



HAL
open science

Rôle de c-Jun dans la réponse aux inhibiteurs de la voie des MAPK dans les mélanomes

Magdalena Pohorecka

► **To cite this version:**

Magdalena Pohorecka. Rôle de c-Jun dans la réponse aux inhibiteurs de la voie des MAPK dans les mélanomes. Cancer. Université Paul Sabatier - Toulouse III, 2018. Français. NNT : 2018TOU30373 . tel-03256054

HAL Id: tel-03256054

<https://theses.hal.science/tel-03256054v1>

Submitted on 10 Jun 2021

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.



THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par :

Université Toulouse 3 Paul Sabatier (UT3 Paul Sabatier)

Présentée et soutenue par :

Magdalena POHORECKA

le Lundi 17 décembre 2018

Titre :

Rôle de c-Jun dans la réponse aux inhibiteurs de la voie des MAPK dans les mélanomes

École doctorale et discipline ou spécialité :

ED BSB : Cancérologie

Unité de recherche :

UMR 1037 - CRCT Equipe 3 "Signalisation cellulaire, oncogénèse et thérapeutiques"

Directeur/trice(s) de Thèse :

Pr. Gilles FAVRE

Jury :

Dr. Marcel DECKERT (Rapporteur)

Dr. Lionel LARUE (Rapporteur)

Pr. Marie-Dominique GALIBERT (Examinatrice)

Pr. Nicolas MEYER (Examineur)

REMERCIEMENTS

Tout d'abord je remercie les membres du jury les Docteurs Deckert M. et Larue L. ainsi que les Professeurs Galibert MD. et Meyer N. d'avoir accepté d'évaluer mon travail de thèse et de participer à ma soutenance.

Je remercie ensuite le Pr. Favre Gilles pour m'avoir accueillie dans votre laboratoire et avoir été mon directeur de thèse. Votre éternel optimisme a contrebalancé mon éternel pessimisme et nous avons quand même réussi à réaliser un « joli » travail...

Merci à mes membres du comité de thèse les Dr. P. Arimondo et L. Nieto pour leurs remarques et conseils sur ces travaux.

Merci à tous ceux qui ont travaillé avec moi sur le projet. En particulier, Claire et Ophélie vous avez été d'une aide précieuse. Claire ma partenaire de manip depuis le début ! Merci pour ton écoute, nos discussions sur le fonctionnariat et autres sujets de la vie quotidienne ;-). Ophélie, tu as rejoint la team « mélanome » que très récemment, mais ton aide est précieuse, et merci d'être un peu la nounou de Lucas pendant nos trajets matinaux en bus ;-)

Un immense merci à Anne P. pour ton soutien, en particulier en fin de thèse. De la même manière un immense merci à Isa pour mon M2 et mon M1, je me souviens encore quand je te courrais après à la fac pour ce fichu stage de M1 ;-)

Rémi G. comme Gitan ;-). Félicitations pour ton poste de technicien au CNRS !! je suis vraiment heureuse pour toi, et j'espère que ton diplôme d'ingénieur sera bientôt reconnu et que tu pourras passer ingé au plus vite ! Olivier C., merci pour ton aide en bioinformatique... ;-). Félicitations pour ton poste de CR au CNRS ! Claudine, la maman du bureau merci pour ton écoute et ta bienveillance. Sarah F. et Sandra, bon courage pour vos thèses ! Merci pour tous nos rires et toutes nos discussions dans le bureau ou à la pause café.

Merci aux autres membres de l'équipe Sylvie, Stéphanie, Olivier S., Aurélien, Cathy, Patoche, Anne C., Simona, Nesibé, Betty et Karine pour nos discussions scientifiques ou pour les conversations de couloir.

Sans oublier les anciens du labo ! Agnese, Nico, Ioio, Marjo (et Jeremstar), Audrey, Brice, Julia, Laetitia, Faten... LA belle époque : les soirées et weekends au labo, les repas sushis, les soirées au Borriquito Loco, les différentes enquêtes de laboratoire avec certaines, les fous rires etc...

que de très bons souvenirs en tête avec aussi Olivier C. et Rémi ! Je vous souhaite à tous beaucoup de bonheur, des post-docs ou autres... Agne et Nico, j'espère que vos projets de retour en France se réaliseront au plus vite, Agne merci pour ton aide à toute heure pour la CHIP ;-) et j'espère qu'on va finir pas réussir à organiser un voyage en Italie tous ensemble pour manger que des bonnes choses que tu adores : pâtes, riz, fromage... ;-) (A ce jour, tu es toujours la seule italienne que je connaisse qui n'aime rien de tout ça) ! Ioio, bon courage pour la période difficile que tu traverses en ce moment. Prends confiance en toi, tu es vraiment quelqu'un de formidable drôle, gentil et intelligent, tu as tout pour réussir ! Marjo et Jeremstar, vous formez une petite famille idéale. Merci Marjo pour ta bienveillance et nos fous rires à la pause café et dans le bureau, je me sentais moins seule avec mon rire de dauphin et je pense qu'on nous entendait dans tout le CRCT ;-) Audrey, merci pour tous tes conseils et de m'avoir rassuré sur le fait que le CDI existe après une thèse sans passer par des concours en tout genre ! Il me tarde de voir la bouille de mini-toi et Brice et de savoir si elle va rejoindre notre clan de filles parlant très discrètement ;-). Laetitia, merci d'avoir été là et d'avoir écouté mes plaintes éternelles sur le ménage, et la gestion des stocks en commun, merci pour ton aide dans l'organisation des auberges espagnoles du labo, de Noël, et des commandes des repas sushis. Sarah G. merci pour ta gentillesse, ton aide en biologie moléculaire, ton écoute. Je vous souhaite bonne route pour la suite avec Elie et futur mini-vous. Enfin merci Laura pour tes conseils et nos fous rires au labo. Bonne chance pour la suite !

Les stagiaires : Chloé et Arthur merci pour votre investissement sur le projet même pour seulement 1 mois et vos gâteaux ! et Marina ma voisine de bureau pendant 6 mois merci pour tes délicieuses crêpes bretonnes et ton caramel au beurre salé (une tuerie !). Bon courage à vous pour la suite et plein de bonheur.

Merci à mes amies de pharma (Audrey A., Manue, Naïs, Claire) pour toutes nos petites sorties gastronomiques difficiles à organiser en fonction de nos emplois du temps respectifs... Aux Limougeauds (Morgane, Marion, Marie, Sarah, Julien, Magratelle ma co-interne des MDS), Limoges c'est comme chez les chtis : On pleure en arrivant et on pleure en repartant ! L'internat de Limoges crée des liens ;-) I've got a feeling...

Merci à Emilouche et Cissou pour nos weekends à Marseille et Bordeaux, nos repas et pour votre présence !

Merci à tous mes amis d'enfance tunisienne : Sophie, Bouchouch, Chebcheb, Sandra, Aïda, Rado, Maxime, Ayoub, Sabrine et bien sûre Céline ! On se connaît presque tous depuis la

maternelle ! Même si on est dispersé aux 4 coins du monde et qu'on ne s'appelle pas régulièrement, lorsqu'on se voit c'est comme si c'était hier ! Vous êtes un pilier dans ma vie et sachez que vous pourrez toujours compter sur moi comme je sais que je peux compter sur vous en cas de coup dur.

Merci aux groupes des « Vieux Secs » et des « Puceaux Sauvages » pour nos weekends féériques et nos soirées organisées en vue de promouvoir l'esprit festif du sud-ouest :-)

Merci à ma toute ma famille en particulier à mes parents. Même si vous ne nous croyez pas, nous sommes conscientes avec Anna de tous les sacrifices que vous avez fait pour qu'on puisse arriver à faire nos études et pour nous assurer un avenir correct... Nous vous en remercions infiniment et sommes conscientes de la chance que nous avons.

Merci à tous ceux que j'ai oublié de citer...

Merci à Mon Chéri de m'avoir soutenue et surtout supportée (ce n'est pas fini en plus, tu as signé pour la vie ;-)) pendant toutes ces années !!! et d'avoir été mon chauffeur particulier les weekends de manip... Enfin, merci à mon choupinou. Tu illumines nos journées et c'est un réel bonheur de te voir grandir et t'épanouir à nos côtés tous les jours. Vivement la suite de l'aventure !!

TABLE DES MATIERES

LISTE DES ABREVIATIONS.....	4
INTRODUCTION	11
I. Le mélanome cutané	12
I.A. GENERALITES	12
I.A.1. Définition et épidémiologie	12
I.A.2. Facteurs de risques.....	14
I.A.2.a. Les facteurs de risques extrinsèques	14
I.A.2.b. Les facteurs de risques intrinsèques.....	14
I.B. PHYSIOPATHOLOGIE	15
I.B.1. Du mélanocyte au mélanome métastatique	15
I.B.1.a. Initiation de la mélanomagenèse.....	17
I.B.1.b. Les voies impliquées dans la progression tumorale	18
I.B.2. Formes anatomo-cliniques	28
I.B.2.a. Le mélanome à extension superficielle.....	28
I.B.2.b. Le mélanome nodulaire	28
I.B.2.c. Le mélanome de Dubreuilh ou mélanome lentigineux	29
I.B.2.d. Le mélanome acrolentigineux	29
I.B.2.e. Les mélanomes muqueux	29
I.B.2.f. Les mélanomes uvéaux.....	29
I.C. PRISE EN CHARGE DU MELANOME	30
I.C.1. Diagnostic.....	30
I.C.2. Prise en charge thérapeutique	31
I.C.2.a. La prise en charge non médicamenteuse	31
I.C.2.b. La chimiothérapie	32
I.C.2.c. Les thérapies ciblées : anti-BRAF et anti-MEK.....	34
I.C.2.d. L'immunothérapie	34
I.C.1. Mieux vaut prévenir que guérir	38
II. La voie des MAPK	40
II.A. GENERALITES	40
II.B. LA VOIE RAS / RAF / MEK / ERK ET SES ALTERATIONS DANS LE MELANOME	41
II.B.1. Les récepteurs à activité tyrosine kinase	43
II.B.2. Les récepteurs couplés aux protéines G.....	43
II.B.3. RAS	45
II.B.3.a. Présentation des protéines RAS et activation.....	45
II.B.3.b. Les mutations de RAS dans le mélanome	46
II.B.3.c. La perte de fonction de NF1.....	47
II.B.4. RAF	48
II.B.4.a. Présentation des protéines RAF et activation.....	48
II.B.4.b. Les mutations de BRAF	50
II.B.5. Les rétrocontrôles de la voie.....	51
II.B.5.a. Les rétrocontrôles immédiats	51
II.B.5.b. Les rétrocontrôles tardifs	52
II.B.6. Les thérapies ciblant cette voie	53
II.B.6.a. L'association inhibiteur de BRAF et inhibiteur de MEK.....	53
II.B.6.b. Comment cibler autrement la voie des MAPK ?	55
II.C. LA VOIE JNK / C-JUN.....	56
II.C.1.a. La voie JNK : présentation et rôle physiologique	56
II.C.1.b. Régulation de l'expression du facteur de transcription c-Jun.....	57

II.C.1.c. c-Jun et mélanome	59
III. Inhibiteurs de la voie des MAPK utilisés en clinique : de l'espoir à la désillusion	61
III.A. GENERALITES	61
III.B. REACTIVATION DE LA VOIE MAPK OU PI3K/AKT	62
III.B.1. La réactivation de la voie par RAS	62
III.B.2. Les résistances liées à RAF	63
III.B.3. Les mutations de MEK et ERK	64
III.B.4. La surexpression des RTK	65
III.B.5. Les autres mécanismes	66
III.C. LES MECANISMES DE RESISTANCE LIES AU MICROENVIRONNEMENT	67
III.C.1. Facteurs solubles et cytokines	67
III.C.2. Les résistances liées aux interactions avec la matrice extracellulaire	68
III.D. L'HETEROGENEITE TUMORALE : DIVERS PHENOTYPES RESPONSABLES DE L'ECHAPPEMENT THERAPEUTIQUE	69
III.D.1. Généralités	69
III.D.2. Le phénotype souche	71
III.D.3. MITF or not MITF ?	72
III.D.4. Le switch métabolique	74
III.D.5. Focus sur c-Jun et résistance aux inhibiteurs de la voie MAPK	75
III.D.6. Conclusion sur l'hétérogénéité tumorale	77
OBJECTIFS	79
RESULTATS ET DISCUSSION	82
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	107
BIBLIOGRAPHIE	110
ANNEXES	130

TABLE DES FIGURES ET DES TABLEAUX

FIGURE 1 : STRUCTURE DE L'ÉPIDERME DE LA PEAU.....	13
FIGURE 2 : RISQUE DE MELANOME ET PHOTOTYPE.....	14
FIGURE 3 : SCHEMA DE LA MELANOMAGENESE AINSI QUE DES PRINCIPALES ALTERATIONS RETROUVEES	16
FIGURE 4 : MECANISMES IMPLIQUES DANS L'ARRÊT DE LA PROLIFÉRATION APRES EXPANSION CLONALE SUITE A L'ACQUISITION DE LA MUTATION BRAF ^{V600E}	18
FIGURE 5 : LE LOCUS CDKN2A.....	20
FIGURE 6 : LA VOIE CANONIQUE PI3K / AKT	20
FIGURE 7 : ORIGINE DES MELANOCYTES.....	22
FIGURE 8 : REGULATION TRANSCRIPTIONNELLE DE MITF.....	23
FIGURE 9 : LE MODELE DE RHEOSTAT DE MITF	24
FIGURE 10 : PHOTOS DES DIFFÉRENTES FORMES CLINIQUES DE MELANOMES	28
FIGURE 11: STRUCTURE D'UN ADC ET MECANISME D'ACTION	33
FIGURE 12: COURBES DE SURVIE GLOBALE COMPARANT LA DACARBAZINE AU NIVOLUMAB DANS LE TRAITEMENT DU MELANOME METASTATIQUE NON BRAF MUTE	36
FIGURE 13 : LES DIFFÉRENTES STRATEGIES D'IMMUNOTHERAPIES	37
FIGURE 14 : RECOMMANDATIONS DE LA SOCIÉTÉ FRANÇAISE DE DERMATOLOGIE POUR LA PRISE EN CHARGE DES PATIENTS ATTEINTS DE MELANOME DE STADE III INOPÉRABLE OU DE STADE IV.....	39
FIGURE 15 : SCHEMA DES DIFFÉRENTES VOIES MAPK CHEZ L'HUMAIN.....	40
FIGURE 16 : PRINCIPAUX ACTEURS DE LA VOIE DES MAPK IMPLIQUES DANS LES CANCERS	42
FIGURE 17 : LE RECEPTEUR C-KIT ET SES VOIES ACTIVÉES.....	43
FIGURE 18 : LES DIFFÉRENTES VOIES ET DIFFÉRENTS MECANISMES PHYSIOLOGIQUES ACTIVÉS PAR LES RCPG	44
FIGURE 19 : LES HOMOLOGIES DE STRUCTURE DES PROTEINES RAS	45
FIGURE 20 : MECANISME D'ACTIVATION DES PROTEINES DE LA SOUS-FAMILLE RAS	46
FIGURE 21 : STRUCTURE DES PROTEINES RAF	48
FIGURE 22 : CASCADE DE SIGNALISATION DE LA VOIE CANONIQUE DES MAPK ET PRINCIPALES CIBLES	49
FIGURE 23 : PRINCIPAUX MECANISMES DE RETROCONTROLES DE LA VOIE ERK	52
FIGURE 24: SCHEMA DES PRINCIPALES MODIFICATIONS POST-TRADUCTIONNELLES DE C-JUN.....	59
FIGURE 25 : ÉVOLUTION DE LA TAILLE TUMORALE PAR PATIENT DANS LE GROUPE VEMURAFENIB DE L'ESSAI CLINIQUE BRIM-3	61
FIGURE 26 : SCHEMA RECAPITULATIF DES DIFFÉRENTS MECANISMES DE RESISTANCE D'ORIGINE GÉNÉTIQUE ET LIÉS AU MICROENVIRONNEMENT	69
FIGURE 27 : SCHEMA RECAPITULATIF DES PRINCIPAUX ACTEURS ET DES PRINCIPALES VOIES DE SIGNALISATIONS IMPLIQUES DANS LA TEM DANS LE MELANOME.....	73
FIGURE 28 : SCHEMA MONTRANT LA LIAISON ENTRE LE SWITCH MÉTABOLIQUE ET LE SWITCH PHÉNOTYPIQUE EN FONCTION DU MICROENVIRONNEMENT	75
TABLEAU 1 : LES DIFFÉRENTS TYPES DE CANCERS DE LA PEAU ET LEURS FREQUENCES	12
TABLEAU 2 : PRINCIPALES CARACTÉRISTIQUES DES DEUX CATEGORIES DE MELANOMES.....	17
TABLEAU 3 : CRITÈRES ABCDE D'ÉVALUATION D'UNE LÉSION PIGMENTÉE.....	30
TABLEAU 4 : INDICE DE BRESLOW ET SURVIE GLOBALE A 5 ANS	31
TABLEAU 5 : CARACTÉRISTIQUES DES 3 CLASSES DE MUTATIONS DE BRAF.....	51

LISTE DES ABREVIATIONS

ADC : Antibody Drug Conjugated

ADN : Acide Désoxyribo Nucléique

AJCC : American Joint Committee on
Cancer

AKT = PKB : Protein Kinase B

ALK : Anaplastic Lymphoma Receptor
Tyrosine Kinase

AMM : Autorisation de Mise sur le Marché

AMPc : Adénosine MonoPhosphate
Cyclique

AP-1 : Activator Protein 1

AQP1 : Aquaporin 1

ARID1A : AT-Rich Interaction Domain 1A

ARID2 : AT-Rich Interaction Domain 2

ARNm : Acide Ribo-Nucléique Messenger

ASCO : American Society of Clinical
Oncology

ASIP : Agouti Signaling Protein

ATF4 : Activating Transcription Factor 4

ATP : Adenosine Tri-Phosphate

AXL : AXL Receptor Tyrosine Kinase

BAD : Bcl-2-Associated Death promoter

BAP1 : BRCA1 Associated Protein 1

BCL2 : B-Cell Lymphoma 2

BCL2A1 : BCL2 Related Protein A1

BFP : Blue Fluorescent Protein

BIM : Bcl-2 Interacting Mediator Of Cell
Death

BLM : Bloom Syndrome RecQ Like Helicase

BDNF : Brain-derived Neurotrophic Factor

BRAF : B-Raf Proto-Oncogene,
Serine/Threonine Kinase

bZIP : basic region-leucine zipper

CAM : Cell Adhesion Molecules

CAPN1 : Calpaine 1

CCND1 : Cycline D1

CD9/30/271 : Antigen CD9/30/271

CDK2/3/4/5 : Cyclin Dependant Kinase
2/3/4/5

CDKN2A : Cyclin-Dependent Kinase
Inhibitor 2A

ChIP-Seq : Chromatin Immuno-
Precipitation Sequencing

CLIP : Corticotropin-Like Intermediate Peptide

CMV : CytoMégaloVirus

COP1 : COP1, E3 Ubiquitin Ligase

COT = MAP3K8 : Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase Kinase 8

CR1/2/3 : Conserved Region 1/2/3

CRC : Cancer Colo Rectal

CRD : Cystein Rich Domain

CRE : cAMP response element

CREB : cAMP Response Element-Binding protein

CSD : Chronically Sun-Damaged

CTLA-4 : Cytotoxic T-Lymphocyte-Associated protein 4

CXCR2 : C-X-C Motif Chemokine Receptor 2

DCT : DopaChrome Tautomerase

DM1 : DM1 Protein Kinase

DTC : Drug Tolerant Cells

DUSP : Dual-Specificity Phosphatases

EDN1 : Endothéline 1

EDNRA/B : Récepteur à l'Endothéline de type A/B

EGF : Epidermal Growth Factor

EGFR : Epidermal Growth Factor Receptor

EphA2 : Ephrin Type-A Receptor 2

ERBB3 : Erb-B2 Receptor Tyrosine Kinase 3

ERK : Extracellular signal-Regulated Kinases

ET3 : EndoThéline 3

ETS-1 : ETS Proto-Oncogene 1, Transcription Factor

EZH2 : Enhancer Of Zeste 2 Polycomb Repressive Complex 2 Subunit

FAK : Focal Adhesion Kinase-Related Nonkinase

FAMMM : Familial Atypical Multiple Mole Melanoma

FBW7 : F-Box And WD Repeat Domain Containing 7

FDA : Food and Drug Administration

FGF2 : Fibroblast Growth Factor 2

FGFR3 : Fibroblast Growth Factor Receptor 3

FOS/FRA : Fos Proto-Oncogene, AP-1 Transcription Factor Subunit / FOS Like 1, AP-1 Transcription Factor Subunit

FOXD3 : Forkhead box D3

GAP : GTPases-Activating Proteins	ID3 : Inhibitor of Differentiation protein 3
GDP : Guanosine Di-Phosphate	IE2 : Immediate-Early 2 protein
GEF : Guanine nucleotide Exchange Factor	IFN α : Interferon α
GFRA2 : GDNF Family Receptor Alpha 2	IGF1 : Insulin Like Growth Factor 1
GLI1/2 : Glioma-associated oncogene Family Zinc Finger $\frac{1}{2}$	IGF-1R : Insulin-like Growth Factor 1 receptor
GM-CSF : Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor	IgG : Immunoglobuline G
GNA11 : G Protein Subunit Alpha 11	IHC : Immuno-Histo-Chimie
GNAQ : G Protein Subunit Alpha Q	IL-1/2/6 : Inter-Leukine 1/2/6
gp100 : GlycoProtein 100	INCa : Institut National du Cancer
GPX4 : Glutathione Peroxidase 4	IRES : Internal ribosome entry site
GRB2 : Growth Factor Receptor Bound Protein 2	IRM : Imagerie par Résonance Magnétique
GSEA : Gene Set enrichment	JAK : Janus Kinase
GSK3 β : Glycogen Synthase Kinase 3 β	JARID1A/B : Jumonji, AT Rich Interactive Domain 1A/B
GTP : Guanosine Tri-Phosphate	JDP : Jun Dimerization Protein
HAS : Haute Autorité de Santé	JNK : c-Jun N-terminal Kinases
HDM2 = MDM2 : Mouse Double Minute 2 Homolog = E3 ubiquitin-protein ligase	JUN : V-Jun Avian Sarcoma Virus 17 Oncogene Homolog
HER2 : Human Epidermal growth factor Receptor-2	KDM4A : Lysine Demethylase 4A
HGF : Hepatocyte Growth Factor	KIT : KIT Proto-Oncogene Receptor Tyrosine Kinase
HSV-1 : Herpes Simplex Virus 1	KO : Knock-out

KSR : Kinase Suppressor of RAS protein kinases

LAR : Leukocyte common Antigen-Related

LDH : Lactate Déshydrogénase

LEF1 : Lymphoid Enhancer-binding Factor 1

lncRNA : Long Non-Coding RNA

LRR : Leucine Rich Repeat

MAF : MAF BZIP Transcription Factor

MAGE-1 : Melanoma-Associated Antigen 1

MAGE-A1 : Melanoma Antigen family A1

MALT1 : MALT1 Paracaspase

MAPK : Mitogen-Activated Protein Kinases

MAPKAPK : MAPK Activated Protein Kinase

MAPKK ou MAP2K : MAPK Kinase

MAPKKK ou MAP3K : MAPK Kinase Kinase

MAPKKKK ou MAP4K : MAPK Kinase Kinase Kinase

MC1R : MelanoCortin 1 Receptor

MEF2C : Myocyte Enhancer Factor 2C

MEK : MAPK/ERK Kinase

MEK1/2/3 : MEK Kinase 1/2/3

MET : Hepatocyte Growth Factor Receptor

miRNA : micro-ARN

MITF : Microphthalmia-associated Transcription Factor

MKP : MAPK Phosphatases

MLANA : Melanoma Antigen Recognized By T-Cells 1

MLK1 à 4 : Mixed Lineage Kinase 1 à 4

MMAE : MonoMéthylAuristatine E

MMP2 : Matrix MetalloProteinase-2

mTOR : Mammalian Target Of Rapamycin

NCSC : Neural Crest Stem Cell

NF1 : Neurofibromin 1

NFκB : Nuclear Factor Kappa B Subunit

NGF : Nerve Growth Factor

NGFR : Nerve Growth Factor Receptor

H/K/N RAS : H/K/N RAS Viral Oncogene Homolog

NSCLC : Non Small Cells Lung Carcinoma

NTF3 : Neurotrophin 3

NTRK : Neurotrophic Receptor Tyrosine Kinase

OCA2 : OCA2 Melanosomal Transmembrane Protein

OIS : Oncogene Induced Senescence

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

PAK1 : P21 (RAC1) Activated Kinase 1

PARP : Poly(ADP-Ribose) Polymerase

PAX3 : Paired box gene 3

PCR : Polymerase Chain Reaction

PD-1 : Programmed Cell Death 1

PDGF : Platelet Derived Growth Factor

PDK1 : Phosphoinositide Dependant Kinase 1

PD-L1 : Programmed Death-Ligand 1

PDX : Patient Derived Xenograft

PFS : Progression-Free Survival

PH : Pleckstrin Homology

pH : Potentiel Hydrogène

PI3K : Phosphatidylinositol-3-Kinase

PIK3CA : Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphate 3-Kinase Catalytic Subunit Alpha

PIP2 : Phospho-Inositide-4,5-biPhosphate

PIP3 : Phospho-Inositide-3,4,5-triPhosphate

PKA : Protéine Kinase A

PLC- γ : Phospholipase C Gamma

PLK3 : Polo-Like Kinase 3

PMEL : Pre MELanosome protein

POMC : Pro-OpioMelanoCortin

POT1 : Protection Of Telomerases protein 1

POU3F2 : POU Class 3 Homeobox 2

PP2A : Protein Phosphatase 2 Phosphatase Activator

PPARGC1A = PGC1 α : Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma Coactivator 1A

pRb : Rétino-Blastoma Protein

PTEN : Phosphatase TENSin Homologue

PTP δ/σ : Protéines Tyrosines Phosphatases δ/σ

PUMA : BCL2 Binding Component 3

RAB17 : Ras-Related Protein Rab-17

RAC1 : Rac Family Small GTPase 1

RACK1 : Receptor For Activated C Kinase 1

RBD : RAS Binding Domain

RCPG : Récepteur Couplé aux Protéines G

RGP : Radial Growth Phase

RHOB/C : Ras Homolog Family Member
B/C

ROS : Espèces Réactives de l'Oxygène

RPTP : Récepteur Protéines Tyrosines
Phosphatases

RSK1 : Ribosomal S6 Kinase 1

RTK : Récepteur Tyrosine Kinase

RXR : Récepteur X aux Rétinoïdes

SAPK : Stress Activated Protein Kinase

SCF : Stem Cell Factor

SEN1 : SUMO Specific Peptidase 1

SH2 : SRC Homology

SHC : SHC Adaptor Protein

SKCM : Skin Cutaneous Melanoma

SLC7A11 : Solute Carrier Family 7 Member
11

SLITRK6 : SLIT And NTRK Like Family
Member 6

SLUG : Snail Family Transcriptional
Repressor

SNAIL : Snail Family Transcriptional
Repressor

SOS : SOS Ras/Rac Guanine Nucleotide
Exchange Factor

SOX10 : Transcription Factor SOX-10

SPARC : Secreted Protein, Acidic, Cysteine-
Rich

SRC : Sarcoma Related

STAT : Signal Transducer And Activator Of
Transcription

SWI/SNF : SWItch/Sucrose Non-
Fermentable complex

TBX3 : T-box 3

TCGA : The Cancer Genome Atlas

TDM : TomoDensitoMétrie

TEM/EMT : Transition Epithélio-
Mésenchymateuse

TEP-FDG : Tomographie par Emission de
Protons au Fluoro-Désoxy-Glucose

TERT : TELomerase Reverse Transcriptase

TGF : Transforming Growth Factor

TGFBR2/3 : Transforming growth factor,
beta receptor 2/3

TKI : Tyrosine Kinase Inhibitors

TNF- α : Tumor Necrosis Factor

TNM : Taille de la tumeur, Nombre de
ganglions envahis et du nombre de
Métastases

TRE : TPA-response Element

TRK : Tyrosine Kinase Receptor

VGP : Vertical Growth Phase

T-VEC : Talimogene Laherparepvec

VRK1 : Vaccinia Related Kinase 1

TWIST1/2 : Twist Family BHLH

WNT3 : Wnt Family Member 3

Transcription Factor 1/2

ZEB1/2 : Zinc finger E-box-binding

TYR : Tyrosinase

homeobox ½

TYRP1 : Tyrosinase Related Protein 1

α-MSH : α-Melanocyte Stimulating

UV : Ultra-Violet

Hormone

Introduction

I. Le mélanome cutané

I.A. Généralités

I.A.1. Définition et épidémiologie

Les cancers de la peau sont classés en 2 familles principales : les cancers non mélanocytaires (ou épithéliaux) et les cancers mélanocytaires aussi appelés mélanomes. Les principaux types de cancers de la peau ainsi que leurs fréquences sont cités dans le Tableau 1 ci-dessous à titre indicatif.

Les cancers de la peau			Fréquences
Non mélanocytaires ou épithéliaux		Carcinomes baso-cellulaires	70%
		Carcinomes spino-cellulaires ou épidermoïdes	20%
Mélanocytaires	Cutanés	Mélanome à extension superficielle	10%
		Mélanome nodulaire	
		Mélanome de Dubreuilh	
		Mélanome acro-lentigineux	
	Non cutanés	Mélanome muqueux	Très rares
		Mélanome uvéal	

Tableau 1 : Les différents types de cancers de la peau et leurs fréquences données INCa 2017

Le mélanome est une tumeur cutanée maligne due à une prolifération anormale d'une population de cellules particulières de l'épiderme appelées « les mélanocytes ». Il s'agit de cellules qui se trouvent au niveau de la membrane basale de l'épiderme et qui sont responsables de la synthèse de mélanine. Cette dernière est le pigment cutané qui protège les kératinocytes contre les dommages à l'ADN dus aux radiations UVs et qui donne la coloration de la peau après bronzage.

La peau est constituée de l'épiderme (surface de la peau), séparé du derme par la membrane basale, et de l'hypoderme (couche la plus profonde). La Figure 1 montre un schéma d'une coupe de l'épiderme. Ce dernier est constitué de 4 couches appelées de la plus profonde à la plus superficielle : couche basale, couche muqueuse, couche granuleuse et couche cornée. Les cellules principales qui composent ces 4 couches sont des cellules épithéliales, les kératinocytes. Ces derniers synthétisent la kératine. Le degré de maturation de ces kératinocytes varie en fonction de la couche : plus ils sont en surface plus ils sont

matures et gorgés de kératine assurant un rôle de barrière protectrice (mécanique et chimique) de l'épiderme.

Outre les kératinocytes et les mélanocytes, l'épiderme comporte quelques cellules de l'immunité, les cellules de Langerhans au niveau de la couche muqueuse. Enfin, au niveau de la membrane basale, on retrouve des cellules du système neuroendocrinien diffus, les cellules de Merkel qui semblent impliquées dans la mécanoréception.

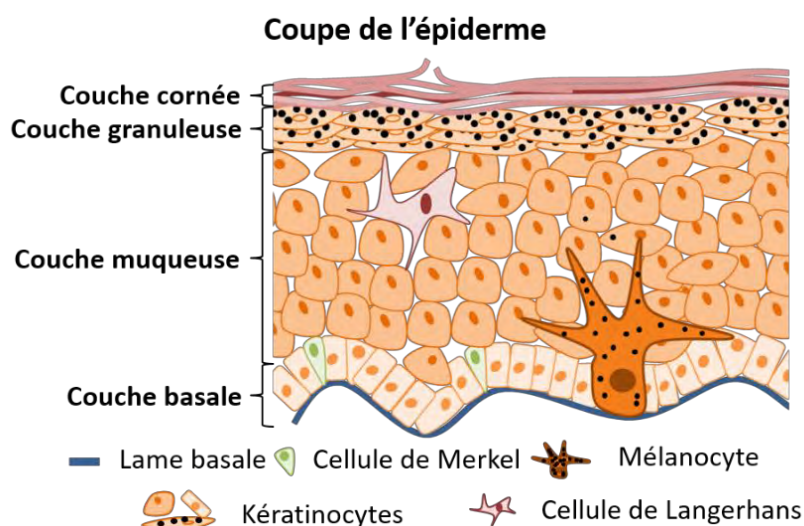


Figure 1 : Structure de l'épiderme de la peau

Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), 2 à 3 millions de cancers cutanés non mélanocytaires et 130 000 mélanomes malins (entre 3 et 5 % des cancers cutanés) sont diagnostiqués chaque année dans le monde. De plus, 66 000 décès annuels sont enregistrés dus à des cancers de la peau. Le mélanome est donc une tumeur cutanée rare mais agressive puisqu'il est responsable de 75 % à 80 % des décès liés à l'ensemble des cancers de la peau (Tripp et al., 2016). Il s'agit d'un cancer qui concerne tous les âges.

En France, entre 2005 et 2012 l'incidence du mélanome a augmenté de 2,9 % chez l'homme et 1,7 % chez la femme (données INCa). Malgré une stabilisation du taux de mortalité, 1773 décès dus au mélanome sont estimés pour l'année 2015 tous sexes confondus.

Ces décès sont en partie dus au fort potentiel métastatique et à la résistance aux différentes thérapies des mélanomes. La compréhension et l'étude des mécanismes d'échappement thérapeutique constituent donc un challenge dans la prise en charge du mélanome.

I.A.2. Facteurs de risques

I.A.2.a. Les facteurs de risques extrinsèques

Il est communément admis que le principal facteur de risque environnemental du mélanome est l'exposition au soleil et plus particulièrement aux radiations UVs. Des études ont montré que des coups de soleil répétés en particulier dans l'enfance sont associés à une augmentation du nombre de mélanomes à l'âge adulte. Les UVB ont longtemps été considérés comme les seuls rayonnements UV pouvant augmenter le risque de mélanome. Cependant, ces dernières décennies l'augmentation de l'utilisation des cabines de bronzage (qui émettent des UVA) a également été corrélée à l'apparition plus fréquente de mélanome (Khan et al., 2018).

Enfin, l'utilisation de certains médicaments tels que les immunosuppresseurs, anti-inflammatoires non stéroïdiens ou encore les anti-TNF α ont également été décrits pour augmenter le risque de mélanome (Chen et al., 2013; Khan et al., 2018).

I.A.2.b. Les facteurs de risques intrinsèques

Nous ne sommes pas tous égaux face aux UVs. En effet, plusieurs facteurs individuels contribuent au risque de développer un mélanome. En fonction du phototype, défini par la couleur de la peau ainsi que la sensibilité au soleil, un individu aura plus ou moins de risque de développer un mélanome (Figure 2).

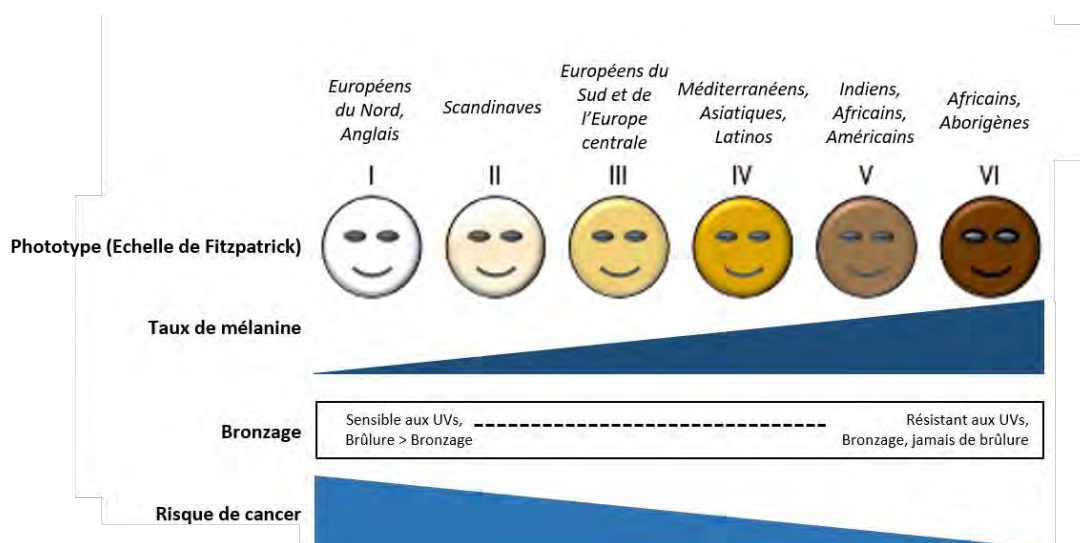


Figure 2 : Risque de mélanome et phototype adaptée de (D'Orazio et al., 2013)

Il existe 2 types de mélanines : les eumélanines (pigments bruns-noirs) et les phéomélanines (pigments jaunes-rouges). L'équilibre entre ces 2 types de mélanines est régulé par la voie α MSH/MC1R. Certains variants du gène *MC1R* augmentent le risque de mélanome (Tagliabue et al., 2018). La mélanine absorbe les UVs et les empêche de pénétrer plus profondément dans le derme. Les eumélanines ont également une activité superoxyde dismutase-like qui permet de neutraliser les espèces réactives de l'oxygène générées dans la cellule par les UVs. Les phéomélanines sont moins efficaces dans la protection des cellules et peuvent être responsables de la production d'espèces réactives de l'oxygène de manière dépendante ou non des radiations UVs. Ceci permet d'expliquer pourquoi certains phototypes sont plus ou moins sensibles aux UVs (Nguyen and Fisher, 2018). D'autres gènes impliqués dans la pigmentation (*ASIP*, *TYR*, *TYRP1*, *OCA2*...) ont également été décrits pour augmenter le risque de développer un mélanome (Ward et al., 2012).

Lorsque des dommages sont causés à l'ADN par les UVs, les mécanismes de réparation sont activés au sein de la cellule. Ces mécanismes de réparation font appel à différentes protéines et par conséquent à différents gènes. De ce fait, un individu qui possède des mutations au niveau de gènes de la réparation de l'ADN sera plus sujet à développer des mélanomes qu'un individu qui n'en a pas. En particulier, les enfants atteints de la maladie *Xeroderma pigmentosum*, appelés également les « enfants de la lune », développent des cancers cutanés spontanés dès l'âge de 2 ans. Cette maladie est caractérisée par des mutations de protéines impliquées dans la réparation par excision de nucléotide des dimères de thymine. On compte également parmi les facteurs de risques intrinsèques les antécédents familiaux et personnels de mélanome ou de cancer cutané. En effet, les différents syndromes du nævus dysplasique (FAMMM : Familial Atypical Multiple Mole Melanoma) peuvent être à l'origine de mélanomes héréditaires dus à des mutations constitutionnelles au niveau du locus *CDKN2A* le plus fréquemment (Chen et al., 2013).

Enfin, un nombre de grains de beauté élevé et la présence de nævi atypiques augmentent également le risque de mélanome (Gandini et al., 2005).

I.B. Physiopathologie

I.B.1. Du mélanocyte au mélanome métastatique

Le modèle de Clark (Clark et al., 1969, 1984), qui date de 1969, décrit les différentes étapes de la progression du mélanome à partir d'un mélanocyte isolé ou d'un nævus pré-existant

(Figure 3). Le nævus commun est aussi appelé nævus bénin ou grain de beauté. Il est intéressant de noter que 80 % des mélanomes se développent *de novo* à partir d'un mélanocyte isolé et seulement 20 % à partir d'un grain de beauté. Durant la première phase, ou phase de croissance radiale (RGP : Radial Growth Phase), les mélanocytes acquièrent un avantage prolifératif et se multiplient de manière anarchique et incontrôlée au niveau de l'épiderme sans franchir la jonction dermo-épidermique. Cette phase comporte les stades allant du mélanocyte au mélanome *in situ* en passant par le nævus dysplasique (ou atypique). Pendant la phase verticale (VGP : Vertical Growth Phase), les mélanocytes acquièrent des capacités invasives, peuvent traverser la lame basale de l'épiderme et se multiplier au niveau du derme. Enfin, durant la dernière phase, les cellules vont disséminer dans l'organisme par voie lymphatique et/ou sanguine afin d'envahir les ganglions lymphatiques et/ou les poumons, le cerveau et le foie pour former les métastases (Miller and Mihm, 2006).

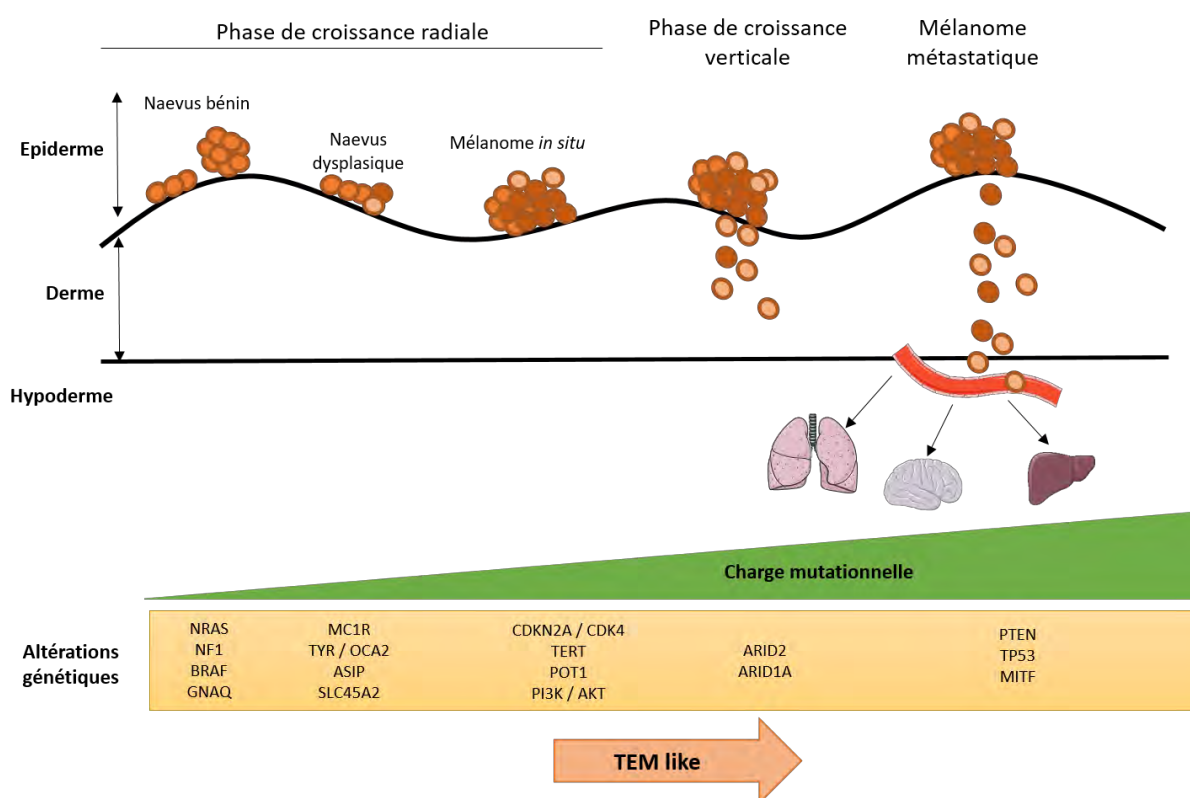


Figure 3 : Schéma de la mélanomagenèse ainsi que des principales altérations retrouvées *adapté de (Miller and Mihm, 2006; Shain and Bastian, 2016)*

Les changements histologiques observés lors de la progression du mélanome s'accompagnent de changements au niveau moléculaire qui impliquent différentes voies de signalisations qui vont être détaillées par la suite.

I.B.1.a. Initiation de la mélanomagenèse

On distingue 2 catégories de mélanomes : les mélanomes dus à une exposition chronique au soleil (« CSD melanomas » : Chronically Sun Damaged melanomas) et les mélanomes dus à une exposition intermittente et forte au soleil ou coups de soleil (« non-CSD melanomas »). Les principales caractéristiques de ces 2 types de mélanomes sont résumées dans le Tableau 2 ci-dessous.

Type de mélanome	Localisation	Exposition solaire	Age	Charge mutationnelle	Mutations
CSD mélanomes	Tête, cou, extrémités	Marques d'exposition solaire importante	> 55 ans	Forte	NF1, NRAS, BRAF non V600E, c-Kit
Non-CSD mélanomes	Tronc, bras, jambes	Intermittante	< 55 ans	Faible	BRAF V600E

Tableau 2 : Principales caractéristiques des deux catégories de mélanomes d'après (Shain and Bastian, 2016)

Les principales mutations initiatrices retrouvées sont des mutations de *BRAF* (nævus commun), *NRAS* ou *NF1*. Toutes ces mutations aboutissent à une hyperactivation de la voie des MAPK responsable de la prolifération des mélanocytes. Chaque individu possède un nombre plus ou moins important de nævi communs qui s'accumulent au cours des 30 premières années de vie et qui ne dépassent pas un diamètre de 2 mm. Une étude en PCR digitale a montré que sur 10 nævi étudiés, 8 nævi possédaient 100 % des cellules avec une mutation hétérozygote *BRAF*^{V600E} (Yeh et al., 2013). Cette étude montre qu'un nævus commun est constitué d'une population de cellules monoclonales. Une autre étude a montré sur 37 mélanomes primaires que, lorsqu'il y avait une lésion bénigne associée, cette dernière était *BRAF*^{V600E} mutée dans 100 % des cas (Shain et al., 2015). Cependant cette mutation n'est pas suffisante pour aboutir à un mélanome. En effet, le nævus commun dégénère rarement et les mélanocytes porteurs de la mutation arrêtent de proliférer et entrent en sénescence (OIS : Oncogene Induced Senescence) (Figure 4). Une étude a montré que sur 1190 mélanomes étudiés seulement 390, donc seulement 30 %, étaient associés à un nævus bénin (Shitara et al., 2014). Cet arrêt de prolifération peut faire intervenir des facteurs intra-cellulaires tels que l'augmentation de l'expression des inhibiteurs de la progression du cycle cellulaire comme par exemple *INK4A* (Michaloglou et al., 2005). Le système immunitaire peut également empêcher la prolifération. L'expression de l'oncogène induit un phénotype inflammatoire dans la cellule qui sera ensuite reconnue par le système immunitaire et éliminée (Kang et al., 2011; Kuilman et al., 2008).

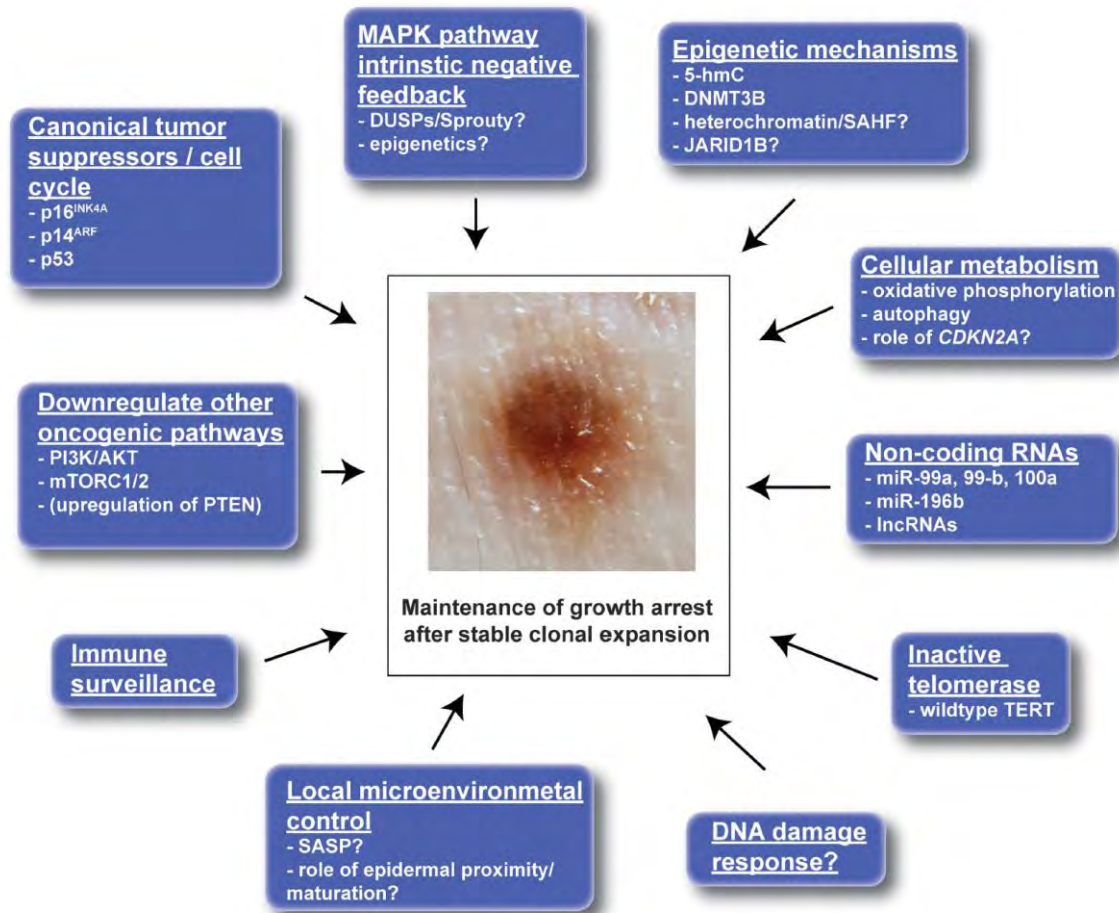


Figure 4 : Mécanismes impliqués dans l'arrêt de la prolifération après expansion clonale suite à l'acquisition de la mutation BRAF^{V600E} tiré de (Damsky and Bosenberg, 2017)

Cependant, ces mécanismes « de défense » peuvent faillir et le nævus commun peut évoluer en nævus dysplasique.

I.B.1.b. Les voies impliquées dans la progression tumorale

Le nævus dysplasique peut se développer à partir d'un mélanocyte isolé ou d'un mélanocyte d'un nævus commun. Ce type de nævus possède une charge mutationnelle intermédiaire entre le nævus bénin et le mélanome « *in situ* ». Il s'agit d'une tâche de couleur non homogène et à bords irréguliers de plus de 5 mm de diamètre. Dans leur étude publiée en 2015 dans le New England Journal of Medicine, Shain et ses collaborateurs comparent les profils mutationnels de 37 mélanomes primaires et lésions précancéreuses. Tout au long de la phase de croissance radiale, les cellules vont accumuler diverses anomalies génétiques impliquées dans différentes voies de la survie cellulaire et de la prolifération (Shain et al., 2015).

- **Les voies p16 / CDK4 / Cycline D1 / pRb et p14 / p53**

L'inactivation du locus *CDKN2A* peut être due à des mutations inactivatrices, des délétions ou des modifications épigénétiques telles que l'hyperméthylation du promoteur par exemple (Conway et al., 2010). Les mutations au niveau du locus *CDKN2A* sont plutôt rares, de 7 à 15 % en fonction du stade du mélanome (Sini et al., 2018). Les délétions de *CDKN2A* sont les altérations les plus fréquentes et sont fortement associées aux mélanomes héréditaires (Bishop et al., 2002; Conway et al., 2010).

Le locus *CDKN2A* comporte 4 exons et code pour 2 suppresseurs de tumeurs : p14^{ARF} et p16^{INK4A} grâce à un épissage alternatif. Ces deux protéines interviennent respectivement dans la régulation de la voie p53 et pRb (Figure 5).

En condition normale, p14^{ARF} séquestre HDM2 (aussi appelée MDM2) qui est l'E3-ubiquitine ligase spécifique de la protéine p53 et responsable de sa dégradation par le protéasome. La perte de p14^{ARF} induit une libération de HDM2 et donc une dégradation accrue de p53 qui n'assure plus son rôle de senseur des dommages à l'ADN et de déclencheur du processus apoptotique.

La deuxième voie régulée par le locus *CDKN2A* est la voie p16 / CDK4 / Cycline D1 / pRb. Dans les conditions physiologiques, p16^{INK4A} séquestre les kinases CDK4 et 6 empêchant ainsi leur liaison avec la cycline D1 et la phosphorylation de pRb. pRb non phosphorylée séquestre le facteur E2F et empêche la transcription et l'expression de gènes impliqués dans la progression du cycle cellulaire de la phase G1 à S.

La délétion de *CDKN2A* induit donc la progression des cellules dans le cycle cellulaire, la prolifération et l'inhibition de l'apoptose et/ou de la sénescence.

Ces voies peuvent également être altérées en raison d'anomalies au niveau des différents gènes en aval. Ainsi, il existe une mutation activatrice de *CDK4* au niveau de l'arginine en position 24 responsable de 2 % des mélanomes familiaux (Ward et al., 2012). Des amplifications de *CDK4* ont également été décrites (Muthusamy et al., 2006). Enfin, des amplifications de *CCND1* (Cycline D1) sont retrouvées dans 10 % des mélanomes (Curtin et al., 2005; Kabbarah and Chin, 2005).

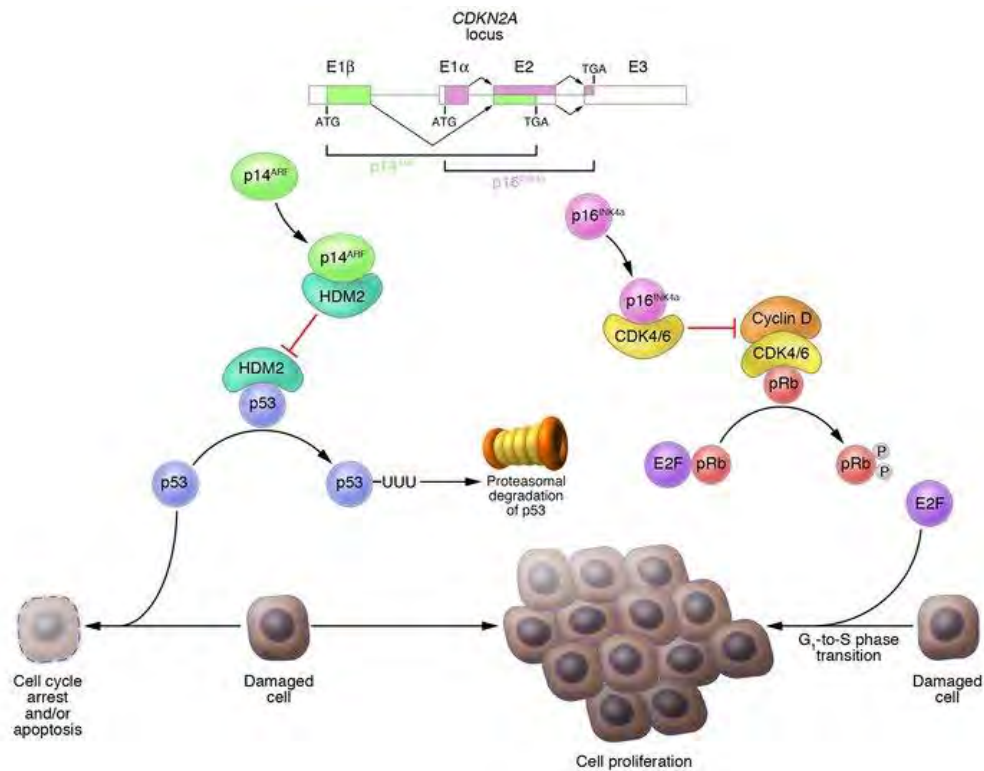


Figure 5 : Le locus CDKN2A tiré de (Chudnovsky et al., 2005)

- La voie PI3K / AKT

Cette voie est souvent dérégulée dans les cancers et notamment les mélanomes (environ 60 %). Elle est impliquée dans de nombreux processus cellulaires tels que : la prolifération, la croissance, la survie, la motilité et le métabolisme. Les Phosphatidylinositol-3-Kinases (PI3K) sont une famille de lipides kinases qui intègrent les signaux issus des récepteurs membranaires couplés aux protéines G (RCPG) ou des récepteurs tyrosines kinases (RTK) (Figure 6). Elles sont constituées d'une sous-unité catalytique p110 et d'une sous-unité régulatrice p85.

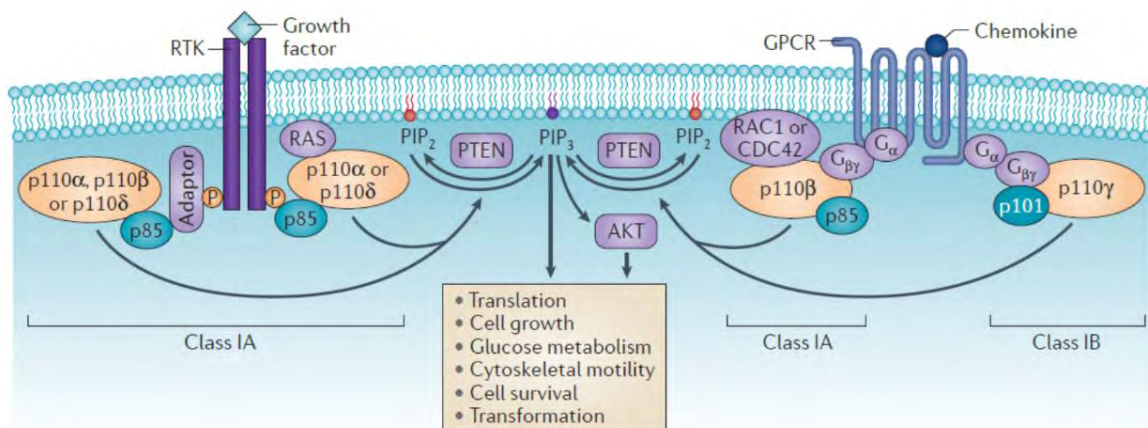


Figure 6 : La voie canonique PI3K / AKT tiré de (Thorpe et al., 2015)

Après fixation de facteurs de croissance ou de chimiokines à leurs récepteurs respectifs, les PI3K sont recrutées à la membrane et activées. Cette activation se fait soit par l'intermédiaire de protéines adaptatrices, soit directement *via* les domaines SH2 des sous-unités catalytiques, soit directement par les petites protéines G de la famille Ras. PI3K phosphoryle ensuite le PIP2 (Phospho-Inositide-4,5-biPhosphate) à la membrane en PIP3 (Phospho-Inositide-3,4,5-triPhosphate). Ce dernier se lie alors à des protéines effectrices (PDK1 et AKT) grâce à son domaine Pleckstrin Homology (PH). La principale protéine effectrice est AKT (ou PKB = protéine Kinase B). Une fois phosphorylée et activée cette dernière peut phosphoryler ses cibles en aval telles que mTOR, MDM2, BAD, GSK3 β (Faes and Dormond, 2015). Cette voie est principalement inhibée par la lipide/protéine phosphatase PTEN (Phosphatase TENSin homologue) qui supprime le résidu 3' phosphate du PIP3.

Les principales altérations de la voie retrouvées dans le mélanome sont :

- des mutations activatrices au niveau des gènes codant les différentes sous-unités des PI3K (Thorpe et al., 2015)
- des mutations activatrices du domaine kinase ou amplifications d'AKT : AKT3 en particulier (Davies et al., 2008; Stahl et al., 2004)
- des mutations activatrices de RTK et RAS
- des délétions ou hyperméthylations du promoteur de PTEN associées à une plus faible survie globale (Roh et al., 2016 ; Tsao et al., 2012)

Enfin, des travaux ont montré un rôle d'AKT indépendant de sa fonction kinase dans la progression du mélanome (Vivanco et al., 2014). La mutation G161V d'AKT2 a été retrouvée dans un échantillon de mélanome. Cette mutation a pour conséquence une inactivation du domaine kinase d'AKT2. Ces travaux ont montré que la surexpression du mutant AKT2^{G161V} dans des mélanocytes primaires humains immortalisés induit une prolifération indépendante des facteurs de croissance de ces mélanocytes suggérant un rôle d'AKT indépendant de son domaine kinase dans la progression du mélanome.

- **Les voies spécifiques de la différenciation mélanocytaire**

Les mélanocytes sont des cellules issues de cellules de la crête neurale. Au cours de l'embryogenèse, pendant la neurulation, les cellules de la crête neurale se détachent du tube neural et acquièrent des propriétés migratoires par un processus de transition

épithélio-mésenchymateuse (Figure 7). Ces cellules migrent alors en périphérie et, suivant leur localisation et les signaux qu'elles reçoivent, se différencient en plusieurs types cellulaires.

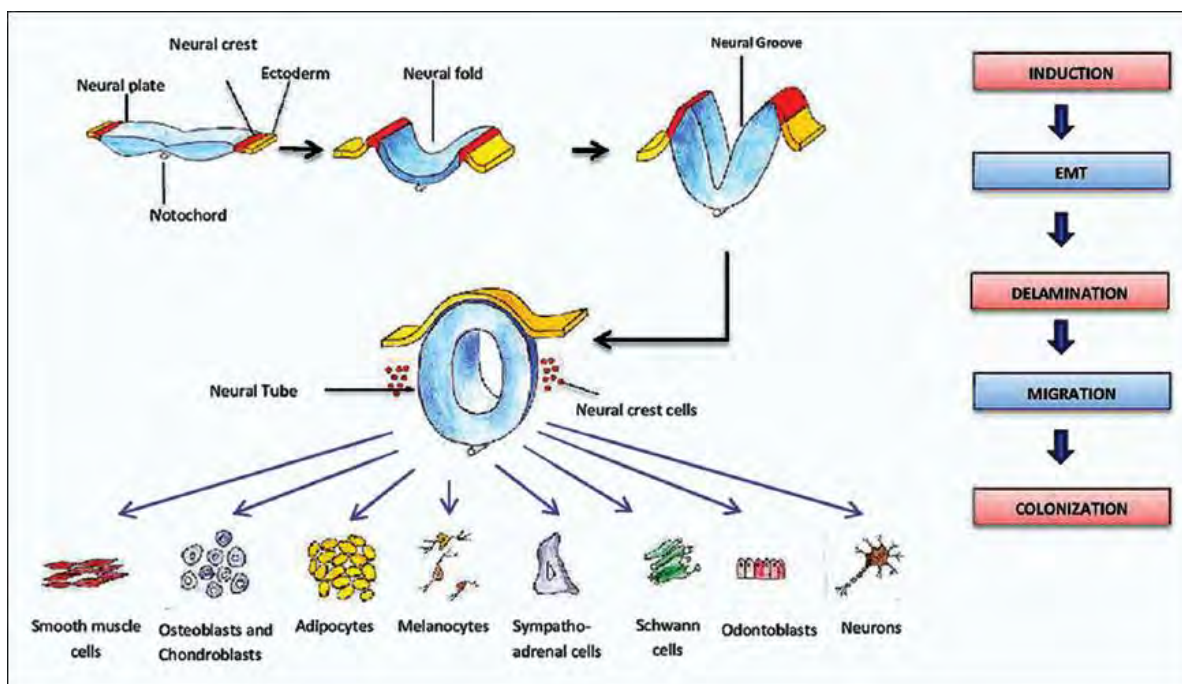


Figure 7 : Origine des mélanocytes tiré de (Shyamala et al., 2015)

Chez les mammifères, certaines cellules de la crête neurale expriment le facteur de transcription SOX10 qui induit, en collaboration avec PAX3, l'expression du facteur de transcription clé de la différenciation mélanocytaire : MITF (Microphthalmia-Associated Transcription Factor) pour former les mélanoblastes (précurseurs des mélanocytes). Chez l'homme la perte de fonction de MITF est associée au syndrome de Waardenburg de type IIA caractérisé par une hypopigmentation, une surdité et des petits yeux (Tassabehji et al., 1994). Il existe plusieurs isoformes de MITF dont l'isoforme M, spécifique des mélanocytes. MITF induit la transcription des gènes impliqués dans :

- la différenciation des mélanocytes : par la transcription de gènes impliqués dans la synthèse de la mélanine (TYR, TYRP1, DCT) et de gènes impliqués dans la formation des mélanosomes (PMEL, MLANA)
- le cycle cellulaire : CDK2
- la survie cellulaire : BCL2, BCL2A1
- et le métabolisme : PPARGC1A (dans le mélanome).

L'expression de MITF est finement régulée que ce soit au niveau transcriptionnel ou post-traductionnel. Sa transcription est principalement activée par SOX10, PAX3, LEF1 et CREB.

Ces différents facteurs de transcription sont activés par la voie WNT3/ β -caténine pour LEF1 et la voie Hippo pour PAX3. Le facteur de transcription CREB peut être activé par phosphorylation d'une part, par la protéine kinase A (PKA) dépendante de l'AMPc formé à la suite de la fixation de l' α MSH sur son récepteur MC1R. D'autre part, CREB peut être phosphorylé par la p90RSK phosphorylée par ERK2. Dans ce cas, la voie des MAPK est activée suite à la fixation de SCF (Stem Cell Factor) sur le RTK c-Kit ou de ET3 (endothéline 3) sur son récepteur EDNRB (Récepteur à l'Endothéline de type B) (Kawakami and Fisher, 2017). Enfin, MITF a été décrit pour être réprimé entre autres par NF κ B, GLI2, FOXD3, POU3F2 et ATF4. Les principaux mécanismes de régulations transcriptionnelles de MITF sont résumés dans la Figure 8 ci-dessous.

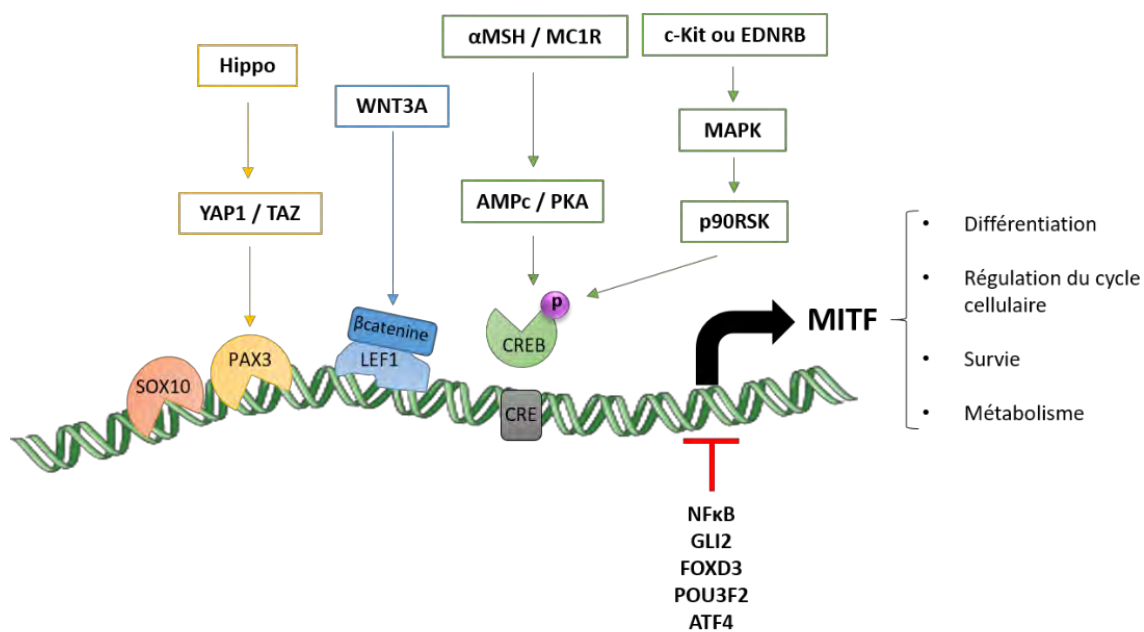


Figure 8 : Régulation transcriptionnelle de MITF adapté de (Kawakami and Fisher, 2017; Seberg et al., 2017)

Au niveau post-traductionnel, MITF est phosphorylé au niveau des sérines 73, 298, 307 et 409. La sérine 298 est phosphorylée par la GSK3 β et est associée à une augmentation de l'activité de MITF (Takeda et al., 2000). La sérine 73 est phosphorylée par ERK2 et la sérine 409 par RSK1. Ces 2 phosphorylations sont stabilisatrices et augmentent l'activité de MITF tout en favorisant sa dégradation (Wu et al., 2000). Enfin, MITF peut être SUMOylé sur les lysines 182 et 316 ce qui module également son activité sur ses gènes cibles (Miller et al., 2005).

MITF est considéré comme « LE » gène impliqué dans le maintien de l'homéostasie des mélanocytes. Dans le mélanome, en fonction de son niveau d'expression dans la cellule, le phénotype sera différent et il agit comme un « rhéostat » (Seberg et al., 2017) (Figure 9).



Figure 9 : Le modèle de rhéostat de MITF tiré de (Seberg et al., 2017)

Ainsi, une dérégulation d'une ou plusieurs voies impliquées dans la régulation de l'expression de MITF peut avoir un impact sur la mélanomagenèse. A ce jour, les rôles exhaustifs ainsi que tous les partenaires de MITF ne sont pas encore connus et/ou peu décrits. Les nouvelles techniques haut-débit (ChIP-seq, spectrométrie de masse...) permettent de découvrir encore de nouveaux partenaires potentiels ainsi que de nouvelles fonctions qui en découlent.

Les principales anomalies de MITF décrites et retrouvées dans le mélanome sont :

- une amplification du gène dans 5 à 20 % des mélanomes au total (Akbani et al., 2015; Garraway et al., 2005) associée à une diminution de la survie à 5 ans
- la mutation E318K qui réduit sa SUMOylation et prédispose au mélanome (Bertolotto et al., 2011; Yokoyama et al., 2011). De plus, cette mutation accélère la tumorigénèse dans des souris *BRAF*^{V600E} et déficientes en PTEN en empêchant l'OIS (Bonet et al., 2017)

La voie α MSH / MC1R est la plus connue et décrite pour activer la transcription de MITF. Les mélanocytes se trouvent au niveau de la membrane basale de l'épiderme. On compte environ un mélanocyte pour 36 à 40 kératinocytes. Lorsque les UV créent des dommages au niveau de l'ADN des kératinocytes, p53 est activé au niveau du noyau. Ce dernier active la transcription du gène *POMC* (Pro-OpioMelanoCortine). POMC est un pro-peptide qui est clivé par la proconvertase 1 en ACTH, elle-même clivée par la proconvertase 2 pour donner la CLIP (Corticotropin-Like Intermediate Peptide) et l' α MSH (α -Melanocyte Stimulating Hormone). POMC est également le précurseur de la β -endorphine. L' α MSH sécrétée par le kératinocyte agit au niveau de son récepteur MC1R au niveau des mélanocytes et induit la

cascade de signalisation AMPc/CREB/MITF. MITF induit à son tour la transcription des gènes impliqués dans la synthèse de mélanine et des mélanosomes qui seront transférés aux kératinocytes. A ce jour, 80 variants du gène *MC1R* sont répertoriés dont 3 sont associés à un phénotype roux (Joshi et al., 2018). Une étude récente a montré que la présence d'un variant de *MC1R* était associée à une augmentation du risque de mélanome indépendamment des caractéristiques phénotypiques dans les cancers sporadiques (Tagliabue et al., 2018). De plus, des variants de certains gènes de la synthèse de mélanine tels que *TYR*, *TYRP1* ou *OCA2* sont associés à des prédispositions aux mélanomes familiaux (Goldstein et al., 2017).

- **Le switch phénotypique**

Lors du passage de la phase de croissance radiale à la phase de croissance verticale, les cellules acquièrent des capacités de migration et d'invasion. Ce phénomène s'appelle la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM ou EMT). Les cellules peuvent franchir la membrane basale, envahir le derme puis coloniser d'autres organes par voie lymphatique ou sanguine. Les mélanocytes n'étant pas des cellules épithéliales, dans le cas de la progression du mélanome ce processus est couramment appelé la TEM-like. Le switch de cadhérine constitue le marqueur clé de la transition entre le phénotype « épithélial » et le phénotype « mésenchymateux ». La E-cadhérine permet les jonctions cellule-cellule au sein des épithéliums et participe au maintien de l'intégrité d'un tissu. Au sein de l'épiderme, elle participe aux jonctions entre les mélanocytes et les kératinocytes. Lors de la TEM, la perte d'expression de la E-cadhérine est observée au profit de l'expression de la N-cadhérine qui permet des interactions avec les fibroblastes du derme et les cellules endothéliales. Une augmentation de l'expression des intégrines telles que l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ est également observée et associée à un réarrangement du cytosquelette d'actine, une augmentation de l'expression de MMP2 et de BCL-2 (pour revue (Li et al., 2015; Miller and Mihm, 2006; Puisieux et al., 2014)). La comparaison de l'expression de gènes dans des mélanomes non métastatiques par rapport à des mélanomes métastatiques chez 161 patients a notamment montré une expression différentielle de gènes impliqués dans la TEM. Ces gènes sont surexprimés chez les patients ayant développé des métastases par rapport à ceux qui n'en ont pas développés et ont un rôle dans l'adhésion cellulaire, la migration et la motilité, les interactions et l'organisation de la matrice extracellulaire (Alonso et al., 2007).

Différentes voies de signalisations ont été décrites comme induisant la TEM lors de la progression du mélanome. On peut ainsi citer la voie RAS/RAF/MEK/ERK, la voie PI3K/AKT/mTOR, la voie WNT, la voie TGF β et la voie SRC. Elles aboutissent toutes :

- D'une part, à une augmentation de l'expression de métalloprotéinases (MMP-2 et 9 en particulier) qui vont dégrader la matrice extracellulaire et par conséquent faciliter la motilité des cellules au sein du stroma.
- D'autre part, à une reprogrammation de l'expression de facteurs de transcription spécifiques de la TEM (TEM-TF) tels que : MITF, SNAIL, SLUG, ZEB1, ZEB2, TWIST1, TWIST2 et NF κ B. Ces facteurs majoritairement des répresseurs de la E-cadhérine. Alors que SLUG et ZEB2 sont exprimés dans des mélanocytes normaux, les mutations de BRAF et/ou NRAS induisent une répression de l'expression de ces derniers en faveur de TWIST1 et ZEB1. Ceci entraîne la perte d'expression de la E-cadhérine et induit une perte des jonctions entre cellules et par conséquent un changement de conformation du cytosquelette d'actine et une perte de polarité de la cellule afin de faciliter la motilité et l'invasion cellulaire (Caramel et al., 2013). Une autre étude a montré que l'expression de SLUG est activée en réponse à des signaux provenant de la matrice-extracellulaire (SPARC/AKT) induisant ainsi, la perte de la E-cadhérine associée à l'acquisition d'un phénotype de type mésenchymateux dans des cellules de mélanomes (Fenouille et al., 2012).

- **Et bien d'autres mécanismes**

La TELomérase Reverse Transcriptase (TERT) constitue la sous-unité catalytique de l'enzyme télomérase. Cette dernière est impliquée dans le maintien de la longueur des télomères au niveau des extrémités des chromosomes et est surtout active dans les cellules souches. A chaque division d'une cellule somatique les télomères se raccourcissent. Lorsque les télomères sont trop courts les cellules entrent progressivement en sénescence et arrêtent de proliférer puis meurent par apoptose. La réactivation de la télomérase dans ces cellules induit leur « immortalisation ». Dans certains mélanomes sporadiques et/ou familiaux, des réactivations de la sous-unité catalytique TERT ont été retrouvées (Horn et al., 2013). Une étude récente a montré que certaines mutations au niveau du promoteur de TERT sont associées à un plus mauvais pronostic (Andrés-Lencina et al., 2018). De la même manière le gène *POT1* (Protection of Telomeres protein 1) est délété dans certains mélanomes (Robles-

Espinoza et al., 2014). POT1 fait partie du complexe « shelterin » qui participe à la protection des télomères et des études ont montré que la déplétion de POT1 chez l'homme était plutôt associée à une élongation des télomères (Baumann and Price, 2010).

La régulation de l'expression génique peut faire intervenir des modifications épigénétiques. Dans différents cancers, comme dans le mélanome, une hyperméthylation des promoteurs de gènes suppresseurs de tumeurs est associée à une diminution de l'expression de ces gènes (Moran et al., 2017). Des mutations au niveau des gènes *ARID2* et *ARID1A*, qui codent pour des sous-unités du complexe de remodelage de la chromatine SWI/SNF, sont retrouvées à des stades avancés de mélanomes (Shain et al., 2015). Enfin, des travaux ont montré que la mutation activatrice *EZH2*^{Y646} (histone méthyltransférase du complexe répresseur polycomb) coopère avec *BRAF*^{V600E} dans l'induction et la progression du mélanome en participant à un remodelage de la chromatine. Cette mutation est retrouvée dans 3 % des mélanomes (Souroullas et al., 2016).

De nombreux travaux ont également montré le rôle des micro-ARN dans la mélanomagenèse. En effet, des travaux ont montré, d'une part la surexpression du micro-ARN 125b dans des lignées cellulaires de mélanomes de phénotype invasif et migratoire et, d'autre part, que cette surexpression chez des patients atteints de mélanome était associée à une faible survie (Rambow et al., 2016). Des travaux ont également montré que le micro-ARN 137 agit sur sa cible, le facteur de transcription *TBX3*, empêchant ainsi la répression de la transcription de la E-cadhérine. Le maintien de l'expression de cette dernière permet d'inhiber la migration et la croissance cellulaire indépendante de l'ancrage. L'expression du miR-137 est diminuée dans certains mélanomes et cette diminution d'expression est associée à un mauvais pronostic (Peres et al., 2017). De nombreux travaux suggèrent que les micro-ARN pourraient servir de marqueurs pronostics de la maladie dans le suivi des patients (Armand-Labit et al., 2015). D'autre part, certains micro-ARN sont impliqués dans des mécanismes de résistances aux chimiothérapies dans le mélanome (Zheng et al., 2018). Enfin, de récents travaux ont montré que l'ARNm codant pour *TYRP1* pouvait séquestrer le micro-ARN 16 empêchant ainsi l'inhibition d'une de ses cibles *RAB17* et augmentant la prolifération et la croissance tumorale (Gilot et al., 2017).

De plus, quelques études récentes montrent le rôle et l'implication des longs ARN non codants (lncRNA) dans la mélanomagenèse. Par exemple, le lncRNA *SAMMSON* est exprimé dans 90 % des mélanomes humains et sa déplétion dans des cellules de mélanomes induit

une diminution de la viabilité quel que soit le statut mutationnel de *BRAF*, *NRAS* ou *TP53*. Cette déplétion induit également une sensibilisation aux inhibiteurs de la voie des MAPK dans des modèles de PDX caractérisée par une augmentation de l'apoptose et une régression tumorale plus importante (Leucci et al., 2016).

I.B.2. Formes anatomo-cliniques



Figure 10 : Photos des différentes formes cliniques de mélanomes

I.B.2.a. Le mélanome à extension superficielle

Il s'agit de la forme clinique la plus fréquente puisqu'il représente environ 70 % des mélanomes cutanés. La progression de ce mélanome est décrite par le modèle de Clark. La phase de croissance radiale est plus ou moins longue et aboutit à une tache de couleur brune à noire, à bords irréguliers et plus ou moins bombée. Une résection à ce stade permet une guérison. Après franchissement de la jonction dermo-épidermique, il a une capacité importante à métastaser. Tout au long de cette thèse, nous nous intéresserons au mélanome à extension superficielle du fait de sa fréquence plus importante.

I.B.2.b. Le mélanome nodulaire

Il représente 5 % des mélanomes. Il s'agit d'une forme particulièrement agressive avec une phase de croissance d'emblée verticale. Il se présente sous la forme d'un nodule noir

(parfois achromique) qui peut être ulcéré ou saigner. Ce type de mélanome concerne le sujet âgé (70 ans) (Scolyer et al., 2011; Ward et al., 2017).

I.B.2.c. Le mélanome de Dubreuilh ou mélanome lentigineux

Ce type de mélanome est appelé également mélanome « *in situ* ». En effet son évolution est très lente et reste souvent cantonnée à l'épiderme. Il concerne le sujet âgé (70 ans). Il est situé au niveau des zones exposées au soleil (tête et cou). S'il est détecté assez tôt, la résection chirurgicale suffit à une guérison complète et est donc de bon pronostic (Charifa and Chen, 2018).

I.B.2.d. Le mélanome acrolentigineux

Cette forme est particulièrement fréquente chez les asiatiques et les sujets à peau foncée et représente de 1 à 7 % des mélanomes. Malgré une croissance radiale lente, il s'agit d'une forme qui, après croissance verticale, peut être agressive et former des métastases. Cette forme se développe sur la plante des pieds ainsi que la paume des mains ou sous les ongles. Il se présente sous la forme d'une tache brune ou noire à bords irréguliers. Les mutations les plus fréquemment retrouvées sont les mutations de *NRAS*, *KIT* et *BRAF* (Nakamura and Fujisawa, 2018).

I.B.2.e. Les mélanomes muqueux

Les mélanomes muqueux représentent moins de 3 % des mélanomes. Ils peuvent se développer au niveau des muqueuses respiratoires, gastro-intestinales et au niveau de l'appareil uro-génital. Ce sont des mélanomes à pronostic plus sombre que les mélanomes cutanés car leur diagnostic est plus tardif du fait de leur localisation. Les facteurs de risques impliqués sont peu connus et sont différents de ceux des mélanomes cutanés. Selon une étude, c-KIT serait surexprimé dans 80 % des cas (Yde et al., 2018). Le plus souvent, il se présente sous la forme de tache ou de nodule brun.

