4: a004903.

Ikuta Y, Nakatsura T, Kageshita T, Fukushima S, Ito S, Wakamatsu K, Baba H, Nishimura Y. 2005. Highly sensitive detection of melanoma at an early stage based on the increased serum secreted protein acidic and rich in cysteine and glypican-3 levels. *Clin Cancer Res* 11: 8079-8088.

Imokawa G, Kobayashi T, Miyagishi M, Higashi K, Yada Y. 1997. The role of endothelin-1 in epidermal hyperpigmentation and signaling mechanisms of mitogenesis and melanogenesis. *Pigment Cell Res* 10: 218-228.

Infante JR, Matsubayashi H, Sato N, Tonascia J, Klein AP, Riall TA, Yeo C, Iacobuzio-Donahue C, Goggins M. 2007. Peritumoral fibroblast SPARC expression and patient outcome with resectable pancreatic adenocarcinoma. *J Clin Oncol* 25: 319-325.

Iruela-Arispe ML, Lane TF, Redmond D, Reilly M, Bolender RP, Kavanagh TJ, Sage EH. 1995. Expression of SPARC during development of the chicken chorioallantoic membrane: evidence for regulated proteolysis in vivo. *Mol Biol Cell* 6: 327-343.

Ji RR, et al. 2012a. An immune-active tumor microenvironment favors clinical response to ipilimumab. *Cancer Immunol Immunother* 61: 1019-1031.

Ji Z, Njauw CN, Taylor M, Neel V, Flaherty KT, Tsao H. 2012b. p53 rescue through HDM2 antagonism suppresses melanoma growth and potentiates MEK inhibition. *J Invest Dermatol* 132: 356-364.

Ji Z, Kumar R, Taylor M, Rajadurai A, Marzuka-Alcala A, Chen YE, Njauw CN, Flaherty K, Jonsson G, Tsao H. 2013. Vemurafenib synergizes with nutlin-3 to deplete survivin and suppresses melanoma viability and tumor growth. *Clin Cancer Res* 19: 4383-4391.

Jiang CC, Lai F, Thorne RF, Yang F, Liu H, Hersey P, Zhang XD. 2011. MEK-independent survival of B-RAFV600E melanoma cells selected for resistance to apoptosis induced by the RAF inhibitor PLX4720. *Clin Cancer Res* 17: 721-730.

Jiang X, Zhou J, Giobbie-Hurder A, Wargo J, Hodi FS. 2013. The activation of MAPK in melanoma cells resistant to BRAF inhibition promotes PD-L1 expression that is reversible by MEK and PI3K inhibition. *Clin Cancer Res* 19: 598-609.

Johannessen CM, et al. 2013. A melanocyte lineage program confers resistance to MAP kinase pathway inhibition. *Nature* 504: 138-142.

Johannessen CM, et al. 2010. COT drives resistance to RAF inhibition through MAP kinase pathway reactivation. *Nature* 468: 968-972.

Johnson JP. 1999. Cell adhesion molecules in the development and progression of malignant melanoma. *Cancer Metastasis Rev* 18: 345-357.

Jones C, et al. 2004. Expression profiling of purified normal human luminal and myoepithelial breast cells: identification of novel prognostic markers for breast cancer. *Cancer Res* 64: 3037-3045.

Joyce JA, Pollard JW. 2009. Microenvironmental regulation of metastasis. *Nat Rev Cancer* 9: 239-252.

Junt T, Scandella E, Ludewig B. 2008. Form follows function: lymphoid tissue microarchitecture in antimicrobial immune defence. *Nat Rev Immunol* 8: 764-775.

Kalluri R, Neilson EG. 2003. Epithelial-mesenchymal transition and its implications for fibrosis. *J Clin Invest* 112: 1776-1784.

Kalluri R, Zeisberg M. 2006. Fibroblasts in cancer. *Nat Rev Cancer* 6: 392-401.

Kamb A, et al. 1994. Analysis of the p16 gene (CDKN2) as a candidate for the chromosome 9p melanoma susceptibility locus. *Nat Genet* 8: 23-26.

Kameyama K, Montague PM, Hearing VJ. 1988. Expression of melanocyte stimulating hormone receptors correlates with mammalian pigmentation, and can be modulated by interferons. *J Cell Physiol* 137: 35-44.

Kapinas K, Kessler CB, Delany AM. 2009. miR-29 suppression of osteonectin in osteoblasts: regulation during differentiation and by canonical Wnt signaling. *J Cell Biochem* 108: 216-224.

Kaplon J, Homig-Holzel C, Gao L, Meissl K, Verdegaal EM, van der Burg SH, van Doorn R, Peeper DS. 2014. Near-genomewide RNAi screening for regulators of BRAF(V600E) -induced senescence identifies RASEF, a gene epigenetically silenced in melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res* 27: 640-652.

Katakai T, Hara T, Lee JH, Gonda H, Sugai M, Shimizu A. 2004. A novel reticular stromal structure in lymph node cortex: an immuno-platform for interactions among dendritic cells, T cells and B cells. *Int Immunol* 16: 1133-1142.

Kato S, Han SY, Liu W, Otsuka K, Shibata H, Kanamaru R, Ishioka C. 2003. Understanding the function-structure and function-mutation relationships of p53 tumor suppressor protein by high-resolution missense mutation analysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 8424-8429.

Kato Y, Franken F, Noel A, Sakai N, Nagashima Y, Koshika S, Miyazaki K, Foidart JM. 2000. High production of SPARC/osteonectin/BM-40 in mouse metastatic B16 melanoma cell lines. *Pathol Oncol Res* 6: 24-26.

Kato Y, et al. 2001. Induction of SPARC by VEGF in human vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 287: 422-426.

Kaufmann B, Muller S, Hanisch FG, Hartmann U, Paulsson M, Maurer P, Zaucke F. 2004. Structural variability of BM-40/SPARC/osteonectin glycosylation: implications for collagen affinity. *Glycobiology* 14: 609-619.

Kelly JW, Rivers JK, MacLennan R, Harrison S, Lewis AE, Tate BJ. 1994. Sunlight: a major factor associated with the development of melanocytic nevi in Australian schoolchildren. *J Am Acad Dermatol* 30: 40-48.

Kelly KA, Allport JR, Yu AM, Sinh S, Sage EH, Gerszten RE, Weissleder R. 2007. SPARC is a VCAM-1 counter-ligand that mediates leukocyte transmigration. *J Leukoc Biol* 81: 748-756.

Kemper K, de Goeje PL, Peeper DS, van Amerongen R. 2014. Phenotype switching: tumor cell plasticity as a resistance mechanism and target for therapy. *Cancer Res* 74: 5937-5941.

Kennedy C, ter Huurne J, Berkhout M, Gruis N, Bastiaens M, Bergman W, Willemze R, Bavinck JN. 2001. Melanocortin 1 receptor (MC1R) gene variants are associated with an increased risk for cutaneous melanoma which is largely independent of skin type and hair color. *J Invest Dermatol* 117: 294-300.

Kim E, Rebecca V, Fedorenko IV, Messina JL, Mathew R, Maria-Engler SS, Basanta D, Smalley KS, Anderson AR. 2013. Senescent fibroblasts in melanoma initiation and progression: an integrated theoretical, experimental, and clinical approach. *Cancer Res* 73: 6874-6885.

Kim H, Ronai ZA. 2015. The UPs and DOWNs of MITF in melanoma resistance. *Pigment Cell Melanoma Res* 28: 132-133.

Kim M, Koh YJ, Kim KE, Koh BI, Nam DH, Alitalo K, Kim I, Koh GY. 2010a. CXCR4 signaling regulates metastasis of chemoresistant melanoma cells by a lymphatic metastatic niche. *Cancer Res* 70: 10411-10421.

Kim T, Kim J, Lee MG. 2010b. Inhibition of mutated BRAF in melanoma. *N Engl J Med* 363: 2261; author reply 2261-2262.

Klemke M, Weschenfelder T, Konstandin MH, Samstag Y. 2007. High affinity interaction of integrin alpha4beta1 (VLA-4) and vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1) enhances migration of human melanoma cells across activated endothelial cell layers. *J Cell Physiol* 121: 368-374.

Kolch W. 2000. Meaningful relationships: the regulation of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway by protein interactions. *Biochem J* 351 Pt 2: 289-305.

Konieczkowski DJ, et al. 2014. A melanoma cell state distinction influences sensitivity to MAPK pathway inhibitors. *Cancer Discov* 4: 816-827.

Kos K, Wilding JP. 2010. SPARC: a key player in the pathologies associated with obesity and diabetes. *Nat Rev Endocrinol* 6: 225-235.

Koukourakis MI, Giatromanolaki A, Brekken RA, Sivridis E, Gatter KC, Harris AL, Sage EH. 2003. Enhanced expression of SPARC/osteonectin in the tumor-associated stroma of non-small cell lung cancer is correlated with markers of hypoxia/acidity and with poor prognosis of patients. *Cancer Res* 63: 5376-5380.

Koya RC, et al. 2012. BRAF inhibitor vemurafenib improves the antitumor activity of adoptive cell immunotherapy. *Cancer Res* 72: 3928-3937.

Kraemer M, Tournaire R, Dejong V, Montreau N, Briane D, Derbin C, Binetruy B. 1999. Rat embryo fibroblasts transformed by c-Jun display highly metastatic and angiogenic activities in vivo and deregulate gene expression of both angiogenic and antiangiogenic factors. *Cell Growth Differ* 10: 193-200.

Krauthammer M, et al. 2012. Exome sequencing identifies recurrent somatic RAC1 mutations in melanoma. *Nat Genet* 44: 1006-1014.

Krtolica A, Parrinello S, Lockett S, Desprez PY, Campisi J. 2001. Senescent fibroblasts promote epithelial cell growth and tumorigenesis: a link between cancer and aging. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 12072-12077.

Ku GY, Yuan J, Page DB, Schroeder SE, Panageas KS, Carvajal RD, Chapman PB, Schwartz GK, Allison JP, Wolchok JD. 2010. Single-institution experience with ipilimumab in advanced melanoma patients in the compassionate use setting: lymphocyte count after 2 doses correlates with survival. *Cancer* 116: 1767-1775.

Kucukdereli H, et al. 2011. Control of excitatory CNS synaptogenesis by astrocyte-secreted proteins Hevin and SPARC. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108: E440-449.

Kuphal S, Bauer R, Bosserhoff AK. 2005a. Integrin signaling in malignant melanoma. *Cancer Metastasis Rev* 24: 195-222.

Kuphal S, Palm HG, Poser I, Bosserhoff AK. 2005b. Snail-regulated genes in malignant melanoma. *Melanoma Res* 15: 305-313.

Kupprion C, Motamed K, Sage EH. 1998. SPARC (BM-40, osteonectin) inhibits the mitogenic effect of vascular endothelial growth factor on microvascular endothelial cells. *J Biol Chem* 273: 29635-29640.

Kurschat P, Wickenhauser C, Groth W, Krieg T, Mauch C. 2002. Identification of activated matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) as the main gelatinolytic enzyme in malignant melanoma by in situ zymography. *J Pathol* 197: 179-187.

Kzhyshkowska J, Krusell L. 2009. Cross-talk between endocytic clearance and secretion in macrophages. *Immunobiology* 214: 576-593.

Kzhyshkowska J, Workman G, Cardo-Vila M, Arap W, Pasqualini R, Gratchev A, Krusell L, Goerdts S, Sage EH. 2006. Novel function of alternatively activated macrophages: stabilin-1-mediated clearance of SPARC. *J Immunol* 176: 5825-5832.

Laberge RM, Awad P, Campisi J, Desprez PY. 2012. Epithelial-mesenchymal transition induced by senescent fibroblasts. *Cancer Microenviron* 5: 39-44.

Lane TF, Sage EH. 1990. Functional mapping of SPARC: peptides from two distinct Ca²⁺-binding sites modulate cell shape. *J Cell Biol* 111: 3065-3076.

Lane TF, Sage EH. 1994. The biology of SPARC, a protein that modulates cell-matrix interactions. *FASEB J* 8: 163-173.

Lane TF, Iruela-Arispe ML, Johnson RS, Sage EH. 1994. SPARC is a source of copper-binding peptides that stimulate angiogenesis. *J Cell Biol* 125: 929-943.

Larkin J, et al. 2014. Combined vemurafenib and cobimetinib in BRAF-mutated melanoma. *N Engl J Med* 371: 1867-1876.

Larue L, Beermann F. 2007. Cutaneous melanoma in genetically modified animals. *Pigment Cell Res* 20: 485-497.

Ledda F, Bravo AI, Adris S, Bover L, Mordoh J, Podhajcer OL. 1997a. The expression of the secreted protein acidic and rich in cysteine (SPARC) is associated with the neoplastic progression of human melanoma. *J Invest Dermatol* 108: 210-214.

Ledda MF, Adris S, Bravo AI, Kairiyama C, Bover L, Chernajovsky Y, Mordoh J, Podhajcer OL. 1997b. Suppression of SPARC expression by antisense RNA abrogates the tumorigenicity of human melanoma cells. *Nat Med* 3: 171-176.

Lee JT, Herlyn M. 2007. Microenvironmental influences in melanoma progression. *J Cell Biochem* 101: 862-872.

Li A, Qu X, Li Z, Qu J, Song N, Ma Y, Liu Y. 2015. Secreted protein acidic and rich in cysteine antagonizes bufalin-induced apoptosis in gastric cancer cells. *Mol Med Rep*.

Li YM, et al. 2004. Upregulation of CXCR4 is essential for HER2-mediated tumor metastasis. *Cancer Cell* 6: 459-469.

Lien HC, Hsiao YH, Lin YS, Yao YT, Juan HF, Kuo WH, Hung MC, Chang KJ, Hsieh FJ. 2007. Molecular signatures of metaplastic carcinoma of the breast by large-scale transcriptional profiling: identification of genes potentially related to epithelial-mesenchymal transition. *Oncogene* 26: 7859-7871.

Lin JY, Fisher DE. 2007. Melanocyte biology and skin pigmentation. *Nature* 445: 843-850.

Lin K, Baritaki S, Militello L, Malaponte G, Bevelacqua Y, Bonavida B. 2010. The Role of B-RAF Mutations in Melanoma and the Induction of EMT via Dysregulation of the NF- κ B/Snail/RKIP/PTEN Circuit. *Genes Cancer* 1: 409-420.

Lindner JL, et al. 2015. Expression of secreted protein acidic and rich in cysteine (SPARC) in breast cancer and response to neoadjuvant chemotherapy. *Ann Oncol* 26: 95-100.

Lito P, Rosen N, Solit DB. 2013. Tumor adaptation and resistance to RAF inhibitors. *Nat Med* 19: 1401-1409.

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

Liu F, Cao J, Wu J, Sullivan K, Shen J, Ryu B, Xu Z, Wei W, Cui R. 2013. Stat3-targeted therapies overcome the acquired resistance to vemurafenib in melanomas. *J Invest Dermatol* 133: 2041-2049.

Loeffler M, Kruger JA, Niethammer AG, Reisfeld RA. 2006. Targeting tumor-associated fibroblasts improves cancer chemotherapy by increasing intratumoral drug uptake. *J Clin Invest* 116: 1955-1962.

Loercher AE, Tank EM, Delston RB, Harbour JW. 2005. MITF links differentiation with cell cycle arrest in melanocytes by transcriptional activation of INK4A. *J Cell Biol* 168: 35-40.

Long GV, et al. 2014. Combined BRAF and MEK inhibition versus BRAF inhibition alone in melanoma. *N Engl J Med* 371: 1877-1888.

Ludwig A, Rehberg S, Wegner M. 2004. Melanocyte-specific expression of dopachrome tautomerase is dependent on synergistic gene activation by the Sox10 and Mitf transcription factors. *FEBS Lett* 556: 236-244.

Luo Z, Tzivion G, Belshaw PJ, Vavvas D, Marshall M, Avruch J. 1996. Oligomerization activates c-Raf-1 through a Ras-dependent mechanism. *Nature* 383: 181-185.

Lynch HT, Fusaro RM, Lynch J. 1995. Hereditary cancer in adults. *Cancer Detect Prev* 19: 219-233.

Machado do Reis L, Kessler CB, Adams DJ, Lorenzo J, Jorgetti V, Delany AM. 2008. Accentuated osteoclastic response to parathyroid hormone undermines bone mass acquisition in osteonectin-null mice. *Bone* 43: 264-273.

Mackie EJ, Chiquet-Ehrismann R, Pearson CA, Inaguma Y, Taya K, Kawarada Y, Sakakura T. 1987. Tenascin is a stromal marker for epithelial malignancy in the mammary gland. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84: 4621-4625.

Mackiewicz-Wysocka M, Krokowicz L, Kocur J, Mackiewicz J. 2014. Resistance to vemurafenib can be reversible after treatment interruption: a case report of a metastatic melanoma patient. *Medicine (Baltimore)* 93: e157.

Maertens O, et al. 2013. Elucidating distinct roles for NF1 in melanomagenesis. *Cancer Discov* 3: 338-349.

Marani M, Hancock D, Lopes R, Tenev T, Downward J, Lemoine NR. 2004. Role of Bim in the survival pathway induced by Raf in epithelial cells. *Oncogene* 23: 2431-2441.

Marquette A, Andre J, Bagot M, Bensussan A, Dumaz N. 2011. ERK and PDE4 cooperate to induce RAF isoform switching in melanoma. *Nat Struct Mol Biol* 18: 584-591.

Martinek N, Shahab J, Saathoff M, Ringuette M. 2008. Haemocyte-derived SPARC is required for collagen-IV-dependent stability of basal laminae in *Drosophila* embryos. *J Cell Sci* 121: 1671-1680.

Marusiak AA, et al. 2014. Mixed lineage kinases activate MEK independently of RAF to mediate resistance to RAF inhibitors. *Nat Commun* 5: 3901.

Mason IJ, Taylor A, Williams JG, Sage H, Hogan BL. 1986. Evidence from molecular cloning that SPARC, a major product of mouse embryo parietal endoderm, is related to an endothelial cell 'culture shock' glycoprotein of Mr 43,000. *EMBO J* 5: 1465-1472.

Massague J. 2008. TGFbeta in Cancer. *Cell* 134: 215-230.

Massi D, Franchi A, Borgognoni L, Reali UM, Santucci M. 1999. Osteonectin expression correlates with clinical outcome in thin cutaneous malignant melanomas. *Hum Pathol* 30: 339-344.

Maurer P, Hohenadl C, Hohenester E, Gohring W, Timpl R, Engel J. 1995. The C-terminal portion of BM-40 (SPARC/osteonectin) is an autonomously folding and crystallisable domain that binds calcium and collagen IV. *J Mol Biol* 253: 347-357.

Maurer P, Mayer U, Bruch M, Jenö P, Mann K, Landwehr R, Engel J, Timpl R. 1992. High-affinity and low-affinity calcium binding and stability of the multidomain extracellular 40-kDa basement membrane glycoprotein (BM-40/SPARC/osteonectin). *Eur J Biochem* 205: 233-240.

McArthur GA, et al. 2014. 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* 15: 323-332.

McClung HM, Thomas SL, Osenkowski P, Toth M, Menon P, Raz A, Fridman R, Rempel SA. 2007. SPARC upregulates MT1-MMP expression, MMP-2 activation, and the secretion and cleavage of galectin-3 in U87MG glioma cells. *Neurosci Lett* 419: 172-177.

McDonald PC, Oloumi A, Mills J, Dobreva I, Maidan M, Gray V, Wederell ED, Bally MB, Foster LJ, Dedhar S. 2008. Rictor and integrin-linked kinase interact and regulate Akt phosphorylation and cancer cell survival. *Cancer Res* 68: 1618-1624.

McMahon M. 2011. Parsing out the complexity of RAF inhibitor resistance. *Pigment Cell Melanoma Res* 24: 361-365.

McMillin DW, et al. 2010. Tumor cell-specific bioluminescence platform to identify stroma-induced changes to anticancer drug activity. *Nat Med* 16: 483-489.

Meador CB, Pao W. 2015. Old Habits Die Hard: Addiction of BRAF-Mutant Cancer Cells to MAP Kinase Signaling. *Cancer Discov* 5: 348-350.

Meads MB, Gatenby RA, Dalton WS. 2009. Environment-mediated drug resistance: a major contributor to minimal residual disease. *Nat Rev Cancer* 9: 665-674.

Medema JP, Vermeulen L. 2011. Microenvironmental regulation of stem cells in intestinal homeostasis and cancer. *Nature* 474: 318-326.

Mettouchi A, Cabon F, Montreau N, Vernier P, Mercier G, Blangy D, Tricoire H, Vigier P, Binetruy B. 1994. SPARC and thrombospondin genes are repressed by the c-jun oncogene in rat embryo fibroblasts. *EMBO J* 13: 5668-5678.

Miao B, et al. 2015. EPHA2 is a mediator of vemurafenib resistance and a novel therapeutic target in melanoma. *Cancer Discov* 5: 274-287.

Michaloglou C, Vredeveld LC, Soengas MS, Denoyelle C, Kuilman T, van der Horst CM, Majoor DM, Shay JW, Mooi WJ, Peeper DS. 2005. BRAFE600-associated senescence-like cell cycle arrest of human naevi. *Nature* 436: 720-724.

Middleton MR, et al. 2000. Randomized phase III study of temozolomide versus dacarbazine in the treatment of patients with advanced metastatic malignant melanoma. *J Clin Oncol* 18: 158-166.

Minn AJ, Gupta GP, Siegel PM, Bos PD, Shu W, Giri DD, Viale A, Olshen AB, Gerald WL, Massague J. 2005. Genes that mediate breast cancer metastasis to lung. *Nature* 436: 518-524.

Mishra S, Zhang B, Cunnick JM, Heisterkamp N, Groffen J. 2006. Resistance to imatinib of bcr/abl p190 lymphoblastic leukemia cells. *Cancer Res* 66: 5387-5393.

Mitsiades CS, Mitsiades NS, Munshi NC, Richardson PG, Anderson KC. 2006. The role of the bone microenvironment in the pathophysiology and therapeutic management of multiple myeloma: interplay of growth factors, their receptors and stromal interactions. *Eur J Cancer* 42: 1564-1573.

Miyoshi K, Sato N, Ohuchida K, Mizumoto K, Tanaka M. 2010. SPARC mRNA expression as a prognostic marker for pancreatic adenocarcinoma patients. *Anticancer Res* 30: 867-871.

Mok SC, Chan WY, Wong KK, Muto MG, Berkowitz RS. 1996. SPARC, an extracellular matrix protein with tumor-suppressing activity in human ovarian epithelial cells. *Oncogene* 12: 1895-1901.

Montagut C, et al. 2008. Elevated CRAF as a potential mechanism of acquired resistance to BRAF inhibition in melanoma. *Cancer Res* 68: 4853-4861.

Mooi WJ, Peeper DS. 2006. Oncogene-induced cell senescence--halting on the road to cancer. *N Engl J Med* 355: 1037-1046.

Moreno BH, Ribas A. 2015. Anti-programmed cell death protein-1/ligand-1 therapy in different cancers. *Br J Cancer*.

Motamed K, Sage EH. 1998. SPARC inhibits endothelial cell adhesion but not proliferation through a tyrosine phosphorylation-dependent pathway. *J Cell Biochem* 70: 543-552.

Motamed K, Blake DJ, Angello JC, Allen BL, Rapraeger AC, Hauschka SD, Sage EH. 2003. Fibroblast growth factor receptor-1 mediates the inhibition of endothelial cell proliferation and the promotion of skeletal myoblast differentiation by SPARC: a role for protein kinase A. *J Cell Biochem* 90: 408-423.

Mouw JK, Ou G, Weaver VM. 2014. Extracellular matrix assembly: a multiscale deconstruction. *Nat Rev Mol Cell Biol* 15: 771-785.

Muller A, et al. 2001. Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. *Nature* 410: 50-56.

Muller J, et al. 2014. Low MITF/AXL ratio predicts early resistance to multiple targeted drugs in melanoma. *Nat Commun* 5: 5712.

Muller PA, et al. 2009. Mutant p53 drives invasion by promoting integrin recycling. *Cell* 139: 1327-1341.

Murphy-Ullrich JE. 2001. The de-adhesive activity of matricellular proteins: is intermediate cell adhesion an adaptive state? *J Clin Invest* 107: 785-790.

Murphy-Ullrich JE, Lane TF, Pallero MA, Sage EH. 1995. SPARC mediates focal adhesion disassembly in endothelial cells through a follistatin-like region and the Ca(2+)-binding EF-hand. *J Cell Biochem* 57: 341-350.

Naba A, Clauser KR, Hoersch S, Liu H, Carr SA, Hynes RO. 2012. The matrisome: in silico definition and in vivo characterization by proteomics of normal and tumor extracellular matrices. *Mol Cell Proteomics* 11: M111 014647.

Nagai MA, Gerhard R, Fregnani JH, Nonogaki S, Rierger RB, Netto MM, Soares FA. 2011. Prognostic value of NDRG1 and SPARC protein expression in breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat* 126: 1-14.

Nagaraju GP, El-Rayes BF. 2013. SPARC and DNA methylation: possible diagnostic and therapeutic implications in gastrointestinal cancers. *Cancer Lett* 328: 10-17.

Nardin A, et al. 2011. Dacarbazine promotes stromal remodeling and lymphocyte infiltration in cutaneous melanoma lesions. *J Invest Dermatol* 131: 1896-1905.

Nathanson KL, et al. 2013. Tumor genetic analyses of patients with metastatic melanoma treated with the BRAF inhibitor dabrafenib (GSK2118436). *Clin Cancer Res* 19: 4868-4878.

Nazarian R, et al. 2010. Melanomas acquire resistance to B-RAF(V600E) inhibition by RTK or N-RAS upregulation. *Nature* 468: 973-977.

Neesse A, Michl P, Tuveson DA, Ellenrieder V. 2014a. nab-Paclitaxel: novel clinical and experimental evidence in pancreatic cancer. *Z Gastroenterol* 52: 360-366.

Neesse A, Frese KK, Chan DS, Bapiro TE, Howat WJ, Richards FM, Ellenrieder V, Jodrell DI, Tuveson DA. 2014b. SPARC independent drug delivery and antitumour effects of nab-paclitaxel in genetically engineered mice. *Gut* 63: 974-983.

Neuzillet C, Tijeras-Raballand A, Cros J, Faivre S, Hammel P, Raymond E. 2013. Stromal expression of SPARC in pancreatic adenocarcinoma. *Cancer Metastasis Rev* 32: 585-602.

Nguyen LV, Vanner R, Dirks P, Eaves CJ. 2012. Cancer stem cells: an evolving concept. *Nat Rev Cancer* 12: 133-143.

Nian Q, Xiao Q, Wang L, Luo J, Chen LP, Yang ZS, Liu L. 2014. SPARC silencing inhibits the growth of acute myeloid leukemia transformed from myelodysplastic syndrome via induction of cell cycle arrest and apoptosis. *Int J Mol Med* 33: 856-862.

Nie J, Sage EH. 2009. SPARC inhibits adipogenesis by its enhancement of beta-catenin signaling. *J Biol Chem* 284: 1279-1290.

Nie J, Chang B, Traktuev DO, Sun J, March K, Chan L, Sage EH, Pasqualini R, Arap W, Kolonin MG. 2008. IFATS collection: Combinatorial peptides identify alpha5beta1 integrin as a receptor for the matricellular protein SPARC on adipose stromal cells. *Stem Cells* 26: 2735-2745.

Niessner H, et al. 2013. Targeting hyperactivation of the AKT survival pathway to overcome therapy resistance of melanoma brain metastases. *Cancer Med* 2: 76-85.

Nikolaou VA, Stratigos AJ, Flaherty KT, Tsao H. 2012. Melanoma: new insights and new therapies. *J Invest Dermatol* 132: 854-863.

Niskakoski A, Kaur S, Staff S, Renkonen-Sinisalo L, Lassus H, Jarvinen HJ, Mecklin JP, Butzow R, Peltomaki P. 2014. Epigenetic analysis of sporadic and Lynch-associated ovarian cancers reveals histology-specific patterns of DNA methylation. *Epigenetics* 9: 1577-1587.

Noonan FP, Recio JA, Takayama H, Duray P, Anver MR, Rush WL, De Fabo EC, Merlino G. 2001. Neonatal sunburn and melanoma in mice. *Nature* 413: 271-272.

O'Connell MP, et al. 2013. Hypoxia induces phenotypic plasticity and therapy resistance in melanoma via the tyrosine kinase receptors ROR1 and ROR2. *Cancer Discov* 3: 1378-1393.

Oba-Shinjo SM, et al. 2006. Melanocyte transformation associated with substrate adhesion impediment. *Neoplasia* 8: 231-241.

Obenauf AC, et al. 2015. Therapy-induced tumour secretomes promote resistance and tumour progression. *Nature* 520: 368-372.

Olmeda D, Moreno-Bueno G, Flores JM, Fabra A, Portillo F, Cano A. 2007. SNAI1 is required for tumor growth and lymph node metastasis of human breast carcinoma MDA-MB-231 cells. *Cancer Res* 67: 11721-11731.

Omholt K, Krockel D, Ringborg U, Hansson J. 2006. Mutations of PIK3CA are rare in cutaneous melanoma. *Melanoma Res* 16: 197-200.

