

# Validation de la protéine Kinase D1 comme facteur pronostique et cible thérapeutique dans le cancer du sein triple négatif et analyse de son rôle dans le maintien du phénotype mésenchymateux dans le mélanome

Caroline Spasojevic

▶ **To cite this version:**

Caroline Spasojevic. Validation de la protéine Kinase D1 comme facteur pronostique et cible thérapeutique dans le cancer du sein triple négatif et analyse de son rôle dans le maintien du phénotype mésenchymateux dans le mélanome. Cancer. Université Paris Saclay (COmUE), 2017. Français. NNT : 2017SACLS404 . tel-01773208

**HAL Id: tel-01773208**
**https://theses.hal.science/tel-01773208**

Submitted on 21 Apr 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.

**NNT : 2017SACLS404**

# THESE DE DOCTORAT
DE
L'UNIVERSITE PARIS-SACLAY
PREPAREE A
L'UNIVERSITE PARIS-SUD

ECOLE DOCTORALE N° 582
CBMS Cancérologie : biologie - médecine - santé

Spécialité de doctorat : Sciences de la vie et de la santé

Par

**Mlle Caroline Spasojevic**

## Validation de la Protéine Kinase D1 comme facteur pronostique et cible thérapeutique dans le cancer du sein triple négatif et analyse de son rôle dans le maintien du phénotype mésenchymateux dans le mélanome

**Thèse présentée et soutenue à Cachan, le 8 novembre 2017 :**

**Composition du Jury :**

| | | |
|---|---|---|
| M. Simon Saule | Professeur des Universités, Université Paris-Saclay | Président du jury |
| M. Patrice Dubreuil | Directeur de Recherche, CRCM de Marseille | Rapporteur |
| M. Eric Pasmant | MCU-PH, Hôpital Cochin | Rapporteur |
| Mme Patricia De Cremoux | MCU-PH, Hôpital Saint Louis | Examinatrice |
| M. Lionel Larue | Directeur de Recherche, Institut Curie | Examinateur |
| M. Ivan Bièche | MCU-PH, Institut Curie | Directeur de thèse |
| M. Christian Auclair | Professeur Emérite des Universités, Université Paris-Saclay | Co-directeur de thèse |

# Remerciements

*Je tiens tout d'abord à remercier les membres du jury :*
*Monsieur le Professeur Simon Saule d'avoir accepté de présider ce jury.*
*Messieurs les Docteurs Patrice Dubreuil et Eric Pasmant pour avoir accepté d'être rapporteurs de cette thèse et d'évaluer ce travail.*
*Monsieur le Docteur Lionel Larue et madame le Docteur Patricia De-Cremoux pour avoir accepté d'examiner cette thèse.*

*Je tiens à remercier le Docteur Ivan Bièche, Directeur de ma thèse, et le Docteur Malcolm Buckle pour m'avoir accueillie au sein de leur laboratoire ainsi que le Professeur Jean Marc Ricort pour m'avoir accueuillie dans son équipe.*

*Je remercie également le Docteur Ivan Bièche pour son encadrement, sa disponibilité et ses conseils précieux pour le bon déroulement de ma thèse.*
*Je remercie mon co-Directeur de thèse Monsieur le Professeur Christian Auclair pour m'avoir accueillie au sein de son équipe lors de mon stage de Master et de m'avoir donné la possibilité de faire cette thèse. Je le remercie également pour ses conseils et son encadrement.*

*Je remercie le Docteur Marie Regairaz pour son soutien, ses conseils scientifiques, nos précieux échanges et son encadrement dans cette thèse.*

*Je remercie tout particulièrement le Docteur Manale Karam pour tout ce qu'elle m'a apporté durant ces 4 années au LBPA, pour son soutien, pour m'avoir transmis sa passion de la recherche et son savoir ; et également, pour ces précieux conseils.*

*Je remercie tous mes collègues du LBPA de l'ENS de Cachan, en particulier Christine, Ilige, Caroline, Messaouda, Syham, Sylvie et Insaf pour m'avoir accompagnée tout au long de cette thèse, pour leur aide technique, nos discussions et nos agréables moments de détentes.*

*Je remercie également tous mes collègues de l'Unité de Pharmacogénomique de l'Institut Curie et en particulier Sophie, Sandrine, Florence, Anne, François, Florian et Walid de m'avoir intégrée dans leur équipe mais aussi pour leurs précieux conseils, pour leur aide technique et pour les nombreux moments sympathiques passés ensemble.*

*Je tiens à remercier le Docteur Elisabetta Marangoni du Laboratoire d'Investigation Préclinique de l'Institut Curie pour m'avoir accueillie dans son équipe pour la réalisation des expérimentations in vivo et pour ses précieux conseils.*

*Je remercie également toute l'équipe du LIP, Franck, Ahmed, Ludmilla, Caroline, Marine et Elodie pour leurs conseils et leur aide technique qui m'ont permis de mener à bien ses expérimentations in vivo ainsi que leur bonne humeur au quotidien.*

*Je remercie AB Science pour m'avoir permis de tester leurs inhibiteurs de PKD1 et ainsi de mieux appréhender le rôle de cette protéine.*

*Je remercie tous les membres de l'animalerie EOPS de l'Institut Curie ainsi que Sophie Château-Joubert de l'Ecole Vétérinaire de Maison Alfort et Didier Meseure de l'Institut Curie pour leur aide technique dans les marquages HIC.*

*Je tiens à remercier le secrétariat de l'Ecole Doctorale de Cancérologie et, en particulier, Madame Brigitte Cyrille.*

*Je remercie le Docteur Valérie Fortuna de m'avoir accueillie au sein de la Maison d'Initiation et de Sensibilisation aux Sciences afin d'y réaliser, durant les deux dernières années de ma thèse, une mission doctorale de vulgarisation scientifique.*
*Je remercie également Marie, Laurène, Kelly, Séverine, Raphaël et Sophie pour les moments passés à animer et préparer les ateliers toujours dans la bonne humeur ainsi que pour leurs échanges scientifiques.*

*Je remercie le Ministère de la Recherche pour son soutien financier au cours de cette thèse.*

*Enfin, je tiens à adresser mes vifs remerciements :*
*A mon frère, mes sœurs et Romain,*
*A mes amis et famille, Ana, Grozdo, Lolotte, Cyrielle, Marjorie, Sophie et Amélia pour leur soutien, encouragements et amour.*

*Et enfin à mes parents, pour leur soutien, encouragement et leur amour, qui ont fait que je suis devenue celle que je suis aujourd'hui.*

# Liste des abréviations

| Abréviation | Français | Anglais |
|---|---|---|
| ADAM A | Désintégrine et metalloprotéase | Disintegrin and metalloprotease |
| AI | Inhibiteur d'aromatases | Aromatase inhibitor |
| BRCA1 | *Breast cancer 1 gene* | |
| BRCA2 | *Breast cancer 2 gene* | |
| CAMK | Kinase dépendante de calcium et calmoduline | Calcium-calmodulin-dependent kinase |
| CDK | Kinase cycline-dépendante | Cyclin-dependent kinase |
| CRD | Domaine riche en cystéine | Cysteine-rich domain |
| DAG | Diacylglycérol | Diacylglycerol |
| EGF | Facteur de croissance épidermique | Epidermal growth factor |
| EGFR | Récepteur au facteur de croissance épidermique | Epidermal growth factor receptor |
| EMT | Transition épithélio-mésenchymateuse | Epithelial-mesenchymal transition |
| ERK | *Extracellular signal-regulated kinase* | |
| ERα | Récepteur aux estrogènes | Estrogen receptor-α |
| FGF | Facteur de croissance fibroblastique | Fibroblast growth factor |
| FGFR | Récepteur au facteur de croissance fibroblastique | Fibroblast growth factor receptor |
| GF | Facteur de croissance | Growth factor |
| HDAC | Histone déacétylase | Histone deacetylase |
| HER2 | Human Epidermal Growth Factor Receptor-2 | |
| IGF-1R | *Insulin-like growth factor receptor 1* | |
| IP3 | *Inositol-1,4,5-triphosphate* | |
| JNK | *c-Jun N-terminal kinase* | |
| MEK | *Mitogen-activated ERK kinase* | |
| MMP | Métalloprotéases de la matrice | Matrix metalloproteases |

| | | |
|---|---|---|
| NF-κB | Facteur nucléaire κB | Nuclear factor κB |
| PARP | *Poly(ADP-ribose) polymérase* | |
| PDGF | Facteur de croissance dérivé des plaquettes | Platelet-derived growth factor |
| PDGFR | Récepteur du facteur de croissance dérivé des plaquettes | Platelet-derived growth factor receptor |
| PDX (ou PDXs) | Xénogreffe dérivée de patient | Patient-derived xenograft |
| PH | Domaine d'homologie à la pleckstrine | Pleckstrin homology |
| PI3-k | *Phosphatidylinositol 3-kinase* | |
| PIP2 | *Phosphatidylinositol-4,5-biphosphate* | |
| PIP3 | *Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate* | |
| PKC | Protéine kinase C | Protein kinase C |
| PKCα | Protéine kinase Cα | Protein kinase Cα |
| PKCβ | Protéine kinase Cβ | Protein kinase Cβ |
| PKCμ | Protéine kinase Cμ | Protein kinase Cμ |
| PKD | Protéine kinase D | Protein kinase D |
| PKD1 | Protéine Kinase D1 | Protein Kinase D1 |
| PKD2 | Protéine kinase D2 | Protein kinase D2 |
| PKD3 | Protéine kinase D3 | Protein kinase D3 |
| PLC | Phospholipase C | Phospholipase C |
| PR | Récepteur à la progestérone | Progesterone receptor |
| PTEN | Homologue de phosphatase et de tensine | Phosphatase and tensin homolog |
| RTK | Récepteur à activité tyrosine kinase | Tyrosine kinase receptor |
| SERD | Régulateur sélectif du récepteur des œstrogènes | Selective estrogen receptor down-regulator |
| SERM | Modulateur sélectif des récepteurs aux œstrogènes | Selective estrogen receptor modulator |
| SSH1L | *Slingshot-1-like* | |
| TGF | *Transforming growth factor* | |

| | | |
|---|---|---|
| TN | Triple négatif | Triple negative |
| TNBC | Cancer du sein triple négatif | Triple negative breast cancer |
| TNM | Tumeur, ganglions, métastases | Tumor, node, metastasis |
| TP53 | | *Tumor protein 53* |
| UV | Ultra-violet | Ultraviolet |
| VEGF | Facteur de croissance de l’endothélium vasculaire | Vascular endothelial growth factor |

# Liste des figures

Figure 1 : Taux d'incidence du cancer du sein en fonction de l'âge chez la femme en France ..... 17
Figure 2: Anatomie de la glande mammaire ..... 20
Figure 3: Structure de l'alvéole mammaire ..... 21
Figure 4: Progression tumorale ..... 22
Figure 5: Types d'adénocarcinomes ..... 24
Figure 6: Classification TNM ..... 25
Figure 7 : Représentation schématique de la classification moléculaire des tumeurs du sein ..... 28
Figure 8 : Profil d'expression des récepteurs hormonaux et d'HER2 dans les différents sous-types moléculaires ..... 29
Figure 9 : Courbes de survie des différents sous-types moléculaires ..... 29
Figure 10 : Principales altérations génétiques en fonction du sous-type de cancer du sein ..... 30
Figure 11 : Choix des thérapies en fonction des sous-types de cancer ..... 33
Figure 12 : Mécanismes les plus courants de résistance aux traitements ..... 34
Figure 13 : Facteurs de risques du mélanome ..... 38
Figure 14 : Probabilité de survie en fonction du stade du mélanome ..... 41
Figure 15 : Changements moléculaires et cellulaires au cours de la progression du mélanome ..... 45
Figure 16: Principales voies de signalisation dérégulées dans le mélanome cutané 47
Figure 17 : Traitement standard du mélanome ..... 49
Figure 19 : Développement tumoral et switch de cadhérines ..... 53
Figure 20 : Structures des différentes sous-familles des PKC ..... 60
Figure 21: Structure moléculaire de PKD1 ..... 61
Figure 22: Les différents mécanismes d'activation de PKD1 ..... 64
Figure 23: Représentation schématique des voies de signalisation modulées par PKD1 ..... 67
Figure 24 : Structure et similarité de la famille des protéines kinase D ..... 77
Figure 25 : Expression de PRKD1 dans une multi cohorte de tumeurs ..... 145
Figure 26A : Expression de PRKD1 dans des mélanomes (Mélanome T) et des tissus sains de peau (Mélanome N) ..... 146
Figure 26B : Expression de PRKD1 dans des tissus tumoraux et sains de cerveau ..... 146
Figure 27 : Expression de PRKD1 dans différents PDXs ..... 147

Figure annexe 1 : Expression de PRKD1 en ARNm dans des lignées de cancer du sein en fonction de leur phénotype épithélial ou mésenchymateux .....157
Figure annexe 2 : Transition Epithelio-mesenchymateuse (TEM) score dans de nombreux tissus tumoraux.....158

# Liste des tableaux

Tableau 1: Classification des tumeurs en fonction du stade ..... 40
Tableau 2 : Classification TNM du mélanome ..... 42
Tableau 3 : Classification et pourcentage de survenue par altérations moléculaires 43

# Préambule

Ces dernières années, de nombreuses avancées ont vu le jour dans le domaine de la prise en charge médicale des cancers. Cependant, cette pathologie très hétérogène reste un problème de santé publique, notamment à cause de la résistance aux traitements actuellement disponibles.

Des travaux préliminaires de notre équipe ont montré que la protéine kinase D1 (PKD1) participe au développement et/ou au maintien du phénotype œstrogèno-dépendant dans le cancer du sein. En effet, dans les cellules de cancer du sein MCF-7 dépendantes en œstrogènes, notre équipe a montré que l'augmentation de l'expression de cette protéine leur permettait de croître indépendamment de l'ancrage et en l'absence d'estradiol. De plus, cette surexpression augmente la prolifération cellulaire ainsi que la réponse aux traitements avec du β-estradiol sur ces cellules comparées aux cellules contrôles. Nous avons également montré qu'au sein d'une cohorte de patientes atteintes d'un cancer du sein ERα$^{+}$ (estrogen receptor α$^{+}$) et traitées au tamoxifène, une forte expression de PKD1 en ARNm était associée à une moins bonne survie sans métastase. En parallèle de cette étude, notre équipe s'est intéressée au niveau d'expression de PKD1 dans des lignées de mélanome cutané. Ainsi, les résultats ont montré que PKD1 était plus exprimée dans les tumeurs de phénotype mésenchymateux que dans les tumeurs ayant un phénotype épithélial. Notre équipe a également prouvé que le Gö6976, un inhibiteur de la protéine kinase Cα (PKCα), de la protéine kinase Cβ (PKCβ) et de PKD1, pouvait *in vitro* réduire l'agressivité de cellules de mélanome métastatique ganglionnaire.

Au vu de ces résultats préliminaires, l'objectif de cette thèse se décompose en deux objectifs distincts. Le premier consiste à valider PKD1 comme facteur pronostique et cible thérapeutique dans le cancer du sein. Le second concerne l'analyse du rôle que pourrait avoir PKD1 dans le maintien du phénotype mésenchymateux du mélanome.

Cette thèse a été menée en co-direction entre l'unité de Pharmacogénomique à l'Institut Curie et le Laboratoire de Biologie et de Pharmacologie Appliquée (LBPA, UMR8113 du CNRS) de l'Ecole Normale Supérieure Paris-Saclay.

L'introduction du manuscrit de cette thèse présente les caractéristiques du cancer du

sein, celles du mélanome, le *switch* de cadhérines dans le développement tumoral et enfin la protéine kinase D1.

# Sommaire

CHAPITRE I INTRODUCTION ..... 15
Partie 1 : Cancer du sein ..... 16
1. Epidémiologie ..... 16
2. Facteurs de risque ..... 16
2.1 Facteurs de risque endogènes ..... 16
2.2 Facteurs de risque exogènes ..... 18
3. Anatomie de la glande mammaire ..... 19
4. Cancérogénèse mammaire ..... 21
5. Classification des tumeurs mammaires ..... 23
5.1 Classification histologique ..... 23
5.2 Classification TNM ..... 24
5.3 Classification par Grade SBR ..... 26
5.4 Classification immunohistochimique ..... 26
5.5 Classification moléculaire ..... 27
6. Traitements du cancer du sein ..... 30
6.1 Les traitements ..... 30
6.2 Les résistances aux traitements ..... 33
Partie 2 : Mélanome cutané ..... 36
1. Epidémiologie ..... 36
2. Facteurs de risque ..... 36
2.1 Risque exogène : exposition aux ultraviolets ..... 36
2.2 Risque endogène ..... 37
3. Différents types de mélanome ..... 38
3.1 Mélanome *in situ* ..... 38
3.2 Mélanome de Dubreuilh ou lentigo malin ..... 39
3.3 Mélanome superficiel extensif ..... 39
3.4 Mélanome nodulaire ..... 39
4. Classification des mélanomes ..... 39
4.1 Classification du mélanome en différents stades ..... 39
4.2 Classification TNM du mélanome ..... 41
4.3 Classification moléculaire du mélanome ..... 43
5. Progression du mélanome ..... 43

6. Physiopathologie moléculaire du mélanome ..... 45
7. Traitements actuels du mélanome ..... 47
Partie 3 : Le « *switch* » de cadhérines dans le développement tumoral ..... 50
1. Le « *switch* » des cadhérines : mécanisme indispensable à la TEM ..... 50
1.1 La TEM dans l'embryogénèse ..... 50
1.2 La TEM dans la cicatrisation ..... 50
1.3 La TEM dans les pathologies ..... 50
1.4 Processus moléculaires impliqués dans la TEM ..... 51
2. Les cadhérines ..... 52
3. Expression des cadhérines E et N au cours du développement tumoral ..... 53
4. Mécanismes de régulation de la progression tumorale par le « *switch* » des cadhérines ..... 54
Partie 4 : Protéine Kinase D1 ..... 58
1. PKD1, membre de la famille des PKC ..... 58
2. Organisation génique ..... 60
3. Structure protéique ..... 61
4. Activation ..... 62
5. Localisation subcellulaire ..... 65
6. Voies de signalisation régulées par PKD1 ..... 65
6.1 Voie de signalisation du BCR ..... 65
6.2 Voie de signalisation des MAP Kinases ..... 65
6.3 Voie de signalisation JNK ..... 66
6.4 Voie NF-κB ..... 66
6.5 Régulation de l'expression génique par les HDAC ..... 66
7. Fonctions ..... 67
7.1 Rôle dans la prolifération cellulaire et la synthèse d'ADN ..... 68
7.2 Rôle dans l'apoptose ..... 68
7.3 Rôles dans l'appareil de Golgi ..... 69
7.4 Rôle dans la réponse immunitaire ..... 69
7.5 Rôle dans l'adhérence et la migrationcellulaires ..... 69
7.6 Rôle dans l'angiogenèse ..... 70
8. PKD1 et cancer ..... 70
8.1 PKD1 dans le cancer du sein ..... 71
8.2 PKD1 dans les autres types de cancer ..... 72
9. Rôle de PKD1 dans d'autres pathologies ..... 73

9.1 Rôle de PKD1 dans les pathologies cardiaques ..... 73
9.2 Rôle de PKD1 dans l'inflammation..... 74
9.3 Rôle de PKD1 dans la dégénérescence neuronale ..... 75
10. Similarité avec les autres membres de la famille des PKD : PKD2 et PKD3 75
11. Inhibiteurs de PKD1 ..... 77
CHAPITRE II OBJECTIFS..... 78
CHAPITRE III RESULTATS ..... 82
PKD1 et mélanome..... 83
PKD1 et cancer du sein .....112
Expression de PKD1 au niveau de différents types de cancer.....143
CHAPITRE IV DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES .....148
ANNEXES .....156
BIBLIOGRAPHIE.....159

# CHAPITRE I
# INTRODUCTION

# Partie 1 : Cancer du sein

## 1. Epidémiologie

Le cancer du sein est le cancer qui est le plus fréquent chez la femme. Son incidence a présenté une forte augmentation entre les années 1980 et 2005 ; elle tend actuellement à se stabiliser. Ainsi, on note 54 000 nouveaux cas et pas moins de 11 900 décès par an pour le cancer du sein chez la femme en France en 2015. Bien que l'incidence ait fortement augmenté, le taux de mortalité quant à lui n'a pas connu de grande variation. Cela s'explique à la fois grâce au dépistage de plus en plus précoce mais aussi à une meilleure prise en charge des patientes (« La situation du cancer en France en 2015 » - INCa avril 2016).

## 2. Facteurs de risque

Le cancer du sein est multifactoriel. De nombreux facteurs de risque ont été mis en évidence pouvant prédisposer à un développement de ce cancer. On distingue ainsi les facteurs de risque exogènes qui sont liés à l'environnement et aux modes de vie et les facteurs de risque endogènes qui eux sont liés à l'individu lui-même (âge, sexe, antécédents familiaux, …).

### 2.1 Facteurs de risque endogènes

- **Age** : L'âge de la femme est un facteur de risque non négligeable; en effet, de nombreuses études épidémiologiques ont montré que l'incidence était augmentée avec l'âge de la patiente (Figure 1).

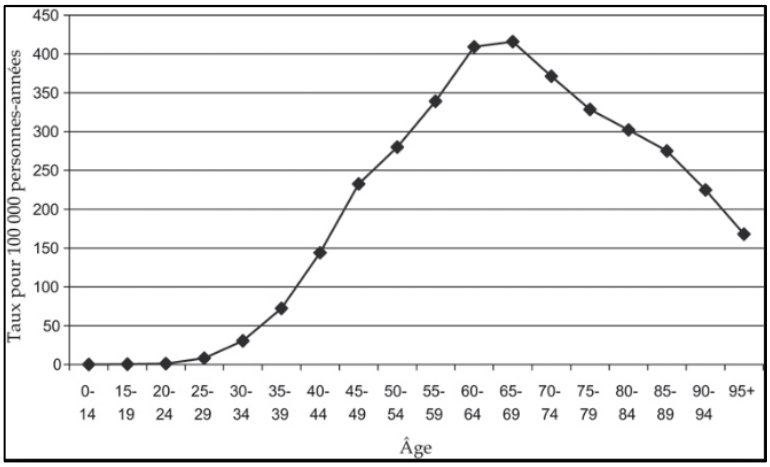



*Figure 1 : Taux d'incidence du cancer du sein en fonction de l'âge chez la femme en France* (Francim, Hospices civils de Lyon, Institut national du cancer).

*Le taux d'incidence du cancer du sein augmente à partir de 40 ans pour atteindre un pic à 60-69 ans.*

- **Durée de vie génitale et âge de la première grossesse** : L'apparition précoce des premiers cycles menstruels ainsi que la survenue tardive de la ménopause sont des facteurs de risque (Brinton et al., 1988). De plus, l'apparition tardive d'une première grossesse ou un délai trop court entre deux grossesses peuvent également être des facteurs de risque importants dans la survenue du cancer du sein (Lesieur et al., 2008).
- **Antécédents familiaux** : Les antécédents familiaux vis-à-vis d'un cancer du sein augmentent de manière importante le risque de survenue d'un cancer du sein.
- **Prédisposition génétique** : 5 à 10% des cancers du sein sont la conséquence d'anomalies génétiques. Les principales mutations germinales inactivatrices observées sont celles de *BRCA1* et *BRCA2*, deux gènes codant pour des protéines impliquées dans la réparation des cassures double-brin de l'ADN (Hrgović et al., 1995).

  60 à 65 % des patientes porteuses d'une mutation *BRCA1* et 45 à 55 % de celles porteuses d'une mutation *BRCA2* sont susceptibles de développer un cancer du sein. Dans la population générale, les femmes porteuses de mutations *BRCA1* ou *BRCA2* sont rares (0,11% et 0,12%, respectivement).

6 % des femmes âgées de moins de 50 ans et présentant un cancer du sein sont porteuses d'une mutation germinale de l'un de ces deux gènes, alors que seulement 1 à 1.5% des femmes âgées de plus de 50 ans en sont affectées.

Les autres gènes dont les mutations sont transmises avec une forte incidence sont les gènes *TP53* (syndrome de Li-Fraumeni) et *PTEN* (syndrome tumoral hamartomateux).

D'autres gènes de susceptibilité plus rares, tels que *CHEK2*, *ATM*, *PALB2*, *BRIP1*, *CDH1*, *RAD50*, *RAD51C* et *RAD51D*, confèrent aux porteuses de ces mutations un risque faible à modéré de survenue d'un cancer du sein. Tous ces gènes sont impliqués dans les mécanismes de réparation de l'ADN (Kamińska et al., 2015).

- **Obésité :** De nombreuses études ont également montré que l'obésité était un facteur de risque pour la survenue d'un cancer du sein. Cela serait dû à l'augmentation, chez les personnes atteintes d'obésité, des concentrations hormonales et notamment de l'œstrogène. Cette augmentation d'œstrogènes pourrait, *via* l'activation de voies de signalisation pro-oncogéniques, favoriser le risque d'apparition d'un cancer du sein (Cleary and Grossmann, 2009; Kamińska et al., 2015).

## 2.2 Facteurs de risque exogènes

- **Traitement hormonal** : La relation entre la prise de contraceptifs hormonaux et la survenue d'un cancer du sein reste encore largement controversée. En effet, des études ont montré que la prise de traitements contraceptifs hormonaux augmentait de 24% le risque de survenue d'un cancer du sein comparé à des femmes n'ayant jamais pris de contraceptifs hormonaux. Mais d'autres travaux n'ont pas trouvé de différences significatives entre les femmes ayant ou n'ayant pas reçu de traitement hormonal contraceptif (Ban and Godellas, 2014; Westhoff, 1999). Ces résultats contradictoires peuvent s'expliquer par les différents contraceptifs hormonaux étudiés lors de ces analyses.
- **Consommation d'alcool** : On considère actuellement que la consommation d'alcool est le deuxième facteur de risque de survenue d'un cancer aujourd'hui dans le monde. Dans le cas du cancer du sein, on considère que 17% des cas

seraient dus à la consommation d'alcool (Key and Reeves, 2016) (e-cancer 2016).

- **Radiations ionisantes** : De nombreuses études ont prouvé que l'exposition unique ou répétée à des radiations ionisantes au niveau du tissu mammaire augmente le risque de cancer du sein du fait de l'altération de l'ADN par les rayons ionisants (Boice, 1996; Key et al., 2001).

## 3. Anatomie de la glande mammaire

La glande mammaire a pour principale fonction de produire et d'excréter le lait. C'est une glande exocrine qui est localisée au niveau du sein, reposant sur les muscles pectoraux. Elle est composée de 10 à 20 lobes qui sont eux-mêmes entourés et séparés entre eux par du tissu conjonctif et adipeux. Chacun de ces lobes est constitué de lobules et est drainé par un canal galactophore qui aboutit au mamelon. Chaque lobule est constitué d'alvéoles (ou acini) regroupées de façon dense autour d'un canal alvéolaire. Plusieurs canaux alvéolaires se réunissent pour former un canal lobulaire. Enfin, un canal galactophore est le regroupement de plusieurs canaux lobulaires (Figure 2) (Dadoune, 1990).

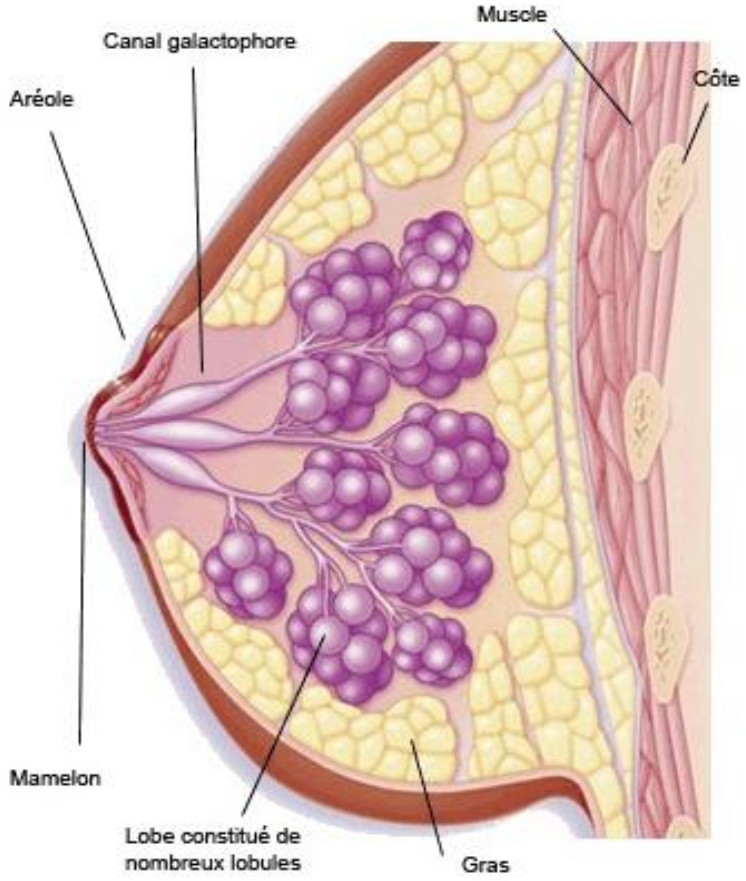



*Figure 2: Anatomie de la glande mammaire*, d'après https://www.ligue-cancer.net/localisation/sein

La glande mammaire est constituée de deux compartiments tissulaires, l'épithélium et le stroma. L'épithélium mammaire est constitué de deux couches de cellules : les cellules épithéliales luminales ainsi que les cellules myoépithéliales. L'épithélium, et plus précisément les tubulo-alvéoles, sont responsables de la production du lait et également de sa sécrétion à l'aide de la contraction de cellules myoépithéliales (qui entourent les tubulo-alvéoles) sous l'action de l'ocytocine. Ces cellules myoépithéliales reposent sur une membrane basale.

Le stroma (ou mésenchyme) correspond, quant à lui, à la matrice extracellulaire ainsi qu'à une variété d'autres cellules telles que les myofibroblastes, les fibroblastes, les cellules endothéliales ainsi que les leucocytes infiltrants. La fonction principale du stroma est de soutenir l'organe et de réguler la fonction de l'épithélium mammaire via des interactions paracrines, physiques et hormonales (Figure 3) (Polyak and Kalluri, 2010).

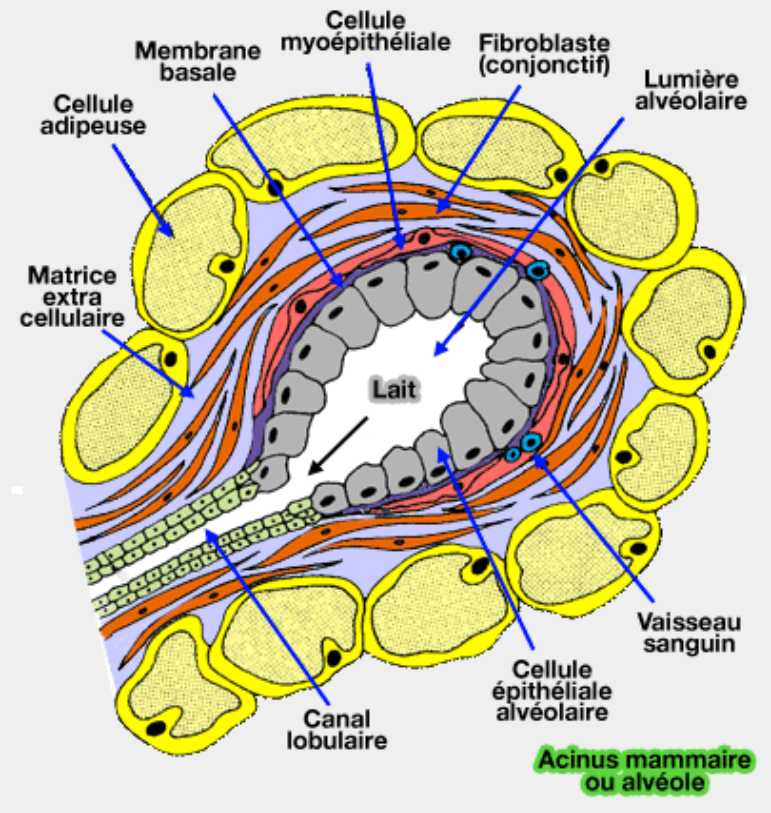



*Figure 3: Structure de l'alvéole mammaire* (d'après Delouis) http://www.vetopsy.fr/reproduction/lactation/glandes-mammaires-histologie.php

La glande mammaire est un organe qui est en constante évolution tout au long de la vie de la femme, sous l'action des hormones durant la puberté, les cycles menstruels et la ménopause.

## 4. Cancérogénèse mammaire

La glande mammaire est un organe qui est très sujet aux transformations cancéreuses du fait de sa constante évolution et du grand nombre de cellules en division. La carcinogenèse mammaire, comme dans de nombreux autres tissus, se déroule selon quatre principales étapes : l'initiation, la promotion, la progression et enfin l'invasion métastatique.

A la suite d'altérations génétiques héréditaires ou non, les cellules épithéliales vont se diviser et proliférer de manière non contrôlée. Cette prolifération va impliquer

la formation de couches cellulaires anormales au niveau du conduit ou du lobule conduisant à une hyperplasie ductale atypique (ADH). A ce stade, cette lésion est encore pré-maligne. Cependant, elle peut ensuite être à l'origine du carcinome canalaire ou lobulaire *in situ* qui pourra à son tour évoluer vers un cancer invasif (après franchissement de la lame basale).

Au cours de ce processus à plusieurs étapes, le contrôle de la prolifération, de la survie, de la différenciation et de la migration cellulaires est dérégulé. Les interactions entre les cellules tumorales et les cellules du stroma deviennent aberrantes, facilitant ainsi la progression de la maladie.

Pour former des métastases, les cellules doivent envahir la lame basale, entrer dans le système vasculaire ou lymphatique (intravasation), survivre en l'absence d'adhérence, sortir du système vasculaire (extravasation), pour finalement établir une nouvelle tumeur au sein d'un nouveau microenvironnement. (Figure 4).

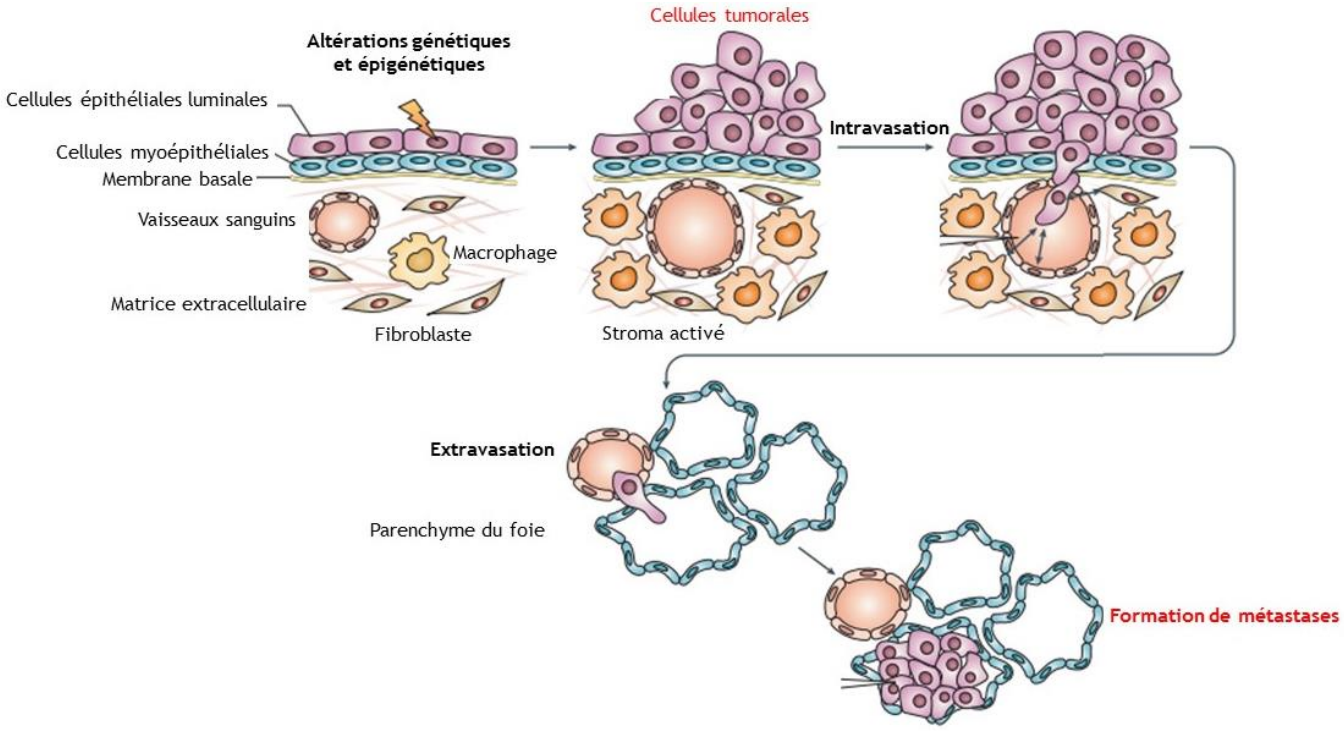



*Figure 4: Progression tumorale* (Vargo-Gogola and Rosen, 2007)

*La progression tumorale se fait en deux étapes principales : 1) une prolifération anormale des cellules épithéliales sans franchissement de la lame basale ; 2) un envahissement des tissus après franchissement de la lame basale qui se traduit par une migration à travers les vaisseaux sanguins ou lymphatiques afin de former des métastases à distance.*

Le cancer du sein est un cancer très hétérogène. Par conséquent, de nombreuses classifications ont été réalisées afin de mieux comprendre et traiter les différents types de tumeurs mammaires.

# 5. Classification des tumeurs mammaires

## 5.1 Classification histologique

Les adénocarcinomes constituent 98% des tumeurs malignes du sein. On en distingue deux types: les adénocarcinomes *in situ* (non infiltrants) et les adénocarcinomes invasifs (infiltrants).

### a) Les adénocarcinomes *in situ*

Les adénocarcinomes *in situ* représentent 15% des adénocarcinomes mammaires et sont caractérisés par une absence de franchissement de la lame basale par les cellules cancéreuses. Le diagnostic précoce de ces tumeurs est nécessaire car il peut être pris en charge très facilement et est de bon pronostic. Dans le cas contraire, on peut observer une rupture de la lame basale et ainsi une transformation de l'adénocarcinome *in situ* en un adénocarcinome infiltrant.

L'adénocarcinome *in situ* peut-être divisé en deux sous-groupes (Figure 5):

- Les adénocarcinomes intracanalaires *in situ* : prolifération anormale des cellules épithéliales au niveau de la lumière du canal galactophore.
- les adénocarcinomes intralobulaires *in situ* : prolifération anormale des cellules épithéliales au niveau des acini.

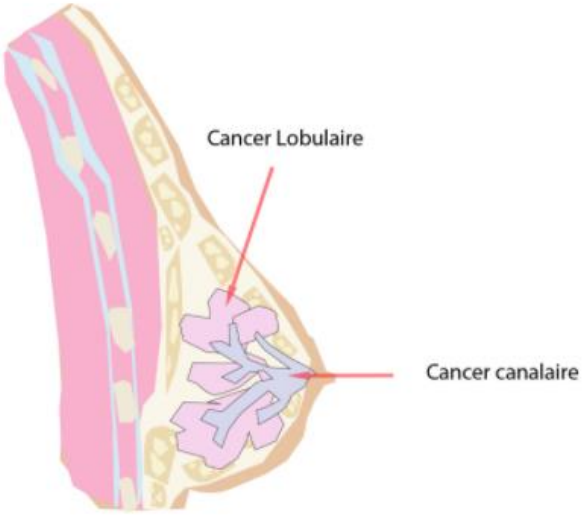



*Figure 5: Types d'adénocarcinomes*, d'après http://www.gynecologue-vaud.ch

**b) Les adénocarcinomes invasifs**

Les adénocarcinomes invasifs représentent la majorité des adénocarcinomes mammaires (75 à 85% des cas environ). Ils sont caractérisés par le franchissement de la lame basale des canaux ou des lobules par les cellules malignes. Il en résulte ainsi une invasion des tissus mammaires avoisinants locaux mais aussi une formation de métastases à distance, le plus souvent au niveau ganglionnaire, osseux, cérébral ou viscéral (poumon, foie…).

De façon analogue aux adénocarcinomes *in situ*, on peut classer les adénocarcinomes invasifs en deux sous-catégories:

- Adénocarcinome canalaire infiltrant, il est de loin le plus fréquent des adénocarcinomes invasifs
- Adénocarcinome lobulaire infiltrant

## 5.2 Classification TNM

La classification TNM (*Tumor, Node, Metastasis*) est une classification internationale des cancers qui a plus de 50 ans et est toujours utilisée par les cliniciens pour catégoriser les tumeurs mammaires. Cette classification s'appuie sur l'extension anatomique de la tumeur et permet de classer les tumeurs en différents stades selon trois mesures. La classification TNM utilisée actuellement en clinique a

été révisée plusieurs fois, la 7ème et dernière révision a été publiée par l'UICC (Union Internationale Contre le Cancer) en 2010.

Le (T) correspond à la taille de la tumeur sur le site primitif, le (N) correspond à l'extension locorégionale (au niveau ganglionnaire) et enfin le (M) correspond à l'extension métastatique de la tumeur (Figure 6).

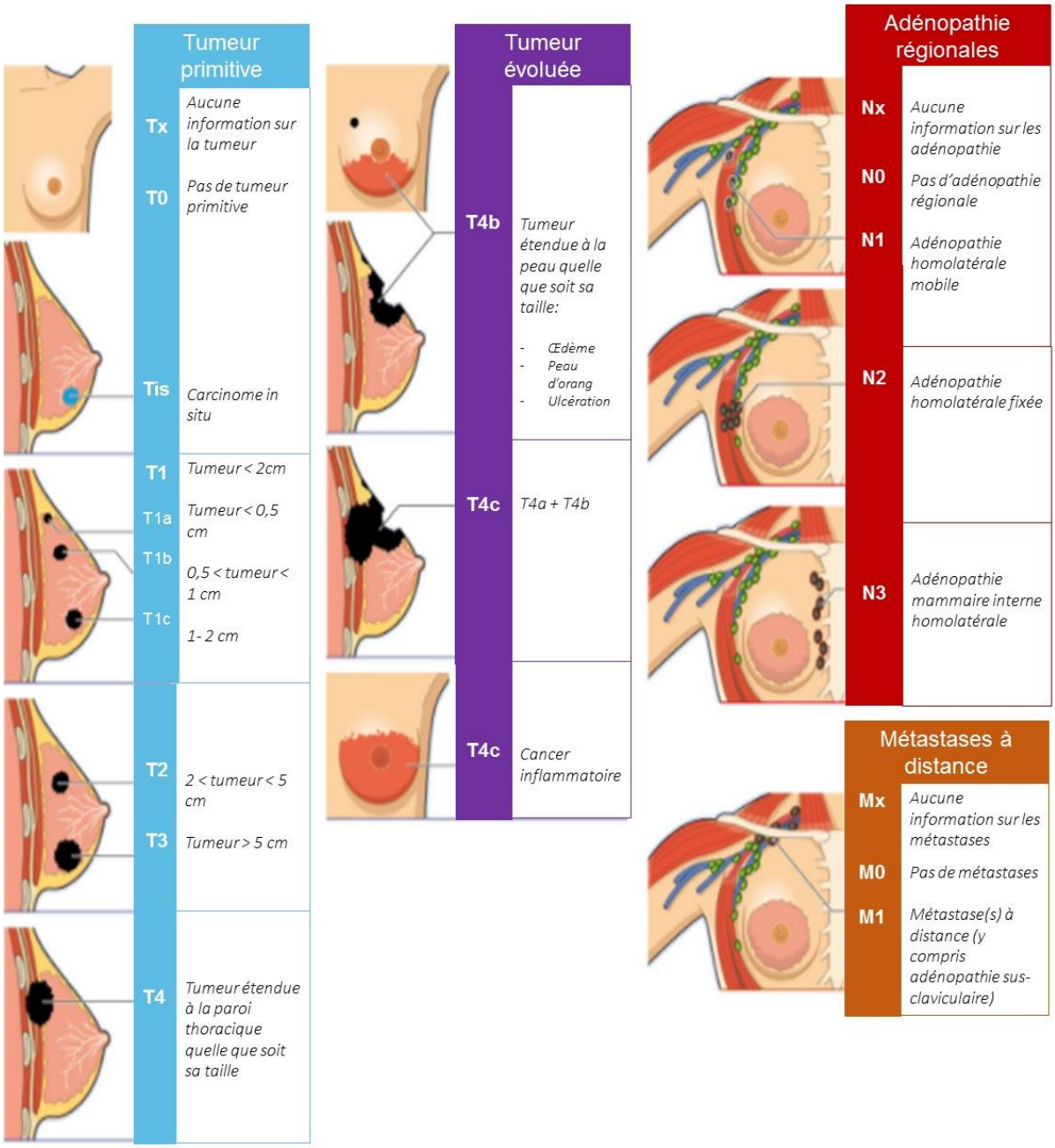



*Figure 6: Classification TNM* (Le livre de sémiologie médicale - Université Paris Diderot/Paris 7, 2012)

## 5.3 Classification par Grade SBR

A la suite de l'examen histologique de la tumeur, on peut la classer selon un grade histopronostique appelé SBR (Scarff-Bloom-Richardson). Lors de cette classification, on s'intéresse à trois paramètres morphologiques : l'architecture tumorale, la forme du noyau ainsi que le nombre de cellules en mitose. Pour chacun de ces paramètres, un score de 1 à 3 est attribué. La somme des 3 scores permet de classer les tumeurs selon trois grades.

Grade 1 : Cancer à croissance lente avec de faibles risques de propagation (score de 3 à 5) ;

Grade 2 : Cancer à évolution moyenne (score de 6 à 7) ;

Grade 3 : Cancer à évolution rapide avec des risques élevés de propagation (score de 8 à 9) ;

On peut également parler de « bas grade » pour les tumeurs les moins agressives et de « haut grade » pour les tumeurs les plus agressives.

## 5.4 Classification immunohistochimique

La classification des tumeurs mammaires peut également se faire de manière immunohistochimique, par l'étude de l'expression de trois récepteurs : le récepteur aux œstrogènes (ER), le récepteur à la progestérone (PR) ainsi que le récepteur de facteurs de croissance épidermiques HER2.

Le seuil de positivité en immunohistochimie de l'expression des deux récepteurs hormonaux ER et PR est défini par une expression de plus de 10% au niveau des cellules tumorales et correspond à un score de +1.

La surexpression d'HER2 par les cellules tumorales est, quant à elle, caractérisée par un score de +3.

La détection de l'expression de HER2 et de deux des récepteurs hormonaux nous permet ainsi de classer les tumeurs en trois groupes :

- Récepteurs hormonaux positifs (ER ou PR > +1)
- HER2 surexprimé (HER2 ≥ +3)

- Triple négatif (ER et PR ≤ +1 et HER2 < +3)

Nous verrons par la suite que cette classification est indispensable pour le choix du traitement de ces tumeurs.

## 5.5 Classification moléculaire

La classification immunohistochimique, bien que plus précise, ne permet pas un classement homogène des tumeurs du sein. En effet, les tumeurs appartenant à chacun des trois sous-groupes décrits précédents répondent de manière variable aux traitements. Afin de pallier à cela, et grâce au développement de techniques d'analyse moléculaire à haut débit, une nouvelle classification des tumeurs a été établie.

Cette nouvelle classification consiste à analyser l'expression des récepteurs ER, PR et HER2 mais également l'expression d'un panel de gènes. Ainsi, en 2000, Pérou et ses collaborateurs ont établi une classification en cinq sous-types sur la base d'une signature intrinsèque correspondant à l'expression de 534 gènes. Ces cinq sous-types sont les suivants : Luminal A, Luminal B, HER2+ (ou ERBB2+), Basal-like et Normal-like (Perou et al., 2000) (Figure 7 et Figure 8).

Le sous-type RH+ décrit précédemment se retrouve divisé en deux sous-groupes : les tumeurs de type Luminal A et de type Luminal B. Les deux sous-types luminaux présentent un profil d'expression génique proche de celui des cellules épithéliales mammaires.

Ainsi, le sous-type Luminal A représente les tumeurs exprimant au moins un récepteur hormonal (le plus généralement ER) et ne surexprimant pas HER2/ERBB2. Ces tumeurs expriment faiblement les gènes liés à la prolifération cellulaire et sont généralement de bon pronostic. Les tumeurs de type Luminal B expriment également au moins un récepteur hormonal mais surexpriment HER2/ERBB2. Ces tumeurs expriment de manière plus importante les gènes liés à la prolifération cellulaire, ce qui se traduit par un moins bon pronostic (Figure 9).

Les sous-types RH- vont être subdivisés en trois sous-groupes dans cette classification : Normal-like, HER2+ et Basal-like.

Les tumeurs de type Normal-like sont caractérisées par un profil d'expression génique proche de celui des cellules épithéliales basales et des adipocytes. Le sous-type HER2+ correspond à la surexpression du gène *HER2/ERBB2* ainsi qu'à une forte expression de gènes liés à la prolifération cellulaire.

Enfin, le sous-type Basal-like se caractérise par un profil d'expression génique proche de celui des cellules myoépithéliales/basales normales et également par une forte expression de gènes liés à la prolifération cellulaire. Il est, du fait des récentes avancées dans le traitement des tumeurs HER2+, le sous-type ayant le plus mauvais pronostic (Figure 9).

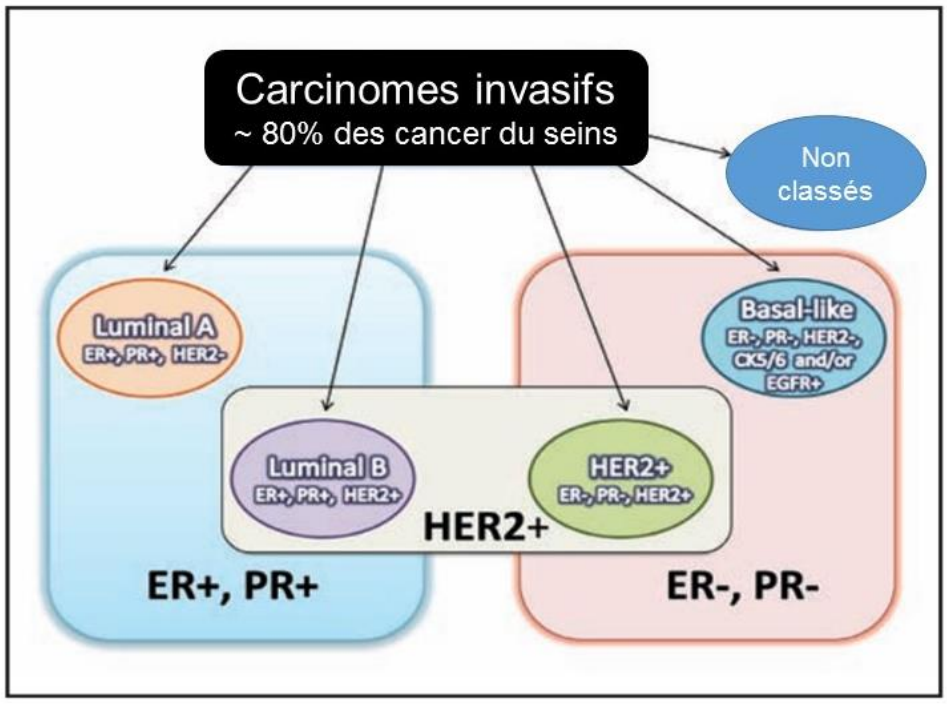



*Figure 7 : Représentation schématique de la classification moléculaire des tumeurs du sein* (d'après Sandhu et al., 2010)

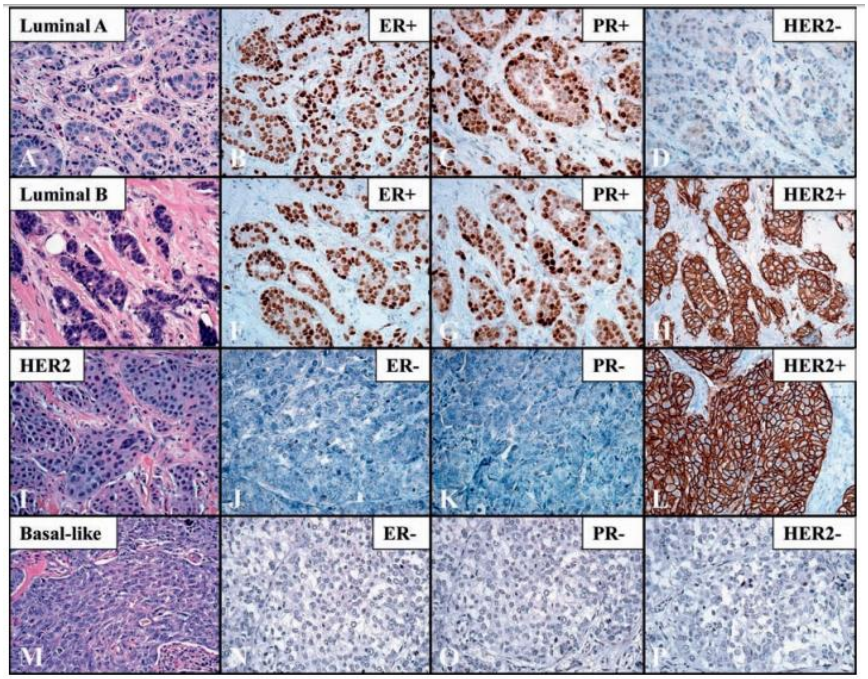



*Figure 8 : Profil d'expression des récepteurs hormonaux et d'HER2 dans les différents sous-types moléculaires* (Sandhu et al., 2010)

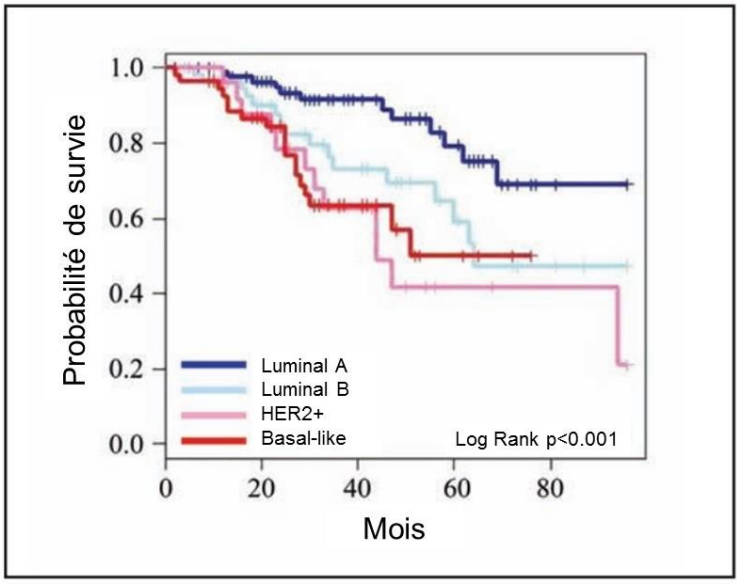



*Figure 9 : Courbes de survie des différents sous-types moléculaires* (d'après Sandhu et al., 2010)

*La survie des patientes ayant une tumeur de type Luminal A ou B est meilleure que celle des patientes atteintes d'une tumeur HER2+ ou Basal-like. La survie du sous-groupe HER2+ (aussi appelé ERBB2+) s'est nettement améliorée ces dernières années du fait du développement de thérapies anti-HER2 (Trastuzumab).*

Il est intéressant de noter que les profils d'altérations génétiques de ces différents sous-types moléculaires ne sont pas les mêmes, confirmant cette classification et son intérêt pour les prises en charge thérapeutiques (Figure 10).

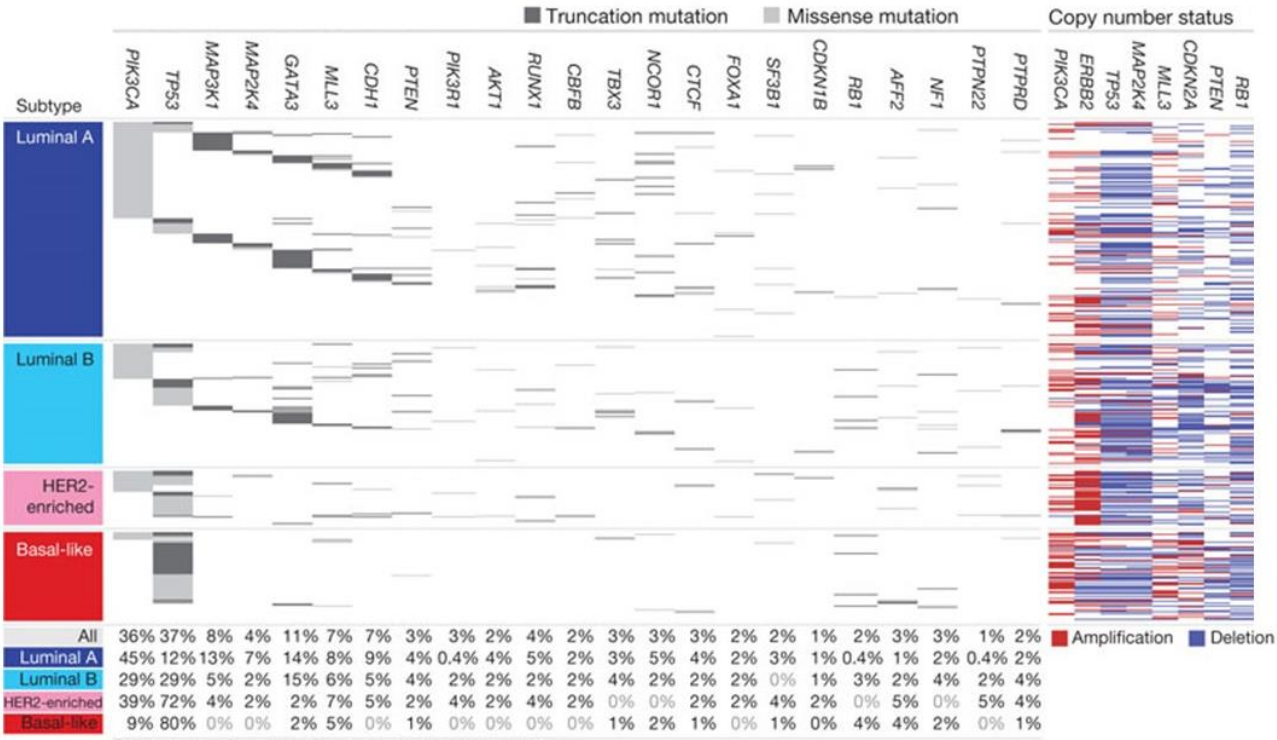



*Figure 10 : Principales altérations génétiques en fonction du sous-type de cancer du sein* (The Cancer Genome Atlas Network, 2012)

*Les profils d'altérations génétiques sont différents en fonction du sous-type de cancer du sein. Les cancers du sein Luminal A présentent plus d'altérations de la voie de signalisation PI3K que les autres sous-types, tandis que les Basal-like et HER2 présentent plus fréquemment une délétion de TP53.*

# 6. Traitements du cancer du sein

## 6.1 Les traitements

Les tumeurs de sein sont très hétérogènes ; de ce fait, les traitements sont nombreux et adaptables en fonction du sous-type moléculaire mais aussi du niveau d'invasion de la tumeur.