I.B.2.f. Les mélanomes uvéaux

Les mélanomes uvéaux sont des tumeurs extrêmement rares puisqu'ils représentent moins de 3 % des mélanomes. En revanche, ce sont les cancers oculaires les plus fréquents. En France, leur incidence est de 500 à 600 nouveaux cas par an. Ils se développent à partir des

mélanocytes au niveau du tractus uvéal, de l'iris, de la rétine, de la choroïde et des corps ciliaires. Les mutations les plus fréquemment retrouvées sont les mutations au niveau des gènes *GNAQ*, *GNA11* et *BAP1*. Leur pronostic est sombre dû à une forte capacité à former des métastases (en particulier hépatiques) (Alsafadi et al., 2018).

I.C. Prise en charge du mélanome

I.C.1. Diagnostic

Le diagnostic repose d'abord sur l'évaluation clinique d'une lésion pigmentée atypique selon les critères ABCDE décrits ci-dessous.

Asymétrie	une tache pigmentée asymétrique peut être un mélanome
Bordure	lésion à bords irréguliers, encochés, polycycliques
Couleur	lésion de couleur hétérogène
Diamètre	lésion dont le diamètre > 6 mm
Evolutivité	lésion qui change d'aspect, de taille, de couleur, d'épaisseur

Tableau 3 : Critères ABCDE d'évaluation d'une lésion pigmentée

La notion d'évolutivité est la plus importante à prendre en compte, toute tache pigmentée qui change d'aspect doit faire suspecter un mélanome. La microscopie en épiluminescence ou dermoscopie, qui permet de visualiser la peau en profondeur, peut orienter le diagnostic mais en aucun cas le confirmer. En cas de lésion douteuse, le diagnostic est confirmé par un examen anatomopathologique après exérèse complète de la lésion. Cet examen confirme la malignité de la lésion et donne des informations sur le type histologique, la présence d'ulcérations ou non, l'indice mitotique et surtout la mesure de l'indice de Breslow (Tableau 4). Ce dernier correspond à l'épaisseur maximale en millimètres entre la partie supérieure de la couche granuleuse et la cellule tumorale la plus profonde au niveau du derme. L'indice de Breslow constitue le principal facteur pronostic de la maladie (AJCC® 2004 et INCa 2017).

Indice de Breslow (mm)	Classification TNM	Marge d'excision recommandée (cm)	Survie globale à 5 ans
Intra-épidermique (<i>in situ</i>)		0,5	95 - 100 %
< 1	T1	1	95 - 100 %
Entre 1 et 2	T2	2	77 - 89 %
Entre 2 et 4	T3	2	60 - 75 %
> 4	T4	2	45%
Mélanome de Dubreuilh		1 (0,5 si impossible)	

Tableau 4 : Indice de Breslow et survie globale à 5 ans (Données AJCC® 2004 et INCa 2017)

En cas de confirmation du diagnostic de mélanome, un bilan d'extension est effectué à la recherche d'une éventuelle dissémination loco-régionale (palpation des aires ganglionnaires, ganglions sentinelles et échographie) ou de métastases à distance (TDM, TEP-FDG ou IRM et dosage LDH).

Le stade de la maladie est ensuite déterminé en fonction de la Taille de la tumeur, du Nombre de ganglions envahis et du nombre de Métastases (classification TNM de l'AJCC®). Pour les stades III inopérables et stades IV, un génotypage est réalisé afin de déterminer le statut mutationnel de la tumeur (*BRAF*, *NRAS*, *c-KIT*, *ALK*, *ROS*, *MET*...) et d'orienter la chimiothérapie ou l'inclusion dans des protocoles d'essais cliniques des patients.

I.C.2. Prise en charge thérapeutique

L'arsenal thérapeutique de la prise en charge du mélanome a connu un essor considérable durant ces cinq dernières années avec la mise sur le marché de nouvelles thérapies ciblées et des immunothérapies. Ces nouvelles thérapies ont considérablement amélioré la qualité de vie et la survie des patients atteints de mélanome par rapport au traitement de référence qu'était jusqu'alors la dacarbazine.

I.C.2.a. La prise en charge non médicamenteuse

Le traitement de référence est le traitement chirurgical. Il s'agit du seul traitement curatif si le mélanome est détecté à un stade précoce (jusqu'au stade *in situ*). L'exérèse de la lésion est nécessaire pour le diagnostic. En fonction de l'indice de Breslow, une reprise chirurgicale peut être nécessaire afin de réduire les risques de récurrence. Les marges d'excision recommandées sont indiquées dans le Tableau 4 et sont tirées des recommandations du référentiel régional d'Oncodermatologie de Midi-Pyrénées de 2017.

La radiothérapie stéréotaxique est surtout utilisée en palliatif pour soulager des métastases osseuses ou cérébrales et améliorer la qualité de vie des patients. L'utilisation de la radiothérapie est tout de même testée dans des essais cliniques en association avec certaines immunothérapies.

I.C.2.b. La chimiothérapie

Les seules chimiothérapies classiques encore utilisées dans le traitement du mélanome métastatique et qui ont l'AMM en France dans cette indication sont la dacarbazine et la fotémustine. Néanmoins leur faible efficacité et leur forte toxicité tendent à faire disparaître ces molécules de l'arsenal thérapeutique au profit des thérapies ciblées ou de l'inclusion dans des essais cliniques. D'autres molécules peuvent également être utilisées au cas par cas et hors AMM comme le temozolomide, les dérivés du platine ou encore le paclitaxel. De manière générale, ces chimiothérapies « conventionnelles » sont utilisées en 2^{ème} et 3^{ème} ligne de traitement ou en traitement adjuvant loco-régional (technique du membre perfusé isolé).

Cependant, les molécules utilisées en chimiothérapie conventionnelle pourraient connaître un regain d'intérêt dans le traitement du mélanome grâce au développement d'anticorps conjugués aux cytotoxiques (ADC). Certains ADC ont déjà eu une AMM dans d'autres cancers et sont utilisés en clinique comme par exemple :

- l'Adcetris® : anticorps monoclonal anti-CD30 conjugué à la MonoMéthylAuristatine E (MMAE) dans le traitement de certains lymphomes hodgkiniens, lymphomes T cutanés, lymphomes anaplasiques à grandes cellules systémiques tous CD30 positifs (2012)
- et le Kadcyla® : anticorps monoclonal anti-HER2 conjugué au DM1 dans le traitement des cancers du sein HER2 positif métastatique ou localement avancé non résecable (2013)

Beaucoup d'ADC sont en essais cliniques dans les cancers solides et/ou liquides. Globalement, un ADC est constitué de la partie immunoglobuline (IgG) mono- ou bi-spécifique, d'un agent cytotoxique et d'un linker qui sert de lien entre la partie IgG et la drogue. Le principe de cette technique est illustré dans la Figure 11.

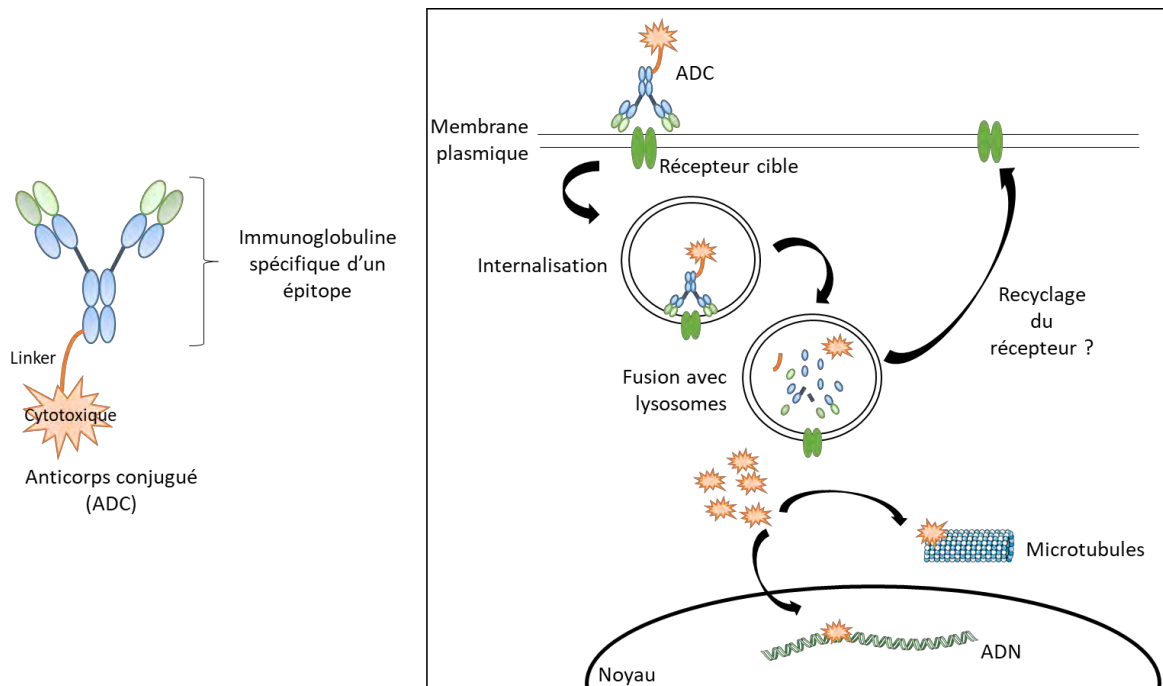


Figure 11: Structure d'un ADC et mécanisme d'action

Brièvement, après reconnaissance et fixation de l'anticorps à son récepteur cible, le couple ADC-récepteur est internalisé dans des endosomes qui fusionnent ensuite avec les lysosomes. Le pH acide de ces derniers induit la dégradation de la partie IgG et la libération de l'agent cytotoxique dans le cytoplasme de la cellule tumorale. En fonction de la nature du cytotoxique, celui-ci exerce son activité soit au niveau des microtubules (inhibition de la polymérisation) soit au niveau de l'ADN (induction de cassures double-brins). Tout ceci conduit à l'arrêt du cycle cellulaire et induit la mort cellulaire par apoptose. La lyse des cellules peut également étendre l'effet aux cellules voisines (effet « bystander »). Enfin, selon les récepteurs ciblés par l'ADC ces derniers pourront être recyclés à la membrane ou dégradés au niveau du lysosome.

Cette technique permet d'une part de réduire les effets indésirables systémiques des agents cytotoxiques en ciblant directement les cellules tumorales. En effet, les antigènes des anticorps sont choisis de manière à ce que leur expression soit spécifique des cellules tumorales (HER2, EGFR...). Il serait envisageable d'utiliser ce type d'anticorps dans le traitement du mélanome. En effet, il s'agit d'une tumeur à fort potentiel immunogène et dont les cellules expriment beaucoup d'antigènes associés aux tumeurs. De plus, il est clairement admis que l'utilisation des thérapies ciblées induit une reprogrammation de

l'expression génique au sein des cellules tumorales notamment la réexpression de certains récepteurs tyrosine kinases. Par exemple, le phénotype « AXL-high » est associé à un phénotype résistant aux thérapies ciblées anti-HER2, anti-EGFR, anti-BRAF/MEK dans de nombreux cancers. Une étude récente a montré que l'utilisation d'un anticorps conjugué à la MMAE anti-AXL en combinaison avec des inhibiteurs de BRAF/MEK dans le mélanome réduit l'émergence de certains clones résistants aux inhibiteurs de la voie des MAPK (Boshuizen et al., 2018).

D'autre part, cette technique permet de « contrer » certains mécanismes de résistances aux chimiothérapies conventionnelles qui peuvent empêcher la drogue de rentrer dans la cellule lorsqu'elle n'est pas conjuguée et par conséquent, d'augmenter les concentrations intracellulaires. Enfin, le ciblage ouvre le champ pour l'utilisation de nouveaux cytotoxiques plus puissants que ceux utilisés jusqu'alors sans conjugaison du fait des toxicités (notamment hématologiques) trop dangereuses en systémique.

I.C.2.c. Les thérapies ciblées : anti-BRAF et anti-MEK

Le développement des thérapies ciblées a constitué un progrès majeur dans la prise en charge des cancers en général. Les réponses tumorales sont spectaculaires et ont considérablement amélioré la qualité de vie des patients avec très peu d'effets indésirables en comparaison avec les chimiothérapies conventionnelles. Dans le mélanome, parmi les inhibiteurs de la voie des MAPK, seules les molécules ciblant la mutation de BRAF V600 (vemurafenib, dabrafenib) et la protéine MEK (cobimetinib, trametinib) ont une AMM en France. Après détermination du statut mutationnel de *BRAF*, la bithérapie associant un inhibiteur de BRAF et un inhibiteur de MEK est indiquée en première ligne de traitement dans les mélanomes *BRAF*-mutés de stade III inopérable et stade IV (recommandations INCa 2017). D'autres molécules ciblant les autres membres de la voie des MAPK sont en cours d'essais cliniques. Toutes ces thérapies ciblées seront détaillées dans le chapitre suivant de cette thèse dans la partie II.B.3.

I.C.2.d. L'immunothérapie

Les cytokines telles que l'IL-2 ou l'IFN α peuvent être utilisées en situation adjuvante au stade 2 du mélanome si l'indice de Breslow est supérieur à 1,5 mm et/ou en cas d'ulcération selon les recommandations de la Haute Autorité de Santé (HAS) de 2012. Les cytokines sont des

molécules qui, au niveau physiologique, stimulent le système immunitaire. L'IFN α possède notamment des effets anti-prolifératifs, anti-angiogéniques et augmente l'infiltrat tumoral en lymphocytes T CD4+ (Di Trollo et al., 2015). Cependant, le rapport bénéfice-risque faible ainsi que les effets indésirables importants de ces molécules font qu'elles sont de moins en moins utilisées en thérapie.

Le T-VEC ou Talimogene Laherparepvec a une AMM européenne mais n'est pas utilisé en France. Des essais cliniques sont en cours pour déterminer sa place dans la stratégie thérapeutique en association ou non avec d'autres thérapies. Aux Etats-Unis, la FDA a autorisé sa mise sur le marché en 2015 pour le traitement du stade III non résecable en injection intra-tumorale. T-VEC est un virus oncolytique génétiquement modifié à partir du virus HSV-1. Après injection intra-tumorale, le virus infecte les cellules tumorales et induit leur lyse. La lyse des cellules libère d'une part, des antigènes tumoraux et d'autre part, du GM-CSF. Tous ces éléments vont permettre le recrutement de cellules dendritiques et de lymphocytes au niveau de la tumeur afin de l'éliminer (Ott and Hodi, 2016).

Les mélanomes sont des tumeurs à fort potentiel immunogène. Les cellules de mélanomes expriment à leur surface des antigènes associés aux tumeurs capables d'induire une réponse immunitaire anti-mélanome. Différentes stratégies vaccinales ont donc été développées et testées afin de potentialiser la réponse immunitaire contre le mélanome. Ces stratégies ont d'abord été testées en utilisant des peptides antigéniques (gp100 et MAGE-1) mais n'ont pas eu de réelle efficacité sur la réponse anti-tumorale. Actuellement, les essais cliniques portent plutôt sur des stratégies de vaccination avec les cellules dendritiques en association avec d'autres thérapies. Les cellules dendritiques sont des cellules présentatrices des antigènes aux lymphocytes. Après présentation de l'antigène, les lymphocytes sont activés et aboutissent à la formation de lymphocytes spécifiques de l'antigène présenté. Les cellules dendritiques ou leurs précurseurs sont prélevés sur le patient et mis en culture. Ces cellules sont ensuite « chargées » avec des antigènes de surface de mélanome « *ex-vivo* » et réinjectées au patient. Des essais sont en cours afin de cibler les cellules dendritiques « *in vivo* » avec des anticorps conjugués à des antigènes tumoraux dirigés contre les marqueurs spécifiques des cellules dendritiques (Bol et al., 2016).

Le transfert adoptif de lymphocytes infiltrant les tumeurs amplifiés, et traités « *in vitro* » par l'IL-2, a également constitué un échec dans la prise en charge thérapeutique du mélanome (Besser et al., 2010).

Actuellement, les seules molécules immunomodulatrices ayant une AMM en France dans le traitement du mélanome sont les inhibiteurs des checkpoints immunologiques : les anticorps anti-CTLA-4 (ipilimumab) et anti-PD1 (pembrolizumab et nivolumab).

Le premier inhibiteur de checkpoint autorisé en 2011 a été l'anti-CTLA-4, l'ipilimumab. CTLA-4 est un récepteur exprimé à la surface des lymphocytes T sur lequel se lient les ligands de co-stimulation CD80/CD86 exprimés à la surface des cellules présentatrices des antigènes et certaines cellules tumorales. La liaison CTLA-4 / CD80 ou CD86 induit des signaux inhibiteurs d'activation des lymphocytes T. L'utilisation d'anticorps anti-CTLA-4 empêche donc ce signal inhibiteur et induit la stimulation du système immunitaire. L'ipilimumab a montré une efficacité supérieure en comparaison à la chimiothérapie seule ou en association (Dequen et al., 2012). Cependant, au vu de sa toxicité par rapport aux anti-PD1, il n'est pas autorisé en 1^{ère} ligne de traitement en monothérapie. L'ipilimumab en monothérapie est donc indiqué après échec d'une 1^{ère} ligne de traitement par thérapie ciblée ou thérapie anti-PD1.

La liaison du récepteur PD-1 des lymphocytes à son ligand PD-L1 exprimé à la surface des cellules présentatrices d'antigènes induit une inhibition de l'activation des lymphocytes. PD-L1 est également exprimé à la surface de cellules tumorales. Ainsi, la tumeur peut empêcher la réponse immunitaire dirigée contre elle. L'utilisation d'anticorps monoclonaux anti-PD1 restaure donc la réponse immunitaire en levant l'inhibition de l'activation des lymphocytes par inhibition compétitive avec PD-L1. Le nivolumab a eu son AMM en 2015 suite à un essai clinique de phase III chez 418 patients avec un mélanome métastatique non BRAF-muté. Le résultat de l'essai a montré une amélioration du taux de survie globale à un an dans le groupe nivolumab de 42,1 % à 72,9 % par rapport au groupe dacarbazine (Robert et al., 2015a) (Figure 12).

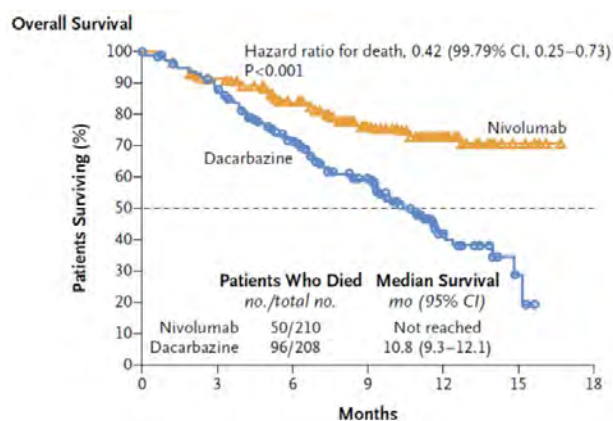


Figure 12: Courbes de survie globale comparant la dacarbazine au nivolumab dans le traitement du mélanome métastatique non BRAF muté tiré de (Robert et al., 2015a)

Le pembrolizumab a également été autorisé en 2015. L'essai KEYNOTE-006 a montré une amélioration de la PFS ainsi que de la survie globale du pembrolizumab par rapport à l'ipilimumab. De plus, dans cette même étude le pembrolizumab a montré moins de toxicités de haut-grades que l'anti-CTLA-4 (Robert et al., 2015b).

Du fait de leur plus faible toxicité, les anticorps anti-PD1 sont utilisés en monothérapie en 1^{ère} ligne de traitement dans les mélanomes de stades III inopérables et stades IV quel que soit le statut mutationnel de *BRAF*. Cependant, ils ne sont indiqués chez les patients avec des tumeurs *BRAF*-mutées que lorsque leur évolution est lente et que les patients ne présentent pas d'altération de l'état général. L'association anti-PD1 et anti-CTLA-4 a montré une meilleure efficacité sur la survie globale par rapport aux anti-PD1 seuls et peut être proposée en 1^{ère} ligne de traitement en cas de bon état général du patient et sans comorbidité (Wolchok et al., 2017). De nombreux essais cliniques sont en cours afin de tester de nouvelles molécules ou nouvelles associations thérapeutiques. Les différentes stratégies d'immunothérapies sont résumées dans la Figure 13 ci-dessous.

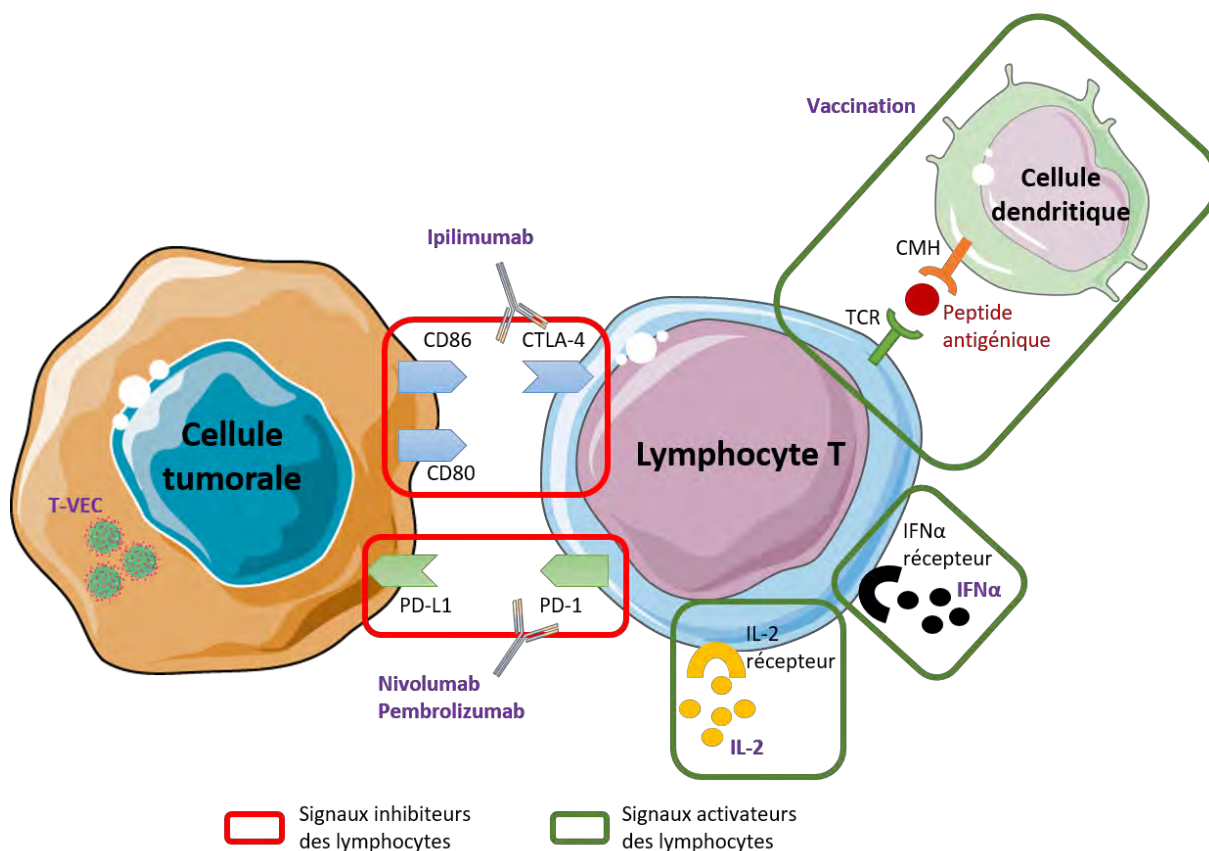


Figure 13 : Les différentes stratégies d'immunothérapies adapté de (Domingues et al., 2018)

En résumé, pour les stades de I à III, la chirurgie est le traitement de référence avec plus ou moins une chimiothérapie ou immunothérapie adjuvante. Pour les stades III inopérables et stades IV, la prise en charge est résumée dans la Figure 14 ci-dessous en privilégiant l'inclusion des patients dans des essais cliniques. En effet, malgré la mise sur le marché de molécules innovantes, qui permettent pour certains patients une rémission complète jusqu'à 2 ans après l'initiation du traitement, les rechutes restent le problème majeur de la prise en charge du mélanome. Beaucoup d'essais cliniques combinant les différentes thérapies sont en cours afin d'essayer d'enrayer l'apparition de mécanismes de résistance.

I.C.1. Mieux vaut prévenir que guérir

A ce jour, aucune thérapie curative n'est disponible. Malgré l'enrichissement de l'arsenal thérapeutique et les taux de réponses encourageants à ces thérapies, les problèmes de rechute persistent. La prévention reste donc le meilleur moyen de lutte contre le mélanome.

Les rayonnements UVs étant le principal facteur de risque environnemental du mélanome, la protection solaire est primordiale (utilisation de crème solaire avec écran total, port de chapeau et lunettes de soleil, maillot de bain avec protection UV pour les enfants).

De plus, plus le diagnostic est précoce, meilleur sera le pronostic. L'auto-surveillance des grains de beauté est donc un moyen de prévenir les stades avancés. Les patients devraient consulter un dermatologue dès lors qu'un grain de beauté change d'aspect ou qu'une nouvelle lésion pigmentée et non homogène apparaît sur le corps. L'auto-surveillance fait également partie du suivi des patients après un mélanome.

Enfin, environ 20% des mélanomes sont d'origine familiale. Une consultation d'oncogénétique peut être proposée aux sujets considérés « à risque » permettant la recherche d'anomalies au niveau des gènes de prédisposition au mélanome. Si une anomalie est détectée, un suivi plus régulier du patient sera à envisager.

TRAITEMENTS SYSTEMIQUES DE 1^{RE} LIGNE, DE 2^E LIGNE ET DE 3^E LIGNE DES MELANOMES CUTANES METASTATIQUES NON RESECABLES (STADE III INOPERABLE ET STADE IV) HORS METASTASE CEREBRALE

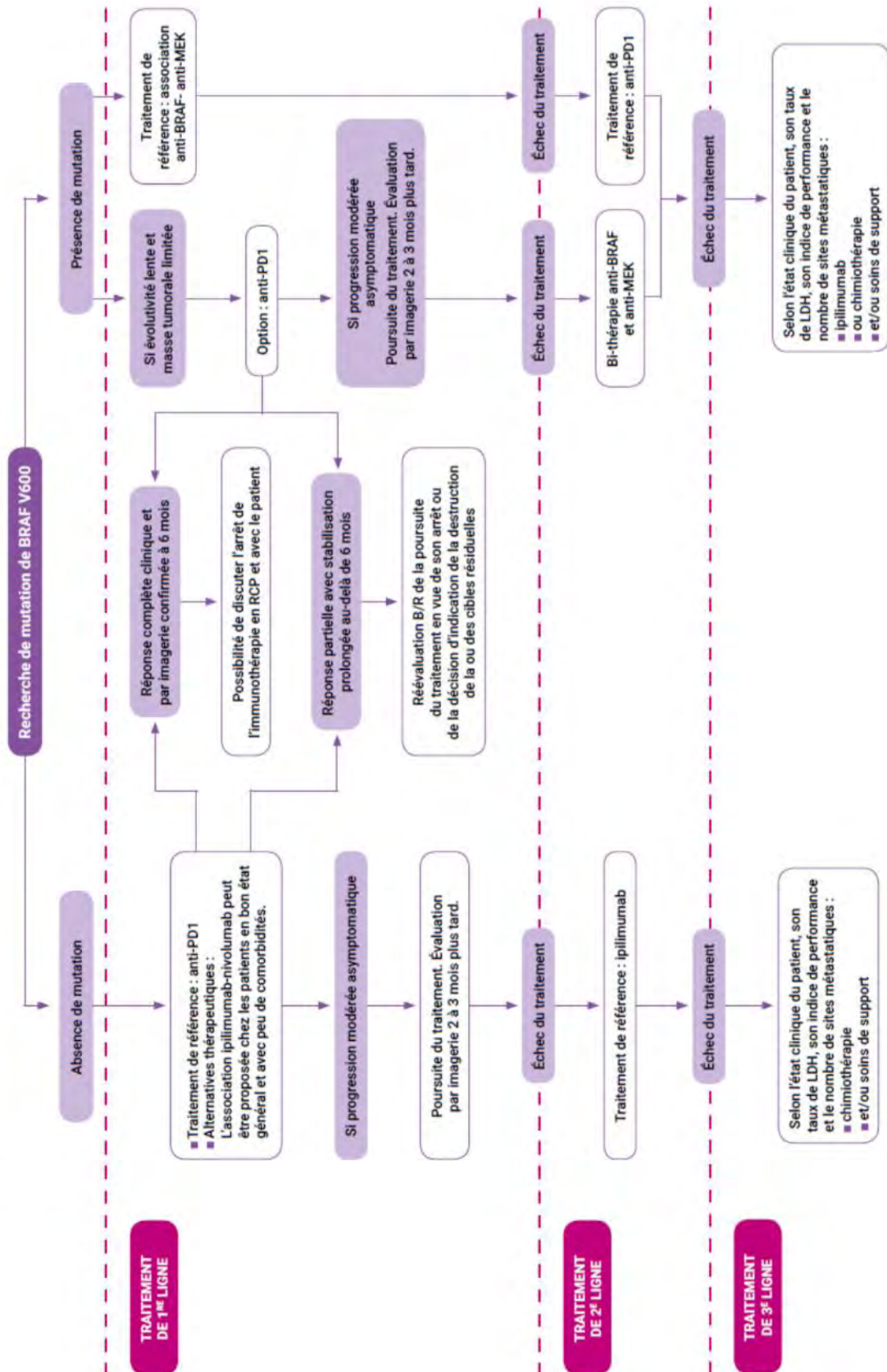


Figure 14 : Recommandations de la Société Française de Dermatologie pour la prise en charge des patients atteints de mélanome de stade III inopérable ou de stade IV (septembre 2017)

II. La voie des MAPK

II.A. Généralités

Les Mitogen-Activated Protein Kinases (MAPK) constituent une famille de sérine / thréonine kinases qui régulent différentes voies de signalisation cellulaire. De manière générale, chaque voie est activée par des phosphorylations successives faisant intervenir 3 kinases : MAPK Kinase Kinase (MAP3K ou MAPKKK), MAPK Kinase (MAP2K ou MAPKK) et la MAPK elle-même. La MAPK activée phosphoryle de nombreux substrats comme des protéines kinases (MAPKAPK : MAPK Activated Protein Kinase), des phosphatases ou des facteurs de transcription impliqués dans les processus cellulaires tels que la prolifération, la survie et la différenciation. Cette voie peut faire intervenir une 4^{ème} kinase en amont MAPKKKK ou MAP4K.

La cascade de phosphorylation a lieu au sein d'un complexe regroupant les 3 kinases par des protéines d'échafaudage. La protéine d'échafaudage détermine la localisation membranaire (membrane cytoplasmique, du réticulum endoplasmique ou des endosomes...) du complexe ainsi que les cibles recrutées et donc les réponses cellulaires associées (Figure 15).

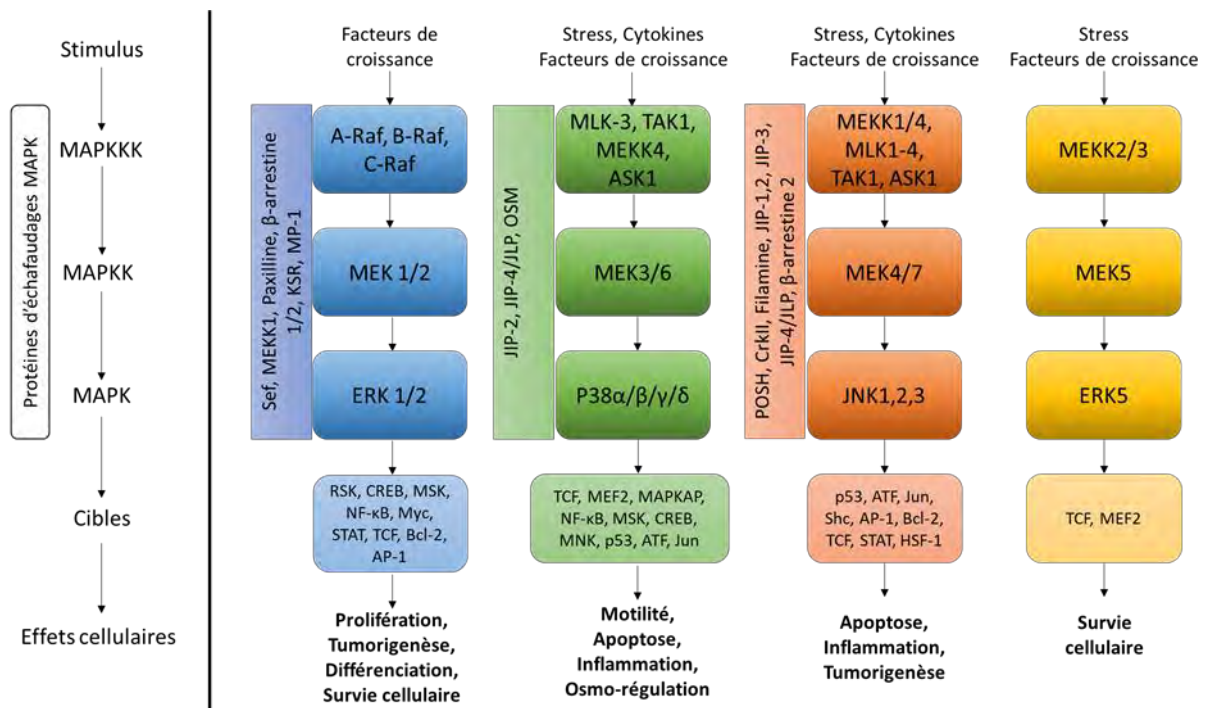


Figure 15 : Schéma des différentes voies MAPK chez l'humain adapté de (Qi and Elion, 2005; Roberts and Der, 2007)

Chez l'homme, on distingue 4 voies MAPK majeures (Lei et al., 2014; Qi and Elion, 2005; Roberts and Der, 2007) :

- La voie ERK1/2 (Extracellular-signal **R**egulated **K**inase 1/2) est de loin la plus décrite et étudiée. Il s'agit de la voie canonique des MAPK et est appelée « voie MAPK » tout au long de ce manuscrit. Elle intègre les signaux extracellulaires provenant de stimuli mitogènes tels que les facteurs de croissance et aboutit à la prolifération, la différenciation et la survie cellulaire.
- La voie JNK1/2/3 : c-Jun **N**-terminal **K**inase 1/2/3 également appelée « voie SAPK » (Stress Activated Protein Kinase). Cette voie est activée en réponse à des stress tels que le stress oxydatif, les radiations ionisantes, les variations de pression osmotique ou encore les xénobiotiques. Cette voie est principalement impliquée dans l'induction de l'apoptose, l'inflammation et le développement neuronal.
- La voie p38-MAPK est constituée des 4 protéines MAPK : p38 $\alpha/\beta/\gamma/\delta$. Elle est activée en réponse à des stress tels que les stress chimiques, les UVs, l'ischémie, IL-1, le TNF ou les variations de pression osmotique. Cette voie est impliquée dans l'induction de la sénescence, l'angiogenèse, l'immunité.
- La voie ERK5 : Extracellular signal **R**egulated **K**inase 5. Cette voie est notamment activée en réponse au stress oxydatif ou à des facteurs de croissance. Elle est essentielle durant le développement embryonnaire pour la formation du système vasculaire et la survie.

II.B. La voie RAS / RAF / MEK / ERK et ses altérations dans le mélanome

La voie des MAPK est considérée comme la voie « driver » de la mélanomagenèse. En effet, l'hyperactivation de cette voie est retrouvée dans 80 % des mélanomes. L'origine de cette suractivation fait intervenir divers mécanismes mais, dans la majorité des cas, il s'agit de mutations activatrices ou inhibitrices des différents acteurs de la voie. La dérégulation de cette voie est également impliquée dans d'autres cancers comme, par exemple, les cancers de la thyroïde, du poumon, du colon, du pancréas... Les principaux acteurs dérégulés de la voie des MAPK dans les cancers sont résumés dans la Figure 16.

PRINCIPALES ALTÉRATIONS DE LA VOIE RTK / RAS / RAF DANS LES CANCERS

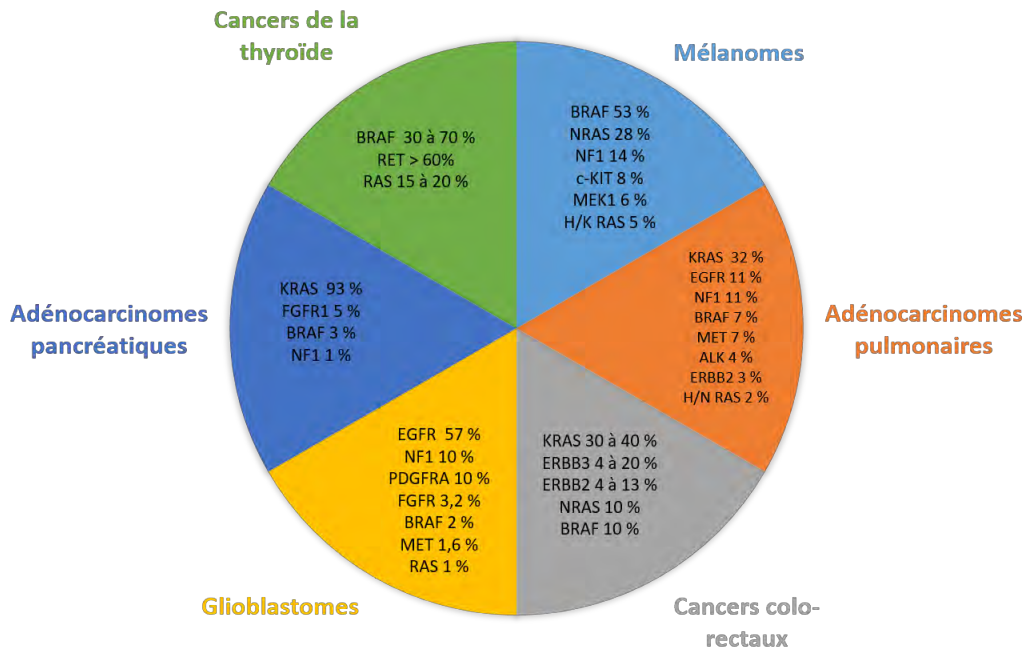


Figure 16 : Principaux acteurs de la voie des MAPK impliqués dans les cancers adapté de (Imperial et al., 2017; Naoum et al., 2018)

Dans le mélanome, la voie MAPK est impliquée dans chacune des 10 caractéristiques nécessaires à la tumorigenèse décrites en 2011 par les Professeurs D. Hanahan et R.A. Weinberg (Hanahan and Weinberg, 2011). En effet, son activation constitutive permet :

- une prolifération indépendante des facteurs de croissance
- un échappement aux inhibiteurs de la prolifération
- un échappement au système immunitaire
- une capacité de réplication infinie
- une inflammation pro-tumorale
- la capacité à former des métastases
- l'induction de l'angiogenèse
- l'instabilité génomique
- la résistance à la mort cellulaire
- la dérégulation épigénétique

Seules les altérations des protéines impliquées dans l'initiation de la mélanomagenèse seront détaillées dans la suite du paragraphe et dans l'ordre de la cascade de signalisation.

II.B.1. Les récepteurs à activité tyrosine kinase

La voie MAPK est activée après fixation de facteurs de croissance sur des récepteurs à activité tyrosine kinase (RTK), récepteurs membranaires retrouvés sous forme monomérique en absence d'activation. Le plus impliqué dans le mélanome est l'oncogène KIT. Après fixation de son ligand SCF (Stem Cell Factor), le récepteur se dimérise. Ceci entraîne l'activation du domaine kinase au niveau intracellulaire du récepteur et ainsi, l'autophosphorylation au niveau des résidus de tyrosine. Le récepteur actif peut ainsi recruter des protéines d'ancrage *via* son domaine SH2 (Src Homology) qui, à leur tour, recrutent des GEF (Guanine nucleotide Exchange Factor) et activent RAS. Le récepteur KIT peut ainsi activer les voies MAPK, PI3K/AKT ou STAT (Figure 17).

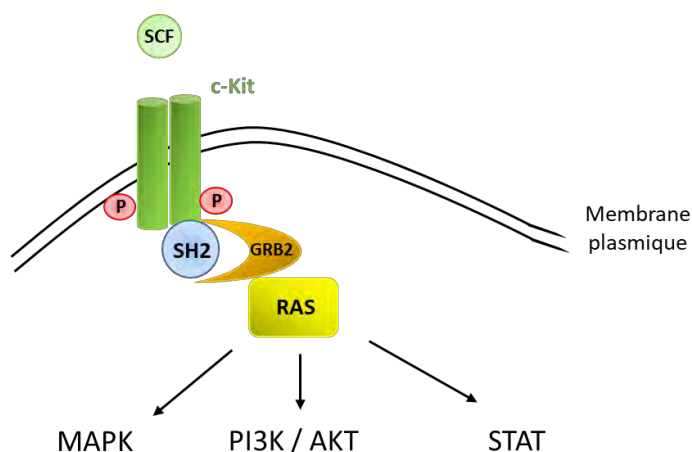


Figure 17 : Le récepteur c-Kit et ses voies activées

Les mutations somatiques de *KIT* sont retrouvées dans 8 à 25 % des mélanomes en fonction de la forme clinique. En effet, elles sont moins fréquentes dans le mélanome à extension superficielle et plutôt retrouvées dans les mélanomes muqueux et acraux (Ponti et al., 2017; Tzen et al., 2014). Les mutations les plus fréquentes concernent l'exon 11 au niveau du codon 576 (L576P) ou l'exon 13 au niveau du codon 642 (K642E) du domaine kinase. Des amplifications de KIT sont également retrouvées (Curtin et al., 2006). Ces mutations aboutissent à une activation constitutive du récepteur et, par conséquent, de la signalisation en aval.

II.B.2. Les récepteurs couplés aux protéines G

La petite GTPase RAS peut également être activée par des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG). Ces dernières sont des protéines hétéro-trimériques membranaires composées de

3 sous-unités : alpha, beta et gamma. Après liaison du ligand sur son récepteur à 7 domaines transmembranaires, la protéine G se lie au récepteur. L'échange du GDP par du GTP au niveau de la sous-unité alpha induit la dissociation de cette dernière des sous-unités beta et gamma. Les sous-unités ainsi activées peuvent ensuite agir sur différents effecteurs et participer à différents processus cellulaires (Figure 18).

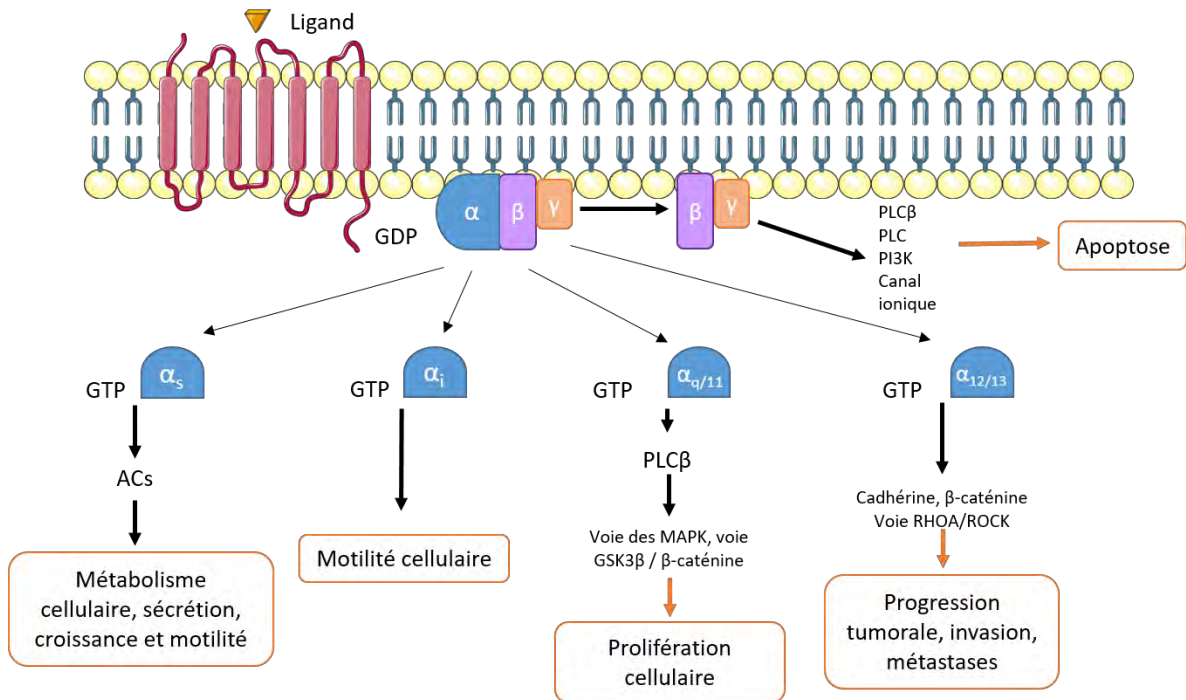


Figure 18 : Les différentes voies et différents mécanismes physiologiques activés par les RCPG

Il existe plusieurs types de sous-unités alpha codées par différents gènes. Parmi eux, les gènes *GNAQ* et *GNA11*, codant les sous-unités α_q et α_{11} sont retrouvés mutés dans 80% des mélanomes uvéaux. Il s'agit le plus souvent de mutations somatiques au niveau des codons Q209 ou R183 (Reddy et al., 2017). En 2004, une étude a montré que les souris porteuses des mutations au niveau de *GNAQ* et *GNA11* présentaient une hyperpigmentation diffuse liée à une augmentation du nombre de mélanocytes au niveau intra-dermique (Raamsdonk et al., 2004). Le séquençage de tumeurs mélanocytaires bénignes et malignes a ensuite montré que la mutation Q209 de *GNAQ* est présente dans 46 % des mélanomes uvéaux et la Q209 de *GNA11* dans 32 %. Cette dernière empêche l'activité GTPase de la sous-unité alpha et conduit à une activation constitutive des voies en aval (Raamsdonk et al., 2009). Les mutations R183 sont plus rares et ne sont présentes que dans 6 % des mélanomes uvéaux (Van Raamsdonk et al., 2010).

II.B.3. RAS

II.B.3.a. Présentation des protéines RAS et activation

Les protéines de la sous-famille RAS sont des petites GTPases monomériques d'environ 21 kDa membranaires qui fonctionnent comme des interrupteurs moléculaires. Les 3 gènes de la sous-famille les plus connus et les plus décrits en cancérologie sont *HRAS*, *KRAS* et *NRAS* et codent pour 4 protéines RAS : HRAS, NRAS, KRAS4A et KRAS4B. Les dernières sont deux isoformes de KRAS issues d'un épissage alternatif de la transcription du gène *KRAS*. Les protéines RAS sont composées d'un domaine G (85 % de la protéine), identique aux 4 isoformes, impliqué dans la liaison du GTP ou GDP, l'activité GTPasique et la liaison aux effecteurs. Les régions « switch I » (SI) et « switch II » (SII) de ce domaine subissent le changement conformationnel lors du passage de la forme GDP à la forme GTP. La région C-terminale, constituée de seulement 25 résidus, est la région hypervariable qui subit les modifications post-traductionnelles (palmitoylation ou farnésylation) et oriente la localisation membranaire des protéines RAS (Figure 19). La forte homologie de séquence des 4 isoformes suggère des fonctions redondantes entre les différentes protéines. Cependant, chaque isoforme a des fonctions spécifiques dépendantes de la localisation de la protéine au niveau de la membrane plasmique, de l'appareil de Golgi ou des endosomes. En effet, en fonction de leur état, les isoformes de RAS sont situées dans des microdomaines membranaires différents et recrutent donc différents effecteurs avec, pour conséquence, des rôles différents (Prior et al., 2003).

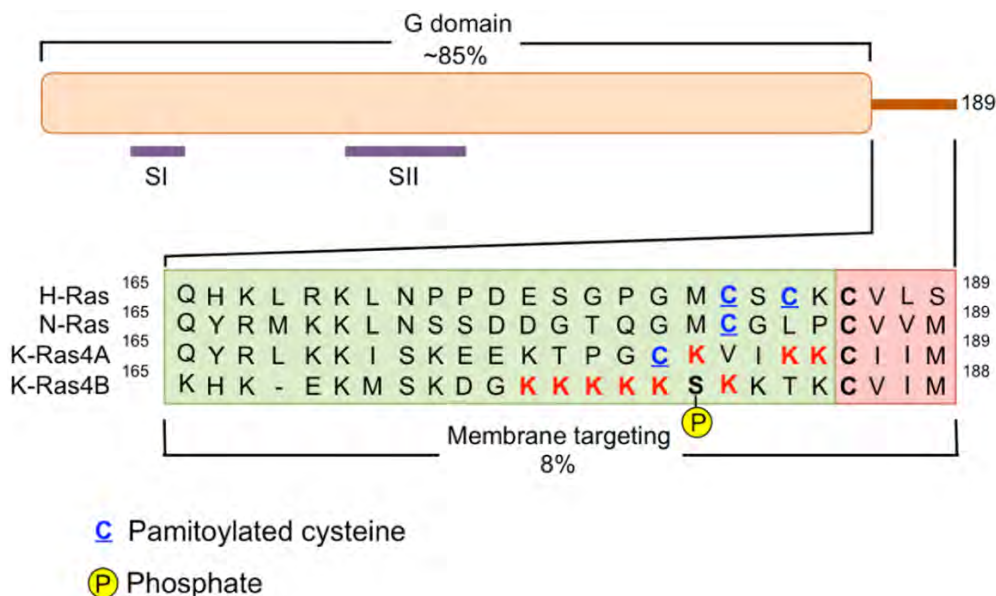


Figure 19 : Les homologies de structure des protéines RAS tiré de (Zeitouni et al., 2016)

Les protéines RAS oscillent entre un état inactif lié au GDP et un état actif lié au GTP. L'équilibre entre les deux formes est finement régulé par les GAPs (GTPases-Activating Proteins) et les GEFs (Guanine nucleotide Exchange Factors). Les GAPs stimulent l'activité GTPase intrinsèque de RAS pour hydrolyser le GTP lié à RAS en GDP et inhibent son activité alors que les GEFs favorisent l'échange du GDP avec du GTP et donc l'activation de RAS. La GEF la plus connue pour activer RAS est la GEF SOS. La liaison du GTP sur RAS induit un changement de conformation de la protéine qui lui permet ensuite d'interagir avec ses effecteurs dont les protéines RAF. La Figure 20, ci-dessous, illustre le mécanisme d'activation commun aux protéines de la sous-famille RAS.

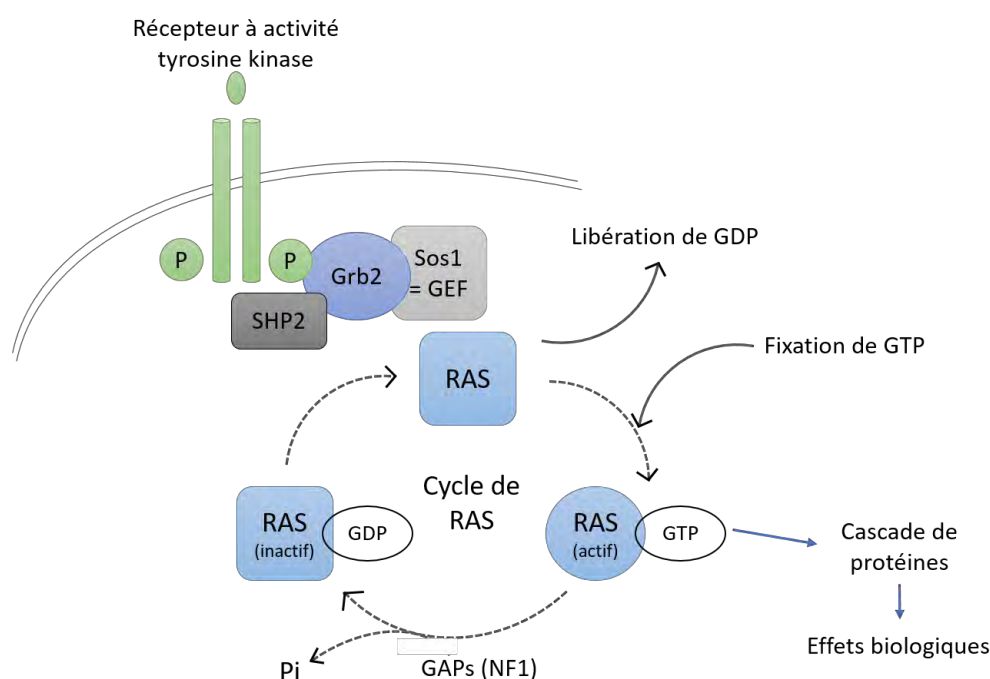


Figure 20 : Mécanisme d'activation des protéines de la sous-famille RAS

II.B.3.b. Les mutations de RAS dans le mélanome

Les principales mutations des isoformes NRAS, HRAS et KRAS retrouvées dans les cancers sont des substitutions d'acides aminés en position 12, 13 et 61 (Prior et al., 2012). Les mutations en position 12 et 13 ont pour conséquence une plus faible affinité de RAS pour les GAPs empêchant la dissociation du GTP de RAS alors que celles en position 61 sont responsables de la diminution de l'activité GTPasique intrinsèque de RAS. Le gène *NRAS* est retrouvé muté dans 15 à 25 % des mélanomes. Les mutations les plus fréquentes sont des substitutions en position 61 de la glutamine par une arginine ou une lysine et aboutissent à

une activation constitutive de NRAS et, par conséquent, de la voie MAPK. Cette mutation est retrouvée dans les nævi congénitaux ainsi que dans les mélanomes sporadiques. Dans le mélanome, les mutations sur les deux autres codons (G12 et G13) de NRAS sont rares. Le knock-in conditionnel et tissu spécifique de NRAS^{G12D} ou NRAS^{Q61R} montre que seulement la mutation Q61R est capable d'initier la mélanomagenèse *in vivo* (Burd et al., 2014). De plus l'étude fonctionnelle de ces 2 mutants montre qu'ils sont capables d'activer de manière similaire les voies de signalisation en aval mais que le mutant Q61R est plus stable et que son activité GTPasique intrinsèque est plus faible que pour le mutant G12D (Burd et al., 2014). Ceci permet en partie d'expliquer la fréquence plus élevée des mutations en position 61 par rapport aux autres.

Les mutations des deux autres homologues KRAS et HRAS sont rares (< 2%) dans le mélanome (Akbari et al., 2015). La surexpression de KRAS^{G12V} dans des mélanocytes de souris *in vivo*, induit une hyperpigmentation de la peau, la formation de nævi et de tumeurs (Milagre et al., 2010). Une étude a montré sur des mélanocytes immortalisés que la seule surexpression du mutant NRAS^{G12V} induit une prolifération plus importante des mélanocytes par rapport à la surexpression du mutant KRAS^{G12V}. Ce dernier induit plutôt un arrêt de la prolifération s'il est exprimé seul et nécessite une coopération avec d'autres oncogènes (Whitwam et al., 2007). Ceci peut en partie expliquer la prévalence des mutations de l'isoforme NRAS par rapport aux autres dans le mélanome.

II.B.3.c. La perte de fonction de NF1

L'activation constitutive de RAS peut également être la conséquence de la perte d'activité d'une de ses GAP. Une étude en 2014 a montré sur un panel de lignées de mélanomes *wild type* pour BRAF et NRAS que les lignées qui avaient des taux élevés de RAS-GTP possédaient une perte de NF1, GAP de RAS (Nissan et al., 2014). Cependant alors que les mutations de BRAF et NRAS sont considérées comme mutuellement exclusives, la perte de NF1 peut être associée à des altérations de BRAF et/ou NRAS. La perte de fonction de NF1 est retrouvée dans 39 % des mélanomes non BRAF^{V600} et NRAS^{Q61} mutés (Akbari et al., 2015). La perte de fonction de NF1 résulte en une activation constitutive de RAS et, par conséquent, de la voie MAPK.

II.B.4. RAF

II.B.4.a. Présentation des protéines RAF et activation

Les protéines RAF sont des sérine / thréonine kinases qui appartiennent à la famille des MAPKKK (MAP3K) dans la cascade MAPK. Chez les mammifères, il existe 3 gènes homologues qui codent pour 3 protéines RAF : *ARAF*, *BRAF* et *CRAF*. Les 3 protéines ont des structures proches et agissent sous formes d'homo- ou hétéro-dimères. Elles possèdent toutes 3 régions conservées (CR1, CR2 et CR3). La région CR1 comporte le domaine de liaison à RAS (RBD) et le domaine de liaison aux phospholipides membranaires (CRD). La région CR2 est la région riche en sérines et thréonines qui participe à la régulation de l'activité kinase portée par la région CR3 en C-terminal (Figure 21).

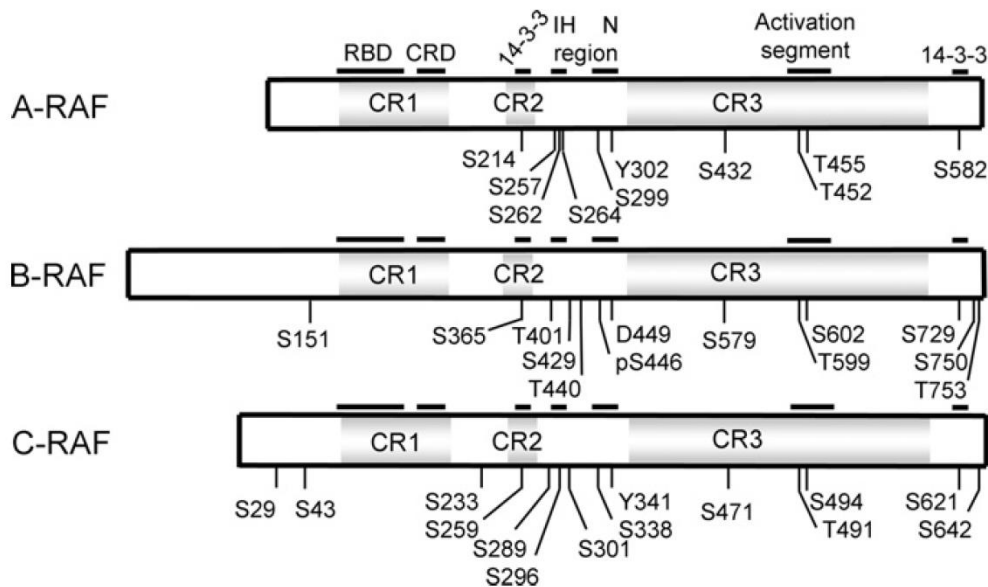


Figure 21 : Structure des protéines RAF tiré de (Roskoski, 2010)

A l'état inactif, dans le cytosol le domaine CR3 est masqué par les domaines CR1 et CR2 qui interagissent avec la protéine 14-3-3. RAF est ainsi en configuration fermée. La liaison de RAS au domaine RBD induit une relocalisation de la protéine à la membrane et sa stabilisation par le Cystein Rich Domain (CRD). Ceci a pour conséquence un changement de conformation du complexe RAF / 14-3-3 en position ouverte qui aboutit au recrutement de protéines d'échafaudage impliquées dans la transduction du signal RAF / MEK / ERK. La liaison de RAS au domaine RBD est nécessaire mais insuffisante à l'activation des protéines

RAF. En effet, les phosphorylations sur les résidus Ser579, Thr599, Ser602 du site catalytique de BRAF sont nécessaires à son activation complète (Roskoski, 2010). Cette activation induit l'homo- ou l'hétéro-dimérisation des protéines RAF nécessaire à leur activité kinase. Les 3 protéines RAF phosphorylent ensuite et activent des substrats communs, MEK1 (Ser218 et Ser222) et MEK2 (Ser222 et Ser226) (MAP/ERK kinase) par l'intermédiaire de protéines d'échafaudage tels que les Kinase Suppressor of Ras protein kinases (KSR) (Roskoski, 2012a). Ces protéines se trouvent au niveau du cytoplasme sous forme de dimères et font partie des MAPKK (MAP2K). Ce sont des tyrosine / thréonine kinases qui, une fois activées, recrutent au niveau du complexe RAF / MEK / KSR leurs cibles ERK1 et ERK2 (les MAPK canoniques). Ces dernières sont phosphorylées sur les tyrosines en position 204 pour ERK1 et 187 pour ERK2 par MEK. Afin d'être complètement actives, les protéines ERK sont encore phosphorylées sur les thréonines en position 202 pour ERK1 et 185 pour ERK2. Les protéines ERK agissent ensuite sur leurs cibles nucléaires ou cytoplasmiques sous forme de monomères ou de dimères (Roskoski, 2012b) (Figure 22).

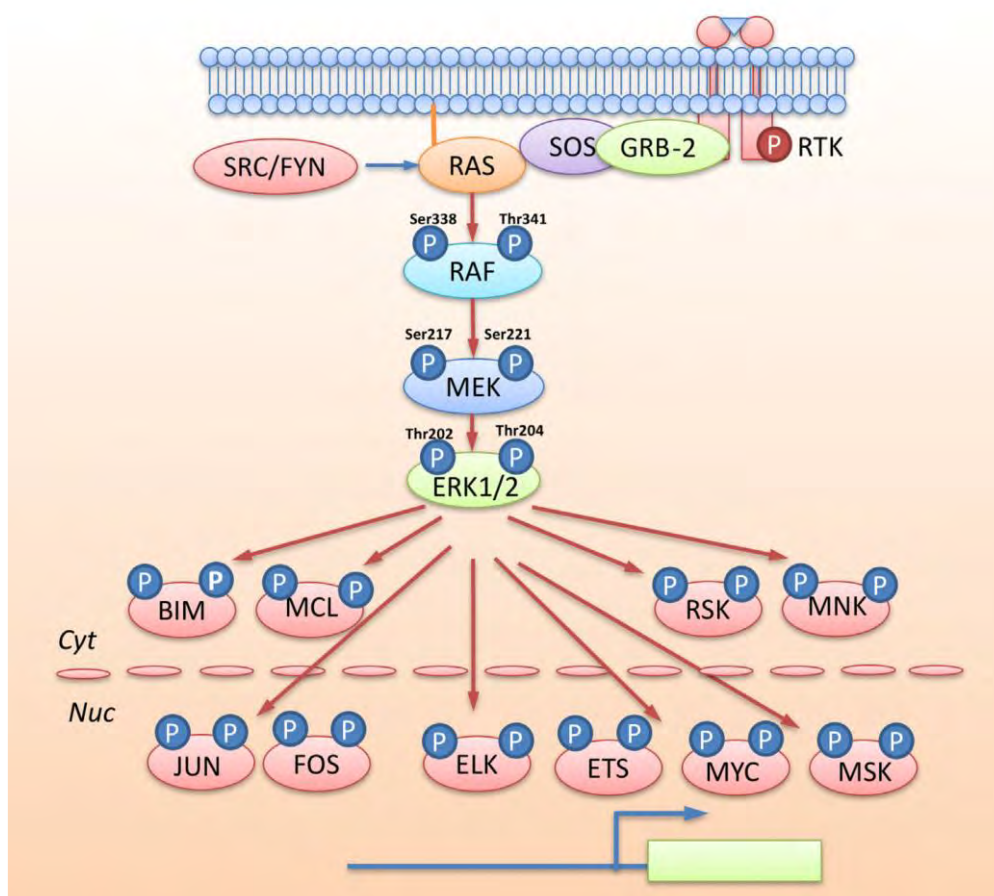


Figure 22 : Cascade de signalisation de la voie canonique des MAPK et principales cibles tiré de (Liu et al., 2018)

II.B.4.b. Les mutations de BRAF

Les mutations de BRAF dans les cancers ont été décrites pour la première fois en 2002 par Davies *et al.*. Dans cette étude des mutations somatiques de BRAF ont été retrouvées dans 66 % des mélanomes. Parmi ces mutations, la mutation ponctuelle qui est une substitution d'une valine par de l'acide glutamique au niveau 600 (V600E) était la plus fréquente et représentait 80 % des mutations de BRAF dans le mélanome (Davies *et al.*, 2002). Les mutations V600K et V600R sont également retrouvées dans le mélanome et représentent environ 20 % et 7 % des mutations de BRAF respectivement. Actuellement, les mutations de *BRAF* sont retrouvées dans 50 % des mélanomes cutanés et 10 à 20 % des mélanomes acraux ou muqueux (Akbari *et al.*, 2015; Manzano *et al.*, 2016). Plus généralement, les mutations de BRAF sont trouvées dans 6 % des cancers dont certains cancers colorectaux, cancers du poumon non à petites cellules et cancers de la thyroïde (Zehir *et al.*, 2017). Il existe environ 200 mutants de *BRAF* identifiés dans les cancers dont une majorité n'a pas encore été étudiée. Récemment, les mutants de BRAF ont été classés en 3 catégories en fonction de leur activité kinase, de leur dépendance par rapport à RAS et de leur dimérisation. Ces catégories déterminent également leur sensibilité ou non aux inhibiteurs de BRAF. Les mutants V600 (D/E/K/R) de BRAF aboutissent à une activation constitutive de l'activité kinase et de la phosphorylation de ERK. Ces derniers agissent sous forme de monomères (indépendants de RAS) ou d'homo-dimères dont la dimérisation est dépendante de RAS (Classe I). Tous les autres mutants activateurs étudiés n'agissent que sous forme de dimères indépendamment de l'activité de RAS (Classe II) (Yao *et al.*, 2015). Enfin les mutants de Classe III, sont les mutants qui diminuent l'activité kinase de BRAF voire l'inhibent complètement. Ces mutants ont plus d'affinité que le BRAF *wild-type* pour le RAS-GTP et forment des dimères avec CRAF *wild-type* qui, par la suite, activent ERK. Ces mutants sont donc souvent retrouvés dans des mélanomes porteurs de mutations de *RAS* ou de délétions de *NF1* (Yao *et al.*, 2017).

Alors que les mutants V600 sont considérés comme des mutations « driver » dans le mélanome, les mutants de classes II et III sont plutôt considérés comme des mutations « passager ». En effet, ces derniers sont souvent associés à d'autres mutants (*NF1* et *NRAS*).

Il est intéressant de noter que les mutations BRAF^{V600E} et NRAS^{Q61R} peuvent être retrouvées au sein d'un même mélanome mais sont mutuellement exclusives dans une même cellule (Sensi *et al.*, 2006).

Les caractéristiques des 3 classes de mutants sont résumées dans le Tableau 5 ci-dessous.

	Classe I	Classe II	Classe III
Codon	V600 D/E/K/R	K601, L597, G464, G469	G466, N581, D594, G596
Dimérisation	Non	Oui	Oui
Signalisation dépendante de RAS	Non	Non	Oui
Activité kinase par rapport au <i>wild type</i>	Augmentée de 500 à 700 fois	Intermédiaire	Diminuée voire absente
Sensibilité aux BRAFi	Oui	Non (éventuellement pan RAF)	Non
Fréquence	50 % mélanomes	5 à 16 % des mélanomes 50 à 80 % des NSCLC 22 à 30 % CRC	9,4 % des mélanomes 15,2 % des CRC et 19,1 % des NSCLC

Tableau 5 : Caractéristiques des 3 classes de mutations de BRAF d'après (Dankner et al., 2018a)

II.B.5. Les rétrocontrôles de la voie

Au niveau physiologique, la voie ERK est finement régulée par des rétrocontrôles classés en 2 catégories résumés dans la Figure 23.

II.B.5.a. Les rétrocontrôles immédiats

Ces rétrocontrôles sont directement sous la dépendance de ERK qui une fois activé peut phosphoryler et inactiver les acteurs en amont. En effet :

- La GEF SOS peut être phosphorylée par ERK et inhiber ainsi la liaison du complexe SOS/Grb-2 au RTK activé empêchant le recrutement de RAS (Buday et al., 1995).
- BRAF peut être phosphorylée par ERK sur le résidu Thr753. Ceci déstabilise le dimère BRAF-CRAF et diminue la transduction du signal (Rushworth et al., 2006).
- BRAF et CRAF peuvent être phosphorylées sur de nombreux autres sites par ERK entraînant l'inactivation des protéines, la dissociation des dimères ainsi que leur relocalisation cytoplasmique.

- MEK1 peut être phosphorylée sur le résidu T292 ou Ser212 par ERK induisant son inactivation (Catalanotti et al., 2009; Roskoski, 2012a).

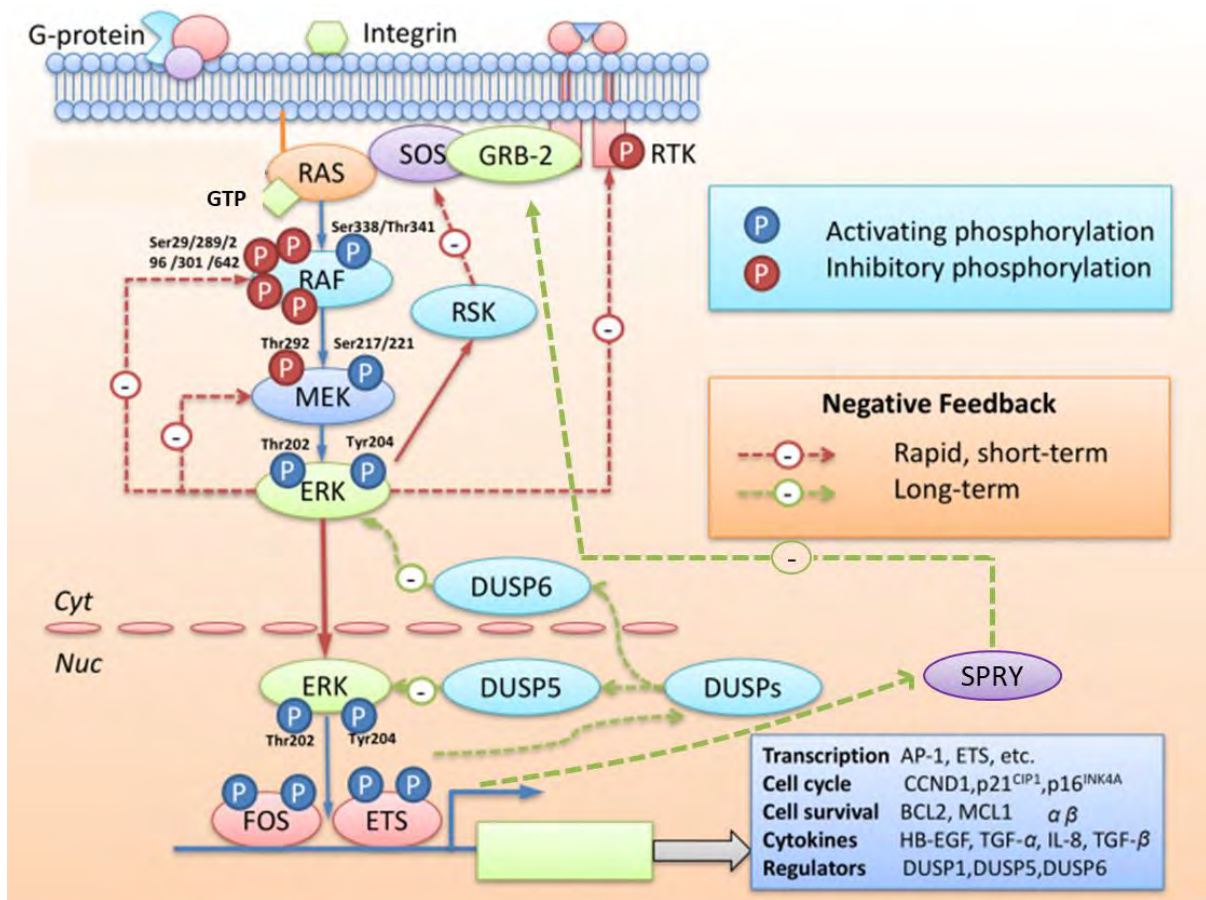


Figure 23 : Principaux mécanismes de rétrocontrôles de la voie ERK adapté de (Liu et al., 2018)

II.B.5.b. Les rétrocontrôles tardifs

Les rétrocontrôles tardifs font intervenir des cibles de ERK. En effet, les cibles majoritaires de ERK sont des facteurs de transcription. Ces derniers induisent la transcription de gènes qui participent à la régulation de la cascade de signalisation en amont.

- Les protéines DUSP (Dual-Specificity Phosphatase) ou MKP (MAPK Phosphatases) sont des phosphatases qui déphosphorylent les résidus tyrosines et thréonines des MAPK dont ERK et les inactivent. Ce sont des protéines inducibles. La spécificité de substrat des DUSP est déterminée par leur localisation subcellulaire. Quelques travaux suggèrent que leur expression peut être tissu spécifique. En particulier, deux

DUSPs sont spécifiques de ERK : DUSP6 au niveau cytoplasmique et DUSP5 au niveau nucléaire (Kidger and Keyse, 2016).

- Les protéines SPRY (Sprouty) sont des protéines dont l'expression est régulée par les cibles nucléaires de ERK. Ces protéines sont ensuite phosphorylées au niveau cytoplasmique ce qui permet d'induire un changement de leur conformation. Elles peuvent ainsi se fixer au complexe Grb2/SOS et permettre sa dissociation de RAS (Neben et al., 2017).

Enfin, MEK1 peut également être phosphorylée sur les résidus Ser212, T286 et T386 par CDK5 et T298 par PAK1 induisant une inhibition de son activité (Roskoski, 2012a).

II.B.6. Les thérapies ciblant cette voie

II.B.6.a. L'association inhibiteur de BRAF et inhibiteur de MEK

La protéine BRAF retrouvée mutée dans environ 50 % des mélanomes, a donc été considérée comme la cible thérapeutique majeure par les industriels. La première molécule autorisée sur le marché en France ciblant la mutation BRAF^{V600} a été le vemurafenib (Zelboraf®) développé par Roche en 2012 pour le traitement des mélanomes de stade III non résecable et stade IV BRAF^{V600}-mutés. Il s'agit d'un inhibiteur compétitif de l'ATP au niveau de la poche ATP de BRAF (BRAFi). Cette AMM a fait suite à la publication des résultats d'un essai clinique de phase III sur 675 patients naïfs de traitement BRAF^{V600E} mutés comparant la dacarbazine au vemurafenib. Ces résultats ont montré une amélioration de la survie globale à 6 mois de 64 % dans le groupe dacarbazine à 84 % dans le groupe vemurafenib ainsi qu'une amélioration du taux de réponse de 5 % à 48 % (Chapman et al., 2011).

La 2^{ème} molécule ciblant la mutation BRAF^{V600} mise sur le marché a été le dabrafenib en 2013 développé par GSK (GlaxoSmithKline®). Elle est indiquée dans les mélanomes de stades III inopérables et les stades IV BRAF^{V600}-mutés ainsi que dans les cancers bronchiques non à petites cellules BRAF^{V600}-mutés. Une étude de phase III randomisée sur 250 patients a également montré la supériorité du dabrafenib par rapport à la dacarbazine en améliorant la durée de la survie sans progression (PFS) de 2,7 à 5,1 mois (Hauschild et al., 2012). Le dabrafenib a par ailleurs montré une efficacité supérieure au vemurafenib dans le traitement des métastases cérébrales.

Cependant, divers mécanismes de résistance à ces monothérapies ont rapidement émergé et seront détaillés dans le chapitre III de cette introduction. Afin de pallier ces résistances, des inhibiteurs de MEK (cobimetinib et trametinib) ont été développés et testés en association avec les inhibiteurs de BRAF. Trois études ont notamment été effectuées chez des patients atteints de mélanomes métastatiques de stades III non résecables ou stades IV et porteurs de la mutation BRAF^{V600E/K} afin de tester l'effet de l'association par rapport à la monothérapie (BRAFi).

D'une part, l'étude coBRIM a montré une amélioration de la PFS de 6,2 à 9,9 mois chez les patients traités par l'association vemurafenib et cobimetinib par rapport aux patients traités par le vemurafenib seul (Larkin et al., 2014). D'autre part, l'étude COMBI-d a montré une amélioration de la survie globale, de la PFS et de la durée de réponse chez les patients traités par l'association dabrafenib et trametinib par rapport au trametinib seul (Long et al., 2014, 2017). Enfin, plus récemment l'étude COLUMBUS a montré que l'association de l'encorafenib (BRAFi) et du binimetinib (MEKi) augmente la PFS de 7,3 à 14,9 mois par rapport au vemurafenib seul (Dummer et al., 2018).

L'association inhibiteurs de BRAF et de MEK est maintenant indiquée en 1^{ère} ligne de traitement des mélanomes de stades III inopérables et stades IV BRAF^{V600}-mutés. Des essais cliniques sont en cours afin de comparer l'efficacité de ces thérapies ciblées à de l'immunothérapie ou en combinaison avec d'autres molécules.

Par ailleurs l'un des effets indésirables principal des monothérapies par BRAFi est l'apparition d'une toxicité cutanée. En particulier, des carcinomes épidermoïdes cutanés et des kératoacanthomes. Ces effets indésirables sont causés par l'hyperactivation paradoxale de la voie MAPK sous BRAFi. Chez les patients, ces différents carcinomes sont porteurs de mutations activatrices de NRAS (Bollag et al., 2010 ; Su et al., 2012a). Par la suite, des travaux de l'équipe du Professeur R. Marais ont montré *in vivo* que les souris ayant des mélanocytes exprimant KRAS^{G12D} et/ou le mutant « kinase-dead » BRAF^{D594A} et traitées par des inhibiteurs de BRAF développaient des métastases (Sanchez-Laorden et al., 2014). D'autre part, il est à noter que les inhibiteurs actuels de BRAF sont actifs sur les formes monomériques (mutants de classe I). L'hyperactivation paradoxale de la voie ERK serait due à une fixation des inhibiteurs de BRAF sur les protéines BRAF et CRAF *wild-type* monomériques. L'activation de NRAS entraîne donc la formation de dimères de RAF dont un monomère est fixé à l'inhibiteur et l'autre non. Le monomère BRAF ou CRAF *wild-type* fixé

au BRAFi induirait une transactivation du monomère non lié à l'inhibiteur et activerait donc la voie (Hatzivassiliou et al., 2010; Poulikakos et al., 2010). L'utilisation des inhibiteurs de MEK permet donc de limiter ces effets indésirables mais pas de les supprimer. L'utilisation d'inhibiteurs pan-RAF, tels que le sorafenib par exemple, induisent également une hyperactivation de ERK. Enfin, le développement de « paradox-breakers » pourrait complètement annuler cet effet indésirable. En effet, le PLX7904 en cours de développement inhibe BRAF^{V600E} sans activer la voie ERK dans les cellules avec hyperactivation de RAS et/ou des RTK (Zhang et al., 2015).

II.B.6.b. Comment cibler autrement la voie des MAPK ?

Le ciblage de RAS constitue un enjeu majeur dans la prise en charge des malades en oncologie. Des inhibiteurs de prénylation ont été développés notamment des inhibiteurs de farnésyl transférase. Cependant, malgré des essais pré-cliniques encourageants, les résultats en clinique chez les patients ayant des cancers mutés *KRAS* ou *NRAS* ont été très décevants. Des petites molécules inhibitrices ciblant l'interaction de RAS avec ses effecteurs en aval ont été développées mais manquent de spécificité par rapport aux autres membres de la superfamille RAS. Une autre stratégie de ciblage de RAS qui semble prometteuse est d'inhiber les GEF. Des inhibiteurs covalents spécifiques de certains mutants notamment KRAS^{G12C} sont en cours de développement dans le traitement de certains cancers du poumon. Ces inhibiteurs se fixent de manière covalente au niveau d'une poche sous la région switch II spécifique de ce mutant et entraînent une affinité de KRAS^{G12C} plus importante pour le GDP que le GTP (Janes et al., 2018 ; Lim et al., 2014 ; Ostrem et al., 2013). L'inhibiteur de ce type de KRAS^{G12C}, ARS-1620, a montré une efficacité *in vivo* sur des xénogreffes de cellules mutées KRAS^{G12C} (Janes et al., 2018). Il s'agit donc d'un concept prometteur qui pourrait également être étendu au ciblage de NRAS. Enfin une dernière stratégie proposée est de cibler les transcrits de RAS par des oligonucléotides (siARN ou miARN) afin d'empêcher la traduction de ces derniers (Chakraborty et al., 2018).

La plupart des mécanismes de résistance aux bithérapies BRAFi et MEKi aboutissent à une réactivation de la phosphorylation de ERK. Dans ce contexte, le ciblage de ERK pourrait être une façon de contrer cette résistance. De nombreuses études ont montré que les inhibiteurs de ERK induisaient une sensibilisation des cellules résistantes aux BRAFi et MEKi quel que soit le mécanisme de résistance impliqué. Actuellement, deux inhibiteurs de ERK sont en

cours d'essais cliniques de phase I et II dans les hémopathies malignes, le mélanome et le cancer du pancréas.