Orimo A, Weinberg RA. 2006. Stromal fibroblasts in cancer: a novel tumor-promoting cell type. *Cell Cycle* 5: 1597-1601.

Orimo A, Gupta PB, Sgroi DC, Arenzana-Seisdedos F, Delaunay T, Naeem R, Carey VJ, Richardson AL, Weinberg RA. 2005. Stromal fibroblasts present in invasive human breast carcinomas promote tumor growth and angiogenesis through elevated SDF-1/CXCL12 secretion. *Cell* 121: 335-348.

- Ostman A. 2012. The tumor microenvironment controls drug sensitivity. *Nat Med* 18: 1332-1334.
- Padua RA, Barrass NC, Currie GA. 1985. Activation of N-ras in a human melanoma cell line. *Mol Cell Biol* 5: 582-585.
- Palmer JS, Duffy DL, Box NF, Aitken JF, O'Gorman LE, Green AC, Hayward NK, Martin NG, Sturm RA. 2000. Melanocortin-1 receptor polymorphisms and risk of melanoma: is the association explained solely by pigmentation phenotype? *Am J Hum Genet* 66: 176-186.
- Paraiso KH, et al. 2012. The HSP90 inhibitor XL888 overcomes BRAF inhibitor resistance mediated through diverse mechanisms. *Clin Cancer Res* 18: 2502-2514.
- Paraiso KH, et al. 2011. PTEN loss confers BRAF inhibitor resistance to melanoma cells through the suppression of BIM expression. *Cancer Res* 71: 2750-2760.
- Parker BS, et al. 2004. Alterations in vascular gene expression in invasive breast carcinoma. *Cancer Res* 64: 7857-7866.
- Parmar A, Marz S, Rushton S, Holzwarth C, Lind K, Kayser S, Dohner K, Peschel C, Oostendorp RA, Gotze KS. 2011. Stromal niche cells protect early leukemic FLT3-ITD+ progenitor cells against first-generation FLT3 tyrosine kinase inhibitors. *Cancer Res* 71: 4696-4706.
- Parrinello S, Coppe JP, Krtolica A, Campisi J. 2005. Stromal-epithelial interactions in aging and cancer: senescent fibroblasts alter epithelial cell differentiation. *J Cell Sci* 118: 485-496.
- Peinado H, et al. 2012. Melanoma exosomes educate bone marrow progenitor cells toward a pro-metastatic phenotype through MET. *Nat Med* 18: 883-891.
- Petti C, Molla A, Vegetti C, Ferrone S, Anichini A, Sensi M. 2006. Coexpression of NRASQ61R and BRAFV600E in human melanoma cells activates senescence and increases susceptibility to cell-mediated cytotoxicity. *Cancer Res* 66: 6503-6511.
- Peyssonnaud C, Eychene A. 2001. The Raf/MEK/ERK pathway: new concepts of activation. *Biol Cell* 93: 53-62.
- Phan E, Ahluwalia A, Tarnawski AS. 2007. Role of SPARC--matricellular protein in pathophysiology and tissue injury healing. Implications for gastritis and gastric ulcers. *Med Sci Monit* 13: RA25-30.
- Phan SH. 2008. Biology of fibroblasts and myofibroblasts. *Proc Am Thorac Soc* 5: 334-337.
- Podhajcer OL, Benedetti L, Girotti MR, Prada F, Salvatierra E, Llera AS. 2008. The role of the matricellular protein SPARC in the dynamic interaction between the tumor and the host. *Cancer Metastasis Rev* 27: 523-537.
- Pollock PM, et al. 2003. High frequency of BRAF mutations in nevi. *Nat Genet* 33: 19-20.
- Polsky D, Bastian BC, Hazan C, Melzer K, Pack J, Houghton A, Busam K, Cordon-Cardo C, Osman I. 2001. HDM2 protein overexpression, but not gene amplification, is related to tumorigenesis of cutaneous melanoma. *Cancer Res* 61: 7642-7646.
- Pomerantz J, et al. 1998. The Ink4a tumor suppressor gene product, p19Arf, interacts with MDM2 and neutralizes MDM2's inhibition of p53. *Cell* 92: 713-723.
- Porras BH, Cockerell CJ. 1997. Cutaneous malignant melanoma: classification and clinical diagnosis. *Semin Cutan Med Surg* 16: 88-96.

Posch C, et al. 2015. Combined Inhibition of MEK and Plk1 has Synergistic Anti-Tumor Activity in NRAS Mutant Melanoma. *J Invest Dermatol*.

Poulikakos PI, Zhang C, Bollag G, Shokat KM, Rosen N. 2010. RAF inhibitors transactivate RAF dimers and ERK signalling in cells with wild-type BRAF. *Nature* 464: 427-430.

Poulikakos PI, et al. 2011. RAF inhibitor resistance is mediated by dimerization of aberrantly spliced BRAF(V600E). *Nature* 480: 387-390.

Prada F, Benedetti LG, Bravo AI, Alvarez MJ, Carbone C, Podhajcer OL. 2007. SPARC endogenous level, rather than fibroblast-produced SPARC or stroma reorganization induced by SPARC, is responsible for melanoma cell growth. *J Invest Dermatol* 127: 2618-2628.

Prahallad A, Sun C, Huang S, Di Nicolantonio F, Salazar R, Zecchin D, Beijersbergen RL, Bardelli A, Bernards R. 2012. Unresponsiveness of colon cancer to BRAF(V600E) inhibition through feedback activation of EGFR. *Nature* 483: 100-103.

Pratilas CA, Taylor BS, Ye Q, Viale A, Sander C, Solit DB, Rosen N. 2009. (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* 106: 4519-4524.

Provenzano PP, Cuevas C, Chang AE, Goel VK, Von Hoff DD, Hingorani SR. 2012. Enzymatic targeting of the stroma ablates physical barriers to treatment of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer Cell* 21: 418-429.

Psaila B, Lyden D. 2009. The metastatic niche: adapting the foreign soil. *Nat Rev Cancer* 9: 285-293.

Puntervoll HE, et al. 2013. Melanoma prone families with CDK4 germline mutation: phenotypic profile and associations with MC1R variants. *J Med Genet* 50: 264-270.

Quante M, et al. 2011. Bone marrow-derived myofibroblasts contribute to the mesenchymal stem cell niche and promote tumor growth. *Cancer Cell* 19: 257-272.

Rahman M, Chan AP, Tai IT. 2011. A peptide of SPARC interferes with the interaction between caspase8 and Bcl2 to resensitize chemoresistant tumors and enhance their regression in vivo. *PLoS One* 6: e26390.

Raines EW, Lane TF, Iruela-Arispe ML, Ross R, Sage EH. 1992. The extracellular glycoprotein SPARC interacts with platelet-derived growth factor (PDGF)-AB and -BB and inhibits the binding of PDGF to its receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89: 1281-1285.

Rana BK, et al. 1999. High polymorphism at the human melanocortin 1 receptor locus. *Genetics* 151: 1547-1557.

Ranadive NS, Menon IA. 1986. Role of reactive oxygen species and free radicals from melanins in photoinduced cutaneous inflammations. *Pathol Immunopathol Res* 5: 118-139.

Real FX, Rettig WJ, Chesa PG, Melamed MR, Old LJ, Mendelsohn J. 1986. Expression of epidermal growth factor receptor in human cultured cells and tissues: relationship to cell lineage and stage of differentiation. *Cancer Res* 46: 4726-4731.

Reed MJ, Puolakkainen P, Lane TF, Dickerson D, Bornstein P, Sage EH. 1993. Differential expression of SPARC and thrombospondin 1 in wound repair: immunolocalization and in situ hybridization. *J Histochem Cytochem* 41: 1467-1477.

Reginato MJ, Mills KR, Becker EB, Lynch DK, Bonni A, Muthuswamy SK, Brugge JS. 2005. Bim regulation of lumen formation in cultured mammary epithelial acini is targeted by oncogenes. *Mol Cell Biol* 25: 4591-4601.

Ribas A, Hodi FS, Callahan M, Konto C, Wolchok J. 2013. Hepatotoxicity with combination of vemurafenib and ipilimumab. *N Engl J Med* 368: 1365-1366.

Rinderknecht M, Detmar M. 2008. Tumor lymphangiogenesis and melanoma metastasis. *J Cell Physiol* 216: 347-354.

Robert C, Ghiringhelli F. 2009. What is the role of cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 blockade in patients with metastatic melanoma? *Oncologist* 14: 848-861.

Robert C, et al. 2011. Ipilimumab plus dacarbazine for previously untreated metastatic melanoma. *N Engl J Med* 364: 2517-2526.

Robert C, et al. 2014. Anti-programmed-death-receptor-1 treatment with pembrolizumab in ipilimumab-refractory advanced melanoma: a randomised dose-comparison cohort of a phase 1 trial. *Lancet* 384: 1109-1117.

Robert C, et al. 2015a. Improved overall survival in melanoma with combined dabrafenib and trametinib. *N Engl J Med* 372: 30-39.

Robert C, et al. 2015b. Nivolumab in previously untreated melanoma without BRAF mutation. *N Engl J Med* 372: 320-330.

Robert G, et al. 2006. SPARC represses E-cadherin and induces mesenchymal transition during melanoma development. *Cancer Res* 66: 7516-7523.

Romberg RW, Werness PG, Lollar P, Riggs BL, Mann KG. 1985. Isolation and characterization of native adult osteonectin. *J Biol Chem* 260: 2728-2736.

Ronnov-Jessen L, Petersen OW, Koteliansky VE, Bissell MJ. 1995. The origin of the myofibroblasts in breast cancer. Recapitulation of tumor environment in culture unravels diversity and implicates converted fibroblasts and recruited smooth muscle cells. *J Clin Invest* 95: 859-873.

Rothhammer T, Bosserhoff AK. 2007. Epigenetic events in malignant melanoma. *Pigment Cell Res* 20: 92-111.

Rumpler G, Becker B, Hafner C, McClelland M, Stolz W, Landthaler M, Schmitt R, Bosserhoff A, Vogt T. 2003. Identification of differentially expressed genes in models of melanoma progression by cDNA array analysis: SPARC, MIF and a novel cathepsin protease characterize aggressive phenotypes. *Exp Dermatol* 12: 761-771.

Rushworth LK, Hindley AD, O'Neill E, Kolch W. 2006. Regulation and role of Raf-1/B-Raf heterodimerization. *Mol Cell Biol* 26: 2262-2272.

Saez-Ayala M, et al. 2013. Directed phenotype switching as an effective antimelanoma strategy. *Cancer Cell* 24: 105-119.

Sage EH, Reed M, Funk SE, Truong T, Steadele M, Puolakkainen P, Maurice DH, Bassuk JA. 2003. Cleavage of the matricellular protein SPARC by matrix metalloproteinase 3 produces polypeptides that influence angiogenesis. *J Biol Chem* 278: 37849-37857.

Sage H, Johnson C, Bornstein P. 1984. Characterization of a novel serum albumin-binding glycoprotein secreted by endothelial cells in culture. *J Biol Chem* 259: 3993-4007.

Sage H, Decker J, Funk S, Chow M. 1989a. SPARC: a Ca²⁺-binding extracellular protein associated with endothelial cell injury and proliferation. *J Mol Cell Cardiol* 21 Suppl 1: 13-22.

- Sage H, Vernon RB, Decker J, Funk S, Iruela-Arispe ML. 1989b. Distribution of the calcium-binding protein SPARC in tissues of embryonic and adult mice. *J Histochem Cytochem* 37: 819-829.
- Said N, Najwer I, Motamed K. 2007. Secreted protein acidic and rich in cysteine (SPARC) inhibits integrin-mediated adhesion and growth factor-dependent survival signaling in ovarian cancer. *Am J Pathol* 170: 1054-1063.
- Sanchez-Laorden B, et al. 2014. BRAF inhibitors induce metastasis in RAS mutant or inhibitor-resistant melanoma cells by reactivating MEK and ERK signaling. *Sci Signal* 7: ra30.
- Sangaletti S, Colombo MP. 2008. Matricellular proteins at the crossroad of inflammation and cancer. *Cancer Lett* 267: 245-253.
- Sangaletti S, Stoppacciaro A, Guiducci C, Torrisi MR, Colombo MP. 2003. Leukocyte, rather than tumor-produced SPARC, determines stroma and collagen type IV deposition in mammary carcinoma. *J Exp Med* 198: 1475-1485.
- Sangaletti S, Gioiosa L, Guiducci C, Rotta G, Rescigno M, Stoppacciaro A, Chiodoni C, Colombo MP. 2005. Accelerated dendritic-cell migration and T-cell priming in SPARC-deficient mice. *J Cell Sci* 118: 3685-3694.
- Sangaletti S, Di Carlo E, Gariboldi S, Miotti S, Cappetti B, Parenza M, Rumio C, Brekken RA, Chiodoni C, Colombo MP. 2008. Macrophage-derived SPARC bridges tumor cell-extracellular matrix interactions toward metastasis. *Cancer Res* 68: 9050-9059.
- Sangaletti S, et al. 2011. SPARC oppositely regulates inflammation and fibrosis in bleomycin-induced lung damage. *Am J Pathol* 179: 3000-3010.
- Sanz-Moreno V, et al. 2011. ROCK and JAK1 signaling cooperate to control actomyosin contractility in tumor cells and stroma. *Cancer Cell* 20: 229-245.
- Sarbassov DD, Guertin DA, Ali SM, Sabatini DM. 2005. Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science* 307: 1098-1101.
- Sarkar D, Leung EY, Baguley BC, Finlay GJ, Askarian-Amiri ME. 2015. Epigenetic regulation in human melanoma: past and future. *Epigenetics* 10: 103-121.
- Sasaki T, Hohenester E, Gohring W, Timpl R. 1998. Crystal structure and mapping by site-directed mutagenesis of the collagen-binding epitope of an activated form of BM-40/SPARC/osteonectin. *EMBO J* 17: 1625-1634.
- Sato N, Fukushima N, Maehara N, Matsubayashi H, Koopmann J, Su GH, Hruban RH, Goggins M. 2003. SPARC/osteonectin is a frequent target for aberrant methylation in pancreatic adenocarcinoma and a mediator of tumor-stromal interactions. *Oncogene* 22: 5021-5030.
- Schellings MW, et al. 2009. Absence of SPARC results in increased cardiac rupture and dysfunction after acute myocardial infarction. *J Exp Med* 206: 113-123.
- Schiemann BJ, Neil JR, Schiemann WP. 2003. SPARC inhibits epithelial cell proliferation in part through stimulation of the transforming growth factor-beta-signaling system. *Mol Biol Cell* 14: 3977-3988.
- Schultz C, Lemke N, Ge S, Golembieski WA, Rempel SA. 2002. Secreted protein acidic and rich in cysteine promotes glioma invasion and delays tumor growth in vivo. *Cancer Res* 62: 6270-6277.
- Schwarzbauer JE, Spencer CS. 1993. The *Caenorhabditis elegans* homologue of the extracellular calcium binding protein SPARC/osteonectin affects nematode body morphology and mobility. *Mol Biol Cell* 4: 941-952.

Scolyer RA, Long GV, Thompson JF. 2011. Evolving concepts in melanoma classification and their relevance to multidisciplinary melanoma patient care. *Mol Oncol* 5: 124-136.

Seno T, Harada H, Kohno S, Teraoka M, Inoue A, Ohnishi T. 2009. Downregulation of SPARC expression inhibits cell migration and invasion in malignant gliomas. *Int J Oncol* 34: 707-715.

Sensi M, et al. 2006. Mutually exclusive NRASQ61R and BRAFV600E mutations at the single-cell level in the same human melanoma. *Oncogene* 25: 3357-3364.

Serini G, Gabbiani G. 1999. Mechanisms of myofibroblast activity and phenotypic modulation. *Exp Cell Res* 250: 273-283.

Serrano M, Hannon GJ, Beach D. 1993. A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4. *Nature* 366: 704-707.

Serrano M, Lin AW, McCurrach ME, Beach D, Lowe SW. 1997. Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a. *Cell* 88: 593-602.

Sethi T, et al. 1999. Extracellular matrix proteins protect small cell lung cancer cells against apoptosis: a mechanism for small cell lung cancer growth and drug resistance in vivo. *Nat Med* 5: 662-668.

Seux M, et al. 2011. TP53INP1 decreases pancreatic cancer cell migration by regulating SPARC expression. *Oncogene* 30: 3049-3061.

Shain KH, Yarde DN, Meads MB, Huang M, Jove R, Hazlehurst LA, Dalton WS. 2009. Beta1 integrin adhesion enhances IL-6-mediated STAT3 signaling in myeloma cells: implications for microenvironment influence on tumor survival and proliferation. *Cancer Res* 69: 1009-1015.

Shankavaram UT, DeWitt DL, Funk SE, Sage EH, Wahl LM. 1997. Regulation of human monocyte matrix metalloproteinases by SPARC. *J Cell Physiol* 173: 327-334.

Shao Y, Aplin AE. 2010. Akt3-mediated resistance to apoptosis in B-RAF-targeted melanoma cells. *Cancer Res* 70: 6670-6681.

Sharpless NE, Bardeesy N, Lee KH, Carrasco D, Castrillon DH, Aguirre AJ, Wu EA, Horner JW, DePinho RA. 2001. Loss of p16Ink4a with retention of p19Arf predisposes mice to tumorigenesis. *Nature* 413: 86-91.

Shekhar MP, Santner S, Carolin KA, Tait L. 2007. Direct involvement of breast tumor fibroblasts in the modulation of tamoxifen sensitivity. *Am J Pathol* 170: 1546-1560.

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

Shi H, et al. 2014a. A novel AKT1 mutant amplifies an adaptive melanoma response to BRAF inhibition. *Cancer Discov* 4: 69-79.

Shi H, et al. 2012. Melanoma whole-exome sequencing identifies (V600E)B-RAF amplification-mediated acquired B-RAF inhibitor resistance. *Nat Commun* 3: 724.

Shi H, et al. 2014b. Acquired resistance and clonal evolution in melanoma during BRAF inhibitor therapy. *Cancer Discov* 4: 80-93.

Shi Q, Bao S, Song L, Wu Q, Bigner DD, Hjelmeland AB, Rich JN. 2007. Targeting SPARC expression decreases glioma cellular survival and invasion associated with reduced activities of FAK and ILK kinases. *Oncogene* 26: 4084-4094.

Shi Q, Bao S, Maxwell JA, Reese ED, Friedman HS, Bigner DD, Wang XF, Rich JN. 2004. Secreted protein acidic, rich in cysteine (SPARC), mediates cellular survival of gliomas through AKT activation. *J Biol Chem* 279: 52200-52209.

Shiba H, et al. 1998. Differential effects of various growth factors and cytokines on the syntheses of DNA, type I collagen, laminin, fibronectin, osteonectin/secreted protein, acidic and rich in cysteine (SPARC), and alkaline phosphatase by human pulp cells in culture. *J Cell Physiol* 174: 194-205.

Shields JD, Emmett MS, Dunn DB, Joory KD, Sage LM, Rigby H, Mortimer PS, Orlando A, Levick JR, Bates DO. 2007. Chemokine-mediated migration of melanoma cells towards lymphatics--a mechanism contributing to metastasis. *Oncogene* 26: 2997-3005.

Shull AY, Latham-Schwark A, Ramasamy P, Leskoske K, Oroian D, Birtwistle MR, Buckhaults PJ. 2012. Novel somatic mutations to PI3K pathway genes in metastatic melanoma. *PLoS One* 7: e43369.

Siddiq F, Sarkar FH, Wali A, Pass HI, Lonardo F. 2004. Increased osteonectin expression is associated with malignant transformation and tumor associated fibrosis in the lung. *Lung Cancer* 45: 197-205.

Singh A, Settleman J. 2010. EMT, cancer stem cells and drug resistance: an emerging axis of evil in the war on cancer. *Oncogene* 29: 4741-4751.

Smalley KS, Brafford P, Haass NK, Brandner JM, Brown E, Herlyn M. 2005. Up-regulated expression of zonula occludens protein-1 in human melanoma associates with N-cadherin and contributes to invasion and adhesion. *Am J Pathol* 166: 1541-1554.

Smalley KS, et al. 2009. CRAF inhibition induces apoptosis in melanoma cells with non-V600E BRAF mutations. *Oncogene* 28: 85-94.

Smalley KS, et al. 2008. Increased cyclin D1 expression can mediate BRAF inhibitor resistance in BRAF V600E-mutated melanomas. *Mol Cancer Ther* 7: 2876-2883.

Smit DJ, Gardiner BB, Sturm RA. 2007. Osteonectin downregulates E-cadherin, induces osteopontin and focal adhesion kinase activity stimulating an invasive melanoma phenotype. *Int J Cancer* 121: 2653-2660.

Smith MP, et al. 2014. The immune microenvironment confers resistance to MAPK pathway inhibitors through macrophage-derived TNFalpha. *Cancer Discov* 4: 1214-1229.

Snyder A, et al. 2014. Genetic basis for clinical response to CTLA-4 blockade in melanoma. *N Engl J Med* 371: 2189-2199.

Socha MJ, Said N, Dai Y, Kwong J, Ramalingam P, Trieu V, Desai N, Mok SC, Motamed K. 2009. Aberrant promoter methylation of SPARC in ovarian cancer. *Neoplasia* 11: 126-135.

Sondergaard JN, et al. 2010. Differential sensitivity of melanoma cell lines with BRAFV600E mutation to the specific Raf inhibitor PLX4032. *J Transl Med* 8: 39.

Song H, Guan Y, Zhang L, Li K, Dong C. 2010. SPARC interacts with AMPK and regulates GLUT4 expression. *Biochem Biophys Res Commun* 396: 961-966.

Sosa MS, Girotti MR, Salvatierra E, Prada F, de Olmo JA, Gallango SJ, Albar JP, Podhajcer OL, Llera AS. 2007. Proteomic analysis identified N-cadherin, clusterin, and HSP27 as mediators of SPARC (secreted protein, acidic and rich in cysteines) activity in melanoma cells. *Proteomics* 7: 4123-4134.

Sosman JA, et al. 2012. Survival in BRAF V600-mutant advanced melanoma treated with vemurafenib. *N Engl J Med* 366: 707-714.

- Soufir N, Avril MF, Chompret A, Demenais F, Bombléd J, Spatz A, Stoppa-Lyonnet D, Benard J, Bressac-de Paillerets B. 1998. Prevalence of p16 and CDK4 germline mutations in 48 melanoma-prone families in France. The French Familial Melanoma Study Group. *Hum Mol Genet* 7: 209-216.
- Soussi T, Wiman KG. 2015. TP53: an oncogene in disguise. *Cell Death Differ*.
- Stahl JM, Sharma A, Cheung M, Zimmerman M, Cheng JQ, Bosenberg MW, Kester M, Sandirasegarane L, Robertson GP. 2004. Deregulated Akt3 activity promotes development of malignant melanoma. *Cancer Res* 64: 7002-7010.
- Steingrimsson E, Copeland NG, Jenkins NA. 2004. Melanocytes and the microphthalmia transcription factor network. *Annu Rev Genet* 38: 365-411.
- Straussman R, et al. 2012. Tumour micro-environment elicits innate resistance to RAF inhibitors through HGF secretion. *Nature* 487: 500-504.
- Sturm RA, Satyamoorthy K, Meier F, Gardiner BB, Smit DJ, Vaidya B, Herlyn M. 2002. Osteonectin/SPARC induction by ectopic beta(3) integrin in human radial growth phase primary melanoma cells. *Cancer Res* 62: 226-232.
- Sturm RA, et al. 2014. Phenotypic characterization of nevus and tumor patterns in MITF E318K mutation carrier melanoma patients. *J Invest Dermatol* 134: 141-149.
- Su F, et al. 2012. RAS mutations in cutaneous squamous-cell carcinomas in patients treated with BRAF inhibitors. *N Engl J Med* 366: 207-215.
- Sullivan MM, Sage EH. 2004. Hevin/SC1, a matricellular glycoprotein and potential tumor-suppressor of the SPARC/BM-40/Osteonectin family. *Int J Biochem Cell Biol* 36: 991-996.
- Sun C, et al. 2014. Reversible and adaptive resistance to BRAF(V600E) inhibition in melanoma. *Nature* 508: 118-122.
- Swaroop A, Hogan BL, Francke U. 1988. Molecular analysis of the cDNA for human SPARC/osteonectin/BM-40: sequence, expression, and localization of the gene to chromosome 5q31-q33. *Genomics* 2: 37-47.
- Taghizadeh F, Tang MJ, Tai IT. 2007. Synergism between vitamin D and secreted protein acidic and rich in cysteine-induced apoptosis and growth inhibition results in increased susceptibility of therapy-resistant colorectal cancer cells to chemotherapy. *Mol Cancer Ther* 6: 309-317.
- Tai IT, Dai M, Owen DA, Chen LB. 2005. Genome-wide expression analysis of therapy-resistant tumors reveals SPARC as a novel target for cancer therapy. *J Clin Invest* 115: 1492-1502.
- Taipale M, Jarosz DF, Lindquist S. 2010. HSP90 at the hub of protein homeostasis: emerging mechanistic insights. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11: 515-528.
- Tang MJ, Tai IT. 2007. A novel interaction between procaspase 8 and SPARC enhances apoptosis and potentiates chemotherapy sensitivity in colorectal cancers. *J Biol Chem* 282: 34457-34467.
- Tartare-Deckert S, Chavey C, Monthouel MN, Gautier N, Van Obberghen E. 2001. The matricellular protein SPARC/osteonectin as a newly identified factor up-regulated in obesity. *J Biol Chem* 276: 22231-22237.
- Termine JD, Kleinman HK, Whitson SW, Conn KM, McGarvey ML, Martin GR. 1981. Osteonectin, a bone-specific protein linking mineral to collagen. *Cell* 26: 99-105.
- Testori A, Rutkowski P, Marsden J, Bastholt L, Chiarion-Sileni V, Hauschild A, Eggermont AM. 2009. Surgery and radiotherapy in the treatment of cutaneous melanoma. *Ann Oncol* 20 Suppl 6: vi22-29.

- Teulings HE, Limpens J, Jansen SN, Zwinderman AH, Reitsma JB, Spuls PI, Luiten RM. 2015. Vitiligo-like depigmentation in patients with stage III-IV melanoma receiving immunotherapy and its association with survival: a systematic review and meta-analysis. *J Clin Oncol* 33: 773-781.
- Thiery JP. 2002. Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nat Rev Cancer* 2: 442-454.
- Thomas NE, et al. 2007. Number of nevi and early-life ambient UV exposure are associated with BRAF-mutant melanoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 16: 991-997.
- Tichet M, et al. 2015. Tumour-derived SPARC drives vascular permeability and extravasation through endothelial VCAM1 signalling to promote metastasis. *Nat Commun* 6: 6993.
- Ting DT, et al. 2014. Single-cell RNA sequencing identifies extracellular matrix gene expression by pancreatic circulating tumor cells. *Cell Rep* 8: 1905-1918.
- Torisu H, Ono M, Kiryu H, Furue M, Ohmoto Y, Nakayama J, Nishioka Y, Sone S, Kuwano M. 2000. Macrophage infiltration correlates with tumor stage and angiogenesis in human malignant melanoma: possible involvement of TNFalpha and IL-1alpha. *Int J Cancer* 85: 182-188.
- Toullec A, et al. 2010. Oxidative stress promotes myofibroblast differentiation and tumour spreading. *EMBO Mol Med* 2: 211-230.
- Tremble PM, Lane TF, Sage EH, Werb Z. 1993. SPARC, a secreted protein associated with morphogenesis and tissue remodeling, induces expression of metalloproteinases in fibroblasts through a novel extracellular matrix-dependent pathway. *J Cell Biol* 121: 1433-1444.
- Tripathi R, Mishra R. 2010. Interaction of Pax6 with SPARC and p53 in brain of mice indicates Smad3 dependent auto-regulation. *J Mol Neurosci* 41: 397-403.
- Tripodo C, et al. 2012. Stromal SPARC contributes to the detrimental fibrotic changes associated with myeloproliferation whereas its deficiency favors myeloid cell expansion. *Blood* 120: 3541-3554.
- Trunzer K, et al. 2013. Pharmacodynamic effects and mechanisms of resistance to vemurafenib in patients with metastatic melanoma. *J Clin Oncol* 31: 1767-1774.
- Tsao H, Zhang X, Fowlkes K, Haluska FG. 2000. Relative reciprocity of NRAS and PTEN/MMAC1 alterations in cutaneous melanoma cell lines. *Cancer Res* 60: 1800-1804.
- Tsao H, Goel V, Wu H, Yang G, Haluska FG. 2004. Genetic interaction between NRAS and BRAF mutations and PTEN/MMAC1 inactivation in melanoma. *J Invest Dermatol* 122: 337-341.
- Tucker MA, Halpern A, Holly EA, Hartge P, Elder DE, Sagebiel RW, Guerry Dt, Clark WH, Jr. 1997. Clinically recognized dysplastic nevi. A central risk factor for cutaneous melanoma. *JAMA* 277: 1439-1444.
- Turajlic S, et al. 2014. Whole-genome sequencing reveals complex mechanisms of intrinsic resistance to BRAF inhibition. *Ann Oncol* 25: 959-967.
- Udayakumar D, Tsao H. 2009. Melanoma genetics: an update on risk-associated genes. *Hematol Oncol Clin North Am* 23: 415-429, vii.
- Valverde P, Healy E, Jackson I, Rees JL, Thody AJ. 1995. Variants of the melanocyte-stimulating hormone receptor gene are associated with red hair and fair skin in humans. *Nat Genet* 11: 328-330.
- Valverde P, Healy E, Sikkink S, Haldane F, Thody AJ, Carothers A, Jackson IJ, Rees JL. 1996. The Asp84Glu variant of the melanocortin 1 receptor (MC1R) is associated with melanoma. *Hum Mol Genet* 5: 1663-1666.

