



HAL
open science

Développement et caractérisation d'une molécule antinéoplasique ciblant l'AMPK et MELK

Elisa Cavazza

► **To cite this version:**

Elisa Cavazza. Développement et caractérisation d'une molécule antinéoplasique ciblant l'AMPK et MELK. Biologie cellulaire. Université Côte d'Azur, 2021. Français. NNT : 2021COAZ6015 . tel-03546724

HAL Id: tel-03546724

<https://theses.hal.science/tel-03546724>

Submitted on 28 Jan 2022

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 DE DOCTORAT

Développement et caractérisation d'une molécule antinéoplasique ciblant l'AMPK et MELK

Elisa CAVAZZA

Centré méditerranéen de médecine moléculaire (C3M) – Equipe 12
– Unité INSERM U1065

**Présentée en vue de l'obtention
du grade de docteur en** Sciences de la Vie
et de la Santé.
Spécialité : Interactions Moléculaires et
Cellulaires
De l'Université Côte d'Azur

Dirigée par : Dr. Stéphane ROCCHI

Soutenue le : 13 Juillet 2021

Devant le jury, composé de :

*Dr Frédéric BOST, DR CNRS, C3M,
UCA – Président du jury*

*Dr Mehdi KHALED, CR INSERM, IGR,
Université Paris Saclay - Rapporteur*

*Dr Célio POUPONNOT, CR CNRS, Institut
Curie, Université PSL - Examineur*

*Pr. Caroline ROBERT, PUPH, IGR,
Université Paris Saclay - Rapportrice*

*Dr. Stéphane ROCCHI, DR INSERM, C3M,
Université Côte d'Azur – Directeur de thèse*

Développement et caractérisation d'une molécule antinéoplasique ciblant l'AMPK et MELK

COMPOSITION DU JURY :

Président du jury :

Docteur **Frédéric BOST**, Directeur de Recherche CNRS, responsable de l'équipe « *Targeting prostate cancer cell metabolism – Team 5* », Centre de Méditerranéen de Médecine Moléculaire (C3M), Université Côte d'Azur.

Rapportrice :

Professeure **Caroline ROBERT**, PUPH, responsable de l'équipe « *Resistance adaptative aux thérapies anticancéreuses* », Institut Gustave Roussy (IGR), Université Paris-Saclay.

Rapporteur :

Docteur **Mehdi KHALED**, Chargé de Recherche INSERM, responsable de l'équipe « *Oncogénèse et Progression tumorale* », Institut Gustave Roussy (IGR), Université Paris-Saclay.

Examineur :

Docteur **Célio POUPONNOT**, Directeur de Recherche CNRS, responsable de l'équipe « *Signalisation et progression tumorale* », Institut Curie, Université Paris Sciences et Lettres.

Directeur de thèse :

Docteur **Stéphane ROCCHI**, Directeur de Recherche INSERM, responsable de l'équipe « *Study of the melanocytic differentiation applied to vitiligo and melanoma - Team 12* », Centre de Méditerranéen de Médecine Moléculaire (C3M) - Université Côte d'Azur.

Mes trois premières années de thèse ont été financées par une Allocation du ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche.

Ma quatrième année de thèse a été financée grâce à l'obtention d'un contrat ATER (Attachée Temporaire à la Recherche et à l'Enseignement) à l'Université Côte d'Azur.

RESUMÉ

Développement et caractérisation d'une molécule antinéoplasique ciblant l'AMPK et MELK

Le **mélanome**, cancer de la peau au fort potentiel métastatique, représente aujourd'hui **plus de 280 000 cas**, dont plus de **60 000 décès**, chaque année dans le monde. Lorsqu'il atteint un stade métastatique, la **mortalité** de ce cancer augmente drastiquement et le **taux de survie** à 5 ans n'est plus que de **50%**. En effet, malgré les progrès significatifs apportés ces dix dernières années dans la **prise en charge thérapeutique** du mélanome métastatique avec l'arrivée des thérapies ciblées et des immunothérapies, plus de 50% des patients ne disposent pas de solution thérapeutique leur procurant une réponse efficace à long-terme. Aujourd'hui, il est donc primordial de trouver de nouvelles **stratégies thérapeutiques** pour ces patients.

Après s'être intéressé aux **propriétés anticancéreuses** de la Metformine, une molécule utilisée initialement en tant qu'antidiabétique, notre laboratoire a développé des composés **dérivés** de cette molécule en collaboration avec l'Institut de Chimie de Nice (ICN) afin d'améliorer les propriétés **pharmacocinétiques** et d'amplifier l'**effet antinéoplasique** de la Metformine, jusqu'alors insuffisant(es) pour apporter un bénéfice chez l'Homme atteint d'un mélanome en monothérapie (essai clinique NCT01840007). Nous avons alors identifié un composé, le **CRO15**, capable d'induire la mort des cellules cancéreuses à des doses 1000 fois moins importantes que la Metformine. Cette molécule provoque la mort des cellules cancéreuses par **autophagie** et **apoptose** par plusieurs mécanismes moléculaires. D'une part, le CRO15 va induire une perturbation de la respiration mitochondriale et provoquer l'activation de la voie **AMPK**. D'autre part, la molécule va inhiber directement la kinase **MELK**, un oncogène surexprimé dans de nombreux cancers, ce qui va induire l'activation de la protéine **p53**. Les deux voies induisent alors conjointement l'expression de la protéine **REDD1**, responsable de la mort cellulaire observée. De plus, dans des **xénogreffes** de cellules de mélanome chez la souris, CRO15 est capable de provoquer la diminution de la croissance tumorale.

Ensuite, étant donné les effets de la Metformine sur la **réponse immunitaire antitumorale**, notamment *via* l'activation de la voie AMPK, nous nous sommes intéressés au rôle de CRO15 dans cette réponse. Nous avons alors montré dans un modèle de carcinome de colon que CRO15 induisait, *in vivo*, la **potentialisation de la réponse aux anti-PD1** en termes de survie et de croissance tumorale chez des souris immunocompétentes. L'analyse des populations immunitaires infiltrant la tumeur indique que CRO15 induirait une diminution des **macrophages M2** dans ces tumeurs. De plus, nous avons montré *in vitro* que notre composé **modulait la polarisation** des macrophages humains en induisant la diminution de l'expression des marqueurs de surface M2, principalement. Bien qu'elles doivent être approfondies, ces données suggèrent qu'en plus de provoquer un effet cytotoxique dans les cellules cancéreuses, CRO15 serait capable de moduler la réponse immunitaire antitumorale pour favoriser l'élimination de la tumeur. Cette molécule serait donc un **candidat prometteur** dans le cadre de l'élaboration d'une nouvelle stratégie thérapeutique contre le mélanome et d'autres cancers solides.

Mots-clés : Mélanome – Traitements – AMPK – MELK – REDD1 - Immunothérapies

ABSTRACT

Development and characterization of an antineoplastic drug targeting AMPK and MELK

Melanoma is a skin cancer with a high metastatic potential. Today, over **280,000 cases** of melanoma are reported every year in the world, leading to the **deaths of more than 60,000 people**. These past ten years, the emergence of new treatments such as targeted therapies or immunotherapies significantly improved the **clinical management** of metastatic melanoma. Nevertheless, patients with metastatic disease still have a dismal prognosis with a **five-year survival** of just 50%. Hence, there is an urge to new therapeutic approaches to fight melanoma.

Our lab was first interested in **antitumoral properties** of an antidiabetic drug Metformin. Despite good antineoplastic effects observed *in vitro* and in mice, no benefit to late-stage melanoma patients was observed in a clinical trial (NCT01840007). To improve the pharmacokinetics and the antitumoral properties of Metformin, we screened derivative compounds to identify **CRO15**, effective on melanoma cells at doses thousand-fold lower without apparent toxicity for normal cells. This compound induces cancer cells death by **apoptosis** and **autophagy** with a dual mechanism. On the one hand, CRO15 disrupts the mitochondrial respiration and triggers the activation of the **AMPK pathway**. On the other hand, it inhibits the **MELK kinase** oncogene, triggering p53 activation. Both pathways come together to **increase REDD1 expression**, triggering cell death both *in vitro* and in a mouse model of melanoma xenograft.

Considering growing evidence of Metformin's effects in **antitumoral immune response** *via* the activation of the AMPK pathway, we studied the effects of CRO15 in this process. Using a colon carcinoma allograft model, we showed that CRO15 **potentiates the response to the anti-PD1**, reducing tumoral growth and improving the survival of immunocompetent but not immunocompromised mice. The analysis of the immune infiltrate suggests that our compound decreases the infiltration of the **M2 macrophages** in tumors. Besides, CRO15 influences the **polarization** of human macrophages *in vitro* and seems to decrease mostly M2 surface markers. Although these data need to be strengthened, they suggest that besides causing a cytotoxic effect, CRO15 could modulate the antitumoral immune response to promote the elimination of the tumor.

Altogether, our data suggest that CRO15 is a **promising drug candidate** opening new therapeutic strategies in the management of melanoma and other solid tumors.

Keywords: Melanoma – Treatments – AMPK – MELK – REDD1 - Immunotherapies

REMERCIEMENTS

Tout d'abord, je tiens à remercier tous les membres de mon jury d'avoir accepté d'évaluer mon travail de thèse :

Le Pr. Caroline Robert et le Dr. Mehdi Khaled en tant que rapporteurs, le Dr. Celio Pouponnot en tant qu'examineur, le Dr. Frédéric Bost en tant que président du jury et le Dr. Stéphane Rocchi en tant que directeur de thèse. Merci à vous tous pour le soin et l'attention que vous avez porté à mes travaux.

J'aimerais également remercier les membres de mon comité de suivi de thèse, le Dr. Laurent Boyer et le Dr. Célio Pouponnot pour leur bienveillance et leurs bons conseils lors de nos réunions annuelles. Merci d'avoir été ouverts à la discussion et de m'avoir guidé dans les moments charnières de mon projet de thèse.

Ensuite, je tiens vraiment à remercier mon directeur de thèse, le Dr. Stéphane Rocchi. Stéphane, depuis mon stage de master 1 je peux compter sur ton soutien indéfectible. Comme tu le sais, je suis passée par beaucoup de phases différentes pendant ma thèse : du stress des débuts de thèse à la pression de la fin de thèse, en passant par les moments difficiles sur mon projet initial et aux moments heureux lorsque le papier du projet « CRO15 » a été accepté, tu m'as toujours fait confiance. Quelques soient les difficultés que nous avons sur notre chemin, tu n'as jamais remis en cause ma parole ou mes résultats et tu ne m'as jamais incriminé pour cela. A chaque moment de doute, que ce soit au niveau professionnel ou même personnel, ta porte était ouverte pour discuter, avec compréhension et bienveillance. Tu as également su prendre les bonnes décisions au bon moment pour moi. Pour tout cela, je te respecte et je te remercie.

Je voudrais également remercier le Pr. Thierry Passeron, mon second chef d'équipe, pour sa gentillesse, ses bons conseils lors de nos réunions d'équipe et sa bonne humeur ! Merci aussi Thierry de m'avoir fait confiance lors de mon stage de master 2 et de m'avoir accompagnée lors de ce stage.

Ensuite, je voudrais remercier toute mon équipe. Et quelle équipe !

Fanny (Fafa), je ne sais pas vraiment par où commencer tellement les souvenirs et les anecdotes me viennent lorsque je pense à notre « duo ». Tu es arrivée au début de ma deuxième année de thèse

mais j'ai l'impression qu'on se connaît depuis bien plus longtemps. Lorsque tu as commencé à travailler sur le projet HA15 avec moi, notre collaboration est devenue tellement naturelle et évidente que j'avais du mal à me souvenir de comment c'était « avant ». Tu m'as beaucoup apporté, autant d'un point de vue professionnel que d'un point de vue personnel. Tout devenait plus facile et beaucoup moins stressant avec toi. Tu m'as apporté une certaine sérénité au laboratoire qui - tous les collègues qui m'ont connu avant te le diront - me manquait auparavant. Je n'oublierai jamais ton aide précieuse notamment à l'animalerie (la semaine et même les week-ends !), ta bonne humeur constante, ton écoute, et surtout le bon nombre de fou-rires qu'on a eu en manipulant ensemble. Merci de rigoler à mes blagues nulles (je me sens moins seule) ! Merci aussi pour les moments de détente en dehors du labo qu'on s'offrait de temps en temps toutes les deux (les petits restos de fin de manip' souris, les quelques après-midis shopping...) et toutes les bonnes discussions que nous avons eues à ces moments-là. Tu es une personne très consciencieuse dans son travail et qui veut toujours bien faire - tes collègues peuvent toujours compter sur ta motivation et ton soutien. Tu es comme une grande sœur de labo ; merci d'avoir été là pour moi. Et surtout : Aperooooooooo !

Patricia, ma petite Pat'. Tout d'abord, désolée pour toutes les fois où ma langue a fourché et où je t'ai appelé Pak x). Plus sérieusement, je te remercie pour ta présence et ton aide précieuse depuis mon 1^{er} stage de master ! Il nous a fallu quelques temps pour nous adopter l'une et l'autre, mais je pense pouvoir dire que cela valait le coup ! Tu es une personne au grand cœur, très riche de tes voyages à travers le monde et de tes expériences passées, qui se soucie du monde qui l'entoure. Au laboratoire, tu es un peu le pilier de l'équipe. J'ai pu profiter pendant ma thèse de ta grande expérience du labo : à chaque souci technique, tu as la solution ! Tu es également toujours volontaire et enthousiaste pour apprendre de nouvelles choses lorsque l'occasion se présente. Bien que tu m'aies épaulé tout au long de ma thèse, je retiens bien sûr particulièrement l'aide inestimable (technique et morale) que tu m'as apporté lors des révisions du papier. En pleine période de « déconfinement » et ses horaires aménagés (en mode tu lances le blot le matin, je le finis l'après-midi et on se donne un petit coup de fil tous les jours pour faire le point), on s'en souviendra longtemps de ces révisions (#REV46). Ce qui est sûr, c'est que sans ce travail d'équipe, je n'y serai pas arrivé, alors merci beaucoup ! Je te remercie également d'avoir été là tout simplement, dans les moments parfois délicats pour me soutenir mais surtout dans tous les bons moments passés ensemble pour rigoler, raconter n'importe quoi et partir en cacahuète !

Claire, appelée aussi Clairounette de Aups ! L'une des pionnières de l'équipe 12, toute petite à ses débuts (l'équipe, pas toi !). Tu es une personne très discrète et j'ai appris à te connaître au fur et à

mesure de mes années de thèse. Je suis toujours impressionnée par le nombre de manip' que tu peux lancer dans une journée (toujours en toute discrétion) lorsque tes cellules sont prêtes : tu envoies du lourd ! Toujours dans des projets très innovants (tu vois que je ne dis pas toujours du mal sur les projets « pigmentation » x)) et souvent avec du « challenge » technique, tu ne baisses jamais les bras. Nous n'avons pas beaucoup travaillé directement ensemble mais tu trouvais toujours un moment (malgré tes journées chargées) lorsqu'il y avait besoin de m'expliquer et de me montrer des manip's que je ne connaissais pas. Je te remercie donc pour ça mais surtout pour tous les repas sympathiques passés ensemble, lorsque tu craques complètement (souvent le jeudi ou le vendredi) et que cela part en vrille (j'espère que tu effaces ton historique internet de temps en temps !) et en fou-rires. Merci également pour les bonnes pâtisseries et desserts que tu nous prépares de temps en temps. C'est toujours un régal !

Nedra, pour moi tu fais toujours partie de l'équipe même si en cette fin de thèse ta présence nous fait cruellement défaut. J'adore ta spontanéité, ton dynamisme mais aussi ta générosité et cela me manque déjà. Tu es une boule d'énergie qui redouble d'efficacité pour pouvoir concilier ton travail et ta vie de famille (qui s'est agrandie). Quand tu es dans le labo et que dans l'empressement tu fais tomber un tube, toute la pièce est au courant grâce aux jolis noms d'oiseaux que tu donnes audit tube dans un langage que toi seule (dans la pièce) comprend. Cela me fait beaucoup sourire quand j'y repense et j'ai l'impression de t'entendre encore ! Merci pour ton sourire, tes emportements, ta franchise, tes pâtisseries tunisiennes (miam !), ton soutien (lors de nos manip souris en parallèle !), et ton rire (jusqu'au larmes !) mémorable, chantant et très communicatif. J'espère que tu vas pouvoir revenir vite au labo et dans l'équipe car je sais qu'il n'y a pas qu'à moi que tu manques.

Guillaume, dit aussi « GB l'ITA-CHU, consultant chez Yukin Therapeutic », un peu long comme nom... Toujours pour te faire remarquer ! Plus sérieusement, derrière ta nonchalance apparente et ta modestie tu as un bagage incroyable (scientifique Claire, je te vois rigoler !) et tu es une mine de savoir et d'informations (notamment pour les jeunes stagiaires ou thésards qui débutent). Professionnellement, tu es enfin considéré et récompensé à ta juste valeur et j'en suis très heureuse pour toi car tu le méritais (Profite, c'est bien parce que je suis en fin de thèse que je te dis des choses gentilles comme ça ! Ne prends pas trop l'habitude !). C'est assez bizarre à dire, mais merci pour toutes les vannes que tu m'envoyais à longueur de semaine et celles que tu me laissais te dire en retour. Même si parfois j'en prenais pour mon grade, tu as aiguisé mon autodérision et mon second degré et je suis prête à dégainer en retour maintenant ! Tu m'as également ouvert les yeux sur certaines choses et j'ai appris à mieux me connaître. On se ressemble peut-être plus qu'on ne veut bien l'admettre sur certains points (et ça fait flippeeeeeeeer !). Sans compter que j'ai aussi considérablement augmenté mes

réflexes pour attraper tout objet volant dans les pièces ! Cela dit, pour la santé mentale de Patricia, il vaudrait mieux que je te cache ta balle avant de partir. Bref, merci pour tout (Allez toi aussi tu y as le droit : Aperooooooooo !)

Thomas, el Toto le varois du Luc (pardon, de Le Luc !) ! Merci d'avoir été présent depuis (presque) le début de ma thèse. L'aventure CRO15 n'aurait pas été la même sans toi ! Derrière les blagues, tu as répondu présent lors des révisions du papier et tu nous as apporté ton aide et tes conseils précieux. Merci également d'avoir pris le temps de relire et corrigé certaines parties de ma thèse ! De manière générale, tu es toujours prêt à aider les étudiant(e)s en thèse (les personnes sans âmes ahah), à partager ton expérience avec nous, tu es toujours ouvert à la discussion et tu apportes ton soutien en cas de petit coup de blues passager (les manip's qui ne marchent pas, toi-même tu sais x)). Tu te soucies toujours du bien-être des personnes qui t'entourent et tu es quelqu'un de bien. Après tous tes efforts, je suis vraiment très contente pour toi que tu aies obtenu ton poste et j'espère que tu vas pouvoir en profiter à fond ! Tu vas me manquer avec toutes tes petites anecdotes, tes jeux de mots et ton accent chantant. Merci aussi pour les découvertes musicales : j'ai une petite pensée pour toi à chaque fois que j'écoute « Paris Combo » !

Michaël, je te vois d'ici râler de la longueur de mes remerciements et ça me fait sourire : « Oh la la la la ! Huit pages de remerciements, elle a encore écrit un pavé ! On ne va quand même pas lire tout ça ! ». J'espère tout de même que tu arriveras jusqu'à cette partie, même si tu sautes tous les autres paragraphes. Mica, quand tu es arrivé au labo (ou plutôt revenu puisque tu étais là bien avant moi) j'étais déjà bien avancé dans ma thèse et donc déjà un petit peu en mode « craquage » (je n'ai pas pu faire illusion bien longtemps !). Même si je te connais depuis moins longtemps que les autres, je t'ai finalement assez vite adopté. J'aime ta philosophie de vie, avec toi tout est simple (« Y'a pas de problème ! »). Il n'y a pas besoin d'avoir été très longtemps avec toi au labo pour comprendre que tu aimes profondément ton métier (ou ton loisir comme tu dis :p). Tu m'as fait prendre du recul quand j'en avais besoin, et tu m'as presque réconcilié avec le métabolisme (qui me fait un peu moins peur qu'avant) ! Merci pour tous tes conseils sur les manip's (notamment celles d'immuno), pour les discussions scientifiques (et autres !) et pour les bières partagées (ton autre loisir ahah). Je suis également très contente que tu aies eu ton poste, et même si je n'ai pas besoin de te le dire : profite-en bien !

Gilbert, sacré Gigi ! Je te remercie pour toutes les petites attentions que tu as au laboratoire pour nous rendre la vie plus facile. Avec toi tout est carré et clean, et même si j'aime bien te taquiner

avec ça de temps en temps, c'est une qualité appréciable en laboratoire ! Tu es une personne gentille, serviable et d'une grande sensibilité et c'est agréable de discuter avec toi (quand tu ne fais pas le cake :p). Merci de faire le DJ en fin du déjeuner pour mettre un petit peu l'ambiance, et surtout merci pour tes mini spectacles d'imitation : tu as un talent certain pour nous faire bien rire. A quand le one-man-show spécial labo ? ;)

Marjorie, ou plutôt Marjo. On n'a pas beaucoup eu l'occasion de travailler ensemble au labo (chacune sur nos projets un peu différents) mais nos petites sorties en dehors du labo : balade/rando du dimanche ou les soirées « coucous » ou anniversaire étaient bien agréables ! Même si de prime abord tu es une « grande râleuse » (tu ne diras pas le contraire je pense, ahah), moi ça me fait toujours un peu sourire et c'est toujours très sympa de partager un petit peu de temps avec toi et de papoter toutes les deux (et/ou avec Djampa). Je me souviendrais toujours de la rando de Peillon pendant laquelle j'ai perdu mon chien (juste après avoir dit : je connais quelqu'un qui a perdu son chien une fois en balade x)) et vous m'avez aidé à le chercher pendant plus d'une heure (ou 2 ?!). Heureusement que vous étiez là. Bref, merci pour ta compagnie au labo mais surtout en dehors du labo !

Meri, I would like to thank you being my supervisor during my “master 2 internship”. It seems to be quite a long time ago now... But I remember it was a nice experience and a nice project (which leads to a good paper!). I also learned to speak English more easily with you as I was practicing every day (I admit I lost it a little bit since then :/). I also thank you for the help you provide me during my thesis and for your cheerfulness!

Hanene, je te connais depuis mon master 1 dans l'équipe 1 et depuis ce jour là tu as toujours été très bienveillante avec moi. Tu es une personne très discrète qui n'a jamais un mot plus haut que l'autre et ça fait du bien. Merci pour ta gentillesse et ton soutien. Je te trouve très courageuse de t'être lancée dans une thèse après une pause dans tes études, courage pour la fin de ta thèse qui s'annonce déjà très bien !

Lauriane, tu as rejoint l'équipe pendant ton stage de master 2 et le courant est tout de suite bien passé avec ta bonne humeur et ton entrain naturel. Je sais que ta thèse n'est pas forcément facile tous les jours avec un projet pas forcément évident et surtout des mélanocytes de patients qui poussent comme ils en ont envie, mais garde courage, tu es sur la bonne voie ! Je te remercie pour les échanges sympathiques que nous avons eus (notamment dans ma voiture, quand je te déposais sur le chemin de la musique).

Adrien, tu es le petit jeunot de l'équipe (mais pas beaucoup plus jeune que moi, n'est-ce pas ?! Gare à toi si tu dis encore le contraire - même si tu fais une tête et demie de plus que moi !). Je te remercie pour les petits mots gentils et les petits compliments que tu nous fais au labo et qui font plaisir :) Je suis contente de te voir vivre cette grande aventure de la paternité ! Profite bien de Léa et d'Eden dans votre nouvelle vie à trois !

Ana, I met you only few weeks ago and unfortunately we won't have so many time to get to know each other. You seem to be a nice girl (and I'm sure you are since you told me you're a big fan of Harry Potter :p) and a good scientist ! Thank you answering my naïve questions about metabolism. I hope you will enjoy your postdoc experience in the team :)

Je souhaiterai également remercier les anciens membres de l'équipe :

Tout d'abord Caroline. Caro, tu étais là à mes tous débuts de thèse et c'était très sympathique de partager ces premiers mois de thèse avec toi. Même si j'aurais aimé que tu restes un peu plus à Nice, je suis contente que tu aies pu rejoindre Romain à Lyon et je te souhaite plein de bonheur avec votre Elias, nouveau venu :)

Laura, merci pour les bons moments passés en congrès et pour l'aide que tu m'as apportée lors de mon stage de master 2 ! J'espère que tout va bien pour toi et ta famille en Australie :)

Emilie, nous ne nous sommes pas croisées très longtemps pendant ma thèse mais je te remercie d'avoir initié et énormément travaillé sur le projet CRO15 ! Merci aussi pour ta disponibilité (même à distance) lorsque j'avais des questions :)

Et enfin Marwa ! Ma petite Marwa, tu me manques avec ton rire sonore et franc, ton dynamisme et ton énergie positive ;) Avec ta personnalité aimable et serviable ponctuée de ton caractère bien trempé (et c'est pour ça qu'on t'apprécie aussi), tu ne te laisses jamais abattre malgré les embûches posées sur ton chemin et c'est pour ça qu'on t'apprécie aussi ! Tu es une combattante de la recherche (et de la vie en général je pense) et je t'ai toujours admiré pour ça et pour ta grande pertinence scientifique ! Merci pour l'aide que tu m'as apporté pendant ma thèse, pour les discussions scientifiques et celles moins scientifiques le soir quand j'avais besoin de parler et d'être reboostée :p J'espère que tu t'éclates en post-doc à New York mais cela ne fait aucun doute pour moi :)

Je voudrais également remercier l'équipe du Dr. Rachid Benhida de l'Institut de Chimie de Nice, et notamment le Dr. Cyril Ronco, pour nous avoir donné (avec Emilie), l'opportunité de travailler sur ce projet !

Ensuite, je tiens à remercier d'autres équipes du C3M : L'Equipe 2 du Dr. Patrick Auberger bien sûr, et notamment Arnaud, Paul et Mathilde. Arnaud, merci pour les heures passées au FACS à tester et optimiser les marquages sur les tumeurs avec moi. Merci également bien sûr d'avoir partagé ton expertise des macrophages avec moi. Je remercie Paul et Mathilde pour les manip's de polarisation de macrophages que nous avons fait ensemble :) C'était très agréable de collaborer avec vous – on se sent bien accueillie dans votre labo (sauf quand j'ai besoin de beaucoup trop de macrophages pour mes manip's et que vous me regardez avec des yeux ronds quand je vous annonce le chiffre, ahah) ;) J'en profite pour remercier également Patrick, le directeur du centre, pour sa sympathie, sa bonne humeur et sa disponibilité !

Je remercie également l'équipe 1, du Dr. Robert Ballotti et le Dr. Corine Bertolotto, de m'avoir accueillie dans leur équipe en début de thèse lorsque notre équipe n'était pas encore créée.

Je remercie également toutes les plateformes du centre, et notamment l'animalerie avec Véronique Corcelle (la responsable) et tout le personnel animalier (Alex, Vincent, Sandrine et Yannick), la gestion (notamment Dominique !) et la plateforme de microscopie avec Maeva Gesson (anciennement) et Marie Ironnelle, pour l'aide qu'ils m'ont apporté pendant ma thèse.

Enfin, je tiens vraiment à remercier ma famille et mes amis.

Merci à mon père et à ma mère, qui m'ont laissé (il y a quelques années maintenant) partir à Nice et qui m'ont de manière générale toujours soutenue et encouragée pendant toutes mes années d'études (même si la distance n'est pas toujours facile). Si j'en suis arrivée là aujourd'hui c'est aussi grâce à vous, à l'éducation et l'amour que vous m'avez donné. Merci.

Merci à mes deux sœurs, Joanna et Annaëlle, pour leurs encouragements pendant ma thèse et merci d'avoir porté autant d'intérêt à ce que je faisais, même si nous sommes toutes dans des domaines d'études/professionnels différents :) Merci pour les moments des retrouvailles (week-ends à Montpellier ou à Nice - ou à Noël en Lorraine) qui ont fait du bien ! Annaëlle (ptite tête :p) je te rejoins dans ta galère de préparation de l'Agreg' l'année prochaine – cette fois-ci ça va le faire pour toi j'en suis sûre ;) Je suis fière de toi et du travail déjà accompli. Joanna, je suis également fière de toi et de

ta progression professionnelle rapide !! Merci à tous de venir de loin pour ma soutenance : ça compte beaucoup pour moi.

Je remercie également mes amis : tout d'abord merci à mes amis de Lorraine (Aurore, Morgane, Mickaël, Sylvie, Mélanie, etc) de prendre de mes nouvelles à distance. Lorsque je remonte en Lorraine (souvent aux moments des fêtes de Noël), c'est une bouffée d'air de tous vous voir ! Une petite mention spéciale à Aurore qui m'a particulièrement encouragé dans cette thèse et qui s'est intéressée à mon projet de recherche et à son avancée à chaque fois qu'on se voyait ! :) Désolée de ne pas pouvoir t'appeler très souvent ma poulette, mais le cœur y est.

Ensuite, merci à mes amis de Nice (Baptiste, Sol, Margaux, Marie-Angela, Fabien, Vincent, Clémence, Olivia, Miguel, Eugénie...) d'avoir été là pour moi depuis la première année de master (pour la plupart). Vous avez rendu ces années à Nice loin de ma famille et de mes amis d'enfance vraiment sympathiques ! Merci pour les révisions à la BU ensemble, les coups de mains et les « serrages de coude » en cas de petit coup de mou, et merci aussi pour tous les très bons moments : les apéros plages et les soirées vieilles villes (avant covid surtout...), les soirées dans le grand appart de Baptiste et Sol, les fou-rires, les randonnées, etc... Vous êtes devenus de vrais amis en seulement quelques années et je suis contente de vous connaître aujourd'hui !

Je remercie également ma belle-famille : Ana, Roberto, Anaïs, Matthieu et Théo ! Ana, merci pour les bons repas du dimanche, pour les bonnes discussions et les rigolades et pour ton soutien à toute épreuve. Anaïs, merci pour ta gentillesse, tes conseils, tes bonnes pâtisseries healthy :p Je suis très contente que tu puisses venir à ma thèse ! Roberto, merci notamment de t'être occupé de tous mes petits soucis mécaniques ;) Théo et Matthieu, merci pour votre bonne humeur et votre bienveillance.

Et enfin, parce que j'ai gardé le meilleur pour la fin, Gaby. Pour avoir traversé cette thèse avec moi (et bien plus que cette thèse d'ailleurs), pour avoir accepté les compromis que j'ai dû faire sur notre vie de couple pour réussir, pour avoir supporté mes humeurs changeantes pendant ces quatre ans, les horaires compliquées, et le travail à la maison, merci. Pour m'avoir soutenue dans les moments difficiles (lorsque mon projet n'avancait pas et que je remettais tout en question) et t'être réjoui dans les moments heureux (comme l'acceptation du papier), merci. Pour avoir pris en charge une grosse partie des tâches à la maison lorsque j'étais trop occupée au labo, merci. Pour avoir cru en moi, merci. Pour m'avoir changé les idées et m'avoir fait rire les soirs où j'avais besoin de ça, merci. Pour tout ça, et pour être resté à mes côtés malgré ces difficultés, pour m'avoir donné ton amour et ton soutien, tu mériterais d'obtenir une partie de ce diplôme avec moi.

TABLE DES MATIÈRES

INTRODUCTION	1
A. Le mélanome cutané métastatique : origine, développement et stratégies thérapeutiques	1
1. Les mélanocytes, cellules épidermiques au rôle protecteur	1
1.1. Structure de la peau	1
1.2. Le mélanocyte, un composant cellulaire de l'épiderme	2
1.3. Rôle des mélanocytes dans la production de mélanine et dans la défense contre les rayonnements UV	2
2. Le mélanome cutané	3
2.1. Epidémiologie du mélanome cutané	4
2.2. Facteurs de risque associés au développement du mélanome	5
2.2.1. Les facteurs constitutionnels	5
2.2.2. Les facteurs environnementaux	6
2.3. Diagnostique et pronostic des mélanomes cutanés	6
2.4. Les différentes étapes de la transformation mélanocytaire	8
2.5. Les altérations intrinsèques et environnementales responsables du développement du mélanome	10
2.5.1. Les modifications génétiques associées au mélanome cutané	10
2.5.1.1. Altération de la voie des MAP kinases : activation constitutive d'une voie de prolifération	11
2.5.1.2. Altération d'autres voies de signalisation impliquées dans le cycle cellulaire, la prolifération ou l'apoptose.	13
2.5.2. Impact de l'environnement sur la croissance du mélanome : implication des cellules du système immunitaire	15
2.5.2.1. Le phénomène d'Immunoediting : zoom sur le mélanome	16
(i) La phase d'élimination	17
(ii) La phase d'équilibre	19
(iii) La phase d'échappement	21
2.6. Traitements actuels et nouvelles stratégies thérapeutiques	26
2.6.1. Prise en charge clinique actuelle des patients avec une mélanome cutané métastatique	26
2.6.1.1. Les thérapies ciblées : en monothérapie ou en combinaison	26
2.6.1.2. Les anticorps monoclonaux : L'émergence d'une immunothérapie révolutionnaire	28
2.6.1.3. Les phénomènes de résistance aux immunothérapies	29
(iv) Les résistances primaires et adaptatives aux immunothérapies	30
(v) Les résistances acquises aux immunothérapies	33
2.6.2. Les nouvelles stratégies thérapeutiques basées sur l'Immunothérapie	34
2.6.2.1. L'immuno-virothérapie oncolytique T-VEC	34
2.6.2.2. Le Transfert Adoptif de Cellules : « TIL » et lymphocytes génétiquement modifiés	35
2.6.3. Les combinaisons de thérapie : une stratégie qui pourrait être gagnante	40
2.6.3.1. Les combinaisons d'immunothérapies et de thérapies ciblées	40
2.6.3.2. La modulation du métabolisme : un soutien pour les thérapies existantes	41
B. Implication de ciblage de la voie AMPK dans le cancer	44
1. Généralités, régulation et fonction originelle de l'AMPK	44
2. Mécanisme d'activation de la voie de l'AMPK par la Metformine	46
3. La voie AMPK : Effets sur la prolifération et la mort cellulaire	48
3.1. Effets sur la prolifération des cellules	48
3.2. Effets sur l'autophagie	49
3.3. Effets sur l'apoptose	51

4. Effets de la Metformine dans le cancer : de la cellule cancéreuse à son environnement	53
4.1. Effets directs de la Metformine sur les cellules cancéreuses	53
4.1.1. Effets de la Metformine dans le cancer	53
4.1.2. Effets de la Metformine dans le mélanome	55
4.2. Effets de la Metformine dans la réponse immunitaire antitumorale	57
4.2.1. Effets sur les lymphocytes	57
4.2.2. Effets sur les cellules myéloïdes	59
5. Les dérivés de la Metformine dans le traitement contre le mélanome	61
C. MELK, une cible thérapeutique potentielle dans le mélanome	63
1. Généralités sur MELK	63
2. Fonctions de MELK	64
2.1.1. Implication de MELK dans le développement embryonnaire	64
2.1.2. Rôle de MELK dans la prolifération et le cycle cellulaire	64
2.1.3. Effets de MELK sur l'apoptose	66
2.1.4. Effets de MELK sur la voie des dommages à l'ADN	67
3. Régulation de MELK	68
4. Implication de MELK dans le cancer et le mélanome	69
4.1. MELK agit comme un oncogène : une idée solide mais controversée	69
4.2. Rôle de MELK dans la réponse immunitaire antitumorale	71
D. REDD1, protéine de la mort cellulaire au carrefour de l'hypoxie et de la réponse aux dommages à l'ADN médiée par p53	72
1. Généralités sur REDD1	72
2. Régulation de REDD1	72
2.1. Réponse de REDD1 à l'hypoxie	73
2.2. Réponse de REDD1 aux dommages à l'ADN : implication de p53	74
2.2.1. Fonctions de p53 : Réparation des dommages à l'ADN, Arrêt du cycle cellulaire et Apoptose	75
2.2.2. Régulation de p53	77
3. Les fonctions cellulaires de REDD1	77
3.1.1. Effets sur la prolifération et la mort cellulaire	77
3.1.1. Effets de REDD1 sur la régulation mitochondriale	79
4. Rôle de REDD1 dans le cancer	80
RESULTATS	82
A. Résultats publiés	82
1. Contexte et hypothèse de travail	82
1. Synthèse des résultats obtenus	83
B. Résultats non publiés	116
1. Contexte et hypothèse de travail	116
2. Résultats obtenus	117
2.1. Choix du modèle d'étude	117
2.2. CRO15 induit une réponse antitumorale chez la souris dépendante du contexte immunitaire	118
2.1. CRO15 potentialise la réponse immunitaire aux anti-PD1 dans un modèle de carcinome de colon	118

2.1.1.	CRO15 améliore la réponse antitumorale aux anti-PD1 dans un modèle d'allogreffe de CT26	118
2.1.2.	CRO15 diminue l'infiltrat tumoral des cellules myéloïdes immunosuppressives	119
2.2.	CRO15 module la polarisation des macrophages <i>in vitro</i>	120

DISCUSSION ET PERSPECTIVES ***122***

A. *Caractérisation des effets cytotoxiques de CRO15 dans les cellules cancéreuses* ***122***

1. Dérégulation métabolique mitochondriale induite par CRO15 122
2. CRO15 induit une activation de la voie AMPK qui provoque la mort des cellules cancéreuses 123
3. Inhibition de la kinase MELK par CRO15 125
4. Induction de la mort des cellules de mélanome par autophagie et apoptose liée à REDD1 127
5. Effet de CRO15 sur les cellules de mélanome résistantes aux inhibiteurs de BRAF 129
6. Effet de CRO15 dans les xénogreffes de cellules de mélanome 130

B. *Caractérisation du rôle de CRO15 dans la réponse immunitaire antitumorale* ***131***

1. Importance du contexte immunitaire et du choix du modèle cellulaire dans la réponse antitumorale médiée par CRO15 132
2. Potentialisation par CRO15 de la réponse aux anti-PD1 133

BIBLIOGRAPHIE ***142***

ANNEXES ***179***

TABLE DES ILLUSTRATIONS

PARTIE INTRODUCTION :

Figure 1 : Structure de la peau

Figure 2 : La mélanogénèse, processus physiologique complexe au sein du mélanocyte

Tableau 1 : Classification des différents phototypes cutanés

Figure 3 : Dépistage des nævi anormaux par la règle ABCDE

Tableau 2 : Les différents stades du mélanome cutané

Figure 4 : Etapes de la transformation du mélanocyte au mélanome

Figure 5 : Evènements phénotypiques clés lors de la pathogénèse et de la progression du mélanome

Tableau 3 : Distribution des principales altérations génétiques retrouvées chez des patients présentant un mélanome cutané

Figure 6 : Classification génétique des mélanome cutanés en 4 sous-types

Figure 7 : Voie de signalisation des MAP Kinases

Figure 8 : Principaux processus biologiques et voies de signalisation altéré(e)s dans le mélanome

Figure 9 : Composition du microenvironnement et progression tumorale

Figure 10 : Concept d'Immuno-édition (« Immunoediting ») du cancer

Figure 11 : Elimination d'une tumeur de mélanome par des cellules immunitaires effectrices

Figure 12 : Représentation simplifiée de la polarisation des macrophages et des neutrophiles et fonctions associées dans le cancer

Figure 13 : Mécanismes d'échappement immunitaire dans le mélanome

Figure 14 : Génération de MDSCs (*Myeloid Derived Suppressor Cells*) en condition tumorale

Figure 15 : Machinerie de présentation antigénique par le CMH I

Figure 16 : Principales thérapies systémiques utilisées dans le mélanome cutané métastatique

Figure 17 : Mode d'action des inhibiteurs d'anti-CTLA4 et de PD-1 en immunothérapie

Figure 18 : Mécanismes de résistance aux immunothérapies intrinsèques à la cellule tumorale

Figure 19 : Mécanismes de résistance aux immunothérapies extrinsèques à la cellule tumorale

Figure 20 : Mode d'action du virus oncolytique T-VEC

Figure 21 : Schéma général de l'utilisation du transfert de cellules de TILs autologues

Figure 22 : Stratégie pour le traitement de patients cancéreux avec des lymphocytes T reconnaissant des néoantigènes tumoraux

Figure 23 : Génération de LT modifiés génétiquement avec un TCR ou un CAR

Figure 24 : Stratégies génétiques combinatoires pour augmenter la tolérance et l'efficacité des LT-CAR

Figure 25 : L'activité métabolique altérée des cellules cancéreuses altèrent le métabolisme des cellules immunitaires

Tableau 4 : Liste des essais cliniques actuels combinant des molécules ciblant le métabolisme et un traitement par immunothérapie

Figure 26 : Structure et régulation de la kinase AMPK

Figure 27 : Régulation des voies métaboliques par l'AMPK

Figure 28 : Représentation schématique de la chaîne respiratoire mitochondriale

Figure 29 : Rôle multifacette de l'AMPK dans la cellule

Figure 30 : Rôle de l'AMPK sur la prolifération et le cycle cellulaire

Figure 31 : Régulation de l'autophagie par l'AMPK et mTORC1

Figure 32 : Voies extrinsèques et intrinsèques de l'apoptose

Figure 33 : Inhibition de mTORC1 par la Metformine

Figure 34 : Effets de la Metformine sur les cellules de mélanome

Figure 35 : Effets de la Metformine sur les cellules immunitaires du microenvironnement tumoral

Figure 36 : Représentation schématique de la structure de MELK

Figure 37 : Rôle de MELK dans la prolifération cellulaire et l'apoptose

Figure 38 : Mécanisme global de la voie de réparation des dommages à l'ADN

Figure 39 : Induction de la polarisation M2 des macrophages par MELK dans le sarcome utérin

Figure 40 : Exemples d'interactions de p53 avec les voies de réparation des dommages à l'ADN

Figure 41 : Mécanismes principaux de régulation du cycle cellulaire et de l'apoptose par p53

Figure 42 : Effets de REDD1 sur la prolifération des cellules et la mort cellulaire

PARTIE RESULTATS :

Figures de l'article:

Fig. 1: CRO15 exerts a deleterious effect on melanoma cell viability.

Fig. 2: CRO15 induces a mitochondrial disorder and activates AMPK pathway.

Fig. 3: CRO15 inhibits MELK kinase activity.

Fig. 4: CRO15 treatment induces p53 pathway activation.

Fig. 5: CRO15 mediates the activation of autophagy and apoptosis in melanoma cells.

Fig. 6: CRO15 decreases tumor growth in mouse models.

Fig. 7: CRO15 induced death in melanoma cells resistant to BRAF inhibitors

Figure R1 : Modèle du mode d'action de CRO15 sur les cellules de mélanome

Figure R2 : La réponse antitumorale de CRO15 est dépendante du contexte immunitaire de la souris

Figure R3 : CRO15 potentialise la réponse aux anti-PD1 dans les tumeurs de CT26

Figure R4 : CRO15 diminue l'infiltrat de cellules myéloïdes immunosuppressives dans les tumeurs de CT26

Figure R5 : CRO15 module la polarisation des macrophages *in vitro* par effet direct

LISTE DES ABBRÉVIATIONS

4E-BP1 : <i>Eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1</i>	BTLA : <i>Band T lymphocyte Attenuator</i>
A2AR : <i>Alpha-2A adrenergic receptor</i>	C/EBP β : <i>CCAAT/enhancer binding protein β</i>
ACC1/2 : <i>Acetyl-Coenzyme A Carboxylase 1 and 2</i>	CaMK : <i>Calcium-Calmodulin-Kinases</i>
ADN : <i>Acide Désoxyribonucléique</i>	CaMKKb : <i>Ca²⁺/Calmodulin-Dependent Protein Kinase Kinase b</i>
ADP : <i>Adenosine Di Phosphate</i>	CAR : <i>Chimeric Antigen Receptor</i>
AEM : <i>Agence Européenne du Médicament</i>	CCDN1 : <i>G1/S-specific cyclin-D1</i>
AG : <i>Acides Gras</i>	CCL5 : <i>CC-motif ligand 5</i>
AhR : <i>Aryl Hydrocarbon Receptor</i>	CCLX : <i>Chemokine C-C-motif ligand X</i>
AICAR : <i>5-Aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleotide</i>	CCRX : <i>C-C chemokine receptor type X</i>
AID : <i>Autoinhibitory Domain</i>	CD : <i>Cellule dendritique</i>
AMM : <i>Autorisation de Mise sur le Marché</i>	CDC25A : <i>Cell division cycle 25A</i>
AMP : <i>Adenosine Mono Phosphate</i>	CDK : <i>Cyclin Dependant Kinase</i>
AMPK : <i>AMP-Activated Protein Kinase</i>	CDKi : <i>CDK inhibitors</i>
AP-1 : <i>Activator-Protein 1</i>	CDKN1A : <i>Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor 1A</i>
Arg-1 : <i>Arginase 1</i>	CDKN2A : <i>Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor 2A</i>
ARID1A/B : <i>AT-Rich Interaction Domain 1</i>	CHK1/2 : <i>Cell cycle checkpoint kinase 1/2</i>
ASK1 : <i>Apoptosis-Signal-Regulating-Kinase-1</i>	CMTM4 : <i>CKLF-like MARVEL Transmembrane domain-containing protein 4</i>
ATF3 : <i>Activating Transcription Factor 3</i>	COX2 : <i>Cyclooxygenase-2</i>
ATG : <i>AuTophagy-related proteins</i>	CPA : <i>Cellule Présentatrice d'Antigène</i>
ATM : <i>Ataxia Telangiectasia Mutated</i>	CSF : <i>Granulocyte-Colony Stimulating Factor</i>
ATP : <i>Adenosine Tri Phosphate</i>	CSPG4 : <i>melanoma-associated chondroitin sulphate proteoglycan</i>
BAD : <i>Bcl-2 Antagonist of cell Death</i>	CTE : <i>Chaîne de Transport d'Electron</i>
BAK : <i>Bcl2-Antagonist/Killer</i>	CTLA4 : <i>Cytotoxic T-Lymphocyte-Associated protein 4</i>
BAP1 : <i>BRCA1 Associated Protein 1</i>	CTSA : <i>Cellular Thermal Shift Assay</i>
BAX : <i>Bcl-2-associated X</i>	CUL4A : <i>Cullin 4A</i>
BBC3 : <i>Bcl-2 Binding Component 3</i>	CXCLX : <i>Chemokine (C-X-C motif) ligand X</i>
BER : <i>Base Excision Repair</i>	DAMPs : <i>Damage-associated Molecular Pattern molecules</i>
BMDM : <i>Bone Marrow Derived Macrophages</i>	DCT : <i>Dopachrome tautomérase</i>
B-Myb : <i>MYB Related Protein B</i>	DDB1 : <i>DNA Damage Binding 1</i>
BRAF ⁱ : <i>inhibiteurs de BRAF</i>	DDIT4 : <i>DNA Damage Inducible Transcript 4</i>
BRCA 1/2 : <i>Breast Cancer 1/2</i>	
BRD4 : <i>Bromodomain-containing factor 4</i>	

DDR : *DNA Damage Response*
 DEPTOR : *DEP domain-containing mTOR interacting protein*
 DIABLO : *Direct Inhibitor Of Apoptosis- Binding Protein With Low pI*
 DMSO : *Diméthylsulfoxyde*
 DNAM-1 : *DNAX accessory molecule-1*
 DTT : *Dithiotréithiol*
 E2F : *Transcription Factor E2*
 E2F1 : *E2F Transcription Factor 1*
 ECAR : *Extracellular Acidification Rate*
 EF2 : *Elongation Factor 2*
 EFEMP1 : *EGF-containing fibulin-like extracellular matrix protein 1*
 EGF : *Epidermal Growth Factor*
 eIF2A : *eukaryotic Initiation Factor 2A*
 eiF4E : *eukaryotic translation initiation Factor 4E*
 Elk-1 : *ETS-like-1*
 Eomes : *Eomesdermin*
 ERAD : *Endoplasmic Reticulum-Associated protein Degradation*
 ERK1/2 : *Extracellular Signal-Regulated Kinase 1/2*
 FAC : *Fibroblastes Associés au Cancer*
 FADH2 : *Dihydroflavine-adenine dinucleotide*
 FAK : *Focal Adhesion Kinase*
 FAS : *First Apoptosis Signal Receptor*
 FDA : *Food and Drug Agency*
 FGF-2 : *Fibroblast Growth Factor 2*
 FHA : *Forkhead Associated Domain*
 FKHR : *Forkhead Transcription Factor*
 FOXM1 : *Forkhead Box M1*
 FOXO3 : *Forkhead Box O3*
 FoxP3 : *Forkhead box P3*
 GADD153 : *Growth Arrest and DNA Damage inducible gene 153*
 GADD45 α : *Growth Arrest And DNA Damage Inducible α*
 GAP : *GTPase activating protein*
 GDA : *GEM-Derived Allografts*
 GEM : *Genetically Engineered Mouses*
 GF : *Growth Factors*
 GLUT-1/4 : *Glucose Transporter 1/4*
 GM-CSF : *Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor*
 Grb2 : *Growth Factor Receptor-Bound Protein 2*
 GSK3 β : *Glycogen Synthase Kinase 3 β*
 H2AX : *Histone H2A family member X*
 HES1 : *Hes Family BHLH Transcription Factor 1*
 HGF : *Hepatocyte Growth Factor*
 HIF-1 α : *Hypoxia Inducible Factor 1 alpha*
 HMB45 : *Human Melanoma Black-45*
 HMGB1 : *High Mobility Group protein B1*
 HR : *Homologous Recombination*
 HRE : *Hypoxia Responsive Element*
 HSV : *Herpes Simplex Virus*
 iCAR : *CAR inhibitor*
 ICB : *Immune Chekcpoint Blockers*
 ICI : *Immune Checkpoint Inhibitors*
 ICN : *Institut de Chimie de Nice*
 ICP34.5 : *Infected Cell Protein 34.5*
 ICP47 : *Infected Cell Protein 47*
 IDO : *Indoleamine 2,3-dioxygénase*
 IFN : *Interferon*
 IGF : *Insulin Growth Factor*
 I κ B- β : *NF- κ B inhibitor β*
 IL-X : *Interleukin X*
 IMP : *Inosine Monophosphate*
 iNOS : *inducible Nitric Oxyde Synthase*
 IPRES : *Innate anti-PD-1 Resistance Signature*
 IR : *Rayons Ionisants*
 irRC : *immune related Response Criteria*
 JAK : *Janus kinase*
 JARID1B : *Jumonji/ARID domain-containing protein 1B*

JNK : *c-Jun N-terminal Kinase*
 KA1 : *Kinase-Associated 1*
 KO : *Knock-out*
 LAG-3 : *Lymphocyte-activation gene 3*
 LKB1 : *Liver Kinase B1*
 LMA : *Leucémie Myéloïde Aigüe*
 LOH : *Loss of Heterozygosity*
 LOX : *Lysyl Oxidase*
 LPS : *Lipposaccharides*
 LT : *Lymphocyte T*
 LT_{CYT} : *Lymphocyte T cytotoxique*
 LT_{EFF} : *Lymphocyte T effecteur*
 LT_H : *Lymphocyte T helper*
 LT_M : *Lymphocytes T mémoires*
 LT_{REG} : *Lymphocyte T régulateur*
 MAM : *Mitochondrial-Associated ER-Membrane*
 MAPK : *Mitogen Activated Protein Kinases*
 MATE1-2 : *Multidrug and toxin extrusion protein 1-2*
 MC1R : *Melanocortin-1 receptor*
 MCL-1 : *Myeloid Cell Leukemia-1*
 MDM2 : *Mouse Double Minute 2*
 MDSC : *Myeloid Derived Suppressor Cells*
 MEC : *Matrice Extracellulaire*
 MEK1/2 : *Mitogen-activated/Extracellular Signal Regulated Protein Kinase 1/2*
 MELK : *Maternal Embryonic Leucine Zipper Kinase*
 MFF : *Mitochondrial Fission Factor*
 MFI : *Moyenne d'Intensité de Fluorescence*
 MIC : *Melanoma Initiating Cells*
 miR : *microARN*
 MITF : *Microphthalmia-associated Transcription Factor*
 mLST8 : *mammalian LST8/G-Protein b-Subunit Like Protein*
 MMP : *Matrix Metalloproteases*
 MMR : *Mismatch Repair*
 MMS : *Methyl Methane Sulfonate*
 MNK1/2 : *MAPK interacting protein kinases 1/2*
 MO25 : *Mouse Protein 25*
 MPF : *Mitosis-Promoting Factor*
 MPNST : *Malignant Peripheral Nerve Sheath Tumor*
 MRC-1 : *Mannose Receptor C-Type 1*
 MRN : *Mre11/Rad50/Nbs1*
 MSC-2 : *Mesenchymal Stem Cell 2*
 MTD : *Maximum Tolerated Dose*
 mTOR : *mechanistic/mammalian Target of Rapamycin*
 NADH : *nicotinamide adenine dinucleotide hydrogen*
 NER : *Nucleotide Excision Repair*
 NETs : *Neutrophil Extracellular Traps*
 NF1 : *Neurofibromatosis-1*
 NF-κB : *Nuclear Factor κ-light-chain-enhancer of activated B cell*
 NGFR : *Nerve Growth Factor Receptor*
 NHEJ : *Non-homologous End-Joining*
 NIPP1 : *Nuclear Inhibitor of Protein Serine/Threonine Phosphatase-1*
 NK : *Natural Killer*
 NO : *Nitric Oxyde*
 NRAS : *Neuroblastoma RAS viral oncogene homolog*
 OCR : *Oxygen Consumption Rate*
 OCT : *Organic Cation Transporters*
 OMS : *Organisation Mondiale de la Santé*
 Ova : *Ovalbumine*
 OXPHOS : *Oxydative Phosphorylation*
 p16INK4a : *p16 INhibitor of Kinase a*
 PARP : *Poly(ADP) Ribose Polymerase*
 PD-1 : *Programmed Cell Death 1*
 PDK1 : *3-Phosphoinositide-Dependant-Protein Kinase 1*
 PD-L1 : *Programmed Cell Death 1 Ligand 1*
 PDX : *Patient-Derived Xenografts*
 PE : *Phosphatidyl-Ethanolamine*
 PGE2 : *Prostaglandine-E2*
 PI3K : *Phosphoinositide-3-kinase*

PKC : *Protein Kinase C*
 PKC- ζ : *Protein kinase calcium dependant zeta*
 PLK1 : *Polo-like kinase 1*
 PMAT : *Plasma Membrane Monoamine Transporter*
 PN : *Polynucléaire Neutrophile*
 PP2A : *Protein Phosphatase 2 A*
 PP2CA : *Protein Phosphatase 2 Ca*
 PPP1R8 : *Protein Phosphatase 1 Regulatory Subunit 8*
 PRAS40 : *Proline-Rich AKT Substrate of 40 kDa*
 PRC : *Phase Radiale de Croissance*
 PTEN : *Phosphatase and TENsin homolog*
 PVC : *Phase Verticale de Croissance*
 pVHL : *Von-Hippel-Lindau Protein*
 Rab-7 : *RAS-Associated Protein 7*
 RAF : *Rapidly Growing Fibrosarcomas*
 Raptor : *Regulatory Associated Protein of mTOR*
 Rb : *Retinoblastoma tumor suppressor protein*
 RE : *Reticulum Endoplasmique*
 REDD1 : *Regulated In Development And DNA Damage Responses 1*
 RGD : *Regulated Cell Death*
 RHEB : *Ras Homolog Enriched In Brain*
 ROS : *Reactive Oxygen Species*
 RPS6 : *Ribosomal protein S6*
 RTK : *Récepteurs à tyrosine kinase*
 S6K : *S6 Kinase*
 SCAMP3 : *Secretory carrier membrane proteins*
 SDF1 : *Stromal Cell Derived-factor 1*
 SI : *Système Immunitaire*
 SILAC : *Stable Isotope Labelling by Amino acids in Cell culture*
 siRNA: *small interferent RNA*
 Smac : *Second mitochondria-derived activator of caspase*
 Snf1 : *Sucrose non-fermenting 1*
 SOS1 : *SOS Ras/Rac Guanine Nucleotide Exchange Factor 1*
 SQSTM1 : *Sequestrosome1*
 STAT : *Transducer and Activator of Transcription*
 STRAD : *Ste20-Related Adaptor*
 STRAP : *Serine-threonine kinase Receptor-Associated Protein*
 TAA : *Tumor Associated Antigen*
 TAC : *Transfert Adoptif de Cellules*
 TAM : *Tumor Associated Macrophages*
 TAP : *Transporter associated with antigen Processing*
 TBK1 : *Tank-binding kinase 1*
 t-BPH : *tert-Butylhydroperoxide*
 TCGA : *The Cancer Genome Atlas*
 TCR : *T Cell Receptor*
 TEM : *Transition Epithelio-Mesenchymateuse*
 TERT : *Telomerase Reverse Transcriptase*
 TGF- β : *Transforming Growth Factor β*
 TIGIT : *T-cell ImmunoGlobulin and Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibitory motif domain*
 TIL : *Tumor Infiltrating Lymphocytes*
 TIM-3 : *T-cell immunoglobulin and mucin-domain containing-3*
 TNFR : *Tumor Necrosis Factor Receptor*
 TNF α : *Tumor Necrosis Factor alpha*
 TNM : *Tumour, Nodes, Metastasis*
 TRAILR : *Tumor-necrosis-factor Related Apoptosis Inducing Ligand Receptor*
 TRP1 : *Tyrosinase Related Protein 1*
 TSC2 : *Tuberous Sclerosis Complex 2*
 T-VEC : *Talimogene laherparepvec*
 TXNIP : *Thioredoxin-Interacting protein*
 TYR : *Tyrosinase*
 UBA : *Ubiquitin-associated-domain*
 Uik1 : *Unc-51 like autophagy activating kinase*
 UPR : *Unfolded Protein Response*
 USP : *Ubiquitin Specific Proteases*
 UVs : *Ultra-Violets*
 VEGF : *Vascular Endothelial Growth Factor*

VPS34 : *Vacuolar Protein Sorting 34*

Wnt : *Wingless*

WT : *Wild Type*

ZRP9 : *Zinc Finger-Like Protein 9*

α -MSH : *Melanocyte Stimulating Hormone*

β 2m : *β 2-microglobulin*

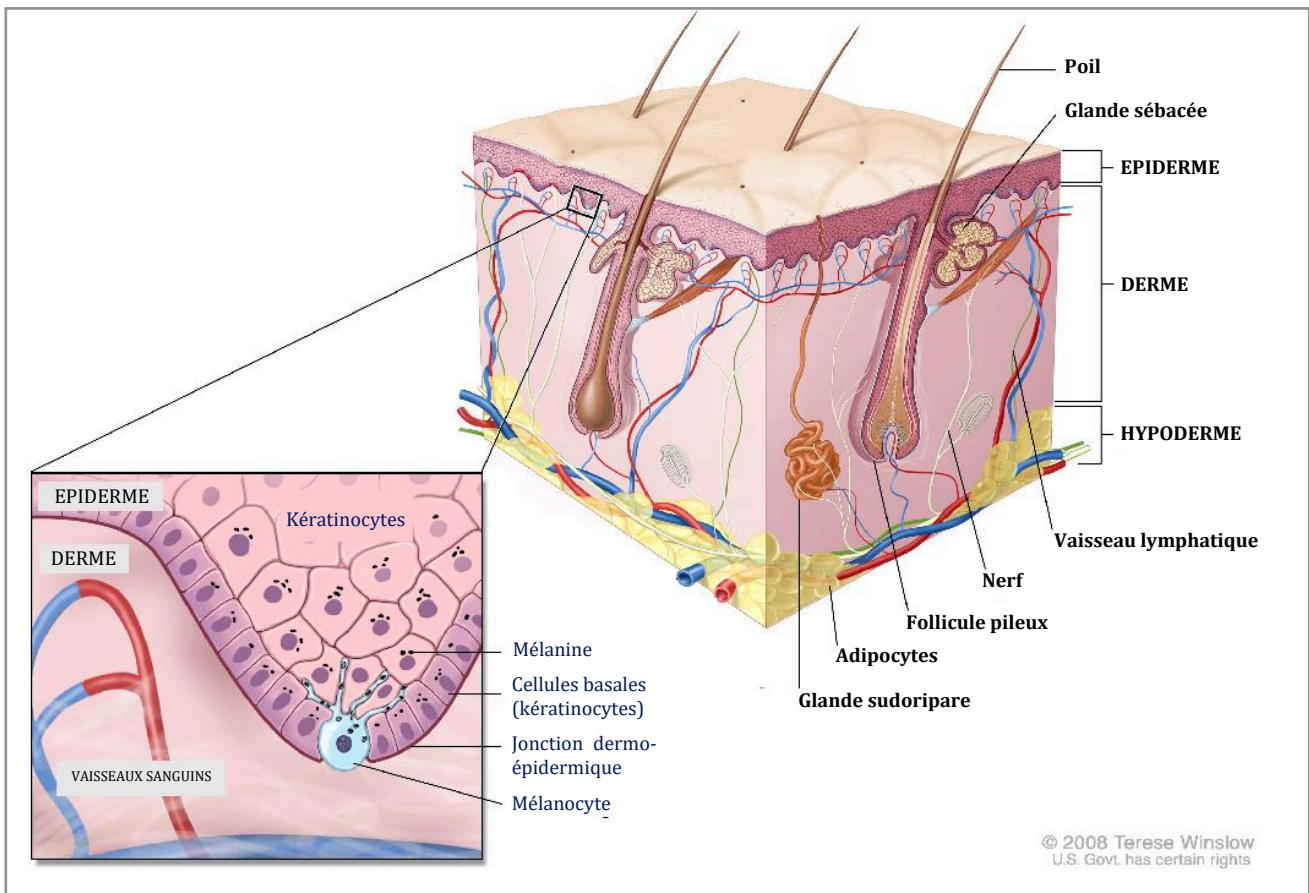


Figure 1 : Structure de la peau

La peau est organisée en 3 couches distinctes et superposées : L'**épiderme**, en surface, est un tissu épithélial constitué majoritairement de kératinocytes. Le **derme**, couche intermédiaire et épaisse, est un tissu conjonctif de soutien composé de fibroblastes et de matrice extracellulaire ; il abrite également les vaisseaux sanguins et lymphatiques, les terminaisons nerveuses, les glandes sébacées et sudoripares. L'**hypoderme**, couche la plus profonde de la peau, est un tissu conjonctif adipeux très vascularisé.

Figure adaptée de : « Skin With Melanocyte Anatomy-HP » (T. Winslow) - National Cancer Institute (<https://visualonline.cancer.gov>)

INTRODUCTION

A. Le mélanome cutané métastatique : origine, développement et stratégies thérapeutiques

Le mélanome cutané est un cancer qui dérive de cellules de peau appelées les **mélanocytes**. Situés dans la couche basale de l'épiderme, les mélanocytes sont des cellules dendritiques spécialisées dans la production d'un pigment, la mélanine, responsable de la couleur de la peau et de sa photoprotection. La transformation du mélanocyte en mélanome, dit **mélanomagenèse**, résulte de l'accumulation d'anomalies génétiques au sein des mélanocytes.

1. Les mélanocytes, cellules épidermiques au rôle protecteur

1.1. Structure de la peau

La peau est un organe complexe très étendu qui couvre une surface de presque 2m² et représente environ 20% du poids total d'un corps humain adulte. Situé à l'interface entre le corps humain et l'environnement extérieur, c'est une **barrière protectrice** importante contre les agents physiques, chimiques ou microbiologiques (Bragazzi *et al.*, 2019). Exerçant également un rôle sensoriel, de régulation thermique ou encore de réserve énergétique, elle est essentielle au bon fonctionnement de l'organisme (Holloway and Jones, 2005).

La peau est organisée en plusieurs couches distinctes que sont, de la plus profonde à la plus superficielle, l'hypoderme, le derme et l'épiderme (*Figure 1*). L'**hypoderme** est un tissu conjonctif lâche très vascularisé qui ancre la peau aux tissus sous-jacents. Composé majoritairement d'adipocytes, il joue le rôle d'isolant thermique et de stockeur de graisses. Le **derme**, couche la plus épaisse des trois, est un tissu conjonctif fibreux principalement constitué de matrice extracellulaire (MEC) synthétisée et remodelée par des fibroblastes. Le collagène, les glycoprotéines et l'élastine présents dans cette matrice confèrent à la peau sa structure, sa résistance et son élasticité. L'**épiderme**, la couche la plus superficielle de la peau, est un épithélium pluristratifié kératinisé non vascularisé. L'approvisionnement des nutriments et de l'oxygène se fait donc grâce la vascularisation du derme sous-jacent. En première ligne, l'épiderme assure la majeure partie des fonctions protectrices de la peau en alertant l'ensemble du corps des changements environnementaux. Enfin, la membrane acellulaire qui sépare le derme de l'épiderme s'appelle la **jonction dermo-épidermique**. Celle-ci permet l'adhésion de l'épiderme au derme mais aussi d'autres fonctions telles que le contrôle des échanges moléculaires entre les deux compartiments (Fenner and Clark, 2016).

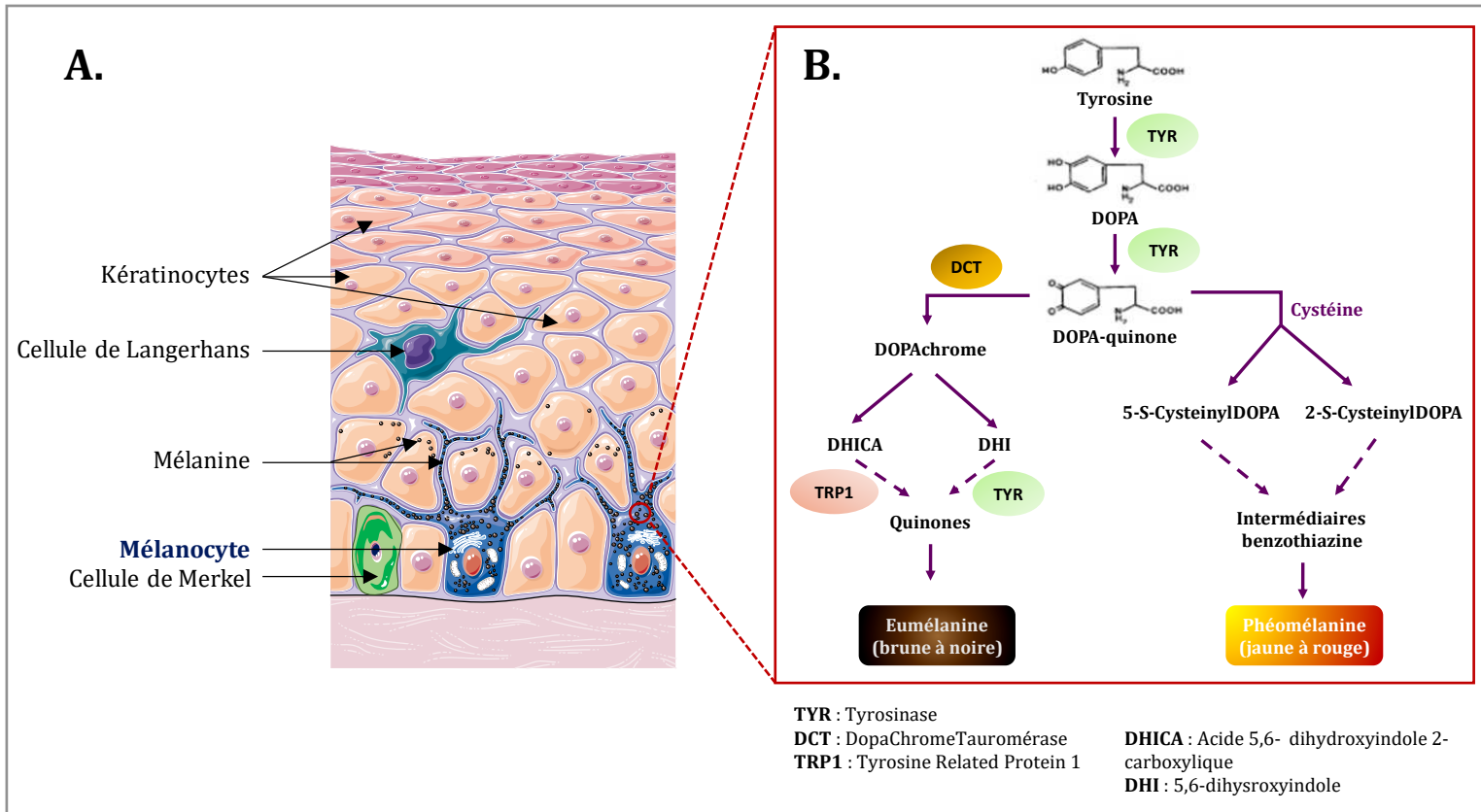


Figure 2 : La mélanogénèse, processus physiologique complexe au sein du mélanocyte

- A. Schéma représentatif de la structure de l'épiderme.** L'épiderme est constitué de 4 types cellulaires : les kératinocytes (majoritaires), les cellules de Langerhans, les cellules de Merkel et les mélanocytes situés à la jonction entre le derme et l'épiderme.
- B. Schéma simplifié de la synthèse de mélanine dans les mélanocytes.** La mélanogénèse se déroule dans les mélanosomes et consiste en une succession de réactions enzymatiques, qui, à partir de la tyrosine, aboutit à la synthèse d'un pigment : la mélanine. C'est la balance entre l'eumélanine et la phéomélanine, ainsi que le degré d'activité de la tyrosinase (TYR) qui définit la couleur de peau de l'individu.

Figure adaptée de : Banque d'images « Servier Medical Art » ; Chicorek *et al*, 2013

1.2. Le mélanocyte, un composant cellulaire de l'épiderme

L'épiderme est composé de quatre types cellulaires différents : les kératinocytes, les cellules de Langerhans, les cellules de Merkel et les mélanocytes (*Figure 2A*) :

- Les **kératinocytes**, qui représentent 85 à 90% des cellules de l'épiderme, produisent de la kératine, protéine qui confère à la peau son caractère imperméable. Ces cellules, en perpétuel renouvellement, évoluent depuis leur forme immature et proliférative dans la couche basale de l'épiderme vers leurs formes différenciées produisant de la kératine dans les couches plus superficielles. Lorsqu'ils atteignent la surface, leur noyau dégénère et ils forment une croûte protectrice éliminée continuellement sous forme de squames.

- Les **cellules de Langerhans** (3 à 5% des cellules de l'épiderme) sont importantes dans la réponse immunitaire cutanée. Ce sont des cellules dendritiques présentatrices d'antigènes qui, après avoir capté un antigène, migrent au travers de l'épiderme puis du derme jusqu'au ganglion lymphatique le plus proche pour le présenter aux lymphocytes T et initier la réponse immunitaire (Stoitzner *et al.*, 2002).

- Les cellules de Merkel (**2 à 5% des cellules de l'épiderme**) sont des cellules du système neuroendocrinien localisées au niveau de la couche basale de l'épiderme. En contact avec les terminaisons nerveuses, elles servent de mécanorécepteurs et assurent la sensibilité de la peau.

- Les **mélanocytes** sont des cellules dendritiques originaires de la crête neurale embryonnaire et représentent 2 à 4% des cellules des cellules de l'épiderme. Ils sont cependant également présents dans les follicules pileux, l'œil (iris et rétine), et même dans l'oreille interne, le système nerveux et le cœur (Thomas and Erickson, 2008) où ils assurent des fonctions différentes en fonction de leur localisation.

Les **mélanocytes** cutanés sont quant à eux situés au niveau de la jonction dermo-épidermique (*Figure 2A*). Leur rôle principal est de produire la **mélanine**, un pigment responsable de la couleur de la peau mais également de la protection contre les rayonnements ultra-violet (UVs) du soleil.

1.3. Rôle des mélanocytes dans la production de mélanine et dans la défense contre les rayonnements UV

Les mélanocytes sont spécialisés dans la production des pigments responsables de la couleur de la peau : les mélanines. Ce processus, appelée **mélanogenèse**, se déroule au sein de vésicules spécialisées : les mélanosomes. Les rayonnements UVs du soleil stimule ce phénomène en induisant la sécrétion de l'hormone α -MSH (*Melanocyte Stimulating Hormone*) par les kératinocytes ; cette dernière étant ensuite transférée aux mélanocytes.

La mélanogénèse consiste en une succession de réactions enzymatiques qui, à partir de la tyrosine, mènent à la synthèse des pigments appelés phéomélanines et eumélanines (Cichorek *et al.*, 2013). Les **eumélanines**, formés à partir de la tyrosine, correspondent à des pigments sombres (bruns ou noirs) présents majoritairement chez les individus à peau mate. *A contrario*, les phéomélanines, formés à partir de **tyrosine** et de **cystéine**, correspondent à des pigments clairs (rouges à jaunes) présents majoritairement chez les individus à peau claire et aux cheveux roux (Maranduca *et al.*, 2019).

Les principales enzymes intervenant dans la mélanogénèse sont la Tyrosinase (**TYR**), catalysant la formation des précurseurs de la mélanine (DOPA et DOPA-quinone), la Tyrosinase Related Protein 1 (**TRP1**) (Kobayashi *et al.*, 1994) et la Dopachrome tautomérase (**DCT**), qui permettent la synthèse des eumélanines (*Figure 2B*). Les mélanosomes chargés de mélanines sont ensuite transportés le long des dendrites des mélanocytes puis transférés aux kératinocytes adjacents protégeant ainsi leur matériel génétique des effets délétères causés par les rayonnements du soleil.

En ce sens, l'eumélanine est beaucoup plus efficace dans la protection des dommages à l'Acide Désoxyribonucléique (ADN) induits par les rayons UVs que la phéomélanine. En effet, l'eumélanine, résistante à la dégradation, sert de barrière physique qui disperse les rayons UVs ; et de filtre absorbant qui réduit la pénétration de ces rayons au sein de l'épiderme (Brenner and Hearing, 2008). La phéomélanine quant à elle se décompose beaucoup plus rapidement sous l'effet des radiations et contribue même à la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) pouvant promouvoir le développement de cancers UVs-induits (Coelho *et al.*, 2015). Le ratio eumélanines/phéomélanines, reflété par les différents **phototypes** existants chez l'homme est donc déterminant pour sa photoprotection. Plus l'individu présente un phototype clair (peau laiteuse, cheveux roux), plus celui-ci aura de risque de développer des cancers de la peau photo-induits.

2. Le mélanome cutané

Les mélanomes sont des tumeurs malignes développées aux dépens des mélanocytes. À la suite d'une accumulation d'anomalies génétiques, les mélanocytes transformés échappent au contrôle des kératinocytes voisins et prolifèrent de façon anarchique pour former un cancer très agressif : le **mélanome cutané**. Dans 20% à 30% des cas, ils peuvent être issus de la dégénérescence d'un grain de beauté, appelé *naevus*, préexistant. Dans la majorité des cas cependant (70% au moins), le mélanome apparaît *de novo*, c'est-à-dire depuis une peau saine en absence de *naevus*, et est encore plus agressif (Cymerman *et al.*, 2016). Il existe plusieurs **sous-types** de **mélanomes cutanés** (superficiel extensif, de Dubreuilh, nodulaire, etc.) classés selon leur aspect morphologique, leur site primaire ou encore leurs caractéristiques de croissance. Le mélanome cutané est le plus grave des cancers de la peau étant donné sa capacité à se disséminer et envahir d'autres organes tels que les ganglions lymphatiques, le foie, les poumons ou encore le système nerveux central. On parle alors de **mélanome cutané métastatique**. Ce cancer touche toutes les tranches d'âge et aussi bien les hommes que les femmes. Une détection précoce est très importante pour que le patient atteint de mélanome bénéficie d'une meilleure prise en charge thérapeutique et de meilleures chances de guérison.

Il est intéressant de noter qu'il existe également un autre type de mélanome qui se développe au niveau de l'œil : le **mélanome uvéal**. Représentant 3% à 5% des mélanomes, c'est le cancer de l'œil le plus fréquent chez l'adulte (500 à 600 nouveaux cas diagnostiqués en France chaque année). Il dérive majoritairement des mélanocytes choroïdiens (présents dans l'uvée) et métastase dans environ 50% des cas, occasionnant alors le décès de la personne dans les 6 à 12 mois suivants (Krantz *et al.*, 2017). Bien qu'ils dérivent des mêmes cellules, le mélanome cutané et le mélanome uvéal sont des cancers très différents qui ne sont pas du tout pris en charge de la même manière. Nous nous concentrerons donc ici uniquement sur le **mélanome cutané**.

2.1. Epidémiologie du mélanome cutané

L'incidence du mélanome cutané a augmenté drastiquement ces dernières années avec un chiffre qui a presque doublé entre les années 1990 et les années 2010. Aujourd'hui **287 223 cas**, dont plus de **60 000 décès**, sont reportés chaque année **dans le monde**, dont 150 000 cas chez les hommes et 137 000 cas chez les femmes (WHO, Globocan 2018 - <https://gco.iarc.fr/>). Le nombre de cas diagnostiqués est donc proche chez les hommes et les femmes. Plus de 50% des cas de mélanome surviennent en **Europe** avec une forte densité en Europe de l'ouest (62 000 cas). La population caucasienne est en effet plus à risque de développer un mélanome. En **France**, plus de 14 000 cas ont été diagnostiqués en 2018.

Comme pour tous les cancers, l'incidence du mélanome augmente avec l'âge. Ainsi, environ 10 personnes sur 100 000 sont diagnostiquées au-delà de 60 ans contre 25 personnes sur 100 000 au-delà de 75 ans. Néanmoins, même si son incidence est moindre avant 40 ans, il est l'un des cancers le plus commun et surtout le plus mortel chez l'adolescent et le jeune adulte (Matthews *et al.*, 2017).

Les mélanomes cutanés représentent 10 % des cancers de la peau mais sont responsables de 80 % des décès associés à ce type de cancer (<https://www.e-cancer.fr/>). Le **taux de mortalité** global de ce cancer (en prenant en compte les formes localisées) est d'environ **15-20%** avec 60 712 décès dans le monde et 2300 décès en France en 2018 (WHO, Globocan 2018). Ce taux augmente cependant drastiquement lorsque le mélanome entre en phase métastatique. En effet, le **taux de survie** à 5 ans passe de 98% pour un mélanome localisé à **50%** pour un **mélanome métastatique** (<https://www.cancer.net/>).

Malheureusement, l'Organisation mondiale de la Santé (OMS) estime que l'incidence du mélanome cutané va encore augmenter dans les prochaines années si les campagnes de prévention ne se généralisent pas. L'OMS estime alors 380 000 cas par an d'ici 2030 et 466 000 cas par an d'ici 2040. Compte tenu de son caractère agressif et de son taux de mortalité élevé, le mélanome représente donc aujourd'hui et dans les années à venir un problème majeur de santé publique.