Le traitement des tumeurs *in situ* ayant un bas grade se fait principalement par

chirurgie et/ou radiothérapie. On appelle ces traitements des thérapies locales car elles vont cibler uniquement l'organe du sein.

Pour le traitement des tumeurs de plus haut grade, on utilise des thérapies systémiques. Les cliniciens ont ainsi à leur disposition des chimiothérapies, de l'hormonothérapie, ainsi que des thérapies ciblées. La chimiothérapie peut être donnée avant la chirurgie (néo-adjuvante) ou après la chirurgie (adjuvante) mais également pour traiter les tumeurs métastatiques. Différents types de chimiothérapie s'offrent aux cliniciens : les anthracyclines telles que la doxorubicine et l'épirubicine ou bien les taxanes tels que le paclitaxel (taxol) ou le docetaxel (taxotere). Les cliniciens peuvent également choisir de donner le 5-fluorouracil (5-FU) ou bien une molécule de la famille des cyclophosphamides et ils peuvent également prescrire des dérivés du platine : carboplatine (paraplatine) (American Cancer Society, 2016). Le choix de la chimiothérapie est dépendant du clinicien, de l'appréciation de la tumeur et des traitements précédents.

Dans le cas de tumeurs de type ER+, les patientes vont recevoir de l'hormonothérapie qui va bloquer la voie de signalisation des œstrogènes. Pour cela, il existe deux types de molécules. Les SERM (Selective Estrogen Receptor Modulators) vont fonctionner comme des agonistes du récepteur aux œstrogènes dans certains tissus ou bien comme des antagonistes dans d'autres tissus, du fait de leur structure analogue avec les œstrogènes (Riggs and Hartmann, 2003). Le tamoxifène et le raloxifène sont deux molécules de la classe des SERM.
Les SERD (*Selective Estrogen Receptor Down-regulators*) sont des antagonistes purs (dépourvus d'activité agoniste) et vont favoriser la dégradation du récepteur aux œstrogènes (Robertson, 2001). Dans la classe des SERD, on trouve l'ICI 182.780, aussi appelé fulvestrant. Les molécules telles que les inhibiteurs d'aromatase (AIs) vont quant à elles diminuer le taux d'œstrogènes circulant dans l'organisme, ce qui induit alors une diminution de l'activation de la voie de signalisation des œstrogènes (American Cancer Society, 2016).

Pour les tumeurs du sein non hormono-dépendantes (RH-), de nombreuses thérapies ciblées se sont développées, notamment pour traiter les tumeurs du sous-groupe HER2+. Le trastuzumab (herceptin), le pertuzumab (perjeta), le TDM-1 sont

des anticorps monoclonaux qui ciblent le récepteur HER2. Le lapatinib (tyverb) est un inhibiteur de la tyrosine kinase HER2 et de la tyrosine kinase EGFR1 (Epidermal Growth Factor Receptor 1). Cette molécule va alors inhiber les voies de transduction activées par les récepteurs HER.

Il existe également des thérapies ciblées agissant en tant qu'inhibiteurs de CDK4/6 (Cyclin Dependent Kinase 4/6): le palbociclib (Ibrance®) ou le ribociclib (Kisqali®) qui sont généralement prescrits dans le cas de tumeurs du sein hormono-dépendantes.

L'everolimus (Afinitor®) est une thérapie ciblée actuellement indiquée dans les tumeurs ER+/HER2- agissant en bloquant la voie de signalisation AKT/Pi3K /mTOR (American Cancer society). Les tumeurs ayant une mutation des gènes *BRCA1* ou *BRCA2* peuvent recevoir des inhibiteurs de PARP (Poly(ADP-ribose) polymérase) (Higgins and Baselga, 2011) (Figure 11).

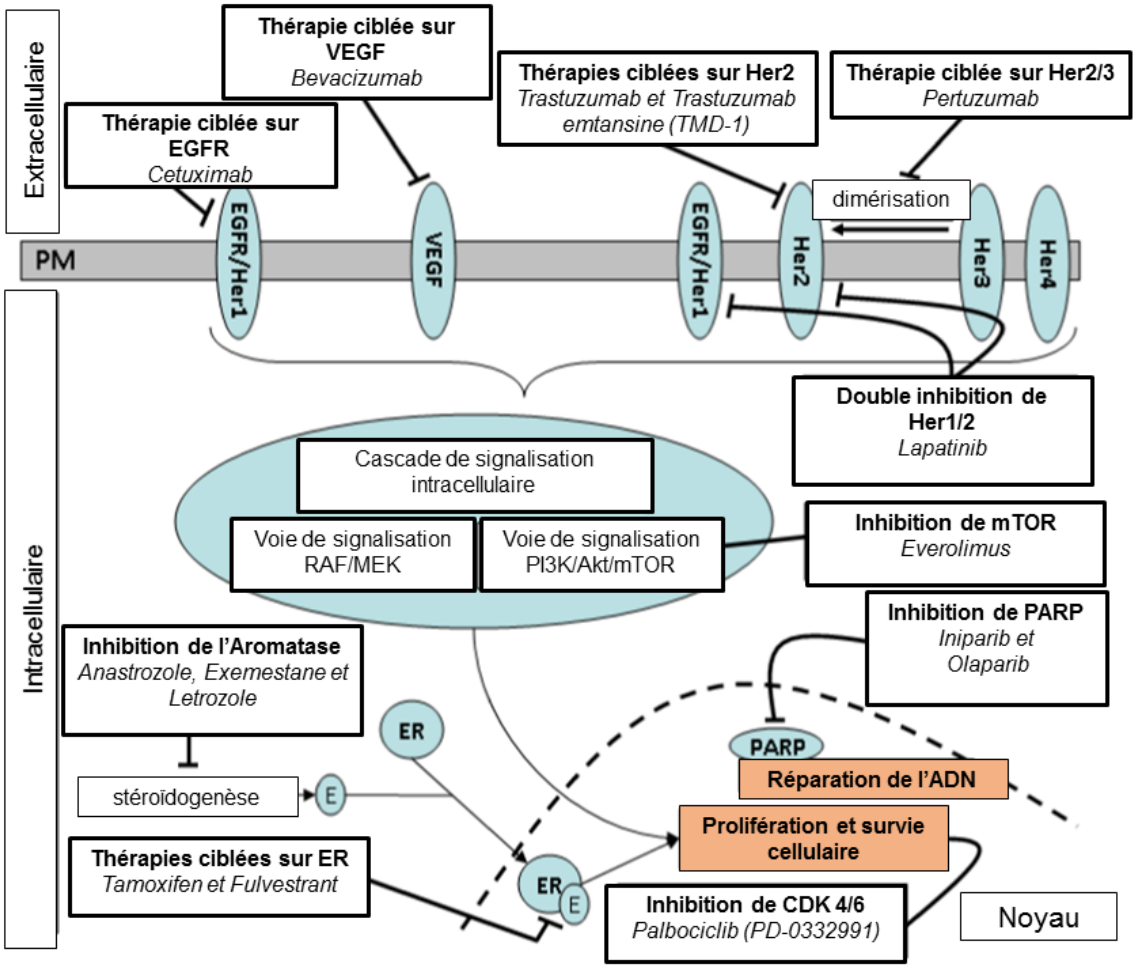



*Figure 11 : Choix des thérapies en fonction des sous-types de cancer du sein* (Sharp and Harper-Wynne, 2014)

## 6.2 Les résistances aux traitements

Malgré des avancées intéressantes dans le traitement du cancer du sein et notamment dans la prise en charge des sous-types HER2+ et HR+, on remarque une importante résistance aux traitements actuels. Cette résistance peut être induite par différents mécanismes moléculaires (Figure 12).

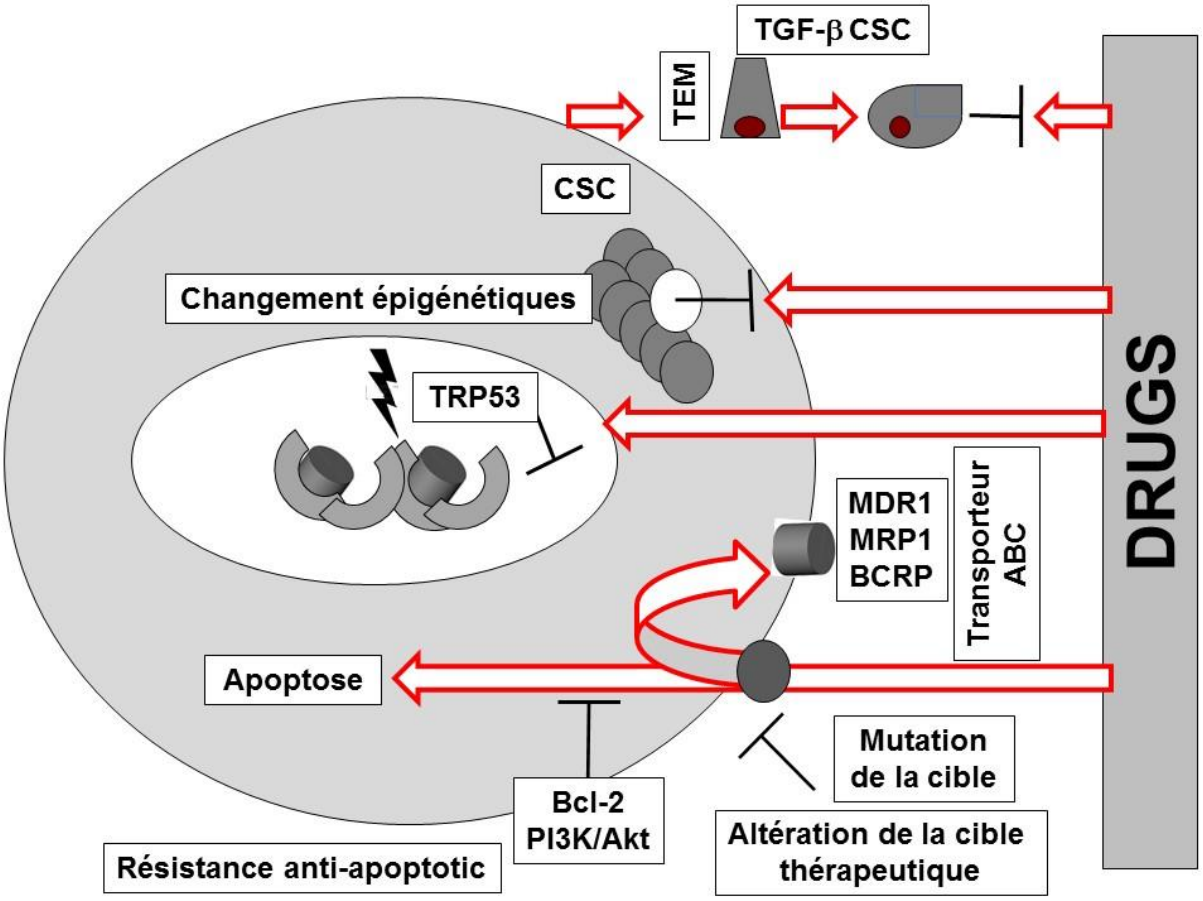



*Figure 12 : Mécanismes les plus courants de résistance aux traitements* (d'après Calaf et al., 2015)

*a) **Transition épithélio-mésenchymateuse** (EMT). Les cellules épithéliales vont perdre leur polarité et les jonctions d'adhérence avec les cellules avoisinantes. Elles vont également acquérir une morphologie fibroblastoïde qui va augmenter la motilité et l'invasivité cellulaire. On observe également une modification associée à la voie de signalisation du TGFβ. Les cellules cancéreuses présentant des caractéristiques EMT et CSC (cellule souche cancéreuse) peuvent acquérir une résistance aux traitements via l'EMT ou via l'expression de transporteurs de la famille ABC (ATP binding cassette).*

*b) **Changements épigénétiques**. La suppression d'expression de gènes suppresseurs de tumeurs tels que TP53 via des modifications de type épigénétique (méthylation de l'ADN) peut influencer le microenvironnement tumoral et favoriser la progression du cancer du sein vers un phénotype métastatique très agressif. Des modifications épigénétiques du promoteur du gène MDR1 (Multidrug resistance*

*protein 1), se traduisant par une augmentation de l'expression de la protéine MDR1 va également induire des résistances aux traitements.*

*c) **miARNs**. Les miARNs sont des régulateurs clés dans la résistance aux traitements du cancer du sein via la régulation positive des transporteurs ABC ou de protéines anti-apoptotiques mais également via la régulation de l'EMT et l'acquisition d'un phénotype CSC. Les miARNs pourraient être des biomarqueurs potentiels de réponse à la thérapie.*

*d) **Transporteurs ABC**. Les pompes à efflux dépendantes de l'ATP permettent de réduire l'accumulation intracellulaire de divers médicaments. Les plus connues sont la protéine P-gp ou MDR1 (Multidrug resistance protein 1), la protéine MRP1 (Multidrug resistance-associated protein 1) et la protéine BCRP (Breast Cancer Resistance Protein). Il a été montré qu'une surexpression de ces protéines diminue la présence intracellulaire de médicaments et induit donc une résistance aux traitements.*

*e) **Mutation au niveau de la cible thérapeutique**. La résistance peut également être induite en raison de mutations ou de modifications d'expression de la cible thérapeutique. En effet, une mutation d'ESR1 (Estrogen receptor 1) peut induire une résistance aux traitements anti-hormonaux. De plus, une mutation activant la voie de signalisation MAPK induit une résistance aux anti-EGFR.*

*f) **Résistance anti-apoptotique**. Il a été montré qu'une dérégulation de l'expression de la protéine anti-apoptotique Bcl-2 (B-cell lymphoma 2) pouvait être associée à la résistance*.

Du fait de l'importance de la résistance aux traitements actuels et de la grande hétérogénéité des tumeurs du sein, il est nécessaire de découvrir de nouvelles cibles thérapeutiques pour le traitement de ce cancer.

# Partie 2 : Mélanome cutané

## 1. Epidémiologie

Le mélanome cutané se situe au neuvième rang des cancers en terme d'incidence (Ali et al., 2013; Rastrelli et al., 2014; Arrangoiz et al., 2016). En effet, en France et pour l'année 2011, 9 780 nouveaux cas ont été diagnostiqués, dont 25% au stade avancé (III et IV).

Dans le monde, l'incidence du mélanome a augmenté de 10% durant les cinquante dernières années. En France, le nombre de nouveaux cas a été multiplié par trois durant les vingt-cinq dernières années. Cela pourrait s'expliquer en raison de l'évolution des habitudes d'exposition au soleil au cours des dernières décennies. Le taux de mortalité lié au mélanome reste important avec 1620 décès en 2011 (INCA, 2013). De plus, le taux de survie à 5 ans pour les personnes atteintes d'un mélanome métastatique n'est que de 14% (Arlo J. and Mihm, 2006).

## 2. Facteurs de risque

Le mélanome cutané, comme de nombreux autres cancers, est un cancer multifactoriel dont les facteurs de risque peuvent être liés à l'environnement, aux modes de vie mais aussi à des facteurs de risques individuels.

### 2.1 Risque exogène : exposition aux ultraviolets

Le risque carcinogène dû à une exposition aux rayons ultra-violet (UV) naturels et artificiels est hautement important et se cumule. Ce risque est déterminé par la dose totale reçue, mais il dépend également de facteurs individuels.

On peut noter que chez les personnes âgées de 40 à 65 ans, les mélanomes sont plus régulièrement retrouvés à des endroits tels que le tronc et les membres. Cette particularité est le reflet d'une exposition plus ou moins volontaire aux rayons UV. Cependant, chez les personnes plus âgées, les mélanomes se situent le plus souvent sur le visage et le cou, traduisant une exposition chronique au soleil (Anderson et al., 2009; Whiteman et al., 2001; Ali et al., 2013; Rastrelli et al., 2014).

Il a également été démontré qu'une forte exposition au soleil durant l'enfance augmente le risque de survenue d'un mélanome (Elwood and Jopson, 1997; Whiteman et al., 2001).

De plus, selon une autre étude, en France, l'exposition aux UV artificiels pourrait être à l'origine de près de 347 nouveaux cas annuels (Boniol et al., 2012).

Au total, on estime que l'exposition aux rayons UV (naturels ou artificiels) est à l'origine de plus de 65% des mélanomes cutanés.

Ce risque de l'exposition aux UV dans la survenue d'un mélanome viendrait, selon les études, de l'accumulation d'altérations génétiques au niveau des mélanocytes. En effet, les rayons UV engendreraient l'accumulation de dommages dans l'ADN des mélanocytes, qui ne seraient plus en mesure de les réparer ; des mutations génétiques pouvant ainsi apparaître (Arlo J. and Mihm, 2006).

## 2.2 Risque endogène

Il a été clairement démontré que l'exposition aux rayons UV n'était pas le seul facteur déterminant la survenue d'un mélanome. En effet, certaines personnes sont plus sensibles à l'exposition aux rayons UV. Le type de peau (phototype) est un critère majeur et déterminant de cette sensibilité (Rastrelli et al., 2014). Le phototype permet de classer la peau en fonction de sa couleur, le classement va de I à VI, VI correspondant aux peaux les plus noires.

Les peaux claires (phototype I ou II) sont les plus à risque. On note également que la présence de *naevi* (accumulation de mélanocytes ou de cellules du nevus donnant lieu à une tâche de naissance brune) de plus de 2 millimètres est un facteur de risque non négligeable (Rastrelli et al., 2014).

De plus, des maladies génétiques telles que le *Xeroderma Pigmentosum* (sensibilité de la peau aux rayons UV) et également des antécédents personnels et familiaux vis-à-vis du mélanome voire même vis-à-vis d'autres cancers (le rétinoblastome, le syndrome de Li-Fraumeni et le syndrome de Lynch de type II), vont favoriser la survenue d'un mélanome (Arlo J. and Mihm, 2006; Rastrelli et al., 2014).

De façon analogue au cancer du sein, 5 à 10% des mélanomes sont une conséquence d'anomalies génétiques héréditaires. À ce jour, deux gènes ont été principalement liés au mélanome : *CDKN2A* (Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A)

et *CDK4* (Cyclin-dependent kinase 4). Une mutation inactivatrice dans l'un de ces gènes confère un risque accru de développer un mélanome. Ces deux gènes jouent un rôle important dans la régulation du cycle cellulaire.

Récemment, il a été découvert que des amplifications de deux autres gènes : *MITF (*Microphthalmia-associated transcription factor) et *MC1R (*récepteur de la mélanocortine de type 1) augmentent le risque de développer un mélanome, à la fois chez les individus atteints de mutations *CDKN2A* et chez les individus non atteints (Badenas et al., 2012; Lee et al., 2015) (Figure 13).

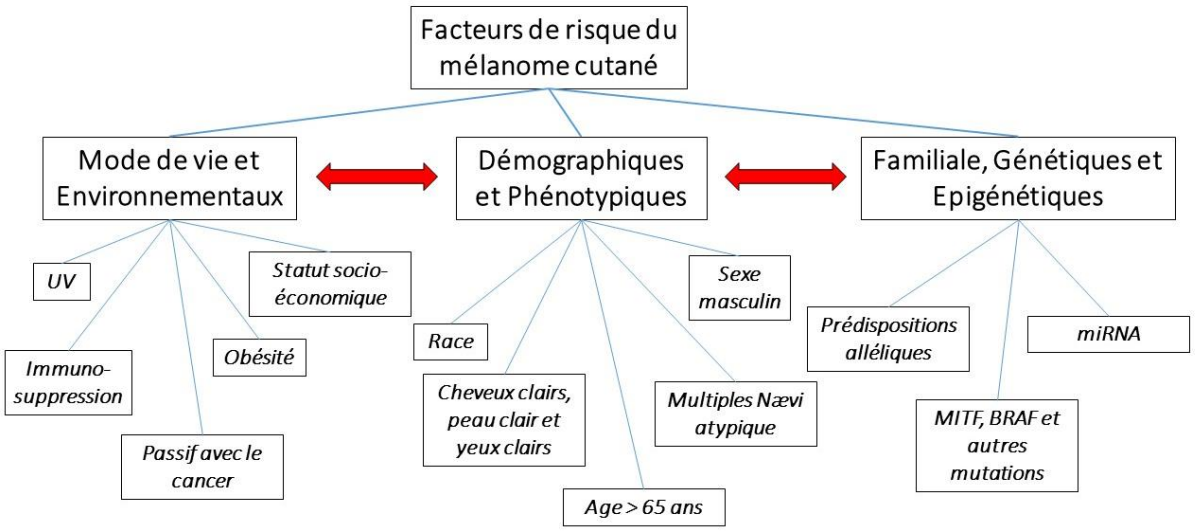



*Figure 13 : Facteurs de risques du mélanome* (D'après Azoury and Lange, 2014)

Tous ces facteurs de risque isolés ou combinés vont favoriser la formation d'un mélanome cutané.

## 3. Différents types de mélanome

Il existe plusieurs types de mélanome cutané qui sont classés en fonction de leur localisation, leur incidence et leurs aspects cliniques (Rastrelli et al., 2014).

### 3.1 Mélanome *in situ*

Dans le mélanome *in situ*, les mélanocytes malins restent confinés au sein de l'épiderme et n'ont pas encore pénétré le derme (Rastrelli et al., 2014).

### 3.2 Mélanome de Dubreuilh ou lentigo malin

Ce type de mélanome est retrouvé en majorité chez les personnes plus âgées. Il se traduit par des tâches pigmentées brunes ou noires sur le visage (Rastrelli et al., 2014). Il reste de nombreuses années dans la couche supérieure de la peau : l'épiderme.

### 3.3 Mélanome superficiel extensif

Le mélanome superficiel extensif (*Superficial spreading melanoma* ou SSM) est la forme la plus fréquente de mélanome. En effet, il représente 70% des mélanomes cutanés. Il commence par se développer de façon horizontale (mélanome *in situ*) durant de nombreuses années et va, à la suite de nouvelles altérations cellulaires, pénétrer les couches les plus profondes de l'épiderme. On appelle cette étape la progression verticale du mélanome. Cette progression peut-être très rapide (Rastrelli et al., 2014).

### 3.4 Mélanome nodulaire

A la différence du SSM, le mélanome nodulaire va très rapidement progresser de manière verticale au sein des couches profondes de l'épiderme. Un diagnostic précoce est alors nécessaire pour assurer un bon pronostic. Cependant, l'incidence de ce mélanome reste aujourd'hui très faible (Rastrelli et al., 2014).

## 4. Classification des mélanomes

### 4.1 Classification du mélanome en différents stades

Après un examen clinique, les mélanomes vont être classés en différents stades allant de 0 à IV, le stade IV étant le stade métastatique le plus avancé (Tableau 1). Ce classement va orienter la prise en charge et le suivi du patient. Ainsi, un patient atteint d'un mélanome de stade II aura un suivi tous les 6 mois les 5 premières années tandis qu'un patient ayant un mélanome de stade III ou IV aura un suivi au minimum tous les 3 mois.

De la même manière, ce classement va permettre de mieux appréhender les

examens cliniques que le patient aura à faire tels que l'imagerie par exemple. De plus, les pronostics diffèrent également en fonction des stades (Figure 14).

En effet, la survie à 5 ans pour un mélanome de stade I est de 97% tandis qu'elle n'est que de 15% pour un mélanome de stade IV (American Cancer Society, 2016).

| Stades | Critères |
|---|---|
| **Stade 0** | Tumeur *in situ* |
| **Stade IA** | Tumeur inférieure ou égale à 1 mm d'épaisseur, sans ulcération et mitoses < 1/mm$^2$ (pT1a), N0, M0 |
| **Stade IB** | Tumeur inférieure ou égale à 1 mm d'épaisseur, avec ulcération et / ou mitoses ≥ 1/mm$^2$ (pT1b), N0, M0 |
| **Stade IIA** | Tumeur supérieure à 1 mm et inférieure ou égale à 2 mm d'épaisseur, avec ulcération (pT2b), N0, M0<br>Tumeur supérieure ou égale à 4 mm d'épaisseur, sans ulcération (pT3a), N0, M0 |
| **Stade IIB** | Tumeur supérieure à 2 mm et inférieure ou égale à 4 mm d'épaisseur, avec ulcération (pT3b), N0, M0<br>Tumeur supérieure à 4 mm d'épaisseur, sans ulcération (pT4a), N0, M0 |
| **Stade IIC** | Tumeur supérieure à 4 mm d'épaisseur, avec ulcération (pT4b), N0, M0 |
| **Stade IIIA** | Tumeur sans ulcération (pT1a-4a), métastases microscopiques dans 1, 2 ou 3 ganglions lymphatiques régionaux (N1a, 2a), M0 |
| **Stade IIIB** | Tumeur sans ulcération (pT1a-4a), métastases macroscopiques dans 1, 2 ou 3 ganglions lymphatiques régionaux ou « en transit » (N1b, 2b, 2c), M0<br>Tumeur avec ulcération (pT1b-4b), métastases microscopiques dans 1, 2 ou 3 ganglions lymphatiques régionaux ou « en transit » (N1a, 2a, 2c), M0 |
| **Stade IIIC** | Tumeur avec ulcération (pT1b-4b), métastases macroscopiques dans 1, 2 ou 3 ganglions lymphatiques régionaux (N1b, 2b, 2c), M0<br>Tumeur avec ou sans ulcération (tous pT), métastases dans 4 ganglions lymphatiques régionaux ou plus ou métastases en transit avec métastase(s) ganglionnaire(s) régionale(s) (N3), M0 |
| **Stade IV** | Métastases à distance (tous pT, tous N, M1) |

Tableau 1: Classification des tumeurs en fonction du stade (Balch et al., 2009)

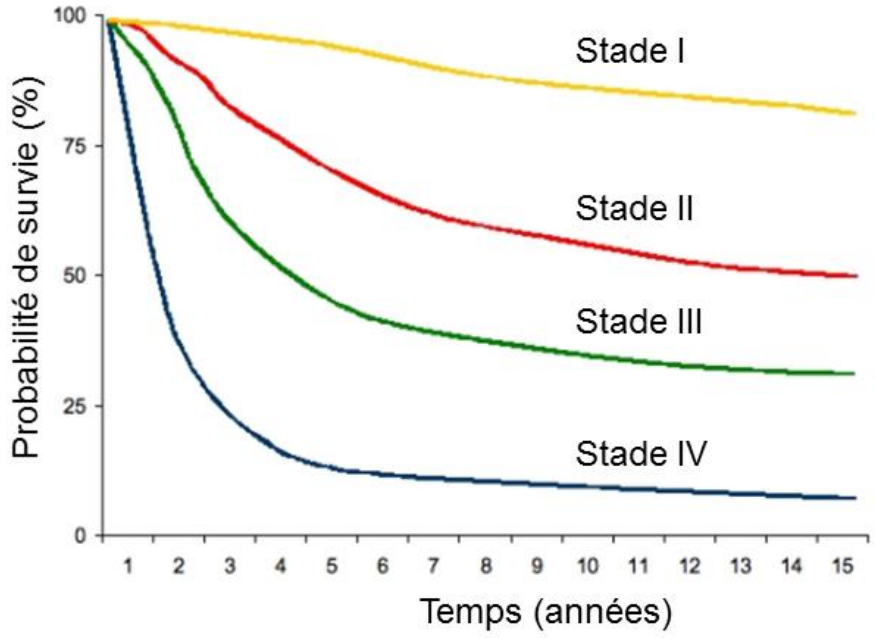



*Figure 14 : Probabilité de survie en fonction du stade du mélanome* (d'après Balch et al., 2009)

## 4.2 Classification TNM du mélanome

Comme pour le cancer du sein, il est possible de classer le mélanome en différents stades grâce à la classification TNM qui va tenir compte de l'épaisseur, du nombre de ganglions envahis ainsi que du nombre de sites métastatiques (Tableau 2).

| CLASSIFICATION | EPAISSEUR (MM) | ULCERATION/MITOSES |
|---|---|---|
| **T** | | |
| **Tis** | Mélanome in situ | NA |
| **T1** | ≤1 | A: sans ulcération et mitoses <1/mm$^2$<br>B: avec ulcération et mitoses ≥1/mm$^2$ |
| **T2** | 1,01-2 | A: sans ulcération<br>B: avec ulcération |
| **T3** | 2,01-4 | A: sans ulcération<br>B: avec ulcération |
| **T4** | >4 | A: sans ulcération<br>B: avec ulcération |
| **N** | **Nombre de ganglions métastatiques** | **Charge métastatique ganglionnaire** |
| **N0** | 0 | A: micrométastase<br>B: macrométastase |
| **N1** | 1 | A: micrométastase<br>B: macrométastase |
| **N2** | 2-3 | A: micrométastase<br>B: macrométastase |
| **N3** | ≥4 ganglions lymphatiques métastatiques ou métastases en transit ou satellites avec ganglions lymphatiques métastatiques | |
| **M** | **Site** | **LDH sérique** |
| **M0** | Pas de métastases à distance | NA |
| **M1A** | Métastases à distance de la peau, du tissu sous-cutané ou d'un ganglion | Normal |
| **M1B** | Métastases pulmonaires | Normal |
| **M1C** | - Toutes autres métastases viscérales<br>- Toutes métastases à distance | Normal<br>Elevé |

Tableau 2 : Classification TNM du mélanome (Balch et al., 2009)

NA: Non applicable; LDH: Lactate déshydrogénase ; TNM : tumeur, ganglion, métastase

## 4.3 Classification moléculaire du mélanome

Du fait d'importantes hétérogénéités entre les mélanomes, une classification moléculaire a été réalisée. Les anomalies génétiques les plus fréquemment retrouvées dans le mélanome cutané sont des mutations activatrices de *BRAF*, *NRAS* et *KIT* (Tableau 3).

Ces anomalies seront plus largement discutées dans la suite de ce manuscrit.

| Site primaire | BRAF | NRAS | KIT |
|---|---|---|---|
| **Peau exposée chroniquement** | 10% | 15% | 28% |
| **Peau non exposée chroniquement** | 60% | 20% | <1% |
| **Extrémités** | 20% | 10% | 36% |
| **Muqueuses** | 10 | 5% | 39% |

Tableau 3 : Classification moléculaire et pourcentages des mutations (d'après Vernez and Hohl, 2011)

# 5. Progression du mélanome

L'initiation tumorale commence par une prolifération non contrôlée de mélanocytes normaux pour produire un nævus bénin. Les mélanocytes sont des cellules qui dérivent de la crête neurale et qui vont pigmenter la peau. Elles se retrouvent ainsi au niveau de l'épiderme, de l'œil et de l'oreille interne. C'est pour cela qu'il est nécessaire de distinguer le mélanome cutané du mélanome uvéal. En effet, bien qu'issues de mélanocytes, il s'agit de deux pathologies distinctes avec une localisation, des dérégulations moléculaires et une étiologie différentes (Materin, 2011).

L'évolution du mélanome se poursuit par une croissance anarchique des mélanocytes dans un nævus préexistant ou dans un nouvel emplacement, ce qui

conduit à une lésion pré-maligne. On appelle ces lésions des nævus atypiques ou dysplasiques. Cette progression est la conséquence d'altérations génétiques et principalement de mutations du gène *BRAF* (BRAF est un acteur de la voie MAP Kinase qui contrôle la prolifération cellulaire) (Arlo J. and Mihm, 2006; Arrangoiz et al., 2016; Hodis et al., 2012).

Ces nævus dysplasiques vont apparaitre sous la forme de macules plates. Ces macules sont de taille supérieure à 5 mm, avec des bordures irrégulières et une pigmentation variable.

L'accumulation de nouvelles altérations génétiques telles que la perte des gènes suppresseurs de tumeur *PTEN*, *TP53* ou encore *CDKN2A* va permettre la progression du mélanome (Hodis et al., 2012; Lee et al., 2015). A ce stade le mélanome est toujours *in situ*, la présence de la E-cadhérine permet le confinement des cellules au niveau de l'épiderme. En effet, la E-cadhérine est exprimée à la surface des mélanocytes et des kératinocytes. Elle va alors favoriser les jonctions entre ces deux types cellulaires (Arlo J. and Mihm, 2006; Arrangoiz et al., 2016; Bonitsis et al., 2006; Hsu et al., 1996). Les mélanocytes prolifèrent horizontalement dans l'épiderme, on parle de croissance radiale ou horizontale du mélanome.

A la suite de nouvelles altérations, un « *switch* » de cadhérines est observé. Il se traduit notamment par une perte d'expression de la E-cadhérine et une augmentation de l'expression de la N-cadhérine. L'augmentation de l'expression de cette cadhérine va permettre aux mélanocytes de former des jonctions avec les cellules du derme qui expriment la N-cadhérine telles que les fibroblastes et les cellules endothéliales. Ces nouvelles interactions cellulaires favorisent la progression des mélanocytes verticalement dans le derme et par la suite l'initiation de métastases à distance dans le poumon, le foie ou le cerveau (Figure 15) (Arlo J. and Mihm, 2006; Arrangoiz et al., 2016).

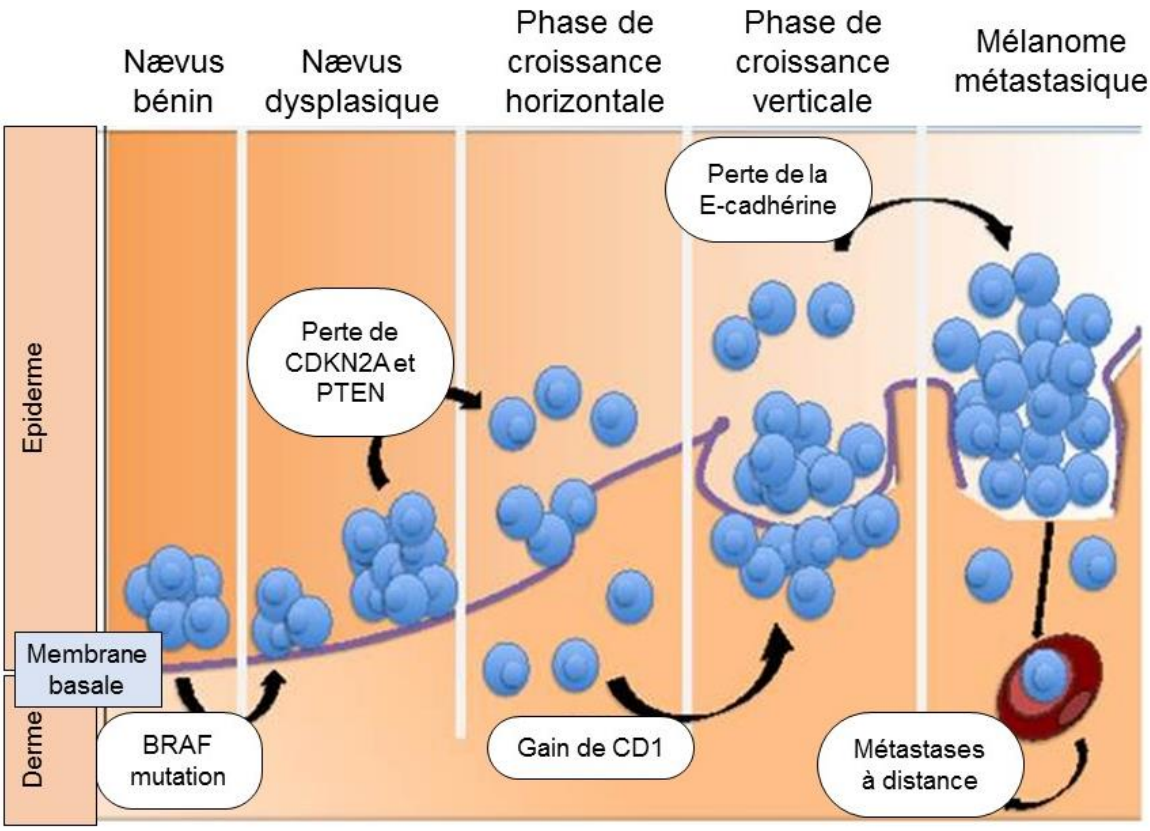



*Figure 15 : Changements moléculaires et cellulaires au cours de la progression du mélanome* (d'après Arrangoiz et al., 2016)

*Lors de la progression du mélanome, on observe le plus généralement des mutations de BRAF, une diminution de l'expression de CDKN2A et PTEN, puis une augmentation de l'expression de CD1 (glycoprotéine transmembranaire) et enfin une diminution de l'expression de la E-cadhérine. Tout cela permet la dissémination métastatique du mélanome cutané.*

## 6. Physiopathologie moléculaire du mélanome

De nombreuses altérations moléculaires ont été décrites dans le mélanome cutané. Les principales voies de signalisation dérégulées sont des voies impliquées dans la prolifération, la sénescence et l'apoptose, telles que la voie MAP Kinases (impliquant les protéines RAS/RAF/MEK/ERK) et la voie PI3K/AKT. On note également des dérégulations de la voie de signalisation Wnt/β-caténine et des voies

p16 et p14 impliquant les protéines CDKN2A/p53 (Figure 16) (Cancer Genome Atlas Network, 2015; Paluncic et al., 2016; Sullivan et al., 2015).

- MAP Kinases

La voie MAP Kinases est de loin la voie de signalisation la plus fréquemment dérégulée dans le mélanome cutané (50% des mélanomes). Cette dérégulation se traduit par une activation constitutive et irréversible de la voie. Une mutation du gène BRAF au niveau du codon V600 est fréquemment retrouvée dans le mélanome. Cette mutation conduit à la synthèse d'une protéine BRAF constitutivement active. BRAF fait partie de la famille des tyrosines kinases RAF qui vont activer les protéines MEK, qui elles-mêmes activeront les protéines ERK (Extracellular signal-regulated kinase). Lorsque les tyrosine/thréonine kinases ERK1/2 sont phosphorylées et activées par MEK, elles vont phosphoryler plusieurs substrats cytoplasmiques et nucléaires nécessaires à la transcription de nombreux gènes qui vont augmenter la prolifération et la survie cellulaires (Atkinson, 2017; Cancer Genome Atlas Network, 2015; Hodis et al., 2012; Long et al., 2011). On retrouve également dans 20% des mélanomes, une mutation du gène N-RAS, codant une petite GTPase également impliquée dans la cascade protéique BRAF/RAS/RAF/MAPK.

- c-Kit

Dans le mélanome cutané, on observe également dans moins de 10% des cas une mutation du récepteur tyrosine kinase c-Kit. La liaison du récepteur c-Kit à son ligand, le Stem Cell Factor (SCF ; un facteur de croissance des cellules souches appartenant à la famille des cytokines), conduit à sa dimérisation et à l'activation de son activité tyrosine kinase intrinsèque. c-Kit activé va à son tour phosphoryler et activer des molécules de transduction du signal impliquées principalement dans les voies de signalisation MAP Kinases et PI3K/AKT. Une mutation de cette protéine, la rendant constitutivement active, favorise la prolifération et la survie des mélanocytes (Curtin et al., 2006).

Les mutations précédemment décrites ne sont pas suffisantes pour induire à elles seules la progression du mélanome. On retrouve également des altérations de gènes suppresseurs de tumeurs tels que *PTEN*, *CDKN2A*, *NF1* ou encore *TP53*,

ainsi que l'activation de la voie PI3K/AKT et de la voie MITF (Aziz et al., 2010; Cancer Genome Atlas Network, 2015; Roh et al., 2016).

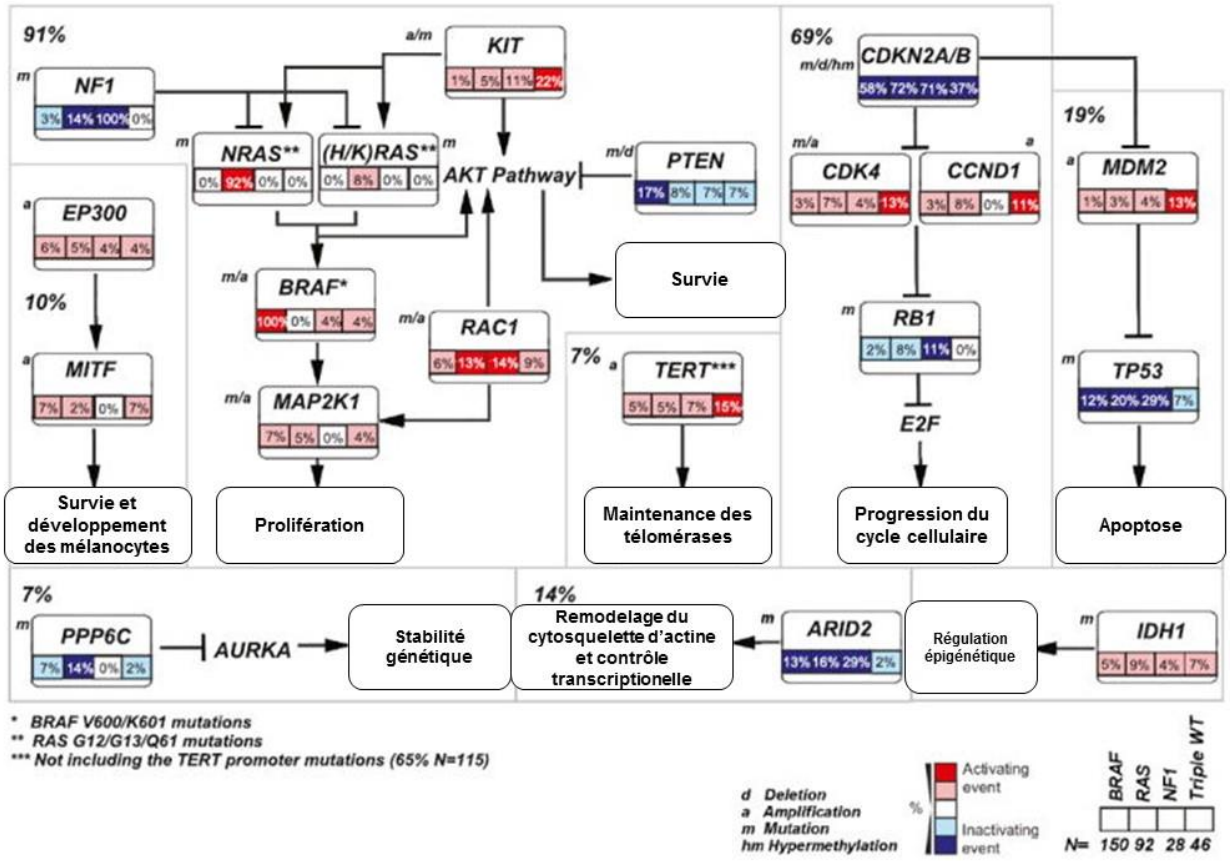



*Figure 16: Principales voies de signalisation dérégulées dans le mélanome cutané* (Cancer Genome Atlas Network, 2015)

## 7. Traitements actuels du mélanome

Jusqu'en 2011, le traitement systémique du mélanome métastatique était de la dacarbazine (agent alkylant) ainsi que des fortes doses d'interleukine 2 (HD-IL-2) (Hashim et al., 2016). Cependant, la dacarbazine n'a montré que de faibles bénéfices et les traitements par l'interleukine 2 présentent de fortes toxicités, notamment rénales et neurologiques. Depuis, les traitements sont centrés sur deux axes : l'inhibition de la voie de signalisation des MAP kinases et l'immunothérapie.

Les inhibiteurs de la voie MAP kinases actuellement utilisés sont des inhibiteurs de BRAF et de MEK.

- Inhibiteurs de BRAF

Les principales molécules utilisées permettent d'inhiber spécifiquement la protéine BRAF mutée. C'est le cas pour le vemurafenib et le dabrafenib. Ces deux traitements ont montré des résultats intéressants comparés au traitement de référence avec la dacarbazine (survie globale de 13,6 mois pour le vemurafenib versus 9,7 mois pour la dacarbazine). Cependant, une forte résistance secondaire apparaît lors du traitement avec les inhibiteurs de BRAF, notamment *via* une réactivation de la voie MAPK indépendante de BRAF (induite par une mutation de *MEK1* ou *MEK2*) (Hashim et al., 2016).

- Inhibiteur de MEK

La découverte de *BRAF* muté comme étant impliqué dans le développement du mélanome a entraîné les chercheurs à s'intéresser aux effecteurs qui se trouvent en aval de BRAF dans la voie de signalisation des MAP kinases. C'est ainsi que des inhibiteurs de MEK ont été développés tel que le trametinib. Celui-ci est prescrit depuis 2013 en cas de mutation de *BRAF* chez les patients atteints d'un mélanome cutané métastatique.

Parmi les immunothérapies utilisées pour le traitement du mélanome, on retrouve les inhibiteurs de CTLA-4 (ipilimumab notamment) et les inhibiteurs de PD-1. L'ipilimumab a reçu son autorisation de mise sur le marché par la FDA en 2011 pour le traitement du mélanome métastasique. Le pembrolizumab, un inhibiteur de PD-1, a été mis sur le marché en 2014 pour les patients atteints d'un mélanome métastatique réfractaire à l'ipilimumab (Hashim et al., 2016).

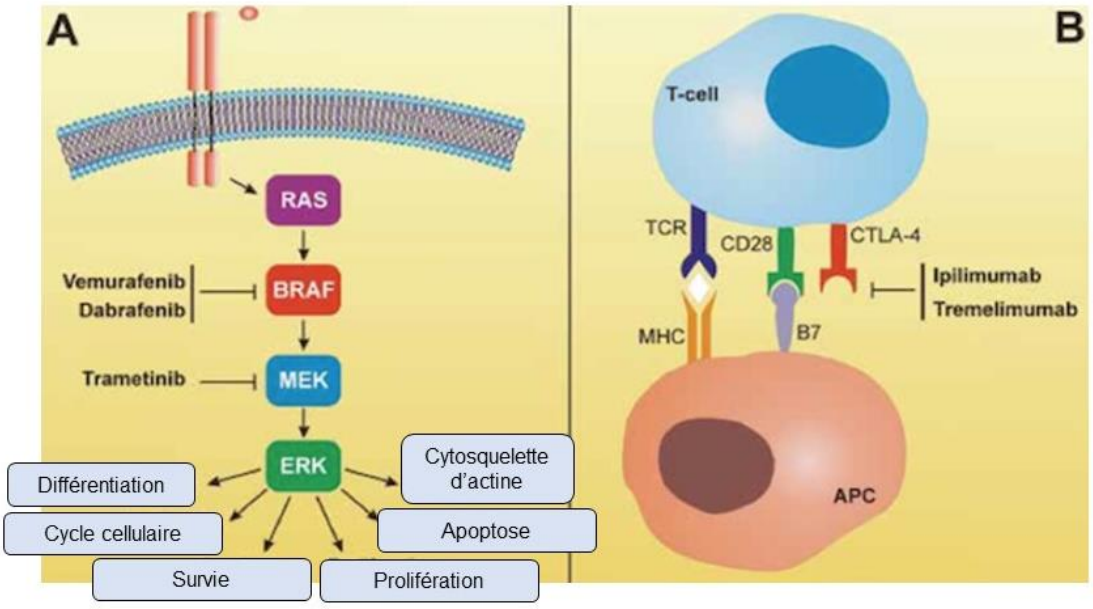



*Figure 17 : Traitement standard du mélanome* (d'après Culver et al., 2011)
*A : Inhibiteurs de la voie BRAF / MAP Kinase*
*B : Immunothérapies*

Ainsi, ces dernières années, le traitement standard du mélanome avancé consiste en des thérapies ciblées inhibant la voie MAP Kinases et des immunothérapies (Figure 17). Cependant, ces deux types de traitement ne permettent pas une guérison systématique du mélanome cutané, notamment pour les stades les plus avancés. En effet, on remarque l'apparition de nombreuses résistances après quelques années de traitement, malgré une stabilisation initiale de la maladie avec les thérapies ciblées. L'immunothérapie apporte de nouveaux outils thérapeutiques mais ne permet pas une rémission de tous les patients atteints d'un mélanome (Ribas et al., 2012). Il reste donc nécessaire de découvrir de nouvelles cibles et/ou combinaisons thérapeutiques pour le traitement du mélanome.

# Partie 3 : Le « *switch* » de cadhérines dans le développement tumoral

## 1. Le « *switch* » des cadhérines : mécanisme indispensable à la TEM

Les cellules épithéliales peuvent se transformer en cellules mésenchymateuses par un processus bien caractérisé appelé la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM). La TEM est définie comme le processus au cours duquel une cellule épithéliale polarisée, reposant sur la membrane basale et liée aux cellules voisines par différents types de jonctions intercellulaires, va subir les modifications lui permettant d'acquérir un phénotype motile mésenchymateux.

### 1.1 La TEM dans l'embryogénèse

La TEM est tout d'abord un phénomène nécessaire au développement embryonaire et qui va aboutir notamment à la formation des organes. Ainsi, en absence de TEM, l'embryogénèse ne dépasse pas le stade blastula. La TEM est impliquée dans la gastrulation, la formation de la crête neurale et des valves cardiaques (Thiery et al., 2009).

### 1.2 La TEM dans la cicatrisation

Lors du processus de cicatrisation, les cellules épithéliales vont subir une TEM afin de pouvoir se détacher de la lame basale et migrer, dans le but de reformer un nouvel épithélium. Après la migration, elles vont subir une TME (transition mésenchymo-épithéliale) qui va leur permettre de redevenir épithéliales, de rétablir des interactions avec les cellules adjacentes et ainsi de reformer un épithélium stable reposant sur la lame basale.

### 1.3 La TEM dans les pathologies

De nombreuses études ont montré l'implication de la TEM dans des processus pathologiques tels que la fibrose de certains organes mais aussi le

développement de métastases (Thiery et al., 2009). Dans le cas du développement tumoral, la TEM va permettre aux cellules épithéliales tumorales de devenir mésenchymateuses. Ce nouveau phénotype va leur permettre d'acquérir une forte motilité et de devenir invasives (Nieto et al., 2016).

La TEM est régulièrement observée lors de la dissémination métastatique des carcinomes. De manière intéressante, un processus similaire est observé lors de la dissémination métastatique du mélanome (Bonitsis et al., 2006; Hsu et al., 1996; Nieto et al., 2016; Thiery et al., 2009).

Dans le cas particulier du mélanome, on ne peut néanmoins pas parler de TEM. En effet, comme nous l'avons vu précédemment, les cellules de mélanome dérivent des mélanocytes et ne sont donc pas d'origine épithéliale. Cependant, elles possèdent de nombreuses caractéristiques des cellules épithéliales, telles que la formation de jonctions adhérentes, la polarité et l'expression de marqueurs épithéliaux.

### 1.4 Processus moléculaires impliqués dans la TEM

La TEM est caractérisée par une perte des jonctions intercellulaires, une perte de la polarité des cellules épithéliales, un remodelage du cytosquelette d'actine, ainsi qu'une diminution d'expression de marqueurs épithéliaux et une acquisition de marqueurs mésenchymateux.

Une des principales étapes de la TEM est la perte d'expression de la E-cadhérine, qui va déstabiliser les jonctions adhérentes. On observe ensuite une perte de la polarité et un remodelage du cytosquelette d'actine, se traduisant par le passage d'une cellule ayant une forme épithéliale à une cellule mésenchymateuse fibroblastoïde. Ensuite, on observe une forte expression des métalloprotéases, qui va permettre aux cellules de franchir la lame basale. En parallèle de cela, les cellules vont perdre les marqueurs épithéliaux tels que la E-cadhérine mais vont acquérir également des marqueurs mésenchymateux tels que la N-cadhérine, la vimentine, ou encore la fibronectine (Nieto et al., 2016).

Ainsi une des étapes clés de la dissémination métastatique des carcinomes et du mélanome est le « switch » des cadhérines.

## 2. Les cadhérines

Les cadhérines sont une classe de glycoprotéines transmembranaires qui jouent un rôle important dans l'adhérence cellulaire en assurant les liaisons intercellulaires au niveau des tissus. Leur fonctionnement est dépendant du calcium. Elles sont composées de trois régions principales : une région extracellulaire amino-terminale contenant cinq domaines répétés communs aux membres de la famille et des sites de fixation des ions calcium, une région transmembranaire, et une région cytosolique carboxy-terminale (David and Rajasekaran, 2012). La fixation des ions calcium aux domaines cadhérines répétés permet la dimérisation des molécules de cadhérines et leur liaison aux domaines semblables d'une cellule adjacente.

D'autre part, les cadhérines se relient, par le biais de leur domaine cytoplasmique, aux caténines intracellulaires, elles-mêmes reliées aux filaments d'actine (David and Rajasekaran, 2012). Ce complexe cadhérines-caténines-cytosquelette d'actine constitue les jonctions adhérentes et permet une adhérence stable entre les cellules (Figure 18).

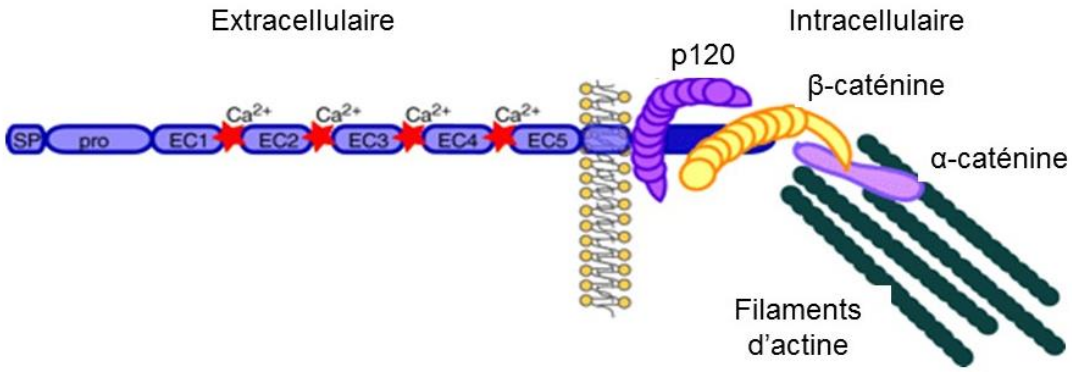



Figure 18: Complexe cadhérine/caténines/cytosquelette d'actine (d'après Wheelock et al., 2008).

*Les cadhérines sont ancrées au cytosquelette d'actine par le biais des caténines α et β ainsi que de la caténine p120*

Il existe plusieurs types de cadhérines : la E-cadhérine présente dans les cellules épithéliales, la N-cadhérine présente dans les cellules neuronales, musculaires et fibroblastiques, la P-cadhérine présente dans les cellules placentaires et embryonnaires, la VE-cadhérine présente dans les cellules

endothéliales vasculaires. Les interactions homophiles entre cadhérines permettent la formation de tissus cellulaires.

## 3. Expression des cadhérines E et N au cours du développement tumoral

Comme nous l'avons vu précédemment, la dissémination métastatique est généralement associée à un « *switch* » de cadhérines, se traduisant par une perte de l'expression de la E-cadhérine et par une induction de l'expression de la N-cadhérine par les cellules tumorales (Kourtidis et al., 2017; Wheelock et al., 2008) (Figure 19).

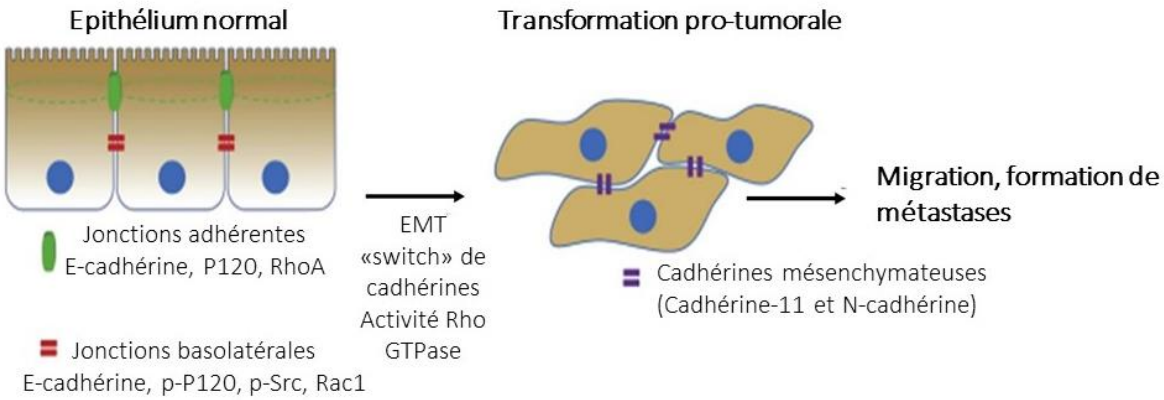



*Figure 19 : Développement tumoral et switch de cadhérines* (d'après Kourtidis et al., 2017)

Ce « *switch* » d'expression des cadhérines est associé à un phénotype tumoral plus agressif. En effet, il a été démontré qu'une inhibition de l'expression de la E-cadhérine augmente la motilité et l'invasivité des cellules tumorales *in vitro* (Frixen et al., 1991; Shamir et al., 2014; Wendt et al., 2011; Yilmaz and Christofori, 2010). De plus, chez les patients, la perte d'expression de la E-cadhérine est associée à un fort développement de métastases et à un mauvais pronostic. Le taux d'expression de la E-cadhérine peut servir de biomarqueur cancéreux en clinique (De Wever et al., 2007). Ainsi, il a été largement démontré que la E-cadhérine peut être qualifiée de suppresseur de tumeur (Frixen et al., 1991; Onder et al., 2008; Shamir et al., 2014; Valastyan and Weinberg, 2011).

De manière analogue, il a été démontré que l'augmentation de l'expression de la N-cadhérine induisait la motilité et l'invasivité des cellules tumorales *in vitro* (Nieman et al., 1999). De plus, les études cliniques ont montré que l'augmentation de l'expression de la N-cadhérine dans les tissus tumoraux est associée à une diminution de la survie sans progression (formation de métastases) ainsi que de la survie globale chez les patients atteints d'un sarcome métastatique (Niimi et al., 2013). Ainsi, de même que pour la perte d'expression de la E-cadhérine, l'augmentation de l'expression de la N-cadhérine est un bon marqueur de la progression tumorale (De Wever et al., 2007; Kreizenbeck et al., 2008; Mariotti et al., 2007; Niimi et al., 2013).