Van Allen EM, et al. 2014. The genetic landscape of clinical resistance to RAF inhibition in metastatic melanoma. *Cancer Discov* 4: 94-109.

van den Oord JJ, Paemen L, Opdenakker G, de Wolf-Peeters C. 1997. Expression of gelatinase B and the extracellular matrix metalloproteinase inducer EMMPRIN in benign and malignant pigment cell lesions of the skin. *Am J Pathol* 151: 665-670.

Vernon RB, Sage H. 1989. The calcium-binding protein SPARC is secreted by Leydig and Sertoli cells of the adult mouse testis. *Biol Reprod* 40: 1329-1340.

Vial E, Perez S, Castellazzi M. 2000. Transcriptional control of SPARC by v-Jun and other members of the AP1 family of transcription factors. *Oncogene* 19: 5020-5029.

Villanueva J, et al. 2010. Acquired resistance to BRAF inhibitors mediated by a RAF kinase switch in melanoma can be overcome by cotargeting MEK and IGF-1R/PI3K. *Cancer Cell* 18: 683-695.

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

Viros A, et al. 2014. Ultraviolet radiation accelerates BRAF-driven melanomagenesis by targeting TP53. *Nature* 511: 478-482.

Voura EB, Ramjeesingh RA, Montgomery AM, Siu CH. 2001. Involvement of integrin alpha(v)beta(3) and cell adhesion molecule L1 in transendothelial migration of melanoma cells. *Mol Biol Cell* 12: 2699-2710.

Vredevelde LC, et al. 2012. Abrogation of BRAFV600E-induced senescence by PI3K pathway activation contributes to melanomagenesis. *Genes Dev* 26: 1055-1069.

Wagenaar TR, Ma L, Roscoe B, Park SM, Bolon DN, Green MR. 2014. Resistance to vemurafenib resulting from a novel mutation in the BRAFV600E kinase domain. *Pigment Cell Melanoma Res* 27: 124-133.

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

Wagle N, et al. 2014. MAP kinase pathway alterations in BRAF-mutant melanoma patients with acquired resistance to combined RAF/MEK inhibition. *Cancer Discov* 4: 61-68.

Walker GJ, Flores JF, Glendening JM, Lin AH, Markl ID, Fountain JW. 1998. Virtually 100% of melanoma cell lines harbor alterations at the DNA level within CDKN2A, CDKN2B, or one of their downstream targets. *Genes Chromosomes Cancer* 22: 157-163.

Wan PT, et al. 2004. Mechanism of activation of the RAF-ERK signaling pathway by oncogenic mutations of B-RAF. *Cell* 116: 855-867.

Wandel E, Raschke A, Hildebrandt G, Eberle J, Dummer R, Anderegg U, Saalbach A. 2002. Fibroblasts enhance the invasive capacity of melanoma cells in vitro. *Arch Dermatol Res* 293: 601-608.

Wang J, et al. 2015. Epigenetic changes of EGFR have an important role in BRAF inhibitor-resistant cutaneous melanomas. *J Invest Dermatol* 135: 532-541.

Wang P, Gilmore AP, Streuli CH. 2004. Bim is an apoptosis sensor that responds to loss of survival signals delivered by epidermal growth factor but not those provided by integrins. *J Biol Chem* 279: 41280-41285.

Wang W, et al. 2009. Crosstalk to stromal fibroblasts induces resistance of lung cancer to epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors. *Clin Cancer Res* 15: 6630-6638.

Wang Y, et al. 2014. Bufalin is a potent small-molecule inhibitor of the steroid receptor coactivators SRC-3 and SRC-1. *Cancer Res* 74: 1506-1517.

Watson IR, et al. 2014. The RAC1 P29S hotspot mutation in melanoma confers resistance to pharmacological inhibition of RAF. *Cancer Res* 74: 4845-4852.

Weaver MS, Sage EH, Yan Q. 2006. Absence of SPARC in lens epithelial cells results in altered adhesion and extracellular matrix production in vitro. *J Cell Biochem* 97: 423-432.

Weaver MS, Workman G, Sage EH. 2008. The copper binding domain of SPARC mediates cell survival in vitro via interaction with integrin beta1 and activation of integrin-linked kinase. *J Biol Chem* 283: 22826-22837.

Webber J, Steadman R, Mason MD, Tabi Z, Clayton A. 2010. Cancer exosomes trigger fibroblast to myofibroblast differentiation. *Cancer Res* 70: 9621-9630.

Weeraratna AT, Jiang Y, Hostetter G, Rosenblatt K, Duray P, Bittner M, Trent JM. 2002. Wnt5a signaling directly affects cell motility and invasion of metastatic melanoma. *Cancer Cell* 1: 279-288.

Wellbrock C, Karasarides M, Marais R. 2004. The RAF proteins take centre stage. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5: 875-885.

Whiteman DC, Whiteman CA, Green AC. 2001. Childhood sun exposure as a risk factor for melanoma: a systematic review of epidemiologic studies. *Cancer Causes Control* 12: 69-82.

Whiteman DC, Pavan WJ, Bastian BC. 2011. The melanomas: a synthesis of epidemiological, clinical, histopathological, genetic, and biological aspects, supporting distinct subtypes, causal pathways, and cells of origin. *Pigment Cell Melanoma Res* 24: 879-897.

Whittaker SR, Theurillat JP, Van Allen E, Wagle N, Hsiao J, Cowley GS, Schadendorf D, Root DE, Garraway LA. 2013. A genome-scale RNA interference screen implicates NF1 loss in resistance to RAF inhibition. *Cancer Discov* 3: 350-362.

Widmer DS, Hoek KS, Cheng PF, Eichhoff OM, Biedermann T, Raaijmakers MI, Hemmi S, Dummer R, Levesque MP. 2013. Hypoxia contributes to melanoma heterogeneity by triggering HIF1alpha-dependent phenotype switching. *J Invest Dermatol* 133: 2436-2443.

Willmore-Payne C, Holden JA, Tripp S, Layfield LJ. 2005. Human malignant melanoma: detection of BRAF- and c-kit-activating mutations by high-resolution amplicon melting analysis. *Hum Pathol* 36: 486-493.

Wilson TR, et al. 2012. Widespread potential for growth-factor-driven resistance to anticancer kinase inhibitors. *Nature* 487: 505-509.

Wolchok JD, et al. 2013. Nivolumab plus ipilimumab in advanced melanoma. *N Engl J Med* 369: 122-133.

Wong DJ, et al. 2014. Antitumor activity of the ERK inhibitor SCH722984 against BRAF mutant, NRAS mutant and wild-type melanoma. *Mol Cancer* 13: 194.

Wu D, Li L, Yang M, Liu H, Yang G. 2011. Elevated plasma levels of SPARC in patients with newly diagnosed type 2 diabetes mellitus. *Eur J Endocrinol* 165: 597-601.

Wu H, Goel V, Haluska FG. 2003. PTEN signaling pathways in melanoma. *Oncogene* 22: 3113-3122.

Yan LM, Wang CZ, Lin B, Liu JJ, Liu DW, Hou R, Wang YF, Gao LL, Zhang SL, Iwamori M. 2015. Lewis y enhances CAM-DR in ovarian cancer cells by activating the FAK signaling pathway and upregulating Bcl-2/Bcl-XL expression. *Biochimie*.

- Yan Q, Clark JI, Wight TN, Sage EH. 2002. Alterations in the lens capsule contribute to cataractogenesis in SPARC-null mice. *J Cell Sci* 115: 2747-2756.
- Yang E, Kang HJ, Koh KH, Rhee H, Kim NK, Kim H. 2007. Frequent inactivation of SPARC by promoter hypermethylation in colon cancers. *Int J Cancer* 121: 567-575.
- Yang G, Rajadurai A, Tsao H. 2005. Recurrent patterns of dual RB and p53 pathway inactivation in melanoma. *J Invest Dermatol* 125: 1242-1251.
- Yang Z, Kyriakides TR, Bornstein P. 2000. Matricellular proteins as modulators of cell-matrix interactions: adhesive defect in thrombospondin 2-null fibroblasts is a consequence of increased levels of matrix metalloproteinase-2. *Mol Biol Cell* 11: 3353-3364.
- Yasumoto K, Yokoyama K, Shibata K, Tomita Y, Shibahara S. 1994. Microphthalmia-associated transcription factor as a regulator for melanocyte-specific transcription of the human tyrosinase gene. *Mol Cell Biol* 14: 8058-8070.
- Yazdi AS, et al. 2003. Mutations of the BRAF gene in benign and malignant melanocytic lesions. *J Invest Dermatol* 121: 1160-1162.
- Yeh JJ, Kim WY. 2015. Targeting Tumor Hypoxia With Hypoxia-Activated Prodrugs. *J Clin Oncol*.
- Yiu GK, Chan WY, Ng SW, Chan PS, Cheung KK, Berkowitz RS, Mok SC. 2001. SPARC (secreted protein acidic and rich in cysteine) induces apoptosis in ovarian cancer cells. *Am J Pathol* 159: 609-622.
- Yokoyama S, et al. 2011. A novel recurrent mutation in MITF predisposes to familial and sporadic melanoma. *Nature* 480: 99-103.
- Yu H, et al. 2009. The role of BRAF mutation and p53 inactivation during transformation of a subpopulation of primary human melanocytes. *Am J Pathol* 174: 2367-2377.
- Zavala VA, Kalergis AM. 2015. New clinical advances in immunotherapy for the treatment of solid tumours. *Immunology*.
- Zeisberg EM, Potenta S, Xie L, Zeisberg M, Kalluri R. 2007. Discovery of endothelial to mesenchymal transition as a source for carcinoma-associated fibroblasts. *Cancer Res* 67: 10123-10128.
- Zerp SF, van Elsas A, Peltenburg LT, Schrier PI. 1999. p53 mutations in human cutaneous melanoma correlate with sun exposure but are not always involved in melanomagenesis. *Br J Cancer* 79: 921-926.
- Zhang J, Liu J. 2013. Tumor stroma as targets for cancer therapy. *Pharmacol Ther* 137: 200-215.
- Zhou Y, Hofstetter WL, He Y, Hu W, Pataer A, Wang L, Wang J, Yu L, Fang B, Swisher SG. 2010. KLF4 inhibition of lung cancer cell invasion by suppression of SPARC expression. *Cancer Biol Ther* 9: 507-513.
- Zipser MC, et al. 2011. A proliferative melanoma cell phenotype is responsive to RAF/MEK inhibition independent of BRAF mutation status. *Pigment Cell Melanoma Res* 24: 326-333.
- Zou W, Chen L. 2008. Inhibitory B7-family molecules in the tumour microenvironment. *Nat Rev Immunol* 8: 467-477.
- Zuo L, Weger J, Yang Q, Goldstein AM, Tucker MA, Walker GJ, Hayward N, Dracopoli NC. 1996. Germline mutations in the p16INK4a binding domain of CDK4 in familial melanoma. *Nat Genet* 12: 97-99.

ANNEXES

The Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT) Regulatory Factor SLUG (SNAI2) Is a Downstream Target of SPARC and AKT in Promoting Melanoma Cell Invasion

Nina Fenouille^{1,2,3}, Mélanie Tichet^{1,2,3}, Maeva Dufies^{1,3}, Anaïs Pottier^{1,2,3}, Ariane Mogha⁴, Julia K. Soo⁵, Stéphane Rocchi^{1,3,7}, Aude Mallavialle^{2,3}, Marie-Dominique Galibert⁴, Amir Khammari⁶, Jean-Philippe Lacour⁷, Robert Ballotti^{1,3,7}, Marcel Deckert^{2,3}, Sophie Tartare-Deckert^{1,2,3,7*}

1 INSERM, U1065, Centre Méditerranéen de Médecine Moléculaire (C3M), Biologie et Pathologies des Mélanocytes, Nice, France, **2** INSERM, U1065, C3M, Microenvironnement, Signalisation et Cancer, Nice, France, **3** Université de Nice – Sophia Antipolis, Faculté de Médecine, Institut Signalisation et Pathologie (IFR50), Nice, France, **4** CNRS-UMR6290, Université de Rennes1, Centre Hospitalier Universitaire (CHU) Rennes, Rennes, France, **5** Division of Biomedical Sciences, St. George's, University of London, London, United Kingdom, **6** CHU Nantes, Département d'OncoDermatologie, INSERM, U892, Nantes, France, **7** CHU Nice, Hôpital Archet, Service de Dermatologie, Nice, France

Abstract

During progression of melanoma, malignant melanocytes can be reprogrammed into mesenchymal-like cells through a process similar to epithelial-mesenchymal transition (EMT), which is associated with downregulation of the junctional protein E-cadherin and acquisition of a migratory phenotype. Recent evidence supports a role for SLUG, a transcriptional repressor of E-cadherin, as a melanocyte lineage transcription factor that predisposes to melanoma metastasis. However, the signals responsible for SLUG expression in melanoma are unclear and its role in the invasive phenotype is not fully elucidated. Here, we report that SLUG expression and activation is driven by SPARC (also known as osteonectin), a secreted extracellular matrix-associated factor that promotes EMT-like changes. Ectopic expression or knockdown of SPARC resulted in increased or reduced expression of SLUG, respectively. SLUG increase occurred concomitantly with SPARC-mediated downregulation of E-cadherin and P-cadherin, and induction of mesenchymal traits in human melanocytes and melanoma cells. Pharmacological blockade of PI3 kinase/AKT signaling impeded SPARC-induced SLUG levels and cell migration, whereas adenoviral introduction of constitutively active AKT allowed rescue of SLUG and migratory capabilities of SPARC knockdown cells. We also observed that pharmacological inhibition of oncogenic BRAF^{V600E} using PLX4720 did not influence SLUG expression in melanoma cells harboring BRAF^{V600E}. Furthermore, SLUG is a bona fide transcriptional repressor of E-cadherin as well as a regulator of P-cadherin in melanoma cells and its knockdown attenuated invasive behavior and blocked SPARC-enhanced cell migration. Notably, inhibition of cell migration in SPARC-depleted cells was rescued by expression of a SLUG transgene. In freshly isolated metastatic melanoma cells, a positive association between SPARC and SLUG mRNA levels was also found. These findings reveal that autocrine SPARC maintains heightened SLUG expression in melanoma cells and indicate that SPARC may promote EMT-associated tumor invasion by supporting AKT-dependent upregulation of SLUG.

Citation: Fenouille N, Tichet M, Dufies M, Pottier A, Mogha A, et al. (2012) The Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT) Regulatory Factor SLUG (SNAI2) Is a Downstream Target of SPARC and AKT in Promoting Melanoma Cell Invasion. PLoS ONE 7(7): e40378. doi:10.1371/journal.pone.0040378

Editor: Neil A. Hotchin, University of Birmingham, United Kingdom

Received: February 6, 2012; **Accepted:** June 4, 2012; **Published:** July 20, 2012

Copyright: © 2012 Fenouille et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was supported by the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) and the Association pour la Recherche sur le Cancer (ARC). NF is a recipient of a doctoral fellowship from ARC. STD is a recipient of a Contrat d'Interface Clinique, Service de Dermatologie, CHU de Nice. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: tartare@unice.fr

Introduction

Epithelial to mesenchymal transition (EMT) is a highly conserved developmental program activated during mesoderm formation and neural crest development. This program has also been implicated in promoting dissemination of single malignant cells from primary epithelial tumors [1]. During EMT, cells discard their epithelial characteristics, including cell adhesion and polarity, reorganize their cytoskeleton and acquire a mesenchymal morphology and the ability to migrate. One of the hallmarks of EMT is the functional loss of the cell-cell junction protein E-cadherin. E-cadherin is considered a suppressor of tumor invasion and consistently, loss or partial loss of E-cadherin has been

associated with metastatic dissemination and poor prognosis in several solid tumors [1]. Several transcription factors have been identified that can repress E-cadherin expression including SNAIL/SNAI1, SLUG/SNAI2, ZEB1, ZEB2/SIP1, Twist proteins and E47 [2]. These EMT transcription factors bind to E-box elements in the promoter region of E-cadherin leading to transcriptional repression of junctional complexes and induction of the mesenchymal phenotype.

Cutaneous melanoma is an aggressive and potentially fatal form of cancer that derives from melanin-producing melanocytes in the epidermis. Melanocytes originate in the neural crest, a population of highly migratory embryonic cells [3]. Melanoma is a neoplasm

of neuroectodermal origin and because of this melanoma cells may not undergo classic EMT-like changes. However, their ability to invade into the dermis is associated with an EMT-like phenotype characterized by changes in expression of cell-cell adhesion molecules of the cadherins family [4,5]. In normal skin, E-cadherin mediates contacts between melanocyte and adjacent keratinocytes. During melanoma progression, the transition from radial growth phase (RGP) to invasive or vertical growth phase (VGP) is characterized by decreased E-cadherin expression that results in the loss of keratinocyte-mediated growth and motility control [6]. In addition to the loss of E-cadherin, downregulation of other members of classical cadherins such as P- or H-cadherin as well as generation of a truncated secreted form of P-cadherin are frequently observed during progression of melanomas [7–9]. Over the past several years, major advances have been made in the identification of genetic factors that contribute to melanoma initiation such as activating mutations in the oncogenes *BRAF* and *NRAS*, however the molecular mechanisms that govern the transition of RGP to VGP with the capacity to metastasize and EMT-related events are still poorly characterized.

SLUG (or *SNAI2*) belongs to the *SNAIL* superfamily of zing-finger transcription factors. These developmental proteins are central regulators of EMT during neural crest cell migration and cancer [10]. SLUG is critical for the normal development of neural crest-derived cells [11] and loss-of-function SLUG mutations result in piebaldism and Waardenburg syndrome type 2, two human disorders associated with defective functioning of the embryonic neural crest [12,13]. SLUG is also required for epithelial cell motility during wound healing and SLUG null mice have retarded epithelial migration rates [14]. More interesting, in melanoma, it was shown that SLUG functions as a melanocyte-specific factor required for the strong metastatic propensity of this tumor [15]. This study also revealed that a gene relevant to embryonic neural crest development might also play a role in the acquisition of the metastatic phenotype. More recently, SLUG was also shown to regulate the transcriptional activity of ZEB1, another important EMT regulator [16]. Apart from its role as an E-cadherin repressor and EMT inducer, SLUG is a survival molecule that promotes resistance to apoptosis in some cell contexts [17–20]. In addition, SLUG is a p53 target that antagonizes p53-mediated apoptosis [21]. Whereas SLUG is recognized to drive melanoma metastasis and a key EMT inducer, an important question remains concerning the mechanisms that contribute to the expression and regulation of SLUG during melanoma progression.

Among the proteins whose expression is associated with metastasis and EMT-like changes is the secreted matricellular protein SPARC (also known as osteonectin), which regulates diverse cellular functions, including cell adhesion, migration, cell cycle and survival in a cell-type- and context-dependent manner [22,23]. Suppression of SPARC expression in human melanoma cells reduced their tumorigenic potential in mouse xenograft assays and inhibited migratory and invasive abilities of human melanoma cells *in vitro* [22,24,25]. Conversely, the expression of SPARC in human melanocytes was sufficient to repress E- and P-cadherin and promote epithelial-mesenchymal like transition with acquisition of a migratory phenotype [22]. Our previous study also found that SPARC regulates *SNAIL* expression in melanocytes and melanoma cells [22]. However, it remains to be addressed whether and how SPARC activates other EMT-inducing transcription factors to suppress E-cadherin and promote cell migration. In this work, we studied further the interplay between SPARC, E- and P-cadherin repression and EMT-like induction in melanoma cells. Our results show SPARC/AKT-dependent regulation of SLUG

as an important mechanism underlying EMT-induced cell migration in melanoma.

Materials and Methods

Plasmids

The Myc-tagged human SPARC expression plasmid was described previously [22]. Wild-type (–178 wt) and E2 box mutant (mE-pal) mouse E-cadherin promoter constructs fused to luciferase were the generous gifts of Dr. Amparo Cano and have been described previously [26]. Flag-tagged SLUG expression plasmid (Addgene plasmid 25696) was from Dr. Eric R. Fearon.

Cells and Reagents

Human 501mel cells, kindly supplied by Ruth Halaban were described elsewhere [27]. Human WM9 and WM793 cell lines were the kind gift of Meenhard Herlyn and have been previously described [28]. MeWo and SK-mel28 cell lines were purchased from ATCC. Human melanoma cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle Medium (DMEM) supplemented with 7% fetal bovine serum (Hyclone). Radial growth phase (SGM3 and SGM4) and vertical growth phase, (SGM5 and ME1402) melanoma lines were provided by the Wellcome Trust Functional Genomics Cell Bank at St George's and described previously [29]. M234, Melan20, M110 and M253b cells were derived from metastatic melanoma tumors by the Dermato-Oncology Department of Nantes University Hospital. A written consent was obtained from the patients for the use of samples and studies were approved by the local ethics committees "Comité de Protection des Personnes Ouest IV-Nantes" and the "Agence Française de Sécurité Sanitaire des Produits de Santé". Human primary epidermal melanocytes were isolated from foreskin and cultured as described previously [22]. 501mel cells expressing a Myc-tagged SPARC (501mel SPARC clones #1 and #2) or carrying an empty expression cassette of pcDNA3 vector (501mel CTRL) were described earlier [25]. 501mel cells were stably transfected with SLUG expression plasmid and bulk selected in 2 µg/ml puromycin prior to protein analysis and migration assays. Primers and culture reagents were purchased from Invitrogen. AKT inhibitor IV (AIIV) and PI3 kinase inhibitor LY29004 were from Calbiochem. BRAF inhibitor PLX4720 was from Synkinase. Cells were exposed to the various inhibitors at the indicated concentrations for 3 hours. An equal amount of DMSO was used as vehicle control. All other reagents were obtained from Sigma unless stated otherwise.

Real-time Quantitative PCR

Total RNA was extracted from cell samples using Nucleospin RAI kit (Macherey-Nagel) and following the manufacturer's instructions. Recovered RNA samples were quantified using NanoDrop spectrophotometer ND1000 (Thermo Fisher Scientific). Reverse transcription was performed on 0.5 µg of total RNA in a volume of 20 µL using High capacity cDNA Reverse Transcription kit (Applied Biosystems) according to the manufacturer's instructions. Quantitative PCR was performed on 25 ng cDNA samples, in sealed 384-well microtiter plates using the SYBR GreenTM PCR Master Mix (Applied Biosystems) with the 7900HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems). Transcript relative amounts were determined using the delta-delta-Ct method [30] and human 18S transcript level was used as internal normalizer for each sample. Primer pairs for each cDNA were designed using Primer Express Software (Applied Biosystems). Primer sequences are shown in Table 1.

Table 1. Sequences of the primers used in Real-time Q-PCR assays.

Gene product	sense	antisense
SPARC	acatcgggcttgcaatac	cagtcagaaggtgtgtcctcat
SNAIL	ttctctaggccttgctgc	tacttctgacatctgagtggtctg
SLUG	ctgggctggccaacataag	ccttgctacagatttacagctgaag
TBX2	tcaccatcctaaactccatgc	atgtcgttgctgcactat
TBX3	gcagctttcaactgctcg	tgaggttcgatgctccata
TWIST1	gcaggacgtgtccagctc	ctggctcttctcgtctgt
TWIST2	gcaagaagtgcagcgaagat	gctctgcagctctcgaa
E47	agtaccggacgaggtgctgc	gctttgcccagctgaggtg
18S	tcggaactgagccatgatt	cctccgacttctgttctgatt

doi:10.1371/journal.pone.0040378.t001

Adenoviral Gene Transduction

Adenoviruses carrying an empty expression cassette of pcDNA3 vector, used as control (AdCTRL) or expressing SPARC with a Myc-tag at its carboxyl terminus were described previously (AdSPARC) [22]. Adenovirus expressing the constitutively active mutant of AKT1, Myr-HA-AKT1 (AdAKT^{ca}), was purchased from Vector Biolabs. Adenoviruses were amplified as earlier described [31]. Cells were infected at multiplicity of infection of 5 and assayed 3 days post-infection.

siRNA Transfection

The control and Stealth[®] SPARC siRNA duplexes (sequences #1 and #2) were designed by Invitrogen and described previously [25,32]. Human SLUG and p53 Stealth[®] siRNAs were purchased from Invitrogen. Transfection of siRNA was carried out using Lipofectamine RNAiMAX (Invitrogen), at a final concentration of 50 nM. Sequences are shown in Table 2.

Cell Lysis and Immunoblotting

Cells were harvested in lysis buffer: 50 mM Tris; 150 mM NaCl; 1% Triton X-100 supplemented with protease inhibitors and phosphatase inhibitors (Roche Diagnostics). Whole cell lysates were subjected to SDS-PAGE and immunoblot analyses done using antibodies to SPARC (Haematologic Technologies), SLUG (Santa Cruz Biotechnology), Myc (Santa Cruz Biotechnology), E-cadherin (BD Biosciences), P-cadherin (BD Biosciences), AKT and phospho-AKT (Ser473) (Cell Signaling Technology), GSK3 β (Santa Cruz Biotechnology), phospho-GSK3 β (Ser9) (Cell Signaling Technology), phospho-ERK1/2 (Cell Signaling Technology), SNAIL (clone 17EC3, a generous gift

of Dr. A. Garcia de Herreros) [33], HSP60 (Santa Cruz Biotechnology), Fibronectin (Sigma) and p53 (Santa Cruz Biotechnology). Peroxidase-conjugated anti-mouse, anti-rabbit and anti-goat antibodies were from Dakopatts. Immunoreactivity was detected with Amersham ECL system.

Fluorescence and Confocal Microscopy

Cells grown on glass coverslips were rinsed briefly in PBS, fixed in PBS containing 4% formaldehyde, and incubated in a solution containing 0.2% saponin and 1% BSA in PBS for 1 h at room temperature. Cells were incubated with primary antibodies (anti-E-cadherin 1:100, BD Biosciences; anti-SPARC 1:50, R&D Systems; anti-SLUG 1:100, Santa Cruz Biotechnology; anti-Fibronectin 1:100, BD Biosciences) for 1 h at room temperature. Cells were washed, incubated with Alexa Fluor-conjugated secondary antibodies (1:1000; Molecular probes), washed again, and mounted in Prolong antifade (Invitrogen). For actin staining, fixed cells were incubated with Texas Red-X phalloidin (1:100, Molecular Probes) for 1 h at room temperature. Images were captured on a Zeiss LSM 510 META laser scanning confocal microscope, with sequential fluorophore excitation.

Cell Migration and Three-dimensional (3D) Spheroid Invasion Assay

Chemotaxis assays were monitored using modified Boyden chambers as previously described [25]. Melanoma spheroids were generated using the liquid overlay technique and implanted into a collagen type 1 matrix in growth medium as described [34]. Tumor cell outgrowth was visualized by phase contrast microscopy.

E-cadherin Promoter Analysis

Transfection of 501mel cells was carried out by using the FuGENE 6 reagent (Roche Applied Sciences). Cells were transfected in 24-well plates with 200 ng of the wild-type (-178 wt) or mutant (mE-pal) luciferase reporter constructs and 50 ng of pCMV- β -galactosidase as a control for transfection efficiency. Cells were harvested 72 hours after transfection and assayed for luciferase activity using the Luciferase assay system (Promega). All experimental values were determined from triplicate wells. Each experiment was repeated at least twice [22,25].

Cell-cell Adhesion Assay

The cell aggregation assay was performed essentially as described in [35] with the minor following modifications. Cells were detached by a treatment with HyQTase (Hyclone), plated on bacterial Petri dishes and incubated at 37°C on a gyratory shaker

Table 2. siRNAs sequences.

name	sense	antisense
siSPARC#1	AUUUCUUUACAUCAGAAUGGGUCUG	CAGACCAUUCUGAUGUAAAGAAAU
siSPARC#2	CCACAGUACCGAAUUCUCUUUAAA	UUAAAGAGAGAAUCCGGUACUGUGG
siSLUG#1	AUUUCUUUACAUCAGAAUGGGUCUG	CAGACCAUUCUGAUGUAAAGAAAU
siSLUG#2	UUGACCGUCUGCAAUGCTT	GCAUUUGCAGACAGGUCAATT
siP53	GCCAAGUCUGGACUUGCAGCUACU	AGUACGUGCAAGUCACAGACUUGGC
siCTRL	CGUACGCGAAUACUUCGATT	UCGAAGUAAUCCGGUACGTT

doi:10.1371/journal.pone.0040378.t002

(100 rpm) for 30 min. Clusters of >5 cells were counted from 5 different fields per dish.