Enfin, des inhibiteurs de c-KIT sont utilisés ou en cours d'essais cliniques dans les mélanomes *KIT*-mutés. Les inhibiteurs utilisés sont : l'imatinib, le sunitinib, le dasatinib et le nilotinib et ne sont pas spécifiques de KIT.

II.C. La voie JNK / c-Jun

II.C.1.a. La voie JNK : présentation et rôle physiologique

Les MAPK JNK (Figure 12) font partie des SAPK (Stress-Activated Protein Kinase) activées en réponse à des stress tels que les irradiations par les UVs, l'hyperosmolarité, des chocs thermiques, des cytokines (TNF α , IL-1, IL-3) ou des facteurs de croissance (EGF, PDGF). La voie non canonique de WNT peut également aboutir à l'activation des JNK. Chez l'homme, les protéines JNK sont codées par 3 gènes situés sur 3 chromosomes différents : *JNK1*, *JNK2* et *JNK3*. Une fois transcrits, les différents ARN subissent plusieurs types d'épissages alternatifs qui aboutissent à la synthèse *in fine* de plus de 10 isoformes différentes de JNK. Ces isoformes présentent plus de 80 % d'homologie de séquence entre elles. Certaines fonctions des JNK semblent redondantes mais il existe également des fonctions spécifiques à chaque isoforme. Les isoformes de JNK1 et JNK2 sont exprimées de façon ubiquitaire dans les cellules de l'organisme alors que l'expression de JNK3 semble limitée au cerveau. Les doubles KO (knock-out) *JNK1* et *JNK2* sont létaux à l'état embryonnaire alors que les KO simples sont viables. Les souris KO pour l'une des isoformes présentent des malformations au niveau du système nerveux central, des troubles de l'immunité ou des hyperplasies épidermiques. En revanche, les KO de *JNK3* protègent les souris de maladies neurodégénératives (pour revue (Zeke et al., 2016; Zhang and Selim, 2012)).

Les protéines JNK agissent sur des substrats cytoplasmiques et nucléaires. Parmi ces derniers, le facteur de transcription c-Jun est une cible majeure impliquée dans la plupart des effets biologiques liés à l'activation des JNK. En effet, c-Jun est impliqué dans la progression du cycle cellulaire, la prolifération, l'apoptose, la survie, la migration, l'invasion, l'angiogenèse et l'inflammation. Son expression est augmentée en réponse à des facteurs de croissance, des cytokines, un stress oxydatif, une irradiation aux UV ou des radiations ionisantes. Il appartient à la famille des facteurs de transcription AP-1 qui est composée des sous-familles de protéines JUN (3 membres : JUNB, JUND et c-Jun), JDP, FOS/FRA, ATF/CREB

et MAF. Les différents membres de cette famille peuvent s'homodimériser ou s'hétérodimériser *via* les domaines bZIP (basic region-leucine zippers) pour former différents complexes AP-1 qui vont se fixer sur leurs éléments de réponse respectifs au niveau des promoteurs des gènes cibles. En condition physiologique, les différents membres de la famille AP-1 sont impliqués dans l'homéostasie prolifération/différenciation de l'épiderme. c-Jun est également impliqué dans la croissance des neurites au niveau du système nerveux central. Dans la tumorigenèse, les rôles des différents membres de la famille AP-1 sont variables. Alors que les membres JUNB et FOS seraient plutôt des gènes suppresseurs de tumeurs, c-Jun aurait plutôt un rôle d'oncogène (Eferl and Wagner, 2003).

II.C.1.b. Régulation de l'expression du facteur de transcription c-Jun

L'expression de c-Jun peut être modulée au niveau transcriptionnel par la voie des MAPK, principalement *via* les kinases JNK et p38 qui vont phosphoryler les facteurs de transcription ATF2 et MEF2C et ainsi induire la transcription du gène de c-Jun. De plus, c-Jun, après activation, peut augmenter sa transcription par rétrocontrôle positif en se fixant sur les éléments de réponses TRE ou CRE au niveau de son propre promoteur (Angel et al., 1988). Ce « feed-back » positif est en partie régulé par l'histone déméthylase KDM4A. En effet, la déméthylation par cette dernière du promoteur de *JUN* facilite l'accessibilité du complexe AP-1 à ses éléments de réponse (Ding et al., 2013).

L'expression de c-Jun peut aussi être modulée au niveau traductionnel par différents miRNA comme par exemple le miR-125b qui se fixe au niveau des régions codantes de l'ARNm de c-Jun et empêche ainsi sa traduction (Kappelmann et al., 2013). De plus, il existe un autre mécanisme de régulation traductionnelle *via* les séquences IRES au niveau de l'ARNm de c-Jun (Blau et al., 2012).

Le mécanisme de régulation post-traductionnelle de c-Jun est complexe et participe également à la régulation de son expression. Son activité est modulée en fonction des modifications post-traductionnelles (phosphorylation, acétylation ou SUMOylation). Les phosphorylations au niveau du domaine N-terminal par les kinases JNK, ERK ou p38 sur les sérines 63 et 73 et les thréonines 91 et 93 sont particulièrement importantes pour la stabilité et la fonction transactivatrice de c-Jun (Morton et al., 2003). D'autres kinases ont également été décrites pour phosphoryler c-Jun sur les résidus 63 et 73 telles que CDK3, CDK4, VRK1 et PLK3 (Cho et al., 2009; Sevilla et al., 2004; Vanden Bush and Bishop, 2011;

Wang et al., 2007). Les phosphorylations des sérines 63 et 73 sont surtout impliquées dans l'activation de c-Jun alors que les phosphorylations des thréonines 91 et 93 par JNK sont plutôt impliquées dans la stabilité et l'interaction de c-Jun avec l'ADN. Enfin, la phosphorylation du résidu Thr239 par la GSK3 β suite à la phosphorylation de la Ser243 par une kinase non connue à ce jour, est responsable du recrutement des ubiquitine-ligases FBW7 et COP1 et de la dégradation de c-Jun par le protéasome (Shao et al., 2013). D'autre part, la calcineurine, une phosphatase capable de déphosphoryler la Ser243, peut annuler la dégradation de c-Jun en augmentant sa stabilité (Huang et al., 2008). Un travail de 1991 décrivait également que la phosphatase PP2A agissait sur c-Jun (Black et al., 1991). Cependant, des travaux plus récents montrent que l'effet observé de la PP2A sur c-Jun serait plutôt lié à l'action de la PP2A sur JNK (Shanley et al., 2001). Enfin, Rack1 peut se fixer au complexe c-Jun / Fbw7 pour former un complexe et empêcher la dégradation de c-Jun par le protéasome et ainsi augmenter sa stabilité (Zhang et al., 2012) alors que la protéine BLM favorise sa dégradation du complexe (Priyadarshini et al., 2018).

Enfin, la SUMOylation de c-Jun sur le résidu de lysine 229 réduit son activité transcriptionnelle et sa désSUMOylation par SENP1 (SUMO protéase) l'augmente. c-Jun est également acétylé par p300 en position K271 mais son rôle a été très peu étudié (Lopez-Bergami et al., 2010).

La Figure 24 résume les principales modifications post-traductionnelles du facteur de transcription c-Jun.

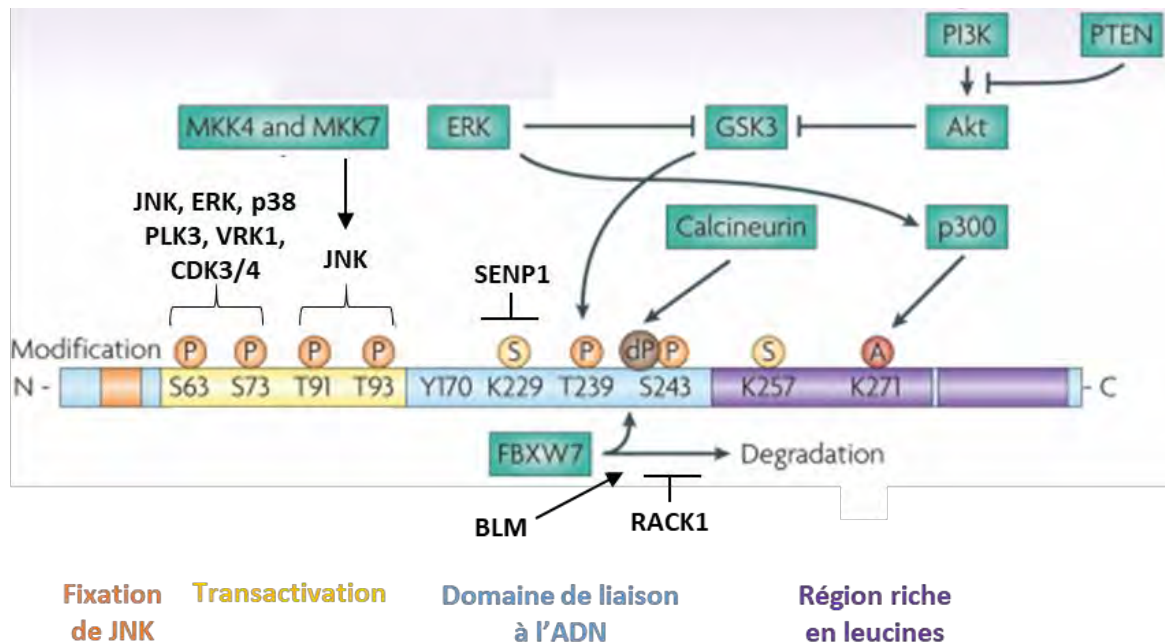


Figure 24: Schéma des principales modifications post-traductionnelles de c-Jun *adapté de (Lopez-Bergami et al., 2010)*

II.C.1.c. c-Jun et mélanome

Plusieurs travaux suggèrent que c-Jun serait le principal facteur de transcription de la famille AP-1 impliqué dans la progression du mélanome. Ainsi, l'expression de dominants négatifs de c-Jun dans des souris transgéniques prévient l'apparition de tumeurs de la peau (Young et al., 1999). De plus, Lopez-Bergami P. et ses collègues ont démontré que ERK active c-Jun dans le mélanome. Ce dernier, induit la transcription de RACK1 et de cycline D1 (Lopez-Bergami et al., 2007). Plus récemment, des travaux ont montré un lien entre le micro-ARN miR-125b sous exprimé dans le mélanome et une augmentation de l'expression de c-Jun (Kappelmann et al., 2013). Spangler B. et ses collaborateurs ont observé une augmentation de l'expression de c-Jun après la perte de la E-cadhérine dans le mélanome (Spangler et al., 2011). Plus précisément, la perte de E-cadhérine active le facteur de transcription ETS-1 qui induit l'expression de RhoC qui à son tour stabilise c-Jun dans le mélanome avec pour conséquence une augmentation de la prolifération (Spangler et al., 2012). Il a également été démontré que la tetraspanine CD9 induit l'expression de MMP-2 dans des cellules de mélanomes humains en activant l'axe JNK/c-Jun (Hong et al., 2005). D'autre part, la surexpression de MAGE-A1 (Melanoma antigen family A1) dans des cellules de mélanomes entraîne une augmentation de la croissance tumorale et des métastases par activation

directe de c-Jun ou par l'intermédiaire de ERK (Wang et al., 2016). De la même manière, MALT1 promeut la prolifération et la motilité cellulaire *via* l'axe JNK/c-Jun (Wang et al., 2017). Enfin, une étude récente sur l'analyse des données de ChiP-Seq sur 3 lignées autres que des mélanomes a révélé, que sur 44 cibles directes de c-Jun, 6 d'entre-elles sont dérégulées dans les mélanomes (Schummer et al., 2016). D'autre part, les cellules de mélanomes ayant un phénotype MITF^{low} présentent un phénotype pro-inflammatoire lié à une augmentation de l'expression de c-Jun. De plus, ces cellules sont responsables du recrutement des macrophages pro-tumoraux (Riesenberg et al., 2015).

Toutes ces études montrent donc que c-Jun joue un rôle clé dans le développement et la progression du mélanome et qu'il serait intéressant de le cibler afin de traiter les mélanomes. Enfin, de plus en plus de travaux montrent un rôle de c-Jun dans la modulation de la réponse aux inhibiteurs de la voie des MAPK qui sera détaillé dans le chapitre III de cette thèse augmentant ainsi l'intérêt du ciblage de c-Jun dans le mélanome.

III. Inhibiteurs de la voie des MAPK utilisés en clinique : de l'espoir à la désillusion

III.A. Généralités

L'utilisation des inhibiteurs de la voie des MAPK a considérablement amélioré la survie et la qualité de vie des patients atteints de mélanomes métastatiques. Cependant, dès les premiers essais cliniques, de nombreux cas de résistances ont commencé à émerger. Ainsi durant l'essai clinique BRIM-3, alors que certains patients présentaient une réponse clinique complète (cercle vert Figure 25) et durable, d'autres présentaient déjà une réponse moindre, voire absente (cercle rouge Figure 25) (Chapman et al., 2011).

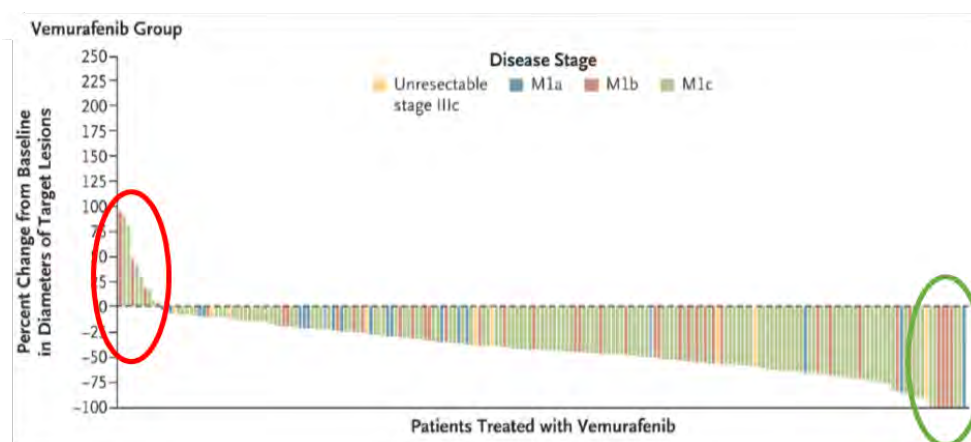


Figure 25 : Evolution de la taille tumorale par patient dans le groupe vemurafenib de l'essai clinique BRIM-3 adapté de (Chapman et al., 2011)

De plus, plusieurs travaux *in vitro* montraient des mécanismes de résistance aux inhibiteurs de BRAF qui seront détaillés dans le prochain paragraphe de ce chapitre. Actuellement, 70 % des patients répondent aux traitements associant les inhibiteurs de BRAF et de MEK. Cependant, le taux de survie sans progression à 3 ans n'est que de 20 %. Cette perte d'efficacité de 50 % sur 3 ans illustre bien l'apparition de résistances à ces traitements.

Les termes de résistance primaire / secondaire sont définis sur des critères cliniques. Lorsque les patients rechutent dans les 6 mois après le début du traitement, le terme de résistance primaire est employé. Au-delà de 6 mois, il s'agit de résistance secondaire.

Les résistances secondaires peuvent être dues à la sélection d'un clone minoritaire, à l'acquisition de nouvelles mutations ou à l'acquisition d'un nouveau phénotype cellulaire due à une reprogrammation de l'expression génique.

Quel que soit le type de résistance, le mécanisme en cause peut être soit d'origine génétique, soit lié à une adaptation de la cellule au traitement conduisant :

- soit à une réactivation de la voie des MAPK et/ou de la voie PI3K/AKT
- soit à un switch phénotypique responsable de l'échappement thérapeutique

III.B. Réactivation de la voie MAPK ou PI3K/AKT

III.B.1. La réactivation de la voie par RAS

En 2010, R. Nazarian et ses collègues ont montré que des cellules de lignées de mélanomes *BRAF*-mutés deviennent résistantes après traitement *in vitro* aux BRAFi, par acquisition de mutations activatrices de *NRAS* au niveau du codon 61 (Q61K) (Nazarian et al., 2010). Des travaux sur des cellules de cancer du colon *BRAF*-mutées ainsi que chez des patients atteints de ces cancers ont montré que l'amplification de *KRAS* est également associée à une résistance aux inhibiteurs de la voie des MAPK (Ahronian et al., 2015). Enfin, tout récemment, des travaux ont montré qu'une augmentation de l'expression de *KRAS wild-type* était corrélée à une progression du mélanome. De plus, dans cette même étude l'inhibition de *KRAS* prévient l'hyperactivation paradoxale de la voie MAPK et potentialise l'effet des inhibiteurs de *BRAF* dans des lignées initialement résistantes à ces derniers (Dietrich et al., 2018).

La perte d'expression de *NF1* permet une réactivation de *RAS* et de la signalisation en aval dans des lignées de mélanomes *BRAF*-mutées (Nissan et al., 2014; Whittaker et al., 2013). De plus, la perte de *NF1* est également liée à la résistance des cellules de mélanomes *BRAF* et *NRAS wild-type* ayant un fort taux de *RAS-GTP* aux inhibiteurs de *MEK* (Nissan et al., 2014). Une étude récente a montré que certains mélanomes qui n'ont pas de délétion de *NF1* ont une expression augmentée de calpaine 1 (*CAPN1*). Cette dernière est responsable de la dégradation de *NF1* entraînant une diminution de la sensibilité des cellules aux inhibiteurs de *MEK* par réactivation de *RAS*. L'utilisation d'inhibiteurs de *CAPN1* restaure cette sensibilité (Alon et al., 2018).

Tous ces mécanismes de réactivation de *RAS* augmentent le phénomène déjà décrit de réactivation paradoxale de la voie MAPK dans le paragraphe II.B.6.a. En effet, *RAS* induit la formation de dimères *CRAF/BRAF* qui induisent l'activation des voies en aval *via* *CRAF*.

III.B.2. Les résistances liées à RAF

Contrairement au récepteur de l'EGFR qui acquiert des mutations secondaires en réponse aux inhibiteurs à tyrosine kinase (erlotinib, gefitinib) dans le cancer du poumon, les mutations secondaires au niveau de BRAF sont rares sous inhibiteurs de la voie des MAPK. Ces mutations secondaires sont appelées mutations « gatekeeper » et empêchent l'inhibiteur de se fixer à sa cible. Des modèles *in vitro* et *in vivo* sur des xénogreffes ont montré que ce genre de mutation de BRAF entraîne une résistance des cellules de mélanomes aux inhibiteurs de ce dernier (Whittaker et al., 2010). Très récemment, une mutation secondaire au niveau de BRAF a été décrite chez un enfant atteint d'une tumeur cérébrale BRAF^{V600}-mutée traitée par dabrafenib. En effet, l'acquisition de la double mutation V600E / L514V de BRAF est responsable de la rechute de ce patient en permettant la dimérisation de RAF et en activant la signalisation en aval (Wang et al., 2018a).

Chez 20 % des patients, des amplifications du gène *BRAF* sont retrouvées et entraînent des résistances aux inhibiteurs de BRAF (Shi et al., 2012; Stagni et al., 2018). Ces amplifications sont également retrouvées dans des modèles de cancers de colon *BRAF*-mutés (Ahronian et al., 2015).

Des travaux ont montré que, des variants d'épissage alternatif de BRAF qui aboutissent à la formation d'une protéine plus courte dépourvue du domaine RBD sont également responsables de résistances (Poulikakos et al., 2011). Ces variants se dimérisent de manière indépendante de RAS et activent la voie MAPK. Dans cette même étude, ce type de variants a également été retrouvé dans 30 % de tumeurs de patients présentant une résistance acquise au vemurafenib.

Enfin, récemment, les mutants de BRAF ont été classés en 3 classes (voir paragraphe II.B.4.b.). Seuls ceux de la classe I (mutants V600) sont sensibles aux inhibiteurs de la voie des MAPK actuellement sur le marché. Si des clones co-existent au sein de la tumeur avec des mutants de classe II et III, ces derniers pourraient entraîner également des résistances (Dankner et al., 2018a). En effet des études ont montré dans le poumon que les cellules mutées BRAF-non V600 sont dépendantes des RTK et résistantes aux BRAFi (Kotani et al., 2018). La classe II est divisée en 2 sous-classes. Une étude récente a montré une efficacité de la combinaison des inhibiteurs de BRAF et MEK sur la sous-classe IIA (L597S) dans des modèles de PDX (Dankner et al., 2018b; Johnson and Dahlman, 2018).

Pour conclure, la réactivation de la voie des MAPK peut également être due à une surexpression de CRAF. Cette dernière est responsable d'une diminution de la sensibilité des cellules aux inhibiteurs de BRAF et a été retrouvée dans des lignées de mélanomes rendues résistantes (Montagut et al., 2008; Su et al., 2012b). Ce type de résistance n'a, en revanche, pas été décrit chez des patients.

III.B.3. Les mutations de MEK et ERK

En 2009, Emery C. et ses collègues ont montré l'acquisition de plusieurs mutations de MEK1 liées à des résistances sur des cellules de mélanome *BRAF*-mutées rendues résistantes à l'AZD6244 (inhibiteur allostérique de MEK). En particulier, la mutation MEK1^{P124L} a été retrouvée chez des patients atteints de mélanomes *BRAF*-mutés en rechute après traitement par AZD6244. De plus, les cellules *BRAF*-mutées rendues résistantes à l'inhibiteur de MEK par acquisition de la mutation MEK1^{P124L} étaient également résistantes au PLX4720 (inhibiteur de BRAF). Enfin, l'association BRAFi et MEKi prévenait l'apparition de cette mutation (Emery et al., 2009). Par la suite, Wagle N. a identifié en 2011 la mutation MEK1^{C121S} dans la métastase d'un patient en rechute sous vemurafenib (Wagle et al., 2011). Les mutations MEK1^{Q65P} et MEK1^{E203K} ont également été associées à des résistances au vemurafenib chez des patients atteints de mélanomes en rechute (Trunzer et al., 2013). Enfin, la mutation MEK1^{F53L} est associée à une résistance à l'association dabrafenib et trametinib dans le cancer du colon (Ahronian et al., 2015).

La mutation MEK2^{Q60P} est également responsable de la résistance à la combinaison dabrafenib et trametinib dans le mélanome (Villanueva et al., 2013) ainsi que la mutation MEK2^{L46F} (Van Allen et al., 2014).

Enfin, en plus d'être activée par les protéines RAF, MEK peut être activée par d'autres MAP3K telles que MEKK1, MEKK2/MEKK3, MAP3K8 (aussi appelée COT) et MLK1 à 4. Ainsi, la surexpression de COT a été associée à une résistance au vemurafenib sur des cellules rendues résistantes et chez des patients en rechute après traitement par inhibiteur de MEK ou de BRAF (Johannessen et al., 2010).

Des études *in cellulo*, ont également montré que des mutations des kinases ERK 1 et 2, en particulier ERK1^{A206V}, ERK1^{S219P}, ERK2^{A189V} et ERK2^{S202P}, pourraient être associées à des résistances aux inhibiteurs de MEK et BRAF seuls ou en association (Goetz et al., 2014). Cependant aucune mutation de ce type n'a pour le moment été retrouvée chez les patients.

III.B.4. La surexpression des RTK

Nazarian R. a été le premier à avoir décrit que la surexpression des récepteurs RTK avait un rôle dans la résistance aux inhibiteurs de la voie des MAPK (Nazarian et al., 2010). En effet, il a montré sur des lignées rendues résistantes ainsi que sur des tumeurs de patients résistants au vemurafenib la surexpression du récepteur PDGFR β . Parallèlement, Villanueva J. et ses collègues ont montré que des taux élevés du récepteur IGF-1R étaient associés à une augmentation de la phosphorylation d'AKT dans des lignées rendues résistantes au vemurafenib et sur des coupes de tumeurs de patients (Villanueva et al., 2010). La surexpression du récepteur PDGFR β est également associée à des taux élevés de phospho-AKT dans des lignées résistantes au PLX4032 (Shi et al., 2011). Des amplifications de *MET* ont également été retrouvées dans des lignées rendues résistantes au PLX4032 (Vergani et al., 2011). La surexpression de l'EGFR dans des lignées résistantes active également la voie PI3K / AKT (Girotti et al., 2013). Abel E. et ses collaborateurs ont montré une induction du facteur de transcription FOXD3 sous inhibition de BRAF dans des cellules de mélanomes *BRAF*-mutées. FOXD3 est responsable de la transcription et de l'expression d'une de ces cibles, le récepteur ERBB3, qui active la voie PI3K/AKT et diminue la sensibilité des cellules au PLX4032 (Abel et al., 2013). Une étude a également montré sur des tumeurs de patients résistants, qu'après traitement au vemurafenib ou au trametinib, il y a une diminution de l'expression du facteur de transcription SOX10 associée à une augmentation de l'expression de l'EGFR, du PDGFR ainsi que des TGFBR2 et TGFBR3 (Sun et al., 2014). Le facteur de transcription MITF semble également impliqué dans la régulation de l'expression de l'EGFR en réponse au vemurafenib (Ji et al., 2015). D'autres récepteurs ont également été retrouvés impliqués dans la résistance aux inhibiteurs de BRAF tels que le FGFR3 associé à une forte activité de la voie PI3K/AKT (Yadav et al., 2012) ou encore plus récemment le récepteur EphA2 (Miao et al., 2015).

Il est intéressant de noter que ces mécanismes semblent communs aux différents cancers traités par les inhibiteurs de MEK et/ou BRAF. En effet, la surexpression de l'EGFR est associée à une résistance innée des cellules aux inhibiteurs de BRAF dans le cancer du colon (Corcoran et al., 2012) tout comme la surexpression de HER2 ou HER3 (Herr et al., 2018).

Enfin dans le cancer de la thyroïde, la surexpression de l'EGFR induit l'activation de la voie PI3K/AKT responsable de la diminution de la sensibilité des cellules aux inhibiteurs de BRAF (Notarangelo et al., 2017). De plus, le PLX4032 induit une augmentation de l'activité de l'axe

IL-6/JAK/STAT3 dans les lignées de cancers de thyroïde responsable d'une diminution de sensibilité des cellules au vemurafenib (Notarangelo et al., 2018) également décrit dans le mélanome (Liu et al., 2013).

III.B.5. Les autres mécanismes

La voie PI3K/AKT peut être réactivée soit par la surexpression des RTK comme cité dans le paragraphe précédent, soit par acquisition de mutations au niveau des différents acteurs de la voie. Ainsi des travaux ont montré l'acquisition de mutations « gain de fonction » au niveau d'AKT1. En particulier, 2 mutations sont retrouvées chez des patients en rechute de traitement aux inhibiteurs de BRAF : AKT1^{E17K} et AKT1^{Q79K} (Shi et al., 2014a, 2014b). Ces mutations étaient absentes des tumeurs initiales. Dans cette même étude, des mutations « gain de fonction » de la sous-unité catalytique de PIK3CA^{D350G} ont également été retrouvées. Cette mutation a pour conséquence une diminution de son interaction avec sa sous-unité régulatrice. Enfin, la délétion M134 au niveau de PTEN induit son inactivation responsable d'une activation constante de la voie PI3K/AKT qui induit une diminution de la sensibilité des cellules aux inhibiteurs de BRAF (Shi et al., 2014b). Des travaux du laboratoire ont également montré une activation d'AKT en réponse au PLX4032 dépendante de la petite GTPase RHOB. De plus, l'association de l'inhibiteur d'AKT avec le PLX4032 potentialise la mort cellulaire *in vitro* et *in vivo* sur des modèles de xénogreffes (Delmas et al., 2015). De nombreux autres travaux ont également montré que l'utilisation d'inhibiteurs de la voie PI3K/AKT potentialise l'effet des inhibiteurs de BRAF (Carlino et al., 2014; Deuker et al., 2015; Shi et al., 2014a).

Enfin, la réactivation de la voie MAPK peut être liée à une mutation de la GTPase RAC1. En effet, la mutation RAC1^{P29S} est retrouvée dans 4 à 9 % des mélanomes et est associée à une résistance aux inhibiteurs de BRAF (vemurafenib et dabrafenib) (Watson et al., 2014). Le mécanisme par lequel RAC1 serait impliqué dans la réactivation de ERK n'est pas connu mais la mutation de RAC1^{P29S} est associée à une augmentation de la phosphorylation de ERK dans des mélanocytes (Krauthammer et al., 2012).

Pour finir, des amplifications du gène *CCND1* ont été associées à des résistances aux inhibiteurs de la voie MAPK (Smalley et al., 2008; Vergani et al., 2011). De plus, les cellules sont encore plus résistantes en présence de mutations de CDK4 associées (Smalley et al., 2008).

III.C. Les mécanismes de résistance liés au microenvironnement

Il est clairement admis que les inhibiteurs de la voie des MAPK modulent les interactions et les échanges des cellules tumorales avec leur microenvironnement ce qui peut participer à l'échappement thérapeutique des cellules tumorales. Le microenvironnement est, entre autres, constitué de cellules stromales, de cellules immunitaires et de la matrice extracellulaire. Les phénomènes de résistance induits par le microenvironnement peuvent faire intervenir des facteurs solubles ou des interactions avec la matrice extracellulaire.

III.C.1. Facteurs solubles et cytokines

Straussman et ses collaborateurs ont réalisé des expériences de co-cultures de cellules de mélanomes *BRAF*-mutées avec différents types de cellules stromales et traitées à des doses croissantes de différents inhibiteurs (Straussman et al., 2012). Les résultats de cette étude ont montré que la sécrétion de HGF (Hepatocyte Growth Factor) par les cellules stromales induit une activation du récepteur MET qui active à son tour les voies MAPK et PI3K/AKT responsables de la résistance des cellules de mélanomes aux inhibiteurs de BRAF. De plus, les patients dont les tumeurs avaient des taux élevés de HGF étaient d'emblée résistants aux inhibiteurs. En effet, l'axe HGF / MET est responsable d'une diminution de l'expression des protéines pro-apoptotiques PUMA et BIM (Rohrbeck et al., 2016). D'autre part, le vemurafenib stimule la sécrétion de FGF2 par les mélanocytes, les kératinocytes et les fibroblastes. Après fixation sur ses récepteurs, le FGF2 active l'axe STAT3-PAX3 responsable d'une diminution de la sensibilité des cellules au vemurafenib (Liu et al., 2013). De la même manière, sous inhibiteurs de BRAF et MEK, les cellules tumorales secrètent du FGF1. Ce dernier active d'une part, par action autocrine et paracrine sur les mélanocytes adjacents la prolifération des cellules de mélanome et d'autre part active les fibroblastes qui à leur tour secrètent de l'HGF (Grimm et al., 2018).

Le vemurafenib peut également induire la sécrétion de TGF β par les mélanocytes BRAF-mutés. Ce dernier induit l'activation des fibroblastes qui secrètent de l'HGF et de la neuréguline qui activent à leur tour la voie PI3K/AKT au niveau des mélanocytes (Fedorenko et al., 2015).

Enfin, en réponse aux inhibiteurs de BRAF, les cellules de mélanomes sensibles induisent la sécrétion de nombreux facteurs solubles (EGF, IGF1, PDGF, ...) qui agissent de manière autocrine et paracrine et contribuent à l'augmentation de la prolifération, de la croissance et

des métastases des cellules tumorales (Obenauf et al., 2015). Ces mécanismes impliquant les facteurs solubles ont également été décrits dans la résistance aux inhibiteurs de BRAF dans le cancer de la thyroïde (Knauf et al., 2018; Notarangelo et al., 2018).

Enfin, une étude plus récente, sur des cellules de mélanomes en co-culture avec des fibroblastes ou non, a montré qu'en présence de fibroblastes, les cellules de mélanomes « switchent » vers un phénotype de type mésenchymateux, dédifférencié et inflammatoire responsable d'une diminution de la sensibilité aux inhibiteurs de BRAF (Seip et al., 2018). Ces résultats suggèrent que le microenvironnement est également impliqué dans le « switch phénotypique » (détaillé dans le paragraphe III.D).

Les cellules immunitaires telles que les macrophages sont également capables de sécréter des cytokines impliquées dans la modulation de la réponse aux inhibiteurs de BRAF. Par exemple, une étude a montré que les macrophages associés aux tumeurs secrètent de l'IL-1 β . Cette dernière induit au sein des fibroblastes la production de ligands du récepteur CXCR2 qui, en se fixant sur leurs récepteurs au niveau des cellules de mélanomes, induisent la résistance de ces cellules aux inhibiteurs de BRAF (Young et al., 2017). De la même manière, l'inhibition de la voie MAPK peut induire une sécrétion de TNF α par les macrophages associés aux tumeurs responsable d'une augmentation de la croissance tumorale (Smith et al., 2014).

III.C.2. Les résistances liées aux interactions avec la matrice extracellulaire

Une étude a montré que l'inhibiteur de BRAF PLX4720 est responsable de l'activation des fibroblastes associés aux cellules de mélanome. Ces derniers sont responsables d'un remodelage de la matrice extracellulaire qui aboutit à une activation de l'axe de signalisation intégrine β 1 / FAK / SRC ayant pour conséquence une réactivation de ERK dans les cellules de mélanomes responsable de la résistance à cet inhibiteur (Hirata et al., 2015).

D'autre part, une induction de la sécrétion de la fibronectine (glycoprotéine de la matrice extracellulaire) a été trouvée sous vemurafenib dans les cellules de mélanomes BRAF^{V600E}/PTEN- ainsi que des taux élevés d'intégrine α 5 β 1 (molécule qui interagit avec la fibronectine) et de pAKT. Ces observations ont été confirmées *in vivo* sur des modèles de xénogreffes et sont responsables d'une diminution de la sensibilité des cellules aux inhibiteurs de BRAF (Fedorenko et al., 2016).

Konieczkowski et al., 2014; Van Allen et al., 2014). Plusieurs études ont montré des profils d'expression de gènes différents sur des biopsies de tumeurs avant traitement, pendant le traitement et à la rechute (Johannessen et al., 2013 ; Rambow et al., 2018) voire au sein d'un même échantillon tumoral (Konieczkowski et al., 2014). De plus, pour une même tumeur primaire, en fonction de la localisation de la métastase, les caractéristiques génétiques et phénotypiques peuvent varier (Reuben et al., 2017). Ceci montre également que le microenvironnement tumoral participe à cette hétérogénéité par la création de différentes niches tumorales au sein d'un même individu.

Cette hétérogénéité tumorale est donc une des principales origines de l'hétérogénéité de la réponse thérapeutique chez les patients.

L'essor des nouvelles technologies telles que le « RNAseq single cell » a permis d'augmenter la précision de l'analyse de cette hétérogénéité tumorale. En effet, l'analyse d'un groupe de cellules fait ressortir les phénotypes majoritaires alors que l'analyse à l'échelle de la cellule unique permet de déterminer plus précisément l'hétérogénéité des phénotypes présents au sein d'une tumeur. Le premier à avoir disséqué l'hétérogénéité tumorale du mélanome par cette technique a été Tirosh I. en 2016. Il a en effet montré que les cellules tumorales possèdent une hétérogénéité de profil transcriptionnel en fonction du cycle cellulaire des cellules, de leur localisation au sein de la tumeur ainsi que de leur sensibilité aux thérapies (Tirosh et al., 2016).

D'autre part, ces techniques permettent d'étudier la maladie résiduelle. En effet, les patients sont considérés en rémission clinique complète lorsqu'en imagerie la tumeur n'est plus détectable. Cependant, malgré cette rémission complète, les patients rechutent à plus ou moins long terme. Ces rechutes sont dues à la maladie résiduelle, c'est-à-dire à une population de cellules tolérantes aux inhibiteurs de la voie MAPK les « Drug Tolerant Cells » ou DTC (Luskin et al., 2018). Ce concept est assez récent et commence à être plus largement étudié dans le mélanome en réponse aux inhibiteurs de la voie MAPK mais également dans le cancer du poumon en réponse aux EGFR-TKI ou encore dans les hémopathies malignes. Les DTC sont des cellules qui ne se divisent pas ou peu et qui partagent certaines caractéristiques de la maladie initiale. Une étude a notamment montré que les DTC expriment certains marqueurs souches tels que CD271 et SOX10 et qu'elles présentent des capacités angiogéniques et tumorigènes (Ravindran Menon et al., 2015). Plusieurs études récentes ont mis en évidence sur des lignées cellulaires ou sur des modèles de PDX (Patient-

Derived Xenograft) grâce à ces techniques « single cell » différents profils phénotypiques en réponse aux inhibiteurs de la voie MAPK. Notamment, trois phénotypes ressortent principalement et en commun dans ces différentes études : le phénotype souche, le phénotype invasif MITF^{low}/AXL^{high} et un phénotype très différencié associé à la signature MITF. Les DTC sont de plus en plus considérées comme responsables des rechutes en raison de la présence du phénotype souche.

III.D.2. Le phénotype souche

Les cellules souches cancéreuses sont caractérisées par leur capacité d'auto-renouvellement et de prolifération illimitée. De plus, elles sont capables de reproduire le phénotype tumoral d'origine lorsqu'elles sont injectées dans un modèle murin immunodéprimé.

Dans son étude sur la dissection de l'hétérogénéité tumorale, Tirosh I. et ses collègues ont montré qu'au sein des tumeurs il existe une population de cellules qui se divisent peu et qui est associée à un phénotype souche (Tirosh et al., 2016). En effet, ces cellules expriment le marqueur souche des cellules issues de la crête neurale, le NGFR. Par la suite, deux études ont également confirmé ces observations sur des lignées cellulaires ainsi que des tumeurs de patients (Fallahi-Sichani et al., 2017 ; Titz et al., 2016). Cette population cellulaire se divise peu et constitue un phénotype stable et réversible. En effet, le retrait du traitement (« drug-holiday ») pendant 9 jours re-sensibilise ces cellules au vemurafenib (Fallahi-Sichani et al., 2017). De plus, la surexpression des marqueurs souches de la crête neurale est corrélée à des concentrations inhibitrices plus élevées des cellules aux inhibiteurs de BRAF donc à la résistance (Su et al., 2017). Enfin, deux études récentes ont montré une dédifférenciation des cellules sous traitement aux inhibiteurs MAPK. D'une part, sur des lignées cellulaires traitées au vemurafenib, l'acquisition du phénotype souche se fait de manière continue à partir du phénotype différencié (Tsoi et al., 2018). D'autre part, dans des modèles de PDX, l'analyse des DTC sous traitement avec l'association dabrafenib-trametinib montre la présence d'une population de cellules exprimant des gènes spécifiques de la crête neurale (Rambow et al., 2018). Ces DTC sont des cellules qui prolifèrent peu en présence de drogue et ont un phénotype réversible, le retrait de la drogue induit une diminution des marqueurs souches. Dans cette étude, le récepteur X aux rétinoïdes (RXR) est impliqué dans l'acquisition de ce phénotype et que l'utilisation d'un inhibiteur de RXR en association avec les inhibiteurs de la voie des MAPK induit une augmentation de la survie sans progression *in vivo* par rapport au traitement standard (Rambow et al., 2018).

Enfin, l'inhibition du facteur de transcription ID3 (Inhibitor of differentiation protein 3) impliqué dans la survie des cellules progénitrices de la crête neurale sensibilise les cellules au vemurafenib (Sachindra et al., 2017).

III.D.3. MITF or not MITF ?

La transition de type « épithélio-mésenchymateuse » est le processus qui permet au mélanocyte d'acquérir la capacité de dégrader la matrice extracellulaire, ainsi que la capacité de migration des cellules afin de franchir la membrane basale entre l'épiderme et le derme et de disséminer dans l'organisme par voie sanguine ou lymphatique pour former des métastases.

Le phénotype MITF^{low} a été décrit comme présentant des caractéristiques invasives, migratoires et un potentiel tumorigène plus importants que les cellules MITF^{high} (Hoek et al., 2008; Rambow et al., 2015). De plus, les cellules MITF^{low} expriment fortement ZEB1, facteur de transcription clé de la TEM dans des cellules résistantes aux inhibiteurs de BRAF et dans des tumeurs de patients en rechute (Richard et al., 2016). Ces cellules ont des capacités invasives accrues (Müller et al., 2014) et expriment fortement des marqueurs d'invasion comme WNT5A, TGFB (Eichhoff et al., 2011; Verfaillie et al., 2015). Elles expriment également à leur surface des marqueurs de résistances tels que, par exemple, le RTK AXL (Müller et al., 2014) ou NF-κB (Konieczkowski et al., 2014). Récemment, une étude a montré que le ciblage du phénotype MITF^{low}/AXL^{high} par un anticorps conjugué à la Mono-Méthyl Auristatine (MMAE) dirigé contre AXL induit une sensibilisation des cellules de mélanome aux inhibiteurs de la voie MAPK (Boshuizen et al., 2018). De la même manière, plusieurs études « single-cell » ont mis en évidence des populations cellulaires résistantes aux inhibiteurs de la voie MAPK et présentant des marqueurs associés à la TEM tels que TGFB1, WNT5A, ZEB1 (Rambow et al., 2018 ; Su et al., 2017 ; Tsoi et al., 2018).

Alors que le phénotype MITF^{low} « invasif » est considéré comme le phénotype résistant, le phénotype MITF^{high} « prolifératif » peut également l'être. En effet, dans l'étude de Rambow F., une sous-population de DTC possède un phénotype très différencié associé à une forte expression de MITF. Une étude a notamment montré dans des lignées cellulaires de mélanome que certaines cellules présentaient une addiction à la drogue médiée par ERK2 (Kong et al., 2017; Lee and Marais, 2017). En effet, les auteurs montrent qu'en présence de l'inhibiteur de BRAF, ERK2 faiblement exprimé active l'expression de MITF responsable de

l'expression de BCL2 (facteur anti-apoptotique) et de la survie des cellules sous traitement. En revanche, lorsque la drogue est retirée ERK2 est activée de façon accrue et induit l'expression de JunB et FRA1. Ces derniers inhibent MITF donc l'expression de BCL2 avec pour conséquence la mort cellulaire. Par ailleurs, l'inhibition de MITF induit une perte de E-cadhérine et un switch phénotypique (Kong et al., 2017; Lee and Marais, 2017).

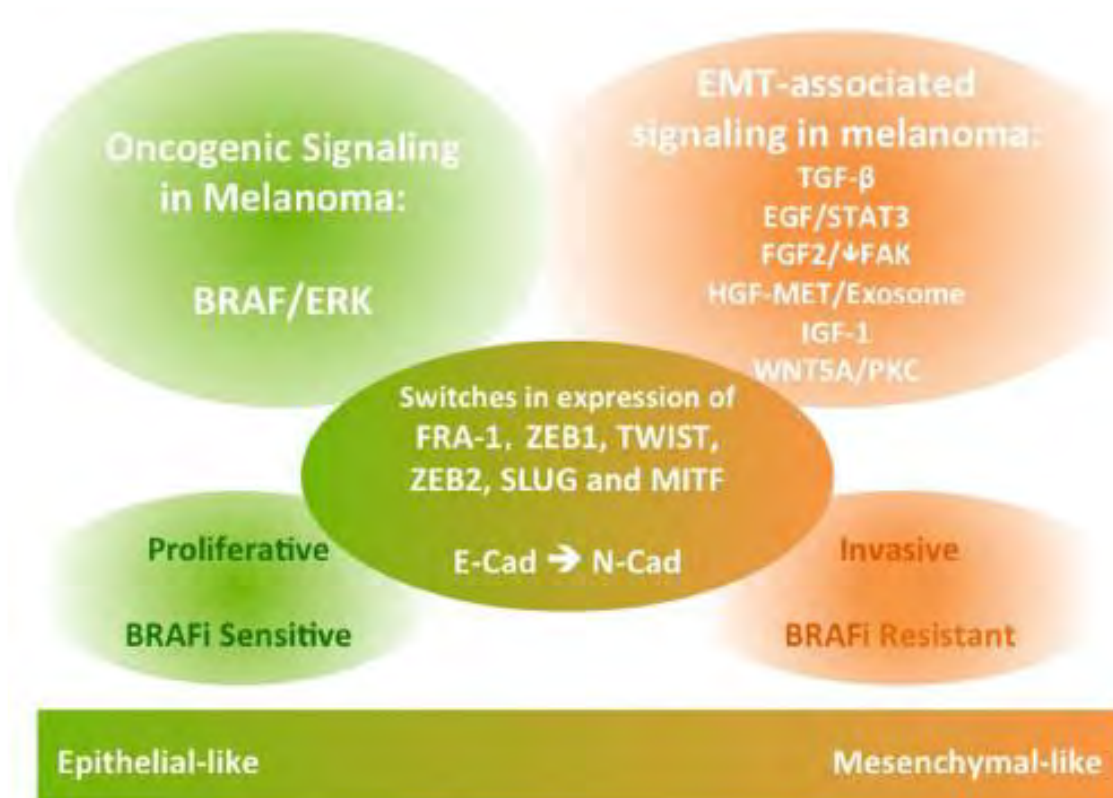


Figure 27 : Schéma récapitulatif des principaux acteurs et des principales voies de signalisations impliqués dans la TEM dans le mélanome tiré de (Li et al., 2015)

Enfin, une dernière étude a montré sur des lignées cellulaires que l'expression de MITF induit l'expression et la sécrétion d'endothéline 1 (EDN1) par les cellules MITF^{high}. L'EDN1 agit ensuite de façon paracrine sur les cellules MITF^{high} par liaison à ses récepteurs EDNRB et sur les cellules MITF^{low} par liaison à ses récepteurs EDNRA induisant la survie et la prolifération de toutes les cellules (Kuilman and Peeper, 2017; Smith et al., 2017).

III.D.4. Le switch métabolique

L'une des caractéristiques des cancers est le dérèglement du métabolisme énergétique. En effet, les cellules tumorales même en présence d'oxygène utilisent préférentiellement la glycolyse pour produire de l'énergie par rapport à la phosphorylation oxydative. C'est ce que l'on appelle l'effet Warburg. Haq R. et ses collaborateurs ont montré que l'inhibition de BRAF induit la réexpression de gènes impliqués dans la phosphorylation oxydative, l'augmentation du nombre de mitochondries et l'augmentation de l'expression de PGC1 α régulateur clé de l'activité mitochondriale. Ce dernier étant une cible directe de MITF (Haq et al., 2013). Ce switch métabolique est responsable d'une diminution de la sensibilité aux inhibiteurs de MAPK. En effet, l'inhibition de la phosphorylation oxydative induit une sensibilisation des cellules aux inhibiteurs de MAPK (Gopal et al., 2014).

D'autre part, Sharma SV. et ses collaborateurs, ont montré, sur des DTC de cancer du poumon non à petites cellules traitées par des EGFR-TKI, que l'état réversible de ces dernières peut être dû au remodelage de la chromatine (Sharma et al., 2010). Ces DTC se divisent peu et expriment fortement une déméthylase JARID1A. De la même manière, dans le mélanome, une étude a identifié que son homologue JARID1B est un marqueur des DTC essentiel au maintien de la croissance de ces cellules (Roesch, 2015; Roesch et al., 2013). En fonction des taux d'oxygène dans le microenvironnement, ces cellules sont capables de passer d'un état prolifératif JARID1B^{low} à un état peu prolifératif JARID1B^{high}. Ce dernier état induit la résistance des cellules à différentes drogues y compris les inhibiteurs de MAPK en régulant l'expression de gènes impliqués dans la phosphorylation oxydative. L'hypoxie est un facteur d'induction des DTC (Ravindran Menon et al., 2015; Roesch et al., 2013).

De plus, les cellules de mélanomes résistantes aux inhibiteurs de BRAF possèdent un taux de ROS (espèces réactives de l'oxygène) élevé. Les inhibiteurs des histones dé-acétylases suppriment l'expression de SLC7A11 à l'origine d'une augmentation plus importante des ROS qui devient délétère pour les DTC (Wang et al., 2018b).

Enfin dans leur étude Tsoi J. et ses collègues ont montré que la dédifférenciation des cellules sous inhibiteurs de la voie des MAPK les sensibilise à la ferroptose, mort cellulaire nécrotique liée à l'accumulation de lipides peroxydés dans la cellule. L'utilisation d'inhibiteurs de peroxydases telles que la GPX4 par exemple, sensibilise ces cellules aux inhibiteurs de BRAF (Kemeny and Fisher, 2018; Tsoi et al., 2018).

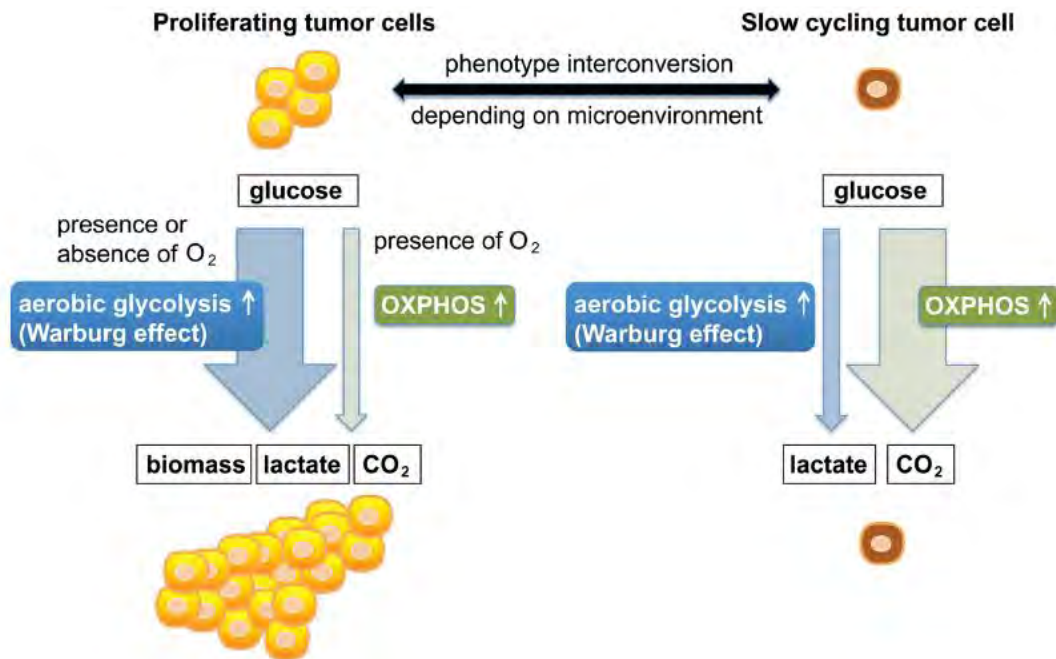


Figure 28 : Schéma montrant la liaison entre le switch métabolique et le switch phénotypique en fonction du microenvironnement tiré de (Roesch, 2015)

Enfin, l'autophagie peut être un moyen de résistance aux inhibiteurs de MAPK. En effet, une étude a montré que les inhibiteurs de BRAF induisent un stress du réticulum endoplasmique qui active à son tour une autophagie cytoprotective. L'inhibition de cette autophagie sensibilise les cellules aux inhibiteurs de BRAF (Ma et al., 2014).

III.D.5. Focus sur c-Jun et résistance aux inhibiteurs de la voie MAPK

Le facteur de transcription c-Jun est impliqué dans différents mécanismes de résistance cités dans les paragraphes précédents et joue un rôle clé dans la réponse adaptative des cellules aux inhibiteurs de la voie MAPK.

D'une part, l'expression de c-Jun est corrélée négativement à celle de MITF. En effet, dans l'étude de Sun et al., les mécanismes de surexpression de l'EGFR, du PDGFR, du TGFBR2 et du TGFBR3 semblent être associés à une augmentation de l'activité de c-Jun dans les cellules déficientes en SOX10 et MITF (Sun et al., 2014). Une deuxième étude a montré que les cellules MITF^{low} / c-Jun^{high} sont responsables de la croissance tumorale et ont une fonction immunosuppressive (Riesenberg et al., 2015).

Une étude a montré que les cellules résistantes aux inhibiteurs de BRAF présentaient une augmentation de l'expression de PD-L1 régulée au niveau transcriptionnel par c-Jun (Jiang et al., 2013). Cette étude montre que c-Jun est également impliqué dans la modulation de la réponse immunitaire en réponse aux inhibiteurs de BRAF.

Nos travaux au laboratoire ont permis d'observer, en réponse au vemurafenib une induction de c-Jun dans des lignées de mélanomes *BRAF*-mutées. Ce dernier induit la transcription d'une de ses cibles directes RHOB qui à son tour participe à la réactivation de la voie AKT responsable d'une diminution de la sensibilité des cellules au vemurafenib (Delmas et al., 2015). De la même manière, Fallahi-Sichani M. et ses collaborateurs ont montré sur un panel de lignées cellulaires *BRAF*-mutées que l'augmentation de l'activité de l'axe JNK / c-Jun entraîne une diminution de l'apoptose induite par les inhibiteurs de la voie MAPK. L'inhibition de JNK avec des inhibiteurs pharmacologiques en association avec le vemurafenib augmente la fraction apoptotique dans ces cellules (Fallahi-Sichani et al., 2015).

En parallèle de ces études Ramsdale R. et ses collègues ont démontré que la surexpression de c-Jun dans des lignées cellulaires est associée à un phénotype de type mésenchymateux. En effet, dans leur étude transcriptomique l'expression de c-Jun est corrélée à une « signature génétique mésenchymateuse » (Ramsdale et al., 2015). Les auteurs ont confirmé ces données sur une cohorte de patients traités par l'association BRAF inhibiteur et MEK inhibiteur. De la même manière, une étude a montré que l'augmentation de l'activité de voie JNK est associée à un phénotype invasif (Verfaillie et al., 2015).

En 2016, Titz B. et ses collaborateurs ont montré que l'activité de c-Jun est augmentée de façon précoce dans les cellules sensibles sous vemurafenib ou dabrafenib et que son expression est maintenue élevée dans les DTC et les cellules rendues résistantes. Ces résultats ont été confirmés sur des échantillons tumoraux de patients durant les premiers jours de traitement ainsi qu'au moment de la rechute. De plus, la déplétion de c-Jun induit une diminution du nombre de DTC sous vemurafenib (Titz et al., 2016). Enfin, l'acquisition du phénotype souche sous inhibition de la voie MAPK est en partie contrôlée par c-Jun (Fallahi-Sichani et al., 2017).

Enfin, une autre étude a montré par une analyse « single cell » qu'au sein d'une tumeur avant traitement il existe des populations qui expriment un faible nombre de marqueurs liés à des résistances (WNT5A, AXL, EGFR, PDGFR β , JUN). Cet état des cellules est considéré comme réversible : elles peuvent devenir sensibles à la drogue ou devenir résistantes de

manière stable. L'ajout du vemurafenib est responsable d'une reprogrammation de l'expression génique *via* une régulation épigénétique qui conduit à l'expression simultanée d'un plus grand nombre de marqueurs. Ces cellules acquièrent ainsi un phénotype résistant stable. Dans cette étude, c-Jun est retrouvé parmi les gènes de résistances (Shaffer et al., 2017).

III.D.6. Conclusion sur l'hétérogénéité tumorale

L'analyse de l'hétérogénéité tumorale montre le degré de complexité auquel il faut faire face afin de pallier les résistances aux thérapies ciblées et pouvoir guérir le mélanome. Les différentes études montrent que plusieurs phénotypes sont responsables de l'échappement thérapeutique. Réussir à cibler tous les phénotypes en même temps semble relever de l'utopie. En effet, toutes les études soulignent qu'il n'existe pas un phénotype unique responsable de la rechute et que tous les phénotypes semblent découler les uns des autres. L'étude de Rambow F. et ses collaborateurs a notamment montré une continuité dans l'acquisition des différents phénotypes. Le traitement dabrafenib-trametinib induit d'abord un switch du phénotype « prolifératif » au phénotype « hypométabolique ». A partir de ce phénotype les cellules choisissent soit la voie de la différenciation MITF^{high}, soit le phénotype MITF^{low}. Ce dernier se divise en deux sous-populations : les cellules SOX10^{high} appartiennent au phénotype souche alors que les SOX10^{low} appartiennent au phénotype invasif (Rambow et al., 2018). Contrairement à l'étude de Rambow F. qui suggère 2 trajectoires différentes entre le phénotype MITF^{low} et MITF^{high}, l'étude de Tsoi J. montre une continuité dans l'acquisition des différents phénotypes sous vemurafenib. Le phénotype MITF^{high} devient progressivement un phénotype transitoire exprimant des marqueurs souches et des marqueurs de différenciation, puis un phénotype souche et enfin un phénotype indifférencié et invasif (Tsoi et al., 2018). L'intérêt d'élucider les mécanismes responsables de tous ces phénotypes est donc de trouver un mécanisme le plus commun possible afin de pouvoir cibler une majorité de phénotypes est de proposer de nouvelles associations thérapeutiques dans le but de guérir les patients. Les études de Rambow F. et de Tsoi J. semblent bien confirmer que le phénotype MITF^{low} est le plus impliqué dans l'apparition des rechutes étant donné qu'il comporte les propriétés souches et invasives nécessaires à la formation de métastases. D'autre part, les marqueurs des différents phénotypes peuvent servir de biomarqueurs. En effet, afin de former des métastases et coloniser d'autres organes les cellules disséminent par voie sanguine ou lymphatique. L'analyse de l'expression des

différents marqueurs trouvés sur les cellules tumorales circulantes permettrait de prédire le phénotype majoritaire responsable de la rechute et le cibler avant que la métastase ne soit cliniquement détectable.

Enfin, quel que soit le phénotype DTC cet état est réversible et semble être dû à un remodelage de la chromatine. Plusieurs études ont montré en ce sens que les inhibiteurs de dé-acétylases ou de déméthylases semblent sensibiliser les DTC aux inhibiteurs de BRAF, ouvrant ainsi le champ à de nouvelles associations thérapeutiques.

Objectifs

L'objectif général de notre laboratoire est de comprendre les anomalies moléculaires des voies de signalisation des cellules cancéreuses et de traduire nos découvertes en nouvelles stratégies thérapeutiques. Le premier thème de recherche porte sur les voies de signalisation impliquant les récepteurs à activité tyrosine kinase (RTK)/RAS/MAPK et les RHO GTPases pour comprendre leur rôle dans le contrôle de la prolifération cellulaire, la survie et la progression tumorale, et concevoir de nouvelles stratégies thérapeutiques.

Nous avons ainsi montré que RHOB est induit dans les cellules de mélanomes en réponse aux inhibiteurs de la voie des MAPK (inhibiteurs de BRAF ou de MEK) avec pour conséquence, une diminution de la sensibilité des cellules à ces inhibiteurs par activation de la voie AKT (Delmas et al., 2015). De plus, nous avons montré qu'une expression élevée de RHOB sur des biopsies de mélanomes est un facteur prédictif de la faible sensibilité au vemurafenib chez les patients. De la même manière, la déplétion de RHOB induit une sensibilisation des cellules de cancer du poumon *EGFR*-mutées aux inhibiteurs de tyrosines kinases de l'*EGFR* tels que l'erlotinib (Calvayrac et al., 2017). D'autre part, nous avons montré, dans le mélanome, que RHOB est une cible directe du facteur de transcription c-Jun. En effet, après inhibition de la voie MAPK, l'expression de c-Jun est induite. Ce dernier se fixe alors sur le promoteur de *RHOB* au niveau de ses éléments de réponse et active sa transcription. Parallèlement, nous avons montré que la déplétion de c-Jun est responsable d'une sensibilisation des cellules aux inhibiteurs de la voie des MAPK (Delmas et al., 2015). Dans cette publication, nous avons étudié le rôle de c-Jun dans la modulation de la réponse aux inhibiteurs de la voie des MAPK sur une lignée de mélanome *BRAF*-mutée.

Le premier objectif de ma thèse a été de valider l'induction de l'expression de c-Jun dans différentes lignées cellulaires de mélanomes *BRAF*- ou *NRAS*-mutées et d'étudier son rôle dans la modulation de la réponse aux inhibiteurs de la voie des MAPK. Dans un deuxième temps, nous avons cherché à caractériser le mécanisme d'induction et d'activation de c-Jun dans la lignée de mélanome *BRAF*-mutée WM266-4. Enfin, c-Jun étant un facteur de transcription impliqué dans de nombreux processus physiologiques il semble difficile de pouvoir le cibler spécifiquement dans les cellules cancéreuses. En effet, les inhibiteurs de JNK testés en clinique n'ont, pour le moment, pas montré de rapport bénéfice/risque suffisant par voie générale (*per os*) afin de passer aux phases III. Le seul essai de phase III actuellement en cours est l'utilisation locale (application d'un gel au niveau du tympan) d'un inhibiteur de JNK (AM-111) dans la perte soudaine de l'audition (NCT02809118). Dans ce

contexte, le dernier objectif de ma thèse était donc d'identifier des cibles de c-Jun (autres que RHOB) pouvant être impliquées dans la modulation de la réponse aux inhibiteurs de la voie des MAPK. Ceci dans le but d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques et proposer de nouvelles associations avec les inhibiteurs de la voie MAPK.

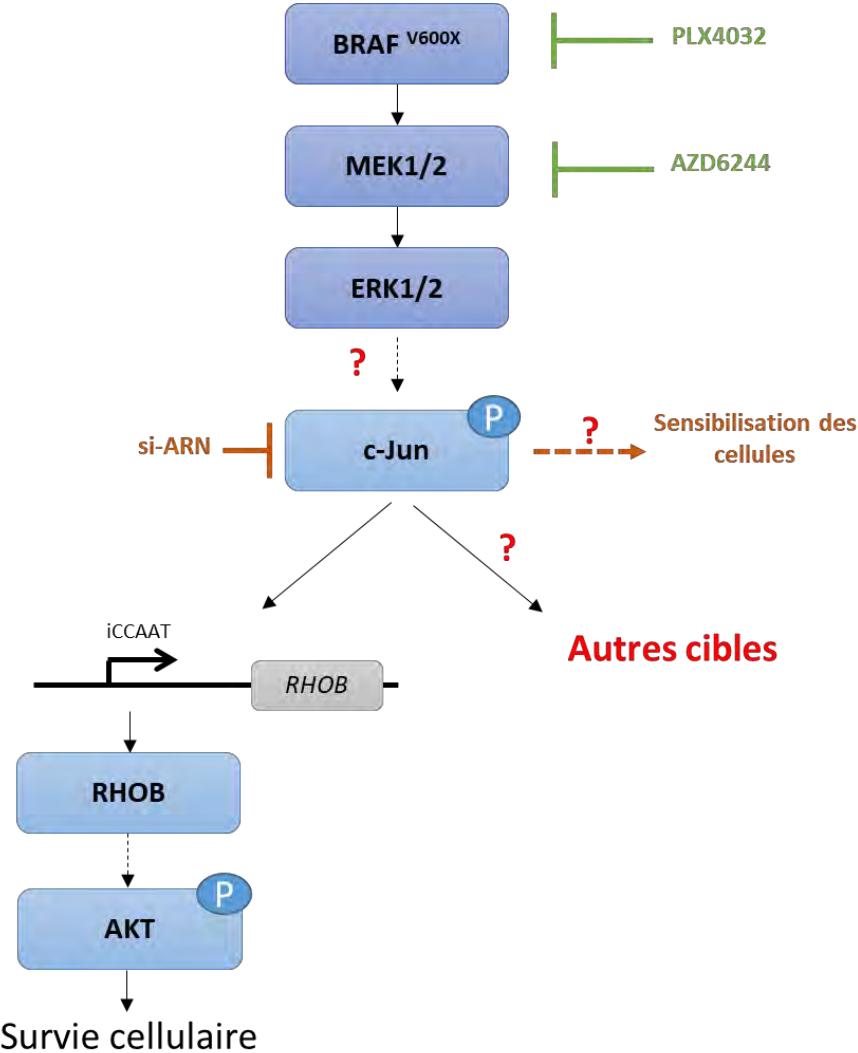


Figure 1 : Schéma résumant les travaux effectués avant ma thèse. Les objectifs de la thèse sont représentés en rouge.

Résultats et Discussion

Résultats objectif 1

1. Le facteur de transcription c-Jun est induit en réponse aux inhibiteurs de la voie des MAPK dans les lignées de mélanomes *BRAF*- et *NRAS*-mutées.

Nous avons montré une induction de la forme totale de c-Jun ainsi que de sa forme phosphorylée sur la sérine 63 après traitement par le vemurafenib ou PLX4032 dans les cellules de mélanomes *BRAF*-mutées WM266-4 (Delmas et al., 2015). Nous avons cherché d'une part lors de ce travail de thèse, à confirmer l'induction de c-Jun sur d'autres lignées *BRAF*-mutées par le PLX4032 (ou vemurafenib ; inhibiteur de BRAF muté) et l'AZD6244 (inhibiteur de MEK).

Le facteur de transcription c-Jun possède plusieurs sites de phosphorylation comme décrit dans le paragraphe II.C.1.b. Les phosphorylations en N-terminal de la protéine notamment des sérines 63 et 73 sont particulièrement importantes pour sa fonction transactivatrice et sa stabilité. La phosphorylation au niveau du résidu thréonine 239 est quant à elle impliquée dans la dégradation du facteur de transcription par le protéasome. Ainsi les travaux du laboratoire n'ayant étudié la phosphorylation de c-Jun que sur sa sérine 63, nous avons également étudié la phosphorylation de c-Jun sur la Ser73 et la Thr239 après traitement des cellules par les deux inhibiteurs de la voie des MAPK.

Pour cela, les lignées de mélanomes métastatiques *BRAF*-mutées, WM266-4, A375 et WM239A, ont été traitées par du PLX4032 ou de l'AZD6244 (Figure 2A). Quel que soit l'inhibiteur utilisé, nous observons une induction de l'expression de c-Jun dans les trois lignées *BRAF*-mutées étudiées après 48 h de traitement. De la même manière, nous observons une augmentation de la forme active de c-Jun représentée par l'augmentation de la phosphorylation sur les sérines 63 et 73. Ces résultats montrent que l'inhibition de la voie des MAPK, illustrée par l'inhibition de p-ERK, induit l'expression de c-Jun ainsi que son activation dans les différentes lignées de mélanome *BRAF* mutées analysées.

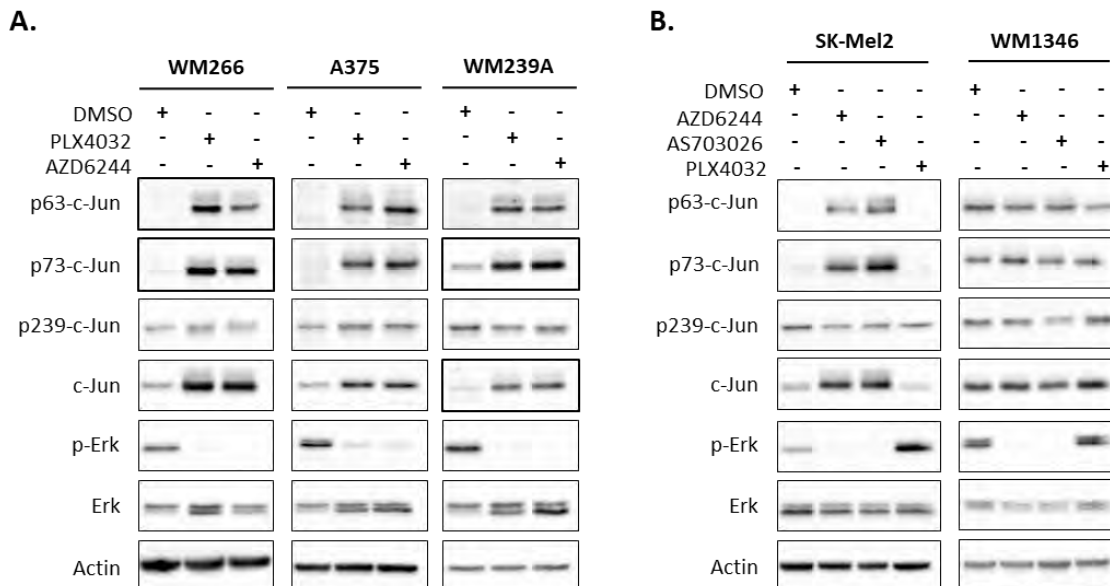


Figure 2 : L'inhibition de la voie des MAPK induit une augmentation de l'expression de la forme totale et active de c-Jun dans les lignées *BRAF*-mutées et de manière variable dans les lignées *NRAS*-mutées. Les cellules *BRAF*-mutées (A.) et *NRAS*-mutées (B.) ont été traitées pendant 48 h en présence d'un inhibiteur de *BRAF* (PLX4032 1 μ M) ou d'un inhibiteur de MEK (AZD6244 1 μ M ou AS703026 1 μ M). L'expression des différentes formes phosphorylées de c-Jun ainsi que de sa forme totale a été analysée par Western Blot. L'expression de p-Erk sert de contrôle d'inhibition de la voie MAPK et l'actine sert de contrôle de dépôt (représentatif $n=3$).

Nous avons ensuite voulu vérifier si l'induction de c-Jun sous inhibiteurs de la voie des MAPK est un phénomène spécifique des lignées *BRAF*-mutées ou s'il est présent dans des lignées avec d'autres mutations de la voie des MAPK. Nous avons donc choisi deux lignées *NRAS*-mutées que nous avons traitées avec deux inhibiteurs de MEK différents (AZD6244 et AS703026) et au PLX4032 (Figure 2B). En absence de mutation de *BRAF*, nous observons comme attendu une inefficacité du PLX4032 sur l'inhibition de la phosphorylation de ERK et pas d'induction de c-Jun. L'inhibition de la voie MAPK, que ce soit par l'AZD6244 ou l'AS703026 induit une augmentation de l'expression de c-Jun ainsi que de son activation dans la lignée SK-Mel2 mais en revanche pas dans la lignée WM1346.

Alors que l'induction de c-Jun est observée dans toutes les lignées *BRAF*-mutées lorsque la voie MAPK est inhibée, ces résultats montrent que dans les lignées *NRAS*-mutées l'induction de c-Jun ainsi que de son activation est variable en fonction de la lignée cellulaire. On peut noter que la lignée WM1346 semble avoir une expression basale de c-Jun plus importante que la lignée SK-Mel2 ce qui pourrait expliquer l'absence d'induction dans cette lignée. Des expériences complémentaires sont nécessaires afin de confirmer ces observations.

Enfin, dans les lignées *BRAF*- ou *NRAS*-mutées que nous avons étudiées, il n'y a pas de variation significative de la phosphorylation sur le résidu Thr239 lorsque la voie MAPK est inhibée (Figure 2A et B). Ces résultats suggèrent que le ratio p239-c-Jun / c-Jun a tendance à diminuer indiquant une diminution de la dégradation de la protéine.

2. La déplétion de c-Jun induit une sensibilisation des cellules de mélanomes *BRAF*- et *NRAS*-mutées aux inhibiteurs de la voie des MAPK.

Nous avons montré dans la lignée WM266-4, que la déplétion de c-Jun induit une sensibilisation de ces cellules au vemurafenib (Delmas et al., 2015). Nous nous sommes donc demandés si ce mécanisme est généralisable aux différentes lignées *BRAF*- et *NRAS*-mutées. Pour cela, nous avons transfecté les cellules avec des siARN dirigés contre c-Jun afin de prévenir son induction sous traitement. Nous avons ensuite traité les cellules à des doses croissantes d'inhibiteur de BRAF (PLX4032) pour les lignées *BRAF*-mutées et d'inhibiteur de MEK (AZD6244) pour les lignées *NRAS*-mutées.

Les résultats des tests de viabilité montrent que dans toutes les lignées, la déplétion de c-Jun induit une diminution de la CI50 de l'inhibiteur utilisé et donc une sensibilisation des cellules aux inhibiteurs de la voie MAPK (Figure 3). Il est intéressant de noter que, même en absence d'induction de c-Jun, la déplétion de ce dernier sensibilise les cellules aux inhibiteurs de MEK (lignée *NRAS*-mutée WM1346).

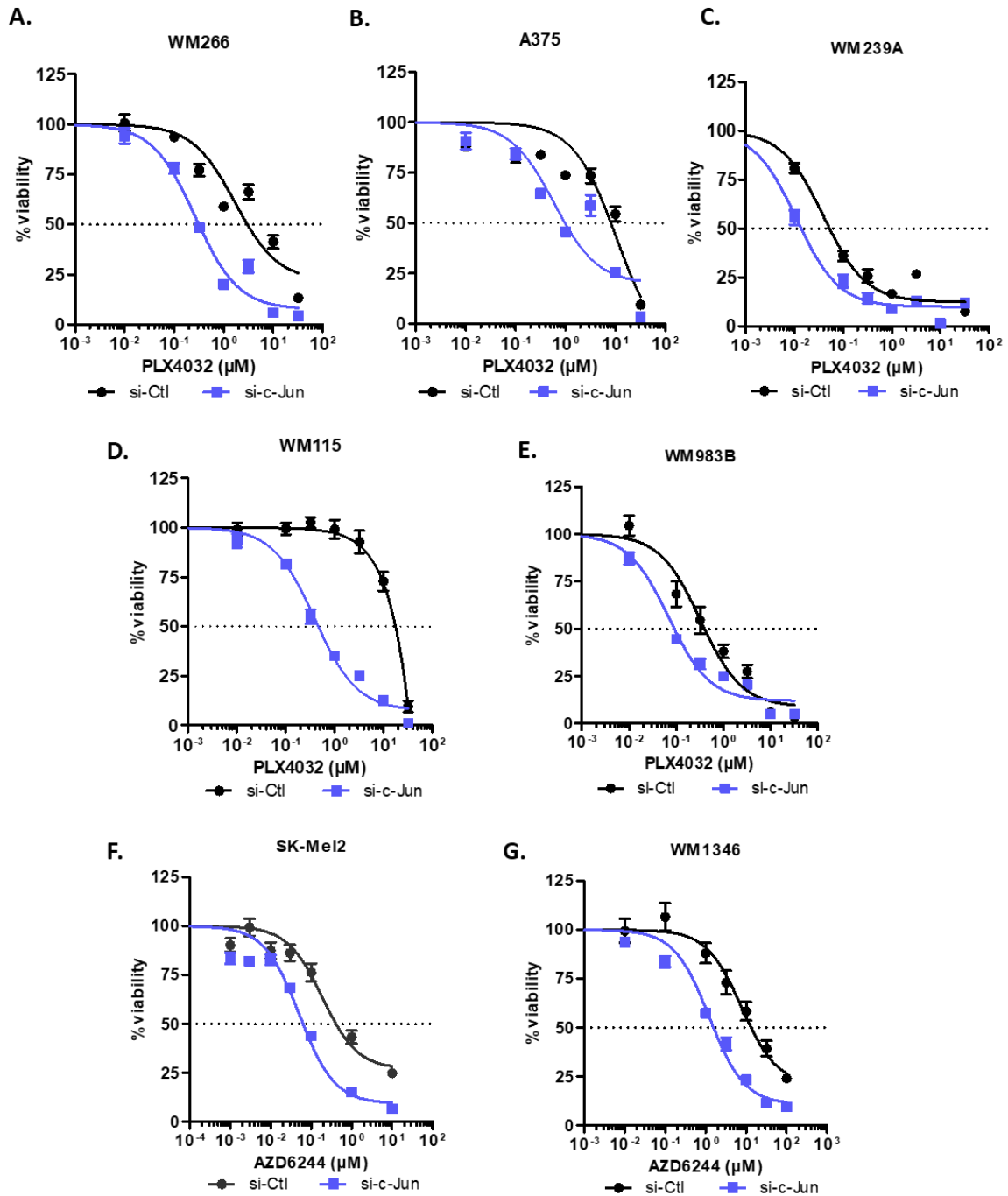


Figure 3 : La déplétion de c-Jun induit une sensibilisation des cellules de mélanomes BRAF- et NRAS-mutées aux inhibiteurs de la voie MAPK. Les différentes lignées cellulaires BRAF-mutées (A, B, C, D, E) et NRAS-mutées (F, G) ont d'abord été transfectées avec des un smart-pool de siARN dirigés contre c-Jun puis traitées au PLX4032 (A, B, C, D, E) ou à l'AZD6244 (F, G) à des doses croissantes. Après 72 h de traitement, la viabilité des cellules a été quantifiée par colorimétrie avec le réactif MTS. Les courbes de survie sont représentées pour toutes les lignées et sont obtenues à partir de la moyenne de triplicats sur 3 expériences indépendantes (moyenne \pm SEM ; $n=3$).

3. La surexpression de c-Jun induit une diminution de la sensibilité aux inhibiteurs de BRAF.

Inversement, nous avons également voulu voir si une augmentation de l'expression de c-Jun induisait une augmentation de la CI50 du vemurafenib. Pour cela, nous avons d'abord cloné l'ADN codant de c-Jun fusionné à la BFP sous contrôle d'un promoteur inducible à la doxycycline. Nous avons ensuite créé des lentivirus et transduit les lignées WM266-4 et A375 (BRAF-mutées) afin qu'elles expriment de façon stable et inducible c-Jun. Nous avons ensuite analysé la sensibilité des cellules transduites par un vecteur contrôle (WM266-4 : Ctl) ou le vecteur exprimant c-Jun (WM266-4 : c-Jun) au vemurafenib en présence ou en absence de doxycycline (Figure 4). L'expression de c-Jun en présence de doxycycline dans la lignée WM266-4 : c-Jun est montrée dans la Figure 10B.

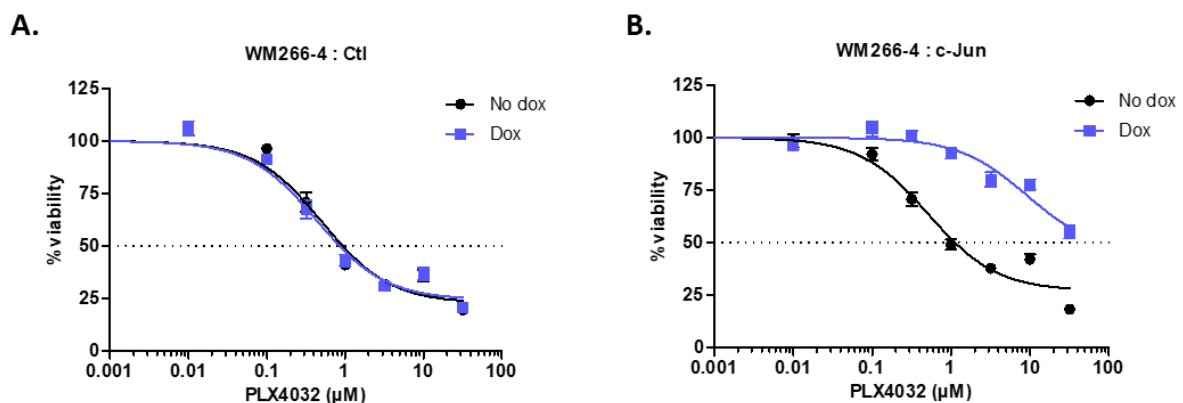


Figure 4 : La surexpression de c-Jun induit une diminution de la sensibilité aux inhibiteurs de BRAF. Les cellules WM266-4 exprimant de façon stable et inducible un plasmide contrôle (A) ou c-Jun (B) ont été traitées avec des doses croissantes de PLX4032 en absence (No dox) ou en présence (Dox) de doxycycline 0,5 µg /mL. Après 72 h de traitement, la viabilité des cellules a été quantifiée par colorimétrie avec le réactif MTS. Les courbes de survie sont représentées pour toutes les lignées et sont obtenues à partir de la moyenne de triplicats sur 3 expériences indépendantes (moyenne ± SEM ; n=3).

Les résultats montrent que la surexpression de c-Jun entraîne une augmentation de la CI50 du vemurafenib donc une diminution de la sensibilité des cellules aux inhibiteurs de la voie MAPK. Les cellules A375 ayant un pourcentage de transduction faible (25 %), nous n'avons pas pu déterminer l'influence de la surexpression de c-Jun sur la modulation de la réponse au PLX4032 dans cette lignée.

Tous ces résultats montrent bien que c-Jun joue un rôle important dans la résistance aux inhibiteurs de la voie des MAPK aussi bien dans des cellules BRAF-mutées que NRAS-mutées.

4. La déplétion de c-Jun dans les lignées *BRAF*-mutées entraîne une augmentation de la mort cellulaire par apoptose en présence de vemurafenib.

La sensibilisation des cellules au vemurafenib liée à la déplétion de c-Jun peut être due soit à un arrêt de la prolifération, soit à une augmentation de la mort cellulaire. Afin de répondre à cette question, nous avons transfecté les cellules WM266-4 avec des siARN dirigés contre c-Jun et analysé la mortalité des cellules par apoptose en présence de PLX4032 (Figure 5).