	PHOTOTYPE I	PHOTOTYPE II	PHOTOTYPE III	PHOTOTYPE IV	PHOTOTYPE V	PHOTOTYPE VI
Couleur des cheveux	Roux	Blonds	Châtains	Bruns	Très Bruns	Noirs
Couleur de la peau	Laitieuse	Très claire	Claire	Mate	Mate	Noire
Tâches de rousseur	Nombreuses	Fréquentes	Rares	Aucune	Aucune	Aucune
Tendance aux coups de soleil	Constante	Constante	Fréquente	Rare	Exceptionnelle	Jamais
Qualité du bronzage	Pas de bronzage	Hâle léger	Hâle moyen	Bronzage foncé	Bronzage très foncé	Bronzage noir

Tableau 1 : Classification des différents phototypes cutanés

Tableau réalisé d'après : Fitzpatrick et al, 1988, Arch Dermatol

2.2. Facteurs de risque associés au développement du mélanome

De **nombreux facteurs** de risques ont été identifiés comme favorisant l'apparition du mélanome cutané. Il peut s'agir alors de facteurs **génétiques ou constitutionnels** ainsi que de facteurs **environnementaux**. Même si ces facteurs n'entraînent pas systématiquement le développement de ce cancer, ils en augmentent le risque. A ce jour, la cause principale reste **l'exposition au soleil** et à ses rayonnements UVs. En effet, même si le soleil est indispensable au corps humain (notamment pour la synthèse de la vitamine D), une exposition intense et intermittente à ses rayons peut provoquer des coups de soleil mais aussi des lésions plus profondes qui mènent au photo-vieillissement de la peau voire au développement de cancers cutanés.

2.2.1. Les facteurs constitutionnels

L'un des principaux facteurs de risque constitutionnel est le **nombre élevé de naevi** (grains de beauté). En effet, une méta-analyse a montré que les individus qui possédaient plus de 100 naevi (normaux) ont sept fois plus de risque de développer un jour un mélanome que les individus avec moins de 15 naevi (Gandini *et al.*, 2005). De plus, la fréquence de mélanomes « naevus-associés » augmente significativement chez les individus avec plus de grains de beautés (Haenssle *et al.*, 2016). Enfin, la présence de **naevi atypiques** (à bords irréguliers) ou de **grande taille** (>5mm de diamètre) augmente également le risque de développer un mélanome.

Le second facteur de risque important inhérent à l'individu est son **phototype**. Caractérisé dans les années 1980 et toujours utilisé aujourd'hui, il est catégorisé en **6 classes** et prend en compte le phénotype cutané/capillaire de l'individu mais aussi sa capacité à bronzer et sa propension à brûler sous les rayonnements UVs (*Tableau 1*) (Fitzpatrick, 1988). Plus ce phototype est faible (Phototype I/II, individu à peau claire avec une très faible capacité de bronzage), plus le risque de développer un mélanome cutané est élevé (Rodenas *et al.*, 1996).

Le dernier facteur de risque majeur concerne **l'historique familial** de l'individu, rapportant l'existence de **gènes de prédisposition** au mélanome. En effet, environ 10% des personnes atteintes de mélanome ont déclaré avoir un parent de 1^{er} ou de 2^{cd} degré ayant développé ce cancer. Les gènes de susceptibilités à haut-risque retrouvés dans ces cas familiaux sont alors **CDKN2A** (*Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor 2A*), mutés dans 25% à 40% des cas, **CDK4** (*Cyclin-Dependent Kinase 4*), **p14ARF** ; 3 gènes impliqués dans le cycle cellulaire et l'apoptose (Hayward, 2003; Ribero *et al.*, 2016) ; et **BAP1** (*BRCA1 Associated Protein 1*), impliqué dans le processus de réparation à l'ADN. Les gènes de susceptibilité à risques intermédiaires sont les gènes **MC1R** (*Melanocortin-1 receptor*) qui détermine la couleur de peau et de cheveux, et **MITF** (*Microphthalmia-associated transcription factor*) impliqué dans la pigmentation et la différenciation des mélanocytes. Enfin, un individu ayant déjà eu un mélanome a dix fois plus de risque d'en développer un nouveau (Van der Leest *et al.*, 2015).



Figure 3 : Dépistage des nævi anormaux par la règle ABCDE

La surveillance de ses grains de beauté (ou *nævi*) permet une détection précoce du mélanome, permettant une meilleure prise en charge de la maladie et de meilleures chances de survie pour le patient. Cette surveillance peut être réalisée de chez soi (autosurveillance) grâce à la règle ABCDE présentée ici, même si elle ne remplace pas les consultations régulières chez le dermatologue pour les personnes à risque.

Figure extraite de : <https://www.e-cancer.fr/Comprendre-prevenir-depister/Se-faire-depister/Depistage-des-cancers-de-la-peau/La-detection-en-pratique>

2.2.2. Les facteurs environnementaux

Le facteur de risque externe majeur est l'exposition **aux rayonnements UVs** provenant du soleil ou encore de cabines de bronzage. Les UV_{AS} et les UV_{BS}, qui sont capables de traverser la couche d'ozone contrairement aux UV_{CS}, sont responsables des dommages cutanés liés aux rayonnements solaires. Les UV_{BS} sont absorbés presque complètement par l'épiderme et agissent directement sur l'ADN des cellules alors que les UV_{AS} pénètrent plus profondément (jusqu'au derme) et causent des dommages indirects à l'ADN via la génération de ROS (D'Orazio *et al.*, 2013).

En Europe, **80% des mélanomes** au moins seraient dus à une exposition au **soleil** (Armstrong and Kricger, 1993). L'exposition au soleil est catégorisée d'**intermittente** pour une exposition courte et intense (notamment lors d'activité de vacances), de **chronique** pour une exposition continue (d'ordre professionnelle principalement) ou de **totale** lorsqu'elle rejoint les deux premières. De nombreux éléments indiquent alors qu'à contrario d'une exposition chronique, une exposition intermittente augmente le risque de mélanome (IARC, 2012). Mais les risques liés au soleil dépendent également du phénotype cutané, de la localisation de l'exposition ou encore de l'âge de l'individu (Berwick *et al.*, 2016). De fait, les mélanomes du cou et de la tête, zones très photo-exposées, sont associés à une exposition chronique et diagnostiqués à un âge avancé alors que les mélanomes au niveau du tronc ou des membres surviennent plus jeunes et sont associés à une exposition intermittente. De plus, une exposition intermittente pendant l'enfance augmenterait le risque de développer un mélanome à l'âge adulte (Armstrong and Cust, 2017). Parallèlement, il a été prouvé que l'utilisation de cabines de bronzage (générant des rayons UVs artificiels) augmente le risque de mélanome de 16% à 20% ; ce risque augmente avec l'accumulation du nombre de séances d'UVs (Ghiasvand *et al.*, 2017). Ces dernières années, de plus en plus de pays ont donc posé des restrictions législatives strictes concernant l'utilisation de ces cabines (Pawlak *et al.*, 2012).

2.3. Diagnostique et pronostic des mélanomes cutanés

En cas de cancer en général, un **diagnostic précoce** est très important pour améliorer la prise en charge de la maladie et les chances de survie du patient. C'est en particulier vrai pour le mélanome qui est un cancer de très **bon pronostic** lorsque ce dernier n'a pas envahi le derme. Ainsi, le taux de survie à 5ans pour les lésions inférieures à 1mm d'épaisseur est de 98% à 99%. En revanche, plus ce cancer est **diagnostiqué tard**, plus le risque de dissémination de la tumeur dans la circulation sanguine et de métastase est important. Dans ce cas, le **pronostic** est alors **très péjoratif** du fait de l'inefficacité des traitements actuels à long-terme à ce stade. Il est donc primordial de détecter le mélanome au plus tôt.

- L'autosurveillance de l'apparition du mélanome

Le mélanome est un cancer qui a pour avantage d'être visible à l'œil nu puisqu'il apparaît sur la peau. Le suivi régulier des grains de beauté, particulièrement chez les personnes à risque, est une démarche simple et non

Stades	Tumeur Primaire (T)	Métastases régionales au ganglion lymphatique (N)	Métastases à distance (M)
IA	≤ 1,0mm, sans ulcération	Aucune	Aucune
IB	≤ 1,0mm avec ulcération ou indice mitotique ≥ 1/mm ²	Aucune	Aucune
IIA	De 1,01 à 2,0mm, avec d'ulcération De 2,01 à 4,0mm, sans ulcération	Aucune	Aucune
IIB	De 2,01 à 4,0mm, avec ulcération >4,0mm, sans ulcération	Aucune	Aucune
IIC	>4,0mm, avec ulcération	Aucune	Aucune
IIIA	N'importe quelle épaisseur de tumeur, sans ulcération	Micrométastases	Aucune
IIIB	N'importe quelle épaisseur de tumeur, avec ulcération	Micrométastases	Aucune
	N'importe quelle épaisseur de tumeur, sans ulcération	Jusqu'à 3 macrométastases	Aucune
	N'importe quelle épaisseur de tumeur ± ulcération	Aucune mais tumeurs satellites et/ou métastases « en transit »	Aucune
IIIC	N'importe quelle épaisseur de tumeur, avec ulcération	Jusqu'à 3 macrométastases	Aucune
	N'importe quelle épaisseur de tumeur ± ulcération	≥4 macrométastases, ou étendue au-delà de la capsule du ganglion, ou tumeurs satellites et/ou métastases en transit	Aucune
IV			Métastases distantes

Tableau 2 : Les différents stades du mélanome cutané

Tableau réalisé d'après : Garbe *et al*, 2016, Eur J Cancer

invasive qui permet de dépister une lésion cutanée (naevus préexistant ou nouvelle lésion) évoluant de manière anormale. En 1985, une règle simple a été mise en place pour apprécier le caractère malin d'un grain de beauté : la **règle ABCDE** (Rigel *et al.*, 2010). Cet examen consiste à observer certains traits morphologiques du grain de beauté tels que l'**A**symétrie, les **B**ords irréguliers, la **C**ouleur non homogène, l'augmentation du **D**iamètre et l'**E**volution (*Figure 3*) pour détecter une anomalie de manière précoce. En cas de concordance avec plusieurs de ces caractéristiques, un dermatologue doit être consulté pour une analyse visuelle et éventuellement histopathologique (après exérèse chirurgicale).

- Diagnostic et pronostic du mélanome selon des critères histopathologiques et génétiques

Lorsqu'une lésion suspecte est retirée, un **examen histopathologique**, éventuellement couplé à une analyse immunohistochimique (Anticorps anti-S-100, HMB45 (*Human Melanoma Black-45*)) est systématiquement effectué. Il permet de poser un diagnostic plus précis et d'établir des facteurs pronostics ; et est basé sur 4 caractéristiques principales selon l'AJCC (*American Joint Committee on Cancer*) (Garbe *et al.*, 2016, 2020) :

- L'**indice de Breslow** qui représente l'**épaisseur de la tumeur** en mm, soit la distance entre les cellules superficielles de l'épiderme et la cellule tumorale la plus profondément détectée. Lorsqu'il est supérieur à 4 mm, le patient a 70% de risque de récidiver avec un taux de survie à 5 ans inférieur à 40%
- La présence ou l'absence d'**ulcération**. En cas d'altération tissulaire de la tumeur primaire, le risque de métastase augmente et le pronostic est moins bon.
- L'**indice mitotique** qui correspond au nombre de **mitoses/mm²**, mesuré au niveau de la tumeur primaire. Ce taux est un bon indicateur de la vitesse de croissance du mélanome primaire. Une croissance rapide est associée à une plus grande agressivité et un risque de récurrence. Cet indice n'est cependant plus utilisé dans la dernière classification AJCC.
- La présence de **microsatellites**, définie par une niche de cellules métastatiques intra-lymphatiques discontinue, clairement séparée par du tissu sain à une distance d'au moins 0,3 mm.

La présence de **métastases** au niveau des **ganglions lymphatiques** sentinelles est également utilisée pour poser un diagnostic et aider au pronostic. Les individus pour lesquels, par exemple, au moins 4 ganglions voisins sont atteints présentent un pronostic très sombre.

Tous ces critères permettent aujourd'hui de définir le stade de ce cancer selon la **classification TNM** (« Tumeur, Nodes, Metastasis » ou « Tumeur, Ganglions lymphatiques, Métastases ») qui caractérise les mélanomes du **stade I** au **stade IV** (*Tableau 2*).

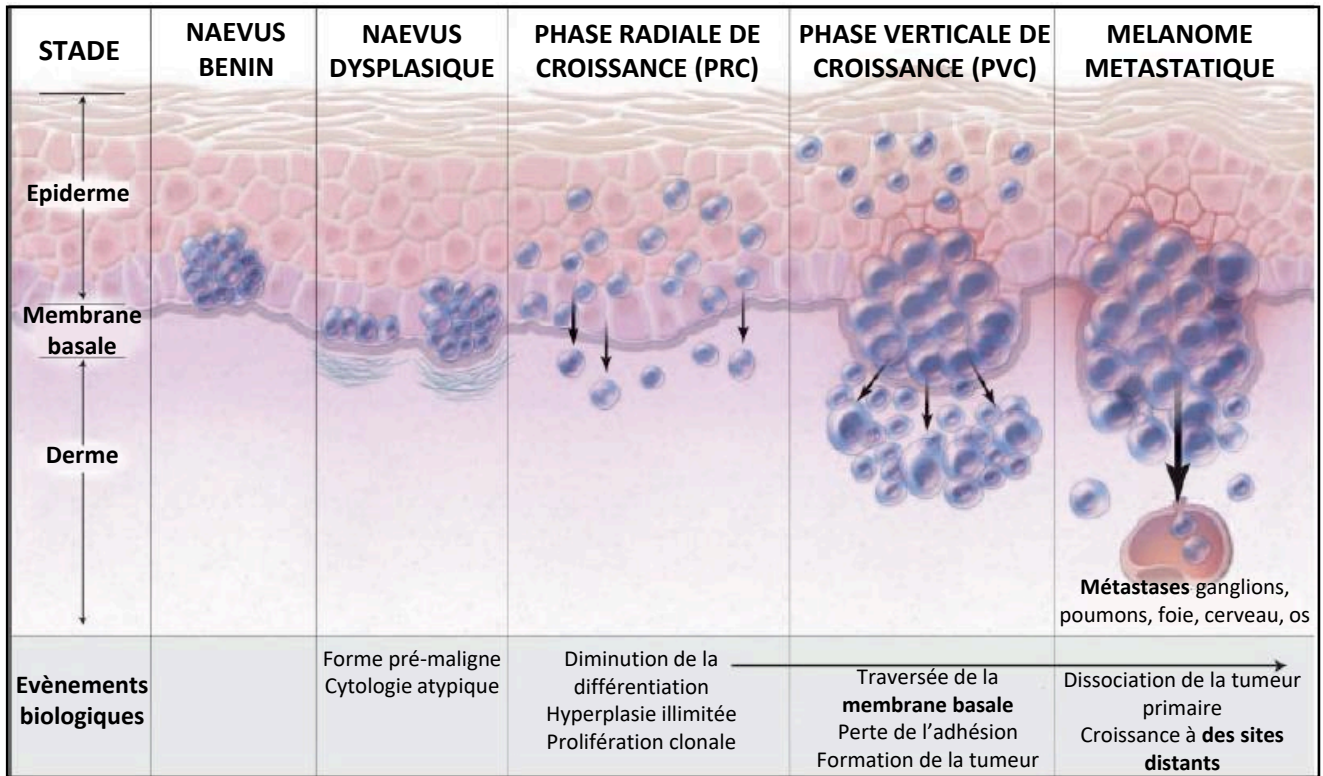


Figure 4 : Etapes de transformation du mélanocyte en mélanome

La transformation du mélanocytes en mélanome est un processus qui se déroule *via* plusieurs étapes successives. Lors de ces étapes, les mélanocytes, puis cellules de mélanome, subissent une accumulation d'altérations génétiques modifiant leurs propriétés biologiques. Dans 25% à 30% des cas, la transformation s'effectue depuis un grain de beauté (naevus) bénin. Dans le reste des cas, le cancer survient *de novo* avec des mélanocytes qui perdent leur caractère différencié (suite à des mutations) et qui prolifèrent au niveau de l'épiderme. C'est la **phase radiale de croissance (PRC)**. Ces cellules de mélanome vont ensuite perdre leur adhésion cellulaire et acquérir des propriétés invasives : elles traversent la membrane basale pour envahir le derme. C'est la **phase verticale de croissance (PVC)**. La phase ultime de transformation nécessite l'acquisition du pouvoir métastatique par les cellules malignes. Les cellules pénètrent alors dans la circulation sanguine/lymphatique et vont coloniser d'autres organes. C'est la **phase métastatique**.

Figure adaptée de : Miller et al, 2006, NEJM

Cette classification établit un premier diagnostic pour le médecin mais elle a le désavantage de ne pas prendre en compte l'**hétérogénéité génétique** des mélanomes qui peut avoir elle aussi une influence sur l'évolution du cancer. Une analyse des altérations génétiques retrouvés au sein de la tumeur permet donc d'améliorer le diagnostic du mélanome. Ainsi, le laboratoire du Dr. Bastian a mené plusieurs études permettant de relier le profil mutationnel de la tumeur et son degré d'exposition aux UVs (Curtin *et al.*, 2005) ou encore de définir quel type de mutation est retrouvé dans une lésion bénigne, intermédiaire, maligne *in situ*, ou maligne invasive (Shain *et al.*, 2015). Le but de ces différents efforts de classification génétiques est de pouvoir prédire plus précisément l'évolution de la tumeur mais aussi de proposer un traitement « sur mesure », adapté à chaque patient. En 2017, un brevet a même été déposé (US2019/0012433 A1) pour établir un diagnostic et pronostic du mélanome de manière non invasive (écouvillonnage en surface de la peau) à partir du profil moléculaire du matériel génétique extrait (Conway, T.C. and Vergara Correa, I.A., 2017).

2.4. Les différentes étapes de la transformation mélanocytaire

La **transformation maligne** d'un mélanocyte en cellules de mélanome, appelée **mélanomagénèse**, est un processus complexe qui résulte de l'accumulation d'altérations génétiques, épigénétiques et même environnementales. Ces événements mutationnels clés, dont les plus précoces sont souvent induits par les rayonnements UVs, vont permettre une évolution depuis une forme bénigne, puis intermédiaire, vers une forme maligne et métastatique du mélanome (Jackett and Scolyer, 2019). Historiquement, un **modèle linéaire** de cette transformation, globalement admis aujourd'hui, repose sur les observations histopathologiques qui retracent les différentes étapes de la transformation mélanocytaire (Clark *et al.*, 1984). Ce modèle repose sur quatre phases évolutives : Le **naevus** (phase facultative), la **phase radiale de croissance (PRC)**, la **phase verticale de croissance (PVC)** et la **phase métastatique** (*Figure 4*).

- Le naevus, l'étape facultative

Dans 25% à 30% des cas seulement, le mélanome va apparaître **depuis un naevus préexistant**. Les nævi communs sont formés par prolifération bénigne de mélanocytes et ont de faibles probabilités de se transformer en mélanome (Shain and Bastian, 2016). Cette prolifération est très fréquemment initiée par les substitutions *V600E* du gène **BRAF** ou *Q61R/L* du gène **NRAS** (voie des MAP [*Mitogen Activated Protein*] kinases) (Jackett and Scolyer, 2019). Bien que de type oncogénique, ces mutations exclusives l'une de l'autre ne suffisent pas à initier la mélanomagénèse. En effet, les mélanocytes du grain de beauté entrent en « pseudo-sénescence » et, dans la majorité des cas, vont y rester toute la vie de l'hôte. Dans certains cas cependant, suite à l'apparition de nouvelles mutations, les cellules *naeviques* vont échapper au contrôle de la sénescence et proliférer pour donner un mélanome en **phase radiale de croissance**.

- La phase radiale de croissance : une étape de progression lente

Dans la majorité des cas (plus de 70%), le mélanome survient *de novo* et se développe à partir d'une peau saine, sans aucune tache ou lésion. Il apparaît alors sous la forme d'une tache pigmentée qui ressemble à un grain de beauté et entre directement en **phase radiale de croissance (PRC)**. Pendant cette phase, les mélanocytes transformés perdent leur inhibition de contact (leur permettant en contexte sain de ne pas hyperproliférer) et prolifèrent au niveau de la jonction dermo-épidermique, **parallèlement à la lame basale** (Jackett and Scolyer, 2019). Ces cellules peuvent proliférer indéfiniment mais dépendent encore des facteurs de croissance produits par les kératinocytes voisins (Bogenrieder and Herlyn, 2002). A ce stade, des mutations au niveau du promoteur du gène *TERT* (*Telomerase Reverse Transcriptase*) (fonctionnement de la télomérase) sont fréquemment impliquées (Shain *et al.*, 2015). C'est au cours de cette phase que le mélanome, dont la taille augmente continuellement et visiblement, est susceptible d'être guéri par exérèse chirurgicale.

- La phase verticale de croissance : étape critique de la mélanomagenèse

Lors de la **phase verticale de croissance (PVC)**, les cellules de mélanomes traversent la jonction dermo-épidermique et progressent alors **en profondeur** dans le derme de manière verticale. Cette progression requiert l'émergence de nouvelles mutations qui continuent de permettre la prolifération des cellules, favorisent leur survie et encouragent les **interactions** avec les cellules du derme (fibroblastes, cellules endothéliales des vaisseaux) (Jackett and Scolyer, 2019). Ces nouvelles propriétés invasives, qui se manifestent par exemple par la capacité de sécrétion des métalloprotéases (MMP) ou encore par un switch des cadhérines (E-cadhérines → N-cadhérines), apparaissent lors d'un phénomène appelé **Transition « de type » Epithélio Mesenchymateuse (Pseudo-TEM)** (Pearlman *et al.*, 2017). Elles permettent une progression rapide du mélanome et favorisent l'apparition de métastases. C'est lors de cette phase qu'apparaissent d'abord les mutations des gènes *CDKN2A* (*Cyclin-Cependent Kinase inhibitor 2A*) (cycle cellulaire), *ARID1A/B* (*AT-Rich Interaction Domain 1*) (remodelage de la chromatine) et plus tard celles de deux gènes suppresseurs de tumeurs : *PTEN* (*Phosphatase and TENsin homolog*) (voie PI3K/Akt) et *TP53* (réparation de l'ADN, cycle cellulaire (Shain *et al.*, 2015).

- La phase métastatique : étape fatale du mélanome

La dernière phase de développement d'un mélanome correspond à la dissémination des cellules tumorales dans l'organisme via la circulation sanguine et lymphatique : c'est la **phase métastatique**. Cette phase dépend de facteurs critiques qui favorisent la motilité des cellules tumorales et favorisent leur survie et leur prolifération à des sites distants. Les cellules tumorales au potentiel métastatique vont alors pouvoir coloniser dans un premier temps les **ganglions lymphatiques** drainant la tumeur primaire, puis des organes distants tels que le **foie**, les **poumons** et le **système nerveux central** et **les os** préférentiellement (Leiter *et al.*, 2004). Les altérations moléculaires associées aux cellules de mélanome à ce stade sont moins bien décrites et il semble que la

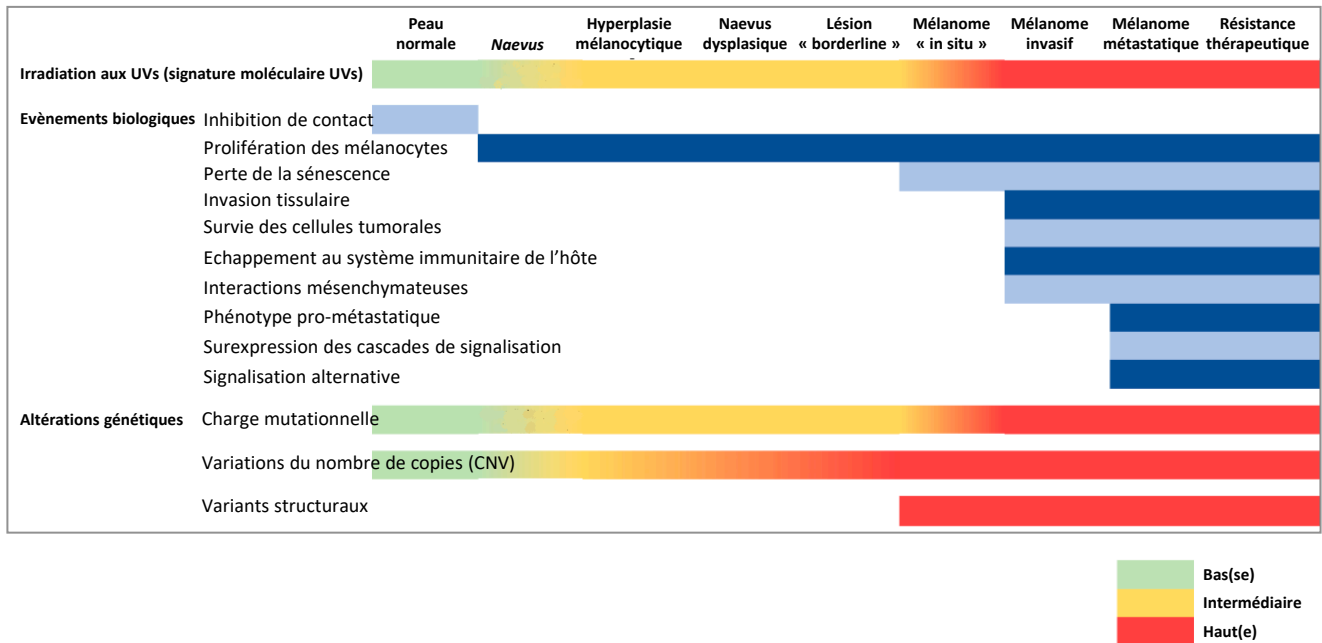


Figure 5 : Evènements phénotypiques clés lors de la pathogénèse et de la progression du mélanome

Lors de la mélanomagénèse, de multiples évènements biologiques (dont les principaux sont présentés ici) surviennent les uns après les autres et impliquent non seulement les mélanocytes ou cellules tumorales elles-mêmes, mais également les cellules de leur environnement (fibroblastes, système immunitaire...). Des altérations génétiques, non détaillées ici, sont alors étroitement liées à ces évènements.

Figure adaptée de : Jakkett and Scolyer, 2019, Cancers

progression métastatique dépende alors énormément de **l'environnement tumoral**. Certaines études ont par exemple montré l'importance des **exosomes dérivés de la tumeur** dans le potentiel métastatique de la tumeur (Guo *et al.*, 2019; Peinado *et al.*, 2012). D'autres mettent en cause certaines **chimiokines**, telles que l'IL10 (*Interleukin-10*) relarguées par les cellules immunitaires infiltrant la tumeur et les cellules tumorales elles-mêmes (Itakura *et al.*, 2011). A cette étape de développement, le mélanome est inopérable et ne répond pas efficacement et/ou à long-terme aux traitements existants dans la majorité des cas.

Bien que ce modèle de progression par étapes successives décrit par Clark en 1984 reste aujourd'hui pris en compte, la mélanomagenèse semble en réalité bien plus complexe que cela. En effet, certaines des étapes décrites ici peuvent être évitées ou contournées et d'autres voies **non linéaires** de la transformation du mélanocyte en mélanome existent (Damsky *et al.*, 2014). De plus, des techniques génomiques récentes telles que le séquençage haut-débit ont permis de mettre en avant la **complexité** et la **multiplicité** des mécanismes jouant un rôle de la pathogénèse du mélanome (Palmieri *et al.*, 2018). Enfin, en plus des facteurs impliqués dans la régulation de la prolifération et la survie des mélanocytes transformés, des agents extrinsèques dans le microenvironnement tumoral (comme les fibroblastes, les cellules endothéliales et les cellules du système immunitaire) ont également un rôle important à jouer dans cette progression tumorale (*Figure 5*).

2.5. Les altérations intrinsèques et environnementales responsables du développement du mélanome

Un patient atteint du mélanome présente un mélange **d'altérations génétiques** ou épigénétiques affectant directement les cellules tumorales des mélanomes. Ces anomalies, importantes dans le processus de développement de la tumeur, sont accompagnées de **changements environnementaux** médiés par les cellules qui avoisinent la tumeur. Le déroulement de la mélanomagenèse repose alors sur ces deux composantes qui interagissent l'une avec l'autre pour former un tout.

2.5.1. Les modifications génétiques associées au mélanome cutané

Le mélanome cutané est un cancer à haute **charge mutationnelle**, qui enregistre plus de 10 mutations par mégabase. Parmi ces mutations, une large proportion porte la « signature » de la conséquence du rayonnement d'ultra-violet (UVs) sur la peau, renforçant alors l'implication du soleil comme facteur de risque majeur (Hodis *et al.*, 2012). Comme pour de nombreux cancers, la transformation maligne de mélanocytes en mélanome suit un modèle **génétique séquentiel** qui aboutit à l'activation constitutive de signaux oncogéniques. La mutation oncogénique **BRAF^{V600E}**, fréquemment retrouvée dans les mélanomes, est d'abord une caractéristique typique de la formation d'un **naevus bénin**. Celle-ci ne permet cependant pas à elle-seule de provoquer la transformation maligne puisqu'elle induit la sénescence des mélanocytes (*Michaloglou et al.*,

TYPE DE GENE	GENE	FREQUENCE D'ALTERATION	TYPE D'ALTERATION / VOIE OU PROCESSUS IMPLIQUE(E)
ONCOGENE	BRAF	50%	Mutations activatrices / MAP Kinases
	RAS	30%	Mutations activatrices / MAP Kinases
	<i>NRAS</i>	27%	
	<i>HRAS</i>	2%	
	<i>KRAS</i>	1%	
	RAC1	6%	Mutations activatrices / Motilité, migration
	CCND1	5%	Amplifications activatrices / cycle cellulaire
	KIT	2,2% + 3,1%	Mutations et amplifications activatrices / MAP Kinases
	CDK4	0,5% + 3%	Mutations et amplifications activatrices / cycle cellulaire
SUPRESSEUR DE TUMEUR	TP53	17%	Mutations inactivatrices / cycle cellulaire et réparation de l'ADN
	NF1	15%	Mutations inactivatrices / MAP Kinases
	CDKN2A	14% + 41%	Mutations et délétions inactivatrices / cycle cellulaire
	ARID2	13%	Mutations inactivatrices / remodelage de la chromatine
	PTEN	8% + 18%	Mutations et délétions inactivatrices / voie PI3K/Akt/mTOR
	PPP6C	7%	Mutations inactivatrices / cycle cellulaire
AUTRES	TERT	6%	Amplifications perte de fonction / Fonctionnement de la télomérase
	MITF	5%	Amplifications activatrices / homéostasie mélanocytaire

Tableau 3 : Distribution des principales altérations génétiques retrouvées chez des patients présentant un mélanome cutané

Liste (non exhaustive) des principales mutations (et leur fréquence) détectée par **séquencage haut-débit** dans une cohorte de **686 patients** atteints de mélanome cutané. Les chiffres en noirs représentent les mutation d'un seul nucléotide, ceux en violet les amplifications et ceux en rouge les délétions. Les voies de signalisation ou processus biologiques importants associés à ces gènes sont précisés en bleu.

2005). La progression vers le mélanome *in situ* puis invasif et métastatique requiert alors **l'accumulation d'autres mutations** (Schadendorf *et al.*, 2018). Les gènes touchés par ces altérations, classés la plupart du temps comme **oncogènes** ou au contraire **suppresseurs de tumeur**, codent pour des protéines impliquées dans de nombreuses voies de signalisation qui jouent un rôle dans la prolifération, la survie ou encore la mort des cellules tumorales. L'émergence du séquençage haut-débit a permis de confirmer les anomalies génétiques déjà bien identifiées mais également d'en découvrir de nouvelles (*Tableau 3*).

L'analyse d'une large cohorte d'échantillons de mélanome (The Cancer Genome Atlas Network, 2015) a permis grâce aux techniques moléculaires modernes et à l'application d'algorithmes bio-informatiques d'identifier **quatre sous-types génétiques** différents sur la base de mutations de gènes activatrices : les mélanomes mutés **BRAF** (50% des cas environ), ceux mutés **RAS** (25% des cas), ceux mutés **NF1** (*Neurofibromatosis-1*) (15% des cas) et enfin ceux qui ne sont mutés pour aucun de ces trois gènes nommés « **triple-wild-type (WT)** » (environ 10% des cas) (*Figure 6*). Cette classification met en évidence l'implication très majoritaire de la voie des MAP kinases (MAPK) dans le mélanome puisque BRAF, RAS et NF1 appartiennent à cette voie.

2.5.1.1. Altération de la voie des MAP kinases : activation constitutive d'une voie de prolifération

La voie de signalisation des MAP (*Mitogen-activated protein*) kinases (**MAPK**) est une voie de signalisation intracellulaire importante. Elle contrôle à travers ses divers effecteurs des processus intracellulaires essentiels tels que l'embryogénèse, la différenciation cellulaire, la prolifération ou encore la survie et l'apoptose (Amaral *et al.*, 2017). Dans des conditions physiologiques, son activation se fait *via* la liaison de facteurs de croissance (GF – *Growth Factors*) à des récepteurs à tyrosine kinase (**RTKs**) (*Figure 7*). Cette interaction va provoquer une autophosphorylation du récepteur, aboutissant au recrutement de facteurs intermédiaires (Grb2 : *Growth Factor Receptor-Bound Protein 2* ; SOS1 : *SOS Ras/Rac Guanine Nucleotide Exchange Factor 1*) catalysant la conversion du RAS-GDP inactif en **RAS-GTP actif**. La régulation de cette activation est effectuée par la protéine GAP (*GTPase activating protein*) **NF1** (*Neurofibromatosis-1*) qui va catalyser la conversion inverse (RAS-GTP → RAS-GDP). Lorsqu'il est **activé**, **RAS** recrute à la membrane des kinases **RAF** (*Rapidly Growing Fibrosarcomas*) (A-Raf, **B-Raf** ou C-Raf) qui sont activées et enclenchent une cascade de phosphorylation : RAF phosphoryle **MEK1/2** (*Mitogen-activated/Extracellular Signal Regulated Protein Kinase 1/2*) qui phosphoryle à son tour **ERK1/2** (*Extracellular Signal-Regulated Kinase 1/2*). Les kinases ERK activent alors de nombreux substrats cytoplasmiques (*Figure 7*) dont certains sont impliqués dans l'**apoptose** ou la **synthèse protéique** et d'autres transloquent dans le noyau afin de phosphoryler des facteurs de transcription impliqués dans la différenciation mélanocytaire, la prolifération cellulaire ou la survie (Mebratu and Tesfagzi, 2009).

Mélanome cutané

■ BRAF ■ Ras ■ NF1 ■ Wild-type or other

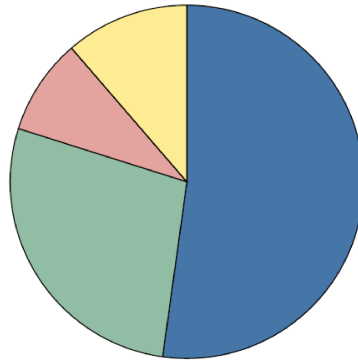


Figure 6 : Classification génétique des mélanomes cutanés en 4 sous-types

Classification génétique et distribution des mutations activatrices de gènes établie d'après les données du « Cancer Genome Atlas ». *BRAF* : B-raf proto-oncogène serine/thréonine kinase ; *NF1* : Neurofibromatosis 1

Figure tirée de : Schandendorf et al, 2018, The Lancet

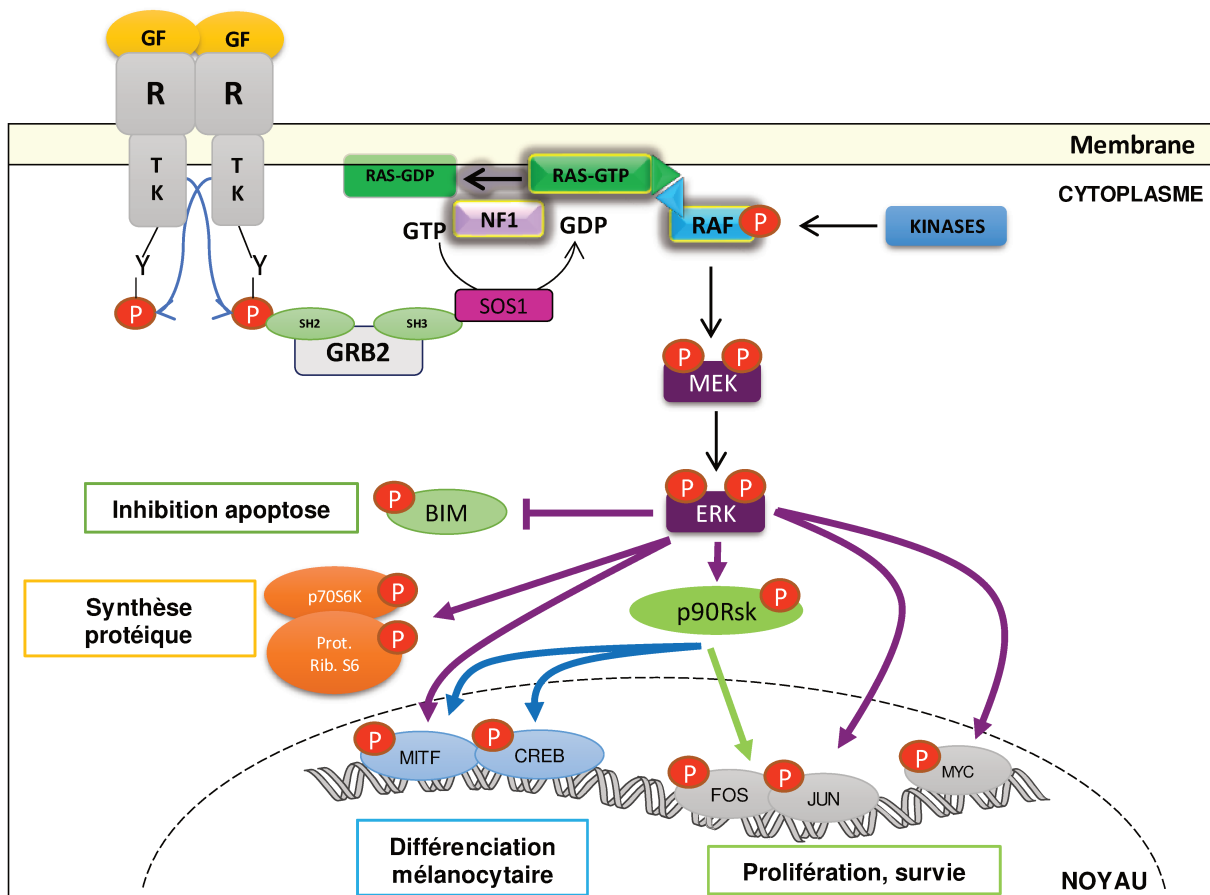


Figure 7 : Voie de signalisation des MAP kinases

L'activation d'un récepteur tyrosine kinase par son ligand entraîne son autophosphorylation, le recrutement d'une protéine adaptatrice Grb2 et l'activation de **Sos1**. Ce facteur d'échange va alors activer la GTPase **RAS** qui phosphoryle en cascade les kinases **RAF**, MEK et ERK. La protéine GAP **NF1** va au contraire inactiver ce signal par conversion de la forme RAS-GTP en RAS-GDP. Dans le cytoplasme, ERK phosphoryle divers substrats et notamment des facteurs de transcription qui migrent au noyau pour activer des programmes de survie, de prolifération ou de synthèse protéique. Cette voie est fréquemment suractivée dans les mélanomes. Les protéines codées par les gènes les plus fréquemment mutés dans le mélanome cutané sont encadrées en jaune.

L'activation de la voie des MAPK est une étape essentielle dans la pathogénèse du mélanome. En effet, les mutations activatrices des gènes *BRAF* et *NRAS* vont provoquer une **activation constitutive** de cette voie alors que la perte de fonction du gène régulateur *NF1* va mener à son **hyperactivation**.

Les **kinases RAF** font parties de la famille des sérines/thréonines kinases et sont souvent décrites comme étant des **oncogènes** dans différents cancers, tels que dans le cancer du côlon, du poumon ou dans le mélanome. Il existe trois isoformes de cette protéine : A-Raf, B-Raf et C-Raf. Les mutations de ***BRAF*** affectent **40% à 60%** des mélanomes cutanés. Elles consistent pour la plupart en des mutations ponctuelles qui résultent au niveau protéique en la substitution d'un acide aminé conduisant à un **état d'activation constant**. La substitution d'une valine par un acide glutamique (**V600E**) représente 74% à 86% des mutations *BRAF*, suivie de celle par une lysine (V600K) (10-30%) et de substitutions beaucoup moins fréquentes telles que V600D, V600M ou V600R (Dimitriou *et al.*, 2018). L'activation constitutive de la voie des MAPK peut également être la conséquence de translocations impliquant le gène ***BRAF*** (Botton *et al.*, 2013, 2019). Lors de ce phénomène, la portion du gène codant pour le domaine **kinase de BRAF** fusionne avec un gène partenaire situé en 5' dont le promoteur est activé dans les cellules mélanocytaires. Les protéines de fusion résultantes, sont dépourvues du domaine auto-inhibiteur de *BRAF* (AID : *Autoinhibitory domain*) ce qui entraîne une activation constitutive de la voie des MAP-kinase, leur procurant un fort potentiel oncogénique. De la même manière, il existe des fusions de *CRAF* ainsi que des fusions de gènes codants des **RTKs** qui eux nécessitent la présence d'un domaine de dimérisation dans leur gène partenaire pour être activés.

Même si plus de 80% des nævi portent cette mutation V600E du gène *BRAF*, l'activation de la voie des MAPK reste brève dans ces lésions car elle est suivie d'un arrêt du cycle cellulaire (sénescence). Au contraire, dans le cas d'un mélanome, des altérations additionnelles telles que la perte de fonction de gènes « suppresseur de tumeur » empêchent cet arrêt du cycle cellulaire et permettent la progression du mélanome (Shain *et al.*, 2015).

Les **protéines RAS** jouent également un rôle d'**oncogène** dans de nombreux cancers (côlon, poumon, mélanome...) : le gène RAS est en effet retrouvé muté dans un cancer sur quatre chez l'Homme. En plus d'être une protéine intégrée à la voie des MAPK, RAS peut également activer la voie des PI3K (*Phosphoinositide-3-kinase*) (Asati, 2016) ; elle joue donc un rôle *via* ces deux voies dans la prolifération, la migration et la survie cellulaire. Les trois isoformes de RAS (H-Ras, K-ras et N-ras) codent chacune pour une petite **GTPase** qui catalyse l'hydrolyse du GTP en GDP. Le gène *RAS* est muté dans **28% à 30%** des mélanomes, en particulier sous son isoforme *NRAS* (25% environ des mélanomes) (Dimitriou *et al.*, 2018) L'altération la plus fréquente est la substitution de la glutamine par une leucine ou une arginine en position 61 (Q61L ou Q61R), qui provoque également l'activation constitutive de la protéine *NRAS*. Cette mutation empêche en effet l'hydrolyse du GTP en GDP par les **protéines GAP** telle que NF1. Les mutations de *NRAS* ont également été identifiées dans 18% des nævi bénins (Damsky and Bosenberg, 2017). Mais tout comme pour *BRAF*, la mutation de *NRAS* à elle seule n'est pas suffisante pour induire la transformation maligne des mélanocytes et requiert d'autres mutations.

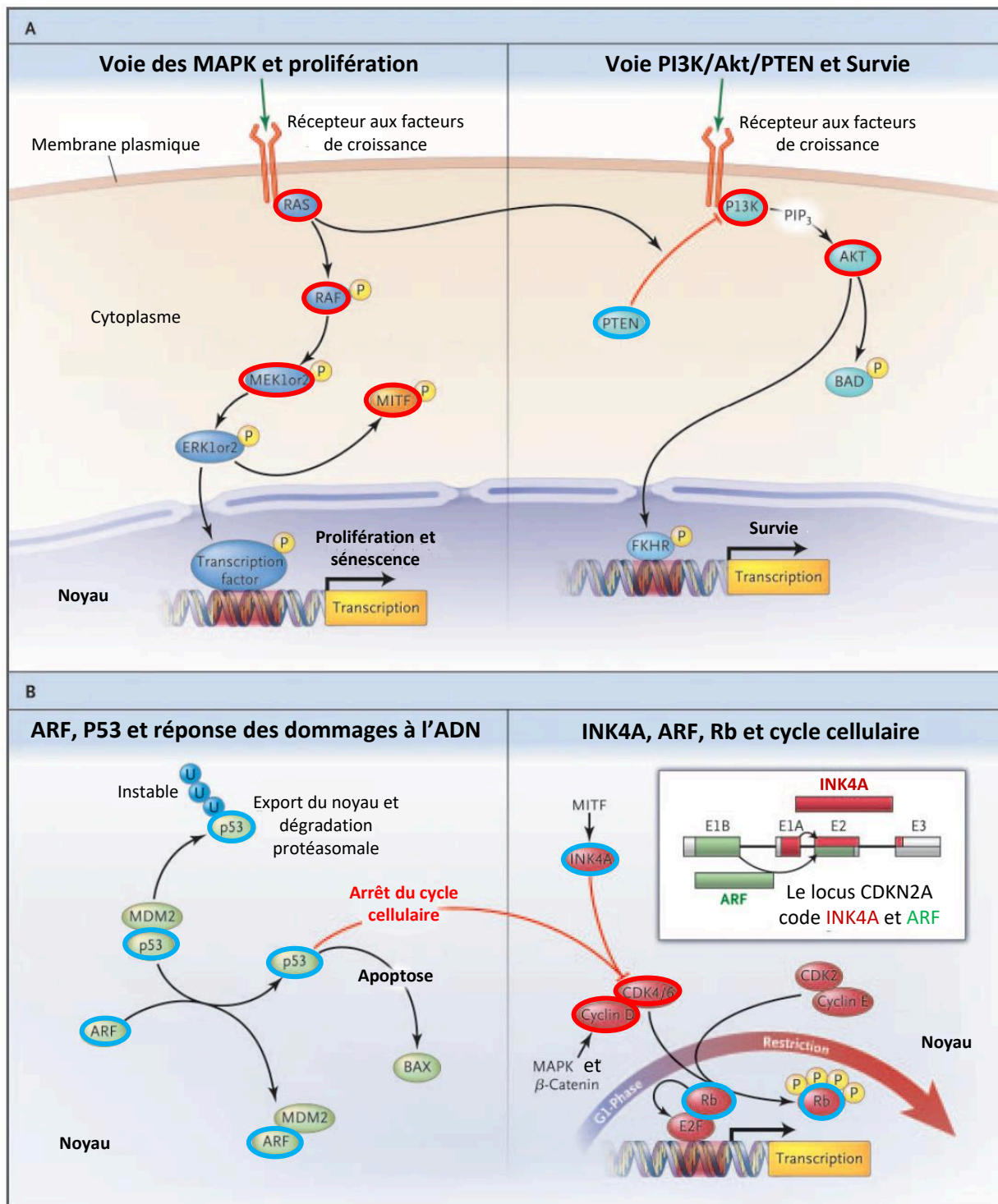


Figure 8 : Principaux processus biologiques et voies de signalisation altéré(e)s dans le mélanome.

Les principales voies de signalisation perturbées dans le cadre de la mélanogénèse sont présentées ici. Les altérations des protéines associées à ses voies (représentation non exhaustive) sont encerclées sur ce schéma. Les protéines encerclées en **rouge** sont celles dont les gènes sont affectées par des mutations **gain de fonction** et celles encerclées en **bleu** sont celles dont les gènes ont subi une **perte de fonction**. En panel A est représenté la voie des **MAP Kinases (MAPK)** associée de manière générale à la **prolifération** des cellules ; et la voie **PI3K/Akt** plutôt associée à leur survie. L'activation de la voie des MAPK permet également la phosphorylation de **MITF** qui joue un rôle dans l'homéostasie des mélanocytes et est retrouvé muté dans certains cas de mélanomes. En panel B est représenté le lien entre les **dommages à l'ADN**, le **cycle cellulaire** et **l'apoptose**. En réponse au dommages subis par l'ADN, **P53** se libère de MDM2 et peut induire un arrêt du cycle cellulaire et l'apoptose des cellules. L'arrêt du cycle cellulaire se fait *via* l'inhibition de **CDK4/6** par l'intermédiaire de la protéine P21 (non représentée ici). Le couple **CDK4/CyclineD** permet en effet la phosphorylation de la protéine **Rb** et donc la libération du facteur de transcription E2F qui par sa liaison à l'ADN induit l'entrée en phase S du cycle cellulaire. La protéine **INK4A** (ou **p16**), codée par **CDKN2A**, inhibe le couple CDK4/CyclineD.

Enfin, la protéine **NF1** joue au contraire le rôle de **suppresseur de tumeur**. Son gène est retrouvé muté dans de nombreux cancers comme les tumeurs malignes des gaines nerveuses périphériques (MPNST), les leucémies lymphoblastiques aiguës, les glioblastomes ou encore le mélanome (Kiuru, 2017). Cette protéine possède un domaine catalytique **GAP** (*GTPase-activating protein*) qui régule négativement la protéine RAS par la conversion du RAS-GTP en RAS-GDP, inhibant donc en aval la voie des et la croissance cellulaire. Le gène *NF1* est muté dans **13% à 17%** des mélanomes. Les altérations sont alors des mutations non synonymes (non-sens, délétions, insertions) dont la plupart sont des événements perte de fonction (Cirenajwis *et al.*, 2017) qui surviennent uniquement à partir du stage malin (mélanome *in situ*).

De manière intéressante, ces mutations de la voie des MAPK sont exclusives l'une de l'autre dans le mélanome (et d'autres néoplasmes). Cela suggère une **redondance fonctionnelle** des protéines touchées et l'absence d'avantage sélectif supplémentaire de la multiplication des mutations au sein de cette même voie pour les cellules tumorales (Damsky and Bosenberg, 2017).

2.5.1.2. Altération d'autres voies de signalisation impliquées dans le cycle cellulaire, la prolifération ou l'apoptose.

L'activation constitutive de la voie des MAPK, bien que très majoritaire, n'est pas systématiquement observée chez les patients atteints de mélanome puisque 10% environ des patients portent une tumeur **triple-WT** (The Cancer Genome Atlas Network, 2015). En outre, même si une altération de la voie des MAPK survient, elle ne suffit pas ni à provoquer la transformation du mélanocyte en cellule de mélanome, ni de permettre la progression de la tumeur. Des mutations de nombreux autres gènes, impliquées dans diverses voies de signalisation, sont alors responsables de ces événements. La dérégulation de ces voies de signalisation aura en effet pour conséquences d'engendrer la **prolifération non contrôlée** des cellules tumorales (croissance auto-suffisante et **insensibilité** aux **signaux inhibiteurs du cycle cellulaire**), de **favoriser leur survie** et d'**inhiber leur apoptose**, ou encore de faciliter leur **capacité de migration et d'invasion** (Dantonio *et al.*, 2018; Kyrgidis *et al.*, 2010). Parmi ces voies, deux (en plus de la voie des MAPK) ont un rôle central dans la pathogénèse du mélanome et dans l'apparition des caractéristiques citées ci-dessus : la voie **PI3K** (*Phosphatidyl Inositol-3-Kinase*)/**Akt**, et la voie de régulation du cycle cellulaire **p16INK4a** (*p16 INhibitor of Kinase a*)/**CDK4** (*Cyclin Dependant Kinase 4*)/**cycline D1**.

• La voie PI3K/Akt

Cette voie de signalisation, activée physiologiquement par des stimuli divers (facteurs de croissance, cytokines...) est impliquée dans de nombreux processus biologiques tels que la **survie**, la croissance, la prolifération, ou la migration/invasion des cellules. La kinase **PI3K** transduit le signal généré par l'interaction entre un facteur de croissance et son récepteur en signaux intracellulaires en convertissant des **phospholipides** ($PIP_2 \rightarrow PIP_3$) qui à leur tour activent la sérine/thréonine kinase **AKT** (*Figure 8*). Cette dernière va alors

atteindre de nombreux effecteurs en aval et provoquer l'**inhibition de l'apoptose** et encourager la **survie** des cellules : AKT inactive la protéine pro-apoptotique BAD (*Bcl-2 Antagonist of cell Death*) ainsi que des facteurs de transcription tels que FKHR (*Forkhead Transcription Factor*) ou NFκB (*Nuclear Factor κ-light-chain-enhancer of activated B cell*) impliqués dans la transcription de gènes apoptotiques (Madhunapantula and Robertson, 2017). De même, Akt peut inactiver Gsk3 (*Glycogen Synthetase Kinase 3*), ce qui entraîne une accumulation de la cycline D1 et permet une progression dans le **cycle cellulaire**. La protéine Akt, via l'activation de NFκB, favoriserait également la migration et l'invasion des cellules (Dantonio et al., 2018; Dhawan et al., 2002). Le suppresseur de tumeur **PTEN** (*Phosphatase and Tensin Homolog*), par conversion du PIP₃ en PIP₂, est le **régulateur négatif** le plus important de la voie PI3K/Akt.

L'activation aberrante de cette voie de signalisation est observée dans de nombreux cancers humains tels que le cancer du sein, du poumon, de la prostate ou le **mélanome**. Les altérations de cette voie dans le mélanome consistent en des mutations ponctuelles ou des variations du nombre de copies de certains composants de la voie. Si les mutations de **PI3K** sont relativement rares (≈3% des mélanomes métastatiques), la surexpression d'**Akt** (et notamment Akt3) est retrouvée dans **43% à 60%** des mélanomes non-familiaux et son expression augmente dans les stades avancés du mélanome. L'activation constitutive de la voie PI3K/Akt est aussi largement due à la perte de fonction de la protéine **PTEN**, détectée dans **10% à 30%** des mélanomes cutanés (Stahl et al., 2004).

- Protéines p16INK4a/CDK4/cycline D1 et régulation du cycle cellulaire

Les protéines **CDK4/6** (*Cyclin Dependant kinase 4/6*) et **Cycline D1** sont des régulateurs importants du cycle cellulaire puisqu'ils permettent, grâce à la phosphorylation de la **protéine Rb** (*Retinoblastome protein*) et à la libération de E2F (*Transcription Factor E2*) l'entrée en phase S des cellules (Figure 8). Ce passage de la phase G1 à la phase S, pendant laquelle l'ADN se réplique, est essentiel pour permettre la progression du cycle en phase G2 et la division cellulaire (mitose). En condition physiologique, ce passage est donc finement régulé pour éviter une prolifération anarchique des cellules. La régulation du couple CDK4/6-CyclineD1 se fait principalement par **P16/INK4a** qui inhibe la cycline D1. Dans le cadre de nombreux cancers solides, il est alors très fréquent de trouver des altérations de cette voie de signalisation (Choi and Anders, 2014). En effet, les deux kinases **CDK4** et **CDK6** sont décrites comme des **oncogènes** majeurs de cancers humains dans lesquels elles sont rendues **hyperactives** par mutation ou amplification de leurs gènes. Dans le mélanome, des amplifications de *CCDN1* (codant la Cycline D1) et de *CDK4* sont retrouvés dans environ 10% des cas, notamment dans les tumeurs triple-WT (The Cancer Genome Atlas Network, 2015). Par ailleurs, la protéine INK4A (ou p16), codée par le gène *CDKN2A*, fait partie des **suppresseurs de tumeur** avec l'une des plus hautes fréquences d'amplification et de délétion dans les cancers humains (Choi and Anders, 2014). La **perte de fonction de CDKN2A** est retrouvée cette fois dans **37% à 72%** des cas de mélanome, en fonction du sous-type génétique de la tumeur (The Cancer Genome Atlas Network, 2015). Enfin, la protéine **Rb**, qui empêche E2F de se fixer à l'ADN pour induire l'entrée en phase S, est inactivée dans environ 5% des mélanomes. Il est également

intéressant de relever que la voie de réponse aux dommages à l'ADN, **MDM2** (*Mouse Double Minute 2*)/**p53**, qui régule en premier lieu l'apoptose, est également étroitement liée au cycle cellulaire. En cas d'activation de cette voie, MDM2 libère p53 qui peut alors activer P21, protéine inhibitrice de CDK4/6 (*Figure 8*). Dans le mélanome, des mutations inactivatrices de **TP53** (codant p53) sont détectées dans 17% des cas, et des mutations activatrices de **MDM2** dans environ 5% des cas (The Cancer Genome Atlas Network, 2015).

En plus de ces deux voies majeures qui regroupent le pourcentage d'altérations génétiques le plus important, de nombreuses autres voies de signalisation qui se recoupent souvent entre elles et engagent les mêmes types de processus biologiques sont également impactées dans le mélanome. Ainsi, on peut trouver une dérégulation de **la voie Wnt** (*Wingless*) (croissance cellulaire, différenciation, migration), de la voie **NFκB** (Survie, Inflammation, Invasion, Métastases), de la voie **JAK/STAT** (*Janus kinase/Transducer and Activator of Transcription*) (prolifération, différenciation, inhibition de l'apoptose, surveillance immunitaire) ou encore de la voie **Notch** (prolifération, différenciation, survie) (Dantonio *et al.*, 2018). Outre les dérégulations générales de ces grandes voies, d'autres protéines « isolées », impliquées dans la régulation de la chromatine (*ARID1/2*), le maintien des télomères (*TERT*) ou encore dans l'homéostasie des mélanocytes (*MITF*) sont également assez fréquemment touchées dans le mélanome (Schadendorf *et al.*, 2018).

Enfin, pour compliquer le tout, les différentes métastases ou mêmes sous-populations cellulaires de tumeurs chez un même patient peuvent évoluer différemment et donc présenter un statut mutationnel différent (Fattore *et al.*, 2019; Grzywa *et al.*, 2017). Cette hétérogénéité intra-tumorale et inter-tumorale rend la prise en charge thérapeutique du patient compliquée et permet également au mélanome de s'adapter sous la pression thérapeutique.

2.5.2. *Impact de l'environnement sur la croissance du mélanome : implication des cellules du système immunitaire*

En 1889, le chirurgien anglais Stephen Paget s'interroge sur la distribution des métastases dans le cadre de cancers du sein et il avance : « [...] *every single cancer cell must be regarded as an organism, alive and capable of development. When a plant goes to seed, its seeds are carried in all directions; but they can only live and grow if they fall on congenial soil* » (Paget, 1889). Il soulève alors, pour la première fois, l'importance de l'environnement de l'hôte (« *soil* » : le sol) pour une croissance et une propagation optimale de la tumeur (« *seed* » : la graine). Cent ans plus tard, cette théorie a ressurgi avec l'étude de Hart et Fidler sur la croissance préférentielle de cellules murines de mélanome dans différents organes (Hart and Fidler, 1980). Depuis, de nombreuses études dans ce domaine ont permis de mieux comprendre l'importance des interactions entre les cellules tumorales et leur environnement dans la progression du cancer.

Le **microenvironnement tumoral** est composé d'un réseau d'éléments cellulaires et acellulaires, divisé en **compartiment tumoral** (cellules cancéreuses et cellules souches cancéreuses) et **compartiment stromal**

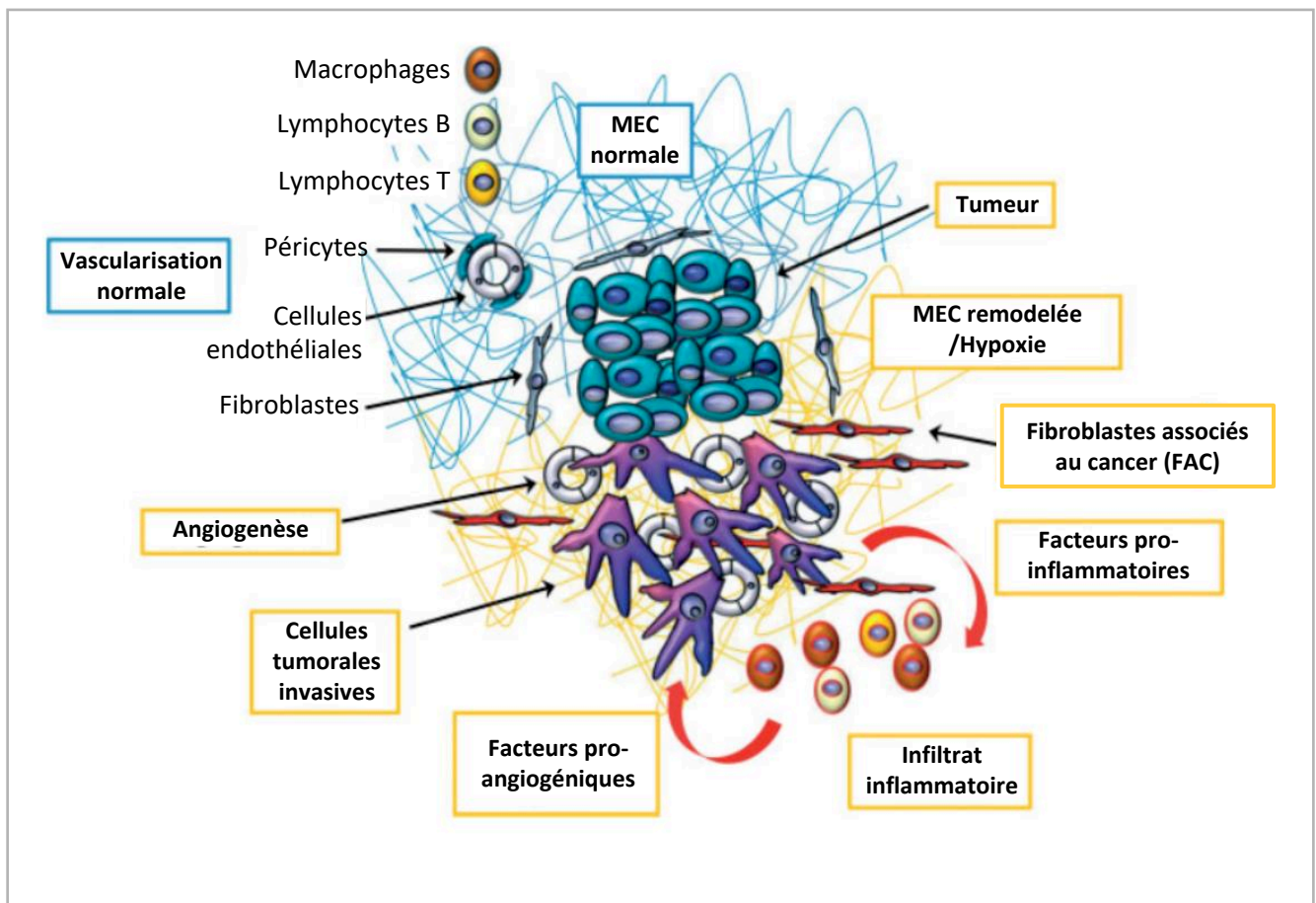


Figure 9 : Composition du microenvironnement et progression tumorale

L'ensemble des cellules et molécules qui entourent la tumeur, appelés microenvironnement tumoral, joue un rôle primordial dans la progression tumorale. Cet ensemble est composé de **Fibroblastes associés au cancer (FAC)**, de **Matrice Extracellulaire (MEC)** remodelée, de **cellules immunitaires** infiltrants la tumeur et de **cellules endothéliales**. Les **FACs**, par sécrétion de facteurs de croissances, de composants de la MEC et de diverses chimiokines, vont favoriser la prolifération tumorale, l'invasion et l'angiogenèse. Les **cellules immunitaires infiltrées** quant à elles peuvent jouer en faveur ou en défaveur de la tumeur en fonction de leur type. Certaines cellules (Lymphocytes B/T-cytotoxiques, Macrophages M1) provoqueront la régression tumorale ; d'autres, polarisées par les cytokines sécrétées par les cellules tumorales (Lymphocytes T régulateurs, Macrophages Associés à la tumeur (M2)), vont favoriser la croissance et l'invasion tumorale par production de facteurs pro-angiogéniques par exemple. L'**hypoxie** va également favoriser l'angiogenèse.

Figure adaptée de : Allen et al, 2011, J Pathol

(Matrice extracellulaire (**MEC**) et cellules stromales). Les cellules stromales sont elles-mêmes composées de **fibroblastes associés au cancer (FAC)**, de **cellules endothéliales** formant la vascularisation, et enfin de **cellules immunitaires** infiltrées (*Figure 9*) (Allen and Jones, 2011; Bhome *et al.*, 2016). Chacun de ses éléments joue un rôle dans la progression de la tumeur. Les fibroblastes, transformés en **FACs** par l'action des cellules tumorales, sont largement impliqués dans la croissance tumorale et l'angiogenèse. Ils agissent grâce à la sécrétion de facteurs de croissance (EGF – *Epidermal Growth Factor*, HGF – *Hepatocyte Growth Factor*...) et de diverses cytokines et chimiokines pro-angiogéniques (SDF1 – *Stromal Cell Derived-factor 1*, FGF-2 – *Fibroblast Growth Factor 2*, VEGF – *Vascular Endothelial Growth Factor*). Ils sont également responsables du **remodelage de la MEC** vers une composition permissive pour l'invasion des cellules cancéreuses *via* par exemple la production massive de collagène ou encore la sécrétion d'enzymes telle que LOX (*Lysyl Oxidase*) qui régulent sa rigidité (Henke *et al.*, 2020). Les **cellules immunitaires** infiltrées comprennent majoritairement des macrophages, des lymphocytes (T, B ou NK) ou des cellules présentatrices d'antigènes (CPA) telles que les cellules dendritiques. Ces cellules peuvent avoir des effets opposés dans la progression du cancer. De manière simplifiée, les lymphocytes TH1 et cytotoxiques CD8+, les macrophages M1 et les CPA participent à la **surveillance immunitaire** et à la régression tumorale alors que les macrophages M2, les lymphocytes T régulateurs (Tregs) et les lymphocytes TH2 permettent la tolérance immunitaire et la **progression de la tumeur**. Les cellules immunitaires pro-tumorales, et notamment les macrophages M2, sécrètent également des cytokines et enzymes qui favorisent l'angiogenèse (VEGF) et l'invasion des cellules tumorales (MMP9 – *Matrix Metalloproteinase 9*) (Allen and Jones, 2011). La vascularisation formée principalement par les **cellules endothéliales** lors du processus d'angiogenèse, qui permet l'apport nécessaire en nutriments et en oxygène et la dissémination des cellules tumorales dans l'organisme, est donc induite à la fois par les FACs et par certaines cellules immunitaires infiltrées. Finalement, tous les éléments du microenvironnement tumoral (compartiment tumoral et stromal) dialoguent entre eux pour favoriser la croissance et la progression de la tumeur. Dans le développement de cette partie, nous nous concentrerons uniquement sur **l'impact ambivalent des cellules immunitaires sur la progression du cancer et du mélanome** *via* le phénomène d'« Immunoediting ».

2.5.2.1. Le phénomène d'Immunoediting : zoom sur le mélanome

Pendant une cinquantaine d'années, l'idée selon laquelle le système immunitaire (**SI**) de l'hôte puisse contrôler le cancer a fait l'objet de débats. D'un côté, certains chercheurs soutenaient le concept de **surveillance immunitaire** qui défend le fait que les cellules immunitaires de l'hôte reconnaissent les cellules tumorales et empêchent le développement du cancer (Thomas, 1959) (Burnet, 1957). Ce concept s'est développé dans les années 1960 avec la découverte de l'existence **d'antigènes tumoraux** spécifiques (Old and Boyse, 1964). De l'autre côté, certaines études vont contre cette hypothèse et certains chercheurs avancent que les cellules tumorales ne possèdent pas les bons « signaux de dangers » et sont trop similaires aux cellules normales dont elles sont dérivées pour déclencher une réponse immunitaire forte ; ils prônent alors le concept de **tolérance** envers les cellules tumorales (Matzinger, 1994; Pardoll, 2003). Il y a une vingtaine d'années est alors apparu le

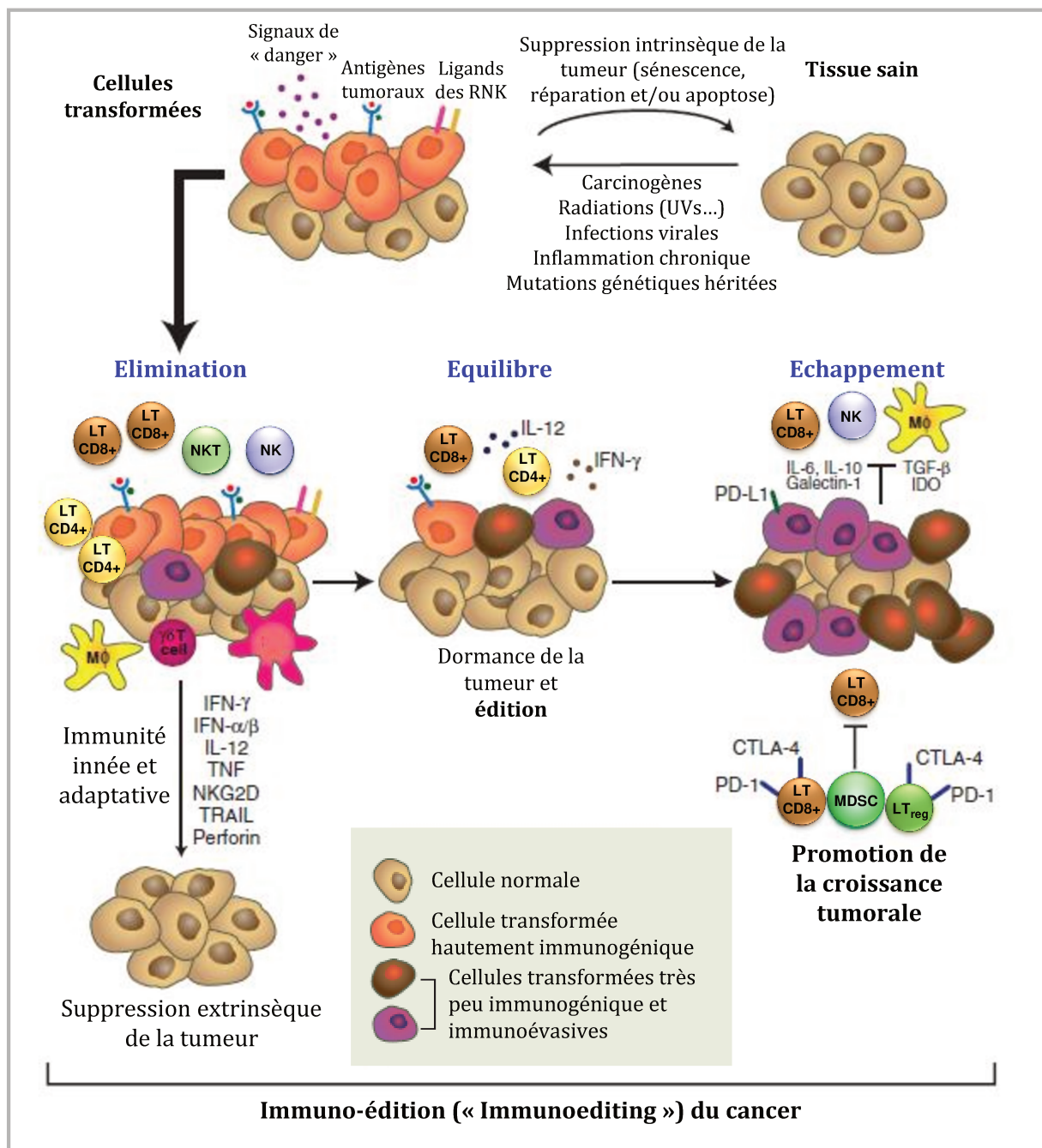


Figure 10 : Concept d'Immuno-édition (« Immunoediting ») du cancer

L'édition immunitaire (ou Immuno-édition) du cancer est un **mécanisme de suppression extrinsèque** de la tumeur qui survient suite à la transformation de cellules normales et uniquement lorsque les mécanismes de **suppression intrinsèques** ont échoués. En général, l'**immuno-édition** consiste en 3 phases successives (les 3 « E ») : L'**élimination**, l'**équilibre** et l'**échappement**.

Pendant la phase d'**élimination**, les cellules de l'immunité innée et adaptative travaillent ensemble pour détruire les tumeurs se développant, bien avant qu'elles deviennent cliniquement apparentes. Si cette phase arrive à son terme, la tumeur est éliminée et le processus se termine ici.

Si en revanche un/plusieurs sous-type(s) de cellule tumorale n'est pas détruit, la tumeur peut entrer en phase d'**équilibre**. Le développement de la tumeur est alors empêché par les cellules du système immunitaire adaptatif (lymphocytes T notamment). L'édition de l'immunogénicité de la tumeur se produit lors de cette phase. La rétention de la tumeur pendant cette phase peut durer toute la vie de l'hôte et signer également la fin de ce processus.

Cependant, la pression de sélection immunitaire constante sur les cellules tumorales génétiquement instables peut faire basculer la tumeur dans sa **phase d'échappement**. L'entrée dans cette phase peut être la conséquence d'une perte de reconnaissance des cellules par le système immunitaire, d'une insensibilité aux mécanismes effecteurs immuns ou et l'induction d'un état immunosuppresseur dans le microenvironnement tumoral (recrutement de MDSCs, de LTregs). La croissance de la tumeur n'est donc plus retenue par les cellules immunitaires et le cancer devient alors cliniquement apparent.

RNK : Récepteur aux cellules NK ; MDSCs : *Myeloid Derived Suppressor Cells* ; LTreg : Lymphocyte T régulateur

Figure adaptée de : Schreiber et al, 2011, Science

concept de «**Tumor Immunoediting** », que l'on pourrait traduire par **immuno-édition** de la tumeur : lors de la croissance tumorale, les cellules du système immunitaires présentes dans l'environnement interagissent avec la tumeur et **modèlent** cette dernière lors de 3 phases successives (les 3 « E ») que sont L'**Elimination**, l'**Equilibre** et l'**Echappement** (O'Donnell *et al.*, 2019; Schreiber *et al.*, 2011). La complexité du dialogue, pendant ce processus, entre les cellules tumorales et les cellules du **système immunitaire**, exhibant un effet **antitumoral** (reconnaissance et élimination) ou au contraire pro-tumoral (tolérance ou même immunosuppression) explique alors le débat survenu et apporte des éléments de réponse soutenant les deux hypothèses.

(i) La phase d'élimination

La **phase d'élimination** se produit avant même qu'une tumeur se développe et devienne apparente cliniquement ; et elle ne s'accomplit que si les cellules tumorales n'ont pas été éliminées par des mécanismes intrinsèques tels que la réparation de l'ADN ou l'apoptose. Elle reprend le grand principe de la **surveillance immunitaire**, pendant laquelle les cellules du **SI innée** et celles du **SI adaptatif** collaborent pour détecter et détruire toute nouvelle tumeur qui se développe (*Figure 10*). Les « signaux de dangers » induits par la tumeur à un stade précoce activent les cellules du **système inné** comme les cellules dendritiques, les macrophages ou les cellules NK (*Natural Killer*). Ces signaux peuvent se présenter sous la forme de **cytokines** produites par la tumeur et son environnement ou encore de fragments relargués par les cellules cancéreuses mortes : les **DAMPS** (*Damage-associated Molecular Pattern molecules*). Ces réponses induites par ces cellules innées facilitent le développement d'une **réponse adaptative** via l'activation et l'**expansion** de **lymphocytes T (LT) effecteurs** CD4+ et CD8+.

Le mélanome est l'un des cancers les plus **immunogéniques**. Cette caractéristique, partagée par d'autres cancers tels que le lymphome diffus à grande cellules B ou l'**adénocarcinome du colon** avec **instabilité des microsatellites** (**MSI** : *Microsatellite Instability*), est due à la fois à sa forte charge mutationnelle qui facilite la génération de nouveaux antigènes tumoraux et à la capacité des cellules tumorales à présenter ces antigènes (Wang *et al.*, 2019). La coopération des axes innés et adaptatifs au stade précoce du mélanome permet donc la génération d'une protection immunitaire à long-terme (*Figure 11*).

• Réponse antitumorale innée dans le mélanome

Les cellules immunitaires innées naturellement présentes dans la peau comprennent les **cellules NK**, les **macrophages**, les **polynucléaires neutrophiles (PN)** et les **cellules dendritiques (CD)**. Dans la tumeur, ces cellules contribuent à une cytotoxicité immédiate et non-spécifique contre les cellules de mélanome.

Grâce à l'interaction des **ligands** exprimés à la surface des cellules de mélanome avec les **récepteurs des cellules NK** (comme NKG2D, NKp30, DNAM-1), ces dernières sont activées de manière indépendante pour éliminer les cellules de mélanome *via* la sécrétion de granule cytotoxiques (Perforine, Granzymes) ou celle de cytokines activant les voies de mort (TNF α : *Tumor Necrosis Factor α*) (Lakshmikanth *et al.*, 2009).