Fluorescent-based Cell Adhesion Assay

The adhesion assays were performed in black 96-well culture dishes in triplicate. Plates were coated overnight at 4°C with 10 µg/mL Fibronectin (BD Biosciences). Cells were collected by HyQTase treatment (Hyclone), labeled with 5 µM CellTracker Green CMFDA (Molecular probes), a cell permeant fluorogenic esterase substrate. After 30 min at 37°C cells were allowed to adhere in serum-free DMEM containing 0.1% fatty-acid-free BSA. At indicated time points, non-adherent cells were removed by washing with PBS supplemented with 1 mM CaCl₂ and 1 mM MgCl₂ and fluorescence was measured using a Fluoroskan microplate reader (excitation, 485 nm; emission, 530 nm). Data are expressed as the percentage of adherent cells per total cells.

Cell Proliferation, Cell Cycle and Apoptosis Analysis

Cell proliferation was determined by a colorimetric assay that is based on the cleavage of yellow tetrazolium salt (XTT) to form an orange formazan dye by mitochondrial dehydrogenases (Cell Proliferation Kit II; Roche Diagnostics). The absorbance of the formazan dye was measured at 490 nm. All experimental values were determined from quadruplicate wells.

Cell cycle profiles were determined by flow cytometric analysis of propidium iodide (PI)-stained cells as previously described [25]. Cells were analyzed using a FACScan (Becton-Dickinson) and the CellQuest software. For flow cytometric analysis of apoptotic death, cells were stained with the Annexin-V-fluos staining kit (Roche Applied Science) according to the manufacturers' protocol.

Statistical Analysis

Unless otherwise stated all experiments were repeated at least three times and representative data/images are shown. Error bars indicate ± SD. Student's *t* and Spearman tests were performed to determine statistical significance. *P*<0.05 was considered statistically significant.

Results

Tumor Cell-derived SPARC Controls SLUG during EMT-like Transition in Melanoma Cells and Melanocytes

We previously showed that SPARC induces E-cadherin repression and EMT-like processes in melanocytes and melanoma cells [22]. To further explore the mechanism of SPARC-mediated E-cadherin silencing, we examined the mRNA expression levels of known E-cadherin repressors that initiate EMT-like transition: SNAIL, SLUG, Twist1, Twist2, E47 [2]. We also examined the levels of Tbx2 and Tbx3, which have been associated with E-cadherin downregulation in melanoma cells [35]. We increased SPARC expression in E-cadherin positive 501mel cells by adenoviral delivery. Real-time Q-PCR analyses showed that overexpression of SPARC in 501mel led to an induction of SLUG, SNAIL, Tbx2 and Tbx3 transcripts (Figure 1A). In contrast, Twist1 and E47 mRNA levels were unaffected by SPARC overexpression. Twist2 mRNA, however, was slightly decreased in cells transduced by AdSPARC compared to control cells. SNAIL mRNA induction following SPARC expression was consistent with our previous observations [22] that SPARC induced SNAIL in human primary melanocytes. At protein level, we confirmed upregulation of SLUG and SNAIL by adenoviral-delivered SPARC expression (Figure 1B, left; Figure S1A), whereas levels of Tbx2 and Tbx3 were unaffected (Figure S1A). Interestingly, SLUG protein induction followed the expression of

SPARC-Myc transgene in the culture media, and was temporally correlated with decreased levels of E-cadherin and P-cadherin and increased expression of the mesenchymal marker Fibronectin (Figure 1B, left). Induction of SLUG mRNA and protein levels as well as alterations of EMT-associated proteins upon SPARC overexpression were also observed in clones of 501mel stably transfected with SPARC (Figure 1B, right; Figure S1C). These EMT-like morphological changes induced by SPARC were confirmed by immunofluorescent staining of SLUG, E-cadherin and Fibronectin. In addition, F-actin staining revealed more stress fibers in SPARC overexpressing cells than in control cells (Figure 1C).

We next asked whether SLUG was regulated by SPARC in normal human melanocytes (NHM). Primary melanocytes were infected with an adenovirus control or expressing SPARC for 4 days and expression of SLUG was analyzed by immunoblotting (Figure 1D). We found that melanocytes modified to produce and secrete SPARC showed a marked increase in SLUG expression compared with control cells. Upregulation of SLUG was associated with loss of E-cadherin and P-cadherin expression and with a significant increase in Fibronectin. The latter finding was confirmed by densitometric analyses of the immunoblots (Figure S1B).

Collectively, these data indicate that SPARC-induced EMT-like transition in melanocytes and melanoma cells is accompanied by upregulation of SLUG, and suggest that SPARC functions by maintaining the augmented expression of SLUG in melanomas.

We next examined whether silencing of SPARC in melanoma cells could affect SLUG protein levels. As we recently showed that siRNA-mediated depletion of SPARC after a 5-day period promotes spontaneous apoptosis [36], we investigated the effect of SPARC depletion in a suitable time window, in which SPARC knockdown did not induce cell death (Figure S1D). To diminish the likelihood of RNAi off-targets effects, we used two independent non-overlapping siRNAs to silence SPARC in 501mel cells. We found that reduction of SPARC in culture media was concomitant with a time-dependent decrease in SLUG and Fibronectin expression and increase in E- and P-cadherins protein levels (Figure 2A, left). A similar robust decrease of SLUG expression upon SPARC knockdown was observed in WM9 melanoma cells (Figure 2A, right). Immunofluorescence microscopy confirmed decreased levels of SLUG and Fibronectin and increased levels of E-cadherin in SPARC knockdown cells compared with control cells (Figure 2B), suggesting that SPARC knockdown cells reverses the EMT-like phenotype. However, F-actin staining revealed no significant differences in cell morphology between control and siSPARC-transfected cells, but an increase in stress fibers formation in SPARC knockdown cells.

The Regulation of SLUG Protein Levels by SPARC is Independent of p53

We recently demonstrated that SPARC suppresses p53 functions in melanoma cells. Notably, we found that p53 is stabilized and activated upon RNAi-mediated knockdown of SPARC [36]. As p53 was shown to induce MDM2-mediated SLUG degradation in lung cancer cells [37], we asked whether downregulation of SLUG was mediated through p53 in SPARC knockdown cells. We used siRNA to target p53 in wild-type p53 501mel cells and melanoma cells containing mutant copies of p53. Treatment with p53 siRNA led to an abolition of p53 in 501mel cells and prevented SPARC siRNA-mediated accumulation of p53 (Figure 3A). Blocking p53 activation in SPARC-depleted cells had no effect on the reduction of SLUG protein levels mediated by SPARC knockdown. Accordingly, in p53-mutated MeWo and

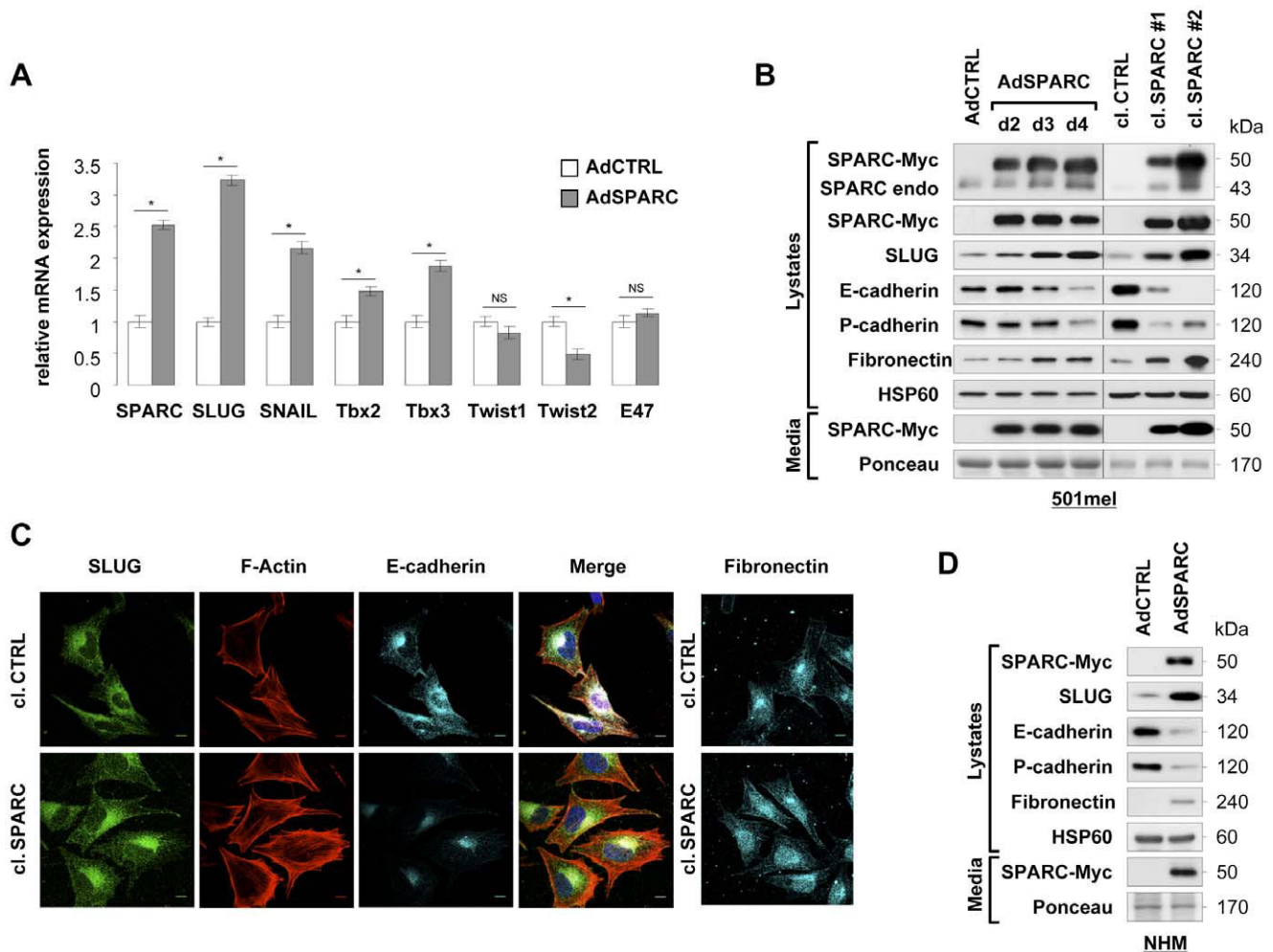


Figure 1. SPARC controls SLUG expression and other markers of the EMT-like transition in melanoma cells and primary melanocytes. (A) Analysis of EMT regulators mRNA levels: RNAs were prepared from 501mel cells infected with control adenovirus (AdCTRL) or adenovirus-expressing SPARC (AdSPARC) for 3 days. Relative gene expression levels of the indicated E-cadherin repressors were analyzed by SYBR green-based real-time Q-PCR. Data are expressed in arbitrary units as fold change between AdSPARC-infected and control cells. Columns, mean of three independent amplifications performed in duplicate; error bars, SD. * $P < 0.05$; NS, not significant (Student's test). (B) Expression levels of EMT markers in SPARC overexpressing melanoma cells: immunoblots of 501mel cells infected with control adenovirus (AdCTRL) or adenovirus-expressing SPARC (AdSPARC) for the indicated times, and of 501mel cell clones expressing SPARC (cl. SPARC #1 and #2) or control vector (cl. CTRL). Total protein lysates and cell supernatants were analyzed for expression of SPARC-Myc transgene, endogenous SPARC, SLUG, E-cadherin, P-cadherin and Fibronectin. HSP60 and Ponceau S-stained bands were used as loading controls in lysates and culture media, respectively. (C) SPARC induces an EMT-like phenotype: F-actin and immunofluorescent staining of 501mel cell clones expressing SPARC (cl.SPARC) or control vector (cl. CTRL). Cells were co-stained with Texas Red-X phalloidin, anti-SLUG (green) and anti-E-cadherin (cyan) and imaged with confocal microscopy. Merged images of the corresponding three channels are presented. In separate panels, fluorescence signal specific to Fibronectin antibody was visualized as blue. Bars, 10 μ m. (D) SPARC promotes EMT-like transition in melanocytes: immunoblots of normal human melanocytes (NHM) infected with control adenovirus (AdCTRL) or adenovirus-expressing SPARC (AdSPARC) for 4 days. Total protein lysates and cell supernatants were analyzed for expression of the indicated proteins. doi:10.1371/journal.pone.0040378.g001

SKmel28 cells, we still observed the downregulation of SLUG upon siRNA-mediated SPARC knockdown and the regained expression of E- and P-cadherin along with reduction of Fibronectin levels (Figure 3B). These findings indicate that the effects of SPARC knockdown on suppression of SLUG and reversion of the EMT-like process did not require activation of the p53 pathway.

Role of PI3 Kinase and AKT in SPARC-induced SLUG Expression and Melanoma Cell Migration and Invasion

We sought to identify the signaling pathways mediating SPARC-induced SLUG expression. The recent observation that

SPARC stimulates PI3 kinase/AKT-dependent pathway in A375 melanoma cells [36] prompted us to examine the role of this pathway in SPARC-driven SLUG expression and promotion of melanoma cell migration. We first examined the effect of pharmacological inhibition of AKT on SLUG expression in control and SPARC-overexpressing 501mel cells. As shown in Figure 4A, SPARC overexpression was associated with increased levels of AKT phosphorylated on Ser473. Addition of AKT inhibitor IV (AIV) efficiently blocked phosphorylation of AKT and of its downstream target GSK3 β on Ser9 and lowered levels of SLUG in both control and SPARC overexpressing cells. Consistently, pharmacologic blockade of PI3 kinase activity by

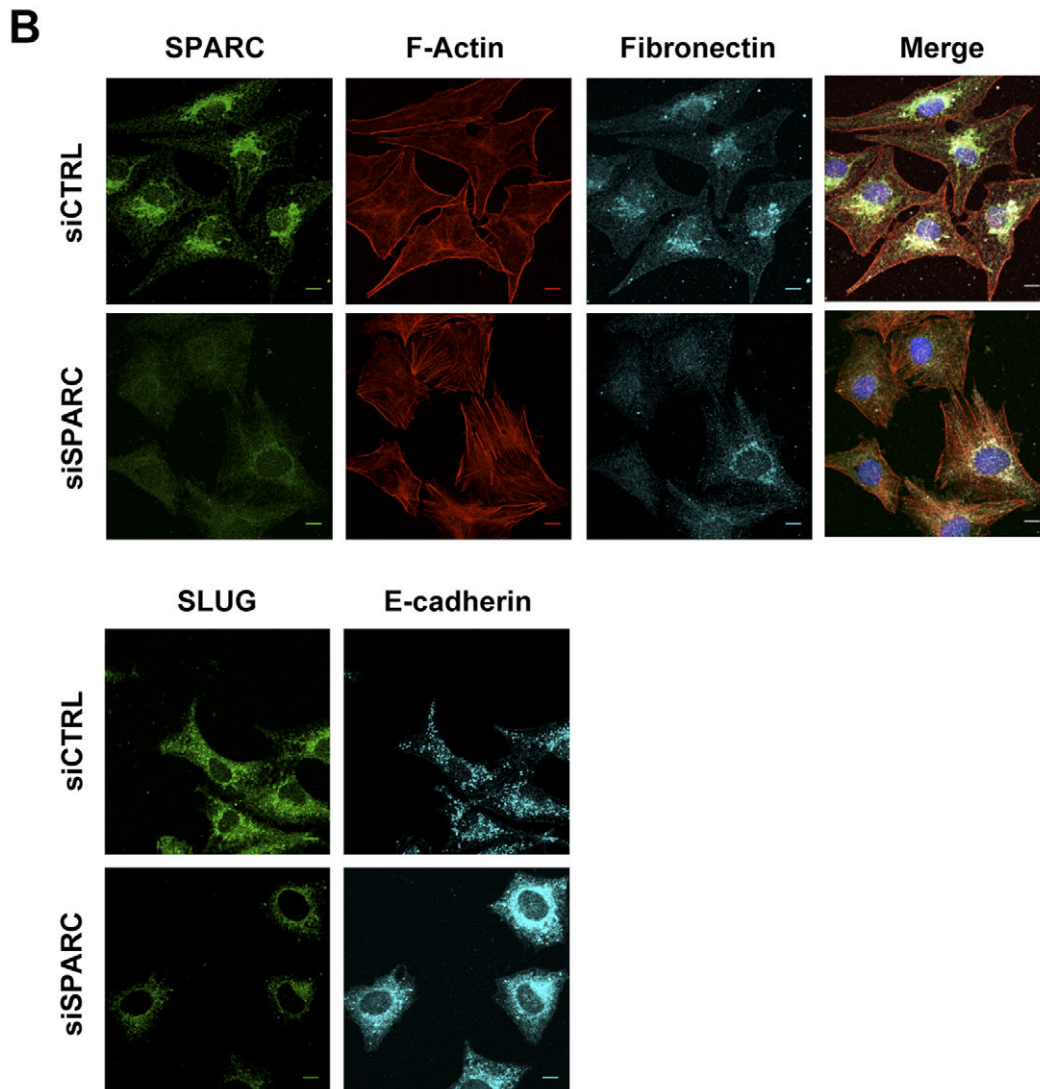
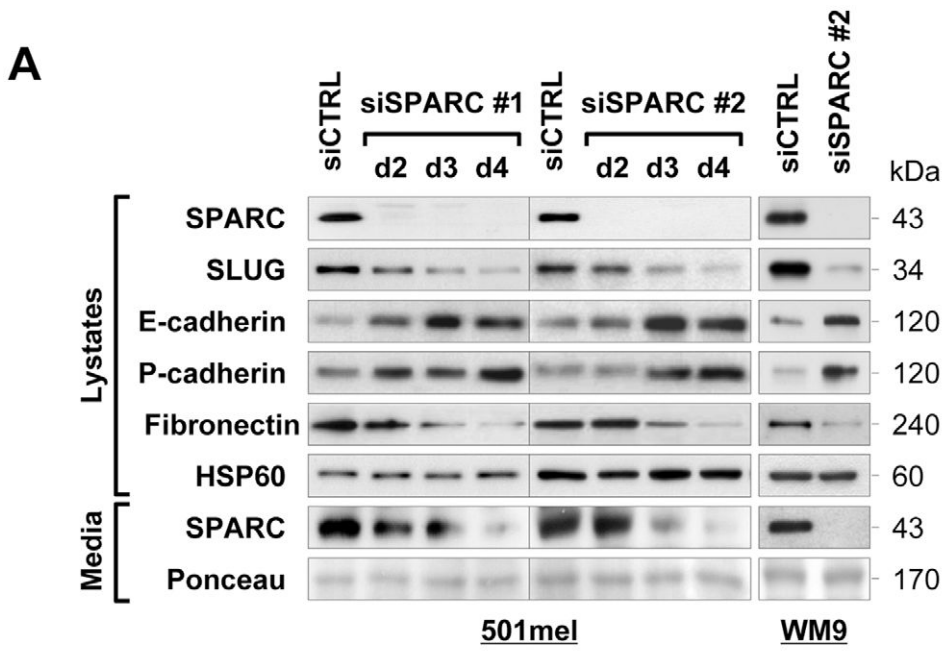


Figure 2. siRNA-mediated knockdown of SPARC decreases SLUG and restores E-cadherin and P-cadherin expression. (A) Expression levels of EMT markers in SPARC-depleted cells: immunoblots of 501mel cells transfected with control siRNA (siCTRL) for 4 days or two SPARC siRNAs for the indicated times (left), and of WM9 cells transfected with siCTRL or siSPARC #2 for 4 days (right). Total protein lysates and cell supernatants were analyzed for expression of the indicated proteins. (B) Morphology of SPARC-depleted cells: F-actin and immunofluorescent staining of 501mel cells transfected with control siRNA (siCTRL) or SPARC siRNA (siSPARC). After 4 days, cells were co-stained with Texas Red-X phalloidin, anti-SPARC (green) and anti-Fibronectin (cyan) and imaged with confocal microscopy. Merged images of the corresponding three channels are presented. Bottom panels, expression of SLUG (green) and E-cadherin (cyan) was analyzed by immunofluorescence staining. Bars, 10 μ m. doi:10.1371/journal.pone.0040378.g002

LY294002 also reduced SLUG protein levels in 501mel SPARC cells. Like the majority of melanoma tumors, 501mel cells harbor the oncogenic BRAF^{V600E} mutation and consequently constitutive activation of the MAP kinase/ERK signaling pathway. We thus examined the effect of a specific BRAF inhibitor (PLX4720) [38] on SLUG protein levels. Treatment with PLX4720 for 3 hours inhibited constitutive MAP kinase/ERK phosphorylation but had no major effect on SLUG protein levels (Figure 4A, right panel). Similar observations were made after prolonged exposure to PLX4720 (data not shown). This suggests that oncogenic BRAF signaling does not decrease SLUG expression in BRAF^{V600E} melanoma cells. In migration assays, pharmacologic blockade of PI3 kinase and AKT by LY294002 and AIV, respectively inhibited basal levels of cell migration and blocked SPARC-enhanced migration (Figure 4B).

To further assess the contribution of AKT, we tested whether a constitutively active form of AKT can rescue SLUG and the migratory phenotype of SPARC knockdown cells. 501mel cells were infected with an adenovirus control (AdCMV) or expressing Myr-AKT (AdAKT^{ca}) and then transfected with control or SPARC siRNA. SPARC knockdown significantly reduced phosphorylation of AKT and SLUG expression (Figure 4C). Forced expression of constitutively active AKT into 501mel cells resulted in its constitutive phosphorylation and increased cell migration (Figure 4C and D). Interestingly, adenoviral delivery of constitutively active AKT allowed rescue of SLUG expression and migratory capabilities of SPARC knockdown cells. Thus, SPARC-mediated SLUG expression and promotion of cell migration

requires AKT activation. These data also reveal a potential link between PI3 Kinase/AKT-regulated cell migration and SLUG expression in melanomas.

To assess the role of SLUG in the control of the cell-cell adhesion molecules E- and P-cadherins in melanoma cells, we carried out knockdown experiments using two different non-overlapping siRNAs specifically targeting SLUG, and gain-of-function experiments where 501mel cells were stably transfected with SLUG. As shown in Figure 5A, knockdown of SLUG led to regained expression of both E- and P-cadherins in a time-dependent manner. A slight decrease in Fibronectin protein expression was also observed in SLUG silenced 501mel cells compared to control siRNA-treated cells. Increased expression of E-cadherin in SLUG knockdown cells was also confirmed by immunofluorescence analysis (Figure 5B). In addition, SLUG-deficient cells adopted a rounded morphology with an altered actin cytoskeleton and a loss of the characteristic fibroblastic-like morphology, as revealed by fluorescent F-actin staining (Figure 5B). In SLUG-overexpressing 501mel cell populations, we found reduced E- and P-cadherins protein levels and increased Fibronectin expression (Figure 5C). We next tested if SLUG depletion would have a functional impact on Ca²⁺-dependent cell-cell adherence. 501mel cells were transfected with control or SLUG siRNA and an *in vitro* cell-cell adhesion assay was performed in presence or absence of Ca²⁺ ions (+ EDTA). The results shown in Figure 5D revealed an increase in cell aggregates from SLUG-depleted cells compared to control cells, and that formation of cell aggregates was prevented upon treatment with

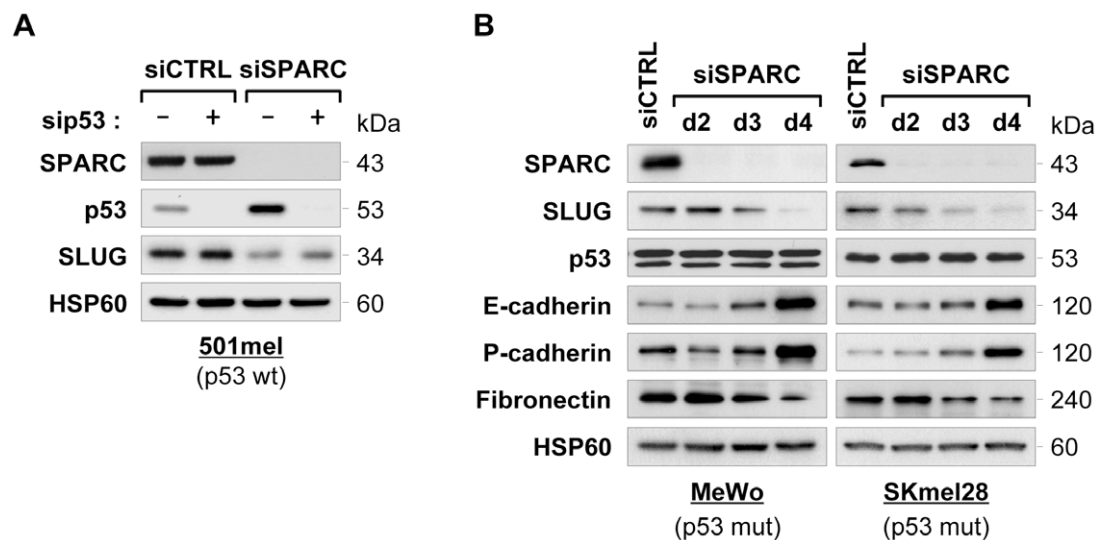


Figure 3. siRNA-mediated knockdown of SPARC decreases SLUG expression in a p53-independent manner. (A) Analysis of SLUG expression in p53 and SPARC co-depleted cells: 501mel cells were transfected for 3 days with control siRNA (siCTRL), p53 siRNA (sip53), SPARC siRNA (siSPARC) alone or in combination at 50 nM final concentration. Total protein lysates from resulting cells were analyzed by immunoblotting for expression of SPARC, p53, SLUG and HSP60 (loading control), as indicated. (B) Analysis of SLUG expression after SPARC depletion in p53-mutated melanoma cells: MeWo and SKmel28 cells were transfected with control siCTRL for 4 days or siSPARC for the indicated times. Expression levels of SPARC, SLUG, p53 E-cadherin, P-cadherin, Fibronectin and HSP60 (loading control) were analyzed by immunoblotting. doi:10.1371/journal.pone.0040378.g003

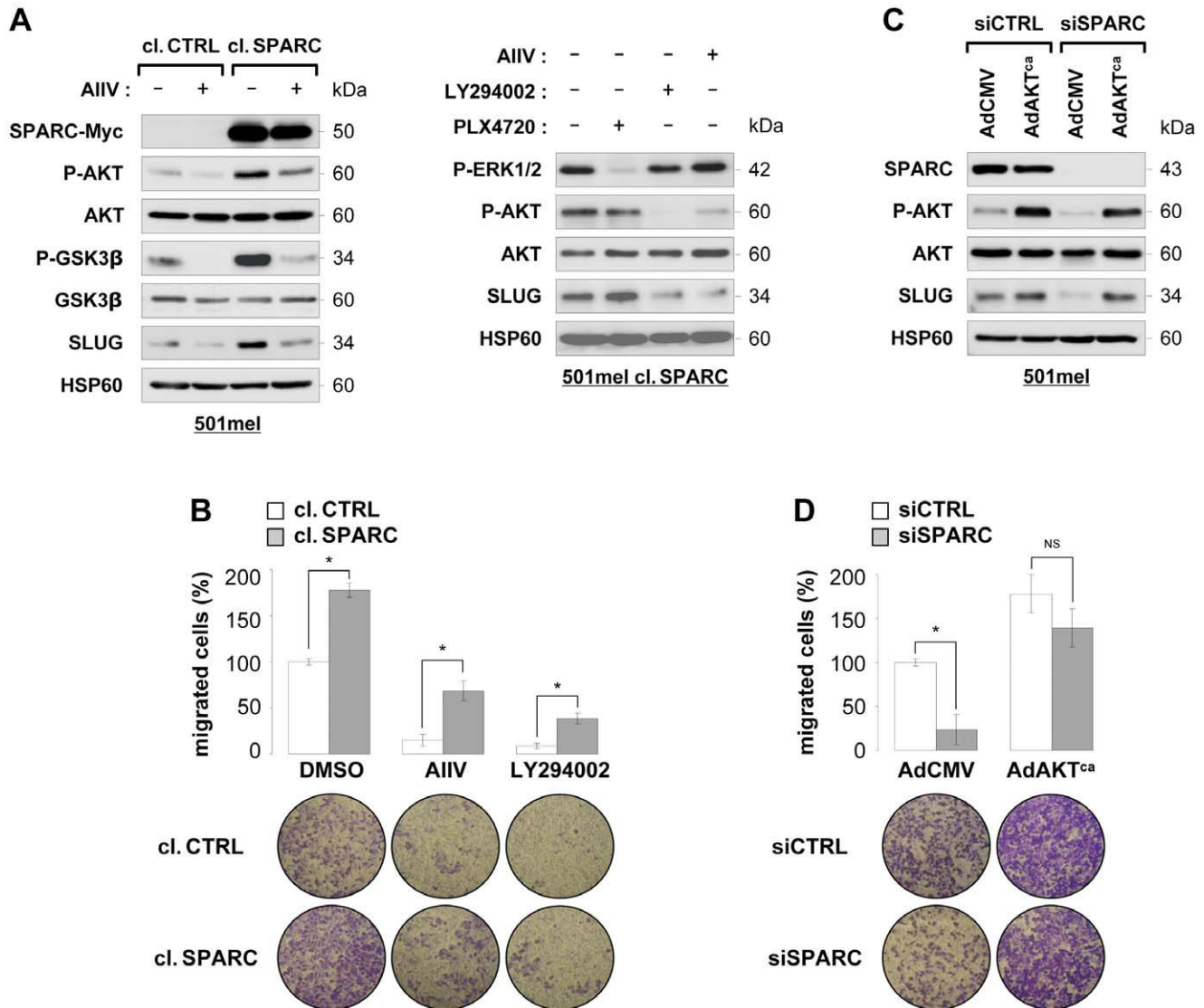


Figure 4. SPARC-mediated SLUG expression and promotion of melanoma cell migration is PI3K/AKT dependent. (A) Influence of PI3K/AKT and BRAFV600E signaling on SLUG expression: left panel, 501mel cells control (cl. CTRL) or overexpressing SPARC (cl. SPARC) were treated with DMSO or 10 mmol/L AKT inhibitor IV (AIIV). Immunoblots show the phosphorylation status of AKT (Ser473) and GSK3β (Ser9) and expression levels of SPARC-Myc transgene, AKT, GSK3β and SLUG. Right panel, 501mel cl. SPARC cells were treated with DMSO or 10 mmol/L AIIV, LY294002 or PLX4720 for 3 hours. Immunoblots show the phosphorylation status of MAP kinases ERK and AKT and expression levels of SLUG. HSP60 was used as a loading control. (B) Influence of PI3K/AKT signaling on cell migration: serum-stimulated cell migration was analyzed using Boyden chamber assays in control and SPARC 501mel cells treated with DMSO or 10 mmol/L AIIV or LY294002 as indicated. Results are expressed in percent of control. Columns, means of triplicates from two independent experiments; error bars, SD. *P<0.05 (Student's test). Representative images of lower surface of membranes are shown. (C) Expression of Myr-AKT protects from SLUG decrease after SPARC depletion: 501mel cells were infected with a control empty adenovirus (AdCMV) or with adenovirus encoding the constitutively active mutant Myr-HA-AKT1 (AdAKT^{ca}) and transfected 6 hours later with 50 nM siCTRL or siSPARC for 3 days. Cells were harvested and proteins were analyzed by immunoblotting using the indicated antibodies. (D) Expression of Myr-AKT rescues migratory defects of SPARC-depleted cells: serum-stimulated cell migration was analyzed using Boyden chamber assays in 501mel cells infected with AdCMV or AdAKT^{ca} and after depletion for endogenous SPARC as described above. Results are expressed in percent of control. Columns, means of triplicates from two independent experiments; error bars, SD. P<0.05; NS, not significant (Student's test). Representative images of lower surface of membranes are shown.

doi:10.1371/journal.pone.0040378.g004

the chelating agent EDTA. Thus, knockdown of SLUG increases Ca²⁺-dependent cell-cell adhesion. In the next series of experiments, we confirmed that SLUG is a transcriptional repressor of E-cadherin in 501mel cells [26,39]. Analysis of E-cadherin mRNA levels by real-time Q-PCR upon SLUG depletion or ectopic expression showed an increase or decrease of E-cadherin transcript, respectively (Figure 5E). We also examined the effect of SLUG on the activity of the mouse E-cadherin promoter in

501mel cells (Figure 5F). Luciferase reporter assays show that depletion of SPARC or SLUG by siRNA increased the activity of the E-cadherin promoter and conversely, expression of SPARC or SLUG repressed promoter activity. No repression was seen when the E-cadherin promoter is mutated in the E-box elements (mE-pal construct). Similar responses to SLUG knockdown or SLUG ectopic expression were seen in other melanoma cell lines (Figure S2).