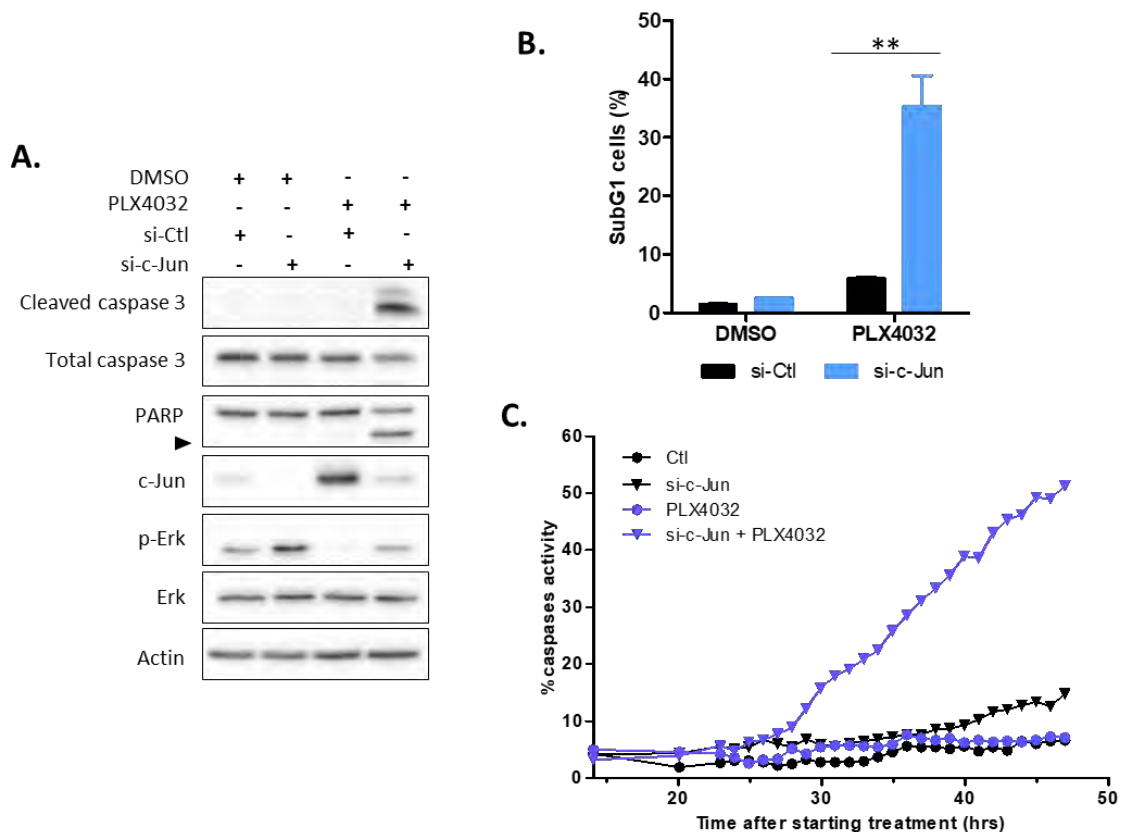


Figure 5 : La déplétion de c-Jun sensibilise les cellules *BRAF*-mutées au vemurafenib en augmentant la mort cellulaire par apoptose. Les cellules WM266-4 ont d'abord été transfectées avec un smart-pool de siARN dirigés contre c-Jun puis traitées au PLX4032 1 μ M pendant 48h. **A.** L'expression des formes clivées de la caspase 3 et de PARP (flèche) ainsi que de leurs formes totales a été analysée par Western Blot. L'expression de p-Erk sert de contrôle d'inhibition de la voie MAPK et l'actine sert de contrôle de dépôt (représentatif $n=3$). **B.** Le pourcentage de cellules en subG1 dans chaque échantillon a été analysé par FACS. (moyenne \pm SEM ; $n=3$. **, $P < 0.01$; t-test). **C.** La cinétique d'activité des caspases 3 et 7 a été déterminée en utilisant le système IncuCyteTM d'imagerie en temps réel et analysée avec le logiciel correspondant ($n=1$).

En présence de l'inhibiteur de BRAF, la déplétion de c-Jun induit une augmentation du clivage de la caspase 3 ainsi que du clivage de la PARP en comparaison avec l'inhibiteur seul ou le si-c-Jun seul (Figure 5A). De la même manière, on observe une augmentation de la fraction de cellules en subG1 (Figure 5B). Enfin, le suivi de l'activité des caspases 3 et 7 avec le système d'imagerie IncuCyteTM montre une augmentation de cette dernière dans les

cellules déplétées en c-Jun et traitées au PLX4032 par rapport aux autres conditions (Figure 5C).

Ces résultats montrent que l'association de la déplétion de c-Jun avec l'inhibition de la voie des MAPK induit une létalité synthétique dans les cellules de mélanomes *BRAF*-mutées. De plus, parallèlement à notre étude, deux laboratoires ont publié des résultats montrant une induction de c-Jun et de son activation sous inhibition de la voie des MAPK dans les cellules de mélanomes *BRAF*-mutées. Les auteurs ont démontré que l'inhibiteur de JNK, JNK-IN8, sensibilise les cellules de mélanome *BRAF*-mutées au vemurafenib en prévenant l'activation de c-Jun (Fallahi-Sichani et al., 2015; Ramsdale et al., 2015). En particulier, l'étude de Ramsdale R. a également montré une augmentation de la fraction de cellules en subG1 dans les cellules déplétées en c-Jun (ou traitées avec un inhibiteur de JNK) en association avec le vemurafenib par rapport au contrôle. Ces études montrent donc que c-Jun joue un rôle important dans la diminution de la sensibilité des cellules au vemurafenib.

Résultats objectif 2

1. L'induction transcriptionnelle de c-Jun est rapide sous inhibition de la voie MAPK.

Par la suite, nous nous sommes intéressés à la cinétique et au mécanisme d'induction de c-Jun par le vemurafenib. Pour cela, nous avons choisi comme modèle la lignée *BRAF*-mutée WM266-4. Le traitement de ces cellules à des temps différents au PLX4032 montre une induction de c-Jun rapide, dès la première heure de traitement au niveau protéique et au niveau de l'ARN messager (Figure 6A et B). On peut noter que cette induction se fait en deux phases. Dans un premier temps c-Jun, l'activité est faiblement induite puis augmente à partir de 16 h.

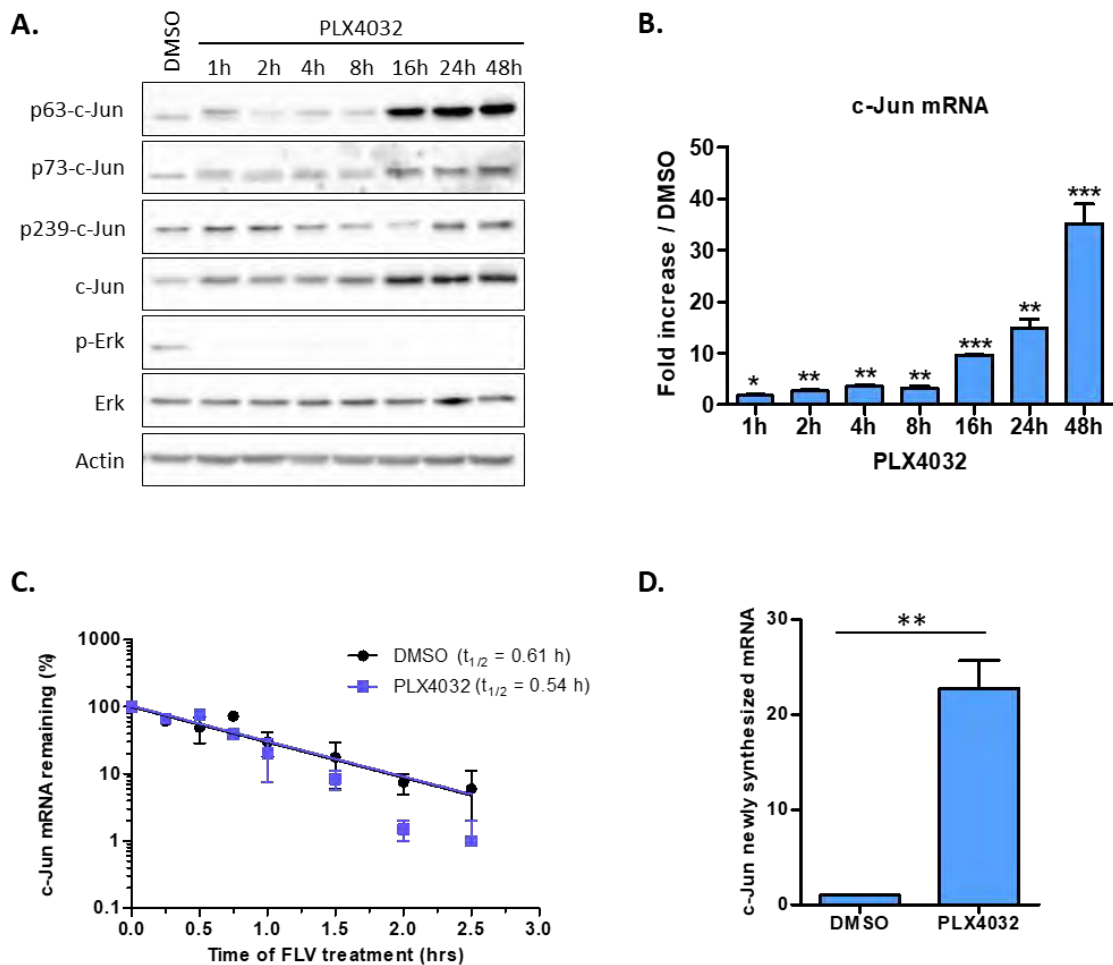


Figure 6 : L'induction de c-Jun est rapide après inhibition de la voie des MAPK et est d'origine transcriptionnelle. **A.** Les cellules WM266-4 ont été traitées aux temps indiqués au PLX4032 1 μ M. L'expression des différentes formes phosphorylées de c-Jun ainsi que de sa forme totale a été analysée par Western Blot. L'expression de p-Erk sert de contrôle d'inhibition de la voie MAPK et l'actine sert de contrôle de dépôt (représentatif $n=3$). **B.** Les cellules WM266-4 ont été traitées aux temps indiqués au PLX4032 1 μ M. Le taux d'induction de l'ARNm de c-Jun par rapport au contrôle a été analysé par RT-qPCR (moyenne \pm SEM ; $n=3$. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$; t-test). **C.** Les cellules WM266-4 ont été traitées pendant 24 h au PLX4032 1 μ M. Les cellules ont ensuite été cultivées pendant différents temps indiqués en présence d'un inhibiteur de la

transcription, le flavopiridol (FLV 1 μ M). L'expression de l'ARNm de c-Jun a été analysée par RT-qPCR en normalisant les taux par rapport au taux au temps t_0 = moment de l'ajout du FLV fixé à 100 % (moyenne \pm SEM ; $n=3$). **D.** Les cellules ont été traitées pendant 1 h au PLX4032 1 μ M puis les cellules ont ensuite été cultivées pendant 16 h en présence d'éthynyl-uridine (EU) 0,2 mM dans le milieu. Les ARNm néo-synthétisés et marqués à l'EU ont ensuite été capturés. Les taux d'ARNm de c-Jun néo-synthétisés ont ensuite été analysés par RT-qPCR. Les données ont été normalisées par rapport au taux d'ARNm dans les cellules non traitées fixé arbitrairement à 1 (moyenne \pm SEM ; $n=3$. **, $P < 0.01$; t-test).

Deux mécanismes peuvent être responsables de l'augmentation du taux de l'ARNm de c-Jun. En effet, il peut s'agir soit d'une stabilisation de l'ARNm de c-Jun soit d'une augmentation de sa transcription. Afin de tester ces deux hypothèses, nous avons d'abord traité les cellules au PLX4032 pendant 24 h puis inhibé la transcription par le flavopiridol afin d'étudier la demi-vie de l'ARNm de c-Jun sous PLX4032. Nos résultats montrent qu'il n'y a pas de différence de la demi-vie du messager de c-Jun lorsque la voie MAPK est inhibée par rapport au contrôle (Figure 6C). L'augmentation de l'expression de l'ARNm de c-Jun n'est donc pas liée à une stabilisation de ce dernier. Nous avons donc analysé la transcription du gène *JUN* par la technique de capture des ARNm néo-synthétisés suivi d'une analyse des transcrits par RT-qPCR. Nos résultats montrent que le PLX4032 induit une augmentation significative de la transcription du gène *JUN* d'un facteur 20 environ (Figure 6D).

L'ensemble de ces résultats montrent que l'induction de c-Jun au niveau protéique est due, au moins en partie, à une augmentation de la transcription du gène *JUN*. De plus, nos résultats montrent clairement une augmentation de la forme active de c-Jun illustrée par une augmentation des formes phosphorylées sur les sérines 63 et 73. Ces 2 sites de phosphorylation participent également à la stabilisation de la protéine (Lopez-Bergami et al., 2010; Morton et al., 2003) probablement impliquée dans l'augmentation de l'expression de la protéine. De plus, une fois activé c-Jun se fixe sur ses éléments de réponse au niveau de son propre promoteur et induit également sa transcription en créant une boucle d'auto-amplification (Angel et al., 1988). Enfin, les résultats présentés dans la Figure 2A et B suggèrent que le ratio p239-c-Jun / c-Jun a tendance à diminuer indiquant une diminution de la dégradation de la protéine. Cependant des études complémentaires telles que, par exemple, l'étude de la demi-vie de la protéine sous vemurafenib, sont nécessaires afin de valider ces observations.

Le mécanisme d'induction de c-Jun sous vemurafenib proposé est illustré dans la Figure 7.

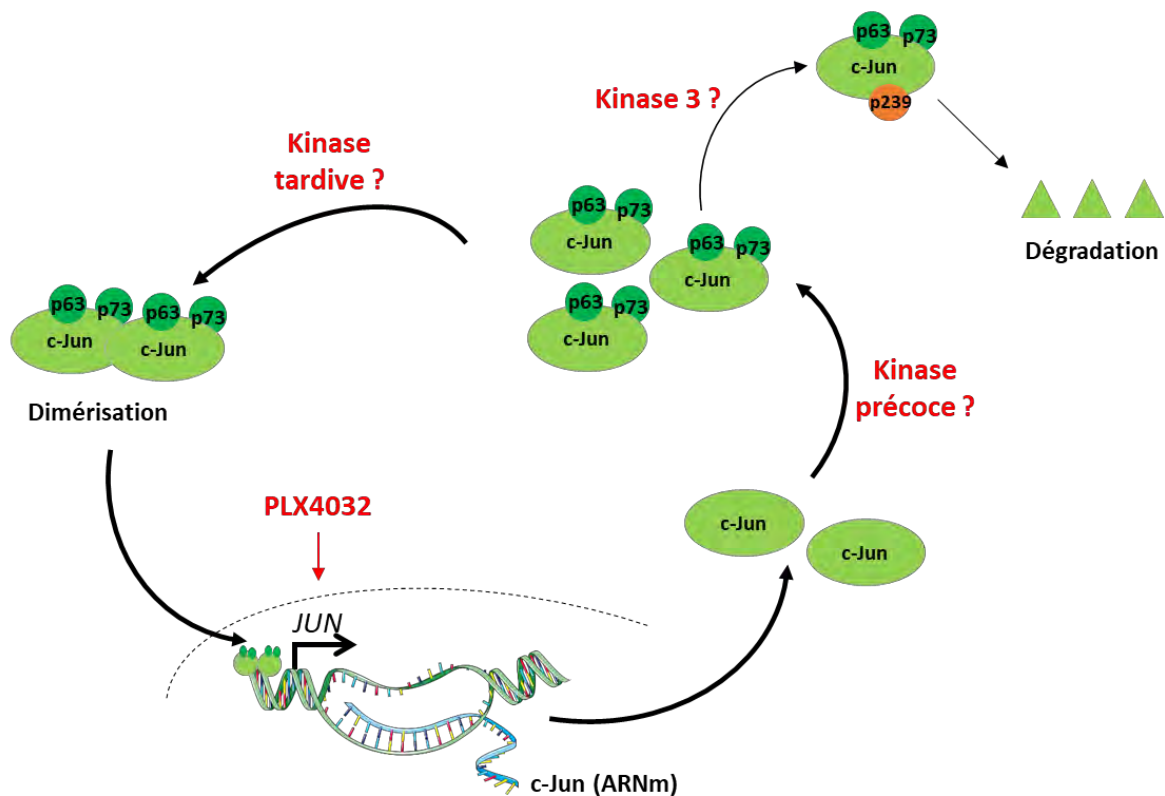


Figure 7 : Mécanisme d'induction de l'expression de c-Jun proposé sous inhibition de la voie des MAPK.

2. Quelle kinase est impliquée dans l'activation de c-Jun ?

Nous nous sommes ensuite intéressés au mécanisme d'activation de c-Jun sous vemurafenib. En effet, les principales kinases connues pour phosphoryler c-Jun sur les résidus 63 et 73 sont JNK, p38 et ERK (Morton et al., 2003). Comme cité dans l'introduction, d'autres kinases ont également été décrites pour phosphoryler c-Jun sur ces résidus telles que PLK3, VRK1, CDK3 ou CDK4 (Cho et al., 2009; Sevilla et al., 2004; Vanden Bush and Bishop, 2011; Wang et al., 2007). Nous avons donc voulu savoir quelle kinase était impliquée dans l'augmentation de l'activité de c-Jun sous traitement au PLX4032.

Lorsque les cellules WM266-4 sont traitées avec le PLX4032, nous observons comme attendu une diminution de la phosphorylation de ERK, témoin de l'inhibition de la voie. De manière surprenante, dans notre modèle cellulaire nous observons également une diminution de l'activité de JNK sous PLX4032 illustrée par la diminution de sa phosphorylation dès la première heure de traitement alors que la phosphorylation de p38 ne semble pas varier (Figure 8).

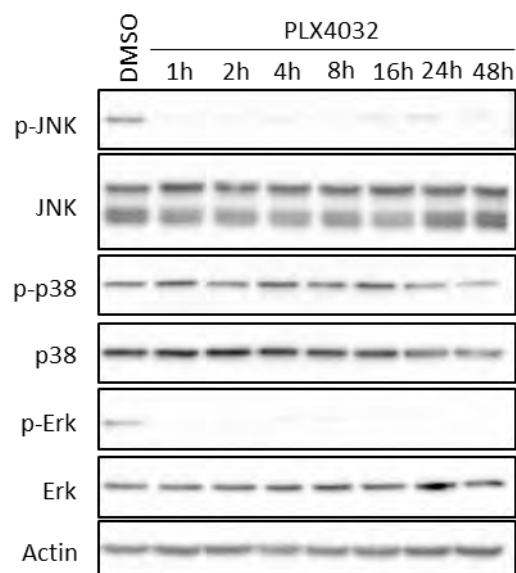


Figure 8 : Le PLX4032 module l'activité de JNK. Les cellules WM266-4 ont été traitées aux temps indiqués en présence d'un inhibiteur de BRAF (PLX4032 1 μ M). L'expression des formes phosphorylées de JNK, p38 et ERK ainsi que de leurs formes totales a été analysée par Western Blot. L'actine sert de contrôle de dépôt (représentatif $n=3$).

Au vu de ces résultats, il semblerait donc que les kinases ERK et JNK ne soient pas responsables de l'activation de c-Jun. De plus, l'utilisation d'inhibiteurs de p38 (SB203580) ou de JNK (SP600125) dans notre modèle ne prévient pas la phosphorylation de c-Jun sur les résidus 63 et 73 (résultats non montrés). Ces résultats suggèrent qu'une kinase « atypique » pourrait être impliquée dans l'activation de c-Jun sous vemurafenib.

Dans les études publiées par Fallahi-Sichani M. et Ramsdale R., les lignées cellulaires ainsi que l'inhibiteur de JNK utilisés étaient différents des nôtres (Fallahi-Sichani et al., 2015; Ramsdale et al., 2015). Nous avons donc voulu tester l'inhibiteur JNK-IN8 dans la lignée WM266-4 et évaluer son influence sur la phosphorylation de c-Jun et la viabilité cellulaire (Figure 9).

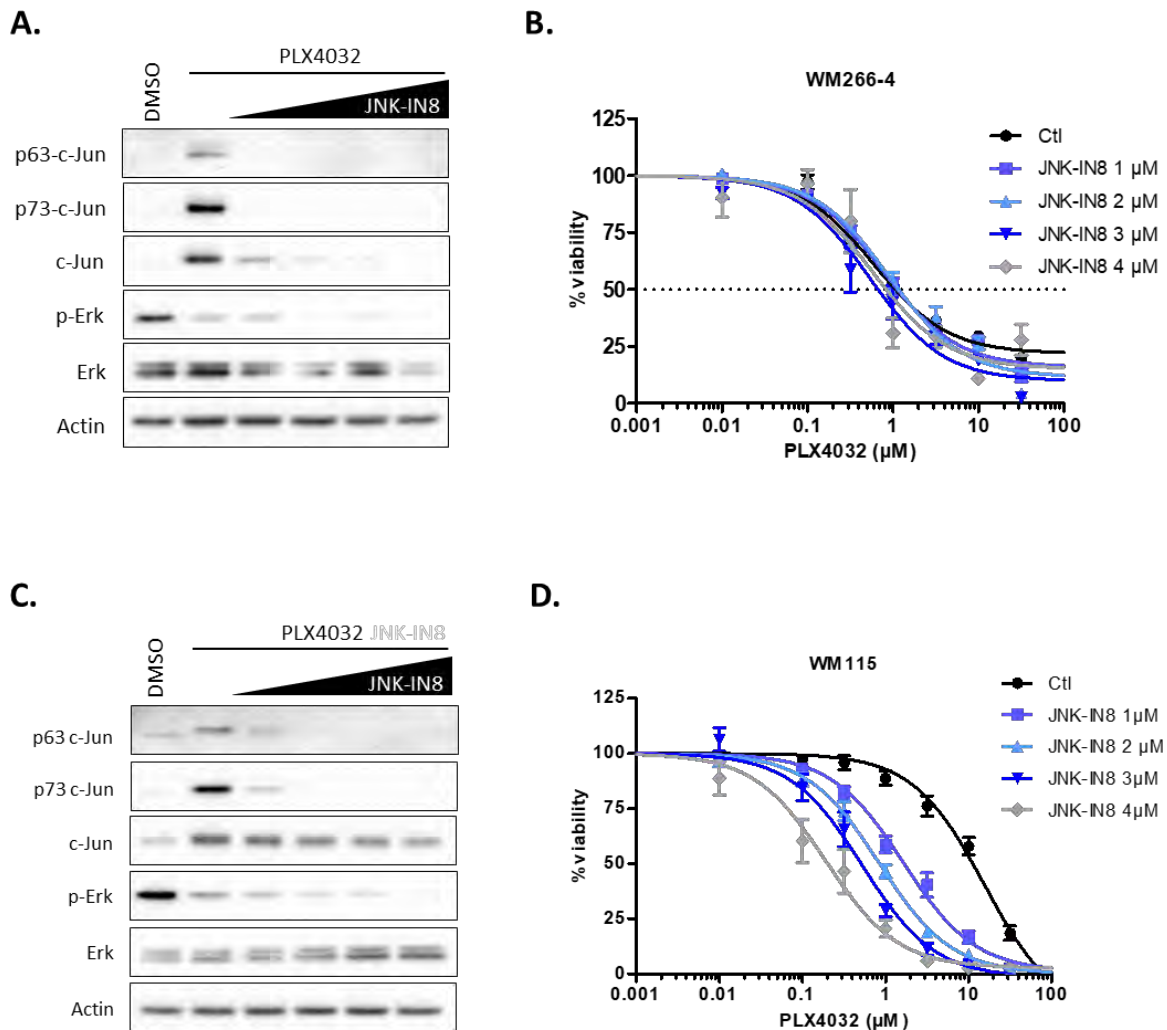


Figure 9 : L'inhibiteur de JNK, JNK-IN8, empêche l'activation de c-Jun dans nos cellules sans effet sur la viabilité cellulaire. Les cellules WM266-4 (A) et WM115 (C) ont été traitées avec du PLX4032 1 μM et du JNK-IN8 à des doses croissantes (1 μM, 2 μM, 3 μM et 4 μM). L'expression des formes phosphorylées de c-Jun et ERK ainsi que de leurs formes totales a été analysée par Western Blot. L'actine sert de contrôle de dépôt (représentatif $n=3$). Les cellules WM266-4 (B) et WM115 (D) ont été traitées à des doses croissantes de PLX4032 en présence ou non de JNK-IN8 aux concentrations indiquées. Après 72 h de traitement, la viabilité des cellules a été quantifiée par colorimétrie avec le réactif MTS. Les courbes de survie sont obtenues à partir de la moyenne de triplicats sur 3 expériences indépendantes (moyenne \pm SEM ; $n=3$).

Les résultats montrent que, malgré la diminution de la forme active de c-Jun ainsi que de sa forme totale (Figure 9A), quelle que soit la concentration d'inhibiteur de JNK utilisée, ce dernier ne sensibilise pas les cellules au vemurafenib (Figure 9B). En effet, la phosphorylation de c-Jun sur les résidus 63 et 73 est inhibée dès la concentration d'inhibiteur 1 μM. Nous avons utilisé en contrôle positif la lignée WM115 (Figure 9C et D). En effet, cette lignée montrait une sensibilisation des cellules à l'inhibiteur JNK-IN8 dans les études publiées parallèlement à la nôtre. Nous observons comme attendu, une diminution de l'activité de c-Jun ainsi qu'une sensibilisation au vemurafenib des cellules dose-

dépendante. Nous observons les mêmes résultats sur la lignée WM266-4 : c-Jun inducible (Figure 10A et B).

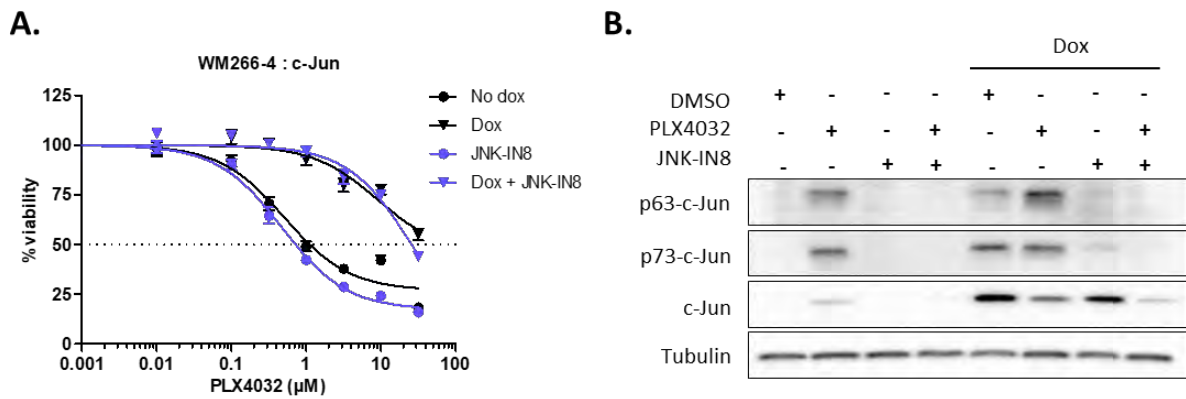


Figure 10 : L'inhibiteur de JNK prévient l'activation de c-Jun mais ne sensibilise les cellules au PLX4032 dans notre modèle de cellules exprimant de manière stable et inducible c-Jun. **A.** Les cellules WM266-4 transduites ont été traitées à des doses croissantes de PLX4032 en présence ou non de JNK-IN8 1 μM et avec ou sans doxycycline 0,5 μg/mL. Après 72 h de traitement, la viabilité des cellules a été quantifiée par colorimétrie avec le réactif MTS. Les courbes de survie sont obtenues à partir de la moyenne de triplicats sur 3 expériences indépendantes (moyenne ± SEM ; n=3). **B.** Les cellules WM266-4 ont été traitées avec du PLX4032 1 μM, du JNK-IN8 1 μM et/ou de la doxycycline 0,5 μg/mL. L'expression des formes phosphorylées de c-Jun ainsi que de sa forme totale a été analysée par Western Blot. La tubuline sert de contrôle de dépôt (représentatif n=3).

Dans l'introduction nous avons vu qu'il existe 3 gènes codant les différents isoformes de JNK. Les isoformes 1 et 2 étant exprimées de façon ubiquitaire, nous avons choisi dans un premier temps d'utiliser des si-ARN dirigés contre ces deux isoformes et d'étudier leur influence sur la viabilité cellulaire et la phosphorylation de c-Jun (Figure 11).

Ces résultats montrent que la déplétion d'une seule isoforme de JNK ne sensibilise pas les cellules en comparaison à la déplétion de c-Jun (Figure 11A) et ne prévient pas la phosphorylation de c-Jun en présence de PLX4032 (Figure 11B). Ces résultats sont quand même à nuancer au vu des outils utilisés. Alors que le si-JNK1 soit ne fonctionne pas, soit entraîne une compensation par les isoformes 2 et 3, celui dirigé contre JNK2 semble avoir une action sur les 3 isoformes tout en maintenant un taux important de c-Jun phosphorylé. De plus, les 3 gènes *JNK* codent pour plus de dix isoformes de JNK, nous ne pouvons pas exclure que certaines isoformes ne soient pas ciblées par les si-ARN et/ou l'anticorps pan-JNK. Seuls des doubles KO complets au niveau des gènes pourraient donc confirmer quelle isoforme est impliquée dans la phosphorylation de c-Jun.

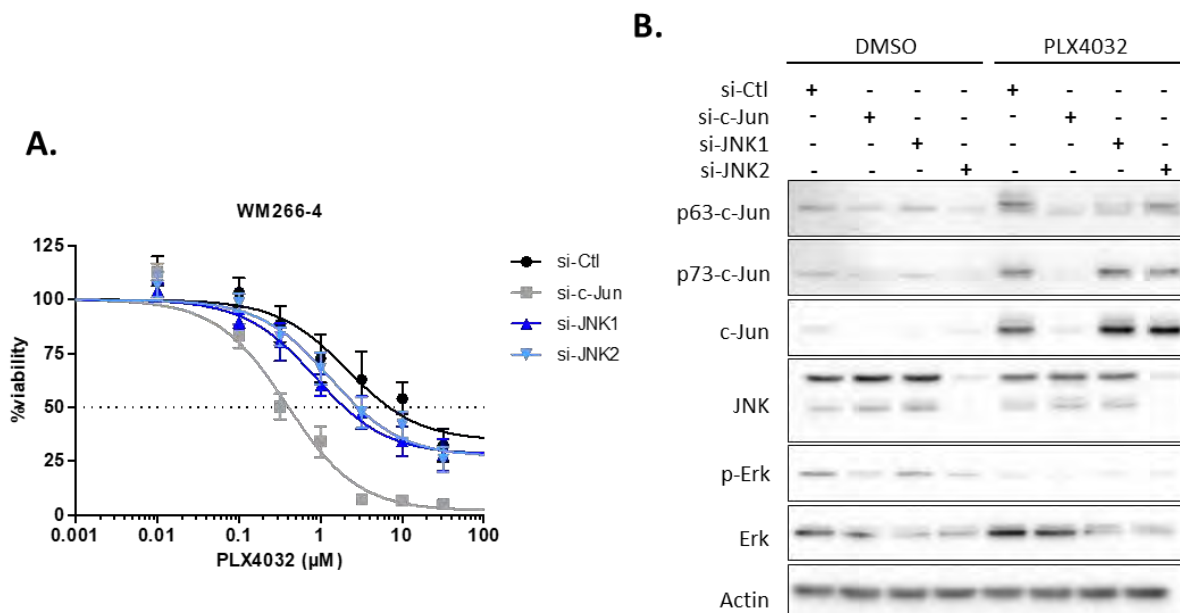


Figure 11 : La déplétion de JNK1 ou JNK2 ne sensibilise pas les cellules au vemurafenib. A. Les cellules WM266-4 ont d'abord été transfectées avec des siARN dirigés contre c-Jun ou JNK1 ou JNK2 puis traitées au PLX4032 à des doses croissantes. Après 72 h de traitement, la viabilité des cellules a été quantifiée par colorimétrie avec le réactif MTS. Les courbes de survie sont obtenues à partir de la moyenne de triplicats sur 3 expériences indépendantes (moyenne \pm SEM ; $n=3$). **B.** Les cellules WM266-4 ont été transfectées avec des siARN dirigés contre c-Jun ou JNK1 ou JNK2 puis traitées au PLX4032 1 μ M. L'expression des formes phosphorylées de c-Jun et ERK, de leurs formes totales ainsi que de la forme totale de JNK a été analysée par Western Blot. L'actine sert de contrôle de dépôt (représentatif $n=3$).

Au vu de ces résultats, plusieurs hypothèses sont possibles quant à la kinase impliquée dans l'activation de c-Jun :

- 1) Les résultats de la sensibilisation aux inhibiteurs de la voie MAPK liée à la déplétion de c-Jun sont dus à un effet off-target du si-c-Jun. Cette hypothèse me paraît peu probable car d'une part, nous avons utilisé un smart-pool avec un mélange de 4 si-ARN qui est censé diminuer l'effet off-target. Nous avons également testé les 4 si-ARN séparément et observé les mêmes effets. D'autre part, dans les études publiées (Fallahi-Sichani et al., 2015; Ramsdale et al., 2015), les auteurs ont observé les mêmes effets cellulaires associés à la déplétion de c-Jun en utilisant des séquences de si-ARN différentes de celles utilisées dans ce travail.
- 2) Une kinase JNK est bien impliquée dans l'activation de c-Jun sous vemurafenib. Lorsque l'on inhibe séparément chaque isoforme de JNK, il existe un effet compensatoire des autres isoformes. Ceci explique que lorsqu'on inhibe JNK2 par des si-ARN on observe toujours la phosphorylation de c-Jun et donc pas d'effet significatif sur la viabilité cellulaire (Figure 11). Par contre, lorsque l'on inhibe toutes les JNK en

même temps (inhibiteur pharmacologique JNK-IN8), la phosphorylation de c-Jun est inhibée. Cependant dans la lignée WM266-4, en réponse à l'inhibition pan-JNK, une voie parallèle est activée et empêche la sensibilisation des cellules au vemurafenib que ce soit dans la lignée parentale ou dans la lignée transduite (Figure 9 et 10). Afin de valider cette hypothèse, l'inhibition simultanée des trois gènes *JNK* par des si-ARN dans un premier temps, voire un KO conditionnel dans un deuxième temps, devrait donner des résultats similaires à ceux de l'inhibiteur de JNK.

- 3) L'utilisation du vemurafenib dans notre modèle cellulaire montre une diminution de la forme phosphorylée de JNK (Figure 7). Une kinase « atypique » phosphoryle c-Jun, l'inhibition de la phosphorylation de c-Jun est due à un effet off-target de l'inhibiteur JNK-IN8 et les cellules activent une voie parallèle de survie en réponse à l'inhibition des 3 isoformes de JNK. JNK-IN8 inhibe également les kinases FMS et MNK2, afin de valider cette hypothèse, nous pourrions tester l'influence de l'inhibition de ces kinases sur la viabilité cellulaire et la phosphorylation de c-Jun.

Résultats objectif 3

Suite à la publication de nos travaux antérieurs montrant une implication de l'axe c-Jun / RHOB / AKT dans la modulation de la réponse cellulaire au vemurafenib (Delmas et al., 2015), le dernier objectif de ma thèse était d'identifier des cibles potentielles de c-Jun, autres que RHOB, impliquées dans la modulation de la réponse aux inhibiteurs de la voie des MAPK.

En effet, nous avons montré qu'en réponse au vemurafenib c-Jun est induit dans la lignée *BRAF*-mutée WM266-4. Ce dernier est responsable de la transcription d'une de ces cibles directes RHOB qui à son tour participe à la réactivation de la voie AKT responsable d'une diminution de la sensibilité des cellules au vemurafenib. De plus, la déplétion de c-Jun induisait une sensibilisation des cellules au vemurafenib mais la surexpression de RHOB ne restaurait que de façon partielle la sensibilité initiale suggérant l'implication d'autres cibles dans la modulation de la réponse aux inhibiteurs de MAPK. Parallèlement, plusieurs équipes ont montré un rôle important de c-Jun dans la diminution de la sensibilité des cellules aux inhibiteurs de la voie MAPK (Fallahi-Sichani et al., 2015; Ramsdale et al., 2015).

Nous avons donc réalisé une étude transcriptomique sur la lignée WM266-4 afin de déterminer quels étaient les gènes modulés par c-Jun sous vemurafenib. Parmi tous les gènes trouvés, nous nous sommes particulièrement intéressés au gène *SLITRK6* (SLIT And NTRK Like Family Member 6). En effet, outre le fait d'être l'un des gènes les plus surexprimés en réponse au vemurafenib, la fonction de la protéine pour laquelle il code a été très peu étudiée (22 articles sur Pubmed en 2018). De plus, *SLITRK6* est une protéine membranaire facilement ciblable en thérapie étant donné qu'un anticorps armé (conjugué à la MMAE) et dirigé contre celle-ci est en cours d'essai clinique de phase I dans le cancer urothélial (ASG15-ME) (Morrison et al., 2016).

Les résultats de ce travail sont présentés sous la forme d'un article en cours de préparation et font l'objet d'une demande de brevet au niveau international (Patent EP17305153).

Quid de *SLITRK6* ?

SLITRK6 est une protéine transmembranaire de type 1 appartenant à la famille des protéines *SLITRK* constituée de 6 membres chez l'homme. Cette famille de protéines a été caractérisée

pour la première fois en 2003 dans des souris présentant des anomalies du tube neural (Aruga and Mikoshiba, 2003). Elle présente 89 à 97 % d'homologie de structure avec la famille Slitrk chez la souris (Aruga et al., 2003). Le domaine extracellulaire de ces protéines comporte 2 domaines à motifs LRR (Leucine-Rich Repeat) avec de part et d'autre de chaque domaine une région riche en cystéines. La partie extracellulaire de ces protéines est similaire aux protéines de la famille Slit qui sont des protéines secrétées et impliquées dans la migration cellulaire et le guidage axonal (Brose and Tessier-Lavigne, 2000). Les protéines à domaines LRR sont une superfamille de protéines impliquées dans les adhésions moléculaires (CAM = cell adhesion molecules) au niveau des synapses neuronales. Les homologies de séquence entre les différents membres de la famille SLITRK sont situées au niveau des domaines LRR, du domaine transmembranaire et du domaine C-terminal intracellulaire. Ce dernier, comporte des résidus de tyrosines phosphorylables similaires à ceux des récepteurs à activité tyrosine kinase, et notamment, une forte homologie avec les récepteurs aux neurotrophines (NGF, BDNF) de la famille TRK (Aruga and Mikoshiba, 2003). Les neurotrophines sont des facteurs essentiels pour la survie et la différenciation des neurones du système nerveux périphérique au cours du développement.

Dans les tissus sains chez l'adulte, l'expression de cette famille de protéines est restreinte au tissu neural et en particulier au niveau du cortex cérébral à l'exception de SLITRK6. En effet, cette dernière n'est pas ou peu exprimée au niveau du cortex cérébral. En revanche, une expression élevée a été retrouvée dans le putamen et a été détectée dans les poumons. Enfin dans les tissus fœtaux son expression a été retrouvée au niveau du foie et des poumons (Aruga et al., 2003). Enfin, SLITRK6 est fortement exprimé au niveau cérébral lors du développement embryonnaire humain pendant les semaines 10 à 12 de gestation (Iruretagoyena et al., 2014). Une analyse transcriptomique a également montré une expression élevée de SLITRK6 sur les « cellules souches » neuronales chez l'adulte sain (Sandberg et al., 2014) suggérant un potentiel rôle de marqueur souche de cette protéine.

Au niveau tumoral, alors que les autres membres de la famille semblent avoir un profil d'expression hétérogène dans les différentes tumeurs cérébrales, l'expression de SLITRK6 est retrouvée seulement dans certains médulloblastomes (Aruga et al., 2003), certaines lignées de leucémies lymphoblastiques (Milde et al., 2007) et est notamment surexprimée dans le cancer urothélial (Morrison et al., 2016; Sanford et al., 2015). En revanche, la

délétion de SLITRK6 a été retrouvée dans 16 % des carcinomes papillaires thyroïdiens (Heiliger et al., 2012).

Le rôle de SLITRK6 en physiologie et en pathologie est peu décrit. Les tous premiers travaux ont montré que dans les cellules de phéochromocytomes PC12, capables de se différencier en neurones, la surexpression de SLITRK6 en présence de NGF diminue le nombre et la croissance des neurites par rapport au contrôle (Aruga and Mikoshiba, 2003). En 2009, des travaux de l'équipe de J. Aruga (Katayama et al., 2009) ont montré sur un modèle de souris KO pour *Slitrk6* que ces souris présentaient un défaut d'innervation au niveau des épithéliums sensoriels de l'oreille interne (cochlée et vestibule). De plus, les neurones de ces souris avaient une capacité limitée à former des neurites. Enfin, ces souris présentaient une diminution d'expression de neurotrophines telles que BDNF et NTF3 ainsi qu'une diminution de l'expression et de l'activité des récepteurs NTRK. La même équipe a ensuite montré que les souris KO pour *Slitrk6* présentait un défaut d'audition ainsi que des troubles du comportement (Matsumoto et al., 2011). Chez l'homme, des mutations du gène *SLITRK6* sont associées à des troubles du comportement, à la surdité ou à la myopie héréditaires (Greenwood and Kelsoe, 2013; Morlet et al., 2014; Salime et al., 2018; Tekin et al., 2013). Enfin, une étude a montré que la perte d'audition liée à une infection congénitale par le cytomégalovirus (CMV) est due à une diminution de l'expression de SLITRK6 induite par la protéine IE2 (Immediate-Early 2 protéine) du CMV (Liao et al., 2017). Plus récemment, des travaux ont montré que la différenciation des cellules SH-SY5Y de neuroblastome en neurones induit la surexpression de SLITRK6, NTRK2/TrkB et NGFR associée à une augmentation de la taille des neurites (Pezzini et al., 2017).

Le mécanisme d'action de SLITRK6 ainsi que les voies de signalisation en aval ne sont pas encore connus. Deux principales hypothèses sont émises. La première serait que ces récepteurs possèdent des ligands spécifiques et agissent ensuite comme des RTK classiques par dimérisation, transactivation, et phosphorylation des résidus de tyrosines intracellulaires et activation des voies effectrices. La deuxième hypothèse serait que ces récepteurs seraient des co-récepteurs des récepteurs TRK ou d'autres RTK et qu'ils moduleraient leur activité (Proenca et al., 2011; Song et al., 2015). Enfin, les protéines SLITRK participent à la synaptogenèse en se liant aux Récepteurs Protéines Tyrosines Phosphatases (RPTP) de type IIa : les Leukocyte common Antigen-Related RPTP (LAR-RPTP). La famille des LAR-RPTP est constituée de 3 membres LAR, PTP δ et PTP σ (Takahashi and Craig, 2013; Um et al., 2014;

Won and Kim, 2018). Par exemple, des études ont montré que SLITRK3 participe à la formation de synapses inhibitrices en se fixant au récepteur PTP δ (Takahashi et al., 2012).

SLITRK6, a potential target to treat *BRAF*-mutant metastatic melanoma

Magdalena Pohorecka^{1,2,3,4}, Claire Medale-Giamarchi^{1,2}, Ophélie Besse¹, Marie Tosolini¹, Olivier Calvayrac¹, Rémi Gence¹, Chloé Tirand², Arthur Bouchet², Nicolas Meyer^{1,4}, Anne Pradines^{1,3} & Gilles Favre^{1,2,3}

¹ Cancer Research Center of Toulouse, INSERM U1037 CNRS ERL5294 UPS, Toulouse, France ;

²University Paul Sabatier, Toulouse, France ;

³Institut Claudius Regaud, Institut Universitaire du Cancer de Toulouse-Oncopole, Laboratory of Medical Biology and Oncogenetics, Toulouse, France ;

⁴CHU Toulouse, Toulouse, France

Correspondence should be addressed to Gilles Favre (favre.gilles@iuct-oncopole.fr)

Key words : SLITRK6, cutaneous melanoma, BRAF inhibitors, MAPK inhibitors, antibody-drug conjugate

ABSTRACT

It is clearly recognized that the MAPK pathway is essential for melanomagenesis. The development of new drugs targeting this pathway such as BRAF inhibitors and/or MEK inhibitors has been a major advance in the therapeutic management of melanoma. However, patients still relapse suggesting the emergence of mechanisms of resistance. Many data show that both the expression and activation of the transcription factor c-Jun are induced after treatment of *BRAF*-mutant cells with MAPK pathway inhibitors (MAPKi). Furthermore, depletion of c-Jun sensitizes cells to these inhibitors triggering apoptosis. We depleted *BRAF*-mutant melanoma cell lines for c-Jun by siRNA and treated cells with a BRAF inhibitor (PLX4032). Whole genome expression was then analysed by transcriptomic study to determine target genes of c-Jun that could be associated with pharmacological response to MAPKi. This study revealed that SLIT And NTRK Like Family Member 6 (SLITRK6) is a potential target gene of c-Jun that could be associated with antitumor pharmacological response to MAPKi. Indeed, SLITRK6 mRNA and protein are induced in *BRAF*-mutant melanoma cell lines after BRAF inhibitor (PLX4032) treatment alone or in combination with MEK inhibitor (AZD6244). We also show that the combination of MAPKi with an antibody conjugated with a cytotoxic drug targeting SLITRK6 (ADC) increases *BRAF*-mutant melanoma cell death triggering apoptosis *in vitro*. Moreover, the use of the ADC in combination with MAPKi slows down the tumor growth xenografts models. Finally, our data show that SLITRK6 could be a new

pharmacological target for the treatment of *BRAF*-mutant metastatic melanoma and/or a potential biomarker of resistant cells to MAPKi.

INTRODUCTION

The discovery of the BRAF mutation and its role as a key driver in melanomagenesis has led to a revolution in the therapeutic management of melanomas. Indeed, the use of BRAF and MEK inhibitors has significantly improved the survival and quality of life of patients with BRAF^{V600} mutant metastatic melanoma. Despite an initial response rate of 70 %, the progression-free survival rate at 3 years is only 20 %. This loss of efficacy over 3 years illustrates the emergence of resistances to such therapies. The understanding of mechanisms implicated in these relapses is a real challenge and should pave the way for new therapeutic combinations.

Currently, the major mechanisms described can be divided into genomic or non genomic mechanisms. The genomic ones have been largely described and are due to genetic alterations such as loss of *NF1*, gain-of-function mutations in *NRAS*, *AKT*, *MEK*, or *ERK* genes, BRAF alternative splicing or amplification or COT overexpression (Goetz et al., 2014; Johannessen et al., 2010; Nazarian et al., 2010; Nissan et al., 2014; Poulikakos et al., 2011; Shi et al., 2012, 2014; Wagle et al., 2011). The non genomic ones involve a genetic reprogramming in the cells. Indeed, the induction of some transcription factors after MAPKi treatment can lead to the overexpression or upregulation of some receptor tyrosine kinase involved in cell survival (Abel et al., 2013). We and others have shown that the transcription factor c-Jun is induced after MAPKi treatment in melanoma cells and leads to a decrease sensitivity to these inhibitors (Delmas et al., 2015; Fallahi-Sichani et al., 2015; Ramsdale et al., 2015). On the one hand, c-Jun activates the RHOB/AKT pathway (Delmas et al., 2015) and on the other hand, it mediates the phenotypic switch from « proliferative » to « invasive » state (Ramsdale et al., 2015). Many studies have shown that the « invasive » state is characterized by gene expression signature from « mesenchymal-like » cells with low levels of MITF and SOX10 and high levels of AXL (Konieczkowski et al., 2014; Müller et al., 2014; Shaffer et al., 2017; Titz et al., 2016; Verfaillie et al., 2015). In this way, the MITF^{low} phenotype has been rapidly described as an alternative resistance mechanism to targeted therapies in melanoma (Kemper et al., 2014). In addition, more and more studies suggest that therapeutic escape is due to the presence of a subpopulation of slowly dividing de-differentiated cells. Such state has been described as a reversible « drug-tolerant » state and is expressing neural crest markers like NGFR, AQP1, GFRA2 or SLITRK6 (Fallahi-Sichani et al., 2017; Rambow et al., 2018; Su et al., 2017; Tirosh et al., 2016; Tsoi et al., 2018). Particularly, the NGFR^{high} state also involves the transcription factor c-Jun (Fallahi-Sichani et al., 2017). Given these data, c-Jun is playing a key role in the adaptive response to MAPKi. Furthermore, the JNK inhibitor JNK-IN8 sensitizes BRAF-mutant

melanoma cells to MAPKi (Fallahi-Sichani et al., 2015; Fallahi-Sichani et al., 2017; Ramsdale et al., 2015). However, to date JNK inhibitors showed unfavorable risk/benefit profile in clinic. So, studying c-Jun target genes involved in the modulation of the pharmacological response to MAPKi should pave the way for new therapeutic strategies to cure melanoma.

Human SLITRK6 (SLIT And NTRK Like Family Member 6) is a type 1 transmembrane protein belonging to the SLITRK family. This family of proteins has been recently described and is implicated in the modulation of neurite outgrowth, neuron survival and synapse formation (Aruga and Mikoshiba, 2003; Aruga et al., 2003; Katayama et al., 2009; Proenca et al., 2011). The extracellular domain of these proteins contain two Leucine-Rich Repeat (LRR) domains which can bind to Receptor-type Protein Tyrosine Phosphatases (RPTP) and particularly the type IIa RPTPs, such as Leucocyte common Antigen-Related (LAR), PTP σ and PTP δ (Takahashi and Craig, 2013). The expression of human SLITRK6 is restricted to the central nervous system and the auditory system (Aruga et al., 2003). Its mutation causes myopia and deafness in humans and mice (Tekin et al., 2013). SLITRK6 is found to be overexpressed in some medulloblastoma, leukemia and urothelial cancer (Aruga et al., 2003; Milde et al., 2007; Sanford et al., 2015). Its overexpression in urothelial cancer led to the development of an antibody drug-conjugate with MonoMethyl Auristatin E (MMAE) targeting SLITRK6 which is currently in phase I clinical trials for the treatment of metastatic urothelial cancer (Morrison et al., 2016).

Here we show that SLITRK6 is a potential target gene of c-Jun and is induced in *BRAF*-mutant melanoma cells after MAPKi treatment. siRNA depletion of SLITRK6 sensitizes cells to MAPKi depending on the cell line, suggesting that its induction could have a role in other cellular functions than survival. However, the use of an antibody drug-conjugate with MMAE targeting SLITRK6 sensitizes all cells to MAPKi *in vitro* and *in vivo* on xenograft models.

RESULTS

SLITRK6 is a MAPKi-induced gene in *BRAF*-mutant melanoma cells.

To identify genes modulated by PLX4032 requiring c-Jun expression, we performed transcriptomic differential expression assays as described in Material and Methods. Figure 1A shows the top 50 up and down regulated genes. We then selected most expressed 32 genes, marked in grey in the Fig 1A (Table S2 for the complete list) upregulated by PLX4032 and down regulated by c-Jun depletion. We then analyzed the expression of this 32 genes in a panel of 6 *BRAF*-mutant melanoma cells with the NanoString technique (Fig 1B). We found similar results obtained from the Affymetrix gene chip arrays for most of the genes. Interestingly, we confirmed the overexpression of c-Jun and RHOB as we (Delmas et al., 2015) and others (Fallahi-Sichani et al., 2015; Ramsdale et al., 2015) previously described. We decided to focus on SLITRK6 which present a constant high level of PLX4032-induced expression over the cell lines.

Using a TCGA-based analysis (firebrowse.org), we observed that SLITRK6 mRNA expression was not consistently differentially expressed between tumors and normal tissue among the different cancer subtypes, and was in some cases inhibited (e.g. in colon or prostate adenocarcinoma) or overexpressed (e.g. in skin cutaneous melanoma) in tumors, although the latter was not significant due to the small number of normal sample (n=2) Fig S1.

Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) using the list of genes that positively or negatively correlate with SLITRK6 expression in skin melanoma (TCGA SKCM data, n=473) show that several gene sets related to Epithelial-Mesenchymal Transition were significantly enriched in the SLITRK6 positively-correlated fraction and genes sets related to metabolism were significantly enriched in the SLITRK6 negatively-correlated fraction (Fig S2). Among all the genes, the melanoma-related transcription factor MITF was the most negatively correlated to SLITRK6 (Fig 1C et Fig 1D).

MAPK inhibition induces a c-Jun dependent SLITRK6 expression

To know whether the increased of PLX4032-induced expression of SLITRK6 in WM266-4 melanoma cells could be extended to other *BRAF*-mutant melanoma cells, we quantified mRNA expression of SLITRK6 in 5 melanoma cell lines. All the cell lines tested showed an increase of mRNA levels under PLX4032 or PLX4032 plus AZD6244 treatment, ranging from 2 to 200 fold of induction (Fig 2A). Of note, we showed that dabrafenib induces similar increase

of SLITRK6 expression (Fig. S3). Moreover, we observed an increase of the protein level of SLITRK6 for A375 and WM266-4 in the same conditions of treatment (Fig 2B and 2C). To know whether MAPKi-induced SLITRK6 expression could be extended to other tumor types, we tested BRAF^{V600E}-mutant colon and thyroid cancer cells. As shown in Fig S4, only RKO displayed an increase of SLITRK6 expression over the four colon cancer cell lines and we did not observe any effect on *BRAF*-mutant thyroid cancer cells. These results suggest that MAPKi-induced SLITRK6 expression is not a common featured of *BRAF*-mutant cells but is more specific to melanoma. To determine if the expression of SLITRK6 is dependent on c-Jun, siRNA targeting c-Jun were transfected in WM266-4 and the cells were treated with PLX4032 alone or in combination with AZD6244. Figure 2D shows that c-Jun depletion prevents MAPKi-induced SLITRK6 expression. JNK phosphorylation of c-Jun at Ser63 and Ser73 is required for the transcriptional activity of c-jun. We treated WM266-4 cells with the specific JNK inhibitor JNK-IN8. Figure 2E shows that the inhibition of c-Jun phosphorylation prevents the induction of SLITRK6 in cells treated with MAPKi. Altogether, these results demonstrated that the induction of SLITRK6 expression can be extended to a panel of *BRAF*-mutant melanoma cells and is dependent on c-Jun expression and activation.

SLITRK6 rapid expression by MAPKi is maintained in MAPKi tolerant cells

We then analyzed the kinetic of PLX4032-induced SLITRK6 expression. The mRNA level significantly increases in two hours PLX4032 treatment and reached a plateau until 16 h, then mRNA increases to reach a 17 fold of induction until 72 h (Fig 3A). We observed a coincidental increase of the SLITRK6 protein, Ser73 c-Jun phosphorylation and protein expression with SLITRK6 mRNA (Fig 3B). To determine whether a continuous infusion of PLX4032 was required to induce SLITRK6 expression we assayed SLITRK6 protein expression after PLX4032 removal. Figure 3C clearly shows that SLITRK6 expression is maintained without returning to the baseline even 96 h after treatment removal suggesting that BRAF-MEK inhibition is required to initiate SLITRK6 induction but an adaptive mechanism independent of MEK inhibition take place to maintain high level of SLITRK6 expression. These results led to test the SLITRK6 expression on Drug Tolerant Cells (DTC). These cells, also called the « minimal residual disease » are defined as subpopulation of cells that remain viable on long term of drug exposure and supposed to be at the origin of the relapse in patients. Cells were continuously treated with 5 μ M of PLX4032 and viable cells collected two weeks after the beginning of treatment. We observed an increase expression of SLITRK6 in DTC as compared to control cells suggesting that SLITRK6 participate to the phenotype of DTC. Interestingly, we show that

SLITRK6 is highly expressed in minimal residual disease from PDX melanoma cells presented in Rambow et al. (Rambow et al., 2018) (JC. Marine personal communication Fig S5A). Using available transcriptomic data, we observed that SLITRK6 mRNA expression was strongly increased by EGFR-TKI in lung cancer cell lines after a short (24h) or prolonged period of treatment (corresponding to the drug-tolerant cell population) (Fig S5B). These results suggested that high expression of SLITRK6 in TKI or MAPKi treated cells is a general feature of drug tolerant cells.

MAPKi-induced SLITRK6 expression is transcriptional

To determine the mechanism underlying PLX4032-induced SLITRK6 mRNA induction, we analyzed the stability of the transcript and the increase in transcription. We demonstrate in WM266-4 that, in the presence of the transcription inhibitor flavopiridol, the half-life of SLITRK6 mRNA was not significantly different whether the cells are treated or not with PLX4032 (Fig. 4A). Analysis of *SLITRK6* transcription by capture of nascent mRNA followed by RT-qPCR showed that PLX4032 increased by approximately 5 folds the transcription of *SLITRK6* gene (Fig. 4B). This increase is reversed when cells are transfected with siRNA targeting c-Jun (Fig. 4C), indicating that *SLITRK6* transcription is dependent of the presence of c-Jun. Altogether, these data indicate that the increase of *SLITRK6* transcript levels in response to PLX4032 is related to an increase in *SLITRK6* transcription but not in *SLITRK6* transcript stability.

SLITRK6 is critical for MAPKi sensitivity in A375 but not in WM266-4 cells

We then, explored the cytotoxic effect of SLITRK6 downregulation combined to MAPKi. We performed Incucyte® caspase activity assays by downregulating SLITRK6 expression with specific siRNA. In A375 cells PLX4032 alone or in combination with AZD6244, SLITRK6 depletion potentiates the caspase activity (Fig. 5A). Likewise, we observed occurrence of cleaved caspase 3 and PARP in the same conditions (Fig. 5B). By contrast, we did not observe significant differences in WM266-4 cells whether SLITRK6 is downregulated or not (Fig. 5C and Fig. 5D). Collectively, these results suggest that SLITRK6 depletion could have a synthetic lethal effect in combination with MAPKi in A375. Indeed, depletion of SLITRK6 or MAPKi alone had no significant effect on cell death. However, these effects seem to be specific of the cellular context since we did not observe same results in WM266-4 cells.

Targeting SLITRK6 expression with ASG-15likeME antibody Drug Conjugated improved MAPKi sensitivity *in vitro* and *in vivo*

We demonstrated that targeting SLITRK6 inhibition to potentiate MAPKi treatment is restricted to specific tumor cell types. However, MAPKi-induced SLITRK6 expression is a common feature of *BRAF*-mutant melanoma cells. This prompted us to propose that targeting MAPKi-induced SLITRK6 expression with an Antibody Drug Conjugated (ADC) broaden cancer cell types which benefit from this therapeutic strategy. We generated the ASG-15likeME, a human mAB conjugated with MMAE and described by Morrison et al. (Morrison et al., 2016) to test our hypothesis. We first used confocal microscopy to visualize binding and internalization of ASG-15like. At 4°C ASG-15like showed membrane localization in MAPKi treated A375 cells while no labelling is observed in non-treated cells (Fig 6A). After 1 hour of incubation at 37°C, membrane localization of ASG-15like is reduced and we observed intracellular localization, suggesting that ASG-15like is rapidly internalized after binding to the membrane (Fig. 6B). We had same results in WM266-4 cells (Fig. S6B). We also tested the specificity of ASG-15like using siRNA targeting SLITRK6 in A375 cells (Fig. S6A). We clearly observed a complete disappearance of the internalization labelling suggesting that ASG-15like is highly specific of its target (Fig. S6A). This results confirm that melanoma cell lines behave in the same way as neuroblastoma cells as described by Morrison et al.. We then tested ASG-15likeME for its ability to kill melanoma cells treated with MAPKi. We showed an increased killing in both cell lines when we combine ASG-15likeME with MAPKi. The most robust effect was seen in WM266-4 showing improvement of the IC₅₀, from 0.2 μM to 0.06 μM (Fig. S7A and S7B). Moreover, we confirm the effect of the combination with an Incucyte® proliferation assay. We show a dramatic anti-proliferative effect of ASG-15likeME combined with MAPKi in both cell lines (Fig. 6B and 6D). This effect is associated with increased cell death analyzed by caspase and PARP cleavage assay (Fig. 6C and 6E). It is interesting to notice that ASG-15likeME alone displayed no significant effect on cell death. These results suggest that ASG-15likeME is able to kill MAPKi-induced SLITRK6 expression melanoma cells.

Finally, we tested the ability of ASG-15likeME to improve the anti-tumoral effect of MAPKi *in vivo*. We used WM266-4 xenograft that have shown the most robust effect *in vitro*. Preliminary data show a significant improvement of the combination of the ASG-15likeME with MAPKi (Fig. 6F).

MATERIAL AND METHODS

Drugs, chemical reagents

PLX4032, AZD6244, were obtained from Selleck Chemicals. DMSO and flavopiridol (FLV) were from Sigma-Aldrich. JNK-IN8 was from Calbiochem. Dabrafenib and Trametinib were from MedChem Express. The antibody drug-conjugate (ADC) against SLITRK6 (ASG15likeME) was synthesized by Evitria and conjugated with MMAE by Levena Biopharma.

Cell lines culture and treatments

BRAF-mutant melanoma cell lines WM115, WM266-4 and A375 were obtained from the American Type Culture Collection (ATCC) and cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10 % (v/v) fetal bovine serum. WM35, WM239A and WM983B *BRAF*-mutant melanoma cells were purchased at Coriell Institute and cultured in MCDB153 medium with 20 % Leibovitz L-15 medium (v/v), 2 % fetal bovine serum heat inactivated (v/v), 5 µg/mL insulin and 1.68 mM CaCl₂. HT29, RKO, Colo205, Colo741 *BRAF*-mutant colon cancer cells were obtained from Ben Allal (CRCT, toulouse, France) and cultured in Roswell Park Memorial Institute (RPMI) supplemented with 10 % (v/v) fetal bovine serum. *BRAF*-mutant thyroid cancer cells BC-PAP were obtained from Ben Allal (CRCT, toulouse, France) and cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10 % (v/v) fetal bovine serum.

Transfection

RNA interference was achieved by transfecting siRNA with Oligofectamine™ in OptiMEM™ (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. Cells were transfected with 40 nM siRNA against c-Jun (siGENOME Human JUN (3725) siRNA – SMARTpool ; Dharmacon™) or with 20 nM of siRNA against SLITRK6 (siGENOME Human SLITRK6 (84189) siRNA – SMARTpool ; Dharmacon™) or a nontargeting sequence (SR-CL000-005 ; Eurogentec). si-RNA sequences are reported in Table S1. After 6 h, transfection medium was replaced and inhibitors were added.

Transcriptomic

WM266-4 cells were transfected with siRNA against c-Jun or nontargeting sequence and treated for 48 h with PLX4032 1 µM or DMSO. Then total mRNA was extracted and samples were hybridized on Affymetrix GeneChip® Human Gene 2.0 ST Arrays. For each condition

triplicates were used from 3 independent experiments. For the analyses, normalized intensity values were obtained using the Robust Multichip Average method with R software. For statistical analyses R software was used. Differential gene expression was analyzed using Benjamini & Hochberg criteria. Threshold adj. p.value 0.05 and log₂FC 0.5.

Nanostring

The cell lines were treated with PLX4032 for 72 h. Total mRNA was then extracted. To assess RNA quality, all samples were run on Fragment Analyzer (AATI). RNA concentration were quantified by Quant-iT RNA Assay kit broad range (Life Technologies SAS) with fluorometer (Clariostar, BMG Labtech). We analyzed RNA using the Nanostring nCounter system (Nanostring Technologies, Seattle, WA) following manufacturer's instructions. We employed a custom-designed codeset containing 32 genes and 16 housekeeping genes, for biological normalization purposes, provided by Nanostring Technologies. Each reaction mixture contained 100 ng of RNA, hybridization buffer, reporter probes, capture probes, as well as six positive and eight negative controls. RNA was hybridized with reporter and capture probes 16 hours at 65°C, and sample preparation ensued at the Nanostring preparation station. Finally, data were analyzed in nSolver Analysis Software, version 3.0 (Nanostring Technologies, Seattle, WA). Raw counts were normalized to the geometric mean of the seven best housekeeping genes (with low %CV).

Quantitative reverse transcription-PCR

Total RNAs were extracted using the RNeasy Plus mini kit (QIAGEN) according to the manufacturer's instructions and the concentration and purity of RNA were determined using the Nanodrop ND-1000. RNAs were reverse transcribed using the iScript cDNA synthesis kit (Bio-Rad). qPCR analyses were performed on a CFX96 real-time system device (Bio-Rad) by using IQ SYBR green Supermix (Bio-Rad) according to the manufacturer's instructions. All samples were analyzed in triplicate, and 28S mRNA was used as endogenous control in the $\Delta\Delta CT$ analysis. The human primer pairs used were: SLITRK6-FW (5'-GCAAAGTCCTATCCCATCA-3') and SLITRK6-RV (5'-TCCCCAAGTGAAGCATTTC-3'), 28S-FW (5'-TCGCTGGGTCTTGATGT-3') and 28S-RV (5'-AGCAGATTGTGACAGACCATTCC-3').

Cell extracts and immunoblotting

Whole cell extracts were obtained by lysing cells in 1 % SDS and 10 mM Tris-HCl (pH 7.4) supplemented with phosphatase inhibitors (Halt phosphatase inhibitor cocktail;

ThermoFisher). Viscosity of the samples was reduced by brief sonication. Proteins were separated by SDS-PAGE and immunoblotted with the following antibodies : anti-SLITRK6 (AF7317 ; R&D), anti-p63-c-Jun (#9261 ; CST), anti-p73-c-Jun (#3270 ; CST), anti-c-Jun (#9165 ; CST), anti-p-Erk (#4377 ; CST), anti-Erk (#4696 ; CST), anti-PARP-1 (#9542 ; CST), anti-cleaved caspase 3 (#9664 ; CST), anti-total caspase (#9662 ; CST), anti-tubulin (T5168 ; Sigma-Aldrich), anti-actin (MAB1501 ; Millipore). Immunoblotting was revealed by chemiluminescence using ChemiDoc MP System (Bio-Rad). Quantification of protein levels was done with Image Lab software (version 4.1).

Nascent RNA transcripts analysis

Nascent RNAs were labeled and captured using the Click-iT Nascent RNA capture kit (Life Technologies) according to the manufacturer's instructions. A 16 h 5-ethynyl uridine (EU) pulse at the concentration of 0.2 mM was performed to label nascent RNAs. Five µg of total RNA was used for the Click reaction.

Caspase activity assay

Cells were seeded in 96-well plates, transfected with si-RNA targeting SLITRK6 or not and treated with inhibitors in the presence of 5 µM of Caspase 3/7 Apoptosis Assay Reagent (Essen bioscience). The Caspase 3/7 reagent labels dead cells yielding green fluorescence. IncuCyte Zoom Live-Cell Imaging system (Essen Bioscience) was used for kinetic monitoring of caspase activity induced by SLITRK6 depletion in treated cells. The plate was scanned and fluorescent and phase-contrast images were acquired in real time every 3 hours for 72 h. Normalized Green Object Count per well at each time point and quantified time-lapse curves were generated by IncuCyte ZOOM software.

Cell proliferation assay

Cells were seeded in 96-well plates and treated for 150 h with inhibitors alone or in combination with ADC against SLITRK6. Cell confluence was measured and quantified by IncuCyte Zoom Live-Cell Imaging system (Essen Bioscience).

Immunofluorescence

Cells were treated with inhibitors for 48 h. Cells were then incubated with the antibody against SLITRK6 synthesized by Evitria for 1 h at 4°C (cell surface binding) or 37°C (internalized antibody). After the incubation period, cells were fixed with 4 % PFA and permeabilized with ethanol at 4°C. Cell surface bound and internalized antibody against SLITRK6 was visualized

using Alexa Fluor 488-labeled goat anti-human IgG (Invitrogen). Then coverslip were mounted with MOWIOL (Calbiochem) and DAPI. Pictures were acquired with inverted confocal microscope (LSM780 ; Carl Zeiss) and analyzed with ImageJ(version 1.48v).

Cell cytotoxicity assay

Cells were treated with inhibitors alone or in combination with ADC. 120 h later, the relative number of viable cells was measured by incubating cells with MTS reagent (CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation assay from Promega) as recommended by the manufacturer. Relative cell survival in the presence of inhibitors was normalized to the untreated cells after background corrections.

Animal studies

1.5×10^6 WM266-4 cells were injected in the flanks of female nude NMRI mice (Charles Rivers ; NU/NU NMRI MOUSE) of 6 weeks subcutaneously. When tumor reached 500 mm^3 , mice were treated with Dabrafenib-Trametinib (DT) combination via daily oral gavage. Dabrafenib and trametinib were dissolved in DMSO at a concentration of 30 and 0.3 mg/mL respectively, aliquoted and stored at -80°C . Each day a fresh aliquot was thawed and diluted 1 : 10 with phosphate-buffered saline. Mice were treated with a capped dose of 600 – 6 μg dabrafenib – trametinib respectively in 200 μL total volume as previously described (Rambow et al., 2018). Mice were also intravenously injected twice per week with 0.5 mg / kg antibody MMAE-conjugated against SLITRK6 (ADC). Tumor volume was monitored three times per week with a caliper and the volume was calculated using the following formula: $V = (\pi/6) * \text{length} * \text{width} * \text{height}$. At day 3, 6 and 9 of treatment three mice of each group were sacrificed for immunohistochemical analyses on samples during treatment. Mice had unrestricted access to food and water and were kept on a 12h light/dark cycle under specific pathogen-free conditions at the CRCT animal facility (US006 CREFRE—Inserm/UPS), which is accredited by the French Ministry of Agriculture to perform experiments on live mice (accreditation number A-31 55508). All experimental protocols were approved by the local ethic committee (Midi-Pyrénées, France) and are in compliance with the French and European regulations on care and protection of laboratory animals.

Statistical analyses

All results are presented as the mean \pm standard error of the mean (SEM) for at least three independent experiments. Statistical analyses of continuous variable were done using *t*-test and IC50 calculation and comparison were performed using GraphPad Prism, version 5.01

(GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$. Hypotheses were two-sided, with an alpha risk of 5 %.

LEGENDS

Figure 1 : Differentially expressed genes analysis on WM266-4 melanoma cells reveals SLITRK6 as a c-Jun dependent target gene induced by PLX4032.

A. Heatmap of the differentially expressed genes in the indicated conditions on Affymetrix GeneChip arrays.

B. Heatmap of expression using NanoString assays of the 40 selected genes (in gray Fig1A) in 6 *BRAF*-mutant melanoma cell lines.

C., D. All data were retrieved from the skin cutaneous melanoma TCGA database (available for 406 tumors), using the cBioPortal for Cancer Genomics tool (cbioportal.org). **C.** Correlation between MITF and SLITRK6 mRNA expression (log₂ scale). **D.** SLITRK6 mRNA expression (log₂ scale) in skin tumors with low (under median) vs high (above median) MITF levels.

Figure 2 : SLITRK6 mRNA and protein induction under MAPK pathway inhibition is dependent on c-Jun.

A. mRNA fold increase of SLITRK6 compared to the control was measured by RT-qPCR in melanoma *BRAF*-mutant cell lines treated with 1 μ M PLX4032 alone or in combination with 0.1 μ M AZD6244 for 72 h (means \pm SEM $n=3$. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$ by unpaired t test).

B. A375 and WM266-4 cells were treated with 1 μ M PLX4032 alone or in combination with 0.1 μ M AZD6244 for 72 h. Western blot analysis was performed for SLITRK6, p73-c-Jun, c-Jun, p-ERK and ERK. Actin was the loading control. Western blot is representative of three independent experiments.

C. Shows the quantification of SLITRK6 expression induction compare to the non treated cells of the western blot in panel B (means \pm SEM $n=3$. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$ by unpaired t test).

D. WM266-4 cells were transfected with an si-RNA targeting c-Jun (si-c-Jun) or not (si-Ctl). Cells were then treated with 1 μ M PLX4032 alone or in combination with 0.1 μ M AZD6244 for 48 h. Western blot analysis was performed for SLITRK6, p73-c-Jun and c-Jun. Actin was the loading control. Western blot is representative of three independent experiments. The top

panel shows the quantification of SLITRK6 expression compared to the control (means \pm SEM $n=3$. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$ by unpaired t test).

E. WM266-4 cells were treated with 1 μ M PLX4032 alone or in combination with 1 μ M JNK-IN8 for 48 h. Western blot analysis was performed for SLITRK6, p63-c-Jun, p73-c-Jun and c-Jun. Tubulin was the loading control. Western blot is representative of three independent experiments.

Figure 3 : Characterization of SLITRK6 expression in WM266-4 cells.

A. WM266-4 cells were treated with 1 μ M PLX4032 for indicated times. mRNA fold increase of SLITRK6 compared to the control was measured by RT-qPCR (means \pm SEM $n=3$. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$ by unpaired t test).

B. WM266-4 cells were treated with 1 μ M PLX4032 for indicated times. Western blot analysis was performed for SLITRK6, p73-c-Jun and c-Jun. Actin was the loading control. Western blot is representative of three independent experiments. The mean of SLITRK6 induction quantification is indicated.

C. WM266-4 cells were treated with 1 μ M PLX4032 for 72 h and washed and cultured in PLX4032-free medium for indicated times (release). Western blot analysis was performed for SLITRK6, p73-c-Jun, c-Jun, p-ERK and ERK. Actin was the loading control. Western blot is representative of three independent experiments.

D. A375 and WM266-4 cells were treated with 5 μ M PLX4032 for 2 weeks. Western blot analysis was performed for SLITRK6. Actin was the loading control.

Figure 4 : MAPKi-induced SLITRK6 expression is transcriptional.

A. WM266-4 cells were treated with 1 μ M PLX4032 for 24 h. After which, the transcription inhibitor FLV (1 μ M) was added for indicated times. SLITRK6 mRNA expression was analyzed by RT-qPCR and normalized to the level at the time of FLV addition, which was set to 100 % (means \pm SEM $n=3$).

B. WM266-4 cells were treated with 1 μ M PLX4032 for 1 h before addition of 0.2 mM EU to the culture medium for 16 h, after which EU-labeled nascent RNAs were captured. Nascent

SLITRK6 RNAs were then analyzed by RT-qPCR. Data were normalized to the level of non-treated cells which was taken at 1 (means \pm SEM $n=3$. *, $P < 0.05$ by unpaired t test).

C. WM266-4 cells were transfected with an si-RNA targeting c-Jun (si-c-Jun) or not (si-Ctl). Cells were then treated with 1 μ M PLX4032 for 1 h before addition of 0.2 mM EU to the culture medium for 16 h, after which EU-labeled nascent RNAs were captured. Nascent SLITRK6 RNAs were then analyzed by RT-qPCR. Data were normalized to the level of non-treated cells which was taken at 1 (means \pm SEM $n=2$).

Figure 5 : SLITRK6 depletion sensitizes cells to MAPK inhibitors depending on cell line.

A, B, C, D. A375 or WM266-4 were transfected with an si-RNA targeting SLITRK6 (si-SLI or si-SLITRK6) or not (si-Ctl). Cells were then treated with 1 μ M PLX4032 alone or in combination with 0.1 μ M AZD6244 for 72 h.

A, C. Real-time caspase 3/7 activity in cells was measured during 72 h using IncuCyte® ZOOM Live-Cell Imaging system (mean \pm SEM of triplicates ; $n=1$)

B, D. Western blot analysis was performed for SLITRK6, cleaved and total caspase 3, cleaved (arrow) and total PARP. Tubulin was the loading control. Western blot are representative of three independent experiments.

Figure 6 : The use of a specific antibody drug conjugate against SLITRK6 sensitizes cells to MAPK inhibitors triggering apoptosis.

A, B. A375 cells were transfected with an si-RNA targeting SLITRK6 (si-SLITRK6) or not (si-Ctl) and treated with 1 μ M PLX4032 alone or in combination with AZD6244 0.1 μ M for 48 h. Cells were then incubated with an antibody against-SLITRK6 for 1 h at 4°C (cell surface binding) or 37°C (internalization). Cell surface bound and internalized SLITRK6 is green and DAPI-stained nuclei are blue. Representative pictures.

B, D. WM266-4 or A375 cells were treated with 0.5 μ M PLX4032 alone or in combination with 0.01 μ M AZD6244 and/or 10 μ g/mL ADC targeting SLITRK6 for 150 h. Cell confluency was analyzed by time-lapse microscopy using IncuCyte® ZOOM Live-Cell Imaging system (means \pm SEM of triplicates ; $n=3$).

C, E. WM266-4 or A375 cells were treated with 0.5 μ M PLX4032 alone or in combination with 0.01 μ M AZD6244 and/or 10 μ g/mL ADC targeting SLITRK6 for 72 h. Western blot analysis was performed for SLITRK6, cleaved (arrow) and total PARP and cleaved caspase 3. Actin was the loading control. ($n=1$)

F. Tumor growth of WM266-4 cells in the flanks of nude NMRI mice subcutaneously injected with 1.5×10^6 WM266-4 cells. When tumor reached around 500 mm³, mice were treated with the combo dabrafenib and trametinib (DT : daily orally gavage capped dose of 600 – 6 μ g D-T respectively per mice) alone or in combination with the ADC against SLITRK6 (ADC : IV twice per week 0.5 mg/kg). The tumor volume was evaluated every 3 days ($n=15$ per group ; means \pm SEM).

SUPPLEMENTARY LEGENDS

Figure S1 : SLITRK6 expression in cancers. (TCGA data)

Figure S2 : Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) using the list of genes that positively (in red) or negatively (in blue) correlate with SLITRK6 expression in skin melanoma (TCGA SKCM data, $n=473$). Data represent the three main gene sets most significantly enriched in the **A.** positively and **B.** negatively correlated genes.

Figure S3 : SLITRK6 mRNA is induced after dabrafenib treatment.

mRNA fold increase of SLITRK6 compare to the control was measured by RT-qPCR in A375 and WM266-4 cells treated with 7nM dabrafenib for 72 h (means \pm SEM $n=3$. **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$ by unpaired t test).

Figure S4 : SLITRK6 induction is not a common feature in BRAF-mutant tumors.

mRNA fold increase of SLITRK6 compare to the control was measured by RT-qPCR in *BRAF*-mutant colon (HT29, RKO, Colo205, Colo741) and thyroid (BC-PAP) cells treated with PLX4032 (at CI50 for each cell line) alone or in combination with AZD6244 (0.1 μ M) for 72 h (means \pm SEM $n=3$).

Figure S5 : SLITRK6 is expressed in Drug Tolerent Cells from BRAF-mutant PDX and EGFR-mutant NSCLC PC9 cells.

A. Expression of SLITRK6 in minimal residual disease from PDX described in Rambow et al. (Rambow et al., 2018) (JC. Marine personal communication)

B. SLITRK6 mRNA expression in EGFR-mutated PC9 lung cancer cells treated with Erlotinib 1 μ M for 24h (Erlo) or 9 days (DTP, Drug-Tolerant Persisters). Data were generated by Guler GD et al. Cancer Cell, 2017 (PMID: 28781121) and were downloaded from Gene Expression Omnibus (GSE74180).

Figure S6 : Antibody against SLITRK6 binds specifically to its target only after MAPKi treatment.

A. A375 cells were transfected with four different si-RNA targeting SLITRK6 (si-SLITRK6) or not (si-Ctl) and treated with 1 μ M PLX4032 alone or in combination with AZD6244 0.1 μ M for 48 h. Cells were then incubated with an antibody against-SLITRK6 for 1 h at 37°C (internalization). Cell surface bound and internalized SLITRK6 is green and DAPI-stained nuclei are blue. Representative pictures.

B. WM266-4 were treated with 1 μ M PLX4032 alone or in combination with AZD6244 0.1 μ M for 48 h. Cells were then incubated with an antibody against-SLITRK6 for 1 h at 4°C (cell surface binding) or 37°C (internalization). Cell surface bound and internalized SLITRK6 is green and DAPI-stained nuclei are blue. Representative pictures.

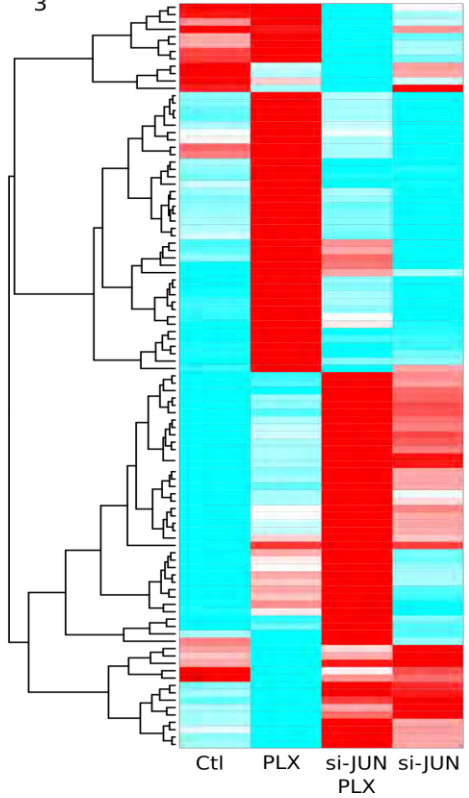
Figure S7 : The ADC against SLITRK6 sensitizes cells to BRAFi.

A, B. WM266-4 or A375 cells were treated with indicated doses of PLX4032 alone or in combination with 10 μ g/mL ADC targeting SLITRK6 for 120 h. Cell viability was measured by MTS and the dose-response was analyzed (means \pm SEM of triplicates ; $n=3$ for WM266-4 cells and $n=1$ for A375 cells).

Figure 1

A.