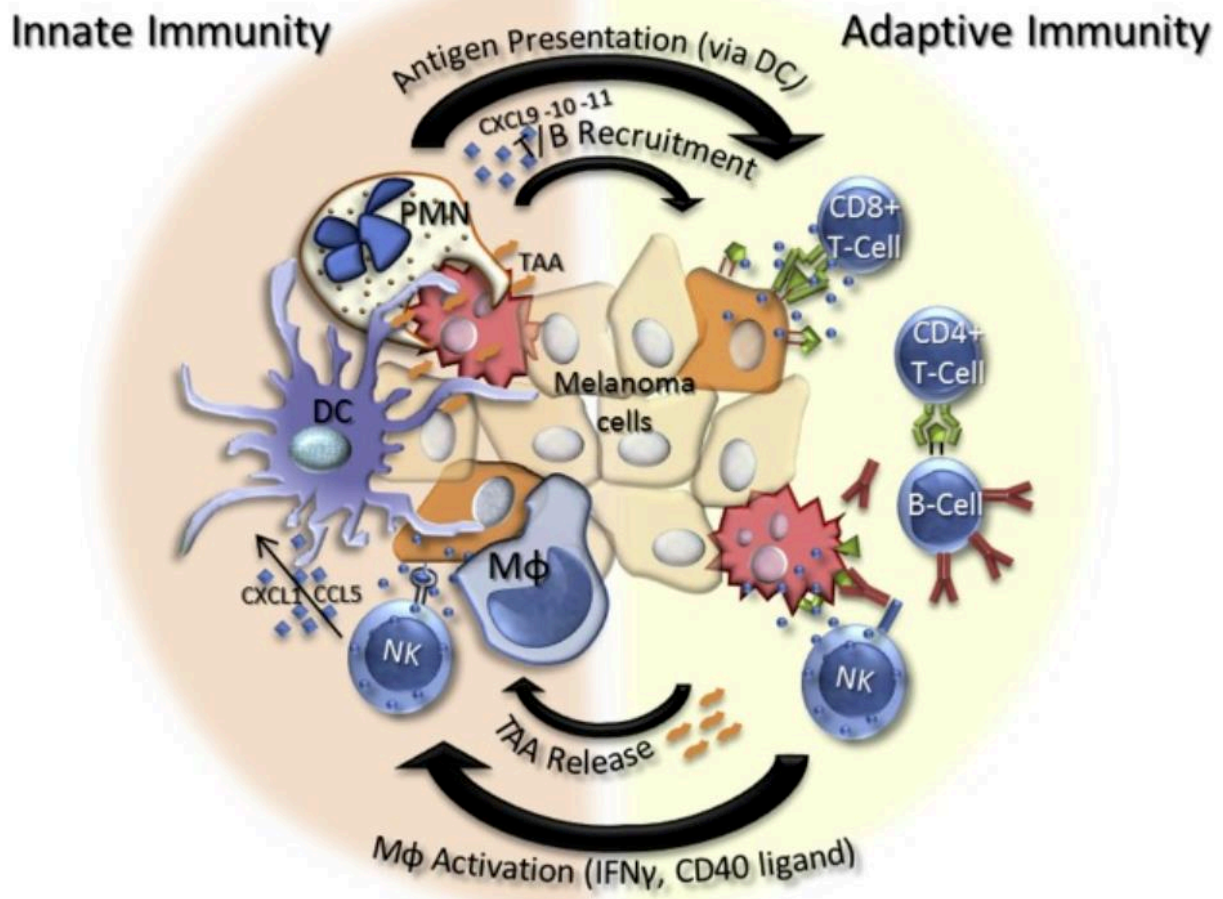


Figure 11 : Elimination d'une tumeur de mélanome par des cellules immunitaires effectrices

Dans la composante innée de l'immunité, les cellules NK se lient aux cellules tumorales *via* des interactions récepteur/ligand et sécrètent des molécules cytotoxiques qui causent la mort des cellules tumorales. Les polynucléaires **neutrophiles** (PMN), les **macrophages** (Mφ) et les **cellules dendritiques** (DC) phagocytent les cellules de mélanome mortes et présentent les **antigènes associés à la tumeur** (TAA). Le recrutement des lymphocytes T (T cells) par gradient de chimiokines et la présentation des TAA à ces lymphocytes active la composante adaptative de l'immunité. Les lymphocytes T CD8+ se lient aux cellules tumorales présentant les antigènes sur des molécules du CMH *via* l'engagement du récepteur au lymphocyte T (TCR) (*en vert*), provoquant la mort des cellules de mélanome par sécrétion de granules cytotoxiques ou activation des récepteurs de mort. Les lymphocytes T CD4+ présentent les antigènes aux lymphocytes B (B cells) qui sécrètent alors des anticorps spécifiques des TAA et cause la mort des cellules tumorales *via* divers mécanismes. Les cellules de l'immunité adaptatives peuvent également réactiver celles de l'immunité innée *via* des interactions récepteur-ligand ou la production de cytokines. L'élimination des cellules de mélanome permet également la libération de nouveaux antigènes tumoraux que peuvent phagocytter les cellules présentatrices d'antigènes (DC, PMN et Mφ).

Figure tirée de : Marzagalli *et al*, 2019, *Semin Cancer Biol*

L'expression de ces ligands est dépendante de la progression tumorale et de la localisation de la tumeur. Ainsi, la perte de l'interaction avec le récepteur DNAM-1 (*DNAX accessory molecule-1*) est responsable d'une perte de la cytotoxicité des cellules NK, notamment dans les stades avancés (métastatiques) de la tumeur. Cette réponse des cellules NK contre le mélanome intervient donc plutôt à un stade précoce. Ces cellules peuvent également contribuer au **recrutement et à la maturation** de cellules présentatrices d'antigènes (Macrophages, PN et CD) *via* la sécrétion de cytokines telles que CXCL1 (*CXC-motif-ligand-1*) et CCL5 (*CC-motif ligand 5*). (Marzagalli *et al.*, 2019).

Les **macrophages** et les **neutrophiles** polarisés vers un phénotype **M1** ou **N1** respectivement (*Figure 12*), exercent leur action tumorale *via* la **phagocytose**, la sécrétion d'**agents tumoricides** (ROS, IFN- γ , Ligand Fas) ou encore le recrutement d'autres cellules immunitaires spécifiques (**LT**) par sécrétion de chimiokines. Une étude a d'ailleurs montré dans un modèle de mélanome murin que la 1^{ère} population de cellules qui **infiltré et inhibe la croissance tumorale** après vaccination par *Salmonella typhimurium* (attiré par les milieux hypoxiques comme le milieu intratumoral) était constitué de **neutrophiles cytotoxiques** (Blache *et al.*, 2012).

En tant que **cellules présentatrices d'antigènes (CPA)** professionnelles, les cellules dendritiques (CD) peuvent être très efficaces pour générer une réponse forte des lymphocytes T contre la tumeur. Les CD matures (ayant reconnu et internalisé des antigènes tumoraux) expriment les marqueurs de costimulation (CD80 et CD86 – *Cluster of Differentiation 80/86*) essentiels pour l'activation des LT mélanome-spécifiques (Tucci *et al.*, 2014). L'interaction du **TCR** (*T cell receptor*) sur le lymphocyte avec le **CMH-I/Antigène** sur la CD, les marqueurs de co-stimulation et la présence de cytokines appropriées (IFN- γ , IL-12) produites par les CD et les LT auxiliaires (LT_h : *T helper*) permet le développement de **LT cytotoxiques (LT_{cyt})** spécifiques (Marzagalli *et al.*, 2019). Dans le mélanome, les cellules dendritiques migratoires **CD103+**, grâce à l'expression du récepteur CCR7 à leur surface, sont essentiels pour une présentation et une activation des LT_{cyt} CD8+ dans le ganglion lymphatique drainant la tumeur ; jouant ainsi un rôle protecteur contre cette tumeur (Roberts *et al.*, 2016).

Les macrophages M1, les polynucléaires neutrophiles N1 et surtout les cellules dendritiques sont donc capables de présenter les antigènes captés et d'envoyer les signaux nécessaires pour engendrer une réponse adaptative secondaire, portées principalement par les LT_h CD4+ et les CT_{cyt} CD8+.

- Réponse antitumorale adaptative dans le mélanome

Les lymphocytes T effecteurs (T_{eff}) constitués des LT CD4+ et des LT CD8+ jouent un rôle important pendant la phase adaptative de l'immunité *via* les interactions TCR-CMH qui sont entretenues par la présence d'IFN- γ et de TNF- α . Ce rôle essentiel est appuyé d'abord par le fait que la **présence de LT** infiltrant la tumeur (TIL – *Tumor Infiltrating Lymphocytes*) est considérée comme un facteur de **bon pronostic** dans les mélanomes de stade III (Clark, 1991) et dans les mélanomes métastatiques (Erdag *et al.*, 2012). Pour une réponse efficace, quatre éléments sont nécessaires : l'**activation** des LT (par interaction avec les cellules dendritiques), la

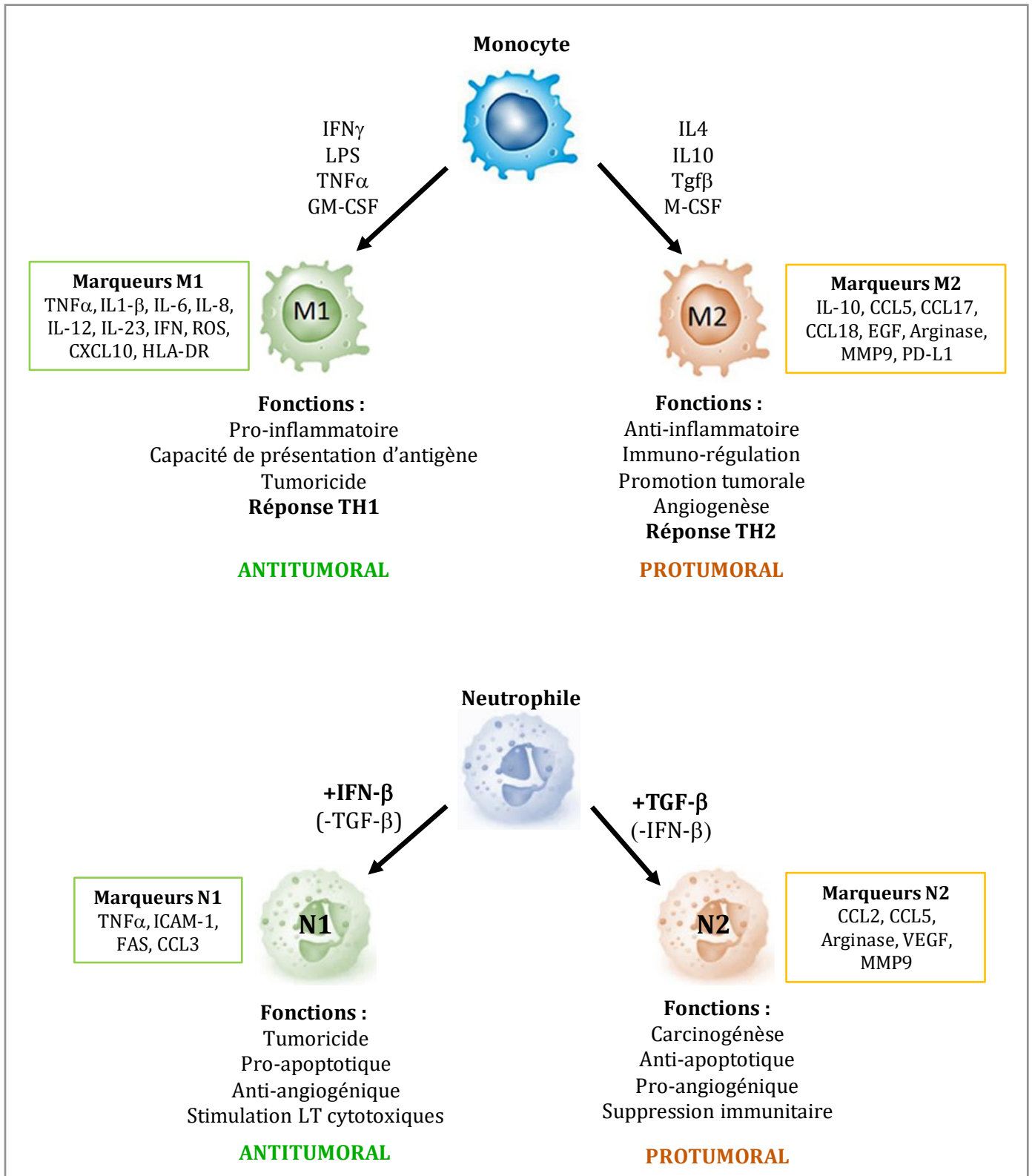


Figure 12 : Représentation simplifiée de la polarisation des macrophages et des neutrophiles et fonctions associées dans le cancer

En fonction de l'environnement dans lequel ils se trouvent et des cytokines présentes dans cet environnement, les **monocytes** et les **neutrophiles** peuvent être polarisés vers un **phénotype M1 ou N1, antitumoral** ou **M2 ou N2, protumoral**.

migration des LT dans la tumeur, l'identification des cellules de mélanome par les LT activés et enfin la sensibilité des cellules tumorales à l'apoptose. La **migration** des LT CD8+ aux métastases de mélanome est facilitée par la **présence des chimiokines** CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CXCL9 et CXCL10, qui peuvent être sécrétées par différentes cellules de l'environnement tumoral telles que les macrophages ou les cellules endothéliales ou les LT CD4+ (Harlin *et al.*, 2009). De plus, il semble que la présence de certaines **intégrines** sur les LT CD8+ soit très importante à la migration et au maintien de ces cellules dans les métastases, de manière site-spécifique (Salerno *et al.*, 2014). Une fois sur place, les LT activés **identifient** les cellules de mélanome qui expriment les **antigènes tumoraux** qui ont initié leur activation. Des molécules de transport de protéine (TAP : *Transporter associated with antigen Processing*), des protéines de liaisons et des chaperonnes (β 2-microglobulin) permettent alors aux peptides tumoraux d'être traités puis chargés sur des molécules du CMH-I à la surface des cellules de mélanome (Mahmoud *et al.*, 2017). Les lymphocytes T cytotoxiques ont alors **deux façons d'éliminer** la cellule de mélanome : par la voie de l'apoptose ou par voie d'exocytose de granules cytotoxiques. Dans le 1^{er} cas, la liaison du ligand Fas (Fas L) sur le lymphocyte au récepteur de mort Fas sur la cellule de mélanome provoque l'activation de la voie des caspases (8, 3 et 6-7 ou 8) et la mort par apoptose de la cellule tumorale. Dans le 2^{ed} cas, la perforine et les granzymes contenus dans des granules LT_{cyt} passent à travers la membrane tumorale (grâce à la perforine) et provoquent l'apoptose par activation des caspases ou par clivage de la protéine pro-apoptotique BID (via les granzymes) (Mahmoud *et al.*, 2017). La mort des cellules procure alors de nouveaux antigènes pour la présentation et l'expansion de LT mélanome-spécifiques (*Figure 11*). Ce cycle répété peut, dans certains cas, aboutir à la disparition complète de la tumeur et à la rémission du patient à long-terme.

Cependant, dans de nombreux cas, un sous-type de population de cellules tumorales, généré par pression de sélection résiste à la reconnaissance et à la destruction immunologique, **échappe** au contrôle du SI. Elles survivent à la phase d'élimination et entrent en **phase d'équilibre** (O'Donnell *et al.*, 2019).

(ii) La phase d'équilibre

C'est lors de cette phase que le SI adaptatif empêche la croissance tumorale tout en sculptant l'**immunogénicité** (*i.e.* la capacité d'induire une réponse immunitaire effective) des cellules tumorales. À l'équilibre, les cellules immunitaires maintiennent les cellules tumorales résiduelles en état de **dormance** (*Figure 10*). Ces dernières peuvent donc rester latentes de longues années, voire toute la vie du patient, avant d'évoluer, de reprendre leur croissance puis de métastaser (Aguirre-Ghiso, 2007). L'existence de cet état de dormance contrôlée par l'immunité a été mise en évidence par une expérience de tumorigénèse qui montre que des souris immunocompétentes traitées avec de faibles doses de carcinogène abritent des cellules tumorales en faible quantité pendant une longue période sans développer de tumeur apparente (Koebel *et al.*, 2007). Après déplétion des lymphocytes T CD4+ et CD8+, cet effet protecteur disparaît et les tumeurs apparaissent dans près de la moitié de ces souris. Cela souligne l'importance de ces **effecteurs adaptatifs** dans le maintien de la phase

d'équilibre. Dans ce même travail, les auteurs ont montré que ce maintien semblait être dû à une combinaison d'effets immunitaires **cytostatiques** (inhibition de la prolifération) et **cytotoxiques** (apoptose).

A ce titre, il a été montré **au niveau moléculaire** dans plusieurs cancers que l'activité de la kinase ERK (Extracellular signal-Regulated Kinase) et celle de sa contrepartie la kinase inhibitrice p38 MAPK (p38 Mitogen-Activated Protein Kinase) avaient un rôle déterminant dans cet état de dormance (Park and Nam, 2020). En effet, des cellules avec une forte activité de ERK et une faible activité de p38 sont hautement proliférative alors que dans le cas inverse (ERK^{low}/p38^{high}), les cellules sont incapables de proliférer mais n'entrent pas pour autant en apoptose : elles sont alors décrites *in vivo* comme étant « dormantes ».

La pression exercée par les effecteurs immuns couplée à l'instabilité génétique des cellules tumorales encouragent la sélection de cellules tumorales aux propriétés immuno-évasives. Ainsi, les cellules tumorales isolées qui se sont développées en absence de lymphocytes T (ayant donc échappé au maintien de la phase d'équilibre) sont **très immunogéniques** alors que les cellules tumorales issues de la **phase d'équilibre** de souris immunocompétentes sont très **peu immunogènes**. Ce dernier point témoigne d'un changement phénotypique des cellules tumorales par les cellules immunitaires (immuno-édition) lors de cette phase.

La rupture de cette phase d'équilibre, *via* le « réveil » des cellules tumorales, pourrait être dû à l'accumulation de plusieurs éléments perturbateurs dans le microenvironnement tumoral. D'une part, il a été montré que certains éléments de la matrice extracellulaire (MEC), comme les **intégrines β -1**, étaient des régulateurs importants du switch qui mène les cellules tumorales d'un état de dormance à une croissance métastatique. En effet, la liaison des protéines de la MEC aux intégrines provoque l'activation de la **kinase FAK** (*Focal Adhesion Kinase*) qui régule à son tour plusieurs voies telles que celle de la prolifération ou du cycle cellulaire (Barkan and Chambers, 2011). D'autre part, plusieurs études ont montré qu'une **inflammation chronique** favorisait la rupture de cette phase d'équilibre. Tout d'abord, une corrélation forte a été établie dans plusieurs cancers (sein, endomètre, bouche) entre le niveau d'inflammation et le taux de récurrence de ces derniers. De plus, l'inflammation chronique peut faciliter d'autres mécanismes, comme la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM), afin de promouvoir la réactivation des cellules dormantes. De manière intéressante, l'**interaction** entre cellules cancéreuses et **cellules myéloïdes** est également importante dans la progression du cancer. Dans le cancer du sein, il a par exemple été montré que les macrophages inflammatoires facilitaient l'extravasation de cellules cancéreuses dans le poumon par sécrétion de la chimiokine CCL2 (Qian *et al.*, 2011). Dans un modèle d'adénocarcinome de pancréas, il a été reporté que le développement de métastases hépatiques dépendait du recrutement de macrophages sécrétant de la granuline. La granuline induit en effet la transformation des cellules hépatiques en myofibroblastes sécrétant de la périostine (Nielsen *et al.*, 2016). L'environnement fibrotique qui en résulte va alors faciliter la voie d'activation des intégrines et la réactivation des cellules dormantes. D'autre part, une équipe a montré plus récemment que les **neutrophiles** jouaient un rôle clé dans le « réveil » des cellules dormantes (Albregues *et al.*, 2018). Une inflammation soutenue au niveau des poumons (provoquée par exemple par l'exposition à la fumée de cigarette) induit la formation par les neutrophiles de

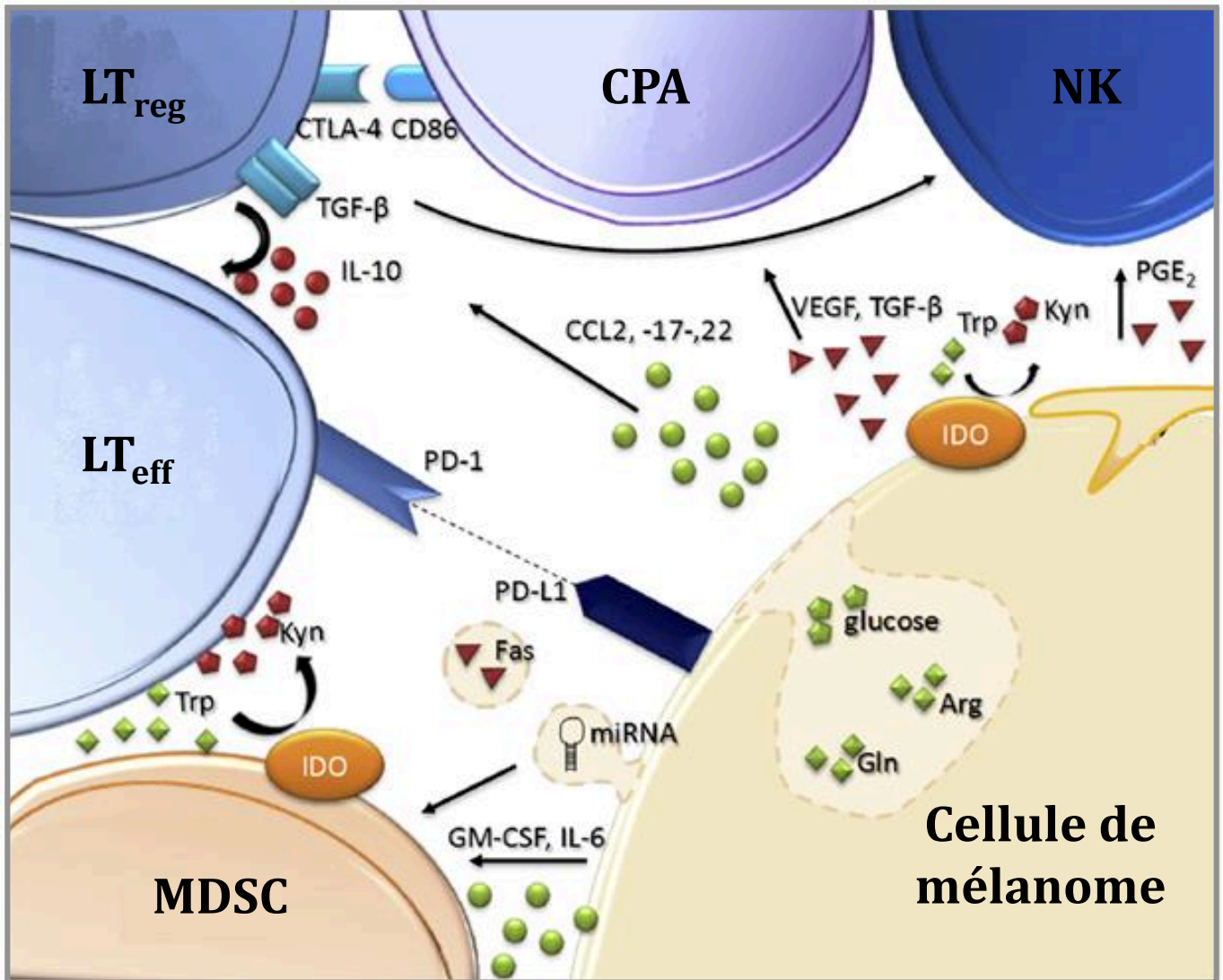


Figure 13 : Mécanismes d'échappement immunitaire dans le mélanome

Pendant la phase d'échappement, le dialogue entre les cellules de mélanome et les différentes cellules du système immunitaire permet une immunosuppression et le maintien de la croissance tumorale. Les **facteurs sécrétés** par les cellules de mélanome peuvent à la fois inhiber le recrutement de cellules effectrices (L_T_{eff}, CPA) (*VEGF*, *TGF-β*) ou attirer des cellules immunosuppressives (L_T_{reg}, MDSC) (*CCL2-22*, *GM-CSF*, *IL-6*). Les cellules immunitaires régulatrices peuvent alors à leur tour sécréter des cytokines (*IL10*) pour inhiber les cellules effectrices. Des **interactions cellule-cellule** peuvent également inhiber la réponse immunitaire : L'engagement du CTLA4 (L_T_{reg}) sur le CD86 (CPA) peut inhiber l'activation de ces dernières. De la même manière, l'expression de PD-L1 sur la cellule de mélanome peut inhiber l'activation du L_T_{eff} par interaction avec son récepteur PD-1. Certains **facteurs métaboliques** tels que l'enzyme IDO permettent l'immunosuppression par conversion du tryptophane (Trp) en Kynurénine (Kyn). Enfin, les besoins massifs des cellules de mélanome en glucose et en acides aminés (Gln, Arg) privent les cellules immunitaires de ces facteurs essentiels.

L_T_{eff} : lymphocyte T effecteur ; **L_T_{reg}** : lymphocyte T régulateur ; **CPA** : Cellule présentatrice d'Antigène ; **MDSC** : Myeloid Derived Suppressor Cell

Figure tirée de : Marzagalli et al, 2019, Semin Cancer Biol

« pièges extracellulaires » (NETs : *Neutrophil Extracellular Traps*) dans la MEC grâce à des protéases responsables du clivage de la laminine. Ce clivage va alors dévoiler un épitope capable d'activer la voie des intégrines sur les cellules tumorales dormantes et de provoquer ainsi leur prolifération.

Lorsque les cellules tumorales se réveillent et échappent à la surveillance immunitaire, elles s'engagent dans la phase finale : l'**échappement**.

(iii) La phase d'échappement

Lors de cette phase, les cellules tumorales peu immunogéniques/immuno-évasives prolifèrent peu à peu pour donner une tumeur bien visible (*Figure 10*). La progression de l'état d'équilibre à la phase d'échappement peut être due au **changement phénotypique de la population** de cellules tumorales (dû à l'immuno-édition et la pression de sélection), et/ou au **changement phénotypique des cellules immunitaires** infiltrées en réponse aux signaux immunosuppresseurs induits par la tumeur elle-même. Les mécanismes d'échappement sont nombreux et peuvent résulter d'altérations au niveau **de la cellule tumorale** elle-même, ou au niveau du **microenvironnement**. Dans le premier cas, il peut s'agir d'altérations génétiques qui augmentent la **résistance aux effets cytotoxiques** des cellules immunitaires (*ex* : surexpression de la protéine anti-apoptotique Bcl2), **diminuent la sensibilité** aux signaux **inhibiteurs de croissance** (*ex* : mutation ou perte du récepteur TGF β [*Transforming growth factor beta*]) ou encore **réduisent la reconnaissance** par les cellules immunitaires (perte de l'expression d'antigènes) (Zitvogel *et al.*, 2006). Dans le second cas, les cellules tumorales peuvent induire un état immunosuppresseur dans le microenvironnement par sécrétion de cytokines telles que *VEGF*, IL6 (*Interleukin-6*) ou *TGF β* (Burkholder *et al.*, 2014). Ces cytokines pourront induire le recrutement de cellules immunosuppressives telles que les Lymphocytes T régulateurs (LT_{reg}) ou les MDSC (*Myeloid Derived Suppressor Cells*) ou empêcher l'action de cellules immunitaires effectrices.

Dans le mélanome, la forte **plasticité** des cellules malignes est à l'origine du caractère immunogénique de ce cancer puisqu'elle favorise la création de néo-antigènes. Cependant, cette plasticité permet également à ces cellules de **s'adapter à un microenvironnement** immunitaire hostile (Hölzel *et al.*, 2013). Les cellules de mélanome devenue agressives sont en effet capables de modifier la **composition** de leur **microenvironnement immunitaire** par sécrétion de **cytokines et chimiokines** immunomodulatrices, par **modification du métabolisme** ou encore *via* des **interactions** ligands-récepteurs. Le dialogue entre ces cellules tumorales et le stroma immunitaire va alors créer un terrain favorable au développement irrésistible du mélanome (*Figure 13*)

• Diminution du recrutement et de l'activation des cellules innées antitumorales au profit de cellules immunosuppressives

La 1^{ère} façon de freiner la réponse immunitaire antitumorale pour les cellules de mélanome va être d'empêcher le recrutement ou l'activation de cellules immunitaires effectrices. Ce blocage est majoritairement

médié par la sécrétion de cytokines, souvent liée à une hyperactivation de la voie NFκB (*Nuclear Factor Kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*), une des voies essentielles de l'inflammation (Umansky and Sevko, 2012). Certaines de ces chimiokines telles que le **VEGF** et le **TGF-β** vont alors impacter le recrutement ainsi que la maturation des **cellules dendritiques** (Ellis and Hicklin, 2008; Javelaud *et al.*, 2008), empêchant ainsi également l'activation des LT effecteurs (LT_{eff}). Le recrutement des **CD** peut également être impacté par le défaut de production de la chimiokine CCL4 dans les cellules de mélanome mutées *BRAF/PTEN* et avec dérégulation de la voie Wnt (forme non dégradable de la **βcaténine**). Dans d'autres cas, l'immunorégulation peut être médiée par l'altération **d'enzymes ou de médiateurs métaboliques**. Ainsi, la surexpression dans les cellules de mélanome de l'enzyme **IDO** (*Indoleamine 2,3-dioxygénase*), qui convertit le tryptophane en kynurénine, engendre l'inhibition de l'activité cytolytique des **cellules NK** par diminution de l'expression de leurs ligands activateurs (tel que NKG2D) (Pietra *et al.*, 2012). En parallèle, l'expression des **récepteurs à l'adénosine** A2ARs sur des cellules myéloïdes (macrophages, CD) impacte indirectement la fonction effectrice des cellules NK (Cekic *et al.*, 2014).

En plus d'empêcher le recrutement de cellules effectrices, les cellules de mélanomes peuvent favoriser le recrutement ou la fonction de cellules immunosuppressives. Ainsi, elles peuvent privilégier le recrutement et la polarisation des **macrophages** de type **M2** pro-tumoraux (*Figure 11*). Les macrophages sont recrutés par sécrétion de **CCL2** (*Chemokine C-C-motif ligand 2*). Une étude a montré que la réponse antitumorale des macrophages dépend du niveau de sécrétion de cette chimiokine (Nesbit *et al.*, 2001) : en quantité importante, cette chimiokine induit une migration massive de macrophages produisant du TNF-α, ce qui induit l'élimination de la tumeur ; en faible quantité cependant, le CCL2 induit une infiltration modeste des macrophages et la croissance tumorale. Deux cytokines jouent en revanche un rôle clair dans la polarisation des macrophages en **macrophages M2** : le **TGF-β** (par expression d'un programme transcriptionnel complet - en coopération avec les glucocorticoïdes) et **l'IL-10** (par diminution de l'expression du CMH II et du ligand de co-stimulation B7 sur les macrophages) (Wang *et al.*, 2017a). Ces macrophages M2 ont alors pour rôle d'inhiber l'activation des LT_{eff}, de favoriser l'invasion par production de métalloprotéases (MMP) et l'angiogenèse par celle de molécules comme le VEGF.

De la même manière, si les **neutrophiles** recrutés par les chimiokines CXCL1/2/3/5 et 8 peuvent être protecteurs (type N1) lors de l'initiation de la tumeur, ils sont souvent **pro-tumoraux** (type N2) dans les **stades avancés** de mélanome. Le mécanisme par lequel les neutrophiles se polarisent vers un phénotype N2 n'est pas encore totalement élucidé mais il a été montré que la présence de **TGF-β** dans différentes tumeurs favorisait fortement ce switch (Fridlender *et al.*, 2009). Une étude plus récente a également démontré l'implication du **G-CSF** (*Granulocyte-Colony Stimulating Factor*) et du **CXCL6** (*Chemokine (C-X-C motif) ligand 6*), sécrétés par des cellules tumorales circulantes, dans le recrutement et la polarisation des neutrophiles N2, appuyant ainsi l'implantation de métastases (Li *et al.*, 2017c). Les neutrophiles N2 contribuent à l'immunosuppression par

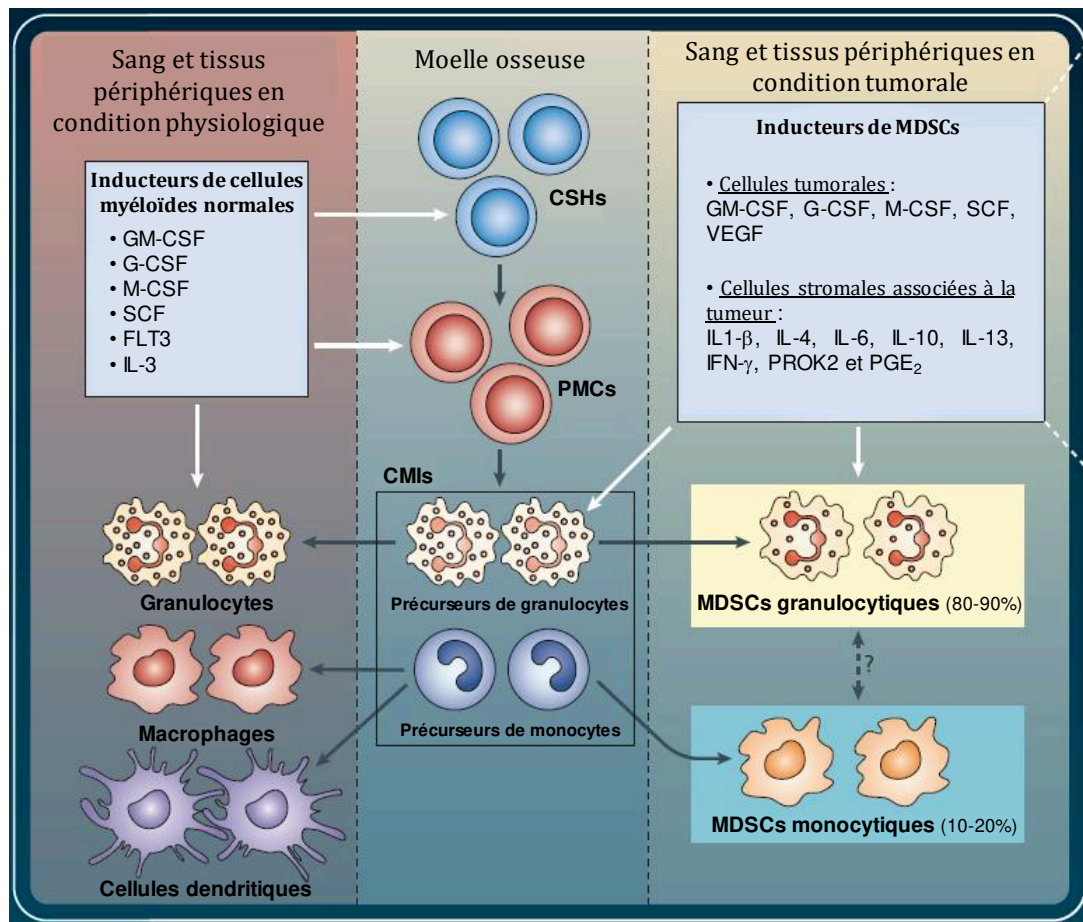


Figure 14 : Génération de MDSCs (*Myeloid Derived Suppressor Cells*) en condition tumorale

Les MDSCs sont une population de cellules hétérogènes et font partie de la lignée de cellules myéloïdes qui comprend les progéniteurs de cellules myéloïdes et les précurseurs de granulocytes, macrophages et cellules dendritiques. Chez un individu sain, les CMIs générés dans la moelle osseuse se différencient en granulocytes, macrophages ou cellules dendritiques matures. De nombreuses cytokines et facteurs solubles relargués lors d'un cancer causent la prolifération des CMIs et bloquent partiellement leur différenciation. Ceci aboutit à l'apparition et à l'accumulation de MDSCs, qui peuvent alors migrer aux organes lymphoïdes secondaires et à la tumeur, où ils exercent leurs effets sur d'autres populations cellulaires.

MDSC : Myeloid Derived Suppressor Cell ; **CSH** : Cellule Souche Hématopoïétique ; **PMC** : Progéniteur Myéloïde Commun ; **CMI** : Cellule Myéloïde Immature

Figure adaptée de : Bronte and Gabrilovitch, 2010
(Poster Nature Review Immunology / Biolegend)

expression de protéines co-inhibitrices (PD-L1), surexpression de molécules immunosuppressives (IDO) ou de cytokines impliquées dans le recrutement LT_{reg} (IL17).

Enfin, le microenvironnement du mélanome abrite également des cellules immunosuppressives appelées **MDSC** (*Myeloid Derived Suppressor Cells*), dérivées de précurseurs myéloïdes de la moelle osseuse et qui peuvent être induits et mobilisées par la présence de cytokines (VEGF, GM-CSF, G-CSF, IL-10, IL-6 IL-1- β ...) libérées dans un contexte cancéreux (*Figure 14*) (Bronte and Gabrilovitch, 2010). Dans le mélanome en particulier, la sécrétion des ligands du récepteur CCR5 (*C-C chemokine receptor type 5*) (CCL3, CCL4 et CCL5) semble être importante pour le recrutement de MDSCs dans la tumeur. Des chercheurs ont en effet montré une **accumulation de MDSCs CCR5+** dans des tumeurs de mélanome (modèle murin), associée à une augmentation des ligands de CCR5 et à une progression tumorale (Blattner *et al.*, 2018). De plus, certains micro-ARNs surexprimés dans le mélanome peuvent induire la conversion des monocytes en MDSCs (Huber *et al.*, 2018). Dans la tumeur, les MDSCs inhibent les fonctions effectrices des LT par plusieurs moyens (Fleming *et al.*, 2018) :

- La sécrétion d'**arginase-1** (Arg1) et d'**iNOS** (*inducible nitric oxyde synthase*) qui résulte en production d'oxyde nitrique (**NO**) induit un arrêt du cycle cellulaire et une perte de fonctionnalité des LT (défaut de présentation par le TCR)
- L'expression de l'enzyme IDO (*Indoléamine 2, 3-dioxygénase*) provoque un double effet *via* la déplétion environnementale de tryptophane dégradé (arrêt du cycle LT_{eff} et différenciation des LT_{CD4+} en LT_{reg}) et la production de kynurénine (inhibition de la survie et de la prolifération des LT)
- La production de **ROS** induit une sous-expression du TCR et à forte dose provoque l'apoptose des LT
- La sécrétion des cytokines **TGF- β** et **IL-10** par les MDSCs réduit l'activité des LT effecteurs et permet le recrutement des LT_{regs} .
- La surexpression du ligand co-inhibiteur **PD-L1** sur les MDSCs induit l'anergie (la tolérance, non-activation) des LT

Les différents effets induits par les cellules tumorales sur ces cellules innées vont alors agir sur la croissance tumorale soit par effet direct (diminution de la cytotoxicité des NK par exemple), soit par effet indirect en empêchant le recrutement et l'activation des cellules du système immunitaire adaptatif.

• Défaut de la présentation et de la reconnaissance antigénique

La présentation des antigènes tumoraux spécifiques (TAA) par les CPA ou par les cellules tumorales elles-mêmes permet d'activer les lymphocytes T qui vont alors reconnaître les cellules tumorales afin de les éliminer (*Figure 15*) ; elle constitue donc le **lien principal** entre immunité innée et adaptative. Les cellules de mélanome peuvent **échapper** à cette reconnaissance via trois mécanismes principaux (Mahmoud *et al.*, 2017) :

- La diminution (ou perte) de l'**expression des antigènes** (TAA) à leur surface

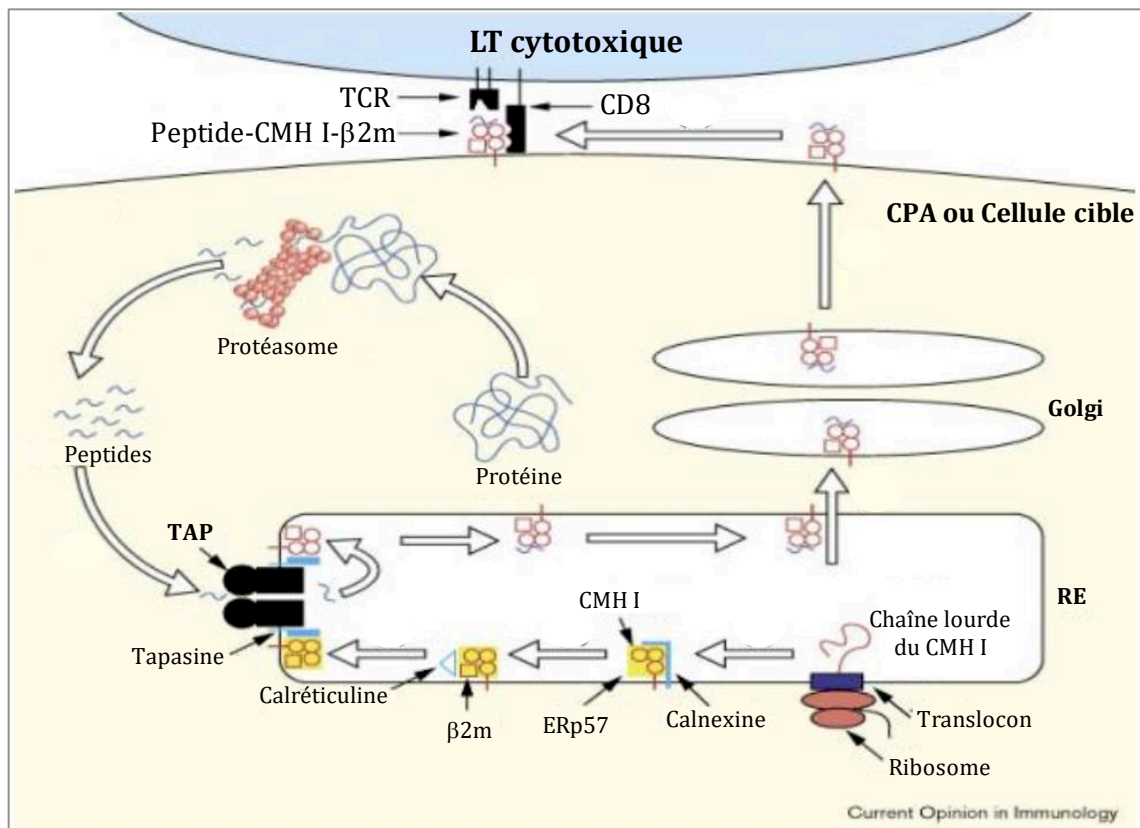


Figure 15 : Machinerie de présentation antigénique par le CMH I

Les molécules du **CMH de classe I** sont synthétisées dans le réticulum endoplasmique (RE). Le pliage et l'assemblage de la molécule sont aidés par une protéine chaperonne, la **calnexine**. La chaîne s'associe à la β 2microglobuline (β 2m) puis ce complexe s'associe à la protéine **TAP** (*Transporter associated with antigen processing*).

La protéine endogène est **synthétisée** principalement dans le cytosol d'une cellule cible, ou **endocytée** par une CPA). Elle est dégradée **en peptides** par le protéasome. Le transfert des peptides dans le RE se fait par l'intermédiaire de la pompe à peptide TAP. Certains peptides peuvent entrer dans le RE et s'associer à la molécule CMH I directement ou avec l'aide d'une molécule chaperonne. Le complexe CMH I- β 2m-peptide qui se dissocie alors de TAP.

Le complexe CMH I- β 2m-peptide traverse les compartiments de l'appareil de Golgi, puis gagne la membrane cellulaire dans une vésicule de transport. Le peptide antigénique peut alors être présenté à un lymphocyte T cytotoxique CD8+ *via* l'interaction avec son TCR (*T cell receptor*).

Figure adaptée de :

http://lvts.fr/Pages_html/Encyclopedies/Cours%20Immuno/chapitre%202.htm

- Des défauts dans la **machinerie de transport et de présentation** des antigènes tels que la diminution de l'expression de la protéine de transport **TAP** (*Transporter Associated with antigen Processing*) qui participe au chargement de l'antigène sur les molécules du CMH I
- La régulation négative des **molécules du CMH** (présentant l'antigène), très fréquemment due dans le mélanome à la perte de la **β2-microglobuline** (β2m), requise pour la formation du complexe « β2m-CMH I-peptide antigénique » et son transport à la surface de la cellule. Cette perte est due le plus souvent à une mutation d'une des copies du gène de la β2m puis de la perte de l'autre copie.

De plus, même lorsque cette reconnaissance antigénique n'est pas affectée dans les tumeurs de mélanome, d'autres mécanismes existent pour empêcher une bonne réponse immunitaire adaptative.

• Diminution du recrutement, de l'activation et de la survie des lymphocytes T effecteurs au profit de lymphocytes T régulateurs

En plus de l'interaction du TCR (LT) avec le CMH/antigène (CPA ou cellules tumorales), le lymphocyte a besoin d'un **signal de costimulation** pour être activé. Ce signal complémentaire est apporté par l'interaction de molécules costimulatrices des CPA ou cellules tumorales (**CD80** et **CD86**, aussi appelés B7-1 et B7-2) avec leur récepteur activateur sur les LT (**CD28**). Parallèlement, l'interaction de **ligands** (PD-L1 - *Programmed death ligand 1*) ou de **récepteurs** (PD-1 - *Programmed cell death protein 1*, CTLA4 - *Cytotoxic T-Lymphocyte-Associated protein 4*) **inhibiteurs** avec leurs partenaires provoquent un signal négatif qui engendre l'**anergie** des LT. Les cellules de mélanome surexpriment alors le ligand PD-L1 (B7-H1) pour empêcher l'activation des LT et provoquer leur apoptose (Dong *et al.*, 2002). De la même manière, il a été montré que les cellules de mélanome surexprimaient CTLA4 de manière IFN-γ dépendante (Mo *et al.*, 2018).

De plus, il a été montré que l'**exposition constante** des lymphocytes T CD8+ aux antigènes de mélanome provoquait un **dysfonctionnement** de ces cellules qui présentent un état d'**épuisement**. Cet état se traduit par une forte expansion clonale de ces LT non fonctionnels qui surexpriment des molécules inhibitrices comme PD1, TIM-3 (*T-cell immunoglobulin and mucin-domain containing-3*) ou LAG-3 (*Lymphocyte-activation gene 3*) (Li *et al.*, 2019). Une étude a alors démontré que cette différenciation des LT en **LT épuisés et dysfonctionnels** par présentation chronique des antigènes par les cellules tumorales suit un programme chronologique parallèle à la progression tumorale (Schietering *et al.*, 2016). En phase précoce, les lymphocytes T sous-expriment les gènes impliqués dans l'activation de leurs fonctions effectrices de manière réversible alors qu'en phase de progression tardive, ils surexpriment les gènes impliqués dans l'immunosuppression de manière irréversible.

Par ailleurs, les cellules de mélanome peuvent échapper à la surveillance immunitaire adaptative grâce à leur **reprogrammation métabolique**. En effet, les cellules cancéreuses ont un besoin de **consommation en nutriments** très important pour pouvoir assurer leur prolifération rapide et basculent par exemple sur un

métabolisme glycolytique même en présence d'oxygène (Effet Warburg). De ce fait, les lymphocytes T dans le milieu intratumoral sont largement impactés par la **privation** de ces nutriments. Le manque de **glucose**, d'**oxygène** ou encore de **certaines acides aminés** importants (Glutamine, Arginine, Tryptophane) inhibe en effet leur prolifération, leur survie ou même leur activation et leur fonction (sécrétion de cytokines, activité cytolytique) (Marzagalli *et al.*, 2019). Contrairement à celui de la glutamine et l'arginine directement consommées par les cellules de mélanome, le manque de tryptophane est dû à la surexpression de **l'enzyme IDO** par les cellules tumorales et les MDSCs. La production de **kynurénine** (depuis le tryptophane) par cette enzyme permet également d'induire la surexpression du **récepteur inhibiteur PD-1** sur les LT_{eff} *via* sa liaison au facteur de transcription ligand-dépendant AhR (*Aryl Hydrocarbon Receptor*). En outre, la liaison de la kynurénine à ce récepteur induit la différenciation des LT en **LT régulateurs**, cellules qui ont pour rôle d'atténuer la réponse immunitaire.

Le microenvironnement du mélanome est effectivement composé de **lymphocytes T régulateurs** (LT_{reg}). Ces cellules sont sur-représentées aussi bien dans les tumeurs primaires que dans les métastases ganglionnaires et distantes (Mourmouras *et al.*, 2007; Viguiet *et al.*, 2004). Les LT_{reg} sont caractérisés par l'expression en surface de CD4 et de CD25 et par celle du facteur de transcription FoxP3 (*Forkhead box P3*) et par leur action immunosuppressive. Cette action s'exerce par différents mécanismes comme la sécrétion de cytokines immunosuppressives (IL-10, TGF- β , IL-35), la consommation massive d'IL-2 (empêchant ainsi les LT_{eff} de profiter de cette cytokine induisant la prolifération) ou encore la surexpression de CTLA4 qui permet d'inhiber l'activation des cellules présentatrices d'antigènes (Togashi *et al.*, 2019). Une des variables qui est le mieux corrélée avec un bon pronostic clinique et la survie des patients atteints de mélanome est d'ailleurs le **ratio entre LT_{CD8+} et LT_{reg}** dans le microenvironnement tumoral du patient. Le recrutement des LT_{reg} dans la tumeur se fait de manière générale par gradient des chimiokines **CCL22**, CCL2 et CCL17 qui se lient au récepteur **CCR4** de ces cellules. Dans le mélanome, il semble que la migration des LT_{reg} soit uniquement due à l'expression de **CCL2** par les cellules de mélanomes. Etant donné cependant que le récepteur CCR4 est exprimé par d'autres cellules immunitaires, l'effet immunosuppressif de CCL2 va dépendre de la balance T_{reg}/T_{eff} dans le microenvironnement tumoral. En parallèle, l'expression des chimiokines **TGF β** et **IL-10** par les cellules de mélanome peut provoquer l'expansion des LT_{reg} existants mais également induire la génération de nouveaux LT_{reg} (Jacobs *et al.*, 2012). Enfin, la surexpression de certains micro-ARNs (**miR-30d**) dans le mélanome provoque *in fine* une augmentation de la sécrétion d'IL10 et un recrutement des LT_{reg} au détriment des LT_{eff} (Gaziel-Sovran *et al.*, 2011).

Pour conclure sur le processus d'immuno-édition, il est important de souligner que son déroulement peut se révéler en réalité plus complexe que cela. En effet, les cellules tumorales peuvent ne pas suivre toutes ces étapes de manière séquentielle et entrer par exemple directement en phase d'équilibre ou en phase d'échappement. De plus, des **facteurs environnementaux externes** comme le stress ou le **traitement du**

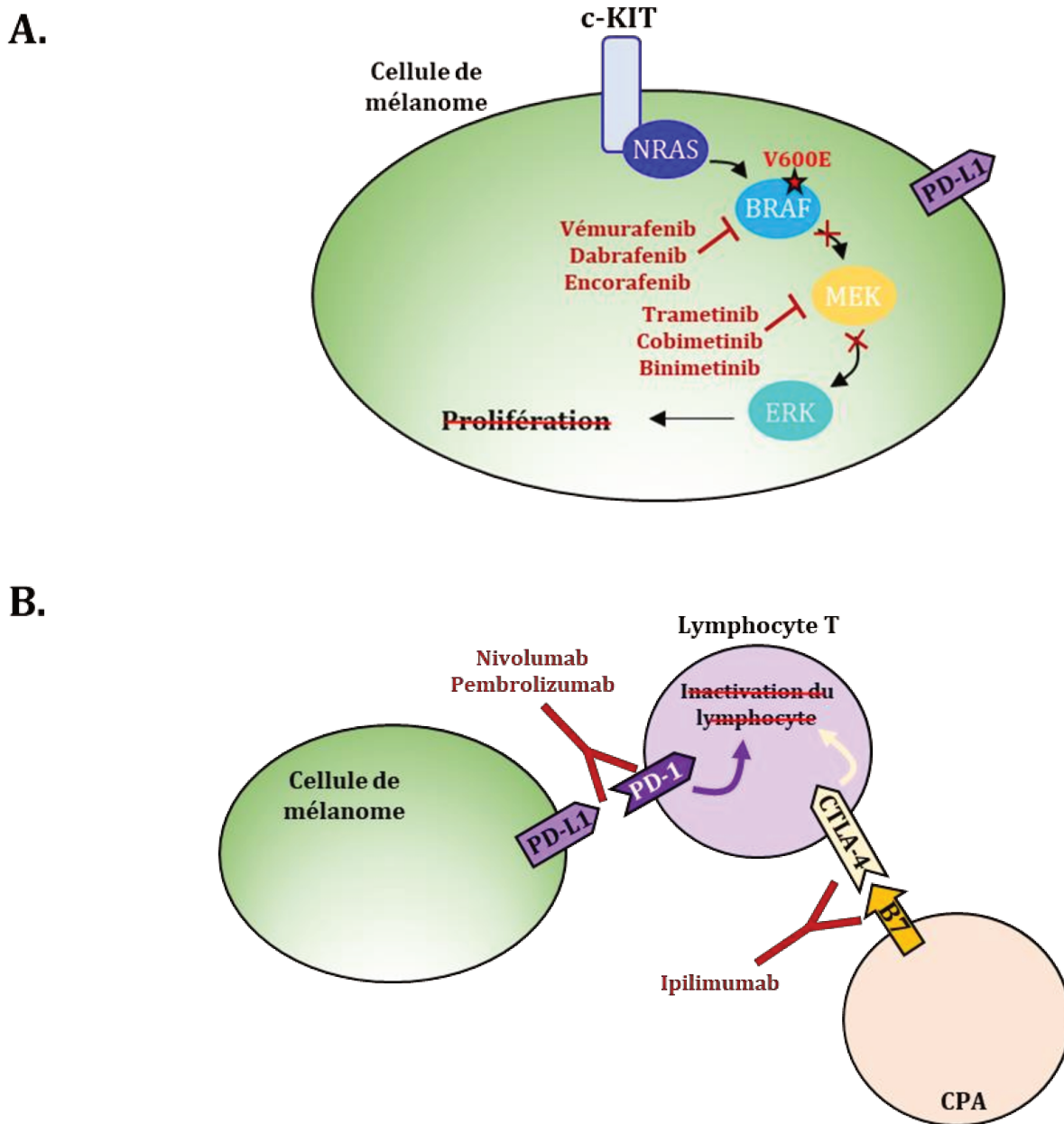


Figure 16 : Principales thérapies systémiques utilisées dans le mélanome cutané métastatique

Deux grandes stratégies thérapeutiques sont utilisées aujourd'hui dans le traitement du mélanome cutané métastatique :

- A. Les thérapies ciblées de la voie des MAP Kinases : les inhibiteurs de BRAF (Vémurafenib, Dabrafenib et Encorafenib) et les inhibiteurs de MEK (Trametinib, Cometinib et Binimetinib). Utilisés en combinaison, ils empêchent l'activation constitutive de cette voie de prolifération dans les cellules de mélanome.
- B. Les **inhibiteurs de « checkpoint »** (point de contrôle) immunitaire : les anticorps monoclonaux **anti-PD1** (Nivolumab et Pembrolizumab) et **anti-CTLA4** (Ipilimumab). Utilisés seuls ou, plus rarement, en combinaison, ils permettent de **lever le frein immunitaire** provoqué par la liaison du récepteur PD-1 sur le ligand PD-L1 (synapse lymphocyte-cellules cancéreuse) ou par la liaison du récepteur CTLA-4 avec ligand B7 (synapse lymphocyte-CPA). Ils favorisent donc l'activation des lymphocytes T.

CPA : Cellule présentatrice de l'antigène

patient par immunothérapies peuvent également influencer l'évolution de ce processus, dans un sens comme dans l'autre (O'Donnell *et al.*, 2019).

2.6. Traitements actuels et nouvelles stratégies thérapeutiques

Lorsque le mélanome est à un stade **non métastatique** (localisé), le traitement de référence est l'exérèse **chirurgicale**. La zone de l'exérèse et les marges prises autour de la tumeur dépendent alors de la localisation du mélanome et de l'indice de Breslow. Si l'examen histopathologique et l'analyse du ganglion sentinelle ne montrent pas de signes précurseurs de métastases, le patient sera alors uniquement surveillé de manière régulière.

En revanche, lorsque le mélanome a atteint le stade métastatique, la prise en charge des patients reposera sur des traitements systémiques. Pendant longtemps, le mélanome métastatique a eu un **pronostic très sombre** avec une médiane de survie entre six et neuf mois. Les chimiothérapies conventionnelles utilisées alors, des **agents alkylants** de l'ADN (Dacarbazine, Fotémustine, ou encore Témozolomide) présentaient au mieux un taux de réponse 15% à 20%, pour une durée médiane de réponse de **4 mois** (Tsao, 2004). Elles restèrent le traitement de référence contre le mélanome métastatique jusqu'en 2011. A partir des années 2010 et jusqu'à aujourd'hui, deux grandes stratégies thérapeutiques ont révolutionné cette prise en charge : les **thérapies ciblées** et l'**immunothérapie**.

2.6.1. Prise en charge clinique actuelle des patients avec une mélanome cutané métastatique

2.6.1.1. Les thérapies ciblées : en monothérapie ou en combinaison

La caractérisation des **mutations** spécifiques dans les années de 2000 dans les différents cancers, et notamment dans le mélanome, a permis le développement des **thérapies ciblées**. Elles ont pour avantage de viser **spécifiquement** la ou les voie(s) de signalisation dérégulée(s) dans les cellules cancéreuses. Elles vont donc être adaptées à chaque patient après analyse du **profil mutationnel** de sa tumeur.

Comme évoqué précédemment, environ 40% à 60% des mélanomes cutanés portent une mutation du gène *BRAF* (Curtin *et al.*, 2005) qui va engendrer l'**activation constitutive de la voie des MAP kinases**. Quatre-vingt-dix pourcents de ces mutations résultent en la substitution d'une valine (V) par un acide glutamique (E) au niveau du codon 600 (**BRAF^{V600E}**), bien que d'autres substitutions existent (BRAF^{V600K}, BRAF^{V600R}). La protéine BRAF sous sa forme mutée est donc une cible thérapeutique très intéressante et a permis le développement et des **inhibiteurs sélectifs de BRAF** : le PLX4032 (**Vémurafénib**) ou le GSK2118436 (**Dabrafénib**) (*Figure 16*). Ces derniers agissent comme des inhibiteurs compétitifs de l'ATP (*Adénosine triphosphate*) pour la forme mutée de BRAF et induisent un arrêt de la prolifération dans les cellules

cancéreuses. Le Vémurafénib et le Dabrafénib ont l'AMM (Autorisation de Mise sur le Marché) dans le mélanome métastatique chez les patients présentant une mutation BRAFV600E. Ils ont en effet montré leur supériorité en terme de survie globale par rapport à la Dacarbazine (Chapman *et al.*, 2011; Hauschild *et al.*, 2012).

Plusieurs obstacles se dressent cependant rapidement devant cette thérapie. Tout d'abord, une **résistance primaire** est observée chez environ **25% des patients** qui ne montrent aucune réponse objective basale (Czarnecka *et al.*, 2020). Ensuite, le problème majeur rencontré chez les patients primo-répondeurs est l'apparition d'une **résistance acquise** (ou secondaire) dans la quasi-totalité des cas, entraînant ainsi des rechutes rapides et agressives après 6 à 9 mois de traitements (Nazarian *et al.*, 2010; Wagle *et al.*, 2011).

Les mécanismes de résistance aux inhibiteurs de BRAF (BRAFi) sont variés et peuvent être dus à l'acquisition de nouvelles altérations génétiques ou épigénétiques. Dans 70% à 80% des cas, la résistance est liée à une **réactivation de la voie des MAPK** *via* des altérations qui surviennent dans d'autres acteurs de la voie (NRAS, MEK, NF1...) (Dulgar *et al.*, 2021). A titre d'exemple, des mutations activatrices de NRAS, retrouvées dans 30% des cas de résistances acquises, provoquent l'activation de la protéine CRAF, et donc celle de la voie des MAPK. D'autres voies dont la fonction est similaire à celle des MAPK peuvent être également affectées : c'est le cas par exemple de la **voie phosphatidylinositide-3-kinase (PI3K)/AKT** qui intervient dans la croissance et la survie cellulaire. Enfin, des modifications non génomiques peuvent également entrer en jeu dans les résistantes aux BRAFi. Ainsi, une **reprogrammation transcriptionnelle** par pression thérapeutique peut favoriser la résistance aux drogues en modifiant par exemple l'expression de **marqueurs de différenciation** tel que MITF ou de **RTKs** tels que AXL et EGFR.

Afin d'améliorer et de **prolonger** l'efficacité des thérapies ciblées dans le mélanome, ces dernières sont aujourd'hui utilisées **en combinaison**. La stratégie est alors d'associer en première ligne de traitement un inhibiteur de BRAF avec un **inhibiteur de MEK**. Les inhibiteurs de MEK (Tramétinib et Cobimetinib) bloquent la voie des MAP Kinases en aval de la protéine BRAF (*Figure 16*). Ils ont reçu l'AMM en association aux inhibiteurs de BRAF dans le traitement du mélanome non résecable ou métastatique porteur d'une mutation V600. Cette association améliore la survie sans progression des patients, qui passe de 7 à 8 mois pour un anti-BRAF seul à 11 à 12 mois pour une combinaison anti-BRAF/anti-MEK (Long *et al.*, 2015; Robert *et al.*, 2014). Plus récemment, d'autres inhibiteurs de BRAF (**Encorafénib**) et de MEK (**Binimetinib**) ont été développés et testés seuls ou en combinaison. En termes de survie sans progression, l'**Encorafénib** seul a montré sa supériorité par rapport au Vémurafénib (9,6 mois contre 7,3 mois) ; la combinaison **Encorafénib/Binimetinib** améliore encore cette SSP (qui passe à 14,9 mois) (Dummer *et al.*, 2018). La combinaison améliore également la **survie globale** qui passe de 16,9 mois (Vémurafénib seul) à 33,6 mois (Ascierto *et al.*, 2020). Cette association a donc reçu l'AMM dans le traitement du mélanome non résecable ou métastatique, chez les adultes porteurs d'une mutation BRAF V600.

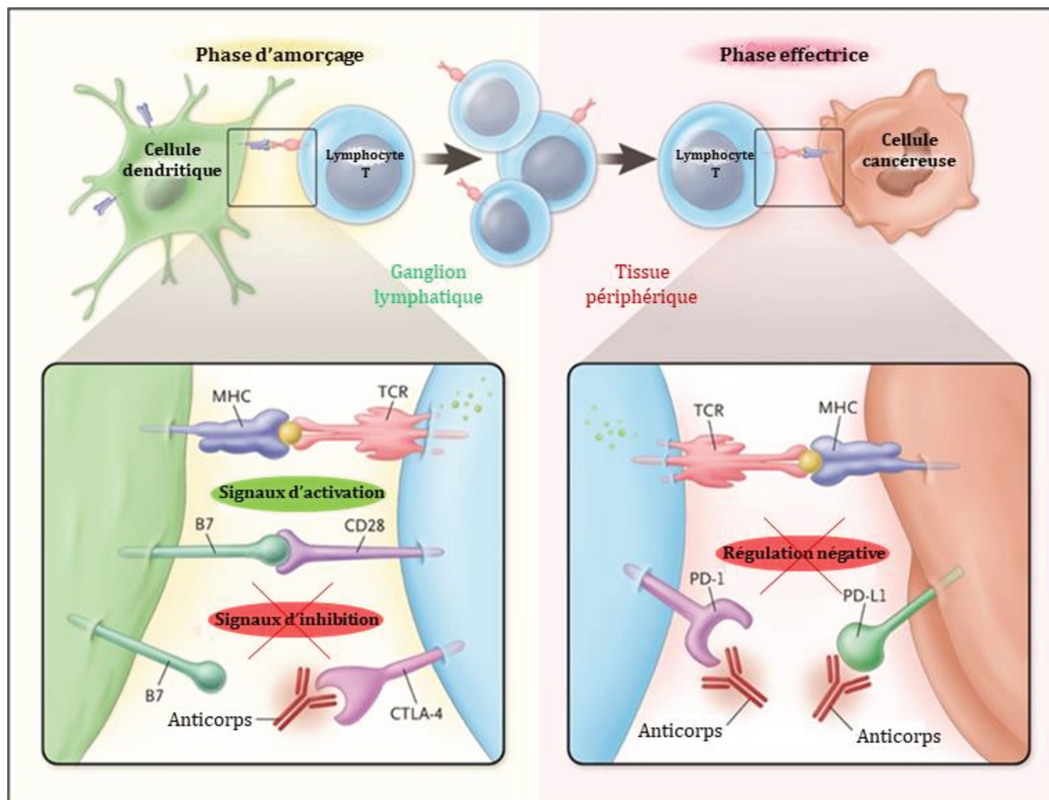


Figure 17 : Mode d'action des inhibiteurs d'anti-CTLA-4 et de PD-1 en immunothérapie

Les **lymphocytes T** reconnaissent les antigènes présentés par le Complexe Majeur d'Histocompatibilité (**CMH**) à la surface des cellules cancéreuses ou des cellules présentatrices d'antigène (CPA) via leur **récepteur (TCR)**. Le 1^{er} signal engendré par cette liaison n'est pas suffisant pour activer la réponse du lymphocyte T. Un 2^{ed} signal, délivré par les **molécules co-stimulatrices B7-1 (CD80) et B7-2 (CD86)** est en effet requis. Le **récepteur CTLA-4** est surexprimé brièvement après activation du lymphocyte et initie la régulation négative de la signalisation du lymphocyte après liaison avec les ligands B7 exprimés par les CPA. L'interaction inhibitrice entre le CTLA-4 et les molécules co-stimulatrices B7 se déroule essentiellement pendant la **phase d'amorçage** de la réponse des lymphocytes T, dans les ganglions lymphatiques. Le récepteur PD-1 est quant à lui exprimé par les lymphocytes T lors d'une exposition longue aux antigènes et résulte en la régulation négative des lymphocytes lors de la liaison avec PD-L1/2 ; essentiellement exprimés dans les tissus inflammés et le microenvironnement tumoral. Cette interaction se déroule donc pendant la **phase effectrice** dans les tissus périphériques. Le blocage des interactions CTLA-4/B7 et PD1/PD-L1 par les anticorps monoclonaux résulte en l'activation préférentielle des lymphocytes T spécifiques de la tumeur.

Figure adaptée de : Ribas et al, 2012, NEJM

Une autre stratégie, en cours d'évaluation, serait de combiner ces thérapies ciblées avec un traitement par immunothérapie.

2.6.1.2. Les anticorps monoclonaux : L'émergence d'une immunothérapie révolutionnaire

Contrairement aux thérapies ciblées, le traitement par **immunothérapie** ne cible pas directement les cellules cancéreuses mais va être destiné à **soutenir/réactiver la réponse immunitaire** du patient contre la tumeur. Autrement dit, cette méthode a donc pour but de faire basculer une tumeur en phase d'échappement immunitaire vers une **phase d'élimination**. Parmi les différentes stratégies exploitées, la plus efficace et utilisée à ce jour comme traitement de référence reste l'injection **d'anticorps monoclonaux**, dits inhibiteurs de « point de contrôle » immunitaire (ICI ou ICB : *Immune Checkpoint Inhibitors/Blockers*). Deux grandes classes d'ICI ont été développés : les **anti-CTLA-4** (*Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4*) et les **anti-PD1** (*Programmed Cell Death 1*) (Figure 16) (Franklin *et al.*, 2017).

Le **CTLA-4** est un récepteur exprimé à la surface des lymphocytes T activés, et qui peut interagir avec son ligand B7 exprimé à la surface des **cellules présentatrices de l'antigène** pour induire une inactivation du lymphocyte T. Cette réaction se déroule donc en général dans les organes lymphoïdes secondaires comme les ganglions lymphatiques. L'**Ipilimumab** est un anticorps monoclonal dirigé contre le CTLA-4 capable de ce fait de lever l'inhibition physiologique induit par la liaison CTLA-4-B7.1/B7.2 (ou CD80/CD86) et de restaurer ainsi l'activation lymphocytaire (Figure 16 et 17). En 2011, l'Ipilimumab a obtenu l'AMM en 1^{ère} ligne de traitement des patients atteints de mélanome métastatique non muté BRAF après avoir démontré une amélioration de la **survie globale** en comparaison avec un traitement par vaccination au GP100 (Hodi *et al.*, 2010) ou un traitement par Dacarbazine (Robert *et al.*, 2011). Par la suite, Eggermont et ses collègues ont montré que ce traitement améliorait également chez des patients avec un mélanome cutané de stade III la **survie sans récurrence** médiane (qui passe de 17 à 26 mois) en comparaison avec un placebo (Eggermont *et al.*, 2015). Des effets secondaires sévères d'ordre immunologique tels que des colites, des éruptions cutanées, ou des endocrinopathies ont été observés lors de ces études chez un pourcentage plus ou moins élevé de patients (de 10% à 50%). Actuellement en France, il n'est plus possible de prescrire l'Ipilimumab en monothérapie, dont le traitement a été retiré de la « liste en sus » et n'est donc plus remboursé par la sécurité sociale.

Le **PD-1** est un récepteur exprimé à la surface des lymphocytes activés, et qui peut interagir avec son ligand principal **PD-L1**, exprimé à la surface des **cellules tumorales** et de certaines cellules immunitaires (macrophages associés à la tumeur, certains lymphocytes). Cette interaction a donc lieu directement dans le **microenvironnement tumoral**, dans une phase plus tardive que celle entre CTLA4 et B7. Dès 2012, une nouvelle classe d'ICI dirigée contre le récepteur PD-1 est arrivée avec le **Nivolumab** et le **Pembrolizumab**. Ces deux agents ont également pour but de lever l'inhibition des lymphocytes T dirigés contre la tumeur (Figure 16 et 17) et ont obtenu l'AMM en 2015, en utilisation de 1^{ère} ligne pour les patients BRAF non muté (BRAF^{WT})

et en seconde ligne chez les patients BRAF mutés ayant échappé à la thérapie ciblée. Ils ont tous deux montré leur supériorité par rapport à l'Ipilimumab. En effet, chez les patients avec un mélanome avancé ayant déjà échoué à une première thérapie systémique, le Pembrolizumab améliore la survie globale à 12 mois des qui passe de 58,2% avec l'Ipilimumab à 74.1% avec le Pembrolizumab. Son **taux de réponse** est également bien supérieur (**33%** contre 11%) (Robert *et al.*, 2015a). En première ligne chez les patients BRAF^{WT}, le Nivolumab montre également une bonne efficacité avec un **taux de réponse de 40%** (versus 14% pour la Dacarbazine) et un taux de survie à 1 an de presque 73% (contre 42% pour la Dacarbazine) (Robert *et al.*, 2015b). Le Nivolumab s'est également montré performant chez les patients n'ayant pas répondu ou ayant échappé aux anti-CTLA4 (Ipilimumab) en augmentant le taux de réponse objective chez ces patients (Weber *et al.*, 2014).

Contrairement aux inhibiteurs de MEK/BRAF, les anti-PD1 ont le double avantage de ne pas limiter leur action au mélanome mutés BRAF et d'offrir aux patients une réponse prolongée. Dorénavant, leur utilisation en 1^{ère} ou 2^{ème} ligne est laissée à l'appréciation du clinicien selon plusieurs critères (l'échelle de performance du patient, les organes impliqués, la charge tumorale, la cinétique de progression tumorale, etc.), indépendamment du statut mutationnel de la tumeur.

Les anti-PD1 et les anti-CTLA4 agissant avec des mécanismes et surtout à des sites d'action différents, il était rationnel de tester l'association de ces deux classes d'anticorps. Un effet synergique des deux molécules a été tout d'abord montré *in vivo* chez la souris, en adéquation avec une augmentation du ratio lymphocytes T effecteurs/lymphocytes T régulateurs (T_{eff}/T_{reg}) et une diminution des MDSCs dans la tumeur (Curran *et al.*, 2010). Des études de phase III chez l'Homme a ensuite confirmé l'intérêt de ce traitement combiné en termes de survie sans progression (Larkin *et al.*, 2015), et de survie globale (Wolchok *et al.*, 2017). L'étude de Larkin *et al* a été actualisée avec des données à 5 ans (Larkin *et al.*, 2019) : le taux de réponse objective pour la combinaison est de 58% et la survie globale de 52%. Cette efficacité est cependant obtenue au prix d'une toxicité élevée avec des évènements indésirables de grade 3-4 (sévères) chez près de 60% des patients.

Cet axe thérapeutique a révolutionné la prise en charge du cancer (notamment du mélanome) et a fait l'objet de 2 prix Nobel de médecine en 2018 remis au Professeur James Allison et au Professeur Tasuko Honjo.

2.6.1.3. Les phénomènes de résistance aux immunothérapies

Même si les traitements par Immunothérapies peuvent être très efficaces chez certains patients, une grande proportion de patients ne répond malheureusement pas à ces anticorps monoclonaux. De plus, certains patients qui répondent en premier lieu aux ICI rechutent après une période de traitement plus ou moins longue. Les **résistances** aux immunothérapies peuvent donc être **primaires** (le patient ne répond pas initialement), **adaptatives** (réponse initiale mais progression à cause de certains clones résistants présents dès le départ et sélectionné par pression thérapeutique), ou **acquises** (réponse objective et progression après une assez longue période de temps à cause d'altérations acquises pendant le traitement) (Sharma *et al.*, 2017).

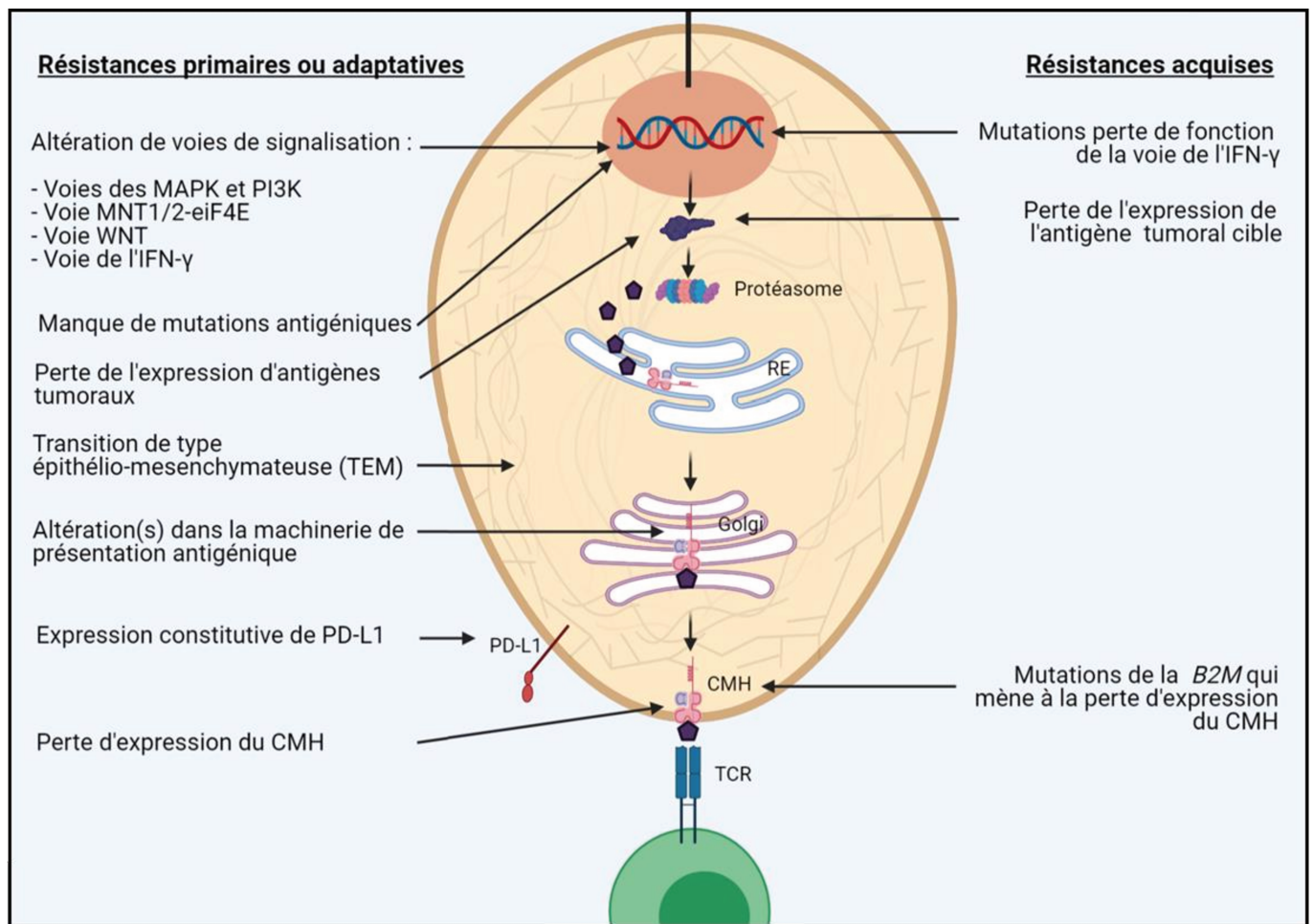


Figure 18 : Mécanismes de résistance aux immunothérapies intrinsèques à la cellule tumorale

A gauche, les facteurs intrinsèques de **résistances primaires et adaptatives** aux immunothérapies. A droite, les facteurs intrinsèques qui sont associés à des **résistances acquises** du cancer aux immunothérapies.

CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité – B2M : beta2-microglobuline – TCR : Récepteur du lymphocyte T (*T Cell Receptor*)

Figure adaptée de : Sharma et al, 2017, Cell

(iv) Les résistances primaires et adaptatives aux immunothérapies

Les mécanismes de **résistances primaires** et **adaptatives** peuvent être dus à des facteurs **intrinsèques** et **extrinsèques** à la cellule tumorale.

• Les facteurs de résistance intrinsèques à la cellule tumorale :

La première raison pour laquelle une tumeur va résister aux ICI est l'absence de sa **reconnaissance** par les lymphocytes T, *via* la **perte des protéines antigéniques**. D'autre part, les cellules cancéreuses peuvent porter des antigènes reconnus par le système immunitaire mais développer des **défauts de présentation antigénique** à la surface du CMH de classe I via l'altération de protéines dans la machinerie de présentation (β 2-microglobuline *e.g.*) (*Figure 18*) (Sharma *et al.*, 2017).

En 2016, les caractéristiques **génomiques** et **transcriptomiques** provenant des tumeurs de patients résistants aux anti-PD1 ont été étudiées (Hugo *et al.*, 2016). Les données génomiques ont tout d'abord montré que les patients avec une **haute charge mutationnelle** avaient une meilleure survie, indépendamment de leur réponse aux anti-PD1. En revanche, les **patients répondeurs** présentent des mutations plus fréquentes du gène *BRCA2* (*Breast Cancer 2*), impliqué dans la réparation double-brin de l'ADN, que les patients non répondeurs. L'hypothèse la plus probable serait que le défaut de réparation de l'ADN pourrait aboutir à des **signatures mutationnelles spécifiques** qui contribueraient à la réponse aux anti-PD1. La présence de mutations de *BRCA2* pourrait donc potentiellement être un marqueur prédictif pour la réponse aux anti-PD1.

L'analyse de la **signature transcriptionnelle** des tumeurs résistantes aux anti-PD1, nommée **IPRES** (*Innate anti-PD-1 Resistance Signature*), a montré la surexpression de gènes impliqués dans des mécanismes importants tels que la régulation de la **transition épithélio-mésenchymateuse** (TEM), le **remodelage de la MEC**, la **cicatrisation** ou encore l'**angiogenèse**. Ces mécanismes ont eux-mêmes un impact, direct ou indirect, sur l'infiltration ou la fonction des cellules immunitaires dans le microenvironnement tumoral. Plusieurs voies de signalisations, liées à ces mécanismes, sont touchées par ces altérations (*Figure 18*). Les principales sont :

- La voie **WNT/ β caténine**. La voie WNT est impliquée dans la **différenciation** des mélanocytes et dans le **switch épithélio-mésenchymateux des cellules** de mélanome. De manière intéressante, l'étude de Hugo *et al* montre des altérations de la voie WNT chez les patients non-répondeurs (*WNT5A*, *ROR2*), mais aussi dans d'autres gènes impliqués dans la **plasticité** des cellules de mélanome et la TEM (comme *AXL*, *LOWL2*).