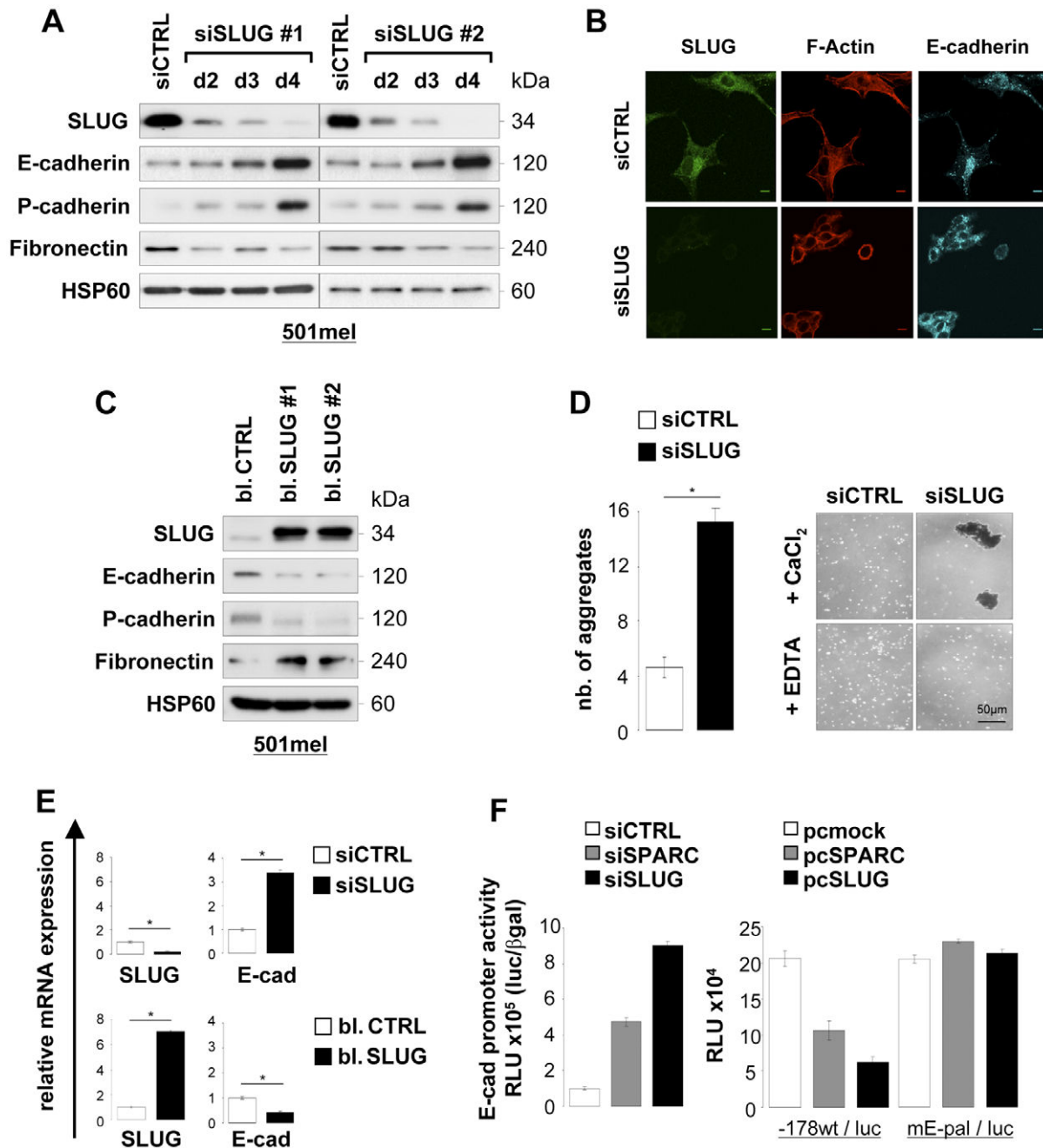


Figure 5. Knockdown or overexpression of SLUG modulates E-cadherin and P-cadherin adhesion molecules. (A) Expression levels of EMT markers in SLUG-depleted cells: 501mel cells were transfected with control siRNA (siCTRL) for 4 days or two SLUG siRNAs (siSLUG #1 and #2) for the indicated times. Expression levels of SLUG, E-cadherin, P-cadherin and Fibronectin were analyzed by immunoblotting. HSP60 was used as loading control. (B) Morphology of SLUG-depleted cells: expression of SLUG (green), E-cadherin (cyan) and actin cytoskeleton (Texas Red-X phalloidin) following siRNA-mediated SLUG depletion in 501mel cells was analyzed by fluorescence staining and confocal microscopy. Bars, 10 μ m. (C) Ectopic SLUG expression induces an EMT-like phenotype: control (bl. CTRL) or SLUG-overexpressing (bl. SLUG #1 and #2) 501mel cell populations were analyzed by immunoblotting for expression of SLUG, E-cadherin, P-cadherin, Fibronectin and HSP60 (loading control). (D) Depletion of SLUG increases Ca^{2+} -dependent cell-cell adhesion: adhesion assays were performed as described in the Materials and Methods after treatment of 501mel cells with siCTRL or siSLUG as indicated. The phase-contrast pictures show aggregates formed in presence of 1 mmol/L $CaCl_2$ alone or with 3 mmol/L EDTA. The average of two independent adhesion assays and SD are presented. Columns, average of two independent assays; error bars, SD. * $P < 0.05$ (Student's test). (E) SLUG regulates E-cadherin mRNA levels: RNAs were prepared from 501mel cells transfected with siCTRL or siSLUG for 4 days, and from bulk selected control or SLUG-overexpressing 501mel cells. The relative mRNA expression levels of SLUG and E-cadherin were measured by SYBR green-based real-time Q-PCR. Columns, mean of three independent amplifications performed in duplicate; error bars, SD. * $P < 0.05$ (Student's test). (F) E-cadherin promoter activity: 501mel cells were transfected with siCTRL, siSPARC or siSLUG, and 24 hours later with wild-type E-cadherin promoter reporter construct (left). 501mel cells were co-transfected with an empty vector (mock) or vectors expressing SPARC or SLUG and wild-type (-178 wt/luc) or mutant (mE-pal/luc) E-cadherin promoter reporter constructs (right). After 3 days, luciferase activities were measured and normalized to β -galactosidase activities. Columns, mean of triplicates; error bars, SD.

doi:10.1371/journal.pone.0040378.g005

Because siRNA SPARC-induced migratory inhibition coincides with SLUG reduction, we next analyzed the effect of SLUG knockdown on melanoma cell migration and invasive behavior. Knockdown of SPARC or SLUG with siRNAs in several melanoma cells strongly inhibited melanoma cell migration in Boyden chambers assays, compared with control cells (Figure S3). These data confirm previous observations and indicate that SPARC and SLUG are both important regulators of melanoma cell migration.

Although SLUG is recognized as a pro-survival factor in some cell types and melanocytes, some studies showed that its depletion in melanoma cells was not associated with significant changes in proliferation and survival [15,20]. Similarly, we found that siRNA-mediated depletion of SLUG did not alter cell proliferation and cell cycle profiles, and was not associated with significant apoptosis over a 4-day period (Figure S4). Therefore, apoptosis does not account for the inhibitory effects on cell migration observed in SLUG knockdown cells.

Tumor migration was then analyzed in a more physiological context; 501mel, WM9 or WM793 cells were grown as spheroids embedded in collagen, an assay that mimics 3-dimensional growth and invasion by melanoma cells [40]. Knockdown of SPARC or SLUG had no effect on spheroid growth rate but significantly reduced cell invasion into collagen (Figure 6A). Thus, SPARC and SLUG expression is required for tumor invasion in 3-dimensional cultures. Consistent with the regulation of SLUG by the PI3 kinase/AKT pathway (see Figure 4), pharmacologic inhibition of this signaling pathway by LY294002 or AIVV inhibited the invasive phenotype of melanoma spheroids into collagen (Figure 6B).

It has remained unclear how SLUG affects cell migration. We observed that Slug-deficient cells showed altered actin cytoskeletal organization (Figure 5B). To determine if the migration defect of SLUG-depleted melanoma cells was related to an alteration in cell adhesion, a fluorescent adhesion assay was performed with Fibronectin. Suppression of SLUG led to decreased attachment of 501mel, MeWo and SKmel28 cells on Fibronectin (Figure S5). Thus, some migratory defects of SLUG knockdown cells may occur through alterations in cell-substratum interactions and cytoskeleton reorganization.

SLUG is Required for SPARC-mediated Melanoma Cell Migration

To show that SLUG is a downstream target of SPARC in melanoma cells, we knocked down SLUG in SPARC-over-expressing 501mel cells. As shown in Figure 7A, knockdown of SLUG abrogated the effect of SPARC-enhanced cell migration as well as basal migration of 501mel cells. Immunoblot analysis shows the efficient depletion of SLUG in control cells and cells stably transfected with SPARC (Figure 7B). As a control, we also analyzed SNAIL expression and found its upregulation in SPARC-overexpressing cells, which is consistent with our early study showing that SPARC increased SNAIL expression in human primary melanocytes [22].

To provide further functional link between SPARC and SLUG in controlling EMT-induced cell migration, we next examined if ectopic expression of SLUG was able to protect from the migratory phenotype of SPARC knockdown cells. Control 501mel cells or stably transfected with SLUG were treated with SPARC siRNA and cell migration assays were performed 4 days later. Ectopic expression of SLUG was able to protect from the knockdown phenotype on migration (Figure 7C) and reinduction of E-cadherin (Figure 7D). Figure 7D also shows that SPARC level was dramatically reduced following siRNA treatment, and that

endogenous SLUG level was reduced upon SPARC depletion. Thus, SLUG functionally contributes to SPARC-enhanced melanoma cell migration and E-cadherin repression.

Relationship between SPARC and SLUG Levels in Melanoma Cells at Various Stages of Tumor Development

Finally, we have examined the expression profiles of SPARC and SLUG in a small panel of cultures of melanoma cells derived from RGP or VGP primary tumors or from lymph node melanoma metastases (Figure 8). Real-time Q-PCR analysis revealed a positive association between SPARC and SLUG transcripts in freshly isolated melanoma samples tested. The positive expression of SPARC mRNA observed in the two VGP melanoma samples confirmed our previous observations that SPARC is induced during the RGP to VGP transition of melanomas [22]. The correlation (R) and P values between SLUG and SPARC levels were determined by regression analysis. These data provide independent support for a potential functional link between SPARC and SLUG during melanoma progression.

Discussion

SPARC is widely expressed in cancer and is thought to promote tumor progression through regulation of cell survival, invasiveness and tumor-host interactions [23,41]. Several studies from our laboratory and others have shown that inhibition of SPARC in both malignant cells *in vitro* [22,24] and tumors *in vivo* [24,25,42] reduces melanoma growth, invasiveness, and induces spontaneous apoptotic cell death and anti-tumor cytotoxic capacity. One mechanism underlying SPARC function in melanoma appears to be E-cadherin repression and promotion of an EMT-like transition [22,43], a process having a central role during RGP to VGP progression. In this study, we show that SPARC regulates the EMT regulatory factor SLUG and demonstrate the critical role of the PI3 kinase/AKT pathway in this process.

Much evidence exists to support an important role for the protein kinase B/AKT in melanomagenesis. Activated AKT was found in 70% of human melanomas [44]. Several mechanisms may contribute to this event including PTEN deletion, AKT3 amplification and aberrant growth factors signaling. Recently, we showed that autocrine production of SPARC by melanoma cells participates to elevated levels of AKT activation and increased tumor cell survival [36]. Besides the involvement of AKT in survival, growth and metabolic-related pathways, AKT affects cell motility and invasion, prerequisite processes for metastasis [45,46]. Interestingly, AKT was shown to downregulate E-cadherin expression and to promote EMT-like transition and invasiveness in carcinoma cells by inducing SNAIL [47]. Our study showing that AKT also contributes to SLUG regulation downstream SPARC-induced EMT-like changes in melanomas emphasizes the crucial role of AKT in controlling SNAIL family factors and tumor-associated EMT processes. However, the mechanisms by which AKT activates SLUG expression and transcriptional activity remain unclear and need further investigations.

We recently described an alternate role for SPARC in melanoma progression, namely its suppression of p53-dependent responses. Inactivation of p53 by SPARC resulted from AKT-dependent activation of MDM2 and we demonstrated that p53 is activated upon knockdown of SPARC in melanoma cells [36]. Recently, p53 was shown to promote SLUG degradation in lung carcinoma cells [37]. We therefore examined the regulation of SLUG by p53 in SPARC knockdown cells and found that SLUG regulation by SPARC is independent of both expression and

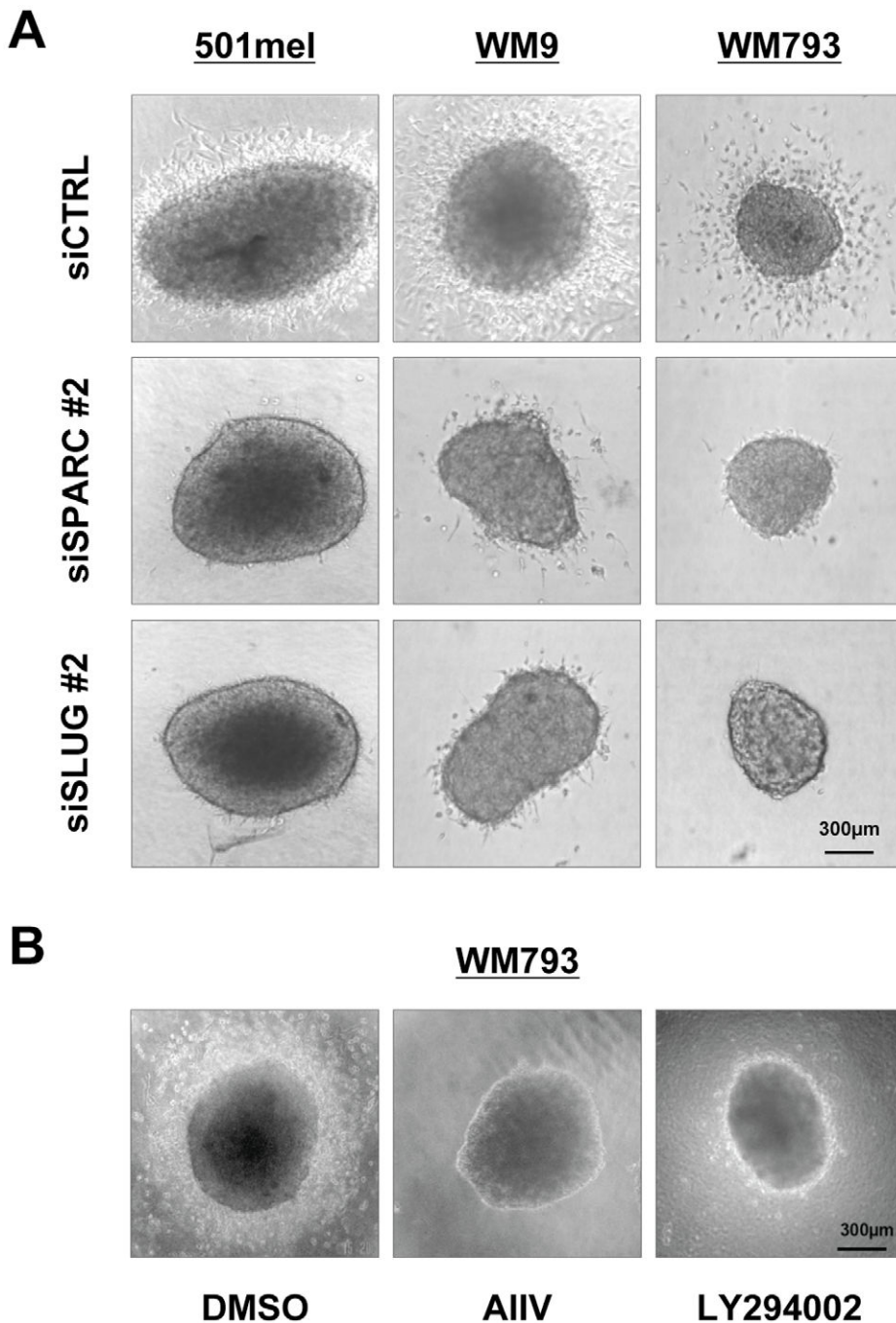


Figure 6. siRNA-mediated knockdown of SPARC or SLUG and inhibition of AKT signaling reduce invasion into 3-dimensional collagen matrix. (A) Depletion of SPARC or SLUG decreases tumor spheroid invasion: preformed melanoma spheroids of 501mel, WM9 and WM793 cells transfected with siCTRL, siSPARC or siSLUG as indicated were implanted into a gel of collagen type I. Spheroids were incubated in growth medium for 3 days and tumor cell outgrowth was visualized by phase contrast microscopy. (B) Influence of PI3K/AKT signaling on spheroid invasion: preformed melanoma spheroids of 501mel, WM9 and WM793 were implanted into a gel of collagen type I and incubated in growth medium for 3 days with DMSO or 10 mmol/L AIIV or LY294002. Tumor cell invasion was visualized as above. Representative example of spheroids from each culture is shown.

doi:10.1371/journal.pone.0040378.g006

mutational status of p53. Accordingly, we observed that reversion of the EMT-like process, including E- and P-cadherin derepression, did not require activation of p53. Consistently, we also reported that decreased motility and invasion of SPARC deficient cells is independent of p53 genetic status [25]. These observations support the notion that SPARC controls two AKT-dependent

pathways involved in (i) melanoma cell survival through p53; and (ii) EMT-associated cell migration through SLUG. Interestingly, our analysis of actin cytoskeleton revealed that suppression or overexpression of SPARC results in a similar phenotype i.e. an increase of stress fibers formation. The molecular mechanisms that

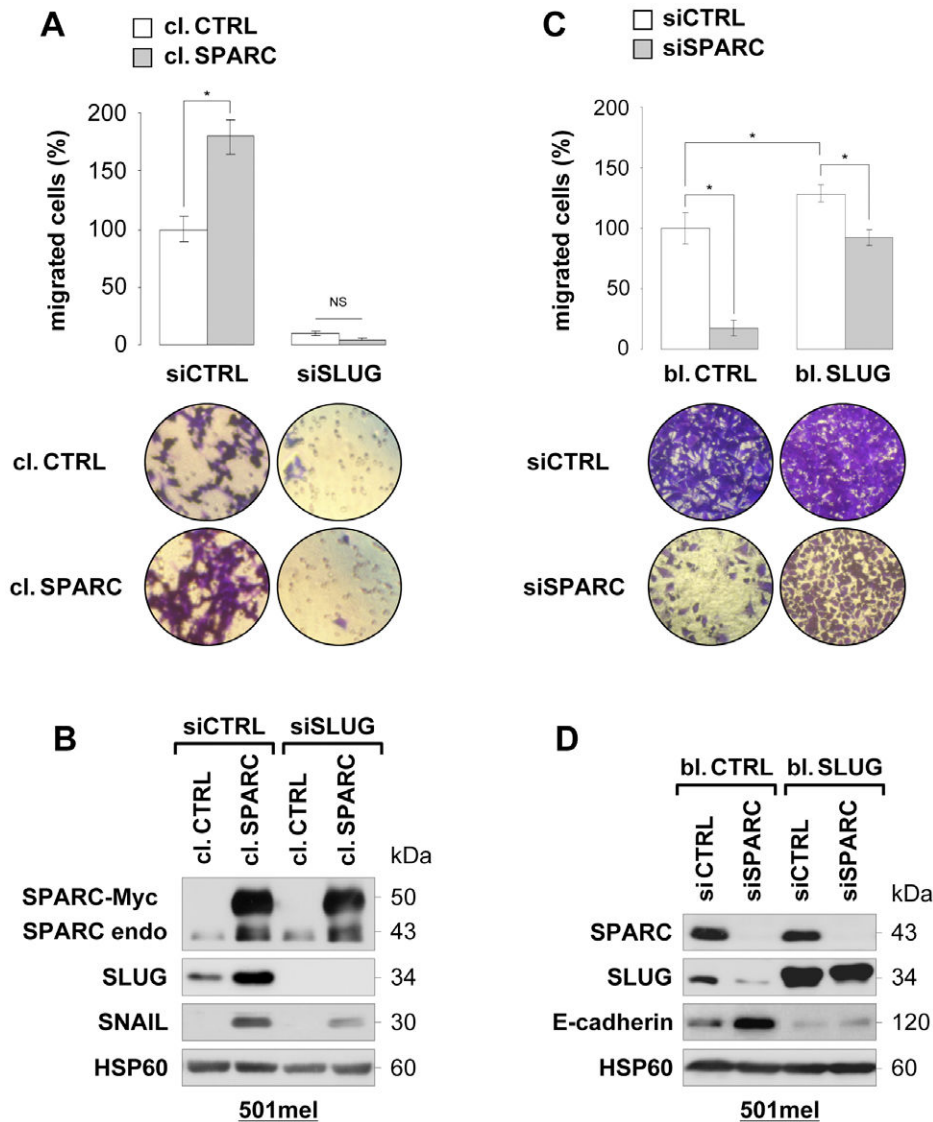


Figure 7. SLUG plays a critical role in SPARC-mediated melanoma cell migration. (A) Depletion of SLUG blunts SPARC-induced cell migration: 501mel cells control (cl. CTRL) or overexpressing SPARC (cl. SPARC) were transfected with control siRNA (siCTRL) or SLUG siRNAs (siSLUG) for 4 days. Chemotaxis was assessed using Boyden chamber assays. Cells were left to migrate for 20 hours, then fixed, stained and counted. Results are expressed in percent of control. Columns, means of triplicates from two independent experiments; error bars, SD. * $P < 0.05$; NS, not significant (Student's test). Representative images of lower surface of membranes are shown. (B) Analysis of SLUG expression: levels of SPARC-Myc transgene, endogenous SPARC, SLUG, SNAIL and HSP60 (loading control) in the resulting cells were analyzed by immunoblotting. (C) Ectopic expression of SLUG bypasses migratory defects of SPARC-depleted cells: Control (bl. CTRL) or SLUG-overexpressing (bl. SLUG) 501mel cells were transfected with control siRNA (siCTRL) or SPARC siRNAs (siSPARC) for 4 days. Chemotaxis was assessed using Boyden chamber assays as described in (A). * $P < 0.05$ (Student's test). (D) Analysis of E-cadherin expression: levels of SPARC, SLUG, E-cadherin and HSP60 (loading control) in the resulting cells were analyzed by immunoblotting.

doi:10.1371/journal.pone.0040378.g007

are involved remain unknown, but this observation outlines the role of SPARC in actin network plasticity.

SLUG is a potent inducer of cell movement during development [48], epithelial cell migration [14] and tumor cell motility [1]. Here we found that SLUG knockdown cytoskeletal organization, abrogates melanoma cell migration and tumor invasiveness, further supporting the role of SLUG in tumor motility. However, it remains still unclear how SLUG controls these processes. It has been reported that SLUG controls integrin expression in human epidermal keratinocytes [49]. Integrin-dependent cell-matrix substratum interaction is essential for directing cell movement. Interestingly, our findings show that

several integrin-dependent events are altered in SLUG knockdown cells, such as adhesion on Fibronectin, tumor invasiveness in 3D collagen matrix, cell morphology and actin cytoskeleton, suggesting that abnormal cell migration observed in SLUG silenced cells result from impaired integrin signaling and adhesion. Whether this results from a direct transcriptional repression of integrin expression or indirect changes in integrin inside-out signaling is currently under investigation in our laboratory.

SLUG knockdown increases Ca^{2+} -dependent cell-cell adhesion and, in addition to E-cadherin, our data demonstrate that SLUG regulates P-cadherin expression in melanoma cells. P-cadherin was described as a regulator of cell-cell adhesion and melanoma

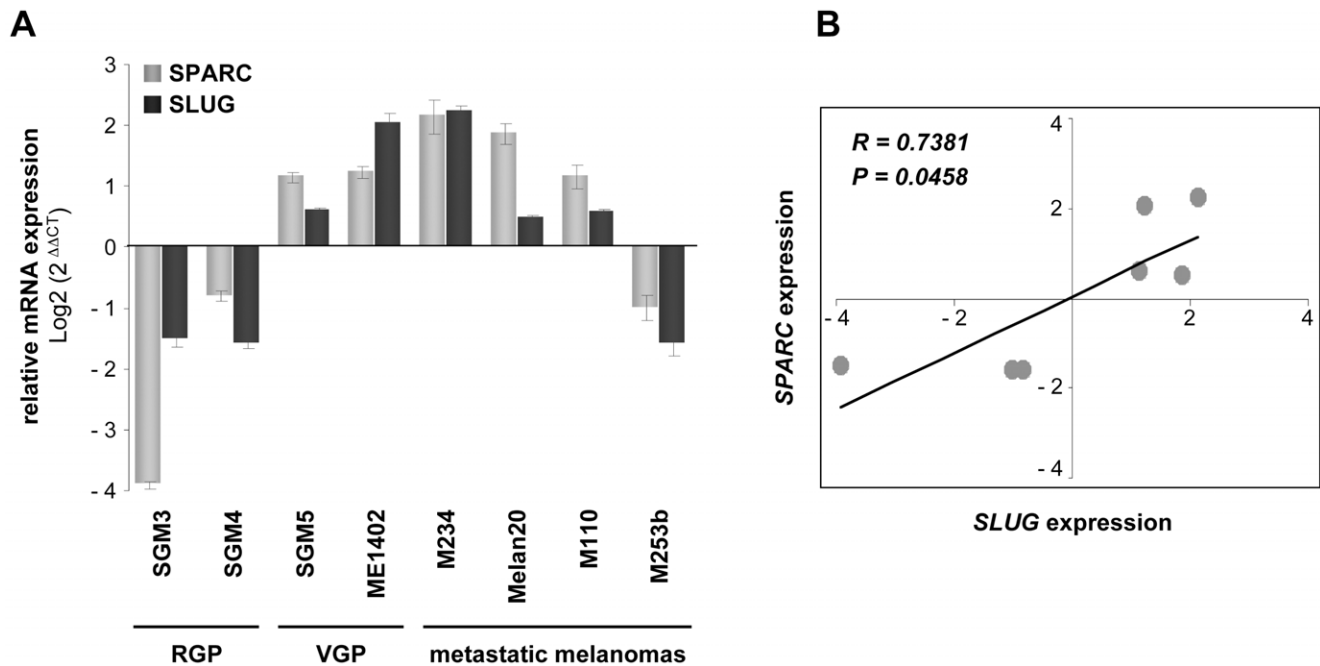


Figure 8. mRNA levels of SPARC and SLUG in melanoma cells at various stages of tumor development. (A) Analysis of SPARC and SLUG mRNA levels: relative gene expression levels of SPARC and SLUG in cultures of melanoma cells derived from RGP, VGP or metastatic melanoma tumors were evaluated by relative Q-PCR using an ABI Biosystems 7900HT Fast Real Time PCR System and the SYBR Green dye detection protocol. Data were analyzed using the 2^{-ddCt} method and human 18S transcript level was used to normalize for each sample. Values are the mean of independent triplicates. RGP, Radial Growth Phase; VGP, Vertical Growth Phase. (B) Positive correlation between SPARC and SLUG in melanoma samples: regression analysis to determine the correlation between SPARC and SLUG in human melanoma samples. *R*, Spearman's Rank Correlation Coefficient; $P < 0.05$ (Spearman's test). doi:10.1371/journal.pone.0040378.g008

invasiveness [50]. Down-regulation of P-cadherin is a frequent event observed during melanoma progression [7]. However, the regulatory mechanism of P-cadherin suppression is unknown. To our knowledge, our findings that SLUG controls P-cadherin levels in melanomas cells are the first description of such a mechanism. In addition, we provide here evidence that SPARC constitutes an important upstream regulator of P-cadherin in melanocytes and melanoma cells. However, it remains to be shown whether P-cadherin is a transcriptional target of SLUG in EMT-associated events.