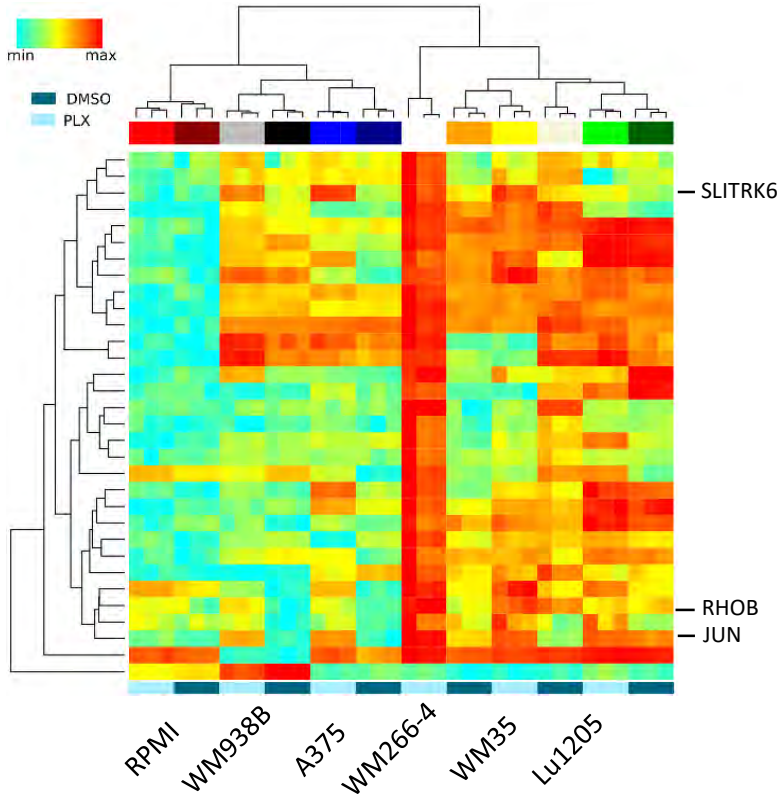
Z-score
-3 3



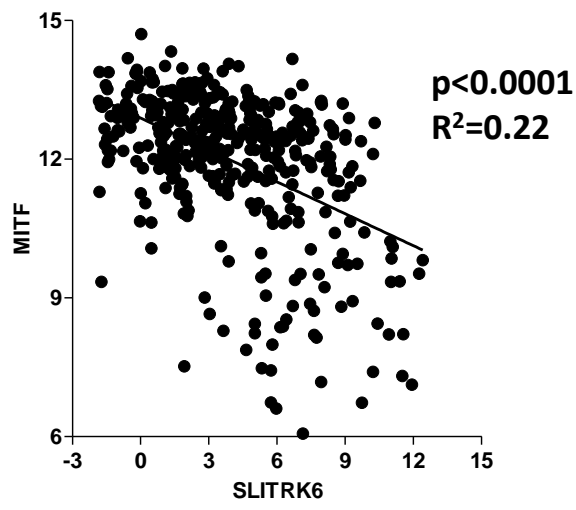
B.

min max

DMSO
PLX



C.



D.

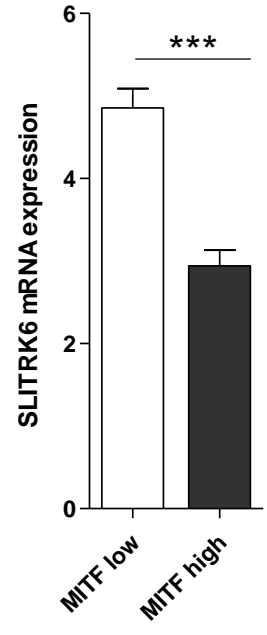


Figure 2

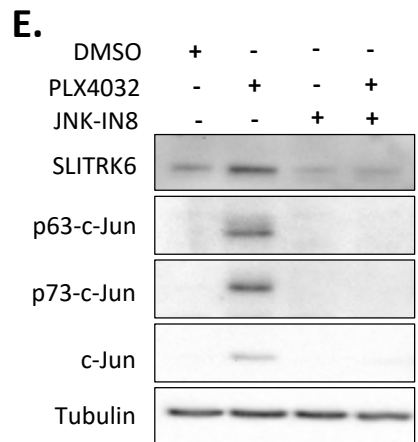
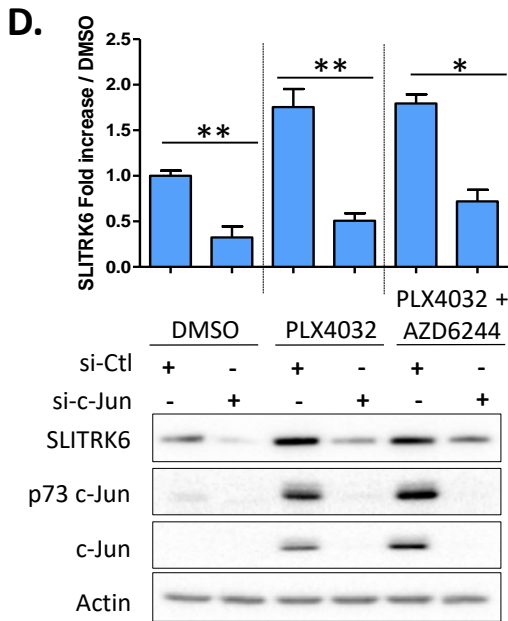
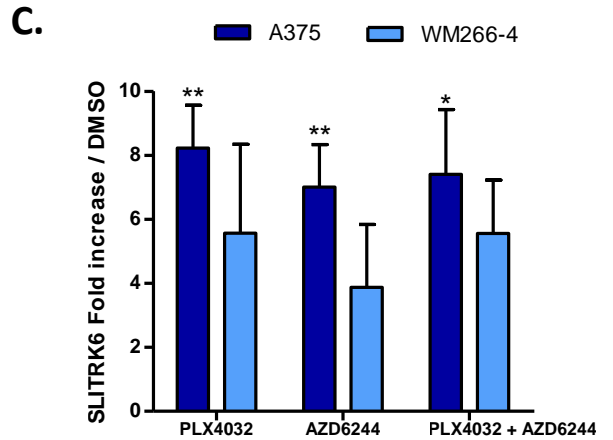
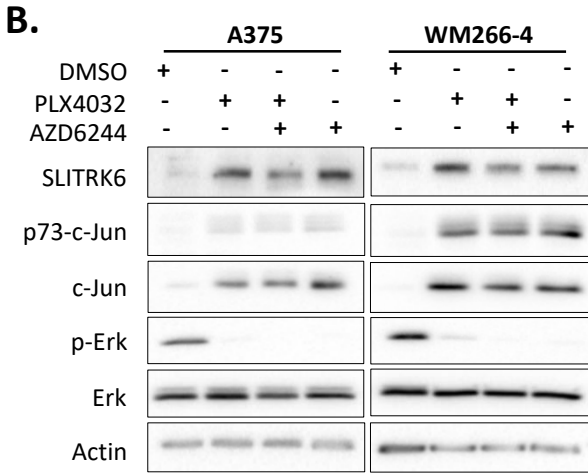
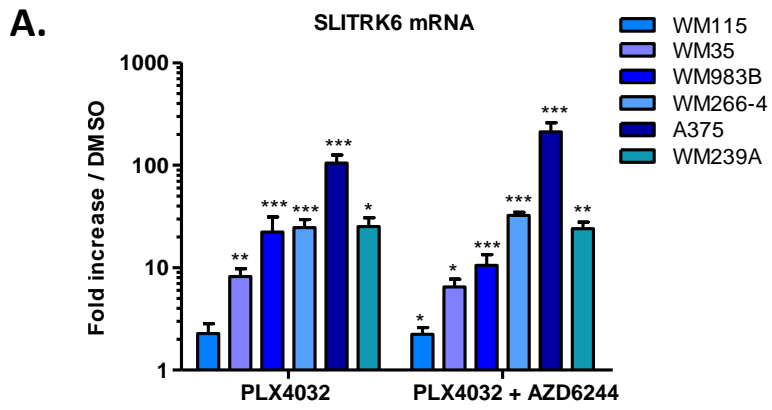


Figure 3

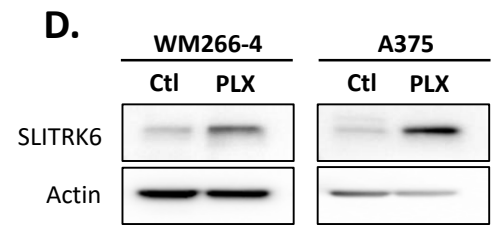
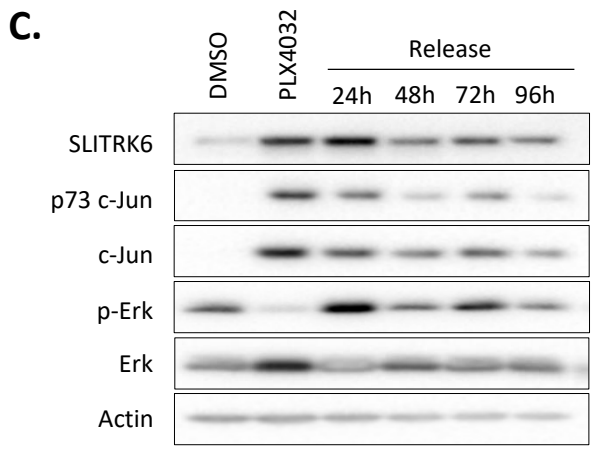
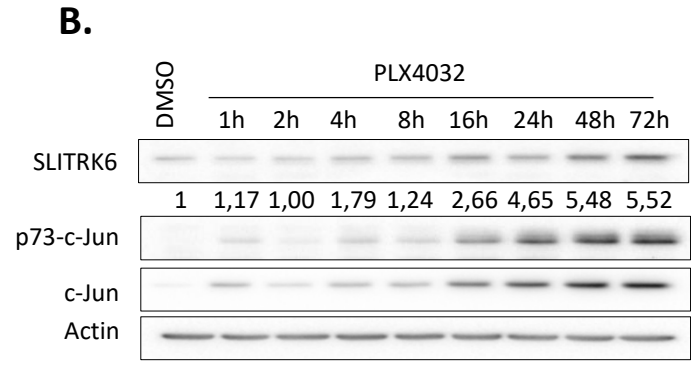
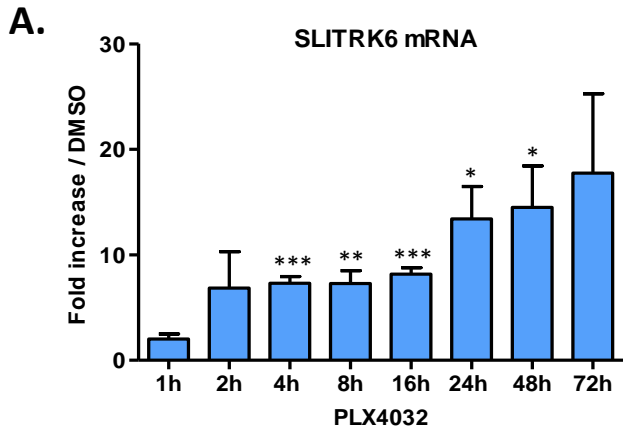


Figure 4

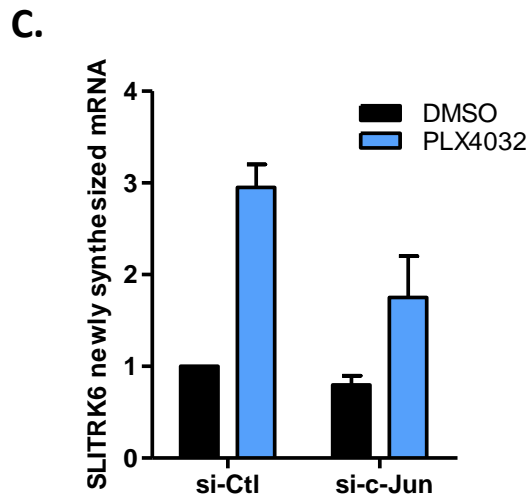
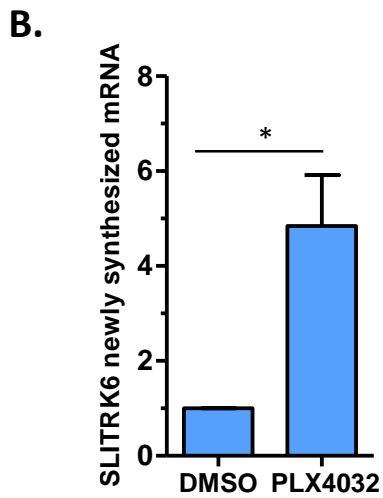
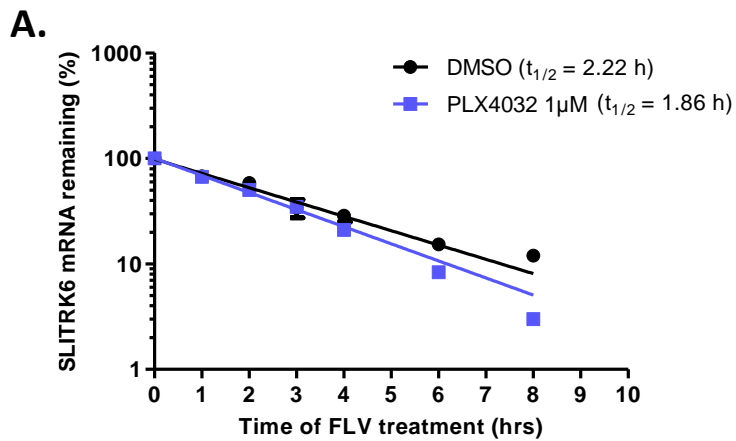
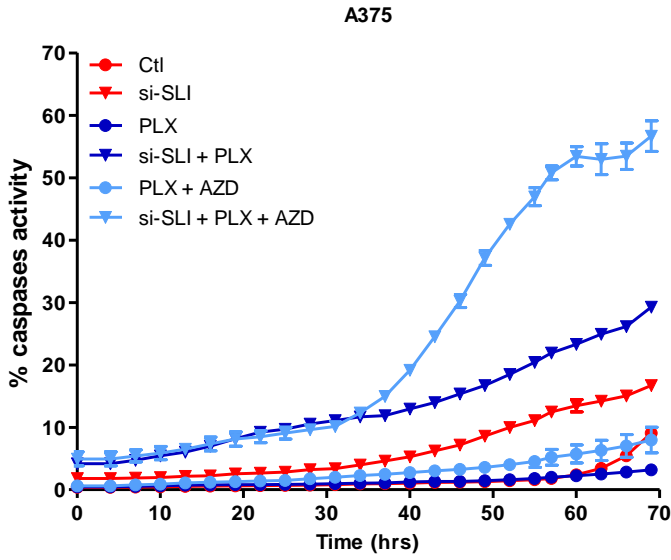
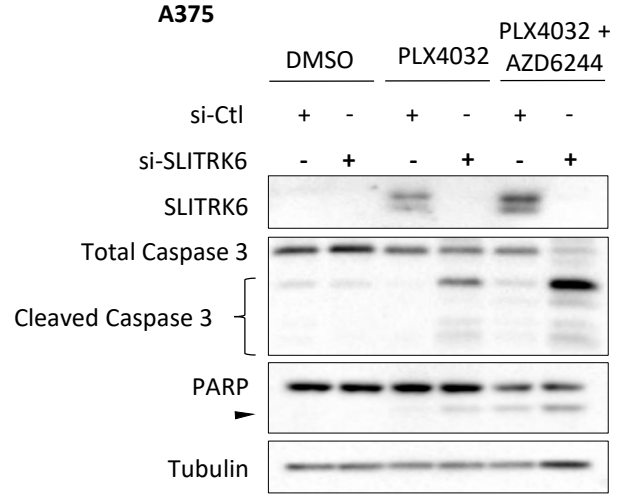


Figure 5

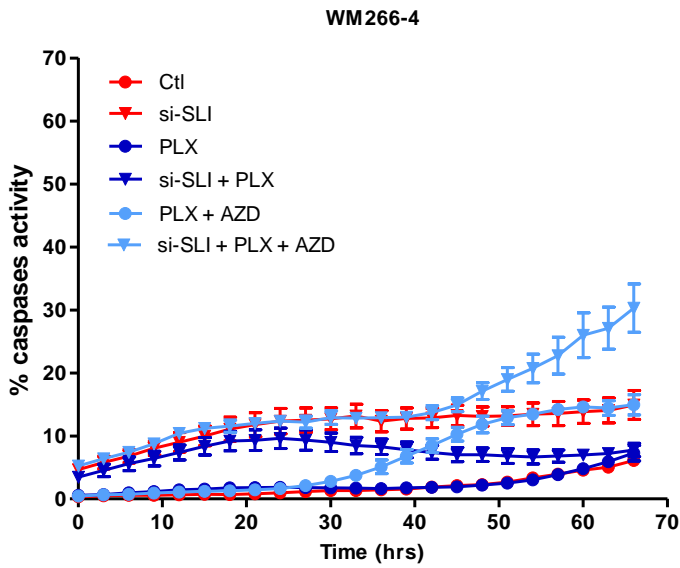
A.



B.



C.



D.

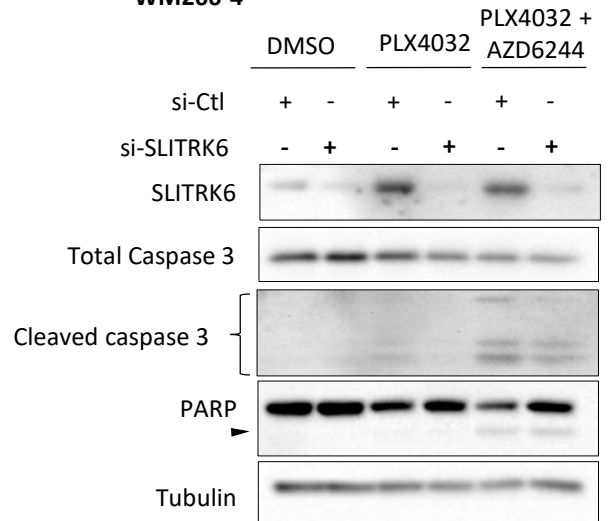
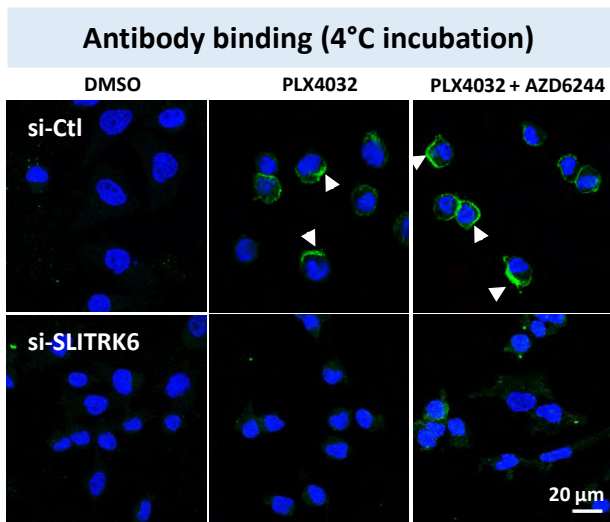
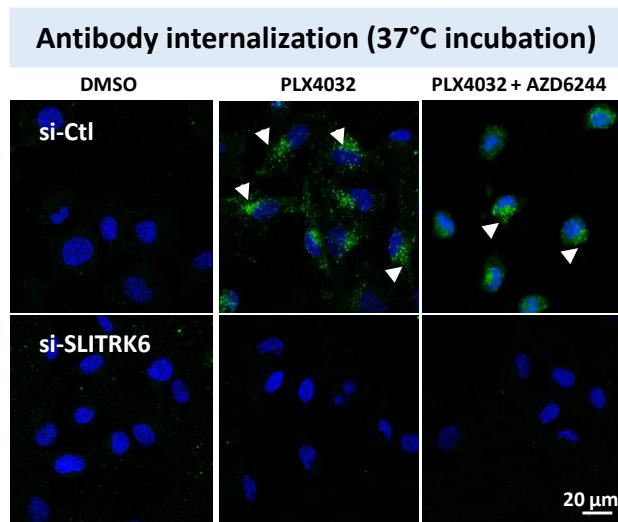


Figure 6

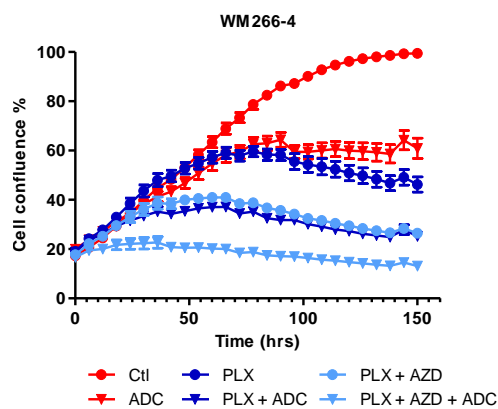
A.



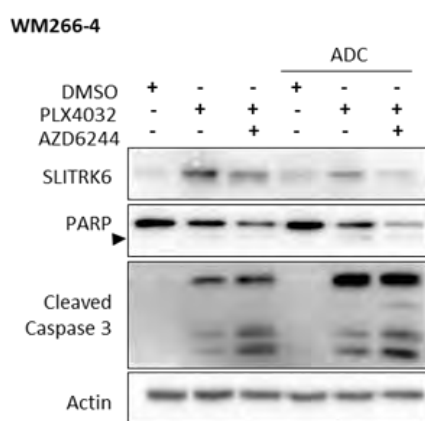
B.



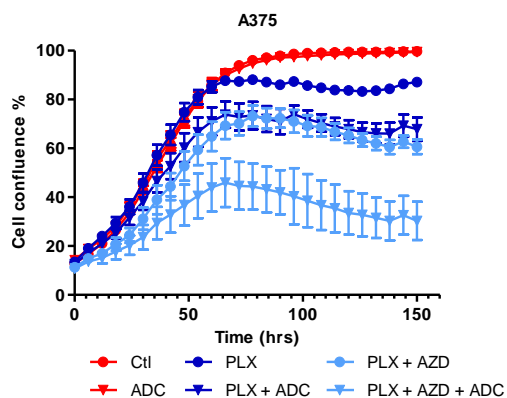
B.



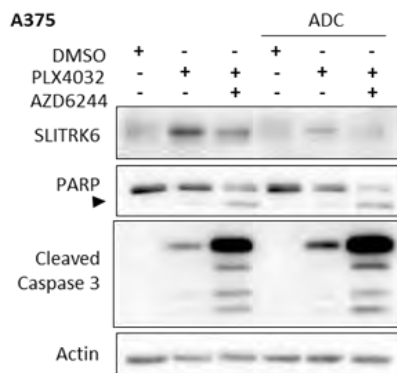
C.



D.



E.



F.

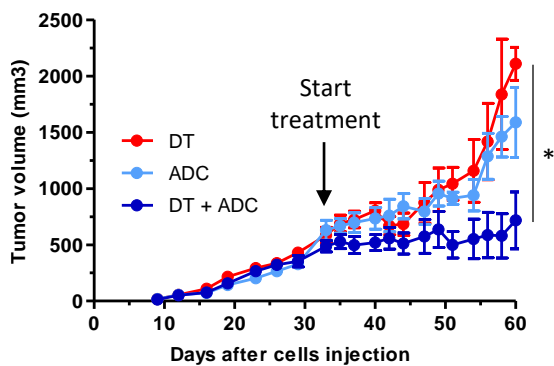
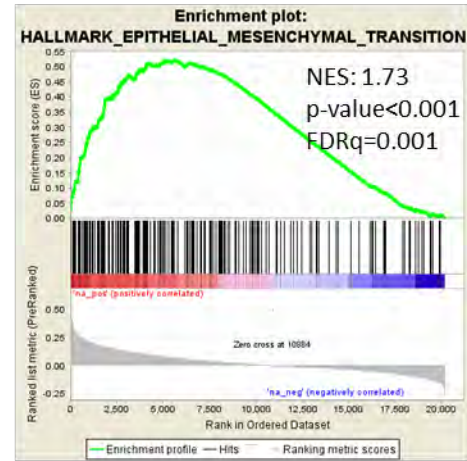
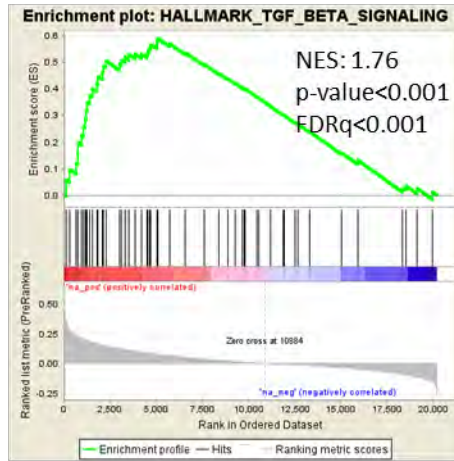
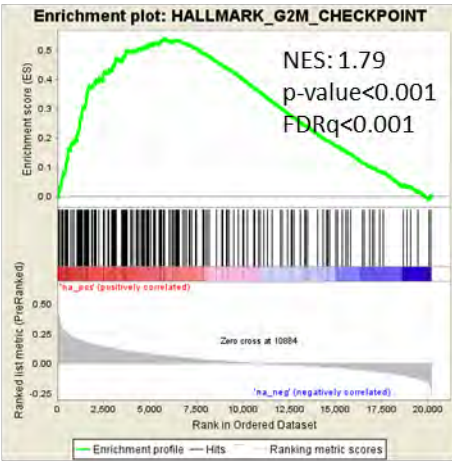


Figure S2

A



B

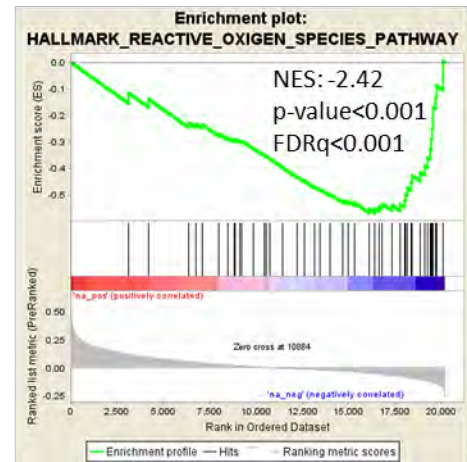
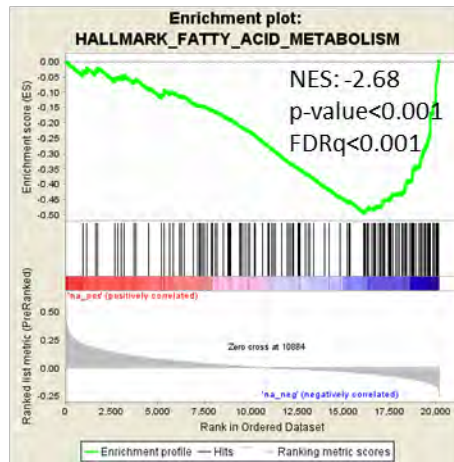
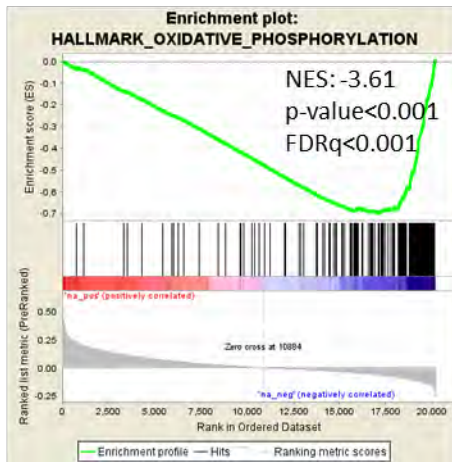


Figure S3

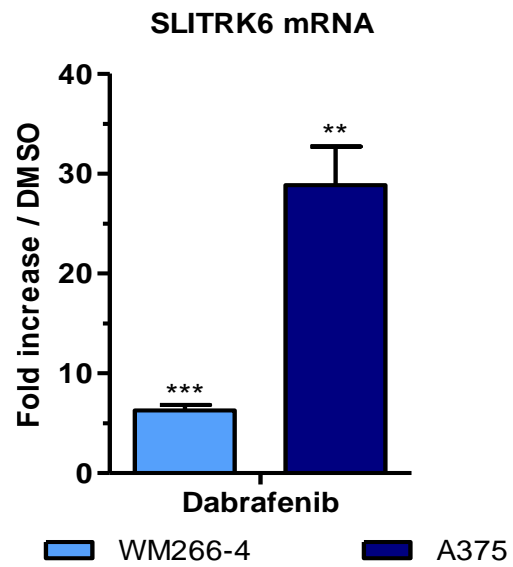


Figure S4

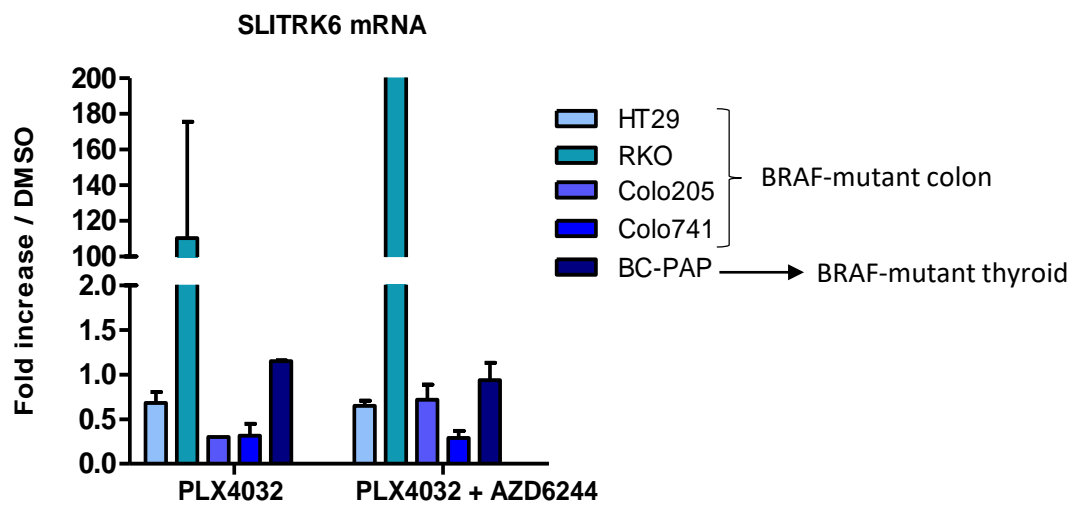
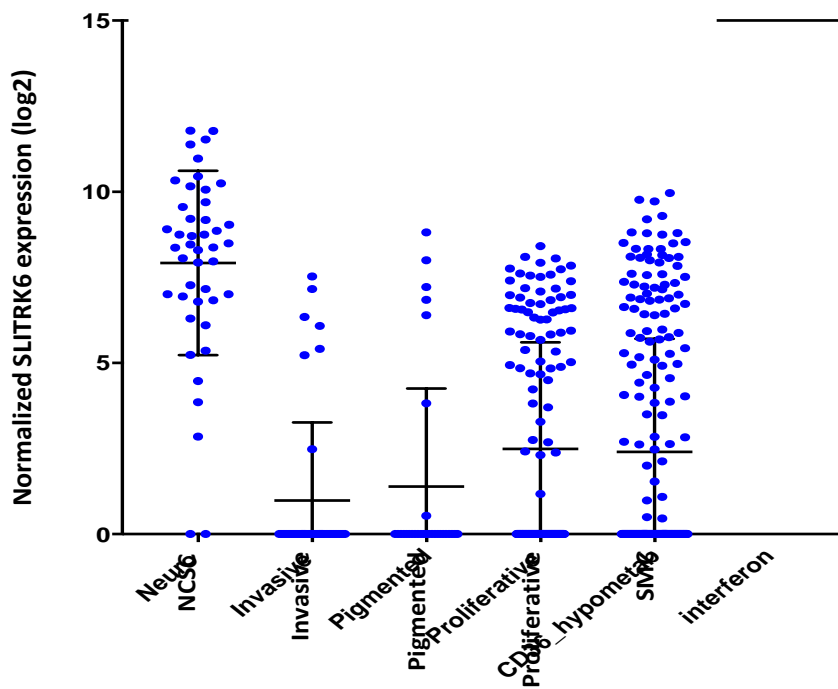


Figure S5

A.



B.

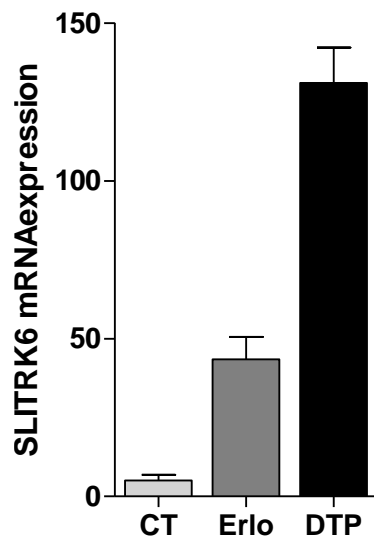
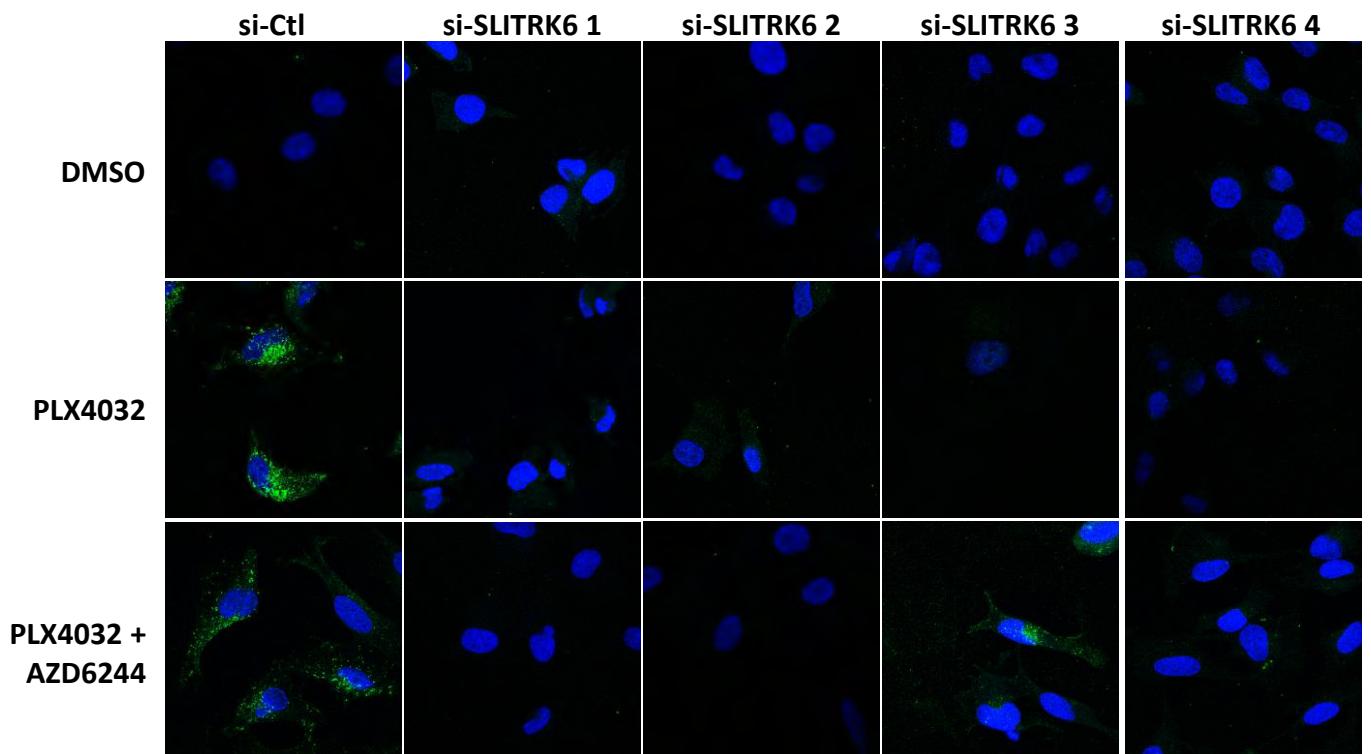


Figure S6

A. A375



B. WM266-4

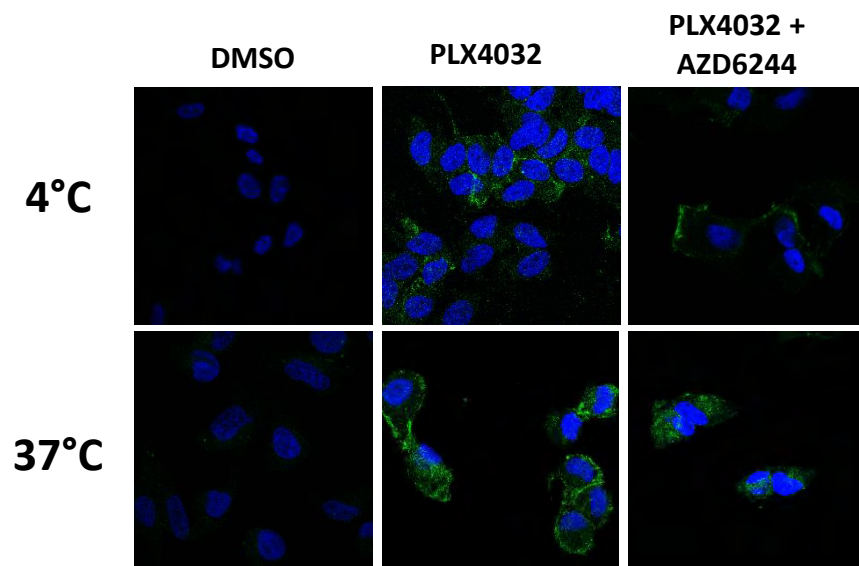
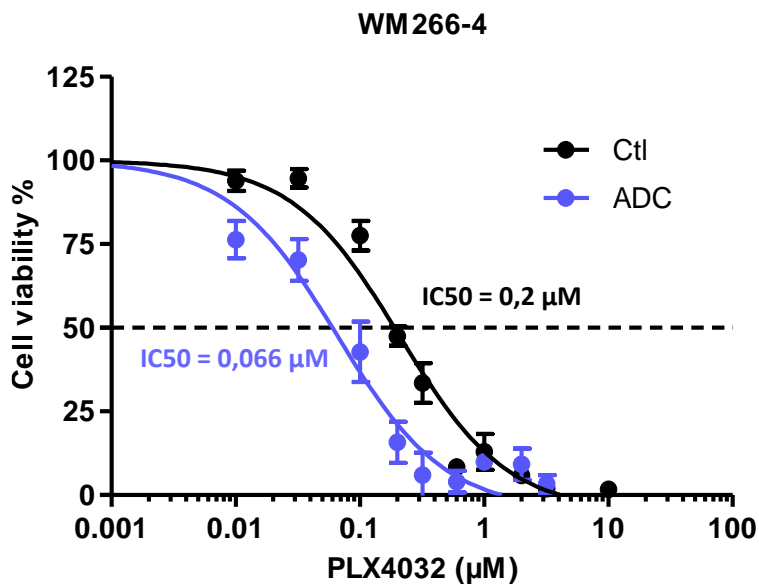


Figure S7

A.



B.

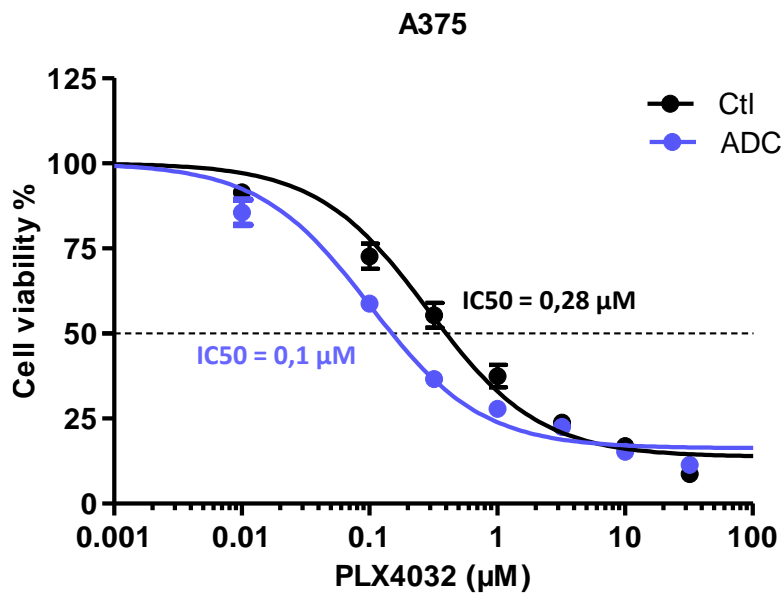


Table S1 : si-RNA sequences

si-c-Jun smart pool	si-c-Jun 1	UGGAAACGACCUUCAUGA
	si-c-Jun 2	UAACGCAGCAGUUGCAAAC
	si-c-Jun 3	GAGCGGACCUUAUGGCUAC
	si-c-Jun 4	AAGUCAUGAACCCACGUUAA
si-SLITRK6 smart pool	si-SLITRK6 1	GAAGAAGGAUCGUUUUAUGA
	si-SLITRK6 2	GAACAUGCCUCCACAGUCU
	si-SLITRK6 3	GAUGGUAUCUGAAAUAAGU
	si-SLITRK6 4	GUAACCACCUGACCAAAUU

Table S2 : List of genes differentially expressed

	Jun_DMSO	Jun_PLX	siCtl_PLX	siCtl_DMSO		
SEL1L3	0,510465281		0	1	0,983196192	
TNFRSF12A	0,387089628		0	1	0,95812346	
COL8A1	0,438085911		0	1	0,735480936	
ITGA11	0,728947328		0	0,95680152	1	
LRRC15	0,195498423		0	1	0,657715265	
NPTX1	0,330463068		0	1	0,656380581	
OLFML3	0,301516853		0	1	0,874199823	
FLT1	0,213497885		0	1	0,88810606	
SLC16A6	0,711766019		0	0,442047967	1	
FOSL1	0,642565091		0	0,412846129	1	
ADAM19	0,452148408		0	0,554789204	1	
UCN2		1	0	0,366910494	0,939751638	
FLNA		0	0,415628518		1	0,247361323
MOXD1		0	0,376997686		1	0,234941191
MYOF		0	0,36917465		1	0,192032826
MAP1LC3C		0	0,381560629		1	0,167686432
BEND6		0	0,441501315		1	0,334892338
FGL2		0	0,481557648		1	0,487571756
NGFR		0	0,349272624		1	0,513331584
CCL2		0	0,348505645		1	0,818061188
CDKN2A		0	0,403845323		1	0,772214948
MIR21		0	0,000688899		1	0,304337294
TIMP4	0,058601927		0		1	0,257682699
DPYD		0	0,042754513		1	0,206717398
PITPNM2	0,02505778		0		1	0,433269325
CNN1		0	0,311133894		1	0,283281963
GALC		0	0,264796701		1	0,22683943
LYPD6		0	0,192871309		1	0,268688175
PMEPA1		0	0,231594634		1	0,277220189
SQRDL		0	0,233618604		1	0,330195482
PGRMC1		0	0,237398915		1	0,407750392
FAM214B		0	0,196664157		1	0,44610857
SYT11		0	0,740036855		1	0,132835197
SEMA3C		0	0,635299105		1	0,158624385
JUN		0	0,805591843		1	0,246849215
RHOB		0	0,784229938		1	0,000918208
TGFB2	0,345580558		0,70067317		1	0

PGM2L1	0,021206261	0,261896013	1	0
CD53	0	0,237172832	1	0,007195435
ITGA2	0	0,324125973	1	0,0323104
CCND2	0	0,304383599	1	0,098716823
SLITRK6	0	0,255627488	1	0,111886804
C1orf198	0	0,493234279	1	0,081487515
TMEM65	0,048724279	0,521093305	1	0
LIPA	0,069355372	0,023068265	1	0
SYNE3	0,108280051	0,129720353	1	0
ITGB8	0,110719275	0	1	0,039543399
TRIM9	0,202223805	0	1	0,043356887
FCRLA	0,249285375	0,227611138	1	0
MIR516A2	0,607355421	0	1	0,085986571
TAS2R31	0,748586373	1	0,100308274	0
MIR3941	0,718248117	1	0,136478188	0
MIR4295	0,810046546	1	0	0,016121217
EMC10	0,818593354	1	0,265906396	0
MIR570	0,861933875	1	0,249031153	0
RNU7-35P	0,845986065	1	0,149835675	0
SNX29P2	0,794995936	1	0,399755943	0
MIR3975	0,76459554	1	0,433302698	0
MIR3671	0,866334758	1	0,44122064	0
MGC24103	0,838314432	1	0,317308048	0
MIR505	0,774009755	1	0,331769532	0
GUSBP3	0,966725355	1	0,388787054	0
LHFPL3-AS1	0,959907209	1	0,386594079	0
MIR1299	0,660909899	1	0,248643937	0
CCDC144A	0,627800228	1	0,29069818	0
RNU7-70P	0,641220904	1	0,186880179	0
FGFBP2	0,483907522	1	0,302783693	0
SNORA70F	0,545436372	1	0,329629547	0
PLAC4	0,757343132	1	0,500034466	0
MIR4534	0,675139703	1	0,49788412	0
MIR4742	0,64385386	1	0,441913677	0
PPARGC1A	0,681988793	1	0,434755835	0
ADAMTS16	0,569537606	1	0,557447571	0
TP53	0,88273787	1	0,900084722	0
BHLHE22	0,22338272	1	0,592419246	0
SAT1	0,201234798	1	0,523458258	0
SOCS6	0,282678368	1	0,502158559	0
GPR158	0,315845244	1	0,620414135	0
GPR155	0,319444506	1	0,561988495	0
SERPINF1	0,149989821	1	0,66321806	0
BCAN	0,114491505	1	0,568418315	0
KCNJ13	0	1	0,740303579	0,018243674
DMD	0	1	0,521103679	0,043655191
MIR4251	0,228106164	1	0,082111781	0
HBG2	0,145746922	1	0,179920764	0
MIR550B1	0,141073652	1	0	0,347267709
MIR642B	0,267765006	1	0	0,772211274
DLEU2L	1	0,544824649	0	0,711258694
SFXN1	1	0,652733033	0	0,56942719
CLDN12	1	0,95206485	0	0,604569797
HIST1H3H	0,856733617	0,519013479	0	1
CCNL1	0,797409931	0,736452754	0	1
FASTKD1	0,916110915	1	0	0,242378761
OR56B1	0,943540583	1	0	0,329467571
EYA3-IT1	1	0,883594383	0	0,180790661

IGSF3	1	0,690926972	0	0,33502349
MIR320D1	1	0,801258034	0	0,399913481
ARRDC3	0,666940386	1	0	0,40650362
SNORD115-				
32	0,718801901	1	0	0,471280346
MIR548C	0,693340659	1	0	0,253372681
MIR548V	0,702250674	1	0	0,309963281

REFERENCES

- Abel, E.V., Basile, K.J., Kugel, C.H., Witkiewicz, A.K., Le, K., Amaravadi, R.K., Karakousis, G.C., Xu, X., Xu, W., Schuchter, L.M., et al. (2013). Melanoma adapts to RAF/MEK inhibitors through FOXD3-mediated upregulation of ERBB3. *J. Clin. Invest.* *123*, 2155–2168.
- Aruga, J., and Mikoshiba, K. (2003). Identification and characterization of Slitrk, a novel neuronal transmembrane protein family controlling neurite outgrowth. *Mol. Cell. Neurosci.* *24*, 117–129.
- Aruga, J., Yokota, N., and Mikoshiba, K. (2003). Human SLITRK family genes: genomic organization and expression profiling in normal brain and brain tumor tissue. *Gene* *315*, 87–94.
- Delmas, A., Cherier, J., Pohorecka, M., Medale-Giamarchi, C., Meyer, N., Casanova, A., Sordet, O., Lamant, L., Savina, A., Pradines, A., et al. (2015). The c-Jun/RHOB/AKT pathway confers resistance of BRAF-mutant melanoma cells to MAPK inhibitors. *Oncotarget* *6*, 15250–15264.
- Fallahi-Sichani, M., Moerke, N.J., Niepel, M., Zhang, T., Gray, N.S., and Sorger, P.K. (2015). Systematic analysis of BRAFV600E melanomas reveals a role for JNK/c-Jun pathway in adaptive resistance to drug-induced apoptosis. *Mol. Syst. Biol.* *11*.
- Fallahi-Sichani, M., Becker, V., Izar, B., Baker, G.J., Lin, J., Boswell, S.A., Shah, P., Rotem, A., Garraway, L.A., and Sorger, P.K. (2017). Adaptive resistance of melanoma cells to RAF inhibition via reversible induction of a slowly dividing de-differentiated state. *Mol. Syst. Biol.* *13*.
- Goetz, E.M., Ghandi, M., Treacy, D.J., Wagle, N., and Garraway, L.A. (2014). ERK Mutations Confer Resistance to Mitogen-Activated Protein Kinase Pathway Inhibitors. *Cancer Res.* *74*, 7079–7089.
- 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/MAP3K8 drives resistance to RAF inhibition through MAP kinase pathway reactivation. *Nature* *468*, 968–972.
- Katayama, K., Zine, A., Ota, M., Matsumoto, Y., Inoue, T., Fritsch, B., and Aruga, J. (2009). Disorganized Innervation and Neuronal Loss in the Inner Ear of Slitrk6-Deficient Mice. *PLoS ONE* *4*.
- Kemper, K., Goeje, P.L. de, Peeper, D.S., and Amerongen, R. van (2014). Phenotype Switching: Tumor Cell Plasticity as a Resistance Mechanism and Target for Therapy. *Cancer Res.* *74*, 5937–5941.
- Konieczkowski, D.J., Johannessen, C.M., Abudayyeh, O., Kim, J.W., Cooper, Z.A., Piris, A., Frederick, D.T., Barzily-Rokni, M., Straussman, R., Haq, R., et al. (2014). A melanoma cell state distinction influences sensitivity to MAPK pathway inhibitors. *Cancer Discov.* *4*, 816–827.
- Milde, T., Shmelkov, S.V., Jensen, K.K., Zlotchenko, G., Petit, I., and Rafii, S. (2007). A novel family of slitrk genes is expressed on hematopoietic stem cells and leukemias. *Leukemia* *21*, 824–827.
- Morrison, K., Challita-Eid, P.M., Raitano, A., An, Z., Yang, P., Abad, J.D., Liu, W., Lortie, D.R., Snyder, J.T., Capo, L., et al. (2016). Development of ASG-15ME, a Novel Antibody-Drug Conjugate Targeting SLITRK6, a New Urothelial Cancer Biomarker. *Mol. Cancer Ther.* *15*, 1301–1310.
- Müller, J., Krijgsman, O., Tsoi, J., Robert, L., Hugo, W., Song, C., Kong, X., Possik, P.A., Cornelissen-Steijger, P.D.M., Foppen, M.H.G., et al. (2014). Low MITF/AXL ratio predicts early resistance to multiple targeted drugs in melanoma. *Nat. Commun.* *5*, 5712.
- Nazarian, R., Shi, H., Wang, Q., Kong, X., Koya, R.C., Lee, H., Chen, Z., Lee, M.-K., Attar, N., Sazegar, H., et al. (2010). Melanomas acquire resistance to B-RAF(V600E) inhibition by RTK or N-RAS upregulation. *Nature* *468*, 973–977.

- Nissan, M.H., Pratilas, C.A., Jones, A.M., Ramirez, R., Won, H., Liu, C., Tiwari, S., Kong, L., Hanrahan, A.J., Yao, Z., et al. (2014). Loss of NF1 in cutaneous melanoma is associated with RAS activation and MEK dependence. *Cancer Res.* *74*, 2340–2350.
- Poulikakos, P.I., Persaud, Y., Janakiraman, M., Kong, X., Ng, C., Moriceau, G., Shi, H., Atefi, M., Titz, B., Gabay, M.T., et al. (2011). RAF inhibitor resistance is mediated by dimerization of aberrantly spliced BRAF(V600E). *Nature* *480*, 387–390.
- Proenca, C.C., Gao, K.P., Shmelkov, S.V., Rafii, S., and Lee, F.S. (2011). Slitrks as emerging candidate genes involved in neuropsychiatric disorders. *Trends Neurosci.* *34*, 143–153.
- Rambow, F., Rogiers, A., Marin-Bejar, O., Aibar, S., Femel, J., Dewaele, M., Karras, P., Brown, D., Chang, Y.H., Debiec-Rychter, M., et al. (2018). Toward Minimal Residual Disease-Directed Therapy in Melanoma. *Cell* *174*, 843-855.e19.
- Ramsdale, R., Jorissen, R.N., Li, F.Z., Al-Obaidi, S., Ward, T., Sheppard, K.E., Bukczynska, P.E., Young, R.J., Boyle, S.E., Shackleton, M., et al. (2015). The transcription cofactor c-JUN mediates phenotype switching and BRAF inhibitor resistance in melanoma. *Sci Signal* *8*, ra82–ra82.
- Sanford, T., Porten, S., and Meng, M.V. (2015). Molecular Analysis of Upper Tract and Bladder Urothelial Carcinoma: Results from a Microarray Comparison. *PLoS ONE* *10*.
- Shaffer, S.M., Dunagin, M.C., Torborg, S.R., Torre, E.A., Emert, B., Krepler, C., Beqiri, M., Sproesser, K., Brafford, P.A., Xiao, M., et al. (2017). Rare cell variability and drug-induced reprogramming as a mode of cancer drug resistance. *Nature* *546*, 431–435.
- Shi, H., Moriceau, G., Kong, X., Lee, M.-K., Lee, H., Koya, R.C., Ng, C., Chodon, T., Scolyer, R.A., Dahlman, K.B., et al. (2012). Melanoma whole exome sequencing identifies V600EB-RAF amplification-mediated acquired B-RAF inhibitor resistance. *Nat. Commun.* *3*, 724.
- Shi, H., Hong, A., Kong, X., Koya, R.C., Song, C., Moriceau, G., Hugo, W., Yu, C.C., Ng, C., Chodon, T., et al. (2014). A novel AKT1 mutant amplifies an adaptive melanoma response to BRAF inhibition. *Cancer Discov.* *4*, 69–79.
- Su, Y., Wei, W., Robert, L., Xue, M., Tsoi, J., Garcia-Diaz, A., Homet Moreno, B., Kim, J., Ng, R.H., Lee, J.W., et al. (2017). Single-cell analysis resolves the cell state transition and signaling dynamics associated with melanoma drug-induced resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *114*, 13679–13684.
- Takahashi, H., and Craig, A.M. (2013). Protein tyrosine phosphatases PTP δ , PTP σ , and LAR: presynaptic hubs for synapse organization. *Trends Neurosci.* *36*, 522–534.
- Tekin, M., Chioza, B.A., Matsumoto, Y., Diaz-Horta, O., Cross, H.E., Duman, D., Kokotas, H., Moore-Barton, H.L., Sakoori, K., Ota, M., et al. (2013). SLITRK6 mutations cause myopia and deafness in humans and mice. *J. Clin. Invest.* *123*, 2094–2102.
- Tirosh, I., Izar, B., Prakadan, S.M., Wadsworth, M.H., Treacy, D., Trombetta, J.J., Rotem, A., Rodman, C., Lian, C., Murphy, G., et al. (2016). Dissecting the multicellular ecosystem of metastatic melanoma by single-cell RNA-seq. *Science* *352*, 189–196.
- Titz, B., Lomova, A., Le, A., Hugo, W., Kong, X., Hoeve, J. ten, Friedman, M., Shi, H., Moriceau, G., Song, C., et al. (2016). JUN dependency in distinct early and late BRAF inhibition adaptation states of melanoma. *Cell Discov.* *2*, 16028.
- Tsoi, J., Robert, L., Paraiso, K., Galvan, C., Sheu, K.M., Lay, J., Wong, D.J.L., Atefi, M., Shirazi, R., Wang, X., et al. (2018). Multi-stage Differentiation Defines Melanoma Subtypes with Differential Vulnerability to Drug-Induced Iron-Dependent Oxidative Stress. *Cancer Cell* *33*, 890-904.e5.

Verfaillie, A., Imrichova, H., Atak, Z.K., Dewaele, M., Rambow, F., Hulselmans, G., Christiaens, V., Svetlichnyy, D., Luciani, F., Van den Mooter, L., et al. (2015). Decoding the regulatory landscape of melanoma reveals TEADS as regulators of the invasive cell state. *Nat. Commun.* 6.

Wagle, N., Emery, C., Berger, M.F., Davis, M.J., Sawyer, A., Pochanard, P., Kehoe, S.M., Johannessen, C.M., MacConaill, L.E., Hahn, W.C., et al. (2011). Dissecting Therapeutic Resistance to RAF Inhibition in Melanoma by Tumor Genomic Profiling. *J. Clin. Oncol.* 29, 3085–3096.

Discussion concernant les travaux sur SLITRK6

Alors que le rôle fonctionnel de SLITRK6 dans le mélanome *BRAF*-muté n'est pas complètement élucidé en réponse aux MAPKi, il semble que son induction en réponse aux MAPKi soit un phénomène général. De plus, l'expression de SLITRK6 est faible au niveau des tissus périphériques (Aruga et al., 2003) il serait donc un marqueur spécifique des cellules tumorales après traitement des cellules aux MAPKi. Par ailleurs, l'utilisation d'un anticorps conjugué dirigé contre SLITRK6 en association avec les MAPKi peut être une perspective à proposer en clinique. Enfin, les résultats intermédiaires des essais cliniques de phase I de l'ASG-15ME dans le cancer urothélial métastatique présentés au Meeting Annuel de l'ASCO en 2016 ne montrent pas de toxicités majeures.

En revanche, plusieurs points méritent encore d'être éclaircis à plus ou moins court terme.

L'induction de SLITRK6 est-elle généralisable à d'autres cancers traités par les MAPKi ?

Tout d'abord, ce travail n'a été réalisé que sur des lignées de mélanomes *BRAF*-mutés. Nous n'avons pas regardé si l'induction de SLITRK6 est généralisable aux lignées *NRAS*-mutées en réponse aux inhibiteurs de MEK. En effet, une étude récente a montré que le phénotype « crête neurale » participe à la progression du mélanome *NRAS*-muté (McConnell et al., 2018). Il ne serait donc pas étonnant de retrouver une réactivation de ce phénotype au cours de l'échappement thérapeutique aux inhibiteurs de MEK dans le mélanome, d'autant plus que nous avons vu une induction de c-Jun dans certaines lignées *NRAS*-mutées.

Par ailleurs, nous nous sommes également demandés si l'induction de SLITRK6 en réponse aux MAPKi était spécifique au mélanome, du fait de l'origine embryonnaire des cellules, ou s'il s'agissait d'un phénomène commun aux cancers *BRAF*-mutés. Nous avons ainsi pu voir que l'induction de SLITRK6 en réponse aux MAPKi dans les autres cancers *BRAF*-mutés semble moins fréquente que dans le mélanome. Par exemple, sur les 4 lignées de cancer de colon traitées avec des doses de PLX4032 correspondant à leurs CI50 respectives, nous avons retrouvé une induction de SLITRK6 dans une seule lignée. En revanche, il semblerait que pour certaines lignées l'expression basale de SLITRK6 soit importante comparée à l'expression basale dans le mélanome. Des expériences supplémentaires sont nécessaires afin de confirmer cette observation dans l'optique d'une nouvelle indication de l'ASG-15ME.

SLITRK6 est-il une cible directe de c-Jun ?

Ces travaux, nous montrent que l'induction transcriptionnelle de SLITRK6 semble très fortement liée à celle de c-Jun. Cependant, nous n'avons pas montré qu'il s'agit d'une cible directe de c-Jun. Le promoteur de SLITRK6 présente une séquence consensus de liaison de c-Jun. Afin de répondre à cette question, une expérience de CHIP est en cours de réalisation.

Des résultats *in vivo* préliminaires mitigés

Dans notre travail, nous observons que l'ASG-15likeME associé aux MAPKi ralentit la croissance tumorale en comparaison au traitement de référence dabrafenib-trametinib. Cette expérience préliminaire est encourageante mais nécessite une optimisation. En effet, la différence peu significative est certainement liée au faible nombre de souris à la fin de l'expérience. Dans une situation où le traitement de référence est peu efficace, puisque le volume tumoral augmente toujours dans la condition dabrafenib-trametinib, on observe une potentialisation de l'effet avec l'anticorps conjugué. Ces résultats suggèrent que même des doses faibles de MAPKi sont capables d'induire SLITRK6 *in vivo*. L'analyse de l'expression de SLITRK6, ainsi que de la phosphorylation de ERK en IHC sur les échantillons tumoraux de ces souris, permettra en partie de répondre à ces questions. Enfin, l'ASG-15likeME est un anticorps conjugué à la MMAE. Cette dernière est un cytotoxique qui agit en inhibant la polymérisation de la tubuline. Les cytotoxiques ont une plus grande efficacité sur des cellules en cours de division. Or les MAPKi agissent sur la diminution de la prolifération. Ceci pourrait en partie expliquer pourquoi on observe une stabilisation de la croissance tumorale et non pas une régression telle que nous l'attendions. Il serait donc envisageable de coupler l'ASG-15like à d'autres drogues plus toxiques et cytostatiques (poisons des mitochondries, poisons des ribosomes) afin d'avoir un effet plus important sur la mort cellulaire.

Récemment, Rambow F. a montré sur des modèles de PDX que lors de la phase de la maladie résiduelle, les cellules au phénotype souche de la crête neurale surexpriment SLITRK6 (Rambow et al., 2018). Une des perspectives de ce travail est donc de voir si dans des modèles de PDX, l'utilisation de l'ASG-15likeME augmente la durée de vie sans progression sous MAPKi.

Quelles sont les voies de signalisation activées en aval de SLITRK6 ?

L'étude de transcriptomique sur les cellules souches neuronales a montré une forte expression de ligands et de récepteurs impliqués dans les interactions neuronales dont SLITRK6 ainsi qu'un enrichissement en gènes impliqués dans la voie du Calcium. De plus, par homologie aux récepteur TRK, SLITRK6 pourrait recruter PLC- γ et être impliquée dans la signalisation calcium-dépendante (Proenca et al., 2011). Enfin, le domaine intracellulaire de ces protéines possède des séquences en acide-aminés qui pourraient fixer des protéines telles que Shc par exemple et ainsi activer la voie MAPK ou PI3K (Proenca et al., 2011).

Des travaux ont également montré que SLITRK5 agit en tant que co-récepteur de TRKB afin, de faciliter son internalisation et son recyclage, et de favoriser la réponse cellulaire en présence de son ligand à BDNF (Song et al., 2015). Par analogie, SLITRK6 pourrait agir en tant que co-récepteur d'autres RTK.

En présence de PLX4032, il semble peu probable que SLITRK6 active la voie MAPK étant donné que la phosphorylation de ERK est éteinte. En revanche, il n'est pas exclu que SLITRK6 ait un rôle dans l'activation d'AKT. En effet, la réactivation de la voie PI3K/AKT a été largement décrite sous MAPKi (Davies et al., 2008; Delmas et al., 2015; Girotti et al., 2013; Shi et al., 2014; Villanueva et al., 2010). Dans un premier temps il serait donc intéressant d'étudier l'activation des effecteurs de la voie PI3K/AKT ainsi que de la voie signalisation du calcium en présence ou non de SLITRK6. Pour répondre à ces questions, il serait intéressant de caractériser les partenaires intracellulaires de SLITRK6 par des techniques de protéomique.

Quel pourrait-être le rôle de SLITRK6 dans la résistance aux MAPKi ?

Dans notre étude, nous avons vu que la déplétion de SLITRK6 par des siARN sensibilise les cellules aux MAPKi de manière variable. En effet, de façon majoritaire la déplétion de SLITRK6 ne sensibilise pas les cellules aux MAPKi (résultats non montrés). Cependant, son induction en réponse à ces inhibiteurs semble être un évènement plus général. C'est pour cela que l'utilisation d'un anticorps dirigé contre SLITRK6 et conjugué à la MMAE sensibilise les cellules aux MAPKi. Nous pouvons supposer que l'effet observé est plus lié à la toxicité de la MMAE qu'à une dégradation de SLITRK6, ce dernier servant juste de vecteur afin de cibler spécifiquement les cellules tumorales. Ces résultats suggèrent, soit que SLITRK6 n'a pas de

fonction dans le phénotype tumoral, soit qu'il pourrait avoir une autre fonction que celle d'empêcher la mort cellulaire en réponse aux MAPKi.

SLITRK6 peut participer au phénotype invasif. D'une part il existe une corrélation négative avec l'expression de MITF, les cellules MITF^{low} sont SLITRK6^{high} (Figure 1 du papier). D'autre part, au vu de son rôle dans la croissance des neurites, SLITRK6 pourrait de manière analogue augmenter la migration et l'invasion par remodelage du cytosquelette d'actine afin de former des protrusions (lamellipodes, filopodes, pseudopodes...). En effet, en réponse au MAPKi les cellules ont tendance à s'allonger. De plus, l'expression de SLITRK6 est également associée au phénotype invasif (Figure S5A). Cette hypothèse pourrait être validée en étudiant l'effet de la perte d'expression de SLITRK6 sur la migration après blessure ou sur l'invasion en chambre de Boyden avec matrigel en présence ou non d'inhibiteur.

De plus en plus d'études s'intéressent à la compréhension des mécanismes mis en place dans les cellules lors de la phase de maladie résiduelle (patient asymptomatique sous traitement). Une étude récente de l'équipe de JC. Marine, a montré que lors de cette phase, sous traitement dabrafenib-trametinib, une sous-population de cellules acquiert un phénotype de cellule souche neurale (NCSC : Neural Crest Stem Cell) et surexprime notamment les marqueurs de type NGFR, SLITRK6, AQP1 et GFRA2 (Rambow et al., 2018). Ces marqueurs sont également retrouvés dans l'étude de transcriptomique sur les cellules souches neuronales (Sandberg et al., 2014). Ce phénotype est, comme pour le phénotype invasif, associé à une faible expression de MITF (MITF^{low}) (Rambow et al., 2018). Le caractère souche de cette sous-population suggère qu'il s'agit des cellules responsables des rechutes. SLITRK6 pourrait donc être utilisé comme biomarqueur prédictif des rechutes notamment sur les cellules tumorales circulantes afin d'anticiper la rechute et adapter le traitement des patients.

Du fait de la structure de leur domaine extracellulaire avec les domaines LRR, toutes les protéines de la famille SLITRK y compris SLITRK6 (pas encore démontré) peuvent se lier avec les protéines de la famille LAR-RPTP (Takahashi and Craig, 2013; Um et al., 2014; Won and Kim, 2018) et participer à la formation de synapses excitatrices ou inhibitrices entre 2 cellules. La superfamille des PTP (Protéines Tyrosines Phosphatases) est constituée de 37 membres dont 21 membres sont transmembranaires (RPTP). La famille des LAR-RPTP est une sous-famille de ces RPTP. Certains de ces RPTP sont exprimés à la surface des macrophages, cellules dendritiques ou lymphocytes T (Lee et al., 2015 ; Stanford et al., 2012)

et sont impliqués dans l'inhibition de la réponse immunitaire (Dolton et al., 2006; Mustelin et al., 2005). D'autre part, des études montrent que les inhibiteurs de la voie des MAPK induisent l'expression de PD-L1 dans les mélanomes (Jiang et al., 2013). Nous pouvons donc supposer qu'en réponse aux inhibiteurs de la voie MAPK, SLITRK6 est induit et participe à la modulation de la réponse immunitaire. Notamment deux études ont montré l'implication de PTP σ dans des maladies auto-immunes. La première a montré que la délétion de PTP σ au niveau des cellules dendritiques chez la souris induit la production d'IFN par les cellules dendritiques, une infiltration leucocytaire et une colite spontanée (Bunin et al., 2015). La deuxième a montré que PTP σ est impliquée dans l'encéphalomyélite auto-immune. Dans cette étude, l'inhibition de PTP σ induit un phénotype pro-inflammatoire et induit l'activation des cellules dendritiques, la différenciation des lymphocytes T CD4+ en Th1 et Th17, réduit le nombre de lymphocytes T régulateurs, facilite l'infiltration des lymphocytes T et active les macrophages dans le système nerveux central (Ohtake et al., 2017, 2018). Ces études sont en faveur d'un rôle inhibiteur de PTP σ de la réponse immunitaire. Dans notre modèle SLITRK6, au même titre que PDL1, pourrait donc inhiber la réponse immunitaire en se fixant au PTP σ exprimé sur les lymphocytes T ou autres cellules de l'immunité et favoriser la progression tumorale. Afin de valider cette hypothèse, il faudrait utiliser des modèles de mélanomes murins *BRAF*-mutés sur des souris immunocompétentes traitées aux MAPKi et analyser la réponse immunitaire anti-tumorale en présence ou en absence de Slitrk6. Si cette hypothèse était validée, nous pourrions proposer une thérapie associant des MAPKi, des anti-PD1 et des anti-SLITRK6 afin de « booster » la réponse immunitaire anti-tumorale plus spécifiquement.

Conclusion et Perspectives

La découverte de la mutation de *BRAF* et de son rôle en tant que « driver » de la mélanomagenèse a conduit à une révolution dans la prise en charge thérapeutique des mélanomes. En effet, l'utilisation des inhibiteurs de *BRAF* en association avec les inhibiteurs de *MEK* a considérablement amélioré la survie des patients atteints de mélanome métastatique *BRAF*-muté ainsi que leur qualité de vie. Malgré un taux de réponse initial de 70 %, le taux de survie sans progression à 3 ans n'est que de 20 %. Cette perte d'efficacité de 50 % sur 3 ans illustre bien l'apparition de résistances à ces traitements. Ces mécanismes de résistances sont liés d'une part à des phénomènes génétiques (mutations, amplifications, ...) et d'autre part à des phénomènes adaptatifs de la cellule au traitement.

Mon travail de thèse consistait à étudier la réponse adaptative de la cellule en réponse aux thérapies ciblées. Nous avons ainsi mis en évidence dans des lignées de mélanome *BRAF*-mutées et *NRAS*-mutées une induction de l'expression de c-Jun ainsi que de sa forme active en réponse aux inhibiteurs de la voie des MAPK. De plus, cette induction est en partie due à une activation transcriptionnelle de c-Jun. Nous avons également montré que la déplétion de c-Jun par des si-ARN induit une sensibilisation des cellules aux inhibiteurs de la voie des MAPK en augmentant la mort cellulaire par apoptose. Par ailleurs, une étude de transcriptomique a été réalisée afin d'étudier quelles sont les cibles de c-Jun qui pourraient être responsables de la diminution de la sensibilité des cellules aux inhibiteurs de MAPK. Parmi toutes les cibles trouvées, nous nous sommes intéressés à l'étude de la protéine transmembranaire *SLITRK6*. Nous avons montré que cette protéine est surexprimée en réponse aux inhibiteurs de la voie des MAPK dans différentes lignées cellulaires de mélanome *BRAF*-mutées. D'autre part, cette surexpression est due à une activation transcriptionnelle et semble dépendante de c-Jun. Enfin, le ciblage de *SLITRK6* par un anticorps conjugué à la MMAE (ADC ou ASG-15likeME) sensibilise les cellules de mélanomes *BRAF*-mutées aux inhibiteurs de la voie des MAPK *in vitro* et *in vivo*.

Plusieurs zones d'ombre restent à éclaircir dans ce travail. Tout d'abord, concernant l'induction et l'activation de c-Jun, nous n'avons pas déterminé si l'induction de la protéine n'est pas également liée à une diminution de sa dégradation. Des études complémentaires sont également nécessaires afin de déterminer quelle kinase est impliquée dans la phosphorylation de c-Jun dans la lignée WM266-4.

Ensuite, concernant l'activation transcriptionnelle de *SLITRK6*, nous montrons que son expression est dépendante de c-Jun mais nous ne savons pas s'il s'agit d'une cible directe de

c-Jun. D'autre part nous n'avons pas étudié son expression dans les lignées *NRAS*-mutées en réponse aux inhibiteurs de MEK.

De plus, nous n'avons pas étudié le rôle fonctionnel de SLITRK6 ni les voies de signalisations activées en aval en présence d'inhibiteur de BRAF. En effet, alors que son induction en réponse aux inhibiteurs de la voie MAPK semble être un évènement commun à beaucoup de lignées, son rôle fonctionnel dans le phénomène d'apoptose semble variable en fonction des lignées. Ces travaux suggèrent donc d'autres rôles qui sont à explorer. En particulier, nous pensons à un rôle potentiel dans la migration, l'invasion et / ou dans la modulation de la réponse immunitaire anti-tumorale sous inhibiteur de la voie MAPK.

Enfin, les études *in vivo* préliminaires montrent que l'utilisation d'un anticorps conjugué à la MMAE dirigé contre SLITRK6 sensibilise les cellules aux inhibiteurs de la voie MAPK. Ceci laisse présager une potentielle association en clinique. En effet, l'ASG-15ME est un ADC dirigé contre SLITRK6 actuellement en cours d'essais cliniques de phase I dans le cancer métastatique urothélial. Les résultats intermédiaires de cette phase I ont été présentés lors du Meeting Annuel de l'ASCO en 2016. En particulier, les résultats de toxicité montrent que cet anticorps est bien toléré chez les patients. D'autre part, de nombreuses études récentes montrent que l'expression de SLITRK6 est associée au phénotype souche. Il serait donc intéressant d'étudier le rôle de l'expression de SLITRK6 sur les cellules tumorales circulantes en tant que biomarqueur prédictif des rechutes des patients sous inhibiteurs de la voie MAPK.

Nos résultats ont permis d'identifier une nouvelle protéine, SLITRK6, induite sous la dépendance de c-Jun en réponse à l'inhibition de la voie MAPK. Les résultats *in vivo* préliminaires associant des MAPKi à un anticorps conjugué dirigé contre SLITRK6 sont encourageants et ouvrent de nouvelles perspectives thérapeutiques pour les patients.

Bibliographie

- Abel, E.V., Basile, K.J., Kugel, C.H., Witkiewicz, A.K., Le, K., Amaravadi, R.K., Karakousis, G.C., Xu, X., Xu, W., Schuchter, L.M., et al. (2013). Melanoma adapts to RAF/MEK inhibitors through FOXD3-mediated upregulation of ERBB3. *J. Clin. Invest.* *123*, 2155–2168.
- Ahronian, L.G., Sennott, E.M., Van Allen, E.M., Wagle, N., Kwak, E.L., Faris, J.E., Godfrey, J.T., Nishimura, K., Lynch, K.D., Mermel, C.H., et al. (2015). Clinical acquired resistance to RAF inhibitor combinations in BRAF-mutant colorectal cancer through MAPK pathway alterations. *Cancer Discov.* *5*, 358–367.
- Akbani, R., Akdemir, K.C., Aksoy, B.A., Albert, M., Ally, A., Amin, S.B., Arachchi, H., Arora, A., Auman, J.T., Ayala, B., et al. (2015). Genomic Classification of Cutaneous Melanoma. *Cell* *161*, 1681–1696.
- Alon, M., Arafeh, R., Lee, J.S., Madan, S., Kalaora, S., Nagler, A., Abgarian, T., Greenberg, P., Ruppin, E., Samuels, Y., et al. (2018). CAPN1 is a novel binding partner and regulator of the tumor suppressor NF1 in melanoma. *Oncotarget* *9*, 31264–31277.
- Alonso, S.R., Tracey, L., Ortiz, P., Pérez-Gómez, B., Palacios, J., Pollán, M., Linares, J., Serrano, S., Sáez-Castillo, A.I., Sánchez, L., et al. (2007). A High-Throughput Study in Melanoma Identifies Epithelial-Mesenchymal Transition as a Major Determinant of Metastasis. *Cancer Res.* *67*, 3450–3460.
- Alsafadi, S., Mobuchon, L., Rodrigues, M., and Stern, M.-H. (2018). Le mélanome uvéal: Une maladie modèle des anomalies de l'épissage et de l'oncogenèse. *médecine/sciences* *34*, 155–160.
- Amaral, T., Sinnberg, T., Meier, F., Krepler, C., Levesque, M., Niessner, H., and Garbe, C. (2017). MAPK pathway in melanoma part II—secondary and adaptive resistance mechanisms to BRAF inhibition. *Eur. J. Cancer* *73*, 93–101.
- Andrés-Lencina, J.J., Rachakonda, S., García-Casado, Z., Srinivas, N., Skorokhod, A., Requena, C., Soriano, V., Kumar, R., and Nagore, E. (2018). TERT promoter mutation subtypes and survival in stage I and II melanoma patients. *Int. J. Cancer*.
- Angel, P., Hattori, K., Smeal, T., and Karin, M. (1988). The jun proto-oncogene is positively autoregulated by its product, Jun/AP-1. *Cell* *55*, 875–885.
- Armand-Labit et al. (2015). Identification of a Circulating MicroRNA Profile as a Biomarker of Metastatic Cutaneous Melanoma.
- Aruga, J., and Mikoshiba, K. (2003). Identification and characterization of Slitrk, a novel neuronal transmembrane protein family controlling neurite outgrowth. *Mol. Cell. Neurosci.* *24*, 117–129.
- Aruga, J., Yokota, N., and Mikoshiba, K. (2003). Human SLITRK family genes: genomic organization and expression profiling in normal brain and brain tumor tissue. *Gene* *315*, 87–94.
- Baumann, P., and Price, C. (2010). Pot1 and Telomere Maintenance. *FEBS Lett.* *584*, 3779–3784.
- Bertolotto, C., Lesueur, F., Giuliano, S., Strub, T., Lichy, M. de, Bille, K., Dessen, P., d'Hayer, B., Mohamdi, H., Remenieras, A., et al. (2011). A SUMOylation-defective MITF germline mutation predisposes to melanoma and renal carcinoma. *Nature* *480*, 94–98.
- Besser, M.J., Shapira-Frommer, R., Treves, A.J., Zippel, D., Itzhaki, O., Hershkovitz, L., Levy, D., Kubi, A., Hovav, E., Chermoshniuk, N., et al. (2010). Clinical Responses in a Phase II Study Using Adoptive Transfer of Short-term Cultured Tumor Infiltration Lymphocytes in Metastatic Melanoma Patients. *Clin. Cancer Res.* *16*, 2646–2655.

- Bishop, D.T., Demenais, F., Goldstein, A.M., Bergman, W., Bishop, J.N., Paillerets, B.B., Chompret, A., Ghorzo, P., Gruis, N., Hansson, J., et al. (2002). Geographical Variation in the Penetrance of CDKN2A Mutations for Melanoma. *JNCI J. Natl. Cancer Inst.* *94*, 894–903.
- Black, E.J., Street, A.J., and Gillespie, D.A. (1991). Protein phosphatase 2A reverses phosphorylation of c-Jun specified by the delta domain in vitro: correlation with oncogenic activation and deregulated transactivation activity of v-Jun. *Oncogene* *6*, 1949–1958.
- Blau, L., Knirsh, R., Ben-Dror, I., Oren, S., Kuphal, S., Hau, P., Proescholdt, M., Bosserhoff, A.-K., and Vardimon, L. (2012). Aberrant expression of c-Jun in glioblastoma by internal ribosome entry site (IRES)-mediated translational activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *109*, E2875–E2884.
- Bol, K.F., Schreibelt, G., Gerritsen, W.R., Vries, I.J.M. de, and Figdor, C.G. (2016). Dendritic Cell–Based Immunotherapy: State of the Art and Beyond. *Clin. Cancer Res.* *22*, 1897–1906.
- Bollag, G., Hirth, P., Tsai, J., Zhang, J., Ibrahim, P.N., Cho, H., Spevak, W., Zhang, C., Zhang, Y., Habets, G., et al. (2010). Clinical efficacy of a RAF inhibitor needs broad target blockade in BRAF-mutant melanoma. *Nature* *467*, 596–599.
- Bonet, C., Luciani, F., Ottavi, J.-F., Leclerc, J., Jouenne, F.-M., Boncompagni, M., Bille, K., Hofman, V., Bossis, G., Marco de Donatis, G., et al. (2017). Deciphering the Role of Oncogenic MITF E318K in Senescence Delay and Melanoma Progression. *JNCI J. Natl. Cancer Inst.* *109*.
- Boshuizen, J., Koopman, L.A., Krijgsman, O., Shahrabi, A., Heuvel, E.G. den, Ligtenberg, M.A., Vredevoogd, D.W., Kemper, K., Kuilman, T., Song, J.-Y., et al. (2018). Cooperative targeting of melanoma heterogeneity with an AXL antibody-drug conjugate and BRAF/MEK inhibitors. *Nat. Med.* *24*, 203–212.
- Brose, K., and Tessier-Lavigne, M. (2000). Slit proteins: key regulators of axon guidance, axonal branching, and cell migration. *Curr. Opin. Neurobiol.* *10*, 95–102.
- Buday, L., Warne, P.H., and Downward, J. (1995). Downregulation of the Ras activation pathway by MAP kinase phosphorylation of Sos. *Oncogene* *11*, 1327–1331.
- Bunin, A., Sisirak, V., Ghosh, H.S., Grajkowska, L.T., Hou, Z.E., Miron, M., Yang, C., Ceribelli, M., Uetani, N., Chaperot, L., et al. (2015). Protein Tyrosine Phosphatase PTPRS Is an Inhibitory Receptor on Human and Murine Plasmacytoid Dendritic Cells. *Immunity* *43*, 277–288.
- Burd, C.E., Liu, W., Huynh, M.V., Waqas, M.A., Gillahan, J.E., Clark, K.S., Fu, K., Martin, B.L., Jeck, W.R., Souroullas, G.P., et al. (2014). Mutation-Specific RAS Oncogenicity Explains NRAS Codon 61 Selection in Melanoma. *Cancer Discov.* *4*, 1418–1429.
- Calvayrac, O., Mazières, J., Figarol, S., Marty-Detraves, C., Raymond-Letron, I., Bousquet, E., Farella, M., Clermont-Taranchon, E., Milia, J., Rouquette, I., et al. (2017). The RAS-related GTPase RHOB confers resistance to EGFR-tyrosine kinase inhibitors in non-small-cell lung cancer via an AKT-dependent mechanism. *EMBO Mol. Med.* *9*, 238–250.
- Caramel, J., Papadogeorgakis, E., Hill, L., Browne, G.J., Richard, G., Wierinckx, A., Saldanha, G., Osborne, J., Hutchinson, P., Tse, G., et al. (2013). A Switch in the Expression of Embryonic EMT-Inducers Drives the Development of Malignant Melanoma. *Cancer Cell* *24*, 466–480.
- Carlino, M.S., Todd, J.R., Gowrishankar, K., Mijatov, B., Pupo, G.M., Fung, C., Snoyman, S., Hersey, P., Long, G.V., Kefford, R.F., et al. (2014). Differential activity of MEK and ERK inhibitors in BRAF inhibitor resistant melanoma. *Mol. Oncol.* *8*, 544–554.