La stabilisation de la β -caténine, qui provoque une **activation constitutive de la voie WNT** est corrélée chez l'Homme avec une exclusion des lymphocytes T de la tumeur (Spranger *et al.*, 2015). Dans un modèle murin, les mêmes auteurs ont montré que l'exclusion des lymphocytes T CD8⁺ était liée à l'absence d'un certain sous-type de cellules dendritiques : les CD CD103⁺, responsables de l'amorçage (ou « priming ») des lymphocytes T. L'activation de la voie WNT provoque en effet un changement

phénotypique des cellules et la diminution de l'expression de la chimiokine CCL4, qui attire les CD103+.

- La **voie PI3K**. Il a été montré que la perte de la protéine PTEN, provoquant une activation constitutive la voie PI3K, était associée à la résistance aux immunothérapies (Peng *et al.*, 2016). La perte de PTEN serait en effet corrélée avec une diminution de l'expression de l'IFN- γ et du granzyme B (*The Cancer Genome Atlas*) et avec l'infiltration des CD8+. Dans un modèle murin de mélanome, le traitement des tumeurs avec un inhibiteur sélectif de PI3K favorise leur réponse aux anti-PD1, renforçant l'idée que la voie PI3K joue un rôle dans la réponse aux ICI.
- Très récemment, l'axe **MNK1/2-eiF4E** (*MAPK interacting protein kinases 1/2 and Eukaryotic translation initiation factor 4E*), lié à la **voie des MAPK** et qui régule la traduction des ARNm, a également montré son implication dans la résistance aux immunothérapies (Huang *et al.*, 2021). Cette étude montre que phospho-eiF4E (activé par MNK1/2) contrôle l'expression traductionnelle de NGFR (*Nerve Growth Factor Receptor*), un effecteur très important du **switch phénotypique** des cellules cancéreuses. Les cellules cancéreuses alors **dédifférenciées** sous-expriment l'antigène spécifique **Melan-A**, perturbant ainsi la reconnaissance antigénique par les lymphocytes. Par ailleurs, phospho-eiF4E régule aussi traductionnellement la **cytokine CCL5**, importante dans le recrutement de MDSCs. Enfin, l'activation de la voie MNK1/2-eiF4E dans **les cellules myéloïdes** infiltrant la tumeur (MDSC et CD) provoque l'expression du **ligand inhibiteur PD-L1**, qui favorise l'échappement de la tumeur. L'inhibition des kinases MNK1/2 reverse tous ces phénotypes et sensibilise les tumeurs de mélanome aux anti-PD1. Une autre étude a également montré que la stimulation du complexe eiF4F provoquait l'augmentation de l'expression de **PD-L1** *via* la régulation traductionnelle de STAT1 (Cerezo *et al.*, 2018).
- La **voie de l'IFN- γ** . Cette voie est essentielle et jouent un rôle clé dans les résistances primaires, adaptatives et mêmes acquises aux inhibiteurs de checkpoint. Elle présente à la fois des effets bénéfiques et délétères dans la réponse immunitaire antitumorale. D'un côté, elle favorise la présentation antigénique *via* l'augmentation des protéines de la machinerie de présentation, permet le recrutement d'autres cellules immunitaires et possède des effets antiprolifératifs et pro-apoptiques sur les cellules tumorales. De l'autre, l'exposition continue d'IFN- γ peut provoquer une immuno-édition des cellules cancéreuses et engendrer leur échappement immunitaire (Benci *et al.*, 2016).
Les cellules cancéreuses échappent en général en effets antitumoraux de l'IFN γ par sous-expression ou mutation des effecteurs de cette voie comme les récepteurs à cette cytokine JAK1/2 (*Janus Kinase 1/2*) et les facteurs de transcriptions STATs (*Signal Transducer and Activators of Transcription*). L'analyse des patients qui ne répondent pas aux anti-CTLA4 a montré qu'ils portaient fréquemment des mutations

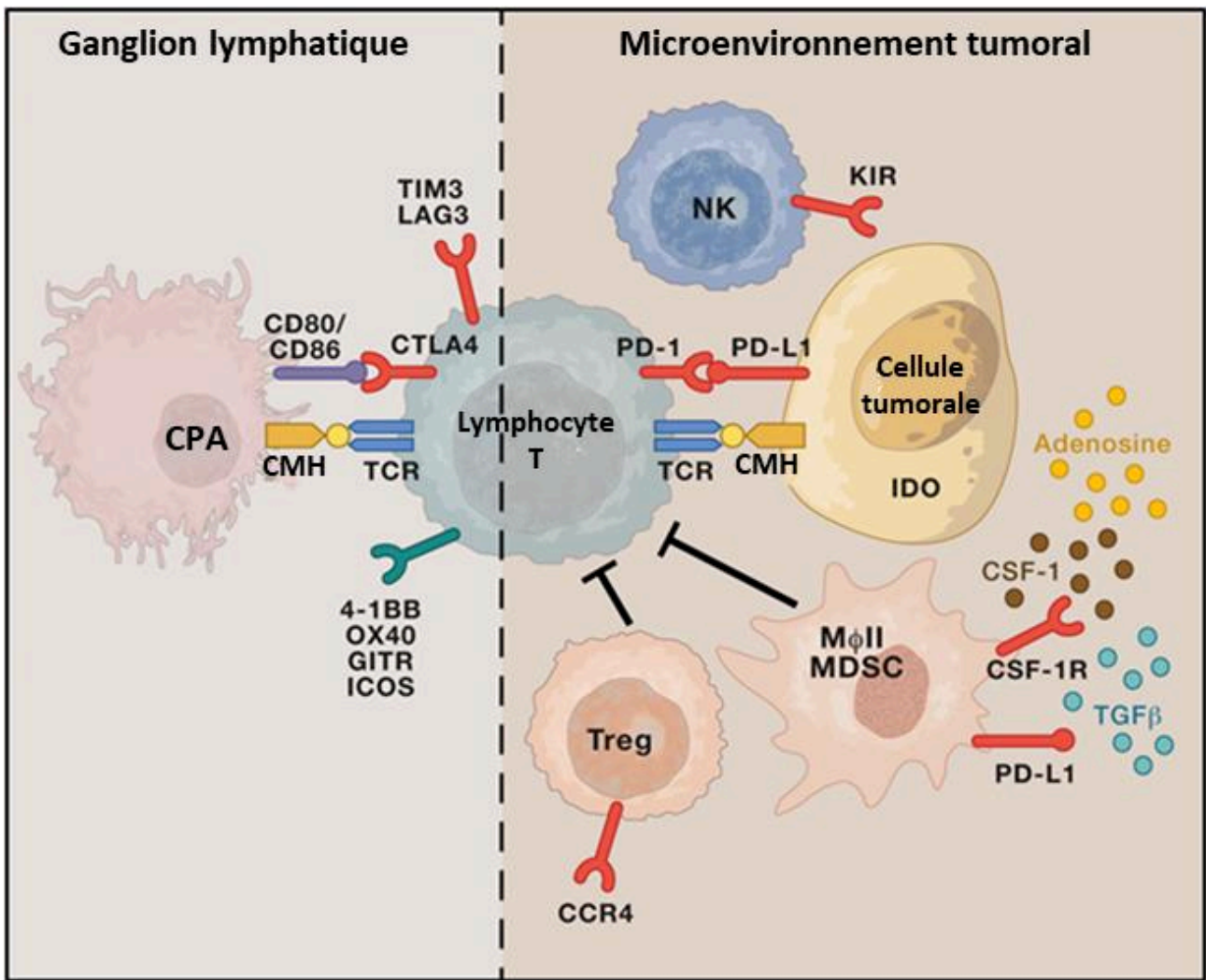


Figure 19 : Mécanismes de résistance aux immunothérapies extrinsèques à la cellule tumorale

Dans les organes lymphoïdes secondaires ainsi que dans le microenvironnement tumoral (MET), des interactions entre **cellules immunitaires** et **cellules tumorales** s'établissent. Ainsi, les cytokines (TGF- β , CSF-1) et métabolites (Adénosine) relargué(e)s par les cellules immunosuppressives façonnent la tumeur en influant sur la migration, la différenciation et **la fonction** des cellules immunitaires. De la même manière, les **molécules inhibitrices** (CTLA-4, PD1, PD-L1, LAG3, TIM3) exprimées à la surface des cellules tumorales ou immunitaires régulent les fonctions effectrices des cellules immunitaires antitumorales. Ces phénomènes, étroitement liés à la **composition** du microenvironnement tumoral, participent à la **résistance** aux immunothérapies.

B2M : beta2-microglobuline – **CPA** : Cellule présentatrice de l'antigène – **CMH** : Complexe Majeur d'Histocompatibilité – **Mφ II** : Macrophage M2 – **TCR** : Récepteur du lymphocyte T (*T Cell Receptor*)

Figure adaptée de : Sharma et al, 2017, Cell

des gènes impliqués dans cette voie (Gao *et al.*, 2016). Ces mutations empêchent les cellules cancéreuses de répondre à la stimulation par l'IFN- γ et leurs donnent un avantage pour échapper aux lymphocytes T. De plus, des mutations dans cette voie aboutissent à la perte d'expression de PD-L1 à la surface des cellules tumorales, rendant les patients résistants aux bloqueurs d'anti-PD1 également (Shin *et al.*, 2017).

Ces éléments suggèrent un rôle important de la **plasticité tumorale** dans la résistance aux inhibiteurs de « checkpoint ». Certaines **modifications épigénétiques** de l'ADN dans les cellules cancéreuses peut également favoriser la résistance aux ICI en provoquant le changement d'expression des gènes immuns et ainsi impacter certains mécanismes importants comme la transformation de la protéine antigénique ou sa présentation. De manière intéressante, des **facteurs de déméthylation** peuvent rétablir l'expression de certains de ces gènes immuns et avoir un impact thérapeutique intéressant (Héninger *et al.*, 2015).

Il faut cependant garder à l'esprit que certains de ces facteurs intrinsèques vont jouer directement sur les facteurs de résistance extrinsèque à la cellule tumorale. Par exemple, l'augmentation de l'expression des **gènes immunosuppresseurs** (*IL10*, *VEGFA*, *VEGFC*) et des gènes impliqués dans le **chimiotactisme** des monocytes et des macrophages (*CCL2*, *CCL7*, *CCL8* et *CCL13*) (Hugo *et al.*, 2016) va jouer un rôle direct dans la composition de l'environnement tumoral.

- Les facteurs de résistance extrinsèques à la cellule tumorale :

Les facteurs extrinsèques qui participent à la résistance primaire ou adaptative aux ICI impliquent des cellules immunitaires trouvées dans le microenvironnement tumoral comme les **lymphocytes Tregs**, les **MDSCs** et les **macrophages M2** (Figure 19).

Dans des modèles murins, il a été montré que la réponse aux anti-CTLA-4 était associée à une augmentation du ratio LT_{eff}/LT_{reg} . Ce shift serait dû à la fois à l'augmentation des LT_{eff} et à la déplétion des LT_{regs} (Simpson *et al.*, 2013). Les tumeurs pour lesquels le traitement par immunothérapie est incapable de provoquer l'augmentation des LT effecteurs ou la diminution des LT régulateurs seront très probablement résistantes au traitement.

La présence de **MDSCs** dans les cancers humains est corrélée à un mauvais pronostic de survie. Certaines études ont montré que la présence de MDSCs chez les patients atteints d'un mélanome était corrélée avec une moins bonne efficacité des inhibiteurs de checkpoint immunitaire (Hou *et al.*, 2020; Meyer *et al.*, 2014). Les MDSCs peuvent contribuer à la résistance aux immunothérapies de plusieurs manières. Ils peuvent en effet cibler directement les lymphocytes T et provoquer leur dysfonctionnement (voir [paragraphe A.2.5.2.1-iii](#)) ou structurer le microenvironnement tumoral via le réseau de molécules immunosuppressives qu'ils sécrètent (augmentation des macrophages M2 et des Tregs *e.g.*).

Les **macrophages associés à la tumeur** (TAMs), qui incluent à la fois les macrophages M1 et M2, sont un autre type de cellules immunitaire qui peut affecter la réponse aux immunothérapies. Des études cliniques dans

plusieurs types de cancer montrent une association entre le fort pourcentage de TAMs (notamment de type M2) dans les tumeurs et leur mauvais pronostic (Hu *et al.*, 2016). Une étude dans un modèle de carcinome hépatocellulaire a montré que les macrophages pouvaient inhiber la réponse des lymphocytes T *via* l'expression du ligand PD-L1 (Kuang *et al.*, 2009). De manière intéressante, une autre étude dans le cancer du pancréas murin (dont l'infiltrat immun est largement composé de TAMs), a montré que le blocage du récepteur macrophagique CSF-1R induisait une diminution du nombre de TAMs, une augmentation de l'expression des molécules du checkpoint (comme PD-L1 et CTLA-4) et potentialisait la réponse aux ICI (Zhu *et al.*, 2014). La diminution du nombre de TAMs permettrait donc dans des cancers à infiltrat myéloïdes de lever la résistance aux immunothérapies.

En dehors de la composition cellulaire du microenvironnement tumoral, d'autres facteurs extrinsèques à la cellule tumorale peuvent jouer un rôle dans la résistance aux immunothérapies. Ainsi, des résistances adaptatives développées pendant un traitement aux ICI ont fait suite à la régulation positive de « **checkpoints** » **immunitaires alternatifs** tels que LAG-3 (*Lymphocyte-activation gene 3*) ou TIM-3 (*T-cell immunoglobulin, mucin domain-3 protein*) (Koyama *et al.*, 2016). Dans le carcinome du poumon non à petites cellules, la surexpression de ces molécules inhibitrices est corrélée avec un **état d'épuisement** des **lymphocytes T** et a pour conséquence la résistance aux ICI (Thommen *et al.*, 2015).

(v) Les résistances acquises aux immunothérapies

Environ un quart des patients montrant une réponse objective aux anti-PD-1 ou anti-CTLA-4 vont malheureusement finir par rechuter après une période qui peut aller jusqu'à plusieurs années.

L'un des mécanismes de résistance acquise est la **perte de la présentation antigénique**. En effet, dans une étude évaluant les mécanismes de résistance acquises aux anti-PD1 (Zaretsky *et al.*, 2016), il a été montré que les cellules tumorales des patients ayant rechuté pouvait porter une mutation homozygote du gène de la β -microglobuline, qui aboutit à une forme tronquée de la protéine B2M (*Figure 18*). Sans protéine B2M fonctionnelle, la molécule du MHC I ne peut être exprimée correctement à la surface de la cellule et les antigènes ne peuvent donc être présentés. Chez deux autres patients de cette étude, des **mutations** perte de fonction **des kinases JAK1 et JAK2**, non présentes dans la biopsie pré-traitement, ont été retrouvées. Elles permettent aux cellules cancéreuses d'échapper à l'effet antiprolifératif de l'IFN- γ . Comme dans le cas de résistances primaires, **l'altération** de ces **voies de signalisation importantes** dans la réponse immunitaire sont impliquées dans les mécanismes de résistances acquises.

Enfin, étant donné que les lymphocytes T antitumoraux sont **spécifiques** des cellules **cancéreuses** exprimant leurs **propres antigènes**, il est possible que ces dernières développent des résistances *via* la diminution de l'expression ou *via* des mutations de ces **antigènes spécifiques**. Des données suggèrent en effet que les lymphocytes T réactivés par les ICI reconnaissent en premier lieu les **néoantigènes tumoraux**

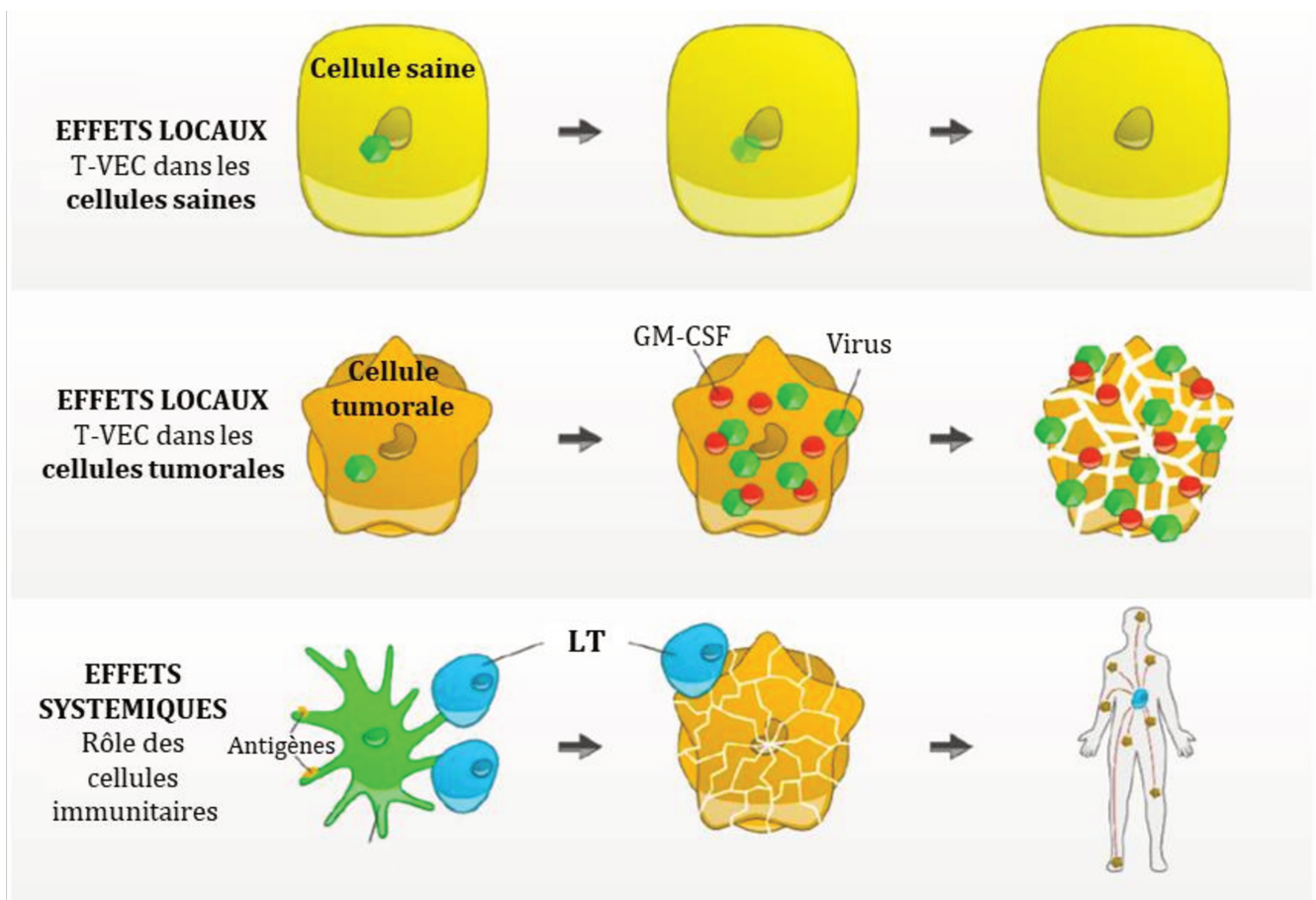


Figure 20: Mode d'action du virus oncolytique T-VEC

Le T-VEC (*Talimogene laherparepvec*) est un virus herpès simplex (HSV) de type 1 génétiquement modifié. La délétion fonctionnelle du gène viral non essentiel de neurovirulence (ICP34.5) **atténue la pathogénicité** du virus et permet sa répllication **tumeur-sélective**. Dans une cellule normale, le virus ne peut se répliquer. Dans les cellules tumorales cependant il est capable de se répliquer et d'induire l'expression du **GM-CSF** (*Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor*). La lyse de la cellule tumorale qui en découle relargue le virus, le GM-CSF et les **antigènes associés à la tumeur**. Cela déclenche le recrutement et l'activation des cellules dendritiques résultant *in fine* en l'induction et l'activation efficace des **LT spécifiques** de la tumeur.

Figure adaptée de : Steininger et al, 2021, Cancers

(Schumacher and Schreiber, 2015). Par conséquent, les délétions génétiques, mutations ou changements épigénétiques qui mèneraient à la perte d'expression de ces néoantigènes présentés par les molécules du CMH permettrait l'acquisition de résistance aux ICI.

2.6.2. *Les nouvelles stratégies thérapeutiques basées sur l'Immunothérapie*

Depuis quelques années, l'engouement pour les thérapies basées sur la réponse immunitaire antitumorale bat son plein. Ainsi, toutes sortes de stratégies ont vu le jour : utilisation de cytokines, de vaccins à ADN ou ARN, d'agonistes aux récepteurs des LT, ou encore de TCR solubles ciblant les antigènes tumoraux (Steininger *et al.*, 2021; Zhao *et al.*, 2019b). Ici, nous nous concentrerons sur les stratégies les plus abouties et les plus encourageantes : **l'immuno-virothérapie** et le **transfert adoptif de cellules**.

2.6.2.1. L'immuno-virothérapie oncolytique **T-VEC**

Le **Talimogene laherparepvec (T-VEC)**, un virus HSV (*Herpes Simplex Virus*) de type 1 génétiquement modifié, est la première thérapie par **virus oncolytique** approuvée par la FDA (Food and Drug Agency) et l'AEM (l'Agence Européenne du Médicament) pour un traitement local du mélanome non résecable de stades IIIB, IIIC ou IVM1a. Il n'est cependant pas encore disponible en France. Il a été développé en 2003 et testé *in vitro* et *in vivo* chez la souris dans différentes tumeurs solides afin de maximiser la réponse immunitaire dirigée spécifiquement contre les cellules cancéreuses. Tout d'abord, grâce à la délétion du gène de la **protéine ICP34.5** (*Infected Cell Protein 34.5*) qui permet d'échapper aux voies cellulaires de réponse antivirale, le virus génétiquement modifié n'est **plus aussi pathogène** et va se répliquer **sélectivement** dans les cellules tumorales (dont les voies de réponse antivirale sont souvent défectueuses). Ensuite, grâce à la délétion du gène viral *ICP47* (*Infected Cell Protein 47*) codant la protéine ICP47 qui bloque habituellement la **présentation antigénique**, il va favoriser la présentation de peptides antigéniques tumoraux présentés par le MHC I, renforçant ainsi la réponse immunitaire. Enfin, l'insertion de deux copies du gènes GM-CSF (*Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor*) humain va permettre le recrutement de cellules dendritiques sur le lieu de la tumeur (Liu *et al.*, 2003). Après injection du virus dans la tumeur, le T-VEC se réplique dans les cellules cancéreuses infectées et les lyse. La libération des fragments variés qui en résulte, comme des antigènes associés à la tumeur et du GM-CSF, va initier une réponse immunitaire locale et favoriser la migration des cellules dendritiques. Ces dernières vont alors pouvoir engendrer une réponse immunitaire systémique par présentation des antigènes aux LT CD4+ et LT CD8+ dans les ganglions lymphatiques régionaux (*Figure 20*).

En 2015, une étude clinique de phase 3 chez patients atteints de mélanome métastatique montre que **l'injection intratumorale de T-VEC** améliore le taux de réponse durable (16,3% vs 2,1%) et la survie globale (23,3 mois vs 18,9 mois) par rapport à une injection sous-cutanée de GM-CSF (Andtbacka *et al.*, 2015). En 2016 et 2018, des études de phase 1 (Puzanov *et al.*, 2016) de phase 2 (Chesney *et al.*, 2018) montrent qu'en

combinaison avec un anti-CTLA4 (Ipilimumab), le **Talimogene laherparepvec** augmente le taux de réponse objectif par rapport à l'Ipilimumab seul. Enfin, en 2017, un essai clinique de phase 1b étudie l'effet de la combinaison **pembrolizumab** (anti-PD-1) plus traitement intratumoral par **T-VEC** par analyse du taux de réponse des patients et des **infiltrats immuns** sur biopsies avant et pendant le traitement (Ribas *et al.*, 2017). Ils observent alors par des critères de réponse liée à l'immunité (irRC) que **62% des patients** testés répondent à la combinaison sans subir d'effets indésirables plus importants qu'avec chaque traitement seul. De manière intéressante, les patients répondent à ce traitement et montrent une augmentation des LT CD8+ et de l'expression de PD-L1 **indépendamment** de leur niveau d'infiltration basal de lymphocyte. Ceci suggère bien l'intérêt d'un pré-traitement par virus oncolytique afin **d'amorcer** la réponse innée puis adaptative dans le but de maximiser l'effets des anti-PD-1. Une étude clinique de phase 3 chez plus de 700 participants atteints de mélanome non résecable de stade IIIB et IVM1c comparant la réponse au Pembrolizumab et celle du Pembrolizumab + Talimogene laherparepvec est en cours et devrait aboutir au courant de l'année 2022 (**NCT02263508**).

2.6.2.2. Le Transfert Adoptif de Cellules : « TIL » et lymphocytes génétiquement modifiés

Le **transfert adoptif de cellules** (ou **TAC/ACT** : *Adoptive Cell Transfer*) est une immunothérapie anticancéreuse **personnalisée**. Elle se base en effet sur l'utilisation, chez les patients atteints de cancer, de leurs propres **cellules immunitaires** ayant développé une activité antitumorale directe. Lors de cette thérapie, des lymphocytes antitumoraux sont prélevés du patient, mis en culture *in vitro* et sélectionnés/ou génétiquement modifiés pour leur **capacité à reconnaître et agir contre** la cellule tumorale (Rosenberg and Restifo, 2015). La culture de ces cellules *in vitro* dispense de l'immunosuppression qui survient normalement *in vivo* dans l'environnement tumoral. Le TAC permet la manipulation de l'hôte avant le transfert, afin de générer un **microenvironnement favorable** à l'immunité antitumorale. Enfin, en plus de leur activité cytotoxique spécifique des antigènes tumoraux, les lymphocytes réactifs transférés peuvent générer une **réponse lymphocytaire mémoire**, permettant potentiellement au patient d'être protégé à long-terme contre la tumeur. Cette thérapie par transfert adoptif de lymphocytes est donc une thérapie d'avenir dans de nombreux types de cancers (Ribas, 2021).

Le transfert adoptif de cellules peut utiliser soit les cellules immunitaires de l'hôte qui présentent **naturellement une réactivité** contre la tumeur (TA de « TIL »), soit des cellules immunitaires de l'hôte **génétiquement modifiées** avec un **TCR antitumoral** ou un **récepteur antigénique chimérique** (CAR : *Chimeric Antigen Receptor*). Ces deux types d'approches ont pu montrer leur intérêt *via* des régressions tumorales spectaculaires et des réponses à long-terme dans différents cancers dont le mélanome.

- Le transfert adoptif de « TIL »

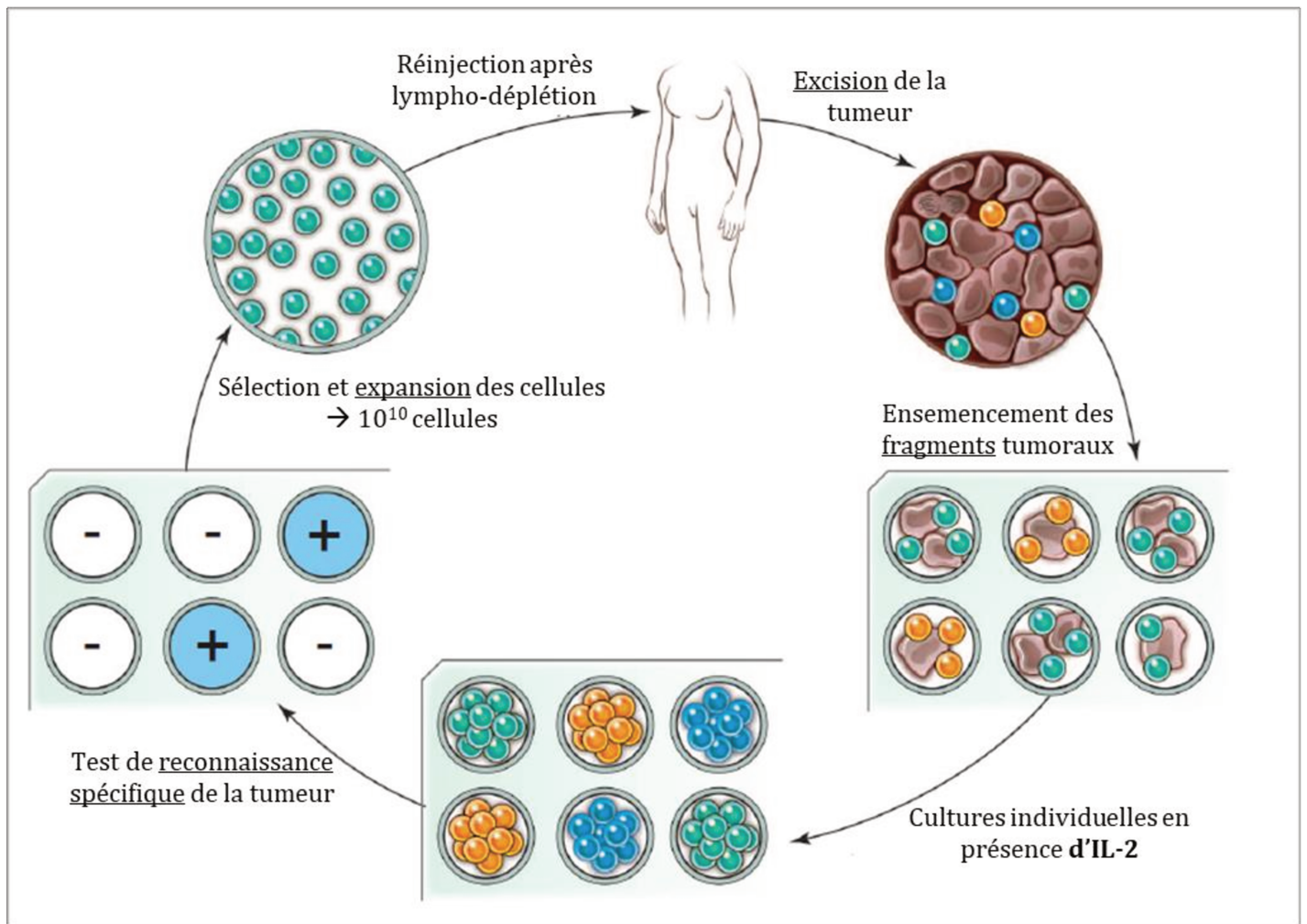


Figure 21: Schéma général de l'utilisation du transfert de cellules de TILs autologues

L'échantillon de mélanome prélevé est digéré en suspension cellulaire ou divisé en de multiples fragments qui sont individuellement cultivés en présence d'IL-2. Les lymphocytes se multiplient, envahissent la tumeur et la détruisent (2-3 semaines). Les cultures pures de lymphocytes qui en découlent peuvent être testés (ou non) pour **leur réactivité** dans des essais de co-culture avec les cellules tumorales. Les cultures sélectionnées sont amplifiées en présence de lymphocytes « nourriciers » (irradiés), d'OKT-3 (un anticorps qui se lie à CD3e pour activer sa signalisation) et d'IL-2. Quelques semaines après, de dix à cent millions de lymphocytes peuvent être obtenus et réinjectés au patient.

Figure adaptée de : Rosenberg et Restifo, 2015, Science

L'ensemble des lymphocytes retrouvés au sein de la tumeur, appelés **TIL** (*Tumor Infiltrating Lymphocytes*), contient des cellules capables de **reconnaître spécifiquement la tumeur autologue**. C'est de cette découverte dans les années 1980 ainsi que des essais murins de TAC à la même période qu'est né le premier essai de transfert adoptif de lymphocyte chez l'Homme en 1988 (Rosenberg *et al.*, 1988). Il montre que le transfert adoptif de TIL autologues, en parallèle de l'injection du facteur de croissance lymphocytaire IL-2 (*Interleukin-2*), peut **provoquer la régression du cancer** chez des patients avec un mélanome métastatique. Malheureusement, cette réponse est relativement **transitoire** et les cellules transférées disparaissent de la circulation sanguine peu de temps après leur injection. Quinze ans plus tard, une découverte améliore considérablement l'utilisation du TAC : la **lymphodéplétion** (ou élimination des cellules lymphoïdes) du patient par chimiothérapie juste avant le transfert des TIL favorise la régression tumorale et permet la repopulation **à long-terme** des lymphocytes antitumoraux injectés (Dudley *et al.*, 2002). Bien que des TIL peuvent être isolés et amplifiés *in vitro* depuis toute sorte de tumeur, il semble que le mélanome soit le seul cancer pour lequel l'**obtention** de culture de lymphocytes capables de reconnaître spécifiquement la tumeur est **reproductible**. Cette approche utilisant des TIL autologues reste donc pour le moment la plus efficace pour induire une régression tumorale durable chez les patients atteints de mélanome. L'approche générale utilisée est la suivante (*Figure 21*) : l'échantillon de mélanome prélevé est divisé en fragments multiples individuellement cultivés dans du milieu supplémenté en IL-2. Les lymphocytes intratumoraux se multiplient, envahissent et détruisent la tumeur en 2-3 semaines. Les **cultures pures de lymphocytes** obtenues peuvent alors être testées (en coculture) pour leur **réactivité** contre la tumeur. Les cultures individuelles sélectionnées sont alors amplifiées en présence de **cellules nourricières**, d'**anticorps anti-CD3ε** et d'**IL-2**. Cinq à six semaines après résection de la tumeur, le patient subit une chimiothérapie pour éliminer ses cellules lymphoïdes, le plus souvent par injection de cyclophosphamide et de fludarabine. Juste après, jusqu'à dix millions de lymphocytes obtenus *in vitro* lui sont administrés en parallèle d'un traitement IL-2. Dans l'étude pilote de Dudley *et al.*, une régression objective du cancer a été observée dans **49% des cas** (21 patients), dont **12% de régression complète**. Une autre étude sur un plus grand nombre de patients quelques années plus tard a ensuite montré que ce taux de réponse objective pouvait aller jusqu'à 72% (en fonction de la méthode pré-traitement de déplétion utilisée) (Rosenberg *et al.*, 2011). Vingt-deux pourcent des patients ont répondu de manière complète et le **taux de survie à 5 ans** est de 29% de manière générale mais de 93% chez les patients qui avaient obtenu une régression complète. Récemment, une étude clinique de phase 2 chez 66 patients avec un mélanome métastatique non résecable et ayant échappé à leur première ligne de traitement (ICI ou thérapies ciblées) a été menée (Sarnaik *et al.*, 2020). En utilisant le protocole classique (décrit ci-dessus), ils ont obtenu un taux de réponse globale de 36% et **taux de contrôle** de la maladie de 80%. Après plus de 18 mois d'observation, la durée de réponse médiane n'a pas encore été atteinte. Cependant, la **toxicité**, notamment due à l'administration d'IL-2 est élevée avec des effets indésirables de grade 3 ou 4 chez 97% des patients.

Etant donné les résultats encourageants de la thérapie par TIL dans le mélanome, de nombreux centres anticancers à travers le monde ont mené des études pour reproduire et **optimiser ce traitement**. La bonne

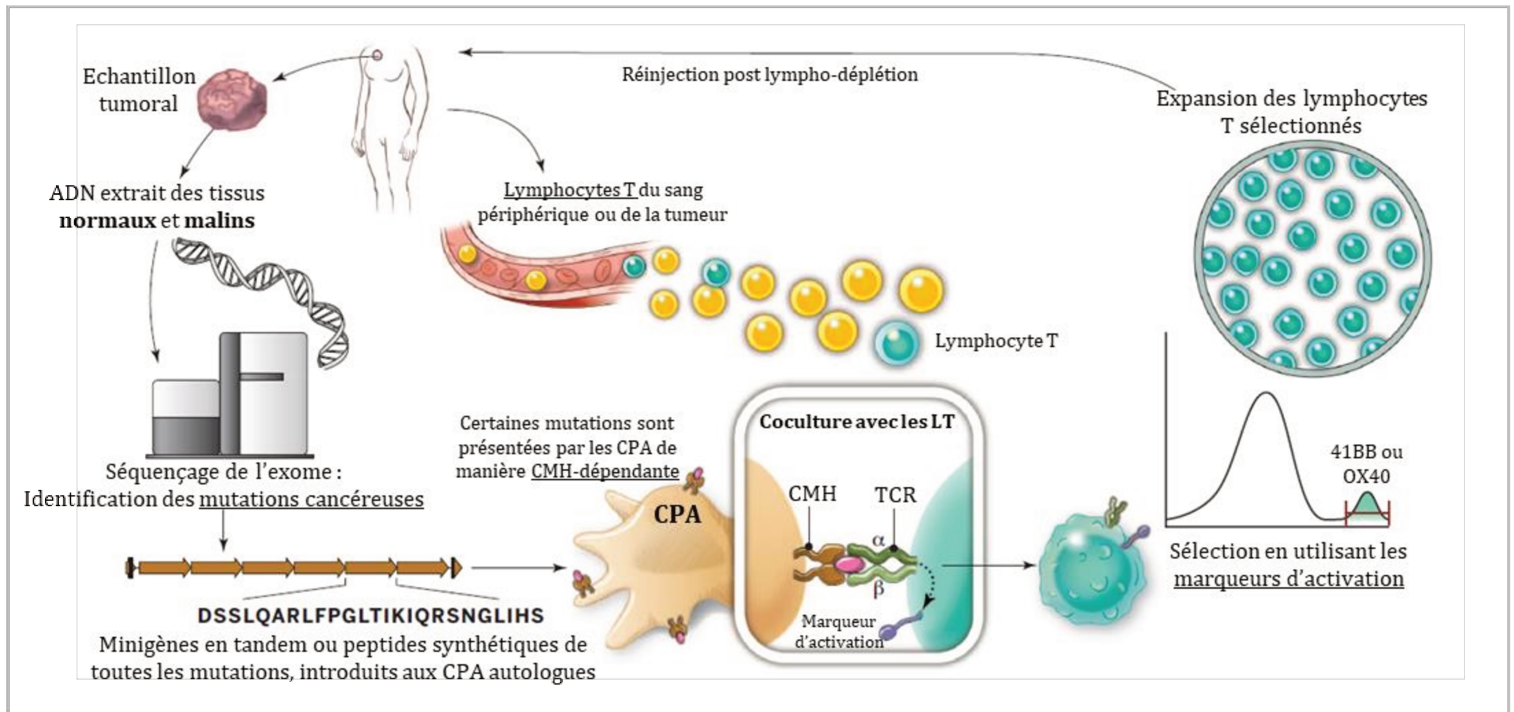


Figure 22: Stratégie pour le traitement de patients cancéreux avec des lymphocytes T reconnaissant des **néoantigènes** tumoraux

Les séquences exoniques de l'ADN de cellules tumorales et normales du même patient sont comparés pour identifier des **mutations tumeur-spécifiques** pouvant aboutir à des **néoantigènes**. La connaissance de ces mutations peut être utilisée pour synthétiser soit des minigènes codant, soit des polypeptides de, chaque acide aminé muté flanqué de 10 acides aminés. Ces peptides ou minigènes sont insérés (et exprimés) dans les CPA autologues du patient, ou ils sont transformés et présentés par les molécules du CMH I ou II du patient. Des cocultures de ces CPA avec des LT du patient sont effectuées pour identifier tous les peptides mutés présentés par la CPA. L'identification des mutations individuelles **responsables** de la reconnaissance de la tumeur est possible à cause de l'expression par le LT de marqueurs d'activation (41BB, sur les LT CD8+, OX40 sur les LT CD4+) lorsqu'ils se lient aux antigènes reconnus. Ces LT activés sont purifiés par cytométrie de flux avant d'être amplifiés et réinjectés au patient.

CMH : Complexe majeur d'Histocompatibilité - CPA : Cellule présentatrice des antigènes - LT : lymphocyte T

Figure adaptée de : Rosenberg et Restifo, 2015, Science

compréhension et **caractérisation des TIL** capables de reconnaître la tumeur est importante pour contrôler au mieux cette thérapie. Les antigènes de mélanome peuvent être divisés en deux catégories : les **antigènes associés à la tumeur** qui sont des antigènes du soi exprimés de manière aberrante dans les cellules cancéreuses, et les **antigènes spécifiques de la tumeur**, qui sont des **néoantigènes** (résultats de mutations) exprimés uniquement par les cellules tumorales. Depuis des années maintenant, nous savons que les TIL reconnaissent fréquemment les antigènes associés à la tumeur tels que des antigènes de différenciation du mélanome. Ainsi, les antigènes **MART-1 et gp100** sont reconnus par une majorité de TIL sélectionnés (Kvistborg *et al.*, 2012). D'un autre côté, les **néoantigènes** sont des cibles très intéressantes car ils ont le potentiel d'être complètement étranger à l'hôte et ne devrait donc bénéficier **d'aucune tolérance** du système immunitaire central. Les progrès techniques de ces dernières années qui ont vu naître le **séquençage exonique haut-débit** et le développement de **plateforme de screening** pour des lymphocytes T spécifiques d'antigènes ont permis de caractériser de manière systématique les **antigènes mutés** reconnus par les TIL des patients. En ce sens, il a été montré que les tumeurs avec une haute charge mutationnelle était plus susceptibles de répondre aux immunothérapies de manière générale (Schumacher and Schreiber, 2015). En 2014, l'équipe du Dr. Robbins montre que ce concept est possible (*Figure 22*) en identifiant chez deux patients atteints de mélanome ayant répondu durablement au transfert de TIL **les cibles mutées** reconnues par ces derniers (Lu *et al.*, 2014). La même année, l'équipe du Dr. Rosenberg montre alors dans un modèle de carcinome que le transfert adoptif de TIL **enrichis** avec des cellules spécifiques de néoantigènes stabilise (1^{ère} injection avec 25% de TIL spécifiques) puis **fait régresser** assez drastiquement (2^{ème} injection avec > 95% de TIL spécifiques) la tumeur (Tran *et al.*, 2014). Une étude clinique de phase I/II chez 10 patients traités par TA de TIL montre une régression tumorale dans 50% des cas qui semble être due à l'action des TIL spécifiques de néoantigènes. En effet, l'analyse immunitaire montre que chez les 3 patients répondeurs testés, des **lymphocytes T spécifiques de néoantigènes** ont été détectés à chaque fois dans les produits de perfusion des TIL. L'activité de ces lymphocytes, dans les deux tiers des cas, s'est de plus considérablement amélioré après la transfert adoptif (van den Berg *et al.*, 2020). Ces études suggèrent que les néoantigènes résultant de mutations sont en effet des cibles intéressantes et prometteuses dans la thérapie par transfert de TIL.

- Le transfert adoptif de lymphocytes génétiquement modifiés

La seconde stratégie du transfert adoptif de cellules, notamment pour les tumeurs de patients qui ne parviennent pas à développer des TIL réactifs de façon constante, est d'introduire dans les lymphocytes T normaux de patients des **récepteurs antitumoraux**. La spécificité des lymphocytes peut en effet être redirigé par l'intégration de gènes codant soit des **TCR alpha-beta conventionnels**, soit des **récepteurs chimériques (CAR)** (*Figure 23*). Les lymphocytes avec un TCR conventionnel reconnaissent les antigènes transformés et présentés par les molécules du CMH de l'hôte. Les CAR sont des **récepteurs artificiels** construits par liaison entre la région variable de l'anticorps (reconnaissant l'antigène) et les **chaînes de signalisation intracellulaire** (CD3- ζ , CD28, 41BB), souvent en combinaison avec des molécules de costimulation. Cela leur permet d'être

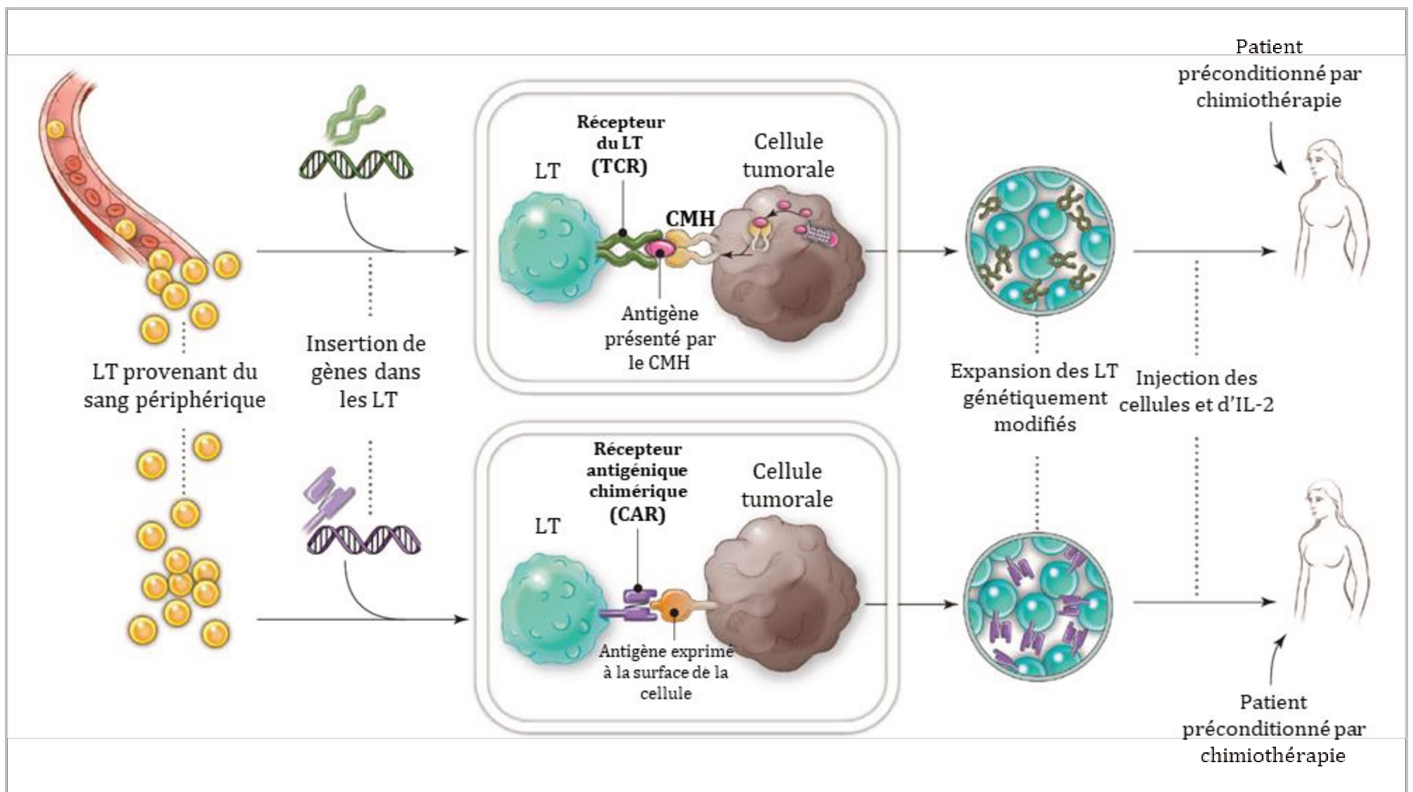


Figure 23 : Génération de LT modifiés génétiquement avec un TCR ou un CAR

Plusieurs techniques ont été développées pour introduire des **récepteurs antitumoraux** dans des lymphocytes normaux qui serviront de thérapie.

En haut, les lymphocytes T du patient sont modifiés par insertion d'un **TCR** (récepteur du LT) **conventionnel**, amplifiées en culture et réinjectés au patient.

En bas, les lymphocytes T du patient sont modifiés par insertion d'un **CAR** (récepteur antigénique chimérique), amplifiées en culture et réinjectés au patient.

Les TCRs conventionnels et les CARs sont des récepteurs différents. Le **TCR** est composé d'une chaîne alpha et d'une chaîne beta, et reconnaît un antigène qui a été transformé et qui est présenté par les molécules du **CMH du patient**. Le **CAR** est un récepteur artificiel construit par liaison des régions variables de l'anticorps aux chaînes de signalisation intracellulaire (CD3- ζ , CD28, 41BB). Il reconnaît des **antigènes présentés à la surface des cellules**, non nécessairement liés à une molécule du CMH.

CAR : Chimeric Antigen Receptor - CMH : Complexe majeur d'Histocompatibilité – LT : lymphocyte T – TCR : T Cell Receptor

Figure adaptée de : Rosenberg et Restifo, 2015, Science

complètement activés lors de la liaison avec l'antigène correspondant. *A contrario* des LT-TCR, les LT-CAR reconnaissent donc les antigènes à la surface des cellules, qu'ils soient ou non présentés par les molécules du CMH (Rosenberg and Restifo, 2015; Simon and Uslu, 2018). Deux questions sont primordiales quant à l'utilisation des lymphocytes génétiquement modifiés : quel **sous-type** de lymphocytes doit être utilisé et **quelle cible antigénique** doit être sélectionnée ?

Des études chez la souris, chez le singe ou plus récemment chez l'Homme suggèrent que l'utilisation de lymphocytes dans un **stade précoce de différenciation** (comme les LT naïfs, ou mémoires centraux), qui sont plus aptes à survivre et assurer leur fonction après transfert chez l'hôte, améliore la réponse immunitaire antitumorale (Berger *et al.*, 2008; Klebanoff *et al.*, 2005; Sommermeyer *et al.*, 2016). Beaucoup d'études se sont concentrées sur les **lymphocytes T CD8+** cytotoxiques. Paradoxalement, les lymphocytes T CD8+ perdent peu à peu leur fonctionnalité lorsqu'elles se différencient et acquièrent la capacité de lyse des cellules cibles (Gattinoni *et al.*, 2005; Gattinoni *et al.*, 2011; McLellan and Ali Hosseini Rad, 2019).

Le choix de la **cible antigénique** est également très important dans la construction des LT-CAR. Contrairement aux TIL autologues naturellement générés chez l'hôte qui présentent **différents degrés d'affinité** pour leur antigène cible, les lymphocytes génétiquement modifiés reconnaissent leur cible avec une très forte affinité. Cette capacité améliore potentiellement la réactivité de ces cellules contre la tumeur, mais est à l'origine de **sévères effets toxiques** dits « off-tumor, on-target » lorsque l'antigène est exprimé, même en moindre mesure, dans les cellules normales. Ainsi, le transfert de LT-CAR dirigés contre MART-1 et gp100 chez des patients avec un mélanome métastatique provoque une régression chez 30% des patients mais aboutit à la destruction des mélanocytes normaux de peau, des yeux ou des oreilles, provoquant des effets indésirables graves (Johnson *et al.*, 2009). Idéalement, la **cible** des LT-CAR ne doit donc être exprimée **que par la tumeur**, ou dans une moindre mesure pas des tissus normaux **non-essentiels** et induire une réponse antitumorale efficace. Dans les cancers hématologiques, ces conditions ont pu être réunies et permettre la génération de **LT-CAR-CD19** utilisés pour la première fois en application clinique en 2010 (Kochenderfer *et al.*, 2010) et de nombreuses autres fois depuis. Chez ces patients, la perte des lymphocytes B peut être compensée par l'injection périodiques d'immunoglobulines. Dans le mélanome, le **CSPG4** (*melanoma-associated chondroitin sulphate proteoglycan*) semble être un bon candidat. Cet antigène, exprimé dans 90% des mélanomes (et dans d'autres cancers), joue un rôle important dans la progression de ce cancer, et n'est pas exprimé dans les tissus sains (Campoli *et al.*, 2004). Récemment, une étude *in vitro* (sur sphéroïdes) et *in vivo* (chez la souris) a montré l'intérêt de LT-CAR-CSPG4 particuliers dans le sarcome à tissus mous (Leuci *et al.*, 2020). Cependant, il a été observé chez certains patients traités par TAC et initialement répondeurs, une progression de la tumeur due au mécanisme d'échappement immunitaire. Sous pression thérapeutique, les cellules tumorales contournent la reconnaissance antigénique en réduisant, par exemple, l'expression des antigènes cibles. Pour prévenir ce genre de phénomène, une équipe a travaillé sur la génération de **NKT-CAR** spécifique du CSPG4 (Simon *et al.*, 2018a). Les **cellules NKT** partagent les caractéristiques des LT et des NK, ont l'avantage d'avoir leur **propre activité antitumorale**, médiée par leur **TCR endogène** qui est activé par des glycolipides présentés par le ligand CD1b des CPA (Exley *et al.*, 2017). L'équipe de Simon et ses collègues a alors montré que l'activité lytique spécifique de ces cellules,

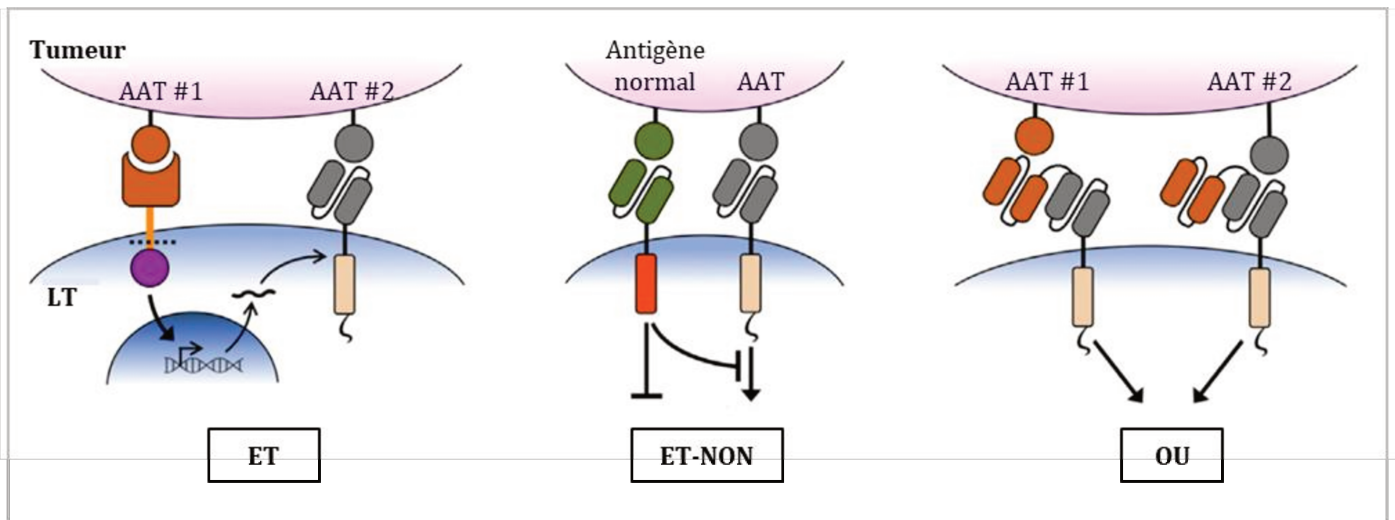


Figure 24 : Stratégies génétiques combinatoires pour augmenter la tolérance et l'efficacité des LT-CAR

AAT : Antigène associé à la tumeur – CAR : Chimeric Antigen Receptor – LT : lymphocyte T

Figure adaptée de : Hong et al, 2020, Cancer cell

in vitro, était au moins aussi importante que celle des LT-CAR. De manière importante, leur **activité cytotoxique intrinsèque** semble être maintenue. Cette caractéristique pourrait permettre, en cas de perte antigénique, de maintenir l'activité tumorale et de garder ainsi le contrôle de la tumeur. Des études cliniques plus approfondies seraient nécessaires pour affirmer le potentiel de ces cellules en thérapie adoptive dans le cadre du mélanome.

Dans d'autres cancers, d'autres stratégies de **double-ciblage** des LT-CAR ont vu le jour au fil des années dans le but d'améliorer l'**efficacité** mais également de prévenir la toxicité liée aux effets « off-tumor, on-target » des traitements (Hong *et al.*, 2020). La 1^{ère} méthode est de modifier génétiquement les lymphocytes **avec deux récepteurs chimériques** qui s'activent uniquement en présence des deux antigènes cibles (logique combinatoire « ET »), augmentant ainsi la spécificité des effets cytotoxiques (*Figure 24*). La seconde, qui se base sur une logique combinatoire dite « ET-NON », prévient également les effets cytotoxiques contre les cellules saines. Cette stratégie utilise un **CAR inhibiteur** (iCAR) qui cible un antigène trouvé dans les tissus sains, couplé avec un **CAR activateur** qui cible l'antigène associé à la tumeur (*Figure 24*). Enfin, la troisième méthode (logique combinatoire « OU »), permet d'augmenter l'efficacité tumorale et de prévenir l'échappement immunitaire en contournant le problème de la perte antigénique. Dans ce cas, les CAR peuvent reconnaître **deux antigènes** associés à la tumeur, et **chacun d'entre eux** peut cette fois-ci activer le lymphocyte indépendamment.

Actuellement, 8 études cliniques sur les LT-CAR dans le mélanome, ciblant différents antigènes, sont en cours aux Etats-Unis, en Allemagne et en Chine (<https://clinicaltrials.gov/Melanoma&term=CAR+T+cells>). Parallèlement, de nouvelles stratégies se mettent en place pour contrer **les obstacles** auxquels les LT-CAR doivent faire face dans les tumeurs solides. Ainsi, les défauts de **migration** des cellules transfusées depuis le sang du patient jusqu'à la tumeur pourraient être améliorés en induisant l'expression dans les LT-CAR de l'Heparanase, une enzyme capable de dégrader l'un des composants majeurs de la MEC (Caruana *et al.*, 2015). De plus, les **mécanismes d'immunosuppression** que subissent les LT-CAR dans le microenvironnement tumoral peuvent être contrés par exemple par **extinction de l'expression des récepteurs inhibiteurs** CTLA-4 ou PD-1 dans les LT-CAR (Rupp *et al.*, 2017; Simon *et al.*, 2018b). Dans le même ordre d'idées, des **cas cliniques** ont reporté que des patients cancéreux (mélanome, lymphome) en progression tumorale sous thérapie par LT-CAR pouvait de nouveau répondre au traitement après administration d'ICI (anti-CTLA4, anti-PD1, respectivement) (Chapuis *et al.*, 2016; Chong *et al.*, 2017).

De manière générale, le principe du transfert adoptif de **cellules T**, capables de générer une **cytotoxicité spécifique** contre les cellules tumorales présentant des antigènes cibles, de **s'amplifier *in vivo*** après leur interaction avec l'antigène, de **circuler** dans tout le corps du patient et de maintenir une **réponse mémoire** à long-terme, ouvre la porte à une **thérapie solide** contre différents types de cancers dans un futur proche. Les efforts de recherche dans ce champ thérapeutique procurent **des solutions** aux défis techniques qui ont limité dans un premier temps l'applicabilité de cette thérapie ; et prédisent une augmentation des études cliniques dans les 10 prochaines années (Ribas, 2021).

2.6.3. Les combinaisons de thérapie : une stratégie qui pourrait être gagnante

Les stratégies de combinaisons entre mêmes types de traitements, telles que l'association de thérapies ciblées (anti-BRAF/anti-MEK) ou celles d'anticorps monoclonaux (anti-PD-1/anti-CTLA-4) sont intéressantes car elles permettent en général d'augmenter l'efficacité du traitement et/ou de repousser l'apparition de résistances. Cependant, elles ont pour désavantage de **cibler les mêmes types de mécanismes**, laissant donc la possibilité à la tumeur d'échapper à leur mode d'action.

2.6.3.1. Les combinaisons d'immunothérapies et de thérapies ciblées

Etonnamment, en plus de leurs effets sur la signalisation de la voie des MAPK, les **inhibiteurs de BRAF/MEK** jouent un rôle important dans le **cycle de l'immunité anticancéreuse**. En plus de provoquer le relargage d'antigènes, ils favorisent l'expression de molécules stimulatrices (IFN- γ , IL-12, TNF- α) et diminuent celle de cytokines immunosuppressives (IL-8, IL-6, IL-10, VEGF). De plus, ils augmentent l'infiltration des LT CD8+ dans la tumeur, diminuent celle des cellules immunosuppressives (MDSC, LT_{reg}), et améliorent la reconnaissance antigénique par augmentation de l'expression des molécules du CMH (Kuske *et al.*, 2018). Plusieurs études pré-cliniques et cliniques montrent que **la combinaison des thérapies ciblées et des inhibiteurs de « checkpoints » immunitaires (ICI)** pourrait provoquer une régression synergique de la tumeur et un contrôle rapide et à long-terme de cette dernière.

Une première étude chez la souris a montré qu'un inhibiteur de RAF pouvait améliorer l'activité antitumorale des anti-CTLA-4 en soutenant l'expansion des LT CD8+ antigènes-spécifiques (Callahan *et al.*, 2014). De manière similaire, une étude murine sur un modèle de mélanome BRAF^{V600E}/PTEN^{-/-} montre que l'administration d'un anti-PD1 ou anti-PDL1 en combinaison avec un inhibiteur de BRAF améliore la réponse tumorale et la survie tout en augmentant le nombre et l'activité des TIL (Cooper *et al.*, 2014). Il a également été montré que l'inhibition de BRAF et de MEK augmentait l'expression de PD-L1 sur les cellules tumorales. La triple combinaison **anti-MEK/anti-BRAF/anti-PD-1** en traitement du mélanome chez la souris s'est donc révélée plus efficace que la double thérapie ciblée (Hu-Lieskovan *et al.*, 2015). Les inhibiteurs de MEK régulent également positivement l'expression de **TIM-3**, un autre **récepteur inhibiteur** de la réponse immunitaire. La combinaison du Trametinib et d'un anticorps bloquant de TIM-3 dans un modèle de souris de mélanome (B16-F10) améliore ainsi la diminution de la croissance tumorale par rapport à ces traitements seuls (Liu *et al.*, 2017).

La combinaison d'un **inhibiteur de BRAF** et d'un **anti-CTLA4** a fait l'objet de nombreux essais cliniques (Yu *et al.*, 2019). Malgré des résultats encourageants dans certaines de ces études, des problèmes de **toxicité sévère** (hépatotoxicité, toxicité gastrointestinale, effets indésirables cutanés de grade 3 ou 4, etc) qui ont souvent mené à l'interruption de l'essai montrent que cette combinaison n'est pas appropriée dans ces conditions de traitement. Plusieurs anticorps anti-PD1 ou anti-PD-L1 ont également été testés en combinaison avec des inhibiteurs de BRAF/MEK dans le mélanome métastatique (NCT01656642, NCT02130466 et

NCT02818023). La toxicité des anti-PD1 observée dans de précédentes études étant bien moindre que celle des anti-CTLA-4, des résultats cliniques de l'association anti-PD-1 ou anti-PD-L1 et anti-BRAF/MEK devraient pouvoir être obtenus dans un futur proche. En outre, lorsque des combinaisons de traitement sont utilisées, il est important de prendre en considération **la séquence** et **l'utilisation dans le temps** des différents traitements. Plusieurs études cliniques explorent donc ces aspects dans le mélanome, dont une de phase 3 (NCT02224781) qui évalue l'efficacité chez les patients mutés BRAF d'un traitement par thérapies ciblées (Dabrafenib/Trametinib) **suivi** d'un traitement par ICI (Ipilimumab/Nivolumab) ou du traitement **inverse** (Ipilimumab/Nivolumab puis Dabrafenib/Trametinib).

2.6.3.2. La modulation du métabolisme : un soutien pour les thérapies existantes

De multiples **autres stratégies de combinaisons**, avec les thérapies ciblées ou les immunothérapies, existent. Elles prennent parti des thérapies existantes et y associe des molécules/traitements qui touchent de grands processus biologiques, souvent impliqués dans la croissance tumorale et la résistance thérapeutique. Dans ce travail de thèse, nous nous sommes penchés sur une molécule qui influe sur le métabolisme des cellules. Or, **moduler le métabolisme** est l'une des stratégies clés pour contrôler la croissance tumorale et contrer les mécanismes de résistances aux thérapies (Bader *et al.*, 2020; Bristot *et al.*, 2020; Cerezo and Rocchi, 2020; Guerra *et al.*, 2020).

Les cellules cancéreuses, qui ont besoin de proliférer rapidement, subissent un switch métabolique caractérisé par une **consommation accrue** de **glucose** et **d'acides aminés** (AA). Bien qu'elles soient capables d'engager la **phosphorylation oxydative** (OXPHOS) au niveau de leur mitochondrie, ces dernières utilisent le glucose comme principale source d'énergie et favorisent la **glycolyse aérobie** (en présence d'O₂) au détriment de l'OXPHOS. Le glucose et les AA sont alors catabolisés en intermédiaires de carbone, utiles à l'assemblage des **macromolécules** à la **production rapide d'ATP**, nécessaires à ces cellules prolifératives (Guerra *et al.*, 2020). D'autre part, ces cellules sont capables, sous pression thérapeutique (notamment suite à l'utilisation de BRAFi), de switcher transitoirement vers un phénotype invasif et résistant, caractérisé par une division lente et un retour à un **métabolisme hautement oxydatif** (Bristot *et al.*, 2020). La plasticité des cellules tumorales, capables de s'adapter à toutes sortes de contraintes métaboliques, leur permet souvent **d'échapper** à différents types de thérapies. Le rôle de l'influence du métabolisme dans la réponse aux immunothérapies a été clairement démontré. L'utilisation des différentes voies métaboliques jouent effectivement un rôle important dans les cellules tumorales mais aussi dans **les cellules immunitaires**, par effet direct ou indirect. Il est donc très intéressant de **cibler** ces voies métaboliques *via* des approches génétiques ou pharmacologiques.

En effet, chaque type de cellule immunitaire présent dans la tumeur a des caractéristiques métaboliques différentes et peut être influencé différemment par des modulateurs métaboliques. Par exemple, les **lymphocytes T effecteurs** reposent sur **métabolisme glycolytique**, qui leur permet de répondre rapidement aux

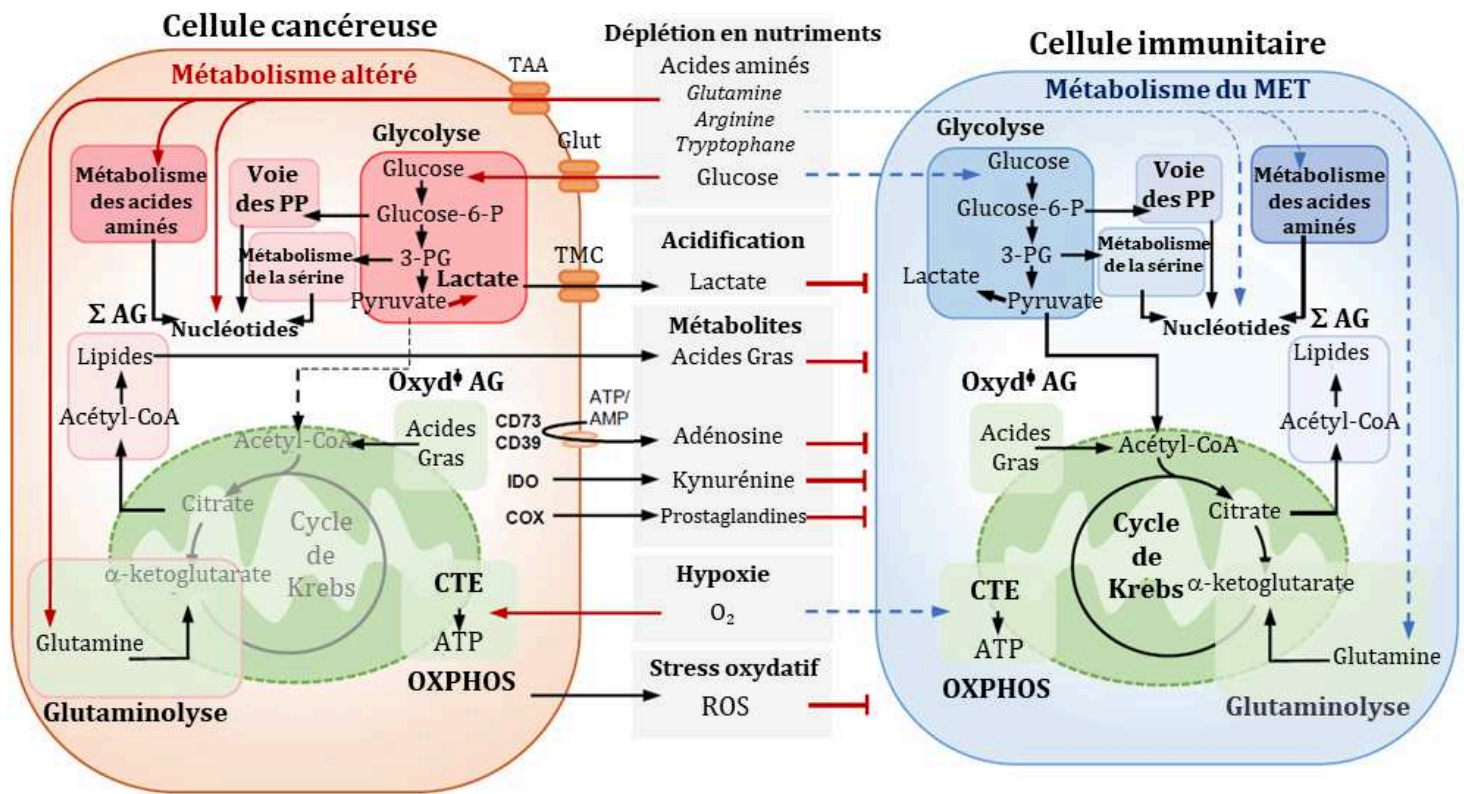


Figure 25 : L'activité métabolique altérée des cellules cancéreuses altèrent le métabolisme des cellules immunitaires

Dans le microenvironnement tumoral (MET), les cellules cancéreuses métaboliquement très actives interfèrent avec la fonction des cellules immunitaires en les privant de nutriments et en produisant des métabolites immunosuppresseurs. Les cellules tumorales consomment de grandes quantités de glucose et d'acides aminés (glutamine, arginine, tryptophane) pour nourrir la **glycolyse**, le **métabolisme des acides aminés** et la **glutaminolyse**. Cette activité limite la disponibilité de ces nutriments aux cellules immunitaires du MET. L'augmentation de la glycolyse résulte en une production accrue de lactate, qui acidifie le MET et inhibe les fonctions effectrices des cellules immunitaires. Les cellules tumorales libèrent également des acides gras (AG), de l'adénosine, de la kynurénine et de prostaglandines qui répriment les fonctions des cellules immunitaires. La consommation élevée d'oxygène due à une forte activité de la phosphorylation oxydative (OXPHOS) contribue à l'hypoxie dans le milieu et la libération de ROS, qui inhibent également les fonctions antitumorales des cellules immunitaires.

3-PG : 3-Phosphoglyceric Acid – **Acetyl-CoA** : acetyl co-enzyme 1 – **AMP** : Adenosine MonoPhosphate – **ATP** : Adénosine Triphosphate – **COX** : Cyclo-oxygénase – **CTE** : Chaîne de transport des électrons – **Oxyd^o AG** : Oxydation des Acides Gras – **Σ AG** : Synthèse des Acides Gras – **Glut** : Transporteurs de glucose – **IDO** : Indoleamine 2,3-Dioxygénase – **TMC** : Transporteurs des Monocarboxylates – **OXPHOS** : Phosphorylation oxydative – **Voie de PP** : Voie des Pentoses Phosphates – **ROS** : Espèces Réactives de l'Oxygène – **TAA** : Transporteurs des AA

Figure adaptée de : Guerra et al, 2020, Cell Report

besoins énergétiques demandés par leur fonction, alors que les **LT régulateurs** ou encore les **LT mémoires** reposent plus sur un métabolisme lié à l'oxydation des acides gras. Les macrophages M1 ou **M2** diffèrent également sur ce point : les premiers, pro-inflammatoires, ont un métabolisme hautement glycolytique alors que les seconds, **immunosuppresseurs**, ont un métabolisme **oxydatif** (utilisation de l'OXPLOS) (Guerra *et al.*, 2020). Les MDSCs quant à eux reposent sur un métabolisme lipidique (oxydation des acides gras), qui soutient leurs capacités immunosuppressives *via* l'induction d'oxyde nitrique (NO), d'arginase 1 (Arg-1) et de peroxyde d'azote (Hossain *et al.*, 2015).

De manière non négligeable, le métabolisme des cellules cancéreuses et leur besoin énergétique **interfère** sur celui des cellules immunitaires et modifie indirectement la composition de la tumeur. Les besoins nutritionnels excessifs des cellules tumorales imposent en effet aux cellules immunitaires qui les entourent un stress métabolique (*Figure 25*). Ainsi, le **manque de glucose et de glutamine** empêche les lymphocytes T de switcher vers un phénotype glycolytique qui leur permet d'exercer leur fonction effectrice. L'excès de lactate produit par les cellules cancéreuses (*via* l'effet Warburg) augmente l'**acidité** du MET et interfère avec le métabolisme des cellules immunitaires antitumorales et leur fonction. Le tryptophane, largement utilisé par les cellules cancéreuses et métabolisé en kynurénine par l'**IDO**, soutient la génération de LTreg et de MDSCs (Guerra *et al.*, 2020). D'une manière similaire, la privation d'oxygène dans les LT induit la protéine HIF-1 α (*Hypoxia Inducible Factor 1 alpha*) qui impacte l'activité antitumorale des TIL CD8⁺ (Zhang *et al.*, 2017b).

Comme nous l'avons vu dans le [paragraphe A.2.6.1.3.](#), les phénomènes de résistance aux immunothérapies extrinsèque à la cellule tumorale sont majoritairement dus à la composition du MET. Les **intermédiaires métaboliques** décrits ci-dessus, jouant un rôle important et souvent pléiotrope sur les cellules du système immunitaire, peuvent être **ciblés** par des inhibiteurs pharmacologiques qui font donc actuellement l'objet d'études cliniques, utilisés en combinaison avec des inhibiteurs de checkpoint immunitaire (*Tableau 4*) (Cerezo and Rocchi, 2020). Certaines drogues utilisées dans ces essais cliniques, cependant, ne ciblent pas directement les intermédiaires métaboliques mais les **grandes voies de signalisation** qui répondent aux fluctuations énergétiques de la cellule et régulent son métabolisme. C'est le cas de la **voie AMPK** (*AMP-Activated Protein Kinase*).

Dans un environnement pauvre en glucose, le **ratio ATP/AMP diminue** (car la synthèse d'ATP est moindre). Cette fluctuation active alors l'AMPK qui va induire l'inhibition des mécanismes consommateurs d'énergie et encourager au contraire des **processus cataboliques**. La voie de l'AMPK joue un rôle important dans le cancer et ses effets sur les cellules tumorales sont aujourd'hui plutôt bien caractérisés (voir [paragraphe B](#)). Cette voie est en effet impliquée dans l'inhibition de la prolifération et l'activation des voies de mort des cellules cancéreuses, ralentissant ainsi leur croissance. Toutefois, au-delà de ses effets directs sur la croissance tumorale, l'AMPK joue un rôle important dans le modelage et la composition du MET. En effet, il a été montré que cette voie soutenait l'expansion et **la survie des TIL** dans le microenvironnement (Blagih *et al.*, 2015; Eikawa *et al.*, 2015). D'un autre côté, la fonction **effectrice** des lymphocytes T est largement limitée par

Cible métabolique	Molécule ciblant le métabolisme	Immunothérapie utilisée	Type tumoral	Référence de l'étude clinique (ClinicalTrials.gov)
IDO 1	BMS-986205	Nivolumab (anti-PD-1)/Ipilimumab (anti-CTLA-4)	Melanome ; Cancer du poumon non à petites cellules	NCT02658890
	Epacadostat	BN-Brachyury (MVA-BN-Brachyury based cancer vaccine)	Cancer de la prostate	NCT03493945
	Epacadostat	Durvalumab (anti-PD-L1)	EBV+ Cancer Nasopharyngé	NCT04231864
Arginase	INCB001158 + Pacadostat	Pembrolizumab (anti-PD1)	Tumeurs solides	NCT03361228
	INCB001158	Pembrolizumab (anti-PD1)	Tumeurs solides	NCT02903914
Glutaminase	Telaglenastat (CB-839)	Pembrolizumab (anti-PD1)	Carcinome pulmonaire non à petites cellules	NCT04265534
AMPK	Metformine	Nivolumab (anti-PD1)	Carcinome pulmonaire non à petites cellules	NCT03048500
	Metformine	Nivolumab (anti-PD1)	Adénocarcinome colorectal	NCT03800602
	Metformine	Sintilimab (anti-PD1)	Carcinome pulmonaire à petites cellules	NCT03994744

Tableau 4 : Liste des essais cliniques actuels combinant des molécules ciblant le métabolisme et un traitement par immunothérapie

Tableau tiré de : Cerezo et Rocchi, 2020, CDDi

l'activation de l'AMPK (Ma *et al.*, 2017). De plus, il semble que cette dernière atténue la fonction inflammatoire et sécrétrice de macrophages et des cellules dendritiques (Carroll *et al.*, 2013; Challier *et al.*, 2013).

L'une des drogues les plus connue pour cibler cette voie est la **Metformine**, un anti-diabétique qui active cette indirectement l'AMPK par altération de la chaîne respiratoire mitochondriale (voir [paragraphe B.2](#)). Plusieurs études pré-cliniques supposent que l'utilisation de la Metformine pourrait améliorer la réponse aux ICI en altérant les mécanismes métaboliques impliqués dans leur résistance. Dans des modèles murins de mélanome et de carcinome de colon, l'utilisation de la Metformine bloque la **consommation d'oxygène** par les cellules cancéreuses, ce qui rend le milieu moins hypoxique. De ce fait, elle permet aux LT d'utiliser cet oxygène, restaurant leur fonction. Elle améliore ainsi le taux de réponse de ces tumeurs aux anti-PD-1, provoquant leur régression (Scharping *et al.*, 2017). Dans un autre modèle murin, l'administration de Metformine favorise la génération de LT mémoires, qui résulte en une meilleure immunité tumorale (Pearce *et al.*, 2009). La Phenformine, un autre anti-diabétique similaire à la Metformine, induit la **diminution des MDSCs** dans la rate et les tumeurs de souris porteuses de mélanome. Elle synergise alors par ce biais l'effets des anti-PD1 sur la régression tumorale en améliorant la fonction des LT CD8+ (Kim *et al.*, 2017).

L'effet de la Metformine et de la voie AMPK sur les différentes populations de cellules immunitaires sera développé dans le [paragraphe B.4.2](#).