Ce « *switch* » de cadhérines survenant lors du développement tumoral a été observé dans différents types de tumeurs, tels que le cancer du sein (Hazan et al., 2000; Wendt et al., 2011), le mélanome (Lade-Keller et al., 2013), le cancer du pancréas (Hotz et al., 2007), le cancer du foie (Araki et al., 2011), le cancer de la vessie (Jäger et al., 2010) et le cancer de la prostate (Jaggi et al., 2006; Yilmaz and Christofori, 2010).

Plus précisément, dans le mélanome, il a également été montré qu'une réexpression de la E- cadhérine ou une diminution de l'expression de la N-cadhérine inhibaient la croissance tumorale, la motilité et l'invasivité cellulaire *in vitro* ainsi que la tumorigénicité *in vivo* (Hsu et al., 1996).

## 4. Mécanismes de régulation de la progression tumorale par le « *switch* » des cadhérines

La perte d'expression de la E-cadhérine pourrait induire la progression tumorale par différents mécanismes :

- La perte d'expression de la E-cadhérine favorise la motilité des cellules épithéliales. La E-cadhérine fait partie intégrante des jonctions cellulaires des cellules épithéliales par le biais du complexe formé avec les caténines et les filaments d'actine, assurant ainsi le maintien de l'intégrité des tissus (Wheelock et

al., 2008). Une diminution d'expression de la E-cadhérine diminuerait la formation des jonctions adhérentes intercellulaires, permettant ainsi aux cellules épithéliales de se dissocier, migrer et envahir les tissus environnants (Wheelock et al., 2008).

- La perte d'expression de la E-cadhérine favorise le rôle oncogénique de la β-caténine. La β-caténine est une protéine ayant deux rôles : structural et transcriptionnel. En effet, liée à la E-cadhérine, la β-caténine permet la liaison aux filaments d'actine et donc la stabilisation des jonctions adhérentes (Jeanes et al., 2008). Sous sa forme libre, elle peut être dégradée par le complexe protéasomique ou agir en association aux facteurs de transcription de la famille TCF/LEF (T Cell Factor/Lymphoid enhancer factor) pour réguler l'expression de gènes cibles favorisant la prolifération et la progression tumorale tels que ceux codant pour la cycline D1, Myc, MMP7,… (Jeanes et al., 2008).

Ainsi, en présence de la E-cadhérine, il y a formation du complexe E-cadhérine / β-caténine / filaments d'actine, la β-caténine est donc maintenue à la membrane, et son rôle oncogénique est inhibé. Cependant, la perte d'expression de la E-cadhérine conduit à l'accumulation de la β-caténine cytoplasmique, son internalisation dans le noyau et l'induction de l'expression de ses gènes cibles pro-tumoraux et donc à la prolifération et l'invasion cellulaires (Jeanes et al., 2008).

Ainsi, la β-caténine possède différents rôles en fonction de sa localisation subcellulaire (Thorstensen et al., 2003).

- La β-caténine peut également avoir un rôle oncogénique dans sa participation à la voie de signalisation Wnt. En l'absence du ligand Wnt, l'excès de β-caténine cytoplasmique est dégradé par le protéasome. En présence de ce ligand, le complexe récepteur-corécepteur (Frizzled-LRP), va recruter à la membrane plasmique certaines protéines qui normalement stimulent la dégradation de β-caténine. De la même manière que précédemment, l'excès de β-caténine cytoplasmique peut être transporté vers le noyau et permettre l'activation transcriptionelle de ces gènes cibles oncogéniques (Nelson and Nusse, 2004).

- La perte d'expression de la E-cadhérine favorise les voies de signalisation de certains récepteurs à activité tyrosine kinase. Il a été démontré que le complexe

transmembranaire E- cadhérine / caténines / filaments d'actine pouvait interagir avec différents récepteurs à activité tyrosine kinase (RTK) tels que le FGFR (*Fibroblast growth factor receptor*) (Yilmaz and Christofori, 2010), l'EGFR (epidermal growth factor receptor) (Jeanes et al., 2008; Yilmaz and Christofori, 2010), l'IGF-IR (récepteur de type I aux facteurs de croissance insulino-mimétiques) et Met (Yilmaz and Christofori, 2010). Ces interactions entraînent une régulation négative des voies de signalisation activées par ces récepteurs (Yilmaz and Christofori, 2010). Plusieurs mécanismes ont été décrits pour expliquer la régulation des voies de signalisation des RTK par la E-cadhérine, dont l'inhibition de l'activation du récepteur par son ligand ou l'induction de son endocytose (Yilmaz and Christofori, 2010). Ainsi, la perte de l'expression de la E-cadhérine dans les cellules cancéreuses pourrait lever l'inhibition de voies de signalisation oncogéniques et donc favoriser la croissance et la progression tumorales.

Contrairement à la E-cadhérine, l'expression de la N-cadhérine favorise quant à elle la progression tumorale.

- La N-cadhérine peut favoriser les voies de signalisation de certains récepteurs à activité tyrosine kinase. De nombreuses études ont montré que la N-cadhérine peut être impliquée dans la régulation positive des voies de signalisation activées par les RTK. En effet, il a été démontré que la N-cadhérine pouvait interagir avec le FGFR et induire l'activation des voies de signalisation situées en aval de celui-ci, soit en facilitant sa dimérisation (indépendamment de la présence de son ligand), soit en empêchant son internalisation et donc en augmentant son activation par le FGF. Ainsi, cette interaction N-cadhérine / FGFR va favoriser la prolifération et la migration cellulaires (Christofori, 2003; Wheelock et al., 2008).
La N-cadhérine peut également interagir avec d'autres RTK dans les cellules tumorales. Par exemple, Le complexe N-cadhérine / β-caténine peut interagir avec le PDGFR (récepteur au facteur de croissance plaquettaire) par l'intermédiaire de la protéine d'échafaudage NHERF. Ce complexe est localisé au niveau du front de migration des cellules tumorales et favorise leur motilité (Theisen et al., 2007)

- La N-cadhérine peut activer de petites GTPases telles que Rac1 et Cdc42

induisant la motilité et l'invasion cellulaires. Ces petites GTPases participent à la motilité cellulaire en induisant la polarisation de l'actine et la formation des lamellipodes et filopodes au niveau du front de migration (Yilmaz and Christofori, 2010).

- L'expression de la N-cadhérine peut faciliter l'interaction avec les fibroblastes et l'endothélium. Ceci est le cas de la transformation mélanocytaire. En effet, comme nous l'avons vu précédemment, les mélanocytes expriment la E-cadhérine et interagissent avec les kératinocytes, ce qui régule leur croissance (Li et al., 2001a). Ainsi, lorsque les mélanocytes perdent l'expression de la E-cadhérine et expriment la N-cadhérine, leur croissance n'est plus contrôlée par les kératinocytes. De plus, ils acquièrent la capacité d'interagir avec les fibroblastes et les cellules endothéliales qui expriment cette N-cadhérine. Cette interaction avec les fibroblastes pourrait leur permettre de migrer à travers le derme tandis que l'interaction avec les cellules endothéliales leur permettrait de pénétrer dans la circulation sanguine. La N-cadhérine va alors favoriser la formation de métastases (Haass et al., 2005; Li et al., 2001b).

Ainsi, le « *switch* » d'expression des cadhérines (E/N) favoriserait, par le biais de différents mécanismes, la progression tumorale et notamment la formation de métastases (Wheelock et al., 2008). Les cellules ont acquis grâce à ce « *switch* » de cadhérines, un phénotype de type mésenchymateux et invasif.

# Partie 4 : Protéine Kinase D1

La protéine Kinase D1 (PKD1), aussi dénommée protéine kinase Cμ (PKCμ), est une sérine/thréonine kinase qui a été clonée pour la première fois en 1994 au sein de deux laboratoires (Johannes et al., 1994; Valverde et al., 1994). L'abréviation de la protéine kinase D1 (PKD1) est à ne pas confondre avec l'abréviation de la *Polycystic kidney disease 1* appelée PKD1 également dans la littérature.

PKD1 a été initialement décrite comme une PKC atypique. Cependant, du fait de ses caractéristiques structurales et fonctionnelles, elle a ensuite été classée au sein de la sous-famille des PKD, qui comporte deux autres membres (PKD2 et PKD3). Ces trois protéines sont fortement similaires. La famille des PKD est elle-même classée dans le groupe des CAMK *(calcium-calmodulin-dependent kinases*) en raison de la forte ressemblance de leurs domaines catalytiques (Rozengurt et al., 2005).

PKD1 régule différentes voies de signalisation et est impliquée dans de nombreux processus fondamentaux tels que la prolifération, la survie, la motilité et l'invasion cellulaires, l'organisation de l'appareil de Golgi et le trafic membranaire (Rozengurt, 2011).

## 1. PKD1, membre de la famille des PKC

Comme nous l'avons vu précédemment, PKD1 fait partie de la famille des protéines kinases C (PKC). Elle a été initialement décrite comme une PKC atypique du fait de sa forte homologie avec cette sous-famille de PKC, avant d'être ensuite classée dans la sous-famille des PKD (Figure 20). La famille des PKC se divise en quatre sous-familles : i) la sous-famille des PKC conventionnelles (cPKC) qui comprend PKCα, PKCβI, PKCβII et PKCγ, ii) la sous-famille des PKC atypiques (aPKC) qui comprend PKCζ et PKCλ, iii) la sous-famille des nouvelles PKC (nPKC) qui comprend quant à elle PKCδ, PKCε, PKCη et PKCθ et iv) la famille des protéines kinases D (PKD), créée àprès la découverte de PKD1 (Toker, 1998).

Depuis plus de 20 ans, des études sont menées sur les rôles cellulaires des PKC. Ainsi, il a été montré que les PKC jouaient un rôle fondamental dans de

nombreux processus physiologiques tels que la prolifération cellulaire, l'apoptose, l'activation plaquettaire ainsi que le remodelage du cytosquelette (Isakov, 2017; Toker, 1998).

De nombreuses équipes se sont ensuite intéressées au(x) rôle(s) que pourraient jouer les PKC dans le développement tumoral. Ils ont montré que les PKC pouvaient jouer un rôle oncogénique ou anti-oncogénique de manières tissu-dépendante et PKC-dépendante. Plus précisément, dans le mélanome, il a été montré que les PKC pouvaient être impliquées dans la tumorigénèse. En effet, les patients atteints d'un mélanome présentant une forte expression de PKCε ont un mauvais pronostic (Lau et al., 2012). Il a également été montré que les PKC pouvaient favoriser l'activation de la voie MAP Kinases, évènement majeur dans l'oncogenèse du mélanome (Cohen et al., 2006). Putnam et son équipe ont également montré que les PKC pouvaient influencer l'organisation du cytosquelette d'actine et promouvoir ainsi l'invasivité cellulaire dans le mélanome (Putnam et al., 2009).

Des études ont également montré le lien étroit entre les PKC, les cadhérines et l'invasion tumorale (Chen and Chen, 2009; Debiais et al., 2001; Delannoy et al., 2001; Gandellini et al., 2009; Jain and Basu, 2014; Masur et al., 2001).

Ainsi, une étude a montré que la forte expression de PKCα est associée, dans le cancer du côlon, à une faible expression de la E-cadhérine (Masur et al., 2001). De la même manière, une autre étude a montré que l'activation des PKC par des esters de phorbol augmentait l'expression de la N-cadhérine (Delannoy et al., 2001). Enfin, il a été rapporté que la déplétion de PKCε induisait une réversion du phénotype tumoral dans des cellules de cancer de la prostate, se traduisant par une augmentation de l'expression de la E-cadhérine (Gandellini et al., 2009).

Au total, ces différentes observations ont permis de faire un lien entre l'agressivité tumorale observée lors du « switch » de cadhérines et la famille des PKC. Le rôle exact joué par les PKC dans ce « switch » de cadhérines reste toutefois à préciser.

De manière surprenante, de nombreuses études ont également montré que les PKC pouvaient jouer un rôle anti-oncogénique, notamment dans le mélanome.

En effet, il a par exemple été montré que PKCβ participait à la différenciation mélanocytaire et réduit l'invasivité cellulaire (Oka et al., 2008; Park et al., 1993; Voris et al., 2010).

Du fait de l'implication des PKC dans la régulation de la progression tumorale, de nombreuses études à visée thérapeutique utilisant des inhibiteurs ou des activateurs de PKC sont en cours de développement (Denning, 2012). Cependant, du fait de la grande diversité des PKC et de leurs rôles, les différentes PKC ont également été étudiées et ciblées de manière spécifique. C'est ainsi qu'a été identifiée la protéine kinase D1.

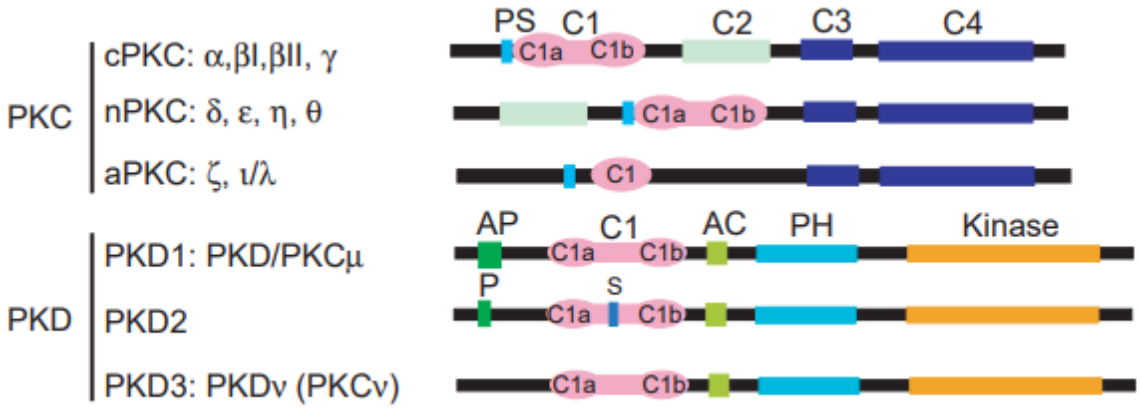



*Figure 20 : Structures des différentes sous-familles des PKC* (Wang, 2006)
*PS : pseudo substrat domaine ; C1 : domaine riche en cystéine ; C2 : domaine de liaison du calcium ; C3+C4 : domaine catalytique ; PH : domaine d'homologie à la pleckstrine ; SP : signal putatif peptidique ; TM : domaine transmembranaire*

## 2. Organisation génique

La protéine kinase D1 est une protéine encodée par le gène *PRKD1*, situé sur le chromosome 14 chez l'homme et comprenant 351 kb. C'est un gène très conservé, retrouvé également chez la souris, le rat, la drosophile, le ver nématode, ainsi que chez la levure (Jaggi et al., 2007). La protéine PKD1 est composée de 912 acides aminés et possède un poids moléculaire de 115 kDa, chez l'Homme.

## 3. Structure protéique

PKD1 est une protéine qui possède un domaine régulateur amino-terminal et un domaine catalytique carboxy-terminal (Sundram et al., 2011). Le domaine régulateur (acides aminés 1-588) est constitué d'une région riche en résidus alanine et proline nommée (AP), une répétition en tandem de deux motifs à doigts de zinc riches en résidus cystéine (C1a et C1b), une région riche en acides aminés acides (AC), ainsi qu'un domaine d'homologie à la pleckstrine (domaine PH). Le domaine PH va permettre l'export nucléaire de PKD1 mais aussi l'auto-inhibition du domaine kinase (Sundram et al., 2011). Ce domaine PH n'est pas retrouvé chez les membres des autres sous-familles de PKC. Le domaine régulateur permet de contrôler l'activité enzymatique de PKD1 mais également sa localisation subcellulaire.

Le domaine catalytique (acides aminés 589-845) contient le domaine sérine/thréonine kinase de la protéine (Sundram et al., 2011). On retrouve à l'extrémité carboxy-terminale un domaine PB (PDZ de type 1) qui va permettre l'interaction avec d'autres protéines (Kunkel et al., 2009) (Figure 21).

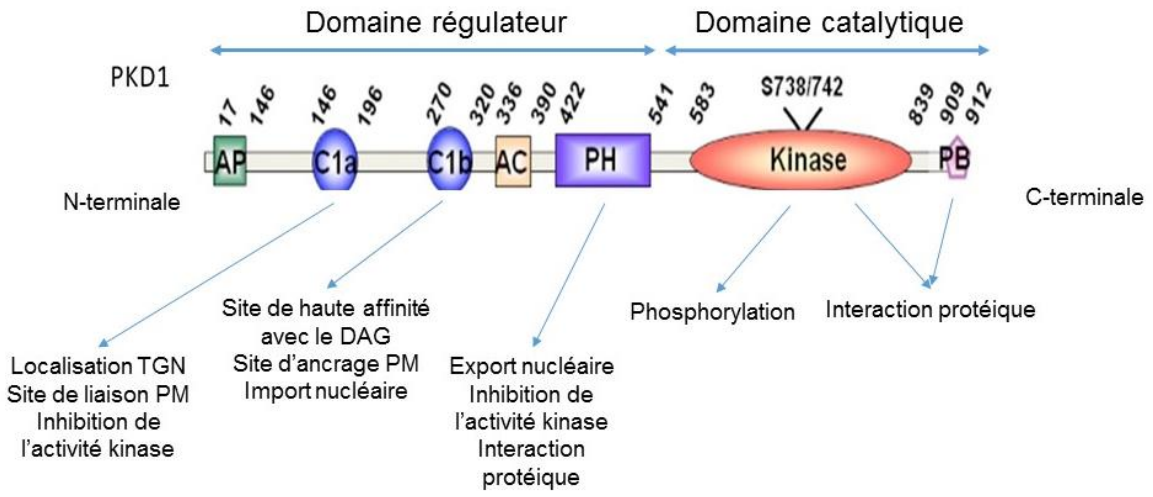



*Figure 21: Structure moléculaire de PKD1* (d'après Sundram et al., 2011)

*La représentation schématique montre la structure de PKD1 et les principales fonctions de ses différents domaines. PKD1 comporte 912 acides aminés. PKD1 contient une région riche en alanine-proline ou en proline à l'extrémité N-terminale et un domaine de liaison PDZ à l'extrémité C-terminale. Les nombres représentent le positionnement des acides aminés de chaque domaine de la protéine PKD1*

*humaine. Les résidus sérine marqués dans le domaine kinase représentent les résidus de la boucle d'activation phosphorylés par nPKC.*

*Abréviations : AC, domaine acide ; AP, domaine riche en alanine/proline ; C1a et C1b, motifs à doigts de zinc riches en cystéine ; PB , domaine PDZ binding ; PH, domaine plekstrin homology ; TGN, réseau trans-golgien ; PM, membrane plasmique*

## 4. Activation

L'activation de PKD1 peut être induite par différents stimuli tels que des facteurs de croissance, des neuropeptides mitogéniques, ainsi que le stress oxydant. Il existe différents mécanismes d'activation de PKD1 (Figure 22). Le mécanisme le mieux caractérisé est celui impliquant la voie phospholipase C/ protéine kinase C (PLC/PKC), appelé aussi activation PKC-dépendante.

Les stimuli qui permettent cette activation PKC-dépendante sont les esters de phorbol, les analogues du diacylglycérol (DAG), les neuropeptides mitogéniques (bombésine, vasopressine, endothéline, bradykinine…), l'acide lysophosphatidique, les facteurs de croissance (PDGF et VEGF), le stress oxydant, ainsi que la bryostatine-1.

Ces différents stimuli vont permettre l'activation de récepteurs couplés aux protéines G (GPCR) ou de récepteurs à activité tyrosine kinase (RTK) membranaires, suite à la fixation de leurs ligands extracellulaires, ce qui conduit à l'activation des phospholipases Cβ ou Cγ (PLCβ ou PLCγ), respectivement. Les PLC activées vont catalyser l'hydrolyse du phosphatidylinositol-4,5-diphosphate (PIP2) membranaire en inositol-1,4,5-triphosphate (IP3) et DAG. Ce dernier recrute les nouvelles PKC (nPKC) et PKD1, les nPKC phosphorylent PKD1 sur ses résidus Ser-738 et Ser-742 chez l'homme (Ser-744 et Ser-748 chez la souris) (Jacamo et al., 2008). Ces phosphorylations lèvent l'auto-inhibition par le domaine régulateur et stabilisent PKD1 dans son état actif. La phosphorylation de ces deux résidus est nécessaire à l'activation de PKD1. En effet, il a été montré que la substitution de ces deux résidus sérine par des résidus alanine induisait un blocage de l'activation de PKD1 par la voie PKC-dépendante (Iglesias and Rozengurt, 1998; Rozengurt, 2011).

De plus, PKD1 peut être activée par le stress oxydant. Ce stress oxydant va induire une phosphorylation par c-Abl du résidu Tyr-463 situé dans le domaine PH de PKD1, ainsi que la phosphorylation Src-dépendante du résidu Tyr-95. Ces deux phosphorylations vont d'une part lever l'auto-inhibition intramoléculaire du domaine PH, d'autre part libérer le domaine kinase C2 de PKD1. Ces changements de conformations de PKD1 vont permettre à la PKCδ de phosphoryler PKD1 sur ses résidus sérine 738 et sérine 742 (Storz and Toker, 2003; Döppler and Storz, 2007; Storz et al., 2003; Döppler and Storz, 2017).

Il existe également d'autres mécanismes d'activation de PKD1 n'impliquant pas les PKC appelés mécanismes d'activation non PKC-dépendants mais ils restent encore peu décrits dans la littérature.

Un de ces mécanismes serait le clivage de PKD1 par la caspase 3, entre son domaine PH et son domaine acide. La localisation précise de ce clivage reste encore incertaine, cependant ce clivage permet la libération et l'activation consécutive du domaine catalytique de PKD1 (Endo et al., 2000; Häussermann et al., 1999; Vántus et al., 2004). Ce processus est mis en place lors de l'apoptose induite par un stress génotoxique ou par le TNFα (tumor necrosis factor α) (Jaggi et al., 2007).

Un autre mécanisme d'activation de PKD1 non dépendante de PKC impliquerait une lente auto-phosphorylation du résidu Ser-742 de PKD1 permettant ainsi son activation (Jaggi et al., 2007).

De plus, il a été montré que la protéine PKD1 active s'auto-phosphoryle sur son résidu Ser-910 (Ser-916 chez la souris). Cette phosphorylation de la sérine 910 est une caractéristique de l'activation de PKD1 et joue un rôle important dans le maintien de sa conformation active (Guha et al., 2010; Jaggi et al., 2007; Rozengurt et al., 2005; Sundram et al., 2011).

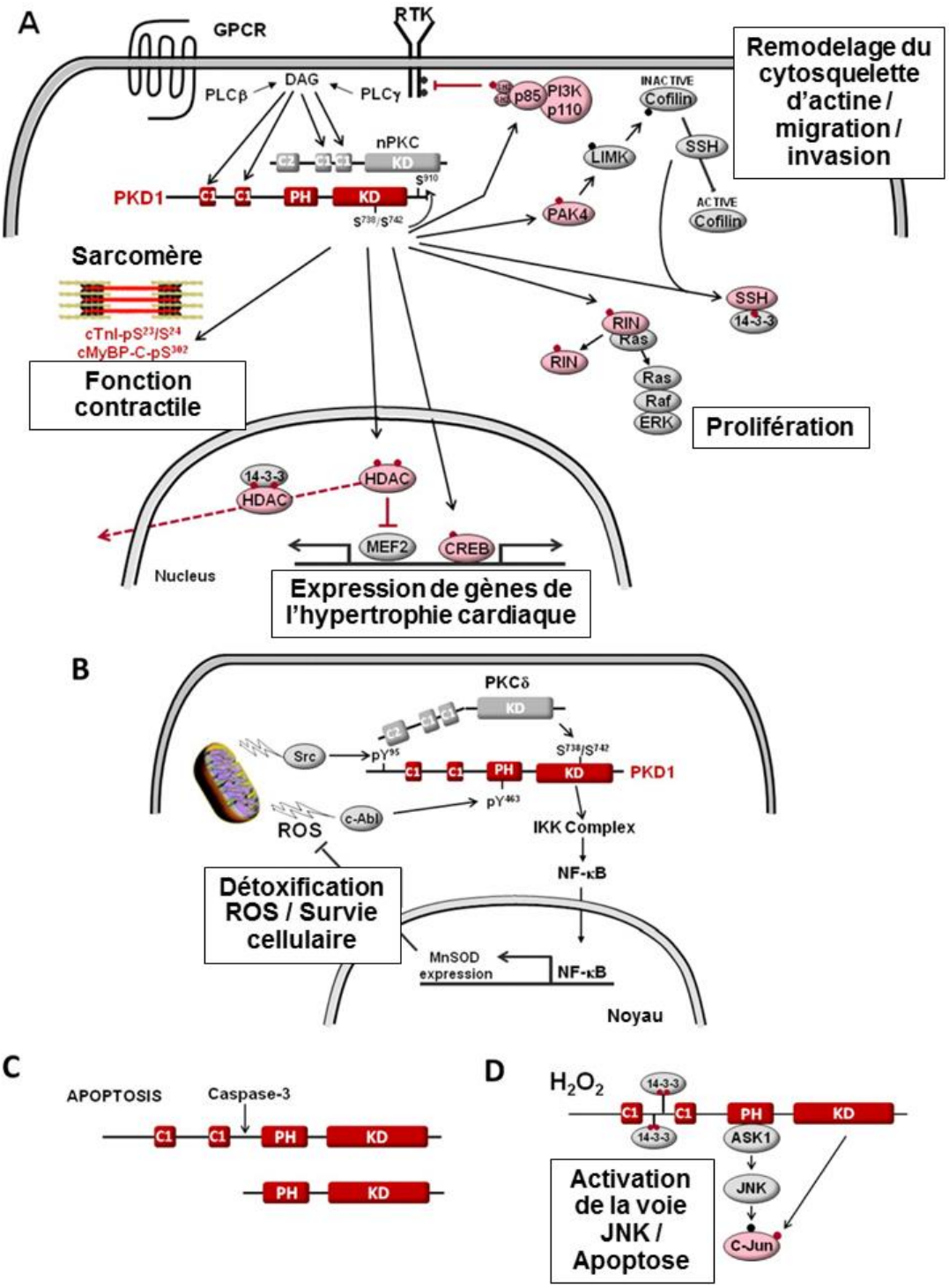



*Figure 22: Les différents mécanismes d'activation de PKD1* (Steinberg, 2012a)

*Représentation schématique des différents modes d'activation de PKD1 et des voies de signalisation régulées.*

*A. Activation PKC-dépendante ; B. Activation par le stress oxydant ; C. Activation par clivage via la caspase-3 ; D. Induction de l'apoptose après traitement au $H_2O_2$. Les protéines en rose sont les substrats directs de PKD1.*

## 5. Localisation subcellulaire

La localisation cellulaire de PKD1 peut varier en fonction de son état d'activation et du type cellulaire. Dans sa conformation inactive, lorsque le domaine catalytique est réprimé par le domaine PH, PKD1 présente une localisation plutôt cytosolique (Chang et al., 2017; Matthews et al., 2000; Rey et al., 2001). Cependant, la protéine PKD1 activée est capable de transloquer rapidement du cytosol vers différents compartiments cellulaires (appareil de Golgi, noyau, membrane plasmique), où elle pourra y phosphoryler ses substrats.

## 6. Voies de signalisation régulées par PKD1

PKD1 est impliquée dans de nombreuses voies de signalisation (Figure 23).

### 6.1 Voie de signalisation du BCR

Il a été montré que PKD1 peut être activée par le récepteur des lymphocytes B (BCR). Cette activation s'effectue *via* une cascade de phosphorylations médiée par les tyrosines kinases Lyn, Syk et Btk, qui aboutissent à l'activation de la PLCγ. Par la suite, la protéine PKD1 est activée et va phosphoryler Syk, ce qui réduirait la capacité de Syk à phosphoryler PLCγ et fonctionnerait comme une boucle de régulation négative du BCR (Matthews et al., 2000).

### 6.2 Voie de signalisation des MAP Kinases

Il a également été montré que PKD1 participait à la cascade de signalisation des MAP Kinases. En effet, une activation prolongée de PKD1 conduit à une activation des protéines MEK, ERK et RSK *via* la phosphorylation de RIN1 par PKD1 (Jaggi et al., 2007; Karam et al., 2012).

### 6.3 Voie de signalisation JNK

D'autres études ont suggéré que PKD1 pouvait réguler négativement la voie de signalisation JNK par phosphorylation de c-Jun. Cependant, cette régulation négative de la voie de signalisation JNK semble être tissu-dépendante. Par exemple, elle n'est pas retrouvée dans des lignées cellulaires de carcinome pulmonaire non à petites cellules (Hurd and Rozengurt, 2003; Kisfalvi et al., 2010).

### 6.4 Voie NF-κB

PKD1 régule également l'activité du facteur de transcription NF-κB. Celui-ci joue un rôle important dans la régulation des réponses inflammatoires et immunitaires induites par le stress oxydant notamment. PKD1 agit dans ce cas comme un senseur du stress oxydant et peut réguler la réponse cellulaire en activant NF-κB. En présence d'espèces radicalaires de l'oxygène, PKD1 est activée par les kinases Src et Abl. PKD1 phosphoryle alors la kinase IKK (IκB kinase), ce qui entraîne la phosphorylation et la dégradation par le protéasome de la protéine IκB (inhibitor of κB). NF-κB est alors libéré et va s'accumuler dans le noyau et induire la transcription de ses gènes cibles (Storz, 2007; Storz and Toker, 2003). PKD1 peut également activer NF-κB par un mécanisme non dépendant d'IKK mais celui-ci reste encore largement inconnu.

### 6.5 Régulation de l'expression génique par les HDAC

Les HDAC (histone déacétylases) sont des protéines qui contrôlent l'expression génique en régulant le degré de compaction de la chromatine et donc l'accès des facteurs de transcription à l'ADN. PKD1 phosphoryle les HDAC de classe II (HDAC5 et HDAC7) et favorise leur transport du noyau vers le cytoplasme, atténuant la répression transcriptionnelle des gènes régulés par ces HDAC. Ainsi, PKD1 qui est activé dans les cellules endothéliales par le facteur de croissance VEGF va induire la prolifération cellulaire et l'angiogenèse notamment *via* la phosphorylation de HDAC5 et HDAC7 (Ren, 2016).

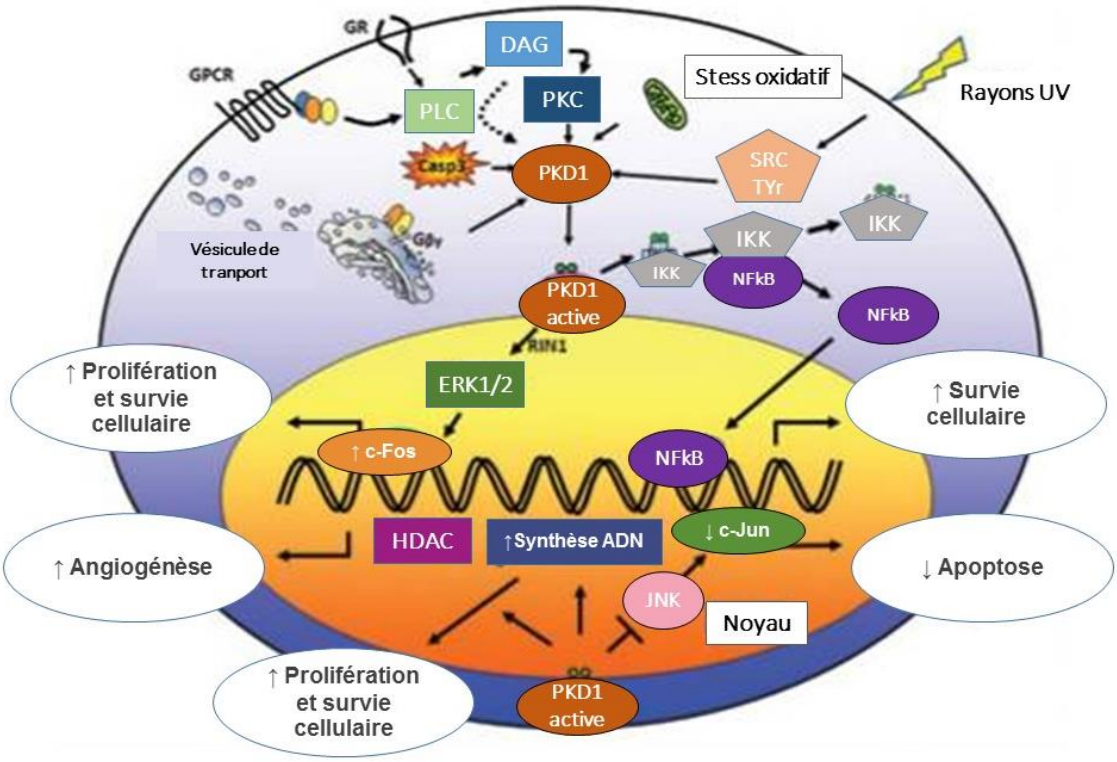



*Figure 23: Représentation schématique des voies de signalisation modulées par PKD1* (Sundram et al., 2011)

*PKD1 régule notamment 1) la voie ERK, 2) l'activité de NF-κB, 3) la voie JNK et 4) les HDAC.*

*Abréviations : Casp3, caspase 3 ; DAG, diacyglycérol ; ERK1/2, extracellular signal-regulated kinase ½ ; GPCR, G protein-coupled receptor ; HDAC, histone deacetylase ; IκBα, NF-κB inhibitor ; JNK, c-jun n-terminal kinase ; NF-κB, nuclear factor-kappa-light-enhancer of activated B cells ; PKC, protéine kinase C ; PLC, phospholipase C ; IKK, IκB kinase*

## 7. Fonctions

La protéine kinase D1 joue un rôle dans de nombreux processus moléculaires, cellulaires ou physiologiques tels que la synthèse d'ADN, le remodelage de la chromatine, la prolifération cellulaire, l'adhérence intercellulaire, la polarisation, la migration cellulaire, l'apoptose et le transport de protéines depuis le Golgi vers la

membrane plasmique, la détoxification des espèces radicalaires de l'oxygène, l'angiogenèse, la réponse immunitaire, la sécrétion d'insuline ainsi que la survie des cellules β pancréatiques (Sundram et al., 2011).

## 7.1 Rôle dans la prolifération cellulaire et la synthèse d'ADN

De nombreuses études ont montré que PKD1 joue un rôle dans la prolifération de différents types cellulaires, notamment les kératinocytes, les cellules endothéliales et les lymphocytes T.

Dans les cellules endothéliales, le VEGF va activer la voie de signalisation ERK notamment *via* PKD1 (Wong and Jin, 2005). De plus, des études ont montré que l'expression de PKD1 stimulait également la prolifération de kératinocytes murins (Rennecke et al., 1999).

Dans les fibroblastes murins swiss 3T3, l'activation de PKD1 par la bombésine ou la vasopressine induit une augmentation de la prolifération cellulaire et de la synthèse d'ADN *via* la voie de signalisation MAPK/ERK (Chiu and Rozengurt, 2001; Sinnett-Smith et al., 2004). Ces différentes études ont montré que l'augmentation de la prolifération cellulaire et de la synthèse d'ADN était principalement due aux substrats de PKD1 (Kim et al., 2016b).

## 7.2 Rôle dans l'apoptose

De nombreuses études ont également montré que PKD1 pouvait exercer une activité anti-apoptotique. En effet, PKD1 diminue la sensibilité des cellules HeLa au TNFα (Rykx et al., 2003). Il a également été montré que PKD1 inhibe l'apoptose induite par le stress oxydatif en régulant les voies NF-κB et JNK (Storz, 2007; Storz and Toker, 2003; Storz et al., 2005).

De façon intéressante, PKD1 peut être activée par un mécanisme PKC-indépendant impliquant un clivage par la caspase-3 qui génère deux fragments de PKD1. Le fragment possédant le domaine catalytique actif pourrait jouer un rôle pro-apoptotique qui reste encore largement incompris (Endo et al., 2000; Vántus et al., 2004).

## 7.3 Rôles dans l'appareil de Golgi

De nombreux travaux ont montré que PKD1 dans sa conformation active et présentant un domaine C1b intact pouvait transloquer dans l'appareil de Golgi. PKD1 serait impliqué dans l'intégrité du transport des protéines du Golgi vers la membrane plasmique (Liljedahl et al., 2001). Il a également été montré dans des fibroblastes que PKD1 serait impliquée dans la régulation du trafic antérograde des protéines vers l'appareil de Golgi (Prigozhina and Waterman-Storer, 2004).

## 7.4 Rôle dans la réponse immunitaire

PKD1 est également impliquée dans la régulation de la signalisation induite par l'activation du BCR. Cette régulation se fait *via* l'augmentation de HPK1 (*hematopoietic progenitor kinase-1*), ce qui se traduit par une stimulation de la voie de signalisation JNK ainsi que par l'activation de NF-κB (Arnold et al., 2005; Jaggi et al., 2007).

## 7.5 Rôle dans l'adhérence et la migrationcellulaires

Des études menées sur des cellules de cancer de la prostate LnCap ont montré que l'inhibition de PKD1 par l'inhibiteur pharmacologique Gö6976 induisait une diminution de l'agrégation cellulaire. De plus, la surexpression de PKD1 dans des cellules C4-2 (cancer de la prostate) augmente l'agrégation et diminue la motilité cellulaire. Dans cette même étude, les auteurs ont aussi montré que le domaine kinase de PKD1 pouvait interagir directement avec la β-caténine (Jaggi et al., 2005a).

D'autres études ont montré que PKD1 phosphoryle la E-cadhérine, stabilisant ainsi le complexe E-cadhérine / β-caténine. La stabilisation de ce complexe va augmenter l'adhérence intercellulaire et diminuer la migration cellulaire (Jaggi et al., 2005a). De plus, il semblerait que l'activation de PKD1 par la bryostatine induit une séquestration de la β-caténine au niveau de la membrane plasmique, inhibant ainsi l'activité oncogénique qu'il exerce dans le noyau (Jaggi et al., 2005b).

PKD1 pourrait également réguler négativement la motilité cellulaire en interagissant avec les filaments d'actine dans d'autres lignées cellulaires (Durand et al., 2016). PKD1 phosphoryle des protéines régulant la polymérisation de l'actine au niveau du front de migration telles que la cortactine et SSH1L (Slingshot-1-like) (Eiseler et al., 2009). La phosphorylation de ces protéines inhibe la formation des lamellipodes et de ce fait la motilité cellulaire.

De manière controversé, il a également été montré que la phosphorylation de la cortactine par PKD1 pouvait déstabiliser le complexe E-cadhérine / β-caténine / filament d'actine et ainsi diminuerait la formation des jonctions adhérentes (Sroka et al., 2016).

Il a également été montré que PKD1 pouvait réguler la transition épithélio-mésenchymateuse dans des cellules de cancer de la prostate. En effet, la surexpression de PKD1 induit une ré-expression de marqueurs épithéliaux (E-cadhérine) et une diminution de marqueurs mésenchymateux (N-cadhérine et vimentine) (Du et al., 2010). Ces derniers résultats renforcent ainsi le rôle que pourrait jouer PKD1 dans l'adhérence et la migration cellulaires.

### 7.6 Rôle dans l'angiogenèse

Deux études récentes ont montré que PKD1 pouvait participer à l'angiogenèse en favorisant la migration des cellules endothéliales *via* la régulation de la transcription de nombreux gènes pro-angiogéniques (Ren, 2016; Zhao et al., 2014). En effet, PKD1 activé par le VEGF peut phosphoryler les HDAC entraînant l'augmentation de la migration des cellules endothéliales (Ha et al., 2008). La phosphorylation des HDAC contribue également à la formation de tubes et de micro-vaisseaux.

## 8. PKD1 et cancer

De nombreuses études ont mis en évidence l'implication de PKD1 dans le développement tumoral. PKD1 est surexprimée dans de nombreux types de cancer tels que le cancer du pancréas (Trauzold et al., 2003) et le cancer de la peau (Arun et al., 2011). Cette surexpression a été associée à une activation de la prolifération

et de la survie cellulaire, de l'invasion tumorale et de l'angiogenèse (Arun et al., 2010, 2011; Ochi et al., 2011). Ainsi, PKD1 pourrait devenir une cible thérapeutique anti-tumorale pertinente.

## 8.1 PKD1 dans le cancer du sein

Le rôle oncogénique de PKD1 dans le cancer du sein reste à ce jour largement controversé.

En effet, des études menées par notre équipe ont montré que la surexpression de PKD1 levait la dépendance aux œstrogènes pour la prolifération cellulaire et la croissance indépendante de l'ancrage des cellules MCF-7 (lignée cellulaire de carcinome mammaire humain dépendante en œstrogènes). Cette œstrogéno-indépendance s'exerce via l'activation de la voie des MAP Kinases (Karam et al., 2012). De plus, notre équipe a montré que la forte expression de PKD1 au niveau transcriptionnel chez les patientes atteintes d'un cancer du sein ER+ résistant aux traitements antihormonaux était associée à une moins bonne survie sans métastases (Karam et al., 2014). Ces dernières données viennent renforcer l'idée que PKD1 pourrait jouer un rôle dans la prolifération des cancers du sein hormono-dépendants mais également dans la résistance aux anti-hormonaux par un mécanisme d'indépendance aux œstrogènes.

Notre équipe a également montré que PKD1 pouvait réguler de manière positive la réponse aux œstrogènes dans des lignées cellulaires de cancer du sein hormono-sensibles. Cette régulation implique une augmentation de l'expression du récepteur aux œstrogènes et se traduit par une augmentation de la prolifération cellulaire (Karam et al., 2014). Ces données soulignent à nouveau le rôle que joue PKD1 dans la signalisation œstrogénique, indispensable au développement des cancers du sein hormono-dépendants

L'équipe de Kim et ses collaborateurs a montré que l'inhibition de PKD1 diminuait la prolifération cellulaire et la croissance indépendante de l'ancrage de lignées de cancer du sein résistantes à la chimiothérapie (Kim et al., 2016a). Les auteurs de cette étude ont associé ces effets à une inhibition de la voie de signalisation pro-oncogénique GSK3 / β-caténine. Le rôle de PKD1 dans la régulation de cette voie suggère un rôle potentiel de PKD1 dans d'autres cancers

dépendant de GSK3 / β-caténine.

A l'opposé, d'autres études ont montré que PKD1 pouvait avoir un rôle anti-oncogénique dans le cancer du sein. En effet, il a été établi que PKD1 peut inhiber la motilité de cellules de cancer du sein *via* la phosphorylation et l'inactivation de la protéine SSH-1L (protéine qui régule la dynamique des microfilaments d'actine). De plus, il a été montré que PKD1 pouvait diminuer l'expression de nombreuses métallo-protéases (MMP) et ainsi diminuer le pouvoir invasif des cellules. De récentes études ont également démontré un rôle de PKD1 dans la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM). En effet, son expression favoriserait le maintien d'un phénotype épithélial (Bastea et al., 2012; Borges et al., 2013; Eiseler et al., 2007, 2009). Ainsi, la régulation négative de la dynamique du cytosquelette d'actine, de la TEM, ou encore de l'expression des MMP par PKD1 suggère un rôle anti-métastatique de la protéine dans le cancer du sein.

Au total, les données publiées sur le rôle de PKD1 dans le cancer du sein sont contradictoires. Des études supplémentaires sont nécessaires pour déterminer les conditions et situations spécifiques dans lesquelles s'exercent les rôles oncogénique ou anti-oncogénique de PKD1, afin de choisir au mieux comment réguler son activité (activation ou inhibition) dans une perspective thérapeutique.

### 8.2 PKD1 dans les autres types de cancer

Dans la littérature, il a été montré que PKD1 avait un rôle pro-oncogénique dans d'autres types de cancers tels que le cancer du pancréas et le mélanome (Bollag et al., 2004; Guha et al., 2002; Ristich et al., 2006). PKD1 peut également avoir un rôle anti-oncogénique dans les cancers de la prostate, du côlon, et de l'estomac, ainsi que dans les ostéosarcomes (Du et al., 2009, 2009; Eiseler et al., 2009; Jaggi et al., 2005b; Onishi et al., 2012).

Des travaux ont montré que dans des cellules tumorales de pancréas, PKD1 induisait une diminution de l'expression de CD95 (récepteur Fas), qui permet le déclenchement de la voie extrinsèque de l'apoptose lorsqu'il est activé par son ligand (CD95L/FasL). La diminution de l'expression de CD95 observée induit une augmentation de la prolifération cellulaire et une diminution de l'apoptose. De plus, l'inhibition pharmacologique de PKD1 restaure la sensibilité des cellules à l'apoptose médiée par CD95 (Trauzold et al., 2003). Cette étude suggère un rôle anti-

apoptotique pour PKD1.

Des études menées sur le cancer de la prostate par Du et al. ont établi que la surexpression de PKD1 diminuait la croissance tumorale *in vivo* (Du et al., 2009, 2010). Il a également été montré que PKD1 pouvait moduler négativement les fonctions du récepteur aux androgènes (Mak et al., 2008). De plus, le récepteur aux androgènes peut inhiber l'expression de PKD1 alors que sa déplétion augmente le niveau d'expression de PKD1 (Zhang et al., 2017). Au total, ces données suggèrent que PKD1 pourrait avoir un rôle dans la réponse des cellules prostatiques aux androgènes et/ou dans l'hormonorésistance du cancer de la prostate, de manière analogue à ce que notre équipe a démontré dans le cancer du sein.

De façon tout à fait intéressante, et de la même manière que dans le cancer du sein, PKD1 régulerait négativement la TEM des cellules de cancer de la prostate et exercerait alors une activité anti-oncogénique (Du et al., 2010).

Enfin, une étude récente a identifié une mutation activatrice du gène *PRKD1* (Glu710Asp) dans les adénocarcinomes polymorphes de bas-grade de la glande salivaire (Weinreb et al., 2014). De manière très intéressante, cette mutation activatrice est retrouvée dans plus de 70% des cas et serait impliquée dans le développement de ce cancer. Les auteurs ont montré que des cellules épithéliales mammaires non transformées exprimant PKD1 mutée présentaient une prolifération accrue mais une motilité réduite (Weinreb et al., 2014). Ces résultats pourraient expliquer les résultats contradictoires rapportés dans la littérature quant au rôle pro- ou anti-oncogénique de PKD1.

## 9. Rôle de PKD1 dans d'autres pathologies

### 9.1 Rôle de PKD1 dans les pathologies cardiaques

De nombreuses études ont montré que PKD1 peut réguler des processus fondamentaux au niveau cardiaque tels que la contraction, la prolifération et la mort cellulaire (Dirkx et al., 2014; Fielitz et al., 2008; Harrison et al., 2006; Stathopoulou et al., 2014).

La surexpression *in vivo* de PKD1 chez la souris conduit au développement d'une cardiomyopathie dilatée, due en partie à une phosphorylation de HDAC5 par

PKD1. HDAC5 ainsi phosphorylé transloquerait du noyau vers le cytoplasme et ne pourrait plus jouer son rôle de répresseur transcriptionel (Harrison et al., 2006). Il semblerait également que PKD1 puisse phosphoryler la troponine I, ce qui réduirait la sensibilité des myofilaments au calcium et par conséquent la contraction cardiaque (Fielitz et al., 2008).

Récemment, une étude a montré que l'activation de PKD1 pourrait représenter une stratégie thérapeutique pour augmenter l'import de glucose dans les cellules cardiaques résistantes à l'insuline. En effet, Dirkx et ses collaborateurs ont montré que la surexpression de PKD1 chez des souris soumises à un régime riche en graisses n'a induit ni une augmentation des dépôts lipidiques, ni une altération de la signalisation médiée par l'insuline. Elle n'a pas induit non plus une perte de glucose, comme cela avait été observé chez les souris contrôles (Dirkx et al., 2014).

## 9.2 Rôle de PKD1 dans l'inflammation

Plusieurs études ont démontré un rôle de PKD1 dans l'inflammation (Ittner et al., 2012; Kim et al., 2010; Upadhyay et al., 2017; Varga et al., 2015). Ce rôle est cohérent avec la régulation par PKD1 de différentes voies essentielles à la réponse inflammatoire telles que les voies MAPK ou NF-kB.

Ainsi, à l'aide d'une inhibition de PKD1 par l'inhibiteur pharmacologique Gö6976 et d'une inhibition de son expression par des siRNA, Kim et ses collaborateurs ont montré que PKD1 était indispensable à l'activation des voies MAPK et NF-kB et à l'expression de diverses cytokines et chimiokines pro-inflammatoires après traitement par un agent infectieux. De plus, les souris prétraitées avec du Gö6976 présentaient un plus faible afflux de neutrophiles après exposition à l'agent infectieux. Ces résultats démontrent que PKD1 est essentielle pour les réponses immunitaires pro-inflammatoires et l'afflux de neutrophiles dans les poumons (Kim et al., 2010).

Une étude récente a également montré que l'inhibition pharmacologique de PKD1 et de VEGFR2 diminuait la réponse inflammatoire dans des lignées cellulaires humaines pro-inflammatoires (Varga et al., 2015).

Au total, ces différentes études identifient PKD1 comme un nouvel acteur de la réponse inflammatoire.

Des travaux menés par Zhu et al. ont également montré que PKD1 était impliquée dans le développement et le maintien de l'hypersensibilité à la chaleur. Ce mécanisme implique l'inhibition de TRPV1 qui est un récepteur ayant un rôle dans les mécanismes nociceptifs et s'activant en réponse à un stimulus thermique (Zhu et al., 2008).

De manière intéressante, l'activité pro-inflammatoire de PKD1 pourrait participer à ses effets oncogénique ou anti-oncogénique. En effet, de nombreuses études ont montré que des cancers pouvaient se développer à la suite d'inflammation chronique (Coussens and Werb, 2002; Todoric et al., 2016).

### 9.3 Rôle de PKD1 dans la dégénérescence neuronale

Une étude récente a montré que PKD1 pouvait réguler l'internalisation et l'activité des NMDAR (Récepteur au N-méthyl-D-aspartate). Ces récepteurs jouent un rôle important dans la plasticité synaptique. Leur phosphorylation par PKD1 va diminuer la plasticité synaptique des neurones en inhibant leurs fonctions (Fang et al., 2015).

Une seconde étude a, quant à elle, suggéré que PKD1 et PKD2 pouvaient ensemble réguler la croissance et la polarité des neurones. En effet, après inhibition stable de l'expression de PKD1 et PKD2 dans des neurones de l'hippocampe, Avriyanti et ses collaborateurs ont observé une diminution de la longueur axonale, une augmentation du nombre de neurones possédant plusieurs axones et enfin une augmentation du nombre de dendrites par neurone (Avriyanti et al., 2015).

Des travaux précédents avaient, de la même manière, suggéré l'implication de PKD1 dans le trafic membranaire des neurones. En effet, l'inhibition de PKD1 réduirait le trafic membranaire neuronal essentiel à leur bon fonctionnement (Bisbal et al., 2008).

## 10. Similarité avec les autres membres de la famille des PKD : PKD2 et PKD3

PKD1 appartient à la famille des PKD qui comprend également les protéines PKD2 et PKD3. La protéine kinase D2 et la protéine kinase D3 ont été caractérisées et clonées pour la première fois en 2000 et en 1999, respectivement.

PKD2 et PKD3 possèdent un poids moléculaire d'une centaine de kilodaltons (97 kDa pour PKD2 et 100,5 kDa pour PKD3) et partagent une forte similarité avec PKD1 avec 69% d'acides aminés identiques. Tout comme PKD1, PKD2 et PKD3 possèdent deux domaines en doigts de zinc riches en cystéines au niveau amino-terminal, un domaine PH ainsi qu'un domaine kinase proche de celui de la famille CAMK (Figure 24) (Durand et al., 2016; Wang, 2006). PKD2 et PKD3 sont fortement exprimées dans différents tissus humains et murins. De façon analogue à PKD1, PKD2 et PKD3 peuvent être activées par de nombreux facteurs de croissance et/ou neuropeptides mitogéniques, de manières PKC-dépendante ou PKC-indépendante (Hayashi et al., 1999; Sturany et al., 2001).

Les rôles de PKD2 et de PKD3 restent aujourd'hui encore peu étudiés. Cependant, l'équipe de Peter Storz a montré récemment que PKD3 était plus exprimé dans les cancers du sein triple négatif et que son inhibition pouvait diminuer la croissance tumorale *in vivo* (Borges et al., 2015). Des études précédentes avaient déjà suggéré un rôle de PKD3 dans le développement du cancer du sein triple négatif par l'activation de la voie de signalisation oncogénique mTOR (Huck et al., 2014). PKD2 pourrait également être impliquée dans le développement des cancers du sein et de la prostate (Alpsoy and Gündüz, 2015). Une autre étude a montré que PKD2 et PKD3 pouvaient coopérer pour favoriser la prolifération des cellules de cancer de la prostate (Zou et al., 2012). Une coopération de PKD2 et/ou PKD3 avec PKD1 n'est pas exclue mais n'a à ce jour pas été identifiée.




*Figure 24 : Structure et similarité de la famille des protéines kinase D* (d'après Wang, 2006)

*Le pourcentage de similarité de chaque domaine avec PKD3 est reporté sous le domaine correspondant.*

*C1a, C1b : Domaine riche en cystéine ; PH : domaine d'homologie à la pleckstrine ; kinase : Domaine catalytique.*

## 11. Inhibiteurs de PKD1

Différents inhibiteurs pharmacologiques de PKD1 ont été décrits dans la littérature.

L'inhibiteur Gö6976 a été le plus couramment employé *in vitro*. Cependant, ce composé inhibe également et de manière équivalente PKCα et PKCβ. C'est pourquoi, plusieurs nouveaux inhibiteurs pharmacologiques de PKD1 ont été identifiés. Ces inhibiteurs se sont révélés inhiber PKD1 *in vitro* avec des IC50 comprises entre 1 et 200 nM. Néanmoins, aucun d'entre eux n'est réellement spécifique de PKD1. En effet, les composés CID755673, CRT5 et CRT0066101 inhibent de manière similaire PKD1 et PKD3. De plus, une des limitations majeures de ces inhibiteurs est l'impossibilité pour la plupart d'entre eux d'être utilisés dans des expérimentations *in vivo*, du fait de leur toxicité et/ou de leur faible biodisponibilité (Arun et al., 2010; Bravo-Altamirano et al., 2011; Evans et al., 2010; Harikumar et al., 2010; Haworth and Avkiran, 2001; Lavalle et al., 2010; Sharlow et al., 2008). Il reste donc nécessaire, pour mieux comprendre le rôle de PKD1 et envisager son inhibition *in vivo*, de développer de nouvelles molécules permettant son inhibition spécifique, notamment vis-à-vis de PKD2 et de PKD3.

# CHAPITRE II
# OBJECTIFS

Depuis plusieurs années, notre équipe s'est intéressée à la famille des PKC et plus précisément à la découverte d'une nouvelle cible thérapeutique contre deux cancers : le cancer du sein qui est le cancer le plus fréquent chez la femme, et le mélanome qui est le cancer de la peau le plus invasif et le plus mortel.

Récemment, notre équipe a montré que le traitement de lignées cellulaires de mélanome métastatique par des inhibiteurs de PKCα, PKCβ et PKD1 induisait une diminution de la prolifération cellulaire et de la croissance indépendante de l'ancrage. Il également été montré que l'expression de la protéine PKD1 est plus forte dans les lignées cellulaires de mélanome métastatique ayant un phénotype le plus mésenchymateux par rapport aux lignées ayant un phénotype plus épithélial.

Le premier objectif de cette thèse est d'analyser le rôle de PKD1 dans le maintien du phénotype mésenchymateux du mélanome. Nous allons ainsi étudier l'impact du traitement par les inhibiteurs de PKCα, PKCβ et PKD1 (Gö6976 et Gö6983) sur des lignées cellulaires de mélanome métastatique ayant un phénotype mésenchymateux ou épithélial et exprimant différents niveaux de PKD1. Pour cela, nous allons analyser l'expression et la localisation de différents marqueurs de phénotypes mésenchymateux et épithéliaux tel que les cadhérines E et N- et la β-caténine après traitements avec les inhibiteurs. Dans ce travail nous allons également observer par microscopie confocale la morphologie de ces cellules après traitements avec ces mêmes inhibiteurs. En effet, les cellules mésenchymateuses et donc plus agressives ont une morphologie bien distinctes de celles ayant un phénotype plutôt épithélial.

Du fait de son rôle pro-tumoral, PKD1 apparaît comme une cible thérapeutique non seulement dans le mélanome mais également dans le cancer du sein. En effet, une étude récente menée par notre équipe a montré que la surexpression de PKD1 dans les cellules de cancer du sein oestrogéno-dépendante MCF-7 augmente la prolifération cellulaire par le biais de la stimulation de la transition de la phase G1 à la phase S du cycle cellulaire ainsi que la croissance indépendante de l'ancrage (Karam et al., 2012). De même, son inhibition réduit la prolifération cellulaire. Ces premiers résultats ont donc permis la mise en évidence des propriétés oncogéniques de PKD1 dans le cancer du sein *in vitro*.

Par la suite, notre équipe a montré que la sur-expression de PKD1 dans ces

mêmes cellules MCF-7 pouvait lever la dépendance aux œstrogènes et leurs permettait ainsi de proliférer, de former des colonies en milieu semi-solide *in vitro* en l'absence d'œstrogènes. Ils ont également montré que cette sur-expression permettait la formation de tumeurs *in vivo* chez la souris *nude* sans ajout d'œstrogènes, ce qui n'est pas le cas avec les cellules parentales MCF-7 qui elles, sont dépendantes en œstrogènes (Karam et al., 2012).

De plus, l'analyse de l'expression en ARNm de *PRKD1* (gène codant pour la protéine PKD1) dans des tissus tumoraux prélevés chez des patientes ayant un cancer du sein REα positif a montré qu'une forte expression de *PRKD1* est associée à une moins bonne survie sans développement de métastases après traitement au Tamoxifène (anti-hormonaux) (Karam et al., 2014).

Ces différentes études ont permis la mise en évidence d'une relation directe entre l'expression de PKD1 d'une part et la perte de dépendance aux œstrogènes ainsi que la résistance aux traitements anti-oestrogéniques dans le cancer du sein ERα positif, d'autre part. Ainsi, PKD1 pourrait devenir une cible thérapeutique pour le traitement des cancers du sein ERα positifs mais non dépendants en œstrogènes et pourrait peut-être contourner la résistance aux traitements hormonaux.