In melanoma, SLUG functions as a melanocyte-specific factor required for the promotion of the metastatic phenotype [15]. The signaling pathways controlling SLUG expression in melanoma cells are beginning to be unraveled. Recently, SLUG was reported to be regulated by HGF-dependent signaling pathways in human melanoma cells [51], and by TGF-beta and activin A in B16 murine melanoma cells [52]. Here, we show that SLUG is controlled by the PI3 kinase/AKT signaling pathway downstream of the matricellular SPARC protein, connecting for the first time SLUG levels to extracellular environment cues critical for the acquisition of the invasive phenotype.

The transcriptional factors of the SNAIL family SNAIL and SLUG were recently shown to collaborate on local tumor invasion and promotion of distant metastasis [53]. In addition, a sequential, hierarchical action of SNAIL factors during tumor progression has been proposed. However, it was reported that SNAIL and SLUG play distinct roles in breast carcinoma progression [54]. Thus, it would be of great importance to investigate whether SNAIL and SLUG cooperate or act independently in the acquisition of invasiveness downstream of SPARC. We previously observed an inverted correlation between SPARC and E-cadherin levels in

melanocytes and melanoma cells [22]. Interestingly, in some melanomas SNAIL and SPARC levels were not correlated, suggesting that mechanisms other than SNAIL induction may be involved in SPARC-mediated E-cadherin repression. Although the melanoma sample size analyzed here is relatively small, the results indicate that SPARC and SLUG expression is positively associated during melanoma progression, further underlining the importance of our present observations. Additional analyses on a larger clinical collection of the expression of SPARC, SNAIL, SLUG and E-cadherin are clearly warranted.

In conclusion, we report here the first demonstration of a regulation of the lineage-specific developmental factor SLUG by SPARC through an AKT-dependent pathway and the importance of this mechanism in EMT-induced cell invasion in melanoma.

Supporting Information

Figure S1 SPARC induces mesenchymal-like transition.

(A) Effect of SPARC overexpression on expression of SLUG, SNAIL, TBX2 and TBX3 in 501mel cells.

Immunoblots of 501mel cells infected with control adenovirus (AdCTRL) or adenovirus-expressing SPARC (AdSPARC). Total protein lysates were analyzed for expression of SPARC-Myc transgene, endogenous SPARC, SLUG, SNAIL, TBX2 and TBX3. HSP60 was used as loading control. (B) Immunoblot analyses showing the increase of Fibronectin in normal human melanocytes cells infected by AdSPARC. Densitometric analysis of three independent Western blots for Fibronectin is shown. * $P < 0.05$ (Student's test). (C) SPARC overexpression increases SLUG mRNA levels. RNAs were prepared from

501mel cells overexpressing SPARC (cl. SPARC #1 and #2) or control vector (cl. CTRL). Slug mRNA expression was measured by SYBR green-based real-time Q-PCR. Relative expression level of SLUG mRNA was normalized for RNA concentrations with four different housekeeping genes. *Columns*, mean of two independent amplifications performed in duplicate; *error bars*, SD. * $P < 0.05$ (Student's test). **(D) Viability of melanoma cells after 4 days of SPARC knockdown by siRNA.** The indicated melanoma cells were transfected with control siRNA (siCTRL, open bars) or SPARC siRNA (siSPARC, filled bars) at 50 nM. 4 days after transfection, cell proliferation was measured by XTT assay. Results are expressed in percent of control. *Columns*, mean of 4 independent determinations; *error bars*, SD. *NS*, not significant (Student's test). (TIF)

Figure S2 siRNA-mediated SLUG knockdown restores E-cadherin expression through transcriptional derepression of the promoter. (A) Analysis of E- and P-cadherin protein levels in SLUG-depleted cells. The indicated melanoma cells were transfected with control siRNA (siCTRL) for 4 days or SLUG siRNA (siSLUG) for the indicated times. Expression levels of SLUG, E-cadherin and P-cadherin were analyzed by immunoblotting. HSP60 was used as loading control. **(B) E-cadherin mRNA levels following SLUG or SPARC depletion.** RNAs were prepared from WM9 cells transfected with siCTRL, siSPARC or siSLUG for 3 days. The relative mRNA expression levels of SPARC, SLUG and E-cadherin were measured by SYBR green-based real-time Q-PCR. * $P < 0.05$ (Student's test). **(C) E-cadherin promoter activity following SLUG or SPARC depletion.** Cells were transfected with siCTRL, siSPARC or siSLUG, and 24 hours later with wild-type E-cadherin promoter reporter construct. After 3 days, luciferase activities were measured and normalized to β -galactosidase activities. *Columns*, mean of triplicates; *error bars*, SD. **(D) E-cadherin promoter activity following SLUG or SPARC expression.** Cells were co-transfected with an empty vector (mock) or vectors expressing SPARC or SLUG, and wild-type E-cadherin promoter reporter construct as indicated. Measurement of luciferase activities was assessed as described above. (TIF)

Figure S3 siRNA-mediated SPARC or SLUG knockdown impairs melanoma cell migration. 501mel **(A)**, WM9 **(B)**, MeWo **(C)** and SKmel28 **(D)** cells were transfected with control siRNA (siCTRL), two SPARC siRNAs (siSPARC #1 and #2) or two SLUG siRNAs (siSLUG #1 and #2) for 4 days. Serum-stimulated cell migration was assessed using Boyden chamber assays. Cells were left to migrate for 20 hours, then fixed, stained and counted. Results are expressed in percent of control. *Columns*, means of triplicates from two independent experiments; *error bars*, SD. Representative images of lower surface of membranes are shown. (TIF)

Figure S4 siRNA-mediated SLUG knockdown shows no effect on melanoma cell proliferation, cell cycle pro-

gression or apoptosis. (A) Analysis of cell proliferation. The indicated melanoma cells were transfected with control siRNA (siCTRL, open bars) or SLUG siRNA (siSLUG, filled bars) at 50 nM. 4 days after transfection, cell proliferation was measured by XTT assay **(B) Analysis of cell cycle distribution.** The indicated melanoma cells were transfected with siCTRL or siSLUG, stained with PI and analyzed for DNA content by flow cytometry. Histograms represent the percentage of cells in different phases of the cell cycle. **(C) Analysis of PARP cleavage.** 501mel cells were transfected with control siRNA (siCTRL) or SLUG siRNA (siSLUG) for 4 days. Expression levels of SLUG and cleaved PARP were analyzed by immunoblotting. Treatment with Staurosporine for 10 hours was used as a positive control of apoptotic cell death. HSP60 was used as loading control **(D) Analysis of cell apoptosis.** WM9 and SKmel 28 cells were transfected with control siRNA (siCTRL) or SLUG siRNA (siSLUG) for 4 days or treated with Staurosporine as above. Cells were stained with PI and Annexin-V-fluos and analyzed by flow cytometry. Histograms show Annexin-V positive/PI negative cells (filled bars; apoptotic subpopulation) and both Annexin-V/PI positive cells (open bars; post-apoptotic/necrotic subpopulation). Note that unlike Staurosporine treatment, cells depleted for SLUG did not undergo apoptosis. (TIF)

Figure S5 siRNA-mediated SLUG knockdown decreases adhesion to Fibronectin. (A) Time-course of adhesion to Fibronectin. 501mel cells were transfected with control siRNA (siCTRL) or SLUG siRNA (siSLUG) for 4 days, then detached, loaded with the green fluorescent marker CMFDA and plated on Fibronectin-coated wells. At the indicated time points, cells were washed and fluorescence of adherent cells was determined with a microplate reader. **(B) Adhesion assays in SLUG-depleted MeWo and SKmel28 cells.** Fluorescent adhesion assays on Fibronectin were performed after transfection of MeWo and SKmel28 cells with control siRNA (siCTRL) or SLUG siRNA (siSLUG) for 4 days. Cells were left to adhere for 3 hours and analyzed as above. *Columns*, average of two independent adhesion assays; *error bars*, SD. * $P < 0.05$ (Student's test). (TIF)

Acknowledgments

We acknowledge the C3M imaging Core Facility (MICA) facility. We thank B. Dreno, M. Herlyn and R. Halaban for melanoma cells, A. Cano and E.R. Fearon for plasmids and A. Garcia de Herreros for anti-SNAIL antibodies. We also thank P. Savagner and D. Bennett for helpful discussions. We are grateful to the BIODERM INSERM network for their contribution.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: NF STD. Performed the experiments: NF MT M. Dufies AP A. Mogha A. Mallavialle. Analyzed the data: NF MT M. Deckert STD. Contributed reagents/materials/analysis tools: SR JPL JKS MDG AK RB. Wrote the paper: NF M. Deckert STD.

References

- Thiery JP, Acloque H, Huang RY, Nieto MA (2009) Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell* 139: 871–890.
- Peinado H, Olmeda D, Cano A (2007) SNAIL, Zeb and bHLH factors in tumour progression: an alliance against the epithelial phenotype? *Nat Rev Cancer* 7: 415–428.
- Chin L, Garraway LA, Fisher DE (2006) Malignant melanoma: genetics and therapeutics in the genomic era. *Genes Dev* 20: 2149–2182.
- Pla P, Moore R, Morali OG, Grille S, Martinuzzi S, et al. (2001) Cadherins in neural crest cell development and transformation. *J Cell Physiol* 189: 121–132.
- Miller AJ, Mihm MC Jr (2006) Melanoma. *N Engl J Med* 355: 51–65.
- Hsu MY, Meier FE, Nesbit M, Hsu JY, Van Belle P, et al. (2000) E-cadherin expression in melanoma cells restores keratinocyte-mediated growth control and down-regulates expression of invasion-related adhesion receptors. *Am J Pathol* 156: 1515–1525.

7. Hoek K, Rimm DL, Williams KR, Zhao H, Ariyan S, et al. (2004) Expression profiling reveals novel pathways in the transformation of melanocytes to melanomas. *Cancer Res* 64: 5270–5282.
8. Bauer R, Hein R, Bosserhoff AK (2005) A secreted form of P-cadherin is expressed in malignant melanoma. *Exp Cell Res* 305: 418–426.
9. Kuphal S, Martyn AC, Pedley J, Crowther LM, Bonazzi VF, et al. (2009) H-cadherin expression reduces invasion of malignant melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res* 22: 296–306.
10. Nieto MA (2002) The SNAIL superfamily of zinc-finger transcription factors. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3: 155–166.
11. Le Douarin NM, Dupin E, Ziller C (1994) Genetic and epigenetic control in neural crest development. *Curr Opin Genet Dev* 4: 685–695.
12. Sanchez-Martin M, Perez-Losada J, Rodriguez-Garcia A, Gonzalez-Sanchez B, Korf BR, et al. (2003) Deletion of the SLUG (SNAI2) gene results in human piebaldism. *Am J Med Genet A* 122A: 125–132.
13. Sanchez-Martin M, Rodriguez-Garcia A, Perez-Losada J, Sagrera A, Read AP, et al. (2002) SLUG (SNAI2) deletions in patients with Waardenburg disease. *Hum Mol Genet* 11: 3231–3236.
14. Savagner P, Kusewitt DF, Carver EA, Magnino F, Choi C, et al. (2005) Developmental transcription factor SLUG is required for effective re-epithelialization by adult keratinocytes. *J Cell Physiol* 202: 858–866.
15. Gupta PB, Kuperwasser C, Brunet JP, Ramaswamy S, Kuo WL, et al. (2005) The melanocyte differentiation program predisposes to metastasis after neoplastic transformation. *Nat Genet* 37: 1047–1054.
16. Wels C, Joshi S, Koefinger P, Bergler H, Schaidler H (2011) Transcriptional activation of ZEB1 by SLUG leads to cooperative regulation of the epithelial-mesenchymal transition-like phenotype in melanoma. *J Invest Dermatol* 131: 1877–1885.
17. Inoue A, Seidel MG, Wu W, Kamizono S, Ferrando AA, et al. (2002) SLUG, a highly conserved zinc finger transcriptional repressor, protects hematopoietic progenitor cells from radiation-induced apoptosis in vivo. *Cancer Cell* 2: 279–288.
18. Perez-Losada J, Sanchez-Martin M, Perez-Caro M, Perez-Mancera PA, Sanchez-Garcia I (2003) The radioresistance biological function of the SCF/kit signaling pathway is mediated by the zinc-finger transcription factor SLUG. *Oncogene* 22: 4205–4211.
19. Kajita M, McClinic KN, Wade PA (2004) Aberrant expression of the transcription factors SNAIL and SLUG alters the response to genotoxic stress. *Mol Cell Biol* 24: 7559–7566.
20. Vannini I, Bonafe M, Tesi A, Rosetti M, Fabbri F, et al. (2007) Short interfering RNA directed against the SLUG gene increases cell death induction in human melanoma cell lines exposed to cisplatin and fotemustine. *Cell Oncol* 29: 279–287.
21. Wu WS, Heinrichs S, Xu D, Garrison SP, Zambetti GP, et al. (2005) SLUG antagonizes p53-mediated apoptosis of hematopoietic progenitors by repressing puma. *Cell* 123: 641–653.
22. Robert G, Gaggioli C, Bailet O, Chavey C, Abbe P, et al. (2006) SPARC represses E-cadherin and induces mesenchymal transition during melanoma development. *Cancer Res* 66: 7516–7523.
23. Arnold SA, Brekken RA (2009) SPARC: a matricellular regulator of tumorigenesis. *J Cell Commun Signal* 3: 255–273.
24. Ledda MF, Adris S, Bravo AI, Kairiyama C, Bover L, et al. (1997) Suppression of SPARC expression by antisense RNA abrogates the tumorigenicity of human melanoma cells. *Nat Med* 3: 171–176.
25. Fenouille N, Robert G, Tichet M, Puissant A, Dufies M, et al. (2011) The p53/p21(Cip1/Waf1) pathway mediates the effects of SPARC on melanoma cell cycle progression. *Pigment Cell Melanoma Res* 24: 219–232.
26. Bolos V, Peinado H, Perez-Moreno MA, Fraga MF, Esteller M, et al. (2003) The transcription factor SLUG represses E-cadherin expression and induces epithelial to mesenchymal transitions: a comparison with SNAIL and E47 repressors. *J Cell Sci* 116: 499–511.
27. Halaban R, Krauthammer M, Pelizzola M, Cheng E, Kovacs D, et al. (2009) Integrative analysis of epigenetic modulation in melanoma cell response to decitabine: clinical implications. *PLoS One* 4: e4563.
28. Satyamoorthy K, Li G, Gerrero MR, Brose MS, Volpe P, et al. (2003) Constitutive mitogen-activated protein kinase activation in melanoma is mediated by both BRAF mutations and autocrine growth factor stimulation. *Cancer Res* 63: 756–759.
29. Soo JK, Mackenzie Ross AD, Kallenberg DM, Milagre C, Heung Chong W, et al. (2011) Malignancy without immortality? Cellular immortalization as a possible late event in melanoma progression. *Pigment Cell Melanoma Res* 24: 490–503.
30. Fleige S, Walf V, Huch S, Prgomet C, Sehm J, et al. (2006) Comparison of relative mRNA quantification models and the impact of RNA integrity in quantitative real-time RT-PCR. *Biotechnol Lett* 28: 1601–1613.
31. Gaggioli C, Deckert M, Robert G, Abbe P, Batoz M, et al. (2005) HGF induces fibronectin matrix synthesis in melanoma cells through MAP kinase-dependent signaling pathway and induction of Egr-1. *Oncogene* 24: 1423–1433.
32. Fenouille N, Puissant A, Dufies M, Robert G, Jacquet A, et al. (2010) Persistent activation of the Fyn/ERK kinase signaling axis mediates imatinib resistance in chronic myelogenous leukemia cells through upregulation of intracellular SPARC. *Cancer Res* 70: 9659–9670.
33. Franci C, Takkunen M, Dave N, Alameda F, Gomez S, et al. (2006) Expression of SNAIL protein in tumor-stroma interface. *Oncogene* 25: 5134–5144.
34. Bailet O, Fenouille N, Abbe P, Robert G, Rocchi S, et al. (2009) Spleen tyrosine kinase functions as a tumor suppressor in melanoma cells by inducing senescence-like growth arrest. *Cancer Res* 69: 2748–2756.
35. Rodriguez M, Aladowicz E, Lanfrancone L, Goding CR (2008) Tbx3 represses E-cadherin expression and enhances melanoma invasiveness. *Cancer Res* 68: 7872–7881.
36. Fenouille N, Puissant A, Tichet M, Zimniak G, Abbe P, et al. (2011) SPARC functions as an anti-stress factor by inactivating p53 through Akt-mediated MDM2 phosphorylation to promote melanoma cell survival. *Oncogene* 30: 4887–4900.
37. Wang SP, Wang WL, Chang YL, Wu CT, Chao YC, et al. (2009) p53 controls cancer cell invasion by inducing the MDM2-mediated degradation of SLUG. *Nat Cell Biol* 11: 694–704.
38. Tsai J, Lee JT, Wang W, Zhang J, Cho H, et al. (2008) Discovery of a selective inhibitor of oncogenic B-Raf kinase with potent antimelanoma activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 3041–3046.
39. Hajra KM, Chen DY, Fearon ER (2002) The SLUG zinc-finger protein represses E-cadherin in breast cancer. *Cancer Res* 62: 1613–1618.
40. Smalley KS, Haass NK, Brafford PA, Lioni M, Flaherty KT, et al. (2006) Multiple signaling pathways must be targeted to overcome drug resistance in cell lines derived from melanoma metastases. *Mol Cancer Ther* 5: 1136–1144.
41. Clark CJ, Sage EH (2008) A prototypic matricellular protein in the tumor microenvironment—where there's SPARC, there's fire. *J Cell Biochem* 104: 721–732.
42. Alvarez MJ, Prada F, Salvatierra E, Bravo AI, Lutzky VP, et al. (2005) Secreted protein acidic and rich in cysteine produced by human melanoma cells modulates polymorphonuclear leukocyte recruitment and antitumor cytotoxic capacity. *Cancer Res* 65: 5123–5132.
43. Smit DJ, Gardiner BB, Sturm RA (2007) Osteonectin downregulates E-cadherin, induces osteopontin and focal adhesion kinase activity stimulating an invasive melanoma phenotype. *Int J Cancer* 121: 2653–2660.
44. Robertson GP (2005) Functional and therapeutic significance of Akt deregulation in malignant melanoma. *Cancer Metastasis Rev* 24: 273–285.
45. Engelman JA, Luo J, Cantley LC (2006) The evolution of phosphatidylinositol 3-kinases as regulators of growth and metabolism. *Nat Rev Genet* 7: 606–619.
46. Chin YR, Toker A (2009) Function of Akt/PKB signaling to cell motility, invasion and the tumor stroma in cancer. *Cell Signal* 21: 470–476.
47. Grille SJ, Bellacosa A, Upson J, Klein-Szanto AJ, van Roy F, et al. (2003) The protein kinase Akt induces epithelial mesenchymal transition and promotes enhanced motility and invasiveness of squamous cell carcinoma lines. *Cancer Res* 63: 2172–2178.
48. Barrallo-Gimeno A, Nieto MA (2005) The SNAIL genes as inducers of cell movement and survival: implications in development and cancer. *Development* 132: 3151–3161.
49. Turner FE, Broad S, Khanim FL, Jeanes A, Talma S, et al. (2006) SLUG regulates integrin expression and cell proliferation in human epidermal keratinocytes. *J Biol Chem* 281: 21321–21331.
50. Van Marck V, Stove C, Jacobs K, Van den Eynden G, Bracke M (2005) P-cadherin in adhesion and invasion: opposite roles in colon and bladder carcinoma. *Int J Cancer* 128: 1031–1044.
51. Koefinger P, Wels C, Joshi S, Damm S, Steinbauer E, et al. (2011) The cadherin switch in melanoma instigated by HGF is mediated through epithelial-mesenchymal transition regulators. *Pigment Cell Melanoma Res* 24: 382–385.
52. Murakami M, Suzuki M, Nishino Y, Funaba M (2010) Regulatory expression of genes related to metastasis by TGF-beta and activin A in B16 murine melanoma cells. *Mol Biol Rep* 37: 1279–1286.
53. Olmeda D, Montes A, Moreno-Bueno G, Flores JM, Portillo F, et al. (2008) Snail and Snai2 collaborate on tumor growth and metastasis properties of mouse skin carcinoma cell lines. *Oncogene* 27: 4690–4701.
54. Come C, Magnino F, Bibeau F, De Santa Barbara P, Becker KF, et al. (2006) SNAIL and SLUG play distinct roles during breast carcinoma progression. *Clin Cancer Res* 12: 5395–5402.

Simalikalactone E (SkE), a new weapon in the armamentarium of drugs targeting cancers that exhibit constitutive activation of the ERK pathway

Guillaume Robert^{1,2,3,4}, Valérie Jullian^{6,7}, Arnaud Jacquelin^{1,2,3,4}, Clémence Ginot^{1,2,3,4}, Maeva Dufies^{1,2,3,4}, Stephanie Torino^{1,4,5}, Anaïs Pottier^{1,4,8}, Frederic Peyrade⁹, Sophie Tartare-Deckert^{1,4,8}, Geneviève Bourdy^{6,7}, Eric Deharo^{6,7} and Patrick Auberger^{1,2,3,4}

¹- INSERM/U1065, C3M, Nice, France

²- Equipe 2: Morts Cellulaires, Différenciation, inflammation et Cancer

³- Equipe labellisée par la Ligue Nationale Contre le Cancer 2011-2013

⁴- Université de Nice, France

⁵- Equipe 6: Toxines microbiennes dans la relation hôte-pathogènes

⁶- Université de Toulouse; Université Paul Sabatier; Pharma-Dev UMR 152; Faculté de Pharmacie; 35 Chemin des maraîchers, F-31062, Toulouse cedex 9, France.

⁷- Institut de Recherche pour le Développement (IRD); Pharma-Dev UMR 152; Faculté de Pharmacie, 35 Chemin des maraîchers, F-31062, Toulouse cedex 9, France.

⁸- Equipe 11, Microenvironnement, Signalisation et Cancer

⁹- Centre Antoine Lacassagne, Nice, France

Correspondence to: Patrick Auberger, **email:** auberger@unice.fr

Keywords: Simalikalactone E, B-Raf inhibitor, CML, Melanoma, Hairy Cell Leukemia, ERK pathway

Received: December 20, 2012, **Accepted:** December 28, 2012, **Published:** December 30, 2012

Copyright: © Robert et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

ABSTRACT:

Simalikalactone E (SkE) is a quassinoid extracted from a widely used Amazonian antimalarial remedy. Although SkE has previously been shown to have cytostatic and/or cytotoxic activities in some tumor cell lines, its mechanism of action has not yet been characterized. We show here that SkE in the high nanomolar range inhibited the growth of various leukemic and solid tumor cell lines. Importantly, SkE was highly efficient at inhibiting chronic myelogenous leukemia (CML) cells that exhibit constitutive activation of the MAPK pathway and, accordingly, it impaired the phosphorylation of ERK1/2. SkE also abrogated MEK1/2 and B-Raf phosphorylation but had no effect on Ras activity. Moreover, SkE was particularly effective against melanoma cell lines carrying the B-Raf-V600E mutation. Importantly, SkE resensitized the PLX-4032-resistant 451Lu melanoma cell line (451Lu-R) and was more efficient than U0126, a MEK inhibitor, and PLX-4032 (PLX) at inducing the apoptosis of two Hairy Cell Leukemia (HCL) patient samples carrying the B-Raf-V600E mutation. Finally, SkE was as efficient as imatinib at inhibiting tumor formation in a xenograft model of CML cells in athymic mice. In conclusion, we show that SkE, a very potent inhibitor of B-Raf-V600E, is highly effective against cancer cell lines that exhibit constitutive activation of the ERK1/2 pathway.

INTRODUCTION

Simalikalactone E (SkE) is a new quassinoid extracted from a widely used Amazonian antimalarial remedy derived from *Quassia amara* L. (Simaroubaceae)

leaves. In the mid-nanomolar concentration range, this new molecule inhibits the growth of *Plasmodium falciparum* cultured in vitro by 50%, independent of the strain sensitivity to chloroquine. SkE can also decrease gametocytemia when present at a 50% inhibitory concentration seven fold lower than that of primaquine, a

leading compound for treating malaria. SkE is less toxic than simalikalactone D (SkD), another antimalarial related quassinoid from *Quassia amara*, and its cytotoxicity towards mammalian cells is dependent on the cell line; it displays a good selectivity index when tested on non-tumorigenic cells. In vivo, SkE inhibits murine malarial growth of *Plasmodium vinckei petteri* by 50% at doses of 1 and 0.5 mg/kg body weight/day when administered by the oral and intraperitoneal route, respectively [1]. Furthermore, unpublished data from our laboratories have established that SkE may have potent antileukemic activity on several hematological malignancies.

The Ras/Raf/MEK/ERK pathway is frequently altered in cancer cells, and mutations in this pathway are recurrent in several hematopoietic and non-hematopoietic malignancies [2, 3]. It is also worth mentioning that mutation of an upstream protein in the MAP kinase pathway excludes the possibility of mutation of another protein in the pathway [4, 5]. For instance, N-Ras, one of the upstream regulators of the pathway, is mutated in 20% of melanoma, whereas K-Ras is mutated in 80% of pancreatic carcinoma. B-Raf, an effector of Ras and the upstream kinase in the ERK cascade, is frequently mutated in melanoma (50-70%) [6], Langerhans cell histiocytosis (57%) [7], thyroid carcinoma (40%) [8] and colorectal cancer (8%) [9]. The frequency of B-Raf mutation is generally very low in leukemia; however, it was recently reported that B-Raf is mutated in most cases of HCL [10-12]. Finally, mutations in MEK1 are also detected at a low frequency in melanoma [13]. In all cases, the mutated protein seems to be endowed with constitutive activity. Inhibitors of B-Raf such as PLX have been introduced recently with success as new anti-melanoma agents that can induce complete remission in patients [14]. Unfortunately, resistance to PLX has been found to occur rapidly after the onset of treatment, mainly through reactivation of the MAP kinase pathway [15]. Therefore, it is essential to develop new therapeutic strategies aimed at inhibiting the MAPK pathway in these resistant patients.

Importantly, HCL is another disease characterized by the B-Raf mutation [10]. HCL is a rare leukemia affecting B cells. This hematopoietic malignancy is associated with the B-Raf V600E mutation in most of patients. This hallmark of the disease has provided the rationale for the use of vemurafenib (PLX-4032) in two patients suffering from HCL who had no other therapeutic options [16]; Peyrade et al. 2012 (in press). In both cases, a two-month treatment with the drug led to elimination of the leukemic clone as well as restoration of normal erythrocyte, platelet and leukocyte counts, which were accompanied by a considerable improvement in the patient status.

In the present study, we describe the activity and mechanism of action of SkE, a new natural compound extracted from *Quassia Amara* that exhibits both potent anti-leukemic and anti-melanoma effects in vitro and

in vivo because of its ability to interfere with the ERK cascade. Therefore, SkE should be tested as a new therapeutic option in cancers that exhibit constitutive activation of the ERK pathway.