Ces différentes études, aux résultats parfois contradictoires, suggèrent que la voie AMPK joue un rôle complexe dans le microenvironnement tumoral. Elle est capable de moduler, de manière contexte et temps-dépendant, les processus métaboliques et signalétiques qui régulent le stress des cellules cancéreuses ou encore l'immunité antitumorale. Les thérapies **ciblant la voie de l'AMPK** peuvent donc être **considérées** pour cette potentielle action à double-facette.

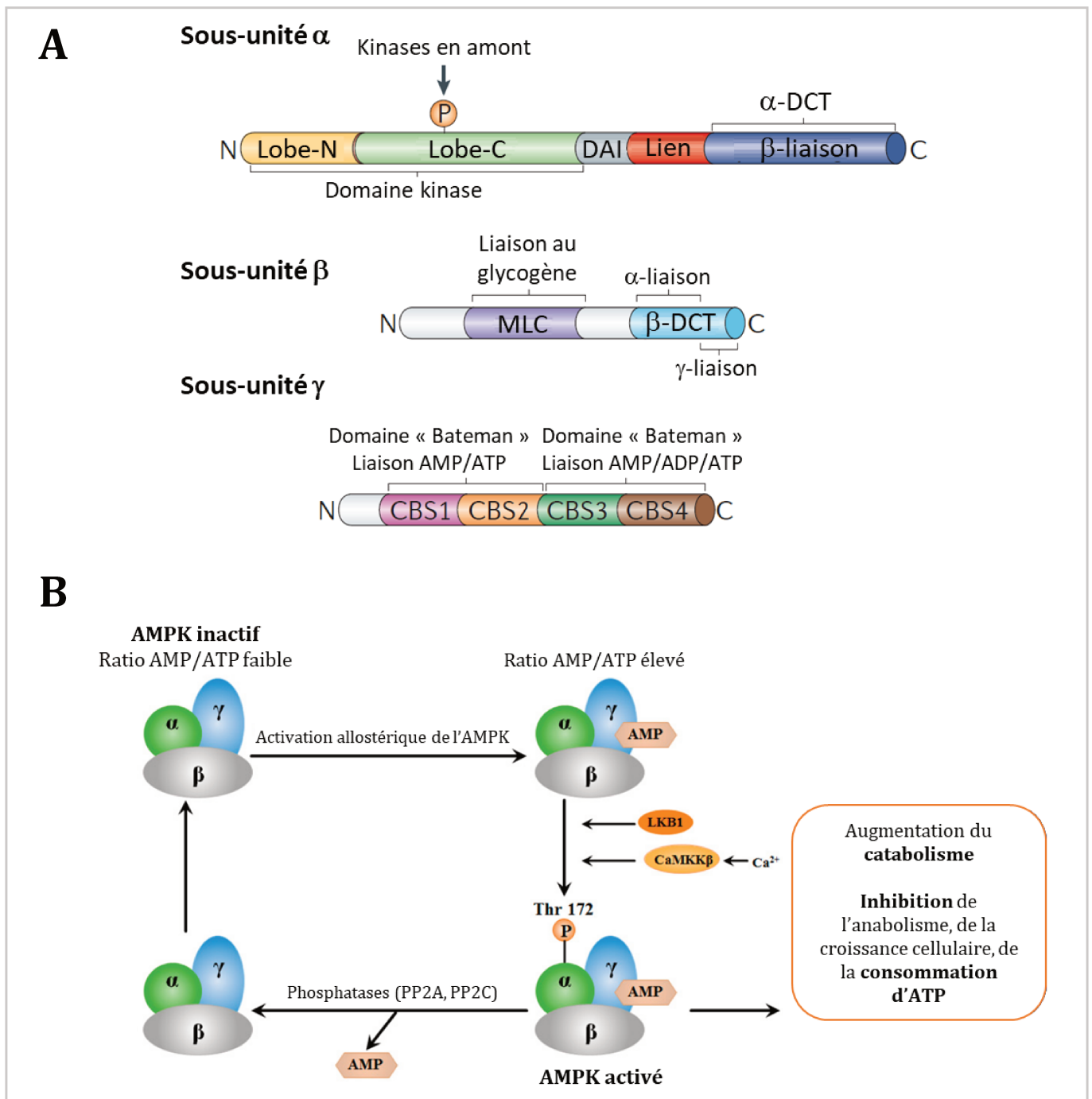


Figure 26 : Structure et régulation de la kinase AMPK

A. Structure de l'AMPK. Cette kinase est composée de 3 sous-unités : α , β et γ . La sous-unité α contient le **domaine kinase** de la protéine : c'est la sous-unité catalytique. Elle contient aussi un **domaine auto-inhibiteur (DAI)** qui maintient la protéine sous sa forme inactive lorsqu'elle n'est pas liée à l'AMP. Les sous-unités β et γ sont régulatrices. Sur la sous-unité γ se trouvent des domaines répétitifs « CBS », qui sont des séquences de motifs répétitifs en tandem. Deux motifs CBS forment un domaine « Bateman » sur lequel se fixe les **dérivés d'adénosine**.

B. Régulation de l'AMPK. Mécanisme d'activation de l'AMPK par augmentation du ratio intracellulaire AMP/ATP. La liaison de l'AMP à la sous-unité γ provoque (1) une activation allostérique de la protéine, (2) la phosphorylation (Thr172) de la sous-unité α par LKB1, (3) l'inhibition de la déphosphorylation de la sous-unité α par les phosphatases (PP2A, PP2C). Au contraire, la **liaison de l'ATP antagonise** tous ces effets. L'augmentation du calcium intracellulaire active CaMKK β , qui phosphoryle également la sous-unité α de l'AMPK en Thr172.

AMP : Adénosine monophosphate – ADP : Adénosine diphosphate – ATP : Adénosine triphosphate - DAI : Domaine auto-inhibiteur - DCT : Domaine Carboxy-Terminal – MLC : Module de liaison au Carbohyrate

B. Implication de ciblage de la voie AMPK dans le cancer

1. Généralités, régulation et fonction originelle de l'AMPK

Chez les mammifères, les cellules doivent maintenir une **balance énergétique** stable, caractérisée par un rapport des concentrations ATP/ADP égale à 10/1. Les différents organismes ont donc développé des mécanismes pour adapter leur métabolisme aux contraintes énergétiques. Dans la cellule, la **kinase AMPK** (*AMP-Activated Protein Kinase*) est souvent décrite comme étant un « **senseur** » de l'énergie cellulaire et peut être **activée** par différents facteurs tels que le stress nutritionnel, l'hypoxie, l'exercice physique ou des activateurs naturels (leptine, adiponectine) ou chimiques (AICAR, Metformine). Inversement, l'AMPK peut être **inhibée** par des dérégulations métaboliques telles qu'un fort taux de glucose (Hardie *et al.*, 2016).

Cette kinase est largement conservée chez les organismes eucaryotes. Chez l'Homme, l'AMPK est un **complexe hétérotrimérique** formé d'une sous-unité catalytique alpha (α) de deux sous-unités régulatrices : les sous-unités beta (β) et gamma (γ) (*Figure 26*). Il existe différents isoformes pour chacune de ces sous-unités ($\alpha 1$, $\alpha 2$, $\beta 1$, $\beta 2$, $\gamma 1$, $\gamma 2$, $\gamma 3$), différenciellement exprimées et activées dans les tissus (Steinberg and Kemp, 2009). Le complexe de l'AMPK est activé par **phosphorylation** d'un **résidu de thréonine** très conservé (**Thr172**) qui se situe dans la boucle d'activation du domaine catalytique α de la kinase. Cette activation peut être le fait de plusieurs phénomènes. Principalement, elle résulte de la dérégulation du **ratio cellulaire AMP** (*Adénosine monophosphate*) / **ATP** (*Adénosine triphosphate*) qui penche vers une augmentation de l'AMP intracellulaire. La fixation du **5'-AMP sur la sous-unité γ** de l'AMPK induit alors trois effets complémentaires (*Figure 26*) : l'**activation allostérique** de la kinase (son changement de conformation augmente de 2 à 5 fois son activité), la promotion de la **phosphorylation de la Thr172** par des kinases en amont (LKB1 : *Liver Kinase B1*), et l'**inhibition de la déphosphorylation** de la Thr172 par des phosphatases (PP2CA : *Protein Phosphatase 2 Ca* ou PP2A : *Protein Phosphatase 2 A*). (Gowans *et al.*, 2013; Sanders *et al.*, 2007). Les effets sur l'activation de la phosphorylation et l'inhibition de la déphosphorylation peuvent être mimés par l'**ADP**.

En plus de sa régulation allostérique par liaison de l'AMP, l'AMPK peut être régulée directement par différentes kinases telle que **LKB1** ou **CaMKK β** (Ca²⁺/Calmodulin-Dependent Protein Kinase Kinase β). **LKB1**, protéine originellement découverte et décrite comme étant un suppresseur de tumeur, est capable de phosphoryler l'AMPK directement sur sa Thr172. Son mode d'activation est assez singulier pour une kinase : il consiste en sa relocalisation du noyau jusqu'au cytoplasme par STRAD (*Ste20-Related Adaptor*) et MO25 (*Mouse Protein 25*) (Hawley *et al.*, 2003). La **CaMKK β** est une **sérine/thréonine kinase** régulée par le complexe **Ca²⁺/Calmoduline**, qui se forme par liaison de l'ion calcium intracellulaire à cette calcioprotéine ubiquitaire (la calmoduline). Son rôle est donc de répondre aux **changements intracellulaires de calcium** et d'activer les kinases CaMK (*Calcium-Calmodulin-Kinases*) I et IV, responsables de nombreuses réponses intracellulaires telles que la progression du cycle cellulaire, la motilité, l'inflammation (CaMKI) ou encore la survie et la réponse immunitaire (CaMKIV) (Huang and Racioppi, 2018). Il a également été montré cependant que cette kinase pouvait phosphoryler le résidu thréonine de différentes protéines telles que l'AMPK (Thr172)

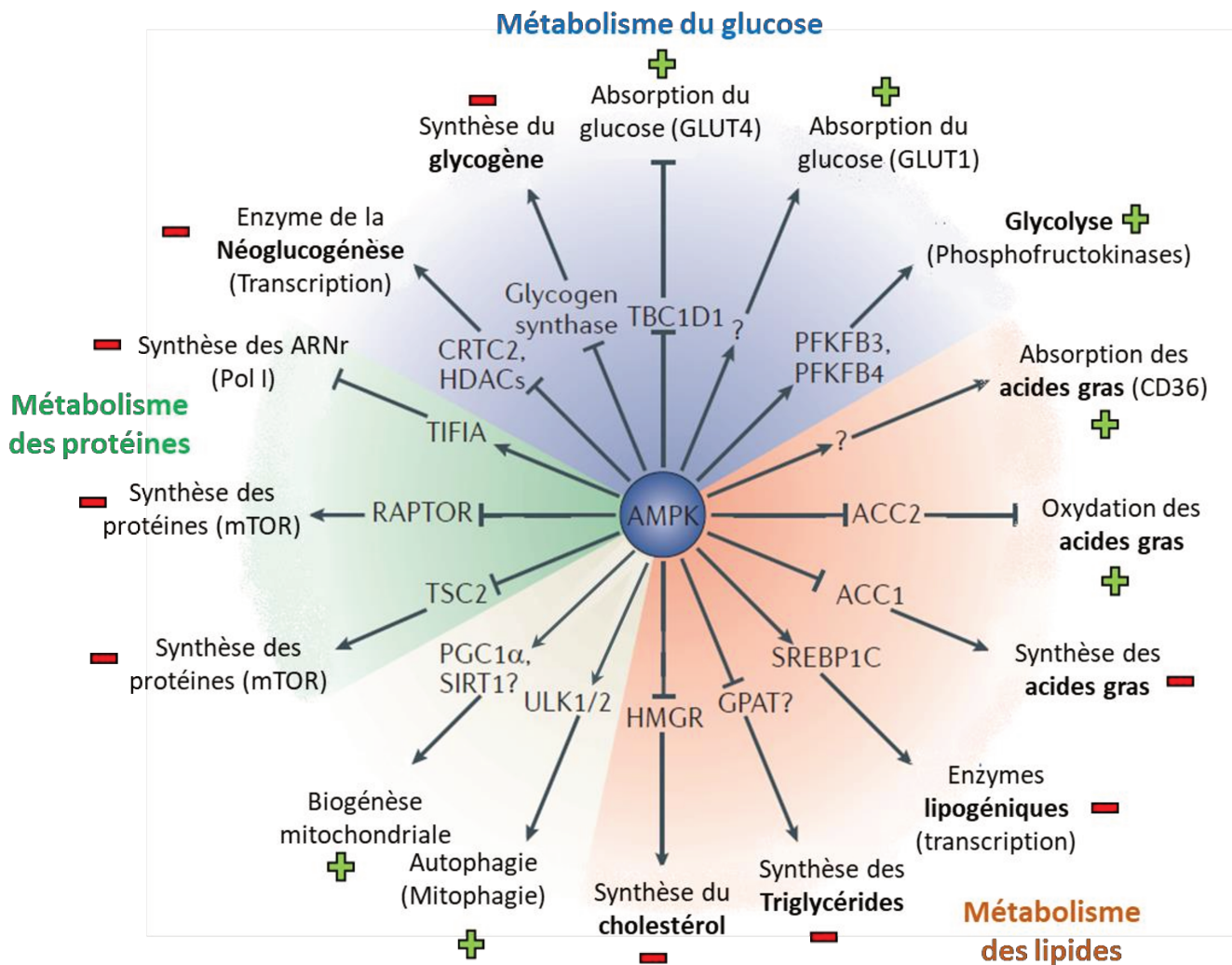


Figure 27 : Régulation des voies métaboliques par l'AMPK

L'AMPK est capable de réguler un grand nombre de **substrats** impliqués dans le métabolisme du **glucose**, des **lipides**, ou encore de la **mitochondrie**. La modulation de ces substrats va aboutir à une augmentation (+) des **voies cataboliques** procurant à la cellule de l'énergie et à une diminution (-) des voies anaboliques consommant de l'énergie.

ACC1/2 : Acetyl-CoA Carboxylase 1/2 - **CRTC2** : CREB-regulated transcription co-activator 2 - **GPAT** : Glycerol-3-phosphate acyltransferase - **HDAC** : Histone Desacetylase - **HMGR** : Hydroxyméthylglutaryl-CoA réductase - **PFKFB3/4** : 6-Phosphofructo-2-Kinase/Fructose-2,6-Biphosphatase 3/4 - **PGC1α** : Peroxisome proliferator activated receptor gamma coactivator 1 alpha - **Raptor** : Regulatory-associated protein of mTOR - **SIRT1** : Sirtuin1 - **SREBP1C** : Sterol regulatory element-binding proteins 1C - **TBC1D1** : TBC1 Domain Family Member 1 - **TSC2** : TSC Complex subunit 2 - **ULK1/2** : Unc-51 Like Autophagy Activating Kinase 1/2

Figure adaptée de : Hardié et al, 2012, Nat. Review et Hardié et al, 2018, J. R. Soc

(Hawley *et al.*, 1995). Enfin, d'autres mécanismes fins de régulation ont été découverts. Il a par exemple été montré que la stimulation de l'AMPK par fixation de l'AMP nécessite la myristoylation (ajout d'un groupement chimique particulier) de la sous-unité β de l'AMPK (Oakhill *et al.*, 2010).

Face au **stress métabolique** de la cellule, l'AMPK activée va **cibler** de nombreux substrats qui jouent tous des rôles importants dans les **différentes voies métaboliques de la cellule** (Hardie, 2018). Chacune de ces régulations déclenchées par l'AMPK converge vers un seul but : fournir à la cellule suffisamment d'énergie pour surmonter ce stress. Pour cela, les voies anaboliques (de synthèse) devront être inhibées en faveur de l'activation des **voies cataboliques**, productrices d'énergie. Ainsi, l'AMPK régule le **métabolisme du glucose**, des **lipides**, des **protéines** et de la **mitochondrie** (Figure 27). L'absorption du **glucose** est donc favorisée par translocation à la membrane plasmique ou la transcription de ses récepteurs GLUT-1 et GLUT-4 (*Glucose Transporter 1/4*) dans les muscles squelettiques (Barnes *et al.*, 2002; McGee *et al.*, 2008) ; et la **glycolyse** est encouragée *via*, notamment, l'activation des enzymes impliquées dans cette voie (différentes phosphofructokinases). Par ailleurs, l'AMPK inactive, par phosphorylation directe, les enzymes lipogéniques ACC1/2 (*Acetyl-Coenzyme A Carboxylase 1 and 2*) (Carling *et al.*, 1987; Fullerton *et al.*, 2013) ce qui provoque la **stimulation de la β -oxydation des acides gras (AG)** au détriment de leur synthèse. Similairement, l'AMPK peut inhiber la synthèse du cholestérol et celle des phospholipides par inactivation des enzymes correspondantes (Hardie, 2018). La kinase peut également favoriser l'entrée des AG dans la cellule par translocation à la membrane de leur transporteur (Habets *et al.*, 2009). En parallèle, la **synthèse des protéines** est inhibée par l'AMPK *via* la phosphorylation de TSC2 (*Tuberous Sclerosis Complex 2*) et de Raptor (*Regulatory Associated Protein of mTOR*) (Gwinn *et al.*, 2008; Inoki *et al.*, 2003). La phosphorylation de ces deux protéines aboutit en effet à l'inhibition du complexe mTORC1, dont mTOR et Raptor font partis. La phosphorylation de la **kinase EF2** (*Elongation Factor 2*) joue également un rôle dans l'inhibition de la synthèse protéique par l'AMPK (Johanns *et al.*, 2017). Enfin, la dégradation spécifique de mitochondries défectueuses par autophagie, appelée **mitophagie**, est induite par la phosphorylation active de Ulk1 (*Unc-51 like autophagy activating kinase*) par l'AMPK dans les muscles squelettiques (Laker *et al.*, 2017). Récemment, il a été montré que la mitophagie pouvait être induite par la phosphorylation AMPK-dépendante de MFF (*Mitochondrial Fission Factor*) et de TBK1 (*Tank-binding kinase 1*), provoquant respectivement la fission mitochondriale et la destruction par autophagosomes (Seabright *et al.*, 2020).

La voie de l'AMPK peut être étudiée grâce à plusieurs **outils pharmacologiques**. Il existe en effet des **prodrogues**, converties en analogues de l'AMP dans la cellule (comme l'AICAR [*5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleoside*] ou le C13), des **activateurs allostériques** ne se fixant pas au site de liaison de l'AMP (comme A-769662 ou 991) ou encore des composés **inhibants la synthèse mitochondriale d'ATP** et augmentant l'AMP intracellulaire (Metformine, Phenformine, Resvératrol) (Hardie *et al.*, 2016). Dans cette dernière classe d'activateurs se trouve l'une des molécules les plus utilisées pour l'étude de l'implication de la voie de l'AMPK dans des modèles divers et variés : **la Metformine**.

La Metformine fait partie d'une famille de molécules appelées les **biguanides**. Ces dernières sont caractérisées par la liaison de deux groupements guanidines via l'un de leur atome d'azote. La guanidine est extraite d'une plante, la *Galega officinalis*, utilisée pour ses vertus antidiabétiques depuis plusieurs siècles, avant même la découverte de ses **effets sur la glycémie** en 1918 (Watanabe, 1918). Il faudra attendre l'année 1957 pour que le médecin français **Jean Sterne** prouve par des essais cliniques chez l'Homme que la Metformine possède le **meilleur rapport bénéfice/risque** de tous les biguanides testés. En effet, de nombreux autres dérivés de la guanidine furent identifiés (Phenformine, Buformine) et utilisés dans le traitement du diabète de type 2 avant d'être écartés pour toxicité importante (induction d'acidose lactique) (Foretz and Viollet, 2014). La Metformine obtient donc l'AMM en tant qu'**antidiabétique** oral en 1958 en Europe puis en 1995 aux Etats-Unis. De nos jours encore, la Metformine reste l'antidiabétique **le plus prescrit dans le monde** (avec plus de 100 millions de patients traités par cette drogue en 2010) (<https://www.americanscientist.org/article/metformin>).

A partir des années 2000, on découvre que les patients diabétiques ont un risque globalement plus élevé de développer des cancers que des personnes saines, à cause notamment de l'augmentation de leur niveau sérique de **facteurs de croissance** tels que l'insuline (Giovannucci *et al.*, 2010). A la même période, de nombreuses **études épidémiologiques rétrospectives** chez les patients atteints de **diabète de type II** ont montré l'influence de la Metformine sur l'incidence de différents cancers. La première étude (Evans *et al.*, 2005) montre que l'incidence de **cancers** chez les patients diabétiques traités avec de la Metformine est moindre que celle des patients traités avec d'autres antidiabétiques. Suite à cela, de nombreuses autres études ont rapporté un **effet antinéoplasique** de la Metformine tous cancers confondus (Bodmer *et al.*, 2010; Bowker *et al.*, 2006; Kim *et al.*, 2018; Libby *et al.*, 2009; Tokajuk *et al.*, 2015) ou dans différents types de cancers (Sein, Prostate) (Bodmer *et al.*, 2010; Murtola *et al.*, 2008). La plus récente, établie par Kim et ses collègues, montre que dans une population coréenne atteinte de diabète de type 2, l'incidence de cancers chez les patients traités depuis 5 ans avec de la Metformine est de **13,2 ‰** contre **21,8 ‰** chez les patients traités avec d'autres traitements. En conséquence de ces études, de nombreux laboratoires ont étudié le mode d'action de cette molécule dans différents types de cancers, à la fois *in vitro* et *in vivo*. Cet aspect sera développé dans le [paragraphe B.4.1](#).

Pris dans leur ensemble, ces éléments nous poussent à considérer la **voie de l'AMPK** comme une cible très intéressante dans le cadre du cancer. L'étude de son activation dans ce contexte, notamment à travers les effets de la Metformine, a donc fait l'objet de plus amples investigations.

2. Mécanisme d'activation de la voie de l'AMPK par la Metformine

La cible cellulaire principale de la Metformine est le **complexe I** de la **chaîne respiratoire**, qui se situe dans la mitochondrie. Souvent décrite comme étant la « centrale énergétique » de la cellule, la **mitochondrie** est un organite essentiel qui constitue le plus important **producteur d'ATP** de la cellule. Le cycle respiratoire (Glycolyse → Cycle de Krebs → Phosphorylation oxydative) sert à convertir l'énergie des molécules organiques

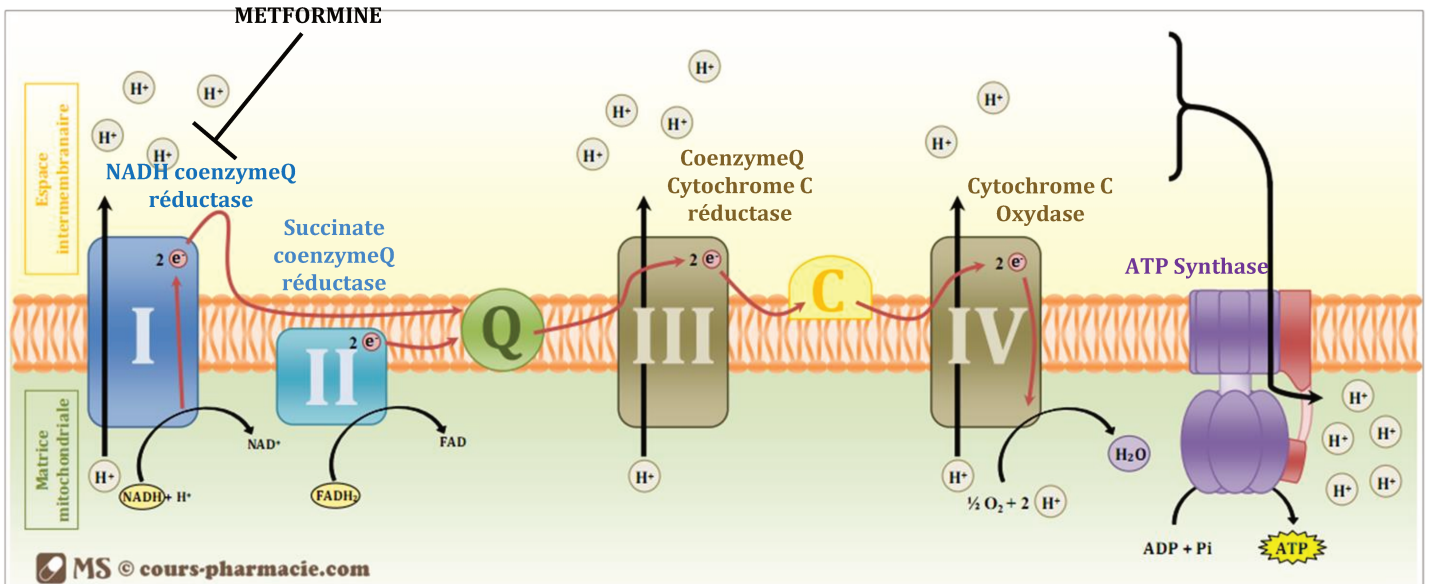


Figure 28 : Représentation schématique de la chaîne respiratoire mitochondriale

Tout au long de la **chaîne respiratoire** les électrons provenant du NADH et du FADH₂ vont perdre de l'énergie qui sera utilisée pour former le gradient électrochimique de proton entre l'espace intermembranaire et la matrice mitochondriale. Les électrons ainsi récupérés sont transportés via les différents complexes :

- Le **complexe I** a une action **NADH coenzyme Q réductase**, récupérant les électrons du NADH et permet le transport de 4 protons de la matrice mitochondriale à l'espace inter-membranaire.
- Le **complexe II** a une action **Succinate coenzyme Q réductase**, récupérant les électrons du FADH₂ et permet le transport d'aucun proton.
- Le **complexe III** a une action **Coenzyme Q cytochrome C réductase**, et permet le transport de 4 protons de la matrice mitochondriale à l'espace intermembranaire.
- Le **complexe IV** a une action **Cytochrome C oxydase**, et permet le transport de 2 protons de la matrice mitochondriale à l'espace inter-membranaire.

Le **coenzyme Q** (ou ubiquinone) permet la transition entre le complexe I ou II et le complexe III et le **cytochrome C** permet la transition entre le complexe III et le complexe IV.

Les électrons de basses énergies libérés à la fin de la chaîne respiratoire réagissent ainsi avec les molécules d'**oxygène** et les **protons** présents dans la matrice mitochondriale afin de former des **molécules d'eau**. Le fonctionnement progressif de la chaîne respiratoire est nécessaire car les électrons libérés par le NADH et le FADH₂ sont riches en énergie et de cette manière ne peuvent pas réagir d'emblée avec les molécules d'oxygène.

Enfin, les protons repartiront vers la matrice mitochondriale via une **pompe à proton** appelée **ATP synthase**, qui permet la synthèse d'ATP à partir d'ADP.

Figure et légende tirées de :

<https://www.cours-pharmacie.com/biochimie/chaîne-respiratoire-et-phosphorylation-oxydative.html>

(comme le glucose) en énergie directement utilisable par la cellule (ATP). Les **deux dernières étapes** de ce cycle se déroulent dans la mitochondrie et constituent la **respiration mitochondriale**. Elles consistent en :

- La génération de co-enzymes transporteurs d'hydrogènes sous leur forme **réduite** (NADH, FADH₂) dans la matrice mitochondriale *via* le **cycle de Krebs**.
- La génération d'ATP par **phosphorylation oxydative** grâce à la chaîne de transport d'électron (CTE), appelée aussi **chaîne respiratoire mitochondriale**, qui utilise les électrons provenant des co-enzymes réduites pour générer l'énergie nécessaire à la phosphorylation de l'ADP (*Figure 28*).

En altérant le fonctionnement du complexe I de cette chaîne, la Metformine **inhibe la phosphorylation oxydative mitochondriale** en empêchant l'oxydation du NADH, ce qui provoque une diminution de la synthèse d'ATP et une augmentation des taux intracellulaires d'AMP (El-Mir *et al.*, 2000; Owen *et al.*, 2000). Le mécanisme précis d'inhibition de ce complexe I n'est pas encore clairement identifié aujourd'hui. Toutefois, la réduction de la charge énergétique de la cellule provoque un stress métabolique qui entraîne **l'activation de l'AMPK** ainsi que la stimulation des voies cataboliques générant de l'ATP. La Metformine est absorbée dans les cellules *via* des transporteurs **OCT 1 à 4** (*Organic Cation Transporters 1-4*), **PMAT** (*Plasma Membrane Monoamine Transporter*) ou **MATE1-2** (*Multidrug and toxin extrusion protein*) (Pernicova and Korbonits, 2014).

L'activation de l'AMPK par la Metformine nécessite l'implication de la **kinase LKB1** *in vitro* et *in vivo*, en particulier dans les cellules musculaires squelettiques et les cellules hépatiques (Sakamoto *et al.*, 2005). En 2008, une étude sur cellules endothéliales montre que la phosphorylation (Ser428) de la LKB1 par la PKC- ζ (*Protein kinase calcium dependant zeta*) est nécessaire à l'activation de l'AMPK par la Metformine (Xie *et al.*, 2008). La protéine LKB1 activée est alors exportée vers le cytosol où elle phosphoryle à son tour la sous-unité alpha de l'AMPK. Ce mécanisme **LKB1-dépendant** de l'activation de l'AMPK par la Metformine se déroule également dans le **foie**, dans lequel la molécule va jouer son **rôle hypoglycémiant** *via* l'augmentation de l'oxydation des acides gras et l'inhibition de la néoglucogénèse, la lipolyse et la synthèse protéique (Shu *et al.*, 2007; Zhou *et al.*, 2001).

Il a quelques années, il a été montré que la Metformine était capable dans des cellules isolées de muscle squelettique d'inhiber directement l'**AMP désaminase**, une enzyme impliquée dans le métabolisme des nucléotides puriques et qui catalyse la réaction transformant l'AMP en IMP (Inosine Monophosphate). Son inhibition provoque ainsi une augmentation de l'AMP intracellulaire, l'activation de l'AMPK et une augmentation de l'absorption du glucose et de l'oxydation des AG (Ouyang *et al.*, 2011). Ce mécanisme est **LKB1-indépendant**. Plus récemment, une étude a montré que la Metformine pouvait altérer **l'intégrité de la mitochondrie** dans les cellules cancéreuses indirectement *via* l'induction d'un stress du réticulum endoplasmique (RE) (Loubiere *et al.*, 2017). Ce stress induit une libération massive de calcium (Ca²⁺) du RE et

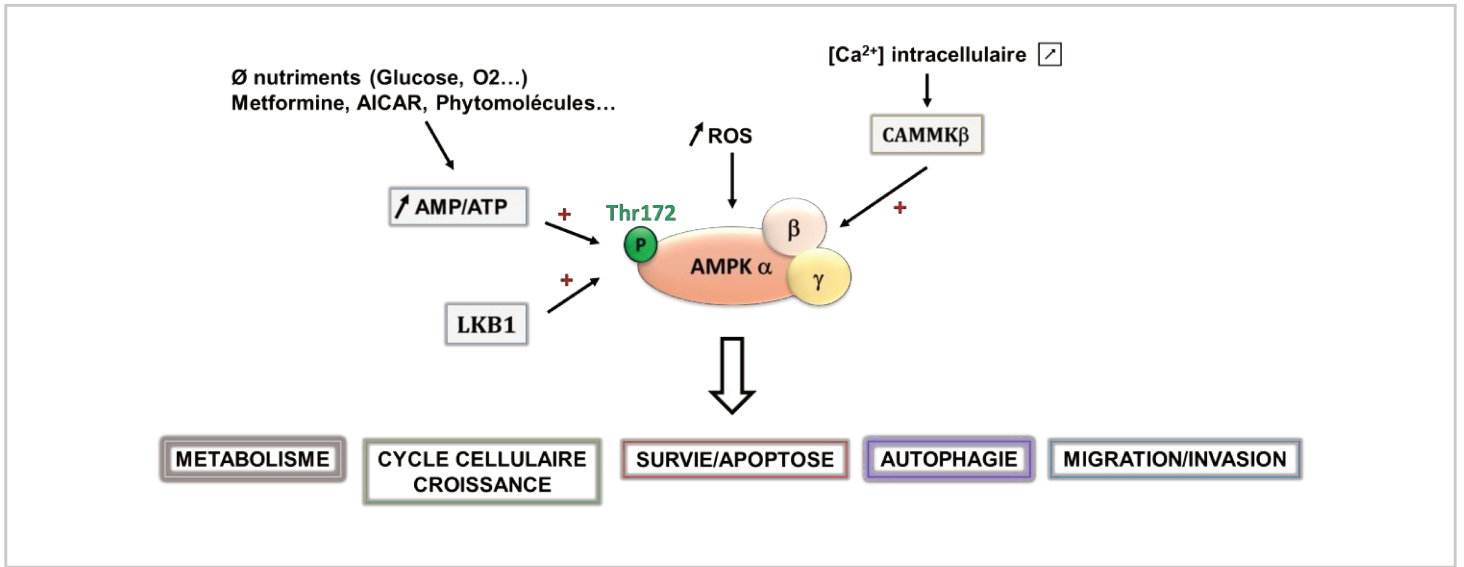


Figure 29 : Rôle multifacette de l'AMPK dans la cellule

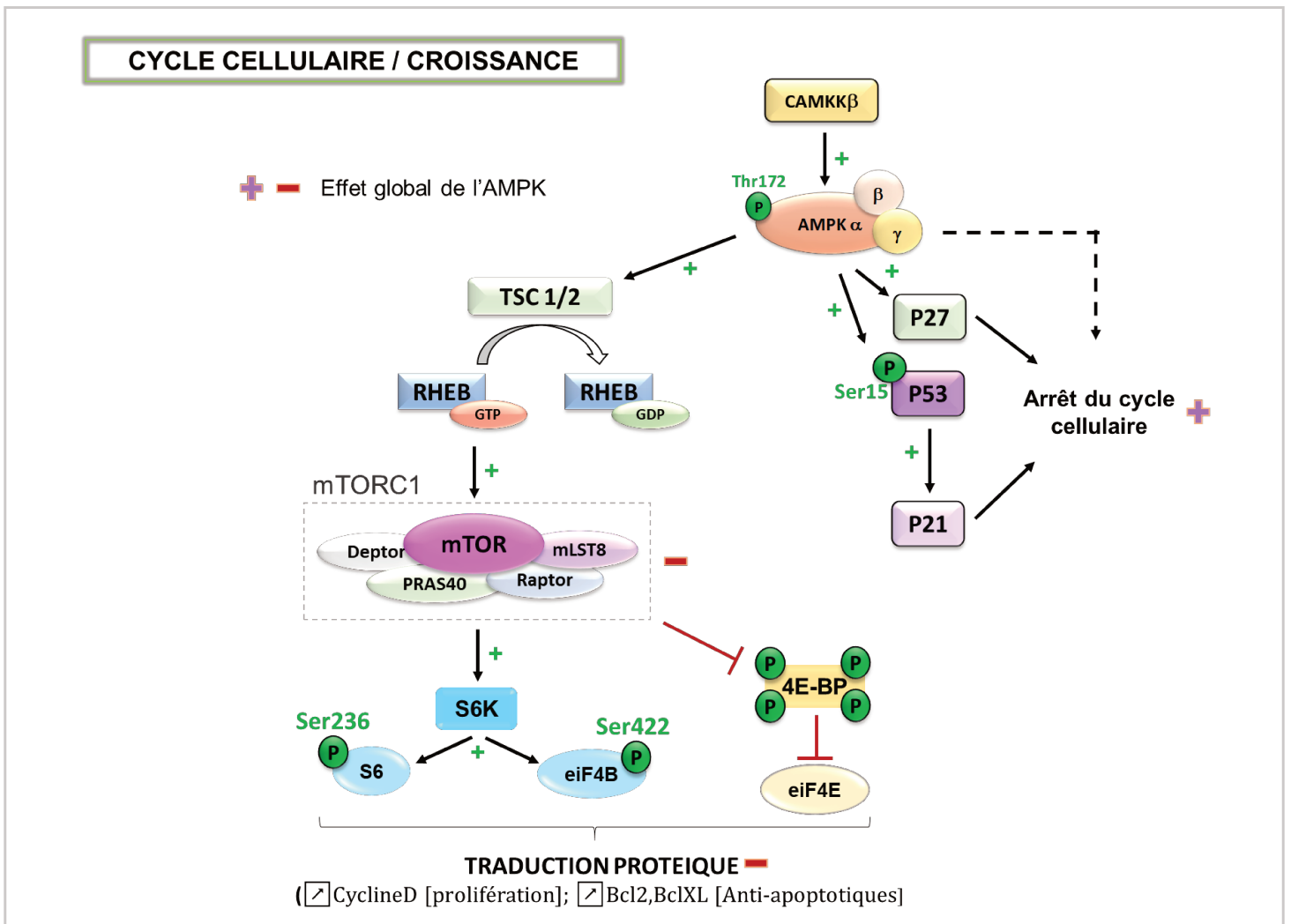


Figure 30 : Rôle de l'AMPK sur la prolifération et le cycle cellulaire

L'AMPK régule la prolifération cellulaire à travers l'induction de l'arrêt du cycle cellulaire et l'inhibition de la synthèse protéique.

4E-BP : Eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1 - **eiF4B** : Eukaryotic translation initiation factor 4B - **eiF4E** : Eukaryotic translation initiation factor 4E - **mTORC** : mammalian Target Of Rapamycin Complex - **Rheb** : Ras homolog enriched in brain - **S6K** : S6 kinase -- **Tsc1/2** : Tuberous sclerosis complex 1/2

une **entrée** de ce calcium dans la **mitochondrie**, provoquant son **gonflement** et la désorganisation de ses crêtes. La destruction de la mitochondrie est **en partie dépendante** de l'activation de l'AMPK.

Pour finir, gardons en mémoire cependant que la Metformine peut également induire son effet antidiabétique **indépendamment** de l'activation de la voie AMPK (Chen *et al.*, 2017b; Deschemin *et al.*, 2017; Foretz *et al.*, 2010; Saeedi *et al.*, 2008). La Metformine induit par exemple, tout comme la déplétion d'acides aminés, l'inhibition de mTORC1 dans des cellules AMPK KO (knock-out) en inactivant le complexe « **Ragulator-Rag** » (Kalender *et al.*, 2010; Sancak *et al.*, 2010). Ce complexe redirige mTORC1 intracellulaire vers un compartiment **périnucléaire** dans lequel se trouve son activateur Rheb. D'autre part, la Metformine peut induire l'inhibition de mTOR de manière AMPK-indépendante par augmentation de l'expression de **REDD1** (Ben Sahra *et al.*, 2011). Les effets métaboliques sur les cellules cardiaques seraient également indépendants de l'activation de l'AMPK et passeraient plutôt par l'activation de la **MAPK p38** et de la **PKC** (*Protein Kinase C*) (Saeedi *et al.*, 2008). Plus récemment, une étude a montré que la Metformine inhibait l'**adipogenèse** de manière partiellement indépendante de l'AMPK, en inhibant l'activation de PPAR γ et induisant celle de Runx2 (Chen *et al.*, 2017b).

3. La voie AMPK : Effets sur la prolifération et la mort cellulaire

En plus de ses effets étendus sur le **métabolisme** en général, l'AMPK est un acteur multifacette et joue un rôle dans d'autres processus cellulaires tels que la **prolifération**, la régulation du **cycle cellulaire**, la polarité des cellules, l'**autophagie** et l'**apoptose** (*Figure 29*) (Luo *et al.*, 2010; Yuan *et al.*, 2013a). Dans le cadre du cancer, nous nous intéressons à l'implication de l'AMPK sur la prolifération et la mort cellulaire.

3.1. Effets sur la prolifération des cellules

La prolifération cellulaire est contrôlée par le **cycle cellulaire**, lui-même régulé par les kinases CDKs (*Cyclin dependant kinases*) et par leurs inhibiteurs, les **CDKi** (*CDK inhibitors*) tels que p21 ou p27 (Schafer, 1998). Il a été montré que l'activation de l'AMPK pouvait causer un arrêt du cycle cellulaire par plusieurs moyens (*Figure 30*). Dès 2001, il a ainsi été observé que l'AICAR, un activateur de l'AMPK, pouvait provoquer l'arrêt cellulaire en phase G1 du cycle dans des cellules cancéreuses de foie (Imamura *et al.*, 2001). Cet arrêt du cycle était dû à la phosphorylation du facteur de transcription p53 en sérine 15 (Ser15) qui induisait lui-même l'augmentation de l'expression du CDKi de phase G1 **P21** (CDKN1A : *Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 1A*). L'AMPK peut également causer un arrêt du cycle en phase G1 par la phosphorylation d'un autre CDKi : **P27** (CDKN1B: *Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 1B*). Dans un modèle *in vitro* de cancer du sein, P27 est phosphorylé en Thr198 en réponse à un traitement par AICAR ou après déplétion du milieu en glucose. Cette phosphorylation provoque la stabilisation de la protéine et l'arrêt du cycle ainsi que l'autophagie (Liang *et al.*, 2007). Une autre étude a confirmé un petit peu plus tard que P27 pouvait en effet être phosphorylé par l'AMPK

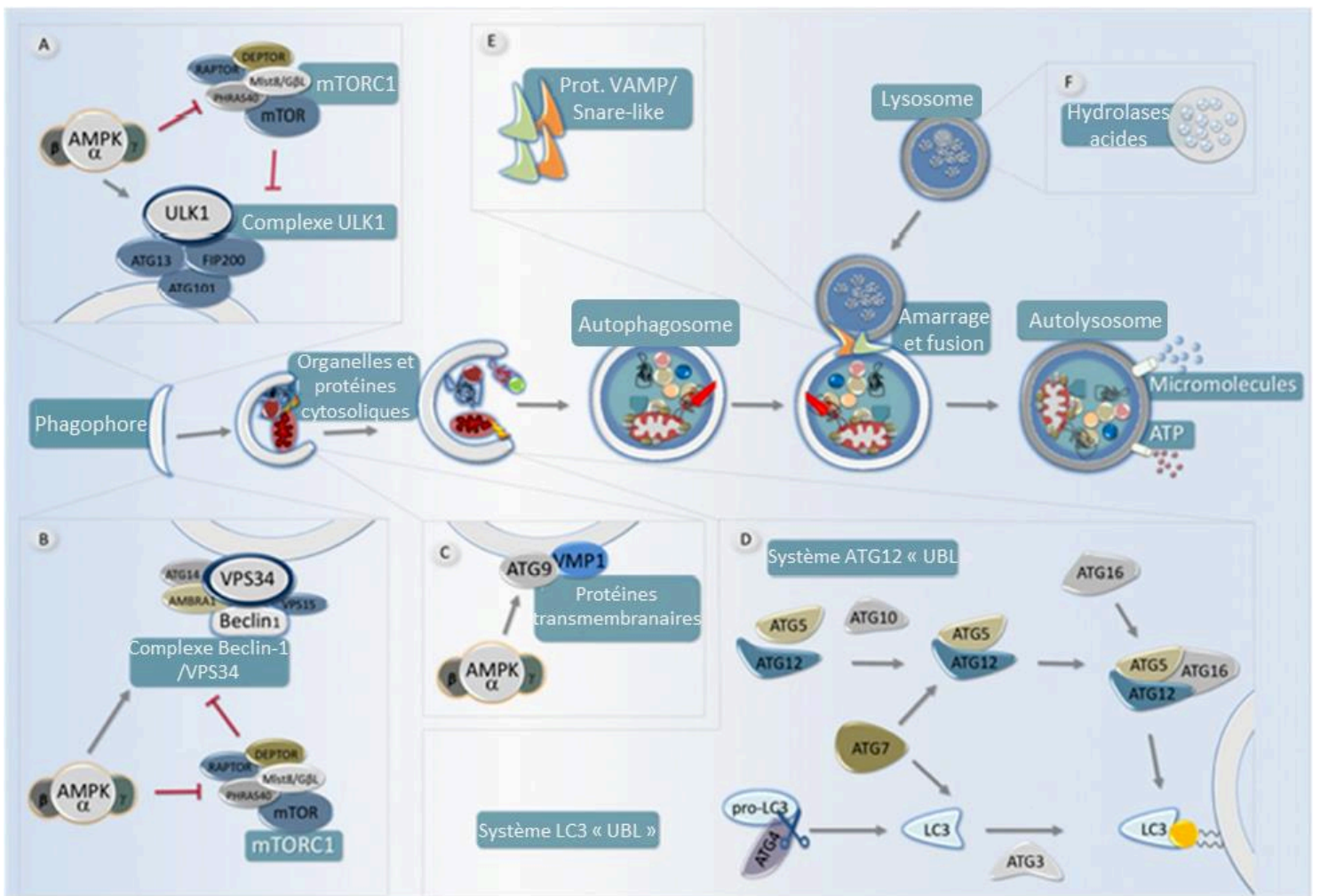


Figure 31 : Régulation de l'autophagie par l'AMPK et mTORC1

Le processus de l'autophagie commence avec la formation d'une membrane d'isolation, appelée phagophore. Puis, il implique l'activation temporelle et spatiale de nombreux composants moléculaires : **(A)** Le complexe **ULK1-FIP200-ATG13-ATG101** est responsable de l'initiation de l'autophagie. L'activité de ce complexe est régulée de manière antagoniste par mTORC1 (inhibition) et l'AMPK (activation). **(B)** Le **complexe PI3K de classe III**, formé par VPS34, Beclin-1, ATG4 et AMBRA1 entre autres, crée un domaine membranaire enrichi en PtsIns3P qui favorise la nucléation du phagophore contenant les protéines ATG. L'AMPK est capable d'augmenter la fonction pro-autophagique de ce complexe et d'améliorer sa formation. **(C)** Deux protéines transmembranaires différentes, **VMP1 et ATG9**, participent au recrutement de membranes au phagophore. L'AMPK peut phosphoryler ATG9 et induire son recrutement vers les sites de formation des autophagosomes. **(D)** Deux systèmes de conjugaison "ubiquitin-like" (UBL), **ATG12 et LC3**, sont requises à la conjugaison de LC3 au lipide phosphatidyl-ethanolamine (PE) à la membrane de l'autophagosome naissant (**LC3-PE** ou **LC3-II**). **(E)** Enfin, les autophagosomes complètement formés se déplacent le long du réseau de microtubules et peuvent éventuellement fusionner avec un lysosome (:**autophagolysosome**). Une fois que le contenu de la vésicule et que la membrane interne est dégradée par les hydrolases acides, les molécules qui en résultent (acides aminés, lipides, etc.) sont recyclés dans le cytoplasme par des perméases membranaires.

ATG : AuTophagy-related – UBL : Ubiquitin-like - VMP1 : Vacuole Membrane Protein 1

Figure adaptée de : Tamargo-Gomez et al, 2018, Int. J. Mol. Sci.

(Short *et al.*, 2010). Enfin, l'AMPK peut causer un arrêt du cycle en phase G1 **indépendamment** de l'activation de la kinase **LKB1**. En effet, dans différentes lignées tumorales LKB1-déficientes, il a été montré que l'activation de la CaMKK β par ajout de calcium induisait également un arrêt du cycle cellulaire en G1 (Fogarty *et al.*, 2016). Cet effet est AMPK-dépendant mais ne dépend en revanche pas de l'expression de P21 et P27, qui reste inchangée.

En plus de ses effets sur les acteurs du cycle cellulaire, l'AMPK impacte indirectement la prolifération cellulaire en **inhibant la synthèse protéique**, nécessaire à la division. Dans des conditions pauvres en nutriment, l'AMPK phosphoryle TSC2, ce qui conduit à l'inactivation de mTOR par la régulation de la petite GTPase RHEB (Bolster *et al.*, 2002). En parallèle, l'AMPK est capable de phosphoryler **Raptor**, une unité du complexe mTORC1. Ceci inactive ce complexe et induit une inhibition de la traduction protéique et du cycle cellulaire (Gwinn *et al.*, 2008). Enfin, l'AMPK limite la synthèse des protéines en inhibant EF2 (*Elongation factor 2*) (Horman *et al.*, 2002).

3.2. Effets sur l'autophagie

L'autophagie est un **processus catabolique** intracellulaire bien conservé dans toutes les cellules nucléées, qui aboutit à la dégradation lysosomale d'organelles intracellulaires (mitochondries altérées, fragments de ribosomes) ou bien de complexes protéiques de grandes tailles. Bien que la dégradation autophagique soit constitutivement active à un niveau basal, l'inducteur physiologique principal de l'autophagie est la pénurie de nutriments ou d'énergie (Tamargo-Gómez and Mariño, 2018). Il existe au moins trois types différents d'autophagies : la micro-autophagie, l'autophagie médiée par des chaperonnes et la **macro-autophagie**. Cette dernière est la **forme principale** d'autophagie et son appellation est souvent simplifiée par le terme **autophagie**, que nous utiliserons dès lors.

Le processus de l'autophagie commence avec la formation d'une membrane, le **phagophore**, qui s'allonge pour former des vésicules à double-membrane appelées **autophagosomes**. Ces derniers séquestrent du contenu cytoplasmique (de manière spécifique ou non-spécifique) et navigue via le réseau de microtubules pour fusionner avec des **lysosomes**. Cette fusion crée un **autophagolysosome** dans lequel le contenu séquestré ainsi que de la membrane interne de l'autophagosome sont **dégradés** (*Figure 31*). Les produits relargués par cette dégradation (lipides, AA, nucléotides) sont alors recyclés dans le cytoplasme et utilisées pour la synthèse de nouvelles molécules.

D'un point de vue moléculaire, l'autophagie nécessite la participation d'un groupe de protéines très conservées appelées **les ATG** (*AuTophagy-related proteins*), décrites initialement chez la levure. Ces protéines sont impliquées dans les différentes étapes de l'autophagie de manière séquentielle et coordonnées, et sont utiles à la formation, la maturation, le transport et la dégradation des autophagosomes (Koyama-Honda *et al.*, 2013). Dans les cellules mammifères, la biogénèse des autophagosomes requiert l'activité combinée de **deux**

complexes protéiques qui sont le complexe **ULK1/2** (*Unc-51 Like Autophagy Activating Kinase 1 et 2*) et le complexe **PI3K de classe 3/VPS34** (*Vacuolar Protein Sorting 34*)/**Beclin-1**, régulés par mTOR. Ils sont recrutés aux sites de formation des autophagosomes et permettent le recrutement de protéines nécessaires à la biogénèse de cette vésicule (Chan *et al.*, 2007). Les protéines ULK sont des sérines-thréonines kinases orthologues des protéines ATG1 chez la levure. L'**élongation** et la **fermeture** des autophagosomes nécessitent l'intervention de deux complexes de conjugaison, dits « *ubiquitin-like* » : **ATG12** et **LC3**, impliquant la participation de cystéines protéinases (ATG7, ATG10, ATG3). L'activité de ces deux systèmes, en coordination, est requise pour **conjuguer LC3 au lipide PE** (Phosphatidyl-Ethanolamine) (*Figure 31*). LC3-PE, appelé **LC3-II**, est associé à la fois aux membranes externes et internes des autophagosomes matures et joue une fonction structurale qui permettrait l'élongation de l'autophagosome mature. La fusion avec le lysosome et l'étape de dégradations sont quant à elles dépendantes de **LAMP-2** et **Rab-7** (RAS-Associated Protein 7) (Jäger *et al.*, 2004).

Chez l'Homme, les deux principaux régulateurs de l'autophagie sont les kinases **mTOR** (*mechanistic/mammalian target of rapamycin*) et **AMPK** (Kim *et al.*, 2011). mTOR peut faire partie de deux complexes différents : mTORC1 ou mTORC2. Ce dernier n'intervient que très peu dans la régulation de l'autophagie. En revanche, **mTORC1**, actif naturellement lorsque la cellule contient beaucoup de nutriments et d'énergie, est considéré comme un **suppresseur majeur** de l'autophagie (Hardie, 2011). L'**AMPK** quant à elle joue un rôle antagoniste en **régulant positivement** l'autophagie, ce qui concorde avec ses fonctions pro-cataboliques. Les deux voies sont alors étroitement connectées, et l'**inhibition de mTORC1** est le mécanisme principal par lequel l'AMPK induit l'autophagie.

Lorsque les facteurs de croissance et autres acides aminés sont abondant, mTORC1 peut réprimer la formation des autophagosomes par phosphorylation inactivatrice d'ATG13, qui inhibe l'activité du complexe ULK1, ou directement en ciblant ULK1 lui-même (Puente *et al.*, 2016). Au contraire, en réponse à des stimuli pro-autophagiques, l'AMPK augmente l'activité de **ULK1** par phosphorylation de la thréonine 574 et des sérines 467, 555 et 637, induisant par conséquent le recrutement des protéines ATG et la formation des autophagosomes (Egan *et al.*, 2011). De plus, l'AMPK bloque l'effet inhibiteur de mTORC1 sur ULK1, en **inhibant l'activité de mTORC1** par deux moyens : la **phosphorylation de TSC2** sur les thréonines 1227 et 1345 qui favorise l'assemblage de TSC1/2 et stimule son activité GTPasique sur Rheb (Hardie, 2011), et **celle de RAPTOR** sur les sérines 722 et 792 qui entraîne sa dissociation du complexe mTORC1 (Gwinn *et al.*, 2008).

En plus de la régulation de ULK1, l'AMPK est également impliquée dans celle du complexe **PI3K de classe 3/VPS34**. Premièrement, comme ULK1 exerce lui-même une action positive sur les membres de ce complexe comme Beclin-1, AMBRA1 ou directement sur la sous-unité catalytique VPS34 (Russell *et al.*, 2013), l'AMPK induit indirectement l'activation de ce complexe *via* l'activation de ULK1. mTORC1 peut également inhiber la biogénèse de l'autophagosome *via* la **phosphorylation inhibitrice** de **ATG14**, un composant essentiel du

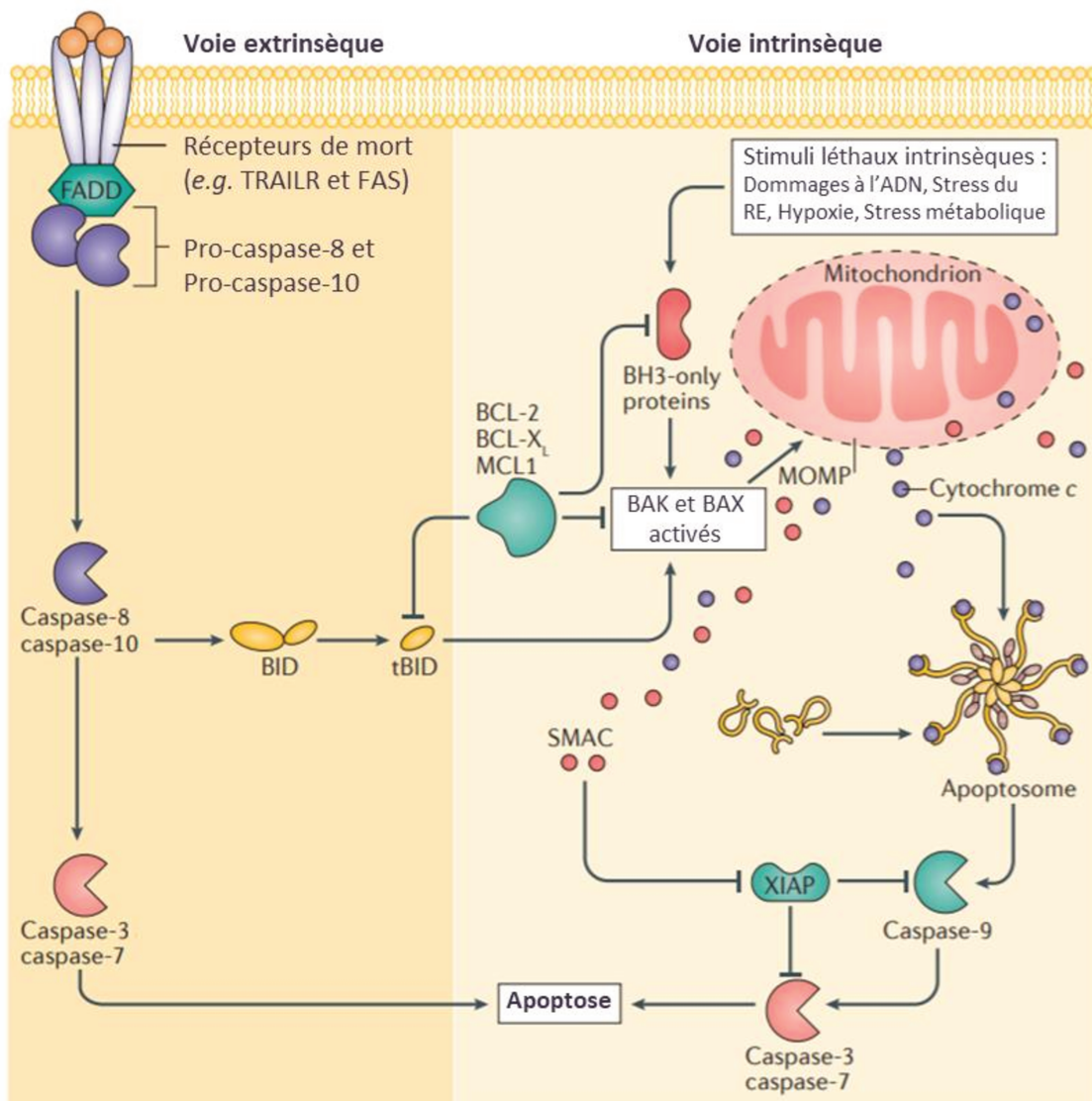


Figure 32 : Voies extrinsèques et intrinsèques de l'apoptose

Dans la voie apoptotique extrinsèque, après la fixation de leurs ligands, les récepteurs de l'apoptose (TRAILR (*Tumor-Necrosis-Factor Related Apoptosis Inducing Ligand Receptor*) ou Fas) peuvent activer les caspases initiatrices (Caspases 8 et 10) au travers la dimérisation de certaines protéines telles que FADD (*Fas-Associated Protein With Death Domain*). Les caspases 8 et 10 actives vont activer les caspases effectrices 3 et 7, conduisant à l'apoptose. La voie mitochondriale intrinsèque (ou mitochondriale) induit la perméabilisation de la membrane externe de la mitochondrie (MOMP). Les cellules stressées activent les protéines de la famille BH3-only protein (Bcl-2 Homology 3 Domain), qui conduisent à l'activation de BAX (Bcl-2 Associated X) et de BAK (Bcl-2 Homologous Antagonist Killer) qui ciblent les MOMP. De ce fait, les protéines SMAC et cytochrome c sont libérées dans le cytoplasme. Le cytochrome c interagit avec APAF-1, ciblant l'assemblage de l'apoptosome et l'activation de la caspase 9. La caspase 9 activée induit l'activation de la caspase 3 et de la caspase 7, conduisant à l'apoptose. De plus, la libération de SMAC facilite l'apoptose en bloquant XIAP (X-Linked Inhibitor Of Apoptosis Protein).

Figure adaptée de : Ichim et Tait, 2016, Nat. Review

complexe VPS34 (Park *et al.*, 2016). L'inhibition de mTORC1 par l'AMPK reverse encore une fois ce phénomène. De plus, l'AMPK phosphoryle directement des sous-unités du complexe PI3KC3/VSP34, dont VPS34 lui-même, ce qui modifie **leur affinité** pour les autres composants du complexe (Kim *et al.*, 2013). Par exemple, la phosphorylation de **Beclin-1** sur la Thr388 augmente sa liaison à VPS34 et ATG14, ce qui augmente l'activité autophagique de la cellule après élimination du glucose.

En dehors de la régulation des deux complexes majeurs, l'AMPK peut également phosphoryler ATG9 en Ser761. La phosphorylation d'ATG9 favorise le recrutement de vésicules contenant ATG9 à des autophagosomes LC3-positifs, améliorant ainsi l'élongation des autophagosomes (Weerasekara *et al.*, 2014). Plus récemment, il a été montré que l'AMPK était également nécessaire à la fusion entre les autophagosomes et les lysosomes (Jang *et al.*, 2018).

Pour finir, rappelons que même si l'autophagie est avant tout un mécanisme de défense et de survie cellulaire, ce processus reste étroitement lié à la mort cellulaire. Dans certains cas, c'est une étape intermédiaire avant l'apoptose ou la nécrose. Dans d'autres contextes, l'autophagie peut conduire directement à la **destruction de la cellule** devenue non fonctionnelle dans un élan « d'auto-cannibalisme cellulaire ». Ce processus est appelé « mort autophagique », et est indépendante de l'activation des caspases (Maiuri *et al.*, 2007).

3.3. Effets sur l'apoptose

Le phénomène de l'**apoptose** a été décrit pour la première fois dans les années 1970 par Kerr et ses collègues pour décrire une mort cellulaire différente de la nécrose (Kerr *et al.*, 1972). L'apoptose est une forme active d'autodestruction qui résulte de la réaction de l'organisme à des stimuli physiologiques ou pathologiques. On dit donc de l'apoptose que c'est une **mort cellulaire programmée**, nécessaire à la survie de l'organisme. Ce mécanisme permet en effet d'éliminer les cellules endommagées ou toxiques tout en préservant les tissus alentours, afin de maintenir l'intégrité de l'organisme (Green, 1998). Ainsi, lorsque l'ADN d'une cellule est endommagé et que les mécanismes cellulaires spécifiques ne parviennent pas à réparer les dommages, la cellule est détruite par apoptose pour éviter qu'elle ne devienne cancéreuse.

L'apoptose peut donc se déclencher sous l'influence de **facteurs internes** à la cellule comme le stress ou les dommages à l'ADN (**voie intrinsèque**) ou de **stimuli externes** qui se manifestent par la présence de cytokines/ligands solubles dans le milieu extracellulaire (**voie extrinsèque**) (Figure 32). Dans ce dernier cas, la liaison des facteurs solubles aux récepteurs de mort FAS (First Apoptosis Signal Receptor), TRAILR (*Tumor-necrosis-factor Related Apoptosis Inducing Ligand Receptor*) ou TNFR (*Tumor Necrosis Factor Receptor*) déclenchent l'apoptose (Ichim and Tait, 2016; Wang and Su, 2018). L'activation des voies intrinsèques et extrinsèques converge vers l'inhibition de la protéine mitochondriale **anti-apoptotique Bcl-2** et/ou l'activation des **protéines pro-apoptotiques BAX** (*Bcl-2-associated X*) et **BAK** (*Bcl2-Antagonist/Killer*). Cela induit l'activation d'une cascade de protéines responsables de la formation de pores dans la membrane externe de la

mitochondrie, et la libération de facteurs pro-apoptotiques tels que le **cytochrome c** ou Smac/DIABLO (*Second mitochondria-derived activator of caspase/Direct Inhibitor Of Apoptosis- Binding Protein With Low pI*). In fine, les voies extrinsèques et intrinsèques de l'apoptose aboutissent à l'activation des **caspases** (protéases à cystéine) qui vont modifier et activer certaines enzymes telles que des endonucléases. Ces dernières vont alors provoquer la **fragmentation de l'ADN**, spécifique d'une mort par apoptose.

Plusieurs éléments montrent que l'activation de la voie AMPK peut mener à l'apoptose des cellules. Tout d'abord, le stress métabolique provoqué par la privation de glucose dans les thymocytes favorise l'induction transcriptionnelle et la **phosphorylation AMPK-dépendante de p53** sur la sérine 46 qui joue un rôle crucial dans l'induction de l'apoptose (Okoshi *et al.*, 2008). Une autre étude a montré que l'AICAR pouvait induire de manière AMPK-dépendante l'apoptose dans des adipocytes suite à la phosphorylation d'eIF2a (*Eukaryotic Initiation Factor 2A*) (Dagon *et al.*, 2006).

Par ailleurs, l'étude de composés dits « naturels » ou **phytochimiques**, dont un certain nombre est capable d'induire l'activation de l'AMPK, a mis en avant d'autres moyens de régulation de l'apoptose par la kinase. Ainsi, le **Resveratrol** induit dans des cellules cancéreuses de colon la génération de ROS et l'activation de la voie AMPK, qui va mener à l'apoptose des cellules (Hwang *et al.*, 2007). Une autre équipe montre ensuite dans une lignée de leucémie que cet effet est lié à l'induction de l'autophagie par la voie LKB1-AMPK-mTOR qui va elle-même induire **l'augmentation du ratio Bax/Bcl2 et des caspases clivées**, marqueurs de l'apoptose (Fan *et al.*, 2018). D'autre part, le **curcumin** induit l'apoptose dans les cellules cancéreuses de colon suite à l'activation de la voie AMPK et aux conséquentes inhibitions de **COX2** (*Cyclooxygenase-2*) et d'**Akt**, deux protéines anti-apoptotiques/pro-survie (Lee *et al.*, 2009). Toujours dans ce modèle de cancer, le **Magnolol** est capable de diminuer l'expression de la protéine anti-apoptotique Bcl-2 et d'augmenter celle de la protéine pro-apoptotique p53 de manière AMPK-dépendante, et de provoquer ainsi l'apoptose des cellules (Park *et al.*, 2012).

Enfin, plusieurs études ont montré dans plusieurs cancers que les **effets apoptotiques** de la **Metformine** de manière AMPK-dépendante (Liu *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2008; Wu *et al.*, 2011). L'étude de Wu et ses collaborateurs montre dans des cellules cancéreuses de poumon que l'activation de l'AMPK par la Metformine provoque une apoptose dépendante de l'activation de la **voie JNK/p38-MAPK** et de l'augmentation de l'expression de **GADD153** (Growth Arrest and DNA Damage inducible gene 153), aussi appelé CHOP.

La **kinase AMPK**, avec ses multiples cibles, régule de très nombreux **processus cellulaires**. Il n'est donc pas vraiment étonnant que son rôle dans le cancer soit controversé (Vara-Ciruelos *et al.*, 2020). Agissant comme un **suppresseur de tumeurs** dans de nombreux cancers, il peut aussi **accélérer la progression** de la tumeur dans certaines situations. Les altérations divergentes des protéines impliquées dans la voie AMPK dans les cancers montrent également le rôle potentiellement **ambivalent** de cette voie. Cependant, de nombreux **activateurs** de l'AMPK tels que l'AICAR, la Phenformine ou encore la Metformine ont montré dans des

contextes variés leur **potentiel anticancéreux** ; pointant du doigt le rôle plutôt **antitumoral** de l'AMPK et l'intérêt du ciblage de cette molécule dans le cancer.

4. Effets de la Metformine dans le cancer : de la cellule cancéreuse à son environnement

La Metformine, en tant qu'anti-diabétique, peut agir sur les cellules cancéreuses *via* deux grands modes d'action : des **effets indirects** dus à la présence d'insuline et d'IGF circulants et des **effets directs** par les voies de signalisation qu'elle touche. Les effets indirects sont principalement dus au fait que l'insuline et les IGF (*Insulin Growth Factor*) circulants favorisent la prolifération des cellules tumorales et la tumorigénèse (Yee, 2006). Par sa capacité à diminuer l'insuline circulante chez les patients, la Metformine empêche donc ce phénomène. Cet aspect ne sera pas plus développé ici.

4.1. Effets directs de la Metformine sur les cellules cancéreuses

Les effets de la Metformine sur les cellules cancéreuses passent bien-sûr beaucoup par **l'activation de la voie de l'AMPK**, mais ils peuvent aussi être **indépendants** de cette voie.

4.1.1. Effets de la Metformine dans le cancer

À la suite des études rétrospectives sur la Metformine menées par *Evans* dans les années 2000, de nombreux laboratoires à travers le monde ont étudié les mécanismes d'actions de ce médicament dans différents types de cancers. Les effets *in vitro* de la Metformine, seule ou en combinaison avec des traitements existants, ont donc été étudiés entre autres dans le cancer du sein, de la prostate (Aljada and Mousa, 2012; Ben Sahra *et al.*, 2008; Roos *et al.*, 2019; Valtorta *et al.*, 2017). De nombreuses études réalisées chez la souris dans le cancer du sein, du pancréas, du poumon ou encore dans l'ostéosarcome *in vivo* montrent que cette molécule peut induire une diminution du volume tumoral *in vivo* (Ko *et al.*, 2016; Li *et al.*, 2017b; Yousef and Tsiani, 2017; Zhang *et al.*, 2018a).

Les effets de la Metformine dépendants de l'AMPK sont médiés par l'activation de la voie de signalisation **LKB1/AMPK** (Bost *et al.*, 2012; Ikhlas and Ahmad, 2017) qui va avoir pour cible plusieurs processus biologiques importants. Tout d'abord, comme cela a été évoqué précédemment, l'activation de l'AMPK va provoquer celle de p53 et induire un **arrêt du cycle en phase G1** ainsi que l'augmentation des acteurs **pro-apoptotiques** p21 et Bax. L'apoptose peut également être induite via l'induction du facteur de transcription **FOXO3** (*Forkhead Box O3*) qui lui-même agit sur les facteurs apoptotiques FAS ligand, Bim ou Bcl-xL (Fu and Tindall, 2008). L'AMPK, via son action sur **ULK1**, va être également capable d'induire l'autophagie des cellules tumorales. De manière assez originale, il a également été montré que la Metformine pouvait induire dans les cellules cancéreuses mammaires l'expression de **DICER**, une protéine impliquée dans

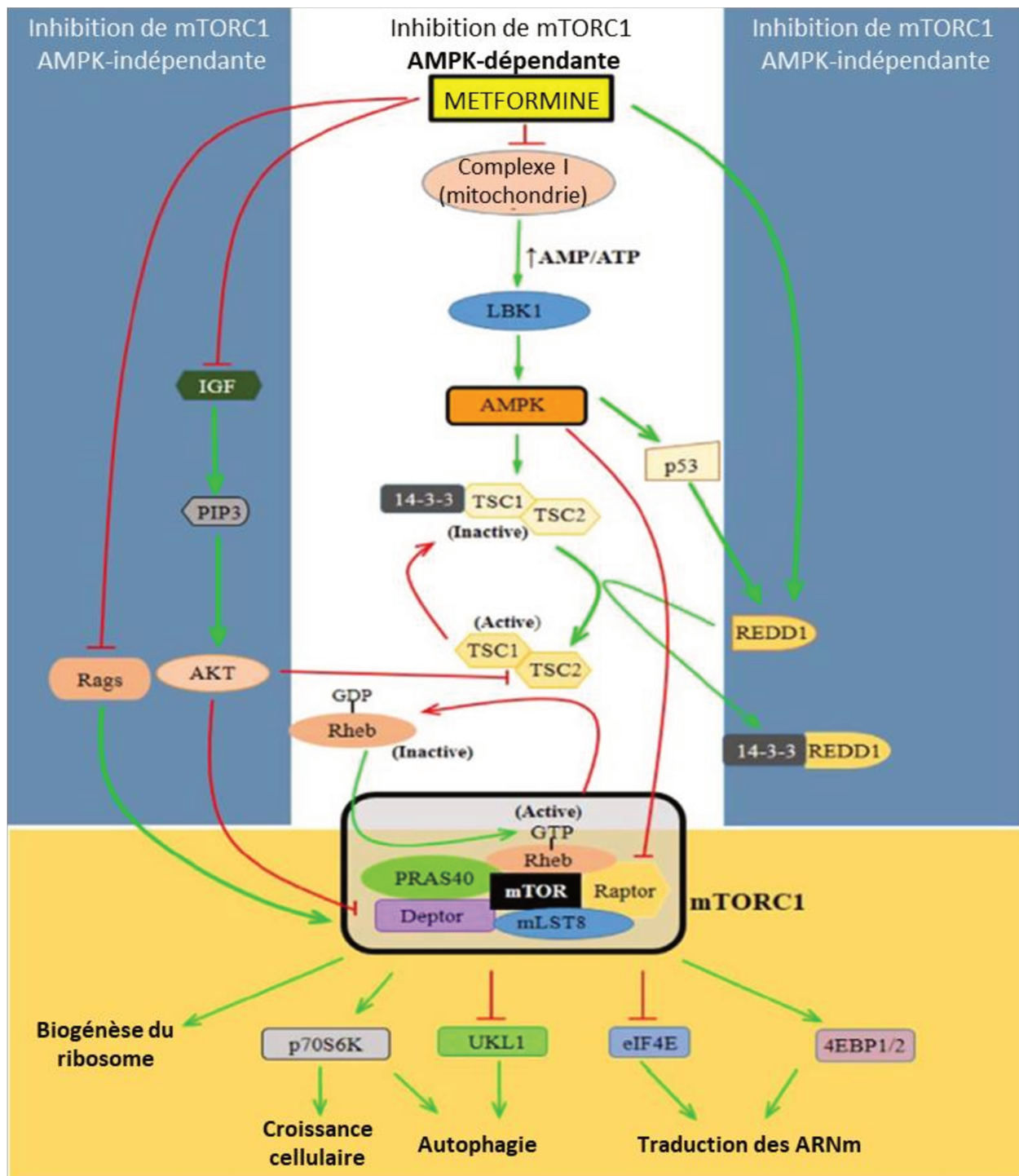


Figure 33 : Inhibition de mTORC1 par la Metformine

L'inhibition du complexe mTORC1 par la Metformine dépend en partie de l'activation de la voie AMPK et en partie d'autres mécanismes tels que l'activation de la protéine REDD1 ou l'inhibition des GTPases RAG. L'inhibition de mTORC1 par la Metformine permet l'arrêt de croissance cellulaire ou de la synthèse des protéines (inhibition de la traduction et de la biogénèse du ribosome), ou encore l'induction de l'autophagie.

AMP : Adenosine monophosphate - **ATP** : adenosine triphosphate - **LKB1** : liver kinase B1 - **TSC1/2** : tuberous sclerosis 1/2 - **GTP** : guanosine triphosphate - **GDP** : guanosine diphosphate - **Rheb** : Ras homolog enriched in brain - **mTOR** : mammalian target of rapamycin - **RAPTOR** : regulatory-associated protein of mTOR - **mLST8** : mammalian lethal with SEC13 protein 8 - **DEPTOR** : DEP domain-containing mTOR-interacting protein - **PRAS40** : proline-rich Akt substrate of 40 kDa - **REDD1** : regulated in development and DNA damage responses - **14-3-3** : 14-3-3 protein - **IGF** : insulin-like growth-factor - **PIP3**:phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate - **AKT** : protein kinase B - **Rags** : recombination-activating genes - **p70S6K** : ribosomal p70S6 kinase - **UKL1** : uridine kinase-like protein 1 - **eIF4E** : eukaryotic translation initiation factor 4E - **4EBP1/2** : eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1/2 .

le mécanisme des ARN interférents (siRNA) (Blandino *et al.*, 2012). Cette induction provoque alors la diminution de l'expression de certains acteurs importants tels que **c-Myc** (proto-oncogène) ou **HIF-1 α** impliqué dans les mécanismes de résistance aux thérapies.

Enfin, l'activation de l'AMPK par la Metformine provoque **l'inhibition de mTORC1** qui régule la croissance cellulaire et la prolifération en contrôlant la biogénèse ribosomale, la traduction des ARNm et le métabolisme. Le complexe mTORC1 est composé de DEPTOR (*DEP domain-containing mTOR interacting protein*), de mLST8 (*mammalian LST8/G-Protein β -Subunit Like Protein*), de RAPTOR (*Regulatory-Associated Protein Of mTOR*), de PRAS40 (*Proline-Rich AKT Substrate of 40 kDa*) et de **mTOR** (*mammalian Target Of Rapamycin*), qui est généralement surexprimé dans les cellules malignes et associé à une résistance aux thérapies anti-cancéreuses. La Metformine est capable d'inhiber le complexe mTORC1 à travers plusieurs moyens, dont les plus directs sont l'activation de TSC1/2 ou l'inhibition de Raptor par l'AMPK (*Figure 33*). Par ce moyen, le Metformine empêche donc la croissance, la prolifération et même l'angiogenèse dans différents modèles de cancers (Liao *et al.*, 2012).

Parallèlement, les effets **AMPK-indépendants** de la Metformine ne sont pas négligeable dans le mode d'action de la molécule (Ikhlas and Ahmad, 2017). Tout d'abord, mTORC1 peut également être inhibé par la Metformine de manière indépendante à l'AMPK (*Figure 33*). Une étude a en effet montré que la Metformine et la Phenformine pouvaient inhiber mTORC1 *via* son action **inhibitrice** sur les **GTPases RAG** (*Recombinant Activating Gene*) (Kalender *et al.*, 2010). Une fois activées par le complexe Ragulator, les GTPases RAG recrutent mTORC1 à la surface des lysosomes où celui-ci est activé par RHEB (*Ras Homolog Enriched In Brain*). D'autre part, on sait que la Metformine limite la sécrétion d'insuline et d'IGF-1. Or, en réponse à ces éléments, la sérine/thréonine **kinase AKT** est activée par la phosphatidyl-inositol-3 kinase (PI3K). A son tour, AKT phosphoryle TSC2, ce qui induit l'inhibition de mTORC1 (Cai *et al.*, 2006). Dans le cancer de la prostate, il a été montré que la Metformine pouvait induire la mort des cellules cancéreuses *via* l'activation de la voie **p53/REDD1** (*Regulated In Development And DNA Damage Responses 1*), conduisant également à l'inhibition de mTORC1 *via* TSC2 (Ben Sahra *et al.*, 2011).

Enfin, indépendamment de l'inhibition de mTORC1, la Metformine supprime l'expression de nombreux gènes impliqués dans la **division cellulaire** (tubuline, histones, etc) (Oliveras-Ferraro *et al.*, 2009), induit la **voie de réparation des dommages à l'ADN** grâce à l'activation d'ATM (*Ataxia Telangiectasia Mutated*) (Vazquez-Martin *et al.*, 2011), ou encore inhibe les facteurs de transcription ATF4 et XBP1 de la voie de l'**UPR** (*Unfolded Protein Response*), provoquant ainsi l'apoptose des cellules tumorales en cas de privation de glucose (Saito *et al.*, 2009).