Au vue de ces résultats, le second objectif de cette thèse est d'étudier la valeur pronostique de *PRKD1* dans la population totale de cancer du sein et de vérifier si PKD1 pouvait être une cible thérapeutique pertinente.

Dans ce but, nous allons analyser l'expression en ARNm de *PRKD1* au sein d'une cohorte de 527 tumeurs de seins de patientes de l'Institut Curie pour laquelle les données pathologiques, biologiques et cliniques sont connues. Nous allons étudier l'impact d'une inhibition pharmacologique ou d'une inhibition de l'expression de PKD1 par des siRNA *in vitro* au sein de lignée cellulaires de cancer du sein triple négative. Afin de réaliser l'inhibition pharmacologique spécifique de PKD1, nous allons en collaboration avec la société AB Science développer des inhibiteurs pharmacologiques de PKD1. L'objectif de ma thèse est également de définir à la suite de différents tests *in vitro* le meilleur inhibiteur pour réaliser l'inhibition de PKD1 au sein de lignées de cancer du sein triple négative. Finalement, nous allons étudier l'impact d'une inhibition pharmacologique de PKD1 *in vivo* au sein de xénogreffes de cancer du sein triple négatif dérivés de patients (PDX).

Dans la littérature, il a été montré que PKD1 avait un rôle pro-oncogénique au

niveau de différents types de cancers, ce qui nous a amené à nous intéresser au niveau d'expression de *PRKD1* dans d'autres types tumoraux que le cancer du sein. Le troisième objectif de cette thèse est alors d'analyser l'expression de *PRKD1* en ARNm au niveau de deux cohortes de multi-cancers (PDX et tumeurs) dont nous disposons à l'Institut Curie.

# CHAPITRE III
# RESULTATS

# PKD1 et mélanome

## Article 1: Protein kinase C inhibitor Gö6876 but not Gö6983 induces the reversion of E- to N- cadherin switch and metastatic phenotype in melanoma: identification of the role of protein kinase D1

Messaouda Merzoug Larabi*, Caroline Spasojevic*, Marianne Eymard, Caroline Hugonin, Christian Auclair et Manale Karam

*BMC Cancer*, *Janvier 2017*

*co-premier auteur

Notre équipe s'est intéressée à l'implication de la famille de PKC et plus précisément à PKD1 au sein du mélanome. En effet, comme nous avons pu le voir précédemment, les PKC ont été montrées comme largement impliquées dans le développement tumoral et plus particulièrement dans le développement tumoral du mélanome. De ce fait, des études préliminaires menées par notre équipe ont montré que le traitement par des inhibiteurs pharmacologiques spécifiques de PKCα, PKCβ et PKD1 sur des lignées cellulaires de mélanome métastasique ganglionnaire (M2 et M4T2) réduisait la prolifération cellulaire.

De plus, notre équipe a également montré que la protéine kinase D1 était plus fortement exprimée au sein des lignées cellulaire de mélanome ayant un phénotype de type mésenchymateux et donc plus agressives. A l'inverse, PKD1 était peu ou pas exprimée au sein de lignées cellulaires de mélanome ayant un phénotype épithélial.

Au vu de ces résultats préliminaires, le premier objectif de ma thèse était d'analyser l'impact du traitement par les inhibiteurs de PKCα, PKCβ et PKD1 sur des lignées cellulaires de mélanome métastatique ayant un phénotype mésenchymateux et exprimant fortement PKD1. Pour cela nous avons analysé dans un premier temps l'effet du traitement par un inhibiteur spécifique de PKD1, PKCα et PKCβ (Gö6976) ou un inhibiteur spécifique de PKCα et PKCβ uniquement (Gö6983) sur une lignée ganglionnaire métastatique de mélanome de type mésenchymateuse. Nous avons ainsi analysé l'expression de marqueurs mésenchymateux nécessaires à la progression mélanocytaire (i.e : *switch* de E- et N-cadhérine). Les premiers résultats

ont montré que la molécule Gö6976 et non l'inhibiteur Gö6983 induisait un *switch* d'expression des cadhérines (perte d'expression de la N-cadhérine et ré-expression la E-cadhérine). Nous avons également mis en évidence que le Gö6976 uniquement induisait un remodelage du cytosquelette d'actine se traduisant par une perte de la forme fibroblastoïde et une relocalisation au niveau cytoplasmique de la β-caténine qui était jusqu'alors nucléaire.

Ces premiers résultats ont permis, grâce aux différentiels de spécificité de ces deux inhibiteurs d'identifier PKD1 comme impliquée dans ces changements induits par le Gö6976 et non retrouvés avec le traitement par le Gö6983. Nous avons également montré que le Gö6976 réduit la croissance indépendante de l'ancrage des cellules, la prolifération cellulaire, la migration et l'invasion cellulaire.

A la suite de cela, notre équipe a analysé l'effet d'une inhibition stable de l'expression de PKD1 par des shRNA au sein de la lignée cellulaire de mélanome métastatique ganglionnaire M2. Les résultats ont montré une diminution de l'agressivité tumorale *via* des tests fonctionnels tels que la clonogénicité, la migration et l'invasion cellulaire. Cependant, les résultats concernant le *switch* de cadhérines et le changement morphologique restent eux non concluants pour les clones où l'inhibition de l'expression de PKD1 a été réalisée.

Grâce à ces résultats, cette étude nous a ainsi permis d'identifier PKD1 comme ayant un rôle dans le maintien du phénotype mésenchymateux au sein du mélanome.

Merzoug-Larabi et al. BMC Cancer (2017) 17:12
DOI 10.1186/s12885-016-3007-5

BMC Cancer

RESEARCH ARTICLE Open Access

# Protein kinase C inhibitor Gö6976 but not Gö6983 induces the reversion of E- to N-cadherin switch and metastatic phenotype in melanoma: identification of the role of protein kinase D1

Messaouda Merzoug-Larabi[1†], Caroline Spasojevic[1,2†], Marianne Eymard[1], Caroline Hugonin[1], Christian Auclair[1] and Manale Karam[1,3*]

**Abstract**

**Background:** Melanoma is a highly metastatic type of cancer that is resistant to all standard anticancer therapies and thus has a poor prognosis. Therefore, metastatic melanoma represents a significant clinical problem and requires novel and effective targeted therapies. The protein kinase C (PKC) family comprises multiple isoforms of serine/threonine kinases that possess distinct roles in cancer development and progression. In this study, we determined whether inhibition of PKC could revert a major process required for melanoma progression and metastasis; i.e. the E- to N-cadherin switch.

**Methods:** The cadherin switch was analyzed in different patient-derived primary tumors and their respective metastatic melanoma cells to determine the appropriate cellular model (aggressive E-cadherin-negative/N-cadherin-positive metastasis-derived melanoma cells). Next, PKC inhibition in two selected metastatic melanoma cell lines, was performed by using either pharmacological inhibitors (Gö6976 and Gö6983) or stable lentiviral shRNA transduction. The expression of E-cadherin and N-cadherin was determined by western blot. The consequences of cadherin switch reversion were analyzed: cell morphology, intercellular interactions, and β-catenin subcellular localization were analyzed by immunofluorescence labeling and confocal microscopy; cyclin D1 expression was analyzed by western blot; cell metastatic potential was determined by anchorage-independent growth assay using methylcellulose as semi-solid medium and cell migration potential by wound healing and transwell assays.

**Results:** Gö6976 but not Gö6983 reversed the E- to N-cadherin switch and as a consequence induced intercellular interactions, profound morphological changes from elongated mesenchymal-like to cuboidal epithelial-like shape, β-catenin translocation from the nucleus to the plasma membrane inhibiting its oncogenic function, and reverting the metastatic potential of the aggressive melanoma cells. Comparison of the target spectrum of these inhibitors indicated that these observations were not the consequence of the inhibition of conventional PKCs (cPKCs), but allowed the identification of a novel serine/threonine kinase, i.e. protein kinase Cμ, also known as protein kinase D1 (PKD1), whose specific inhibition allows the reversion of the metastatic phenotype in aggressive melanoma.
(Continued on next page)

* Correspondence: manale.karam@gmail.com; mdoldur@qf.org.qa
†Equal contributors
[1]LBPA, ENS Cachan, CNRS, Université Paris-Saclay, Cachan 94235, France
[3]Qatar Biomedical Research Institute, Hamad Bin Khalifa University, Qatar Foundation, Doha 5825, Qatar
Full list of author information is available at the end of the article

BioMed Central

© The Author(s). 2017 **Open Access** This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.

(Continued from previous page)

**Conclusion:** In conclusion, our study suggests, for the first time, that while cPKCs don't embody a pertinent therapeutic target, inhibition of PKD1 represents a novel attractive approach for the treatment of metastatic melanoma.

**Keywords:** Gö6976, Protein kinase C, Protein kinase D1, Cadherin switch, Melanoma, Metastasis

## Background

Melanoma is a highly metastatic and deadly type of cancer that arises from melanocytes, melanin-producing cells residing in the basal layer of the epidermis and necessary for protection of skin cells from deleterious effects of ultraviolet light. The incidence of melanoma is increasing very fast worldwide [1]. When diagnosed early, most patients with primary melanoma can be cured by surgical resection. However, if not detected and removed early, melanoma cells can metastasize rapidly. Metastatic melanoma has historically been considered an untreatable disease, where standard treatment options produced modest response rates and failure to improve overall survival [2, 3]. Recently, the treatment landscape for advanced melanoma was revolutionized by the development of new targeted and immune therapeutic strategies. Particularly, BRAF/MAPK pathway inhibitors and immune checkpoint inhibitors have proven to significantly improve survival in melanoma patients in comparison to traditional therapeutics [4, 5]. However, many patients develop resistance to MAPK inhibitor therapies and most patients do not respond to immunotherapies. Therefore, metastatic melanoma represents an important health problem and requires novel and effective targeted therapies.

In human epidermis, normal melanocytes interact with keratinocytes through the adhesion molecule E-cadherin. This communication maintains differentiation state of melanocytes and control their proliferation and migration [6, 7]. Transformation of melanocytes into melanoma entails a number of genetic and environmental factors involving cell adhesion and growth regulatory genes. One key event allowing melanoma progression is the loss of E-cadherin and gain of another member of classical cadherins, i.e. N-cadherin [8, 9]. This cadherin switch results in the loss of keratinocyte-mediated growth and motility control [6] and enables melanoma cells to interact directly with N-cadherin-expressing stromal cells from the dermis, such as fibroblasts and vascular or lymphoid endothelial cells [10]. These events are crucial to allow melanoma cells to metastasize.

E- and N-cadherin are members of the classical cadherin family that play an important role in cell-cell adhesion regulating morphogenesis during embryonic development and maintaining integrity in developed tissues [11]. These transmembrane glycoproteins mediate calcium-dependent intercellular adhesion in a homophilic manner. Cadherin-mediated cell-cell junctions are formed as a result of interaction between extracellular domains of identical cadherins, which are located on the membrane of neighboring cells. The stability of these adhesive junctions is insured by binding of the intracellular cadherin domain with the actin cytoskeleton through the cytoplasmic proteins α-, β- and γ-catenins [12]. The E-cadherin is expressed by most normal epithelial tissues and N-cadherin is typically expressed by mesenchymal cells which, in contrast to epithelial cells, are non-polarized, elongated, less adherent between each other, motile and resistant to anoikis [13]. However, many epithelium-derived cancer cells have lost E-cadherin expression and inappropriately express N-cadherin. This cadherin switch has been shown to promote tumor growth, motility and invasion through a process called epithelial-mesenchymal transition (EMT) [6, 14–16] and to be associated with metastasis and poor prognosis in patients [17, 18]. Since functional restoration of E-cadherin or depletion of N-cadherin in melanoma cells inhibits tumor cell growth, motility and invasion in vitro and reduces tumorigenicity in vivo [6, 19], identification of molecular mechanisms reverting the E- to N-cadherin switch may be a way to identification of new potential therapeutic targets for melanoma treatment.

The protein kinase C (PKC) family of serine/threonine kinases includes multiple isozymes that are divided into three groups, conventional, novel, or atypical, depending on their requirements for $Ca^{2+}$ or diacylglycerol for activation [20]. Signaling through PKCs is induced by a remarkable number of stimuli, including G-protein-coupled receptor agonists and growth factors. Individual PKC isozymes regulate a varied array of biological processes including cell proliferation, survival, migration and apoptosis. They are involved in the development and progression of different types of cancer including melanoma [21, 22]. PKCu, also known as PKD1 (protein kinase D1) was initially described as a member of the PKC family [23]. However, PKD1 possesses distinct substrate specificity [24] and has therefore recently been classified as a novel subgroup of the calcium/calmodulin-dependent kinase (CAMK) family [25]. Despite the new classification of PKD1, this serine/threonine kinase shares with conventional and novel PKCs common activators, such as phorbol esters [24], as well as potent inhibitors such as Gö6976 [26, 27]. Phorbol esters and Gö6976 inhibitor has been shown to regulate cell junctions, cadherin expression and

migration [28, 29]. However, to date, the role of PKCs in cadherin switch and melanoma progression remains unknown.

In the present study, we analyzed whether PKC inhibitors Gö6976 and Gö6983 would revert the E- to N-cadherin switch and metastatic phenotype in aggressive melanoma cells.

## Methods

### Antibodies and materials

The primary antibodies used were rabbit anti-E-cadherin, rabbit anti-N-cadherin, mouse anti-β-catenin and rabbit anti-PKD1 (1/500 for western blot and 1/50 for immunofluorescence; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), goat anti-actin (1/200 for western blot; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) and rabbit anti-cyclin D1 (1/1000 for western blot, Cell signaling technology, Denvers, MA). Horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies used were goat anti-rabbit IgG (1/2000; Dako, Glostrup, Denmark), rabbit anti-goat IgG (1/2000 Santa Cruz Biotechnology) and goat anti-mouse IgG (1/5000; Rockland, Gilbertsville, PA). The Alexa Fluor-conjugated secondary antibodies were Alexa-Fluor-594-conjugated donkey anti-rabbit IgG, Alexa-Fluor-488-conjugated donkey anti-mouse IgG conjugated (1/200; Invitrogen, Cergy-Pontoise, France). Actin was stained with Alexa-Fluor-488-conjugated phalloidin (1/50; Invitrogen, Cergy-Pontoise, France). The nucleus was stained with 4',6-diamidino-2-phenylindole DAPI (1/50000; Invitrogen, Cergy-Pontoise, France). Gö6976 and Gö6983 were purchased from Calbiochem (Darmstadt, Germany). All other biochemicals were from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO).

### Cell culture

Primary (T1 and I5), their respective lymph-node metastasis (G1 and M2), and the cutaneous metastasis (M4T2) melanoma cell lines were obtained from 70-77-year old patients from Institut Gustave Roussy (Villejuif, France), as previously described [30]. These cells were cultured in RPMI medium supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), 100 units/mL penicillin and 100 μg/mL streptomycin (P/S), and 1 mM sodium pyruvate (complete medium).

### Stable shRNA lentiviral transduction

For stable PKD1 depletion, cells were infected with human PKCμ shRNA (sc-36245-v) or control shRNA (sc-108080) lentiviral transduction particles from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA) according to the manufacturer's protocol. Stable clones expressing the shRNA were selected with 2 μg/mL puromycin.

### Western blot analysis

Cells were lysed for 20 min at 4 °C in 50 mM Tris–HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 100 mM sodium fluoride, 10 mM tetra-sodium diphosphate decahydrate, 2 mM sodium orthovanadate, 1 mM phenylmethylsulfonylfluoride, 10 μg/mL aprotinin and 1% Nonidet P-40. Lysates were clarified by centrifugation at 14,000 rpm for 10 min at 4 °C. 30–80 μg of total protein extracts were separated by SDS-PAGE and transferred onto nitrocellulose membranes. These were incubated with the specific antibodies overnight at 4 °C and revealed by enhanced chemiluminescence (Amersham, GE Healthcare, UK).

### MTT assay

Cells were seeded in quadruplicates into 96-well plates at a density of 1,000 cells per well in complete medium and incubated for 1 to 6 days at 37 °C, 5% $CO_2$. On the day of analysis, cells were incubated with 0.5 mg/ml MTT for 2 h at 37 °C. Then, 10% SDS were added to each well and incubated for 16 h at 37 °C. Absorbance value (OD) was measured at 570 nm.

### Colony formation assay

Cells were resuspended in 2.5 mL of methylcellulose (0.8%) prepared in complete medium containing vehicle control (DMSO), 1 μM Gö6976 or 1 μM Gö6983. Cells were then plated in uncoated 35 mm culture dishes and incubated at 37 °C in a humidified atmosphere at 5% CO2 for 3 weeks. Colonies were then photographed and counted under a light microscope using a grid.

### Wound healing assay

The scratch wound was created using 200 μL sterile pipette tip in a confluent cell culture pre-treated for 24 h with DMSO, 1 μM Gö6976 or 1 μM Gö6983. The scratch area was washed and cells were re-incubated with the same inhibitors. The images were taken at 0, 16 and 24 h. The lines show the area where the scratch wound was created.

### Transwell migration assay

24-well transwell chambers (Corning Costar, Corning, NY, USA) with 8.0-μm pore size polycarbonate membrane were used. 100,000 cells were plated in duplicates in 200 μL serum-free RPMI medium in the upper well. Complete medium was added to the lower well. After 24 h of incubation, cells that migrated through the membrane to the lower well were all counted by light microscopy.

### Immunofluorescence

Cells cultured on cover glass slides (Menzel-Gläser; Braunschweig, Germany) were fixed and permeabilized with Cytofix-Cytoperm solution (BD Biosciences, Le Pont

de Claix, France) for 10 min at room temperature. Cells were washed with 2% glycine solution, then blocked with blocking buffer containing 2% FBS and 0.5% saponin in PBS for 30 min at 37 °C. Cells were incubated with the primary antibodies, then with Alexa Fluor-conjugated secondary antibodies or phalloidin for 1 h at room temperature each. DAPI was added for 2–3 min at room temperature. The slides were mounted with Mowiol solution (Southern Biotech, Birmingham, AL). Immunofluorescence images were acquired with inverted epifluorescence or confocal microscopes and analyzed with IMSTAR or LEICA softwares, respectively.

#### Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

Soluble E-cadherin was detected in conditioned media from shRNA lentiviral transduced cells with sandwich ELISA (Human E-cadherin EIA Kit, Takara Bio, Osaka, Japan), according to the manufacturer's specifications. Briefly, samples were added, in triplicates, to the wells and then incubated in the dark for 2 h at 37 °C. The wells were washed 3 times with TBS containing 0.1% Tween-20 and 5 mM $CaCl_2$. The antibody conjugated to peroxidase and specific to human E-cadherin was added for 1 h at 37 °C, the wells were washed 4 times and then the substrate solution (TMBZ) was added for 15 min at room temperature before the reaction was stopped with 1 N sulfuric acid. The plate was read at 450 nm.

## Results

#### Comparative analysis of E- and N-cadherin expression and oncogenic properties between primary melanoma cells and their respective metastatic cells

To study the possibility to revert the E- to N-cadherin switch and the tumor phenotype in metastatic melanoma, the appropriate cellular model (i.e. aggressive metastasis-derived melanoma cells that do not express E-cadherin but strongly express N-cadherin) was first selected. Therefore, the expression of these cadherins and the oncogenic properties (i.e. anchorage-dependent and -independent growth and migration) were analyzed in two couples of primary and corresponding lymph-node metastasis melanoma cells. I5 (primary tumor) and M2 (lymph-node metastasis) cell lines were derived from the same patient. T1 (primary tumor) and G1 (lymph-node metastasis) cell lines were derived from another patient.

The expression of E- and N-cadherins in I5, M2, T1 and G1 melanoma cell lines was analyzed by western blot (Fig. 1a). High expression levels of E-cadherin and very low expression levels of N-cadherin were found in T1 and G1 cells. On the other hand, both I5 and M2 cells were found to express N-cadherin but not E-cadherin. Specifically, the metastatic M2 cells showed a significant 5-fold increase in N-cadherin expression level in comparison to their corresponding primary tumor cells (I5). These results suggest that the I5 and M2 melanoma cells arise from melanocyte(s) that underwent the cadherin switch.

The proliferation (Fig. 1b), anchorage-independent growth (Fig. 1c) and migration (Fig. 1d) of the melanoma cell lines were also analyzed. Except for the I5 cell line, these mesenchymal features strongly and significantly correlate with high N-cadherin and low E-cadherin expression in our set of melanoma models (Additional file 1). Furthermore, significantly higher proliferation, anchorage-independent growth (anoikis resistance) and migration rates were found in M2 cells that don't express E-cadherin but express the highest level of N-cadherin compared to I5, T1 and G1 cells. Thus, the M2 cell line is the most aggressive among this set of melanoma models.

Taken together, these results suggest that the highly aggressive E-cadherin-negative/N-cadherin-positive metastatic M2 cell line is an appropriate cellular model to study the possibility to induce the reversion of the cadherin switch and tumor phenotype in aggressive metastatic melanoma.

#### Effect of Gö6976 and Gö6983 on E- and N-cadherin expression in M2 metastatic melanoma cells

To determine whether PKC inhibitors may affect the expression of E- and/or N-cadherin in metastatic melanoma cells, M2 cells were incubated with 1 μM Gö6976 or 1 μM Gö6983 for different periods of time (0, 1, 3, 24 and 48 h), then analyzed by western blot (Fig. 2). Compared to untreated control cells (0 h), Gö6976-treated cells exhibited an induced expression of E-cadherin and a significantly decreased (by approximately 50%) expression of N-cadherin as soon as 1 h and 3 h of treatment, respectively. This Gö6976-induced N- to E-cadherin switch was maintained for at least 48 h. However, treatment of the M2 cells with Gö6983 affected neither N-cadherin nor E-cadherin expression. These results demonstrate that Gö6976 but not Gö6983 induces E-cadherin and reduces N-cadherin expression in M2 metastatic melanoma cells.

#### Effect of Gö6976 and Gö6983 on the morphology and intercellular interactions of M2 metastatic melanoma cells

The cadherin switch is a major event of the EMT during tumor progression that entails profound morphological changes to a cell and affects intercellular interactions [16]. Therefore, the effect of the PKC inhibitors (Gö6976 and Gö6983) on the M2 cell morphology and intercellular interactions was analyzed by actin labeling and fluorescent microscopy (Fig. 3a). Untreated cells (0 h) showed a typical elongated mesenchymal-like shape and formed very few cell-cell contacts. Treatment with Gö6976 induced a rapid cell shape change from elongated to cuboidal accompanied by a strong increase in cell-cell interactions

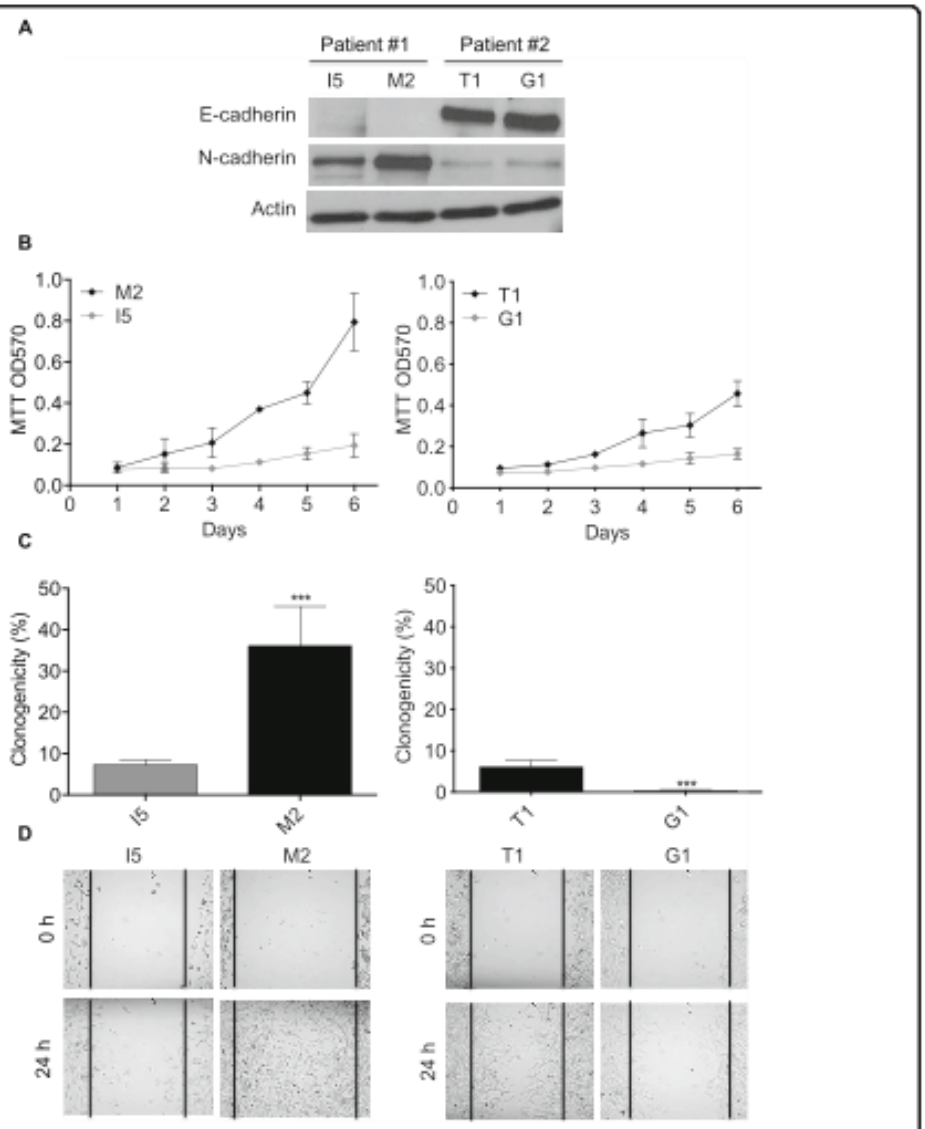



**Fig. 1** Comparative analysis of E- and N-cadherin expression and oncogenic properties between primary tumor and respective metastatic melanoma cell lines **a**. Protein extracts from the primary tumor (I5 and T1) and respective lymph-node metastatic (M2 and G1) melanoma cell lines were analyzed by western blot using anti-E-cadherin, anti-N-cadherin and anti-actin antibodies. The results presented are those of typical experiments. **b**. The proliferation of I5, M2, T1 and G1 cells was analyzed over six days by MTT assay. Results presented are the means ± SD for three independent experiments. **c**. I5, M2, T1 and G1 cells were cultured in methylcellulose semi-solid medium for three weeks. Then, the colonies formed were counted. The results are presented as the percentage of seeded cells that form colonies (clonogenicity) and are the means ± SD for three independent experiments. ***, $p < 0.005$ versus respective primary tumor cells. **d**. Representative images of cell migration evaluated by wound healing assay. Images of wound repair were taken at 0 and 24 h after wound

(Fig. 3a). These changes were observed as early as 1 h after treatment with Gö6976 and were maintained for at least 48 h. In contrast, Gö6983-treated cells remained elongated and isolated (Fig. 3a). Thus, Gö6976 but not Gö6983 induces a rapid cell shape modification from an elongated mesenchymal-like structure into a "cuboidal" epithelial-like

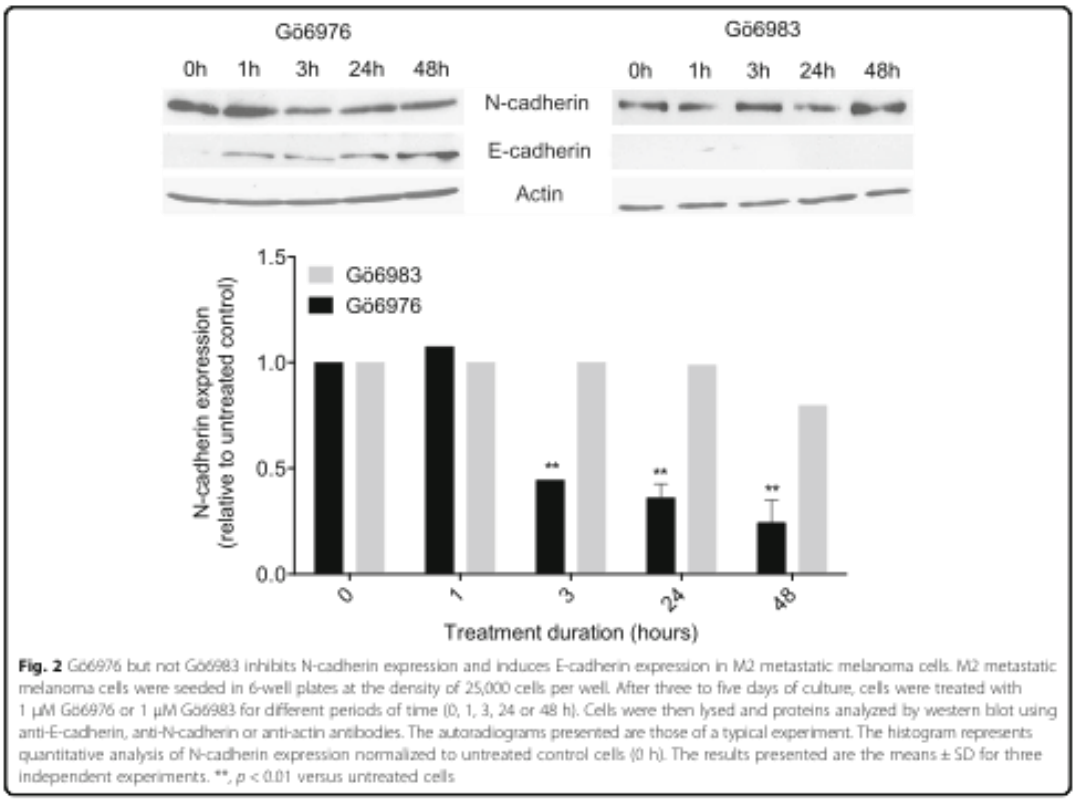



**Fig. 2** Gö6976 but not Gö6983 inhibits N-cadherin expression and induces E-cadherin expression in M2 metastatic melanoma cells. M2 metastatic melanoma cells were seeded in 6-well plates at the density of 25,000 cells per well. After three to five days of culture, cells were treated with 1 μM Gö6976 or 1 μM Gö6983 for different periods of time (0, 1, 3, 24 or 48 h). Cells were then lysed and proteins analyzed by western blot using anti-E-cadherin, anti-N-cadherin or anti-actin antibodies. The autoradiograms presented are those of a typical experiment. The histogram represents quantitative analysis of N-cadherin expression normalized to untreated control cells (0 h). The results presented are the means ± SD for three independent experiments. **, $p < 0.01$ versus untreated cells

shape and a strong increase in intercellular interactions in M2 metastatic melanoma cells.

### Cellular localization of the Gö6976-induced E-cadherin molecules

Since Gö6976 was found to regulate the expression of the cell adhesion molecules N- and E-cadherins as well as the intercellular interactions of M2 cells (Figs. 2 and 3a), the subcellular localization of these cadherins was next analyzed. Therefore, M2 cells were treated with Gö6976 or Gö6983 for 24 h before actin and N-cadherin (Fig. 3b) or E-cadherin (Fig. 3c) fluorescent co-staining and confocal microscopy analysis. Whatever the condition, N-cadherin staining was mostly localized in the cytoplasm (Fig. 3b). On the other hand, E-cadherin staining was observed only in Gö6976-treated, but not in untreated or Gö6983-treated cells and was strongly increased at the cell-cell contacts (Fig. 3c). Thus, Gö6976-incited cell clustering is associated with induced E-cadherin expression and localization at the intercellular interactions.

### Effect of Gö6976 and Gö6983 on the subcellular localization of β-catenin

The stability of E-cadherin-mediated intercellular interactions requires the accumulation of β-catenin at the plasma membrane at these cell-cell contact sites [31]. Loss of E-cadherin expression during EMT and tumor progression is accompanied by β-catenin translocation to the nucleus where it acts as oncogenic transcription factor [32, 33]. Since Gö6976-treatment induces the expression of E-cadherin at the cellular junctions in the E-cadherin-negative metastatic melanoma cells (M2 cells), the status of β-catenin in these cells and the effect of the PKC inhibitors (Gö6976 and Gö6983) on its subcellular localization and expression were determined (Fig. 4a and b). In untreated M2 mesenchymal-like melanoma cells (0 h), β-catenin was accumulated at high levels in the nuclei of the cells in addition to its location at the plasma membrane (Fig. 4a). When the cells were treated with Gö6976, β-catenin staining disappeared from the nuclei as soon as 1 h of treatment and was observed at the plasma membrane (Fig. 4a, left column). This Gö6976-induced relocation of β-catenin

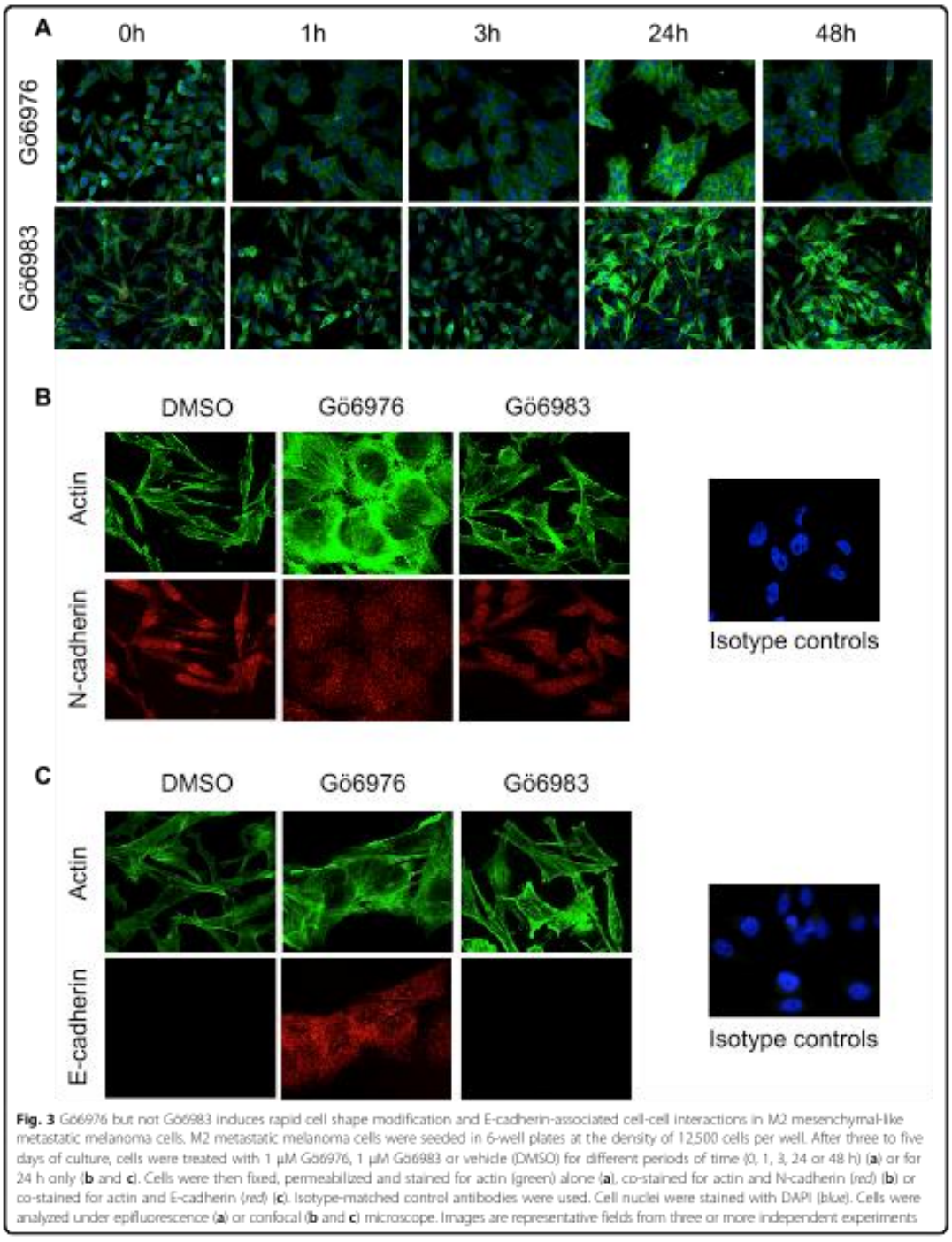



**Fig. 3** Gö6976 but not Gö6983 induces rapid cell shape modification and E-cadherin-associated cell-cell interactions in M2 mesenchymal-like metastatic melanoma cells. M2 metastatic melanoma cells were seeded in 6-well plates at the density of 12,500 cells per well. After three to five days of culture, cells were treated with 1 μM Gö6976, 1 μM Gö6983 or vehicle (DMSO) for different periods of time (0, 1, 3, 24 or 48 h) (**a**) or for 24 h only (**b** and **c**). Cells were then fixed, permeabilized and stained for actin (green) alone (**a**), co-stained for actin and N-cadherin (*red*) (**b**) or co-stained for actin and E-cadherin (*red*) (**c**). Isotype-matched control antibodies were used. Cell nuclei were stained with DAPI (blue). Cells were analyzed under epifluorescence (**a**) or confocal (**b** and **c**) microscope. Images are representative fields from three or more independent experiments

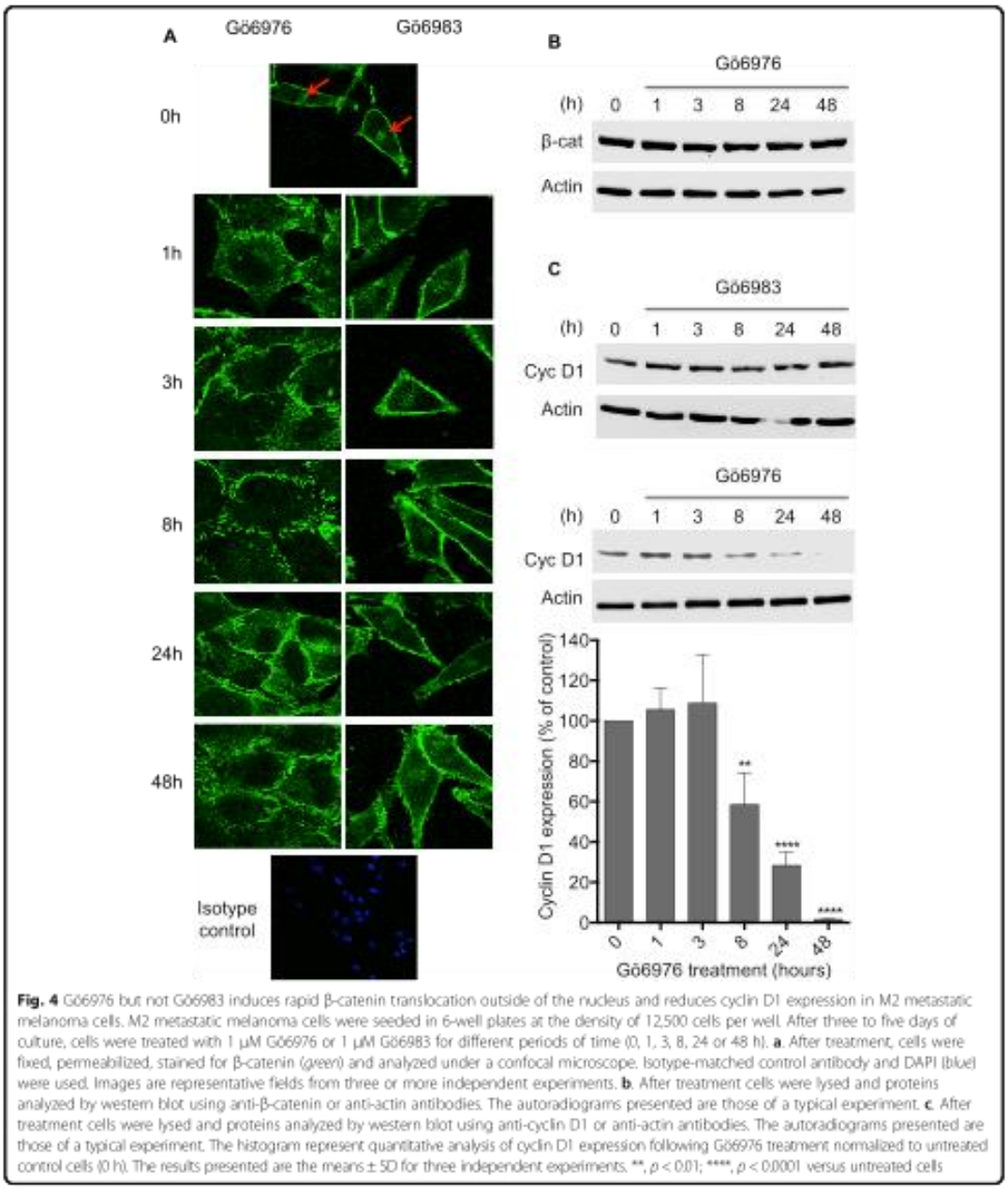



**Fig. 4** Gö6976 but not Gö6983 induces rapid β-catenin translocation outside of the nucleus and reduces cyclin D1 expression in M2 metastatic melanoma cells. M2 metastatic melanoma cells were seeded in 6-well plates at the density of 12,500 cells per well. After three to five days of culture, cells were treated with 1 μM Gö6976 or 1 μM Gö6983 for different periods of time (0, 1, 3, 8, 24 or 48 h). **a**. After treatment, cells were fixed, permeabilized, stained for β-catenin (*green*) and analyzed under a confocal microscope. Isotype-matched control antibody and DAPI (blue) were used. Images are representative fields from three or more independent experiments. **b**. After treatment cells were lysed and proteins analyzed by western blot using anti-β-catenin or anti-actin antibodies. The autoradiograms presented are those of a typical experiment. **c**. After treatment cells were lysed and proteins analyzed by western blot using anti-cyclin D1 or anti-actin antibodies. The autoradiograms presented are those of a typical experiment. The histogram represent quantitative analysis of cyclin D1 expression following Gö6976 treatment normalized to untreated control cells (0 h). The results presented are the means ± SD for three independent experiments. **, $p < 0.01$; ****, $p < 0.0001$ versus untreated cells

from the nucleus to the plasma membrane was stable and maintained for at least 48 h of treatment (Fig. 4a, left column). Noteworthy, Gö6976 did not affect β-catenin expression (Fig. 4b). On the other hand, when the cells were treated with Gö6983, β-catenin was still located at high levels in the nuclei of the cells whatever the duration of treatment (1–48 h) (Fig. 4a, right column). In conclusion, Gö6976, but not Gö6983, induces the translocation of β-catenin from the nucleus to the plasma membrane.

### Effect of Gö6976 on cyclin D1 expression

To determine whether the Gö6976-induced relocation of β-catenin from the nucleus to the plasma membrane was associated with a decrease in its oncogenic function, the effect of Gö6976 treatment on the expression of a major β-catenin target, i.e. the oncoprotein cyclin D1, was analyzed (Fig. 4c). M2 cells were incubated with Gö6976 or Gö6983 for different periods of time then lysed and cyclin D1 expression analyzed by western blot using a specific antibody. As shown in Fig. 4a, cyclin D1 was strongly expressed in untreated M2 cells (0 h). Gö6976 treatment markedly inhibited cyclin D1 expression levels over time; by approximately 41% and 93% after 8 and 48 h of treatment, respectively. Thus, Gö6976 treatment inhibits cyclin D1 expression in M2 melanoma cells. In contrast to Gö6976, Gö6983 didn't have any significant effect on cyclin D1 expression. These data further confirm that the reduction in cyclin D1 by Gö6976 may reflect changes in cadherin expression patterns.

### Effect of Gö6976 and Gö6983 on the metastatic and migration potential of M2 melanoma cells

Loss of E-cadherin expression, nuclear localization of β-catenin and cyclin D1 expression are characteristics that have been shown to correlate with transformation, increased oncogenic activity and progression of most cancers, including melanoma [9, 34]. To test whether the Gö6976-induced reversion of these characteristics (Figs. 1, 2, 3 and 4) correlates with a reduced aggressivity of the metastatic melanoma cells, the effect of this inhibitor on the anchorage-independent growth (reflecting cell metastatic potential) and migration capacity of the M2 cells was determined (Fig. 5).

Anchorage-independent growth was analyzed by studying the ability of M2 cells treated or not with Gö6976 or Gö6983 to survive, grow and form colonies in the methylcellulose semi-solid medium. As shown in Fig. 5a, Gö6976 strongly reduced the number and volume of the colonies formed in methylcellulose (by 54% and 93.2% respectively), whereas Gö6983 had no significant effect. Gö6976 also strongly inhibited by 62.9% (Fig. 5b) and 91.9% (Fig. 5c) the horizontal (wound healing assay) and chemotactic (transwell assay) migrations, respectively.

Noteworthy, although the horizontal migration was not affected by Gö6983 (Fig. 5b), this inhibitor significantly reduced, by 50%, the chemotactic migration of M2 cells but to a lesser extent than Gö6976 (percentage of inhibition = 93.2%) (Fig. 5c).

Together, these results indicate that the Gö6976-induced E-cadherin expression, membrane translocation of β-catenin and loss of cyclin D1 expression correlate with a decreased anchorage-independent growth and migration capacity of the M2 metastatic melanoma cells.

### Effect of Gö6976 and Gö6983 on the metastatic and migration potential of M4T2 melanoma cells

To further confirm the ability of Gö6976 to revert the E- to N-cadherin switch and pro-metastatic phenotype of aggressive melanoma cells, the effect of this inhibitor was also tested on M4T2 cells that are derived from the cutaneous metastasis of a different melanoma patient and express high levels of N-cadherin but low levels of E-cadherin.

As shown in Fig. 6, treatment of M4T2 melanoma cells with Gö6976 strongly inhibits anchorage-independent growth (approximately 76.9% and 97.1% reduction in the number and volume of colonies, respectively; Fig. 6a), horizontal migration (very faint wound closure 24 h after scratch while full closure observed after at least 16 h for control DMSO-treated cells; Fig. 6b) and chemotactic migration (by approximately 92%; Fig. 6c).

Furthermore, treatment of M4T2 cells with Gö6976 also induced a 4.7-fold increase in E-cadherin expression and a decrease in N-cadherin expression by 40.8% (Fig. 6d) compared to control (DMSO-treated) cells.

On the other hand, treatment of M4T2 cells with Gö6983 reduced their chemotactic migration by only 33.6% (vs. 92% when treated with Gö6976) (Fig. 6c), and did not affect horizontal migration (Fig. 6b), anchorage-independent growth (Fig. 6a) or cadherin switch (Fig. 6d).

Together, these results show that in the same way as in M2 cells, treatment with Gö6976, but not with Gö6983, induces N- to E-cadherin switch and reversion of the pro-metastatic phenotype in the M4T2 metastatic melanoma cells.

In contrast to the metastatic melanoma cells (M2 and M4T2 cell lines) (Figs. 2, 5a and 6a, d), Gö6976 inhibitor did not significantly affect the expression of E- or N-cadherins or the anchorage-independent growth in the primary melanoma cell line (I5) (Additional file 2). Thus, the effects of this inhibitor seem to be specific to advanced metastatic melanoma.

Taken all together, our results have shown that the PKC inhibitors; i.e. Gö6976 and Gö6983, differentially affect the reversion of E- to N-cadherin switch and metastatic phenotype in aggressive melanoma cells (Figs. 1, 2, 3, 4, 5 and 6). In fact, whereas Gö6976 induces E-cadherin expression, β-catenin translocation from the nucleus to the plasma membrane and intercellular interactions, and inhibits N-cadherin and cyclin D1 expression, anchorage-independent growth and horizontal and chemotactic migration of metastatic mesenchymal-like melanoma cells, Gö6983 could only reduce the chemotactic migration but to a much lesser extent than Gö6976. These results suggest that a specific PKC isoform targeted by Gö6976 but not by Gö6983 would be involved in the reversion of the cadherin switch and metastatic phenotype and; therefore,

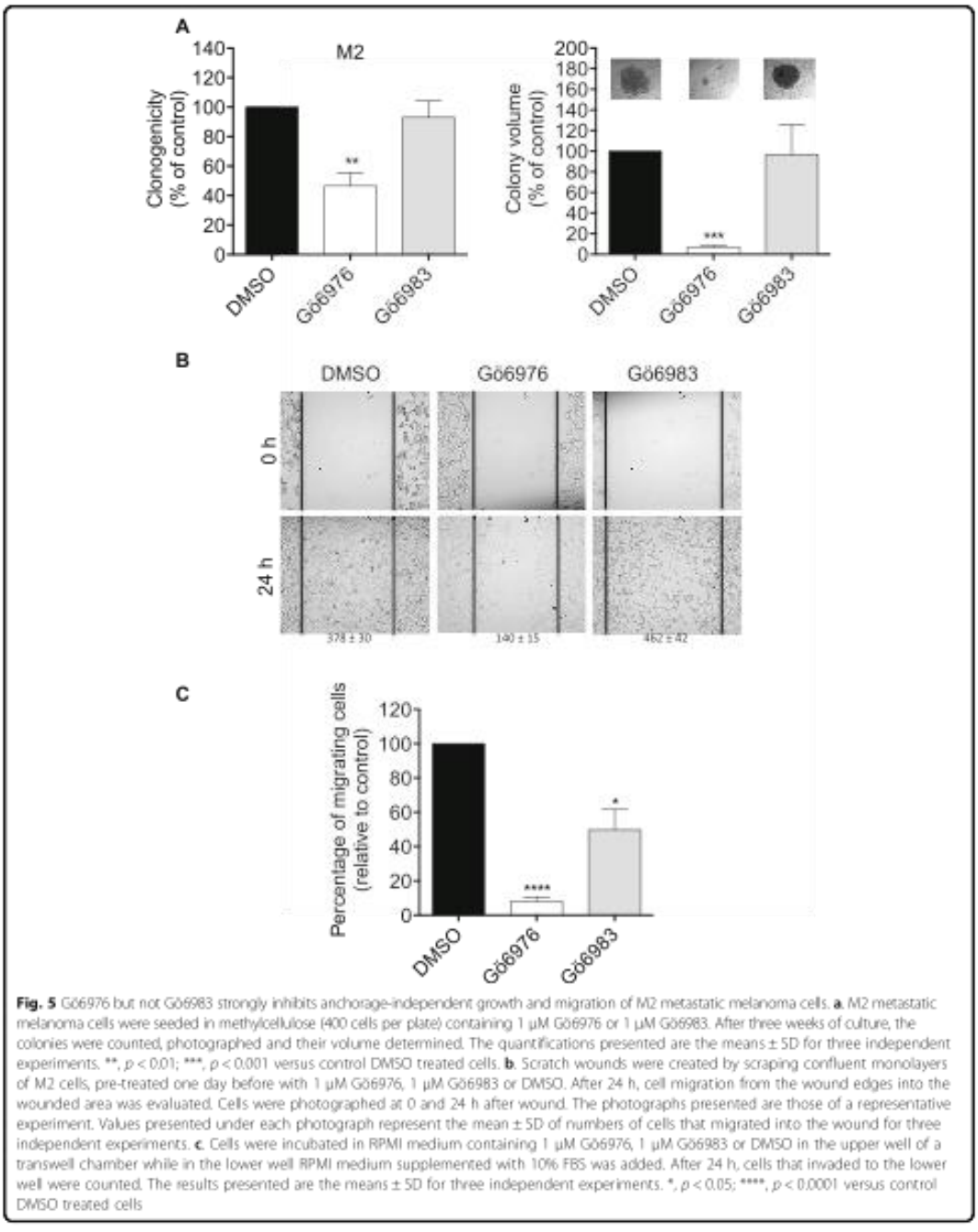



**Fig. 5** Gö6976 but not Gö6983 strongly inhibits anchorage-independent growth and migration of M2 metastatic melanoma cells. **a**. M2 metastatic melanoma cells were seeded in methylcellulose (400 cells per plate) containing 1 μM Gö6976 or 1 μM Gö6983. After three weeks of culture, the colonies were counted, photographed and their volume determined. The quantifications presented are the means ± SD for three independent experiments. **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$ versus control DMSO treated cells. **b**. Scratch wounds were created by scraping confluent monolayers of M2 cells, pre-treated one day before with 1 μM Gö6976, 1 μM Gö6983 or DMSO. After 24 h, cell migration from the wound edges into the wounded area was evaluated. Cells were photographed at 0 and 24 h after wound. The photographs presented are those of a representative experiment. Values presented under each photograph represent the mean ± SD of numbers of cells that migrated into the wound for three independent experiments. **c**. Cells were incubated in RPMI medium containing 1 μM Gö6976, 1 μM Gö6983 or DMSO in the upper well of a transwell chamber while in the lower well RPMI medium supplemented with 10% FBS was added. After 24 h, cells that invaded to the lower well were counted. The results presented are the means ± SD for three independent experiments. *, $p < 0.05$; ****, $p < 0.0001$ versus control DMSO treated cells

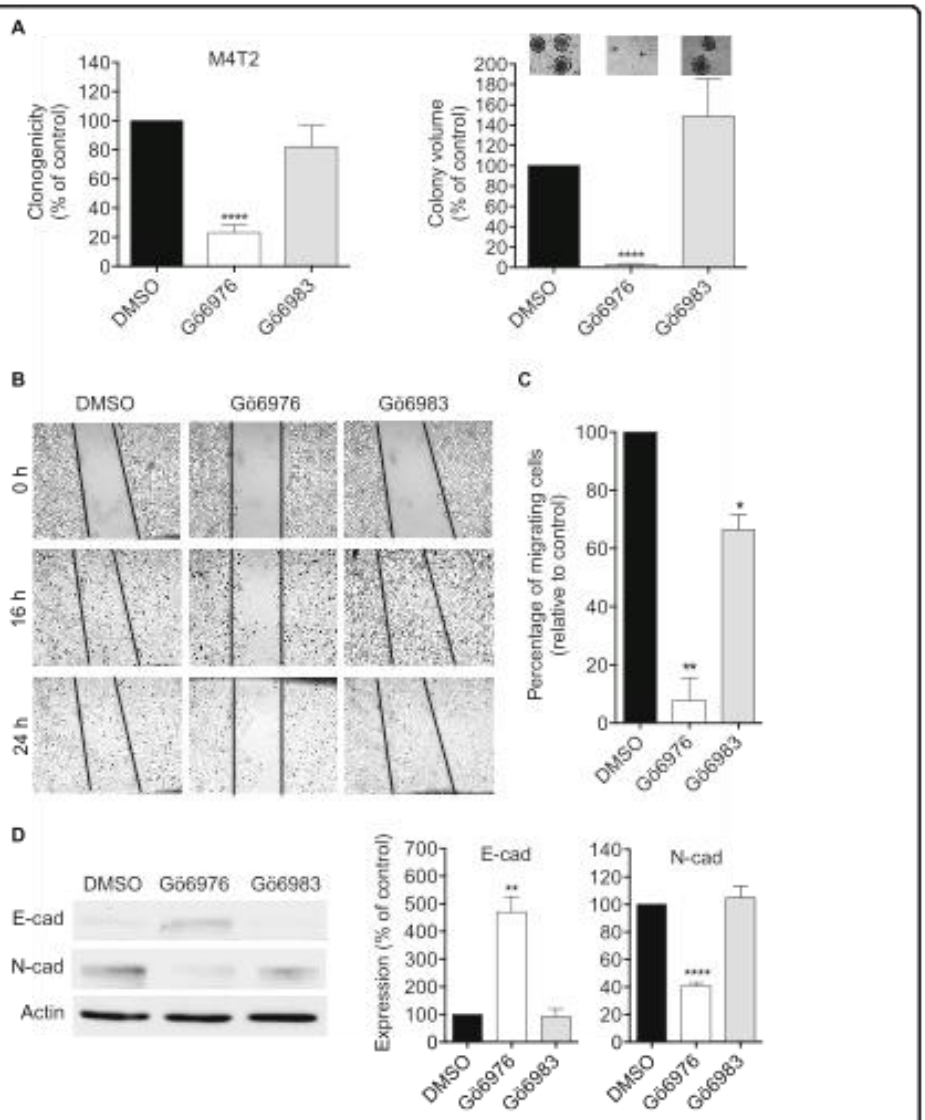



**Fig. 6** Gö6976 but not Gö6983 strongly inhibits anchorage-independent growth and migration and reverses the E to N-cadherin switch in M4T2 metastatic melanoma cells. **a**. M4T2 metastatic melanoma cells were seeded in methylcellulose (1000 cells per plate) containing 1 μM Gö6976 or 1 μM Gö6983. After three weeks of culture, the colonies were counted, photographed and their volume determined. The quantifications presented are the means ± SD for three independent experiments. ****, $p < 0.0001$ versus control DMSO treated cells. **b**. Scratch wounds were created by scraping confluent monolayers of M4T2 cells, pre-treated one day before with 1 μM Gö6976, 1 μM Gö6983 or DMSO. After 16 and 24 h, cell migration from the wound edges into the wounded area was evaluated. Cells were photographed at 0, 16 and 24 h after wound. The photographs presented are those of a representative experiment. **c**. Cells were incubated in RPMI medium containing 1 μM Gö6976, 1 μM Gö6983 or DMSO in the upper well of a transwell chamber while in the lower well RPMI medium supplemented with 10% FBS was added. After 24 h, cells that invaded to the lower well were counted. The results presented are the means ± SD for three independent experiments. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$ versus control DMSO treated cells. **d**. Cells were seeded in 6-well plates at the density of 25,000 cells per well. After three to five days of culture, cells were treated with 1 μM Gö6976, 1 μM Gö6983 or DMSO for 24 h). Cells were then lysed and proteins analyzed by western blot using anti-E-cadherin, anti-N-cadherin or anti-actin antibodies. The autoradiograms presented are those of a typical experiment. The histograms represent quantitative analysis of E- or N-cadherin expression normalized to control DMSO treated cells. The results presented are the means ± SD for two independent experiments. **, $p < 0.01$; ****, $p < 0.0001$ versus DMSO treated cells

would become a pharmaceutical target for the treatment of melanoma. Next, we searched to determine this target.

#### Analysis of PKD1 expression in different melanoma cell lines and correlation with E-/N-cadherin expression

Since Gö6976 is a selective inhibitor of PKCα, PKCβ and PKCμ and Gö6983 a selective inhibitor of PKCα and PKCβ but not PKCμ [26, 27], we hypothesized that the specific inhibition of PKCμ, which is also known as PKD1 (protein kinase D1), would be responsible for the Gö6976-induced N- to E-cadherin switch and tumor reversion in metastatic melanoma cells.