- Catalanotti, F., Reyes, G., Jesenberger, V., Galabova-Kovacs, G., Simoes, R. de M., Carugo, O., and Baccarini, M. (2009). A Mek1–Mek2 heterodimer determines the strength and duration of the Erk signal. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *16*, 294–303.
- Chakraborty, A., Linnane, E., and Ross, S. (2018). Ras proteins as therapeutic targets. *Biochem. Soc. Trans.* BST20170529.
- Chapman, P.B., Hauschild, A., Robert, C., Haanen, J.B., Ascierto, P., Larkin, J., Dummer, R., Garbe, C., Testori, A., Maio, M., et al. (2011). Improved Survival with Vemurafenib in Melanoma with BRAF V600E Mutation. *N. Engl. J. Med.* *364*, 2507–2516.
- Charifa, A., and Chen, C.S.J. (2018). Cancer, Melanoma, Lentigo Maligna. In *StatPearls*, (Treasure Island (FL): StatPearls Publishing), p.
- Chen, S.T., Geller, A.C., and Tsao, H. (2013). Update on the Epidemiology of Melanoma. *Curr. Dermatol. Rep.* *2*, 24.
- Cho, Y.-Y., Tang, F., Yao, K., Lu, C., Zhu, F., Zheng, D., Pugliese, A., Bode, A.M., and Dong, Z. (2009). Cyclin-Dependent Kinase-3–Mediated c-Jun Phosphorylation at Ser63 and Ser73 Enhances Cell Transformation. *Cancer Res.* *69*, 272–281.
- Chudnovsky, Y., Khavari, P.A., and Adams, A.E. (2005). Melanoma genetics and the development of rational therapeutics. *J. Clin. Invest.* *115*, 813–824.
- Clark, W.H., From, L., Bernardino, E.A., and Mihm, M.C. (1969). The Histogenesis and Biologic Behavior of Primary Human Malignant Melanomas of the Skin. *Cancer Res.* *29*, 705–727.
- Clark, W.H., Elder, D.E., Guerry, D., Epstein, M.N., Greene, M.H., and Van Horn, M. (1984). A study of tumor progression: The precursor lesions of superficial spreading and nodular melanoma. *Hum. Pathol.* *15*, 1147–1165.
- Conway, C., Beswick, S., Elliott, F., Chang, Y.-M., Randerson-Moor, J., Harland, M., Affleck, P., Marsden, J., Sanders, D.S., Boon, A., et al. (2010). Deletion at chromosome arm 9p in relation to BRAF/NRAS mutations and prognostic significance for primary melanoma. *Genes. Chromosomes Cancer* *49*, 425–438.
- Corcoran, R.B., Ebi, H., Turke, A.B., Coffee, E.M., Nishino, M., Cogdill, A.P., Brown, R.D., Pelle, P.D., Dias-Santagata, D., Hung, K.E., et al. (2012). EGFR-mediated re-activation of MAPK signaling contributes to insensitivity of BRAF mutant colorectal cancers to RAF inhibition with vemurafenib. *Cancer Discov.* *2*, 227–235.
- Curtin, J.A., Fridlyand, J., Kageshita, T., Patel, H.N., Busam, K.J., Kutzner, H., Cho, K.-H., Aiba, S., Bröcker, E.-B., LeBoit, P.E., et al. (2005). Distinct Sets of Genetic Alterations in Melanoma. *N. Engl. J. Med.* *353*, 2135–2147.
- Curtin, J.A., Busam, K., Pinkel, D., and Bastian, B.C. (2006). Somatic Activation of KIT in Distinct Subtypes of Melanoma. *J. Clin. Oncol.* *24*, 4340–4346.
- Damsky, W.E., and Bosenberg, M. (2017). Melanocytic nevi and melanoma: unraveling a complex relationship. *Oncogene* *36*, 5771.
- Dankner, M., Rose, A.A.N., Rajkumar, S., Siegel, P.M., and Watson, I.R. (2018a). Classifying BRAF alterations in cancer: new rational therapeutic strategies for actionable mutations. *Oncogene* *1*.

Dankner, M., Lajoie, M., Moldoveanu, D., Nguyen, T.-T., Savage, P., Rajkumar, S., Huang, X., Lvova, M., Protopopov, A., Vuzman, D., et al. (2018b). Dual MAPK inhibition is an effective therapeutic strategy for a subset of class II BRAF mutant melanoma. *Clin. Cancer Res.* clincanres.3384.2017.

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

Davies, M.A., Stemke-Hale, K., Tellez, C., Calderone, T.L., Deng, W., Prieto, V.G., Lazar, A.J.F., Gershenwald, J.E., and Mills, G.B. (2008). A novel AKT3 mutation in melanoma tumours and cell lines. *Br. J. Cancer* 99, 1265–1268.

Delmas, A., Cherier, J., Pohorecka, M., Medale-Giamarchi, C., Meyer, N., Casanova, A., Sordet, O., Lamant, L., Savina, A., Pradines, A., et al. (2015). The c-Jun/RHOB/AKT pathway confers resistance of BRAF-mutant melanoma cells to MAPK inhibitors. *Oncotarget* 6, 15250–15264.

Dequen, P., Lorigan, P., Jansen, J.P., van Baardewijk, M., Ouwens, M.J.N.M., and Kotapati, S. (2012). Systematic Review and Network Meta-Analysis of Overall Survival Comparing 3 mg/kg Ipilimumab With Alternative Therapies in the Management of Pretreated Patients With Unresectable Stage III or IV Melanoma. *The Oncologist* 17, 1376–1385.

Deuker, M.M., Durban, V.M., Phillips, W.A., and McMahon, M. (2015). PI3'-Kinase Inhibition Forestalls the Onset of MEK1/2 Inhibitor Resistance in BRAF-Mutated Melanoma. *Cancer Discov.* 5, 143–153.

Di Trollo, R., Simeone, E., Di Lorenzo, G., Buonerba, C., and Ascierto, P.A. (2015). The use of interferon in melanoma patients: A systematic review. *Cytokine Growth Factor Rev.* 26, 203–212.

Dietrich, P., Kuphal, S., Spruss, T., Hellerbrand, C., and Bosserhoff, A.K. (2018). Wild-type KRAS is a novel therapeutic target for melanoma contributing to primary and acquired resistance to BRAF inhibition. *Oncogene* 37, 897–911.

Ding, X., Pan, H., Li, J., Zhong, Q., Chen, X., Dry, S.M., and Wang, C.-Y. (2013). Epigenetic Activation of AP-1 Promotes Squamous Cell Carcinoma Metastasis. *Sci. Signal.* 6, ra28.1-15.

Dolton, G.M., Sathish, J.G., and Matthews, R.J. (2006). Protein tyrosine phosphatases as negative regulators of the immune response. *Biochem. Soc. Trans.* 34, 1041–1045.

Domingues, B., Lopes, J.M., Soares, P., and Pópulo, H. (2018). Melanoma treatment in review. *ImmunoTargets Ther.* 7, 35–49.

D’Orazio, J., Jarrett, S., Amaro-Ortiz, A., and Scott, T. (2013). UV Radiation and the Skin. *Int. J. Mol. Sci.* 14, 12222–12248.

Dummer, R., Ascierto, P.A., Gogas, H.J., Arance, A., Mandalà, M., Liskay, G., Garbe, C., Schadendorf, D., Krajsova, I., Gutzmer, R., et al. (2018). Encorafenib plus binimetinib versus vemurafenib or encorafenib in patients with BRAF -mutant melanoma (COLUMBUS): a multicentre, open-label, randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol.* 19, 603–615.

Eferl, R., and Wagner, E.F. (2003). AP-1: a double-edged sword in tumorigenesis. *Nat. Rev. Cancer* 3, 859–868.

Eichhoff, O.M., Weeraratna, A., Zipser, M.C., Denat, L., Widmer, D.S., Xu, M., Kriegel, L., Kirchner, T., Larue, L., Dummer, R., et al. (2011). Differential LEF1 and TCF4 expression is involved in melanoma cell phenotype switching. *Pigment Cell Melanoma Res.* 24, 631–642.

Emery, C.M., Vijayendran, K.G., Zipser, M.C., Sawyer, A.M., Niu, L., Kim, J.J., Hatton, C., Chopra, R., Oberholzer, P.A., Karpova, M.B., et al. (2009). MEK1 mutations confer resistance to MEK and B-RAF inhibition. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *106*, 20411–20416.

Faes, S., and Dormond, O. (2015). PI3K and AKT: Unfaithful Partners in Cancer. *Int. J. Mol. Sci.* *16*, 21138–21152.

Fallahi-Sichani, M., Moerke, N.J., Niepel, M., Zhang, T., Gray, N.S., and Sorger, P.K. (2015). Systematic analysis of BRAFV600E melanomas reveals a role for JNK/c-Jun pathway in adaptive resistance to drug-induced apoptosis. *Mol. Syst. Biol.* *11*.

Fallahi-Sichani, M., Becker, V., Izar, B., Baker, G.J., Lin, J., Boswell, S.A., Shah, P., Rotem, A., Garraway, L.A., and Sorger, P.K. (2017). Adaptive resistance of melanoma cells to RAF inhibition via reversible induction of a slowly dividing de-differentiated state. *Mol. Syst. Biol.* *13*.

Fedorenko, I.V., Wargo, J.A., Flaherty, K.T., Messina, J.L., and Smalley, K.S.M. (2015). BRAF inhibition generates a host/tumor niche that mediates therapeutic escape. *J. Invest. Dermatol.* *135*, 3115–3124.

Fedorenko, I.V., Abel, E.V., Koomen, J.M., Fang, B., Wood, E.R., Chen, Y.A., Fisher, K.J., Iyengar, S., Dahlman, K.B., Wargo, J.A., et al. (2016). Fibronectin induction abrogates the BRAF inhibitor response of BRAF V600E/PTEN-null melanoma cells. *Oncogene* *35*, 1225–1235.

Fenouille, N., Tichet, M., Dufies, M., Pottier, A., Mogha, A., Soo, J.K., Rocchi, S., Mallavialle, A., Galibert, M.-D., Khammari, A., et al. (2012). The Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT) Regulatory Factor SLUG (SNAI2) Is a Downstream Target of SPARC and AKT in Promoting Melanoma Cell Invasion. *PLoS ONE* *7*.

Gandini, S., Sera, F., Cattaruzza, M.S., Pasquini, P., Abeni, D., Boyle, P., and Melchi, C.F. (2005). Meta-analysis of risk factors for cutaneous melanoma: I. Common and atypical naevi. *Eur. J. Cancer* *41*, 28–44.

Garraway, L.A., Widlund, H.R., Rubin, M.A., Getz, G., Berger, A.J., Ramaswamy, S., Beroukhi, R., Milner, D.A., Granter, S.R., Du, J., et al. (2005). Integrative genomic analyses identify *MITF* as a lineage survival oncogene amplified in malignant melanoma. *Nature* *436*, 117–122.

Gilot, D., Migault, M., Bachelot, L., Journé, F., Rogiers, A., Donnou-Fournet, E., Mogha, A., Mouchet, N., Pinel-Marie, M.-L., Mari, B., et al. (2017). A non-coding function of *TYRP1* mRNA promotes melanoma growth. *Nat. Cell Biol.* *19*, 1348–1357.

Girrotti, M.R., Pedersen, M., Sanchez-Laorden, B., Viros, A., Turajlic, S., Niculescu-Duvaz, D., Zambon, A., Sinclair, J., Hayes, A., Gore, M., et al. (2013). Inhibiting EGF Receptor or SRC Family Kinase Signaling Overcomes BRAF Inhibitor Resistance in Melanoma. *Cancer Discov.* *3*, 158–167.

Goetz, E.M., Ghandi, M., Treacy, D.J., Wagle, N., and Garraway, L.A. (2014). ERK Mutations Confer Resistance to Mitogen-Activated Protein Kinase Pathway Inhibitors. *Cancer Res.* *74*, 7079–7089.

Goldstein, A.M., Xiao, Y., Sampson, J., Zhu, B., Rotunno, M., Bennett, H., Wen, Y., Jones, K., Vogt, A., Burdette, L., et al. (2017). Rare germline variants in known melanoma susceptibility genes in familial melanoma. *Hum. Mol. Genet.*

Gopal, Y.N.V., Rizos, H., Chen, G., Deng, W., Frederick, D.T., Cooper, Z.A., Scolyer, R.A., Pupo, G., Komurov, K., Sehgal, V., et al. (2014). Inhibition of mTORC1/2 overcomes resistance to MAPK pathway inhibitors mediated by PGC1 α and Oxidative Phosphorylation in melanoma. *Cancer Res.* *74*, 7037–7047.

- Greenwood, T.A., and Kelsoe, J.R. (2013). Genome-Wide Association Study of Irritable vs. Elated Mania Suggests Genetic Differences between Clinical Subtypes of Bipolar Disorder. *PLoS ONE* 8.
- Grimm, J., Hufnagel, A., Wobser, M., Borst, A., Haferkamp, S., Houben, R., and Meierjohann, S. (2018). BRAF inhibition causes resilience of melanoma cell lines by inducing the secretion of FGF1. *Oncogenesis* 7, 71.
- Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2011). Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* 144, 646–674.
- Haq, R., Shoag, J., Andreu-Perez, P., Yokoyama, S., Edelman, H., Rowe, G.C., Frederick, D.T., Hurley, A.D., Nellore, A., Kung, A.L., et al. (2013). Oncogenic BRAF regulates oxidative metabolism via PGC1 α and MITF. *Cancer Cell* 23, 302–315.
- Hatzivassiliou, G., Song, K., Yen, I., Brandhuber, B.J., Anderson, D.J., Alvarado, R., Ludlam, M.J.C., Stokoe, D., Gloor, S.L., Vigers, G., et al. (2010). RAF inhibitors prime wild-type RAF to activate the MAPK pathway and enhance growth. *Nature* 464, 431–435.
- Hauschild, A., Grob, J.-J., Demidov, L.V., Jouary, T., Gutzmer, R., Millward, M., Rutkowski, P., Blank, C.U., Miller, W.H., Kaempgen, E., et al. (2012). Dabrafenib in BRAF-mutated metastatic melanoma: a multicentre, open-label, phase 3 randomised controlled trial. *The Lancet* 380, 358–365.
- Heiliger, K.-J., Hess, J., Vitagliano, D., Salerno, P., Braselmann, H., Salvatore, G., Ugolini, C., Summerer, I., Bogdanova, T., Unger, K., et al. (2012). Novel candidate genes of thyroid tumourigenesis identified in Trk-T1 transgenic mice. *Endocr. Relat. Cancer* 19, 409–421.
- Herr, R., Halbach, S., Heizmann, M., Busch, H., Boerries, M., and Brummer, T. (2018). BRAF inhibition upregulates a variety of receptor tyrosine kinases and their downstream effector Gab2 in colorectal cancer cell lines. *Oncogene* 37, 1576–1593.
- Hirata, E., Girotti, M.R., Viros, A., Hooper, S., Spencer-Dene, B., Matsuda, M., Larkin, J., Marais, R., and Sahai, E. (2015). Intravital Imaging Reveals How BRAF Inhibition Generates Drug-Tolerant Microenvironments with High Integrin β 1/FAK Signaling. *Cancer Cell* 27, 574–588.
- Hoek, K.S., Eichhoff, O.M., Schlegel, N.C., Döbbeling, U., Kobert, N., Schaerer, L., Hemmi, S., and Dummer, R. (2008). In vivo Switching of Human Melanoma Cells between Proliferative and Invasive States. *Cancer Res.* 68, 650–656.
- Hong, I.-K., Kim, Y.-M., Jeoung, D.-I., Kim, K.-C., and Lee, H. (2005). Tetraspanin CD9 induces MMP-2 expression by activating p38 MAPK, JNK and c-Jun pathways in human melanoma cells. *Exp. Mol. Med.* 37, 230–239.
- Horn, S., Figl, A., Rachakonda, P.S., Fischer, C., Sucker, A., Gast, A., Kadel, S., Moll, I., Nagore, E., Hemminki, K., et al. (2013). TERT Promoter Mutations in Familial and Sporadic Melanoma. *Science* 339, 959–961.
- Huang, C.-C., Wang, J.-M., Kikkawa, U., Mukai, H., Shen, M.-R., Morita, I., Chen, B.-K., and Chang, W.-C. (2008). Calcineurin-mediated dephosphorylation of c-Jun Ser-243 is required for c-Jun protein stability and cell transformation. *Oncogene* 27, 2422–2429.
- Imperial, R., Toor, O.M., Hussain, A., Subramanian, J., and Masood, A. (2017). Comprehensive pancancer genomic analysis reveals (RTK)-RAS-RAF-MEK as a key dysregulated pathway in cancer: Its clinical implications. *Semin. Cancer Biol.*

- Iruretagoyena, J.I., Davis, W., Bird, C., Olsen, J., Radue, R., Broman, A.T., Kendzioriski, C., BonDurant, S.S., Golos, T., Bird, I., et al. (2014). Differential changes in gene expression in human brain during late first trimester and early second trimester of pregnancy. *Prenat. Diagn.* *34*, 431–437.
- Janes, M.R., Zhang, J., Li, L.-S., Hansen, R., Peters, U., Guo, X., Chen, Y., Babbar, A., Firdaus, S.J., Darjania, L., et al. (2018). Targeting KRAS Mutant Cancers with a Covalent G12C-Specific Inhibitor. *Cell* *172*, 578-589.e17.
- Ji, Z., Chen, Y.E., Kumar, R., Taylor, M., Njauw, C.-N.J., Miao, B., Frederick, D.T., Wargo, J.A., Flaherty, K.T., Jönsson, G., et al. (2015). MITF Modulates Therapeutic Resistance through EGFR Signaling. *J. Invest. Dermatol.* *135*, 1863–1872.
- Jiang, X., Zhou, J., Giobbie-Hurder, A., Wargo, J., and Hodi, F.S. (2013). The Activation of MAPK in Melanoma Cells Resistant to BRAF Inhibition Promotes PD-L1 Expression That Is Reversible by MEK and PI3K Inhibition. *Clin. Cancer Res.* *19*, 598–609.
- Johannessen, 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/MAP3K8 drives resistance to RAF inhibition through MAP kinase pathway reactivation. *Nature* *468*, 968–972.
- Johannessen, C.M., Johnson, L.A., Piccioni, F., Townes, A., Frederick, D.T., Donahue, M.K., Narayan, R., Flaherty, K.T., Wargo, J.A., Root, D.E., et al. (2013). A melanocyte lineage program confers resistance to MAP kinase pathway inhibition. *Nature* *504*, 138–142.
- Johnson, D.B., and Dahlman, K.B. (2018). Class matters: Sensitivity of BRAF-mutant melanoma to MAPK inhibition. *Clin. Cancer Res.* clincanres.1795.2018.
- Joshi, A.D., Li, X., Kraft, P., and Han, J. (2018). Hierarchical modeling of melanocortin 1 receptor variants with skin cancer risk. *Genet. Epidemiol.* *0*.
- Kabbarah, O., and Chin, L. (2005). Revealing the genomic heterogeneity of melanoma. *Cancer Cell* *8*, 439–441.
- Kang, T.-W., Yevsa, T., Woller, N., Hoenicke, L., Wuestefeld, T., Dauch, D., Hohmeyer, A., Gereke, M., Rudalska, R., Potapova, A., et al. (2011). Senescence surveillance of pre-malignant hepatocytes limits liver cancer development. *Nature* *479*, 547–551.
- Kappelmann, M., Kuphal, S., Meister, G., Vardimon, L., and Bosserhoff, A.-K. (2013). MicroRNA miR-125b controls melanoma progression by direct regulation of c-Jun protein expression. *Oncogene* *32*, 2984–2991.
- Katayama, K., Zine, A., Ota, M., Matsumoto, Y., Inoue, T., Fritzsche, B., and Aruga, J. (2009). Disorganized Innervation and Neuronal Loss in the Inner Ear of Slitrk6-Deficient Mice. *PLoS ONE* *4*.
- Kawakami, A., and Fisher, D.E. (2017). The master role of microphthalmia-associated transcription factor in melanocyte and melanoma biology. *Lab. Invest.* *97*, 649–656.
- Kemeny, L.V., and Fisher, D.E. (2018). Targeting the (Un)differentiated State of Cancer. *Cancer Cell* *33*, 793–795.
- Khan, A.Q., Travers, and Kemp (2018). Roles of UVA radiation and DNA damage responses in melanoma pathogenesis. *Environ. Mol. Mutagen.* *0*.
- Kidger, A.M., and Keyse, S.M. (2016). The regulation of oncogenic Ras/ERK signalling by dual-specificity mitogen activated protein kinase phosphatases (MKPs). *Semin. Cell Dev. Biol.* *50*, 125–132.

- Knauf, J.A., Lockett, K.A., Chen, K.-Y., Voza, F., Socci, N.D., Ghossein, R., and Fagin, J.A. (2018). Hgf/Met activation mediates resistance to BRAF inhibition in murine anaplastic thyroid cancers.
- Kong, X., Kuilman, T., Shahrabi, A., Boshuizen, J., Kemper, K., Song, J.-Y., Niessen, H.W.M., Rozeman, E.A., Geukes Foppen, M.H., Blank, C.U., et al. (2017). Cancer Drug Addiction is Relayed by an ERK2-Dependent Phenotype Switch. *Nature* 550, 270–274.
- Konieczkowski, D.J., Johannessen, C.M., Abudayyeh, O., Kim, J.W., Cooper, Z.A., Piris, A., Frederick, D.T., Barzily-Rokni, M., Straussman, R., Haq, R., et al. (2014). A melanoma cell state distinction influences sensitivity to MAPK pathway inhibitors. *Cancer Discov.* 4, 816–827.
- Kotani, H., Adachi, Y., Kitai, H., Tomida, S., Bando, H., Faber, A.C., Yoshino, T., Voon, D.C., Yano, S., and Ebi, H. (2018). Distinct dependencies on receptor tyrosine kinases in the regulation of MAPK signaling between BRAF V600E and non-V600E mutant lung cancers. *Oncogene* 37, 1775–1787.
- Krauthammer, M., Kong, Y., Ha, B.H., Evans, P., Bacchiocchi, A., McCusker, J.P., Cheng, E., Davis, M.J., Goh, G., Choi, M., et al. (2012). Exome sequencing identifies recurrent somatic RAC1 mutations in melanoma. *Nat. Genet.* 44, 1006–1014.
- Kuilman, T., and Peeper, D.S. (2017). Phenotypic diversity drives paracrine drug tolerance. *EMBO Mol. Med.* e201707956.
- Kuilman, T., Michaloglou, C., Vredeveld, L.C.W., Douma, S., Doorn, R. van, Desmet, C.J., Aarden, L.A., Mooi, W.J., and Peeper, D.S. (2008). Oncogene-Induced Senescence Relayed by an Interleukin-Dependent Inflammatory Network. *Cell* 133, 1019–1031.
- Larkin, J., Ascierto, P.A., Dréno, B., Atkinson, V., Liskay, G., Maio, M., Mandalà, M., Demidov, L., Stroyakovskiy, D., Thomas, L., et al. (2014). Combined Vemurafenib and Cobimetinib in *BRAF* -Mutated Melanoma. *N. Engl. J. Med.* 371, 1867–1876.
- Lee, R.J., and Marais, R. (2017). Cancer: Tumours addicted to drugs are vulnerable. *Nature* 550, 192–193.
- Lee, H., Yi, J.-S., Lawan, A., Min, K., and Bennett, A.M. (2015). Mining the Function of Protein Tyrosine Phosphatases in Health and Disease. *Semin. Cell Dev. Biol.* 0, 66–72.
- Lei, Y.-Y., Wang, W.-J., Mei, J.-H., and Wang, C.-L. (2014). Mitogen-Activated Protein Kinase Signal Transduction in Solid Tumors. *Asian Pac. J. Cancer Prev.* 15, 8539–8548.
- Leucci, E., Vendramin, R., Spinazzi, M., Laurette, P., Fiers, M., Wouters, J., Radaelli, E., Eyckerman, S., Leonelli, C., Vanderheyden, K., et al. (2016). Melanoma addiction to the long non-coding RNA *SAMMSON*. *Nature* 531, 518–522.
- Li, F.Z., Dhillon, A.S., Anderson, R.L., McArthur, G., and Ferrao, P.T. (2015). Phenotype Switching in Melanoma: Implications for Progression and Therapy. *Front. Oncol.* 5.
- Liao, H., Sato, H., Chiba, R., Kawai, T., Nakabayashi, K., Hata, K., Akutsu, H., Fujiwara, S., and Nakamura, H. (2017). Human cytomegalovirus downregulates SLITRK6 expression through IE2. *J. Neurovirol.* 23, 79–86.
- Lim, S.M., Westover, K.D., Ficarro, S.B., Harrison, R.A., Choi, H.G., Pacold, M.E., Carrasco, M., Hunter, J., Kim, N.D., Xie, T., et al. (2014). Therapeutic Targeting of Oncogenic K-Ras by a Covalent Catalytic Site Inhibitor. *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* 53, 199–204.

- Liu, F., Cao, J., Wu, J., Sullivan, K., Shen, J., Ryu, B., Xu, Z., Wei, W., and Cui, R. (2013). Stat3-Targeted Therapies Overcome the Acquired Resistance to Vemurafenib in Melanomas. *J. Invest. Dermatol.* *133*, 2041–2049.
- Liu, F., Yang, X., Geng, M., and Huang, M. (2018). Targeting ERK, an Achilles' Heel of the MAPK pathway, in cancer therapy. *Acta Pharm. Sin. B* *8*, 552–562.
- Long, G.V., Stroyakovskiy, D., Gogas, H., Levchenko, E., de Braud, F., Larkin, J., Garbe, C., Jouary, T., Hauschild, A., Grob, J.J., et al. (2014). Combined BRAF and MEK Inhibition versus BRAF Inhibition Alone in Melanoma. *N. Engl. J. Med.* *371*, 1877–1888.
- Long, G.V., Flaherty, K.T., Stroyakovskiy, D., Gogas, H., Levchenko, E., de Braud, F., Larkin, J., Garbe, C., Jouary, T., Hauschild, A., et al. (2017). Dabrafenib plus trametinib versus dabrafenib monotherapy in patients with metastatic BRAF V600E/K-mutant melanoma: long-term survival and safety analysis of a phase 3 study. *Ann. Oncol.* *28*, 1631–1639.
- Lopez-Bergami, P., Huang, C., Goydos, J.S., Yip, D., Bar-Eli, M., Herlyn, M., Smalley, K.S.M., Mahale, A., Eroshkin, A., Aaronson, S., et al. (2007). Rewired ERK-JNK Signaling Pathways in Melanoma. *Cancer Cell* *11*, 447–460.
- Lopez-Bergami, P., Lau, E., and Ronai, Z. (2010). Emerging roles of ATF2 and the dynamic AP1 network in cancer. *Nat. Rev. Cancer* *10*, 65–76.
- Luskin, M.R., Murakami, M.A., Manalis, S.R., and Weinstock, D.M. (2018). Targeting minimal residual disease: a path to cure? *Nat. Rev. Cancer* *18*, 255–263.
- Ma, X.-H., Piao, S.-F., Dey, S., McAfee, Q., Karakousis, G., Villanueva, J., Hart, L.S., Levi, S., Hu, J., Zhang, G., et al. (2014). Targeting ER stress-induced autophagy overcomes BRAF inhibitor resistance in melanoma. *J. Clin. Invest.* *124*, 1406–1417.
- Manzano, J.L., Layos, L., Bugés, C., de los Llanos Gil, M., Vila, L., Martínez-Balibrea, E., and Martínez-Cardús, A. (2016). Resistant mechanisms to BRAF inhibitors in melanoma. *Ann. Transl. Med.* *4*.
- Matsumoto, Y., Katayama, K., Okamoto, T., Yamada, K., Takashima, N., Nagao, S., and Aruga, J. (2011). Impaired Auditory-Vestibular Functions and Behavioral Abnormalities of Slitrk6-Deficient Mice. *PLoS ONE* *6*.
- McConnell, A.M., Mito, J.K., Ablain, J., Dang, M., Formichella, L., Fisher, D.E., and Zon, L.I. (2018). Neural crest state activation in NRAS driven melanoma, but not in NRAS-driven melanocyte expansion. *Dev. Biol.*
- Miao, B., Ji, Z., Tan, L., Taylor, M., Zhang, J., Choi, H.G., Frederick, D.T., Kumar, R., Wargo, J.A., Flaherty, K.T., et al. (2015). EphA2 is a Mediator of Vemurafenib Resistance and a Novel Therapeutic Target in Melanoma. *Cancer Discov.* *5*, 274–287.
- Michaloglou, C., Vredeveld, L.C.W., Soengas, M.S., Denoyelle, C., Kuilman, T., Horst, C.M.A.M. van der, Majoor, D.M., Shay, J.W., Mooi, W.J., and Peeper, D.S. (2005). BRAF^{E600}-associated senescence-like cell cycle arrest of human naevi. *Nature* *436*, 720–724.
- Milagre, C., Dhomen, N., Geyer, F.C., Hayward, R., Lambros, M., Reis-Filho, J.S., and Marais, R. (2010). A mouse model of melanoma driven by oncogenic KRAS. *Cancer Res.* *70*, 5549–5557.
- Milde, T., Shmelkov, S.V., Jensen, K.K., Zlotchenko, G., Petit, I., and Rafii, S. (2007). A novel family of slitrk genes is expressed on hematopoietic stem cells and leukemias. *Leukemia* *21*, 824–827.
- Miller, A.J., and Mihm, M.C. (2006). Melanoma. *N. Engl. J. Med.* *355*, 51–65.

- Miller, A.J., Levy, C., Davis, I.J., Razin, E., and Fisher, D.E. (2005). Sumoylation of MITF and Its Related Family Members TFE3 and TFE8. *J. Biol. Chem.* *280*, 146–155.
- Montagut, C., Sharma, S.V., Shioda, T., McDermott, U., Ulman, M., Ulkus, L.E., Dias-Santagata, D., Stubbs, H., Lee, D.Y., Singh, A., et al. (2008). Elevated CRAF as a potential mechanism of acquired resistance to BRAF inhibition in melanoma. *Cancer Res.* *68*, 4853–4861.
- Moran, B., Silva, R., Perry, A.S., and Gallagher, W.M. (2017). Epigenetics of malignant melanoma. *Semin. Cancer Biol.*
- Morlet, T., Rabinowitz, M.R., Looney, L.R., Riegner, T., Greenwood, L.A., Sherman, E.A., Achilly, N., Zhu, A., Yoo, E., O'Reilly, R.C., et al. (2014). A homozygous SLITRK6 nonsense mutation is associated with progressive auditory neuropathy in humans. *The Laryngoscope* *124*, E95-103.
- Morrison, K., Challita-Eid, P.M., Raitano, A., An, Z., Yang, P., Abad, J.D., Liu, W., Lortie, D.R., Snyder, J.T., Capo, L., et al. (2016). Development of ASG-15ME, a Novel Antibody-Drug Conjugate Targeting SLITRK6, a New Urothelial Cancer Biomarker. *Mol. Cancer Ther.* *15*, 1301–1310.
- Morton, S., Davis, R.J., McLaren, A., and Cohen, P. (2003). A reinvestigation of the multisite phosphorylation of the transcription factor c-Jun. *EMBO J.* *22*, 3876–3886.
- Müller, J., Krijgsman, O., Tsoi, J., Robert, L., Hugo, W., Song, C., Kong, X., Possik, P.A., Cornelissen-Steijger, P.D.M., Foppen, M.H.G., et al. (2014). Low MITF/AXL ratio predicts early resistance to multiple targeted drugs in melanoma. *Nat. Commun.* *5*, 5712.
- Mustelin, T., Vang, T., and Bottini, N. (2005). Protein tyrosine phosphatases and the immune response. *Nat. Rev. Immunol.* *5*, 43–57.
- Muthusamy, V., Hobbs, C., Nogueira, C., Cordon-Cardo, C., McKee, P.H., Chin, L., and Bosenberg, M.W. (2006). Amplification of CDK4 and MDM2 in malignant melanoma. *Genes. Chromosomes Cancer* *45*, 447–454.
- Nakamura, Y., and Fujisawa, Y. (2018). Diagnosis and Management of Acral Lentiginous Melanoma. *Curr. Treat. Options Oncol.* *19*, 42.
- Naoum, G.E., Morkos, M., Kim, B., and Arafat, W. (2018). Novel targeted therapies and immunotherapy for advanced thyroid cancers. *Mol. Cancer* *17*.
- Nazarian, R., Shi, H., Wang, Q., Kong, X., Koya, R.C., Lee, H., Chen, Z., Lee, M.-K., Attar, N., Sazegar, H., et al. (2010). Melanomas acquire resistance to B-RAF(V600E) inhibition by RTK or N-RAS upregulation. *Nature* *468*, 973–977.
- Neben, C.L., Lo, M., Jura, N., and Klein, O.D. (2017). Feedback regulation of RTK signaling in development. *Dev. Biol.*
- Nguyen, N.T., and Fisher, D.E. (2018). MITF and UV responses in skin: from pigmentation to addiction. *Pigment Cell Melanoma Res.* *0*.
- Nissan, M.H., Pratilas, C.A., Jones, A.M., Ramirez, R., Won, H., Liu, C., Tiwari, S., Kong, L., Hanrahan, A.J., Yao, Z., et al. (2014). Loss of NF1 in cutaneous melanoma is associated with RAS activation and MEK dependence. *Cancer Res.* *74*, 2340–2350.
- Notarangelo, T., Sisinni, L., Condelli, V., and Landriscina, M. (2017). Dual EGFR and BRAF blockade overcomes resistance to vemurafenib in BRAF mutated thyroid carcinoma cells. *Cancer Cell Int.* *17*.

Notarangelo, T., Sisinni, L., Trino, S., Calice, G., Simeon, V., and Landriscina, M. (2018). IL6/STAT3 axis mediates resistance to BRAF inhibitors in thyroid carcinoma cells. *Cancer Lett.*

Obenauf, A.C., Zou, Y., Ji, A.L., Vanharanta, S., Shu, W., Shi, H., Kong, X., Bosenberg, M.C., Wiesner, T., Rosen, N., et al. (2015). Therapy-induced tumour secretomes promote resistance and tumour progression. *Nature* *520*, 368–372.

Ohtake, Y., Kong, W., Hussain, R., Horiuchi, M., Tremblay, M.L., Ganea, D., and Li, S. (2017). Protein tyrosine phosphatase σ regulates autoimmune encephalomyelitis development. *Brain. Behav. Immun.* *65*, 111–124.

Ohtake, Y., Saito, A., and Li, S. (2018). Diverse functions of protein tyrosine phosphatase σ in the nervous and immune systems. *Exp. Neurol.* *302*, 196–204.

Ostrem, J.M., Peters, U., Sos, M.L., Wells, J.A., and Shokat, K.M. (2013). K-Ras(G12C) inhibitors allosterically control GTP affinity and effector interactions. *Nature* *503*, 548–551.

Ott, P.A., and Hodi, F.S. (2016). Talimogene Laherparepvec for the Treatment of Advanced Melanoma. *Clin. Cancer Res.* *22*, 3127–3131.

Peres, J., Kwesi-Maliepaard, E.M., Rambow, F., Larue, L., and Prince, S. (2017). The tumour suppressor, miR-137, inhibits malignant melanoma migration by targetting the TBX3 transcription factor. *Cancer Lett.* *405*, 111–119.

Pezzini, F., Bettinetti, L., Di Leva, F., Bianchi, M., Zoratti, E., Carozzo, R., Santorelli, F.M., Delledonne, M., Lalowski, M., and Simonati, A. (2017). Transcriptomic Profiling Discloses Molecular and Cellular Events Related to Neuronal Differentiation in SH-SY5Y Neuroblastoma Cells. *Cell. Mol. Neurobiol.* *37*, 665–682.

Ponti, G., Manfredini, M., Greco, S., Pellacani, G., Depenni, R., Tomasi, A., Maccaferri, M., and Cascinu, S. (2017). BRAF, NRAS and C-KIT Advanced Melanoma: Clinico-pathological Features, Targeted-Therapy Strategies and Survival. *Anticancer Res.* *37*, 7043–7048.

Poulikakos, P.I., Zhang, C., Bollag, G., Shokat, K.M., and Rosen, N. (2010). RAF inhibitors transactivate RAF dimers and ERK signaling in cells with wild-type BRAF. *Nature* *464*, 427–430.

Poulikakos, P.I., Persaud, Y., Janakiraman, M., Kong, X., Ng, C., Moriceau, G., Shi, H., Atefi, M., Titz, B., Gabay, M.T., et al. (2011). RAF inhibitor resistance is mediated by dimerization of aberrantly spliced BRAF(V600E). *Nature* *480*, 387–390.

Prior, I.A., Muncke, C., Parton, R.G., and Hancock, J.F. (2003). Direct visualization of Ras proteins in spatially distinct cell surface microdomains. *J. Cell Biol.* *160*, 165–170.

Prior, I.A., Lewis, P.D., and Mattos, C. (2012). A Comprehensive Survey of Ras Mutations in Cancer. *Cancer Res.* *72*, 2457–2467.

Priyadarshini, R., Hussain, M., Attri, P., Kaur, E., Tripathi, V., Priya, S., Dhapola, P., Saha, D., Madhavan, V., Chowdhury, S., et al. (2018). BLM Potentiates c-Jun Degradation and Alters Its Function as an Oncogenic Transcription Factor. *Cell Rep.* *24*, 947-961.e7.

Proenca, C.C., Gao, K.P., Shmelkov, S.V., Rafii, S., and Lee, F.S. (2011). Slitrks as emerging candidate genes involved in neuropsychiatric disorders. *Trends Neurosci.* *34*, 143–153.

Puisieux, A., Brabletz, T., and Caramel, J. (2014). Oncogenic roles of EMT-inducing transcription factors. *Nat. Cell Biol.* *16*, 488–494.

- Qi, M., and Elion, E.A. (2005). MAP kinase pathways. *J Cell Sci* *118*, 3569–3572.
- Raamsdonk, C.D.V., Fitch, K.R., Fuchs, H., Angelis, M.H. de, and Barsh, G.S. (2004). Effects of G-protein mutations on skin color. *Nat. Genet.* *36*, 961–968.
- Raamsdonk, C.D.V., Bezrookove, V., Green, G., Bauer, J., Gaugler, L., O'Brien, J.M., Simpson, E.M., Barsh, G.S., and Bastian, B.C. (2009). Frequent somatic mutations of *GNAQ* in uveal melanoma and blue naevi. *Nature* *457*, 599–602.
- Rambow, F., Job, B., Petit, V., Gesbert, F., Delmas, V., Seberg, H., Meurice, G., Van Otterloo, E., Dessen, P., Robert, C., et al. (2015). New Functional Signatures for Understanding Melanoma Biology from Tumor Cell Lineage-Specific Analysis. *Cell Rep.* *13*, 840–853.
- Rambow, F., Bechadergue, A., Luciani, F., Gros, G., Domingues, M., Bonaventure, J., Meurice, G., Marine, J.-C., and Larue, L. (2016). Regulation of Melanoma Progression through the TCF4/miR-125b/NEDD9 Cascade. *J. Invest. Dermatol.* *136*, 1229–1237.
- Rambow, F., Rogiers, A., Marin-Bejar, O., Aibar, S., Femel, J., Dewaele, M., Karras, P., Brown, D., Chang, Y.H., Debiec-Rychter, M., et al. (2018). Toward Minimal Residual Disease-Directed Therapy in Melanoma. *Cell* *174*, 843-855.e19.
- Ramsdale, R., Jorissen, R.N., Li, F.Z., Al-Obaidi, S., Ward, T., Sheppard, K.E., Bukczynska, P.E., Young, R.J., Boyle, S.E., Shackleton, M., et al. (2015). The transcription cofactor c-JUN mediates phenotype switching and BRAF inhibitor resistance in melanoma. *Sci Signal* *8*, ra82–ra82.
- Ravindran Menon, D., Das, S., Krepler, C., Vultur, A., Rinner, B., Schauer, S., Kashofer, K., Wagner, K., Zhang, G., Bonyadi Rad, E., et al. (2015). A stress-induced early innate response causes multidrug tolerance in melanoma. *Oncogene* *34*, 4448–4459.
- Reddy, B.Y., Miller, D.M., and Tsao, H. (2017). Somatic driver mutations in melanoma. *Cancer* *123*, 2104–2117.
- Reuben, A., Spencer, C.N., Prieto, P.A., Gopalakrishnan, V., Reddy, S.M., Miller, J.P., Mao, X., De Macedo, M.P., Chen, J., Song, X., et al. (2017). Genomic and immune heterogeneity are associated with differential responses to therapy in melanoma. *NPJ Genomic Med.* *2*.
- Richard, G., Dalle, S., Monet, M., Ligier, M., Boespflug, A., Pommier, R.M., de la Fouchardière, A., Perier-Muzet, M., Depaepe, L., Barnault, R., et al. (2016). ZEB1-mediated melanoma cell plasticity enhances resistance to MAPK inhibitors. *EMBO Mol. Med.* *8*, 1143–1161.
- Riesenberg, S., Groetchen, A., Siddaway, R., Bald, T., Reinhardt, J., Smorra, D., Kohlmeyer, J., Renn, M., Phung, B., Aymans, P., et al. (2015). MITF and c-Jun antagonism interconnects melanoma dedifferentiation with pro-inflammatory cytokine responsiveness and myeloid cell recruitment. *Nat. Commun.* *6*.
- Robert, C., Long, G.V., Brady, B., Dutriaux, C., Maio, M., Mortier, L., Hassel, J.C., Rutkowski, P., McNeil, C., Kalinka-Warzocha, E., et al. (2015a). Nivolumab in Previously Untreated Melanoma without *BRAF* Mutation. *N. Engl. J. Med.* *372*, 320–330.
- Robert, C., Schachter, J., Long, G.V., Arance, A., Grob, J.J., Mortier, L., Daud, A., Carlino, M.S., McNeil, C., Lotem, M., et al. (2015b). Pembrolizumab versus Ipilimumab in Advanced Melanoma. *N. Engl. J. Med.* *372*, 2521–2532.
- Roberts, P.J., and Der, C.J. (2007). Targeting the Raf-MEK-ERK mitogen-activated protein kinase cascade for the treatment of cancer. *Oncogene* *26*, 3291–3310.

- Robles-Espinoza, C.D., Harland, M., Ramsay, A.J., Aoude, L.G., Quesada, V., Ding, Z., Pooley, K.A., Pritchard, A.L., Tiffen, J.C., Petljak, M., et al. (2014). *POT1* loss-of-function variants predispose to familial melanoma. *Nat. Genet.* *46*, 478–481.
- Roesch, A. (2015). Tumor heterogeneity and plasticity as elusive drivers for resistance to MAPK pathway inhibition in melanoma. *Oncogene* *34*, 2951–2957.
- Roesch, A., Vultur, A., Bogeski, I., Wang, H., Zimmermann, K.M., Speicher, D., Körbel, C., Laschke, M.W., Gimotty, P.A., Philipp, S.E., et al. (2013). Overcoming intrinsic multi-drug resistance in melanoma by blocking the mitochondrial respiratory chain of slow-cycling JARID1Bhigh cells. *Cancer Cell* *23*.
- 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.
- Rohrbeck, L., Gong, J.-N., Lee, E.F., Kueh, A.J., Behren, A., Tai, L., Lessene, G., Huang, D.C.S., Fairlie, W.D., Strasser, A., et al. (2016). Hepatocyte growth factor renders BRAF mutant human melanoma cell lines resistant to PLX4032 by downregulating the pro-apoptotic BH3-only proteins PUMA and BIM. *Cell Death Differ.* *23*, 2054–2062.
- Roskoski, R. (2010). RAF protein-serine/threonine kinases: Structure and regulation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *399*, 313–317.
- Roskoski, R. (2012a). MEK1/2 dual-specificity protein kinases: Structure and regulation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *417*, 5–10.
- Roskoski, R. (2012b). ERK1/2 MAP kinases: Structure, function, and regulation. *Pharmacol. Res.* *66*, 105–143.
- Rushworth, L.K., Hindley, A.D., O'Neill, E., and Kolch, W. (2006). Regulation and Role of Raf-1/B-Raf Heterodimerization. *Mol. Cell. Biol.* *26*, 2262–2272.
- Sachindra, Larribère, L., Novak, D., Wu, H., Hüser, L., Granados, K., Orouji, E., and Utikal, J. (2017). New role of ID3 in melanoma adaptive drug-resistance. *Oncotarget* *8*, 110166–110175.
- Salime, S., Riahi, Z., Elrharchi, S., Elkhatabi, L., Charoute, H., Nahili, H., Rouba, H., Kabine, M., Bonnet, C., Petit, C., et al. (2018). A novel mutation in SLITRK6 causes deafness and myopia in a Moroccan family. *Gene* *659*, 89–92.
- Sanchez-Laorden, B., Viros, A., Girotti, M.R., Pedersen, M., Saturno, G., Zambon, A., Niculescu-Duvaz, D., Turajlic, S., Hayes, A., Gore, M., et al. (2014). BRAF Inhibitors Induce Metastasis in RAS Mutant or Inhibitor-Resistant Melanoma Cells by Reactivating MEK and ERK Signaling. *Sci Signal* *7*, ra30–ra30.
- Sandberg, C.J., Vik-Mo, E.O., Behnan, J., Helseth, E., and Langmoen, I.A. (2014). Transcriptional Profiling of Adult Neural Stem-Like Cells from the Human Brain. *PLoS ONE* *9*.
- Sanford, T., Porten, S., and Meng, M.V. (2015). Molecular Analysis of Upper Tract and Bladder Urothelial Carcinoma: Results from a Microarray Comparison. *PLoS ONE* *10*.
- Schummer, P., Kuphal, S., Vardimon, L., Bosserhoff, A.K., and Kappelmann, M. (2016). Specific c-Jun target genes in malignant melanoma. *Cancer Biol. Ther.* *17*, 486.
- Scolyer, R.A., Long, G.V., and Thompson, J.F. (2011). Evolving concepts in melanoma classification and their relevance to multidisciplinary melanoma patient care. *Mol. Oncol.* *5*, 124–136.

- Seberg, H.E., Otterloo, E.V., and Cornell, R.A. (2017). Beyond MITF: Multiple transcription factors directly regulate the cellular phenotype in melanocytes and melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res.* *30*, 454–466.
- Seip, K., Jørgensen, K., Haselager, M.V., Albrecht, M., Haugen, M.H., Egeland, E.V., Lucarelli, P., Engebraaten, O., Sauter, T., Mælandsmo, G.M., et al. (2018). Stroma-induced phenotypic plasticity offers phenotype-specific targeting to improve melanoma treatment. *Cancer Lett.* *439*, 1–13.
- Sensi, M., Nicolini, G., Petti, C., Bersani, I., Lozupone, F., Molla, A., Vegetti, C., Nonaka, D., Mortarini, R., Parmiani, G., et al. (2006). Mutually exclusive *NRAS*^{Q61R} and *BRAF*^{V600E} mutations at the single-cell level in the same human melanoma. *Oncogene* *25*, 3357–3364.
- Sevilla, A., Santos, C.R., Barcia, R., Vega, F.M., and Lazo, P.A. (2004). c-Jun phosphorylation by the human vaccinia-related kinase 1 (VRK1) and its cooperation with the N-terminal kinase of c-Jun (JNK). *Oncogene* *23*, 8950–8958.
- Shaffer, S.M., Dunagin, M.C., Torborg, S.R., Torre, E.A., Emert, B., Krepler, C., Beqiri, M., Sproesser, K., Brafford, P.A., Xiao, M., et al. (2017). Rare cell variability and drug-induced reprogramming as a mode of cancer drug resistance. *Nature* *546*, 431–435.
- Shain, A.H., and Bastian, B.C. (2016). From melanocytes to melanomas. *Nat. Rev. Cancer* *16*, 345.
- Shain, A.H., Yeh, I., Kovalyshyn, I., Sriharan, A., Talevich, E., Gagnon, A., Dummer, R., North, J., Pincus, L., Ruben, B., et al. (2015). The Genetic Evolution of Melanoma from Precursor Lesions. *N. Engl. J. Med.* *373*, 1926–1936.
- Shanley, T.P., Vasi, N., Denenberg, A., and Wong, H.R. (2001). The Serine/Threonine Phosphatase, PP2A: Endogenous Regulator of Inflammatory Cell Signaling. *J. Immunol.* *166*, 966–972.
- Shao, J., Teng, Y., Padia, R., Hong, S., Noh, H., Xie, X., Mumm, J.S., Dong, Z., Ding, H.-F., Cowell, J., et al. (2013). COP1 and GSK3 β Cooperate to Promote c-Jun Degradation and Inhibit Breast Cancer Cell Tumorigenesis. *Neoplasia N. Y. N* *15*, 1075–1085.
- Sharma, S.V., Lee, D.Y., Li, B., Quinlan, M.P., Takahashi, F., Maheswaran, S., McDermott, U., Azizian, N., Zou, L., Fischbach, M.A., et al. (2010). A chromatin-mediated reversible drug tolerant state in cancer cell subpopulations. *Cell* *141*, 69–80.
- Shi, H., Kong, X., Ribas, A., and Lo, R. s. (2011). Combinatorial treatments that overcome PDGFR β -driven resistance of melanoma cells to V600EB-RAF inhibition. *Cancer Res.* *71*, 5067–5074.
- Shi, H., Moriceau, G., Kong, X., Lee, M.-K., Lee, H., Koya, R.C., Ng, C., Chodon, T., Scolyer, R.A., Dahlman, K.B., et al. (2012). Melanoma whole exome sequencing identifies V600EB-RAF amplification-mediated acquired B-RAF inhibitor resistance. *Nat. Commun.* *3*, 724.
- Shi, H., Hong, A., Kong, X., Koya, R.C., Song, C., Moriceau, G., Hugo, W., Yu, C.C., Ng, C., Chodon, T., et al. (2014a). A novel AKT1 mutant amplifies an adaptive melanoma response to BRAF inhibition. *Cancer Discov.* *4*, 69–79.
- Shi, H., Hugo, W., Kong, X., Hong, A., Koya, R.C., Moriceau, G., Chodon, T., Guo, R., Johnson, D.B., Dahlman, K.B., et al. (2014b). Acquired resistance and clonal evolution in melanoma during BRAF inhibitor therapy. *Cancer Discov.* *4*, 80–93.
- Shitara, D., Nascimento, M.M., Puig, S., Yamada, S., Enokihara, M.M.S.S., Michalany, N., and Bagatin, E. (2014). Nevus-Associated Melanomas Clinicopathologic Features. *Am. J. Clin. Pathol.* *142*, 485–491.

- Shyamala, K., Yanduri, S., Girish, H.C., and Murgod, S. (2015). Neural crest: The fourth germ layer. *J. Oral Maxillofac. Pathol.* *19*, 221.
- Sini, M.C., Doneddu, V., Paliogiannis, P., Casula, M., Colombino, M., Manca, A., Botti, G., Ascierto, P.A., Lissia, A., Cossu, A., et al. (2018). Genetic alterations in main candidate genes during melanoma progression. *Oncotarget* *9*, 8531–8541.
- Smalley, K.S.M., Lioni, M., Palma, M.D., Xiao, M., Desai, B., Egyhazi, S., Hansson, J., Wu, H., King, A.J., Van Belle, P., et al. (2008). Increased cyclin D1 expression can mediate BRAF inhibitor resistance in BRAF V600E–mutated melanomas. *Mol. Cancer Ther.* *7*, 2876–2883.
- Smith, M.P., Sanchez-Laorden, B., O’Brien, K., Brunton, H., Ferguson, J., Young, H., Dhomen, N., Flaherty, K.T., Frederick, D.T., Cooper, Z.A., et al. (2014). The immune-microenvironment confers resistance to MAP kinase pathway inhibitors through macrophage-derived TNF α . *Cancer Discov.* *4*, 1214–1229.
- Smith, M.P., Rowling, E.J., Miskolczi, Z., Ferguson, J., Spoerri, L., Haass, N.K., Sloss, O., McEntegart, S., Arozarena, I., von Kriegsheim, A., et al. (2017). Targeting endothelin receptor signalling overcomes heterogeneity driven therapy failure. *EMBO Mol. Med.* *9*, 1011–1029.
- Song, M., Giza, J., Proenca, C.C., Jing, D., Elliott, M., Dincheva, I., Shmelkov, S.V., Kim, J., Schreiner, R., Huang, S.-H., et al. (2015). Slitrk5 Mediates BDNF-Dependent TrkB Receptor Trafficking and Signaling. *Dev. Cell* *33*, 690–702.
- Souroullas, G.P., Jeck, W.R., Parker, J.S., Simon, J.M., Liu, J.-Y., Paulk, J., Xiong, J., Clark, K.S., Fedoriw, Y., Qi, J., et al. (2016). An oncogenic *Ezh2* mutation induces tumors through global redistribution of histone 3 lysine 27 trimethylation. *Nat. Med.* *22*, 632–640.
- Spangler, B., Vardimon, L., Bosserhoff, A.K., and Kuphal, S. (2011). Post-transcriptional regulation controlled by E-cadherin is important for c-Jun activity in melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res.* *24*, 148–164.
- Spangler, B., Kappelmann, M., Schitteck, B., Meierjohann, S., Vardimon, L., Bosserhoff, A.K., and Kuphal, S. (2012). ETS-1/RhoC signaling regulates the transcription factor c-Jun in melanoma. *Int. J. Cancer* *130*, 2801–2811.
- Stagni, C., Zamuner, C., Elefanti, L., Zanin, T., Bianco, P.D., Sommariva, A., Fabozzi, A., Pigozzo, J., Mocellin, S., Montesco, M.C., et al. (2018). BRAF gene copy number and mutant allele frequency correlate with time to progression in metastatic melanoma patients treated with MAPK inhibitors. *Mol. Cancer Ther.* molcanther.1124.2017.
- Stahl, J.M., Sharma, A., Cheung, M., Zimmerman, M., Cheng, J.Q., Bosenberg, M.W., Kester, M., Sandirasegarane, L., and Robertson, G.P. (2004). Deregulated Akt3 Activity Promotes Development of Malignant Melanoma. *Cancer Res.* *64*, 7002–7010.
- Stanford, S.M., Rapini, N., and Bottini, N. (2012). Regulation of TCR signalling by tyrosine phosphatases: from immune homeostasis to autoimmunity. *Immunology* *137*, 1–19.
- Straussman, R., Morikawa, T., Shee, K., Barzily-Rokni, M., Qian, Z.R., Du, J., Davis, A., Mongare, M.M., Gould, J., Frederick, D.T., et al. (2012). Tumor microenvironment induces innate RAF-inhibitor resistance through HGF secretion. *Nature* *487*, 500–504.
- Su, F., Viros, A., Milagre, C., Trunzer, K., Bollag, G., Spleiss, O., Reis-Filho, J.S., Kong, X., Koya, R.C., Flaherty, K.T., et al. (2012a). RAS Mutations in Cutaneous Squamous-Cell Carcinomas in Patients Treated with BRAF Inhibitors. *N. Engl. J. Med.* *366*, 207–215.

Su, F., Bradley, W.D., Wang, Q., Yang, H., Xu, L., Higgins, B., Kolinsky, K., Packman, K., Kim, M.J., Trunzer, K., et al. (2012b). Resistance to Selective BRAF Inhibition Can Be Mediated by Modest Upstream Pathway Activation. *Cancer Res.* *72*, 969–978.

Su, Y., Wei, W., Robert, L., Xue, M., Tsoi, J., Garcia-Diaz, A., Homet Moreno, B., Kim, J., Ng, R.H., Lee, J.W., et al. (2017). Single-cell analysis resolves the cell state transition and signaling dynamics associated with melanoma drug-induced resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *114*, 13679–13684.

Sun, C., Wang, L., Huang, S., Heynen, G.J.J.E., Prahallad, A., Robert, C., Haanen, J., Blank, C., Wesseling, J., Willems, S.M., et al. (2014). Reversible and adaptive resistance to BRAF(V600E) inhibition in melanoma. *Nature* *508*, 118–122.

Tagliabue, E., Gandini, S., Bellocco, R., Maisonneuve, P., Newton-Bishop, J., Polsky, D., Lazovich, D., Kanetsky, P.A., Ghiorzo, P., Gruis, N.A., et al. (2018). MC1R variants as melanoma risk factors independent of at-risk phenotypic characteristics: a pooled analysis from the M-SKIP project. *Cancer Manag. Res.* *10*, 1143–1154.

Takahashi, H., and Craig, A.M. (2013). Protein tyrosine phosphatases PTP δ , PTP σ , and LAR: presynaptic hubs for synapse organization. *Trends Neurosci.* *36*, 522–534.

Takahashi, H., Katayama, K., Sohya, K., Miyamoto, H., Prasad, T., Matsumoto, Y., Ota, M., Yasuda, H., Tsumoto, T., Aruga, J., et al. (2012). Selective control of inhibitory synapse development by Slitrk3-PTP δ trans-synaptic interaction. *Nat. Neurosci.* *15*, 389–S2.

Takeda, K., Takemoto, C., Kobayashi, I., Watanabe, A., Nobukuni, Y., Fisher, D.E., and Tachibana, M. (2000). Ser298 of MITF, a mutation site in Waardenburg syndrome type 2, is a phosphorylation site with functional significance. *Hum. Mol. Genet.* *9*, 125–132.

Tassabehji, M., Newton, V.E., and Read, A.P. (1994). Waardenburg syndrome type 2 caused by mutations in the human microphthalmia (MITF) gene. *Nat. Genet.* *8*, 251–255.

Tekin, M., Chioza, B.A., Matsumoto, Y., Diaz-Horta, O., Cross, H.E., Duman, D., Kokotas, H., Moore-Barton, H.L., Sakoori, K., Ota, M., et al. (2013). SLITRK6 mutations cause myopia and deafness in humans and mice. *J. Clin. Invest.* *123*, 2094–2102.

Thorpe, L.M., Yuzugullu, H., and Zhao, J.J. (2015). PI3K in cancer: divergent roles of isoforms, modes of activation and therapeutic targeting. *Nat. Rev. Cancer* *15*, 7–24.

Tirosh, I., Izar, B., Prakadan, S.M., Wadsworth, M.H., Treacy, D., Trombetta, J.J., Rotem, A., Rodman, C., Lian, C., Murphy, G., et al. (2016). Dissecting the multicellular ecosystem of metastatic melanoma by single-cell RNA-seq. *Science* *352*, 189–196.

Titz, B., Lomova, A., Le, A., Hugo, W., Kong, X., Hoeve, J. ten, Friedman, M., Shi, H., Moriceau, G., Song, C., et al. (2016). JUN dependency in distinct early and late BRAF inhibition adaptation states of melanoma. *Cell Discov.* *2*, 16028.

Tripp, M.K., Watson, M., Balk, S.J., Swetter, S.M., and Gershenwald, J.E. (2016). State of the Science on Prevention and Screening to Reduce Melanoma Incidence and Mortality: The Time is Now. *CA. Cancer J. Clin.*

Trunzer, K., Pavlick, A.C., Schuchter, L., Gonzalez, R., McArthur, G.A., Hutson, T.E., Moschos, S.J., Flaherty, K.T., Kim, K.B., Weber, J.S., et al. (2013). Pharmacodynamic Effects and Mechanisms of Resistance to Vemurafenib in Patients With Metastatic Melanoma. *J. Clin. Oncol.* *31*, 1767–1774.

Tsao, H., Chin, L., Garraway, L.A., and Fisher, D.E. (2012). Melanoma: from mutations to medicine. *Genes Dev.* *26*, 1131–1155.

- Tsoi, J., Robert, L., Paraiso, K., Galvan, C., Sheu, K.M., Lay, J., Wong, D.J.L., Atefi, M., Shirazi, R., Wang, X., et al. (2018). Multi-stage Differentiation Defines Melanoma Subtypes with Differential Vulnerability to Drug-Induced Iron-Dependent Oxidative Stress. *Cancer Cell* 33, 890-904.e5.
- Tzen, C.-Y., Wu, Y.-H., and Tzen, C.-Y. (2014). Characterization of KIT mutation in melanoma. *Dermatol. Sin.* 32, 7–12.
- Um, J.W., Kim, K.H., Park, B.S., Choi, Y., Kim, D., Kim, C.Y., Kim, S.J., Kim, M., Ko, J.S., Lee, S.-G., et al. (2014). Structural basis for LAR-RPTP/Slitrk complex-mediated synaptic adhesion. *Nat. Commun.* 5, 5423.
- Van Allen, E.M., Wagle, N., Sucker, A., Treacy, D., Johannessen, C., Goetz, E.M., Place, C.S., Taylor-Weiner, A., Whittaker, S., Kryukov, G., et al. (2014). The genetic landscape of clinical resistance to RAF inhibition in metastatic melanoma. *Cancer Discov.* 4, 94–109.
- Van Raamsdonk, C.D., Griewank, K.G., Crosby, M.B., Garrido, M.C., Vemula, S., Wiesner, T., Obenaus, A.C., Wackernagel, W., Green, G., Bouvier, N., et al. (2010). Mutations in GNA11 in Uveal Melanoma. *N. Engl. J. Med.* 363, 2191–2199.
- Vanden Bush, T.J., and Bishop, G.A. (2011). CDK-Mediated Regulation of Cell Functions via c-Jun Phosphorylation and AP-1 Activation. *PLoS ONE* 6.
- Verfaillie, A., Imrichova, H., Atak, Z.K., Dewaele, M., Rambow, F., Hulselmans, G., Christiaens, V., Svetlichnyy, D., Luciani, F., Van den Mooter, L., et al. (2015). Decoding the regulatory landscape of melanoma reveals TEADS as regulators of the invasive cell state. *Nat. Commun.* 6.
- Vergani, E., Vallacchi, V., Frigerio, S., Deho, P., Mondellini, P., Perego, P., Cassinelli, G., Lanzi, C., Testi, M.A., Rivoltini, L., et al. (2011). Identification of MET and SRC Activation in Melanoma Cell Lines Showing Primary Resistance to PLX4032. *Neoplasia N. Y. N* 13, 1132–1142.
- Villanueva, J., Vultur, A., Lee, J.T., Somasundaram, R., Fukunaga-Kalabis, M., Cipolla, A.K., Wubbenhorst, B., Xu, X., Gimotty, P.A., Kee, D., et al. (2010). Acquired Resistance to BRAF Inhibitors Mediated by a RAF Kinase Switch in Melanoma Can Be Overcome by Cotargeting MEK and IGF-1R/PI3K. *Cancer Cell* 18, 683–695.
- Villanueva, J., Infante, J.R., Krepler, C., Reyes-Uribe, P., Samanta, M., Chen, H.-Y., Li, B., Swoboda, R.K., Wilson, M., Vultur, A., et al. (2013). Concurrent MEK2 mutation and BRAF amplification confer resistance to BRAF and MEK inhibitors in melanoma. *Cell Rep.* 4, 1090–1099.
- Vivanco, I., Chen, Z.C., Tanos, B., Oldrini, B., Hsieh, W.-Y., Yannuzzi, N., Campos, C., and Mellinghoff, I.K. (2014). A kinase-independent function of AKT promotes cancer cell survival. *ELife* 3.
- Wagle, N., Emery, C., Berger, M.F., Davis, M.J., Sawyer, A., Pochanard, P., Kehoe, S.M., Johannessen, C.M., MacConaill, L.E., Hahn, W.C., et al. (2011). Dissecting Therapeutic Resistance to RAF Inhibition in Melanoma by Tumor Genomic Profiling. *J. Clin. Oncol.* 29, 3085–3096.
- Wang, D., Wang, J., Ding, N., Li, Y., Yang, Y., Fang, X., and Zhao, H. (2016). MAGE-A1 promotes melanoma proliferation and migration through C-JUN activation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 473, 959–965.
- Wang, J., Yao, Z., Jonsson, P., Allen, A.N., Qin, A.C.R., Uddin, S., Dunkel, I.J., Petriccione, M., Manova, K., Haque, S., et al. (2018a). A Secondary Mutation in BRAF Confers Resistance to RAF Inhibition in a BRAF V600E-Mutant Brain Tumor. *Cancer Discov.* 8, 1130–1141.
- Wang, L., Dai, W., and Lu, L. (2007). Stress-induced c-Jun Activation Mediated by Polo-like Kinase 3 in Corneal Epithelial Cells. *J. Biol. Chem.* 282, 32121–32127.

- Wang, L., Leite de Oliveira, R., Huijberts, S., Bosdriesz, E., Pencheva, N., Brunen, D., Bosma, A., Song, J.-Y., Zevenhoven, J., Los-de Vries, G.T., et al. (2018b). An Acquired Vulnerability of Drug-Resistant Melanoma with Therapeutic Potential. *Cell*.
- Wang, Y., Zhang, G., Jin, J., Degan, S., Tameze, Y., and Zhang, J.Y. (2017). MALT1 promotes melanoma progression through JNK/c-Jun signaling. *Oncogenesis* 6, e365.
- Ward, K.A., Lazovich, D., and Hordinsky, M.K. (2012). Germline melanoma susceptibility and prognostic genes: A review of the literature. *J. Am. Acad. Dermatol.* 67, 1055–1067.
- Ward, W.H., Lambreton, F., Goel, N., Yu, J.Q., and Farma, J.M. (2017). *Clinical Presentation and Staging of Melanoma* (Codon Publications).
- Watson, I.R., Li, L., Cabeceiras, P.K., Mahdavi, M., Gutschner, T., Genovese, G., Wang, G., Fang, Z., Tepper, J.M., Stemke-Hale, K., et al. (2014). The RAC1 P29S Hotspot Mutation in Melanoma Confers Resistance to Pharmacological Inhibition of RAF. *Cancer Res.* 74, 4845–4852.
- Whittaker, S., Kirk, R., Hayward, R., Zambon, A., Viros, A., Cantarino, N., Affolter, A., Nourry, A., Niculescu-Duvaz, D., Springer, C., et al. (2010). Gatekeeper Mutations Mediate Resistance to BRAF-Targeted Therapies. *Sci. Transl. Med.* 2, 35ra41-35ra41.
- Whittaker, S.R., Theurillat, J.-P., Van Allen, E., Wagle, N., Hsiao, J., Cowley, G.S., Schadendorf, D., Root, D.E., and Garraway, L.A. (2013). A genome-scale RNA interference screen implicates NF1 loss in resistance to RAF inhibition. *Cancer Discov.* 3, 350–362.
- Whitwam, T., VanBrocklin, M.W., Russo, M.E., Haak, P.T., Bilgili, D., Resau, J.H., Koo, H.-M., and Holmen, S.L. (2007). Differential oncogenic potential of activated RAS isoforms in melanocytes. *Oncogene* 26, 4563–4570.
- Wolchok, J.D., Chiarion-Sileni, V., Gonzalez, R., Rutkowski, P., Grob, J.-J., Cowey, C.L., Lao, C.D., Wagstaff, J., Schadendorf, D., Ferrucci, P.F., et al. (2017). Overall Survival with Combined Nivolumab and Ipilimumab in Advanced Melanoma. *N. Engl. J. Med.* 377, 1345–1356.
- Won, S.Y., and Kim, H.M. (2018). Structural Basis for LAR-RPTP–Mediated Synaptogenesis. *Mol. Cells* 41, 622–630.
- Wu, M., Hemesath, T.J., Takemoto, C.M., Horstmann, M.A., Wells, A.G., Price, E.R., Fisher, D.Z., and Fisher, D.E. (2000). c-Kit triggers dual phosphorylations, which couple activation and degradation of the essential melanocyte factor Mi. *Genes Dev.* 14, 301–312.
- Yadav, V., Zhang, X., Liu, J., Estrem, S., Li, S., Gong, X.-Q., Buchanan, S., Henry, J.R., Starling, J.J., and Peng, S.-B. (2012). Reactivation of Mitogen-activated Protein Kinase (MAPK) Pathway by FGF Receptor 3 (FGFR3)/Ras Mediates Resistance to Vemurafenib in Human B-RAF V600E Mutant Melanoma. *J. Biol. Chem.* 287, 28087–28098.
- Yao, Z., Torres, N.M., Tao, A., Gao, Y., Luo, L., Li, Q., de Stanchina, E., Abdel-Wahab, O., Solit, D.B., Poulidakos, P.I., et al. (2015). BRAF Mutants Evade ERK-Dependent Feedback by Different Mechanisms that Determine Their Sensitivity to Pharmacologic Inhibition. *Cancer Cell* 28, 370–383.
- Yao, Z., Yaeger, R., Rodrik-Outmezguine, V.S., Tao, A., Torres, N.M., Chang, M.T., Drosten, M., Zhao, H., Cecchi, F., Hembrough, T., et al. (2017). Tumours with class 3 BRAF mutants are sensitive to the inhibition of activated RAS. *Nature* 548, 234–238.
- Yde, S.S., Sjoegren, P., Heje, M., and Stolle, L.B. (2018). Mucosal Melanoma: a Literature Review. *Curr. Oncol. Rep.* 20, 28.

- Yeh, I., von Deimling, A., and Bastian, B.C. (2013). Clonal BRAF Mutations in Melanocytic Nevi and Initiating Role of BRAF in Melanocytic Neoplasia. *JNCI J. Natl. Cancer Inst.* *105*, 917–919.
- Yokoyama, S., Woods, S.L., Boyle, G.M., Aoude, L.G., MacGregor, S., Zismann, V., Gartside, M., Cust, A.E., Haq, R., Harland, M., et al. (2011). A novel recurrent mutation in MITF predisposes to familial and sporadic melanoma. *Nature* *480*, 99–103.
- Young, H.L., Rowling, E.J., Bugatti, M., Giurisato, E., Luheshi, N., Arozarena, I., Acosta, J.-C., Kamarashev, J., Frederick, D.T., Cooper, Z.A., et al. (2017). An adaptive signaling network in melanoma inflammatory niches confers tolerance to MAPK signaling inhibition. *J. Exp. Med.* *214*, 1691–1710.
- Young, M.R., Li, J.-J., Rincón, M., Flavell, R.A., Sathyanarayana, B.K., Hunziker, R., and Colburn, N. (1999). Transgenic mice demonstrate AP-1 (activator protein-1) transactivation is required for tumor promotion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *96*, 9827–9832.
- Zehir, A., Benayed, R., Shah, R.H., Syed, A., Middha, S., Kim, H.R., Srinivasan, P., Gao, J., Chakravarty, D., Devlin, S.M., et al. (2017). Mutational Landscape of Metastatic Cancer Revealed from Prospective Clinical Sequencing of 10,000 Patients. *Nat. Med.* *23*, 703–713.
- Zeitouni, D., Pylayeva-Gupta, Y., Der, C., Bryant, K., Zeitouni, D., Pylayeva-Gupta, Y., Der, C.J., and Bryant, K.L. (2016). KRAS Mutant Pancreatic Cancer: No Lone Path to an Effective Treatment. *Cancers* *8*, 45.
- Zeke, A., Misheva, M., Reményi, A., and Bogoyevitch, M.A. (2016). JNK Signaling: Regulation and Functions Based on Complex Protein-Protein Partnerships. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* *MMBR* *80*, 793–835.
- Zhang, J.Y., and Selim, M.A. (2012). The role of the c-Jun N-terminal Kinase signaling pathway in skin cancer. *Am. J. Cancer Res.* *2*, 691–698.
- Zhang, C., Spevak, W., Zhang, Y., Burton, E.A., Ma, Y., Habets, G., Zhang, J., Lin, J., Ewing, T., Matusow, B., et al. (2015). RAF inhibitors that evade paradoxical MAPK pathway activation. *Nature* *526*, 583–586.
- Zhang, J., Zhu, F., Li, X., Dong, Z., Xu, Y., Peng, C., Li, S., Cho, Y.-Y., Yao, K., Zykova, T.A., et al. (2012). Rack1 protects N-terminal phosphorylated c-Jun from Fbw7-mediated degradation. *Oncogene* *31*, 1835–1844.
- Zheng, Y., Sun, Y., Liu, Y., Zhang, X., Li, F., Li, L., and Wang, J. (2018). The miR-31-SOX10 axis regulates tumor growth and chemotherapy resistance of melanoma via PI3K/AKT pathway. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*

Annexes

The c-Jun/RHOB/AKT pathway confers resistance of *BRAF*-mutant melanoma cells to MAPK inhibitors

Audrey Delmas^{1,2,3}, Julia Cherier^{1,3}, Magdalena Pohorecka^{1,2,3}, Claire Medale-Giamarchi^{1,2,3}, Nicolas Meyer^{1,2,4}, Anne Casanova³, Olivier Sordet^{1,3}, Laurence Lamant^{1,5}, Ariel Savina⁶, Anne Pradines^{1,2,3}, Gilles Favre^{1,2,3}

¹Inserm, UMR 1037-CRCT, Toulouse, France

²Université Paul Sabatier, Toulouse, France

³Institut Claudius Regaud, Institut Universitaire du Cancer de Toulouse-Oncopole, Laboratory of Medical Biology and Oncogenetics, Toulouse, France

⁴Centre Hospitalo-Universitaire de Toulouse, Institut Universitaire du Cancer de Toulouse-Oncopole, Department of Dermatology, Toulouse, France

⁵Centre Hospitalo-Universitaire de Toulouse, Institut Universitaire du Cancer de Toulouse-Oncopole, Department of Pathology, Toulouse, France

⁶Scientific Partnerships, Roche SAS, Boulogne Billancourt, France

Correspondence to:

Gilles Favre, **e-mail:** favre.gilles@iuct-oncopole.fr

Keywords: melanoma, RHOB, AKT, vemurafenib, resistance

Received: January 19, 2015

Accepted: April 25, 2015

Published: May 07, 2015

ABSTRACT

The response of *BRAF*-mutant melanoma patients to BRAF inhibitors is dramatically impaired by secondary resistances and rapid relapse. So far, the molecular mechanisms driving these resistances are not completely understood. Here, we show that, in *BRAF*-mutant melanoma cells, inhibition of BRAF or its target MEK induces RHOB expression by a mechanism that depends on the transcription factor c-Jun. In those cells, RHOB deficiency causes hypersensitivity to BRAF and MEK inhibitors-induced apoptosis. Supporting these results, loss of RHOB expression in metastatic melanoma tissues is associated with an increased progression-free survival of *BRAF*-mutant patients treated with vemurafenib. Following BRAF inhibition, RHOB activates AKT whose inhibition causes hypersensitivity of *BRAF*-mutant melanoma cells to BRAF inhibitors. In mice, AKT inhibition synergizes with vemurafenib to block tumor growth of *BRAF*-mutant metastatic melanoma. Our findings reveal that BRAF inhibition activates a c-Jun/RHOB/AKT pathway that promotes tumor cell survival and further support a role of this pathway in the resistance of melanoma to vemurafenib. Our data also highlight the importance of using RHOB tumor levels as a biomarker to predict vemurafenib patient's response and to select those that would benefit of the combination with AKT inhibitors.

INTRODUCTION

The hypothesis of melanoma addiction to the RAF/MEK/ERK pathway, namely the MAPK pathway, emerged with the discovery of a high frequency of the BRAF^{V600E}-activating mutation in melanoma cell lines and primary tumors [1]. Since then, evidence of melanoma dependency on MAPK pathway accumulated and its inhibition by either BRAF or MEK inhibitors (BRAFi and MEKi,

respectively) emerged as a therapeutic strategy [2]. The first-in-class specific BRAFi, vemurafenib (PLX4032), led to an unprecedented response for 80% patients in phase III clinical trials [3, 4]. However, the improvement of disease-free survival and global survival was disappointingly weak, due to the rapid acquisition of resistance, opening the way to the discovery of new classes of MAPK inhibitors [5] or to BRAFi combinations with cytotoxic drugs [6].

Intensive investigations led to identify several resistance mechanisms on the basis of *in vitro* resistant cell lines and clinical studies. Most of them reactivate the MAPK and/or PI3K/AKT pathways by acquisition of *RAS* and *MEK* mutations [7, 8], or over-expression of COT [9], CRAF or growth factor receptor such as FGFR3, EGFR, PDGFR α , PDGFR β [7, 10–13]. Moreover, MAPK inhibition modulates transcription factors expression that could regulate adaptive responses [14]. Although their roles are not clearly defined, the genes whose expression is modulated could impact on the sensitivity of melanoma cells to BRAFi and therefore could be of clinical relevance. In line with this hypothesis, the transcription factor FOXD3 and the pro-apoptotic BH3-only protein NOXA, are induced and down-regulated, respectively following PLX4032 treatment thus promoting resistance to cell death [15, 16]. Hence, MAPK inhibition can regulate *per se* the expression of resistance factors.

RHO GTPases are regulated by many signaling pathways, such as the MAPK pathway, and control numerous cellular functions including the balance between survival and apoptosis [17]. In that way, they may impact on the cellular response to MAPK inhibitors. Cross-regulations between RHO GTPases and MAPK pathways have been reported [18, 19] and several members of the RHO GTPase family have been involved in apoptosis inhibition to both chemotherapies and targeted therapies. For instance, RHOJ mediates melanoma cell resistance to dacarbazine [20], RAC1 is involved in breast cancer cell response to trastuzumab [21] and RHOE/RND3 enhances multidrug resistance in gastric cancer cells [22]. In addition, inhibition of MAPK pathway has an impact on the regulation of the expression of RHO GTPase genes. This may result in a modulation of the tumor cell sensitivity to MAPK inhibitors, as demonstrated for RHOE/RND3, which impedes melanoma cell invasion in response to PLX4032 [23].

We therefore investigated the role of RHO GTPases in melanoma cell response to PLX4032 and others inhibitors of the MAPK pathway. Using RT-qPCR screening, we detected a significant induction of RHO B expression upon PLX4032 treatment in *BRAF*-mutant melanoma cells. RHO B is well known to be modulated in response to anticancer therapies and to control tumor cell response to ionizing radiation and cytotoxic drugs [24–26]. Moreover, RHO B has also been involved in the response to targeted therapy as described by Vishnu and colleagues in ovarian cells [27]. Here, we show that in *BRAF*-mutant melanoma cells, PLX4032 induces c-Jun activation resulting in RHO B expression and subsequent AKT activation. We demonstrate that pharmacological association of BRAFi with AKT inhibitors (AKTi) displays a higher antitumor activity

than BRAFi alone on *BRAF*-mutant cells. Finally, we demonstrate that the expression of RHO B in melanoma tissues determines a poor clinical response to PLX4032. Altogether, these findings support a potential role for RHO B as a predictive biomarker to PLX4032 therapy and the c-Jun/RHO B/AKT signaling axis as a new target to prevent resistance to BRAFi of *BRAF*-mutant melanoma tumors.

RESULTS

RHO B expression is induced by the BRAFi PLX4032 in *BRAF*-mutant melanoma cells

We first analyzed RHO GTPase transcripts in the metastatic *BRAF*^{V600X}-mutant melanoma cell lines WM266-4 and A375 following a 48 h treatment with PLX4032. In both cell lines, RAC1b mRNA levels decreased while those of RHO B, RHOJ and RHOQ increased (Figure 1A and 1B). *RHO B* was the most induced gene with a factor of 5.7 ± 1.2 in WM266-4 cells (Figure 1A) and of 2.0 ± 0.3 in A375 cells (Figure 1B). In those two cell lines, the increase in the RHO B mRNA level was associated with an increase in the RHO B protein level (Figure 1C). PLX4032 treatment also increased RHO B protein level in six other *BRAF*-mutant melanoma cell lines, which are representative of melanoma progression (RGP-VGP to metastatic) (Figure 1D).