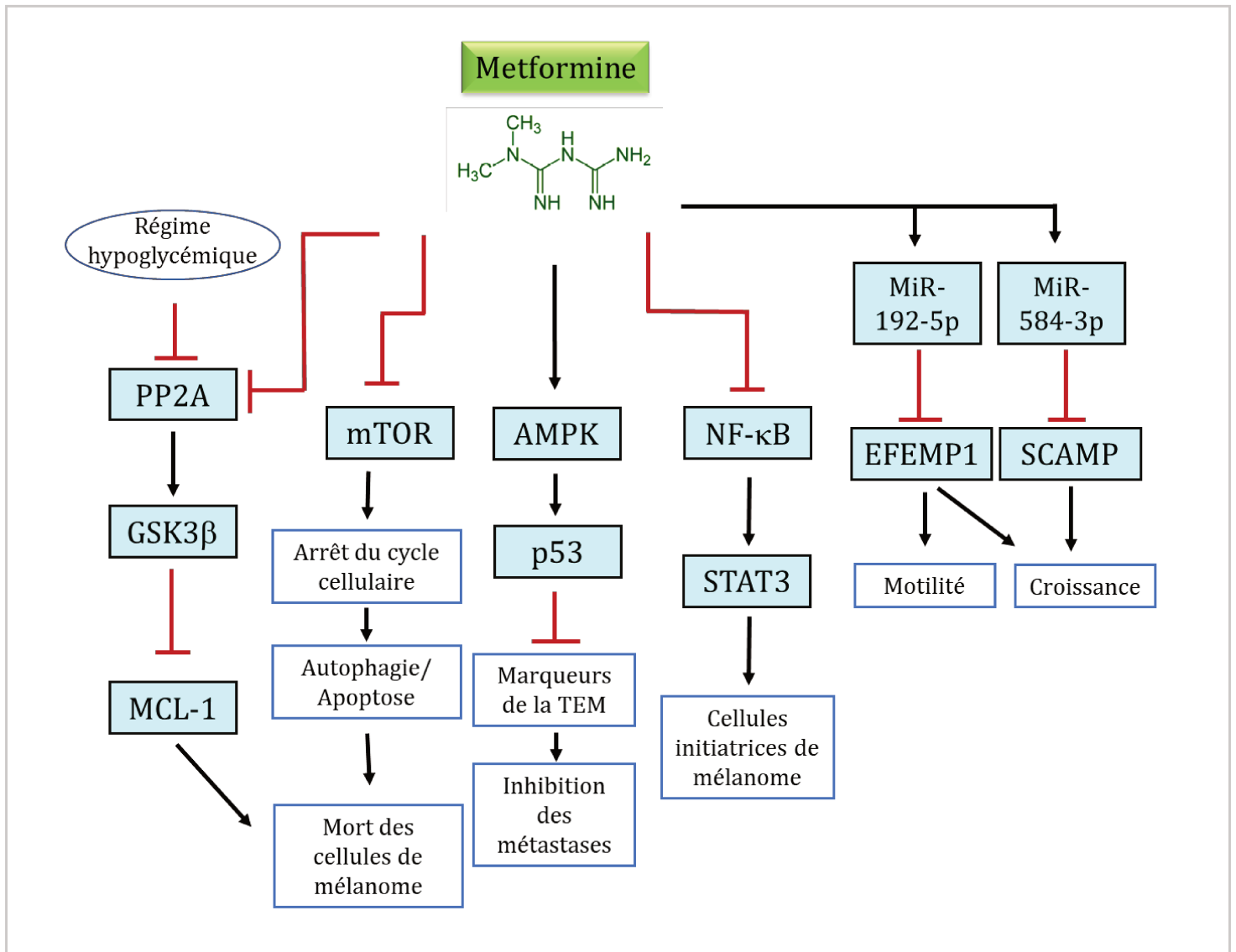


Figure 34 : Effets de la Metformine sur les cellules de mélanome

Dans les cellules de mélanome, la **Metformine** peut inhiber mTOR indépendamment de l'activation de l'AMPK et induire un arrêt du cycle cellulaire, de l'autophagie et ensuite la mort des cellules de mélanome. Cette molécule peut également induire la mort en combinaison d'un régime hypoglycémique, via l'activation de la kinase GSK3β et l'inhibition de la protéine pro-survie MCL-1. En parallèle, la metformine active l'axe AMPK/p53 qui entraîne l'inhibition du potentiel métastatique des cellules de mélanome. La motilité de ces cellules peut également être inhibée par l'induction de micro-ARNs particuliers. Enfin, la metformine induit l'inhibition de la voie de signalisation NF-κB/STAT3 ce qui inhibe les cellules initiatrices de mélanome.

4.1.2. Effets de la Metformine dans le mélanome

L'effet antitumoral de la Metformine a été particulièrement étudié dans le **mélanome**, pour lequel près de cinquante pourcents des patients ne bénéficient toujours pas de thérapies efficaces à long-terme. Dans ce contexte, de nombreux laboratoires ont montré que la **Metformine** ainsi que d'autres **activateurs de l'AMPK** (AICAR, Phenformine) étaient capables **d'inhiber la prolifération** des **cellules cancéreuses** de mélanome (Li *et al.*, 2018; Petti *et al.*, 2012; Tomic *et al.*, 2011; Yuan *et al.*, 2013b).

Notre laboratoire a montré que la Metformine induisait dans le temps un **arrêt du cycle cellulaire** en phase G0-G1 (24H de traitement), puis une induction de l'**autophagie** (72H) et enfin l'**apoptose** (96H) des cellules de mélanome (Tomic *et al.*, 2011). Dans cette étude, le mécanisme moléculaire aboutissant à l'arrêt du cycle n'a pas été identifié. Dans le cancer de la prostate, l'arrêt du cycle induit par la Metformine est provoqué par l'inhibition de la **cycline D1** et la déphosphorylation de la **protéine Rb** (Ben Sahra *et al.*, 2008). Dans le modèle de mélanome (Tomic *et al.*, 2011), l'induction de la mort des cellules par apoptose semble être une **conséquence de l'autophagie** prolongée. De plus, l'inactivation de l'AMPK (inhibiteur pharmacologique ou siARN) montre une **inhibition partielle** des effets sur la mort des cellules de mélanome. Les mécanismes de mort induits par la Metformine sont donc à la fois **dépendants et indépendants de l'AMPK**. Enfin, cette molécule induit une diminution du volume tumoral dans un modèle de xéno-greffes de souris. Une autre étude dans un modèle murin de mélanome a montré que la Metformine induit un arrêt du cycle, une autophagie et une apoptose de manière **p53-dépendante** (Janjetovic *et al.*, 2011). De manière intéressante, il a également été montré au laboratoire que la Metformine était capable d'inhiber les **capacités invasives** des cellules de mélanome (Cerezo *et al.*, 2013). Ainsi, l'expression des facteurs impliqués dans la **pseudo-transition épithélio-mésenchymateuse** (TEM) (Slug, Snail, N-cadhérine) était inhibé par la molécule. Le mécanisme lié aux effets anti-invasifs observés est **AMPK/p53-dépendant**. Plus récemment, une équipe a montré que la Metformine pouvait inhiber la croissance et la **motilité** des cellules de mélanome *via* la surexpression de microARNs particuliers (Tseng *et al.*, 2019). Ces derniers ciblent des gènes comme SCAMP3 (*Secretory carrier membrane proteins*) et EFEMP1 (*(EGF) containing fibulin-like extracellular matrix protein 1*) impliqués dans la croissance cellulaire et la motilité. Les effets de la Metformine sur les cellules de mélanome sont résumés sur la *Figure 34*.

La Metformine pourrait jouer un rôle sur les **cellules initiatrices de mélanome** (MIC : *Melanoma Initiating Cells*). Ces cellules, qui possèdent certaines caractéristiques et marqueurs de cellules souches, ont été identifiées dans des tumeurs de mélanome et participent à l'hétérogénéité de ces dernières. Elles pourraient être responsables du **potentiel métastatique** de la tumeur mais également de la résistance à certaines thérapies (Zabierowski and Herlyn, 2008). Une équipe a montré que l'activation de la voie de signalisation STAT3 (*Signal Transducer and Activator of Transcription 3*) était nécessaire à l'acquisition de ces « propriétés MIC » (Ohanna *et al.*, 2013). De façon intéressante, une autre équipe a montré la même année que la Metformine bloque la voie NF- κ B (*Nuclear Factor-kappa B*) et la phosphorylation de STAT3 dans les cellules cancéreuses aux propriétés de cellules souches (Hirsch *et al.*, 2013). De même, il a été observé dans notre laboratoire une diminution du

nombre de cellules exprimant des marqueurs MIC (tels que JARID1, CD271 ou Notch1) après traitement à la Metformine (*résultats non publiés*) (Figure 34).

Enfin, il a été montré beaucoup plus récemment dans un modèle de xéno greffe de mélanome qu'un jeûne intermittent des souris avec un **régime hypoglycémique/normoglycémique** améliorerait considérablement l'effet antitumoral de la Metformine, uniquement lorsque cette dernière était administrée pendant la période d'hypoglycémie (Elgendy *et al.*, 2019). L'effet observé est dû à une **activation** de la **kinase GSK3 β** (*Glycogen Synthase Kinase 3*) qui induit la diminution de la protéine pro-survie MCL-1 (*Myeloid Cell Leukemia-1*). L'activation de GSK3 β est la résultante d'une inhibition de la **PP2A** (phosphatase inhibant elle-même GSK3 β) par deux mécanismes distincts induits par la Metformine et le faible niveau de glucose.

Des études pré-cliniques **de combinaisons entre la Metformine et d'autres traitements** ont été effectuées. Ainsi, le traitement de plusieurs lignées cellulaires de mélanome avec de la Metformine en combinaison avec du Vemurafenib a montré des résultats encourageants avec un effet antitumoral synergique des deux molécules dans 6 sur 11 des lignées testées (Niehr *et al.*, 2011). Il a également été observé que la Metformine augmentait la cytotoxicité du cisplatine dans les cellules de mélanome (Hirsch *et al.*, 2013; Janjetovic *et al.*, 2011). Enfin, deux autres études, plus récentes, sur la combinaison de la Metformine avec un inhibiteur de Erk (Trousil *et al.*, 2017) ou avec de la thérapie photodynamique (Tudor *et al.*, 2017) décrivent également une efficacité anti-mélanome importante. Les combinaisons de dérivés de biguanides avec les **immunothérapies** seront évoquées dans le *paragraphe 4.2*.

Aujourd'hui, plus de 300 essais cliniques ont été/sont menés pour tester l'efficacité de la Metformine dans différents cancers (<https://clinicaltrials.gov/ct2/results>), dont certains dans le cadre du mélanome. L'un de ces essais a été réalisé au service de dermatologie du CHU de Nice (NCT01840007). Il visait à évaluer l'efficacité de la Metformine seule chez les patients atteints de mélanome métastatiques en échec thérapeutique suite à un traitement par chimiothérapie/thérapies ciblées et qui n'était pas éligibles (ou ne répondaient pas) aux immunothérapies (Montaudié *et al.*, 2017). Les résultats de cette étude pilote, effectuée sur 17 patients âgés de 74 ans en moyenne, n'ont pas vraiment été encourageants. Ils montrent que l'utilisation de la **Metformine** à une dose correspondant à celle donnée aux patients diabétiques **n'induit pas d'efficacité significative** chez les patients atteints d'un mélanome métastatique. Le stade avancé du mélanome chez ces patients en échec thérapeutique et la faible biodisponibilité de la molécule sont des éléments qui pourraient expliquer ce résultat. Il serait donc intéressant de tester la Metformine ou un autre dérivé de biguanide possédant de meilleures caractéristiques pharmacologiques à un stade plus précoce de la maladie.

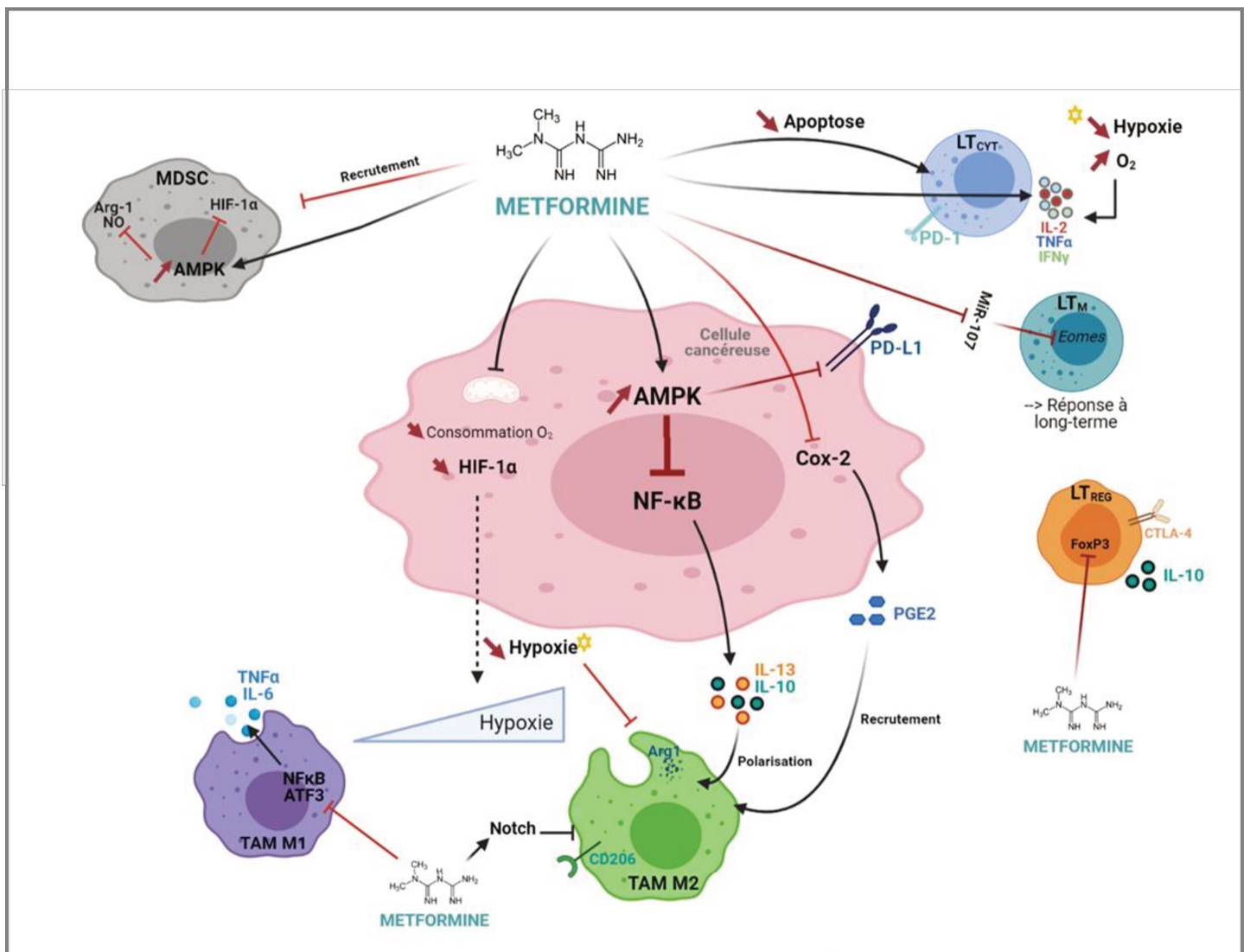


Figure 35 : Effets de la Metformine sur les cellules immunitaires du microenvironnement tumoral

Les effets de la **Metformine** sur les cellules du microenvironnement tumoral peuvent être à la fois **directs** ou **indirects**. Par son action inhibitrice sur la phosphorylation oxydative, elle permet de réduire le niveau d'hypoxie environnemental, ce qui va améliorer la fonction des lymphocytes T cytotoxiques (LT_{CYT}) ou encore empêcher la polarisation des macrophages (TAM) vers un type M2. Dans la cellule cancéreuse toujours, elle va avoir un effet **anti-inflammatoire**, qui peut avoir un rôle sur le recrutement de certaines cellules telles que les macrophages M2. L'activation de l'**AMPK** provoque également la dégradation de **PD-L1** qui ne sera plus présenté à la membrane de la cellule et n'inhibera plus la fonction du LT via le **récepteur PD-1**. Parmi ses effets directs sur les cellules myéloïdes, la Metformine peut inhiber la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires des macrophages M1, mais elle peut **aussi bloquer la polarisation** des M2 via la réactivation de la **voie Notch**. Elle inhibe également le recrutement des **MDSC** (*Myeloid-Derived Suppressor Cells*) dans la tumeur. Du côté des lymphocytes, la Metformine peut favoriser la génération de **lymphocytes T mémoires** (LT_M) et améliorer la sécrétion des cytokines antitumorales IFN-γ et TNF-α. Elle a également un effet inhibiteur direct sur **les lymphocytes T régulateurs** (LT_{REG}) *via* l'inhibition du facteur de transcription FoxP3.

4.2. Effets de la Metformine dans la réponse immunitaire antitumorale

De nombreuses études *in vivo* dans différents types de cancers, comme évoqué précédemment, ont prouvé que les dérivés de la famille des biguanides, et en particulier la Metformine, avaient un réel **potentiel antitumoral**. Le rôle de la Metformine dans **l'inhibition de la prolifération** et **l'induction de la mort** des cellules cancéreuses explique **en partie** les effets observés *in vivo*. Cependant, de plus en plus d'études montrent que la Metformine serait également capable d'influencer, indirectement ou directement, le **micro-environnement tumoral** et notamment la présence ou même la différenciation de certaines cellules immunitaires (Jin and Jin, 2020; Kurelac *et al.*, 2020; Saito *et al.*, 2020).

4.2.1. Effets sur les lymphocytes

Il a été reporté plusieurs fois dans la littérature récente que la Metformine pouvait booster la réponse immunitaire adaptative, notamment en augmentant l'infiltration des **lymphocytes T** dans la tumeur et en favorisant leur **fonction cytotoxique** (Cha *et al.*, 2018; Eikawa *et al.*, 2015; Pereira *et al.*, 2018).

Tout d'abord, la Metformine peut avoir un effet direct sur les lymphocytes (*Figure 35*). Ainsi, Pearce et ses collègues ont montré en 2009 que l'activation de l'AMPK, qui provoque une augmentation de l'**oxydation des acides gras**, est nécessaire à la génération de **lymphocytes T mémoires (LT_M)** qui vont être responsable d'une immunité à long-terme (Pearce *et al.*, 2009). Dans une expérience de vaccination, les souris C57BL/6 sont immunisées avec de l'**ovalbumine (Ova)** puis, une semaine plus tard, traitées quotidiennement avec de la Metformine (ou un contrôle). Après 3 semaines de traitement, des cellules cancéreuses **EL4-Ova** sont injectées aux souris. Le traitement par la Metformine, qui a favorisé la génération de LT_m contre l'Ova, protège alors les souris contre le développement des tumeurs. Très récemment, une équipe a montré que la **génération de LT CD8+ mémoires** par la Metformine était dépendante de la régulation négative du microARN-107 (**miR-107**) par activation d'AMPK. La diminution de l'expression de miR-107 permet d'augmenter celle d'Eomesdermin (**Eomes**), qui à son tour inhibe la transcription du gène codant PD-1 et favorise la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (Zhang *et al.*, 2020a).

De plus, la Metformine est capable de **protéger** les lymphocytes infiltrant la tumeur de **l'apoptose** et empêche leur « **épuisement** », et ce de manière AMPK-dépendante. Cela entraîne chez les souris traitées une augmentation de la fonction inflammatoire de ces lymphocytes, capables de sécréter de l'IL2 (Interleukin-2), de l'IFN- γ et du TNF- α (Eikawa *et al.*, 2015). Le transfert adoptif de lymphocytes naïfs traités *ex vivo* avec de la Metformine chez des souris portant une tumeur de mélanome (B16-Mo5) montre que cet effet protecteur est un **effet direct**. Parallèlement, il a été montré que la Metformine pouvait induire la diminution des **lymphocytes T régulateurs (LTreg)** dans plusieurs modèles tumoraux (sarcome, mélanome, leucémie) au sein de la tumeur (Kunisada *et al.*, 2017). Dans cette étude, la Metformine induit une diminution des cellules CD4+/CD25+ (LTregs) mais permet également la régulation négative de l'expression de CTLA-4 et de la sécrétion d'IL-10.

Ce phénotype est causé par une inhibition du facteur de transcription **FoxP3**, qui provoque la différenciation des LT CD4+ naïfs en LTreg. Cette inhibition semble être liée au statut métabolique des lymphocytes, qui switch vers un **profil glycolytique**, sous l'effet de la Metformine.

En plus de son effet direct sur les lymphocytes, la Metformine peut influencer le microenvironnement tumoral en agissant sur le métabolisme des cellules tumorales. Etant donné que cette molécule inhibe la **respiration mitochondriale**, tout laisse à penser que les cellules tumorales ainsi que les cellules immunitaires soient contraintes d'utiliser uniquement la glycolyse pour générer de l'énergie, créant ainsi **une compétition** pour le glucose dans le MET, délétère aux lymphocytes. Comment expliquer dans ce cas les effets pro-survie et pro-cytotoxique de la Metformine ? L'une des explications probable est apportée par deux études complémentaires (Incio *et al.*, 2016; Scharping *et al.*, 2017). La première, réalisée sur un modèle de cancer pancréatique lié à l'obésité, montre que la Metformine participe à la réduction du volume tumoral en induisant une meilleure **perfusion vasculaire** et en favorisant de ce fait le **recrutement de LT cytotoxiques** dans la tumeur. La seconde étude, réalisée dans un modèle de mélanome et de cancer colorectal, montre que l'**hypoxie** générée dans certaines tumeurs réduit la prolifération et l'activité des LT cytotoxiques (production d'IFN- γ) (Scharping *et al.*, 2017). Or, la Metformine, en inhibant la phosphorylation oxydative, **empêche la consommation d'oxygène** par les **cellules tumorales** et diminue l'hypoxie dans le milieu. Chez les souris traitées avec de la Metformine, les TILs CD8+ retrouvent alors un **profil métabolique oxydatif**, au détriment des cellules cancéreuses, et retrouvent leur **fonction cytotoxique**. Le ciblage préférentiel des cellules cancéreuses par la Metformine peut être expliqué par l'expression beaucoup plus importante du **récepteur OCT1**, nécessaire à l'entrée de la molécule, sur ces cellules que sur les lymphocytes. Dans cette étude, le traitement des souris par la Metformine synergise l'effet antitumoral des **anti-PD1**. De plus, une étude dans le cancer de l'ovaire montre que la diminution **d'HIF-1 α** par la Metformine dans les MDSCs réduit leur fonction immunosuppressive et favorise indirectement la fonction cytotoxique des LT CD8+ (Li *et al.*, 2018). Cibler l'OXPPOS pour améliorer l'hypoxie dans le milieu tumoral semble donc être une bonne stratégie pour augmenter la réponse aux thérapies existantes et notamment aux immunothérapies (Boreel *et al.*, 2021).

Enfin, l'étude de Cha et ses collaborateurs a montré dans un modèle de tumeur mammaire que la Metformine promouvait l'activation des LT CD8+ indirectement *via* la **diminution de l'expression de PD-L1** par les cellules tumorales (Cha *et al.*, 2018). L'activation de la voie AMPK par la molécule conduit en effet à la **dégradation** associée au réticulum endoplasmique (ERAD : *Endoplasmic Reticulum-Associated protein Degradation*) du ligand inhibiteur PD-L1, qui n'est alors plus présenté à la membrane des cellules. Par conséquent, les LT CD8+ qui ne sont plus inhibé par leur liaison avec PD-L1 peuvent continuer d'assurer leur fonction cytotoxique. Dans cette étude, des effets antitumoraux synergiques ont été observés par traitement d'une combinaison entre la Metformine et les anti-CTLA-4. Très récemment, des progrès en termes **de distribution** de la Metformine jusqu'au site tumoral ont été réalisés. Le chargement de la molécule dans des

nanoparticules poreuses favorisent en effet sa libération dans la tumeur, ce qui provoque la dégradation de PD-L1 et améliore la réponse immunitaire cytotoxique (Wen *et al.*, 2021).

4.2.2. Effets sur les cellules myéloïdes

La population myéloïde au sein d'une tumeur est majoritairement composée de macrophages, qui peuvent être de type M1 ou M2 et de MDSCs (*Myeloid Derived Suppressor Cells*) (voir [paragraphe A.2.5.2.1](#)).

L'effet de la Metformine sur les macrophages a été étudié à la fois directement sur des modèles de macrophages *in vitro* mais également de manière indirecte dans leur contexte tumoral *in vivo*. On les appelle alors les **TAM** (*Tumor-Associated Macrophages*). L'effet de ce biguanide dans les macrophages est alors assez controversé et dépend du contexte dans lequel cet effet est étudié.

De manière générale, les études réalisées *in vitro* montrent que la Metformine a tendance à inhiber les **signaux inflammatoires** médiés par les macrophages. Ainsi, la Metformine empêche la sécrétion LPS(*Lipposaccharides*)-induite des cytokines TNF- α et IL-6 dans les cellules murines macrophagiques RAW264.7 par **inhibition** parallèle des **voies NF- κ B** et **ATF3** (*Activating Transcription Factor 3*) (Kim *et al.*, 2014). D'autres part, l'étude de macrophages dérivés de moelle osseuse de souris (**BMDM** : *Bone Marrow Derived Macrophages*) a montré qu'en plus de son effet inhibiteur sur la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires, la Metformine pouvait induire la **polarisation** des macrophages vers un **phénotype M2** ainsi que la sécrétion d'IL-10 par ces derniers (Jing *et al.*, 2018; Kelly *et al.*, 2015). Ces études *in vitro* et *ex vivo* suggéreraient alors que la Metformine induirait un phénotype pro-tumorigénique des macrophages.

Néanmoins, dans le **contexte du cancer**, il semble que le traitement par la Metformine est plus souvent associé à **l'inhibition du rôle pro-tumorigénique** des macrophages (*Figure 35*). Cela nous indique une fois de plus que les interactions entre les différents acteurs cellulaires au sein de la tumeur sont très importantes pour évaluer l'action des médicaments sur la fonction des TAMs ; dont l'effet peut être indirect. A ce propos, dans un modèle de co-culture entre des cellules d'hépatocarcinome et des macrophages, l'effet de la Metformine sur l'induction de marqueur M2 dans les macrophages est aboli et même contrebalancé lorsque ces derniers sont en présence des cellules tumorales (Chen *et al.*, 2015). Cette dédifférenciation des macrophages M2 semble être dû à une réaction de la **voie Notch** dans les macrophages traités par la Metformine lorsque ceux-ci sont en présence des cellules tumorales seulement. En parallèle, des études de modèles cancéreux sur souris syngéniques montrent que la Metformine est associée à une diminution des TAMs, notamment de type M2, dans la tumeur. Dans des cellules tumorales de prostate, le biguanide induit la diminution de l'expression de **COX2** (*Cyclooxygénase-2*) et par conséquent celle de la sécrétion de **PGE2** (*Prostaglandine-E2*), produit par cette enzyme. PGE2 étant impliqué dans le recrutement des macrophages, cette inhibition provoque une diminution générale du nombre de TAMs dans le tissu tumoral (Liu *et al.*, 2018a). De plus, deux autres études

montrent que la Metformine peut rediriger la polarisation des macrophages d'un phénotype M2 vers un **phénotype M1** dans la tumeur (Ding *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2018a). Dans la 1^{ère}, la Metformine inhibe *in vitro* la polarisation des macrophages M2 médiée par l'IL-13 de manière **partiellement dépendante** de l'AMPK, et induit également *in vivo* (modèle de cancer du poumon) la diminution des TAMs **CD206+** (de type M2) (Ding *et al.*, 2015). Dans la seconde, il a été montré dans plusieurs modèles cancéreux (mammaire, colorectal, rénal) que la Metformine induisait une inhibition de l'angiogenèse dépendante de la diminution du **VEGF**. L'effet observé est en fait la conséquence de l'augmentation du **ratio des macrophages M1 (CD68+/iNOS+) /M2 (CD68+/Arg1+)** dans la tumeur chez les souris traitées avec de la Metformine. Encore une fois, la Metformine semble inhiber *in vitro* la polarisation des M2 **induits par l'IL13** (Wang *et al.*, 2018a). Dans le contexte d'une tumeur et de son sécrétome, la Metformine peut donc avoir un **effet direct** sur la polarisation des TAMs. De surcroît, une étude a montré que cette molécule pouvait également avoir un **effet indirect** sur la polarisation des macrophages. En effet, la Metformine **active** dans des cellules cancéreuses de sein la voie de **l'AMPK** et **inhibe la voie NF-κB**, ce qui provoque une diminution de la sécrétion d'IL4, d'IL10 et d'IL-13 (cytokines polarisant vers un type M2), et une augmentation de la sécrétion d'IFN γ (cytokine polarisant vers un type M1). Le milieu conditionné de ces cellules cancéreuses induit alors la polarisation des macrophages vers un phénotype fonctionnel M1 (sécrétion d'IL-12 et de TNF- α) plutôt qu'un phénotype M2 (sécrétion d'IL-8, d'IL-10 et de TGF- β) (Chiang *et al.*, 2017).

Cibler directement les macrophages ou indirectement les cellules tumorales avoisinantes dans le MET afin de rediriger la polarisation des TAM d'un type M2 vers un type M1 semble donc être une bonne stratégie antitumorale. Très récemment, une stratégie très élégante, basée sur le développement de **microparticules** dérivées des macrophages et modifiées avec du **mannose** (Man-MPs) pour reconnaître préférentiellement les macrophages M2, a été élaborée (Wei *et al.*, 2021). L'injection de **Man-MPs chargées avec de la Metformine** (Man-MPs-Met) dans des souris portant des tumeurs induit la diminution des macrophages M2 au profit des macrophages M1 dans ces dernières. Cela provoque une augmentation considérable des **LT CD8+** infiltrant la tumeur, parallèlement à une diminution des LT_{reg} et des MDSCs, qui aboutit à une régression drastique de la croissance tumorale chez ces souris. Pour finir, le traitement de souris portant des hépatocarcinomes avec des Man-MPs-Met en **combinaison avec des anti-PD1** amplifie ces effets chez les souris chez qui on observe alors une réponse antitumorale complète.

Enfin, il a été observé lors d'une étude s'appuyant à la fois sur des modèles mathématiques et expérimentaux, que le **niveau d'hypoxie** dans la tumeur jouait un rôle sur la polarisation des TAMs (Carmona-Fontaine *et al.*, 2017). Ainsi, un fort niveau d'hypoxie va orienter les macrophages vers un phénotype M2 et induire l'expression de marqueurs spécifiques comme Arg1 (*Arginase 1*) ou MRC-1 (*Mannose Receptor C-Type 1*). Or, comme cela a été mentionné précédemment, la Metformine est capable en inhibant la respiration cellulaire de faire baisser ce niveau d'hypoxie dans la tumeur. Cela pourrait donc être une explication supplémentaire de l'effet de la Metformine sur la diminution des marqueurs M2 exprimés par les TAMs.

Quelques études montrent également l'effet **d'activateurs de l'AMPK** sur les **MDSC**. Une première étude, réalisée principalement *in vitro* sur un modèle de MDSC murin immortalisé (MSC-2), montre qu'un nouvel activateur de l'AMPK (OSU-53) inhibe la **fonction immunosuppressive** de ces cellules (Tripathi *et al.*, 2016). En effet, le traitement des MSC-2 par OSU-53 inhibe leur production d'oxide nitrique (NO) ainsi que leur sécrétion d'IL-6 et de TNF- α . De plus, ce traitement ralentit **la migration** des MSC-2 en réponse aux cytokines sécrétées par des cellules tumorales. Dans le même travail, le traitement de MDSC isolés de tumeurs de mélanome de patients avec de l'OSU-53 provoque une réduction significative de l'expression transcriptionnelle des gènes immunosuppresseurs comme Arginase 1 et iNOS (*inductible Oxide Nitric Synthase*). En 2017, Kim et ses collègues montrent dans un modèle de mélanome murin que la **Phenformine** provoque l'affaiblissement de **l'infiltration de MDSC** de type granulocytiques (G-MDSC) dans la tumeur. Ce processus semble dépendant de l'AMPK car l'ajout de **CC** (*Compound C*), un inhibiteur de l'AMPK, réverse le phénotype observé. De la même manière, l'utilisation d'un anti-oxydant atténue l'effet inhibiteur de la Phenformine sur les G-MDSC, ce qui suggère que la **production de ROS** induite par le biguanide est importante dans ce processus. Enfin, dans cette étude, la Phenformine augmente **l'activité antitumorale des anti-PD1** et permet une diminution synergique du volume tumoral (Kim *et al.*, 2017).

La Metformine, ou d'autres activateurs de l'AMPK comme la Phenformine, ont montré leurs effets antitumoraux à la fois par leur **action antiproliférative et cytotoxique** sur les **cellules tumorales** et par leur action immunomodulatrice dans le microenvironnement tumoral. Ces molécules semblent donc être de bons candidats pour traiter patients atteints de mélanome, notamment en combinaison avec des immunothérapies. A ce sujet, une **étude rétrospective** a été menée assez récemment sur deux petites cohortes de patients avec mélanome métastatique traités avec (A) une combinaison Ipilimumab/Nivolumab ou (B) la Ipilimumab/Nivolumab et Metformine (Afzal *et al.*, 2018). Les résultats, bien que non significatifs d'un point de vue statistique compte tenu du faible nombre de patients, sont très encourageants. Le **taux de réponse globale** passe alors de 54,5% (cohorte A) à 68,2% (cohorte B), la **survie globale médiane** de 28 mois (A) à 46,7mois (B) et la **survie sans progression médiane** de 5 mois (A) à 19,8 mois (B).

5. Les dérivés de la Metformine dans le traitement contre le mélanome

Depuis la découverte des effets anti-cancéreux de la Metformine, plusieurs laboratoires ont travaillé sur le développement d'activateurs de l'AMPK en tant que nouvelles molécules antitumorales (Kim *et al.*, 2016). Pour exemple, un dérivé des benzimidazoles, le composé 911, a montré un impact sur la croissance des cellules tumorales (Guigas and Viollet, 2016). D'autres activateurs directs de l'AMPK ont également montré des effets-tumoraux dans différents cancers. Ainsi, la molécule GSK621 induit une **diminution de la viabilité** des

cellules de LMA (Leucémie Myéloïde Aigüe) (Sujobert *et al.*, 2015) alors qu'une autre molécule, appelée MT-63-78, montre un effet similaire sur des cellules du cancer de la prostate (Zadra *et al.*, 2014).

Ces diverses études montrent l'intérêt porté à **la voie de l'AMPK** en tant que **cible thérapeutique importante** dans le cadre du cancer. Les résultats décevants de l'essai clinique sur la Metformine dans le cadre du mélanome réalisé au CHU de Nice (Montaudié *et al.*, 2017) ont souligné notamment le problème de dose efficace de cette molécule dans le cadre du cancer. En effet, afin d'obtenir des résultats anticancéreux significatifs avec la Metformine *in vitro* ou *in vivo*, cette molécule doit être utilisée à des **doses importantes** (**10mM in cellulo** ou **2mg/souris/jour in vivo**), qui ne sont pas retrouvées dans le corps du patient diabétique en clinique. Notre laboratoire a décidé de produire des **dérivés de la Metformine**, en collaboration avec l'Institut de Chimie de Nice (ICN), afin d'obtenir des composés possédant de **meilleures capacités pharmacocinétiques** (Brevet CNE/BOD-SB BEP170794 - NECs pro-AMPK). Le développement de ces dérivés a pour objectif de conserver la bonne tolérance des patients observée avec la Metformine tout en augmentant ses effets antitumoraux. Le travail sur l'un de ces dérivés, **le CRO15**, largement initié par le docteur Emilie Jaune lors sa thèse, a également fait également l'objet de mon travail de thèse. Une partie de ce travail, en partenariat avec le Dr. Jaune, a notamment mené à une première publication, qui sera présentée dans la partie « résultats » de ce manuscrit.

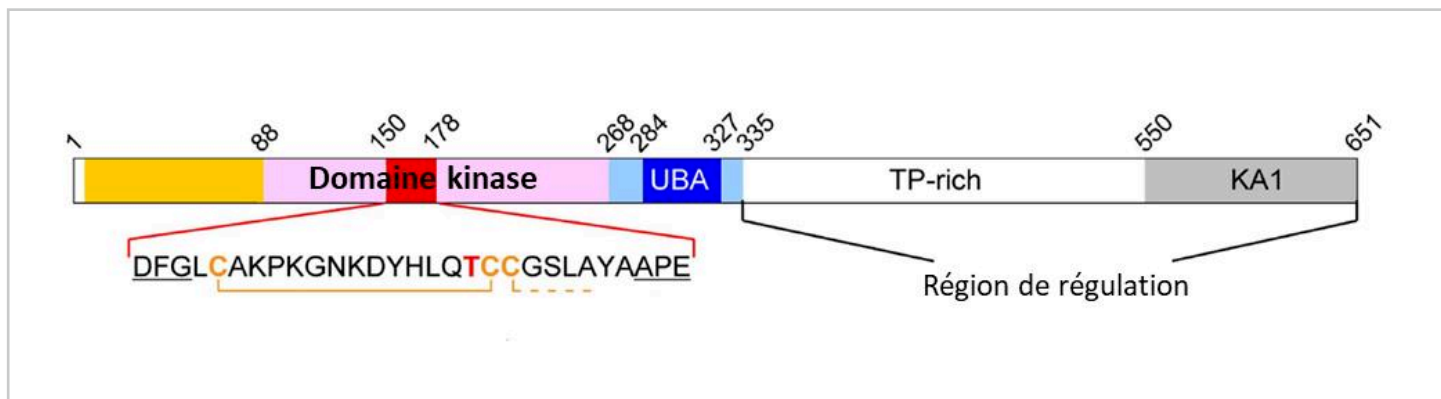


Figure 36 : Représentation schématique de la structure de MELK

La protéine Melk est composée d'une **domaine kinase** (Lobe N-terminal représenté en orange et lobe C-terminal en rose), d'une domaine **UBA** (*Ubiquitin-Associated Domain*) sur lequel peut se fixer des protéines ubiquitylées et d'une région régulatrice composée d'un **domaine KA1** (*Kinase-Associated-1*) et d'une domaine riche en sites de phosphorylation, dit « **TP-rich** ». La **séquence d'activation**, représentée en rouge, contient le résidu de thréonine (**T**) 167, nécessaire à l'activité de la kinase. Les résidus cystéines (**C**) sont quant à eux impliqués dans la formation de ponts disulfures.

C. MELK, une cible thérapeutique potentielle dans le mélanome

1. Généralités sur MELK

La protéine **MELK** (Maternal Embryonic Leucine Zipper Kinase), également appelée **MPK38** (Murine Protein Serine/Threonine Kinase 38) ou pEg3 (*Eg3 protein*), est une **sérine/thréonine kinase** impliquée dans la régulation de nombreux processus physio-pathologiques comme le développement embryonnaire, le cycle cellulaire, la prolifération, la réponse aux dommages à l'ADN ou encore l'apoptose (voir [paragraphe C.2.](#)).

Cette protéine est restée très peu décrite jusque dans les années 2010, et malgré l'intérêt grandissant de la communauté scientifique pour celle-ci ces dernières années, certaines de ses fonctions (notamment dans le cancer) restent encore aujourd'hui méconnues ou mal comprises (McDonald and Graves, 2020). Historiquement, MELK a été identifiée simultanément par deux groupes de recherche en 1997 en tant que **kinase** impliquée dans le développement embryonnaire (Heyer *et al.*, 1997) ou au niveau cellulaire dans la transduction du signal dans certaines lignées hématopoïétiques (Gil *et al.*, 1997). Cette protéine est codée par le gène *MELK* qui est situé sur le chromosome humain 9. Le clonage de l'ADNc de MELK a montré que la séquence de son **domaine kinase** partageait l'**identité** de celui des kinases de la **famille Snf1/AMPK** (*Sucrose non-fermenting 1/AMPK*), rangeant alors MELK dans cette famille de protéines.

Structurellement, MELK est composée comme les autres membre de sa famille d'un **domaine sérine/thréonine kinase** en N-terminal, suivi d'un domaine très conservé d'interaction aux protéines ubiquitinylées dit **UBA** (*Ubiquitin-associated-domain*) (*Figure 36*). Pour déclencher son activité catalytique, MELK doit être phosphorylé dans sa boucle d'activation sur la **thréonine 167** (Thr167) (Canevari *et al.*, 2013; Cao *et al.*, 2013). La région C-terminale est une **région régulatrice** contenant une région « TP-rich », qui contient de nombreux sites de phosphorylation, et la région KA1 (*Kinase-Associated 1*) qui contribue à l'association de MELK avec d'autres kinases de la famille AMPK.

En 2010, une étude montre que MELK est strictement exprimée dans les **cellules en prolifération**, que ce soit dans les tissus normaux ou cancéreux. Le niveau d'expression de la protéine varie pendant le **cycle cellulaire** et semble augmenter pendant la phase G2/M par rapport à la première partie de l'interphase. En fin de mitose, ce niveau d'expression diminue car la protéine semble en partie dégradée en parallèle de sa déphosphorylation (Badouel *et al.*, 2010). De manière intéressante, MELK a été retrouvé **surexprimé** dans de nombreux cancers comme celui du sein, de l'ovaire, du colon, de la peau, du sang ou encore de la prostate, en comparaison des tissus sains correspondants (Thangaraj *et al.*, 2020). Il a été suggéré que cette surexpression reflète alors le fait que l'**indice mitotique** des cellules tumorales est bien plus élevé que dans les cellules saines. L'étude de MELK dans le cancer à travers la régulation de ses différentes fonctions physio-pathologiques est donc importante à la bonne compréhension de cette protéine.

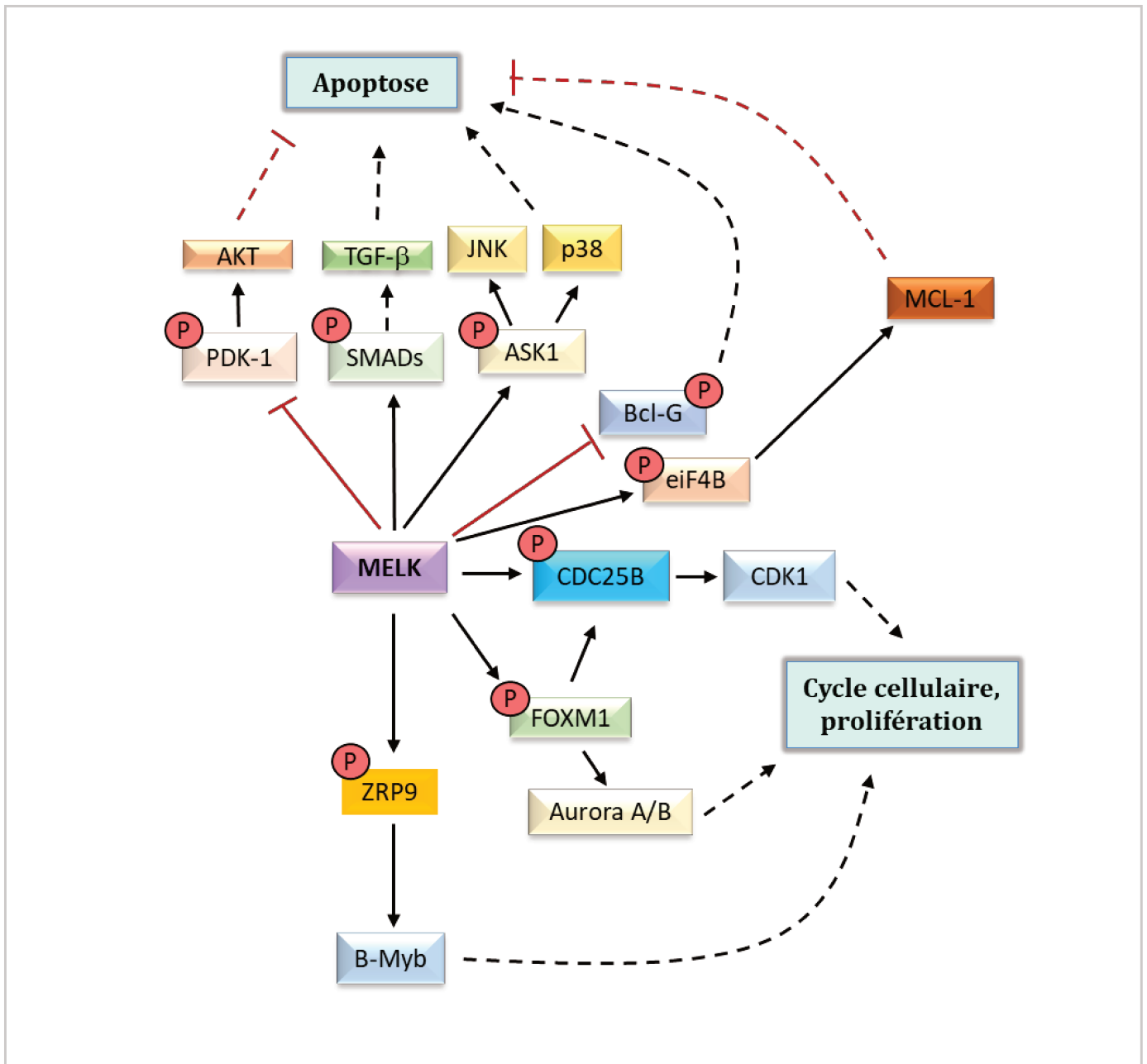


Figure 37 : Rôle de MELK dans la prolifération cellulaire et l'apoptose

La protéine Melk intervient dans plusieurs processus cellulaires tels que le **cycle cellulaire**, la **prolifération** et l'**apoptose**. Melk joue son rôle pro-prolifératif par la phosphorylation de facteurs importants tels que ZRP9 (*Zinc Finger-Like Protein 9*), FOXM1 (*Forkhead Box M1*) ou encore CDC25B. Tous vont à leur tour réguler des cibles impliquées dans le cycle cellulaire ou la prolifération.

Par ailleurs, Melk va avoir un rôle ambivalent dans l'apoptose. Dans certaines conditions, Melk **activer** des **protéines apoptotiques** comme ASK1 (*Apoptosis-Signal-Regulating-Kinase-1*) ou les protéines SMADs ou inhiber la protéine pro-survie PDK1 (*3-Phosphoinositide-Dependant-Protein Kinase 1*). Dans d'autres contextes, cette protéine peut **inhiber l'apoptose** par activation de la protéine eiF4B qui elle-même active la **protéine de survie MCL-1** (*Myeloid Cell Leukemia 1*), ou encore par inhibition de la pro-apoptotique Bcl-G.

2. Fonctions de MELK

2.1.1. *Implication de MELK dans le développement embryonnaire*

Originellement, MELK a été cloné dans des ovocytes ; il a alors été observé que **son expression** était **augmentée** lors du **développement embryonnaire** précoce de la souris (Heyer *et al.*, 1997, 1999). De manière similaire à d'autres transcrits impliqués dans le développement embryonnaire, le **transcrit** de MELK s'accumule depuis le stade de **développement à 8 cellules** jusqu'au stade de **blastocyste**. *A contrario*, l'expression de la **protéine** MELK est détectable pendant **tout le développement** pré-implantatoire. La présence de la protéine au stade très précoce est alors probablement due à la traduction de **l'ARNm maternel** présent dans le zygote (Heyer *et al.*, 1999). En plus de son expression dans les tissus extra-embryonnaires, MELK est également observé dans les cellules épithéliales des membres, de la queue, des yeux et du nez. Ces premiers résultats suggèrent alors un rôle des MELK dans **l'organisation spatiale** et le **développement des organes** lors de **l'embryogénèse**.

Des études un peu plus récentes ont montré par la suite que MELK était exprimé au niveau cellulaire dans plusieurs types de cellules souches. Ainsi, MELK est exprimé dans les **progéniteurs neuronaux multipotents MNP** : *Multipotent Neural Progenitors*) à différents stades de développement. Sa surexpression dans les MNP favorise la génération de neurosphères, indiquant que MELK est impliqué dans **l'auto-renouvellement** de ces cellules (Nakano *et al.*, 2005). *In vivo*, dans le système nerveux central de la souris, l'expression de MELK est restreinte aux stades de développement embryonnaire **précoce et intermédiaires**. Après la naissance, MELK est détecté au niveau de l'hippocampe, région dans laquelle résident les cellules souches neuronales. Ces observations soutiennent les données obtenues *in vitro*. Ensuite, il a été montré que MELK était exprimé dans les **myoblastes** prolifératifs, dans un stade non différencié seulement (Niesler *et al.*, 2007), dans les **progéniteurs** de glande mammaire (Pickard *et al.*, 2009), ou encore dans les cellules souches cancéreuses de glioblastome (Marie *et al.*, 2008). Enfin, une étude effectuée dans un modèle embryologique **murin** a montré que l'expression de MELK est importante dans le **développement de la rétine**. En effet, sa délétion est responsable d'une microphthalmie chez la souris. L'analyse perte et gain de fonction de MELK au niveau de la rétine indique alors que son **expression** dans les **cellules souches rétiniennes** est associé à leur prolifération, expliquant alors le phénotype observé (Saito *et al.*, 2012). Toutes ces études montrent le rôle de MELK dans le développement embryonnaire, notamment via son expression spécifique dans les cellules souches de différents tissus.

2.1.2. *Rôle de MELK dans la prolifération et le cycle cellulaire*

L'expression de MELK, une fois les cellules normales **différenciées**, diminue à un niveau presque indétectable. La protéine est alors exprimée uniquement dans des **cellules prolifératives** telles que cela a été décrit dans les cellules cancéreuses. Le niveau des ARNm de MELK est en effet élevé au moment de la **mitose**. Cela permet à cette protéine d'agir sur différents substrats impliqués dans la prolifération cellulaire (*Figure 37*).

Ainsi, MELK se lie à **ZRP9** (*Zinc Finger-Like Protein 9*) et le phosphoryle, ce qui induit sa translocation dans le noyau de la cellule (Seong *et al.*, 2002). Là, ZRP9 peut activer le facteur de transcription **B-Myb** (MYB Related Protein B), impliqué, entre autre, dans la régulation positive **du cycle cellulaire** (Seong *et al.*, 2003). Par ailleurs, il a été montré que MELK pouvait se fixer sur la protéine **NIPP1** (*Nuclear Inhibitor of Protein Serine/Threonine Phosphatase-1*), un facteur nécessaire à l'assemblage du spliceosome. Cette interaction impliquant le domaine FHA (*Forkhead Associated Domain*) de NIPP et le domaine « **TP-rich** » de MELK, résulte en **l'inhibition de l'épissage des ARN pré-messagers**. Le complexe MELK-NIPP1 est surexprimé pendant la mitose, procurant à la cellule un moyen de régulation négative du cycle cellulaire par MELK (Vulsteke *et al.*, 2004).

Les études montrent de manière générale que MELK induit la progression du **cycle cellulaire**. Tout d'abord, dans un modèle de cellules cancéreuses, l'expression de MELK **est modulée** de manière **cyclique** et **suit l'expression** d'acteurs du cycle cellulaire comme Cyclin-A/1, Cyclin-B et CDK4 (Badouel *et al.*, 2010). De plus, dans différents cancers, la **surexpression de MELK** est décrite comme étant liée à la **régulation positive concomitante** de gènes essentiels dans la progression du **cycle cellulaire** tels que *CDK1*, *CCNB1/2*, *TOP2A*, *AURKB*, *PLK1*, and *BUB1* ; ce qui suggère fortement que MELK a un rôle important dans ce processus (McDonald and Graves, 2020). Cette protéine pourrait réguler à la fois les **phases G2 et M** (Mitose) du cycle, et la **cytokinèse**. En effet, MELK est capable de réguler le cycle cellulaire *via* la **phosphorylation** de **Cdc25B**, une tyrosine-phosphatase qui va alors se transloquer au centrosome et activer la **protéine kinase CDK1**, responsable de la transition G2/M (Davezac *et al.*, 2002). Dans différents modèles de cancer, la protéine MELK semble indispensable à la transition entre la métaphase et l'anaphase (Minata *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2014). De plus, chez l'amphibien *Xenopus*, MELK est important dans la **cytokinèse**, mécanisme qui permet la division de la cellule et de son contenu cytoplasmique en fin de mitose/méiose. Lorsque MELK est surexprimé ou au contraire délété dans ce modèle, la dynamique est l'organisation de cette division cellulaire est altérée (Le Page *et al.*, 2011). Enfin, une étude a montré que MELK pouvait induire la **progression du cycle cellulaire** par phosphorylation de **FOXM1** (*Forkhead Box M1*) sur ses résidus sérines (Joshi *et al.*, 2013). Ce facteur de transcription régule à son tour de nombreux gènes essentiels pour la progression mitotique des cellules cancéreuses, tels que **Aurora A/B** et **Cdc25B**. Les membres de la famille de kinases Aurora, notamment Aurora A et B, sont en effet impliqués dans la condensation des chromosomes, l'assemblage du fuseau mitotique et la cytokinèse, nécessaires à l'aboutissement de la mitose (Ruchaud *et al.*, 2007). Enfin, il semble que l'activité de MELK augmente après sa phosphorylation par le complexe CDK1-CyclineB ou par Erk1/2 (voie des MAPK), ce qui suggère un cross-talk entre **les différentes voies de prolifération**, qui pourrait induire un renforcement de la mitose.

L'ensemble de ces résultats soulignent l'implication de MELK dans la **régulation du cycle cellulaire** et dans **l'activation de la prolifération**.

2.1.3. Effets de MELK sur l'apoptose

De manière intéressante, il semble que MELK puisse avoir à la fois un rôle **pro-apoptotique** ou **pro-survie**, selon le contexte étudié (Figure 37).

En effet, dans un contexte physiologique mais lorsque la cellule est en état de stress (stress oxydatif induit par H₂O₂ notamment), MELK peut activer la **kinase ASK1** (Apoptosis-Signal-Regulating-Kinase-1) par phosphorylation directe de sa Thr838. Cette dernière active alors les kinases **JNK** (*c-Jun N-terminal Kinase*) et **p38** qui provoquent l'apoptose des cellules (Jung *et al.*, 2008a). De plus, MELK peut contribuer à l'arrêt de la croissance et à l'apoptose des cellules médiés par la voie TGF- β . En effet, il a été montré que MELK pouvait interagir directement avec les **protéines SMAD** (SMAD 2, 3, 4 et 7) *via* son domaine kinase. La phosphorylation de ces protéines est alors essentielle à l'induction de l'**apoptose** TGF- β dépendante (Seong *et al.*, 2010). Enfin, MELK peut provoquer la mort des cellules en inhibant leur survie. Ainsi, MELK inhibe l'activité de **PDK1** (*3-Phosphoinositide-Dependant-Protein Kinase 1*) *via* sa phosphorylation en Thr354, et l'empêche alors de phosphoryler sa cible **Akt**, pro-survie (Seong *et al.*, 2012). En plus de cibler directement Ask1, les protéines SMAD et PDK1, MELK peut provoquer leur activation (Ask1 et SMADs) ou leur inhibition (PDK1) indirectement par interaction avec la protéine STRAP (*Serine-threonine kinase Receptor-Associated Protein*) (Seong *et al.*, 2014).

En revanche, MELK montre dans certaines conditions, notamment dans le contexte du cancer, un rôle **pro-survie** ou **anti-apoptotique**. Tout d'abord, il a été montré que la protéine pro-apoptotique **Bcl-G** était une cible importante de MELK. Dans le cancer du sein, MELK phosphoryle Bcl-G, ce qui provoque l'**inhibition** de son **activité pro-apoptotique** (Lin *et al.*, 2007). Ensuite, il a été montré un peu plus récemment grâce à un screening effectué dans des cellules cancéreuses, que l'un des substrats de MELK était **eiF4B** (Wang *et al.*, 2016). MELK phosphoryle **eiF4B** en Ser406, notamment lors de la phase de mitose (M) du cycle cellulaire, afin de réguler la synthèse protéique. L'activation d'eiF4B par MELK induit particulièrement la synthèse de **MCL-1**, protéine **anti-apoptotique** qui joue un rôle important dans la survie des cellules cancéreuses. L'inactivation de MELK ou d'eiF4B induit alors l'apoptose des cellules cancéreuses. D'autre part, l'inhibition de MELK dans des cellules de leucémie lymphoïde chronique provoque l'apoptose rapide des cellules en parallèle de l'**inhibition d'Akt** et de l'augmentation de l'expression de **p53** (Zhang *et al.*, 2018b). De manière générale, de nombreuses études ont montré que l'**inhibition de MELK** dans les cellules cancéreuses (par ARN-interférent : ARNi) provoque un ralentissement de la prolifération et une **induction de l'apoptose**. Ces résultats ont parfois été discutés, notamment par rapport aux effets « off-target » (sur des gènes **non-ciblés**) des ARNi, mais l'utilisation de siARN ou de shARN multiples dans une même étude écarte cette possibilité. De plus, lorsque ces effets antiprolifératifs et pro-apoptotiques de l'inhibition de MELK sont retrouvés de nombreuses fois par des laboratoires différents, la preuve que l'effet est bien dû à la perte de MELK devient solide (Settleman *et al.*, 2018).

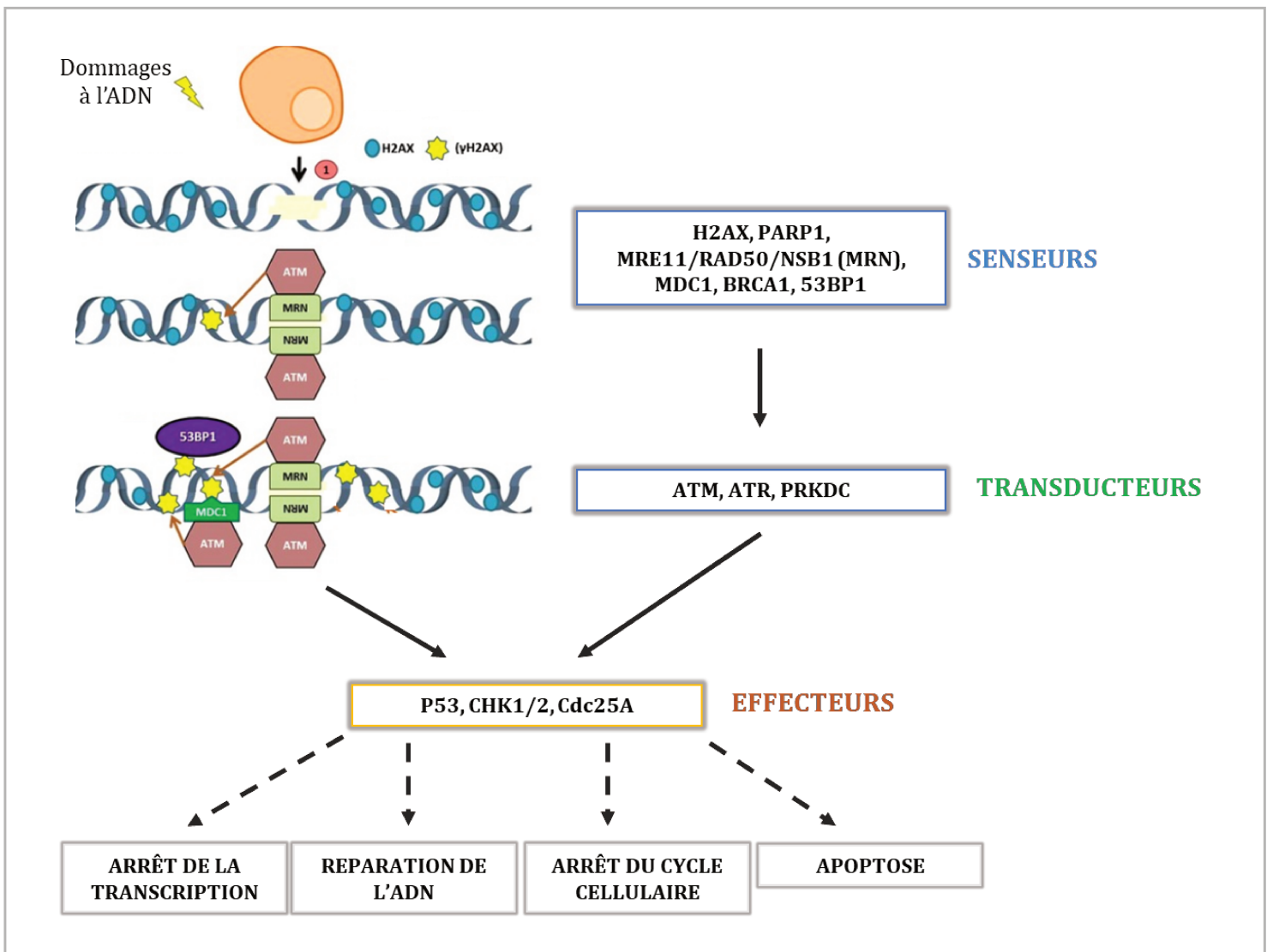


Figure 38 : Mécanisme global de la voie de réparation des dommages à l'ADN

La cellule perçoit les dommages à l'ADN (comme les cassures double-brin) grâce à différents **senseurs** qui vont se fixer sur la zone endommagée. Ces senseurs recrutent alors **des transducteurs du signal** (comme ATM) qui vont permettre le recrutement de nouveaux senseurs ainsi que l'activation de **protéines effectrices** impliquées dans des mécanismes cellulaires tels que la réparation de l'ADN, la transcription, le cycle cellulaire ou encore l'apoptose.

ATM : *Ataxia telangiectasia mutated* - ATR : *Ataxia telangiectasia and Rad3 related* - BRCA1 : *Breast Cancer 1* - Cdc25a : *Cell Division Cycle 25 homologue A* - CHK1/2 : *Checkpoint Kinase 1/2* - H2AX : *H2A Histone Family Member X* - MDC1 : *Mediator of DNA Damage Checkpoint protein 1* - PARP1 : *Poly(ADP-Ribose)-polymerase-1* - PRKDC : *DNA-dependant Protein Kinase* - 53BP1 : *p53 Binding Protein 1*

Figure réalisée d'après : Hernandez *et al*, 2015, *Aging Cell* et Wan *et al*, 2013, *Antioxid. Redox. Signal*

Il semblerait donc qu'en fonction du modèle cellulaire mais surtout du contexte dans lequel se trouve les cellules (physiologique, cancer), la protéine MELK puisse avoir un effet antagoniste sur le processus de l'apoptose.

2.1.4. Effets de MELK sur la voie des dommages à l'ADN

Dans les cellules saines, la préservation de l'**intégrité génomique** est essentielle pour l'homéostasie cellulaire. Or, l'ADN des cellules est souvent régulièrement soumis à des agents nuisibles à sa structure, qu'ils soient exogènes ou endogènes. Pour pallier cela, la cellule possède un système de **réparation des dommages à l'ADN** (DDR : *DNA Damage Response*) qui intervient par exemple en cas de cassure double-brin. Dans ce système, des senseurs (tels que **H2AX**, BRCA1, ou 53BP1) reconnaissent les dégâts causés sur l'ADN et activent des transducteurs du signal, comme **ATM** (*Ataxia Telangiectasia Mutated*), qui vont eux-mêmes agir sur des médiateurs et/ou des effecteurs (**CHK1/2**, CDC25A, p53) pour provoquer l'arrêt du cycle cellulaire ou encore l'apoptose des cellules (*Figure 38*) (Bensimon *et al.*, 2011). Les cellules cancéreuses prolifératives, qui doivent répliquer leur ADN beaucoup plus fréquemment et accumulent les erreurs, présentent de multiples aberrations géniques. Cependant, elles présentent bien souvent des **altérations** au niveau **des protéines « points de contrôle »** de la cascade DDR (DCM1, H2AX, ATM...) (Bartkova *et al.*, 2005), ce qui leur permet de tolérer ces aberrations, et de survivre.

En 2015, une étude réalisée sur des cellules cancéreuses de sein a montré que **MELK** était impliqué dans la résistance à la voie de **réponse aux dommages à l'ADN** (Beke *et al.*, 2015). Grâce à un inhibiteur pharmacologique de MELK, ils montrent que l'**inhibition** de cette protéine induit dans ces cellules cancéreuses **l'arrêt du cycle cellulaire en phase S** et l'accumulation de fourches de réplifications bloquées et de cassures double-brin de l'ADN. Au niveau protéique, ils observent une accumulation de la protéine H2AX phosphorylée (**γ -H2AX** : γ -Histone H2A Member X) dans le noyau des cellules, qui corrèle avec l'activation d'ATM et la phosphorylation de CHK2 (*Checkpoint kinase 2*). L'activation de la cascade DDR en réponse à l'inhibition de MELK induit ensuite la phosphorylation de **p53** (Ser15), l'expression prolongée de **p21**, et la régulation négative de **FOXM1** et de ses cibles ; expliquant alors l'arrêt du cycle observé. Cette étude montre que MELK augmenterait le **seuil de tolérance** aux dommages à l'ADN dans les cellules cancéreuses.

Quelques années plus tard, une autre étude montre dans des cellules cancéreuses du col de l'utérus que l'inhibition de MELK (par siARN cette fois-ci) induit une augmentation de l'expression de **γ -H2AX**. En combinaison avec un agent alkylant de l'ADN, l'inhibition de MELK aboutit cette fois-ci à une augmentation de la **caspase-3 clivée** et donc à l'apoptose des cellules. Dans cette étude, MELK semble impliquer dans le mécanisme de réparation par **recombinaison homologue**, en modulant l'expression des protéines du **complexe MRN** (*Mre11/Rad50/Nbs1*), impliqué dans ce type de réparation (Wang *et al.*, 2018b). La même année, dans un modèle de cancer du sein triple-négatif, il a été montré que MELK conférait une résistance à la radiothérapie via l'induction d'un autre mécanisme de réparation de l'ADN : la jonction d'extrémité non homologues (NHEJ : *Non-homologous End-Joining*). En effet, MELK est alors capable de **stabiliser les protéines Ku70/Ku80** sur le site de la cassure de l'ADN et d'induire ce type de réparation sous l'effet de la radiation. L'inhibition de

MELK permet alors la dissolution de ce complexe et la mort des cellules cancéreuses (Nyati *et al.*, 2018). Enfin, très récemment, une étude sur des cellules humaines **cancéreuses de vessie** montre que MELK est surexprimé dans les tumeurs de grade élevé et de mauvais pronostic. L'étude *in vitro* de l'expression de MELK dans ces cellules indique que son inhibition pharmacologique induit la **phosphorylation d'ATM et de CHK2**, provoquant ainsi la diminution de l'expression de MDMX, Cyclin-D1, CDK2 et E2F1 mais d'une augmentation de l'expression de p53 et de p21. Dans ce cancer, MELK semble donc **empêcher** l'arrêt du cycle par la voie ATM/CHK2/p53. (Chen *et al.*, 2020)

3. Régulation de MELK

Comme les onze autres membres de la famille AMPK-RK (Related Kinases), **MELK** doit être phosphorylé sur la **thréonine 167** (Thr-167) et la **Sérine 171** (Ser171) dans la boucle d'activation pour effectuer son activité catalytique. Le mécanisme d'activation est en revanche unique au sein de sa famille car il consiste en une **autophosphorylation** de sa Thr167, et non en la phosphorylation de ce site par des kinase extérieures telles que LKB1 et CAMKK β (Beullens *et al.*, 2005; Lizcano *et al.*, 2004).

Potentiellement, MELK peut être régulé par le contrôle redox de **ponts disulfures** intramoléculaire entre **deux cystéines** présentes dans le domaine kinase (Cys-154 et Cys-168). Des analyses biochimiques suggèrent en effet que l'activité de MELK est maximale en présence d'**agents réducteurs** (comme le DTT : *Dithiotréithiol*) (Beullens *et al.*, 2005). L'observation de la structure de MELK par cristallographie montre que la liaison disulfure intramoléculaire mène à une distorsion structurale qui pourrait empêcher l'activité catalytique de MELK (Cho *et al.*, 2014), ce qui expliquerait l'effet observé avec l'utilisation du DTT. Il semble cependant que MELK peut s'associer avec d'autres protéines *via* des interactions disulfures. Le rôle de la formation du pont disulfure n'est pas encore bien élucidé et des études plus approfondies nous diront si ce pont est physiologiquement pertinent.

La protéine MELK est également dotée d'une région régulatrice constituée d'une région « TP-rich » et d'un **domaine KA1**. Ce domaine semble jouer un rôle de régulateur négatif de la kinase car son clivage (côté C-terminal) permet d'améliorer l'activité de MELK *in vitro* (Beullens *et al.*, 2005). De manière intéressante, ce domaine est capable de se lier **aux membranes** de la cellule, ce qui suggérerait un mécanisme potentiel de MELK par liaison avec des membranes (Moravcevic *et al.*, 2010). Dans son domaine « **TP-rich** », MELK peut également être phosphorylé par différentes protéines qui vont participer à sa régulation. Par exemple, la protéine MPF (Mitosis-Promoting Factor) et ERK peuvent phosphoryler la kinase en 5 sites différents (Thr414, Thr449, Thr451, Thr481 et Ser498) pendant la mitose (Badouel *et al.*, 2006). D'autres part, la phosphorylation de MELK en Thr478 pendant la mitose favorise son interaction de PPP1R8 (*Protein Phosphatase 1 Regulatory Subunit 8*), un inhibiteur spécifique des protéines Ser/Thr phosphatases de type 1 (Vulsteke *et al.*, 2004).

Il semble que les moyens de régulation de MELK soient nombreux et encore loin d'être tous élucidés. De plus amples recherches sur le sujet permettront sans doute d'avoir une vision plus claire et plus globale de sa régulation.

4. Implication de MELK dans le cancer et le mélanome

4.1. MELK agit comme un oncogène : une idée solide mais controversée

Depuis la découverte de MELK en 1997 en tant qu'acteur du développement embryonnaire, de nombreuses études ont étudié le rôle de cette protéine **dans le cancer**. La première étude, publiée en 2005, présente MELK comme une cible thérapeutique intéressante en cancérologie. Cette étude montre que le niveau transcriptionnel de MELK est **surexprimé dans une vingtaine de tissus cancéreux** (par rapport à leur tissu sain équivalent) (Gray *et al.*, 2005). De plus, la **diminution de l'expression de MELK** dans des lignées cancéreuses du col de l'utérus, mammaires, colorectales et gastriques par utilisation d'ARN interférants (ARNi) provoque **la diminution de leur prolifération**. Dans les dix années qui suivirent, de nombreuses autres études montrent également une surexpression de MELK dans différents cancers (glioblastome, sein, prostate, etc) et une diminution de la prolifération des lignées cancéreuses correspondantes sous l'effet de l'inhibition de MELK par ARNi (Du *et al.*, 2014; Kuner *et al.*, 2013; Lin *et al.*, 2007; Nakano *et al.*, 2008). Sous l'influence de toutes ces études, le premier **inhibiteur** dit sélectif de **MELK**, appelé OTSSP167 (ou OTS167) a été développé (Chung *et al.*, 2012). Son utilisation engendre une diminution de la croissance et **une apoptose** dans plusieurs lignées cancéreuses testées. Il est donc actuellement testé dans quatre essais cliniques différents (NCT01910545, NCT02926690, NCT02795520, NCT02768519). En plus de son utilisation en clinique, cet inhibiteur a largement été utilisé depuis son développement pour **l'analyse fonctionnelle** de MELK. Malheureusement, il a démontré par la suite qu'OTS167 était **très peu sélectif** pour MELK, et ciblait également une dizaine d'autres kinases (Ji *et al.*, 2016; Klaeger *et al.*, 2017). D'autres **inhibiteurs** ont par la suite été développés et certains, testés cette fois-ci pour leur **sélectivité** comme NVS-MELK8a et MELK-T1, montrent également des effets **antiprolifératifs** et **pro-apoptotiques** dans des modèles de cancer du sein (Beke *et al.*, 2015; McDonald *et al.*, 2020).

En 2014, la protéine MELK est à nouveau décrite comme essentielle à la prolifération de cellules de cancer du sein de type basal (BLBC) (Wang *et al.*, 2014). Dans cette étude, ils montrent non-seulement l'effet antiprolifératif de l'inhibition de MELK par ARNi, mais aussi **le retour** (« rescue ») à un phénotype prolifératif par ajout de **MELK exogène sauvage**. Le phénotype n'est pas retrouvé lorsqu'ils ajoutent un MELK **muté pour son domaine kinase**. Ceci démontre alors que l'effet sur la prolifération observé avec les ARNi est bien **MELK-dépendant**.

Malgré tous les indices qui laissent alors à penser que MELK agit **comme un oncogène** en favorisant la prolifération des cellules, certains résultats contradictoires poussent à mettre en doute cette affirmation. Trois ans plus tard en effet, une autre équipe montre dans le même modèle de cancer que la délétion de MELK par la technologie **d'édition du génome CRISPR/Cas9** n'impacte pas du tout la prolifération des cellules ou encore la cytokinèse. Ils en concluent que l'expression de MELK **n'est pas requise** dans le cancer BLBC (Lin *et al.*, 2017). À la suite de cela, deux autres études utilisant la même technologie d'édition du génome ont montré des résultats similaires dans le cancer du sein ainsi que dans d'autres lignées cancéreuses (Giuliano *et al.*, 2018; Huang *et al.*, 2017). Huang et ses collègues montrent alors que l'utilisation d'un CRISPR interférence

(CRISPRi) dirigé contre MELK n'a aucun effet sur la prolifération des cellules cancéreuses de sein. De multiples « ARN guides » ciblant le promoteur de MELK ont été utilisés et font diminuer, lors de l'ajout de la Cas9, l'expression du transcrit de MELK et de sa protéine de manière efficace. Certains de ces « ARN guides » ont alors été clonés dans des vecteurs dont l'expression est induite par la doxycycline : des lignées stables ont alors été établies. L'extinction de MELK dans ces lignées par l'ajout de Cas9 et par plusieurs jours de traitement à la doxycycline **n'induit pas de diminution de la prolifération cellulaire**. Dans l'étude de *Giuliano* et ses collaborateurs, il est montré que l'extinction de MELK dans différentes lignées cancéreuses (sein, mélanome, colorectal) n'induit pas de défaut de prolifération des cellules dans un milieu semi-solide mimant la croissance dite « indépendante-de l'ancrage ». De plus, l'extinction de MELK dans deux lignées cancéreuses de sein n'a pas d'effet sur la croissance de xénogreffes chez la souris. Une étude cependant, utilisant la technologie CRISPR/Cas9 contre MELK dans un modèle de leucémie lymphoïde chronique, montre que l'extinction de MELK induit une diminution de la prolifération et une augmentation de l'apoptose (Zhang *et al.*, 2018b). Cette analyse ne représente cependant qu'une petite partie du travail et n'est pas autant développée que dans les papiers mentionnés précédemment. Une des explications possibles de ces résultats **en apparence contradiction** avec le grand nombre d'études réalisées avec des ARNi et des inhibiteurs pharmacologiques serait le biais induit par la **technique** utilisée. Dans ces études d'extinction de MELK par édition du génome, il n'est pas exclu que les cellules aient le temps de **reprogrammer leurs voies de signalisation** afin de contourner la perte de MELK et de retrouver une croissance normale. D'autre part, la sélection d'un **clone non dépendant de MELK** pour la croissance cellulaire pourrait expliquer le phénotype obtenu. Enfin, ces résultats n'expliquent pas les six études réalisées par différents laboratoires qui montrent que les effets antiprolifératifs de l'inhibition de MELK par ARNi sont contrebalancés par l'ajout d'un **MELK exogène sauvage** (Hebbard *et al.*, 2010; Janostiak *et al.*, 2017; Minata *et al.*, 2014; Nakano *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2014; Xia *et al.*, 2016).

MELK et mélanome :

En 2007, une étude sur la **classification moléculaire** des différents stades de mélanome révèle qu'il y a une corrélation positive entre l'expression de MELK dans les tumeurs et l'agressivité de cette dernière (Ryu *et al.*, 2007). Plus récemment, une autre étude s'est intéressée à **l'implication de MELK** dans la **croissance des cellules de mélanome** (Janostiak *et al.*, 2017). Cette dernière montre que l'activation de la **voie des MAPK** (qui est constitutive dans la majorité des mélanomes) provoque l'augmentation du facteur de transcription **E2F1** (*E2F Transcription Factor 1*) qui va lui-même induire l'**augmentation** de l'expression de **MELK**. Le traitement des cellules de mélanome par un inhibiteur de BRAF ou de MEK (Vémurafénib/Tramétinib) ainsi que l'inhibition de l'expression de E2F1 par ARN interférant provoque alors la diminution de l'expression transcriptionnelle et protéique de MELK. Grâce à une construction génétique avec un gène rapporteur (essai luciférase), les auteurs montrent qu'E2F1 est capable de se lier directement **au promoteur de MELK** pour induire son expression. Par une approche grande échelle (SILAC : *Stable Isotope Labelling by Amino acids in Cell culture*), il est ensuite remarqué que **l'inhibition de MELK** régule notamment les acteurs de la **voie NF-**

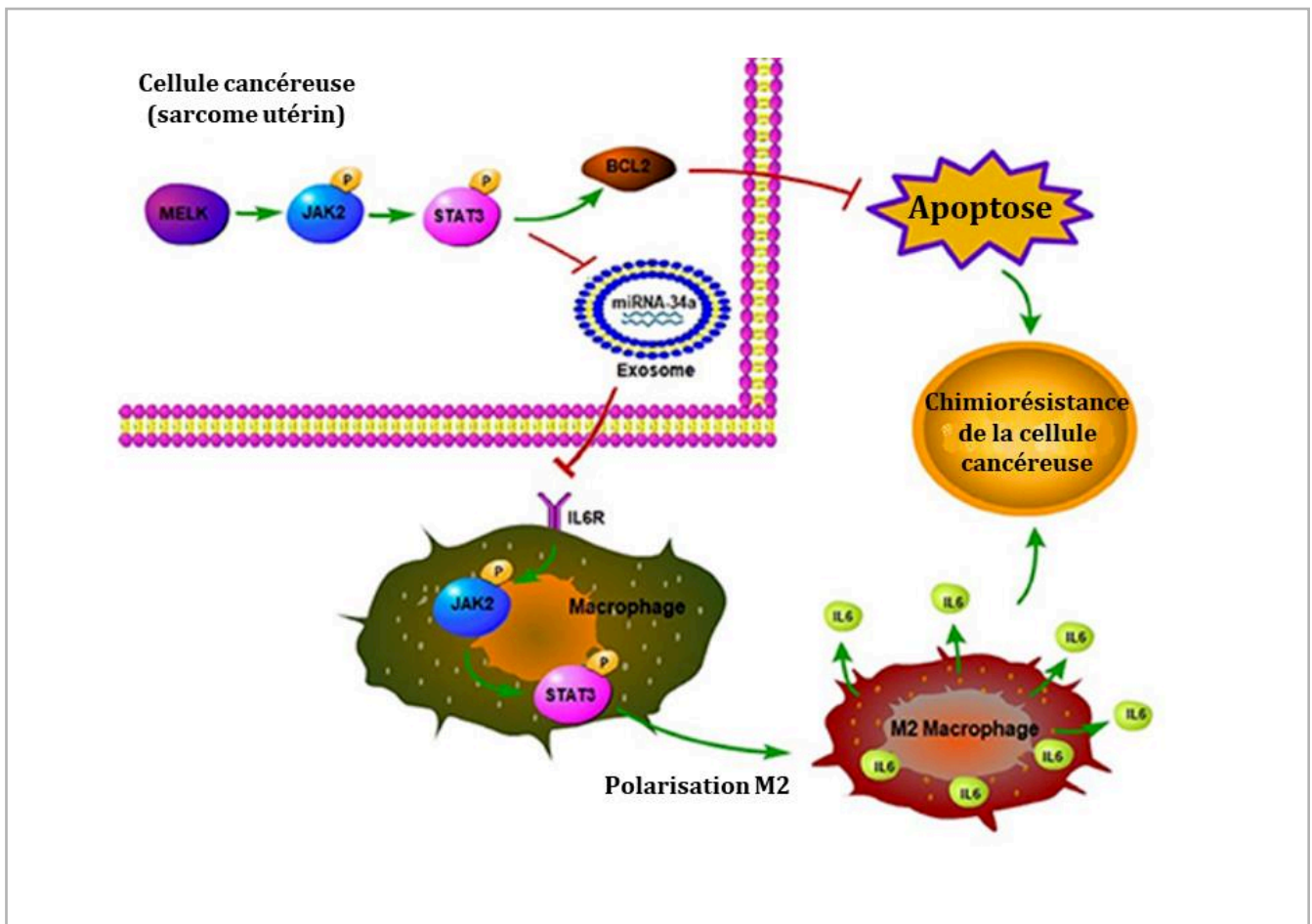


Figure 39 : Induction de la polarisation M2 des macrophages par MELK dans le sarcome utérin

Melk induit la chimiorésistance des cellules cancéreuses de sarcome utérin non seulement par un **mécanisme anti-apoptotique** médié par la **voie JAK2/STAT3** mais également en provoquant la **polarisation des macrophages vers un type M2** via la même voie de signalisation. Ces derniers contribuent également à la chimiorésistance des cellules cancéreuses par sécrétion d'IL-6.