To test this hypothesis, first, the expression of PKD1 and its relationship with E- and N-cadherin statuses were analyzed by western blot in different melanoma cell lines (i.e. T1, G1, l5, M2 and M4T2) (Fig. 7). In T1 and G1 melanoma cells that express high levels of E-cadherin but very low levels of N-cadherin, PKD1 expression was very faint (Fig. 7a). In l5, M2 and M4T2 melanoma cells, that express null or very low levels of E-cadherin but high levels of N-cadherin, PKD1 expression was strong with maximal expression in the most aggressive cell line (i.e. M2 cells) (Fig. 7a). In addition to this strong qualitative correlation between PKD1 expression and E-cadherin negative/N-cadherin positive phenotype, quantitative correlation was also confirmed by Spearman correlation coefficient analysis ($r = 0.921$; $p = 0.006$ and $r = -0.8$; 0.067 for correlation with N-cadherin and E-cadherin, respectively) (Fig. 7b). Furthermore, PKD1 expression significantly correlated with the mesenchymal features of the melanoma cell lines used in this study and was associated with a high metastatic potential (anchorage-independent growth and migration) (Additional file 3).

These data support the hypothesis that the effect of Gö6976 on N- to E-cadherin switch and tumor reversion in melanoma cells would be due to the inhibition of PKD1.

#### PKD1 silencing by lentiviral vector based shRNA transduction in the M2 metastatic melanoma cells

Next, to allow direct analysis of the role of PKD1 inhibition in human metastatic melanoma, M2 cell clones stably expressing shRNAs directed against PKD1 (named P2, P3, P4, P5, P6 and P7) or scrambled shRNA control (named C1 and C2) were generated by lentiviral particles transduction. The efficiency of PKD1 knockdown was determined by western blot (Fig. 8). The results show that whereas the clones transduced with lentiviral control shRNA express similar levels of PKD1 protein as parental M2 cells, clones transduced with lentiviral PKD1-specific shRNAs show varying degrees of PKD1 knockdown efficiency. PKD1 expression was strongly inhibited in P6, P2, P7, P3 and P4 clones by approximately 90.9, 90.78, 88.1, 68.7 and 63.5%, respectively, but weakly inhibited in P5 clone by approximately 20%.

#### Effect of PKD1 depletion on E-cadherin expression in M2 mesenchymal-like melanoma cells

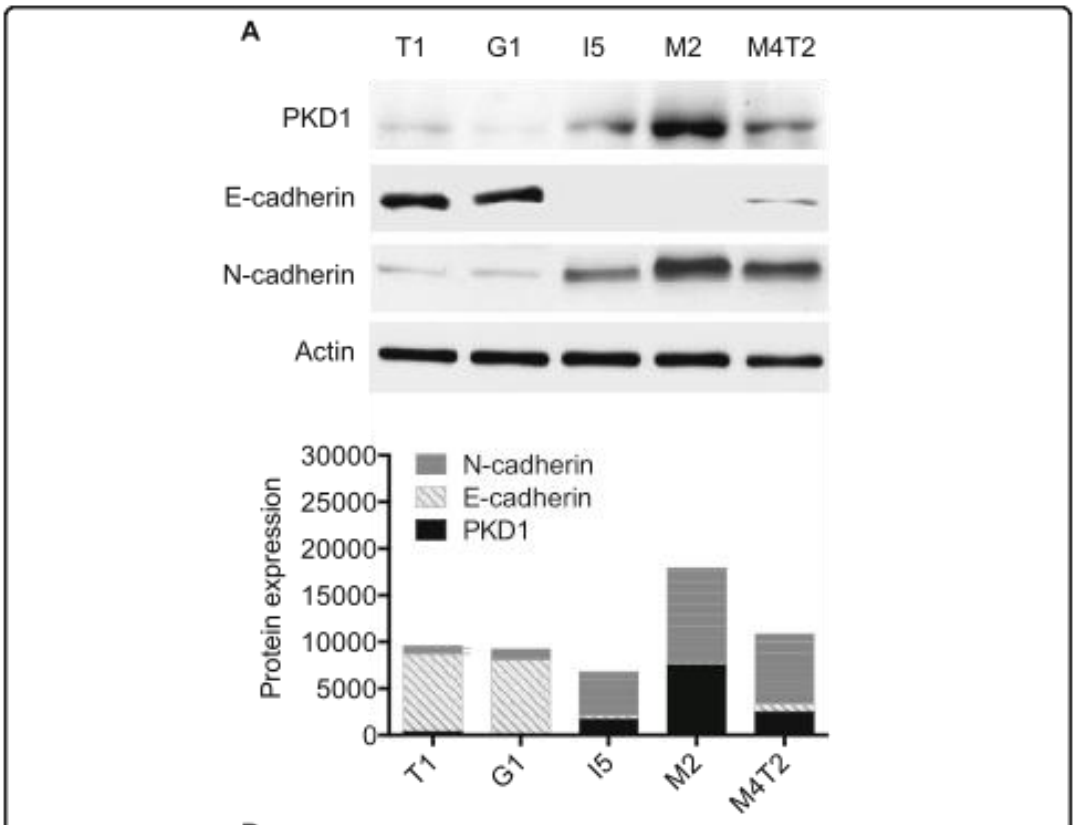
Since Gö6976 but not Gö6983 induces E-cadherin expression in the E-cadherin-negative metastatic melanoma cells (Fig. 2), we tested whether PKD1 depletion would have the same effect. Therefore, total proteins from lentiviral control (C1 and C2) and PKD1-specific (P2, P3, P4, P5 and P6) shRNA-transduced M2 clones cultured in semi-solid methylcellulose medium (Fig. 9a) or in adherent conditions (Fig. 9b) were extracted and analyzed for PKD1 and/or E-cadherin expression by western blot. A very faint protein band at 120 kDa and a very thick band at 80 kDa representing full-length and cleaved E-cadherin molecules, respectively, were observed in the protein extracts from PKD1-depleted (P2, P3, P4 and P6) M2 clones cultured in methylcellulose but not from control (C1 and C2) or PKD1-faintly inhibited (P5) M2 clones (Fig. 9a). Nonetheless, when these cells were cultured under adherent conditions (Fig. 9b), neither full-length nor cleaved E-cadherin corresponding bands could be observed in the protein extracts from any of the M2 clones (Fig. 9b).

Since a strong expression of cleaved E-cadherin was observed in PKD1-depleted M2 clones cultured in methylcellulose, we asked whether induced E-cadherin would be cleaved and secreted in the medium of the adherent cells while sequestered in the spheres of colonies formed in methylcellulose. To test this hypothesis, conditioned media from control (C1 and C2) and PKD1-specific (P3, P4, P5 and P6) shRNA-transduced M2 clones were analyzed for the presence of soluble E-cadherin by ELISA. As indicated in Fig. 9c, significant amounts of soluble E-cadherin were detected in the media of PKD1-specific (P3, P4, P5 and P6) but not control (C1 and C2) shRNA-transduced M2 clones. Taken together, these results indicate that PKD1 depletion induces the expression of E-cadherin that is cleaved and secreted in M2 cells.

Interestingly, PKD1 knockdown also induced the expression of E-cadherin in M4T2 metastatic melanoma cells. However, in contrast to the M2 cells, full-length E-cadherin was detected in M4T2 cells (Additional file 4). This result further confirms the role of PKD1 in the regulation of E-cadherin expression and also suggests that the mechanism leading to the cleavage of the newly formed E-cadherin molecules in M2 cells is cell-context specific.

#### Effect of PKD1 depletion on the cell shape and cell-cell interactions in M2 melanoma cells

Since Gö6976 but not Gö6983 induces a rapid cell shape modification (from elongated to cuboidal) and cell-cell




B

| | PKD1 |
|---|---|
| **N-cadherin** | |
| Pearson correlation coefficient | 0.921 |
| *p* | 0.006 |
| **E-cadherin** | |
| Pearson correlation coefficient | -0.8 |
| *p* | 0.067 |

**Fig. 7** Protein kinase D1 expression positively correlates with N-cadherin and negatively correlates with E-cadherin in primary and metastatic melanoma cells. Protein extracts from primary (T1 and I5) and metastatic (G1, M2 and M4T2) melanoma cells were analyzed by western blot using anti-PKD1, anti-E-cadherin, anti-N-cadherin and anti-actin antibodies. **a**. The results presented are those of typical experiments. The histograms represent quantitative analysis of PKD1, N-cadherin and E-cadherin expression from two independent experiments. **b**. The table represents the relationship between PKD1 protein levels and E-cadherin and N-cadherin levels in the melanoma cell lines

interactions in M2 cells (Fig. 3a), we tested whether PKD1 depletion may exert the same effect. Therefore, the cell morphology and intercellular interactions of control (C1 and C2) and PKD1-specific (P2, P3, P4, P5, P6 and P7) shRNA-transduced M2 clones were analyzed by actin-labeling and confocal microscopy (Fig. 10). Results showed that all shRNA-transduced M2 clones (control and PKD1-depleted) present typical elongated

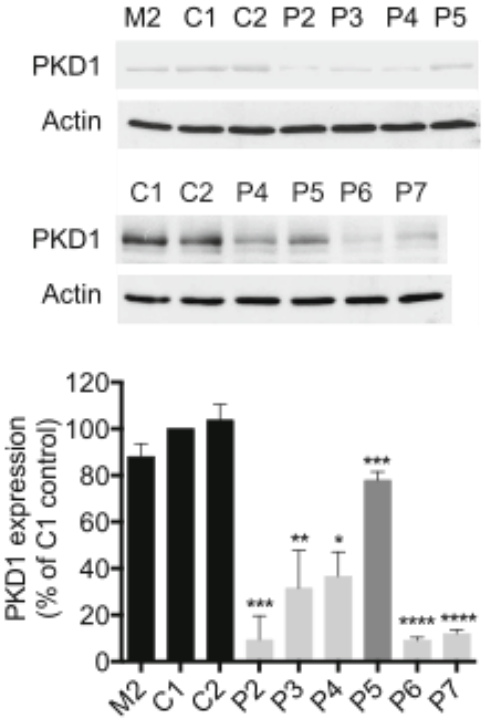



**Fig. 8** PKD1 silencing by lentiviral vector based shRNA transduction in the M2 metastatic melanoma cells. Protein extracts from parental (M2), lentiviral PKD1-specific (clones P2, P3, P4, P5, P6 and P7) and control (clones C1 and C2) shRNA-transduced M2 cells were analyzed by western blot using anti-PKD1 and anti-actin antibodies. The results presented are those of typical experiments. The histograms represent quantitative analysis of PKD1 expression normalized to C1 control clone. The results presented are the means ± SD for two independent experiments. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$; ****, $p < 0.0001$ versus C1 and C2 control clones

mesenchymal-like shape and form very few cell-cell contacts, suggesting that PKD1 depletion could induce neither reversion of mesenchymal-like morphology nor intercellular interactions in M2 cells.

#### Effect of PKD1 silencing on the metastatic potential of M2 melanoma cells

To determine whether PKD1 inhibition may affect the metastatic potential of M2 melanoma cells, control (C1 and C2) and PKD1-specific (P2, P3, P4, P5, P6 and P7) shRNA-transduced M2 clones were assayed for anchorage-independent growth and migration. Results show that anchorage-independent growth of PKD1-depleted (i.e. P2, P3, P4, P6 and P7) M2 clones was strongly inhibited by 77.5, 74.1, 97.8, 78 and 54.5%, respectively, in comparison to control shRNA-transduced (C1 and C2) and parental (M2) cells (Fig. 11a). Furthermore, except for P4 clone, chemotactic migration of all other PKD1-depleted (P2, P3, P6, P7) M2 clones was strongly inhibited by 80.4, 73.6, 93.7 and 84%, respectively (Fig. 11b). However, horizontal (wound healing) migration was not significantly (P4) or weakly inhibited by 27% (P3), 33% (P6) and 35% (P7) compared to control shRNA-transduced (C1 and C2) cells, in all PKD1-depleted clones, except for P2 clone (strong inhibition by 70.5%) (Fig. 11c).

Anchorage-independent growth and migration rates of P5 clone, in which PKD1 expression was only slightly inhibited, were similar to control cells (Fig. 11) suggesting that a specific and strong PKD1 inhibition is required to revert the metastatic phenotype in melanoma cells.

## Discussion

In this study, we tested whether PKC inhibitors (such as Gö6976 and Gö6983) would revert the E- to N-cadherin switch, a major hallmark of the EMT process, required for melanoma progression and metastasis [9, 15, 35].

First, we analyzed the cadherin switch in two couples of patient-derived primary (I5, T1) and their respective lymph-node metastasis (M2, G1) melanoma cells. Different profiles of E- and N-cadherin expression were observed. When comparing T1 (primary tumor) and G1 (corresponding lymph node metastasis) melanoma cells, both cell lines expressed high levels of E-cadherin and very low levels of N-cadherin. Although these findings are inconsistent with the theory of E- to N-cadherin switch during melanoma progression (i.e. E-cadherin expression in primary tumor and N-cadherin expression in metastasis), the expression of E-cadherin by the metastasis-derived cells (G1) might be the consequence of a MET (mesenchymal-epithelial transition) that would have occurred at the metastatic site. MET was postulated to be part of the process of metastatic tumor formation [36, 37]. In fact, progression of solid tumors involves spatial and temporal occurrences of EMT, whereby tumor cells acquire a more invasive and metastatic phenotype [38]. Subsequently, the disseminated mesenchymal tumor cells undergo the reverse transition, MET, at the site of metastases, as metastases recapitulate the pathology of their corresponding primary tumors [39]. Just as a critical EMT event is the downregulation or silencing of E-cadherin and upregulation of N-cadherin, the re-expression of E-cadherin and loss of N-cadherin is proposed to be the important hallmark of MET [39]. Presently, it is unclear how MET facilitates the formation of metastases. Some findings suggest a possible mechanism whereby MET helps the tumor cells to construct connections with the resident non-neoplastic epithelial cells and may enable dormancy and survival of tumor cells at a lower metabolic load at target organ

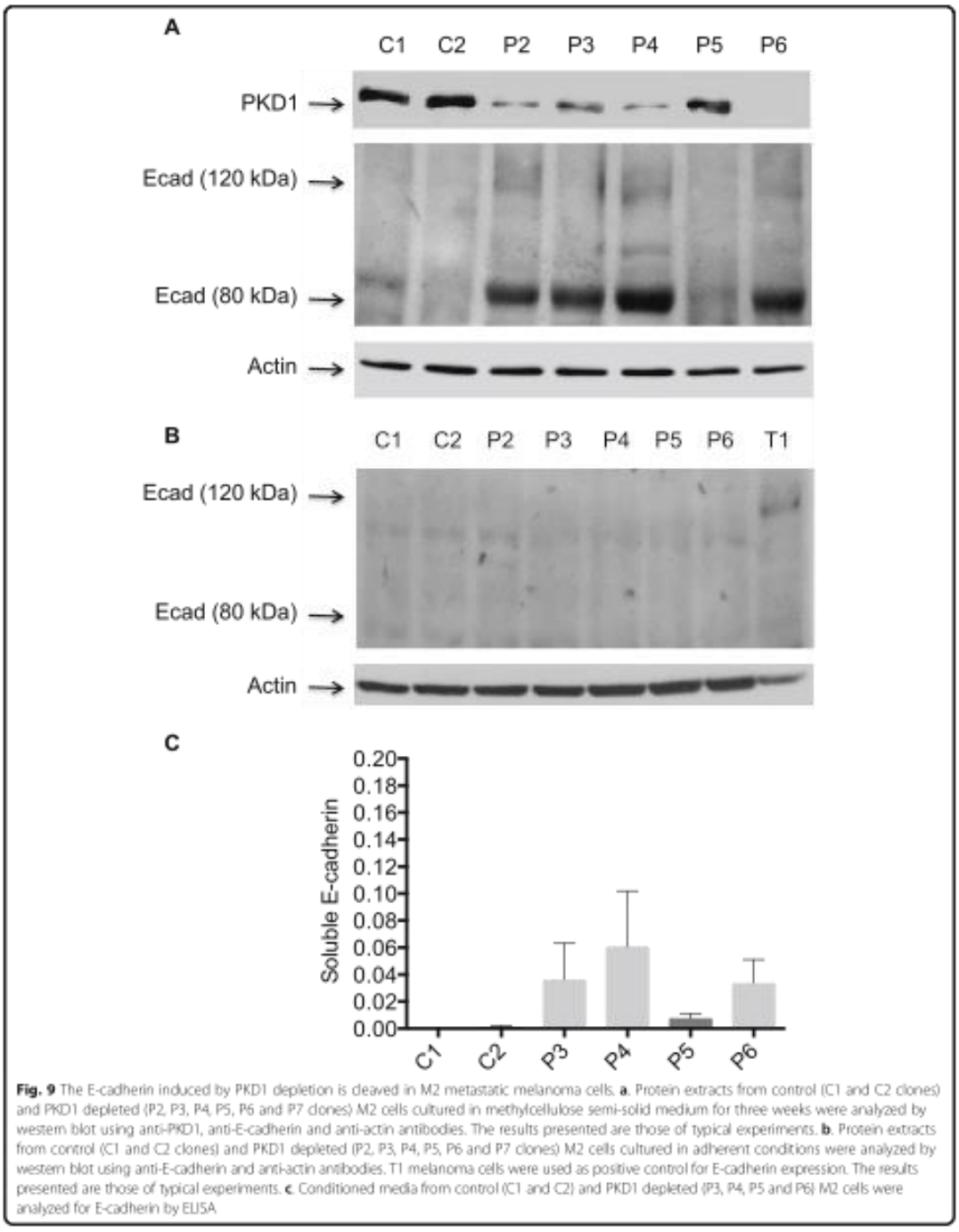



**Fig. 9** The E-cadherin induced by PKD1 depletion is cleaved in M2 metastatic melanoma cells. **a**. Protein extracts from control (C1 and C2 clones) and PKD1 depleted (P2, P3, P4, P5, P6 and P7 clones) M2 cells cultured in methylcellulose semi-solid medium for three weeks were analyzed by western blot using anti-PKD1, anti-E-cadherin and anti-actin antibodies. The results presented are those of typical experiments. **b**. Protein extracts from control (C1 and C2 clones) and PKD1 depleted (P2, P3, P4, P5, P6 and P7 clones) M2 cells cultured in adherent conditions were analyzed by western blot using anti-E-cadherin and anti-actin antibodies. T1 melanoma cells were used as positive control for E-cadherin expression. The results presented are those of typical experiments. **c**. Conditioned media from control (C1 and C2) and PKD1 depleted (P3, P4, P5 and P6) M2 cells were analyzed for E-cadherin by ELISA

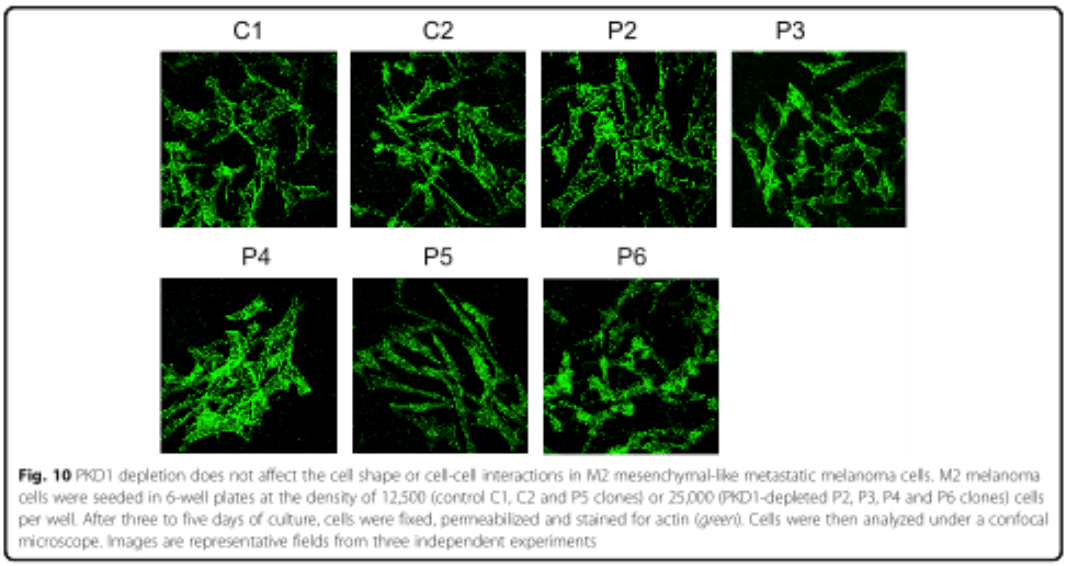



**Fig. 10** PKD1 depletion does not affect the cell shape or cell-cell interactions in M2 mesenchymal-like metastatic melanoma cells. M2 melanoma cells were seeded in 6-well plates at the density of 12,500 (control C1, C2 and P5 clones) or 25,000 (PKD1-depleted P2, P3, P4 and P6 clones) cells per well. After three to five days of culture, cells were fixed, permeabilized and stained for actin (*green*). Cells were then analyzed under a confocal microscope. Images are representative fields from three independent experiments

[39]. Consistently, G1 cells, that may be derived from metastatic cells that have underwent MET, grow very slowly, are non-tumorigenic and do not migrate. On the other hand, E-cadherin expression was absent in both I5 (primary tumor) and M2 (corresponding lymph node metastasis) melanoma cells while N-cadherin expression was significantly higher in the metastasis cells, suggesting that I5 primary tumor cells may have already underwent EMT. However, these cells did not show higher proliferation and migration potentials than their counterparts T1 cells but progressed to highly aggressive metastatic cells (i.e. M2 cells). This observation suggests that depending on the cellular context, the pro-metastatic effect of cadherin switch might require additional events that could occur later in tumorigenesis [16]. In agreement with this hypothesis, a study by Chen et al. 2014 shows that E-cadherin loss in non-malignant breast cells is insufficient to induce EMT or to enhance their transforming potential [40]. Furthermore, other studies by Knudsen et al. 2005 show that N-cadherin expression in the mammary gland of transgenic mice (mice expressing N-cadherin under the control of mouse mammary tumor virus promoter) does not induce tumors. Interestingly, even crossing these mice with mice expressing the Neu oncogene in the mammary gland does not produce tumors more aggressive than those in mice expressing Neu alone [41]. However, crossing them with mice expressing polyoma virus middle T antigen in the mammary epithelium leads to increased metastasis [42]. These studies suggest that the effects of cadherin switching are late events in tumorigenesis and demonstrate that the influence of an inappropriate cadherin on the phenotype of the cell is context dependent [16]. This could be the same in melanoma cells. Thus, despite the E- to N-cadherin switch in I5 primary melanoma cells, these cells require additional mutations or events to acquire enhanced mesenchymal features allowing their invasion and metastasis formation. The primary (I5) and corresponding metastasis (M2) melanoma cells could be a good model to study the events that are required in addition to the E- to N-cadherin switch to allow melanoma progression to metastatic phenotype. Interestingly, except for I5, cell lines that express high N-cadherin and low E-cadherin levels had a better capacity of proliferation, clonogenicity and migration than cell lines with low N-cadherin and high E-cadherin expression. Thus, consistent with the cadherin switch theory in melanoma progression, our data show a strong link between high N-cadherin/low E-cadherin expression and tumor aggressiveness and defines M2 metastatic melanoma cells (Absent E-cadherin/high N-cadherin expression and highly tumorigenic and motile) as a pertinent model to study the possibility to revert the E- to N-cadherin switch and the metastasis phenotype. In addition to this lymph-node metastasis melanoma model, another cutaneous metastasis melanoma model with low E-cadherin/high N-cadherin expression (i.e. M4T2 cells) was used to further confirm our results.

Treatment of metastatic melanoma cells with PKC inhibitors Gö6976 or Gö6983 resulted in different responses regarding cadherin switch and oncogenic activity of these cells. Gö6976 but not Gö6983 treatment induced the expression of E-cadherin and inhibited the expression of

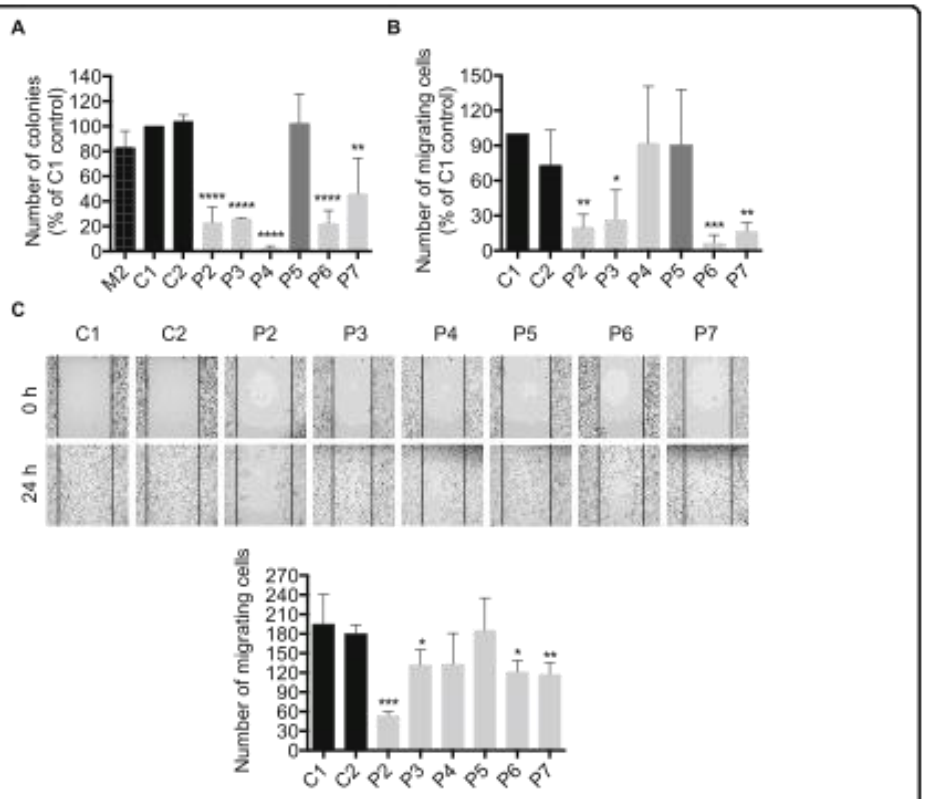



**Fig. 11** PKD1 depletion inhibits anchorage-independent growth and migration of M2 metastatic melanoma cells. **a**. PKD1 depleted (P2, P3, P4, P5, P6 and P7 clones) and control (C1 and C2 clones) M2 cells were cultured in methylcellulose semi-solid medium for three weeks. Then, the colonies formed were counted. The quantifications presented are the means ± SD for three independent experiments. **, $p < 0.01$; ****, $p < 0.0001$ versus C1 and C2 control cells. **b**. Cells were incubated in RPMI medium in the upper well of a transwell chamber while in the lower well RPMI medium supplemented with 10% FBS was added. After 24 h, cells that invaded to the lower well were counted. The results presented are the means ± SD for three independent experiments. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$ versus C1 and C2 control cells. **c**. Representative images of cell migration evaluated by wound healing assay. Images of wound repair were taken at 0 and 24 h after wound and the cells that migrated to the wounded area were counted. The results presented are the means ± SD for three independent experiments. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$ versus C1 and C2 control cells

N-cadherin in metastatic melanoma cells. This Gö6976-induced N- to E-cadherin switch was associated with rapid phenotypic and molecular changes that comply with the generally described model of cadherin switch during tumor progression [6, 14–16]. In fact, our results showed that the Gö6976-induced E-cadherin expression and N-cadherin loss were associated with a rapid cell shape modification from an elongated mesenchymal-like structure into a 'cuboidal' epithelial-like shape and a strong increase in cell-cell junctions [43–45]. Furthermore, treatment of lymph-node metastatic melanoma cells with Gö6976 induced the translocation of β-catenin from the nucleus to the plasma membrane. However, the membrane β-catenin staining in Gö6976-treated cells is not perfectly lining the plasma membrane. In fact, it has been shown that newly synthesized E-cadherin arrives at the plasma membrane already in complex with β-catenin [46–48]. Then, once at the plasma membrane, this β-catenin pool is transferred to E-cadherins that were already present at the plasma membrane. Furthermore, the β-catenin released from E-cadherin may participate in new exchange cycles [47]. Thus, since during the times of Gö6976-treatment used in our present study (0–48 h), E-cadherin expression is continuing to increase (Fig. 2), so new E-cadherin molecules are still being synthesized and transported to the plasma membrane, the diffuse β-catenin staining may be explained by these β-catenin-E-cadherin exchange cycles [47]. In agreement with this hypothesis, in Gö6976-treated cells, β-catenin staining, which completely disappeared

from the nucleus, is mostly accumulated at the newly formed intercellular junctions while less β-catenin staining is observed at the free borders of the plasma membrane or in the cytoplasm, consistent with E-cadherin staining (Fig. 3c). This translocation of the β-catenin from the nucleus to the plasma membrane favors its tumor suppressor role of insuring the stability of E-cadherin-mediated intercellular interactions to its oncogenic role of transcription factor [32, 33], as further supported by the inhibition of the expression of its target cyclin D1 after Gö6976 treatment. These observations also suggest that the Gö6976-induced E-cadherin molecules are functional. In addition to these molecular changes, Gö6976 treatment resulted in decreased anchorage-independent growth and motility of metastatic melanoma cells, confirming the reversion of the metastatic phenotype. In contrast to the metastatic melanoma cells (M2 and M4T2 cell lines), Gö6976 inhibitor did not significantly affect the expression of E- or N-cadherins or the anchorage-independent growth in the primary melanoma cell line (I5) (Additional file 2). Thus, the effects of this inhibitor seem to be specific to advanced metastatic melanoma suggesting that the reversion of the mesenchymal features by Gö6976 requires late event(s) in the melanoma progression. Since a strong increase in the expression of the Gö6976-target « PKD1 » is observed in M2 metastatic cells in comparison to their corresponding primary tumor cells (I5), overexpression of this serine/threonine kinase could be one of these events.

In contrast to Gö6976, the PKC inhibitor Gö6983 did not affect any of the E-/N-cadherin expression, intercellular interactions, β-catenin subcellular localization or anchorage-independent growth in metastatic melanoma cells. Although Gö6983 could significantly inhibit the chemotactic (FBS attraction in transwell) migration of these cells but not their horizontal (wound healing) migration, its effect was much lower than the effect of Gö6976. These results suggest that suppression of specific PKC isoforms inhibited by Gö6976 but not by Gö6983 would be involved in the reversion of the E- to N-cadherin switch and metastatic phenotype in melanoma. Very few studies have attempted to examine the involvement of PKCs in EMT, E/N-cadherin expression regulation and/or cell-cell junctions. To our knowledge, these studies were based on the treatment of the cells with either PKC activator, phorbol ester [28, 49], or PKC inhibitor Gö6976 [29, 50] but not on direct analysis of the role of specific PKC isoforms. In fact, phorbol ester has been shown to induce N-cadherin expression in osteoblasts [28] and EMT in prostate cancer [49]. On the other hand, Gö6976 has been shown to promote formation of cell junctions and inhibit invasion of urinary bladder carcinoma cells [29], suppress S252W FGFR-2 mutation-induced N-cadherin expression in human osteoblasts [50] and inhibit EMT in renal tubular epithelial cells [51]. These studies support our present data and indicate that phorbol ester and Gö6976 targets, i.e. PKCs, can be involved in the E- to N-cadherin switch; however, no specific isoforms could be determined as key players in this process. A recently published study by Jain and Basu 2014 shows, by overexpression or siRNA techniques, that PKCε promotes EMT in breast cancer [52]. However, this isoform can't be involved in the reversion of the E- to N-cadherin switch observed in our present study because neither Gö6976 nor Gö6983 is a potent inhibitor of PKCε, which implies that, in melanoma cells, other PKC isoform(s) regulate the cadherin switch.

Given the differential effect of the PKC inhibitors Gö6976 and Gö6983, our present data suggest that specific isoenzyme(s) targeted by Gö6976 but not by Gö6983 would be involved in the reversion of the E- to N-cadherin switch and metastatic phenotype in melanoma.

In vitro kinase assays using recombinant full-length PKC isoenzymes α, β, γ, δ, ε, ζ and μ (i.e. PKD1) show that Gö6976 selectively inhibits PKCα ($IC_{50}$ = 2.3 nM), PKCβ ($IC_{50}$ = 6.2 nM) and PKCμ ($IC_{50}$ = 20 nM). However, it does not affect the kinase activity of the PKCγ, δ, ε, and ζ-isozymes even at μM levels [27]. On the other hand, Gö6983 efficiently inhibits several PKC isozymes ($IC_{50}$ = 7 nM for PKCα and PKCβ; 6 nM for PKCγ, 10 nM for PKCδ and 60 nM for PKCζ) but is extremely inefficient in suppressing PKCμ kinase activity in vitro ($IC_{50}$ = 20 μM) [26]. Despite the highly conserved catalytic region of the PKC isoforms, these kinases are differentially targeted by Gö6976 and Gö6983 ATP-competitive inhibitors. That can be due to variability in their regulatory region that might affect the binding of the inhibitor to the kinase domain [53]. Furthermore, although the chemical structures of Gö6976 and Gö6983 are very close, the central aromatic ring is opened in Gö6983 but intact in Gö6976, which accounts for the different substrate specificities of these inhibitors [26]. In contrast to the other PKC isoforms that are not inhibited by Gö6976, conventional PKCs (PKCα and PKCβ) and PKCμ share tandem repetition of C1 motifs (forming the DAG/PMA-binding domain) that is located at a comparable distance towards the catalytic domain [23], which could be important for the binding of Gö6976. On the other hand, PKCμ significantly differs in some structural features from the other PKC isoforms including PKCα and PKCβ [23]. In fact, PKCμ is larger than the other PKCs with a sequence of 912 amino acids. It contains a hydrophobic domain in the N-terminal region and a pleckstrin homology domain that are absent in the other PKC isoforms. This additional sequence may be responsible for the failure of Gö6983 to inhibit PKCμ probably by preventing its binding to the ATP-binding site. Furthermore, the specificity of action of these inhibitors can be independent of the regulatory domain

of the PKCs but differences in small sequences or single amino acids in their catalytic domains can affect the affinity of the inhibitors to the ATP-binding site. However, structural/molecular biology studies are required determine the exact reason for the differences in pharmacological action of these inhibitors.

Whatever the mechanism, since Gö6976 is a selective inhibitor of PKCα, PKCβ and PKCμ and Gö6983 a selective inhibitor of PKCα and PKCβ but not PKCμ [26, 27], we hypothesized that the specific inhibition of PKCμ, which is also known as PKD1, would be responsible for the Gö6976-induced N- to E-cadherin switch and tumor reversion in metastatic melanoma cells. Although this serine/threonine kinase is a major cellular target for the tumor-promoting phorbol esters and growth factors which rapidly induce its activity [25, 54], PKD1 has a complex relationship with respect to cancer development. In fact, depending on the tissue type, PKD1 exerts different functions and effects [55]. To date, the role of PKD1 in melanoma initiation and progression is not yet explored, except for the unique data by Kempkes et al. 2012 showing that PKD1 knockdown inhibits proliferation and migration-related processes such as filopodia formation and αvβ3 integrin recycling in WM9 melanoma cell line [56]. These data support our hypothesis. To study more specifically and deeply the involvement of PKD1 in melanoma progression, we firstly analyzed the expression pattern of this kinase in different melanoma cell lines. PKD1 was expressed in 4 out of the 5 melanoma cell lines tested and this expression strongly correlated with E-cadherin negative/N-cadherin positive phenotype and metastatic potential (anchorage-independent growth and migration). PKD1 knockdown in M4T2 metastatic melanoma cells significantly induced down-regulation of N-cadherin and up-regulation of E-cadherin (Additional file 4), supporting the role of PKD1 in E-cadherin to N-cadherin switch. Several studies suggest a role of PKD1 in gene expression regulation either by direct interaction and phosphorylation of transcription factors [57, 58] or by phosphorylation and nuclear exclusion of histone deacetylases (HDACs) [59]. Some of the transcription factors that can be regulated by PKD1 are known to modulate the expression of E-cadherin or N-cadherin even if no direct correlation between PKD1 and these cadherins has been established. In fact, a study by Eiseler et al. 2012 has shown that PKD1 efficiently interacts in nuclei with Snail1, the main transcription factor that suppresses E-cadherin expression during EMT in most epithelial cancers including melanoma [60, 61]. PKD1 phosphorylates Snail1 at Ser-11 which recruits HDAC-1 and −2 as well as LOXL3, a transcriptional co-activator which is also upregulated by PKD1. This newly formed complex enhances Snail activity and induces proliferation and anchorage-independent growth [57]. Although, in this study, authors did not test whether this PKD1-mediated regulation of snail1 activity might affect E-cadherin/N-cadherin expression, another study by Peinado et al. 2004 shows that snail mediates E-cadherin repression by the recruitment of HDAC1/2. Thus, it is very likely that PKD1 might inhibit E-cadherin expression using this mechanism. On the other hand, PKD1 can induce the activation of NFκB [62], a transcription factor that can directly bind to N-cadherin promoter and activate its expression [63]. Interestingly, N-cadherin can also be directly regulated by E-cadherin. In fact, loss of E-cadherin induces NFκB activity and consequent N-cadherin expression in melanoma cells. Thus, regulation of E-cadherin expression by PKD1 could be enough to induce E- to N-cadherin switch. Although a bunch of evidence suggest a role of PKD1 in the regulation of transcription factors that are regulators of E- or N-cadherin expression, these hypotheses need to be tested to determine the exact mechanism by which PKD1 regulates E- to N-cadherin switch.

In the second metastatic melanoma cell line tested (i.e. M2), although the stable knockdown of PKD1 by specific shRNAs induced the expression of E-cadherin, these shPKD1-induced E-cadherin molecules could only be detected as cleaved form in the colony spheres of cells cultured in semi-solid medium or as secreted molecules in the conditioned medium of the adherent cells. Furthermore, the shPKD1-induced E-cadherin molecules did not allow the formation of cell-cell junctions in M2 melanoma cells; on the contrary, the cells transduced by shPKD1 maintained their elongated mesenchymal and isolated shape. Furthermore, although PKD1 knockdown induced a slight decrease in the horizontal migration (wound healing) potential of metastatic melanoma cells, the inhibition was very low in comparison of the effect of the Gö6976 inhibitor. These data suggest that the E-cadherin molecules induced by PKD1 knockdown are not functional, which is not surprising since these molecules were observed in a truncated form. This observation could be explained by the strong expression, by M2 melanoma cells, of metalloproteinases (MMPs) such as MMP2, MMP9, MMP12 and MMP13 [64–67] that may cleave the newly synthesized E-cadherin molecules [68]. Noteworthy, PKCs, in particular PKCα, have been shown to induce MMP expression and/or activity [69–71]. Thus, the restoration of full length and functional E-cadherin molecules by Gö6976 could be the consequence of the dual inhibition of PKD1 (which induces E-cadherin expression) and PKCα (which may inhibit expression and/or activity of MMPs, thus preventing the cleavage of the newly synthesized E-cadherin). The mechanism by which E-cadherin cleavage is mediated in M2 cells might be absent or negatively regulated in M4T2 cells where full-length E-cadherin could be detected after PKD1 knockdown (Additional file 4). Thus, protease profiling and

PKC isoform combination silencing experiments would allow the verification of these hypotheses.

Finally, despite its failure to induce the expression of functional E-cadherin, PKD1 knockdown alone strongly altered anchorage-independent growth and migration of metastatic melanoma cells, probably by regulating signaling pathways such as extracellular signal-regulated kinase (ERK), c-jun N-terminal kinase (JNK) and nuclear factor-kappa B (NFκB), as previously described in hormone-positive breast cancer [72, 73] and pancreatic cancer [74, 75].

## Conclusions

The cPKC/PKCμ inhibitor Gö6976 reverses the E- to N-cadherin switch and as a consequence induces profound morphological, molecular and cellular changes that revert the mesenchymal phenotype and metastatic potential of aggressive melanoma cells. On the other hand, the cPKC inhibitor Gö6983 doesn't show any significant effect on this cadherin switch. The comparison of the target spectrum of these two PKC inhibitors indicates that these observations are not the consequence of the inhibition of cPKCs, but identifies a novel serine/threonine kinase, i.e. PKCμ isoform (also known as PKD1), whose specific inhibition by shRNAs induces E-cadherin expression and reverses the metastatic phenotype in all metastatic melanoma cell lines tested. Noteworthy, in one of these cell lines, specific inhibition of PKD1 alone induces the expression of E-cadherin molecules which are found to be cleaved, probably due to the effect of proteases secreted by these cells. However, the PKD1/cPKC inhibitor Gö6976 induces the expression of full length E-cadherin in this same cell line. Thus, in some melanoma cells, depending on their protease expression profile, a combinatory inhibition of PKD1 and cPKC might be considered for a more effective reversion of the E- to N-cadherin switch.

Despite the recent advances in metastatic melanoma treatments including molecular targeted and immune therapies, many patients develop resistance or do not respond to these therapeutic approaches. Since the E- to N-cadherin switch plays a critical role in the response to these therapies and in melanoma progression and based on our data from the present study, we propose the inhibition of PKD1 as a novel attractive approach for the treatment of metastatic melanoma that should be further tested in preclinical studies either alone or in combination with other therapies depending of the disease context.

## Additional files

**Additional file 1:** Correlation between N-/E-cadherin expression and mesenchymal features in primary (T1 and I5) and metastatic (G1, M2 and M4T2) melanoma cells. The relationship between N-cadherin (A) or E-cadherin (B) expression and mesenchymal features in melanoma cells was estimated using Pearson's correlation analysis applied on the data from western blot, MTT, methylcellulose and wound healing assays that are presented in Figs. 1, 6 and 7a. In panel B, the last column of the table represents the same correlation study but excluding I5 cell line from the analysis. The results highlight the strong and significant negative correlation between E-cadherin expression and mesenchymal features in most melanoma models and the existence of some models (such as I5) in which E-cadherin loss might not be enough to induce mesenchymal features and might require additional events in tumor development. (PPTX 64 kb)

**Additional file 2:** Effect of Gö6976 on the expression of E- and N-cadherins and the anchorage-independent growth in I5 primary melanoma cell line. A. I5 primary melanoma cells were seeded in 6-well plates at the density of 50,000 cells per well. After three days of culture, cells were treated with 1 μM Gö6976, 1 μM Gö6983 or DMSO for 24 h. Cells were then lysed and proteins analyzed by western blot using anti-E-cadherin, anti-N-cadherin or anti-actin antibodies. T1 melanoma cells were used as positive control for E-cadherin expression. B. I5 primary melanoma cells were seeded in methylcellulose (1000 cells per plate) containing 1 μM Gö6976 or 1 μM Gö6983. The colonies were counted after 18 days of culture. (PPTX 135 kb)

**Additional file 3:** Correlation between PKD1 expression and mesenchymal features in primary (T1 and I5) and metastatic (G1, M2 and M4T2) melanoma cells. The relationship between PKD1 expression and mesenchymal features in melanoma cells was estimated using Pearson's correlation analysis applied on the data from western blot, MTT, methylcellulose and wound healing assays that are presented in Figs. 1, 6 and 7a. (PPTX 51 kb)

**Additional file 4:** PKD1 knockdown induces the expression of E-cadherin and inhibits the expression of N-cadherin in M4T2 metastatic melanoma cells. M4T2 cells were transfected or not with either specific PKD1-targeting (siPKD1) or control non-targeting (siControl) siRNAs according to the manufacturer protocol (Santa Cruz Biotechnology, sc-36245 and sc-37007, respectively). Three days after transfection, these cells were analyzed by western blot for PKD1, E-cadherin, N-cadherin and actin expression. (PPTX 102 kb)

### Abbreviations

CAMK: Calcium/calmodulin-dependent kinase; DMSO: Dimethylsulfoxide; EMT: Epithelial-mesenchymal transition; ERK: Extracellular signal-regulated kinase; JNK: c-jun N-terminal kinase; MET: Mesenchymal-epithelial transition; MMP: Metalloproteinase; NFκB: Nuclear factor-kappa B; PKC: Protein kinase C; PKD1: Protein kinase D1

### Acknowledgments

We would like to thank Dr Manish Singh for his technical support in the use of the inverted epifluorescence microscope.

### Funding

MM, CS, CH and MK (partially) were funded by OSEO innovation "APAS-IPK" that also financially supported this study. ME was funded by the French Ministry of Higher Education and Research. MK was also partially funded by Qatar foundation.

### Availability of data and materials

All relevant data or materials are provided in the manuscript or as "Additional files". Any additional dataset supporting the results reported in this article is available from the corresponding author on reasonable request.

### Authors' contributions

MML carried out the anchorage-independent growth and migration studies on M4T2 cells, compared the expression of PKD1, E-cadherin and N-cadherin in the different melanoma cell lines, analyzed E-cadherin expression in PKD1-depleted cells and participated in drafting the manuscript. CS carried out the cadherin switch analysis following treatment with PKC inhibitors as well as all immunofluorescence studies, and participated in drafting the manuscript. ME participated in the analysis of PKD1 expression in stable clones generated by lentiviral shRNA transduction and performed the anchorage-independent

growth and migration assays in M2 cells. CH carried out the ELISA assay and helped in confocal microscopy. CA participated in the design of the study and data analysis. MK conceived, designed and coordinated the study, generated the lentiviral shRNA transduced stable clones and helped to draft the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

**Competing interests**
The authors declare that they have no competing interests in this section.

**Consent for publication**
Not applicable.

**Ethics approval and consent to participate**
Not applicable.

**Author details**
[1]LBPA, ENS Cachan, CNRS, Université Paris-Saclay, Cachan 94235, France. [2]Département de Génétique, Institut Curie, Unité de Pharmacogénomique, Paris 75248, France. [3]Qatar Biomedical Research Institute, Hamad Bin Khalifa University, Qatar Foundation, Doha 5825, Qatar.

**Received: 3 December 2015 Accepted: 15 December 2016**
**Published online: 05 January 2017**

**References**

1. Erdei E, Torres SM. A new understanding in the epidemiology of melanoma. Expert Rev Anticancer Ther. 2010;10(11):1811–23. doi:10.1586/era.10.170.
2. Garbe C, Peris K, Hauschild A, Saiag P, Middleton M, Spatz A, et al. Diagnosis and treatment of melanoma. European consensus-based interdisciplinary guideline–Update 2012. Eur J Cancer. 2012;48(15):2375–90. doi:10.1016/j.ejca.2012.06.013.
3. Gray-Schopfer V, Wellbrock C, Marais R. Melanoma biology and new targeted therapy. Nature. 2007;445(7130):851–7. doi:10.1038/nature05661.
4. Callahan MK. Immune checkpoint therapy in melanoma. Cancer J. 2016;22(2):73–80. doi:10.1097/PPO.0000000000000183.
5. Carlino MS, Long GV, Kefford RF, Rizos H. Targeting oncogenic BRAF and aberrant MAPK activation in the treatment of cutaneous melanoma. Crit Rev Oncol Hematol. 2015;96(3):385–98. doi:10.1016/j.critrevonc.2015.08.021.
6. Hsu MY, Meier FE, Nesbit M, Hsu JY, Van Belle P, Elder DE, et al. E-cadherin expression in melanoma cells restores keratinocyte-mediated growth control and down-regulates expression of invasion-related adhesion receptors. Am J Pathol. 2000;156(5):1515–25. doi:10.1016/S0002-9440(10)65023-7.
7. Valyi-Nagy IT, Hirka G, Jensen PJ, Shih IM, Juhasz I, Herlyn M. Undifferentiated keratinocytes control growth, morphology, and antigen expression of normal melanocytes through cell-cell contact. Lab Invest. 1993;69(2):152–9.
8. Danen EH, de Vries TJ, Morandini R, Ghanem GG, Ruiter DJ, van Muijen GN. E-cadherin expression in human melanoma. Melanoma Res. 1996;6(2):127–31.
9. Hsu MY, Wheelock MJ, Johnson KR, Herlyn M. Shifts in cadherin profiles between human normal melanocytes and melanomas. J Investig Dermatol Symp Proc. 1996;1(2):188–94.
10. Haass NK, Smalley KS, Herlyn M. The role of altered cell-cell communication in melanoma progression. J Mol Histol. 2004;35(3):309–18.
11. Halbleib JM, Nelson WJ. Cadherins in development: cell adhesion, sorting, and tissue morphogenesis. Genes Dev. 2006;20(23):3199–214. doi:10.1101/gad.1486806.
12. Kemler R. From cadherins to catenins: cytoplasmic protein interactions and regulation of cell adhesion. Trends Genet. 1993;9(9):317–21.
13. Lee JM, Dedhar S, Kalluri R, Thompson EW. The epithelial-mesenchymal transition: new insights in signaling, development, and disease. J Cell Biol. 2006;172(7):973–81. doi:10.1083/jcb.200601018.
14. Hazan RB, Qiao R, Keren R, Badano I, Suyama K. Cadherin switch in tumor progression. Ann N Y Acad Sci. 2004;1014:155–63.
15. Li G, Satyamoorthy K, Herlyn M. N-cadherin-mediated intercellular interactions promote survival and migration of melanoma cells. Cancer Res. 2001;61(9):3819–25.
16. Wheelock MJ, Shintani Y, Maeda M, Fukumoto Y, Johnson KR. Cadherin switching. J Cell Sci. 2008;121(Pt 6):727–35. doi:10.1242/jcs.000455.
17. Alexaki VI, Javelaud D, Van Kempen LC, Mohammad KS, Dennler S, Luciani F, et al. GLI2-mediated melanoma invasion and metastasis. J Natl Cancer Inst. 2010;102(15):1148–59. doi:10.1093/jnci/djq257.
18. Miller AJ, Mihm Jr MC. Melanoma. N Engl J Med. 2006;355(1):51–65. doi:10.1056/NEJMra052166.
19. Ciolczyk-Wierzbicka D, Gil D, Laidler P. The inhibition of cell proliferation using silencing of N-cadherin gene by siRNA process in human melanoma cell lines. Curr Med Chem. 2012;19(1):145–51.
20. Newton AC. Protein kinase C: structure, function, and regulation. J Biol Chem. 1995;270(48):28495–8.
21. Denning MF. Specifying protein kinase C functions in melanoma. Pigment Cell Melanoma Res. 2012;25(4):466–76. doi:10.1111/j.1755-148X.2012.01015.x.
22. Oka M, Kikkawa U. Protein kinase C in melanoma. Cancer Metastasis Rev. 2005;24(2):287–300. doi:10.1007/s10555-005-1578-8.
23. Johannes FJ, Prestle J, Eis S, Oberhagemann P, Pfizenmaier K. PKCu is a novel, atypical member of the protein kinase C family. J Biol Chem. 1994;269(8):6140–8.
24. Valverde AM, Sinnett-Smith J, Van Lint J, Rozengurt E. Molecular cloning and characterization of protein kinase D: a target for diacylglycerol and phorbol esters with a distinctive catalytic domain. Proc Natl Acad Sci U S A. 1994;91(18):8572–6.
25. Rozengurt E, Rey O, Waldron RT. Protein kinase D signaling. J Biol Chem. 2005;280(14):13205–8. doi:10.1074/jbc.R500002200.
26. Gschwendt M, Dieterich S, Rennecke J, Kittstein W, Mueller HJ, Johannes FJ. Inhibition of protein kinase C mu by various inhibitors. Differentiation from protein kinase c isoenzymes. FEBS Lett. 1996;392(2):77–80.
27. Martiny-Baron G, Kazanietz MG, Mischak H, Blumberg PM, Kochs G, Hug H, et al. Selective inhibition of protein kinase C isozymes by the indolocarbazole Go 6976. J Biol Chem. 1993;268(13):9194–7.
28. Delannoy P, Lemonnier J, Hay E, Modrowski D, Marie PJ. Protein kinase C-dependent upregulation of N-cadherin expression by phorbol ester in human calvaria osteoblasts. Exp Cell Res. 2001;269(1):154–61. doi:10.1006/excr.2001.5301.
29. Koivunen J, Aaltonen V, Koskela S, Lehenkari P, Laato M, Peltonen J. Protein kinase C alpha/beta inhibitor Go6976 promotes formation of cell junctions and inhibits invasion of urinary bladder carcinoma cells. Cancer Res. 2004;64(16):5693–701. doi:10.1158/0008-5472.CAN-03-3511.
30. Gassara A, Messai Y, Gaudin C, Abouzahr S, Jalil A, Diarra-Mehrpour M, et al. The decreased susceptibility of metastatic melanoma cells to killing involves an alteration of CTL reactivity. Int J Oncol. 2006;29(1):155–61.
31. Tian X, Liu Z, Niu B, Zhang J, Tan TK, Lee SR, et al. E-cadherin/beta-catenin complex and the epithelial barrier. J Biomed Biotechnol. 2011;2011:567305. doi:10.1155/2011/567305.
32. Du W, Liu X, Fan G, Zhao X, Sun Y, Wang T, et al. From cell membrane to the nucleus: an emerging role of E-cadherin in gene transcriptional regulation. J Cell Mol Med. 2014;18(9):1712–9. doi:10.1111/jcmm.12340.
33. Orsulic S, Huber O, Aberle H, Arnold S, Kemler R. E-cadherin binding prevents beta-catenin nuclear localization and beta-catenin/LEF-1-mediated transactivation. J Cell Sci. 1999;112(Pt 8):1237–45.
34. Sinnberg T, Menzel M, Ewerth D, Sauer B, Schwarz M, Schaller M, et al. beta-Catenin signaling increases during melanoma progression and promotes tumor cell survival and chemoresistance. PLoS One. 2011;6(8):e23429. doi:10.1371/journal.pone.0023429.
35. Sandig M, Voura EB, Kalnins VI, Siu CH. Role of cadherins in the transendothelial migration of melanoma cells in culture. Cell Motil Cytoskeleton. 1997;38(4):351–64. doi:10.1002/(SICI)1097-0169(1997)38:4<351::AID-CM5>3.0.CO;2-6.
36. Chaffer CL, Thompson EW, Williams ED. Mesenchymal to epithelial transition in development and disease. Cells Tissues Organs. 2007;185(1–3):7–19. doi:10.1159/000101298.
37. Hugo H, Ackland ML, Blick T, Lawrence MG, Clements JA, Williams ED, et al. Epithelial--mesenchymal and mesenchymal--epithelial transitions in carcinoma progression. J Cell Physiol. 2007;213(2):374–83. doi:10.1002/jcp.21223.
38. Thiery JP. Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. Nat Rev Cancer. 2002;2(6):442–54. doi:10.1038/nrc822.
39. Yao D, Dai C, Peng S. Mechanism of the mesenchymal-epithelial transition and its relationship with metastatic tumor formation. Mol Cancer Res. 2011;9(12):1608–20. doi:10.1158/1541-7786.MCR-10-0568.
40. Chen A, Beetham H, Black MA, Priya R, Telford BJ, Guest J, et al. E-cadherin loss alters cytoskeletal organization and adhesion in non-malignant breast cells but is insufficient to induce an epithelial-mesenchymal transition. BMC Cancer. 2014;14:552. doi:10.1186/1471-2407-14-552.
41. Knudsen KA, Sauer C, Johnson KR, Wheelock MJ. Effect of N-cadherin misexpression by the mammary epithelium in mice. J Cell Biochem. 2005;95(6):1093–107. doi:10.1002/jcb.20469.