RESULTS

SkE exerts potent antileukemic activity *in vitro*

We have reported previously that SkE is both cytostatic and cytotoxic for some tumor cell lines [1]. The present study was conducted to address the mechanism of action of SkE in different cancer cell lines. We first used the well-characterized human K562 cell line to determine whether SkE affects the proliferation of leukemic cells. To this end, we performed colony formation assays in soft-agar using increasing doses of SkE or a maximal dose of imatinib, a tyrosine kinase inhibitor that targets BCR-ABL, the fusion oncoprotein responsible for this disease. As expected, imatinib (1 μ M) inhibited the clonogenic potential of K562 cells in soft-agar by more than 90% (Figure 1A). Importantly, SkE was a highly potent inhibitor of K562 cell colony formation in identical conditions, with a maximal effect at 500 nM (Figure 1A). At this dose, SkE was even more potent than imatinib, the leading therapy for CML. The IC₅₀ value for the SkE effect was found to be 250 nM. SkE was also a very potent inhibitor of CD34⁺ cell growth for cells isolated from two CML patients at diagnosis (Figure 1B). Finally, SkE also exerted potent antileukemic effects on several imatinib-resistant CML cell lines (not shown).

SkE inhibits the MAP kinase pathway

In an attempt to identify the potential targets of SkE, we used the PathScan® RTK signaling antibody array kit from Cell Signaling, which allows the simultaneous quantification of the activity of approximately 50 kinases. Among these kinases, two were significantly affected by SkE. Indeed, SkE inhibited the activity of ERK by 70% and c-Abl by 15% (Figure 2 A and B). To confirm the effect of SkE on BCR-ABL activity, we next incubated K562 cells for 2 h with 250 nM of SkE and analyzed the phosphorylation status of both BCR-ABL and known BCR-ABL substrates. In accordance with the results obtained with the RTK signaling array kit, we confirmed the inhibition of c-Abl by SkE as judged by the decreased phosphorylation of c-Abl as soon as 3 hrs after the addition of SkE to the culture medium. We also noted a decrease in the phosphorylation status of STAT5 (Figure 2C). Moreover, dephosphorylation of ERK1/2 was clearly detected as soon as 30 min after the addition of SkE and was maximal at 15 h. Collectively, our results confirm that SkE is a very potent inhibitor of the ERK pathway in K562

cells. Furthermore, it appears that c-Abl dephosphorylation did not precede ERK dephosphorylation but rather followed ERK inhibition. Figure 2C also shows that SkE failed to affect autophagy in K562 CML cells, as assessed by the absence of delipidation of LC3-b in cells treated with this drug.

SkE is a B-Raf inhibitor

We next used the Δ Raf-1:ER (HEK-ER) cells, which express an inducible form of the kinase Raf-1, to assess the

effects of SkE in comparison with U0126, a well-known inhibitor of MEK1, in the Ras/Raf/MEK/ERK pathway. Tamoxifen induced the activation of the ERK pathway, as assessed by the increased phosphorylation of ERK1/2 (Figure 3A). Importantly, SkE (500 nM) was as efficient as U0126 (2.5 μ M) at abolishing tamoxifen-induced ERK1/2 activation (Figure 3B). To precisely identify the target of SkE, we analyzed the entire ERK pathway. SkE efficiently inhibited the phosphorylation status of both MEK1/2 and B-Raf (Figure 3C). However, SkE failed to affect the activity of Ras in a GST-RAS pull-down assay (Figure 3D). Collectively, our data clearly demonstrate that SkE

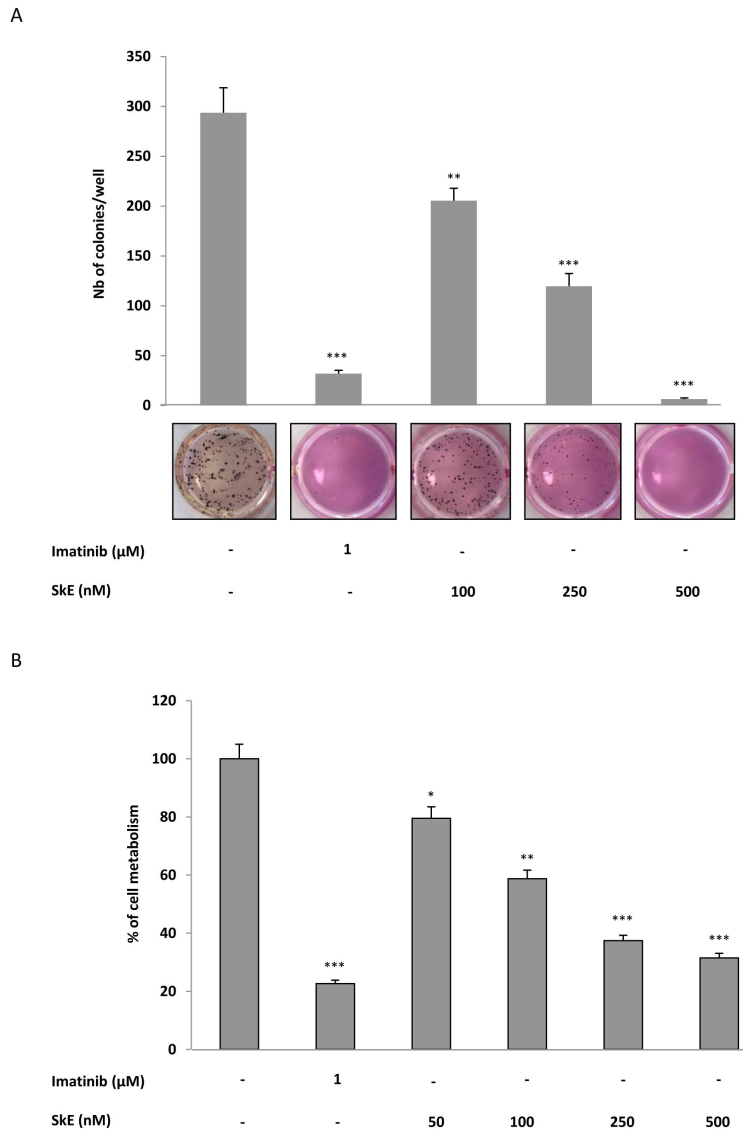


Figure 1: SkE treatment induces cell death of CML cell lines and primary CML CD34+ cells. (A) SkE in the 100-500 nM range was added to K562 CML cell lines growing in semi-solid methyl cellulose medium (0.5×10^3 cells/ml). Imatinib (1 μ M) was used as an internal control. Colonies were detected after 10 days of culture by adding 1 mg/ml of MTT reagent and were scored by Image J quantification software. Results are expressed as the number of colony forming cells per well after drug treatment. Results are given as the mean \pm SD of 3 different determinations made in triplicate. Error bars = 95% confidence intervals. (B) Primary CML CD34+ cells were incubated for 48 h at 37°C with increasing concentrations of SkE. The cell metabolism was measured by the XTT assay, as described in the Materials and Methods section. Results are given as the mean \pm SD of 3 different determinations made in triplicate. Error bars = 95% confidence intervals.

acts as an inhibitor of B-Raf. Finally, the effect of SkE on the ERK cascade was rapidly reversible upon withdrawal of the drug (Figure 3E).

SkE inhibits the growth of PLX resistant-cell lines *in vitro*

PLX, also known as vemurafenib, has been shown to be highly effective in both B-Raf V600E melanoma cell

lines and in patients with metastatic melanoma. However, in patients, the rapid reactivation of the ERK cascade is responsible for relapses. We investigated whether SkE was capable of resensitizing PLX-resistant cell lines. To this end, we used dabrafenib (GSK2118436) sensitive and resistant melanoma cell lines which also exhibits cross resistance to vemurafenib (PLX-4720). This PLX-sensitive 451 melanoma cell line and its PLX-resistant counterpart were incubated for 24 h with PLX (1 μ M)

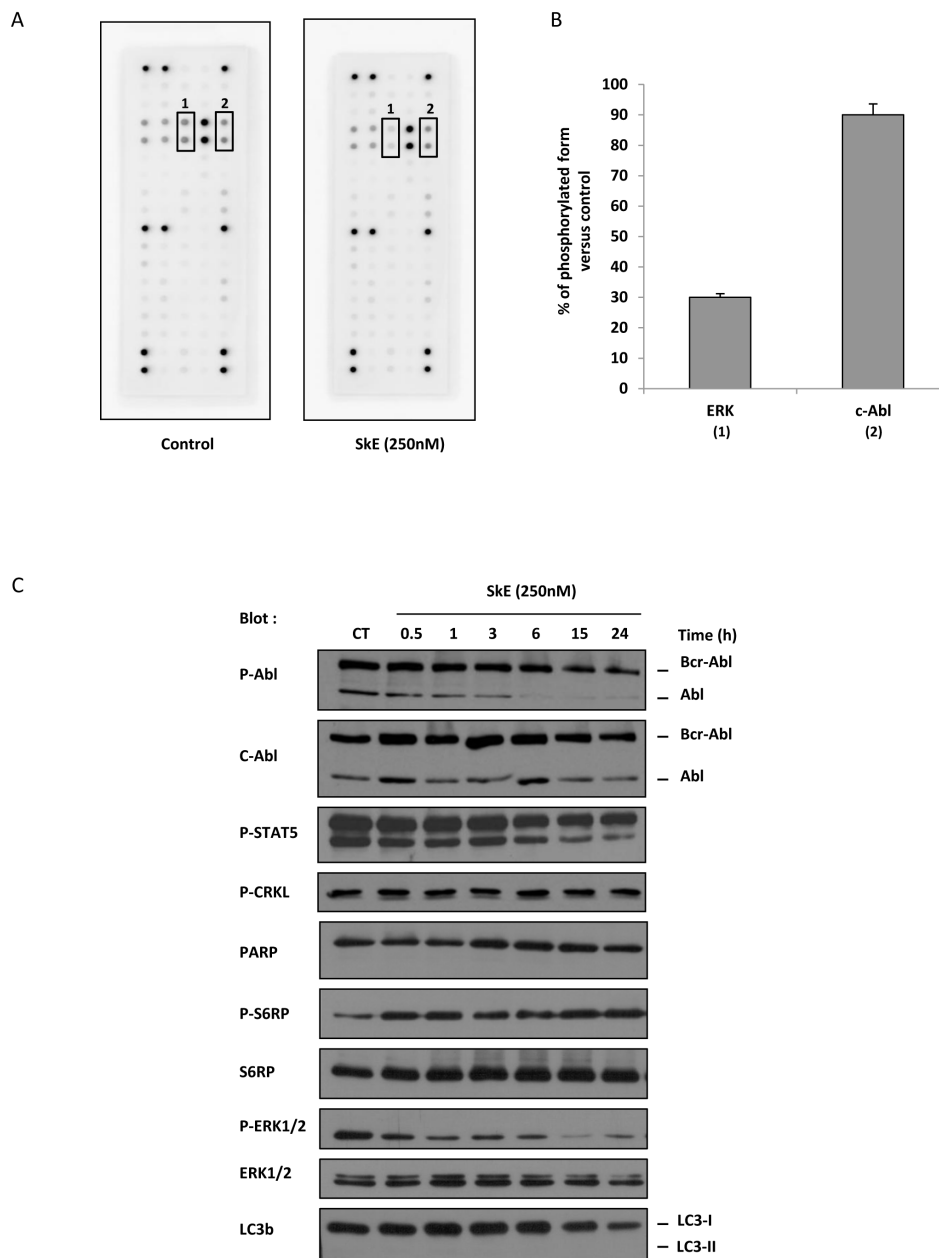


Figure 2: SkE treatment impairs ERK1/2 phosphorylation. (A) K562 cells were treated with 250 nM of SkE for 2 h; then, cells were lysed, and cell lysates were loaded on a Pathscan multikinase® membrane. (B) Histograms represent the relative intensity quantification of the most regulated dot with Image J software. Results are expressed as the percentage of kinase phosphorylation in SkE-treated cells versus control cells. (C) K562 cells were incubated at 37°C with 250 nM SkE for the indicated times. Whole-cell lysates were prepared, and the expression of Phospho-C-Abl, C-Abl, Phospho-STAT5, Phospho-CRKL, PARP, Phospho-S6RP, S6RP, Phospho-ERK1/2, ERK1/2 and LC3b was visualized on a Western blot.

or two concentrations of SkE and the cell viability was assessed using the XTT assay. As expected, the 451Lu-R melanoma cell lines [22] were fully resistant to PLX, whereas both the 451Lu-R cell lines were highly sensitive to the effect of SkE (Figure 4A). Importantly, PLX-resistant cells appeared to be even more sensitive to SkE.

We next analyzed the efficiency of U0126, PLX and SkE on blood cells from two HCL patients carrying

the B-Raf V600E mutation. SkE, at a concentration of 500 nM, induced cell death in more than 70% of the blood cells, as assessed by propidium iodide staining (Figure 4B), whereas PLX and U0126 were less efficient, triggering 55% and 44% cell death, respectively. As a whole, these findings show that SkE also exhibited high activity against the B-Raf V600E mutation.

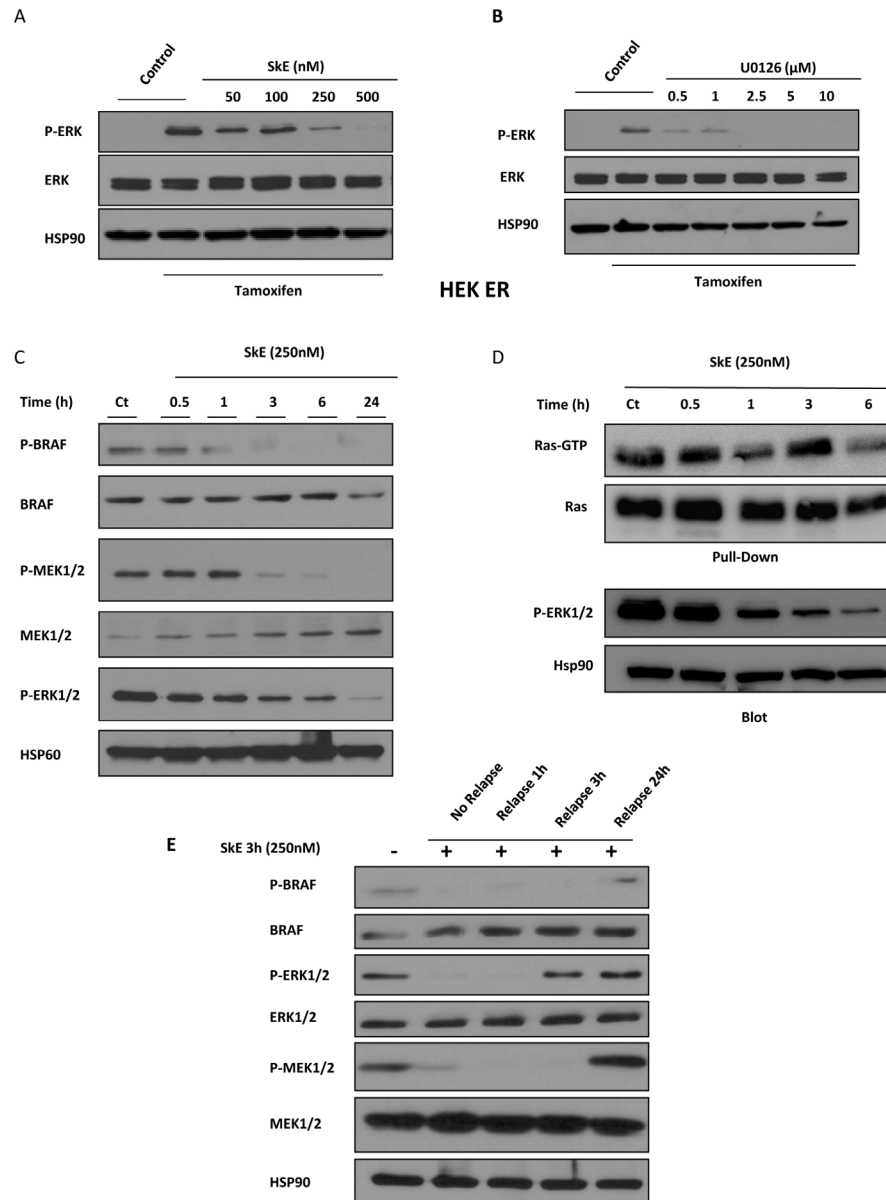


Figure 3: SkE can inhibit the RAF/MEK/ERK signaling pathway. HEK Raf-ER cells were pre-treated with increasing doses of SkE (A) or U0126 (B) for 1 h. Cells were then treated with tamoxifen (1 μM) for one additional hour. Protein samples were separated by electrophoresis, and the expression of Phospho-ERK and ERK was visualized on a Western blot. (C) K562 leukemic cells were treated for different times with 250 nM SkE. The status of phosphorylation of BRAF, MEK and ERK was visualized by Western blot. (D) K562 cells were incubated at 37°C with 250 nM SkE for the indicated times. Ras activity was determined after GST-pull-down. Ras-GTP levels were determined using GST-c-Raf RBD to pull down active GTP-bound Ras from cell extracts by glutathione beads. The beads were washed 4 times and subjected to SDS/PAGE (12% polyacrylamide). Ras and Phospho-ERK1/2 proteins were detected by Western blot analysis. (E) K562 cells were treated with 250 nM SkE for 3 h. Cells were then washed and placed in fresh medium for 1 h, 3 h or 24 h. The BRAF, MEK and ERK1/2 protein levels and their phosphorylation status were analyzed by Western blot. HSP60 and HSP90 were used as the loading controls.

SkE inhibits the growth of CML cells in athymic mice

To address the efficacy of SkE *in vivo*, we investigated the ability of the drug to inhibit the growth of the K562 CML cell line implanted in athymic mice. To this end, K562 cells carrying the luciferase gene were injected in the flanks of athymic mice. Mice were randomized and separated into three groups. When tumors reached 100 mm³ in size (after 5 days), each subgroup of mice was treated daily with an intraperitoneal injection of vehicle, 60 mg/kg imatinib or 1 mg/kg of SkE. At day 18, imatinib and SkE had induced tumor regression to a similar extent (Figure 5A). The tumor size was evaluated by photon imaging at days 3, 9, 14, 16 and 18 following the injection of 30 mg/kg of luciferin (Figure 5B). The inhibitory effect of SkE on K562 cell growth *in vivo* was detected as early as 14 days after the onset of injection. By days 16 and 18, there was almost complete regression of tumors in the imatinib and SkE-treated mice. Finally, histological

slides of tumors clearly showed dephosphorylation of ERK in tumors collected from SkE-treated mice at day 18 (Figure 5C). Clearly, there was also a visible decrease in the number of K562 cells present in the tumors of SkE-treated animals. Taken collectively, these data demonstrate that SkE (1 mg/kg) is as effective as imatinib (60 mg/kg), the leading compound for treating CML patients, which is used to inhibit CML cell growth *in vivo*. Moreover, the effect of SkE *in vivo* relied on ERK1/2 dephosphorylation.

DISCUSSION

The Ras/Raf/MEK/ERK cascade is a very attractive target in cancer therapy. Indeed, numerous solid and hematopoietic tumors exhibit activation of this pathway following genetic alterations either in upstream signaling molecules, such as receptor tyrosine kinases and oncogenic fusion proteins, or in overexpression of one of the elements of this pathway [2, 3]. The upstream regulator of the cascade, Ras, is mutated in 20 to 30% of human cancers. Of note, the frequency of K-Ras mutations is

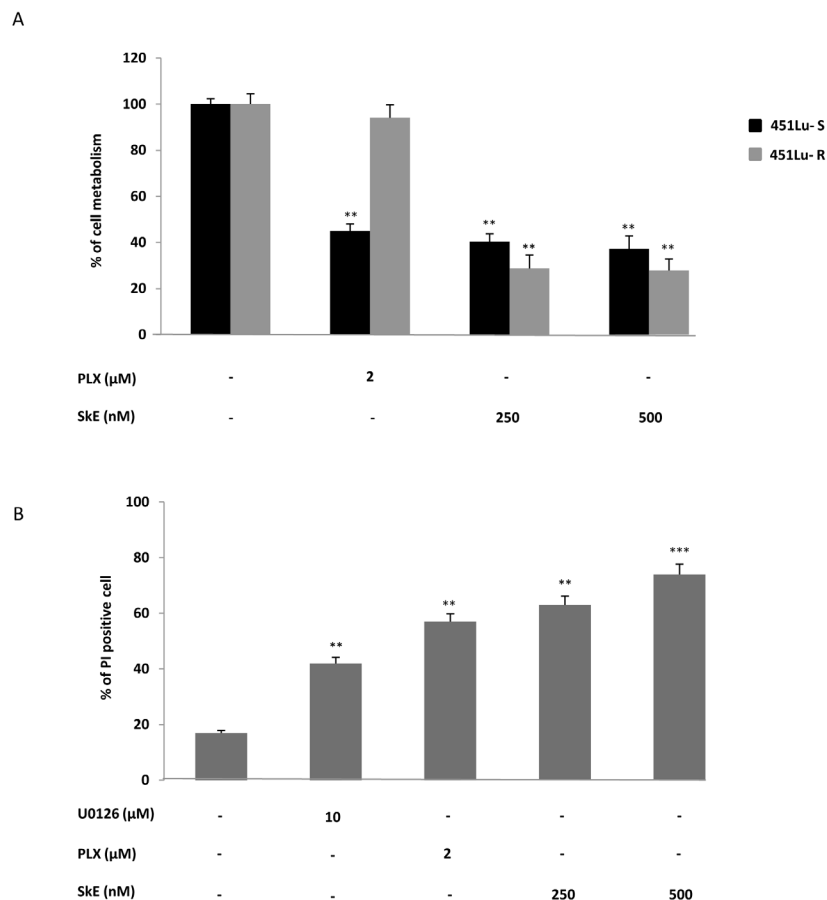


Figure 4: SkE induces cell death of tumors exhibiting the BRAF V600E mutation. (A) PLX-sensitive and PLX-resistant 451Lu melanoma cell lines were treated with either 2 μM PLX or increasing doses of SkE. Forty-eight hours later, cell metabolism was measured by the XTT assay as described in the Materials and Methods section. (B) Primary blood cells from patients suffering from hairy cell leukemia were treated with 2 μM PLX, 10 μM U0126 or increasing doses of SkE. Twenty-four hours later, cells were stained using propidium iodide, and cell death was analyzed with a cytometer.

very high in advanced pancreatic cancers [23]. Mutations in the downstream kinase B-Raf are also frequently found in cancers. This is well exemplified in melanoma, in which B-Raf mutations are present in 50-70% of patients, and in HCL, in which the frequency of B-Raf mutations is close to 100%. In both cases, the B-Raf-V600E mutation is

consistently detected. The downstream kinase MEK1/2 is mutated at a low frequency in some cancers, and, to date, there is no evidence of mutation in the downstream kinase ERK1/2. In addition to mutations in various elements of the cascade, the Ras/Raf/MEK/ERK pathway is found to be activated in a very large number of hematopoietic

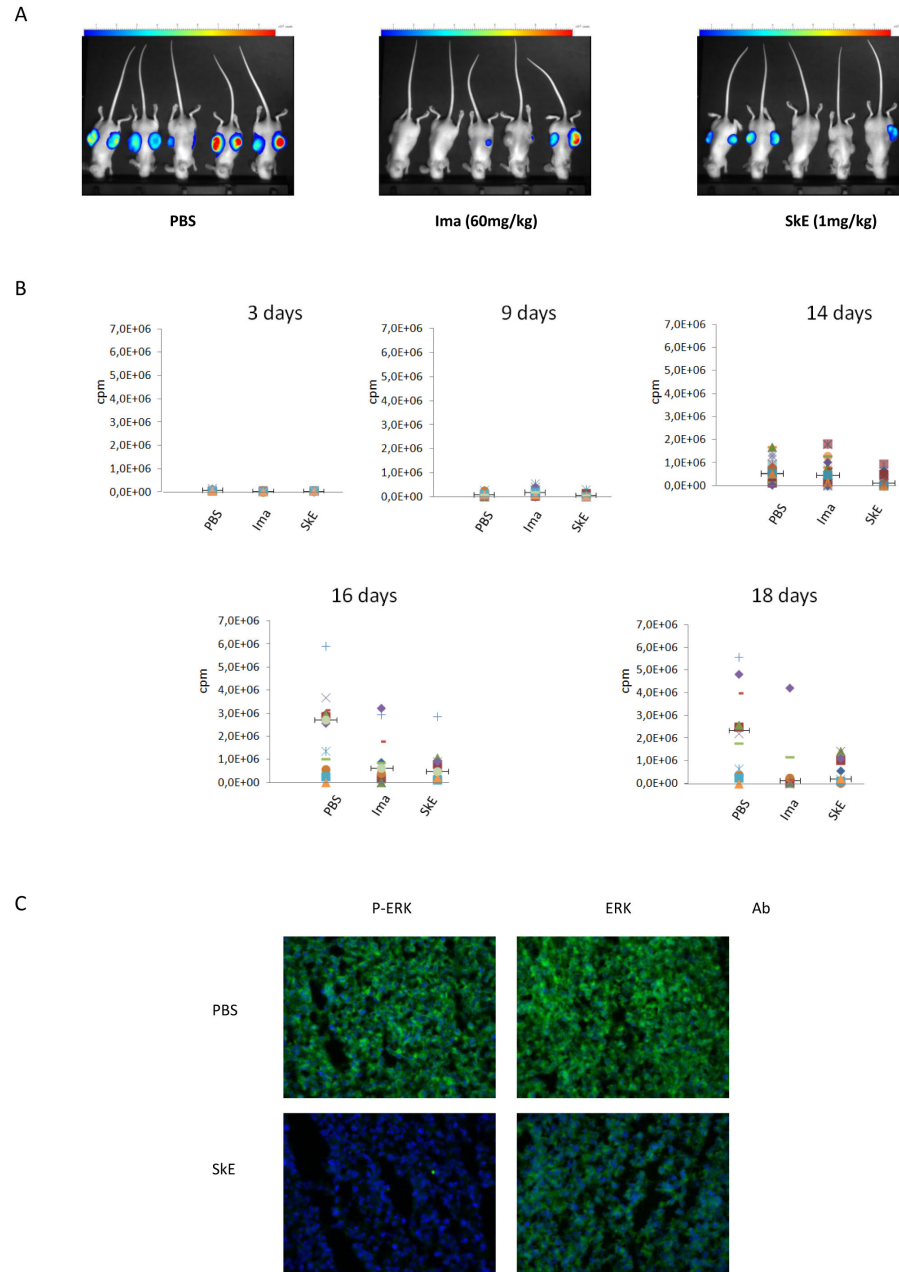


Figure 5: Chronic treatment with SkE is as effective as imatinib in inhibiting the growth of tumors derived from CML cells in athymic mice. A total of 5×10^6 K562 leukemic cells were implanted in both flanks in athymic mice. After tumor establishment, when the tumors reached 100 mm³, animals received a daily intraperitoneal injection of vehicle, imatinib (60 mg/kg body weight) or SkE (1 mg/kg body weight). (A) This picture shows the size of tumors at day 16 post injection with vehicle (left panel), Imatinib (middle panel) and SkE (right panel). (B) This panel shows the evolution of tumor growth, expressed in cpm at different times post-injection of the same treatments. (C) Tumors were removed, frozen and cut to perform immune staining. Slides containing a representative section of each tumor were incubated with either an anti-phospho-ERK1/2 or anti-ERK1/2 antibody. Slides were finally mounted and analyzed under a fluorescence microscope.

and solid tumors [2, 24, 25]. For instance, constitutive activation of the pathway is also observed independent of activating mutations in solid and hematopoietic malignancies, including CML, in which the BCR-ABL fusion oncoprotein (which drives the pathology) is responsible for ERK1/2 activation. Importantly, our group and others have also reported a high constitutive activation of ERK1/2 in several tyrosine kinase inhibitor-resistant CML cell lines [26-28]. Of note, SkE was also found to be highly effective at killing these tyrosine kinase inhibitor-resistant CML cell lines (data not shown).

The present study was conducted to determine whether SkE could be used as an antitumoral agent. We show here that very low doses of SkE efficiently inhibited the growth of several solid and hematopoietic cancer cell lines, including melanoma and CML cell lines. Of note, SkE was highly efficient in cells exhibiting constitutive activation of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway. For instance, SkE was found to be ten-fold more effective in melanoma cell lines carrying the V600E B-Raf mutation than in melanoma cell lines that did not carry a mutation (Supplementary Figure 1). In addition, SkE was also very potent in CML cell lines exhibiting constitutive activation of the MAP kinase pathway following the expression of the BCR ABL fusion protein.

To decipher the mechanism of action of SkE, we used both melanoma and CML cell lines and primary cells from patients diagnosed with melanoma and HCL and demonstrated that low concentrations of SkE interfere with the activation of ERK, as shown by the clear inhibition of ERK1/2 phosphorylation. We next sought to identify the specific point in the Ras/Raf/MEK/ERK pathway affected by SkE in different cellular models with either constitutive or inducible MAPK kinase activation. Importantly, SkE impaired the activities of both MEK and B-Raf. By contrast, SkE failed to affect Ras activity, strongly suggesting that the drug acts at the level of B-Raf to inhibit the ERK pathway. At present, it is not known whether SkE also affects the activity of other Raf isoforms, including A-Raf and C-Raf.

Importantly, chloroquine, an anti-malarial drug with a chemical structure different from SkE, has previously been reported to inhibit ERK activation [29]. However, the chloroquine dose necessary to achieve complete inhibition of ERK in human peripheral blood monocytes in this study was 1000 times higher than the one used in the present study for SkE in melanoma and CML cell lines. This very high potency of SkE in inhibiting B-Raf prompted us to assess its activity in melanoma cell lines carrying B-Raf-V600E mutations and in primary cells from HCL patients who consistently carried this mutation. SkE potently inhibited the growth and clonogenic potential of both cell lines, confirming the very potent anti-tumoral effect of this drug, particularly in cells exhibiting constitutive activation of the Ras/Raf/MEK/ERK cascade.