Figure tirée de : Zhang et al, 2020, Front Oncol

κB. Des analyses plus particulières montrent ensuite que MELK induit en fait la **phosphorylation** de **SQSTM1**(Sequestosome1)/p62, elle-même responsable de l'activation de la voie NF-κB (Duran *et al.*, 2008; Long *et al.*, 2010). Ainsi, l'activation de MELK aboutit alors à la phosphorylation de **IκB-β** (NF-κB inhibitor β), qui lève alors son inhibition sur **NF-κB/p65**. Cette dernière va alors transloquer dans le noyau pour activer ses gènes cibles et **induire la prolifération** des cellules de mélanome. En **inhibant** l'expression de MELK, tous ces effets (prolifération des cellules, phosphorylation de SQSTM1, activation de la voie NF-κB) sont réservés. Etant donné le rôle important de la voie NF-κB dans le cancer et dans le mélanome, ces résultats indiquent que MELK pourrait être une **cible thérapeutique** intéressante dans le cadre de leur traitement.

4.2. Rôle de MELK dans la réponse immunitaire antitumorale

Une unique étude reliant MELK et la réponse immunitaire antitumorale, très récente, existe à ce jour (Zhang *et al.*, 2020b). Elle montre, dans un modèle de sarcome utérin, disposant de très peu d'options thérapeutiques encore aujourd'hui, que **MELK** est surexprimé dans ce cancer et responsable de la **résistance** au traitement par doxorubicine. De manière intéressante, cette résistance est basée sur deux mécanismes principaux médiés par MELK : **l'inhibition de l'apoptose** dans les cellules cancéreuses, et l'induction de la **polarisation des macrophages** en macrophages de **type M2**. L'analyse des **profils d'expression des ARNm** ainsi que ceux **des micro-ARNs** dans ces cellules cancéreuses surexprimant MELK (+/- traitées à la doxorubicine) montre des modulations de transcrits impliqués dans **l'apoptose** ainsi qu'une diminution de l'expression du **micro-ARN miR34-a** dans les cellules surexprimant MELK. Cela amène les auteurs à s'intéresser à la voie **JAK2/STAT3**, impliquée dans la résistance à l'apoptose et liée à l'expression de miR-34a (Siddiquee and Turkson, 2008; Zhang *et al.*, 2017a). Ils confirment alors que la surexpression de MELK dans les cellules induit l'activation de la voie JAK/STAT3, menant d'une part à l'expression de la protéine anti-apoptotique Bcl-2, et d'autre part à la diminution de l'expression de **miR-34a** (*Figure 39*). De manière intéressante, miR34-a peut être sécrété par la cellule tumorale et cibler d'autres cellules au sein de la tumeur. Dans un modèle *in vitro* de macrophages, par utilisation de milieux conditionnés, ils montrent que la **surexpression de MELK** dans les cellules cancéreuses provoque la **polarisation des macrophages vers un type M2**, exprimant plus de **CD206** et **d'Arg-1**, et moins d'iNOS. L'effet observé est alors expliqué par le fait que **miR-34a**, lorsqu'il est dans le milieu extracellulaire, inhibe la polarisation vers un type M2 médié par la voie JAK2/STAT3 *via* sa liaison avec le **récepteur IL6-R** (*Figure 39*). En provoquant la diminution de son expression, MELK restaure donc cette polarisation en macrophage M2. Enfin, les auteurs ont montré que les macrophages M2 participait à la résistance des cellules tumorales à la doxorubicine *via* leur sécrétion d'IL6. Chez la souris, le traitement des tumeurs de sarcome utérin par doxorubicine en combinaison avec un inhibiteur pharmacologique de MELK provoque alors une belle diminution de la croissance tumorale.

D. REDD1, protéine de la mort cellulaire au carrefour de l'hypoxie et de la réponse aux dommages à l'ADN médiée par p53

1. Généralités sur REDD1

La protéine **REDD1** (*REgulated in Development and DNA Damage Responses 1*), appelée également **DDIT4** (*DNA Damage Inducible Transcript 4*) ou encore Rpt801 est codée par le gène DDIT4 situé, chez l'Homme, sur le chromosome 10. Elle fut identifiée pour la première fois dans les années 2000 par deux équipes (Ellisen *et al.*, 2002; Shoshani *et al.*, 2002) et décrite comme étant impliquée dans la **réponse aux dommages à l'ADN** et à l'**hypoxie**. REDD1 est une petite protéine de 232 acides aminés, soit 25kDa, conservée de l'insecte jusqu'à l'Homme. L'observation et l'analyse de cette séquence d'acides aminés ne permet pas d'identifier de domaine fonctionnel particulier ou d'activité enzymatique. En 2010, l'analyse structuro-fonctionnelle de la protéine par cristallographie et mutagénèse dirigée indique que **deux segments de la protéine** sont **essentiels** à sa fonction de manière **interdépendante** (Vega-Rubin-de-Celis *et al.*, 2010). La cristallographie indique que ces deux segments se replient ensemble pour former un **nouveau domaine** qui consiste en deux hélices alpha antiparallèles et d'un feuillet beta mixte.

Au niveau cellulaire, REDD1 est ubiquitaire, il peut être localisé au niveau du cytoplasme, du noyau mais aussi de la **mitochondrie** (Britto *et al.*, 2018; Horak *et al.*, 2010) ou encore de la **membrane plasmique** (Michel *et al.*, 2014). Sa localisation semblerait impliquée dans ses différentes fonctions. En condition physiologique basale, cette protéine est faiblement exprimée, mais son expression peut être induite par différents types de **stress** pour permettre à la cellule s'adapter en provoquant **des réponses cellulaires adéquates** telles que l'inhibition de mTOR (Ellisen *et al.*, 2002; Katiyar *et al.*, 2009; Kimball *et al.*, 2008). La demi-vie de REDD1 est courte (5-10min) et Katiyar et ses collègues ont montré qu'elle était dégradée par le protéasome sous l'influence du **complexe ubiquitine-ligase** CUL41-DDB1-ROC1- β -TRCP E3.

2. Régulation de REDD1

L'expression de REDD1 est régulée en réponse à de nombreux **stress cellulaires**. En fonction du stress engendré, la régulation de REDD1 va impliquer différents intervenants.

Lorsque la cellule est soumise à un **stress du réticulum endoplasmique** par exemple, généré par l'accumulation de protéines mal repliées dans ce compartiment, l'expression transcriptionnelle de REDD1 va être induite par le facteur de transcription **ATF4**, lui-même activé par **eiF2 α** phosphorylé (Whitney *et al.*, 2009). L'axe PERK/eiF2 α /ATF4 induite par le stress du RE est donc essentielle à la régulation positive de REDD1. D'autre part, une équipe a montré que cette protéine peut être activée à la suite **d'un stress induit par des radiations** gamma dans une lignée d'ostéoblastes fœtaux. Cette activation est due à l'inhibition de l'expression d'un micro-ARN ciblant REDD1 : le miR30c (Li *et al.*, 2012). Par ailleurs, dans une lignée cancéreuse de foie, REDD1 peut être inhibée de manière transcriptionnelle par **IL6**, une cytokine pléiotrope **pro-inflammatoire**,

de manière STAT3-dépendante (Pinno *et al.*, 2016). Plus récemment, il a été montré que REDD1 pouvait être induit par un stress oxydatif. Dans les hépatocytes, l'introduction de **ROS** par H₂O₂ ou t-BPH (*tert-butylhydroperoxide*) induit l'expression de la protéine REDD1. Cet effet est médié par l'activation du facteur de transcription hétérodimérique **AP-1** (*Activator-Protein 1*), et de son composant **c-Jun**. Ce dernier se lie alors sur un site proche du promoteur de REDD1 et induit son expression (Cho *et al.*, 2018a).

La régulation de la protéine peut également se faire au niveau post-traductionnel, notamment en modulant sa dégradation. Ainsi, deux équipes niçoises ont pu montrer de tels phénomènes. Dans la 1^{ère} étude, l'**insuline** stimule l'expression de REDD1 *via* l'activation de la **protéine MEK** en la protégeant de sa dégradation (Regazzetti *et al.*, 2012). A l'inverse, dans la seconde étude, il est montré que l'activation dans des cellules leucémiques de la **caspase-3** induit la **dégradation de REDD1** par **clivage** de 3 sites spécifiques à cette caspase (Puissant *et al.*, 2014).

En dehors de ces mécanismes de régulation décrits ponctuellement, les deux **facteurs de stress principaux** qui régulent l'activation de REDD1 restent **l'hypoxie** et les **dommages à l'ADN**.

2.1. Réponse de REDD1 à l'hypoxie

Originellement, REDD1 a été décrit comme étant une protéine impliquée dans la voie de réponse à l'hypoxie (Shoshani *et al.*, 2002). Dans cette étude, l'expression de REDD1 est induite très rapidement après hypoxie (après environ 1H), de manière dépendante de l'activation d'**HIF-1** (*Hypoxia Inducible Factor-1*). HIF-1 est un facteur de transcription hétérodimérique qui contient une sous-unité alpha (α) et une sous-unité beta (β). En condition de normoxie, HIF-1 α est hydroxylé (Pro564) de manière dépendante à l'oxygène et il est alors reconnu par un complexe ubiquitine-ligase appelé pVHL (*Von-Hippel-Lindau Protein*) et dégradé par le protéasome. Dans un **environnement hypoxique**, HIF1 α n'est plus hydroxylé, se dégage du complexe pVHL et transloque dans le noyau pour activer des gènes régulés par des **motifs HRE** (*Hypoxia Responsive Element*) (Gothié and Pouyssegur, 2002). Ainsi, dans l'étude de Shoshani et ses collègues, HIF-1 se fixe au promoteur de REDD1 pour induire son expression. Selon le contexte cellulaire, REDD1 va alors protéger les cellules de la mort induite par l'hypoxie à travers l'inhibition de la génération de ROS, ou au contraire sensibiliser les cellules à l'hypoxie pour induire leur apoptose.

Une autre équipe a montré que **l'inhibition de mTOR** en réponse à l'hypoxie *via* REDD1 est dépendant du complexe TSC1/2 mais **n'est pas dépendante** de l'activation de l'**AMPK** ou de LKB1 (Brugarolas *et al.*, 2004). En revanche, dans une autre étude conduite dans des cellules de carcinome de la tête et du cou, le **stress énergétique** induit par une hypoxie prolongée induit l'expression de REDD1 de manière **dépendante** à l'activation de l'**AMPK** (Schneider *et al.*, 2008). Dans des cellules cancéreuses de prostate, l'induction de REDD1 médiée par HIF-1 α est dépendante de l'activation de la voie **Pi3K/Akt** (Schwarzer *et al.*, 2005). En

2010, il est montré que dans les adipocytes, l'ajout d'**insuline** peut provoquer l'activation d'HIF1 α et l'augmentation de l'expression de REDD1 de manière dépendante à la voie **PI3K/mTOR** (Regazzetti *et al.*, 2010). Cet effet est déjà observable dans des conditions de normoxie, mais est amplifié en hypoxie. Très récemment, un mécanisme complètement différent a été décrit dans un modèle d'adénocarcinome de la prostate. Dans cette étude, l'expression de REDD1 est induite par la **perte d'hétérozygotie (LOH) du gène KRAS** muté en G12D (Ma *et al.*, 2020). En effet cette **LOH** de **KRAS^{G12D}** est associée dans ce cancer à un phénotype agressif et de mauvais pronostic. Il a été montré ici que cette **perte de fonction** induisait dans les cellules cancéreuses une augmentation du métabolisme de la glutamine non canonique, de manière **REDD1-dépendante**. Ce phénomène est encore une fois amplifié en environnement hypoxique.

Comme évoqué précédemment, REDD1 est une protéine qui peut être rapidement dégradée. L'un des mécanismes de régulation de sa dégradation repose sur sa phosphorylation (en ser19, thr23 et thr25) par la **kinase GSK3 β** (Glycogen Synthase Kinase 3b), qui induit son interaction avec le complexe E3 ubiquitine ligase CUL4A(*Cullin 4A*)/DDB1(DNA Damage Binding 1) et sa dégradation par le protéasome (Katiyar *et al.*, 2009). Ce mécanisme rapide survient dès lors que la cellule passe d'un environnement **hypoxique** à une **condition de normoxie**, afin de restaurer le stress engendré par l'hypoxie. Depuis, d'autres ubiquitine-ligases ciblant REDD1 et induisant sa dégradation protéasomale, telles que Parkin (Romaní-Aumedes *et al.*, 2014) ou encore HUWE1 (Thompson *et al.*, 2014) ont été décrites. En 2013, une équipe montre que **mTOR** régule la **stabilité** de REDD1 d'une manière protéasome dépendante qui n'est cependant pas liée à la régulation de CUL41 ou de HUWE1. Ainsi, **l'inhibition de mTOR** par REDD1 **diminue la stabilité** de cette dernière, agissant comme une boucle de rétrocontrôle négative (Tan and Hagen, 2013).

2.2. Réponse de REDD1 aux dommages à l'ADN : implication de p53

Comme son nom l'indique, l'expression de **REDD1** (REgulated in Development and DNA Damage Responses 1) est également majoritairement régulée lorsque la cellule subit des **dommages à l'ADN**. Dans le travail d'Ellisen et ses collègues, il est montré que REDD1 peut en effet être activé sous l'influence de plusieurs types de stimuli induisant des dommages à l'ADN, tels que des **rayons ionisants (IR)** ou l'ajout d'un **agent alkylant** de l'ADN (**MMS** : *Methyl Methane Sulfonate*) (Ellisen *et al.*, 2002). Cependant, chaque stimulus semble provoquer sa propre voie de réponse aux dommages générés. Les dommages induits par IR, qui provoquent l'activation de p21, passent par l'activation d'ATM et la **stabilisation de p53** par phosphorylation de sa **ser15**. Dans cette étude, il est alors montré que l'expression de **REDD1** à la suite de la stimulation par IR est **dépendante de p53**, capable de cibler directement la protéine et de la réguler transcriptionnellement.

Dans une autre étude, il est montré dans des kératinocytes que l'induction de REDD1 par des dommages à l'ADN créés par ajout de **MMS** provoque la régulation transcriptionnelle de REDD1 qui impliquent des sites particuliers sur le **promoteur** de la protéine : les sites C/EBP et de liaison à Elk-1 (*ETS-like-1*) (Lin *et al.*, 2005).

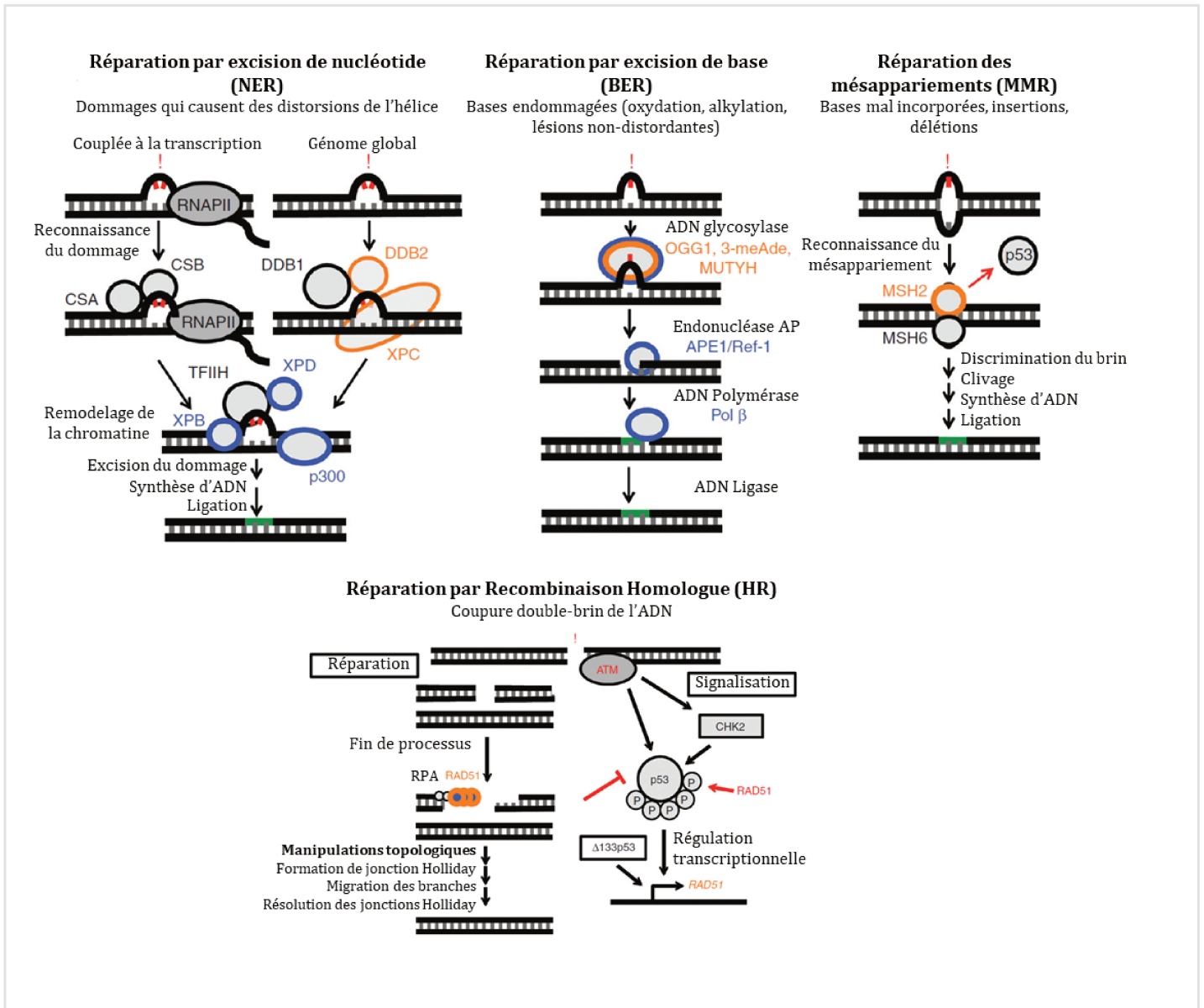


Figure 40 : Exemples d'interactions de p53 avec les voies de réparation des dommages à l'ADN

En haut : Représentations simplifiées de la réparation par excision de nucléotide (NER), de la réparation par excision de base (BER) et de la réparation des mésappariements (MMR).

En bas : Représentation simplifiée de la réparation par **recombinaison homologue** (HR), lorsqu'il y a eu cassure double-brin de l'ADN.

Les facteurs qui sont en interaction de **type transcriptionnelle** avec p53 sont entourés **en orange** et ceux en interaction **non-transcriptionnelle** sont entourés **en bleu**. Les flèches rouges indiquent les effets de régulation **sur p53**.

Par exemple, p53 induit la **transcription** de *DDB2* et de *XPC* et d'autre part, **recrute** l'histone acétylase p300. Il favorise par ces moyens la NER.

OGG1 (en haut) et RED51 (en bas) ont à la fois des interactions transcription dépendante et indépendante avec p53.

Ce processus semble en revanche **indépendant de p53** car la délétion du site de liaison à p53 ne change pas le phénotype observé. Par ailleurs, une étude dans le lymphome B à large cellule montre que REDD1 peut être induit par l'activation de la **voie NF-κB** non canonique (impliquant p100 et p52) sous l'effet d'une **chimiothérapie** induisant des dommages à l'ADN (Doxorubicine). Cette fois-ci encore, l'induction de REDD1 est indépendante de p53 (Ramachandiran *et al.*, 2015).

Enfin, il est important de noter que si **p53** peut induire l'expression de REDD1 sous l'influence de certains stimuli provoquant des dommages à l'ADN, REDD1 **régule négativement p53** en retour à travers l'inhibition de mTOR (Vadysirisack *et al.*, 2011). Cette boucle de régulation permet alors probablement à la cellule de limiter l'effet pro-apoptotique induit par les dommages à l'ADN.

Selon le contexte cellulaire ainsi que le type de stimulus induisant des dommages à l'ADN, l'induction de **REDD1** peut être dépendante ou non de l'activation de **p53** dans la cellule. Quoi qu'il en soit, les deux protéines semblent étroitement **liées** par leur rôle majeur de régulateurs des **voies de réponse aux dommages à l'ADN**.

2.2.1. Fonctions de p53 : Réparation des dommages à l'ADN, Arrêt du cycle cellulaire et Apoptose

La protéine **p53**, codée par le gène *TP53*, est souvent décrite comme étant la « gardienne du génome » de la cellule. En réponse à de nombreux signaux de stress (**dommages à l'ADN**, activation d'un oncogène, hypoxie, etc), la protéine est stabilisée et activée et se lie à des séquences spécifiques au niveau des promoteurs de **ses gènes cibles**. Il est ainsi capable, en sa qualité de **suppresseur de tumeur**, d'induire un certain nombre de processus dont les principaux sont la **réparation de l'ADN**, l'**arrêt du cycle cellulaire** (transitoire ou permanent avec la **sénescence**) et l'**apoptose**. Le but ici n'est pas de dresser un portrait exhaustif du rôle de p53 dans la régulation de toutes ces voies mais de décrire son implication globale dans ces différentes fonctions.

Tout d'abord, suite aux dommages induits sur l'ADN (cassure double brin, erreur de réplication...), p53 est capable d'activer **plusieurs processus de réparations de l'ADN**. Il va ainsi pouvoir interférer dans la réparation des mésappariements (**MMR** : *Mismatch Repair*), la réparation par excision de base (**BER** : *Base Excision Repair*) ou encore la réparation par excision de nucléotides (**NER** : *Nucleotide Excision Repair*) (Sengupta and Harris, 2005), mais aussi dans des mécanismes de réparation induits par des cassures double-brins tels que la recombinaison homologue (**HR** : *Homologous Recombination*). Ces nombreux mécanismes de régulation des voies de réparation de l'ADN peuvent être dépendants ou indépendants de l'**activité transcriptionnelle** de p53 (*Figure 40*) (Williams and Schumacher, 2016). Son rôle peut être à la fois de **stimuler** les mécanismes de réparation (comme c'est le cas globalement pour la réparation par NER), ou parfois de **freiner** ces mécanismes. Par exemple, lors du processus de recombinaison homologue, la protéine **RAD51** qui se lie à l'ADN au niveau de sa cassure pour induire la reconstruction du brin, peut être **régulé négativement** de plusieurs manières par p53. Il existe en effet une **régulation transcriptionnelle** de cette protéine par liaison de p53 sur son promoteur (Arias-Lopez *et al.*, 2006), mais également par **interaction directe** de p53 avec la

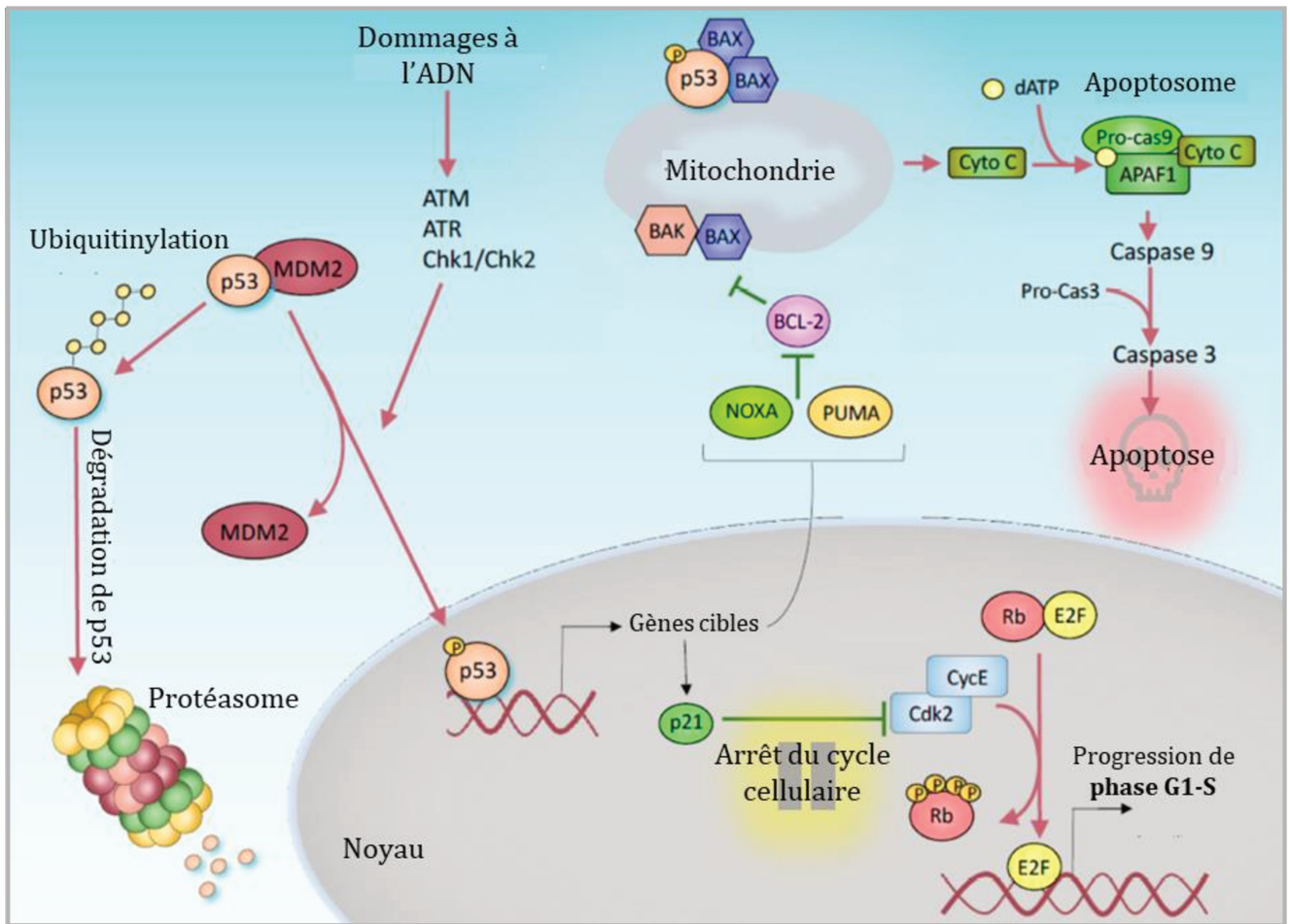


Figure 41 : Mécanismes principaux de régulation du cycle cellulaire et de l'apoptose par p53

Les modifications **post-traductionnelles** de p53 (ubiquitinylation, acétylation, phosphorylation) déterminent sa stabilité et son activation. MDM2 (**M**ouse **D**ouble **M**inute **2**) ubiquitine ainsi p53 en condition physiologique pour provoquer sa dégradation par le protéasome. En cas de dommages à l'ADN par exemple, des protéines comme **ATM** (Ataxia Telangiectasia Mutated) stabilisent et activent p53.

Les cibles transcriptionnelles principales de p53 sont **p21**, impliquée dans le contrôle de la progression du **cycle cellulaire**, et **PUMA** et **Noxa**, impliqués dans l'apoptose médiée par la libération de cytochrome c.

Figure adaptée de : Pitolli et al, 2019, Cancers

protéine RAD51, ce qui bloque le processus de réparation (Linke *et al.*, 2003). Selon l'importance des dégâts causés sur l'ADN et l'implication des différentes voies de réparation, p53 va réguler finement ces mécanismes pour conduire soit à l'arrêt temporaire du cycle cellulaire et à la réparation de l'ADN, soit à l'apoptose des cellules trop endommagées.

Ainsi, il a été montré que p53 activait de manière transcriptionnelle le gène *CDKN1A* codant pour la protéine **p21**, impliquée à la fois dans un arrêt du cycle cellulaire transitoire et permanent (El-Deiry *et al.*, 1993; Harper *et al.*, 1993; Tonnessen-Murray *et al.*, 2017). En effet, l'activation de p21 médiée par p53 inhibe l'activité des **CDKs 2 et 4** (*Cyclin Dependent Kinases 2/4*), ce qui résulte en l'inhibition du recrutement des différentes **cyclines** (A, E, D1) et donc de la phosphorylation de **Rb** (*Retinoblastoma tumor suppressor protein*). Cette hypo-phosphorylation de Rb empêche la transcription médiée par **E2F** des gènes inducteurs de la phase S (*Figure 41*). La transition de la phase G1 à la phase S est donc inhibée par l'axe p53-p21. La protéine peut également induire un arrêt du cycle cellulaire **en phase G2** via la régulation positive d'autres gènes cibles tels que GADD45 α (Growth Arrest And DNA Damage Inducible α) (Kastan *et al.*, 1992), 14-3-3 σ (Hermeking *et al.*, 1997) ou encore *Reprimo* (Ohki *et al.*, 2000). Dans le deuxième cas, il a été montré que 14-3-3 σ séquestre Cdc25c, ce qui l'empêche de déphosphoryler Cdc2 et d'initier la transition G2/M. Dans le dernier cas, il a été montré que *Reprimo* induisait également l'inhibition de l'activité de Cdc2 et la translocation dans le noyau de la cycline B1.

Lorsque l'activation de p21 est prolongée et son niveau d'expression est élevé, le maintien de la protéine Rb sous sa forme non phosphorylée permet le recrutement de **modificateurs de la chromatine** qui provoque la condensation de l'ADN (hétérochromatine), mettant sous silence les gènes responsables de la progression du cycle (Narita *et al.*, 2003).

La protéine p53 peut également réguler transcriptionnellement des membres **pro-apoptotiques** de la famille Bcl-2 tels que Noxa et PUMA/BBC3 (*Bcl-2 Binding Component 3*) (Villunger *et al.*, 2003). Ces derniers **inhibent** alors la protéine **anti-apoptotique Bcl-2** et provoquent l'apoptose des cellules. De plus, p53 peut contrôler l'apoptose des cellules par des mécanismes non-transcriptionnels. Ainsi, p53 peut se lier directement à **Bax** (*Bcl-2 Associated X, apoptosis regulator*) et **Bak** (*Bcl-2 Homologous Antagonist Killer*) dans le cytoplasme des cellules et augmenter la perméabilité de la membrane mitochondriale, ce qui permet l'efflux de facteurs apoptogènes (Cytochrome c) depuis la mitochondrie (Chipuk *et al.*, 2004; Leu *et al.*, 2004; Perfettini *et al.*, 2004). Enfin, comme nous l'avons vu précédemment, p53 peut induire l'expression de REDD1, qui peut avoir un rôle apoptotique.

En plus de tout cela, p53 peut réguler de nombreux autres processus tels que le métabolisme de la cellule, l'autophagie (par activation de la transcription de gènes associés à l'autophagie ou par inhibition négative de mTOR) ou encore la transition épithélio-mésenchymateuse (Pitolli *et al.*, 2019). Des mutations de

TP53, retrouvées fréquemment dans plusieurs types de cancer dont le mélanome (17% des cas) résultent en une perte de ses **fonctions physiologiques** de **suppresseur de tumeur**, et souvent à un gain de propriétés oncogéniques (Kim and Lozano, 2018).

2.2.2. Régulation de p53

Dans des conditions physiologiques, l'expression de p53 est maintenue à un niveau basal faible par l'ubiquitine ligase E3 **MDM2** (*Murine Double Minute 2*), qui se lie à p53 et provoque son **ubiquitinylation**, induisant alors sa dégradation par le protéasome (*Honda et al.*, 1997; *Kubbutat et al.*, 1997) (*Figure 40*). Cette action est réversible puisqu'il a été montré que sous l'influence de facteurs de stress, des protéines appelées USP (*Ubiquitin Specific Proteases*), telles que USP10 ou USP42 peuvent cliver les ubiquitines fixées à p53 et ainsi protéger la protéine de sa dégradation (*Hock et al.*, 2011; *Yuan et al.*, 2010).

De plus, en réponse à différents types de stress, la protéine p53, en plus d'être stabilisée, est activée par des modifications post-traductionnelles comme sa **phosphorylation** et son **acétylation** (Reed and Quelle, 2015; Vousden and Prives, 2009). Son acétylation sur un grand nombre de **lysine** induit un changement conformationnel de la protéine, et est essentielle à certaines fonctions de la protéine. Par exemple, l'acétylation de p53 en lysine 120 (K120) est cruciale pour induire son effet apoptotique via Bax et Puma (*Sykes et al.*, 2006). La **phosphorylation** de p53 en de nombreux sites permet en général une **stabilisation** de la protéine et est impliquée également dans ses fonctions sur le cycle cellulaire et l'apoptose (*Kruse and Gu*, 2008). Par exemple, les phosphorylations situées dans le domaine N-terminal de la protéine (comme celle en **Ser15**), induite par des dommages à l'ADN, permettent la stabilisation de p53 par inhibition de l'**interaction** p53-MDM2. Ces phosphorylations sont effectuées par des protéines impliquées dans le stress cellulaire telles que les kinases de la **famille des MAPK** (JNK, ERK, p38MAPK) ou les kinases des **points de contrôles de l'intégrité** du génome (ATR, ATM, CHK, etc).

Une fois stabilisé et activé, le facteur de transcription peut alors se lier aux séquences promotrices de ces gènes cibles, et effectuer ses fonctions.

3. Les fonctions cellulaires de REDD1

3.1.1. Effets sur la prolifération et la mort cellulaire

Lorsque l'expression de REDD1 est induite, sa fonction principale va être **d'inhiber la protéine mTOR** au sein du complexe mTORC1 (*Brugarolas et al.*, 2004; *Sofer et al.*, 2005). Il a tout d'abord été observé que cette inhibition sous dans un environnement hypoxique via *REDD1* était dépendante du **complexe TSC1/2**. Dans l'étude réalisée par *Sofer* et ses collègues l'année suivante, il est montré qu'un stress nutritionnel dans les fibroblastes induisait également l'inhibition de mTOR, comme en témoigne la diminution de la phosphorylation

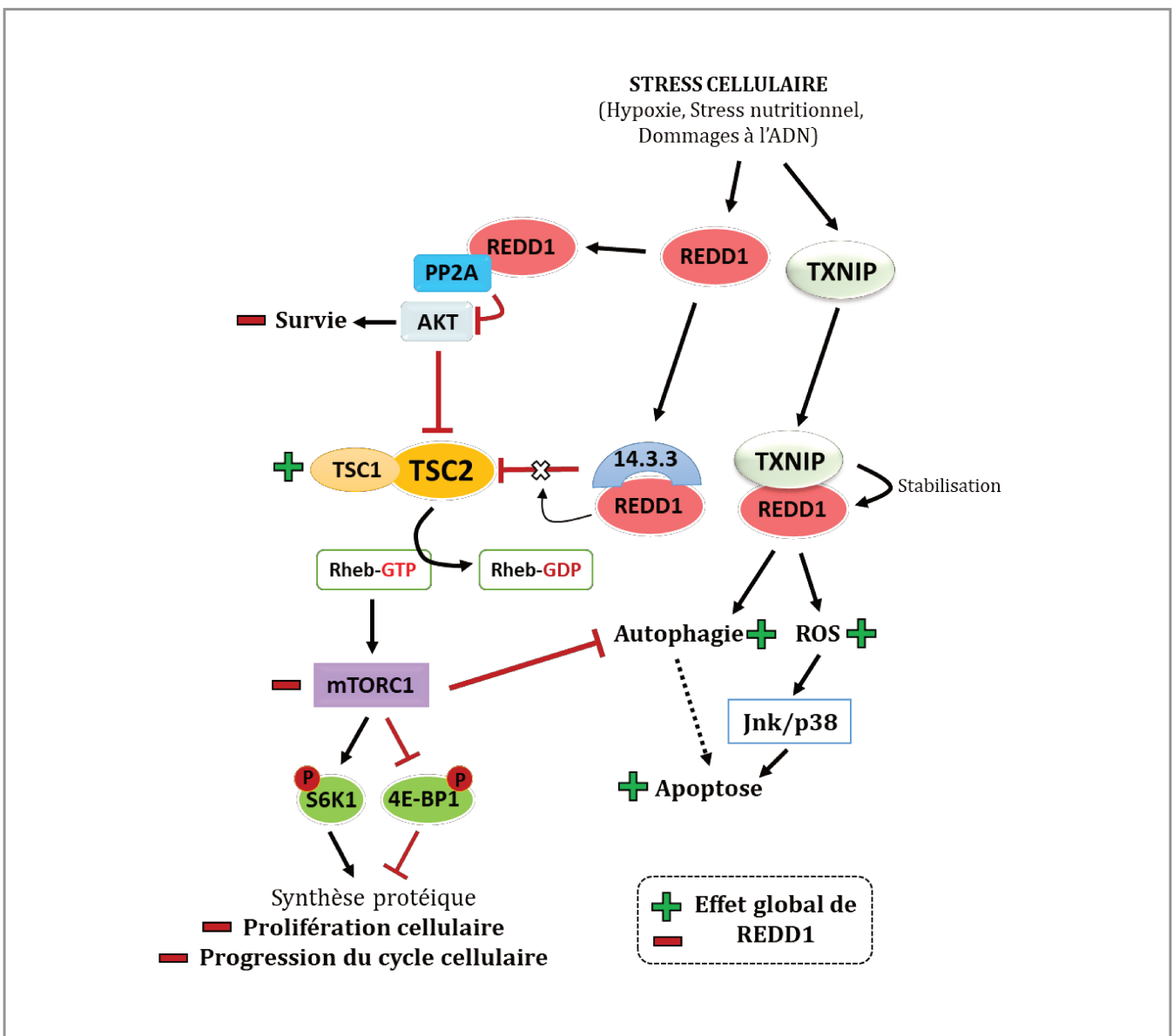


Figure 42 : Effets de REDD1 sur la prolifération des cellules et la mort cellulaire

Lors de stress cellulaires, **REDD1** est capable d'activer le complexe **TSC1/2** par sa liaison avec la protéine **14.3.3**, normalement fixée à TSC2. D'autre part, REDD1 peut induire la **déphosphorylation** d'Akt, la protéine pro-survie, par l'activation de la phosphatase PP2A, ce qui renforce son action positive sur le complexe TSC1/2. La protéine **TXNIP**, notamment induite lors d'un stress nutritionnel, participe également à la stabilisation de REDD1.

Le complexe TSC1/2 activé va alors inhiber l'**activité GTPase de Rheb**, ce qui va provoquer l'**inhibition de mTOR** et de la **phosphorylation** de ses substrats : **S6K1** et **4E-BP1**. L'inhibition de mTOR médiée par REDD1 va donc induire un **arrêt du cycle cellulaire**, une inhibition de la **prolifération** et une **induction de l'autophagie**. De plus, REDD1, notamment en complexe avec TXNIP, a également un effet direct sur l'induction de l'autophagie par formation d'autophagosomes et sur la **génération de ROS**, qui provoque l'**apoptose** des cellules. Cette apoptose est renforcée par l'inhibition d'Akt médiée par REDD1.

de ses cibles : **S6K** et **4EBP1**. Cette inhibition est **dépendante de REDD1** car elle n'est plus observée dans des cellules REDD1^{-/-}. Cet effet est également dépendant de **TSC2** et de l'inhibition de son substrat, la protéine **GTPase Rheb**. En revanche, même si l'activation de l'AMPK peut provoquer l'inhibition de mTOR de manière REDD1 dépendante, celle-ci n'est pas **requise** pour observer ce phénotype (Sofer *et al.*, 2005). La même équipe a ensuite montré que l'activation de TSC2 par REDD1 dans un milieu hypoxique résulte de sa liaison avec la **protéine 14-3-3**, qui inhibe en condition normale la protéine TSC2. **REDD1 libère** donc **TSC2** de sa liaison avec 14-3-3 et provoque son activation (DeYoung *et al.*, 2008). De plus, une autre équipe a montré qu'en réponse à un stress nutritionnel, REDD1 provoquait la **déphosphorylation d'Akt** en thréonine 308 (**Thr308**) par la **phosphatase PP2A**, ce qui induit l'activation de TSC2. En effet, en présence de facteurs de croissance, Akt est activé par phosphorylation et régule négativement TSC2. REDD1 semble servir d'intermédiaire entre PP2A et Akt puisque sa liaison à l'une ou l'autre des protéines est primordiale à l'activation de TSC2 (Dennis *et al.*, 2014). Par ailleurs, il a également été montré que la **Metformine** pouvait induire une inhibition de mTOR via REDD1, indépendamment de l'activation de l'AMPK mais **dépendante de l'expression de p53** (Ben Sahra *et al.*, 2011). Enfin, l'induction d'un stress énergétique provoque non seulement l'augmentation de REDD1 via l'activation d'**ATF4** mais aussi celle de la protéine **TXNIP** (*Thioredoxin-Interacting protein*), originellement impliquée dans la régulation du potentiel redox. Cette dernière va être responsable de la **stabilisation** de REDD1, provoquant ainsi l'inhibition de mTOR (Jin *et al.*, 2011) (*Figure 42*). Quel que soit le mécanisme d'inhibition de mTOR par REDD1 mis en jeu, ce dernier aboutit à une **diminution de la prolifération des cellules** par inhibition de la phosphorylation de ses deux effecteurs : **S6K** (*S6 Kinase*) et **4E-BP1** (*Eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1*). En effet, S6K cible la protéine ribosomale S6 (RPS6) et induit la synthèse de protéines alors que 4E-BP1 sous sa forme phosphorylée libère la protéine **eIF4E** qui provoque la traduction coiffe-dépendante de protéines impliquées dans le cycle cellulaire (Cycline D1, Myc, etc.). L'inhibition de ces deux protéines clés entraîne donc **un arrêt de la progression du cycle cellulaire** et de la **croissance des cellules**.

En plus de son effet sur la prolifération, l'inhibition de la voie Akt/mTOR par REDD1 peut conduire à la **mort cellulaire**. Tout d'abord, nous avons vu que REDD1 pouvait directement inhiber la **phosphorylation** en thr308 d'**Akt** via PP2A (Dennis *et al.*, 2014). Dans les cellules neuronales, REDD1 peut induire l'inhibition de la phosphorylation de la **ser473** en plus de celle de la thr308 (Malagelada *et al.*, 2008). Etant donné le rôle **pro-survie** d'Akt, son inhibition par REDD1 est un premier mécanisme pour induire la mort des cellules. Ensuite, en ciblant mTOR qui est un inhibiteur majeur de l'autophagie, REDD1 est capable de **promouvoir l'autophagie** des cellules, potentiellement jusqu'à la **mort autophagique**. Ainsi, il a été montré dans plusieurs types cellulaires (muscle squelettique, fibroblastes, lymphocytes ou lignées cancéreuses) que REDD1 était requis pour induire l'initiation d'une autophagie dépendante de **Ulk-1** en réponse à un stress énergétique, une hypoxie ou encore à l'utilisation de glucocorticoïdes (Liu *et al.*, 2018a; Molitoris *et al.*, 2011; Qiao *et al.*, 2015; Steiner *et al.*, 2015). Dans l'étude de Qiao et ses collègues, l'interaction de REDD1 avec la protéine pro-oxydante **TXNIP** en condition de stress favorise la **production de ROS** par **inhibition** de l'endopeptidase **ATG4B** (*Autophagy*

Related 4B) et provoque ainsi l'autophagie des cellules. Plus récemment, il a été montré dans les cardiomyocytes que TXNIP induisait la formation d'**autophagosomes** par son interaction avec REDD1, ce qui induit une autophagie dépendante de mTOR (Gao *et al.*, 2020). Un mécanisme d'induction de l'autophagie dépendant de TXNIP/REDD1, mais cette fois-ci indépendant de mTOR, a été également décrit dans un modèle d'ostéoarthrite (Alvarez-Garcia *et al.*, 2016). Enfin, dans des cellules cancéreuses de prostate, il a été montré que le facteur de transcription **C/EBPβ** (CCAAT/enhancer binding protein β) induit l'expression de REDD1, ce qui favorise la **formation d'autophagosome** et l'augmentation de LC3-II (Barakat *et al.*, 2016).

Dans la première étude sur REDD1, il est décrit que de manière contexte et cellule-dépendant(e), la protéine peut à la fois protéger de l'apoptose ou au contraire **sensibiliser certaines cellules à l'apoptose** induite par un stress oxydatif (Shoshani *et al.*, 2002). Depuis, quelques études ont soutenu le fait que REDD1 pouvait jouer un rôle pro-apoptotique dans les cellules. Dans un modèle de cancer du sein, **l'induction de ROS** par ajout d'arsenic et de mélatonine induit l'expression de REDD1, ce qui provoque l'apoptose des cellules *via* l'inhibition de mTOR et l'activation des protéines de stress **JNK/p38** (Yun *et al.*, 2016). Une autre étude montre que l'hyperglycémie, dans des cellules de rétine, peut provoquer la production de ROS *via* l'induction de REDD1 et induire par conséquent la mort des cellules (Miller *et al.*, 2018). Il semble donc qu'il y ait une boucle de régulation positive entre les ROS et REDD1. Dans des cellules endothéliales traitées avec du LPS, **l'inhibition de REDD1 empêche la génération de ROS** et de cytokines pro-inflammatoires et améliore la viabilité des cellules en supprimant l'apoptose (comme en témoigne l'augmentation de la protéine anti-apoptotique Bcl-2). Ce mécanisme est en partie dépendant de TXNIP (Hou *et al.*, 2018).

3.1.1. Effets de REDD1 sur la régulation mitochondriale

Comme nous venons de le voir, les effets de REDD1 sur la **mort cellulaire** peuvent être dépendant de la **génération** d'espèces réactives de l'oxygène (**ROS**). Cependant, l'effet de REDD1 sur la production mitochondriale de ROS n'est pas encore bien élucidé car les études sur ce sujet donnent des résultats contradictoires. Dans certains cas, **l'extinction de l'expression de REDD1** provoque une augmentation de la génération de ROS (Horak *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2019) et dans d'autres, une diminution (Hou *et al.*, 2018; Qiao *et al.*, 2015). Il est possible que ces contradictions soient dues aux différences d'intégrité mitochondriale dans les différents systèmes étudiés. Par exemple, REDD1 est **pro-oxydant** après un **traitement H₂O₂** non toxique pour la mitochondrie (400μM) (Ellisen *et al.*, 2002) ou après injection de glucose chez des souris diabétiques (30mM), ce qui ne touche pas directement la mitochondrie (Miller *et al.*, 2019). En revanche, REDD1 est **antioxydant** en réponse à des stimuli qui altèrent l'intégrité mitochondriale tels que de fortes concentrations de H₂O₂ et des radiations ionisantes (Liu *et al.*, 2019; Xu *et al.*, 2013). Des études plus approfondies sur le lien entre intégrité mitochondriales et génération de ROS sont nécessaires pour valider cette hypothèse. L'altération de la production de ROS médiée par REDD1 pourrait être également liée à son interaction avec la protéine pro-oxydante TXNIP (Alvarez-Garcia *et al.*, 2016; Jin *et al.*, 2011; Qiao *et al.*,

2015). Ainsi, le complexe REDD1-TXNIP pourrait améliorer le recyclage de la mitochondrie en favorisant la **mitophagie**. Ce processus permet la dégradation sélective par autophagie des mitochondries produisant des ROS. Encore une fois cependant, le rôle de REDD1 dans la mitophagie n'est pas très clair. Dans les ostéocytes et les macrophages, l'induction de REDD1 est capable d'augmenter la mitophagie (Alvarez-Garcia *et al.*, 2016; Ip *et al.*, 2017), mais dans les cellules musculaires, son expression n'est pas nécessaire à la mitophagie (Britto *et al.*, 2018). De plus, Britto et ses collègues ont montré que l'extinction de REDD1 provoque une régulation positive de l'AMPK, qui est elle-même favorise la mitophagie.

D'autres part, une étude a montré que lorsque REDD1 est éteint, la consommation d'oxygène (O₂) par les fibroblastes augmente (Lafarge *et al.*, 2014). Dans les muscles squelettiques, ce résultat est confirmé (Britto *et al.*, 2018). De plus, sa surexpression provoque une diminution de la **respiration mitochondriale**, corrélée à une diminution de la consommation d'O₂. Par ailleurs, il semble que la délétion de REDD1 favorise les **interactions** entre le réticulum endoplasmique et la mitochondrie. Or, ces zones d'interaction entre les deux organites, appelées MAM (*Mitochondrial-Associated ER-Membrane*), sont nécessaire au transfert du calcium du RE à la mitochondrie, ce qui permet la consommation d'oxygène et la génération d'ATP. Par conséquent, REDD1 pourrait provoquer une **diminution de la consommation d'oxygène** *via* la perturbation des MAM.

Enfin, la voie **Akt/mTOR** est impliquée dans la biogénèse de la mitochondrie. L'effet de REDD1, qui touche cette voie de signalisation, sur ces deux processus, reste également controversé. Par exemple, dans le muscle squelettique, la délétion de REDD1 n'a aucun effet sur l'expression des gènes de biogénèse mitochondriale, la synthèse de citrate et l'activité de de la cytochrome oxydase (Britto *et al.*, 2018), alors que dans les chondrocytes, la perte de REDD1 provoque une diminution du contenu mitochondriale et des marqueurs de la biogénèse (Alvarez-Garcia *et al.*, 2016).

4. Rôle de REDD1 dans le cancer

Etant donné le rôle de REDD1 dans l'inhibition de la voie mTOR, cette protéine est plutôt considérée intuitivement comme un **suppresseur de tumeur**. En effet, la délétion de REDD1 augmente la prolifération de fibroblastes embryonnaires de souris immortalisés implantés dans des souris Nude (Horak *et al.*, 2010). De plus, dans des cellules cancéreuses qui présentent une **faible expression** basale de **REDD1**, l'induction de la protéine par plusieurs molécules pharmacologiques provoque une **diminution de la croissance cellulaire** et de la **prolifération**. Des effets anti-cancéreux ont ainsi été démontré dans des cancers de la prostate, de l'estomac, du rein, de leucémie myéloïde aigue, de l'ovaire et du sein (Ben Sahra *et al.*, 2011; Chen *et al.*, 2017a; Liao *et al.*, 2018; Sinha *et al.*, 2014; Stevens *et al.*, 2019; Wang *et al.*, 2015). Plus récemment, une étude a montré que la **perte** de REDD1 amenait à la **progression tumorale** de cellules mutées pour *RAS* par reprogrammation métabolique. En effet, la perte de REDD1 augmente l'absorption de lysophospholipides, le stockage des lipides ainsi que l'oxydation des acides gras, ce qui permet à la fois de soutenir le **niveau d'ATP** et celui de **NADPH détoxifiant**, suffisant à la cellule tumorale pour survivre et proliférer (Qiao *et al.*, 2020). De manière intéressante, il a également été montré que l'expression de REDD1 était induite lors de **l'activation des**

lymphocytes T, et que son expression était essentielle à la prolifération et à la survie de ces cellules (Reuschel *et al.*, 2015). Ce processus pourrait donc également jouer un rôle au sein de la tumeur, où REDD1 pourrait agir comme un suppresseur de tumeur en favorisant la prolifération des lymphocytes T.

Par ailleurs, l'**expression constitutive** de la protéine REDD1 est en général associée à un **mauvais pronostic** dans différents cancers et à leur caractère malin. Cette expression constitutive est également associée à la résistance de certains cancer aux thérapies (Chang *et al.*, 2018; Pinto *et al.*, 2017). Dans le glioblastome par exemple, l'expression de REDD1 protège les cellules du manque d'oxygène (Foltyn *et al.*, 2019). D'autre part, dans le cancer du poumon, l'expression prolongée de REDD1 **inhibe** la boucle de régulation négative de mTORC1/S6K1 sur IRS1/PI3K/Akt, et promeut alors la survie des cellules (Jin *et al.*, 2013).

Ces résultats indiquent que l'**élévation transitoires de REDD1**, par un activateur pharmacologique par exemple, est intéressante pour contrôler la croissance tumorale, alors que l'expression soutenue et constitutive de REDD1 dans les tumeurs pourraient en revanche leur conférer des avantages en termes de survie et de résistance aux thérapies.

Au cours de cette introduction, nous avons donc exploré les aspects fonctionnels et de régulations de trois protéines importantes (**AMPK**, **MELK** et **REDD1**), situées au carrefour de voies métaboliques et cellulaires importantes à l'établissement et à la progression de différents cancers. Ces protéines, imbriquées dans un **réseau** de voies de signalisation régulant différents processus métaboliques mais aussi la prolifération, la survie ou la mort des cellules, ont en effet toutes un rôle important, parfois controversé ou contexte-dépendant, sur les cellules cancéreuses. Leur **modulation**, dans le cadre du mélanome ou d'autres cancers, est donc une piste très intéressante à examiner et a fait l'objet de la caractérisation d'une nouvelle molécule anti-mélanome développée au laboratoire : le CRO15.

RESULTATS

A. Résultats publiés

1. Contexte et hypothèse de travail

L'incidence du mélanome a fortement augmenté ces trente dernières années. Aujourd'hui, **plus de 280 000 cas** de mélanome sont recensés chaque année dans le monde. Cette tumeur au fort potentiel métastatique constitue un problème de santé publique majeur. En effet, malgré les progrès significatifs apportés ces dix dernières années dans la **prise en charge thérapeutique** du mélanome métastatique avec l'arrivée des thérapies ciblées et des immunothérapies, plus de 50% des patients ne disposent pas de solution thérapeutique leur procurant une réponse efficace à long-terme. L'identification de **molécules candidates** s'appuyant sur de **nouvelles stratégies** thérapeutiques est donc un élément incontournable pour la mise en place de biothérapies spécifiques contre le mélanome.

Ces dernières années, notre laboratoire s'est particulièrement intéressé aux **effets anti-mélanome** de la **Metformine**, une molécule appartenant à la famille des biguanides et traitement le plus utilisé pour le traitement du diabète de type 2. Parallèlement à d'autres groupes qui ont montré des effets antiprolifératifs de la Metformine dans différents cancers, notre équipe a montré que la Metformine (10 mM) induit de manière séquentielle un **arrêt du cycle cellulaire en phase G0-G1**, une **autophagie** puis une **apoptose** dans les cellules de mélanome (Tomic *et al.*, 2011). La mort des cellules est un effet à long-terme de la Metformine qui ne survient qu'après **72H/96H** de traitement. Par la suite, notre laboratoire a mis en évidence que la Metformine inhibait les **capacités d'invasion et de migration** des cellules de mélanome de manière **AMPK** et **p53** dépendantes (Cerezo *et al.*, 2013). Les effets pro-autophagiques/pro-apoptotiques ou anti-invasifs de la Metformine observés *in vitro* ont été confirmés dans des modèles *in vivo* de xénogreffe de lignées de mélanome humain dans la souris immunodéprimée.

Malgré ces résultats encourageants, **l'essai clinique** multicentrique **visant à évaluer l'efficacité de la Metformine en monothérapie** chez des patients atteints de mélanome métastatique (non répondants aux thérapies actuelles) **n'a pas démontré d'effet bénéfique** (Montaudié *et al.*, 2017). Cette différence avec les observations faites chez la souris peut notamment être expliqué par la **dose maximale recommandée utilisée** de 2540 mg/jour per os (soit environ **30-40 mg/kg chez l'Homme**) contre 2 mg/jour en injection intrapéritonéale soit environ **100 mg/kg chez la souris**). La **biodisponibilité** de la Metformine prise oralement chez l'Homme n'est donc probablement pas suffisante pour induire un effet anticancéreux dans cette étude. De plus, les patients recrutés pour cette étude ayant échoués au moins à deux lignes de traitements étaient à un stade très avancé de progression du mélanome. Les conditions n'étaient donc pas optimales pour observer un potentiel bénéfique de la Metformine en monothérapie.

Par conséquent, en collaboration avec l'équipe du Dr. Rachid Benhida à l'Institut de Chimie de Nice (ICN), nous avons développé et testé de nouveaux **composés dérivés** de la Metformine afin d'identifier une **molécule** présentant de meilleures **propriétés pharmacocinétiques** au site tumoral que celles de la Metformine, et susceptible d'améliorer la réponse clinique des patients atteints de mélanome. Après avoir **évalué** une centaine de nouvelles molécules dérivées de la Metformine par un **screening structure-activité**, un composé prometteur, appelé **CRO15**, a été sélectionné. D'abord identifié et en partie caractérisé par le Dr. Emilie Jaune, le composé a fait l'objet d'investigations ultérieures lors de ma thèse et ce travail a permis la publication d'un article scientifique dont nous sommes co-auteur principal (Jaune, Cavazza *et al.*, 2021).

1. Synthèse des résultats obtenus

Lors de ce travail, nous avons tout d'abord montré que CRO15, une molécule dérivée de la Metformine contenant un motif biguanide cyclisé et un anneau aromatique supplémentaire, pouvait induire la **mort des cellules de mélanome** indépendamment de leur statut mutationnel, à une dose 1000 fois moins importante que la Metformine (**Figure 1 de l'article**) (Tomic *et al.*, 2011). De manière intéressante, le traitement des cellules normales de la peau (mélanocytes, kératinocytes, fibroblastes) par CRO15 à cette même dose n'est pas toxique.

La Metformine étant un inhibiteur de la **respiration mitochondriale**, nous avons évalué les effets de CRO15 sur ce processus. Par une expérience utilisant la technologie *Seahorse* (Agilent), nous avons suivi le taux de **consommation d'oxygène** (O.C.R : *Oxygen Consumption Rate*) des cellules de mélanome au cours du temps. Nous avons alors pu constater que le CRO15 provoquait une **diminution de la respiration basale** des cellules de mélanome, dans une mesure moindre que la Metformine (**Figure 2 de l'article**), et induisait une diminution du **potentiel mitochondrial**. Cette altération de la respiration résulte en une diminution de la production d'ATP et en l'activation de la **voie AMPK**. Lorsque nous empêchons l'activation de cette voie (grâce à des adénovirus **dominant-négatifs** pour les formes catalytiques alpha 1/2 de l'AMPK), nous observons une **restauration partielle** de la viabilité des cellules de mélanome traitées avec du CRO15. La mort induite par le CRO15 est donc en partie dépendante de l'activation de l'AMPK. Afin de découvrir les **autres voies impliquées** dans le mécanisme d'action de CRO15, nous avons effectué un « **essai kinome** » *in vitro*, qui permet de mesurer la modulation de l'activité d'une centaine de **kinases** impliquées dans les processus de tumorigenèse en présence de **CRO15**. Nous avons ainsi mis en évidence que CRO15 inhibe la kinase **MELK**. Ainsi, nous avons confirmé que CRO15 interagissait avec MELK et induisait une diminution de son expression protéique ainsi que de son **activité** (**Figure 3 de l'article**). En conséquence, nous observons sous l'effet de CRO15 une diminution de l'expression des cibles indirectes de MELK impliquées dans le **cycle cellulaire** (NF-κB, CDK1, CDK2, Cycline-E). Comme évoqué dans l'introduction, MELK est également impliqué dans l'augmentation de la tolérance aux dommages à l'ADN dans les cellules cancéreuses. Il est donc attendu que son **inhibition par CRO15** induit une augmentation des dommages à l'ADN, comme en témoigne la phosphorylation des **senseurs** (H2AX, CHK2) et des **effecteurs** de la voie de réponse aux dommages à l'ADN (ATM, CHK2). De manière intéressante, la **surexpression de MELK** couplée à l'**inhibition de la voie AMPK** restaure complètement la

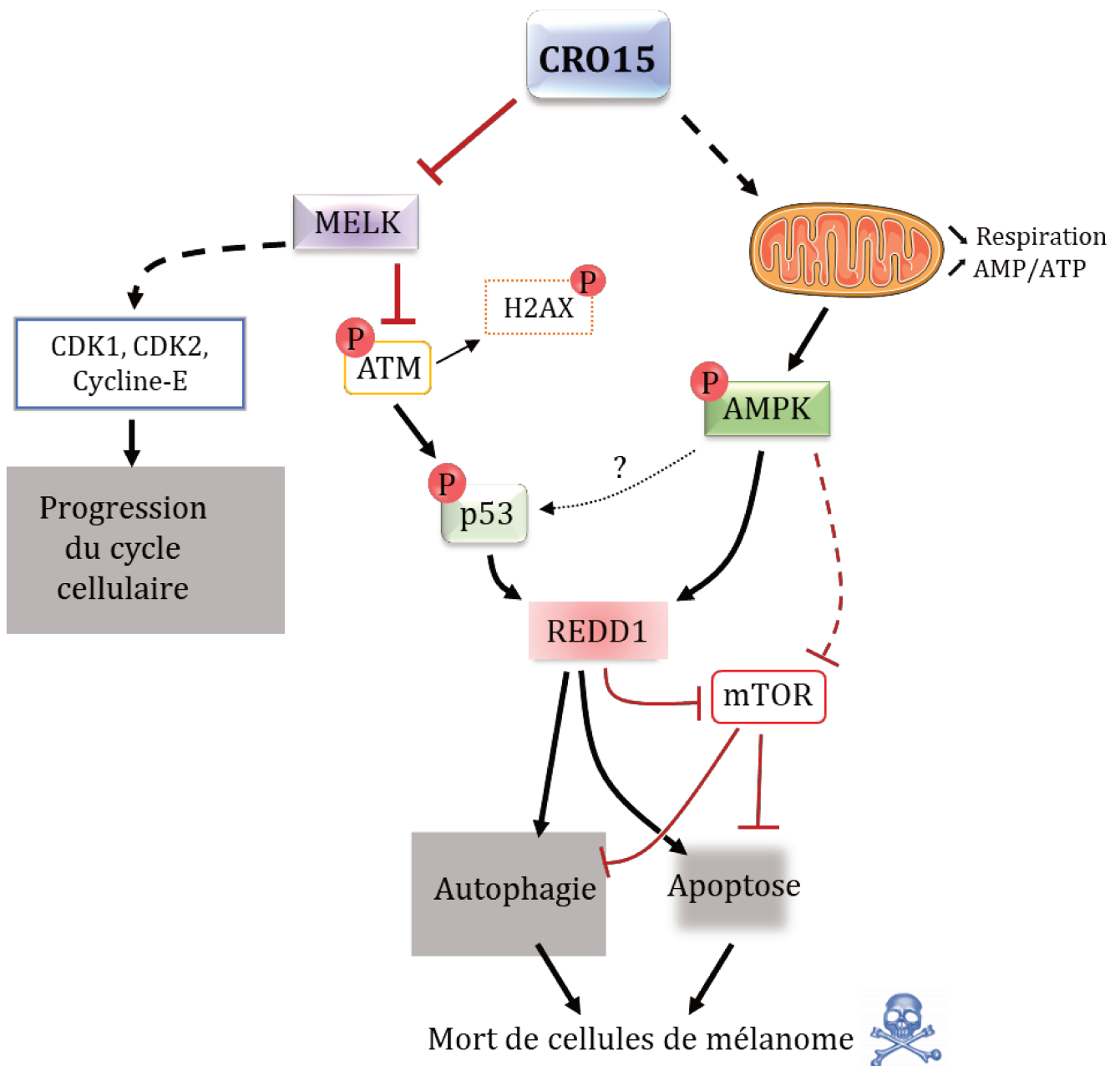


Figure R1 : Modèle du mode d'action de CRO15 sur les cellules de mélanome

CRO15 agit à travers deux mécanismes principaux : l'**activation** de la **voie AMPK** suite à l'induction d'un désordre mitochondrial, et l'**inhibition** de la kinase **MELK**. La modulation de ces deux voies par CRO15 converge vers l'activation de la protéine **REDD1** et provoque la mort des cellules de mélanome par **autophagie** et **apoptose**. L'inhibition de la kinase MELK conduit à la sensibilisation des cellules aux **dommages à l'ADN** et à la phosphorylation de **p53**. L'activation de p53, tout comme celle de la voie AMPK, induit l'expression de la protéine REDD1. REDD1 peut alors provoquer la mort des cellules par des mécanismes directs ou par inhibition de sa cible principale : **mTOR**.

AMPK : AMP-Activated Protein Kinase - *ATM* : Ataxia Telangiectasia Mutated - *CDK1/2* : Cyclin-Dependant Kinase 1/2 - *H2AX* : Histone H2A Member X - *MELK* : Maternal Embryonic Leucine Zipper Kinase - *mTOR* : mammalian Target Of Rapamycin - *REDD1* : Regulated In Development And DNA Damage Responses 1

viabilité des cellules en réponse au CRO15. Cela suggère que l'AMPK et MELK sont les deux cibles importantes impliquées dans le mécanisme de mort médié par notre molécule.

Par ailleurs, l'effet cytotoxique de CRO15 est moins intense dans les cellules cancéreuses **mutées pour TP53**. Ce phénotype est expliqué par le fait que la mort des cellules cancéreuses médiée par CRO15 est partiellement dépendante de **l'activation de p53** comme illustré par sa phosphorylation en sérine 15 (Ser15) ([Figure 4 de l'article](#)). La surexpression d'une forme exogène sauvage de p53 dans des cellules mutées *TP53* restaure l'effet cytotoxique de CRO15 sur ces cellules. De manière intéressante, CRO15 induit l'expression de **REDD1**, cible de p53, et cette induction **est atténuée**, mais toujours présente, lorsqu'on inhibe l'expression de p53. Nous avons ensuite cherché à déterminer **le type de mort** induit par notre molécule et avons découvert que CRO15 provoquait de manière parallèle et indépendante la **mort par autophagie** (conversion de LC3-I en **LC3-II**) et **l'apoptose** des cellules de mélanome (clivage de PARP et des caspases 3 et 9) ([Figure 5 de l'article](#)). De plus, nous observons à nouveau l'induction de l'expression de **REDD1** après le traitement des cellules par CRO15, et l'inhibition de la phosphorylation de mTOR, cible la plus connue de REDD1. Cette fois-ci, lorsque l'on **inhibe la voie AMPK** en parallèle de **l'extinction de p53**, l'induction de REDD1 est totalement inhibée et la viabilité des cellules traitées avec CRO15 est complètement restaurée. De manière similaire, **l'extinction de l'expression de REDD1** empêche l'induction de l'apoptose et de l'autophagie et restaure également complètement la viabilité des cellules en réponse au CRO15 ([Figure 5G et 5H de l'article](#)).

Etant donné les résultats intéressants observés *in vitro*, nous avons voulu observer l'effet du traitement quotidien de CRO15 dans un modèle de **xélogreffe de cellules de mélanome** mutées *BRAF* (A375) injectées dans des souris immunodéprimée *Nude*. Nous avons constaté que CRO15 induisait une **diminution importante** de la **croissance tumorale**, plus importante que celle observée avec la Metformine et comparable à celle observée avec un inhibiteur de BRAF, le PLX4032 (Vemurafenib) ([Figure 6 de l'article](#)). De manière intéressante, l'injection quotidienne de notre molécule ne semble pas toxique chez la souris, comme le montre la prise de poids des animaux et le dosage inchangé des transaminases hépatiques. A l'instar de nos observations *in vitro*, l'analyse des **coupes de tumeurs** a confirmé une induction de l'autophagie et de l'apoptose par CRO15 dans les cellules tumorales. Pour finir, nous avons voulu vérifier que notre molécule était efficace dans les cellules de mélanome qui ont acquis une **résistance aux thérapies ciblées**. Nous avons alors constaté que CRO15 était aussi capable d'induire la mort de cellules résistantes au PLX4032, par les **mêmes voies de signalisation et mécanismes** que ceux observés dans les cellules sensibles au Vemurafenib aussi bien *in vitro* qu'*in vivo* ([Figure 7 de l'article](#)).

Pour conclure, cette étude a montré que CRO15, un dérivé de la Metformine, était capable d'induire la mort des cellules de mélanome par autophagie et apoptose *via* deux mécanismes parallèles : **l'activation de la voie AMPK**, et **l'inhibition de la kinase MELK**. Ces modulations convergent alors, en partie à travers l'activation de la protéine p53, vers l'induction de l'expression de la protéine REDD1, responsable de la mort des cellules. Un **schéma récapitulatif** du mode d'action de CRO15 est proposé ci-contre ([Figure R1](#)).

ARTICLE

Open Access

Discovery of a new molecule inducing melanoma cell death: dual AMPK/MELK targeting for novel melanoma therapies

Emilie Jaune^{1,2,3}, Elisa Cavazza^{1,2,3}, Cyril Ronco^{3,4}, Oleksandr Grytsai^{3,4}, Patricia Abbe^{1,2,3}, Nedra Tekaya^{1,2,3}, Marwa Zerhouni^{1,2,3}, Guillaume Beranger^{1,2,3}, Lisa Kaminski^{3,5}, Frédéric Bost^{3,5}, Maeva Gesson^{1,2,3}, Meri Tulic^{1,2,3}, Paul Hofman^{6,7,8}, Robert Ballotti^{3,9}, Thierry Passeron^{1,2,10}, Thomas Botton^{1,2,3}, Rachid Benhida^{3,4} and Stéphane Rocchi^{1,2,3}

Abstract

In the search of biguanide-derived molecules against melanoma, we have discovered and developed a series of bioactive products and identified the promising new compound CRO15. This molecule exerted anti-melanoma effects on cells lines and cells isolated from patients including the ones derived from tumors resistant to BRAF inhibitors. Moreover, CRO15 was able to decrease viability of cells lines from a broad range of cancer types. This compound acts by two distinct mechanisms. First by activating the AMPK pathway induced by a mitochondrial disorder. Second by inhibition of MELK kinase activity, which induces cell cycle arrest and activation of DNA damage repair pathways by p53 and REDD1 activation. All of these mechanisms activate autophagic and apoptotic processes resulting in melanoma cell death. The strong efficacy of CRO15 to reduce the growth of melanoma xenograft sensitive or resistant to BRAF inhibitors opens interesting perspective.

Introduction

Melanoma is the most aggressive skin cancer and possesses a strong invasive capability that allows the development of metastasis principally in the lymph nodes, liver, lungs, and central nervous system. Metastatic melanoma is one of the deadliest cancers because of its ability to develop resistance to current therapies.

For 15 years, targeted therapies against BRAF (mutated in 50–60% of primary melanoma) or MEK protein has been developed, and some of them are commercialized,

including BRAF inhibitors such as vemurafenib (or PLX4032), dabrafenib and encorafenib, as well as MEK inhibitors such as selumetinib, trametinib, cobimetinib or binimetinib¹. The results with combination between BRAF and MEK inhibitors seem promising with an increase in the median progression-free survival (9.9 months for combination versus 6.2 months for BRAF inhibitors alone) and shrinkage of the tumor^{2,3}. However, after a few weeks of treatment, patients develop strong resistance to therapies, allowing metastasis growth and relapse^{4–6}.

Melanoma cells have the capacity to escape the immune response. This observation led to the development of immune checkpoint inhibitors allowing the reactivation of the immune system to kill melanoma cells^{7,8}. Currently, two different types of immunotherapies are available in the form of blocking antibodies: Ipilimumab (anti-CTLA-4) and Nivolumab or Pembrolizumab (anti-PD-1). Ipilimumab targets the CTLA-4 receptor of CD4+ T cells

Correspondence: Thomas Botton (Thomas.BOTTON@univ-cotedazur.fr) or Rachid Benhida (benhida@unice.fr) or Stéphane Rocchi (srocchi@unice.fr)

¹INSERM, U1065, Equipe 12, Centre Méditerranéen de Médecine Moléculaire (C3M), Bâtiment ARCHIMED, 151 route de saint Antoine de Ginestière, 06204 Nice cedex 3, France

²Equipe Labellisée Fondation pour la Recherche Médicale (FRM) 2020, Paris, France

Full list of author information is available at the end of the article

These authors contributed equally: Emilie Jaune, Elisa Cavazza

Edited by D. Aberdam

© The Author(s) 2021



Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

allowing their activation. This treatment increases survival rate in patients, but only 15% respond to this treatment⁹. PD-1 is also expressed on T cells and its expression inhibits T cell activation. Its target PDL-1 is widely found in melanoma cells. Anti-PD-1 treatment elicits a response in approximately 30% of patients¹⁰. Even if these responses are objective and long-lasting, approximately 65–70% of patients do not respond to this treatment. More recently, the result of phase III trial using combination of ipilimumab and nivolumab demonstrated an increase of efficacy compared with ipilimumab alone with the detriment of higher toxicity¹¹. Indeed, grade 3/4 toxicity rate were observed in 55% cases for combination therapy. Thus, identification of new anti-melanoma compounds is essential to developing new therapies.

In this perspective, we previously used a structure/function approach that led to the characterization of the anti-melanoma properties of Thiazolbenzenesulfonamide (TZB). We thus identified HA15 as the lead compound of this family, able to trigger melanoma cell death by induction of a strong endoplasmic reticulum stress¹².

Here, we use a similar approach to improve the biological activity of biguanides on melanoma.

Metformin is the most commonly used biguanide in diabetic treatment. It assumes little side effects and is well tolerated. A number of studies have shown that metformin induces cell death by apoptosis in numerous types of cancer, including melanoma¹³. We have shown that metformin is responsible for cell cycle arrest of melanoma cells in G1–G0 after 24 h of treatment^{14–16}. This cell cycle arrest induces AMPK pathway activation, which activates autophagy and apoptosis signaling cascades, leading to melanoma cell death. In vivo, we have demonstrated that metformin decreases tumor growth in a xenograft mouse model¹⁴. Furthermore, we have shown that metformin decreases the invasive capacity of melanoma cells in an AMPK/p53 dependent manner without affecting their cell migration ability¹⁶. These results were confirmed by the observation that metformin strongly decreases melanoma pulmonary metastasis formation in C57BL/6 mice. These results prompted us to perform a multicentric clinical trial aiming to test the efficacy of metformin as monotherapy for melanoma treatment. Unfortunately, very few patients responded to this treatment¹⁷. It is worth noting that metformin has low activity (IC_{50} in the millimolar range) and low oral bioavailability requiring therefore high daily dose for treatment of cancer. Moreover, taking into account the small molecular size of metformin, its pleiotropic effects and mechanism of action remain unclear and controversial.

As a result, we started a medicinal chemistry program aimed at developing new metformin-derived molecules with improved potency and suitable pharmacological profile to obtain a better response in patients. After an

initial screening, an extensive structure-activity-based hit-to-lead optimization led us to identify a new potential candidate called CRO15.

Results

CRO15 exerts deleterious effects on melanoma cell viability

After extensive screening of new molecules derived from metformin, based on structure/activity characteristics, a lead compound, called CRO15, with an original structure was discovered. This molecule, described in Fig. 1A, shows a biguanide cyclized form, with an additional aromatic ring compared to metformin.

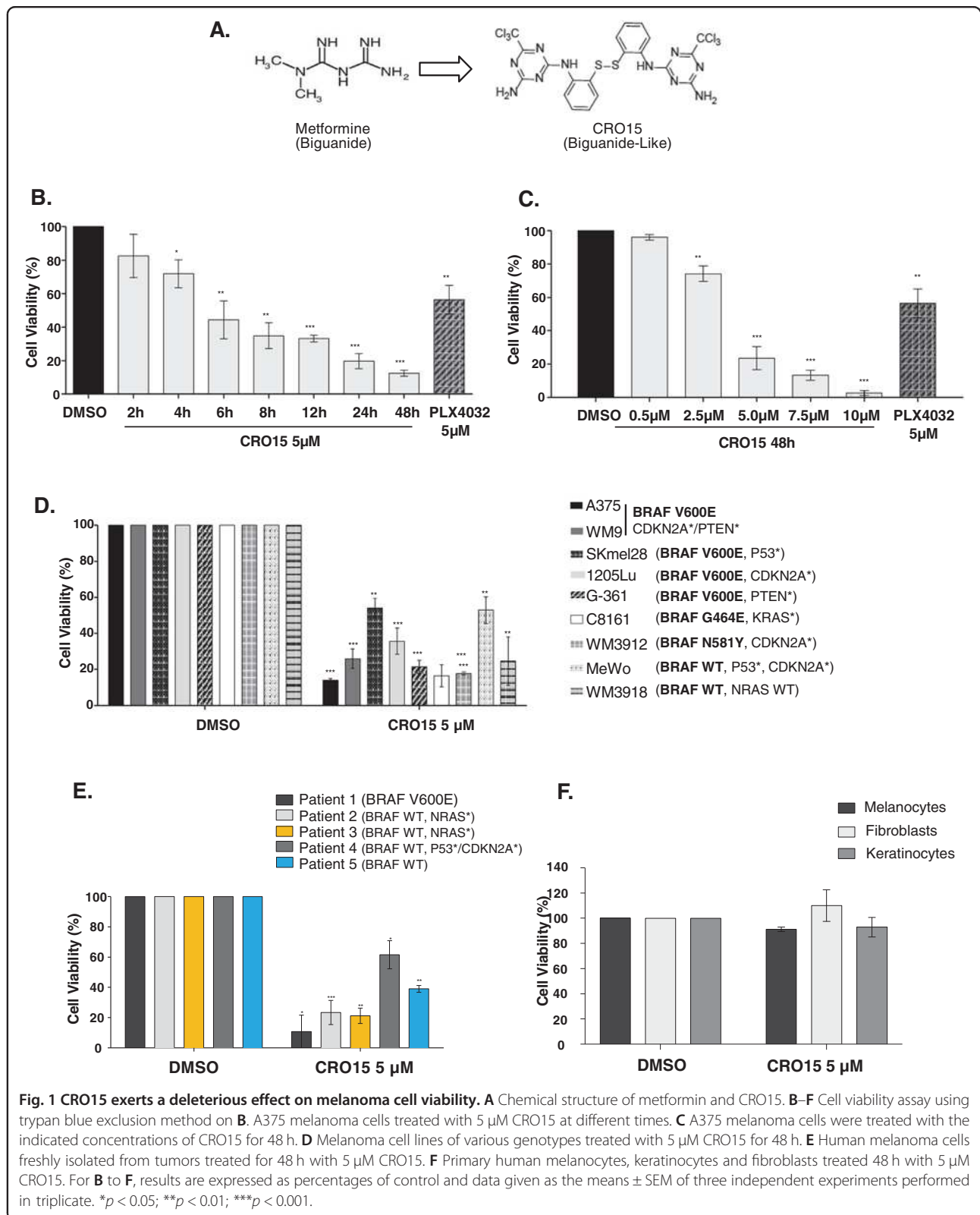
The effect of CRO15 on melanoma cells viability was determined using a blue trypan exclusion assay. Time course experiments showed that after 4 h of treatment with 5 μ M CRO15, melanoma cell viability decreased in comparison to the DMSO control condition (Fig. 1B). These experiments were performed in A375 melanoma cells, which are sensitive to BRAF inhibitors. After 48 h of treatment, only 15% of melanoma cells were still alive.