The increase in RHO B expression in WM266-4 cells treated with PLX4032 for 48 h was dose-dependent, reaching a maximum at 1 μ M, and was coincident with the inhibition of ERK phosphorylation (Figure 1E and 1F). At this PLX4032 concentration, RHO B induction was clearly detected after 24 h and increased over time (Figures 1F and S1). In contrast, the two RHO B homologs RHOA and RHOC were not induced (Figures 1F and S1). To determine whether continuous exposure to PLX4032 was necessary to maintain the observed elevated expression of RHO B, we examined RHO B expression following PLX4032 removal. We found that RHO B expression was maintained and did not return to its baseline levels even 96 h after termination of the PLX4032 treatment (Figure 1G). As a control, ERK phosphorylation was recovered after 24 h indicating that BRAF inhibition was indeed obliterated (Figure 1G). These results suggest that although BRAF inhibition is required to prime RHO B induction, an adaptive mechanism of melanoma cells may occur following PLX4032 treatment to maintain high levels of RHO B. We conclude that PLX4032 triggers a sustained induction of RHO B expression in *BRAF*-mutant melanoma cells.

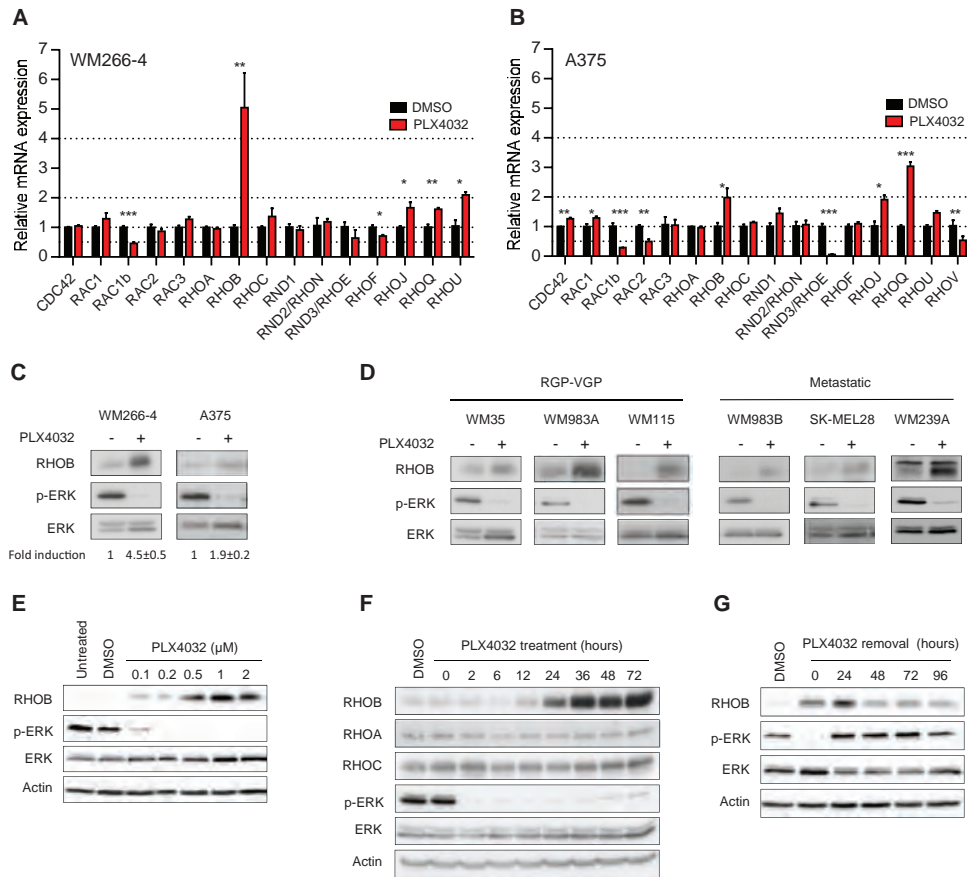


Figure 1: PLX4032 increases RHOB expression in BRAF^{V600E} melanoma cells. **A** and **B**. RT-qPCR analysis of RHOGTPase transcripts in WM266-4 and A375 cells treated with 1 μ M PLX4032 for 48 h. **C** and **D**. Western blotting of RHOB, p-ERK and ERK in *BRAF*-mutant melanoma cells treated with 1 μ M PLX4032 for 48 h. **E** and **F**. Western blotting of the indicated proteins in WM266-4 cells treated with the indicated PLX4032 concentrations for 48 h (**E**) and for the indicated times with 1 μ M PLX4032 (**F**). **G**. WM266-4 cells were treated with 1 μ M PLX4032 for 48 h, then washed and cultured in PLX4032-free medium for the indicated times. RHOB, RHOA, RHOC, p-ERK and ERK were analyzed by Western blotting. Actin was the loading control.

MAPK inhibition triggers RHOB induction in *BRAF*-mutant melanoma cells

Next we addressed whether RHOB induction by PLX4032 in *BRAF*-mutant melanoma cells was related to BRAF inactivation. We found that BRAF inhibition with siRNA or with the PLX4032-unrelated BRAF^{V600E} inhibitor SB590885 increased RHOB protein levels in WM266-4 cells (Figure 2A, 2B). Inhibition of the BRAF substrate MEK with AZD6244 or AS703026 also resulted in an increased RHOB expression in those cells (Figure 2B). These results indicate that BRAF inactivation causes RHOB overexpression in *BRAF*-mutant melanoma cells.

In melanomas, the MAPK pathway is frequently hyperactivated by mutations in the *BRAF* gene (approximately 50% of melanomas) but also in *NRAS* (18%), *KIT* (9%), *HRAS* (2%) or *KRAS* (2%) genes (COSMIC database). We therefore examined the impact of PLX4032 and MEKi on RHOB expression in wild type *BRAF* melanoma cells harboring mutations in *NRAS* (WM1346 and SK-MEL2 cells), *KIT* (WM3211 cells) or

KRAS (WM1791C cells). Consistent with the selectivity of PLX4032 for *BRAF*-mutant cells, it failed to inhibit MAPK signaling in these four cell lines, as shown by the lack of decrease in ERK phosphorylation, and the lack of RHOB induction (Figure 2C). In contrast, the MEKi AZD6244 inhibited ERK phosphorylation and induced RHOB expression (Figure 2C). Taken together, these results indicate that the BRAF/MEK pathway regulates RHOB expression.

The induction of RHOB after MAPK pathway inhibition suggests that this phenomenon could be a common feature for *BRAF*-mutant tumor cells. We therefore tested the effect of PLX4032 and AZD6244 treatment on BRAF^{V600E}-mutant colon cancer cells. As shown in Figure 2D, efficient inhibition of MAPK signaling with PLX4032 or AZD6244, demonstrated by inhibition of ERK phosphorylation, did not significantly affect RHOB expression even with a higher dose (5 μ M) than that used in melanoma cells (1 μ M). These results suggest that RHOB modulation by MAPK signaling is not a common mechanism in *BRAF*-mutant cells but a feature of specific tumors such as melanoma.

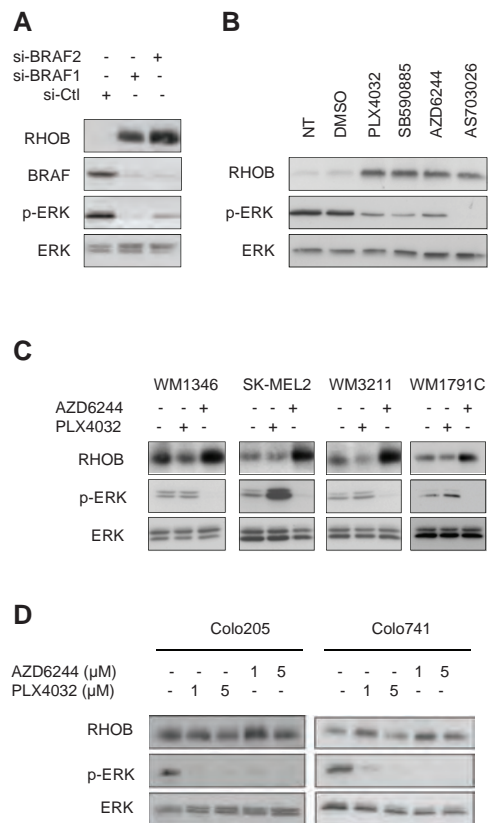


Figure 2: Inhibition of the BRAF/MEK/ERK pathway induces RHOB in melanoma cells. **A** and **B**. Western blotting of the indicated proteins in WM266-4 cells transfected with BRAF-targeting (si-BRAF1 and si-BRAF2) or non-targeting (si-Ctl) siRNAs (A) or treated for 48 h with 1 μM of BRAF (PLX4032 or SB590885) or MEK (AZD6244 or AS703026) inhibitors (B). **C**. Western blotting of RHOB, p-ERK and ERK in wild-type *BRAF* melanoma cell lines treated with 1 μM PLX4032 or AZD6244 for 48 h. **D**. Western blotting of RHOB, p-ERK and ERK in *BRAF*^{V600E} colon cell lines treated with the indicated PLX4032 or AZD6244 concentrations for 48 h.

c-Jun is involved in PLX4032-induced RHOB expression

We next investigated the mechanism underlying RHOB induction by PLX4032. Increase of RHOB transcript stability has been reported in response to UV [28, 29] and camptothecin [30]. Experiments performed in the presence of the transcription inhibitor actinomycin D showed that the half-life of RHOB mRNA was not significantly prolonged in PLX4032-treated cells (Figure 3A). We then analyzed RHOB promoter activity using a luciferase reporter gene assay system. We found a 2 to 3-fold increase of RHOB promoter activity after a 24 h PLX4032 treatment (Figure 3B).

To identify the promoter region involved in the transcriptional activation of RHOB in response to PLX4032, we performed luciferase assays with plasmids containing different RHOB promoter lengths. We found that all constructs increased luciferase activity following PLX4032 treatment, including the -45 shorter one, which contains only the TATA boxes and an inverted CCAAT box (iCCAAT) (Figure 3C). Mutations of iCCAAT strongly reduced promoter response to PLX4032 (Figure 3D).

These results indicate that this promoter region is required for RHOB induction by PLX4032.

The iCCAAT region has been reported to control RHOB expression in cell stress response in a c-Jun-dependent manner [31–33]. Hence, we examined c-Jun activation after PLX4032 treatment by analyzing both total and phosphorylated (S63) c-Jun. Figure 3E shows that both c-Jun and p-c-Jun (S63) were induced in response to PLX4032. As for RHOB, total and phosphorylated c-Jun were maintained over at least 96 h after PLX4032 removal (Figure S2A). To assess more directly the role of c-Jun in RHOB upregulation, we inhibited its expression. We found that siRNA-mediated depletion of c-Jun prevented the induction of RHOB in response to PLX4032 (Figure 3F).

Previous work show that JNK and p38 are implicated in the activation of the c-Jun/RHOB axis in response to UV and γ-radiation [32, 34]. However, we found that phosphorylated p38 and JNK rather decreased following PLX4032 treatment (Figure S2B). In addition, the JNK inhibitor, SP600125, as well as the p38 inhibitors, SB203580 and BIRB796, did not prevent PLX4032-induced c-Jun and RHOB expression (Figure S2C and S2D). Together, these data indicate that PLX4032 induces

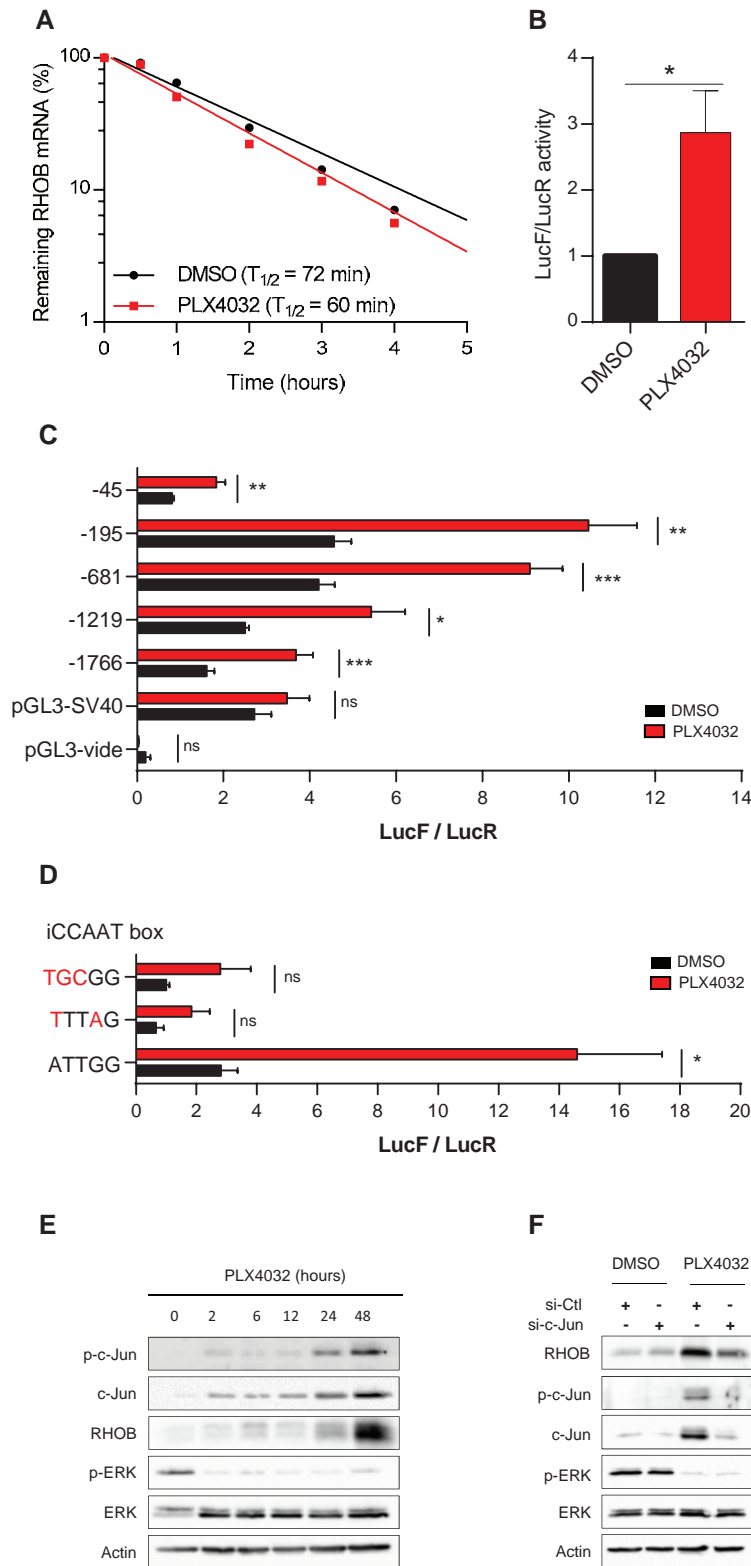


Figure 3: RHOB is induced by PLX4032 through transcriptional activation in an iCCAAT and c-Jun dependent pathway. **A.** After a 48 h incubation of WM266-4 cells with PLX4032 (1 μ M), RHOB mRNA half-life was measured by RT-qPCR using the transcription inhibitor actinomycin D (5 μ g/mL) and normalized to the long half-life of actin mRNA (one representative experiment). **B-D.** Luciferase assays in WM266-4 cells co-transfected with RHOB promoter-firefly luciferase constructs and pRL-CMV before treatment with PLX4032 (2 μ M, 24 h in B and C; 1 μ M, 48 h in D). **E and F.** Western blotting of p-c-Jun, c-Jun, RHOB, p-ERK and ERK in WM266-4 cells treated with 1 μ M PLX4032 for the indicated times (E) or transfected with c-Jun-targeting or non-targeting (si-Ctl) siRNAs before treatment with 1 μ M PLX4032 for 48 h (F). Actin was the loading control.

c-Jun expression and phosphorylation by a JNK- and p38- independent mechanism.

Inhibition of RHOB sensitizes melanoma cells to MAPK inhibitors-induced apoptosis

To determine the role of RHOB in the cellular response to MAPK inhibitors, RHOB expression was prevented by RNA interference (Figure S3A). Following RHOB depletion, the IC₅₀ of PLX4032 was significantly reduced in the *BRAF*-mutant A375 and WM266-4 cells but not in the wild-type *BRAF* SK-MEL2 cells which are insensitive to PLX4032 (Figure 4A, 4B and 4C and Table S1). In contrast, RHOB depletion sensitized both mutant and wild-type *BRAF* cells to the MEKi AZD6244 (Figure 4D, 4E and 4F and Table S1). Likewise, RHOB downregulation also sensitized WM266-4 cells to the combination of BRAFi with MEKi (Figure 4G). Because we found that c-Jun induces RHOB (Figure 3), we examined whether c-Jun inhibition would also sensitize cells to PLX4032. We found that depletion of c-Jun with siRNA sensitized WM266-4 cells to PLX4032 (Figure 4H and Table S2) and that this effect was in part reversed by adenovirus-mediated RHOB overexpression (Figures 4I and S3B and Table S3).

To study the mechanisms underlying RHOB-dependent cell sensitivity to PLX4032, we assayed apoptotic markers after RHOB depletion. We found that RHOB siRNA increased apoptosis of WM266-4 cells in response to PLX4032 as demonstrated by an increase in the number of nuclei with subG1 DNA content, in apoptotic DNA fragmentation and in PARP and caspase-3 cleavage (Figure 5A-5C). Similar results were obtained in A375 cells (Figure S4). In addition, the pan-caspase inhibitor Z-VAD-FMK prevented PLX4032-induced PARP and caspase-3 cleavage (Figure 5D) and the accumulation of subG1 cells (Figure 5E). Overall these data show that RHOB depletion triggers caspase-dependent apoptosis of *BRAF*-mutant melanoma cells exposed to MAPK inhibitors.

High basal RHOB expression in melanoma cell lines and patients biopsies is associated with a poor response to PLX4032

Given that RHOB depletion determines the cellular response to PLX4032 in *BRAF*-mutant melanoma cells, we hypothesized that the basal expression of RHOB may predict the response to BRAFi. Therefore, we compared RHOB mRNA levels (Figure 6A) with the IC₅₀ of PLX4032 (Figure 6B) in 8 different cell lines. A strong correlation was observed between RHOB basal expression and PLX4032 IC₅₀. Cell lines with low RHOB expression were more sensitive to PLX4032, suggesting that, in melanoma cells, high RHOB expression may predict a poor response of *BRAF*-mutant patients to PLX4032.

RHOB expression levels were subsequently analyzed by immunostaining in a retrospective series of 32 biopsies from patients with metastatic melanoma harboring BRAF^{V600X} mutations, receiving PLX4032 as a front-line therapy (Figure 6C). We observed a significant expression of RHOB in 8 out of the 32 samples (Table S5). Interestingly, we found that the Progression Free Survival (PFS) was significantly shorter in patients whose tumor samples displayed a positive RHOB staining before treatment compared to those with negative RHOB staining (median PFS: 135 days [Interquartile range – IQR: 107; 141] versus 235 days [IQR: 214; 314] respectively; $p < 10^{-3}$) (Figure 6D and Table S5), with a hazard ratio of short-duration therapeutic response of 10^{-3} (95% confidence interval – 95% CI: 2×10^{-4} ; 9×10^{-3}). We conclude that the basal expression of RHOB in tumor cells may represent a predictive value of PLX4032 response to treatment in BRAF^{V600X} metastatic melanoma.

RHOB modulates response to PLX4032 through AKT pathway

Lastly, we investigated the molecular mechanisms by which RHOB impairs an efficient response to PLX4032. It has been previously reported that RHOB activates the AKT pathway [28, 35–37] and that AKT is activated following PLX4032 treatment [38]. We demonstrate that phosphorylated AKT is markedly reduced in response to simultaneous RHOB depletion and PLX4032 treatment in *BRAF*-mutant cells WM266-4 (Figure 7A), Lu1205, WM239A, RPMI-7951 (Figure S5). Same findings were observed in *NRAS*-mutant cells WM1346 treated with the MEKi AZD6244 (Figure S5). These data suggest that RHOB inhibition impedes AKT signaling. Therefore the resistance to PLX4032 should be recovered in RHOB knockdown cells when AKT phosphorylation is rescued by expressing a constitutively active AKT-myr protein. Consistent with this hypothesis, overexpression of AKT-myr in RHOB depleted cells completely abolished sensitization to PLX4032 (Figures 7B and S6 and Table S4).

These findings highlight that AKT inhibition would reverse RHOB-mediated PLX4032 resistance. In order to confirm this assumption, we analyzed the combination of PLX4032 with AKT inhibitors, either G594 (an ATP competitive inhibitor of AKT provided by Genentech) or MK2206. AKT inhibition enhanced PLX4032 cytotoxic effect as shown by an increased PARP and caspase-3 cleavage (Figures 7C and S7). To determine whether combination of PI3K/AKTi and BRAFi displays additive or synergistic effect, co-treatments were performed *in vitro* and combination indexes were calculated. All three PI3K/AKT pathway inhibitors (LY294002, MK2206 and G594) demonstrated a substantial synergistic effect when combined with PLX4032 in WM266-4 cells (Figure 7D).

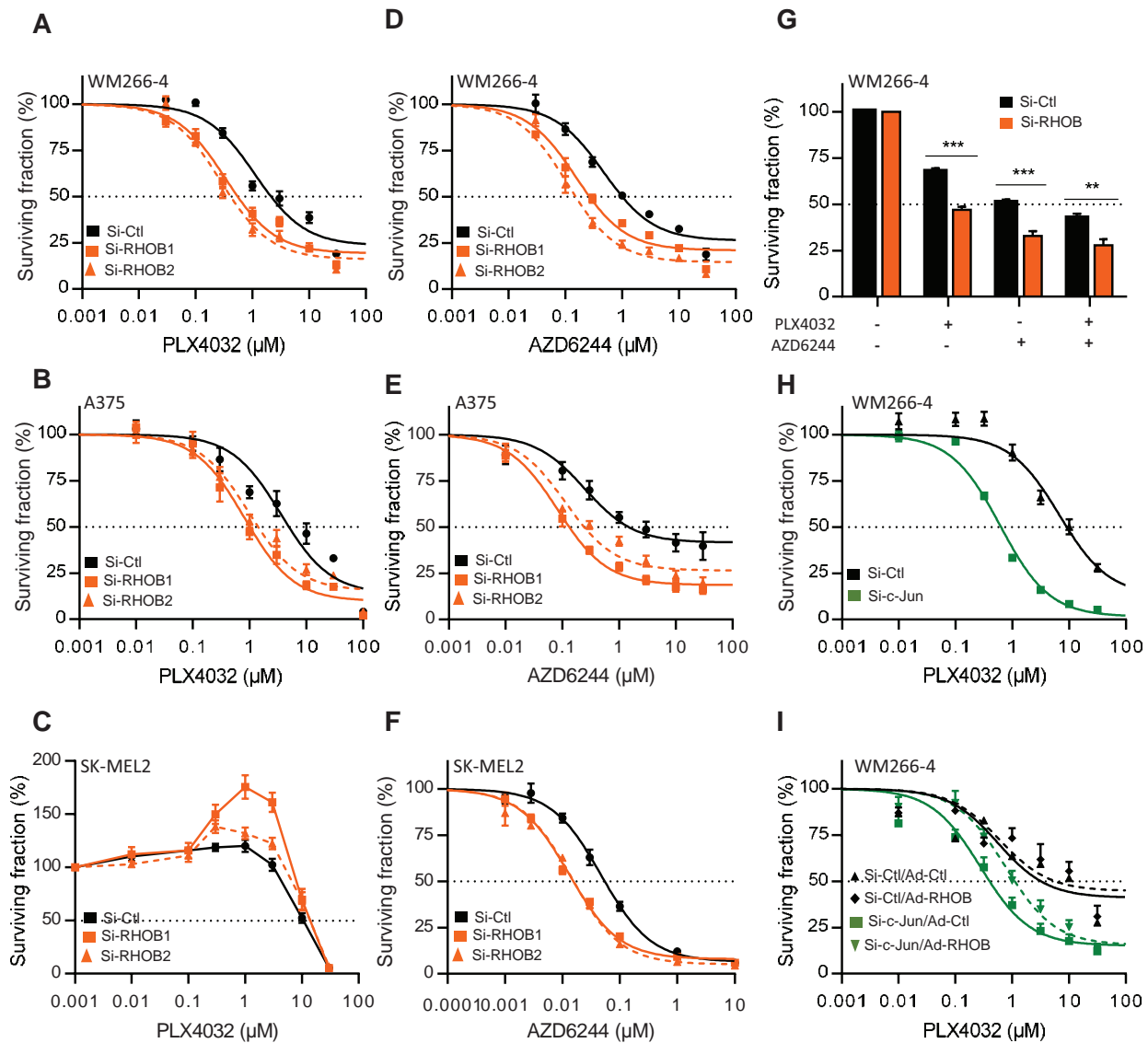


Figure 4: Inhibition of the c-Jun/RHOB axis increases cell sensitivity to BRAF and MEK inhibitors. A-F. WM266-4, A375 or SK-MEL2 cells were transfected with siRNAs control (si-Ctl) or targeting RHOB (si-RHOB1 and si-RHOB2) before treatment with PLX4032 or AZD6244 for 72 h. G. WM266-4 cells were transfected with siRNAs control (si-Ctl) or targeting RHOB (si-RHOB) before treatment with PLX4032 (1 μM) and/or AZD6244 (1 μM) for 72 h. H. WM266-4 cells were transfected with siRNAs control (si-Ctl) or targeting c-Jun (si-c-Jun) before treatment with PLX4032 for 72 h. I. WM266-4 cells were transfected with siRNAs control (si-Ctl) or targeting c-Jun (si-c-Jun), then transduced with adenovirus control (Ad-Ctl) or expressing RHOB (Ad-RHOB) and treated for 72 h with PLX4032. In each condition, cell viability was measured by MTS and the dose-response was analyzed (except in G).

In a same manner, a synergistic effect was found between the AKTi, G594 and PLX4032 in the 7 other *BRAF*-mutant cell lines and between G594 and AZD6244 in 2 *NRAS*-mutant cell lines (Table S6).

We next evaluated this combination effect in the WM266-4 xenografted mouse model. After tumor appearance, mice were treated with control vehicle, G594 and/or PLX4032 and the tumor growth was monitored. As shown in Figures 7E and S8, both tumor growth and

tumor weight were significantly reduced in mice receiving BRAFi/AKTi combination compared to the monotherapies (Figures 7E and S8), confirming that AKT signaling pathway plays a role in the *in vivo* responses of *BRAF*-mutant tumors to PLX4032.

We conclude that PLX4032-induced RHOB expression drives AKT-dependent cell survival and that BRAFi/AKTi combination should improve therapeutic response of RHOB positive tumors.

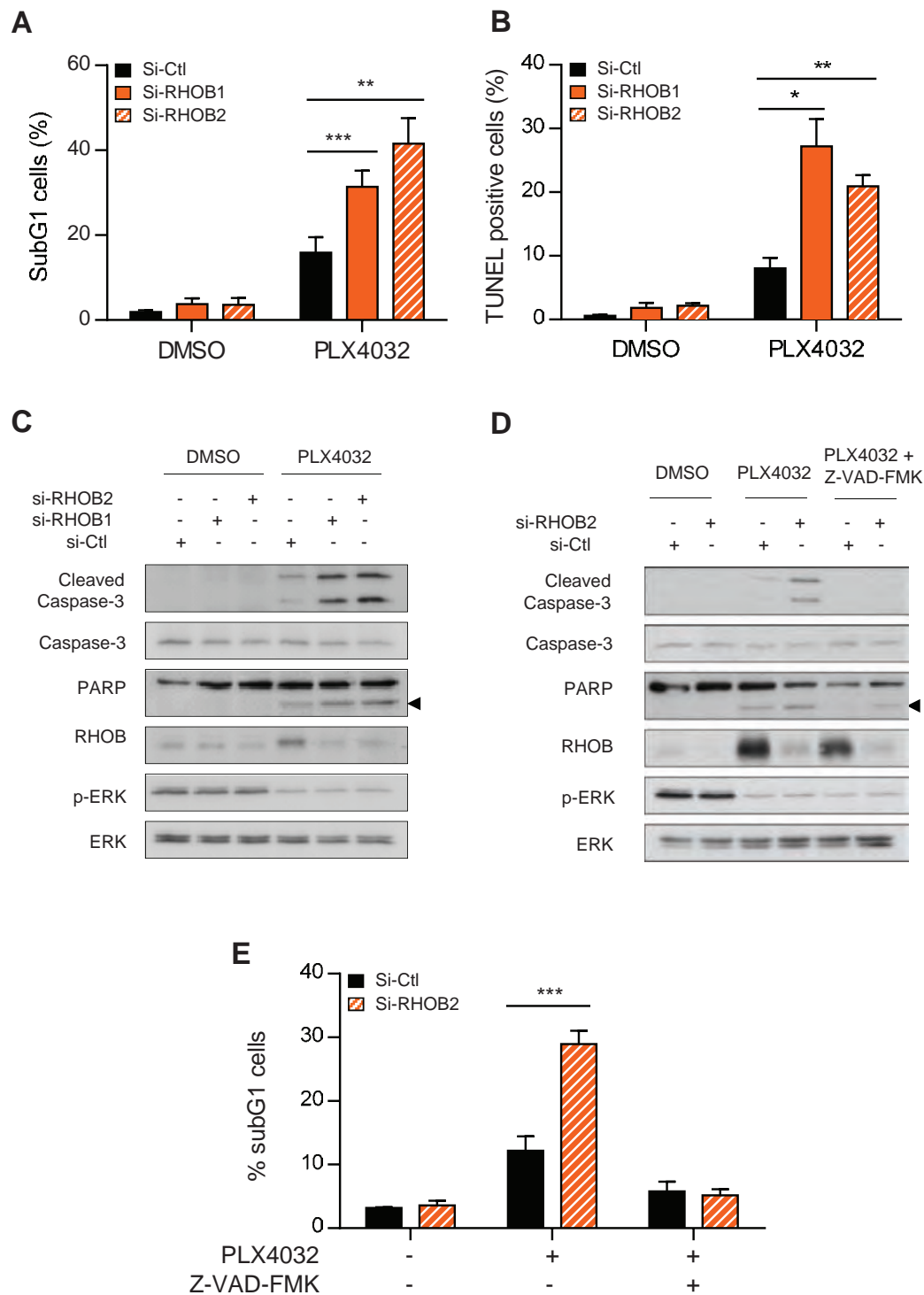


Figure 5: Concurrent inhibition of MAPK with RHOB triggers apoptosis. WM266-4 cells were transfected with siRNAs control (si-Ctl) or targeting RHOB (si-RHOB1 and si-RHOB2) before treatment with 2 μ M PLX4032 for 72 h. Apoptosis was determined by the percentage of cells with subG1 DNA content **A**, **E**, or positive for TUNEL assay **B**, or by Western blotting analysis of cleaved caspase-3 and cleaved PARP (the arrowheads at right indicate the cleaved fragment) **C** and **D**. Total caspase-3, RHOB, p-ERK and ERK were analyzed in parallel. In **D** and **E**, cells were co-treated or not with 2 μ M PLX4032 and the pan-caspase inhibitor Z-VAD-FMK (25 μ M).

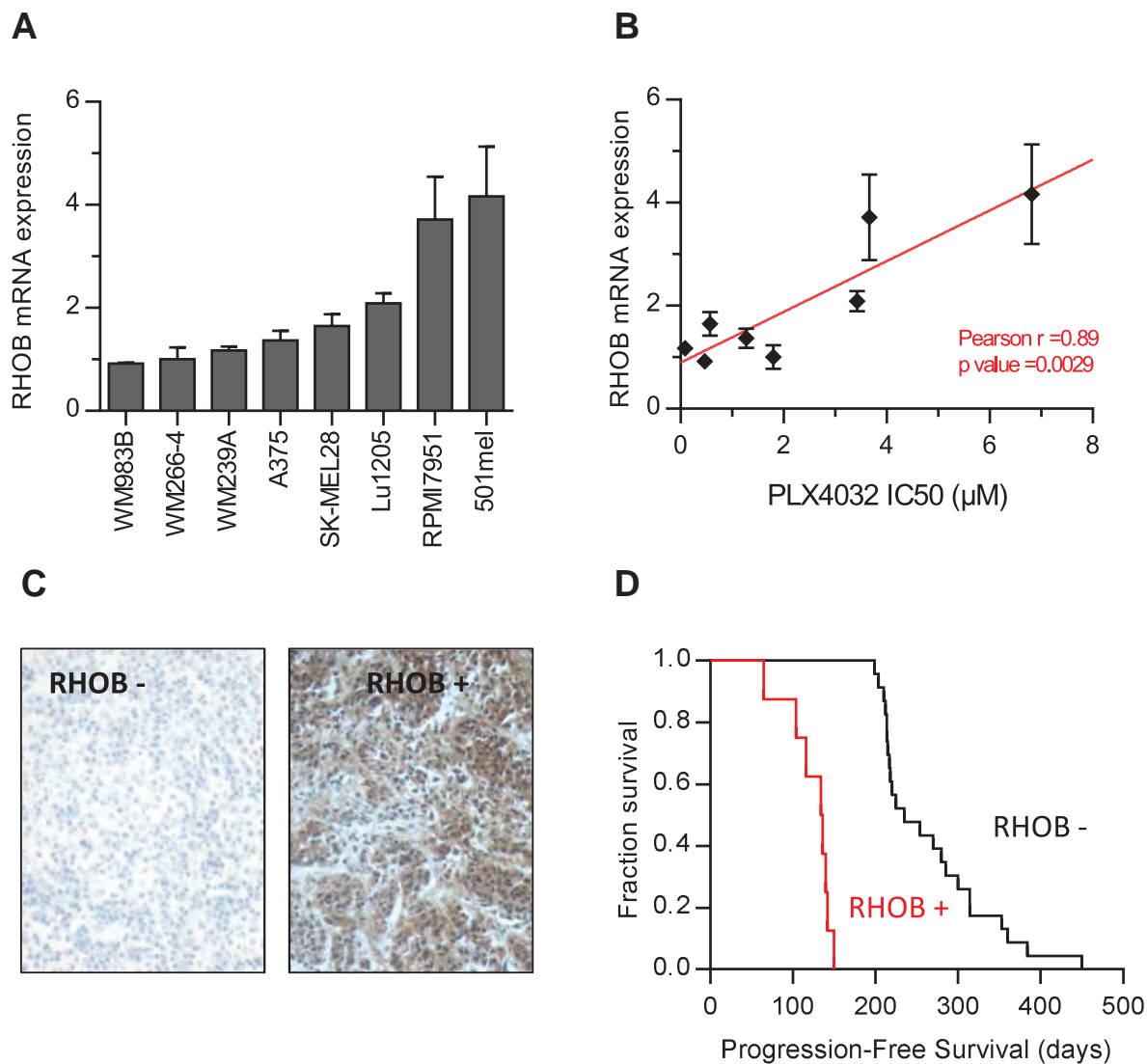


Figure 6: High RHOB expression in melanoma cell lines and patient melanoma biopsies predict low sensitivity to the BRAF inhibitor PLX4032. **A.** RHOB expression in a panel of *BRAF*-mutant metastatic melanoma cell lines analyzed by RT-qPCR. **B.** The IC50 of PLX4032 in a panel of *BRAF*-mutant metastatic melanoma cell lines was determined by viability assay and correlated with RHOB mRNA expression. **C.** Example of positive and negative RHOB immunostaining in melanoma biopsies. **D.** Kaplan-Meier progression-free survival of 32 patients with a metastatic *BRAF*^{V600X} melanoma following treatment with PLX4032 according to biopsies' RHOB staining.

DISCUSSION

In this study we demonstrate that inhibition of mutant *BRAF* in melanoma cells with pharmacological inhibitors or siRNA knockdown results in the activation of the c-Jun/RHOB/AKT signaling axis, which leads to cell survival. Interestingly, a concomitant consequence of c-Jun/RHOB/AKT activation is a decrease of PLX4032 cellular responses, entailing acquired resistance.

RHO proteins have been shown to play a role in modulating cell survival and some of them have been described to be regulated by the MAPK pathway [17].

Importantly, we found that the expression of 6 members of the RHOGTPase family was significantly modified in response to PLX4032 in melanoma cells. RND3 is downregulated as previously described [23] whereas RHOB, RHOJ, RHOQ and RHOV are induced. While nothing is known about the role of RHOQ and RHOV in melanomagenesis, RHOJ participates to chemoresistance through DNA repair control [20] and modulates metastasis potential in melanoma [39]. Of interest is the PLX4032-induced RAC1b downregulation, suggesting that RAC1b and *BRAF* cooperate in melanomagenesis as previously described in colorectal cancer [40].

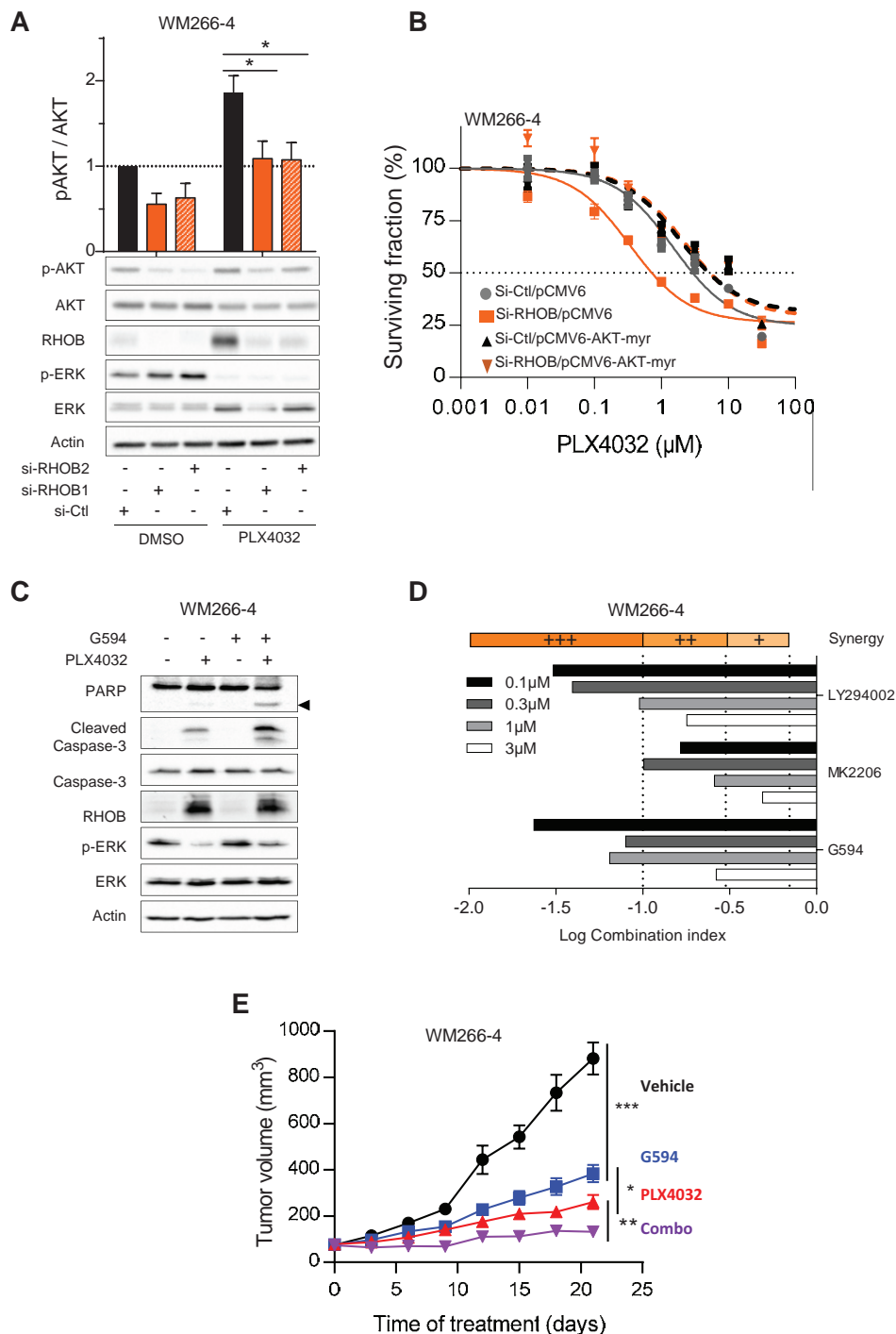


Figure 7: RHOB-mediated resistance to PLX4032 is overcome by combination with an AKT inhibitor. **A.** WM266-4 cells were transfected with siRNA control (si-Ctl) or targeting RHOB (si-RHOB1 or si-RHOB2) before treatment with 2 μ M PLX4032 for 72 h. AKT phosphorylation was analyzed by Western blotting. Total AKT, RHOB, p-ERK and ERK were examined in parallel. Actin was the loading control. Histogram is a quantification of 5 independent experiments. **B.** WM266-4 cells were co-transfected with siRNAs control (si-Ctl) or targeting RHOB (si-RHOB2) and empty plasmid (pCMV6-Ctl) or encoding AKT-myristic acid (pCMV6-AKT-myr). Cells were then treated with PLX4032 and the viability was assayed 72 h later. **C.** Western blotting of caspase-3 and PARP cleavage (the cleaved fragment is indicated by the arrowhead) in WM266-4 cells treated with 2 μ M PLX4032 and/or 1 μ M G594 for 48 h. Total caspase-3, RHOB, p-ERK and ERK were examined in parallel. Actin was the loading control. **D.** WM266-4 cells were treated with equal amount of PI3K/AKT inhibitors (LY294002, MK2206 or G594) and PLX4032. Viability was assayed 72 h later by MTS assay. Combination indexes (CI) were calculated with CompuSyn (very strong synergism (+++) $CI < 0.1$; strong synergism (++) $0.1 < CI < 0.3$; synergism (+) $0.3 < CI < 0.7$). **E.** Athymic mice were subcutaneously inoculated with WM266-4 cells. Mice were randomized 10 days later in 4 groups (10 mice per group) and treated orally with vehicle, G594 or/ and PLX4032 for 21 days. The tumor volume was evaluated every 3 days.

We focused our attention on the stress-inducible *RHOB* gene [28, 30, 33, 41, 42] that plays a negative role on tumor progression. Moreover, *RHOB* functions are mediated by tyrosine kinase receptors and their downstream effectors [25, 26, 43]. We have demonstrated previously that *RHOB* is downregulated by *KRAS*^{V12} in lung cancer cell lines increasing invasiveness via *AKT1* [44]. More recently, we have revealed that *RHOB* knock-out is critical to determine tumor aggressiveness in a murine *EGFR*^{L858R}-induced lung adenocarcinoma [45]. Herein, we show that *BRAF*^{V600E} mutant causes a MAPK-dependent decrease of *RHOB* expression in melanoma cell lines. It is likely that the mechanism of *RHOB* downregulation is related to cell type and/or cell context. Indeed, Jiang et al. [46] found that *AKT* induced *RHOB* downregulation in non-melanoma cell lines. According to our cellular data, the patient's samples revealed an absence of *RHOB* expression in more than 70% of melanoma tissues bearing *BRAF*^{V600E} mutants. This suggests that reduced *RHOB* levels represent a critical event during melanomagenesis.

The observation of a persistent *RHOB* expression after PLX4032 removal, despite ERK re-phosphorylation (Figure 1G), suggests that *RHOB* participates to an original long lasting adaptive cellular program in melanoma cells. We show that *RHOB* expression after PLX4032 treatment depends on the transcription factor c-Jun. It has been demonstrated that iCCAAT is critical for UVB-induced *RHOB* expression [32, 47]. In that model, phosphorylated c-Jun is associated to ATF2 and NF-Y inducing HDAC1 release then allowing p300 binding to iCCAAT triggering *RHOB* expression. In stress conditions, c-Jun was described to be phosphorylated following JNK and p38 activation [32, 34] while in our model JNK and p38 were not involved in PLX4032-induced c-Jun phosphorylation and expression. We evidence here a key role of c-Jun in the long lasting regulation of *RHOB* expression by PLX4032 and the significance of this pathway in cell survival following cellular treatment.

RHOB has been demonstrated to control *AKT* phosphorylation to exert its cellular functions in many cell types. Here, we demonstrated that, by contrast to lung [44] and breast cancer [36] cells, *RHOB* downregulation decreases *AKT* phosphorylation in melanoma, similarly to endothelial cells [36, 48] (Figures 7A and S5). These data reinforce the notion that the modulation of *AKT* phosphorylation by *RHOB* depends on the cellular phenotype. We show here that *RHOB/AKT* signaling inhibition is critical for PLX4032-induced caspase-dependent apoptosis. In the same way, genotoxic stress-induced *RHOB* expression favors cell survival through *AKT* pathway [28, 30, 35, 41, 49]. We provide new evidence that the *RHOB/AKT* axis is a common adaptive mechanism to cell injury.

It has been previously reported that *AKT* is activated in PLX4032-treated *PTEN* negative melanoma and is involved in melanoma resistance [50]. However, the role of the c-Jun/*RHOB/AKT* axis in the cellular sensitivity to MAPK inhibitors appeared to be independent on *PTEN* status. Indeed, whereas WM266-4 cells lack *PTEN* expression, A375 cells are wild-type for *PTEN* and are also sensitized to MAPK inhibitors by *RHOB* siRNA (Figures 4, 5 and S4) or *AKTi* (Figure 7, Table S6).

The combination of PI3K/*AKT* inhibitors with PLX4032 to improve melanoma treatment has been recently proposed although the mechanism was not clearly established. We demonstrate that PLX4032 induces a cell adaptive response including a long lasting expression of c-Jun and *RHOB* leading to the activation of *AKT* signaling axis which may trigger cell resistance by inhibiting apoptosis. While *AKTi* are not able to induce cell death by themselves they lead to a synergistic synthetic lethal interaction with *BRAF*i. Our observations further support the rationale to treat patients with a combination of *BRAF* and *AKT* inhibitors.

Finally, our results on metastatic melanoma biopsies highlight a pivotal role for *RHOB* in the therapeutic management of this disease. Interestingly, the analysis of *RHOB* expression in these samples revealed that patients with *RHOB* positive biopsies displayed a poor response to PLX4032. We therefore hypothesize that patients with a high *RHOB* expression would display a high *AKT* pathway activity and benefit from *BRAF* and *AKT* inhibitors combination rather than *BRAF*i monotherapy. However, it could not be excluded that *RHOB* negative patients' survival would also be improved by such a therapeutic combination by preventing potential late resistance appearance. Analyzing future combinational clinical trial regarding *RHOB* status will bring answers to these remaining questions.

Taken together, our findings tempt us to conclude that the c-Jun/*RHOB/AKT* signaling axis is a synthetic lethal partner of *BRAF*-mutant, and potentially of *NRAS*-mutant, melanomas and to propose *RHOB* as a critical biomarker to predict patient's response to PLX4032 and to select those that would benefit of the combination with *AKT* inhibitors.

MATERIALS AND METHODS

Cell culture and pharmacological inhibitors

WM115, WM266-4, A375, SK-MEL28, SK-MEL2 and RPMI-7951 were purchased at ATCC; WM35, WM983A, WM983B, WM239A, WM3211 and Lu1205 at Coriell Institute and WM1346 at Wistar Institute. WM115, WM266-4, A375 and SK-MEL28 were cultured in DMEM/FBS 10% (v/v), SK-MEL2, 501mel and RPMI-7951 in RPMI-1640/FBS 10% (v/v), WM35, WM983A,

WM983B, WM3211, WM1346 and Lu1205 in MCDB153 medium with 20% Leibovitz L-15 medium (v/v), 2% FBS heat inactivated (v/v), 5 µg/mL insulin and 1.68 mM CaCl₂. Cell lines were authenticated for mutations in *BRAF* and *NRAS* by sequencing within the time frame of the experiments. PLX4032, SB590885, AZD6244, AS703026 and MK2206 were from Selleck Chemicals, Z-VAD-FMK and actinomycin D from Sigma-Aldrich, LY294002 from Calbiochem, G594 competitive inhibitor of AKT was provided by Genentech.

Transfection

RNA interference was achieved by transfecting siRNA with Oligofectamine™ in OptiMEM™ (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. After 6 h, transfection medium was replaced and inhibitors were added. siRNA sequences are reported in Table S7. pCMV6-AKT-myr plasmid, gifted by Pr. Franke (Columbia University) and pCMV6-CTRL were co-transfected with siRNA using Lipofectamine® 2000 in OptiMEM™.

Adenovirus transduction

Cells were first transfected with siRNA and then transduced overnight at M.O.I 25 with replication-defective (ΔE1, E3) adenoviral vectors expressing RHOB (Ad-RHOB) or control under the transcriptional control of the CMV promoter as previously described [51].

Cell proliferation assay

After transfection or transduction, cells were treated with inhibitors. 72 h later, the relative number of viable cells was measured by incubating cells with MTS reagent (CellTiter 96® Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay from Promega) as recommended by the manufacturer. Relative cell survival in the presence of inhibitors was normalized to the untreated cells after background corrections.

Western blot analysis

Cell extracts were analyzed by Western blotting with the following primary antibodies against RHOB, RHOA, BRAF, ERK1/2 (Santa Cruz Biotechnology); RHOC, p-ERK (T202/Y204), p-AKT (S473), AKT, PARP, Cleaved Caspase-3, Caspase-3, c-Jun, p-c-Jun (S63), p-p38 (T180/Y182), p38, pJNK (T183/Y185), JNK (Cell Signaling Technology) or actin (Chemicon). Detection was performed using peroxidase-conjugated secondary antibodies and chemi-luminescence detection kit (Clarity™ ECL, Biorad) on autoradiographs or with ChemiDoc™ MP Imaging System (Bio-Rad). Quantifications were done for

three independent experiments with ImageLab software (Bio-Rad) and normalized to actin.

Quantitative real-time reverse transcription-PCR

Total RNA was isolated by RNeasy® kit (Qiagen) and reverse-transcribed using iScript™ cDNA synthesis kit (Bio-Rad). Quantitative PCR was performed with a CFX96™ detection system (Bio-Rad) using iQ™ SYBR® Green Supermix (Bio-Rad) and normalized to actin or 28S. Primers sequences are detailed in Table S8.

Study of RHOB promoter activity

The previously described pGL3-RHOB plasmids containing different lengths of RHOB promoter sequence upstream of the firefly luciferase gene into pGL3 luciferase reporter vector [52] were co-transfected with pRL-CMV vector (Promega) as an internal control with Lipofectamine™ 2000 (Invitrogen). The iCCAAT of the shorter construct (-45) was mutated using QuickChange® Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene). The obtained constructs were sequenced to ensure successful mutagenesis. Firefly and renilla luciferase activities were measured with Dual-Luciferase Reporter Assay (Promega).

Apoptosis analysis

DNA fragmentation was detected by a modified TUNEL procedure using the ApopTag® Fluorescein *In Situ* Apoptosis Detection Kit (Millipore). Positive cells were counted by fluorescence microscopy. For subG1 analysis, DNA content was assessed by staining ethanol-fixed cells with propidium iodide and monitoring by FACSCalibur™ (BD Biosciences). The number of cells with subG1 DNA content was determined with the ModFit software.

Animal studies

1.2×10^6 WM266-4 cells were subcutaneously injected into the flank of 6 weeks female athymic mice (NMRI-NU, Janvier) and allowed to grow 10 days. Subsequently, animals received by oral gavage 50 mg/ kg/ bid of PLX4032 and/or 20 mg/kg/day G594 or vehicle. PLX4032, formulated as MBP, and G594 were provided by Genentech and prepared according to their advices. Tumor sizes were evaluated every 3 days by caliper measurement of two perpendicular diameters ($l < L$) and the tumor volumes were calculated with the following equation tumor volume = $l \times l \times L/2$. Animals were euthanized after 21 days of treatment, tumor were harvested and weighted. All animal procedures were performed in accordance with the animal care guidelines of the European Union and French laws and were

approved by the local Ethical Commission of the Institut Claudius Regaud.

Melanoma patient tumor samples and immunostaining

Tumor samples from 32 patients with metastatic BRAF^{V600E} melanoma (confirmed by genotyping) were obtained from the tumor bank of the department of pathology (Toulouse-Purpan Hospital, France) after written informed consent. Tumor samples consisted of 19 distant metastasis, 5 lymph nodes and 8 primary melanomas. Progression-free survival was retrospectively evaluated for each patient. Paraffin 4 μ m-thick sections of melanoma biopsies were incubated with RHOB antibody (Santa Cruz Biotechnology) and revealed using the DAKO-LSAB+ peroxidase kit and diaminobenzidine (DakoCytomation).

Statistical analysis

All results are presented as the mean \pm standard error of the mean (SEM) for at least three independent experiments. Statistical analyses of continuous variable were done using *t*-test and IC50 calculation and comparison were performed using GraphPad Prism, version 5.01 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). **P* < 0.05; ***P* < 0.01; ****P* < 0.001. Patient survival analysis were done using log-rank test of Kaplan-Meier survival curves. Hypotheses were two-sided, with an Alpha risk of 5%.

ACKNOWLEDGMENTS

This research was supported in part by Genentech, the “Institut National de la Recherche Medicale” INSERM, the “Fondation Recherche et Innovation Thérapeutique en Cancérologie”. We thank Bettina Couderc and Catherine Bouchenot for the generation of the adenovirus expressing RHOB. We also thank Magali Farella for *BRAF* and *NRAS* cell line sequencing, Stéphanie Cabantous for critically reading the manuscript and Lourdes Gasquet at the Claudius Regaud Institute animal facility.

REFERENCES

1. Davies H, Bignell GR, Cox C, Stephens P, Edkins S, Clegg S, Teague J, Woffendin H, Garnett MJ, Bottomley W, Davis N, Dicks E, Ewing R, Floyd Y, Gray K, Hall S, et al. Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature*. 2002; 417:949–954.
2. Tuveson DA, Weber BL, Herlyn M. BRAF as a potential therapeutic target in melanoma and other malignancies. *Cancer cell*. 2003; 4:95–98.
3. Chapman PB, Hauschild A, Robert C, Haanen JB, Ascierto P, Larkin J, Dummer R, Garbe C, Testori A, Maio M. Improved survival with vemurafenib in melanoma with BRAF V600E mutation. *New England Journal of Medicine*. 2011; 364:2507–2516.
4. Sosman JA, Kim KB, Schuchter L, Gonzalez R, Pavlick AC, Weber JS, McArthur GA, Hutson TE, Moschos SJ, Flaherty KT. Survival in BRAF V600-mutant advanced melanoma treated with vemurafenib. *New England Journal of Medicine*. 2012; 366:707–714.
5. Robert G, Jullian V, Jacquel A, Ginet C, Dufies M, Torino S, Pottier A, Peyrade F, Tartare-Deckert S, Bourdy G, Deharo E, Auberger P. Simalikalactone E (SkE), a new weapon in the armamentarium of drugs targeting cancers that exhibit constitutive activation of the ERK pathway. *Oncotarget*. 2012; 3:1688–1699.
6. Roos WP, Quiros S, Krumm A, Merz S, Switzeny OJ, Christmann M, Loquai C, Kaina B. B-Raf inhibitor vemurafenib in combination with temozolomide and fotemustine in the killing response of malignant melanoma cells. *Oncotarget*. 2014; 5:12607–12620.
7. Nazarian R, Shi H, Wang Q, Kong X, Koya RC, Lee H, Chen Z, Lee M-K, Attar N, Sazegar H, Chodon T, Nelson SF, McArthur G, Sosman JA, Ribas A, Lo RS. Melanomas acquire resistance to B-Raf(V600E) inhibition by RTK or N-RAS upregulation. *Nature*. 2010; 468:973–977.
8. Wagle N, Emery C, Berger MF, Davis MJ, Sawyer A, Pochanard P, Kehoe SM, Johannessen CM, MacConaill LE, Hahn WC, Meyerson M, Garraway LA. Dissecting Therapeutic Resistance to RAF Inhibition in Melanoma by Tumor Genomic Profiling. *Journal of Clinical Oncology*. 2011; 29:3085–3096.
9. Johannessen CM, Boehm JS, Kim SY, Thomas SR, Wardwell L, Johnson LA, Emery CM, Stransky N, Cogdill AP, Barretina J, Caponigro G, Hieronymus H, Murray RR, Salehi-Ashtiani K, Hill DE, Vidal M, et al. COT drives resistance to RAF inhibition through MAP kinase pathway reactivation. *Nature*. 2010; 468:968–972.
10. Sabbatino F, Wang Y, Wang X, Flaherty KT, Yu L, Pepin D, Scognamiglio G, Pepe S, Kirkwood JM, Cooper ZA, Frederick DT, Wargo JA, Ferrone S, Ferrone CR. PDGFR α up-regulation mediated by sonic hedgehog pathway activation leads to BRAF inhibitor resistance in melanoma cells with BRAF mutation. *Oncotarget*. 2014; 5:1926–1941.
11. Lito P, Pratilas Christine A, Joseph Eric W, Tadi M, Halilovic E, Zubrowski M, Huang A, Wong Wai L, Callahan Margaret K, Merghoub T, Wolchok Jedd D, de Stanchina E, Chandarlapaty S, Poulidakos Poulidakos I, Fagin James A, Rosen N. Relief of Profound Feedback Inhibition of Mitogenic Signaling by RAF Inhibitors Attenuates Their Activity in BRAFV600E Melanomas. *Cancer Cell*. 2012; 22:668–682.

12. Yadav V, Zhang X, Liu J, Estrem S, Li S, Gong X-Q, Buchanan S, Henry JR, Starling JJ, Peng S-B. Reactivation of mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway by FGF receptor 3(FGFR3)/Ras mediates resistance to vemurafenib in human B-RAF V600E mutant melanoma. *The Journal of biological chemistry*. 2012; 287:28087–28098.
13. Sun C, Wang L, Huang S, Heynen GJJE, Prahallad A, Robert C, Haanen J, Blank C, Wesseling J, Willems SM, Zecchin D, Hobor S, Bajpe PK, Liefink C, Mateus C, Vagner S, et al. Reversible and adaptive resistance to BRAF(V600E) inhibition in melanoma. *Nature*. 2014; 508:118–122.
14. Packer LM, East P, Reis-Filho JS, Marais R. Identification of direct transcriptional targets of (V600E)BRAF/MEK signalling in melanoma. *Pigment cell & melanoma research*. 2009; 22:785–798.
15. Basile KJ, Abel EV, Aplin AE. Adaptive upregulation of FOXD3 and resistance to PLX4032/4720-induced cell death in mutant B-RAF melanoma cells. *Oncogene*. 2011; 31:2471–2479.
16. Basile KJ, Aplin AE. Downregulation of Noxa by RAF/MEK inhibition counteracts cell death response in mutant B-RAF melanoma cells. *American journal of cancer research*. 2012; 2:726–735.
17. Karlsson R, Pedersen ED, Wang Z, Brakebusch C. Rho GTPase function in tumorigenesis. *Biochim Biophys Acta*. 2009; 1796:91–98.
18. Fang WB, Jokar I, Zou A, Lambert D, Dendukuri P, Cheng N. CCL2/CCR2 chemokine signaling coordinates survival and motility of breast cancer cells through Smad3 protein- and p42/44 mitogen-activated protein kinase (MAPK)-dependent mechanisms. *The Journal of biological chemistry*. 2012; 287:36593–36608.
19. Makrodouli E, Oikonomou E, Koc M, Andera L, Sasazuki T, Shirasawa S, Pintzas A. BRAF and RAS oncogenes regulate Rho GTPase pathways to mediate migration and invasion properties in human colon cancer cells: a comparative study. *Molecular Cancer*. 2011; 10:118.
20. Ho H, Aruri J, Kapadia R, Mehr H, White MA, Ganesan AK. RhoJ Regulates Melanoma Chemoresistance by Suppressing Pathways That Sense DNA Damage. *Cancer Research*. 2012; 72:5516–5528.
21. Zhao Y, Wang Z, Jiang Y, Yang C. Inactivation of Rac1 reduces Trastuzumab resistance in PTEN deficient and insulin-like growth factor I receptor overexpressing human breast cancer SKBR3 cells. *Cancer Letters*. 2011; 313:54–63.
22. Li K, Lu Y, Liang J, Luo G, Ren G, Wang X, Fan D. RhoE enhances multidrug resistance of gastric cancer cells by suppressing Bax. *Biochemical and biophysical research communications*. 2009; 379:212–216.
23. Klein RM, Spofford LS, Abel EV, Ortiz A, Aplin AE. B-RAF regulation of Rnd3 participates in actin cytoskeletal and focal adhesion organization. *Molecular biology of the cell*. 2008; 19:498–508.
24. Fritz G, Kaina B. Ras-related GTPase RhoB forces alkylation-induced apoptotic cell death. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2000; 268:784–789.
25. Jiang K, Delarue FL, Sebti SM. EGFR, ErbB2 and Ras but not Src suppress RhoB expression while ectopic expression of RhoB antagonizes oncogene-mediated transformation. *Oncogene*. 2004; 23:1136–1145.
26. Mazieres J, Tillement V, Allal C, Clanet C, Bobin L, Chen Z, Sebti SM, Favre G, Pradines A. Geranylgeranylated, but not farnesylated, RhoB suppresses Ras transformation of NIH-3T3 cells. *Experimental Cell Research*. 2005; 304:354–364.
27. Vishnu P, Colon-Otero G, Kennedy GT, Marlow LA, Kennedy WP, Wu KJ, Santoso JT, Copland JA. RhoB mediates antitumor synergy of combined ixabepilone and sunitinib in human ovarian serous cancer. *Gynecologic Oncology*. 2012; 124:589–597.
28. Canguilhem B, Pradines A, Baudouin C, Boby C, Lajoie-Mazenc I, Charveron M, Favre G. RhoB protects human keratinocytes from UVB-induced apoptosis through epidermal growth factor receptor signaling. *The Journal of Biological Chemistry*. 2005; 280:43257–43263.
29. Westmark CJ, Bartleson VB, Malter JS. RhoB mRNA is stabilized by HuR after UV light. *Oncogene*. 2004; 24:502–511.
30. Mamouni K, Cristini A, Guirouilh-Barbat J, Monferran S, Lemarie A, Faye JC, Lopez BS, Favre G, Sordet O. RhoB Promotes gammaH2AX Dephosphorylation and DNA Double-Strand Break Repair. *Molecular and Cellular Biology*. 2014; 34:3144–3155.
31. Kim B-K, Kim HM, Chung K-S, Kim D-M, Park S-K, Song A, Won K-J, Lee K, Oh Y-K, Lee K, Song K-B, Simon JA, Han G, Won M. Upregulation of RhoB via c-Jun N-terminal kinase signaling induces apoptosis of the human gastric carcinoma NUGC-3 cells treated with NSC12618. *Carcinogenesis*. 2011; 32:254–261.
32. Ahn J, Choi J-H, Won M, Kang C-M, Gyun M-R, Park H-M The activation of p38 MAPK primarily contributes to UV-induced RhoB expression by recruiting the c-Jun and p300 to the distal CCAAT box of the RhoB promoter. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2011; 409:211–216.
33. Kim CH, Won M, Choi CH, Ahn J, Kim BK, Song KB, Kang CM, Chung KS. Increase of RhoB in gamma-radiation-induced apoptosis is regulated by c-Jun N-terminal kinase in Jurkat T cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2010; 391:1182–1186.

34. Kim DM, Won M, Chung CS, Kim S, Yim HJ, Jung SH, Jeong S. JNK-mediated transcriptional upregulation of RhoB is critical for apoptosis of HCT-116 colon cancer cells by a novel diarylsulfonylurea derivative. *Apoptosis*. 2010; 15:1540–1548.
35. Meyer N, Peyret-Lacombe A, Canguilhem B, Medale-Giamarchi C, Mamouni K, Cristini A, Monferran S, Lamant L, Filleron T, Pradines A, Sordet O, Favre G. RhoB promotes cancer initiation by protecting keratinocytes from UVB-induced apoptosis but limits tumor aggressiveness. *Journal of Investigative Dermatology*. 2014; 134:203–212.
36. Kazerounian S, Gerald D, Huang M, Chin YR, Udayakumar D, Zheng N, O'Donnell RK, Perruzzi C, Mangiante L, Pourat J, Phung TL, Bravo-Nuevo A, Shechter S, McNamara S, DuHadaway JB, Kocher ON, et al. RhoB Differentially Controls Akt Function in Tumor Cells and Stromal Endothelial Cells during Breast Tumorigenesis. *Cancer Research*. 2012; 73:50–61.
37. Skuli N, Monferran S, Delmas C, Lajoie-Mazenc I, Favre G, Toulas C, Cohen-Jonathan-Moyal E. Activation of RhoB by hypoxia controls hypoxia-inducible factor-1 α stabilization through glycogen synthase kinase-3 in U87 glioblastoma cells. *Cancer Research*. 2006; 66:482–489.
38. Chen B, Tardell C, Higgins B, Packman K, Boylan JF, Niu H. BRAFV600E Negatively Regulates the AKT Pathway in Melanoma Cell Lines. *PLoS ONE*. 2012; 7:e42598.
39. Ho H, Soto Hopkin A, Kapadia R, Vasudeva P, Schilling J, Ganesan AK. RhoJ modulates melanoma invasion by altering actin cytoskeletal dynamics. *Pigment Cell & Melanoma Research*. 2013; 26:218–225.
40. Matos P, Oliveira C, Velho S, Gonçalves V, da Costa LT, Moyer MP, Seruca R, Jordan P. B-Raf(V600E) cooperates with alternative spliced Rac1b to sustain colorectal cancer cell survival. *Gastroenterology*. 2008; 135:899–906.
41. Li Y-D, Liu Y-P, Cao D-M, Yan Y-M, Hou Y-N, Zhao J-Y, Yang R, Xia Z-F, Lu J. Induction of small G protein RhoB by non-genotoxic stress inhibits apoptosis and activates NF- κ B. *Journal of Cellular Physiology*. 2011; 226:729–738.
42. Liu AX, Rane N, Liu JP, Prendergast GC. RhoB is dispensable for mouse development, but it modifies susceptibility to tumor formation as well as cell adhesion and growth factor signaling in transformed cells. *Molecular and Cellular Biology*. 2001; 21:6906–6912.
43. Mazieres J, Antonia T, Daste G, Muro-Cacho C, Berchery D, Tillement V, Pradines A, Sebti S, Favre G. Loss of RhoB expression in human lung cancer progression. *Clinical cancer research*. 2004; 10:2742–2750.
44. Bousquet E, Mazieres J, Privat M, Rizzati V, Casanova A, Ledoux A, Mery E, Couderc B, Favre G, Pradines A. Loss of RhoB expression promotes migration and invasion of human bronchial cells via activation of AKT1. *Cancer Research*. 2009; 69:6092–6099.
45. Calvayrac O, Pradines A, Raymond-Letron I, Rouquette I, Bousquet E, Lauwers-Cances V, Filleron T, Cadranel J, Beau-Faller M, Casanova A, Milia J, Favre G, Mazieres J. RhoB determines tumor aggressiveness in a murine EGFR858R-induced adenocarcinoma model and is a potential prognostic biomarker for lepidic lung cancer. *Clinical Cancer Research*. 2014; 20:6541–50.
46. Jiang K, Sun J, Cheng J, Djeu JY, Wei S, Sebti S. Akt mediates Ras downregulation of RhoB, a suppressor of transformation, invasion, and metastasis. *Molecular and Cellular Biology*. 2004; 24:5565–5576.
47. Fritz G. rhoB Encoding a UV-inducible Ras-related Small GTP-binding Protein Is Regulated by GTPases of the Rho Family and Independent of JNK, ERK, and p38 MAP Kinase. *Journal of Biological Chemistry*. 1997; 272:30637–30644.
48. Adini I, Rabinovitz I, Sun JF, Prendergast GC, Benjamin LE. RhoB controls Akt trafficking and stage-specific survival of endothelial cells during vascular development. *Genes & Development*. 2003; 17:2721–2732.
49. Fritz G, Kaina B. Transcriptional activation of the small GTPase gene rhoB by genotoxic stress is regulated via a CCAAT element. *Nucleic acids research*. 2001; 29:792–798.
50. Paraiso KHT, Xiang Y, Rebecca VW, Abel EV, Chen YA, Munko AC, Wood E, Fedorenko IV, Sondak VK, Anderson ARA, Ribas A, Palma MD, Nathanson KL, Koomen JM, Messina JL, Smalley KSM. PTEN Loss Confers BRAF Inhibitor Resistance to Melanoma Cells through the Suppression of BIM Expression. *Cancer Research*. 2011; 71:2750–2760.
51. Couderc B, Pradines A, Rafii A, Golzio M, Deviers A, Allal C, Berg D, Penary M, Teissie J, Favre G. *In vivo* restoration of RhoB expression leads to ovarian tumor regression. *Cancer Gene Therapy*. 2008; 15:456–464.
52. Tovar D, Faye JC, Favre G. Cloning of the human RHOB gene promoter: characterization of a VNTR sequence that affects transcriptional activity. *Genomics*. 2003; 81:525–530.

PCT REQUEST

Print Out (Original in Electronic Form)

0	For receiving Office use only	
0-1	International Application No.	
0-2	International Filing Date	
0-3	Name of receiving Office and "PCT International Application"	
0-4	Form PCT/RO/101 PCT Request	
0-4-1	Prepared Using	CMS Online Filing Version CMS 1.14 MT/FOP 20020701/0.20.5.20
0-5	Petition The undersigned requests that the present international application be processed according to the Patent Cooperation Treaty	
0-6	Receiving Office (specified by the applicant)	European Patent Office (EPO) (RO/EP)
0-7	Applicant's or agent's file reference	FAVRE17032MC
I	Title of Invention	METHODS AND PHARMACEUTICAL COMPOSITIONS FOR THE TREATMENT OF CANCERS ASSOCIATED WITH ACTIVATION OF THE MAPK PATHWAY
II	Applicant	
II-1	This person is	Applicant only
II-2	Applicant for	All designated States
II-4	Name	INSERM (INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET DE LA RECHERCHE MÉDICALE)
II-5	Address	101, rue de Tolbiac 75013 Paris France
II-6	State of nationality	FR
II-7	State of residence	FR
III-1	Applicant and/or inventor	
III-1-1	This person is	Applicant only
III-1-2	Applicant for	All designated States
III-1-4	Name	UNIVERSITÉ PAUL SABATIER TOULOUSE III
III-1-5	Address	118 route de Narbonne, 31400 Toulouse France
III-1-6	State of nationality	FR
III-1-7	State of residence	FR

PCT REQUEST

Print Out (Original in Electronic Form)

III-2	Applicant and/or inventor	
III-2-1	This person is	Applicant only
III-2-2	Applicant for	All designated States
III-2-4	Name	CENTRE HOSPITALIER UNIVERSITAIRE DE TOULOUSE
III-2-5	Address	2, rue Viguerie Hôtel-Dieu Pont Neuf 31300 TOULOUSE France
III-2-6	State of nationality	FR
III-2-7	State of residence	FR
III-3	Applicant and/or inventor	
III-3-1	This person is	Inventor only
III-3-3	Inventor for	
III-3-4	Name (LAST, First)	FAVRE, Gilles
III-3-5	Address	INSERM - U1037 - CRCT, 2 avenue Hubert Curien, 31037 Toulouse France
III-4	Applicant and/or inventor	
III-4-1	This person is	Inventor only
III-4-3	Inventor for	
III-4-4	Name (LAST, First)	POHORECKA, Magdalena
III-4-5	Address	CRCT 2 AVENUE HUBERT CURIEN - CS 53717 France 31037 Toulouse France
IV-1	Agent or common representative; or address for correspondence	
	The person identified below is hereby/ has been appointed to act on behalf of the applicant(s) before the competent International Authorities as:	Agent
IV-1-1	Name (LAST, First)	COLLIN, Matthieu
IV-1-2	Address	Inserm Transfert 7 rue Watt 75013 PARIS France
IV-1-3	Telephone No.	0155030113
IV-1-4	Facsimile No.	0155030160
IV-1-5	e-mail	patents@inserm-transfert.fr
IV-1-5(a))	E-mail authorization The receiving Office, the International Searching Authority, the International Bureau and the International Preliminary Examining Authority are authorized to use this e-mail address, if the Office or Authority so wishes, to send notifications issued in respect of this international application:	exclusively in electronic form (no paper notifications will be sent)

PCT REQUEST

Print Out (Original in Electronic Form)

V	DESIGNATIONS	
V-1	The filing of this request constitutes under Rule 4.9(a), the designation of all Contracting States bound by the PCT on the international filing date, for the grant of every kind of protection available and, where applicable, for the grant of both regional and national patents.	
VI-1	Priority claim of earlier regional application	
VI-1-1	Filing date	10 February 2017 (10.02.2017)
VI-1-2	Number	17305153.3
VI-1-3	Regional Office	EP
VI-2	Priority document request The receiving Office is requested to prepare and transmit to the International Bureau a certified copy of the earlier application(s) identified above as item(s):	VI-1
VI-3	Incorporation by reference : where an element of the international application referred to in Article 11(1)(iii)(d) or (e) or a part of the description, claims or drawings referred to in Rule 20.5(a) is not otherwise contained in this international application but is completely contained in an earlier application whose priority is claimed on the date on which one or more elements referred to in Article 11(1)(iii) were first received by the receiving Office, that element or part is, subject to confirmation under Rule 20.6, incorporated by reference in this international application for the purposes of Rule 20.6.	
VII-1	International Searching Authority Chosen	European Patent Office (EPO) (ISA/EP)
VII-2	Request to use results of earlier search; reference to that search	
VII-2-1	Filing date	10 February 2017 (10.02.2017)
VII-2-2	Application Number	17305153.3
VII-2-3	Country (or regional Office)	EP
VII-2-5	Documents are available to the ISA in a form and manner acceptable to it and therefore do not need to be submitted by the applicant to the ISA (Rule 12bis.1(f)):	A copy of the results of the earlier search A copy of the earlier application A copy of any document cited in the results of the earlier search

PCT REQUEST

Print Out (Original in Electronic Form)

VIII	Declarations	Number of declarations	
VIII-1	Declaration as to the identity of the inventor	-	
VIII-2	Declaration as to the applicant's entitlement, as at the international filing date, to apply for and be granted a patent	-	
VIII-3	Declaration as to the applicant's entitlement, as at the international filing date, to claim the priority of the earlier application	-	
VIII-4	Declaration of inventorship (only for the purposes of the designation of the United States of America)	-	
VIII-5	Declaration as to non-prejudicial disclosures or exceptions to lack of novelty	-	
IX	Check list	Number of sheets	Electronic file(s) attached
IX-1	Request (including declaration sheets)	5	✓
IX-2	Description	32	✓
IX-3	Claims	2	✓
IX-4	Abstract	1	✓
IX-5	Drawings	8	✓
IX-6a	Sequence listing part of the description (also to be used for the purposes of international search)	-	✓
IX-7	TOTAL	48	
	Accompanying Items	Paper document(s) attached	Electronic file(s) attached
IX-8	Fee calculation sheet	-	✓
IX-20	Figure of the drawings which should accompany the abstract	NONE	
IX-21	Language of filing of the international application	English	
X-1	Signature of applicant, agent or common representative		
X-1-1	Name (LAST, First)		
X-1-3	Capacity (if such capacity is not obvious from reading the request)		

PCT REQUEST

Print Out (Original in Electronic Form)

FOR RECEIVING OFFICE USE ONLY

10-1	Date of actual receipt of the purported international application	
10-2	Drawings:	
10-2-1	Received	
10-2-2	Not received	
10-3	Corrected date of actual receipt due to later but timely received papers or drawings completing the purported international application	
10-4	Date of timely receipt of the required corrections under PCT Article 11(2)	
10-5	International Searching Authority	ISA/EP
10-6	Transmittal of search copy delayed until search fee is paid	

FOR INTERNATIONAL BUREAU USE ONLY

11-1	Date of receipt of the record copy by the International Bureau	
------	--	--

**METHODS AND PHARMACEUTICAL COMPOSITIONS FOR THE
TREATMENT OF CANCERS ASSOCIATED WITH ACTIVATION OF THE MAPK
PATHWAY**

5 **FIELD OF THE INVENTION:**

The present invention relates to methods and pharmaceutical compositions for the treatment of cancers associated with activation of the MAPK pathway.

BACKGROUND OF THE INVENTION:

10 The MAPK (mitogen-activated protein kinase) pathway has been shown to play a key role in a number of normal physiological processes such as cellular metabolism, cell cycle progression, cell death, and neurological function. The MAPK pathway is constitutively activated in a significant proportion of human tumors often through gain-of-function mutations in RAS or RAF gene family members. For instance, mutations in the MAPK pathway have been shown to be very important in melanoma development in that up to 90% of melanomas and benign melanocytic neoplasms carry activating mutations in B-RAF, K-RAS, or N-RAS. 15 Activating mutations in BRAF indeed occur in 7-8% of all solid tumors and in 60% of malignant melanomas, 8-15% of colorectal cancer and 3% of cases of pancreatic carcinoma and 2% of lung cancers. Melanoma is the most aggressive skin cancer. It often induces metastasis and its incidence is rapidly growing and continues to rise alarmingly. Surgery is curative in 20 nearly all cases before metastatic stage, but when metastasis appears, surgery, radiotherapy and conventional chemotherapy have little curative effects and subject survival is usually short. Therefore several promising new therapies have been developed essentially based on targeted chemotherapy using MAPK inhibitors and in particular specific anti-BRAFV600 inhibitors (e.g. Vemurafenib (PLX4032) and Dabrafenib). Preclinical studies indicate that Vemurafenib and 25 Dabrafenib block the mutated BRAF protein, inducing cell growth arrest and cell death in a low proportion of tumors carrying this mutation. Clinical trials of Vemurafenib and Dabrafenib have shown therapeutic effect in more than 50% of subjects with BRAFV600E positive metastatic melanomas. More recently, it has been shown that the combination of BRAF inhibitor and MEK inhibitor improved tumor response and induced an increase overall survival of the BRAF 30 mutated subject leading to propose this combination as the first line therapy in such subjects. However, unfortunately, in most subject's melanoma cells outbreak and progress again once resistance to MAPK inhibitors is acquired. Therefore, identification and characterization of unknown pathways mediating resistance to those inhibitors are essential for the rational design

of targeted strategies to prevent and overcome said resistance across this entire population of subjects.

SUMMARY OF THE INVENTION:

5 The present invention relates to methods and pharmaceutical compositions for the treatment of cancers associated with activation of the MAPK pathway. In particular, the present invention is defined by the claims.

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION:

10 The response to MAPK inhibitors is dramatically impaired by secondary resistances and rapid relapse. So far, the molecular mechanisms driving these resistances are not completely understood. The inventors have shown that in BRAF-mutant melanoma cells, inhibition of BRAF or its target MEK induces RHOB expression by a mechanism that depends on the transcription factor c-Jun (Oncotarget. 2015 Jun 20;6(17):15250-64). More particularly their findings reveal that BRAF inhibition activates a c-Jun/RHOB/AKT pathway that promotes tumor cell survival and further support a role of this pathway in the resistance of melanoma to
15 MAPK inhibitors. Now the inventors show that activation of c-Jun induces the expression of SLITRK6 (SLIT and NTRK-like family, member 6). In particular, the inventors demonstrate that SLITRK6 is induced by a MAPK inhibitor (e.g. Vemurafenib) and the inhibition of its induction leads to apoptotic cell death as in the A375 line. Thus, the only inhibition of SLITRK6 by an inhibitor of activity or expression should potentiate the antitumor effect of MAPK
20 inhibitors and avoid the emergence of a resistance to those compounds. Furthermore the specific expression of SLITRK6 also paves the way of strategies based on depletion of the residual cancer cells by targeting them with anti-SLITRK6 antibodies capable of mediating ADCC or antibody-drug conjugates binding to SLITRK6.

25 Accordingly, the first object of the present invention relates to a method of treating a cancer associated with activation of the MAPK pathway in a subject in need thereof comprising administering to the subject a therapeutically effective combination comprising at least one MAPK inhibitor and an agent capable of inducing cell death of SLITRK6 expressing cancer cells.

30 A further object of the present invention relates to a method of treating a cancer resistant to MAPK inhibitors in a subject in need thereof comprising administering to the subject a therapeutically effective amount of an agent capable of inducing cell death of SLITRK6 expressing cancer cells.

A further object of the present invention relates to a method for enhancing the potency of a MAPK inhibitor administered to a subject suffering from a cancer as part of a treatment

regimen, the method comprising administering to the subject a pharmaceutically effective amount of an agent capable of inducing cell death of SLITRK6 expressing cancer cells in combination with at least one MAPK inhibitor.

5 A further object of the present invention relates to a method of preventing resistance to an administered MAPK inhibitor in a subject suffering from a cancer comprising administering to the subject a therapeutically effective amount of an agent capable of inducing cell death of SLITRK6 expressing cancer cells.