42. Hulit J, Suyama K, Chung S, Keren R, Agiostratidou G, Shan W, et al. N-cadherin signaling potentiates mammary tumor metastasis via enhanced extracellular signal-regulated kinase activation. Cancer Res. 2007;67(7):3106–16. doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-3401.
43. Derycke LD, Bracke ME. N-cadherin in the spotlight of cell-cell adhesion, differentiation, embryogenesis, invasion and signalling. Int J Dev Biol. 2004; 48(5–6):463–76. doi:10.1387/ijdb.041793ld.
44. Islam S, Carey TE, Wolf GT, Wheelock MJ, Johnson KR. Expression of N-cadherin by human squamous carcinoma cells induces a scattered fibroblastic phenotype with disrupted cell-cell adhesion. J Cell Biol. 1996;135(6 Pt 1):1643–54.
45. Wheelock MJ, Johnson KR. Cadherins as modulators of cellular phenotype. Annu Rev Cell Dev Biol. 2003;19:207–35. doi:10.1146/annurev.cellbio.19.011102.111135.
46. Hinck L, Nathke IS, Papkoff J, Nelson WJ. Dynamics of cadherin/catenin complex formation: novel protein interactions and pathways of complex assembly. J Cell Biol. 1994;125(6):1327–40.
47. Klingelhofer J, Troyanovsky RB, Laur OY, Troyanovsky S. Exchange of catenins in cadherin-catenin complex. Oncogene. 2003;22(8):1181–8. doi:10.1038/sj.onc.1206245.
48. Ozawa M, Kemler R. Molecular organization of the uvomorulin-catenin complex. J Cell Biol. 1992;116(4):989–96.
49. He H, Davidson AJ, Wu D, Marshall FF, Chung LW, Zhau HE, et al. Phorbol ester phorbol-12-myristate-13-acetate induces epithelial to mesenchymal transition in human prostate cancer ARCaPE cells. Prostate. 2010;70(10): 1119–26. doi:10.1002/pros.21146.
50. Lemonnier J, Hay E, Delannoy P, Lomri A, Modrowski D, Caverzasio J, et al. Role of N-cadherin and protein kinase C in osteoblast gene activation induced by the S252W fibroblast growth factor receptor 2 mutation in Apert craniosynostosis. J Bone Miner Res. 2001;16(5):832–45. doi:10.1359/jbmr.2001.16.5.832.
51. Tang R, Yang C, Tao JL, You YK, An N, Li SM, et al. Epithelial-mesenchymal transdifferentiation of renal tubular epithelial cells induced by urinary proteins requires the activation of PKC-alpha and beta1 isozymes. Cell Biol Int. 2011;35(9):953–9. doi:10.1042/CBI20100668.
52. Jain K, Basu A. Protein kinase C-epsilon promotes EMT in breast cancer. Breast Cancer. 2014;8:61–7. doi:10.4137/BCBCR.S13640.
53. Steinberg SF. Structural basis of protein kinase C isoform function. Physiol Rev. 2008;88(4):1341–78. doi:10.1152/physrev.00034.2007.
54. Rozengurt E, Sinnett-Smith J, Van Lint J, Valverde AM. Protein kinase D (PKD): a novel target for diacylglycerol and phorbol esters. Mutat Res. 1995;333(1–2):153–60.
55. Sundram V, Chauhan SC, Jaggi M. Emerging roles of protein kinase D1 in cancer. Mol Cancer Res. 2011;9(8):985–96. doi:10.1158/1541-7786.MCR-10-0365.
56. Kempkes C, Rattenholl A, Buddenkotte J, Strozyk E, Eberle J, Hausser A, et al. Proteinase-activated receptors 1 and 2 regulate invasive behavior of human melanoma cells via activation of protein kinase D1. J Invest Dermatol. 2012; 132(2):375–84. doi:10.1038/jid.2011.314.
57. Eiseler T, Kohler C, Nimmagadda SC, Jamali A, Funk N, Joodi G, et al. Protein kinase D1 mediates anchorage-dependent and -independent growth of tumor cells via the zinc finger transcription factor Snail1. J Biol Chem. 2012; 287(39):32367–80. doi:10.1074/jbc.M112.370999.
58. Johannessen M, Delghandi MP, Rykx A, Dragset M, Vandenheede JR, Van Lint J, et al. Protein kinase D induces transcription through direct phosphorylation of the cAMP-response element-binding protein. J Biol Chem. 2007;282(20):14777–87. doi:10.1074/jbc.M610669200.
59. Sinnett-Smith J, Ni Y, Wang J, Ming M, Young SH, Rozengurt E. Protein kinase D1 mediates class IIa histone deacetylase phosphorylation and nuclear extrusion in intestinal epithelial cells: role in mitogenic signaling. Am J Physiol Cell Physiol. 2014;306(10):C961–71. doi:10.1152/ajpcell.00048.2014.
60. Batlle E, Sancho E, Franci C, Dominguez D, Monfar M, Baulida J, et al. The transcription factor snail is a repressor of E-cadherin gene expression in epithelial tumour cells. Nat Cell Biol. 2000;2(2):84–9. doi:10.1038/35000034.
61. Poser I, Dominguez D, de Herreros AG, Varnai A, Buettner R, Bosserhoff AK. Loss of E-cadherin expression in melanoma cells involves up-regulation of the transcriptional repressor Snail. J Biol Chem. 2001;276(27):24661–6. doi:10.1074/jbc.M011224200.
62. Yuan J, Lugea A, Zheng L, Gukovsky I, Edderkaoui M, Rozengurt E, et al. Protein kinase D1 mediates NF-kappaB activation induced by cholecystokinin and cholinergic signaling in pancreatic acinar cells. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2008;295(6):G1190–201. doi:10.1152/ajpgi.90452.2008.
63. Kuphal S, Bosserhoff AK. Influence of the cytoplasmic domain of E-cadherin on endogenous N-cadherin expression in malignant melanoma. Oncogene. 2006;25(2):248–59. doi:10.1038/sj.onc.1209054.
64. Kondratiev S, Gnepp DR, Yakirevich E, Sabo E, Annino DJ, Rebeiz E, et al. Expression and prognostic role of MMP2, MMP9, MMP13, and MMP14 matrix metalloproteinases in sinonasal and oral malignant melanomas. Hum Pathol. 2008;39(3):337–43. doi:10.1016/j.humpath.2007.07.003.
65. Rotte A, Martinka M, Li G. MMP2 expression is a prognostic marker for primary melanoma patients. Cell Oncol. 2012;35(3):207–16. doi:10.1007/s13402-012-0080-x.
66. Zhang Z, Zhu S, Yang Y, Ma X, Guo S. Matrix metalloproteinase-12 expression is increased in cutaneous melanoma and associated with tumor aggressiveness. Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine. 2015. doi:10.1007/s13277-015-3622-9.
67. Zhao X, Sun B, Li Y, Liu Y, Zhang D, Wang X, et al. Dual effects of collagenase-3 on melanoma: metastasis promotion and disruption of vasculogenic mimicry. Oncotarget. 2015;6(11):8890–9.
68. Hofmann UB, Houben R, Brocker EB, Becker JC. Role of matrix metalloproteinases in melanoma cell invasion. Biochimie. 2005;87(3–4):307–14. doi:10.1016/j.biochi.2005.01.013.
69. Kim S, Han J, Lee SK, Choi MY, Kim J, Lee J, et al. Berberine suppresses the TPA-induced MMP-1 and MMP-9 expressions through the inhibition of PKC-alpha in breast cancer cells. J Surg Res. 2012;176(1):e21–9. doi:10.1016/j.jss.2011.11.1041.
70. Roy S, Chakraborti T, Chowdhury A, Chakraborti S. Role of PKC-alpha in NF-kappaB-MT1-MMP-mediated activation of proMMP-2 by TNF-alpha in pulmonary artery smooth muscle cells. J Biochem. 2013;153(3):289–302. doi:10.1093/jb/mvs150.
71. Shin Y, Yoon SH, Choe EY, Cho SH, Woo CH, Rho JY, et al. PMA-induced up-regulation of MMP-9 is regulated by a PKCalpha-NF-kappaB cascade in human lung epithelial cells. Exp Mol Med. 2007;39(1):97–105. doi:10.1038/emm.2007.11.
72. Karam M, Bieche I, Legay C, Vacher S, Auclair C, Ricort JM. Protein kinase D1 regulates ERalpha-positive breast cancer cell growth response to 17beta-estradiol and contributes to poor prognosis in patients. J Cell Mol Med. 2014;18(12):2536–52. doi:10.1111/jcmm.12322.
73. Karam M, Legay C, Auclair C, Ricort JM. Protein kinase D1 stimulates proliferation and enhances tumorigenesis of MCF-7 human breast cancer cells through a MEK/ERK-dependent signaling pathway. Exp Cell Res. 2012;318(5):558–69. doi:10.1016/j.yexcr.2012.01.001.
74. Guha S, Tanasanvimon S, Sinnett-Smith J, Rozengurt E. Role of protein kinase D signaling in pancreatic cancer. Biochem Pharmacol. 2010;80(12): 1946–54. doi:10.1016/j.bcp.2010.07.002.
75. Kisfalvi K, Hurd C, Guha S, Rozengurt E. Induced overexpression of protein kinase D1 stimulates mitogenic signaling in human pancreatic carcinoma PANC-1 cells. J Cell Physiol. 2010;223(2):309–16. doi:10.1002/jcp.22036.

Submit your next manuscript to BioMed Central and we will help you at every step:

- We accept pre-submission inquiries
- Our selector tool helps you to find the most relevant journal
- We provide round the clock customer support
- Convenient online submission
- Thorough peer review
- Inclusion in PubMed and all major indexing services
- Maximum visibility for your research

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit

BioMed Central

# Protein kinase C inhibitor Gö6976 but not Gö6983 induces the reversion of E- to N-cadherin switch and metastatic phenotype in melanoma: identification of the role of protein kinase D1

Messaouda Merzoug-Larabi†, Caroline Spasojevic†, Marianne Eymard, Caroline Hugonin, Christian Auclair and Manale Karam ✉
† Contributed equally

*BMC Cancer* 2017 17:12 | DOI: 10.1186/s12885-016-3007-5 | © The Author(s). 2017
Received: 3 December 2015 | Accepted: 15 December 2016 | Published: 5 January 2017

Additional file 1: Correlation between N-/E-cadherin expression and mesenchymal features in primary (T1 and I5) and metastatic (G1, M2 and M4T2) melanoma cells. The relationship between N-cadherin (A) or E-cadherin (B) expression and mesenchymal features in melanoma cells was estimated using Pearson's correlation analysis applied on the data from western blot, MTT, methylcellulose and wound healing assays that are presented in Figs. 1, 6 and 7a. In panel B, the last column of the table represents the same correlation study but excluding I5 cell line from the analysis. The results highlight the strong and significant negative correlation between E-cadherin expression and mesenchymal features in most melanoma models and the existence of some models (such as I5) in which E-cadherin loss might not be enough to induce mesenchymal features and might require additional events in tumor development. (PPTX 64 kb)

Additional file 2: Effect of Gö6976 on the expression of E- and N-cadherins and the anchorage-independent growth in I5 primary melanoma cell line. A. I5 primary melanoma cells were seeded in 6-well plates at the density of 50,000 cells per well. After three days of culture, cells were treated with 1 μM Gö6976, 1 μM Gö6983 or DMSO for 24 h. Cells were then lysed and proteins analyzed by western blot using anti-E-cadherin, anti-N-cadherin or anti-actin antibodies. T1 melanoma cells were used as positive control for E-cadherin expression. B. I5 primary melanoma cells were seeded in methylcellulose (1000 cells per plate) containing 1 μM Gö6976 or 1 μM Gö6983. The colonies were counted after 18 days of culture. (PPTX 135 kb)

Additional file 3: Correlation between PKD1 expression and mesenchymal features in primary (T1 and I5) and metastatic (G1, M2 and M4T2) melanoma cells. The relationship between PKD1 expression and mesenchymal features in melanoma cells was estimated using Pearson's correlation analysis applied on the data from western blot, MTT, methylcellulose and wound healing assays that are presented in Figs. 1, 6 and 7a. (PPTX 51 kb)

Additional file 4: PKD1 knockdown induces the expression of E-cadherin and inhibits the expression of N-cadherin in M4T2 metastatic melanoma cells. M4T2 cells were transfected or not with either specific PKD1-targeting (siPKD1) or control non-targeting (siControl) siRNAs according to the manufacturer protocol (Santa Cruz Biotechnology, sc-36245 and sc-37007, respectively). Three days after transfection, these cells were analyzed by western blot for PKD1, E-cadherin, N-cadherin and actin expression. (PPTX 102 kb)

Additional file 1

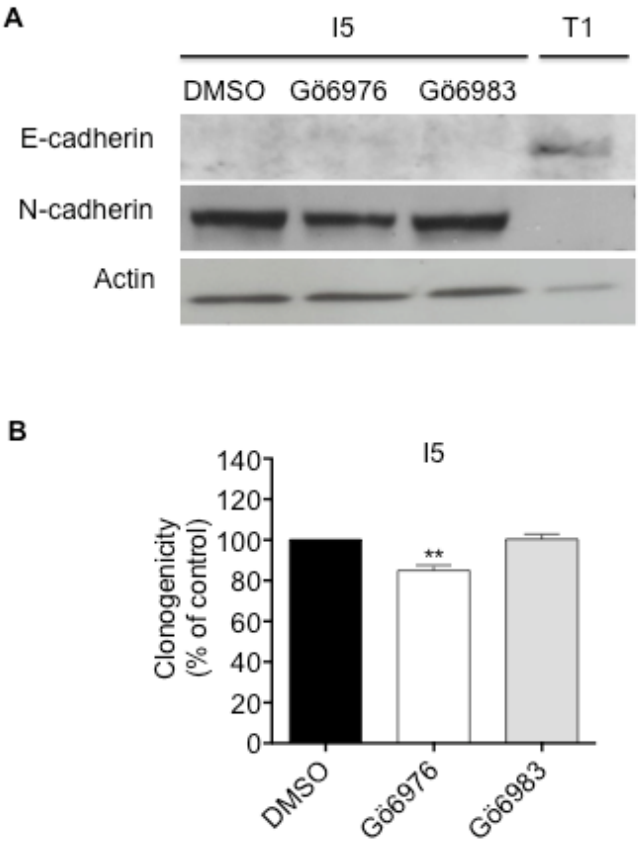
**A**

| Correlation between N-cadherin expression and mesenchymal features in M2, M4T2, G1, T1 and I5 melanoma cell lines | |
|---|---|
| **Clonogenicity** | |
| Pearson correlation coefficient | 0.938 |
| *p* | 0.009 |
| **Migration (Closure % at 24 hours)** | |
| Pearson correlation coefficient | 0.878 |
| *p* | 0.025 |
| **Proliferation (MTT OD570 at day 6)** | |
| Pearson correlation coefficient | 0.768 |
| *p* | 0.05 |

**B**

| Correlation between E-cadherin expression and mesenchymal features in M2, M4T2, G1, T1 including or not I5 melanoma cell lines | | |
|---|---|---|
| | **Including I5** | **Excluding I5** |
| **Clonogenicity** | | |
| Pearson correlation coefficient | -0.697 | -0.906 |
| *p* | 0.096 | 0.047 |
| **Migration (Closure % after 24 hours)** | | |
| Pearson correlation coefficient | -0.622 | -0.992 |
| *p* | 0.131 | 0.004 |
| **Proliferation (MTT OD570 at day 6)** | | |
| Pearson correlation coefficient | -0.45 | -0.846 |
| *p* | 0.22 | 0.047 |

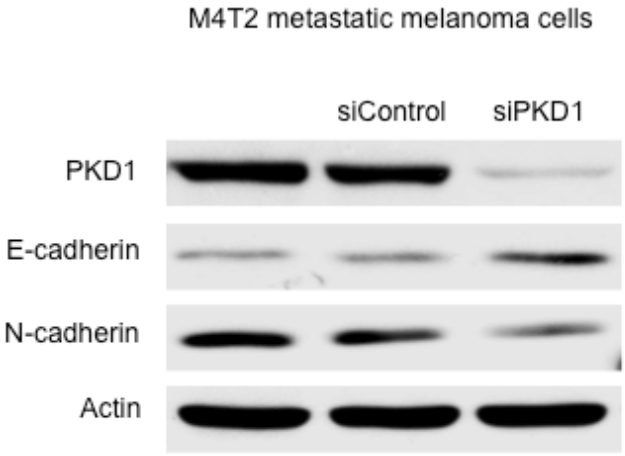
Additional file 2



Additional file 3

| Correlation between PKD1 expression and mesenchymal features in M2, M4T2, G1, T1 and I5 melanoma cell lines | |
|---|---|
| **Clonogenicity** | |
| Pearson correlation coefficient | 0.973 |
| *p* | 0.003 |
| **Migration (Closure % at 24 hours)** | |
| Pearson correlation coefficient | 0.772 |
| *p* | 0.063 |
| **Proliferation (MTT OD570 at day 6)** | |
| Pearson correlation coefficient | 0.805 |
| *p* | 0.05 |

Additional file 4



# PKD1 et cancer du sein

## Article 2: PKD1 is a potential biomarker and therapeutic target in triple negative breast cancer

Caroline Spasojevic, Elisabetta Marangoni, Sophie Vacher, Franck Assayag, Didier Meseure, Sophie Château-Joubert, Martine Humbert, Manale Karam, Jean Marc Ricort, Christian Auclair, Marie Regairaz et Ivan Bièche

*Article soumis, Septembre 2017*

Le cancer du sein est un cancer très hétérogène et comme nous avons pu le voir dans l'introduction de ce manuscrit il y a une nécessité d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques.

Dans ce but, notre équipe s'est intéressée à l'implication de la protéine kinase D1 dans le cancer du sein. Nous avons précédemment montré que PKD1 pouvait jouer un rôle pro-tumoral dans le cancer du sein. En effet, la sur-expression de PKD1 au sein de cellules exprimant le récepteur aux œstrogènes et donc dépendante en œstrogènes permettait de lever cette dépendance pour la survie et la prolifération cellulaire (Karam et al., 2012). Plus récemment, notre équipe a également montré que PKD1 pouvait réguler la dépendance aux œstrogènes par la modulation de l'expression du récepteur des œstrogènes (Karam et al., 2014). Dans cette même étude, notre équipe a aussi montré que le niveau d'expression de PKD1 en ARNm était associé à une moins bonne survie sans développement de métastases parmi les tumeurs de sein ERα+ résistants aux traitements anti-hormonaux. Les tumeurs de seins ERα+ résistants aux traitements anti-hormonaux peuvent être associées à des tumeurs de seins ERα- car elles ne sont pas dépendantes de la signalisation des œstrogènes.

Au vu de ces résultats, l'objectif de cette seconde étude a été d'étudier la valeur pronostique de PKD1 dans les différentes sous-populations de cancer du sein et de vérifier si PKD1 pouvait être une cible thérapeutique pertinente.

Dans ce but, nous avons analysé l'expression en ARNm de *PRKD1* (gène codant pour la protéine PKD1) au sein d'une cohorte de 527 tumeurs du sein de patientes

de l'Institut Curie dont les données pathologiques, biologiques et cliniques étaient connues. Les résultats ont montré que *PRKD1* était un facteur indépendant de mauvais pronostic au sein de la population totale de cancer du sein et plus précisément au sein du sous types de cancer du sein triple négatif. Nous avons également analysé l'impact d'une inhibition pharmacologique ou d'une inhibition de l'expression de PKD1 par des siRNA *in vitro* sur la formation de colonies dans une lignée cellulaire de cancer du sein triple négatif. Nous avons, dans un premier temps, sélectionné le meilleur modèle de lignée mammaire pour cette étude. Nous avons ainsi analysé l'expression de PKD1 au sein d'un large panel de 21 lignées cellulaires de cancer du sein triple négatif. En parallèle de cela, nous avons également, en collaboration avec la société AB Science, testé un large panel d'inhibiteurs spécifiques de PKD1. Pour cela, nous avons reçu 41 inhibiteurs pharmacologiques de PKD1 sélectionnés par la société AB Science comme ayant la plus faible IC50 *in vitro* sur leur capacité à inhiber l'activité de la kinase purifiée. Puis nous avons ensuite sélectionné les deux inhibiteurs ayant une faible IC50 (concentration inhibitrice médiane) sur leur capacité à inhiber la croissance indépendante de l'ancrage des cellules MCF-7 sur-exprimant PKD1 *in vitro* et ayant une bonne biodisponibilité *in vivo*. A la suite de cela, nous avons étudié l'impact d'une inhibition pharmacologique de PKD1 sur la croissance tumorale *in vivo* au sein de xénogreffes de cancer du sein triple négatif dérivées de patients (PDX). Pour cela, nous avons préalablement choisi le meilleur modèle de PDX de cancer du sein triple négatif pour son expression de PKD1 parmi un large panel de PDXs disponible au sein du LIP (Laboratoire d'Investigation Préclinique) de l'Institut Curie.

Les résultats d'expression de PKD1 sur un large panel de lignées cellulaires de cancer du sein triple négatif nous ont permis d'identifier la lignée MDA-MB-436 comme modèle ayant une bonne expression de PKD1. Afin de réaliser l'inhibition de PKD1, nous avons testé en collaboration avec AB Science, des inhibiteurs spécifiques de PKD1 et nous avons sélectionné les molécules AB9275 et AB9539 comme meilleurs inhibiteurs pharmacologiques de PKD1. L'inhibition de PKD1 dans la lignée cellulaire MDA-MB-436 par les deux inhibiteurs pharmacologiques de PKD1 (AB9275 et AB9539) ou par l'inhibition de son expression *via* des siRNA a réduit la capacité des cellules à former des colonies.

L'analyse de l'expression de PKD1 dans un large panel de PDXs de cancer du

sein triple négatif, nous a permis de sélectionner un modèle ayant une expression de PKD1 positive : le modèle HBCx-60. Le traitement de ce modèle par un inhibiteur pharmacologique de PKD1 (AB9275) a permis de diminuer significativement la croissance tumorale *in vivo*.

Au travers de ces résultats, cette étude a montré que PKD1 est un facteur de mauvais pronostic dans la population de cancer du sein triple négatif et qu'elle est une cible thérapeutique pertinente pour ce sous type de tumeurs du sein.

## PKD1 is a potential biomarker and therapeutic target in triple-negative breast cancer

Caroline Spasojevic[1,2], Elisabetta Marangoni[3], Sophie Vacher[1], Franck Assayag[3], Didier Meseure[4], Sophie Château-Joubert[5], Martine Humbert[6], Manale Karam[2,7], Jean Marc Ricort[2,8], Christian Auclair[6,8], Marie Regairaz[2,8] and Ivan Bièche[1]

[1]Pharmacogenomics Unit, Department of Genetics, Institut Curie, Paris, France.
[2]LBPA, CNRS UMR8113, ENS Paris Saclay, Paris-Saclay, University, Cachan, France.
[3]Translational Research Department, Institut Curie, PSL Research University, Paris, France
[4]Department of Pathology, Institut Curie, Paris, France
[5]BioPôle Alfort, Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, Maisons Alfort, France.
[6]AB Science SA, Paris, France.
[7]Cancer Research Center, Qatar Biomedical Research Institute, Hamad Bin Khalifa University, Qatar Foundation, Doha, Qatar
[8]Biology department, ENS Paris Saclay, Paris-Saclay, University, Cachan, France

.

**Abstract:**

Protein Kinase D1 (PKD1) is a serine/threonine kinase encoded by the *PRKD1* gene. PKD1 has been previously shown to be a prognostic factor in ERα+ tamoxifen-resistant breast tumors and PKD1 overexpression confers estrogen independence to ERα+ MCF7 cells. In the present study, our goal was to determine whether PKD1 is a prognostic factor and/or a relevant therapeutic target in breast cancer. We analyzed *PRKD1* mRNA levels in 527 primary breast tumors. We found that high *PRKD1* mRNA levels were significantly and independently associated with a low metastasis-free survival in the whole breast cancer population and in the triple-negative breast cancer (TNBC) subtype specifically. We identified novel PKD1 inhibitors and assessed their antitumor activity *in vitro* in TNBC cell lines and *in vivo* in a TNBC patient-derived xenograft (PDX) model. Pharmacological inhibition and siRNA-mediated depletion of PKD1 reduced colony formation in MDA-MB-436 TNBC cells. PKD1 inhibition also reduced tumor growth *in vivo* in a TNBC PDX model. Together, these results establish PKD1 as a poor prognostic factor and a potential therapeutic target in TNBC.

**Corresponding author:** Dr Ivan Bièche, Unit of Pharmacogenomics, Department of genetics, Institut Curie, 26 rue d'Ulm, Paris 75005, France. Phone: 331-7238-9363; Email: ivan.bieche@curie.fr

**Abbreviations:**

BC: Breast cancer

TNBC: Triple-negative breast cancer

MFS: Metastasis-free survival

HR: Hormone receptors

ER: Estrogen receptor

RTV: Relative tumor volume

**Keywords:** Triple-negative breast cancer, Protein kinase D1, PKD

## 1. Introduction

Breast cancer is currently the first cause of death from cancer in women, and the second most common cancer overall, with 1.7 million new cases and 521,900 deaths each year according to the most recent worldwide study (Ferlay et al., 2015). Breast cancer prognosis is variable, depending mostly on tumor stage at diagnosis and on the molecular features of the tumor. Breast tumors can be divided into different molecular subtypes : i) the Luminal A and B subtypes, expressing high levels of estrogen and/or progesterone receptors, ii) the HER2+ subtype, overexpressing the human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) protein and iii) the triple negative breast cancers (TNBC) expressing none of the hormone receptors and showing no HER2 amplification and/or overexpression (Foulkes et al., 2010; Perou et al., 2000). TNBC and HER2+ cancers are the most aggressive tumors with the highest metastatic potential. The poor prognosis of TNBC also results from the lack of treatment options for these patients, who cannot benefit from either hormone or HER2-targeted therapies (Higgins and Baselga, 2011). Although hormone-sensitive tumors can be treated with endocrine drugs, resistance is observed in about 40% of advanced stage cases (Calaf et al., 2015). Thus, it remains very important to identify new targets and associated biomarkers for breast cancer therapy.

We have previously shown that the Protein kinase D1 (PKD1) can promote both proliferation and estrogen independence in breast cancer cells (Karam et al., 2012, 2014). PKD1 is a serine/threonine kinase encoded by the *PRKD1* gene (Rozengurt et al., 2005). PKD1 belongs to the PKD family (together with PKD2 and PKD3) within the CAMK (calcium/calmodulin-dependent kinase) superfamily. It is an atypical protein kinase C (PKC) activated by growth factors, mitogenic neuropeptides, as well as oxidative stress (Steinberg, 2012b). PKD1 regulates a variety of biological processes such as cell proliferation, survival, motility, organization of the Golgi apparatus and membrane trafficking (Merzoug-Larabi et al., 2017; Rozengurt, 2011). Hotspot activating mutations of *PRKD1* have recently been identified in polymorphous low-grade adenocarcinomas of salivary glands and likely constitute oncogenic drivers in these tumors (Weinreb et al., 2014). In breast cancer, a study from Kim and coll. showed that PKD1 can induce chemoresistance in cells (Kim et al., 2016a). In addition, we have previously demonstrated that PKD1 can confer resistance to antiestrogen therapy in ERα+ breast cancer cells (Karam et al., 2014).

Thus, PKD1 is likely to be a relevant therapeutic target in breast cancer.

The objective of the present study was to determine whether PKD1 can be a prognostic factor and/or a therapeutic target in breast cancer. Because PKD3 has also been identified as a potential molecular target in breast cancer (Borges et al., 2015), we extended our study to the two other members of the PKD family. Thus, we first analyzed PKD1, PKD2 and PKD3 expressions in a large series of primary breast tumors. After identifying PKD1 as an independent prognostic factor in TNBC, we assessed the antitumor activity of PKD1 pharmacological inhibition in TNBC cell lines and patient-derived xenografts (PDXs).

## 2. Results

### 2.1. *PRKD1* expression is a prognostic factor in total and TN breast cancer

To determine whether the expression of PKD family members is associated with prognosis in breast cancer, we first analyzed *PRKD1*, *PRKD2* and *PRKD3* mRNA levels by quantitative RT-PCR in a large series of 527 primary breast tumors with known clinical/pathological status and long-term outcome. The cohort was composed of 102 HR-/ERBB2- (TNBC), 72 HR-/ERBB2$^{+}$, 295 HR+/ERBB2- and 58 HR+/ERBB2+ cases. Clinical, pathological and biological characteristics of the entire cohort are described in table 1. In this cohort, a high histological grade, high macroscopic tumor size, lymph node status >3 and negative progesterone receptor status were significantly associated with a lower metastasis-free survival (MFS) (table 1).

*PRKD1*, *PRKD2* and *PRKD3* mRNA expressions were detected in 11%, 52% and 25% of cases, respectively. Importantly, we were able to detect PKD1 protein expression by immunohistochemistry in five tumors expressing high *PRKD1* mRNA levels. Conversely, no PKD1 protein expression was observed in five samples showing low *PRKD1* mRNA levels (Figure 1A).

To assess the prognostic value of *PRKD1*, *PRKD2* and *PRKD3* expressions, median expression levels were used as cutoff values to stratify patient samples intro groups of low expression and high expression. Outcome and clinical/biological parameters were then compared between low and high expression groups. Interestingly, only high *PRKD1* expression was associated with a lower metastasis-free survival independently of the BC subtype (p=0.0083; Figure 1B), whereas *PRKD2* or *PRKD3*

expressions did not significantly correlate with prognosis (Supplemental figure 1). High *PRKD1* mRNA levels were also significantly associated with a low SBR histological grade, ER- status and ERBB2+ status in the entire cohort (Supplemental table 1).

We next assessed the prognostic value of *PRKD1* expression in the different BC subtypes (TNBC, HR-/ERBB2+, HR+/ERBB2- and HR+/ERBB2+) and found that high *PRKD1* mRNA levels were associated with a lower MFS in TNBC (p=0.010; Figure 1C) but not in HR-/ERBB2+, HR+/ERBB2- or HR+/ERBB2+ tumors (Supplemental figure 1). High *PRKD1* mRNA levels did not correlate with clinical, pathological or biological parameters in TNBC (Supplemental Table 2).

To determine whether *PRKD1* could be an independent prognostic factor, we next performed a multivariate analysis in both the entire BC population and the TNBC subgroup. We tested the influence of *PRKD1* mRNA levels on MFS, together with the histological grade, lymph-node status, macroscopic tumor size, and progesterone receptor status (table 1). We found that lymph node invasion (p=0.0000009), high macroscopic tumor size (p=0.002), high histological grade (p=0.03) and high *PRKD1* expression (p=0.003) were significantly associated with a poorer prognosis in the whole breast cancer population (Table 2A). Most interestingly, high *PRKD1* expression was the only factor predicting MFS in TNBC (p=0.008) (Table 2B).

Together, these results show that *PRKD1*, *PRKD2* and *PRKD3* are expressed in breast cancer and that *PRKD*1 mRNA expression is an independent prognostic factor in the entire BC population and in the TNBC subpopulation. The poorer prognosis of TNBC expressing high *PRKD1* levels suggests that PKD1 plays a role in the biology of TN breast tumors and could represent a therapeutic target for their treatment.

### 2.2. Effect of PKD1 inhibition in TNBC cells

To determine whether PKD1 could be a relevant therapeutic target in TNBC, we next assessed the effect of PKD1 inactivation in cellular assays.

Since no selective PKD1 pharmacological inhibitor has been reported to date, we first screened a large panel of compounds to identify those capable of inhibiting PKD1 kinase activity in a biochemical assay. Forty-one molecules were found to inhibit PKD1 activity *in vitro* with an IC50 lower than 480 nM (range 9 – 480 nM).

In a previous work, we have shown that PKD1 overexpression confers estrogen

independence in MCF7 breast cancer cells (Karam et al., 2012). Interestingly, MCF7 parental cells are not able to grow on a semi-solid medium in the absence of estrogens whereas MCF7-PKD1 cells form colonies under the same conditions (Karam et al., 2012). Thus, the effect of the 41 potential PKD1 inhibitors was assessed in MCF7-PKD1 cells grown on methylcellulose in the absence of estrogens. The majority of molecules (33 out of 41) were able to inhibit estrogen-independent clonogenicity of MCF7-PKD1 cells with an IC50 below 5 µM (supplemental Table 3). Two compounds were selected for further experiments: AB9539, which showed the lowest IC50 (0.23 µM) and AB9275 which demonstrated a higher IC50 (1.27 µM) but possesses a good bioavailability (about 20%).

To evaluate the effect of PKD1 pharmacological inhibition in TNBC cells, *PRKD1* transcript levels were first analyzed by quantitative RT-PCR in a series of 21 TNBC cell lines. We found that *PRKD1* was expressed at the mRNA level in about half of the TNBC cell lines (Figure 2A). PKD1 protein expression was then analyzed by western blot in three cell lines showing *PRKD1* mRNA expression (MDA-MB-436, CAMA-1, HCC-38) and in three cell lines in which *PRKD1* transcript was not detected (MDA-MB-231, MDA-MB-468, HCC-1937). PKD1 protein expression was observed only in MDA-MB-436 cells (Figure 2B), which also expressed high levels of *PRKD1* mRNA. Thus, this cell line was selected to further study the effect of PKD1 inhibition. MDA-MB-436 cells were treated with different concentrations of the AB9539 or AB9275 compounds and colonies were counted after two weeks. Interestingly, both molecules were able to reduce colony formation, with an IC50 of 2.0 µM and 4.1 µM for AB9539 and AB9275, respectively (Figure 2C). Importantly, PKD1 silencing also resulted in a marked inhibition of clonogenicity in MDA-MB-436 cells (Figure 2D).

In conclusion, we identified two novel PKD1 inhibitors and demonstrated that both pharmacological inhibition and siRNA-mediated depletion of PKD1 reduces the ability of PKD1-expressing TNBC cells to form colonies.

**2.3. Antitumor activity of the AB9275 PKD1 inhibitor *in vivo***

To examine whether pharmacological inhibition of PKD1 could inhibit tumor growth *in vivo*, we decided to evaluate the antitumor activity of the AB9275 molecule in a TNBC patient-derived xenograft (PDX) model. AB9275 was preferred over AB9539 because of its better bioavailabilty (20% versus less than 5%).

In order to select a relevant *in vivo* model, PKD1 expression was analyzed in a panel

of 41 TNBC PDXs. *PRKD1* mRNA expression was detected by quantitative RT-PCR in about half of the PDXs (Figure 3A). PKD1 protein expression was confirmed by western blot and immunohistochemistry in three PDXs showing *PRKD1* mRNA expression (BC385, HBCx-60 and HBCx-4B) (Figure 3A-C). Conversely, PKD1 protein expression was low in the HBCx-12A model (expressing low *PRKD1* mRNA levels) (Figure 3A-C). The HBCx-60 PDX model, which expresses high levels of both *PRKD*1 mRNA and PKD1 protein (Figure 3A-C), was selected for *in vivo* evaluation of AB9275 activity.

Athymic mice bearing HBCx-60 xenografts were randomized into control and treatment groups and received either vehicle or AB9275 at 30 mg/kg, once daily during 22 days. The drug was well tolerated since body weight remained stable among treated animals and no toxic death was observed. Importantly, treatment with AB9275 was potent against the HBCx-60 model with a tumor growth inhibition (TGI) of 49% at the end of the treatment ($p<0.05$; Figure 3D).

These data demonstrate that pharmacological inhibition of PKD1 is able to inhibit tumor growth in a PKD1-expressing TNBC model *in vivo*.

## 3. Discussion

We previously reported that overexpression of PKD1 confers estrogen independence to ER+ breast cancer cells and is associated with a poorer prognosis in ER+ tamoxifen-treated breast tumors (Karam et al., 2014). This prompted us to determine whether PKD1 could be a potential prognostic factor and/or a therapeutic target in breast cancer. We showed that among the three members of the PKD family, only PKD1 is an independent prognostic factor in our entire breast cancer cohort. Indeed, *PRKD2* and *PRKD3* expression levels had no influence on MFS in the same series of tumors. It has been previously shown that PKD1 is down-regulated in breast cancer as compared to normal breast tissue (Borges et al., 2013; Eiseler et al., 2009). However, the association between PKD1 expression and outcome has never been examined. In our cohort, we did observe that PKD1 is down-regulated in primary breast tumors as compared to normal breast tissue (data not shown) and we also showed that high *PRKD1* mRNA levels are predictive of a poorer prognosis in both the entire cohort and the TNBC subgroup. Borges et al. reported that high *PRKD3* expression is a poor prognostic factor in ER- breast tumors (Borges et al., 2015).

However, we were not able to reach the same conclusions in our series of tumors (Supplemental table 1).

The biological role of PKD1 in breast cancer is still unclear but we have previously demonstrated that it can drive estrogen independence in ER+ BC cells (Karam et al., 2014). Most interestingly, high *PRKD1* expression is a poor prognostic factor in ER+ tamoxifen-treated breast tumors, suggesting that PKD1 participates to endocrine therapy resistance in the clinics (Karam et al., 2014). In the present study, we found that *PRKD1* expression is associated with a poor prognosis specifically in TNBC, *i.e.* in another hormone-independent BC subtype. Together, these data indicate that PKD1 is likely to play a specific role in estrogen-independent breast tumors.

Several potential PKD1 inhibitors have been reported in the literature. They were shown to inhibit PKD1 *in vitro* with IC50s comprised between 1 and 200 nM but none of them is specific for PKD1 (Arun et al., 2010; Bravo-Altamirano et al., 2011; Evans et al., 2010; Harikumar et al., 2010; Haworth and Avkiran, 2001; Lavalle et al., 2010; Sharlow et al., 2008; Tandon et al., 2015). Indeed, the CID755673, CRT5 and CRT0066101 compounds similarly inhibit PKD1 and PKD3 while the Gö6976 molecule (which has been used extensively to inhibit PKD1) also inhibits PKCα and PKCβ (Supplemental figure 2). Moreover, a major limitation of these inhibitors is that very few can be used *in vivo*. Thus, we identified for the first time a specific PKD1 inhibitor which can be administered *in vivo*. Indeed, the AB9275 molecule did not inhibit PKD3, PKCα and/or PKCβ *in vitro* at concentrations inhibiting PKD1 (supplemental Figure 2A). The molecule also showed a good selectivity profile in a competition assay against a broad panel of kinases (supplemental Figure 2B). In addition, AB9275 showed no toxicity in mice at the dose of 30 mg/kg/day and demonstrated a good bioavailabity (about 20%).

Pharmacological inhibition or siRNA-mediated depletion of PKD1 has previously shown cytotoxicity in melanoma, breast cancer, prostate cancer and pancreatic cancer cells (Harikumar et al., 2010; Kempkes et al., 2012; Kim et al., 2016a; Lavalle et al., 2010; Merzoug-Larabi et al., 2017). The CRT0066101 compound was also able to inhibit tumor growth of MCF7 chemoresistant xenografts *in vivo* (Kim et al., 2016a). In the present study, we show that TNBC cells are also sensitive to PKD1 inhibition or PKD1 knockdown. In addition, we demonstrate that PKD1 inhibition reduces tumor growth *in vivo* in a TNBC PDX model. Together, these results

suggest that PKD1 could be a relevant therapeutic target in TNBC.

Interestingly, the AB9275 PKD1 inhibitor demonstrated antitumor activity *in vivo* in spite of its moderate ability to inhibit clonogenicity of MFC7-PKD1 and MDA-MB-436 cells (IC50 of 1.3 and 4.1 µM, respectively). Conversely, the AB9539 molecule was more potent in cellular assays (IC50 of 0.2 and 2.0 against MCF7-PKD1 and MDA-MB-436 cells, respectively) but could not be evaluated *in vivo* because of its low bioavailability. Improving the pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of our current inhibitors should thus generate much more potent molecules, which could be developed for the treatment of TNBC, as well as other malignancies.

In conclusion, we showed for the first time that PKD1 is an independent prognostic factor and a promising therapeutic target in TNBC. The development of potent PKD1 inhibitors could provide a novel treatment option for TNBC patients.

## 4. Material and methods.

### Patients

Primary breast tumor samples were obtained from 527 women treated at Institut Curie - Hôpital René Huguenin (Saint-Cloud, France) between 1978 and 2008. All patients treated at Institut Curie before 2007 were informed that their tumor samples might be used for scientific purposes and had the opportunity to decline. Since 2007, patients treated at Institut Curie have given their approval by signing an informed consent. This study was approved by the local ethics committee (Breast Group of Institut Curie - René Huguenin Hospital). The samples were immediately stored in liquid nitrogen until RNA extraction. A tumor sample was considered suitable for this study if the proportion of tumor cells exceeded 70%. All patients (mean age 60.9 years, range 29 – 91 years) met the following criteria: primary unilateral non metastatic breast carcinoma for which complete clinicopathological data and follow-up were available; no radiotherapy or chemotherapy before surgery; and full follow-up at Institut Curie - Hôpital René Huguenin. Adjuvant therapy was administered to 367 patients, consisting of chemotherapy alone in 95, hormone therapy alone in 177, and both treatments in 95 patients. Estrogen receptor (ER), progesterone receptor (PR), and human epidermal growth factor receptor 2 (ERBB2) statuses were determined at the protein level by biochemical methods (Dextran-coated charcoal method, enzyme immunoassay or immunohistochemistry) and confirmed by real-time

quantitative RT-PCR (Bièche et al., 1999, 2001). The population was divided into four groups according to HR (ER and PR) and ERBB2 statuses as follows: two luminal subtypes [HR+ (ERα+ or PR+)/ERBB2+ (n=58)] and [HR+ (ERα+ or PR+ )/ERBB2- (n=295)]; an ERBB2+ subtype [HR- (ERα- and PR-)/ERBB2+ (n=72)] and a triple-negative subtype [HR- (ERα- and PR-)/ERBB2- (n=102)]. Within a median follow-up of 9.4 years (range 1 month to 33.2 years), 210 patients developed distant metastasis.

**RNA extraction**

Total RNA was extracted from breast tumor samples by using acid-phenol guanidium as previously described (Bieche et al., 2001). RNA quality was determined by electrophoresis through agarose gels, staining with ethidium bromide, and visualization of the 18S and 28S RNA bands under ultraviolet light.

**Real-time RT-PCR**

Quantitative values were obtained from the cycle number (Ct value) at which the increase in the fluorescence signal associated with exponential growth of PCR products started to be detected by the laser detector of the ABI Prism 7900 Sequence Detection System (Perkin-Elmer Applied Biosystems, Foster City, CA), using PE Biosystems analysis software according to the manufacturer's manuals. The *TBP* gene (Genbank accession NM_003194) encoding the TATA box-binding protein (a component of the DNA-binding protein complex TFIID) was quantified as an endogenous RNA control, and each sample was normalized on the basis of its TBP content (Bièche et al., 1999). Results, expressed as N-fold differences in target gene expression relative to the *TBP* gene and termed "Ntarget", were determined as Ntarget = $2^{\Delta Ctsample}$, where the ΔCt value of the sample was determined by subtracting the average Ct value of the target gene from the average Ct value of the *TBP* gene. The smallest amount of mRNA that was detectible (Ct=35) was used as a reference (basal mRNA level=1) to normalize the data. Primers' sequences are available on request. The conditions of cDNA synthesis and PCR have been described previously (Bièche et al., 1999).

**Cell culture**

Breast cancer cell lines were obtained from the American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA). PKD1 overexpression by stable transfection has been

previously described (Karam et al., 2012). MCF7-PKD1 cells were cultured in DMEM-Glutamax medium, supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) and 100 units/mL penicillin and 100 mg/mL streptomycin (P/S) (Invitrogen Life Technologies, Cergy-Pontoise, France). 1 mg/mL G418 (Calbiochem, Darmstadt, Germany) was added for the culture of stably transfected MCF7-PKD1 cells. MDA-MB-436 cells were cultured in RPMI 1640 medium supplemented with 10% FBS P/S. HCC38 cells were cultured in RPMI 1640 medium supplemented with 10% FBS, P/S and 1% sodium pyruvate. CAMA-1 cells were cultured in MEM (eagle) medium supplemented with 10% FBS and P/S.

**Western blot analysis**

Cells were lysed for 20 min at 4°C in 50 mM Tris–HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 100 mM sodium fluoride, 10 mM tetra-sodium diphosphate decahydrate, 2 mM sodium orthovanadate, 1 mM PMSF, 10 µg/mL aprotinin and 1% Nonidet P-40. Lysates were clarified by centrifugation at 14,000 rpm for 10 min at 4°C. 30–80 µg of total proteins were separated by SDS-PAGE and transferred onto nitrocellulose membranes. These were incubated with specific antibodies and revealed by enhanced chemiluminescence (Amersham, GE Healthcare, UK).

The following antibodies were used at the indicated dilutions: anti-PKD1: 1/1000 (HPA029834; Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France),anti-β-actin: 1/5000 (A5441; Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France). Horseradish peroxidase-conjugated goat anti-rabbit IgG: 1/2000 (P0448,Dako, Glostrup, Denmark) and horseradish peroxidase-conjugated goat anti-mouse IgG: 1/5000 (610-1302, Rockland, Gilbertsville, PA, USA).

**Anchorage-independent growth assay**

10,000 MCF7-PKD1 cells were suspended in 2.5 mL of methylcellulose (0.8%) prepared in estrogen-free medium containing or not different concentrations of PKD1 inhibitors or dimethylsulfoxide (DMSO). Cells were plated in uncoated 35-mm culture dishes and incubated for three weeks. Then, macroscopic colonies were counted.

**Colony formation assay**

8,000 cells were seeded in 6-well plates with complete medium containing or not different concentrations of PKD1 inhibitors or DMSO. Macroscopic colonies were counted after two weeks.

**siRNA transfection**

50,000 cells were transfected with 50 nM *PRKD*1-targeting or nontargeting siRNAs (L-005028-00-0005, smartpool siRNA targeting *PRKD1*, Dharmacon, Colorado, USA), and 48h after transfection, 8 000 cells were plated in 6-well plates for colony formation assay.

***In vivo* experiments**

*In vivo* experiments were performed on female Swiss nude mice purchased from Charles River (Saint-Germain-sur-l'Arbresle, France). Mice care and housing were conformed to the institutional guidelines as put forth by the French Ethical Committee. Human TNBC xenograft models were established as previously described (Marangoni et al., 2007; Reyal et al., 2012). A toxicity study was first performed on mice bearing human BC xenografts which received 20 or 30 mg/kg of AB9275 *per os* once daily during 22 days. As no toxicity was observed, the dose of 30 mg/kg was selected for the next experiments. For the evaluation of AB9275 antitumor activity, the mice received the drug (treated group) or water (control group) *per os* once daily during 22 days. Tumor growth was evaluated with a caliper twice a week. Tumor growth inhibition (TGI) of treated tumors versus controls was calculated as the ratio of the mean relative tumor volume (RTV) in the treated group to the mean RTV in the control group at the same time.

**Immunohistochemistry**

Paraffin-embedded breast tumors samples, obtained at the time of initial diagnosis, were retrieved from the archives of the Department of Biopathology at René Huguenin Hospital. Sections of 3 µm in thickness were cut with a microtome from the paraffin-embedded tissue blocks of normal breast tissue, pre-invasive lesions and IBCs (invasive breast cancer). Tissue sections were dewaxed and rehydrated through a series of xylene and ethanol washes. Immunostaining was performed on a Dako automated system. Primary antibody against PKD1 (Cell signaling, Danvers, MA) was incubated overnight at 4°C (dilution 1/100).

Patient-derived xenografts were fixed in 10% neutral buffered formalin and embedded in paraffin. Tissue sections were immunostained in a Discovery XT Platform (Ventana Medical System, Tucson, Arizona, USA, part of Roche Diagnostics) using EDTA buffer pH 8.0 (CC1, Ventana Medical System) for antigen retrieval. Primary antibody against PKD1 (Cell signaling, Danvers, MA) was incubated during 30 min at 37°C (dilution 1/100). After incubation with anti-rabbit

secondary antibodies, slides were covered with the chromogenic substrate diaminobenzidine (ChromoMap Kit with Anti rabbit OmniMap, Ventana Medical System) and counterstained with hematoxylin.

**Statistical analysis**

Relationships between mRNA levels and clinical parameters were identified using the chi-square test.

Metastasis-free survival (MFS) was determined as the interval between initial diagnosis and detection of the first metastasis. Survival distributions were estimated by the Kaplan-Meier method and the significance of differences between survival rates were ascertained with the log-rank test. The cox proportional hazards regression model was used to assess prognostic significance and the results are expressed as hazard ratios and 95% confidence intervals.

The Wilcoxon-Mann-Whitney test was used to compare individual RTVs at the end of the experiment between treated and control groups.

**Acknowledgments**

We thank Ahmed Dahmani, Ludmilla De-Platter, Caroline Guibaudet and Marine Ruppe for their technical assistance for the *in vivo* experiments. We thank Ilige Youssef for editing the manuscript.

**References**

1. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray F. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. Int J Cancer. 2015; 136: E359-386. doi: 10.1002/ijc.29210.

2. Perou CM, Sørlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, Pollack JR, Ross DT, Johnsen H, Akslen LA, Fluge Ø, Pergamenschikov A, Williams C, et al. Molecular portraits of human breast tumours. Nature. 2000; 406: 747–52. doi: 10.1038/35021093.

3. Foulkes WD, Smith IE, Reis-Filho JS. Triple-negative breast cancer. N Engl J Med. 2010; 363: 1938–48. doi: 10.1056/NEJMra1001389.

4. Higgins MJ, Baselga J. Targeted therapies for breast cancer. J Clin Invest. 2011; 121: 3797–803. doi: 10.1172/JCI57152.

5. Calaf GM, Zepeda AB, Castillo RL, Figueroa CA, Arias C, Figueroa E, Farías JG. Molecular aspects of breast cancer resistance to drugs (Review). Int J Oncol. 2015; 47: 437–45.

6. Karam M, Bièche I, Legay C, Vacher S, Auclair C, Ricort J-M. Protein kinase D1 regulates ERα-positive breast cancer cell growth response to 17β-estradiol and contributes to poor prognosis in patients. J Cell Mol Med. 2014; 18: 2536–52. doi: 10.1111/jcmm.12322.

7. Karam M, Legay C, Auclair C, Ricort J-M. Protein kinase D1 stimulates proliferation and enhances tumorigenesis of MCF-7 human breast cancer cells through a MEK/ERK-dependent signaling pathway. Exp Cell Res. 2012; 318: 558–69. doi: 10.1016/j.yexcr.2012.01.001.

8. Rozengurt E, Rey O, Waldron RT. Protein kinase D signaling. J Biol Chem. 2005; 280: 13205–8. doi: 10.1074/jbc.R500002200.

9. Steinberg SF. Regulation of Protein Kinase D1 Activity. Mol Pharmacol. 2012; 81: 284–91. doi: 10.1124/mol.111.075986.

10. Rozengurt E. Protein kinase D signaling: multiple biological functions in health and disease. Physiol Bethesda Md. 2011; 26: 23–33. doi: 10.1152/physiol.00037.2010.

11. Merzoug-Larabi M, Spasojevic C, Eymard M, Hugonin C, Auclair C, Karam M. Protein kinase C inhibitor Gö6976 but not Gö6983 induces the reversion of E- to N-cadherin switch and metastatic phenotype in melanoma: identification of the role of protein kinase D1. BMC Cancer [Internet]. 2017 [cited 2017 May 24]; 17. doi: 10.1186/s12885-016-3007-5.

12. Weinreb I, Piscuoglio S, Martelotto LG, Waggott D, Ng CKY, Perez-Ordonez B, Harding NJ, Alfaro J, Chu KC, Viale A, Fusco N, da Cruz Paula A, Marchio C, et al. Hotspot activating PRKD1 somatic mutations in polymorphous low-grade adenocarcinomas of the salivary glands. Nat Genet. 2014; 46: 1166–9. doi: 10.1038/ng.3096.

13. Kim DY, Park EY, Chang E, Kang H-G, Koo Y, Lee EJ, Ko JY, Kong HK, Chun K-H, Park JH. A novel miR-34a target, protein kinase D1, stimulates cancer stemness and drug resistance through GSK3/β-catenin signaling in breast cancer. Oncotarget. 2016; 7: 14791–802. doi: 10.18632/oncotarget.7443.

14. Borges S, Perez EA, Thompson EA, Radisky DC, Geiger XJ, Storz P. Effective Targeting of Estrogen Receptor-Negative Breast Cancers with the Protein Kinase D Inhibitor CRT0066101. Mol Cancer Ther. 2015; 14: 1306–16. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-14-0945.

15. Eiseler T, Döppler H, Yan IK, Goodison S, Storz P. Protein kinase D1 regulates matrix metalloproteinase expression and inhibits breast cancer cell invasion. Breast Cancer Res BCR. 2009; 11: R13. doi: 10.1186/bcr2232.

16. Borges S, Döppler H, Perez EA, Andorfer CA, Sun Z, Anastasiadis PZ, Thompson E, Geiger XJ, Storz P. Pharmacologic reversion of epigenetic silencing of the PRKD1 promoter blocks breast tumor cell invasion and metastasis. Breast Cancer Res BCR. 2013; 15: R66. doi: 10.1186/bcr3460.

17. Evans IM, Bagherzadeh A, Charles M, Raynham T, Ireson C, Boakes A, Kelland L, Zachary IC. Characterization of the biological effects of a novel protein kinase D inhibitor in endothelial cells. Biochem J. 2010; 429: 565–72. doi: 10.1042/BJ20100578.

18. Harikumar KB, Kunnumakkara AB, Ochi N, Tong Z, Deorukhkar A, Sung B, Kelland L, Jamieson S, Sutherland R, Raynham T, Charles M, Bagherzadeh A, Bagherazadeh A, et al. A novel small-molecule inhibitor of protein kinase D blocks pancreatic cancer growth in vitro and in vivo. Mol Cancer Ther. 2010; 9: 1136–46. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-09-1145.

19. Sharlow ER, Giridhar KV, LaValle CR, Chen J, Leimgruber S, Barrett R, Bravo-Altamirano K, Wipf P, Lazo JS, Wang QJ. Potent and selective disruption of protein kinase D functionality by a benzoxoloazepinolone. J Biol Chem. 2008; 283: 33516–26. doi: 10.1074/jbc.M805358200.

20. Haworth RS, Avkiran M. Inhibition of protein kinase D by resveratrol. Biochem Pharmacol. 2001; 62: 1647–51.

21. Arun SN, Xie D, Dodd ME, Zhong X, Bollag WB. The potential use of protein kinase D inhibitors for prevention/treatment of epidermal tumors. J Dermatol Sci. 2010; 60: 29–39. doi: 10.1016/j.jdermsci.2010.07.015.

22. Bravo-Altamirano K, George KM, Frantz M-C, Lavalle CR, Tandon M, Leimgruber S, Sharlow ER, Lazo JS, Wang QJ, Wipf P. Synthesis and Structure-Activity Relationships of Benzothienothiazepinone Inhibitors of Protein Kinase D. ACS Med Chem Lett. 2011; 2: 154–9. doi: 10.1021/ml100230n.

23. Tandon M, Salamoun JM, Carder EJ, Farber E, Xu S, Deng F, Tang H, Wipf P, Wang QJ. SD-208, a novel protein kinase D inhibitor, blocks prostate cancer cell proliferation and tumor growth in vivo by inducing G2/M cell cycle arrest. PloS One. 2015; 10: e0119346. doi: 10.1371/journal.pone.0119346.

24. Lavalle CR, Bravo-Altamirano K, Giridhar KV, Chen J, Sharlow E, Lazo JS, Wipf P, Wang QJ. Novel protein kinase D inhibitors cause potent arrest in prostate cancer cell growth and motility. BMC Chem Biol. 2010; 10: 5. doi: 10.1186/1472-6769-10-5.

25. Kempkes C, Rattenholl A, Buddenkotte J, Strozyk E, Eberle J, Hausser A, Cevikbas F, Schneider SW, Steinhoff M. Proteinase-Activated Receptors 1 and 2 Regulate Invasive Behavior of Human Melanoma Cells via Activation of Protein Kinase D1. J Invest Dermatol. 2012; 132: 375–84. doi: 10.1038/jid.2011.314.

26. Bièche I, Onody P, Laurendeau I, Olivi M, Vidaud D, Lidereau R, Vidaud M. Real-Time Reverse Transcription-PCR Assay for Future Management of *ERBB2*-based Clinical Applications. Clin Chem. 1999; 45: 1148–56.

27. Bièche I, Parfait B, Laurendeau I, Girault I, Vidaud M, Lidereau R. Quantification of estrogen receptor alpha and beta expression in sporadic breast cancer. Oncogene. 2001; 20: 8109–15. doi: 10.1038/sj.onc.1204917.

28. Bieche I, Parfait B, Le Doussal V, Olivi M, Rio MC, Lidereau R, Vidaud M. Identification of CGA as a novel estrogen receptor-responsive gene in breast cancer: an outstanding candidate marker to predict the response to endocrine therapy. Cancer Res. 2001; 61: 1652–8.

29. Marangoni E, Vincent-Salomon A, Auger N, Degeorges A, Assayag F, de Cremoux P, de Plater L, Guyader C, De Pinieux G, Judde J-G, Rebucci M, Tran-Perennou C, Sastre-Garau X, et al. A new model of patient tumor-derived breast cancer xenografts for preclinical assays. Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res. 2007; 13: 3989–98. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-07-0078.

30. Reyal F, Guyader C, Decraene C, Lucchesi C, Auger N, Assayag F, De Plater L, Gentien D, Poupon M-F, Cottu P, De Cremoux P, Gestraud P, Vincent-Salomon A, et al. Molecular profiling of patient-derived breast cancer xenografts. Breast Cancer Res BCR. 2012; 14: R11. doi: 10.1186/bcr3095.

## Figure legends

### Figure 1: *PRKD1* expression is a poor prognostic factor in the entire breast cancer cohort and in the TNBC subgroup

A. Immunohistochemistal analysis of PKD1 protein expression in primary breast tumors showing high or low *PRKD1* mRNA levels. Original magnification x200.
B. Kaplan-Meier analysis of metastasis-free survival according to *PRKD1* mRNA expression in the entire breast cancer cohort (n=527).
C. Kaplan-Meier analysis of metastasis-free survival according to *PRKD1* mRNA expression in TNBC (n=102).

### Figure 2: Effect of PKD1 inhibition in TNBC cells

A. *PRKD1* mRNA levels in 21 TNBC cell lines. *PRKD1* mRNA expression was analyzed by RT-qPCR and normalized to that of the *TBP* control gene.
B. Western-blot analysis of PKD1 protein expression in six TNBC cell lines. β-actin was used as a loading control.
C. Effect of PKD1 pharmacological inhibitors on clonogenicity of MDA-MB-436 cells. CFU, colony forming unit. Untreated cells were used as a reference (100%). Mean values ± SEM from two independent experiments are shown.
D. Effect of siRNA-mediated PKD1 knockdown on MDA-MB-436 clonogenicity. MDA-MB-436 cells were transfected with 50 nM non-targeting (siCNTRL) or PKD1-targeting (si*PRKD*1) siRNAS during 48 hours. Left: western-blot showing the efficiency of PKD1 silencing. β-actin was used as a loading control. Right: colony formation was evaluated after two weeks. Cells transfected with non-targeting

siRNAs were used as a reference (100%). Mean values ± SEM from two independent experiments are shown.

**Figure 3: *In vivo* antitumor activity of the AB9275 PKD1 inhibitor against a TNBC PDX**

A. *PRKD1* mRNA levels in 41 TNBC PDXs. *PRKD1* mRNA expression was analyzed by RT-qPCR and normalized to that of the *TBP* control gene.
B. Western-blot analysis of PKD1 protein expression in four PDXs expressing high or intermediate *PRKD1* mRNA levels (HBCx-4A, HBCx-60, BC385) and low *PRKD1* mRNA levels (HBCx-12A). β-actin was used as a loading control.
C. Immunohistochemical analysis of PKD1 protein expression in the HBCx-4A, HBCx-60, BC385, and HBCx-12A tumors. Original magnification x200.
D. Effect of AB9275 on tumor growth in the HBCx-60 PDX model. Mice bearing HBCx-60 tumors were treated *per os* once daily during 22 days with 30 mg/kg AB9275 (n=7) or water (n=8). Mean RTV±SEM are shown. *, $P < 0.05$ ; Wilcoxon-Mann-Whitney test.