Owing to its ability to inhibit lysosomal protease,

chloroquine is often used as an inhibitor of autophagy, a catabolic process that can favor cell survival in adverse conditions, such as cellular stress and nutrient deprivation [30]. In this line, the inhibition of autophagy can sensitize cancer cell lines to chemotherapy, and several clinical trials have been initiated that include chloroquine as a second-line therapeutic agent in different forms of cancers [31, 32]. However, the findings presented herein clearly establish that an optimal concentration of SkE failed to affect the lipidation of LC3, arguing against an effect of SkE on autophagy induction when used as a single drug.

In the present study, we also demonstrated that SkE drastically reduced the growth of CML cells in athymic mice. A dose as low as 1 mg/kg of SkE was sufficient to inhibit the growth of K562 cells, whereas 60 mg/kg of imatinib mesylate, the leading treatment for CML, was required to obtain a similar effect. These results clearly show that SkE has an excellent *in vivo* bioavailability in mice. Moreover, our results strongly suggest that the antiproliferative and proapoptotic effects of SkE are intimately linked to its ability to interfere with the MAP kinase cascade. This was confirmed by our analysis of tumor histological slides from athymic mice grafted with K562 CML cell lines, which clearly showed a complete inhibition of ERK1/2 phosphorylation in SkE-treated mice.

Finally, we also present evidence that SkE is highly effective at circumventing dabrafenib (GSK2118436) resistance in melanoma cell lines. Dabrafenib is a potent B-Raf inhibitor currently used in phase III studies for metastatic melanoma. It has been reported that dabrafenib initially induced complete remission in patients with metastatic melanoma [14]. However, following this initial beneficial response, all of the patients relapsed. Relapses are likely due to the reactivation of the MAPK pathway and, accordingly, MEK inhibitors such as U0126 can efficiently resensitize dabrafenib-resistant cell lines *in vitro*. Our group and others have recently reported that the B-Raf inhibitor vemurafenib (PLX-4720) is very effective in HCL patients who carry the B-Raf V600E mutation, inducing complete remission and the restoration of normal blood cell counts and hemoglobin concentration in patients with refractory HCL [11]. Another important finding of the present study is that low concentrations of SkE can inhibit the growth of primary cells from HCL patients more efficiently than vemurafenib (i.e., inhibition occurs in the high nanomolar range versus the micromolar range).

In conclusion, we describe here for the first time the unusual ability of the new compound SkE to inhibit B-Raf activation not only in melanoma and HCL but also in CML cell lines exhibiting constitutive activation of the ERK pathway. In addition, we show that this drug is highly effective at inhibiting HCL-patient-derived primary blood cells carrying this mutation and at inhibiting melanoma cell line with acquired resistance to the B-Raf inhibitors PLX-4720 and GSK2118436. Finally, we also show

evidence that SkE at very low doses is highly effective in a preclinical murine model of CML. Collectively, our findings show that SkE could be a new weapon in the armamentarium of drugs targeting cancers that exhibit constitutive activation of the ERK pathway and that SkE warrants testing in humans.

MATERIALS AND METHODS

Reagents and antibodies

RPMI 1640 and DMEM media as well as fetal calf serum (FCS) were purchased from Lonza (Walkersville, MD, USA). Sodium fluoride, orthovanadate, phenylmethylsulfonyl fluoride, aprotinin and leupeptin were purchased from Sigma (Saint-Louis, MO, USA). Imatinib was purchased from Enzo Life Sciences (Villeurbanne, France). U0126 was purchased from Tocris (Bristol, UK). PLX-4720 was purchased from Selleck Chemicals (Houston, TX, USA). Anti-C-Abl, anti-MEK1/2, anti-Hsp90 and anti-Hsp60 antibodies were purchased from Santa Cruz Biotechnology (Tebu-Bio, Le Perray en Yvelines, France). Anti-phospho-Abl (Tyr245), anti-phospho-STAT5, anti-phospho-Crkl (Tyr207), anti-PARP, anti-phospho-S6 Ribosomal Protein (Ser235/236), anti-S6 Ribosomal Protein, anti-phospho-ERK1/2, anti-ERK1/2, anti-phospho-MEK1/2, anti-phospho-B-Raf, anti-B-Raf and anti-LC3b were purchased from Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA). HRP conjugated anti-mouse, anti-rabbit and anti-goat antibodies were purchased from Dakopatts (Glostrup, Denmark).

Cell lines

The human CML K562 cell line was provided by ATCC and was grown at 37°C under 10% CO₂ in RPMI 1640 medium supplemented with 5% FCS (Gibco BRL, Paisley, UK) and 50 units/ml of penicillin, 50 µg/ml streptomycin and 1 mM sodium pyruvate. 293 RAF/ER cells are a derivative of HEK-293 (ATCC: CRL1573) cells that stably express a fusion protein comprising the catalytic domain of Raf-1 and the hormone-binding domain of the estrogen receptor. 293 RAF/ER cells were cultured in DMEM without phenol red, supplemented with 10% heat inactivated FCS, as described previously [17]. The 451Lu melanoma cells, which are sensitive or resistant to PLX-4720, were grown in DMEM supplemented with 10% FCS.

Measurement of cell metabolism (XTT)

Cells (15×10³ cells/100 µl) were incubated with the different effectors for the times indicated. A total of 50

µl of XTT reagent (sodium 3'-[1-(phenylaminocarbonyl)-3,4-tetrazolium]-bis(4-methoxy-6-nitro)benzene sulfonic acid hydrate) was added to each well. Absorbance of the formazan dye produced by metabolically active cells was measured at 490 nm as described previously [18]. Each assay was performed in quadruplicate.

Western Blot

Western blot analyses have been previously described in detail [19].

Phosphoprotein array analysis

K562 cells were treated (or not treated) with 250 nM SkE for 2 hours. Cells were rinsed with cold PBS and lysed as described for Western blot analysis. Cell lysates were clarified by centrifugation (10,000 g for 5 minutes at 4°C), and the protein levels were normalized using the Bradford assay. Then, 150 µg of cell extracts was left on the chip as described in the RTK Pathscan array kit from Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA). After incubation and successive steps of washing, the arrays were dried and imaged using a Fujifilm LAS-3000 Imaging System. Duplicate spot intensities were quantified from each array image using the Image J quantification software (U.S. National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA).

Primary cell isolation

Blood samples were collected from patients newly diagnosed with CML or HCL as part of an institutionally approved cellular sample collection protocol. Informed consent was obtained according to institutional guidelines. Mononuclear cells were isolated from blood samples by density centrifugation (Ficoll-Paque™ Plus), washed with PBS, 5% SVF, and 2 mM EDTA, and then resuspended in cell culture medium (IMDM, 10% fetal bovine serum) and incubated overnight at 37°C in a 5% CO₂ incubator. CML cells were labeled with CD34 microbeads isolated by magnetic positive selection (StemSep™ Human CD34 Selection Kit; StemCell, Vancouver, BC, Canada). Purity was estimated to be at least 90% by FACS analysis. Experiments were performed using an IMDM (10% fetal bovine serum) for CML and HCL cells.

Colony formation assay

SkE was added to the K562 CML cell lines (10³ cells/ml) growing in semi-solid methylcellulose medium. MethoCult H4100 was used for cell lines (StemCell Technologies Inc., Vancouver, Canada). Colonies were detected after 10 days of culture by

adding 1 mg/ml of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromide (MTT) reagent and were scored by Image J quantification software (U.S. National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA).

Microscopic analysis of tumors

Tumors from control or SkE-treated mice were removed, frozen and cut in preparation for immunostaining. Slides containing a representative section of each tumor were fixed, permeabilized and incubated with anti-phospho-ERK 1/2 or anti-ERK antibodies diluted in PBS and 1% BSA at RT for 1 h. Then, cells were washed and incubated with a secondary anti-Rabbit antibody. Finally, DAPI was used to label the nuclei, and the slides were mounted and then analyzed under a fluorescence microscope (LEICA TCR5500, Leica, Somers, Germany).

Tumor regression experiments in athymic Mice

Female athymic NMRI Mice (Janvier, Le Genest Saint Ile, France) were randomized into 3 experimental groups, each containing 7 animals. Two sets of animals received a 200 μ l injection of 5.10^6 K562-Luc leukemia cells in both flanks. When tumors reached 100 mm³, the animals were injected intraperitoneally with vehicle (PBS), Imatinib or SkE at dose levels of 60 mg/kg and 1 mg/kg body weight, respectively. The growth of the leukemic cells comprising the tumor was visualized in the animal at different days after intraperitoneal injection of 30 mg/kg luciferin (Caliper Life Sciences) by bioluminescence imaging with a Photon Imager (Biospace Lab), as described elsewhere [20]. The *in vivo* study was conducted according to French legislation on laboratory animal use and care (N^o2001-464).

Measurement of cell death

Following U0126, PLX-4720 or SkE treatment, HCL cells were stained with propidium iodide, and the stained cells were analyzed with a cytometer.

Extraction and purification of simalikalactone E

SkE was extracted and purified from *Quassia amara* as previously described [1].

Pull-down of the activated form of Rho GTPase

K562 cells were incubated at 37°C with 250 nM SkE for the indicated times. Ras activity was determined after GST-pull-down. Ras-GTP levels were determined

using GST-c-Raf RBD to pull down active GTP-bound Ras from cell extracts by glutathione beads. The beads were washed 4 times and subjected to SDS/PAGE (12% polyacrylamide). Ras and Phospho-ERK1/2 proteins were detected by Western blot analysis as described previously [21].

Statistical analysis

All data are presented as the mean \pm SD of at least three independent determinations. P-values were determined using the Prism V5.0b software (GraphPad, La Jolla, CA, USA). Unless stated otherwise in the figure legend, comparisons of the different groups were made with the one-way ANOVA test with Bonferroni correction. P-values of 0.05 (*), 0.01 (**) and 0.001 (***) were considered statistically significant.

ACKNOWLEDGMENTS

We are indebted to Drs. M. Herlyn and J. Villanueva (Wistar Institute, Philadelphia, PA, USA) for the kind gift of the 451Lu melanoma cells that are sensitive and resistant to GSK2118436 and PLX-4720. We also acknowledge Dr. Gilles Pages for the kind gift of the 293 RAF/ER cells. We acknowledge the C3M Imaging Core Facility (MICA) and genomic facility. We thank the Conseil Regional PACA and the Conseil Général des Alpes-Maritimes for their financial support to C3M. We also acknowledge the Département de la valorisation de l'IRD for financial and legal advice and support.

GRANT SUPPORT

This work was supported by grant from the Ligue Nationale Contre le Cancer "Equipe labellisée 2011-2013". GR and AJ are recipients of fellowships from the Fondation de France and the Ligue Nationale Contre le Cancer respectively.

REFERENCE

1. Cachet N, Hoakwie F, Bertani S, Bourdy G, Deharo E, Stien D, Houel E, Gornitzka H, Fillaux J, Chevalley S, Valentin A, Jullian V. Antimalarial activity of simalikalactone E, a new quassinoid from *Quassia amara* L. (Simaroubaceae). *Antimicrob Agents Chemother.* 2009; 53:4393-4398.
2. Steelman LS, Franklin RA, Abrams SL, Chappell W, Kempf CR, Basecke J, Stivala F, Donia M, Fagone P, Nicoletti F, Libra M, Ruvolo P, Ruvolo V, Evangelisti C, Martelli AM, McCubrey JA. Roles of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway in leukemia therapy. *Leukemia.* 2011; 25:1080-1094.
3. Roberts PJ, Der CJ. Targeting the Raf-MEK-ERK mitogen-activated protein kinase cascade for the treatment of cancer. *Oncogene.* 2007; 26:3291-3310.

4. Colombino M, Capone M, Lissia A, Cossu A, Rubino C, De Giorgi V, Massi D, Fonsatti E, Staibano S, Nappi O, Pagani E, Casula M, Manca A, Sini M, Franco R, Botti G et al. BRAF/NRAS mutation frequencies among primary tumors and metastases in patients with melanoma. *J Clin Oncol*. 2012; 30:2522-2529.
5. Sensi M, Nicolini G, Petti C, Bersani I, Lozupone F, Molla A, Vegetti C, Nonaka D, Mortarini R, Parmiani G, Fais S, Anichini A. Mutually exclusive NRASQ61R and BRAFV600E mutations at the single-cell level in the same human melanoma. *Oncogene*. 2006; 25:3357-3364.
6. Wellbrock C, Hurlstone A. BRAF as therapeutic target in melanoma. *Biochem Pharmacol*. 2010; 80:561-567.
7. Badalian-Very G, Vergilio JA, Degar BA, MacConaill LE, Brandner B, Calicchio ML, Kuo FC, Ligon AH, Stevenson KE, Kehoe SM, Garraway LA, Hahn WC, Meyerson M, Fleming MD, Rollins BJ. Recurrent BRAF mutations in Langerhans cell histiocytosis. *Blood*. 2010; 116:1919-1923.
8. Puxeddu E, Moretti S, Elisei R, Romei C, Pascucci R, Martinelli M, Marino C, Avenia N, Rossi ED, Fadda G, Cavaliere A, Ribacchi R, Falorni A, Pontecorvi A, Pacini F, Pinchera A et al. BRAF(V599E) mutation is the leading genetic event in adult sporadic papillary thyroid carcinomas. *J Clin Endocrinol Metab*. 2004; 89:2414-2420.
9. Tie J, Gibbs P, Lipton L, Christie M, Jorissen RN, Burgess AW, Croxford M, Jones I, Langland R, Kosmider S, McKay D, Bollag G, Nolop K, Sieber OM, Desai J. Optimizing targeted therapeutic development: analysis of a colorectal cancer patient population with the BRAF(V600E) mutation. *Int J Cancer*. 2011; 128:2075-2084.
10. Tiacci E, Trifonov V, Schiavoni G, Holmes A, Kern W, Martelli MP, Pucciarini A, Bigerna B, Pacini R, Wells VA, Sportoletti P, Pettirossi V, Mannucci R, Elliott O, Liso A, Ambrosetti A et al. BRAF mutations in hairy-cell leukemia. *N Engl J Med*. 2011; 364:2305-2315.
11. Tiacci E, Schiavoni G, Forconi F, Santi A, Trentin L, Ambrosetti A, Cecchini D, Sozzi E, Francia di Celle P, Di Bello C, Pulsoni A, Foa R, Inghirami G, Falini B. Simple genetic diagnosis of hairy cell leukemia by sensitive detection of the BRAF-V600E mutation. *Blood*. 2012; 119:192-195.
12. Verma S, Greaves WO, Ravandi F, Reddy N, Bueso-Ramos CE, O'Brien S, Thomas DA, Kantarjian H, Medeiros LJ, Luthra R, Patel KP. Rapid detection and quantitation of BRAF mutations in hairy cell leukemia using a sensitive pyrosequencing assay. *Am J Clin Pathol*. 2012; 138:153-156.
13. Emery CM, Vijayendran KG, Zipser MC, Sawyer AM, Niu L, Kim JJ, Hatton C, Chopra R, Oberholzer PA, Karpova MB, MacConaill LE, Zhang J, Gray NS, Sellers WR, Dummer R, Garraway LA. MEK1 mutations confer resistance to MEK and B-RAF inhibition. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009; 106:20411-20416.
14. Sosman JA, Kim KB, Schuchter L, Gonzalez R, Pavlick AC, Weber JS, McArthur GA, Hutson TE, Moschos SJ, Flaherty KT, Hersey P, Kefford R, Lawrence D, Puzanov I, Lewis KD, Amaravadi RK et al. Survival in BRAF V600-mutant advanced melanoma treated with vemurafenib. *N Engl J Med*. 2012; 366:707-714.
15. Su F, Bradley WD, Wang Q, Yang H, Xu L, Higgins B, Kolinsky K, Packman K, Kim MJ, Trunzer K, Lee RJ, Schostack K, Carter J, Albert T, Germer S, Rosinski J et al. Resistance to selective BRAF inhibition can be mediated by modest upstream pathway activation. *Cancer Res*. 2012; 72:969-978.
16. Dietrich S, Glimm H, Andrulis M, von Kalle C, Ho AD, Zenz T. BRAF inhibition in refractory hairy-cell leukemia. *N Engl J Med*. 2012; 366:2038-2040.
17. Luciano F, Jacquel A, Colosetti P, Herrant M, Cagnol S, Pages G, Auberger P. Phosphorylation of Bim-EL by Erk1/2 on serine 69 promotes its degradation via the proteasome pathway and regulates its proapoptotic function. *Oncogene*. 2003; 22:6785-6793.
18. Puissant A, Grosso S, Jacquel A, Belhacene N, Colosetti P, Cassuto JP, Auberger P. Imatinib mesylate-resistant human chronic myelogenous leukemia cell lines exhibit high sensitivity to the phytoalexin resveratrol. *FASEB J*. 2008; 22:1894-1904.
19. Robert G, Puissant A, Dufies M, Marchetti S, Jacquel A, Cluzeau T, Colosetti P, Belhacene N, Kahle P, Da Costa CA, Luciano F, Checler F, Auberger P. The caspase 6 derived N-terminal fragment of DJ-1 promotes apoptosis via increased ROS production. *Cell Death Differ*. 2012; 19:1769-1778.
20. Puissant A, Dufies M, Fenouille N, Ben Sahra I, Jacquel A, Robert G, Cluzeau T, Deckert M, Tichet M, Cheli Y, Cassuto JP, Raynaud S, Legros L, Pasquet JM, Mahon FX, Luciano F et al. Imatinib triggers mesenchymal-like conversion of CML cells associated with increased aggressiveness. *J Mol Cell Biol*. 2012; 4:207-220.
21. Munro P, Flatau G, Doye A, Boyer L, Oregioni O, Mege JL, Landraud L, Lemichez E. Activation and proteasomal degradation of rho GTPases by cytotoxic necrotizing factor-1 elicit a controlled inflammatory response. *J Biol Chem*. 2004; 279:35849-35857.
22. Villanueva J, Vultur A, Lee JT, Somasundaram R, Fukunaga-Kalabis M, Cipolla AK, Wubbenhorst B, Xu X, Gimotty PA, Kee D, Santiago-Walker AE, Letrero R, D'Andrea K, Pushparajan A, Hayden JE, Brown KD 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; 18:683-695.
23. McCubrey JA, Steelman LS, Chappell WH, Abrams SL, Montalto G, Cervello M, Nicoletti F, Fagone P, Malaponte G, Mazzarino MC, Candido S, Libra M, Basecke J, Mijatovic S, Maksimovic-Ivanic D, Milella M et al. Mutations and Deregulation of Ras/Raf/MEK/ERK and PI3K/PTEN/Akt/mTOR Cascades. *Oncotarget*. 2012; 3:954-987.
24. Steelman LS, Chappell WH, Abrams SL, Kempf RC, Long

- J, Laidler P, Mijatovic S, Maksimovic-Ivanic D, Stivala F, Mazzarino MC, Donia M, Fagone P, Malaponte G, Nicoletti F, Libra M, Milella M et al. Roles of the Raf/MEK/ERK and PI3K/PTEN/Akt/mTOR pathways in controlling growth and sensitivity to therapy-implications for cancer and aging. *Aging (Albany NY)*. 2011; 3:192-222.
25. Chappell WH, Steelman LS, Long JM, Kempf RC, Abrams SL, Franklin RA, Basecke J, Stivala F, Donia M, Fagone P, Malaponte G, Mazzarino MC, Nicoletti F, Libra M, Maksimovic-Ivanic D, Mijatovic S et al. Ras/Raf/MEK/ERK and PI3K/PTEN/Akt/mTOR inhibitors: rationale and importance to inhibiting these pathways in human health. *Oncotarget*. 2011; 2:135-164.
 26. Grosso S, Puissant A, Dufies M, Colosetti P, Jacquelin A, Lebrigand K, Barbry P, Deckert M, Cassuto JP, Mari B, Auberger P. Gene expression profiling of imatinib and PD166326-resistant CML cell lines identifies Fyn as a gene associated with resistance to BCR-ABL inhibitors. *Mol Cancer Ther*. 2009; 8:1924-1933.
 27. Fenouille N, Puissant A, Dufies M, Robert G, Jacquelin A, Ohanna M, Deckert M, Pasquet JM, Mahon FX, Cassuto JP, Raynaud S, Tartare-Deckert S, Auberger P. Persistent activation of the Fyn/ERK kinase signaling axis mediates imatinib resistance in chronic myelogenous leukemia cells through upregulation of intracellular SPARC. *Cancer Res*. 2010; 70:9659-9670.
 28. Donato NJ, Wu JY, Stapley J, Gallick G, Lin H, Arlinghaus R, Talpaz M. BCR-ABL independence and LYN kinase overexpression in chronic myelogenous leukemia cells selected for resistance to STI571. *Blood*. 2003; 101:690-698.
 29. Weber SM, Chen JM, Levitz SM. Inhibition of mitogen-activated protein kinase signaling by chloroquine. *J Immunol*. 2002; 168:5303-5309.
 30. Rubinsztein DC, Gestwicki JE, Murphy LO, Klionsky DJ. Potential therapeutic applications of autophagy. *Nat Rev Drug Discov*. 2007; 6:304-312.
 31. Gupta A, Roy S, Lazar AJ, Wang WL, McAuliffe JC, Reynoso D, McMahon J, Taguchi T, Floris G, Debiec-Rychter M, Schoffski P, Trent JA, Debnath J, Rubin BP. Autophagy inhibition and antimalarials promote cell death in gastrointestinal stromal tumor (GIST). *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010; 107:14333-14338.
 32. Bellodi C, Lidonnici MR, Hamilton A, Helgason GV, Soliera AR, Ronchetti M, Galavotti S, Young KW, Selmi T, Yacobi R, Van Etten RA, Donato N, Hunter A, Dinsdale D, Tirro E, Vigneri P et al. Targeting autophagy potentiates tyrosine kinase inhibitor-induced cell death in Philadelphia chromosome-positive cells, including primary CML stem cells. *J Clin Invest*. 2009; 119:1109-1123.

Articles publiés

Fenouille, N., Tichet, M., Dufies, M., **Pottier, A.**, Mogha, A., Soo, J. K., Rocchi, S., Malavialle, A., Khammari, A., Lacour, J-P., Galibert, MD., Ballotti, R., Deckert, M. and Tartare-Deckert, S. The epithelial-mesenchymal transition (EMT) regulatory factor Slug (SNAI2) is a downstream target of SPARC and AKT in promoting melanoma cell invasion. *PLoS One*. 2012. 7(7):e40378.

Robert, G., Jullian, V., Jacquet, A., Ginet, C., Dufies, M., Torino, S., **Pottier, A.**, Peyrade, F., Tartare Deckert, S., Bourdy, G., Deharo, E., Auberger, P. Simalikalactone E (SkE), a new weapon in the armamentarium of drugs targeting cancers that exhibit constitutive activation of the ERK pathway. *Oncotarget*. 2012.3(12): 1688-99

Articles en préparation

Pottier, A., Berestjuk, I., Boukari, F., Prod'Homme, V., Girard, C., Montaudié, H., Andreani, O., Lacour, J.P., Deckert, M., and Tartare-Deckert, S. Increase of SPARC through autocrine tumor cell production contributes to therapeutic resistance in melanoma. Article en préparation.

RESUME

Le mélanome, résultat de la « transformation » maligne des mélanocytes, est le cancer de la peau le plus dangereux. Il est capable de se disséminer rapidement et efficacement dans l'organisme sous forme de métastases principalement ganglionnaires, pulmonaires, cérébrales et hépatiques. Au stade métastatique, ce cancer est réfractaire à la chimiothérapie avec moins de 10% de réponses objectives sans amélioration de la survie pour la chimiothérapie de référence qu'est la Dacarbazine. Ces cinq dernières années, des thérapies ciblées telles que les inhibiteurs de la kinase BRAF^{V600} (Vémurafénib/Dabrafénib) retrouvée dans plus de 60% des mélanomes, ou les immunothérapies (inhibiteurs de CTLA-4 ou PD-1/PD-L1), ont été développées et ont montré des effets spectaculaires en termes de survie globale et sans progression de la maladie. Malheureusement, la mise en place de mécanismes de résistances par les mélanomes, ou celle de niche de résistance telle que les ganglions lymphatiques (premier site d'arrivée des métastases), fait presque systématiquement de l'ombre à ces thérapies en induisant une rechute du patient.

Les cellules cancéreuses peuvent en effet subir des altérations génétiques, génomiques, ou épigénétiques et résister aux inhibiteurs de BRAF^{V600}. D'autre part, ancrées au sein d'un microenvironnement qu'elles façonnent et avec lequel elles interagissent, elles peuvent également profiter de facteurs solubles du stroma tumoral et de l'adhésion à la matrice extracellulaire pour survivre face aux molécules thérapeutiques: l'appréhension de ce phénomène d'EMDR (pour, Environment Mediated Drug Resistance) est désormais primordiale dans l'étude des processus de résistance thérapeutique.

Dans ce contexte, je me suis d'abord intéressée à la protéine matricielle SPARC, une protéine matricellulaire qui orchestre les interactions entre les cellules saines ou cancéreuses et leur microenvironnement. Absente dans les mélanocytes, son expression est initiée et augmentée dans les mélanomes, corrélée à la progression tumorale et à un mauvais pronostic clinique. De précédentes études de l'équipe ont identifié SPARC comme médiateur clé de la prolifération et de la survie des mélanomes. Lorsqu'elle est sécrétée par les cellules de mélanome, elle agit de manière autocrine en induisant la répression du suppresseur de tumeur p53 via l'activation de la voie AKT/MDM2, favorisant ainsi la progression du cycle cellulaire et la survie tumorale. Cependant, la contribution de la surexpression de SPARC dans la survie des mélanomes face aux thérapies n'était pas connue.

J'ai donc d'abord évalué la contribution de la protéine SPARC dans la résistance innée (ou primaire) des mélanomes aux thérapies anti-mélanome, en particulier au Vémurafénib. Par des approches complémentaires de « gain » ou « perte » de fonction *in vitro*, j'ai montré que la forte expression de SPARC dans les mélanomes mutées BRAF^{V600} confèrent une résistance innée aux effets antiprolifératifs de la Dacarbazine et des inhibiteurs de BRAF^{V600} ou de MEK, en favorisant la progression du cycle cellulaire vers la phase S, et en inhibant la mort cellulaire par apoptose via l'inactivation du suppresseur de tumeur p53 et l'expression de la Survivine. Par une approche de co-culture indirecte utilisant des cellules de mélanome « low-SPARC » en présence de sécrétome de cellules « High-SPARC » délétées ou non de SPARC, j'ai pu montrer le caractère transmissible SPARC-dépendant de la résistance innée des cellules de mélanome.

J'ai ensuite cherché à comprendre l'implication de la protéine SPARC dans la résistance acquise des mélanomes aux inhibiteurs de BRAF^{V600}. Par comparaison de lignées de mélanomes mutées BRAF^{V600} ayant acquis une résistance au Vémurafénib ou au Dabrafénib avec des lignées d'origine sensibles à ces traitements, j'ai montré que le développement de résistance à ces traitements peut être associé à une surexpression du module signalétique SPARC/AKT. De plus, par étude corrélative des niveaux de SPARC sérique de patients atteints de mélanomes métastatiques mutés BRAF^{V600} et de leur réponse aux thérapies ciblant la voie RAF-MEK-ERK, nous avons proposé le dosage du SPARC sérique comme indicateur clinique de la réponse thérapeutique des patients ou de leur éventuelle rechute. Ensuite, j'ai montré que l'extinction de SPARC suffit à resensibiliser au Vémurafénib les cellules résistantes dont la résistance est ERK-indépendante et que, combinée à un inhibiteur de MEK, elle induit la mort des cellules résistantes dont la résistance est ERK-indépendante et ERK-dépendante.

Ainsi, ce premier travail a permis de caractériser l'expression de SPARC comme nouveau déterminant de la sensibilité des mélanomes mutés BRAF^{V600} au Vémurafénib (ou au Dabrafénib). De plus, cette étude met en évidence l'intérêt du ciblage de la protéine SPARC en combinaison avec les inhibiteurs de la voie RAF-MEK-ERK pour optimiser ou restaurer la sensibilité des mélanomes à ces inhibiteurs.

Au cours d'une seconde étude qui est actuellement poursuivie, nous nous sommes intéressés au rôle que pouvaient jouer les fibroblastes ganglionnaires lymphatiques dans la résistance thérapeutique des mélanomes, alors très peu exploré jusqu'à présent. Nous avons montré que les fibroblastes ganglionnaires, qu'ils soient sains ou associés aux mélanomes, présentent des caractéristiques de fibroblastes activés et sont capables de conférer une résistance au Vémurafénib aux cellules de mélanomes mutées BRAF^{V600} en générant une matrice extracellulaire à laquelle les cellules de mélanome adhèrent fortement, et qui est permissive à la survie de ces dernières face au Vémurafénib.

Mots clés : mélanome cutané métastatique, BRAF^{V600}, protéine matricellulaire SPARC, fibroblastes ganglionnaires lymphatiques, p53, résistance thérapeutique.