10 As used herein, the expression “MAPK pathway” also known as the “RAS-RAF-MEK-ERK pathway” has its general meaning in the art and refers to chain of proteins in the cell that communicates a signal from a receptor on the surface of the cell to the DNA in the nucleus of the cell. The signal starts when a signalling molecule binds to the receptor on the cell surface and ends when the DNA in the nucleus expresses a protein and produces some change in the cell, such as cell division.

15 In some embodiments, the subject suffers from a cancer showing an increased activation of the MAPK pathway (i.e. “cancer associated with activation of the MAPK pathway”). As used herein, increased expression or activity is understood as an expression level or activity level which is at least 10%, at least 20%, at least 30%, at least 40%, at least 50%, at least 100%, at least 200%, at least 300% or more with respect to a reference expression level or to a reference activity level. Methods for determining whether the expression level of a given
20 component of the MAPK pathway is increased are well-known in the art and include methods based on the determination of the mRNA levels of the corresponding component (e.g., Northern blot, RT-PCR and the like) and methods based on the determination of the protein levels of the corresponding component (e.g., ELISA, Western blot, etc.). Methods for determining whether the activity of one or more components of the MAPK pathway is increased are based on the
25 determination of the activity of the different components and are widely known to the skilled person. Suitable methods for determining the activity of the MAPK pathway include, for instance, the detection of phosphorylated ERK (MAPK) protein as well as the ratio of phosphoERK to ERK.

30 In some embodiments, the subject suffers from a cancer characterized by the presence of at least one mutation in a protein involved in the MAPK pathway. Typically, the cancer is characterized by at least one mutation in a tyrosine kinase receptor (e.g. FGFR1, FGFR2, FGFR3, EGFR, HER2, IGF-1R cMET ...), BRAF, RAS, CRAF, CCND1, CDK4, MAP2K1, MAP2K2, NRAS, KRAS HRAS, PTEN, PIK3CA, and P16. In some embodiments, the subject suffers from a RAS-mutated cancer. As used herein, the term “RAS” represents any member of

the RAS family of proteins or mutants thereof. Ras family proteins include, but are not limited to, HRAS, KRAS and NRAS, as well as other members of this subfamily as well: DIRAS1; DIRAS2; DIRAS3; ERAS; GEM; MRAS; NKIRAS1; NKIRAS2; NRAS; RALA; RALB; RAPIA; RAP1B; RAP2A; RAP2B; RAP2C; RASD1; RASD2; RASL10A; RASL10B; 5 RASL11A; RASL11B; RASL12; REM1; REM2; RERG; RERGL; RRAD; RRAS; RRAS2 (Wennerberg et al., The Ras superfamily at a glance, J. Cell. Sci., 2005, 118 (Pt 5), 843-846). Accordingly, the expression "mutated-RAS cancer" refers to a cancer in which the cancer cells comprise an activating mutation in a Ras protein. In particular, the subject suffers from a NRAS-mutated cancer. A number of mutations in NRAS are known and typically include Q61R, 10 Q61K, Q61H, Q61L, Q61N, Q61E, Q61P, A146T, A146P, or A146V. In some embodiments, the subject suffers from a RAF-mutated cancer. As used herein, the term "RAF" represents any member of the Raf family of proteins or mutants thereof. RAF family proteins include, but are not limited to A-RAF, B-RAF and C-RAF. Accordingly, the expression "mutated-RAF cancer" refers to a cancer in which the cancer cells comprise an activating mutation in a Raf protein. In 15 particular, the subject suffers from a BRAF-mutated cancer. A number of mutations in BRAF are known. In particular, the V600E mutation is prominent. Other mutations which have been found are R461I, I462S, G463E, G463V, G465A, G465E, G465V, G468A, G468E, N580S, E585K, D593V, F594L, G595R, L596V, T598I, V599D, V599E, V599K, V599R, V600E, A727V, and most of these mutations are clustered to two regions: the glycine-rich P loop of the 20 N lobe and the activation segment and flanking regions. As is known in the art, several PCR and/or sequencing based methods are known for use in detecting mutations in the MAPK pathway and are presented in several research articles and US patents including, but not limited to, Brose, et al. Cancer Research 62:6997-7000 (2002), Solit et al, Cancer Research 70(14): 5901-5911 (1010), Xu, et al. Cancer research 63:4561-4567 (2003), as well as U.S. Pat. No. 25 7,745,128, and several commercially available kits (see Dxs Diagnostic Innovations, Applied Biosystems, and Quest diagnostics).

In some embodiments, the subject suffers from a cancer selected from the group consisting of melanoma, multiple myeloma, lung cancer, colorectal cancer, thyroid carcinoma, blood cancer, leukemia, and lymphoma. In particular, the subject suffers from melanoma, in 30 particular metastatic melanoma. As used herein, "melanoma" refers to a condition characterized by the growth of a tumor arising from the melanocytic system of the skin and other organs. Most melanocytes occur in the skin, but are also found in the meninges, digestive tract, lymph nodes and eyes. When melanoma occurs in the skin, it is referred to as cutaneous melanoma. Melanoma can also occur in the eyes and is called ocular or intraocular melanoma. Melanoma

occurs rarely in the meninges, the digestive tract, lymph nodes or other areas where melanocytes are found. 40-60 % of melanomas carry an activating mutation BRAF.

As used herein, the term "MAPK inhibitor" refers to any compound that is currently known in the art or that will be identified in the future, and includes any chemical entity that, upon administration to a subject, results in inhibition the MAPK pathway in the cancer cells of the subject. MAPK inhibitors include but are not limited to low molecular weight inhibitors, antibodies or antibody fragments, antisense constructs, small inhibitory RNAs (i.e. RNA interference by dsRNA; RNAi), and ribozymes. In some embodiments, the MAPK inhibitor is a small organic molecule. MAPK inhibitors include, for example, RAS inhibitors, RAF inhibitors, or MEK inhibitors.

A MEK inhibitor is a compound that shows MEK inhibition when tested in the assays titled, "Enzyme Assays" in U.S. Pat. No. 5,525,625, column 6, beginning at line 35. The complete disclosure of U.S. Pat. No. 5,525,625 is hereby incorporated by reference. Specifically, a compound is an MEK inhibitor if a compound shows activity in the assay titled, "Cascade Assay for Inhibitors of the MAP Kinase Pathway," column 6, line 36 to column 7, line 4 of the U.S. Pat. No. 5,525,625 and/or shows activity in the assay titled, "In Vitro MEK Assay" at column 7, lines 4 to 27 of the above-referenced patent. Alternatively, MEK inhibition can be measured in the assay described in WO 02/06213 A1, the complete disclosure of which is hereby incorporated by reference. MEK inhibitors include, for example, ARRY-142886 (also known as AZD6244; Array BioPharma/Astrazeneca), PD-184352 (also known as CI-1040; Pfizer), XL518 (Exelixis), PD0325901 (Pfizer), PD-98059 (Pfizer), MEK1 (EMD), or 2-(2-amino-3-methoxyphenyl)-4-oxo-4H-[1]benzopyran and 2-(2-chloro-4-iodo-phenylamino)-N-cyclopropylmethoxy-3,4-difluoro- benzamide. Specific preferred examples of MEK inhibitors that can be used according to the present invention include ARRY-142886, PD-184352, PD-98059, PD-0325901, XL518, or MEK1.

RAS inhibitors include, for example, BMS-214662 (Bristol-Myers Squibb), SCH 66336 (also known as lonafarnib; Schering-Plough), L-778,123 (Merck), R115777 (also known as Zarnestra or Tipifamib; Johnson and Johnson), and 6-[(4-chloro-phenyl)-hydroxy-(3-methyl-3H-imidazol-4-yl)-methyl]-4-(3-ethynyl-phenyl)-1-methyl-1H-quinolin-2-one (OSIPharmaceuticals, Inc.). Ras inhibitors disclosed in U.S. Pat. Nos. 6,150,377 and 6,645,982 are included. The complete disclosures of U.S. Pat. Nos. 6,150,377 and 6,645,982 are incorporated by reference.

Suitable RAF inhibitor and in particular BRAF inhibitors may include, but are not limited to, 1,2-di-cyclyl substituted alkyne compounds or derivatives; 1-methyl-5-(2-(5-

(trifluoromethyl)-1 H- imidazol-2-yl)pyridin-4-yloxy)-N-(4-(trifluoromethyl)phenyl)-1 H- benzo[d]imidazol-2- amine); 2,6-disubstituted quinazoline, quinoxaline, quinoline, and isoquinoline compounds or derivatives; 4-amino-5-oxo-8-phenyl-5H-pyrido-[2,3-D]-pyrimidine compounds or derivatives; 4- amino-thieno[3,2-C]pyridine-7-carboxylic acid
5 compounds or derivatives; 5-(4-aminophenyl)-isoquinoline compounds or derivatives; benzene sulfonamide thiazole compounds or derivatives; benzimidazole compounds or derivatives; bicyclic compounds or derivatives; bridged, bicyclic heterocyclic or spiro bicyclic heterocyclic derivatives of pyrazolo[1 ,5-a]pyrimidine compounds or derivatives; cinnamide and hydro-
10 cinnamide compounds or derivatives; di-substituted imidazole compounds or derivatives; fused tricyclic pyrazolo[1 ,5-a]pyrimidine compounds or derivatives; heteroaryl compounds or derivatives; heterocyclic compounds or derivatives; 1 H-benzo [D] imidazole compounds or derivatives; imidazo [4,5-B] pyridine compounds or derivatives; N-(6-aminopyridin-3-yl)-3-(sulfonamido) benzamide compounds or derivatives; N-[3-(1 -amino-5,6,7,8-tetrahydro-
15 2,4,4B-triazafluoren-9-yl)- phenyl] benzamide compounds or derivatives; nitrogen-containing bicyclic heteroaryl compounds or derivatives; N-oxides of heterocyclic substituted bisarylurea compounds or derivatives; omega-carboxylaryl substituted diphenyl urea compounds or derivatives; oxazole compounds or derivatives; phenethylamide compounds or derivatives; phenylsulfonamide-substituted, pyrazolo[1 , 5-a]pyrimidine compounds or derivatives; phenyltriazole compounds or derivatives; heterocyclic compounds or derivatives; 1 h-
20 pyrazolo[3,4-b] pyridine compounds or derivatives; purine compounds or derivatives; pyrazole [3,4-B] pyridine compounds or derivatives; pyrazole compounds or derivatives; pyrazoline compounds or derivatives; pyrazolo [3,4-b] pyridines, pyrrolo [2, 3-b] pyridine compounds or derivatives; pyrazolo [3,4-d]pyrimidine compounds or derivatives; pyrazolo [5,1 -c] [1 ,2,4] triazine compounds or derivatives; pyrazolyl compounds or derivatives; pyrimidine compounds
25 or derivatives; pyrrol compounds or derivatives; pyrrolo [2,3-B] pyridine compounds or derivatives; substituted 6-phenyl-pyrido [2, 3-D] pyrimidin-7-ones compounds or derivatives; substituted benzazole compounds or derivatives; substituted benzimidazole compounds or derivatives; substituted bisaryl- urea compounds or derivatives; thienopyridine compounds or derivatives; thienopyrimidine, thienopyridine, or pyrrolopyrimidine compounds or derivatives;
30 thiophene amide compounds or derivatives, and any other suitable aryl and/or heteroaryl compounds or derivatives. Several patents and patent applications disclose exemplar BRAF inhibitors that may be used in accordance with the embodiments described herein including, but not limited to, International Patent Application Publication Nos WO2011117381 , WO2011119894, WO2011117381 , WO2011097594, WO2011097526, WO2011085269,

WO2011090738, WO2011025968, WO2011025927, WO2011023773, WO2011028540,
 WO2010111527, WO2010104973, WO2010100127, WO2010078408, WO2010065893,
 WO2010032986, WO2009115572, WO2009108838, WO2009111277, WO2009111278,
 WO2009111279, WO2009111280, WO2009108827, WO2009111260, WO2009100536,
 5 WO2009059272, WO2009039387, WO2009021869, WO2009006404, WO2009006389,
 WO2008140850, WO2008079277, WO2008055842, WO2008034008, WO2008115263,
 WO2008030448, WO2008028141 , WO2007123892, WO2007115670, WO2007090141 ,
 WO2007076092, WO2007067444, WO2007056625, WO2007031428, WO2007027855,
 WO2007002433, WO2007002325, WO2006125101 , WO2006124874, WO2006124780,
 10 WO2006102079, WO2006108482, WO2006105844, WO2006084015, WO2006076706,
 WO2006050800, WO2006040569, WO2005112932, WO2005075425, WO2005049603,
 WO2005037285, WO2005037273, WO2005032548; and US Patent Nos. US8642759,
 US8557830, US8504758, US7863288, US7491829, US7482367, and US7235576; the
 specifications of all of which are hereby incorporated by reference as if fully set forth herein.

15 In some embodiments, the BRAF inhibitor is selected from a group of molecules selected from
 AMG542, ARQ197, ARQ736, AZ628, CEP-32496, GDC-0879, GSK1 120212, GSK21 18436
 (dabrafenib, Tafinlar®), LGX818 (encorafenib), NMS-P186, NMS-P349, NMS-P383, NMS-
 P396, NMS-P730, PLX3603 (RO5212054), PLX4032 (vemurafenib, Zelboraf®), PLX4720
 (Difluorophenyl-sulfonamide), PF- 04880594, PLX4734, RAF265 (CHIR-265), R04987655,
 20 SB590885, sorafenib, sorafenib tosylate, or XL281 (BMS-908662). In some embodiments, one
 skilled in the art may generate or identify novel BRAF inhibitors using in vitro, in vivo, in silico,
 or other screening methods known in the art. For example, a BRAF inhibitor of wild type BRAF
 may be identified from a training set of small molecules, peptides, or nucleic acids using an
 assay for detecting phosphorylation of molecules which are downstream from BRAF in the
 25 MAPK signaling cascade (e.g., MEK and/or ERK). The BRAF inhibitor may act to suppress or
 inhibit BRAF expression and/or signaling function, thereby reducing phosphorylation of MEK
 and ERK. Several phosphorylation assays are available which could be used in such
 embodiments including, but not limited to, kinase activity assays (e.g., those sold by R&D
 Systems®, Promega®, Life Technologies®); phospho-specific antibodies for use with
 30 immunoassays such as western blots, enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA), flow
 cytometry, immunocytochemistry, immunohistochemistry; mass spectrometry, proteomics, and
 phospho-protein multiplex assays.

In some embodiments, the subject is preferentially administered with a combination of
 BRAF inhibitor with a MEK inhibitor.

As used herein, the term "treatment" or "treat" refer to both prophylactic or preventive treatment as well as curative or disease modifying treatment, including treatment of subject at risk of contracting the disease or suspected to have contracted the disease as well as subjects who are ill or have been diagnosed as suffering from a disease or medical condition, and includes suppression of clinical relapse. The treatment may be administered to a subject having a medical disorder or who ultimately may acquire the disorder, in order to prevent, cure, delay the onset of, reduce the severity of, or ameliorate one or more symptoms of a disorder or recurring disorder, or in order to prolong the survival of a subject beyond that expected in the absence of such treatment. By "therapeutic regimen" is meant the pattern of treatment of an illness, e.g., the pattern of dosing used during therapy. A therapeutic regimen may include an induction regimen and a maintenance regimen. The phrase "induction regimen" or "induction period" refers to a therapeutic regimen (or the portion of a therapeutic regimen) that is used for the initial treatment of a disease. The general goal of an induction regimen is to provide a high level of drug to a subject during the initial period of a treatment regimen. An induction regimen may employ (in part or in whole) a "loading regimen", which may include administering a greater dose of the drug than a physician would employ during a maintenance regimen, administering a drug more frequently than a physician would administer the drug during a maintenance regimen, or both. The phrase "maintenance regimen" or "maintenance period" refers to a therapeutic regimen (or the portion of a therapeutic regimen) that is used for the maintenance of a subject during treatment of an illness, e.g., to keep the subject in remission for long periods of time (months or years). A maintenance regimen may employ continuous therapy (e.g., administering a drug at a regular intervals, e.g., weekly, monthly, yearly, etc.) or intermittent therapy (e.g., interrupted treatment, intermittent treatment, treatment at relapse, or treatment upon achievement of a particular predetermined criteria [e.g., disease manifestation, etc.]).

As used herein the term "resistance to MAPK inhibitors" is used in its broadest context to refer to the reduced effectiveness of at least one MAPK inhibitor (e.g. a BRAF inhibitor alone or a combination comprising a BRAF inhibitor and a MEK inhibitor) to inhibit the growth of a cell, kill a cell or inhibit one or more cellular functions, and to the ability of a cell to survive exposure to an agent designed to inhibit the growth of the cell, kill the cell or inhibit one or more cellular functions. The resistance displayed by a cell may be acquired, for example by prior exposure to the agent, or may be inherent or innate. The resistance displayed by a cell may be complete in that the agent is rendered completely ineffective against the cell, or may be partial in that the effectiveness of the agent is reduced. Accordingly, the term "resistant" refers

to the repeated outbreak of cancer, or a progression of cancer independently of whether the disease was cured before said outbreak or progression.

As used herein, the term “SLITRK6” has its general meaning in the art and refers to SLIT and NTRK like family member 6 encoded by SLITRK6 gene (Gene ID: 84189). The term
5 SLITRK6 is also known as DFNMYP. This gene encodes a member of the SLITRK protein family. Members of this family are integral membrane proteins that are characterized by two N-terminal leucine-rich repeat (LRR) domains and a C-terminal region that shares homology with TRK neurotrophin receptors. This protein was originally described as a regulator of neurite
10 outgrowth required for normal hearing and vision. Exemplary human nucleic and amino acid sequences are represented respectively by the NCBI reference sequences NM_032229.2 and NP_115605.2. As used herein, the term “SLITRK6 expressing cancer cells” refers to cancer cells that express SLITRK6 following administration of BRAF inhibitor.

As used herein, the term “agent capable of inducing cell death of SLITRK6 expressing cancer cells” refers to any molecule that under cellular and/or physiological conditions is
15 capable of inducing cell death of SLITRK6 expressing cancer cells. In particular, the agent is capable of inducing apoptosis of SLITRK6 expressing cancer cells. In some embodiments, the agent is capable of depleting SLITRK6 cancer cells. As used herein, the term “depletion” with respect to cancer cells, refers to a measurable decrease in the number of SLITRK6 expressing cancer cells in the subject. The reduction can be at least about 10%, e.g., at least about 20%,
20 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, or more. In some embodiments, the term refers to a decrease in the number of SLITRK6 cancer cells in the subject below detectable limits.

In some embodiments, the agent is an inhibitor of SLITRK6 expression. The inventors have indeed shown that inhibition of SLITRK6 can trigger apoptosis of cancer cells. An
25 “inhibitor of expression” refers to a natural or synthetic compound that has a biological effect to inhibit the expression of a gene. In some embodiments, said inhibitor of gene expression is a siRNA, an antisense oligonucleotide or a ribozyme. For example, anti-sense oligonucleotides, including anti-sense RNA molecules and anti-sense DNA molecules, would act to directly block the translation of SLITRK6 mRNA by binding thereto and thus preventing protein
30 translation or increasing mRNA degradation, thus decreasing the level of SLITRK6, and thus activity, in a cell. For example, antisense oligonucleotides of at least about 15 bases and complementary to unique regions of the mRNA transcript sequence encoding SLITRK6 can be synthesized, e.g., by conventional phosphodiester techniques. Methods for using antisense techniques for specifically inhibiting gene expression of genes whose sequence is known are

well known in the art (e.g. see U.S. Pat. Nos. 6,566,135; 6,566,131; 6,365,354; 6,410,323; 6,107,091; 6,046,321; and 5,981,732). Small inhibitory RNAs (siRNAs) can also function as inhibitors of expression for use in the present invention. SLITRK6 gene expression can be reduced by contacting a subject or cell with a small double stranded RNA (dsRNA), or a vector or construct causing the production of a small double stranded RNA, such that SLITRK6 gene expression is specifically inhibited (i.e. RNA interference or RNAi). Antisense oligonucleotides, siRNAs, shRNAs and ribozymes of the invention may be delivered in vivo alone or in association with a vector. In its broadest sense, a "vector" is any vehicle capable of facilitating the transfer of the antisense oligonucleotide, siRNA, shRNA or ribozyme nucleic acid to the cells and typically cells expressing SLITRK6. Typically, the vector transports the nucleic acid to cells with reduced degradation relative to the extent of degradation that would result in the absence of the vector. In general, the vectors useful in the invention include, but are not limited to, plasmids, phagemids, viruses, other vehicles derived from viral or bacterial sources that have been manipulated by the insertion or incorporation of the antisense oligonucleotide, siRNA, shRNA or ribozyme nucleic acid sequences. Viral vectors are a preferred type of vector and include, but are not limited to nucleic acid sequences from the following viruses: retrovirus, such as moloney murine leukemia virus, harvey murine sarcoma virus, murine mammary tumor virus, and rous sarcoma virus; adenovirus, adeno-associated virus; SV40-type viruses; polyoma viruses; Epstein-Barr viruses; papilloma viruses; herpes virus; vaccinia virus; polio virus; and RNA virus such as a retrovirus. One can readily employ other vectors not named but known to the art. In some embodiments, the inhibitor of expression is an endonuclease. The term "endonuclease" refers to enzymes that cleave the phosphodiester bond within a polynucleotide chain. Some, such as Deoxyribonuclease I, cut DNA relatively nonspecifically (without regard to sequence), while many, typically called restriction endonucleases or restriction enzymes, and cleave only at very specific nucleotide sequences. The mechanism behind endonuclease-based genome inactivating generally requires a first step of DNA single or double strand break, which can then trigger two distinct cellular mechanisms for DNA repair, which can be exploited for DNA inactivating: the errorprone non homologous end-joining (NHEJ) and the high-fidelity homology-directed repair (HDR). In a particular embodiment, the endonuclease is CRISPR-cas. As used herein, the term "CRISPR-cas" has its general meaning in the art and refers to clustered regularly interspaced short palindromic repeats associated which are the segments of prokaryotic DNA containing short repetitions of base sequences. In some embodiment, the endonuclease is CRISPR-cas9 which is from *Streptococcus pyogenes*. The CRISPR/Cas9 system has been described in US 8697359 B1 and US 2014/0068797. In some embodiment, the

endonuclease is CRISPR-Cpf1 which is the more recently characterized CRISPR from Provotella and Francisella 1 (Cpf1) in Zetsche et al. ("Cpf1 is a Single RNA-guided Endonuclease of a Class 2 CRISPR-Cas System (2015); Cell; 163, 1-13).

5 In some embodiments, the agent is a small organic molecule which inhibits the kinase activity of SLITRK6 or all molecule that can inhibit SLITRK6 function.

In some embodiments, the agent is an antibody having binding affinity for SLITRK6. In some embodiments, the agent is an antibody directed against the extracellular domain of SLITRK6. In some embodiments, the antibody leads to the inhibition of SLITRK6 activity. In some embodiments, the antibody leads to the internalisation of SLITRK6 in cancer cells. In some embodiments, the antibody leads to the depletion of cancer cells (e.g. an antibody-drug conjugate as described herein after).

As used herein, the term "antibody" is thus used to refer to any antibody-like molecule that has an antigen binding region, and this term includes antibody fragments that comprise an antigen binding domain such as Fab', Fab, F(ab')₂, single domain antibodies (DABs), TandAbs dimer, Fv, scFv (single chain Fv), dsFv, ds-scFv, Fd, linear antibodies, minibodies, diabodies, bispecific antibody fragments, bibody, tribody (scFv-Fab fusions, bispecific or trispecific, respectively); sc-diabody; kappa(lamda) bodies (scFv-CL fusions); BiTE (Bispecific T-cell Engager, scFv-scFv tandems to attract T cells); DVD-Ig (dual variable domain antibody, bispecific format); SIP (small immunoprotein, a kind of minibody); SMIP ("small modular immunopharmaceutical" scFv-Fc dimer; DART (ds-stabilized diabody "Dual Affinity ReTargeting"); small antibody mimetics comprising one or more CDRs and the like. The techniques for preparing and using various antibody-based constructs and fragments are well known in the art (see Kabat et al., 1991, specifically incorporated herein by reference). Diabodies, in particular, are further described in EP 404, 097 and WO 93/1 1 161 ; whereas linear antibodies are further described in Zapata et al. (1995). Antibodies can be fragmented using conventional techniques. For example, F(ab')₂ fragments can be generated by treating the antibody with pepsin. The resulting F(ab')₂ fragment can be treated to reduce disulfide bridges to produce Fab' fragments. Papain digestion can lead to the formation of Fab fragments. Fab, Fab' and F(ab')₂, scFv, Fv, dsFv, Fd, dAbs, TandAbs, ds-scFv, dimers, minibodies, diabodies, bispecific antibody fragments and other fragments can also be synthesized by recombinant techniques or can be chemically synthesized. Techniques for producing antibody fragments are well known and described in the art. For example, each of Beckman et al., 2006; Holliger & Hudson, 2005; Le Gall et al., 2004; Reff & Heard, 2001 ; Reiter et al., 1996; and Young et al., 1995 further describe and enable the production of effective antibody fragments. In some

embodiments, the antibody of the present invention is a single chain antibody. As used herein the term “single domain antibody” has its general meaning in the art and refers to the single heavy chain variable domain of antibodies of the type that can be found in Camelid mammals which are naturally devoid of light chains. Such single domain antibody are also “nanobody®”.

5 For a general description of (single) domain antibodies, reference is also made to the prior art cited above, as well as to EP 0 368 684, Ward et al. (Nature 1989 Oct 12; 341 (6242): 544-6), Holt et al., Trends Biotechnol., 2003, 21(11):484-490; and WO 06/030220, WO 06/003388.

As used herein the term “bind” indicates that the antibody has affinity for the surface molecule. The term “affinity”, as used herein, means the strength of the binding of an antibody
10 to an epitope. The affinity of an antibody is given by the dissociation constant K_d , defined as $[Ab] \times [Ag] / [Ab-Ag]$, where $[Ab-Ag]$ is the molar concentration of the antibody-antigen complex, $[Ab]$ is the molar concentration of the unbound antibody and $[Ag]$ is the molar concentration of the unbound antigen. The affinity constant K_a is defined by $1/K_d$. Preferred methods for determining the affinity of mAbs can be found in Harlow, et al., Antibodies: A
15 Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1988), Coligan et al., eds., Current Protocols in Immunology, Greene Publishing Assoc. and Wiley Interscience, N.Y., (1992, 1993), and Muller, Meth. Enzymol. 92:589-601 (1983), which references are entirely incorporated herein by reference. One preferred and standard method well known in the art for determining the affinity of mAbs is the use of Biacore instruments.

20 In natural antibodies, two heavy chains are linked to each other by disulfide bonds and each heavy chain is linked to a light chain by a disulfide bond. There are two types of light chain, lambda (λ) and kappa (κ). There are five main heavy chain classes (or isotypes) which determine the functional activity of an antibody molecule: IgM, IgD, IgG, IgA and IgE. Each chain contains distinct sequence domains. The light chain includes two domains, a variable
25 domain (VL) and a constant domain (CL). The heavy chain includes four domains, a variable domain (VH) and three constant domains (CH1, CH2 and CH3, collectively referred to as CH). The variable regions of both light (VL) and heavy (VH) chains determine binding recognition and specificity to the antigen. The constant region domains of the light (CL) and heavy (CH) chains confer important biological properties such as antibody chain association, secretion,
30 trans-placental mobility, complement binding, and binding to Fc receptors (FcR). The Fv fragment is the N-terminal part of the Fab fragment of an immunoglobulin and consists of the variable portions of one light chain and one heavy chain. The specificity of the antibody resides in the structural complementarity between the antibody combining site and the antigenic determinant. Antibody combining sites are made up of residues that are primarily from the

hypervariable or complementarity determining regions (CDRs). Occasionally, residues from nonhypervariable or framework regions (FR) can participate to the antibody binding site or influence the overall domain structure and hence the combining site. Complementarity Determining Regions or CDRs refer to amino acid sequences which together define the binding affinity and specificity of the natural Fv region of a native immunoglobulin binding site. The light and heavy chains of an immunoglobulin each have three CDRs, designated L-CDR1, L-CDR2, L- CDR3 and H-CDR1, H-CDR2, H-CDR3, respectively. An antigen-binding site, therefore, typically includes six CDRs, comprising the CDR set from each of a heavy and a light chain V region. Framework Regions (FRs) refer to amino acid sequences interposed between CDRs. The residues in antibody variable domains are conventionally numbered according to a system devised by Kabat et al. This system is set forth in Kabat et al., 1987, in Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Department of Health and Human Services, NIH, USA (hereafter "Kabat et al."). This numbering system is used in the present specification. The Kabat residue designations do not always correspond directly with the linear numbering of the amino acid residues in SEQ ID sequences. The actual linear amino acid sequence may contain fewer or additional amino acids than in the strict Kabat numbering corresponding to a shortening of, or insertion into, a structural component, whether framework or complementarity determining region (CDR), of the basic variable domain structure. The correct Kabat numbering of residues may be determined for a given antibody by alignment of residues of homology in the sequence of the antibody with a "standard" Kabat numbered sequence. The CDRs of the heavy chain variable domain are located at residues 31-35B (H-CDR1), residues 50-65 (H-CDR2) and residues 95-102 (H-CDR3) according to the Kabat numbering system. The CDRs of the light chain variable domain are located at residues 24-34 (L-CDR1), residues 50-56 (L-CDR2) and residues 89-97 (L-CDR3) according to the Kabat numbering system.

In some embodiments, the antibody is a humanized antibody. As used herein, "humanized" describes antibodies wherein some, most or all of the amino acids outside the CDR regions are replaced with corresponding amino acids derived from human immunoglobulin molecules. Methods of humanization include, but are not limited to, those described in U.S. Pat. Nos. 4,816,567, 5,225,539, 5,585,089, 5,693,761, 5,693,762 and 5,859,205, which are hereby incorporated by reference.

In some embodiments, the antibody is a fully human antibody. Fully human monoclonal antibodies also can be prepared by immunizing mice transgenic for large portions of human immunoglobulin heavy and light chain loci. See, e.g., U.S. Pat. Nos. 5,591,669, 5,598,369,

5,545,806, 5,545,807, 6,150,584, and references cited therein, the contents of which are incorporated herein by reference.

In some embodiments, the antibody comprises heavy and light chain variable regions of an antibody designated Hal5-10acl2 produced by a Chinese Hamster Ovary (CHO) cell deposited under the American Type Culture Collection (ATCC) Accession No.: PTA-13102. The heavy chain variable region of Hal5-10acl2 has the amino acid as set forth in SEQ ID NO:1, and the light chain variable region of Hal5-10acl2 has the amino acid sequence as set forth in SEQ ID NO:2

SEQ ID NO:1

10 QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVI
WYDGSNQYYADSVKGRFTISRDNKNTLFLQMHSRAEDTAVYYCARGLTS
GRYGMDVWVGQTTVTVSS

SEQ ID NO:2

15 DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLLSHGFTNYLDWYLQKPGQSPQLLIYL
GSSRASGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGLYYCMQPLQIPWTFGQGTK
VEIKR

In some embodiments, the antibody contains the heavy chain CDRs of the heavy chain variable region of HA15-10acl2 (SEQ ID NO:1). In some embodiments, the antibody of the present invention comprises the light chain CDRs of the light chain variable region of HA15-10acl2 (SEQ ID NO:2).

In some embodiments, the antibody suitable for depletion of cancer cells mediates antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity. As used herein the term “antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity” or ‘ADCC’ refer to a cell-mediated reaction in which non-specific cytotoxic cells (e.g., Natural Killer (NK) cells, neutrophils, and macrophages) recognize bound antibody on a target cell and subsequently cause lysis of the target cell. While not wishing to be limited to any particular mechanism of action, these cytotoxic cells that mediate ADCC generally express Fc receptors (FcRs).

As used herein “Fc region” includes the polypeptides comprising the constant region of an antibody excluding the first constant region immunoglobulin domain. Thus Fc refers to the last two constant region immunoglobulin domains of IgA, IgD, and IgG, and the last three constant region immunoglobulin domains of IgE and IgM, and the flexible hinge N-terminal to these domains. For IgA and IgM Fc may include the J chain. For IgG, Fc comprises immunoglobulin domains Cgamma2 and Cgamma3 (C γ 2 and C γ 3) and the hinge between Cgamma1 (C γ 1) and Cgamma2 (C γ 2). Although the boundaries of the Fc region may vary, the

human IgG heavy chain Fc region is usually defined to comprise residues C226 or P230 to its carboxyl-terminus, wherein the numbering is according to the EU index as in Kabat et al. (1991, NIH Publication 91-3242, National Technical Information Service, Springfield, Va.). The “EU index as set forth in Kabat” refers to the residue numbering of the human IgG1 EU antibody as described in Kabat et al. supra. Fc may refer to this region in isolation, or this region in the context of an antibody, antibody fragment, or Fc fusion protein. An Fc variant protein may be an antibody, Fc fusion, or any protein or protein domain that comprises an Fc region. Particularly preferred are proteins comprising variant Fc regions, which are non-naturally occurring variants of an Fc region. The amino acid sequence of a non-naturally occurring Fc region (also referred to herein as a “variant Fc region”) comprises a substitution, insertion and/or deletion of at least one amino acid residue compared to the wild type amino acid sequence. Any new amino acid residue appearing in the sequence of a variant Fc region as a result of an insertion or substitution may be referred to as a non-naturally occurring amino acid residue. Note: Polymorphisms have been observed at a number of Fc positions, including but not limited to Kabat 270, 272, 312, 315, 356, and 358, and thus slight differences between the presented sequence and sequences in the prior art may exist.

The terms “Fc receptor” or “FcR” are used to describe a receptor that binds to the Fc region of an antibody. The primary cells for mediating ADCC, NK cells, express FcγRIII, whereas monocytes express FcγRI, FcγRII, FcγRIII and/or FcγRIV. FcR expression on hematopoietic cells is summarized in Ravetch and Kinet, *Annu. Rev. Immunol.*, 9:457-92 (1991). To assess ADCC activity of a molecule, an in vitro ADCC assay, such as that described in U.S. Pat. No. 5,500,362 or 5,821,337 may be performed. Useful effector cells for such assays include peripheral blood mononuclear cells (PBMC) and Natural Killer (NK) cells. Alternatively, or additionally, ADCC activity of the molecules of interest may be assessed in vivo, e.g., in an animal model such as that disclosed in Clynes et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 95:652-656 (1998). As used herein, the term “Effector cells” are leukocytes which express one or more FcRs and perform effector functions. The cells express at least FcγRI, FcγRII, FcγRIII and/or FcγRIV and carry out ADCC effector function. Examples of human leukocytes which mediate ADCC include peripheral blood mononuclear cells (PBMC), natural killer (NK) cells, monocytes, cytotoxic T cells and neutrophils.

In some embodiments, the antibody suitable for depletion of cancer cells is a full-length antibody. In some embodiments, the full-length antibody is an IgG1 antibody. In some embodiments, the full-length antibody is an IgG3 antibody.

In some embodiments, the antibody suitable for depletion of cancer cells comprises a variant Fc region that has an increased affinity for Fc γ RIA, Fc γ RIIA, Fc γ RIIB, Fc γ RIIIA, Fc γ RIIIB, and Fc γ RIV. In some embodiments, the antibody of the present invention comprises a variant Fc region comprising at least one amino acid substitution, insertion or deletion wherein
5 said at least one amino acid residue substitution, insertion or deletion results in an increased affinity for Fc γ RIA, Fc γ RIIA, Fc γ RIIB, Fc γ RIIIA, Fc γ RIIIB, and Fc γ RIV. In some
embodiments, the antibody of the present invention comprises a variant Fc region comprising at least one amino acid substitution, insertion or deletion wherein said at least one amino acid
residue is selected from the group consisting of: residue 239, 330, and 332, wherein amino acid
10 residues are numbered following the EU index. In some embodiments, the antibody of the present invention comprises a variant Fc region comprising at least one amino acid substitution
wherein said at least one amino acid substitution is selected from the group consisting of: S239D, A330L, A330Y, and 1332E, wherein amino acid residues are numbered following the
EU index.

15 In some embodiments, the glycosylation of the antibody suitable for depletion of cancer cells is modified. For example, an aglycosylated antibody can be made (i.e., the antibody lacks glycosylation). Glycosylation can be altered to, for example, increase the affinity of the antibody for the antigen. Such carbohydrate modifications can be accomplished by, for example,
altering one or more sites of glycosylation within the antibody sequence. For example, one or
20 more amino acid substitutions can be made that result in elimination of one or more variable region framework glycosylation sites to thereby eliminate glycosylation at that site. Such aglycosylation may increase the affinity of the antibody for antigen. Such an approach is described in further detail in U.S. Patent Nos. 5,714,350 and 6,350,861 by Co et al. Additionally
or alternatively, an antibody can be made that has an altered type of glycosylation, such as a
25 hypofucosylated or non-fucosylated antibody having reduced amounts of or no fucosyl residues or an antibody having increased bisecting GlcNac structures. Such altered glycosylation patterns have been demonstrated to increase the ADCC ability of antibodies. Such carbohydrate modifications can be accomplished by, for example, expressing the antibody in a host cell with altered glycosylation machinery. Cells with altered glycosylation machinery have been
30 described in the art and can be used as host cells in which to express recombinant antibodies of the present invention to thereby produce an antibody with altered glycosylation. For example, EP 1,176,195 by Hang et al. describes a cell line with a functionally disrupted FUT8 gene, which encodes a fucosyl transferase, such that antibodies expressed in such a cell line exhibit hypofucosylation or are devoid of fucosyl residues. Therefore, in some embodiments, the

human monoclonal antibodies of the present invention may be produced by recombinant expression in a cell line which exhibit hypofucosylation or non-fucosylation pattern, for example, a mammalian cell line with deficient expression of the FUT8 gene encoding fucosyltransferase. PCT Publication WO 03/035835 by Presta describes a variant CHO cell line, Lecl3 cells, with reduced ability to attach fucose to Asn(297)-linked carbohydrates, also resulting in hypofucosylation of antibodies expressed in that host cell (see also Shields, R.L. et al, 2002 J. Biol. Chem. 277:26733-26740). PCT Publication WO 99/54342 by Umana et al. describes cell lines engineered to express glycoprotein-modifying glycosyl transferases (e.g., beta(1,4)-N acetylglucosaminyltransferase III (GnTIII)) such that antibodies expressed in the engineered cell lines exhibit increased bisecting GlcNac structures which results in increased ADCC activity of the antibodies (see also Umana et al, 1999 Nat. Biotech. 17: 176-180). Eureka Therapeutics further describes genetically engineered CHO mammalian cells capable of producing antibodies with altered mammalian glycosylation pattern devoid of fucosyl residues (<http://www.eurekainc.com/a&boutus/companyoverview.html>). Alternatively, the human monoclonal antibodies of the present invention can be produced in yeasts or filamentous fungi engineered for mammalian- like glycosylation pattern and capable of producing antibodies lacking fucose as glycosylation pattern (see for example EP1297172B1

In some embodiments, the antibody suitable for depletion of cancer cells mediated complement dependant cytotoxicity. "Complement dependent cytotoxicity" or "CDC" refers to the ability of a molecule to initiate complement activation and lyse a target in the presence of complement. The complement activation pathway is initiated by the binding of the first component of the complement system (C1q) to a molecule (e.g., an antibody) complexed with a cognate antigen. To assess complement activation, a CDC assay, e.g., as described in Gazzano-Santaro et al., J. Immunol. Methods, 202:163 (1996), may be performed.

In some embodiments, the antibody suitable for depletion of cancer cells mediates antibody-dependent phagocytosis. As used herein, the term "antibody-dependent phagocytosis" or "opsonisation" refers to the cell-mediated reaction wherein nonspecific cytotoxic cells that express FcγRs recognize bound antibody on a target cell and subsequently cause phagocytosis of the target cell.

In some embodiments, the antibody suitable for depletion of cancer cells is a multispecific antibody comprising a first antigen binding site directed against SLITRK6 and at least one second antigen binding site directed against an effector cell as above described. In said embodiments, the second antigen-binding site is used for recruiting a killing mechanism such as, for example, by binding an antigen on a human effector cell. In some embodiments, an

effector cell is capable of inducing ADCC, such as a natural killer cell. For example, monocytes, macrophages, which express FcRs, are involved in specific killing of target cells and presenting antigens to other components of the immune system. In some embodiments, an effector cell may phagocytose a target antigen or target cell. The expression of a particular FcR on an effector cell may be regulated by humoral factors such as cytokines. An effector cell can phagocytose a target antigen or phagocytose or lyse a target cell. Suitable cytotoxic agents and second therapeutic agents are exemplified below, and include toxins (such as radiolabeled peptides), chemotherapeutic agents and prodrugs. In some embodiments, the second binding site binds to a Fc receptor as above defined. In some embodiments, the second binding site binds to a surface molecule of NK cells so that said cells can be activated. In some embodiments, the second binding site binds to NKp46. Exemplary formats for the multispecific antibody molecules of the present invention include, but are not limited to (i) two antibodies cross-linked by chemical heteroconjugation, one with a specificity to a specific surface molecule of ILC and another with a specificity to a second antigen; (ii) a single antibody that comprises two different antigen-binding regions; (iii) a single-chain antibody that comprises two different antigen-binding regions, e.g., two scFvs linked in tandem by an extra peptide linker; (iv) a dual-variable-domain antibody (DVD-Ig), where each light chain and heavy chain contains two variable domains in tandem through a short peptide linkage (Wu et al., Generation and Characterization of a Dual Variable Domain Immunoglobulin (DVD-IgTM) Molecule, In : Antibody Engineering, Springer Berlin Heidelberg (2010)); (v) a chemically-linked bispecific (Fab')₂ fragment; (vi) a Tandab, which is a fusion of two single chain diabodies resulting in a tetravalent bispecific antibody that has two binding sites for each of the target antigens; (vii) a flexibody, which is a combination of scFvs with a diabody resulting in a multivalent molecule; (viii) a so called "dock and lock" molecule, based on the "dimerization and docking domain" in Protein Kinase A, which, when applied to Fabs, can yield a trivalent bispecific binding protein consisting of two identical Fab fragments linked to a different Fab fragment; (ix) a so-called Scorpion molecule, comprising, e.g., two scFvs fused to both termini of a human Fab-arm; and (x) a diabody. Another exemplary format for bispecific antibodies is IgG-like molecules with complementary CH3 domains to force heterodimerization. Such molecules can be prepared using known technologies, such as, e.g., those known as Triomab/Quadroma (Trion Pharma/Fresenius Biotech), Knob-into-Hole (Genentech), CrossMAB (Roche) and electrostatically-matched (Amgen), LUZ-Y (Genentech), Strand Exchange Engineered Domain body (SEEDbody)(EMD Serono), Biclonic (Merus) and DuoBody (Genmab A/S) technologies.

In some embodiments, the antibody suitable for depletion of cancer cells is conjugated to a therapeutic moiety, i.e. a drug. The therapeutic moiety can be, e.g., a cytotoxin, a chemotherapeutic agent, a cytokine, an immunosuppressant, an immune stimulator, a lytic peptide, or a radioisotope. Such conjugates are referred to herein as an "antibody-drug conjugates" or "ADCs".

In some embodiments, the antibody suitable for depletion of cancer cells is conjugated to a cytotoxic moiety. The cytotoxic moiety may, for example, be selected from the group consisting of taxol; cytochalasin B; gramicidin D; ethidium bromide; emetine; mitomycin; etoposide; teniposide; vincristine; vinblastine; colchicin; doxorubicin; daunorubicin; dihydroxy anthracin dione; a tubulin- inhibitor such as maytansine or an analog or derivative thereof; an antimetabolic agent such as monomethyl auristatin E or F or an analog or derivative thereof; dolastatin 10 or 15 or an analogue thereof; irinotecan or an analogue thereof; mitoxantrone; mithramycin; actinomycin D; 1-dehydrotestosterone; a glucocorticoid; procaine; tetracaine; lidocaine; propranolol; puromycin; calicheamicin or an analog or derivative thereof; an antimetabolite such as methotrexate, 6 mercaptopurine, 6 thioguanine, cytarabine, fludarabine, 5 fluorouracil, decarbazine, hydroxyurea, asparaginase, gemcitabine, or cladribine; an alkylating agent such as mechlorethamine, thioepa, chlorambucil, melphalan, carmustine (BSNU), lomustine (CCNU), cyclophosphamide, busulfan, dibromomannitol, streptozotocin, dacarbazine (DTIC), procarbazine, mitomycin C; a platinum derivative such as cisplatin or carboplatin; duocarmycin A, duocarmycin SA, rachelmycin (CC-1065), or an analog or derivative thereof; an antibiotic such as dactinomycin, bleomycin, daunorubicin, doxorubicin, idarubicin, mithramycin, mitomycin, mitoxantrone, plicamycin, anthramycin (AMC)); pyrrolo[2,1-c][1,4]-benzodiazepines (PDB); diphtheria toxin and related molecules such as diphtheria A chain and active fragments thereof and hybrid molecules, ricin toxin such as ricin A or a deglycosylated ricin A chain toxin, cholera toxin, a Shiga-like toxin such as SLT I, SLT II, SLT IIV, LT toxin, C3 toxin, Shiga toxin, pertussis toxin, tetanus toxin, soybean Bowman-Birk protease inhibitor, Pseudomonas exotoxin, alorin, saporin, modeccin, gelatin, abrin A chain, modeccin A chain, alpha-sarcin, Aleurites fordii proteins, dianthin proteins, Phytolacca americana proteins such as PAPI, PAPII, and PAP-S, momordica charantia inhibitor, curcumin, croton, sapaonaria officinalis inhibitor, gelonin, mitogellin, restrictocin, phenomycin, and enomycin toxins; ribonuclease (RNase); DNase I, Staphylococcal enterotoxin A; pokeweed antiviral protein; diphtherin toxin; and Pseudomonas endotoxin.

In some embodiments, the antibody suitable for depletion of cancer cells is conjugated to an auristatin or a peptide analog, derivative or prodrug thereof. Auristatins have been shown

to interfere with microtubule dynamics, GTP hydrolysis and nuclear and cellular division (Woyke et al (2001) *Antimicrob. Agents and Chemother.* 45(12): 3580-3584) and have anti-cancer (US5663149) and antifungal activity (Pettit et al., (1998) *Antimicrob. Agents and Chemother.* 42: 2961-2965. For example, auristatin E can be reacted with para-acetyl benzoic acid or benzoylvaleric acid to produce AEB and AEVB, respectively. Other typical auristatin derivatives include AFP, MMAF (monomethyl auristatin F), and MMAE (monomethyl auristatin E). Suitable auristatins and auristatin analogs, derivatives and prodrugs, as well as suitable linkers for conjugation of auristatins to Abs, are described in, e.g., U.S. Patent Nos. 5,635,483, 5,780,588 and 6,214,345 and in International patent application publications WO02088172, WO2004010957, WO2005081711, WO2005084390, WO2006132670, WO03026577, WO200700860, WO207011968 and WO205082023.

In some embodiments, the antibody suitable for depletion of cancer cells is conjugated to pyrrolo[2,1-c][1,4]- benzodiazepine (PDB) or an analog, derivative or prodrug thereof. Suitable PDBs and PDB derivatives, and related technologies are described in, e.g., Hartley J. A. et al., *Cancer Res* 2010; 70(17) : 6849-6858; Antonow D. et al., *Cancer J* 2008; 14(3) : 154-169; Howard P.W. et al., *Bioorg Med Chem Lett* 2009; 19: 6463-6466 and Sagnou et al., *Bioorg Med Chem Lett* 2000; 10(18) : 2083-2086.

In some embodiments, the antibody suitable for depletion of cancer cells is conjugated to a cytotoxic moiety selected from the group consisting of an anthracycline, maytansine, calicheamicin, duocarmycin, rachelmycin (CC-1065), dolastatin 10, dolastatin 15, irinotecan, monomethyl auristatin E, monomethyl auristatin F, a PDB, or an analog, derivative, or prodrug of any thereof.

In some embodiments, the antibody suitable for depletion of cancer cells is conjugated to an anthracycline or an analog, derivative or prodrug thereof. In some embodiments, the antibody is conjugated to maytansine or an analog, derivative or prodrug thereof. In some embodiments, the antibody is conjugated to calicheamicin or an analog, derivative or prodrug thereof. In some embodiments, the antibody is conjugated to duocarmycin or an analog, derivative or prodrug thereof. In some embodiments, the antibody is conjugated to rachelmycin (CC-1065) or an analog, derivative or prodrug thereof. In some embodiments, the antibody is conjugated to dolastatin 10 or an analog, derivative or prodrug thereof. In some embodiments, the antibody is conjugated to dolastatin 15 or an analog, derivative or prodrug thereof. In some embodiments, the antibody is conjugated to monomethyl auristatin E or an analog, derivative or prodrug thereof. In some embodiments, the antibody is conjugated to monomethyl auristatin F or an analog, derivative or prodrug thereof. In some embodiments, the antibody is conjugated

to pyrrolo[2,1-c][1,4]-benzodiazepine or an analog, derivative or prodrug thereof. In some embodiments, the antibody is conjugated to irinotecan or an analog, derivative or prodrug thereof.

In some embodiments, the antibody suitable for depletion of cancer cells is conjugated to a nucleic acid or nucleic acid-associated molecule. In one such embodiment, the conjugated nucleic acid is a cytotoxic ribonuclease (RNase) or deoxy-ribonuclease (e.g., DNase I), an antisense nucleic acid, an inhibitory RNA molecule (e.g., a siRNA molecule) or an immunostimulatory nucleic acid (e.g., an immunostimulatory CpG motif-containing DNA molecule). In some embodiments, the antibody is conjugated to an aptamer or a ribozyme.

Techniques for conjugating molecule to antibodies, are well-known in the art (See, e.g., Arnon et al., "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy," in *Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy* (Reisfeld et al. eds., Alan R. Liss, Inc., 1985); Hellstrom et al., "Antibodies For Drug Delivery," in *Controlled Drug Delivery* (Robinson et al. eds., Marcel Dekker, Inc., 2nd ed. 1987); Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review," in *Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications* (Pinchera et al. eds., 1985); "Analysis, Results, and Future Prospective of the Therapeutic Use of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy," in *Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy* (Baldwin et al. eds., Academic Press, 1985); and Thorpe et al., 1982, *Immunol. Rev.* 62:119-58. See also, e.g., PCT publication WO 89/12624.) Typically, the nucleic acid molecule is covalently attached to lysines or cysteines on the antibody, through N-hydroxysuccinimide ester or maleimide functionality respectively. Methods of conjugation using engineered cysteines or incorporation of unnatural amino acids have been reported to improve the homogeneity of the conjugate (Axup, J.Y., Bajjuri, K.M., Ritland, M., Hutchins, B.M., Kim, C.H., Kazane, S.A., Halder, R., Forsyth, J.S., Santidrian, A.F., Stafin, K., et al. (2012). Synthesis of site-specific antibody-drug conjugates using unnatural amino acids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 109, 16101–16106.; Junutula, J.R., Flagella, K.M., Graham, R.A., Parsons, K.L., Ha, E., Raab, H., Bhakta, S., Nguyen, T., Dugger, D.L., Li, G., et al. (2010). Engineered thio-trastuzumab-DM1 conjugate with an improved therapeutic index to target human epidermal growth factor receptor 2-positive breast cancer. *Clin. Cancer Res.* 16, 4769–4778.). Junutula et al. (2008) developed cysteine-based site-specific conjugation called "THIOMABs" (TDCs) that are claimed to display an improved therapeutic index as compared to conventional conjugation methods. Conjugation to unnatural amino acids that have been incorporated into the antibody is also being explored for ADCs; however, the generality of this approach is yet to be established (Axup et al., 2012). In particular the one skilled in the art can

also envisage Fc-containing polypeptide engineered with an acyl donor glutamine-containing tag (e.g., Gin-containing peptide tags or Q- tags) or an endogenous glutamine that are made reactive by polypeptide engineering (e.g., via amino acid deletion, insertion, substitution, or mutation on the polypeptide). Then a transglutaminase, can covalently crosslink with an amine donor agent (e.g., a small molecule comprising or attached to a reactive amine) to form a stable and homogenous population of an engineered Fc-containing polypeptide conjugate with the amine donor agent being site- specifically conjugated to the Fc-containing polypeptide through the acyl donor glutamine- containing tag or the accessible/exposed/reactive endogenous glutamine (WO 2012059882).

10 As used herein, the term “combination” is intended to refer to all forms of administration that provide a first drug together with a further (second, third...) drug. The drugs may be administered simultaneous, separate or sequential and in any order. Drugs administered in combination have biological activity in the subject to which the drugs are delivered. Within the context of the invention, a combination thus comprises at least two different drugs, and wherein one drug is at least a MAPK-inhibitor (e.g. a BRAF inhibitor or a BRAF inhibitor + a MEK inhibitor) and wherein the other drug is at least an agent capable of inducing cell death of SLITRK6 expressing cancer cells. In some instance, the combination of the present invention results in the synthetic lethality of the cancer cells.

20 A "therapeutically effective amount" refers to an amount effective, at dosages and for periods of time necessary, to achieve a desired therapeutic result. A therapeutically effective amount of drug may vary according to factors such as the disease state, age, sex, and weight of the individual, and the ability of drug to elicit a desired response in the individual. A therapeutically effective amount is also one in which any toxic or detrimental effects of the antibody or antibody portion are outweighed by the therapeutically beneficial effects. The efficient dosages and dosage regimens for drug depend on the disease or condition to be treated and may be determined by the persons skilled in the art. A physician having ordinary skill in the art may readily determine and prescribe the effective amount of the pharmaceutical composition required. For example, the physician could start doses of drug employed in the pharmaceutical composition at levels lower than that required in order to achieve the desired therapeutic effect and gradually increase the dosage until the desired effect is achieved. In general, a suitable dose of a composition of the present invention will be that amount of the compound which is the lowest dose effective to produce a therapeutic effect according to a particular dosage regimen. Such an effective dose will generally depend upon the factors described above. For example, a therapeutically effective amount for therapeutic use may be

measured by its ability to stabilize the progression of disease. A therapeutically effective amount of a therapeutic compound may decrease tumor size, or otherwise ameliorate symptoms in a subject. One of ordinary skill in the art would be able to determine such amounts based on such factors as the subject's size, the severity of the subject's symptoms, and the particular composition or route of administration selected. An exemplary, non-limiting range for a therapeutically effective amount of drug is about 0.1-100 mg/kg, such as about 0.1-50 mg/kg, for example about 0.1-20 mg/kg, such as about 0.1-10 mg/kg, for instance about 0.5, about such as 0.3, about 1, about 3 mg/kg, about 5 mg/kg or about 8 mg/kg. An exemplary, non-limiting range for a therapeutically effective amount of an antibody of the present invention is 0.02-100 mg/kg, such as about 0.02-30 mg/kg, such as about 0.05-10 mg/kg or 0.1-3 mg/kg, for example about 0.5-2 mg/kg. Administration may e.g. be intravenous, intramuscular, intraperitoneal, or subcutaneous, and for instance administered proximal to the site of the target. Dosage regimens in the above methods of treatment and uses are adjusted to provide the optimum desired response (e.g., a therapeutic response). For example, a single bolus may be administered, several divided doses may be administered over time or the dose may be proportionally reduced or increased as indicated by the exigencies of the therapeutic situation. In some embodiments, the efficacy of the treatment is monitored during the therapy, e.g. at predefined points in time. As non-limiting examples, treatment according to the present invention may be provided as a daily dosage of the agent of the present invention in an amount of about 0.1-100 mg/kg, such as 0.2, 0.5, 0.9, 1.0, 1.1, 1.5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90 or 100 mg/kg, per day, on at least one of days 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, or 40, or alternatively, at least one of weeks 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 or 20 after initiation of treatment, or any combination thereof, using single or divided doses every 24, 12, 8, 6, 4, or 2 hours, or any combination thereof.

Typically, the drug of the present invention is administered to the subject in the form of a pharmaceutical composition which comprises a pharmaceutically acceptable carrier. Pharmaceutically acceptable carriers that may be used in these compositions include, but are not limited to, ion exchangers, alumina, aluminum stearate, lecithin, serum proteins, such as human serum albumin, buffer substances such as phosphates, glycine, sorbic acid, potassium sorbate, partial glyceride mixtures of saturated vegetable fatty acids, water, salts or electrolytes, such as protamine sulfate, disodium hydrogen phosphate, potassium hydrogen phosphate, sodium chloride, zinc salts, colloidal silica, magnesium trisilicate, polyvinyl pyrrolidone,

cellulose-based substances, polyethylene glycol, sodium carboxymethylcellulose, polyacrylates, waxes, polyethylene-polyoxypropylene- block polymers, polyethylene glycol and wool fat. For use in administration to a subject, the composition will be formulated for administration to the subject. The compositions of the present invention may be administered orally, parenterally, by inhalation spray, topically, rectally, nasally, buccally, vaginally or via an implanted reservoir. The used herein includes subcutaneous, intravenous, intramuscular, intra-articular, intra-synovial, intrasternal, intrathecal, intrahepatic, intralesional and intracranial injection or infusion techniques. Sterile injectable forms of the compositions of this invention may be aqueous or an oleaginous suspension. These suspensions may be formulated according to techniques known in the art using suitable dispersing or wetting agents and suspending agents. The sterile injectable preparation may also be a sterile injectable solution or suspension in a non-toxic parenterally acceptable diluent or solvent, for example as a solution in 1,3-butanediol. Among the acceptable vehicles and solvents that may be employed are water, Ringer's solution and isotonic sodium chloride solution. In addition, sterile, fixed oils are conventionally employed as a solvent or suspending medium. For this purpose, any bland fixed oil may be employed including synthetic mono-or diglycerides. Fatty acids, such as oleic acid and its glyceride derivatives are useful in the preparation of injectables, as are natural pharmaceutically-acceptable oils, such as olive oil or castor oil, especially in their polyoxyethylated versions. These oil solutions or suspensions may also contain a long-chain alcohol diluent or dispersant, such as carboxymethyl cellulose or similar dispersing agents that are commonly used in the formulation of pharmaceutically acceptable dosage forms including emulsions and suspensions. Other commonly used surfactants, such as Tweens, Spans and other emulsifying agents or bioavailability enhancers which are commonly used in the manufacture of pharmaceutically acceptable solid, liquid, or other dosage forms may also be used for the purposes of formulation. The compositions of this invention may be orally administered in any orally acceptable dosage form including, but not limited to, capsules, tablets, aqueous suspensions or solutions. In the case of tablets for oral use, carriers commonly used include lactose and corn starch. Lubricating agents, such as magnesium stearate, are also typically added. For oral administration in a capsule form, useful diluents include, e.g., lactose. When aqueous suspensions are required for oral use, the active ingredient is combined with emulsifying and suspending agents. If desired, certain sweetening, flavoring or coloring agents may also be added. Alternatively, the compositions of this invention may be administered in the form of suppositories for rectal administration. These can be prepared by mixing the agent with a suitable non-irritating excipient that is solid at room temperature but liquid at rectal

temperature and therefore will melt in the rectum to release the drug. Such materials include cocoa butter, beeswax and polyethylene glycols. The compositions of this invention may also be administered topically, especially when the target of treatment includes areas or organs readily accessible by topical application, including diseases of the eye, the skin, or the lower
5 intestinal tract. Suitable topical formulations are readily prepared for each of these areas or organs. For topical applications, the compositions may be formulated in a suitable ointment containing the active component suspended or dissolved in one or more carriers. Carriers for topical administration of the compounds of this invention include, but are not limited to, mineral oil, liquid petrolatum, white petrolatum, propylene glycol, polyoxyethylene, polyoxypropylene
10 compound, emulsifying wax and water. Alternatively, the compositions can be formulated in a suitable lotion or cream containing the active components suspended or dissolved in one or more pharmaceutically acceptable carriers. Suitable carriers include, but are not limited to, mineral oil, sorbitan monostearate, polysorbate 60, cetyl esters wax, cetaryl alcohol, 2-octyldodecanol, benzyl alcohol and water. Topical application for the lower intestinal tract can
15 be effected in a rectal suppository formulation (see above) or in a suitable enema formulation. Patches may also be used. The compositions of this invention may also be administered by nasal aerosol or inhalation. Such compositions are prepared according to techniques well-known in the art of pharmaceutical formulation and may be prepared as solutions in saline, employing benzyl alcohol or other suitable preservatives, absorption promoters to enhance
20 bioavailability, fluorocarbons, and/or other conventional solubilizing or dispersing agents. For example, an antibody present in a pharmaceutical composition of this invention can be supplied at a concentration of 10 mg/mL in either 100 mg (10 mL) or 500 mg (50 mL) single-use vials. The product is formulated for IV administration in 9.0 mg/mL sodium chloride, 7.35 mg/mL sodium citrate dihydrate, 0.7 mg/mL polysorbate 80, and Sterile Water for Injection. The pH is
25 adjusted to 6.5. An exemplary suitable dosage range for an antibody in a pharmaceutical composition of this invention may be between about 1 mg/m² and 500 mg/m². However, it will be appreciated that these schedules are exemplary and that an optimal schedule and regimen can be adapted taking into account the affinity and tolerability of the particular antibody in the pharmaceutical composition that must be determined in clinical trials. A pharmaceutical
30 composition of the invention for injection (e.g., intramuscular, i.v.) could be prepared to contain sterile buffered water (e.g. 1 ml for intramuscular), and between about 1 ng to about 100 mg, e.g. about 50 ng to about 30 mg or more preferably, about 5 mg to about 25 mg, of the inhibitor of the invention.

A further object of the present invention relates to a method of determining relapse in subject suffering from a cancer after a treatment regimen comprising administration of a MAPK inhibitor comprising i) detection the expression of SLITRK6 in a tumor sample obtained from the subject and ii) concluding that the subject relapses when the expression of SLITRK6 is detected at step i).

The term “relapse” as used herein refers to reappearance of the cancer after an initial period of responsiveness (e.g., complete response or partial response). The initial period of responsiveness may involve the level of cancer cells falling below a certain threshold, e.g., below 20%, 1%, 10%, 5%, 4%, 3%, 2%, or 1%. The reappearance may involve the level of cancer cells rising above a certain threshold, e.g., above 20%, 1%, 10%, 5%, 4%, 3%, 2%, or 1%. More generally, a response (e.g., complete response or partial response) can involve the absence of detectable MRD (minimal residual disease). In some embodiments, the initial period of responsiveness lasts at least 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10, or 12 months; or at least 1, 2, 3, 4, or 5 years.

As used herein, the term “tumor sample” means any tissue tumor sample derived from the subject. Said tissue sample is obtained for the purpose of the in vitro evaluation. In some embodiments, the tumor sample may result from the tumor resected from the subject. In some embodiments, the tumor sample may result from a biopsy performed in the primary tumor of the subject or performed in metastatic sample distant from the primary tumor of the subject. In some embodiments, the tumor sample is a sample of circulating tumor cells. As used herein, the term “circulating tumor cell” or “CTC” refers to a cancer cell derived from a cancerous tumor that has detached from the tumor and is circulating in the blood stream of the subject. Typically the CTCs are isolated from the blood sample using a filter and/or a marker based method. For example, CTCs can be isolated using an anti-EpCAM antibody to magnetically capture CTCs expressing this antigen on their surfaces with for example the CellSearchR system (Scher et al., 2005; Berthold et al., 2008; Madan et al., 2011; Fleming et al., 2006; Gulley and Drake, 2011; Bublely et al., 1999; Scher et al., 2008). Other approaches include for example detecting the presence of circulating nucleic acids (Schwarzenbach et al., 2011), on immunohistochemistry with anti-cytokeratin 8 and 18 antibodies that are also used in combination with the anti-EpCAM antibodies, or on CTC-chips as well as the EPISPOT test, which depletes CD45 cells first and examines the remaining cells. In addition, collagen adhesion matrix assays (CAM assays) can be used (for a review on these methods, see Doyen et al., 2011).

Detection of expression of SLITRK6 may be performed by any method well known in the art.

In some embodiments, the detection is performed by immunodetection such as immunohistochemistry or immunofluorescence. For instance, immunohistochemistry typically includes the following steps i) fixing the tumor tissue sample with formalin, ii) embedding said tumor tissue sample in paraffin, iii) cutting said tumor tissue sample into sections for staining, 5 iv) incubating said sections with the binding partner specific for the marker (i.e. SLITRK6), v) rinsing said sections, vi) incubating said section with a secondary antibody typically biotinylated and vii) revealing the antigen-antibody complex typically with avidin-biotin-peroxidase complex. Accordingly, the tumor tissue sample is firstly incubated the binding partners. After washing, the labeled antibodies that are bound to marker of interest are revealed 10 by the appropriate technique, depending of the kind of label is borne by the labeled antibody, e.g. radioactive, fluorescent or enzyme label. Multiple labelling can be performed simultaneously. Alternatively, the method of the present invention may use a secondary antibody coupled to an amplification system (to intensify staining signal) and enzymatic molecules. Such coupled secondary antibodies are commercially available, e.g. from Dako, 15 EnVision system. Counterstaining may be used, e.g. H&E, DAPI, Hoechst. Other staining methods may be accomplished using any suitable method or system as would be apparent to one of skill in the art, including automated, semi-automated or manual systems. For example, one or more labels can be attached to the antibody, thereby permitting detection of the target protein (i.e the marker). Exemplary labels include radioactive isotopes, fluorophores, ligands, 20 chemiluminescent agents, enzymes, and combinations thereof. In some embodiments, the label is a quantum dot. Non-limiting examples of labels that can be conjugated to primary and/or secondary affinity ligands include fluorescent dyes or metals (e.g. fluorescein, rhodamine, phycoerythrin, fluorescamine), chromophoric dyes (e.g. rhodopsin), chemiluminescent compounds (e.g. luminal, imidazole) and bioluminescent proteins (e.g. luciferin, luciferase), 25 haptens (e.g. biotin). A variety of other useful fluorescers and chromophores are described in Stryer L (1968) *Science* 162:526-533 and Brand L and Gohlke J R (1972) *Annu. Rev. Biochem.* 41:843-868. Affinity ligands can also be labeled with enzymes (e.g. horseradish peroxidase, alkaline phosphatase, beta-lactamase), radioisotopes (e.g. ^3H , ^{14}C , ^{32}P , ^{35}S or ^{125}I) and particles (e.g. gold). The resulting stained specimens may be imaged using a system for viewing the 30 detectable signal and acquiring an image, such as a digital image of the staining. Methods for image acquisition are well known to one of skill in the art. For example, once the sample has been stained, any optical or non-optical imaging device can be used to detect the stain or biomarker label, such as, for example, upright or inverted optical microscopes, scanning confocal microscopes, cameras, scanning or tunneling electron microscopes, scanning probe

microscopes and imaging infrared detectors. In some examples, the image can be captured digitally. The obtained images can then be used for quantitatively or semi-quantitatively determining the amount of the marker in the sample. Various automated sample processing, scanning and analysis systems suitable for use with immunohistochemistry are available in the art. Such systems can include automated staining and microscopic scanning, computerized image analysis, serial section comparison (to control for variation in the orientation and size of a sample), digital report generation, and archiving and tracking of samples (such as slides on which tissue sections are placed). Cellular imaging systems are commercially available that combine conventional light microscopes with digital image processing systems to perform quantitative analysis on cells and tissues, including immunostained samples. See, e.g., the CAS-200 system (Becton, Dickinson & Co.). In particular, detection can be made manually or by image processing techniques involving computer processors and software. Using such software, for example, the images can be configured, calibrated, standardized and/or validated based on factors including, for example, stain quality or stain intensity, using procedures known to one of skill in the art (see e.g., published U.S. Patent Publication No. US20100136549).

In some embodiments, detecting the expression of SLITRK6 is determined by detecting the quantity of mRNA encoding for SLITRK6. Methods for determining the quantity of mRNA are well known in the art. For example the nucleic acid contained in the samples (e.g., cell or tissue prepared from the subject) is first extracted according to standard methods, for example using lytic enzymes or chemical solutions or extracted by nucleic-acid-binding resins following the manufacturer's instructions. The extracted mRNA is then detected by hybridization (e. g., Northern blot analysis, in situ hybridization) and/or amplification (e.g., RT-PCR). Other methods of Amplification include ligase chain reaction (LCR), transcription-mediated amplification (TMA), strand displacement amplification (SDA) and nucleic acid sequence based amplification (NASBA). Typically, the nucleic acid probes include one or more labels, for example to permit detection of a target nucleic acid molecule using the disclosed probes. Detectable labels include colored, fluorescent, phosphorescent and luminescent molecules and materials, catalysts (such as enzymes) that convert one substance into another substance to provide a detectable difference (such as by converting a colorless substance into a colored substance or vice versa, or by producing a precipitate or increasing sample turbidity), haptens that can be detected by antibody binding interactions, and paramagnetic and magnetic molecules or materials. Particular examples of detectable labels include fluorescent molecules (or fluorochromes). Numerous fluorochromes are known to those of skill in the art, and can be selected, for example from Life Technologies (formerly Invitrogen), e.g., see, The Handbook—

A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies). Probes made using the disclosed methods can be used for nucleic acid detection, such as ISH procedures (for example, fluorescence in situ hybridization (FISH), chromogenic in situ hybridization (CISH) and silver in situ hybridization (SISH)) or comparative genomic hybridization (CGH). Numerous
5 procedures for FISH, CISH, and SISH are known in the art. For example, procedures for performing FISH are described in U.S. Pat. Nos. 5,447,841; 5,472,842; and 5,427,932; and for example, in Pir1kel et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 83:2934-2938, 1986; Pinkel et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 85:9138-9142, 1988; and Lichter et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 85:9664-9668, 1988. CISH is described in, e.g., Tanner et al., Am. .1. Pathol. 157:1467-1472, 2000 and U.S. Pat. No.
10 6,942,970. Additional detection methods are provided in U.S. Pat. No. 6,280,929.

The invention will be further illustrated by the following figures and examples. However, these examples and figures should not be interpreted in any way as limiting the scope of the present invention.

FIGURES:

15 **Figure 1. SLITRK6 mRNA expression is induced under MAPK inhibitor treatment in BRAF-mutant melanoma cells.** A375, Lu1205, WM266-4 and WM983B cell lines were treated with a BRAF inhibitor (PLX4032) at 1 μ M alone or in combination with a 0.1 μ M MEK inhibitor (AZD6244). mRNA fold increase relative to the DMSO control is determined by Q-PCR. The results are presented as the mean \pm SD of the average of 3
20 independent experiments. *** p <0.001; T-test.

Figure 2. siRNA directed against SLITRK6 inhibit its expression of in metastatic melanoma cell lines. A375 and WM266-4 cells lines are first transfected with siRNAs against SLITRK6 or control siRNAs and then treated with PLX4032 at 1 μ M alone or in combination with the AZD6244 at 0.1 μ M for 72 h. The expression of SLITRK6 is analyzed by Western
25 Blot. Tubulin is used as loading control.

Figure 3. Concurrent inhibition of MAPK pathway and SLITRK6 triggers apoptosis in BRAF-mutant melanoma cells. A375 and WM266-4 cell lines are first transfected with siRNAs specific for SLITRK6 or control siRNAs and then treated with PLX4032 at 1 μ M alone or in combination with the AZD6244 at 0.1 μ M for 72 h. The kinetics
30 of activation of caspases 3 and 7 over time is monitored by fluorescence using Incucyte®. The data are standardized with respect to the number of cells per well at the end of the experiment. These results are representative of 2 experiments.

Figure 4. Concurrent inhibition of MAPK pathway and SLITRK6 triggers apoptosis in BRAF-mutant melanoma cells. A375 and WM266-4 cell lines are first

transfected with siRNAs specific for SLITRK6 or control siRNAs and then treated with PLX4032 at 1 μ M alone or in combination with the AZD6244 at 0.1 μ M for 72 h. Cleavages of caspase 3 and PARP are analyzed by Western Blot. Tubulin and actin are used as loading control. . These results are representative of 3 experiments.

5 **EXAMPLE:**

 The response of subjects suffering from a BRAF-mutated cancer to BRAF inhibitors is dramatically impaired by secondary resistances and rapid relapse. So far, the molecular mechanisms driving these resistances are not completely understood. Recently we showed that, inhibition of BRAF or its target MEK in BRAF-mutant melanoma cell lines induces RHOB
10 expression by a mechanism that depends on the transcription factor c-Jun (Oncotarget. 2015 Jun 20;6(17):15250-64). More particularly our findings reveal that BRAF inhibition activates a c-Jun/RHOB/AKT pathway that promotes tumor cell survival and further support a role of this pathway in the resistance of melanoma to vemurafenib. Following transcriptomic analyses we showed that activation of c-Jun induces the expression of SLITRK6 (SLIT and NTRK-like
15 family, member 6). In particular, we demonstrate that SLITRK6 expression is induced by Vemurafenib (PLX4032) (Figure 1). Furthermore the inhibition of its induction leads to apoptotic cell death (Figures 3 and 4) putting on light a synthetic lethal pathway through simultaneous BRAF (or MAPK pathway) inhibition and SLITRK6 down regulation. Thus, inhibition of SLITRK6 by an inhibitor of activity or expression should potentiate the antitumor
20 effect of MAPK inhibitors and avoid the emergence of a resistance to MAPK inhibitors. Furthermore the specific expression of the protein also paves the way of strategies based on depletion of the residual cancer cells by targeting them with anti-SLITRK6 antibodies capable of mediating ADCC or antibody-drug conjugates binding to SLITRK6.

REFERENCES:

25 Throughout this application, various references describe the state of the art to which this invention pertains. The disclosures of these references are hereby incorporated by reference into the present disclosure.

CLAIMS:

1. A method of treating a cancer associated with activation of the MAPK pathway in a subject in need thereof comprising administering to the subject a therapeutically effective combination comprising at least one MAPK inhibitor and an agent capable of inducing cell death of SLITRK6 expressing cancer cells.
5
2. The method of claim 1 wherein the subject suffers from a cancer characterized by a mutation in the MAPK pathway.
3. The method of claim 3 wherein the patients suffers from a NRAS mutated cancer or from a BRAF-mutated cancer.
- 10 4. The method of claim 1 wherein the subject suffers from a cancer selected from the group consisting of melanoma, multiple myeloma, lung cancer, colorectal cancer, thyroid carcinoma, blood cancer, leukemia, and lymphoma.
5. The method of claim 1 wherein the MAPK inhibitor is selected from the group consisting of MEK inhibitors and BRAF inhibitors
- 15 6. The method of claim 1 wherein the subject is administered with a combination comprising a BRAF inhibitor, a MEK inhibitor and an agent capable of inducing cell death of SLITRK6 expressing cancer cells.
7. The method of claim 1 wherein the MAPK inhibitor is verumafenib.
8. The method of claim 1 wherein the agent is an inhibitor of SLITRK6 expression.
- 20 9. The method of claim 1 wherein the agent is an antibody having binding affinity for SLITRK6.
10. The method of claim 9 wherein the antibody comprises heavy and light chain variable regions of an antibody designated Hal5-10acl2 produced by a Chinese Hamster Ovary (CHO) cell deposited under the American Type Culture Collection (ATCC) Accession No.: PTA-13102, wherein the heavy chain variable region of Hal5-10acl2 has the amino acid as set forth in SEQ ID NO:1, and the light chain variable region of Hal5-10acl2 has the amino acid sequence as set forth in SEQ ID NO:2.
25

11. The method of claim 9 wherein the antibody mediates antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity.
12. The method of claim 9 wherein the antibody is conjugated to an auristatin or a peptide analog, derivative or prodrug thereof.
- 5 13. A method of determining relapse in subject suffering from a cancer after a treatment regimen comprising administration of a MAPK inhibitor comprising i) detection the expression of SLITRK6 in a tumor sample obtained from the subject and ii) concluding that the subject relapses when the expression of SLITRK6 is detected at step i).
- 10 14. The method of claim 13 wherein the tumor sample results from the tumor resected from the subject, results from a biopsy performed in the primary tumor of the subject or performed in a metastasis distant from the primary tumor of the subject or is a sample of circulating tumor cells.
15. The method of claim 13 wherein detecting the expression of SLITRK6 is determined by detecting the quantity of mRNA encoding for SLITRK6 or by immunodetection.

ABSTRACT OF THE INVENTION**METHODS AND PHARMACEUTICAL COMPOSITIONS FOR THE
5 TREATMENT OF CANCERS ASSOCIATED WITH AN ACTIVATION OF THE
MAPK PATHWAY**

The response of subjects suffering from cancer to MAPK inhibitors is dramatically impaired by secondary resistances and rapid relapse. So far, the molecular mechanisms driving
10 these resistances are not completely understood. The inventors show that expression of
SLITRK6 (SLIT and NTRK-like family, member 6) is induced by a MAPK inhibitor (e.g.
Vemurafenib) and the inhibition of its induction in presence of the MAPK inhibitor induces
synthetic lethality. Thus, the only inhibition of SLITRK6 by an inhibitor of activity or
expression should potentiate the antitumor effect of the MAPK inhibitors and avoid the
15 emergence of a resistance to those compounds. Furthermore the specific expression of
SLITRK6 also paves the way of strategies based on depletion of the residual cancer cells by
targeting them with anti-SLITRK6 antibodies capable of mediating ADCC or antibody-drug
conjugates binding to SLITRK6.

Résumé

Il est clairement admis que la voie des MAPK est essentielle à la mélanomagenèse. Le développement de nouveaux médicaments ciblant cette voie, tels que les inhibiteurs de BRAF et/ou de MEK, a constitué une avancée majeure dans la prise en charge thérapeutique du mélanome. Cependant, les patients rechutent systématiquement sous traitement, ce qui suggère l'émergence de mécanismes de résistances. De nombreuses études montrent que l'expression et l'activation du facteur de transcription c-Jun sont induites après traitement de cellules de mélanome *BRAF*-mutées par des inhibiteurs de la voie des MAPK (MAPKi). De plus, la déplétion de c-Jun sensibilise ces cellules à ces inhibiteurs en induisant l'apoptose. Nous avons transfecté des lignées cellulaires de mélanome *BRAF*-mutées par des siARN dirigés contre c-Jun et traité ces cellules avec un inhibiteur de BRAF (PLX4032). Nous avons ensuite analysé l'expression du génome par une étude de transcriptomique afin de déterminer les gènes cibles de c-Jun qui pourraient être impliqués dans la réponse pharmacologique aux MAPKi. Cette étude a révélé que SLIT And NTRK Like Family Member 6 (SLITRK6) est un gène cible de c-Jun qui pourrait être associé à une réponse pharmacologique antitumorale aux MAPKi. En effet, l'ARNm et la protéine SLITRK6 sont induits dans les lignées cellulaires de mélanome *BRAF*-mutées après traitement par inhibiteur de BRAF seul ou en association avec un inhibiteur de MEK (AZD6244). Nous avons également montré que la combinaison des inhibiteurs de la voie des MAPK avec un anticorps conjugué à un cytotoxique ciblant SLITRK6 augmente la mort des cellules de mélanome *BRAF*-mutées en induisant de l'apoptose *in vitro*. Finalement, nos travaux montrent que SLITRK6 pourrait être une nouvelle cible pharmacologique pour le traitement du mélanome métastatique *BRAF*-muté et/ou être un biomarqueur potentiel de cellules résistantes aux MAPKi.

Mots clés : mélanome cutané / signalisation cellulaire / thérapies ciblées / résistance / inhibiteurs de la voie des MAPK / *BRAF*-muté / c-Jun / SLITRK6

Abstract

It is clearly recognized that the MAPK pathway is essential for melanomagenesis. The development of new drugs targeting this pathway such as BRAF inhibitors and/or MEK inhibitors has been a major advance in the therapeutic management of melanoma. However, patients still relapse suggesting the emergence of mechanisms of resistance. Many data show that both the expression and activation of the transcription factor c-Jun are induced after treatment of *BRAF*-mutant cells with MAPK pathway inhibitors (MAPKi). Furthermore, depletion of c-Jun sensitizes cells to these inhibitors triggering apoptosis. We depleted *BRAF*-mutant melanoma cell lines for c-Jun by siRNA and treated cells with a BRAF inhibitor (PLX4032). Whole genome expression was then analysed by transcriptomic study to determine target genes of c-Jun that could be associated with pharmacological response to MAPKi. This study revealed that SLIT And NTRK Like Family Member 6 (SLITRK6) is a target gene of c-Jun that could be associated with antitumor pharmacological response to MAPKi. Indeed, SLITRK6 mRNA and protein are induced in *BRAF*-mutant melanoma cell lines after BRAF inhibitor treatment alone or in combination with MEK inhibitor (AZD6244). We also show that the combination of MAPKi with an antibody conjugated with a cytotoxic drug targeting SLITRK6 increases *BRAF*-mutant melanoma cell death triggering apoptosis *in vitro*. Finally, our data show that SLITRK6 could be a new pharmacological target for the treatment of *BRAF*-mutant metastatic melanoma and/or a potential biomarker of resistant cells to MAPKi.

Keywords : cutaneous melanoma / cell signaling / targeted therapies / resistance / MAPK pathway inhibitors / BRAF mutant / c-Jun / SLITRK6