**Table 1. Clinical, pathological and biological characteristics of the 527 primary BC tumors**

| | Entire cohort (%) | Metastatic cases (%) | *p*-value[a] |
|---|---|---|---|
| *Total* | 527 (100.0) | 210 (39.8) | |
| *Age* | | | |
| ≤50 | 125 (23.8) | 52 (41.6) | 0.52 (NS) |
| >50 | 402 (76.2) | 158 (39.3) | |
| *SBR histological grade*[b.c] | | | |
| I | 60 (11.7) | 12 (20.0) | **0.0013** |
| II | 241 (47.1) | 100 (41.5) | |
| III | 211 (41.2) | 94 (44.5) | |
| *Lymph node status*[d] | | | |
| 0 | 159 (30.5) | 48 (30.2) | **0.0000001** |
| 1-3 | 250 (47.9) | 88 (35.2) | |
| >3 | 113 (21.6) | 72 (63.7) | |
| *Macroscopic tumor size*[e] | | | |
| ≤25mm | 248 (48.0) | 77 (31.0) | **0.0000055** |
| > 25mm | 269 (52.0) | 132 (49.0) | |
| *ER status* | | | |
| Negative | 181 (34.3) | 75 (41.4) | 0.10 |
| Positive | 346 (65.7) | 134 (38.7) | |
| *PR status* | | | |
| Negative | 255 (48.4) | 110 (43.1) | **0.025** |
| Positive | 272 (51.6) | 100 (36.7) | |
| *ERBB2 status* | | | |
| Negative | 473 (89.8) | 190 (40.2) | 0.55 |
| Positive | 54 (10.2) | 20 (37.0) | |
| *Molecular subtypes* | | | |
| HR-/ERBB2- | 102 (19.3) | 38 (37.3) | 0.054 |
| HR-/ERBB2+ | 72 (13.7) | 36 (50.0) | |
| HR+/ERBB2- | 295 (56.0) | 115 (39.0) | |
| HR+/ERBB2+ | 58 (11.0) | 21 (36.2) | |

a: Log-rank Test (MFS)
b: Scarff Bloom Richardson classification
c: information available for 512 patients
d: information available for 522 patients
e: information available for 517 patients

**Table 2A. Multivariate analysis of the influence of *PRKD1* expression on MFS in the series of 517 breast tumors**

| **Characteristics** | | **HR** [a] | **95% CI** [b] | ***p*-value** [c] |
|---|---|---|---|---|
| *Lymph node status* | 0<br>1-3<br>>3 | 1<br>1.64<br>2.67 | <br>1.34-1.99<br>1.81-3.96 | **0.0000009** |
| *Macroscopic tumor size* | ≤25mm<br>>25mm | 1<br>1.58 | <br>1.18-2.11 | **0.002** |
| *SBR histological grade* | I<br>II<br>III | 1<br>1.29<br>1.66 | <br>1.03-1.61<br>1.06-2.60 | **0.03** |
| *PR status* | positive<br>negative | 1<br>1.3 | <br>0.97-1.75 | 0.08 (NS) |
| *PRKD1 expression* | Low<br>High | 1<br>1.52 | 1.16-2.01 | **0.003** |

a:Hazard ratio
b: 95% Confidential Interval.
c: Multivariate COX analysis.

**Table 2B. Multivariate analysis of the influence of *PRKD*1 expression on MFS in the series of 102 triple-negative breast tumors**

| **Characteristics** | | **HR** [a] | **95% CI** [b] | ***p*-value** [c] |
|---|---|---|---|---|
| *Lymph node status* | 0<br>1-3<br>>3 | 1<br>1.23<br>1.51 | <br>0.79-1.92<br>0.62-3.69 | 0.37 (NS) |
| *Macroscopic tumor size* | ≤25mm<br>>25mm | 1<br>1.75 | <br>0.87-3.53 | 0.12 (NS) |
| | 1-3<br>>3 | 1.23<br>1.51 | 0.79-1.92<br>0.62-3.69 | 0.37 (NS) |
| *SBR histological grade* | I<br>II<br>III | 1<br>1.2<br>1.45 | <br>0.69-2.09<br>0.48-4.39 | 0.51 (NS) |
| *PRKD1 expression* | Low<br>High | 1<br>2.54 | <br>1.28-5.03 | **0.008** |

a: Hazard ratio.
b: 95% Confidential Interval.
c: Multivariate COX analysis.

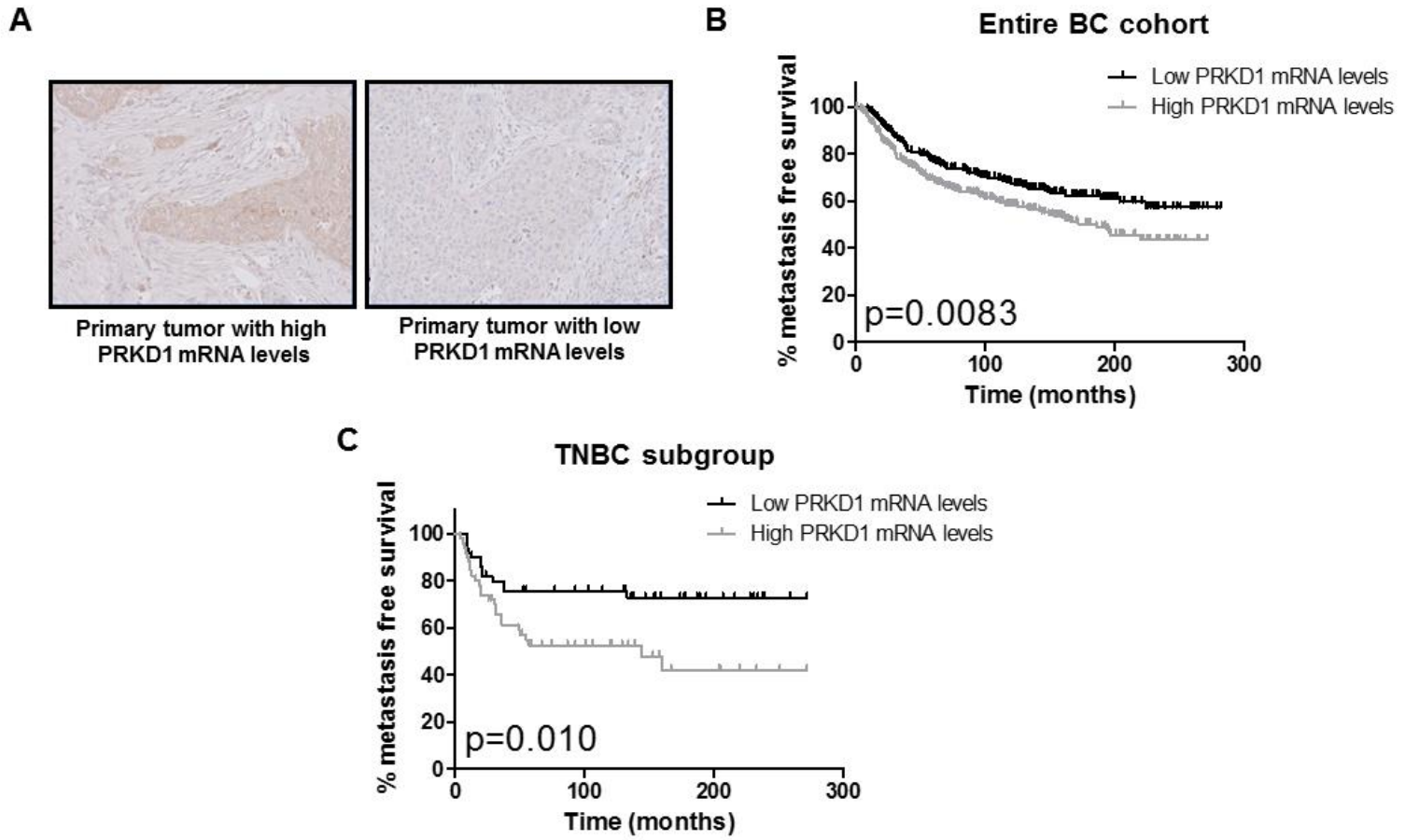



Figure 1: Spasojevic et al.

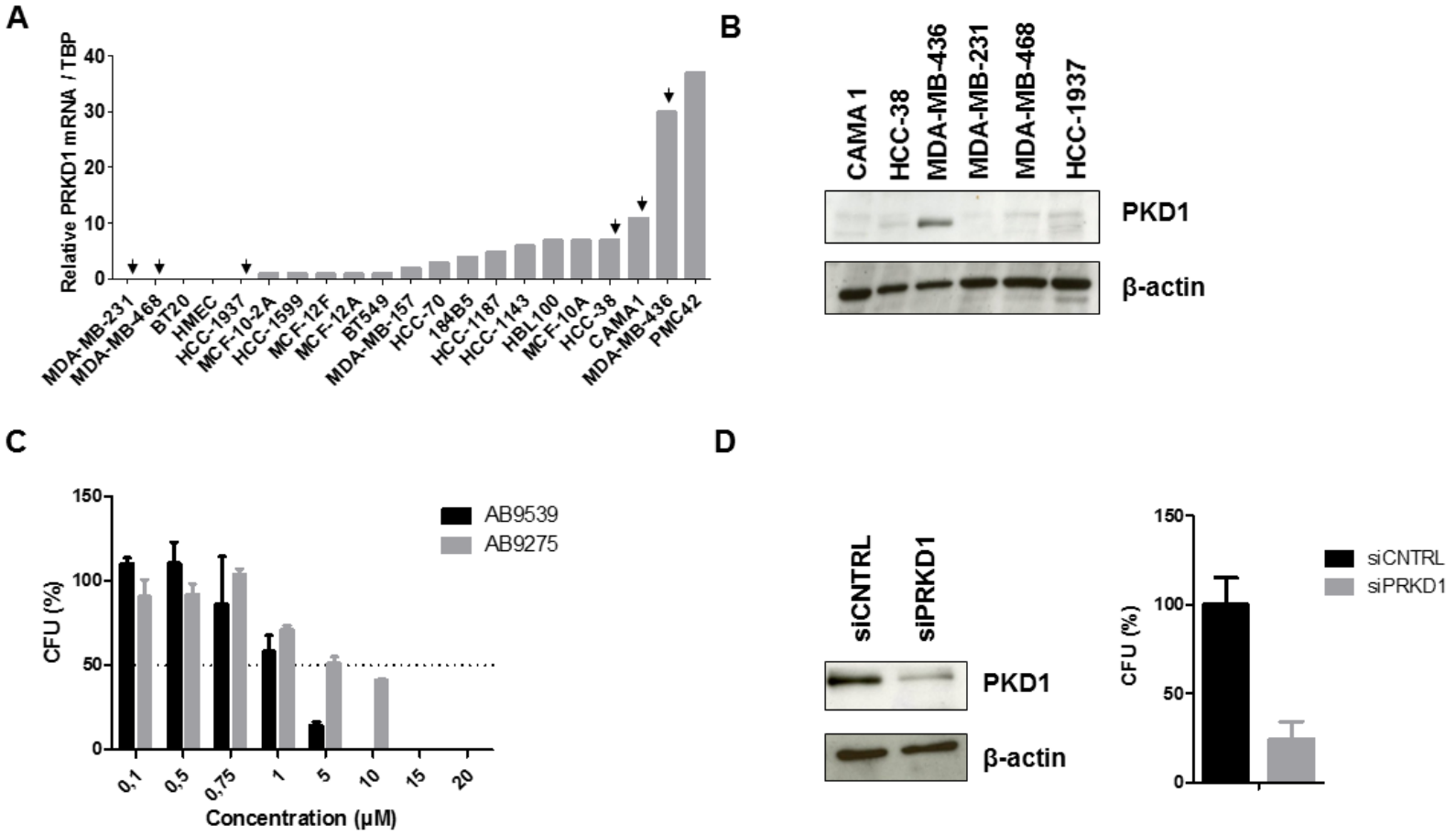



Figure 2: Spasojevic et al.

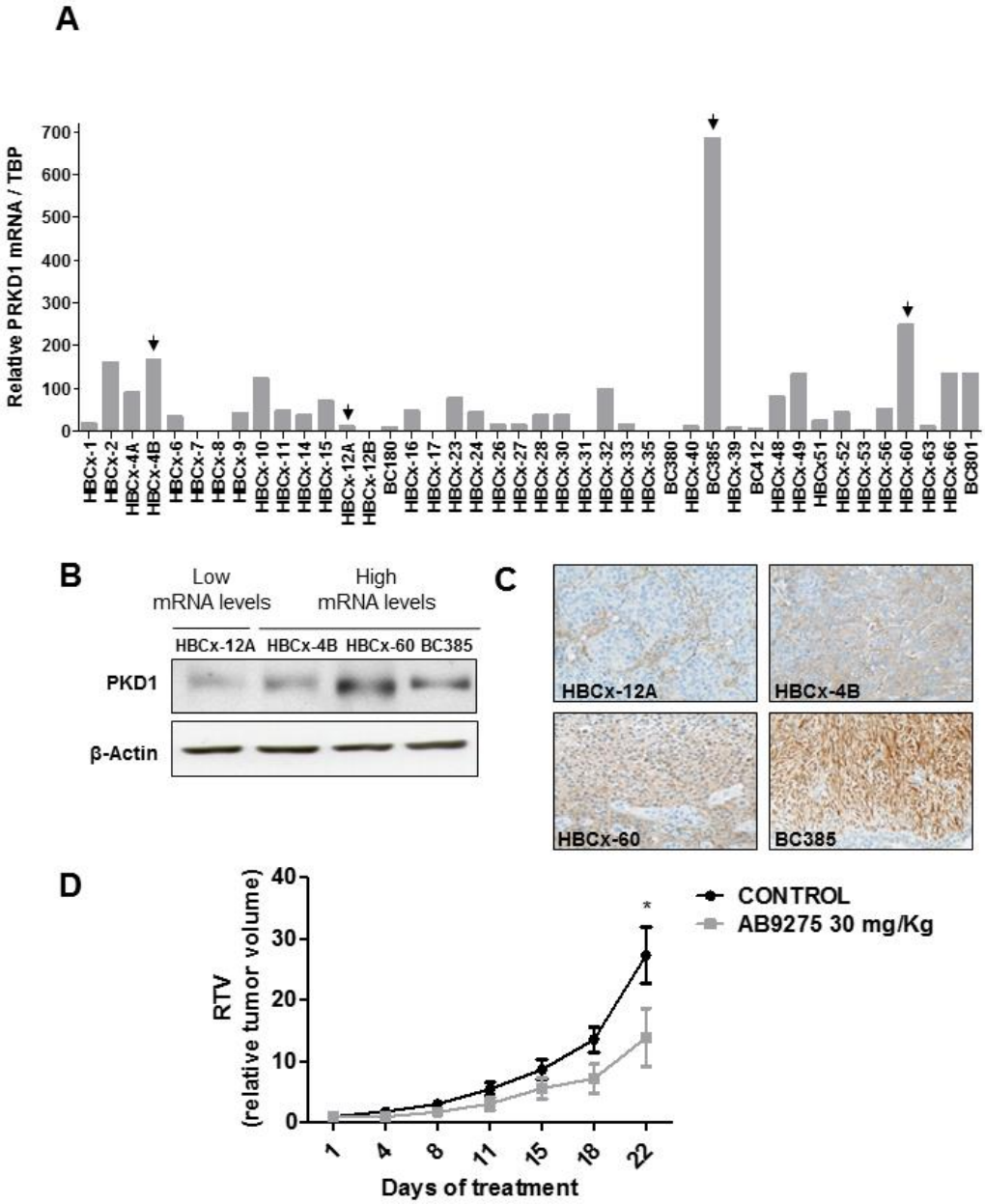



Figure 3: Spasojevic et al.

## Supplemental data

### List of supplemental tables

Supplemental table 1: Relationship between *PRKD1* mRNA levels and classical clinical/biological parameters in the entire BC cohort

Supplemental table 2: Relationship between *PRKD1* mRNA levels and classical clinical/biological parameters in the TNBC subgroup

Supplemental table 3: Inhibition of estrogen-independent clonogenicity of MCF7-PKD1 cells by the 41 PKD1 inhibitors

### Legends of supplemental figures

Supplemental figure 1: Kaplan-Meier analysis of metastasis-free survival according to *PRKD1*, *PRKD2* and *PRKD3* expressions in the entire BC cohort and in the four BC subtypes.

Supplemental figure 2: Specificity of the AB9275 PKD1 inhibitor

A) Comparison of *in vitro* kinase inhibitory activities between AB9275 and different PKD1 inhibitors. Mean IC50s were obtained from two independent experiments for AB9275, Gö6976 and CRT0066101. Other IC50s were obtained from the literature (as indicated).

B) Kinome selectivity profile of the AB9275 compound. The selectivity of AB9275 towards a panel of 442 kinases was determined using the KINOMEscan® (DiscoveRx, Fremont CA) competition assay. AB9275 was screened at 1 µM. Kinases found to bind the compound are marked with red circles and larger circles indicate higher-affinity binding.

**Supplemental table 1: Relationship between *PRKD1* mRNA levels and classical clinical/biological parameters in the entire BC cohort**

| | | Number of patients (%) | | |
|---|---|---|---|---|
| | Total population (%) | Low *PRKD1* mRNA levels | High *PRKD1* mRNA levels | *p* [a] |
| *Total* | 527 (100) | 262 (51.6) | 265 (48.3) | |
| *Age* | | | | |
| ≤50 | 125 (23.7) | 56 (44.8) | 69 (55.2) | 0.081 (NS) |
| >50 | 402 (76.3) | 216 (53.7) | 186 (46.3) | |
| *SBR histological grade* [b,c] | | | | |
| I | 60 (11.7) | 22 (36.7) | 38 (63.3) | |
| II | 241 (47.1) | 126 (52.3) | 115 (47.7) | **0.030** |
| III | 211 (41.2) | 118 (55.9) | 93 (44.1) | |
| *Lymph node status* [d] | | | | |
| 0 | 159 (30.5) | 89 (55.9) | 70 (44.1) | |
| 1-3 | 250 (47.9) | 128 (51.2) | 122 (48.8) | 0.21 (NS) |
| >3 | 113 (21.6) | 51 (45.1) | 62 (54.8) | |
| *Macroscopic tumor size* [e] | | | | |
| ≤25mm | 248 (48.0) | 122 (49.2) | 126 (50.8) | 0.28 (NS) |
| >25mm | 269 (52.0) | 145 (53.9) | 124 (46.1) | |
| *ER status* | | | | |
| Negative | 181 (34.3) | 81 (44.7) | 100 (55.3) | **0.023** |
| Positive | 346 (65.7) | 191 (55.2) | 155 (44.8) | |
| *PR status* | | | | |
| Negative | 255 (48.4) | 130 (51.0) | 125 (49.0) | 0.78 (NS) |
| Positive | 272 (51.6) | 142 (52.2) | 130 (47.8) | |
| *ERBB2 status* | | | | |
| Negative | 397 (75.3) | 215 (54.2) | 182 (45.8) | **0.041** |
| Positive | 130 (24.7) | 57 (43.8) | 73 (56.2) | |
| *Molecular subtypes* | | | | |
| RH- ERBB2- | 102 (19.4) | 53 (52.0) | 49 (48.0) | |
| RH- ERBB2+ | 72 (13.7) | 28 (38.9) | 44 (61.1) | 0.11 (NS) |
| RH+ ERBB2- | 295 (56.0) | 162 (54.9) | 133 (45.1) | |
| RH+ ERBB2+ | 58 (11.0) | 29 (50.0) | 29 (50.0) | |

a $\chi 2$ Test

b Scarff Bloom Richardson classification.

c Information available for 512 patients.

d Information available for 522 patients.

e Information available for 517 patients.

**Supplemental table 2: Relationship between *PRKD1* mRNA levels and classical clinical/biological parameters in the TNBC subgroup**

| | | Number of patients (%) | | |
|---|---|---|---|---|
| | Total population (%) | Low *PRKD1* mRNA levels | High *PRKD1* mRNA levels | *p* [a] |
| *Total* | 102 (100) | 51 (50.0) | 51 (50.0) | |
| *Age* | | | | |
| ≤50 | 39 (38.2) | 22 (56.4) | 17 (43.6) | 0.31 (NS) |
| >50 | 63 (61.8) | 29 (46.0) | 34 (54.0) | |
| *SBR histological grade* [b,c] | | | | |
| I | 3 (3.1) | 1 (33.3) | 2 (66.7) | |
| II | 18 (18.8) | 5 (27.8) | 13 (72.2) | 0.10 (NS) |
| III | 75 (78.1) | 41 (54.7) | 34 (45.3) | |
| *Lymph node status* [d] | | | | |
| 0 | 48 (47.1) | 28 (58.3) | 20 (41.7) | |
| 1-3 | 39 (38.2) | 15 (38.5) | 24 (61.5) | 0.46 (NS) |
| >3 | 14 (13.7) | 7 (50.0) | 7 (50.0) | |
| *Macroscopic tumor size* [d] | | | | |
| ≤25mm | 40 (39.7) | 18 (45.0) | 22 (55.0) | 0.18 (NS) |
| >25mm | 61 (60.3) | 32 (52.5) | 29 (47.5) | |

[a] $\chi 2$ Test

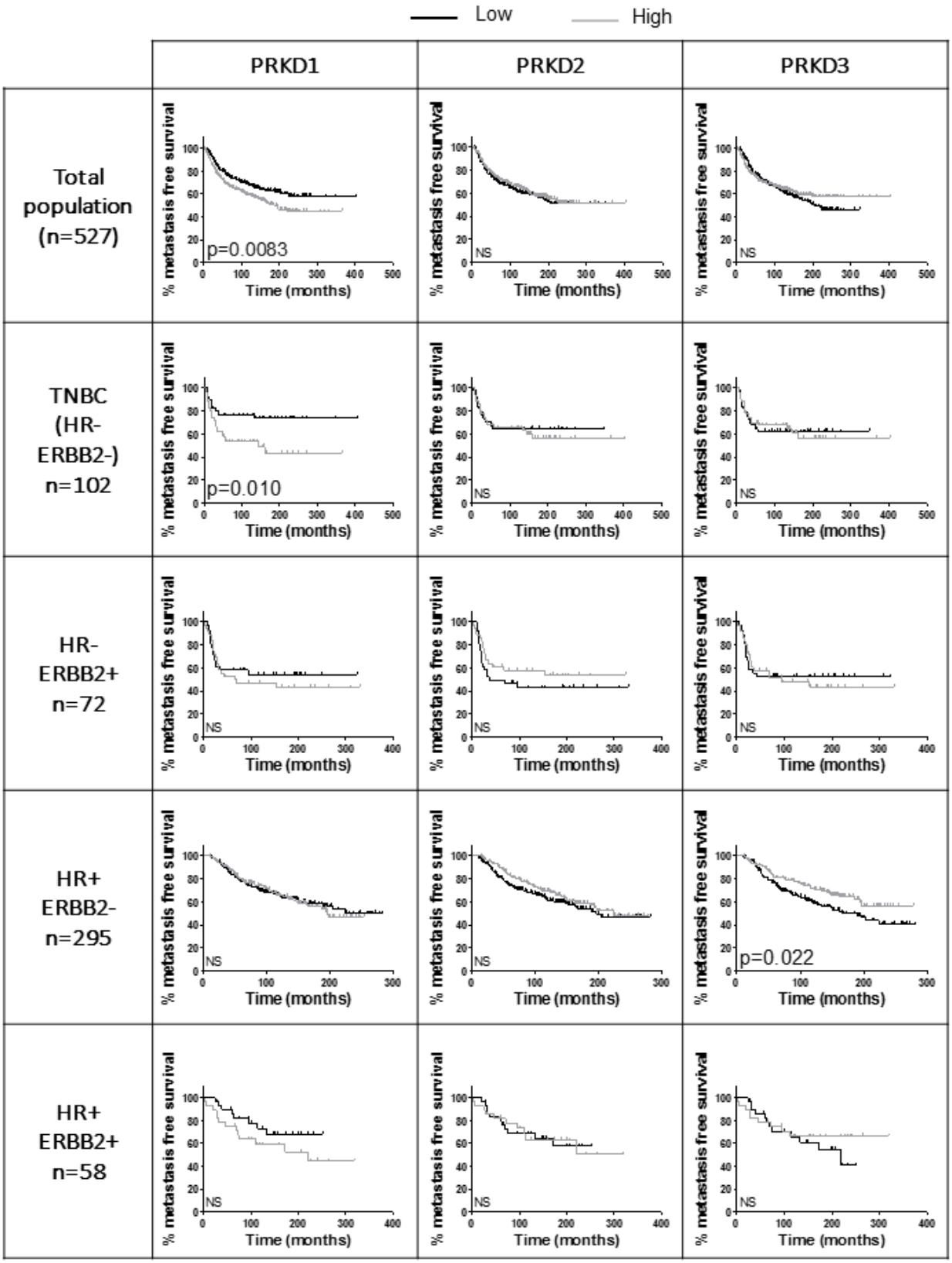
[b] Scarff Bloom Richardson classification.

[c] Information available for 96 patients.

[d] Information available for 101 patients.

**Supplemental table 3: Inhibition of estrogen-independent clonogenicity of MCF7-PKD1 cells by the 41 PKD1 inhibitors**

| Molecule | IC50 (µM) |
|---|---|
| **AB9539** | **0.23** |
| AB8870 | 0.62 |
| AB8857-3 | 0.74 |
| AB8874 | 0.79 |
| AB9324 | 0.86 |
| AB9358 | 0.87 |
| AB9331 | 0.95 |
| AB9431 | 0.96 |
| AB9576 | 1.12 |
| AB8845 | 1.16 |
| AB8862 | 1.17 |
| **AB9275** | **1.27** |
| AB9428 | 1.31 |
| AB9429 | 1.39 |
| AB8424 | 1.41 |
| AB8823 | 1.47 |
| AB9225 | 1.95 |
| AB9452 | 1.96 |
| AB8905 | 2.29 |
| AB8912 | 2.44 |
| AB9282 | 3.01 |
| AB9185 | 3.16 |
| AB8908 | 3.25 |
| AB9323 | 3.40 |
| AB9129 | 3.71 |
| AB8831 | 4.11 |
| AB9145 | 4.91 |
| AB9270 | 4.94 |
| AB9297 | 5.02 |
| AB8909 | 5.15 |
| AB9195 | 5.47 |
| AB9130 | 5.55 |
| AB8899 | >10 |
| AB8910 | >10 |
| AB9109 | >10 |
| AB9110 | >10 |
| AB9118 | >10 |
| AB9137 | >10 |
| AB9159 | >10 |
| AB9367 | >10 |
| AB9376 | >10 |




Supplemental figure 1: Spasojevic et al.

**A**

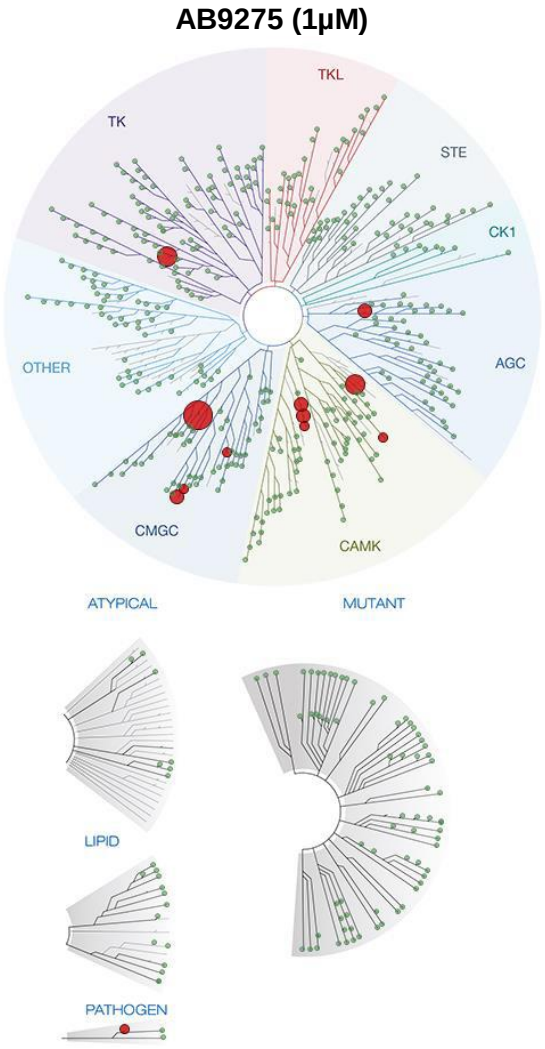
| PKD1 inhibitors | IC50 (nM) | | | |
|---|---|---|---|---|
| | PKD1 | PKD3 | PKCα | PKCβ |
| **AB9275** | 37 | 175 | 20000 | 20000 |
| **CRT0066101** | 4,5 | 1,6 | no inhibition[1] | no inhibition[1] |
| **Gö6976** | 25 | 630 | 20 | 45 |
| **CID 755673** | 182 [2] | 227 [2] | 10000 [2] | 10000 [2] |
| **CRT5** | 1 [3] | 1.5 [3] | no inhibition[3] | no inhibition[3] |

[1] Harikumar et al., 2010

[2] Sharlow et al., 2008

[3] Evan et al., 2010

**B**




Supplemental figure 2 : Spasojevic et al.

# Expression de PKD1 dans différents types de cancer

Les résultats des deux études précédentes et les nombreux articles sur le rôle de PKD1 dans d'autres types de cancer que le mélanome et le cancer du sein, nous ont amenés à tester l'hypothèse que PKD1 pourrait également avoir un rôle oncogénique dans d'autres types de cancers.

Pour répondre à cette question, nous disposons à l'Institut Curie d'une cohorte de patients atteints de différents types de cancer (cancer du sein, du poumon, du côlon, des ovaires, …). Pour chaque type d'organes nous disposons de tissus sains. Nous disposons également d'une seconde cohorte composée de PDXs de différents types de cancers. Nous pouvons alors quantifier l'expression de *PRKD1* en ARNm dans les tissus tumoraux et les comparer aux tissus normaux afin de déterminer si *PRKD1* est sur-exprimé dans ces différents cancers et confirmer ces résultats sur la cohorte de PDXs.

**Matériels et méthodes :**

Echantillons de patients

La collection d'échantillons dont nous disposons est composée de cancers du canal anal et et de tissus normaux associés (n=48 et n=17, respectivement), de cancers ORL et de tissus normaux associés (n=50 et n=27), de mélanomes uvéals (n=41), de cancers de la prostate et de tissus normaux associés (n=48 et n=7), de cancers de l'ovaire et de tissus normaux associés (n=52 et n=27), de cancers de la thyroïde et de tissus normaux associés (n=31 et n=9), de cancers du col de l'utérus et de tissus normaux associés (n=37 et n=14), de mélanomes et de tissus normaux associés (n=27 et n=9), de cancers de l'endomètre et de tissus normaux associés (n=29 et n=8), de cancers du côlon et de tissus normaux associés (n=49 et n=30), de cancers du poumon et de tissus normaux associés (n=57 et n=16), de cancers du rein et de tissus normaux associés (n=22 et n=18), de cancers du pancréas et de tissus normaux associés (n=22 et n=11), de cancers du foie et de tissus normaux associés (n=31 et n=10), de cancers de la vessie et de tissus normaux associés (n=50 et n=14), de cancers de l'estomac et de tissus normaux associés (n=29 et n=11), de

glioblastomes et de tissus normaux associés (n=50 et n=21) ainsi que de cancers du sein et de tissus normaux associés (n=96 et n=11).

Echantillons de PDXs

La cohorte de PDXs est composée de cancers du côlon (n=60), de l'ovaire (n=20), de l'estomac (n=1), du sein (n=67), du poumon (n=20), du rein (n=16), du canal anal (n=7), de la sphère ORL (n=8) et du pancréas (n=1), de glioblastomes (n=5), de mélanomes cutanés (n=13),de méningiomes (n=4), de mélanomes uvéals (n=14), (n=1) et d'angiosarcomes (n=1),

L'extraction d'ARN ainsi que la quantification en ARNm de *PRKD1* a été réalisée selon le même protocole que décrit précédemment dans l'article Spasojevic et al. (Article 2).

**Résultats**

L'analyse de l'expression de *PRKD1* en ARNm dans la cohorte multi-cancers de Curie a montré que cette expression était significativement plus élevée chez les mélanomes et des glioblastomes que dans les tissus sains correspondants (Figure 25 ; Figure 26A ; Figure 26B). De plus, *PRKD1* est sous-exprimé dans de nombreux types de cancer, tels que les cancers du canal anal, ORL, de l'ovaire, de la thyroïde, du col de l'utérus, de l'endomètre, du côlon, du poumon, du rein, du foie, de la vessie et du sein. *PRKD1* présente une expression similaire entre les tissus tumoraux et normaux pour les cancers de la prostate et de l'estomac.

Afin de confirmer nos résultats sur ces tumeurs, nous avons donc analysé de la même manière que précédemment l'expression de *PRKD1* en ARNm dans une cohorte de PDXs multi-cancers. Les résultats présentés en figure 27 montrent qu'à nouveau, *PRKD1* est sur-exprimé dans le mélanome cutané et le glioblastome comparés aux autres types de cancer.

Ces données complémentaires nous permettent de confirmer l'importance de PKD1 dans le mélanome et suggèrent que PKD1 participe au développement et/ou à la progression du glioblastome.

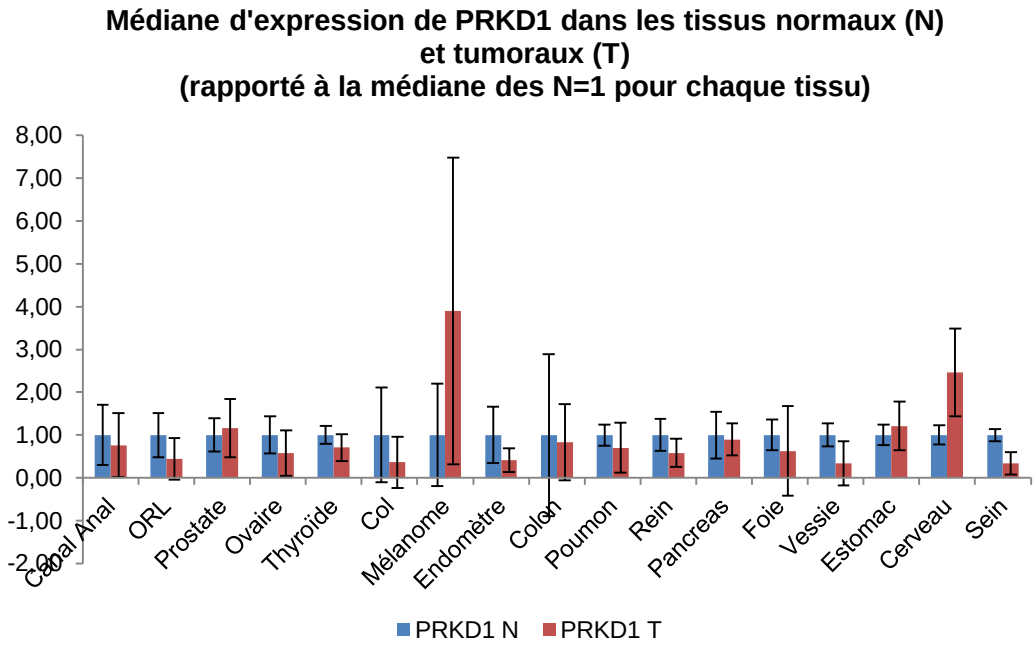



*Figure 25 : Expression de PRKD1 dans une multi cohorte de tumeurs*

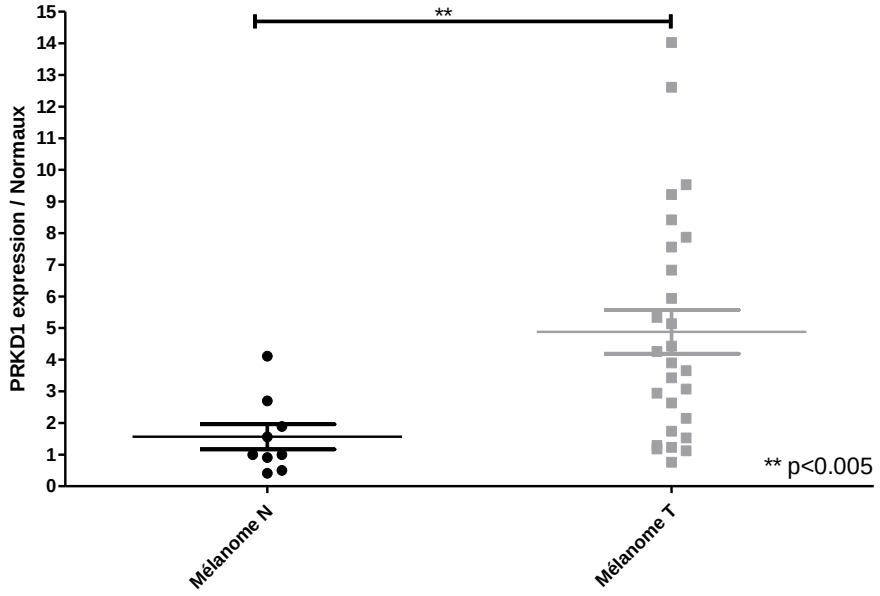



*Figure 26A : Expression de PRKD1 dans des mélanomes (Mélanome T) et des tissus sains de peau (Mélanome N)*

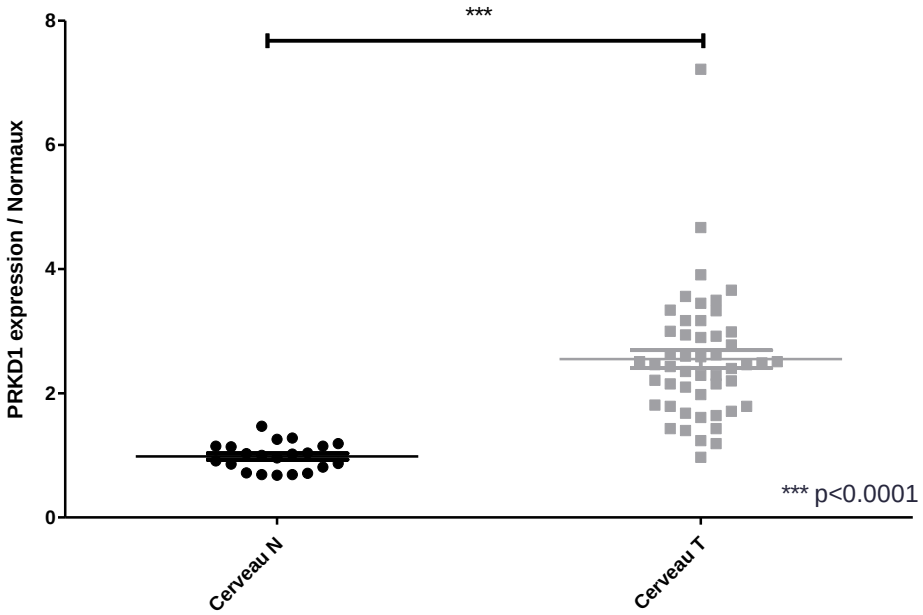



*Figure 26B : Expression de PRKD1 dans des tissus tumoraux et sains de cerveau*

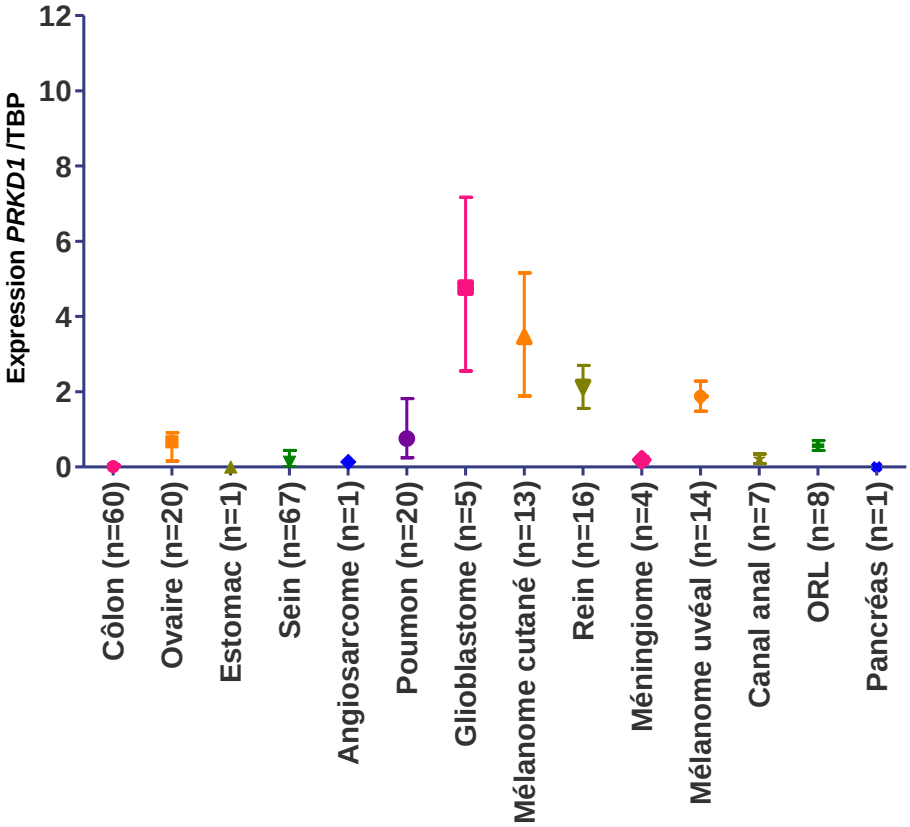



*Figure 27 : Expression de PRKD1 dans différents PDXs*

# CHAPITRE IV
# DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Les résultats de notre étude sur le mélanome nous ont permis de montrer, grâce à l'analyse différentielle entre deux inhibiteurs plus ou moins spécifiques de PKD1 et à une inhibition de l'expression de PKD1 à l'aide de shRNA, que l'inhibition de PKD1 diminuait l'agressivité tumorale en réduisant la prolifération, la clonogénicité, la migration et l'invasivité de la lignée cellulaire M2 de mélanome métastatique ganglionnaire. Notre étude nous a également permis de mettre en évidence un lien fort entre le *switch* des cadhérines (transition E- vers N-cadhérine), l'agressivité des cellules de mélanome et le niveau d'expression et/ou d'activité de la protéine kinase D1. En effet, notre étude a conclu que l'inhibition de PKD1 induisait, en plus d'une diminution de l'agressivité tumorale, un *switch* d'expression des cadhérines (transition E- vers N-cadhérine) et une modification morphologique de cellules M2 allant d'une forme mésenchymateuse à une forme pseudo-épithéliale moins agressive. Il est à noter également que, dans le cas de l'inhibition de l'expression de PKD1 à l'aide des shRNA, nous avons remarqué uniquement une diminution de l'agressivité tumorale mais pas de changement morphologique des cellules, et ceci à la différence de l'inhibition par des agents pharmacologiques. Cette inhibition spécifique de PKD1 nous conforte dans le fait que, dans le mélanome, seul PKD1, et non la large famille des PKC, est à l'origine de ce maintien du phénotype mésenchymateux.

Le rôle de PKD1 dans le développement du mélanome a été peu exploré. Dans la littérature, l'équipe de Kempkes a montré en 2012 que l'inhibition de l'expression de PKD1 induisait une diminution de la prolifération et de la migration cellulaires dans la lignée WM9 de mélanome humain (Kempkes et al., 2012). Nos résultats confirment ainsi ceux de l'équipe de Kempkes. De façon additionnelle, nous montrons que PKD1 joue un rôle dans le maintien du phénotype mésenchymateux du mélanome et apparaît comme une cible thérapeutique pertinente dans le traitement du mélanome métastatique. Tan et ses collaborateurs ont établi un classement en fonction du score EMT de différents types de cancer (plus le score est élevé, plus les tumeurs sont de type mésenchymateux et inversement, plus le score est faible, plus les tumeurs sont de type épithélial) (Tan et al., 2014). Il est ainsi intéressant de noter que, dans cette classification, le mélanome est le troisième type de cancer montrant le score EMT le plus élevé, derrière le glioblastome et

l'ostéosarcome. Malgré le fait que nous ne puissions pas qualifier d'EMT le processus aboutissant à une perte de marqueurs épithéliaux et à une expression de marqueurs mésenchymateux par les cellules de mélanome, il semblerait que ce phénotype mésenchymateux induit par PKD1 soit essentiel à l'agressivité tumorale.

Finalement, nos résultats concernant l'expression de PKD1 dans deux cohortes multi-cancer (tumeurs primitives et PDXs) ont montré que PKD1 était fortement exprimée dans le mélanome ainsi que dans le glioblastome, comparés aux autres types de cancers. De plus, nos résultats ont également établi que PKD1 était plus exprimée dans les échantillons de mélanome que dans les tissus sains correspondants. Ces dernières analyses viennent renforcer notre hypothèse selon laquelle PKD1 pourrait être une cible thérapeutique pertinente dans le traitement du mélanome métastatique.

Les résultats obtenus dans des lignées de mélanome, mais également sur les cohortes de patients posent la question suivante : est-ce qu'une inhibition de PKD1 *in vivo* dans des mélanomes greffés chez la souris pourrait réduire la croissance tumorale ? Pour répondre à cela, il serait pertinent de compléter notre étude par une inhibition pharmacologique de PKD1 *in vivo* à l'aide de PDXs de mélanome (pour lesquels nous disposons d'une dizaine de modèles à l'Institut Curie). Nous pourrions ainsi confirmer sur des modèles PDX les résultats obtenus par Kempkes et al. qui montrent qu'une inhibition de PKD1 sur une lignée cellulaire de mélanome xénogreffée induit une diminution de la croissance tumorale *in vivo* (Kempkes et al., 2012).

La seconde partie de ma thèse était consacrée à la validation de PKD1 en tant que facteur pronostique et cible thérapeutique dans le traitement des cancers du sein triple négatifs. Notre étude nous a permis de mettre en évidence qu'une forte expression de *PRKD1* (gène codant PKD1) est un facteur indépendant de mauvais pronostic dans les cancers du sein triple négatifs. Nous avons également mis en évidence que, malgré sa sous-expression globale dans le cancer du sein, PKD1 pouvait être une cible thérapeutique pertinente dans les cancers du sein triple négatif, en particulier pour les tumeurs qui expriment les plus forts niveaux de PKD1. De nombreuses études avaient souligné le fait que PKD1 était sous-exprimée dans

les tumeurs mammaires mais jusqu'alors, aucune étude n'avait abordé la valeur pronostique de l'expression PKD1 dans le cancer du sein (Borges and Storz, 2013; Borges et al., 2013; Eiseler et al., 2009).

Notre équipe avait précédemment montré que PKD1 était un facteur de mauvais pronostic dans le cancer du sein ER+ résistant aux traitements anti-hormonaux (Karam et al., 2014). Ces tumeurs peuvent être assimilées à des tumeurs ER- car elles ne dépendent plus des œstrogènes pour survivre et/ou proliférer. Ainsi, lorsque l'on bloque la voie de signalisation des œstrogènes par un traitement anti-hormonal, elles sont toujours capables de proliférer. Au regard de nos résultats, PKD1 apparaît comme une cible thérapeutique pertinente pour le traitement des cancers du sein indépendants des œstrogènes. En effet, PKD1 pourrait se substituer à la voie de signalisation des œstrogènes dans les tumeurs du sein ER+ résistants aux traitements anti-hormonaux, ainsi que dans les tumeurs ER- et triple négatives.

Contrairement à la littérature (Borges et al., 2015), nous n'avons pas montré de valeur pronostique pour les autres membres de la famille des protéines kinases D (PKD2 et PKD3) dans la population globale de cancers du sein, ni dans la sous-population de cancers du sein triple négatif.

Nous avons également voulu confirmer que PKD1 pouvait être une cible thérapeutique attractive pour le traitement de cancer du sein triple négatif. Dans la mesure où aucun inhibiteur sélectif de PKD1 n'était disponible commercialement (à l'exception du CRT0066101 qui est un inhibiteur pan-PKD (Harikumar et al., 2010)), nous avons, avec la société AB Science, identifié plusieurs inhibiteurs spécifiques de PKD1. Nous avons ainsi pu mettre en évidence que l'inhibition pharmacologique de PKD1 ou de son expression à l'aide de siRNA dans une lignée cellulaire MDA-MB-436 de cancer du sein triple négatif réduisait la clonogénicité *in vitro*. Ces données confirment ainsi les résultats que nous avions obtenus dans le mélanome, où l'inhibition de PKD1 *in vitro* réduisait également la clonogénicité ainsi que les capacités prolifératives et migratoire des cellules de mélanome. Nos résultats sont également concordants avec l'étude de Kim et de ses collaborateurs, qui ont montré que l'inhibition de PKD1 réduisait l'agressivité de cellules tumorales mammaires résistantes à la chimiothérapie (Kim et al., 2016a). Nous avons également montré que l'inhibition pharmacologique de PKD1 réduisait la croissance tumorale *in vivo*

dans un modèle de PDX de cancer du sein triple négatif. L'efficacité modérée de notre inhibition de PKD1 *in vivo* pourrait être améliorée en affinant les structures chimiques de l'inhibiteur. En effet, il a été montré qu'une mauvaise ADME (Absorption, Distribution, Métabolisme et Elimination) pouvait avoir un impact non négligeable sur l'efficacité d'un traitement pharmacologique. Ainsi, en améliorant les caractéristiques de nos inhibiteurs, il serait peut-être possible d'obtenir une rémission complète des souris greffées et non uniquement une diminution de la croissance tumorale.

Au vu de ces résultats, cette étude nous a permis de mettre en évidence la valeur pronostique de PKD1 et nous a également permis de valider PKD1 comme cible thérapeutique dans le traitement du cancer du sein triple négatif.

La mise en relation de nos résultats dans le mélanome et le cancer du sein nous a également amenés à analyser le niveau d'expression du gène *PRKD1* au niveau transcriptionnel dans des lignées de cancer du sein préalablement classées en fonction de leur phénotype (mésenchymateux ou épithélial). Le classement des lignées cellulaires a été réalisé après analyse par RT-qPCR de l'expression de gènes décrits comme caractéristiques des phénotypes mésenchymateux ou épithélial. Cette analyse avait pour but de vérifier si, dans le cancer du sein, PKD1 pouvait jouer un rôle dans le maintien du phénotype mésenchymateux (comme dans le mélanome). Ces résultats (figure annexe 1) ont montré que le gène *PRKD1* était significativement plus exprimé dans les lignées ayant un phénotype mésenchymateux que dans celles ayant un phénotype épithélial. Il semblerait donc que, comme dans le mélanome, PKD1 puisse jouer un rôle dans le maintien du phénotype mésenchymateux des cellules tumorales mammaires. Ce rôle reste à confirmer.

L'étude d'une potentielle régulation positive de la TEM par PKD1 dans le cancer du sein semble cependant délicate à réaliser. En effet, selon l'étude de Tan et al. (figure annexe 2), le cancer du sein ne fait pas partie des cancers ayant un score EMT important. De plus, bien que PKD1 apparaisse comme un facteur indépendant de mauvais pronostic pour la population de cancer du sein triple négatif (qui exprime le plus PKD1), PKD1 semble globalement peu exprimée dans les tumeurs du sein par rapport aux autres cancers.

De plus, des études ont montré que PKD2 et PKD3 pouvaient également jouer un rôle dans la TEM et la migration cellulaire (le lien avec PKD1 n'a pas été exploré dans ces différentes études) (Alpsoy and Gündüz, 2015; Borges et al., 2015; Zou et al., 2012). PKD2 et PKD3 forment un complexe dans lequel PKD3 stimule PAK4 (une sérine/thréonine kinase qui régule le remodelage du cytosquelette d'actine), ce qui conduit à la réorganisation dynamique des filaments d'actine, nécessaire à la migration cellulaire. De plus, PKD2 et PKD3 augmentent l'expression et l'activation de UPa (Urokinase impliquée dans la dégradation de la matrice extracellulaire) et des métalloprotéases, ce qui induit le remodelage de la matrice extracellulaire et favorise la migration cellulaire. PKD3 peut également affecter le trafic de la paxilline et entraîner ainsi la migration cellulaire. De plus, le traitement par l'inhibiteur pan-PKD CRT0066101 de cellules PKD2/PKD3 positives, présentant un phénotype mésenchymateux, a également démontré que PKD2 et PKD3 peuvent être des inducteurs potentiels de la TEM. Les mécanismes de régulation de la TEM par PKD2 et PKD3 restent toutefois largement méconnus.

Au total, ces résultats suggèrent qu'il serait pertinent d'explorer plus avant les mécanismes de régulation de la TEM dans des cellules de cancer du sein mésenchymateuses exprimant fortement PKD1. Il serait également pertinent d'étudier les redondances potentielles des trois membres de la famille PKD pour la régulation de la TEM dans le cancer du sein.

Au vu de nos résultats prometteurs dans le cancer du sein et le mélanome concernant l'implication de PKD1, nous nous sommes demandé si PKD1 pouvait jouer un rôle pro-oncogénique dans d'autres types de tumeurs. Dans la littérature, il a été montré que PKD1 avait un rôle pro-oncogénique dans certains cancers : le cancer du pancréas et le mélanome (Bollag et al., 2004; Guha et al., 2002; Ristich et al., 2006). De plus, PKD1 semblerait être sous-exprimée dans de nombreux cancers tels que le cancer du sein mais aussi les cancers de la prostate, du côlon, de l'estomac, ainsi que l'ostéosarcome (Du et al., 2009, 2009; Eiseler et al., 2009; Jaggi et al., 2005b; Onishi et al., 2012).

Dans ce but, nous avons analysé l'expression de *PRKD1* au niveau ARNm dans une cohorte de différents types de cancers (poumon, sein, mélanome,

glioblastome, etc…) disponible à l'Institut Curie. Les résultats ont montré que *PRKD1* est fortement surexprimée principalement dans le mélanome et le glioblastome. Les résultats sur une cohorte de PDXs ont également montré que le glioblastome et le mélanome étaient les deux types de cancers exprimant le plus PKD1.

De plus, Tan et ses collaborateurs présentent le glioblastome comme faisant partie des types tumoraux, avec le mélanome, ayant les plus hauts scores EMT (Tan et al., 2014) (annexe 2). Ces données viennent renforcer l'idée que PKD1 pourrait jouer un rôle important dans la tumorigenèse du glioblastome et être une cible thérapeutique attractive pour ce cancer.

Jusqu'à présent, aucune étude n'a été réalisée concernant PKD1 et le glioblastome. Cependant, l'équipe d'Azoitei et ses collaborateurs ont montré un rôle potentiel de PKD2 dans le développement du glioblastome. En effet, ils ont prouvé que PKD2 était fortement exprimée dans des glioblastomes de tous grades, dans des lignées cellulaires de glioblastome ainsi que dans des lignées primaires (Azoitei et al., 2011). De plus, leurs résultats montrent que l'inhibition de PKD2 par des siRNA réduisait la prolifération cellulaire *in vitro* et *in vivo* (Azoitei et al., 2011).

Il serait donc pertinent de tester l'effet d'une inhibition pharmacologique de PKD1 sur des lignées cellulaires de glioblastome et de mesurer l'impact de cette inhibition sur l'expression des marqueurs mésenchymateux et épithéliaux, tel que nous l'avons fait dans le cadre de notre étude sur le mélanome. Il serait également pertinent d'analyser l'impact d'une inhibition de PKD1 *in vivo* dans des PDXs de glioblastomes disponibles à l'Institut Curie.

Une autre perspective de ce travail serait d'évaluer l'activité des inhibiteurs de PKD1 en combinaison avec des thérapies ciblées déjà existantes. En effet, certaines études ont montré que la combinaison d'inhibiteurs de PKC et d'inhibiteurs de MEK pouvait dans le cas du mélanome uvéal métastatique inhiber de manière plus importante la prolifération cellulaire *in vitro* et la croissance tumorale *in vivo* que lorsque ces deux inhibiteurs étaient utilisés seuls (Sagoo et al., 2014).

De plus, de nombreuses études ont montré une implication de la famille des PKC dans la résistance aux médicaments. Ainsi, une étude a montré que les PKCε et PKCη pouvaient être à l'origine de la résistance aux inhibiteurs de BRAF dans le

mélanome, *via* une activation parallèle de la voie des MAP Kinases (Johannessen et al., 2010). Il serait alors intéressant de rechercher, dans la mesure où PKD1 stimule également la voie MAP Kinases, s'il n'y aurait pas une redondance des rôles des différentes PKC dans cette résistance aux inhibiteurs de BRAF.

Une autre étude a établi que les PKC sont plus exprimées dans les lignées résistantes aux drogues comparées aux lignées sensibles. De plus, d'après cette étude, il semblerait que les PKC puissent réguler positivement l'expression de la protéine P-gp (Rumsby et al., 1998). La protéine P-gp, aussi appelée « *Multi drug resistance protein* », est impliquée dans la résistance multiple aux drogues en favorisant l'efflux de médicaments. Dans le cancer du sein, il a déjà été montré que PKD1 était associée à la résistance aux anti-hormonaux mais également à la chimiothérapie (Karam et al., 2014; Kim et al., 2016a). Il serait donc pertinent d'étudier plus avant le rôle joué par PKD1 dans la résistance aux drogues.

Malgré une littérature controversée sur PKD1 attribuant un rôle oncogénique ou anti-oncogénique à cette protéine, cette thèse a permis d'identifier PKD1 comme un acteur majeur du développement et/ou de la progression tumorale et comme une nouvelle cible thérapeutique pertinente dans le mélanome, le cancer du sein triple négatif et le glioblastome.

# ANNEXES

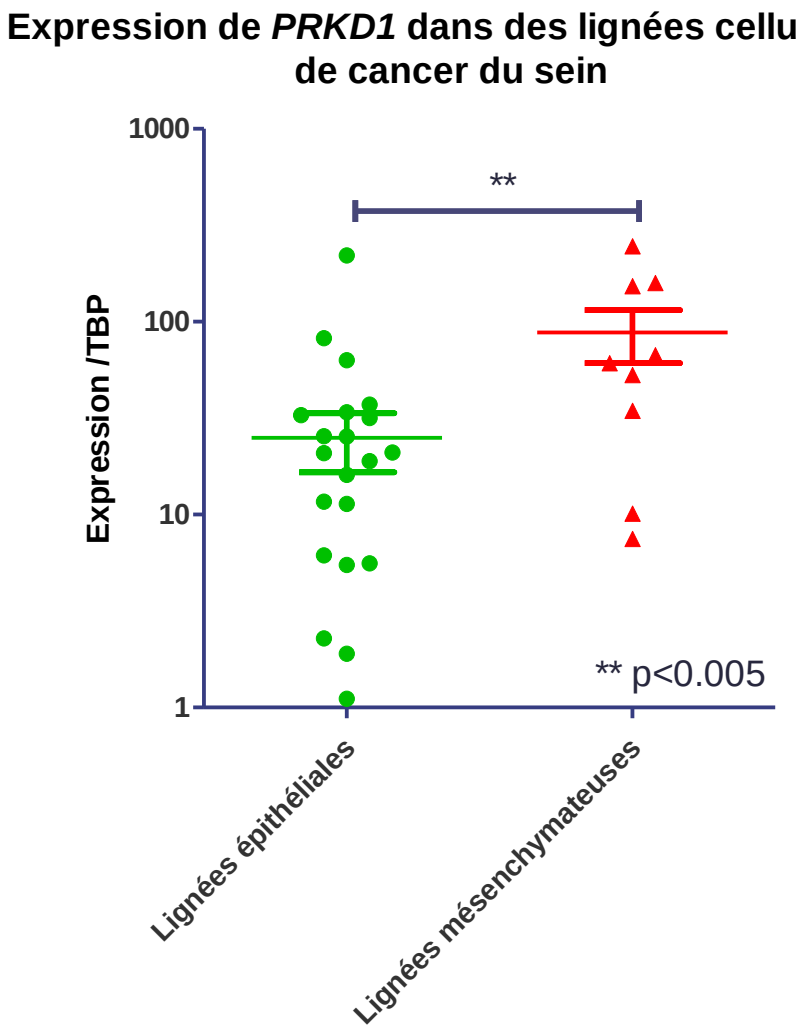



*Figure annexe 1 : Expression de PRKD1 en ARNm dans des lignées de cancer du sein en fonction de leur phénotype épithélial ou mésenchymateux*

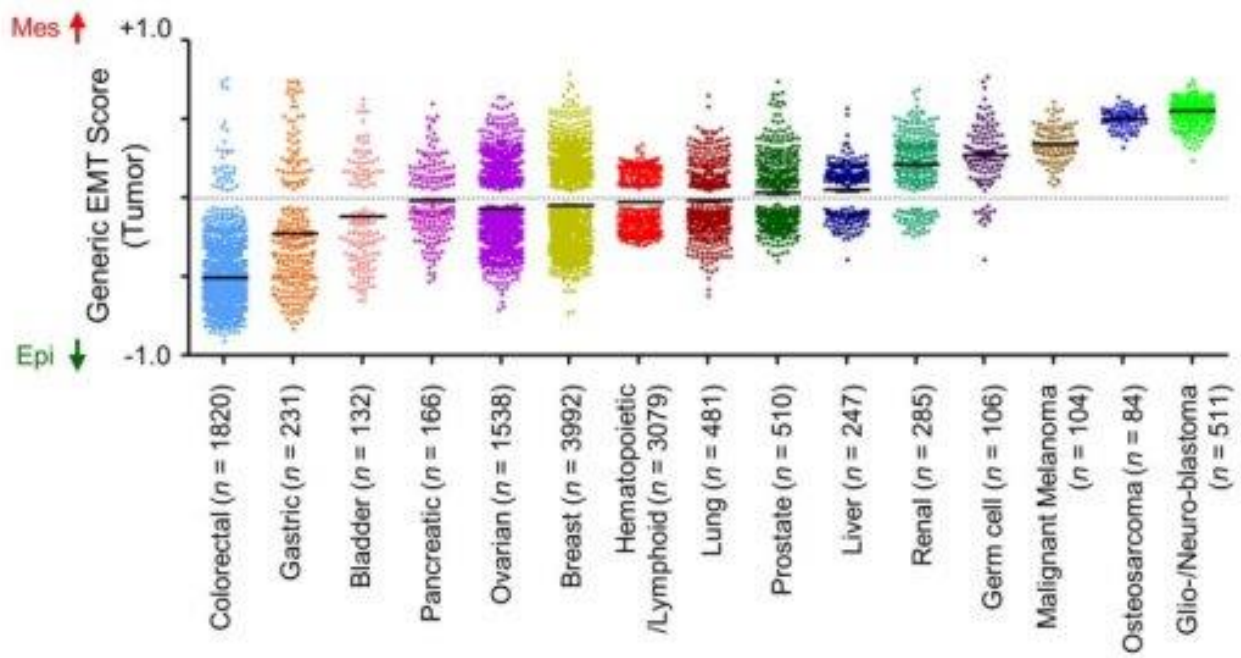



*Figure annexe 2 : Transition Epithelio-mesenchymateuse (TEM) score dans de nombreux tissus tumoraux (Tan et al., 2014)*

# BIBLIOGRAPHIE

Ali, Z., Yousaf, N., and Larkin, J. (2013). Melanoma epidemiology, biology and prognosis. EJC Suppl. EJC Off. J. EORTC Eur. Organ. Res. Treat. Cancer Al *11*, 81–91.

Alpsoy, A., and Gündüz, U. (2015). Protein kinase D2 silencing reduced motility of doxorubicin-resistant MCF7 cells. Tumour Biol. J. Int. Soc. Oncodevelopmental Biol. Med. *36*, 4417–4426.

Anderson, W.F., Pfeiffer, R.M., Tucker, M.A., and Rosenberg, P.S. (2009). Divergent cancer pathways for early-onset and late-onset cutaneous malignant melanoma. Cancer *115*, 4176–4185.

Araki, K., Shimura, T., Suzuki, H., Tsutsumi, S., Wada, W., Yajima, T., Kobayahi, T., Kubo, N., and Kuwano, H. (2011). E/N-cadherin switch mediates cancer progression via TGF-β-induced epithelial-to-mesenchymal transition in extrahepatic cholangiocarcinoma. Br. J. Cancer *105*, 1885–1893.

Arlo J., M., and Mihm, M.C. (2006). Melanoma. N. Engl. J. Med. *355*, 51–65.

Arnold, R., Patzak, I.M., Neuhaus, B., Vancauwenbergh, S., Veillette, A., Van Lint, J., and Kiefer, F. (2005). Activation of hematopoietic progenitor kinase 1 involves relocation, autophosphorylation, and transphosphorylation by protein kinase D1. Mol. Cell. Biol. *25*, 2364–2383.

Arrangoiz, R., Dorantes, J., Cordera, F., Juarez, M.M., Paquentin, E.M., and León, E.L. de (2016). Melanoma Review: Epidemiology, Risk Factors, Diagnosis and Staging. J. Cancer Treat. Res. *4*, 1.

Arun, S.N., Xie, D., Dodd, M.E., Zhong, X., and Bollag, W.B. (2010). The potential use of protein kinase D inhibitors for prevention/treatment of epidermal tumors. J. Dermatol. Sci. *60*, 29–39.

Arun, S.N., Kaddour-Djebbar, I., Shapiro, B.A., and Bollag, W.B. (2011). Ultraviolet B irradiation and activation of protein kinase D in primary mouse epidermal keratinocytes. Oncogene *30*, 1586–1596.

Atkinson, V. (2017). Recent advances in malignant melanoma. Intern. Med. J. *47*, 1114–1121.

Avriyanti, E., Atik, N., Kunii, M., Furumoto, N., Iwano, T., Yoshimura, S.-I., Harada, R., and Harada, A. (2015). Functional redundancy of protein kinase D1 and protein kinase D2 in neuronal polarity. Neurosci. Res. *95*, 12–20.

Aziz, S.A., Jilaveanu, L.B., Zito, C., Camp, R.L., Rimm, D.L., Conrad, P., and Kluger, H.M. (2010). Vertical targeting of the phosphatidylinositol-3 kinase (PI3K) pathway as a strategy for treating melanoma. Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res. *16*, 6029–6039.

Azoitei, N., Kleger, A., Schoo, N., Thal, D.R., Brunner, C., Pusapati, G.V., Filatova, A., Genze, F., Möller, P., Acker, T., et al. (2011). Protein kinase D2 is a novel regulator of glioblastoma growth and tumor formation. Neuro-Oncol. *13*, 710–724.

Azoury, S.C., and Lange, J.R. (2014). Epidemiology, risk factors, prevention, and early detection of melanoma. Surg. Clin. North Am. *94*, 945–962, vii.

Badenas, C., Aguilera, P., Puig-Butillé, J.A., Carrera, C., Malvehy, J., and Puig, S. (2012). GENETIC COUNSELLING IN MELANOMA. Dermatol. Ther. *25*, 397–402.

Balch, C.M., Gershenwald, J.E., Soong, S., Thompson, J.F., Atkins, M.B., Byrd, D.R., Buzaid, A.C., Cochran, A.J., Coit, D.G., Ding, S., et al. (2009). Final Version of 2009 AJCC Melanoma Staging and Classification. J. Clin. Oncol. *27*, 6199–6206.

Ban, K.A., and Godellas, C.V. (2014). Epidemiology of breast cancer. Surg. Oncol. Clin. N. Am. *23*, 409–422.

Bastea, L.I., Döppler, H., Balogun, B., and Storz, P. (2012). Protein kinase D1 maintains the epithelial phenotype by inducing a DNA-bound, inactive SNAI1 transcriptional repressor complex. PloS One *7*, e30459.

Bièche, I., Onody, P., Laurendeau, I., Olivi, M., Vidaud, D., Lidereau, R., and Vidaud, M. (1999). Real-Time Reverse Transcription-PCR Assay for Future Management of *ERBB2*-based Clinical Applications. Clin. Chem. *45*, 1148–1156.

Bièche, I., Parfait, B., Laurendeau, I., Girault, I., Vidaud, M., and Lidereau, R. (2001). Quantification of estrogen receptor alpha and beta expression in sporadic breast cancer. Oncogene *20*, 8109–8115.

Bieche, I., Parfait, B., Le Doussal, V., Olivi, M., Rio, M.C., Lidereau, R., and Vidaud, M. (2001). Identification of CGA as a novel estrogen receptor-responsive gene in breast cancer: an outstanding candidate marker to predict the response to endocrine therapy. Cancer Res. *61*, 1652–1658.

Bisbal, M., Conde, C., Donoso, M., Bollati, F., Sesma, J., Quiroga, S., Añel, A.D., Malhotra, V., Marzolo, M.P., and Cáceres, A. (2008). Protein Kinase D Regulates Trafficking of Dendritic Membrane Proteins in Developing Neurons. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. *28*, 9297–9308.

Boice, J.D. (1996). Cancer following irradiation in childhood and adolescence. Med. Pediatr. Oncol. Suppl. *1*, 29–34.

Bollag, W.B., Dodd, M.E., and Shapiro, B.A. (2004). Protein kinase D and keratinocyte proliferation. Drug News Perspect. *17*, 117–126.

Boniol, M., Autier, P., Boyle, P., and Gandini, S. (2012). Cutaneous melanoma attributable to sunbed use: systematic review and meta-analysis. The BMJ *345*.

Bonitsis, N., Batistatou, A., Karantima, S., and Charalabopoulos, K. (2006). The role of cadherin/catenin complex in malignant melanoma. Exp. Oncol. *28*, 187–193.

Borges, S., and Storz, P. (2013). Protein Kinase D isoforms – New targets for therapy in invasive Breast Cancers? Expert Rev. Anticancer Ther. *13*.

Borges, S., Döppler, H., Perez, E.A., Andorfer, C.A., Sun, Z., Anastasiadis, P.Z., Thompson, E., Geiger, X.J., and Storz, P. (2013). Pharmacologic reversion of epigenetic silencing of the PRKD1 promoter blocks breast tumor cell invasion and metastasis. Breast Cancer Res. BCR *15*, R66.

Borges, S., Perez, E.A., Thompson, E.A., Radisky, D.C., Geiger, X.J., and Storz, P. (2015). Effective Targeting of Estrogen Receptor-Negative Breast Cancers with the Protein Kinase D Inhibitor CRT0066101. Mol. Cancer Ther. *14*, 1306–1316.

Bravo-Altamirano, K., George, K.M., Frantz, M.-C., Lavalle, C.R., Tandon, M., Leimgruber, S., Sharlow, E.R., Lazo, J.S., Wang, Q.J., and Wipf, P. (2011). Synthesis and Structure-Activity Relationships of Benzothienothiazepinone Inhibitors of Protein Kinase D. ACS Med. Chem. Lett. *2*, 154–159.

Brinton, L.A., Schairer, C., Hoover, R.N., and Fraumeni, J.F. (1988). Menstrual factors and risk of breast cancer. Cancer Invest. *6*, 245–254.

Calaf, G.M., Zepeda, A.B., Castillo, R.L., Figueroa, C.A., Arias, C., Figueroa, E., and Farías, J.G. (2015). Molecular aspects of breast cancer resistance to drugs (Review). Int. J. Oncol. *47*, 437–445.

Cancer Genome Atlas Network (2015). Genomic Classification of Cutaneous Melanoma. Cell *161*, 1681–1696.

Chang, J.-K., Ni, Y., Han, L., Sinnett-Smith, J., Jacamo, R., Rey, O., Young, S.H., and Rozengurt, E. (2017). Protein kinase D1 (PKD1) phosphorylation on Ser203 by type I p21-activated kinase (PAK) regulates PKD1 localization. J. Biol. Chem. jbc.M116.771394.

Chen, C.-L., and Chen, H.-C. (2009). Functional suppression of E-cadherin by protein kinase Cδ. J. Cell Sci. *122*, 513–523.

Chiu, T., and Rozengurt, E. (2001). PKD in intestinal epithelial cells: rapid activation by phorbol esters, LPA, and angiotensin through PKC. Am. J. Physiol. Cell Physiol. *280*, C929-942.

Christofori, G. (2003). Changing neighbours, changing behaviour: cell adhesion molecule-mediated signalling during tumour progression. EMBO J. *22*, 2318–2323.

Cleary, M.P., and Grossmann, M.E. (2009). Obesity and Breast Cancer: The Estrogen Connection. Endocrinology *150*, 2537–2542.

Cohen, E.E.W., Lingen, M.W., Zhu, B., Zhu, H., Straza, M.W., Pierce, C., Martin, L.E., and Rosner, M.R. (2006). Protein kinase C zeta mediates epidermal growth factor-induced growth of head and neck tumor cells by regulating mitogen-activated protein kinase. Cancer Res. *66*, 6296–6303.

Coussens, L.M., and Werb, Z. (2002). Inflammation and cancer. Nature *420*, 860–867.

Culver, M.E., Gatesman, M.L., Mancl, E.E., and Lowe, D.K. (2011). Ipilimumab: a novel treatment for metastatic melanoma. Ann. Pharmacother. *45*, 510–519.

Curtin, J.A., Busam, K., Pinkel, D., and Bastian, B.C. (2006). Somatic activation of KIT in distinct subtypes of melanoma. J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol. *24*, 4340–4346.

Dadoune, J. (1990). Histologie (Paris : Médecine-Sciences Flammarion).

David, J.M., and Rajasekaran, A.K. (2012). Dishonorable discharge: the oncogenic roles of cleaved E-cadherin fragments. Cancer Res. *72*, 2917–2923.

De Wever, O., Derycke, L., Hendrix, A., De Meerleer, G., Godeau, F., Depypere, H., and Bracke, M. (2007). Soluble cadherins as cancer biomarkers. Clin. Exp. Metastasis *24*, 685–697.

Debiais, F., Lemonnier, J., Hay, E., Delannoy, P., Caverzasio, J., and Marie, P.J. (2001). Fibroblast growth factor-2 (FGF-2) increases N-cadherin expression through protein kinase C and Src-kinase pathways in human calvaria osteoblasts. J. Cell. Biochem. *81*, 68–81.

Delannoy, P., Lemonnier, J., Haÿ, E., Modrowski, D., and Marie, P.J. (2001). Protein kinase C-dependent upregulation of N-cadherin expression by phorbol ester in human calvaria osteoblasts. Exp. Cell Res. *269*, 154–161.

Denning, M.F. (2012). Specifying protein kinase C functions in melanoma. Pigment Cell Melanoma Res. *25*, 466–476.

Dirkx, E., van Eys, G.J.J.M., Schwenk, R.W., Steinbusch, L.K.M., Hoebers, N., Coumans, W.A., Peters, T., Janssen, B.J., Brans, B., Vogg, A.T., et al. (2014). Protein kinase-D1 overexpression prevents lipid-induced cardiac insulin resistance. J. Mol. Cell. Cardiol. *76*, 208–217.

Döppler, H., and Storz, P. (2007). A novel tyrosine phosphorylation site in protein kinase D contributes to oxidative stress-mediated activation. J. Biol. Chem. *282*, 31873–31881.

Döppler, H., and Storz, P. (2017). Mitochondrial and Oxidative Stress-Mediated Activation of Protein Kinase D1 and Its Importance in Pancreatic Cancer. Front. Oncol. *7*, 41.

Du, C., Jaggi, M., Zhang, C., and Balaji, K.C. (2009). Protein kinase D1-mediated phosphorylation and subcellular localization of beta-catenin. Cancer Res. *69*, 1117–1124.

Du, C., Zhang, C., Hassan, S., Biswas, M.H.U., and Balaji, K.C. (2010). Protein kinase D1 suppresses epithelial-to-mesenchymal transition through phosphorylation of snail. Cancer Res. *70*, 7810–7819.

Durand, N., Borges, S., and Storz, P. (2016). Protein Kinase D Enzymes as Regulators of EMT and Cancer Cell Invasion. J. Clin. Med. *5*.

Eiseler, T., Schmid, M.A., Topbas, F., Pfizenmaier, K., and Hausser, A. (2007). PKD is recruited to sites of actin remodelling at the leading edge and negatively regulates cell migration. FEBS Lett. *581*, 4279–4287.

Eiseler, T., Döppler, H., Yan, I.K., Goodison, S., and Storz, P. (2009). Protein kinase D1 regulates matrix metalloproteinase expression and inhibits breast cancer cell invasion. Breast Cancer Res. BCR *11*, R13.

Elwood, J.M., and Jopson, J. (1997). Melanoma and sun exposure: an overview of published studies. Int. J. Cancer *73*, 198–203.

Endo, K., Oki, E., Biedermann, V., Kojima, H., Yoshida, K., Johannes, F.J., Kufe, D., and Datta, R. (2000). Proteolytic cleavage and activation of protein kinase C [micro] by caspase-3 in the apoptotic response of cells to 1-beta -D-arabinofuranosylcytosine and other genotoxic agents. J. Biol. Chem. *275*, 18476–18481.

Evans, I.M., Bagherzadeh, A., Charles, M., Raynham, T., Ireson, C., Boakes, A., Kelland, L., and Zachary, I.C. (2010). Characterization of the biological effects of a novel protein kinase D inhibitor in endothelial cells. Biochem. J. *429*, 565–572.

Fang, X.-Q., Qiao, H., Groveman, B.R., Feng, S., Pflueger, M., Xin, W.-K., Ali, M.K., Lin, S.-X., Xu, J., Duclot, F., et al. (2015). Regulated internalization of NMDA receptors drives PKD1-mediated suppression of the activity of residual cell-surface NMDA receptors. Mol. Brain *8*, 75.

Ferlay, J., Soerjomataram, I., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., Rebelo, M., Parkin, D.M., Forman, D., and Bray, F. (2015). Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. Int. J. Cancer *136*, E359-386.

Fielitz, J., Kim, M.-S., Shelton, J.M., Qi, X., Hill, J.A., Richardson, J.A., Bassel-Duby, R., and Olson, E.N. (2008). Requirement of protein kinase D1 for pathological cardiac remodeling. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *105*, 3059–3063.

Foulkes, W.D., Smith, I.E., and Reis-Filho, J.S. (2010). Triple-negative breast cancer. N. Engl. J. Med. *363*, 1938–1948.

Frixen, U.H., Behrens, J., Sachs, M., Eberle, G., Voss, B., Warda, A., Löchner, D., and Birchmeier, W. (1991). E-cadherin-mediated cell-cell adhesion prevents invasiveness of human carcinoma cells. J. Cell Biol. *113*, 173–185.

Gandellini, P., Folini, M., Longoni, N., Pennati, M., Binda, M., Colecchia, M., Salvioni, R., Supino, R., Moretti, R., Limonta, P., et al. (2009). miR-205 Exerts tumor-suppressive functions in human prostate through down-regulation of protein kinase Cepsilon. Cancer Res. *69*, 2287–2295.

Guha, S., Rey, O., and Rozengurt, E. (2002). Neurotensin induces protein kinase C-dependent protein kinase D activation and DNA synthesis in human pancreatic carcinoma cell line PANC-1. Cancer Res. *62*, 1632–1640.

Guha, S., Tanasanvimon, S., Sinnett-Smith, J., and Rozengurt, E. (2010). Role of protein kinase D signaling in pancreatic cancer. Biochem. Pharmacol. *80*, 1946–1954.

Ha, C.H., Wang, W., Jhun, B.S., Wong, C., Hausser, A., Pfizenmaier, K., McKinsey, T.A., Olson, E.N., and Jin, Z.-G. (2008). Protein kinase D-dependent phosphorylation and nuclear export of histone deacetylase 5 mediates vascular endothelial growth factor-induced gene expression and angiogenesis. J. Biol. Chem. *283*, 14590–14599.

Haass, N.K., Smalley, K.S.M., Li, L., and Herlyn, M. (2005). Adhesion, migration and communication in melanocytes and melanoma. Pigment Cell Res. *18*, 150–159.

Harikumar, K.B., Kunnumakkara, A.B., Ochi, N., Tong, Z., Deorukhkar, A., Sung, B., Kelland, L., Jamieson, S., Sutherland, R., Raynham, T., et al. (2010). A novel small-molecule inhibitor of protein kinase D blocks pancreatic cancer growth in vitro and in vivo. Mol. Cancer Ther. *9*, 1136–1146.

Harrison, B.C., Kim, M.-S., van Rooij, E., Plato, C.F., Papst, P.J., Vega, R.B., McAnally, J.A., Richardson, J.A., Bassel-Duby, R., Olson, E.N., et al. (2006). Regulation of cardiac stress signaling by protein kinase d1. Mol. Cell. Biol. *26*, 3875–3888.

Hashim, P.W., Friedlander, P., and Goldenberg, G. (2016). Systemic Therapies for Late-stage Melanoma. J. Clin. Aesthetic Dermatol. *9*, 36–40.

Häussermann, S., Kittstein, W., Rincke, G., Johannes, F.J., Marks, F., and Gschwendt, M. (1999). Proteolytic cleavage of protein kinase Cmu upon induction of apoptosis in U937 cells. FEBS Lett. *462*, 442–446.

Haworth, R.S., and Avkiran, M. (2001). Inhibition of protein kinase D by resveratrol. Biochem. Pharmacol. *62*, 1647–1651.

Hayashi, A., Seki, N., Hattori, A., Kozuma, S., and Saito, T. (1999). PKCnu, a new member of the protein kinase C family, composes a fourth subfamily with PKCmu. Biochim. Biophys. Acta *1450*, 99–106.

Hazan, R.B., Phillips, G.R., Qiao, R.F., Norton, L., and Aaronson, S.A. (2000). Exogenous expression of N-cadherin in breast cancer cells induces cell migration, invasion, and metastasis. J. Cell Biol. *148*, 779–790.

Higgins, M.J., and Baselga, J. (2011). Targeted therapies for breast cancer. J. Clin. Invest. *121*, 3797–3803.

Hodis, E., Watson, I.R., Kryukov, G.V., Arold, S.T., Imielinski, M., Theurillat, J.-P., Nickerson, E., Auclair, D., Li, L., Place, C., et al. (2012). A landscape of driver mutations in melanoma. Cell *150*, 251–263.

Hotz, B., Arndt, M., Dullat, S., Bhargava, S., Buhr, H.-J., and Hotz, H.G. (2007). Epithelial to mesenchymal transition: expression of the regulators snail, slug, and twist in pancreatic cancer. Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res. *13*, 4769–4776.

Hrgović, Z., Kaufmann, M., Loncar, J., Salihagić, A., and Langenbeck, U. (1995). [Genetic diagnosis and therapy of hereditary breast carcinoma]. Med. Arh. *49*, 13–17.

Hsu, M.Y., Wheelock, M.J., Johnson, K.R., and Herlyn, M. (1996). Shifts in cadherin profiles between human normal melanocytes and melanomas. J. Investig. Dermatol. Symp. Proc. *1*, 188–194.

Huck, B., Duss, S., Hausser, A., and Olayioye, M.A. (2014). Elevated protein kinase D3 (PKD3) expression supports proliferation of triple-negative breast cancer cells and contributes to mTORC1-S6K1 pathway activation. J. Biol. Chem. *289*, 3138–3147.

Hurd, C., and Rozengurt, E. (2003). Uncoupling of protein kinase D from suppression of EGF-dependent c-Jun phosphorylation in cancer cells. Biochem. Biophys. Res. Commun. *302*, 800–804.

Iglesias, T., and Rozengurt, E. (1998). Protein kinase D activation by mutations within its pleckstrin homology domain. J. Biol. Chem. *273*, 410–416.

Isakov, N. (2017). Protein kinase C (PKC) isoforms in cancer, tumor promotion and tumor suppression. Semin. Cancer Biol.

Ittner, A., Block, H., Reichel, C.A., Varjosalo, M., Gehart, H., Sumara, G., Gstaiger, M., Krombach, F., Zarbock, A., and Ricci, R. (2012). Regulation of PTEN activity by p38δ-PKD1 signaling in neutrophils confers inflammatory responses in the lung. J. Exp. Med. *209*, 2229–2246.

Jacamo, R., Sinnett-Smith, J., Rey, O., Waldron, R.T., and Rozengurt, E. (2008). Sequential protein kinase C (PKC)-dependent and PKC-independent protein kinase D catalytic activation via Gq-coupled receptors: differential regulation of activation loop Ser(744) and Ser(748) phosphorylation. J. Biol. Chem. *283*, 12877–12887.

Jäger, T., Becker, M., Eisenhardt, A., Tilki, D., Tötsch, M., Schmid, K.W., Romics, I., Rübben, H., Ergün, S., and Szarvas, T. (2010). The prognostic value of cadherin switch in bladder cancer. Oncol. Rep. *23*, 1125–1132.

Jaggi, M., Johansson, S.L., Baker, J.J., Smith, L.M., Galich, A., and Balaji, K.C. (2005a). Aberrant expression of E-cadherin and beta-catenin in human prostate cancer. Urol. Oncol. *23*, 402–406.

Jaggi, M., Rao, P.S., Smith, D.J., Wheelock, M.J., Johnson, K.R., Hemstreet, G.P., and Balaji, K.C. (2005b). E-cadherin phosphorylation by protein kinase D1/protein kinase C{mu} is associated with altered cellular aggregation and motility in prostate cancer. Cancer Res. *65*, 483–492.

Jaggi, M., Nazemi, T., Abrahams, N.A., Baker, J.J., Galich, A., Smith, L.M., and Balaji, K.C. (2006). N-cadherin switching occurs in high Gleason grade prostate cancer. The Prostate *66*, 193–199.

Jaggi, M., Du, C., Zhang, W., and Balaji, K.C. (2007). Protein kinase D1: a protein of emerging translational interest. Front. Biosci. J. Virtual Libr. *12*, 3757–3767.

Jain, K., and Basu, A. (2014). Protein Kinase C-ε Promotes EMT in Breast Cancer. Breast Cancer Basic Clin. Res. *8*, 61–67.

Jeanes, A., Gottardi, C.J., and Yap, A.S. (2008). Cadherins and cancer: how does cadherin dysfunction promote tumor progression? Oncogene *27*, 6920–6929.

Johannes, F.J., Prestle, J., Eis, S., Oberhagemann, P., and Pfizenmaier, K. (1994). PKCu is a novel, atypical member of the protein kinase C family. J. Biol. Chem. *269*, 6140–6148.

Johannessen, C.M., Boehm, J.S., Kim, S.Y., Thomas, S.R., Wardwell, L., Johnson, L.A., Emery, C.M., Stransky, N., Cogdill, A.P., Barretina, J., et al. (2010). COT drives resistance to RAF inhibition through MAP kinase pathway reactivation. Nature *468*, 968–972.

Kamińska, M., Ciszewski, T., Łopacka-Szatan, K., Miotła, P., and Starosławska, E. (2015). Breast cancer risk factors. Przeglad Menopauzalny Menopause Rev. *14*, 196–202.

Karam, M., Legay, C., Auclair, C., and Ricort, J.-M. (2012). Protein kinase D1 stimulates proliferation and enhances tumorigenesis of MCF-7 human breast cancer cells through a MEK/ERK-dependent signaling pathway. Exp. Cell Res. *318*, 558–569.

Karam, M., Bièche, I., Legay, C., Vacher, S., Auclair, C., and Ricort, J.-M. (2014). Protein kinase D1 regulates ERα-positive breast cancer cell growth response to 17β-estradiol and contributes to poor prognosis in patients. J. Cell. Mol. Med. *18*, 2536–2552.

Kempkes, C., Rattenholl, A., Buddenkotte, J., Strozyk, E., Eberle, J., Hausser, A., Cevikbas, F., Schneider, S.W., and Steinhoff, M. (2012). Proteinase-Activated Receptors 1 and 2 Regulate Invasive Behavior of Human Melanoma Cells via Activation of Protein Kinase D1. J. Invest. Dermatol. *132*, 375–384.

Key, T.J., and Reeves, G.K. (2016). Alcohol, diet, and risk of breast cancer. BMJ *353*, i2503.

Key, T.J., Allen, N.E., Verkasalo, P.K., and Banks, E. (2001). Energy balance and cancer: the role of sex hormones. Proc. Nutr. Soc. *60*, 81–89.

Kim, D.Y., Park, E.Y., Chang, E., Kang, H.-G., Koo, Y., Lee, E.J., Ko, J.Y., Kong, H.K., Chun, K.-H., and Park, J.H. (2016a). A novel miR-34a target, protein kinase D1, stimulates cancer stemness and drug resistance through GSK3/β-catenin signaling in breast cancer. Oncotarget *7*, 14791–14802.

Kim, G.R., Cho, S.-N., Kim, H.-S., Yu, S.Y., Choi, S.Y., Ryu, Y., Lin, M.Q., Jin, L., Kee, H.J., and Jeong, M.H. (2016b). Histone deacetylase and GATA-binding factor 6 regulate arterial remodeling in angiotensin II-induced hypertension. J. Hypertens. *34*, 2206–2219.

Kim, Y.-I., Park, J.-E., Brand, D.D., Fitzpatrick, E.A., and Yi, A.-K. (2010). Protein kinase D1 is essential for the pro-inflammatory response induced by hypersensitivity pneumonitis-causing thermophilic actinomycetes Saccharopolyspora rectivirgula. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *184*, 3145–3156.

Kisfalvi, K., Hurd, C., Guha, S., and Rozengurt, E. (2010). Induced overexpression of protein kinase D1 stimulates mitogenic signaling in human pancreatic carcinoma PANC-1 cells. J. Cell. Physiol. *223*, 309–316.

Kourtidis, A., Lu, R., Pence, L.J., and Anastasiadis, P.Z. (2017). A central role for cadherin signaling in cancer. Exp. Cell Res. *358*, 78–85.

Kreizenbeck, G.M., Berger, A.J., Subtil, A., Rimm, D.L., and Gould Rothberg, B.E. (2008). Prognostic significance of cadherin-based adhesion molecules in cutaneous malignant melanoma. Cancer Epidemiol. Biomark. Prev. Publ. Am. Assoc. Cancer Res. Cosponsored Am. Soc. Prev. Oncol. *17*, 949–958.

Kunkel, M.T., Garcia, E.L., Kajimoto, T., Hall, R.A., and Newton, A.C. (2009). The protein scaffold NHERF-1 controls the amplitude and duration of localized protein kinase D activity. J. Biol. Chem. *284*, 24653–24661.

Lade-Keller, J., Riber-Hansen, R., Guldberg, P., Schmidt, H., Hamilton-Dutoit, S.J., and Steiniche, T. (2013). E- to N-cadherin switch in melanoma is associated with decreased expression of phosphatase and tensin homolog and cancer progression. Br. J. Dermatol. *169*, 618–628.

Lau, E., Kluger, H., Varsano, T., Lee, K., Scheffler, I., Rimm, D.L., Ideker, T., and Ronai, Z.A. (2012). PKCε promotes oncogenic functions of ATF2 in the nucleus while blocking its apoptotic function at mitochondria. Cell *148*, 543–555.

Lavalle, C.R., Bravo-Altamirano, K., Giridhar, K.V., Chen, J., Sharlow, E., Lazo, J.S., Wipf, P., and Wang, Q.J. (2010). Novel protein kinase D inhibitors cause potent arrest in prostate cancer cell growth and motility. BMC Chem. Biol. *10*, 5.

Lee, J.J., Sholl, L.M., Lindeman, N.I., Granter, S.R., Laga, A.C., Shivdasani, P., Chin, G., Luke, J.J., Ott, P.A., Hodi, F.S., et al. (2015). Targeted next-generation sequencing reveals high frequency of mutations in epigenetic regulators across treatment-naïve patient melanomas. Clin. Epigenetics *7*, 59.

Lesieur, B., Vercambre, M., Dubernard, G., Khosrotehrani, K., Uzan, S., Aractingi, S., and Rouzier, R. (2008). Risque de cancer du sein lié à la grossesse. /data/revues/03682315/00370001/07004231/.

Li, G., Schaider, H., Satyamoorthy, K., Hanakawa, Y., Hashimoto, K., and Herlyn, M. (2001a). Downregulation of E-cadherin and Desmoglein 1 by autocrine hepatocyte growth factor during melanoma development. Oncogene *20*, 8125–8135.

Li, G., Satyamoorthy, K., and Herlyn, M. (2001b). N-cadherin-mediated intercellular interactions promote survival and migration of melanoma cells. Cancer Res. *61*, 3819–3825.

Liljedahl, M., Maeda, Y., Colanzi, A., Ayala, I., Van Lint, J., and Malhotra, V. (2001). Protein kinase D regulates the fission of cell surface destined transport carriers from the trans-Golgi network. Cell *104*, 409–420.

Long, G.V., Menzies, A.M., Nagrial, A.M., Haydu, L.E., Hamilton, A.L., Mann, G.J., Hughes, T.M., Thompson, J.F., Scolyer, R.A., and Kefford, R.F. (2011). Prognostic and clinicopathologic associations of oncogenic BRAF in metastatic melanoma. J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol. *29*, 1239–1246.

Mak, P., Jaggi, M., Syed, V., Chauhan, S.C., Hassan, S., Biswas, H., and Balaji, K.C. (2008). Protein kinase D1 (PKD1) influences androgen receptor (AR) function in prostate cancer cells. Biochem. Biophys. Res. Commun. *373*, 618–623.

Marangoni, E., Vincent-Salomon, A., Auger, N., Degeorges, A., Assayag, F., de Cremoux, P., de Plater, L., Guyader, C., De Pinieux, G., Judde, J.-G., et al. (2007). A new model of patient tumor-derived breast cancer xenografts for preclinical assays. Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res. *13*, 3989–3998.

Mariotti, A., Perotti, A., Sessa, C., and Rüegg, C. (2007). N-cadherin as a therapeutic target in cancer. Expert Opin. Investig. Drugs *16*, 451–465.

Masur, K., Lang, K., Niggemann, B., Zanker, K.S., and Entschladen, F. (2001). High PKC α and Low E-Cadherin Expression Contribute to High Migratory Activity of Colon Carcinoma Cells. Mol. Biol. Cell *12*, 1973–1982.

Materin, M.A. (2011). Retina Today - The Relationship Between Cutaneous and Uveal Melanoma.

Matthews, S.A., Iglesias, T., Rozengurt, E., and Cantrell, D. (2000). Spatial and temporal regulation of protein kinase D (PKD). EMBO J. *19*, 2935–2945.

Maxime Vernez, and Hohl, D. (2011). Diagnostic histopathologique du mélanome primaire en 2011, et après ?

Merzoug-Larabi, M., Spasojevic, C., Eymard, M., Hugonin, C., Auclair, C., and Karam, M. (2017). Protein kinase C inhibitor Gö6976 but not Gö6983 induces the reversion of E- to N-cadherin switch and metastatic phenotype in melanoma: identification of the role of protein kinase D1. BMC Cancer *17*.

Nelson, W.J., and Nusse, R. (2004). Convergence of Wnt, beta-catenin, and cadherin pathways. Science *303*, 1483–1487.

Nieman, M.T., Prudoff, R.S., Johnson, K.R., and Wheelock, M.J. (1999). N-cadherin promotes motility in human breast cancer cells regardless of their E-cadherin expression. J. Cell Biol. *147*, 631–644.

Nieto, M.A., Huang, R.Y.-J., Jackson, R.A., and Thiery, J.P. (2016). EMT: 2016. Cell *166*, 21–45.

Niimi, R., Matsumine, A., Iino, T., Nakazora, S., Nakamura, T., Uchida, A., and Sudo, A. (2013). Soluble Neural-cadherin as a novel biomarker for malignant bone and soft tissue tumors. BMC Cancer *13*, 309.

Ochi, N., Tanasanvimon, S., Matsuo, Y., Tong, Z., Sung, B., Aggarwal, B.B., Sinnett-Smith, J., Rozengurt, E., and Guha, S. (2011). Protein kinase D1 promotes anchorage-independent growth, invasion, and angiogenesis by human pancreatic cancer cells. J. Cell. Physiol. *226*, 1074–1081.

Oka, M., Kikkawa, U., and Nishigori, C. (2008). Protein kinase C-betaII represses hepatocyte growth factor-induced invasion by preventing the association of adapter protein Gab1 and phosphatidylinositol 3-kinase in melanoma cells. J. Invest. Dermatol. *128*, 188–195.

Onder, T.T., Gupta, P.B., Mani, S.A., Yang, J., Lander, E.S., and Weinberg, R.A. (2008). Loss of E-cadherin promotes metastasis via multiple downstream transcriptional pathways. Cancer Res. *68*, 3645–3654.

Onishi, Y., Kawamoto, T., Kishimoto, K., Hara, H., Fukase, N., Toda, M., Harada, R., Kurosaka, M., and Akisue, T. (2012). PKD1 negatively regulates cell invasion, migration and proliferation ability of human osteosarcoma. Int. J. Oncol. *40*, 1839–1848.

Paluncic, J., Kovacevic, Z., Jansson, P.J., Kalinowski, D., Merlot, A.M., Huang, M.L.-H., Lok, H.C., Sahni, S., Lane, D.J.R., and Richardson, D.R. (2016). Roads to melanoma: Key pathways and emerging players in melanoma progression and oncogenic signaling. Biochim. Biophys. Acta *1863*, 770–784.

Park, H.Y., Russakovsky, V., Ohno, S., and Gilchrest, B.A. (1993). The beta isoform of protein kinase C stimulates human melanogenesis by activating tyrosinase in pigment cells. J. Biol. Chem. *268*, 11742–11749.

Perou, C.M., Sørlie, T., Eisen, M.B., van de Rijn, M., Jeffrey, S.S., Rees, C.A., Pollack, J.R., Ross, D.T., Johnsen, H., Akslen, L.A., et al. (2000). Molecular portraits of human breast tumours. Nature *406*, 747–752.

Polyak, K., and Kalluri, R. (2010). The role of the microenvironment in mammary gland development and cancer. Cold Spring Harb. Perspect. Biol. *2*, a003244.

Prigozhina, N.L., and Waterman-Storer, C.M. (2004). Protein kinase D-mediated anterograde membrane trafficking is required for fibroblast motility. Curr. Biol. CB *14*, 88–98.

Putnam, A.J., Schulz, V.V., Freiter, E.M., Bill, H.M., and Miranti, C.K. (2009). Src, PKCalpha, and PKCdelta are required for alphavbeta3 integrin-mediated metastatic melanoma invasion. Cell Commun. Signal. CCS *7*, 10.

Rastrelli, M., Tropea, S., Rossi, C.R., and Alaibac, M. (2014). Melanoma: epidemiology, risk factors, pathogenesis, diagnosis and classification. Vivo Athens Greece *28*, 1005–1011.

Ren, B. (2016). Protein Kinase D1 Signaling in Angiogenic Gene Expression and VEGF-Mediated Angiogenesis. Front. Cell Dev. Biol. *4*, 37.

Rennecke, J., Rehberger, P.A., Fürstenberger, G., Johannes, F.J., Stöhr, M., Marks, F., and Richter, K.H. (1999). Protein-kinase-Cmu expression correlates with enhanced keratinocyte proliferation in normal and neoplastic mouse epidermis and in cell culture. Int. J. Cancer *80*, 98–103.

Rey, O., Sinnett-Smith, J., Zhukova, E., and Rozengurt, E. (2001). Regulated nucleocytoplasmic transport of protein kinase D in response to G protein-coupled receptor activation. J. Biol. Chem. *276*, 49228–49235.

Reyal, F., Guyader, C., Decraene, C., Lucchesi, C., Auger, N., Assayag, F., De Plater, L., Gentien, D., Poupon, M.-F., Cottu, P., et al. (2012). Molecular profiling of patient-derived breast cancer xenografts. Breast Cancer Res. BCR *14*, R11.

Ribas, A., Hersey, P., Middleton, M.R., Gogas, H., Flaherty, K.T., Sondak, V.K., and Kirkwood, J.M. (2012). New Challenges in Endpoints for Drug Development in Advanced Melanoma. Clin. Cancer Res. *18*, 336–341.

Riggs, B.L., and Hartmann, L.C. (2003). Selective estrogen-receptor modulators -- mechanisms of action and application to clinical practice. N. Engl. J. Med. *348*, 618–629.

Ristich, V.L., Bowman, P.H., Dodd, M.E., and Bollag, W.B. (2006). Protein kinase D distribution in normal human epidermis, basal cell carcinoma and psoriasis. Br. J. Dermatol. *154*, 586–593.

Robertson, J.F. (2001). ICI 182,780 (Fulvestrant)--the first oestrogen receptor down-regulator--current clinical data. Br. J. Cancer *85 Suppl 2*, 11–14.

Roh, M.R., Gupta, S., Park, K.-H., Chung, K.Y., Lauss, M., Flaherty, K.T., Jönsson, G., Rha, S.Y., and Tsao, H. (2016). Promoter Methylation of PTEN Is a Significant Prognostic Factor in Melanoma Survival. J. Invest. Dermatol. *136*, 1002–1011.

Rozengurt, E. (2011). Protein kinase D signaling: multiple biological functions in health and disease. Physiol. Bethesda Md *26*, 23–33.

Rozengurt, E., Rey, O., and Waldron, R.T. (2005). Protein kinase D signaling. J. Biol. Chem. *280*, 13205–13208.

Rumsby, M.G., Drew, L., and Warr, J.R. (1998). Protein kinases and multidrug resistance. Cytotechnology *27*, 203–224.

Rykx, A., De Kimpe, L., Mikhalap, S., Vantus, T., Seufferlein, T., Vandenheede, J.R., and Van Lint, J. (2003). Protein kinase D: a family affair. FEBS Lett. *546*, 81–86.

Sagoo, M., Harbour, J., Stebbing, J., and Bowcock, A. (2014). Combined PKC and MEK inhibition for treating metastatic uveal melanoma. Oncogene *33*, 4722–4723.

Sandhu, R., Parker, J.S., Jones, W.D., Livasy, C.A., and Coleman, W.B. (2010). Microarray-Based Gene Expression Profiling for Molecular Classification of Breast Cancer and Identification of New Targets for Therapy. Lab. Med. *41*, 364–372.

Shamir, E.R., Pappalardo, E., Jorgens, D.M., Coutinho, K., Tsai, W.-T., Aziz, K., Auer, M., Tran, P.T., Bader, J.S., and Ewald, A.J. (2014). Twist1-induced dissemination preserves epithelial identity and requires E-cadherin. J. Cell Biol. *204*, 839–856.

Sharlow, E.R., Giridhar, K.V., LaValle, C.R., Chen, J., Leimgruber, S., Barrett, R., Bravo-Altamirano, K., Wipf, P., Lazo, J.S., and Wang, Q.J. (2008). Potent and selective disruption of protein kinase D functionality by a benzoxoloazepinolone. J. Biol. Chem. *283*, 33516–33526.

Sharp, A., and Harper-Wynne, C. (2014). Treatment of Advanced Breast Cancer (ABC): The Expanding Landscape of Targeted Therapies. J. Cancer Biol. Res.

Sinnett-Smith, J., Zhukova, E., Hsieh, N., Jiang, X., and Rozengurt, E. (2004). Protein kinase D potentiates DNA synthesis induced by Gq-coupled receptors by increasing the duration of ERK signaling in swiss 3T3 cells. J. Biol. Chem. *279*, 16883–16893.

Sroka, R., Van Lint, J., Katz, S.-F., Schneider, M.R., Kleger, A., Paschke, S., Seufferlein, T., and Eiseler, T. (2016). Cortactin is a scaffolding platform for the E-cadherin adhesion complex and is regulated by protein kinase D1 phosphorylation. J. Cell Sci. *129*, 2416–2429.

Stathopoulou, K., Cuello, F., Candasamy, A.J., Kemp, E.M., Ehler, E., Haworth, R.S., and Avkiran, M. (2014). Four-and-a-half LIM domains proteins are novel regulators of the protein kinase D pathway in cardiac myocytes. Biochem. J. *457*, 451–461.

Steinberg, S.F. (2012a). Regulation of protein kinase D1 activity. Mol. Pharmacol. *81*, 284–291.

Steinberg, S.F. (2012b). Regulation of Protein Kinase D1 Activity. Mol. Pharmacol. *81*, 284–291.

Storz, P. (2007). Mitochondrial ROS--radical detoxification, mediated by protein kinase D. Trends Cell Biol. *17*, 13–18.

Storz, P., and Toker, A. (2003). Protein kinase D mediates a stress-induced NF-kappaB activation and survival pathway. EMBO J. *22*, 109–120.

Storz, P., Döppler, H., Johannes, F.-J., and Toker, A. (2003). Tyrosine phosphorylation of protein kinase D in the pleckstrin homology domain leads to activation. J. Biol. Chem. *278*, 17969–17976.

Storz, P., Döppler, H., and Toker, A. (2005). Protein kinase D mediates mitochondrion-to-nucleus signaling and detoxification from mitochondrial reactive oxygen species. Mol. Cell. Biol. *25*, 8520–8530.

Sturany, S., Van Lint, J., Muller, F., Wilda, M., Hameister, H., Hocker, M., Brey, A., Gern, U., Vandenheede, J., Gress, T., et al. (2001). Molecular cloning and characterization of the human protein kinase D2. A novel member of the protein kinase D family of serine threonine kinases. J. Biol. Chem. *276*, 3310–3318.

Sullivan, R., LoRusso, P., Boerner, S., and Dummer, R. (2015). Achievements and challenges of molecular targeted therapy in melanoma. Am. Soc. Clin. Oncol. Educ. Book Am. Soc. Clin. Oncol. Meet. 177–186.

Sundram, V., Chauhan, S.C., and Jaggi, M. (2011). Emerging roles of protein kinase D1 in cancer. Mol. Cancer Res. MCR *9*, 985–996.

Tan, T.Z., Miow, Q.H., Miki, Y., Noda, T., Mori, S., Huang, R.Y.-J., and Thiery, J.P. (2014). Epithelial-mesenchymal transition spectrum quantification and its efficacy in deciphering survival and drug responses of cancer patients. EMBO Mol. Med. *6*, 1279–1293.

Tandon, M., Salamoun, J.M., Carder, E.J., Farber, E., Xu, S., Deng, F., Tang, H., Wipf, P., and Wang, Q.J. (2015). SD-208, a novel protein kinase D inhibitor, blocks prostate cancer cell proliferation and tumor growth in vivo by inducing G2/M cell cycle arrest. PloS One *10*, e0119346.

The Cancer Genome Atlas Network (2012). Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. Nature *490*, 61–70.

Theisen, C.S., Wahl, J.K., Johnson, K.R., and Wheelock, M.J. (2007). NHERF links the N-cadherin/catenin complex to the platelet-derived growth factor receptor to modulate the actin cytoskeleton and regulate cell motility. Mol. Biol. Cell *18*, 1220–1232.

Thiery, J.P., Acloque, H., Huang, R.Y.J., and Nieto, M.A. (2009). Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. Cell *139*, 871–890.

Thorstensen, L., Holm, R., Lothe, R.A., Tropé, C., Carvalho, B., Sobrinho-Simoes, M., and Seruca, R. (2003). WNT-inducible signaling pathway protein 3, WISP-3, is mutated in microsatellite unstable gastrointestinal carcinomas but not in endometrial carcinomas. Gastroenterology *124*, 270–271.

Todoric, J., Antonucci, L., and Karin, M. (2016). Targeting Inflammation in Cancer Prevention and Therapy. Cancer Prev. Res. (Phila. Pa.) *9*, 895–905.

Toker, A. (1998). Signaling through protein kinase C. Front. Biosci. J. Virtual Libr. *3*, D1134-1147.

Trauzold, A., Schmiedel, S., Sipos, B., Wermann, H., Westphal, S., Röder, C., Klapper, W., Arlt, A., Lehnert, L., Ungefroren, H., et al. (2003). PKCmu prevents CD95-mediated apoptosis and enhances proliferation in pancreatic tumour cells. Oncogene *22*, 8939–8947.

Upadhyay, K., Park, J.-E., Yoon, T.W., Halder, P., Kim, Y.-I., Metcalfe, V., Talati, A.J., English, B.K., and Yi, A.-K. (2017). Group B Streptococci Induce Proinflammatory Responses via a Protein Kinase D1-Dependent Pathway. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *198*, 4448–4457.

Valastyan, S., and Weinberg, R.A. (2011). Tumor metastasis: molecular insights and evolving paradigms. Cell *147*, 275–292.

Valverde, A.M., Sinnett-Smith, J., Van Lint, J., and Rozengurt, E. (1994). Molecular cloning and characterization of protein kinase D: a target for diacylglycerol and phorbol esters with a distinctive catalytic domain. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *91*, 8572–8576.

Vántus, T., Vertommen, D., Saelens, X., Rykx, A., De Kimpe, L., Vancauwenbergh, S., Mikhalap, S., Waelkens, E., Kéri, G., Seufferlein, T., et al. (2004). Doxorubicin-induced activation of protein kinase D1 through caspase-mediated proteolytic cleavage: identification of two cleavage sites by microsequencing. Cell. Signal. *16*, 703–709.

Varga, A., Gyulavári, P., Greff, Z., Futosi, K., Németh, T., Simon-Szabó, L., Kerekes, K., Szántai-Kis, C., Brauswetter, D., Kokas, M., et al. (2015). Targeting vascular endothelial growth factor receptor 2 and protein kinase D1 related pathways by a multiple kinase inhibitor in angiogenesis and inflammation related processes in vitro. PloS One *10*, e0124234.

Vargo-Gogola, T., and Rosen, J.M. (2007). Modelling breast cancer: one size does not fit all. Nat. Rev. Cancer *7*, 659–672.

Voris, J.P., Sitailo, L.A., Rahn, H.R., Defnet, A., Gerds, A.T., Sprague, R., Yadav, V., Caroline Le Poole, I., and Denning, M.F. (2010). Functional alterations in protein kinase C beta II expression in melanoma. Pigment Cell Melanoma Res. *23*, 216–224.

Wang, Q.J. (2006). PKD at the crossroads of DAG and PKC signaling. Trends Pharmacol. Sci. *27*, 317–323.

Weinreb, I., Piscuoglio, S., Martelotto, L.G., Waggott, D., Ng, C.K.Y., Perez-Ordonez, B., Harding, N.J., Alfaro, J., Chu, K.C., Viale, A., et al. (2014). Hotspot activating PRKD1 somatic mutations in polymorphous low-grade adenocarcinomas of the salivary glands. Nat. Genet. *46*, 1166–1169.

Wendt, M.K., Taylor, M.A., Schiemann, B.J., and Schiemann, W.P. (2011). Down-regulation of epithelial cadherin is required to initiate metastatic outgrowth of breast cancer. Mol. Biol. Cell *22*, 2423–2435.

Westhoff, C.L. (1999). Breast cancer risk: perception versus reality. Contraception *59*, 25S–28S.

Wheelock, M.J., Shintani, Y., Maeda, M., Fukumoto, Y., and Johnson, K.R. (2008). Cadherin switching. J. Cell Sci. *121*, 727–735.

Whiteman, D.C., Whiteman, C.A., and Green, A.C. (2001). Childhood sun exposure as a risk factor for melanoma: a systematic review of epidemiologic studies. Cancer Causes Control CCC *12*, 69–82.

Wong, C., and Jin, Z.-G. (2005). Protein kinase C-dependent protein kinase D activation modulates ERK signal pathway and endothelial cell proliferation by vascular endothelial growth factor. J. Biol. Chem. *280*, 33262–33269.

Yilmaz, M., and Christofori, G. (2010). Mechanisms of motility in metastasizing cells. Mol. Cancer Res. MCR *8*, 629–642.

Zhang, L., Zhao, Z., Xu, S., Tandon, M., LaValle, C.R., Deng, F., and Wang, Q.J. (2017). Androgen suppresses protein kinase D1 expression through fibroblast growth factor receptor substrate 2 in prostate cancer cells. Oncotarget *8*, 12800–12811.

Zhao, S., Zhou, L., Niu, G., Li, Y., Zhao, D., and Zeng, H. (2014). Differential regulation of orphan nuclear receptor TR3 transcript variants by novel vascular growth factor signaling pathways. FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol. *28*, 4524–4533.

Zhu, H., Yang, Y., Zhang, H., Han, Y., Li, Y., Zhang, Y., Yin, D., He, Q., Zhao, Z., Blumberg, P.M., et al. (2008). Interaction between protein kinase D1 and transient receptor potential V1 in primary sensory neurons is involved in heat hypersensitivity. Pain *137*, 574–588.

Zou, Z., Zeng, F., Xu, W., Wang, C., Ke, Z., Wang, Q.J., and Deng, F. (2012). PKD2 and PKD3 promote prostate cancer cell invasion by modulating NF-κB- and HDAC1-mediated expression and activation of uPA. J. Cell Sci. *125*, 4800–4811.

université PARIS-SACLAY | ÉCOLE DOCTORALE Cancérologie, biologie, médecine, santé (CBMS)

**Title**: Validation of Protein Kinase D1 as a prognostic factor and therapeutic target in triple-negative breast cancer and analysis of the role of PKD1 in the maintenance of the mesenchymal phenotype in melanoma.
**Keys words**: Oncology, Therapeutic target, Breast cancer, Melanoma.

**Abstract**: PKD1 is a serine-threonine kinase encoded by the *PRKD1* gene. It belongs to the protein kinase D (PKD) family. The PKD family also includes PKD2 and PKD3 which share a high structural similarity with PKD1. Some studies suggest that PKD1 is involved in many oncogenic pathways such as MAPK, NF-κB, HDAC... Recent data from our group showed that PKD1 is more expressed in melanoma cell lines with mesenchymal phenotype compared to melanoma cell lines with epithelial phenotype. We also showed that PKD1 participates in the development and/or maintenance of the estrogen-independent phenotype in breast cancer, and that high PKD1 mRNA levels were associated with a worse outcome in tamoxifen-treated tumors.

The objective of my thesis is to analyze the role of PKD1 in the maintenance of mesenchymal phenotype in melanoma and to determine whether PKD1 could be a prognostic factor and/or a therapeutical target for the treatment of breast cancer subpopulations.

We analyzed molecular markers involved in mesenchymal and epithelial phenotype (cadherin, β-catenin …) and the functional characteristics of mesenchymal melanoma cells after PKD1 pharmacological inhibition. Results suggest that PKD1 inhibition induced a mesenchymal to epithelial like transition in these melanoma mesenchymal cell lines.

In addition, the expression of *PRKD1*, *PRKD2* and *PRKD3* was analyzed by RT-qPCR in 527 breast cancers. We showed that higher *PRKD1* mRNA levels were associated with a lower metastasis-free survival in the overall breast cancer population. *PRKD1* prognostic value was even stronger in ERα- and in triple negative tumors.

Then, we tested PKD1 inhibitors in collaboration with the AB Science pharmaceutical company. We assessed the anti-tumoral activity of PKD1 inhibitors *in vitro* in TNBC (triple negative breast cancer) cell lines and *in vivo* in a TNBC PDX (patient derivated xenograft) model. PKD1 pharmacological inhibition or depletion by siRNA reduced colony forming units in MDA-MB-436 TNBC cells. PKD1 pharmacological inhibition also reduced tumor growth *in vivo* in TNBC PDX model.

Following those results, we analyzed *PRKD1* expression in different multi-cancer cohorts. Our results showed that higher *PRKD1* expression is found in melanoma and glioblastoma.

In conclusion, results showed that PKD1 could participate in the maintenance of mesenchymal phenotype in melanoma. And that PKD1 could be an interesting therapeutic target in melanoma, breast cancer and glioblastoma.

**Titre** : Validation de la Protéine Kinase D1 comme facteur pronostique et cible thérapeutique dans le cancer du sein triple négatif et analyse de son rôle dans le maintien du phénotype mésenchymateux dans le mélanome.
**Mots clés** : Oncologie, Cible thérapeutique, Cancer du sein, Mélanome.

**Résumé** : PKD1 est une sérine-thréonine kinase codée par le gène *PRKD1*. Elle appartient à la famille des protéines kinase D (PKD). La famille des PKD comprend également deux autres membres, PKD2 et PKD3 qui partagent une grande similarité structurale avec PKD1. Certaines études suggèrent que la PKD1 est impliquée dans de nombreuses voies oncogéniques telles que MAPK, NF-κB, HDAC ... Les données préliminaires de notre équipe avait montré que PKD1 est fortement exprimée dans les lignées cellulaires de mélanome ayant un phénotype mésenchymateux. Nous avons également montré que PKD1 participe à l'indépendance vis-à-vis des œstrogènes dans le cancer du sein et que la forte expression des transcrits *PRKD1* était associée à une moins bonne survie dans les tumeurs traitées au Tamoxifène.

L'objectif de ma thèse est d'analyser le rôle de la PKD1 dans le maintien du phénotype mésenchymateux dans le mélanome et de déterminer si PKD1 pourrait être un facteur pronostique et une cible thérapeutique pertinente pour certaines sous-populations de cancer du sein.

Nous avons analysé les marqueurs moléculaires impliqués dans le phénotype mésenchymateux et épithélial (cadhérine, β-caténine ...) ainsi que les caractéristiques fonctionnelles des cellules de mélanome ayant un phénotype mésenchymateux après inhibition pharmacologique de PKD1. Les résultats ont montré que l'inhibition de PKD1 induit une réversion du phénotype mésenchymateux vers un phénotype pseudo-épithélial moins agressif.

L'expression de *PRKD1*, *PRKD2* et *PRKD3* a été analysée par RT-qPCR dans 527 tumeurs de sein. Nous avons montré que les niveaux plus élevés d'ARNm de *PRKD1* étaient associés à un mauvais pronostic dans la population globale de cancer du sein et plus particulièrement dans les tumeurs ERα- et les tumeurs triples négatives.

Nous avons criblé des inhibiteurs pharmacologiques de PKD1 en collaboration avec la société pharmaceutique AB Science, et nous avons évalué l'activité anti-tumorale de plusieurs d'entre eux *in vitro* dans la lignée cellulaire de cancer du sein triple négative MDA-MB-436 et *in vivo* dans un modèle de PDX (xénogreffe dérivée du patient) de cancer du sein triple négatif. L'inhibition pharmacologique de PKD1 ou à l'aide de siRNA a réduit la capacité des cellules MDA-MB-436 à former des colonies. L'inhibition pharmacologique de PKD1 a également réduit la croissance tumorale *in vivo* dans le modèle de PDX. Finalement, nous avons analysé l'expression de *PRKD1* dans différentes cohortes multi-cancers. Nos résultats ont montré qu'une forte expression de *PRKD1* est retrouvée dans le mélanome et le glioblastome.

En conclusion, les résultats ont montré que PKD1 pourrait être une cible thérapeutique pertinente pour le mélanome, le cancer du sein et le glioblastome.