Figure 1C shows a dose-dependent response after 48 h of treatment of A375 melanoma cells with CRO15. The 50% inhibitory concentration (IC_{50}) of this molecule was identified to be between 2.5 and 5 μ M. Our previous results obtained on the same cell line demonstrated that metformin was inducing cell death after 96 h of treatment at 5 and 10 mM¹⁴. The effects of CRO15 were confirmed on other melanoma cell lines with various mutational statuses (Fig. 1D). We observed a large decrease in melanoma cell viability after 48 h, independent of their mutations. The anti-melanoma effects of CRO15 were also confirmed in a more physiological model of melanoma cell cultures freshly isolated from patient tumors with BRAF mutation (Patient 1), NRAS mutation (Patients 2 and 3), PTEN and p53 mutations (Patient 4) and with no known mutation (Patient 5). Importantly, we observed no toxicity of CRO15 (5 μ M) on normal human cells, such as melanocytes, fibroblasts and keratinocytes, at 48 h of treatment (Fig. 1F).

CRO15 induces a mitochondrial disorder and activates AMPK pathway

To understand the signaling pathway induced by CRO15, we first examined metabolic alterations and AMPK pathway activation. Indeed, it is known that metformin can induce the AMPK (*AMP-activated* protein kinase) pathway by inhibition of the complex I of the respiratory chain of mitochondria.

To determine whether CRO15 has the same effects as metformin, we first studied the mitochondrial potential of melanoma cells after drug treatment (6 h) by Seahorse experiments (Fig. 2A). We observed a significant reduction in basal mitochondrial respiration in response to



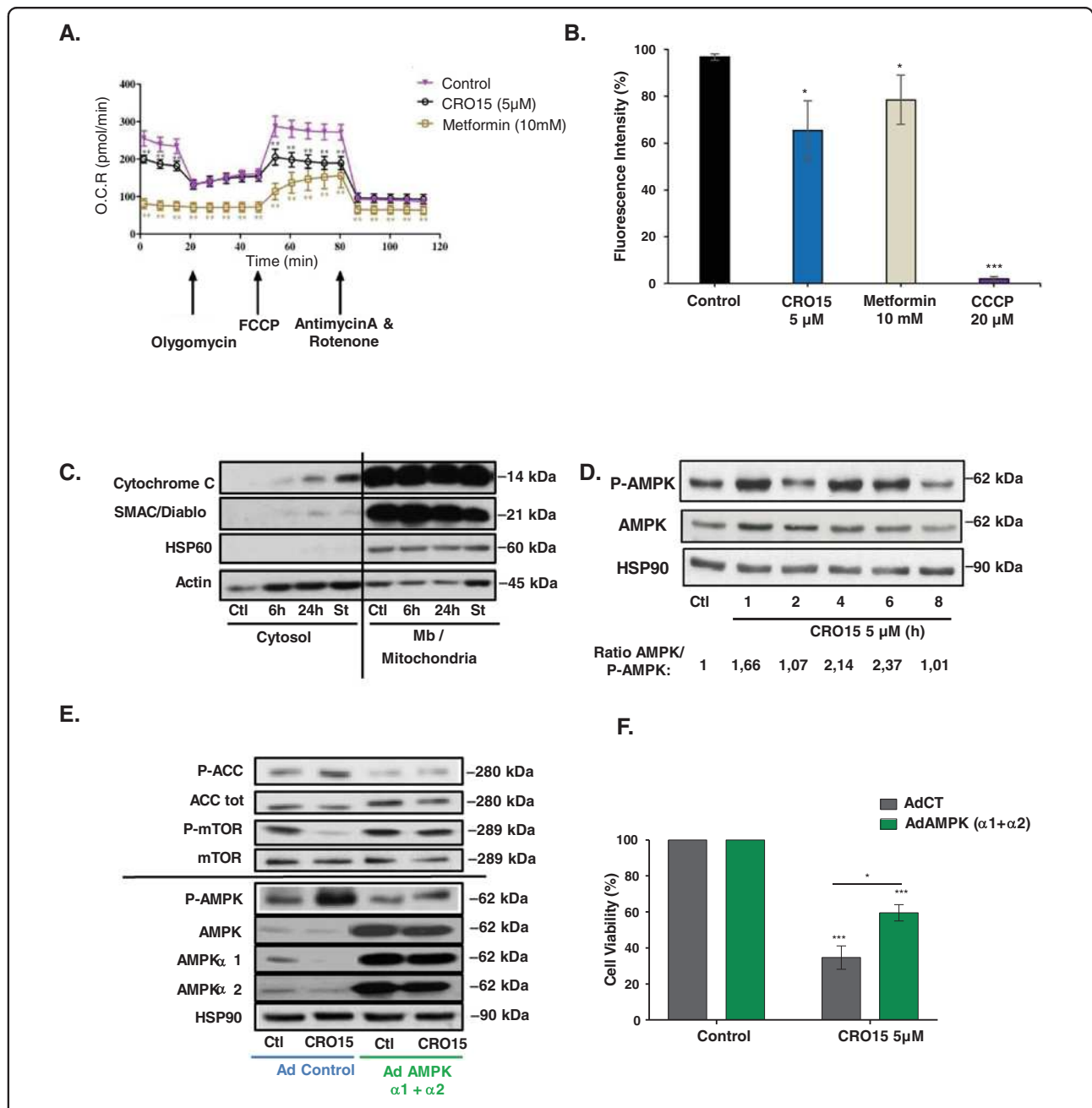


Fig. 2 CRO15 induces a mitochondrial disorder and activates AMPK pathway. **A** Measurement of mitochondrial function in A375 melanoma cells with a Seahorse XF Cell Mito stress test after 6 h of treatment with 5 µM CRO15, 10 mM metformin or DMSO used as control. At 20 min, cells are treated with oligomycin, an inhibitor of complex V of respiratory chain; at 50 min, with FCCP, which disrupts the mitochondrial membrane potential; and at 80 min, with Rotenone and antimycin A, inhibitors of complex I and III, respectively. **B** A375 cells were treated with 5 µM CRO15 (6h), 10 mM metformin (6h) or 20 µM CCCP (20 min). Measurement of mitochondrial potential membrane was performed by flow cytometry with a TMRE probe. **C** Lysates from A375 melanoma cells exposed for the indicated durations to CRO15 were analyzed by western blotting using the indicated antibodies after cell fractionation. One representative experiment of three is shown. **D** Lysates from A375 cells treated with 5 µM CRO15 for the indicated durations were analyzed by western blotting using the indicated antibodies. One representative experiment of three is shown. **E** Lysates from A375 cells transduced with dominant negative AMPK subunits α1 and α2 for 24 h and treated with 5 µM CRO15 were analyzed by western blotting using the indicated antibodies. One representative experiment of three is shown. **F** Quantification of cell viability from **E** using trypan blue exclusion method. Results are expressed as percentages of DMSO control and data given as the means ± SEM of three independent experiments performed in triplicate. **p* < 0.05; ***p* < 0.01; ****p* < 0.001.

CRO15, which was not as great as that seen with metformin. Interestingly, the results showed a problem in restoration of maximal respiration after FCCP injection. This experiment demonstrates that although CRO15 does not have exactly the same efficiency as metformin on mitochondrial respiration, it induces significant dysregulations. To confirm the effects of CRO15 on mitochondrial metabolism, we measured mitochondrial transmembrane potential in melanoma cells (Fig. 2B). We used TMRE, a cell-permanent dye that readily accumulates in active mitochondria. Depolarized or inactive mitochondria have decreased membrane potential and fail to sequester TMRE. We observed a depolarization of the mitochondria in response to metformin (10 mM) but also CRO15 treatment (5 μ M). This result was confirmed by a decrease in ATP production after CRO15 treatment (Supplemental Fig. 1A) and a release of cytochrome C and SMAC/Diablo in the cytoplasm after 6 and 24 h of treatment with CRO15 (Fig. 2C).

Dysregulation of mitochondria implicated activation of signaling pathways such as the AMPK pathway. Indeed, a decrease in ATP/AMP ratio is responsible for activation by phosphorylation of AMPK. Thus, treatment with CRO15 induced a time-dependent phosphorylation of AMPK on multiple melanoma cell lines (Fig. 2D and Supplemental Fig. 1B) but had minimal effects on melanocytes and fibroblasts consistent with its lack of toxicity normal cells (Supplemental Fig. 1C).

AMPK kinase can act on many effectors. For example, AMPK activation can induce the phosphorylation of ACC (*Acetyl-CoA carboxylase*) and the dephosphorylation of mTOR (*mammalian target of rapamycin*) and thus inactivates their activities and stop diverse metabolisms activities. To confirm the involvement of the AMPK pathway in the mechanism of action of CRO15, we infected A375 cells with adenoviruses expressing dominant negative forms of AMPK α 1 and α 2, the two catalytic subunits of AMPK kinase. These adenoviruses, by expression of dominant negative forms of AMPK, shut down activation of endogenous AMPK (Fig. 2E) and partially restored cell viability of melanoma cells treated with CRO15 (5 μ M) for 24 h (Fig. 2F). These results demonstrate that the AMPK pathway plays a role in CRO15-induced decrease in melanoma cell viability.

CRO15 inhibits MELK kinase activity

To discover other pathways implicated in CRO15 mechanisms, we performed a kinome assay in comparison to metformin in which more than 120 kinases involved in cancer were analyzed (Table 1). This *in vitro* experiment allowed us to observe the percentage of direct modulation of different kinase activities induced by CRO15 in function of Z' factor (Fig. 3A). We showed a strong inhibition of activity of MAPKAPK2 (inhibition: 90%, Z': 0.82) and

Table 1 Results of *in vitro* Kinome assay in response to CRO15 (1 μ M) or metformin (1 mM) (n = 2).

Kinase			CRO15 1 μ M	Metformin 1 mM
MAPKAPK2	Activity	Km app	90	-2
AKT2 (PKB beta)	Activity	100	74	3
GSK3B (GSK3 beta)	Activity	Km app	72	2
MELK	Activity	Km app	72	2
JAK2	Activity	Km app	64	-1
MAPK8 (JNK1)	Binding		64	-5
FER	Activity	Km app	61	7
SRC	Activity	Km app	49	22
ABL1 T315I	Activity	Km app	46	0
CHEK1 (CHK1)	Activity	Km app	42	6
AKT1 (PKB alpha)	Activity	Km app	40	0
YES1	Activity	Km app	40	7
AURKA (Aurora A)	Activity	Km app	39	4
WEE1	Binding		39	4
GSK3A (GSK3 alpha)	Activity	Km app	38	5
MAPK9 (JNK2)	Binding		36	-3
EPHA7	Binding		35	-7
BRAF V599E	Activity	100	34	4
CDK5/p35	Activity	Km app	33	4
AMPK (A1/B2/G3)	Activity	Km app	32	1
CHEK2 (CHK2)	Activity	Km app	28	6
MAP3K14 (NIK)	Binding		28	0
ABL1	Activity	Km app	27	3
MAPK10 (JNK3)	Binding		27	0
MST1R (RON)	Activity	Km app	27	-2
BLK	Activity	Km app	26	0
MAPK7 (ERK5)	Activity	Km app	25	4
MST4	Activity	Km app	24	15
AMPK (A1/B2/G2)	Activity	Km app	23	7
FGFR1	Activity	Km app	23	-12
RPS6KB1 (p70S6K)	Activity	Km app	22	1
ERN1	Binding		21	1
KDR (VEGFR2)	Activity	Km app	21	3
AMPK (A1/B1/G2)	Binding		20	2
MET (cMet)	Activity	Km app	20	-4
PRKCH (PKC eta)	Activity	Km app	20	5
EPHB4	Activity	Km app	19	5
FES (FPS)	Activity	Km app	19	1
IKKBK (IKK beta)	Activity	Km app	19	1
MAP2K1 (MEK1)	Activity	100	19	16
PRKCQ (PKC theta)	Activity	Km app	19	-4
ROS1	Activity	Km app	19	3
CSNK1G3 (CK1 gamma 3)	Activity	Km app	18	2
RAF1 (cRAF) Y340D Y341D	Activity	100	18	4
EGFR (ErbB1) T790M L858R	Activity	Km app	16	-1
PAK1	Activity	Km app	16	-1
PIM1	Activity	Km app	16	0
BRAF	Activity	100	15	11
AMPK (A1/B1/G3)	Binding		14	2
DYRK1B	Activity	Km app	14	3

Table 1 continued

Kinase			CRO15 1 μ M	Metformin 1 mM
KIT	Activity	Km app	14	-2
MAPK1 (ERK2)	Activity	Km app	14	6
DDR2	Binding		13	-1
MAPK3 (ERK1)	Activity	Km app	13	9
NTRK3 (TRKC)	Activity	Km app	13	1
AXL	Activity	Km app	12	0
DNA-PK	Activity	Km app	12	4
HCK	Activity	Km app	12	5
MAPK11 (p38 beta)	Activity	Km app	12	12
PDGFRA D842V	Activity	Km app	12	2
PLK2	Activity	Km app	12	11
CSK	Activity	Km app	11	10
PDK1	Activity	100	11	6
FGFR2	Activity	Km app	10	-4
FLT3 D835Y	Activity	Km app	10	5
HIPK3 (YAK1)	Activity	Km app	10	3
PDGFRA (PDGFR alpha)	Activity	Km app	10	0
AMPK (A2/B2/G3)	Activity	Km app	9	12
CDK1/cyclin B	Activity	Km app	8	5
DAPK3 (ZIPK)	Activity	Km app	8	0
DYRK2	Binding		8	1
FGFR3	Activity	Km app	8	1
IGF1R	Activity	Km app	8	2
IKBKE (IKK epsilon)	Activity	Km app	8	2
ERBB4 (HER4)	Activity	Km app	7	1
MAPK14 (p38 alpha) Direct	Activity	Km app	7	7
PRKACA (PKA)	Activity	Km app	7	16
DCAMKL1 (DCLK1)	Activity	Km app	6	7
EGFR (ErbB1) T790M	Activity	Km app	6	-2
EIF2AK2 (PKR)	Binding		6	12
FLT4 (VEGFR3)	Activity	Km app	6	4
FRAP1 (mTOR)	Activity	Km app	6	3
PAK4	Activity	Km app	6	2
RET	Activity	Km app	6	0
CSNK1G2 (CK1 gamma 2)	Activity	Km app	5	-2
KIT D816H	Binding		5	13
PRKCI (PKC iota)	Activity	Km app	5	-3
PRKCZ (PKC zeta)	Activity	Km app	5	6
PTK2 (FAK)	Activity	Km app	5	2
EGFR (ErbB1) L861Q	Activity	Km app	4	1
EPHA2	Activity	Km app	4	9
MAP2K2 (MEK2)	Activity	100	4	7
NIM1K	Activity	Km app	4	9
ROCK1	Activity	Km app	4	0
CDK2/cyclin A	Activity	Km app	3	11
CSNK1G1 (CK1 gamma 1)	Activity	Km app	3	6
DCAMKL2 (DCK2)	Activity	Km app	3	4
EGFR (ErbB1) L858R	Activity	Km app	3	-3
HIPK2	Activity	Km app	2	7
MAPK12 (p38 gamma)	Activity	Km app	2	4
MERTK (cMER)	Activity	Km app	2	4

Table 1 continued

Kinase			CRO15 1 μ M	Metformin 1 mM
MAPK13 (p38 delta)	Activity	Km app	1	14
TAKO2 (TAO1)	Activity	Km app	1	9
ERBB2 (HER2)	Activity	Km app	0	3
FLT1 (VEGFR1)	Activity	Km app	0	1
ZAP70	Activity	Km app	0	0
FGFR4	Activity	Km app	-1	8
TEK (Tie2)	Activity	Km app	-1	5
FLT3	Activity	Km app	-2	6
EGFR (ErbB1)	Activity	Km app	-4	2
AMPK (A1/B2/G1)	Binding		-5	2
AMPK (A2/B2/G1)	Binding		-5	5
ALK	Activity	Km app	-7	5
AMPK (A2/B2/G2)	Binding		-8	0
MAPK15 (ERK7)	Binding		-11	1
KIT V560G	Activity	Km app	-13	6
NTRK1 (TRKA)	Activity	Km app	-14	2
BMX	Activity	Km app	-22	7
PRKD1 (PKC mu)	Activity	Km app	-56	18

MELK kinase (inhibition: 72%, Z' : 0.90). Our results regarding MAPKAPK2, also known as MAPK2, indicate that this kinase is not involved in AMPK-independent effects of CRO15 in intact cells as its downstream effector HSP27 is not modulated (Supplemental Fig. 2A). Indeed, MAPK2 is also directly regulated by p38 MAPK protein, which, is activated under CRO15 treatment.

We thus focused our attention on MELK (*maternal embryonic leucine zipper kinase*). This kinase is described to be an oncogene and is overexpressed in multiple cancers, including melanoma^{18,19}. Furthermore, MELK promotes mitosis and proliferation of melanoma cells via the NF- κ B pathway²⁰ and increases DNA damage tolerance to promote proliferation of breast cancer cells²¹.

As shown in Fig. 3B, a probe consisting in CRO15 labeled with a fluorescent tag showed a strong colocalization of CRO15 with MELK antibody (approximately 60%) in CT26 cells supporting an interaction between CRO15 with MELK. We next determined in vitro inhibition of MELK activation by CRO15 in comparison with a known MELK inhibitor, OTS167 (Fig. 3C). As OTS167, CRO15 decreases MELK activity in a dose-dependent manner. However, in contrast to CRO15, OTS167 is toxic to normal cells, such as melanocytes, keratinocytes, and fibroblasts (Supplemental Fig. 2C).

To determine whether MELK is a target of CRO15 in intact cells, we performed pull-down and biotin precipitation experiments in A375 cells infected with a MELK adenovirus and treated with a biotin-tagged CRO15. For the pull-down experiment, A375 lysates were incubated overnight with 100 μ M biotin-CRO15 or

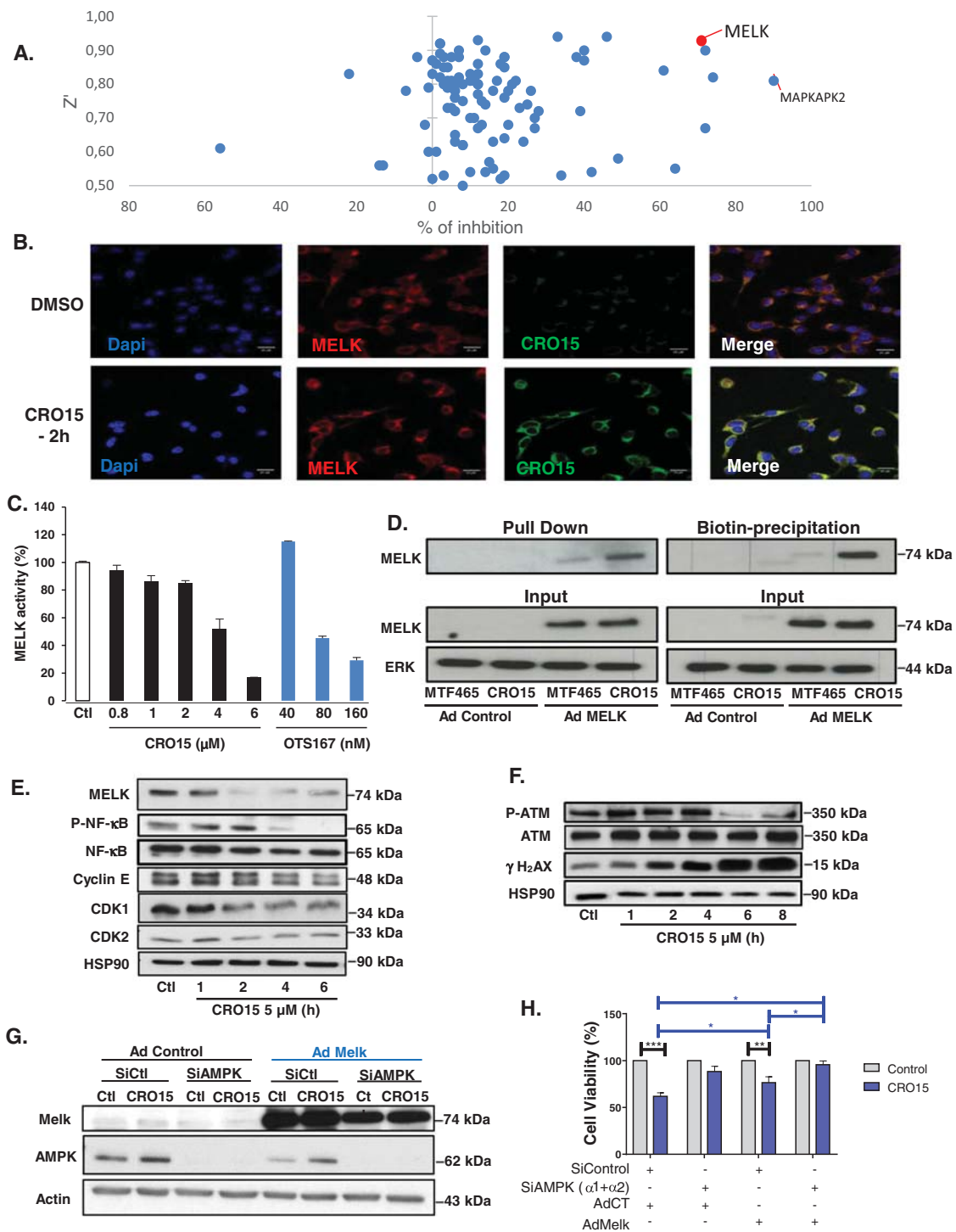


Fig. 3 (See legend on next page.)

(see figure on previous page)

Fig. 3 CRO15 inhibits MELK kinase activity. **A** Scatter plot representing the percentage of kinase inhibition and their Z' factor measured during two independent in vitro kinase assay with 1 μ M CRO15. **B** Immunofluorescence pictures of CT26 cancer cells treated with 5 μ M CRO15 for 2 h. MELK was labeled with a specific antibody (in red), CRO15 was coupled to a fluorescent tag (in green) and nuclei were stained with DAPI (in blue). **C** In vitro test of kinase activity using recombinant MELK protein treated with CRO15 with the MELK inhibitor OTS167. **D** A375 cells were infected with MELK adenovirus for 24 h. For the pull down assay, cells lysates were incubated overnight with 100 μ M Biotin-CRO15 or its inactive analog MTF465. For Biotin precipitation, cells were treated for 2 h with 20 μ M Biotin-CRO15 or MTF465 before lysis and western blot analysis with the indicated antibodies. One representative experiment of three is shown. **E** and **F** A375 cells were treated with 5 μ M CRO15 with the indicated durations, and lysates were analyzed by western blotting using the indicated antibodies. One representative experiment of three is shown. **G** A375 cells were transfected with siRNA directed against AMPK α 1 and AMPK α 2 (20 nM each) or 40 nM of control siRNA. Twenty-four hours later, cells were infected with a MELK adenovirus or a control adenovirus before treatment with 5 μ M of CRO15. After 24h, viable cells were counted using the trypan blue dye exclusion method ($n = 3$) (right panel). In parallel, cell lysates were analyzed by western blotting with the indicated antibodies (left panel). One representative experiment of three is shown.

with biotin-MTF465, a non-active CRO15 analog devoid of its pharmacophore. We thus demonstrated a direct interaction of MELK with biotin-CRO15 (Fig. 3D) but very weak with the negative control, biotin-MTF465. This result was further confirmed by detecting MELK after biotin precipitation on lysates of A375 treated for 2 h with 20 μ M of biotin-CRO15.

We then determined the consequences of MELK inhibition for melanoma cells. Importantly, MELK expression correlates with melanoma progression²². A bio-informatic analysis of expression data on melanoma shows that MELK is significantly overexpressed in metastatic melanoma compared to primary melanoma (Supplemental Fig. 2B). Its overexpression correlates with the overexpression of its downstream target CDK1 (Cyclin-Dependent Kinase 1), implicated in the mitosis process. We performed kinetics of CRO15 (5 μ M) in A375 cells, and detected a time-dependent decrease in expression of MELK but also of NF- κ B phosphorylation and some mitosis markers, such as Cyclin E, CDK1, and CDK2 (Cyclin-Dependent Kinase 1 and 2) (Fig. 3E). Interestingly, we confirmed the inhibition of all actors implicated in the NF- κ B pathway to induce melanoma cell proliferation (Supplemental Fig. 2A). Finally, MELK is known to increase DNA damage tolerance in breast cancer cells²¹. In our system, the inhibition of MELK by CRO15 was associated with a strong inhibition of the DNA damage repair pathway with decreased phosphorylation of ATM (Ataxia Telangiectasia Mutated) associated with an increase in the DNA damage marker γ H2AX. CRO15-mediated activation of CHK2 (Checkpoint Kinase 2) and γ H2AX were also observed by immunofluorescence in A375 cells (Supplemental Fig. 2D, E). To confirm that the biological activity of CRO15 involves the activation of AMPK and the inhibition of the MELK oncogene, we tried to counteract its effects on rescue experiments (Fig. 3G). Noticeably, knocking-down AMPK using siRNA or over-expressing MELK using adenoviral construct partially restored cell viability and the combination of both almost completely abolished the anti-melanoma effect of CRO15. This

experiment unequivocally demonstrates the implication of both AMPK activation and MELK inhibition in the mode of action of CRO15.

DNA damage repair pathway induces p53 pathway activation

As described in the literature, the ATM/CHK2 axis is often responsible for p53 activation on serine 15 after DNA damage²³. Furthermore, AMPK activators included metformin-activated p53 by phosphorylation on serine 15. Thus, we wanted to determine whether CRO15 can also activate this protein. We first examined the viability of different melanoma cells mutated for p53 after CRO15 induction and we observed that, in the cells expressing an inactive form of p53, the decrease of viability is less important than in the other melanoma cell lines expressing Wild Type p53 (Fig. 4A). We next wanted to determine whether p53 is implicated in CRO15 mechanisms. CRO15 induced a time-dependent phosphorylation of p53 on Ser15 that suggested p53 activation in A375 cells (Fig. 4B). We confirmed an increase in p53 activity upon CRO15 treatment by luciferase assays (Fig. 4C).

As expected, the activity of endogenous p53 was not detectable in response to CRO15 or positive control actinomycin in p53-mutated SK-MEL-28 cells (Fig. 4D, right part). When we infected these cells with wild type p53, CRO15 induced a strong activity of p53. In parallel, shutting down p53 expression with a siRNA induced a partial restoration of cell viability mediated by CRO15 (Fig. 4D, left part). This result is confirmed by western blot analysis, which showed that knockdown of endogenous p53 abolished the phosphorylation of p53 on Ser15 and attenuated the increase in expression of a direct target gene of p53, REDD1 (Regulated in Development and DNA damage response 1) in response to CRO15 (Fig. 4E).

Finally, SK-MEL-28 cells were infected with an adenovirus encoded an active form of p53, and we observed that when we restored p53 function, we restored the sensitivity to CRO15 (Supplemental Fig. 3A, B).

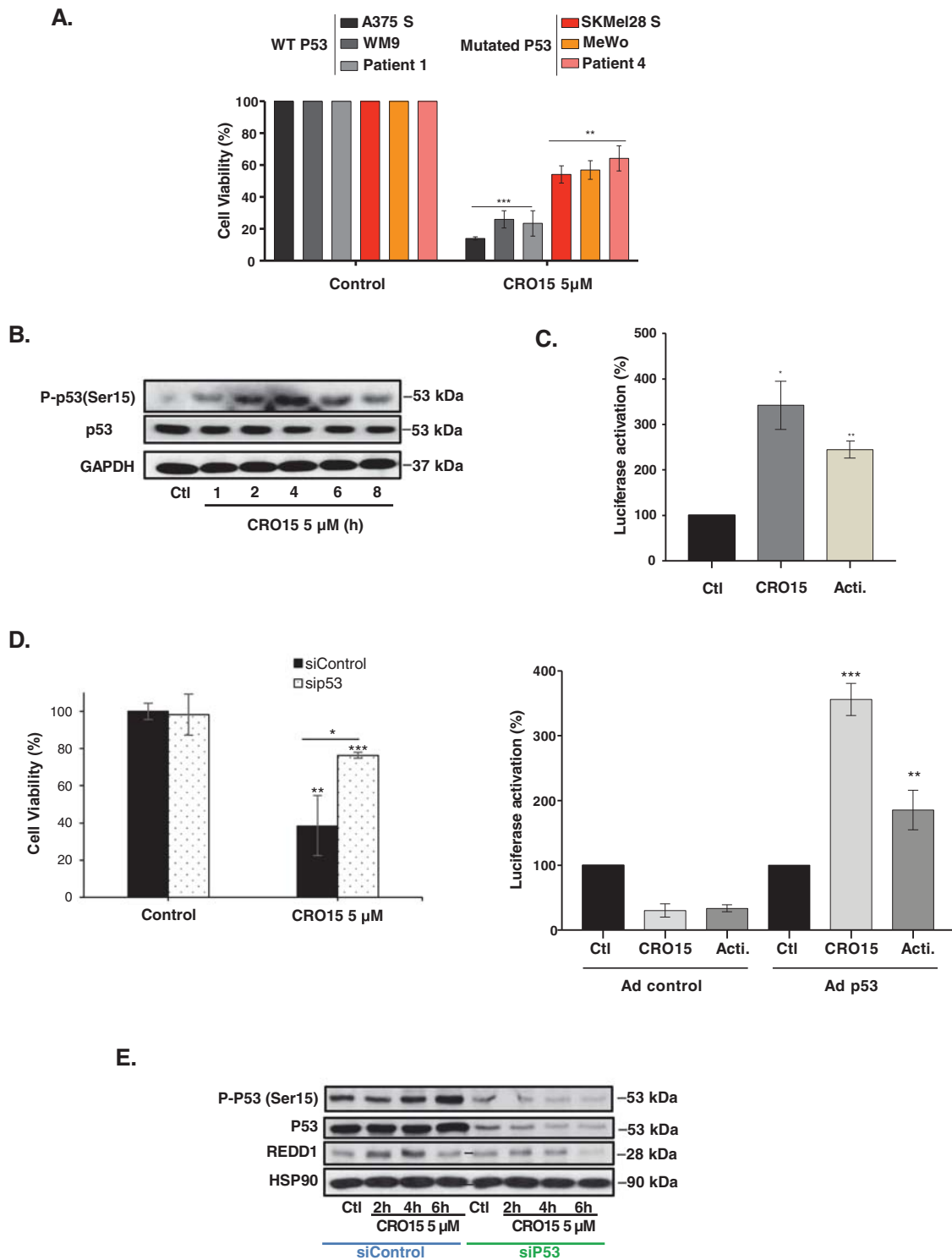


Fig. 4 (See legend on next page.)

(see figure on previous page)

Fig. 4 CRO15 treatment induces p53 pathway activation. **A** Indicated melanoma cell lines were treated with 5 μ M CRO15 for 48 h before viable cells were counted using the trypan blue dye exclusion method. **B** A375 cells were treated with 5 μ M CRO15 for the indicated duration, and lysates were analyzed by western blotting with indication antibodies. One representative experiment of three is shown. **C** Luciferase activity in A375 cells transfected with a p53 luciferase reporter upon 5 μ M CRO15 treatment or actinomycin used as a positive control for p53 induction. **D** (left part) A375 cells were transfected with sip53 and then treated with 5 μ M CRO15. After 24 h of treatment, viable cells were counted using the trypan blue exclusion method. The results are expressed as percentages of the DMSO control. (Right part) SK-MEL-28 cells were infected with control or p53-encoding adenoviruses and transfected with a p53 luciferase reporter. Cells were treated 24 h with 5 μ M CRO15 and a luciferase assay was performed. **E** A375 cells were transfected with control or p53 siRNA and treated with 5 μ M CRO15 for the indicated duration. Lysates were analyzed by western blotting with the indicated antibodies. One representative experiment of three is shown. For **C** and **D**, data given as the means \pm SEM of three independent experiments performed in triplicate. * p < 0.05; ** p < 0.01; *** p < 0.001.

CRO15 mediates the activation of autophagy and apoptosis in melanoma cells

Metformin induces both autophagy and apoptosis in melanoma cells to induce cell death¹⁴. We observed that CRO15 induced a time-dependent accumulation of LC3-II (Fig. 5A). This was confirmed by confocal microscopy, with accumulation of LC3 in melanoma cells under CRO15 stimulation in the same manner as that accumulation of LC3 under rapamycin stimulation, which is an autophagy activator (Fig. 5B and Supplemental Fig. 4A). To confirm that in our system, autophagy favors melanoma cell death and does not protect them, we blocked the autophagic flux with a protease inhibitor, pepstatin and a cysteine protease inhibitor, E64d. After stimulation with CRO15 for 24 h, we observed a partial restoration of melanoma cell viability when autophagy was blocked (Supplemental Fig. 4B, C). Finally, it was also shown by autophagy inhibition with siRNA against LC3 and ATG5 (Data not shown). For the apoptosis pathway, we observed a characteristic cleavage of PARP (Poly-ADP-Ribose polymerase) in a time-dependent manner under CRO15 treatment (Fig. 5A). We also observed a decrease in total caspase 3 and 9 expression, which are specific markers for caspase-dependent apoptosis. To confirm the implication of apoptosis in CRO15-induced cell death, we performed flow cytometry analysis (Fig. 5C). First, we examined the presence of annexin V on the cellular membrane in melanoma cells. Indeed, when cells enter apoptosis, a flip-flop into the plasma membrane takes place and phosphatidylserines, which are normally inside the cells, are exposed to the extracellular medium and can link with annexin V. After CRO15 stimulation, we observed a large increase in melanoma cells stained with annexin V. We also studied the presence of caspase 3 active cells after CRO15 stimulation. We observed that melanoma cells treated with this drug present approximately 60% of caspase-3 active cells compared to the control. Finally, autophagy and apoptosis after CRO15 stimulation were also observed in electronic microscopy (Supplemental Fig. 4D). In these pictures, we observed the formation of apoptotic blebs and

autophagolysosomes with a double membrane characteristic of autophagy.

To determine whether these two mechanisms are dependent on each other, we blocked autophagy by siLC3, apoptosis by Q-VD (inhibitor of pan caspase) and both mechanisms at the same time (Supplemental Fig. 4E, F). We observed that when the two mechanisms are blocked, all melanoma cell viability is restored. When we blocked only autophagy or apoptosis, we partially restored melanoma cell viability. Interestingly, when the two mechanisms are blocked independently, the other mechanism is still activated. Thus, autophagy and apoptosis are two mechanisms activated independently by CRO15.

We identify pathways involving AMPK and/or p53, which are responsible for the cell death mechanism induced by CRO15. To confirm that only these two proteins are responsible for melanoma cell death induced by CRO15, we blocked these two proteins and studied cell viability. After infection with adenoviruses of dominant negative forms of AMPK α 1 and α 2 and transfection of sip53, we observed a total restoration of melanoma cell viability after CRO15 stimulation for 24 h (Fig. 5D, E), indicating that these 2 proteins are responsible for cell death induced by CRO15. Interestingly, by western blot analysis, we observed that CRO15 increased the expression of REDD1 after 2 h of stimulation but that this increase was lost when the AMPK and p53 pathways were inhibited (Fig. 5E). Thus, we wanted to determine whether REDD1 can be implicated in melanoma cell death mechanisms induced by CRO15. REDD1 is a protein implicated in the stress response (i.e., DNA damage, metabolic dysregulation, etc.) and can activate different cell death mechanisms when restoration of melanoma cell viability stress is too strong for the cell. We observed that REDD1 is activated by CRO15 at an early time point post-stimulation and that its principal target, mTOR, is no longer phosphorylated and therefore inactivated (Fig. 5F). To confirm the implication of REDD1 in the cell death mechanism, we inhibited REDD1 expression with siRNA, and in blue trypan exclusion, we observed that there was a total restoration of melanoma cell viability after 24 h of

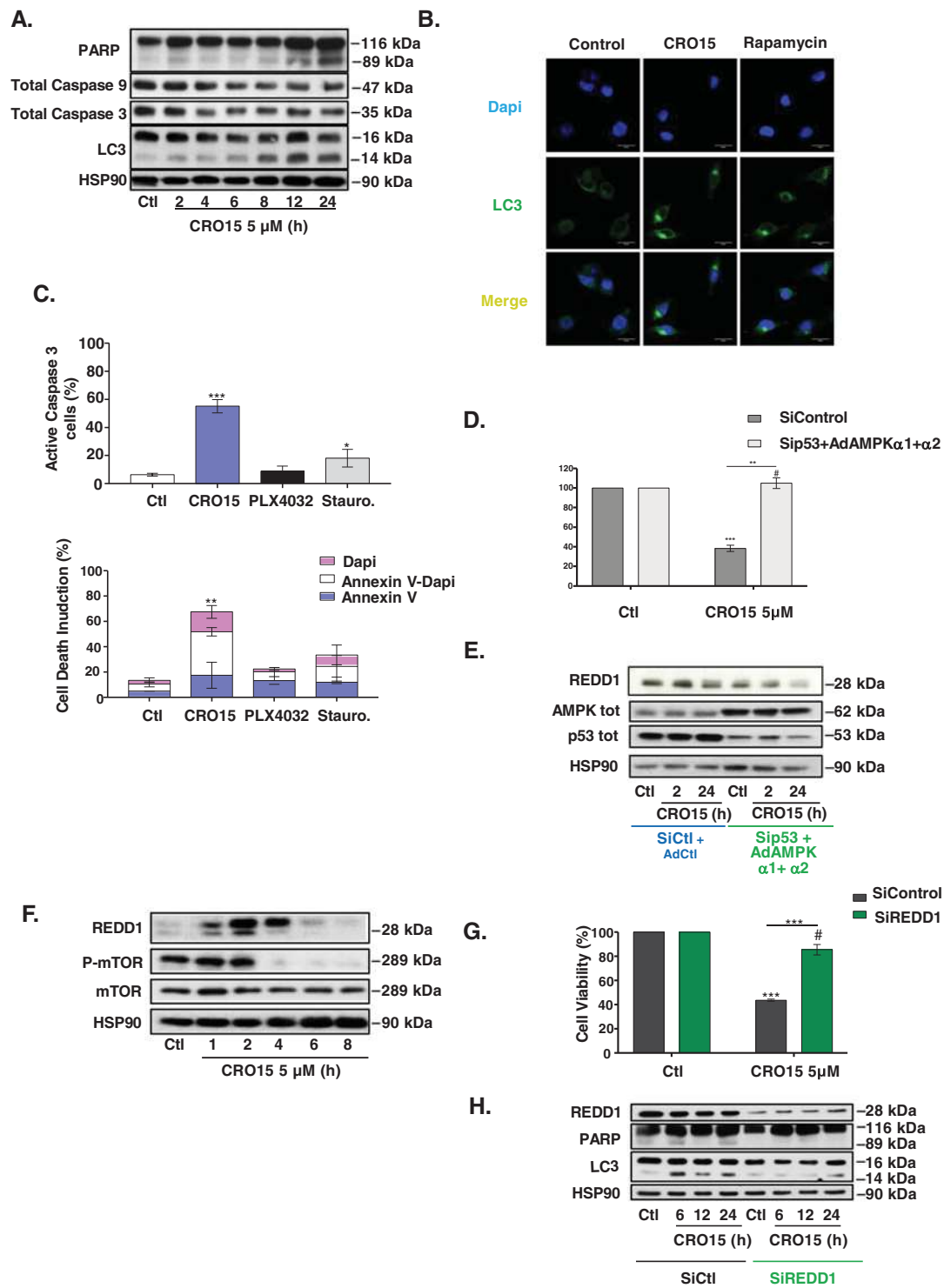


Fig. 5 (See legend on next page.)

(see figure on previous page)

Fig. 5 CRO15 mediates the activation of autophagy and apoptosis in melanoma cells. **A** A375 cells were treated with 5 μ M CRO15 for the indicated duration. Lysates were analyzed by western blotting with the indicated antibodies. One representative experiment of three is shown. **B** Immunofluorescence pictures of A375 melanoma cells treated with DMSO, 5 μ M CRO15 or 400 nM of the autophagy inducer rapamycin for 6 h. LC3B was labeled with antibody (green), and DNA was visualized with DAPI (blue). **C** A375 melanoma cells were treated for 24 h with 5 μ M CRO15, 5 μ M PLX4032 or with 1 μ M of the pan-kinase inhibitor staurosporine for 6 h used as positive control of apoptosis induction. Cells were analyzed by flow cytometry using a specific antibody against Caspase 3 active protein conjugated with FITC (upper panel) or Annexin V conjugated with ALEXA and DAPI (lower panel) or against. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$. **D** A375 cells were infected with dominant negative adenoviruses against $\alpha 1$ and $\alpha 2$ AMPK subunits for 24 h before transfection with sip53 for another 24 h. Cells were determined by trypan blue staining after a 24 h treatment with 5 μ M CRO15 or DMSO control. **E** A375 cells were infected with dominant negative adenoviruses against $\alpha 1$ and $\alpha 2$ AMPK subunits for 24 h and were transfected with sip53 for another 24 h. Cells were treated with 5 μ M CRO15 for the indicated durations, and lysates were analyzed by western blot with the indicated antibodies. One experiment of three is shown. **F** A375 cells were treated with 5 μ M CRO15 for the indicated durations, and lysates were analyzed by western blotting with the indicated antibodies. One representative experiment of three is shown. **G** A375 cells were transfected with siREDD1 for 24 h and then treated with 5 μ M CRO15 for 24 h before cell viability was determined using the trypan blue exclusion method. **H** A375 cells were transfected with siREDD1 for 24 h and then treated with 5 μ M CRO15 for the indicated duration. Lysates were analyzed by western blotting with the indicated antibodies. One representative experiment of three is shown. For **D** and **G**, the results are expressed as percentages of the control and data given as the means \pm SEM of three independent experiments performed in triplicate. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

CRO15 stimulation (Fig. 5G). Interestingly, we showed in western blot analysis that when REDD1 is inhibited, autophagy (with LC3 II conversion) and apoptosis (with PARP cleavage) are lost under CRO15 stimulation (Fig. 5H).

In conclusion, we demonstrate that CRO15 induces melanoma cell death by AMPK and p53 pathways to induce autophagy and apoptosis of melanoma cells, and this process is REDD1 dependent.

CRO15 decreases tumor growth in mouse models

To assess the antineoplastic potential effect of CRO15 in vivo, A375 melanoma cells (1.0×10^6) were injected subcutaneously into 5-week-old female athymic nude mice. After tumor apparition (approximately size of 50 mm³), mice were treated every day with Labrafil (control), PLX4032 (0.7 mg/mouse/day) and CRO15 (0.7 mg/mouse/day) over a period of 4 weeks. This dose corresponds to the equivalent dose of PLX4032 given to patient in melanoma therapy. Untreated control mice rapidly developed visible tumors, and we observed a dramatic increase in tumor growth throughout the study (Fig. 6A). By contrast, treatment of mice with PLX4032 or CRO15 markedly attenuated the development of tumors. Moreover, the tumors derived from CRO15-treated mice present consistently and significantly lower weight than those from untreated control mice (Fig. 6B). Furthermore, the treatment of mice with CRO15 induced no apparent toxicity, and we noted no change in their behavior and body mass (Fig. 6C). Furthermore, we evaluated hepatic toxicity by measuring hepatic transaminases in the sera of treated mice (Fig. 6D), and no change appeared between control and CRO15-treated mice, indicating the absence of hepatic toxicity. We then investigated the molecular mechanisms involved in the anti-tumorigenic effects of CRO15 in vivo. Tumor sections from mice were stained

with LC3 antibody, and we observed an increase in LC3 expression in CRO15 conditions, confirming the activation of autophagy by CRO15 in vivo (Fig. 6E). For apoptosis, we stained the tumor sections with active-caspase 3 antibodies and TUNEL assay. We observed an increase in both active caspase 3 and TUNEL staining in CRO15 conditions (Fig. 6E). These results confirmed the activation of autophagy and apoptosis in vivo by CRO15.

CRO15 induces cell death in melanoma cells resistant to BRAF inhibitors

As mentioned above, treatment of BRAF V600E melanoma patients with BRAF inhibitors, such as PLX4032, leads to systematic resistance and metastasis relapse. In Fig. 7A, we showed that CRO15 induces melanoma cell death in A375, SK-MEL-28 and WM9 melanoma cells that had acquired resistance to PLX4032. Interestingly, we confirmed that in SK-MEL-28 cells mutated for p53, CRO15 was less efficient. In addition, we observed that CRO15 induces the same molecular and death mechanisms in A375 resistant melanoma cells. Indeed, in western blot analysis, we observed phosphorylation of AMPK after CRO15 stimulation. We also observed a decrease in MELK expression and CDK1 in a time-dependent manner. Phosphorylation of p53 (ser15), increased expression of REDD1 and decreased phosphorylation of mTOR were confirmed at early time of stimulation by CRO15 at 5 μ M (Fig. 7B). For cell death mechanisms induced by CRO15, PARP cleavage and LC3-II accumulation were observed in western blot analysis (Fig. 7B). These two mechanisms were confirmed by confocal microscopy with staining of LC3 for autophagy (Fig. 7C) and flow cytometry, with increasing annexin V and active caspase 3 staining for apoptosis (Fig. 7D). Finally, we tested the anti-tumorigenic effect of CRO15 in mice injected with A375 R melanoma cells presenting acquired resistance to the

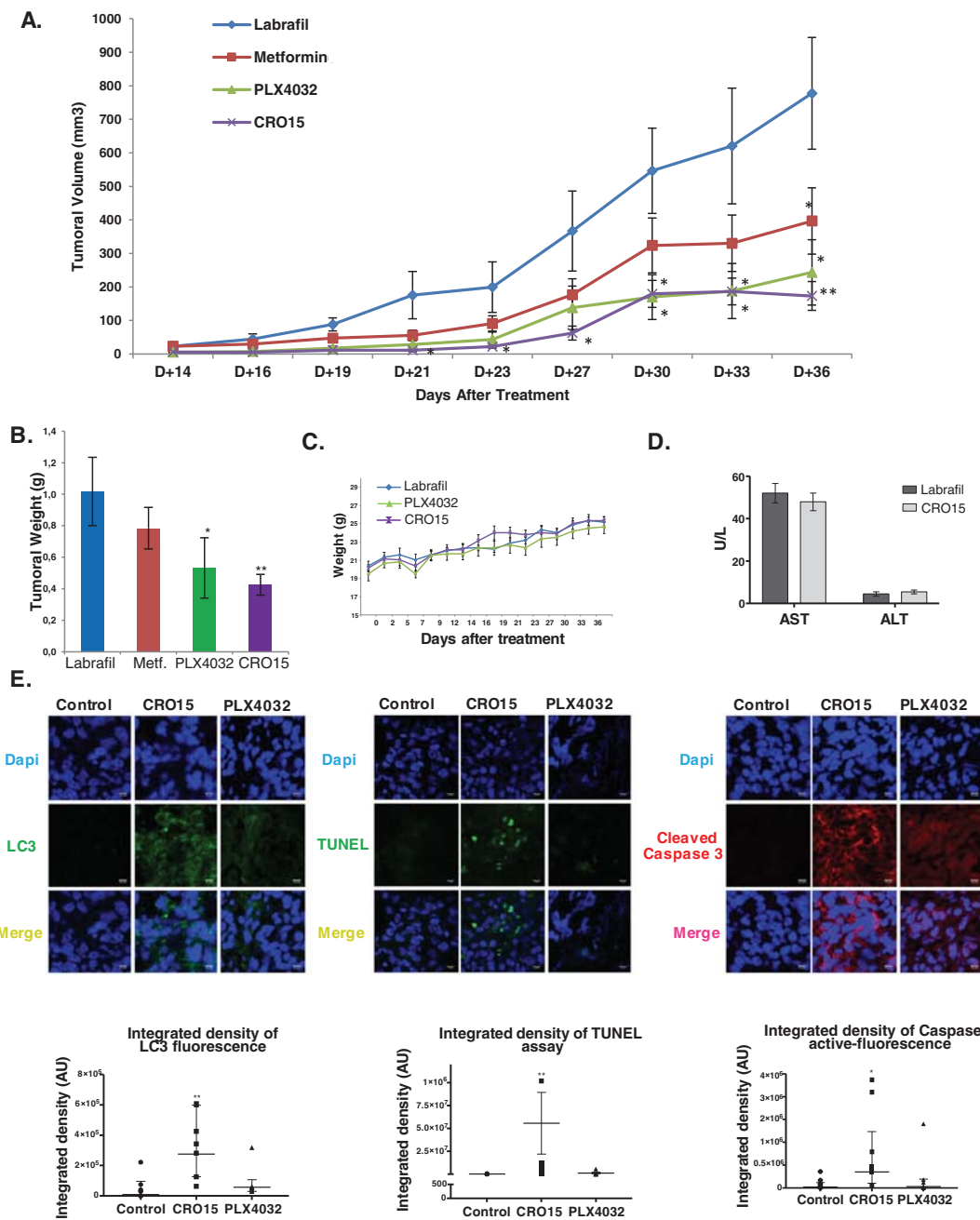


Fig. 6 CRO15 decreases tumor growth in mouse models. **A** Female immune-deficient BALB/c nu/nu (nude) mice were inoculated subcutaneously with 1.0×10^6 A375 cells. After 4 days, mice ($n = 6$ in each group) were treated with CRO15 (0.7 mg/mouse/day), PLX4032 (0.7 mg/mouse/day) or vehicle (Labrafil). Tumor growth curves were determined by measuring the tumor volume. The bars indicate the mean \pm SEM. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$. **B** Tumor weight of A375 xenograft after mouse euthanasia. The bars indicate the mean \pm SEM * $p < 0.05$. **C** Mice weight over the course of the experiment. **D** Quantification of hepatic transaminases (AST and ALT) on plasma of nude mice treated with vehicle or CRO15 at end point. **E** Immunofluorescence staining on xenograft tumor sections. LC3B (green) and active caspase 3 (red) were immunolabeled, and apoptotic cells were visualized with a TUNEL kit. Nuclei were visualized with DAPI (blue). Integrated density was determined for each condition on Fuji. Data are geometric means with 95% CI of three independent experiments performed in triplicate. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

BRAF inhibitor PLX4032. Briefly, as previously described, we subcutaneously injected A375 Resistant cells (1.0×10^6) into nude mice, which were then treated with

Labrafil, PLX4032 (0.7 mg/mouse/day) and CRO15 (0.7 mg/mouse/day). Untreated mice or PLX4032-treated mice rapidly developed dramatic tumor growth

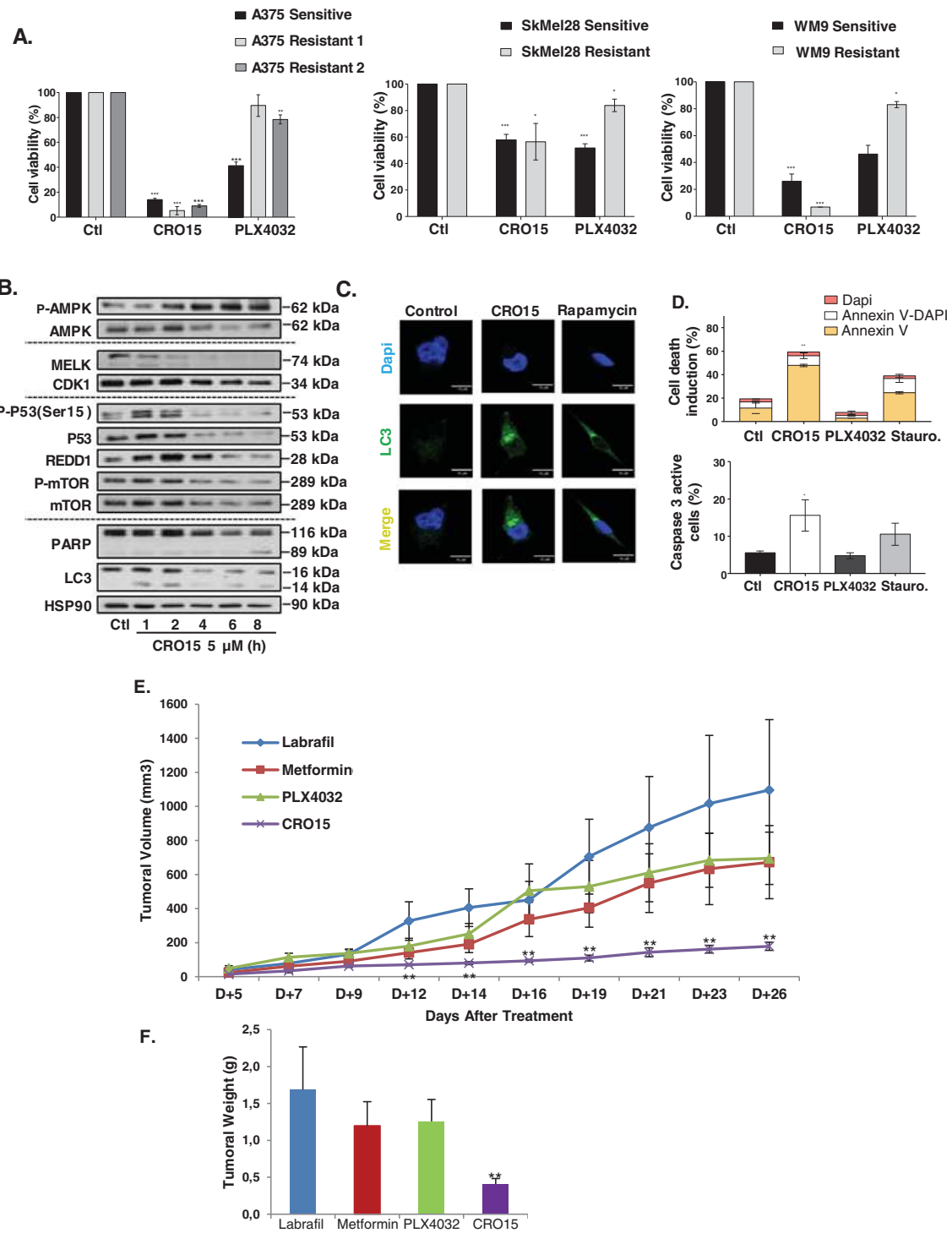


Fig. 7 (See legend on next page.)

(see figure on previous page)

Fig. 7 CRO15 induced death in melanoma cells resistant to BRAF inhibitors. **A** Indicated melanoma cell lines were treated with 5 μ M CRO15 or 5 μ M PLX4032. After 48 h, cell viability was determined by Trypan blue exclusion method. The results are expressed as percentages of the corresponding control and data given as the means \pm SEM of three independent experiments performed in triplicate. * p < 0.05; ** p < 0.01; *** p < 0.001. **B** A375-resistant cells were treated with 5 μ M CRO15 for the indicated durations. Lysates were analyzed by western blotting with the indicated antibodies. One representative experiment of three is shown. **C** Immunofluorescence images of A375-resistant melanoma cells treated with 5 μ M CRO15 or 400 nM rapamycin for 6 h or DMSO control. LC3B was labeled with antibody (green), and the nuclei were visualized with DAPI (blue). **D** A375-resistant melanoma cells were treated for 24 h with 5 μ M of CRO15 or PLX4032 for 24 h or with 1 μ M staurosporine for 6 h. Cells were analyzed in flow cytometry with a specific antibody directed Annexin V (conjugated with ALEXA) or Caspase 3 active protein (conjugated with FITC). * p < 0.05; ** p < 0.01; *** p < 0.001. **E** Female immune-deficient BALB/c nu/nu (nude) mice were inoculated subcutaneously with 1.0×10^6 A375-resistant cells. After 7 days, mice ($n = 6$ in each group) were treated with CRO15 (0.7 mg/mouse/day), PLX4032 (0.7 mg/mouse/day) or vehicle (Larabrafil). Tumor growth curves were determined by measuring the tumor volume. The bars indicate the mean \pm SEM. * p < 0.05; ** p < 0.01. **F** Tumor weight of A375-resistant xenograft after mouse euthanasia. The bars indicate the mean \pm SEM * p < 0.05; ** p < 0.01.

throughout the study (Fig. 7E). In contrast, CRO15-treated mice markedly attenuated the development of tumors. Moreover, tumors derived from CRO15-treated mice were consistently and significantly lower than those from untreated or PLX-treated mice (Fig. 7F). These data clearly demonstrate the anti-melanoma activity of CRO15 in vivo in BRAF inhibitor-resistant cells. As observed in tumors from melanoma cells sensitive to BRAF inhibitor, CRO15 induced a strong increase in LC3, active caspase 3 and TUNEL staining compared to tumor sections from control or PLX4032 (Supplemental Fig. 5B). In this experiment, no apparent toxicity appeared with no change in mouse behavior, body mass (Supplemental Fig. 5A) or liver mass (data not shown).

Discussion

Currently, therapies against metastatic melanoma are not efficient enough. Indeed, targeted therapies against BRAF V600E/MEK initially show very efficient responses, but after a few weeks of treatment, melanoma relapses and metastases begin to grow again^{3–6,11}. For immunotherapies, objective responses are sustainable but only in 30 to 40% of patients in the best way^{7,8,24}. Thus, for many patients (more than 50%), there are no effective treatments for their melanoma, and discovering new therapies is essential. In this report, we present anti-melanoma effects of a new biguanide-derived compound CRO15. Melanoma presents many different mutations and oncogene proteins. In this study, we showed that CRO15 induces melanoma cell death independently of their mutational status, and this is due to activation of the AMPK and p53 pathways and inhibition of MELK kinase activity. As biguanides, CRO15 is able to activate the AMPK pathway by disrupting mitochondrial metabolism and by changing the ATP/AMP ratio. Interestingly, in melanoma glycolytic metabolism, mediated by mitochondrial activity, is very important^{25,26}. Furthermore, it was described that melanoma cells resistant to BRAF inhibitors showed an oxidative metabolism that was more

important and dependent on mitochondria for cell survival²⁷. In this context, mitochondria seem to be very important, and their pharmacological dysregulation could pave the road to develop new melanoma therapies. Furthermore, AMPK is an energy sensor of the cells; it plays a role in cellular energy homeostasis. It is composed of 3 subunits α , β , and γ ²⁸. Both subunits play a specific role in the stability and activity of AMPK, and the α subunits play a role in catalytic activity²⁹. AMPK plays an important role in metabolism regulation with inhibition of fatty acid synthesis, cholesterol and triglycerides by ACC phosphorylation³⁰. However, AMPK also plays a role in the induction of autophagy and apoptosis by a number of different mechanisms. For example, AMPK can directly phosphorylate ULK1 (UNC-51-like kinase)³¹ or activate REDD1³², both of which dephosphorylate mTOR and induce autophagy. Interestingly, AMPK can also activate the apoptosis pathway by eIF2 α (eukaryotic Initiation Factor 2 α)³³ or by p53³⁴. In our study, we showed that the AMPK pathway is partially responsible for melanoma cell death induced by CRO15. Despite the fact that the AMPK pathway is present in all human cells and in cancer human cells, but we did not observe any toxicity in normal human cells. Interestingly, we observed that CRO15 is able to induce minimal AMPK phosphorylation in both normal keratinocytes and melanocytes without affecting their viability. Our hypothesis is that the AMPK pathway is constitutively more activated in melanoma cells because of their metabolic activity. When CRO15 is added to these cells, a threshold is exceeded, and this high level of AMPK induces the activation of autophagy and apoptosis in melanoma cells. In normal human cells, the level of AMPK is lower than this threshold, and thus, no cellular death is induced. However, the other scenario is that cancer cells might overexpress CRO15 transporters.

To determine the AMPK-independent effects of CRO15, we performed a kinome assay, and we identified 2 kinases significantly inhibited by our compound. The first candidate is a member of the Ser/Thr protein kinase

family, MAPKAPK2. This kinase is regulated through direct phosphorylation by p38 MAP kinase. In conjunction with p38 MAP kinase, this kinase is known to be involved in many cellular processes, including stress and inflammatory responses, nuclear export, gene expression regulation, cell proliferation and metastasis invasion. Heat shock protein HSP27 was shown to be one of its substrates^{35,36}. Our experiments quickly allowed us to eliminate this candidate in the CRO15 mode of action in melanoma cells. Indeed, CRO15 rapidly increases the activation of p38 and does not decrease the phosphorylation of MAPKAPK2 and of its substrate HSP27. Furthermore, our preliminary experiments indicate that CRO15 is not able to inhibit melanoma cell invasion, which constitutes one of the main effects of the enzyme (data not shown)^{36–38}.

The second evaluated candidate of CRO15 was the oncogene MELK. This protein is a member of the AMPK/Snf1 family, which is a serine/threonine kinase that is highly conserved across a variety of mammalian and non-mammalian species. MELK has been shown to be activated by auto-phosphorylation *in vitro*, which is a unique mechanism among the AMPK/Snf1 family members³⁹. This kinase is overexpressed in several human cancers and stem cell populations, including melanoma cells^{19,40,41}. MELK plays a prominent role in cell cycle control, cell proliferation and cancer treatment resistance and is a good candidate for potential anti-cancer therapies. Further, a recent study demonstrated the importance of MELK expression and its effects on the NF- κ B pathway in melanoma proliferation²⁰. Indeed, MELK is overexpressed in primary and even more in metastatic melanoma, suggesting its implications in melanoma progression²². This increasing expression is correlated with increased expression of CDK1, an essential protein promoting proliferation and mitosis⁴². However, two recent articles questioned the role of MELK in cancer development since, contrary to siRNA, disruption of MELK using the CRISP-Cas9 approach had no appreciable impacts on tumor cell growth^{43,44}. This apparent discrepancy could be explained by a conditional dependency on MELK for the proliferation of cancer cells⁴⁵ as it is required for clonogenic cell growth like other oncogenes such as MYC or KRAS.

Our results showed that CRO15 directly decreases MELK kinase activity during *in vitro* kinase assay but also in intact melanoma cells, as indicated by the inhibition of NF- κ B phosphorylation and some mitotic makers, such as Cyclin E, CDK1 or CDK2. These results suggest that in our system, inhibition of MELK induced a decrease in mitosis and cell proliferation after CRO15 stimulation mediated by NF- κ B pathway inhibition. Interestingly, in contrast to the other MELK inhibitor OTS167, CRO15 is non-toxic in normal cells, such as fibroblasts, melanocytes

and keratinocytes. MELK is also implicated in the DNA damage response²¹. Indeed, MELK was shown to increase the tolerance of cancer cells to the DNA damage response by inhibiting the phosphorylation of ATM. This allows cancer cells to inhibit activation of death mechanisms induced by this response. When melanoma cells are treated with CRO15, ATM phosphorylation is observed during early stimulation, which induces activation of the DNA damage pathway response. These results suggest that CRO15 could remove ATM inhibition induced by MELK and reactivate the DNA damage response pathway. This activation allows phosphorylation of p53 on ser15 by CHK2, which leads to the activation of REDD1⁴⁶, which is responsible for melanoma cell death. Indeed, p53 plays an essential role in human cells and is implicated in the DNA damage response induced by ATM²³. Activation of p53 induced a protective response against DNA damage and tried to repair it. However, sustainable activation of DNA damages induced an increase in REDD1 expression by p53 and thus activation of cell-death mechanisms. REDD1 (RTP801/Dig2/DDIT4) was identified as a hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) target gene involved in the regulation of cell survival. REDD1 is also regulated in response to DNA damage, nutrient depletion, glucocorticoid and insulin^{47,48}. This protein is a negative regulator of mTOR and is defined as a key metabolic regulator suppressing tumorigenesis thought effects on mTOR activity⁴⁹ and mitochondria. After CRO15 treatment, REDD1 expression is quickly increased and induces mTOR dephosphorylation. This is responsible for autophagy induction, which is confirmed by the loss of LC3-II conversion when REDD1 is deleted. In addition, REDD1 also activates apoptosis⁵⁰ and the knock down of REDD1 leads to loss of PARP cleavage in melanoma cells upon CRO15 treatment. REDD1 is the key protein activated in melanoma cells in response to CRO15 treatment and is responsible for melanoma cell death.

When the AMPK and p53 pathways are independently inhibited, activation of REDD1 by CRO15 is still conserved at a lower level. The fact that REDD1 can be independently activated by these two pathways is an advantage for CRO15 treatment. Indeed, many melanoma cells and other cancer cells present p53 inactivation. However, CRO15 can induce cell death even in p53-mutated melanoma cells. Moreover, MELK is important in melanoma progression and therefore may be implicated in resistance against current therapies. Indeed, we observed that MELK, as well as CDK1, is significantly overexpressed in metastatic melanoma. We next confirmed the efficiency of CRO15 in resistant melanoma cells. Counterintuitively, the decrease in viability induced by CRO15 seems to be more dramatic in PLX4032-resistant cells than in their parental counterpart, except for the SK-MEL-28 cell line, mutated for p53. The same

mechanisms are activated in melanoma cells resistant to BRAF inhibitors, which implicate MELK, AMPK, p53, and REDD1. Autophagy and apoptosis induced by CRO15 are responsible for melanoma cell death after REDD1 activation in these resistant melanoma cells. Furthermore, MELK is overexpressed in many cancers, such as breast cancer, glioma, and colon cancer, and plays a role in oncogenes in these cancers^{18,19,41}. Interestingly, CRO15 can decrease the viability of a number of cancer cell lines, including breast, cervix or prostate cancer (Supplemental Fig. 6).

Finally, *in vivo* results confirmed our hypothesis that melanoma cells are impacted by CRO15 treatment. Indeed, effects on tumoral volume and tumoral growth both in xenograft-sensitive and resistant to BRAF inhibitor mice models show that CRO15 is able to induce melanoma cell death without apparent toxicity in mice. Activation of autophagy and apoptosis in these tumors confirms the implications of the same pathways *in vivo*. Metabolic activity of melanoma cells and the potential overexpression of MELK in these cells seem to be important for CRO15-induced cell death and could explain why normal human or mouse cells are not affected by this compound. All these results allow us to think that CRO15 could be a good candidate in the development of new treatments against melanoma or other cancer types. Furthermore, a recent study by Janostiak et al. showed that in melanoma cells, MELK expression is in part increased by the MAPK kinase pathway via transcription factor E2F1 (19). Thus, inhibition of MELK in combination with BRAF inhibitors allows for an effect on resistant melanoma cell viability compared to BRAF inhibitors alone and decreases the development of resistance. In this context, it could be interesting to study the effect of the combination of CRO15 or other MELK inhibitors and BRAF inhibitors for melanoma treatment.

In summary, we demonstrate that CRO15 inhibits tumor growth through autophagic and apoptotic mechanisms induced by REDD1 and initiated by AMPK and p53 activation by inhibition of MELK kinase activity. Considering the drastic effects of CRO15 on cancer growth in mice, together with the lack of apparent toxicity, this study provides compelling data to support the future evaluation of CRO15 in clinical trials and strengthens the idea that MELK inhibition could be useful, alone or in combination, as a new therapeutic approach in cancer treatment.

Materials and methods

Reagents and antibodies

Trypan blue, DMEM, RPMI, penicillin/streptomycin, trypsin, siRNA against LC3, MELK and p53 were purchased from Life Technology. Fetal calf serum (FCS) was

purchased from HyClone. MCDB 153 medium, metformin, staurosporine and dimethylacetamide were purchased from Sigma-Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France). Labrafil M1944 Cs was purchased from Gatte fosse. Annexin V and DAPI were purchased from Roche Applied Science. PLX4032 was purchased from Euro-medex. HSP60, p53, HSP90, Actin, Cyclin E, AMPK α 1 and AMPK α 2 antibodies were purchased from Santa Cruz Biotechnology (TEBU; Le Perray en Yvelines, France). LC3-B, \oplus -AMPK α (T172), \oplus -mTOR (S2448), PARP, AMPK α total, mTOR total, \oplus -ACC (Ser79), ACC total, MELK, CDK1, \oplus -CHK2 (Thr68), CHK2 total, CDK2, \oplus -P53 (ser15), Caspase 9 and Caspase 3 antibodies were from Cell Signaling Technology (Beverly, MA, USA). Antibodies against \oplus -CDC25B (S323), CDC25B total, gamma-H₂AX, and ATM total were purchased from ABCAM. Antibodies against cyclin D1 and pRb were from BD Bioscience (Pont de Claix, France). REDD1 antibody was purchased from Proteintech. TMRE was purchased from Abcam (ab113852-TMRE Mitochondrial Membrane Potential Assay Kit). ATP production was measured using a Malachite Green Phosphate Assay Kit produced by Cayman chemical (n°10009325). MELK adenovirus and \oplus -ATM (10H11.E12) antibody were purchased from TEBU.

Cell cultures

Normal human melanocytes and fibroblasts were prepared and maintained as previously described⁵¹. Melanoma cell lines were purchased from the American Tissue Culture Collection. The resistant melanoma cell lines A375 and SK-MEL-28 were a gift from Professor P. Marchetti and described in Corazao-Rozas et al.⁵². See Supplemental Experimental Procedures for cell preparation.

siRNA transfection

Transfection of duplex siRNAs (50 nmol/l) was carried out using Lipofectamine RNAiMAX (Invitrogen) in OptiMEM (Invitrogen) as described⁵³. The day after transfection, CRO15 was added to the medium, and proteins were extracted 24 h. siRNA targeting LC3, P53 and MELK were purchased from Life Technology. REDD1 siRNA was purchased from Dharmacon (Lafayette, CO, USA). As a nonspecific control, scramble sequence of siRNAs were used.

Adenoviral infections

Adenoviruses encoding a dominant-negative form (Ad AMPK-DN) of subunits α 1 and α 2 of AMPK were a generous gift of Dr. Foufelle (INSERM, UMR-S 872, Paris, France). Adenoviruses encoding MELK and p53 protein have been purchased from Tebu. An adenovirus of which the expression cassette contains the major late promoter

with no exogenous gene was used as a control (Ad control). Adenoviruses were produced in human embryonic kidney 293 cells and stored at -80°C . A375 cells were infected for 48 h with adenoviruses before CRO15 treatment.

Trypan blue exclusion assay

For trypan blue staining, 200 μl of cells were aseptically transferred to a 1.5 ml clear Eppendorf tube and incubated for 3 min at room temperature with an equal volume of 0.4% trypan blue solution. Viable cells were counted, and the results are expressed as the percentage of control cells. All the experiments were performed 3 times in triplicate.

Western blot analysis

Western blot analyses were performed as described⁵⁴. Proteins were extracted in buffer containing 50 mmol/l Tris-HCl (pH 7.5), 15 mmol/l, NaCl, 1% Triton X-100, and 1 \times protease and phosphatase inhibitors. Briefly, after protein dosage by Pierce BCA protein assay kit, 30 μg of cell lysate from each condition were separated by SDS-PAGE, transferred onto a polyvinylidene fluoride membrane (Millipore), and then exposed to the appropriate antibodies. Proteins were visualized with the ECL System from Amersham. The western blot analyses shown are representative of at least three independent experiments.

Immunofluorescence microscopy

See Supplemental Experimental Procedures

SeaHorse experiments

ECAR and OCR were measured using the Seahorse XF96 Extracellular Flux Analyzer (Seahorse Bioscience, North Billerica, MA, USA). The Cell Mito Stress Test media supplemented with 2 mM Glutamax, 1 mM sodium pyruvate, and 25 mM glucose was used. Briefly, 2×10^4 cells were plated in a seahorse-specific 96-well plate and then pre-treated for 6 h with 5 μM CRO15 or 10 mM metformin or control.

Mitochondrial transmembrane potential measuring

See Supplemental Experimental Procedures

Cell fractionation

Cell fractionation was performed with the Calbiochem kit, proteoextract 539790 following manufacturer's instructions.

Kinome assays

Kinome assays were performed with a kit as described in the Thermo Fisher Kit, SelectScreenTM Biochemical Profiling Service, Z'-LYTETM Assay.

MELK kinase assay

MELK kinase assay was performed with the ADP-GloTM Kinase Assay kit from Promega.

Pull-down assay

Cells or cell lysates were incubated with CRO15-biotin or control overnight at 4°C . Fifty microliters of streptavidin-agarose were added for 2 h at 4°C . The CRO15/MELK complexes were analyzed by SDS-PAGE and immunoblotted using anti-MELK antibody.

Bioinformatic analysis

See Supplemental Experimental Procedures

Luciferase assay

See Supplemental Experimental Procedures

Flow cytometry

See Supplemental Experimental Procedures

In vivo murine cancer model

See Supplemental Experimental Procedures

Circulating levels of transaminase

Determination of serum transaminases (aspartate aminotransferase/alanine aminotransferase) was performed using in vitro tests with pyridoxal phosphate activation on a Roche/Hitachi cobas c systems (ASTPM, ALTPM, cobas) as previously described¹².

Electron microscopy

A375 cell pellets were collected in 1% OsO₄, dehydrated in alcohol series, and embedded in epoxy resin. Thin sections were contrasted with uranyl acetate and lead citrate. Preparations were observed either with a Philips CM12 electron microscope operating at 80 kV (FEI) or with a Jeol 1400 mounted with CCD cameras (Morada, Olympus SIS).

ATP production measurement

Cells were plated on a 6-well plate and treated with 5 μM CRO15 for 6 h or with control. At the end of stimulation, cells were lysed in FISHER buffer (TRIS 2 M pH = 8, NaCl 5 M, NP-40 1%, Proteases Inhibitors), and ATP production was measured as described in the malachite green phosphate assay protocol by absorbance at 620 nm.

Autophagic flux

Cells were pre-treated for 2 h with pepstatin and E64d to inhibit autophagic flux prior to treatment for 24 h with 5 μM CRO15, 400 nM rapamycin or control. Cells were analyzed by blue trypan exclusion and western blot analysis.

Unless specified in figure legends, all the data were subjected to two-tailed T-test analysis using Prism 7

(GraphPad Software, San Diego, California, USA). The results are presented as the means \pm SEM.

Acknowledgements

The authors sincerely thank P. Marchetti and J. Kluza (INSERM U837, équipe 4, Lille, France) for A375 and SK-MEL-28 melanoma resistant cell lines. The authors greatly acknowledge the CCMA (Centre Commun de Microscopie Appliquée, Université de Nice Sophia Antipolis, Microscopy, and Imaging platform Côte d'Azur, MICA) and its personnel. This research was supported by the INSERM, University of Nice Sophia-Antipolis, SATT Sud-Est, Fondation pour la Recherche Médicale (EQU202003010248) and Canceropole PACA. E.J. and T.B. are, respectively, recipient of a doctoral fellowship and a Young Investigator grant from Fondation ARC pour la Recherche sur le Cancer, France. N.T. is a recipient of a postdoctoral fellowship from the Canceropole PACA.

Author details

¹INSERM, U1065, Equipe 12, Centre Méditerranéen de Médecine Moléculaire (C3M), Bâtiment ARCHIMED, 151 route de saint Antoine de Ginestière, 06204 Nice cedex 3, France. ²Equipe Labellisée Fondation pour la Recherche Médicale (FRM) 2020, Paris, France. ³Université Cote d'Azur, Nice, France. ⁴Institut de Chimie de Nice UMR-CNRS 7272, Université Nice Sophia Antipolis, Parc Valrose, 06108 Nice Cedex 2, France. ⁵INSERM, U1065, Equipe 5, Centre Méditerranéen de Médecine Moléculaire (C3M), Bâtiment ARCHIMED, 151 route de saint Antoine de Ginestière, 06204 Nice cedex 3, France. ⁶UFR de Médecine, Université de Nice Sophia Antipolis, 06000 Nice, France. ⁷Institute of Research on Cancer and Ageing of Nice (IRCAN), INSERM U1081, CNRS UMR7284, Nice 06107, France. ⁸Laboratoire de pathologie clinique et expérimentale et Hospital-related biobank (BB-0033-00025), Hôpital Pasteur, 06002 Nice, France. ⁹INSERM, U1065, Equipe 1, Centre méditerranéen de Médecine Moléculaire (C3M), Bâtiment ARCHIMED, 151 route de saint Antoine de Ginestière, 06204 Nice cedex 3, France. ¹⁰Service de Dermatologie, Hôpital Archet II, CHU, 06204 Nice, France

Author contributions

E.J., E.C., C.R., O.G., P.A., N.T., M.Z., G.B., L.K., M.G., and T.B. provided acquisition, analysis and interpretation of data, statistical analysis and provided technical and material support. F.B., M.T., P.H., R.B., and T.P. provided critical reagents and advice. T.B., R.B., and S.R. wrote the manuscript. All authors read and approved the final paper.

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

Ethics approval and consent to participate

This study was approved by the local ethical committee. Normal human melanocytes, keratinocytes, and fibroblasts, as well as melanoma cell cultures freshly isolated from patient were collected in accordance with the institutional review board with regard to informed consent (protocol XXX). Animal experiment was carried out in accordance with the Declaration of Helsinki as part of the protocol number XXX approved by the French Ministry of Research and the local ethical committee.

Publisher's note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Supplementary Information accompanies this paper at (<https://doi.org/10.1038/s41419-020-03344-6>).

Received: 8 April 2020 Revised: 1 December 2020 Accepted: 10 December 2020

Published online: 11 January 2021

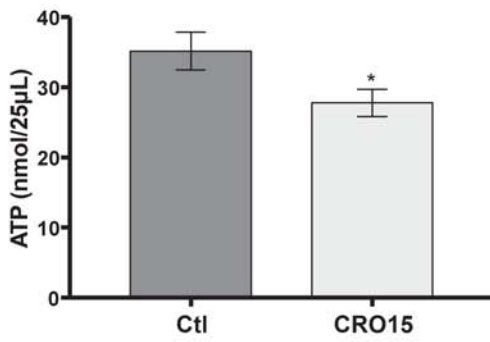
References

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

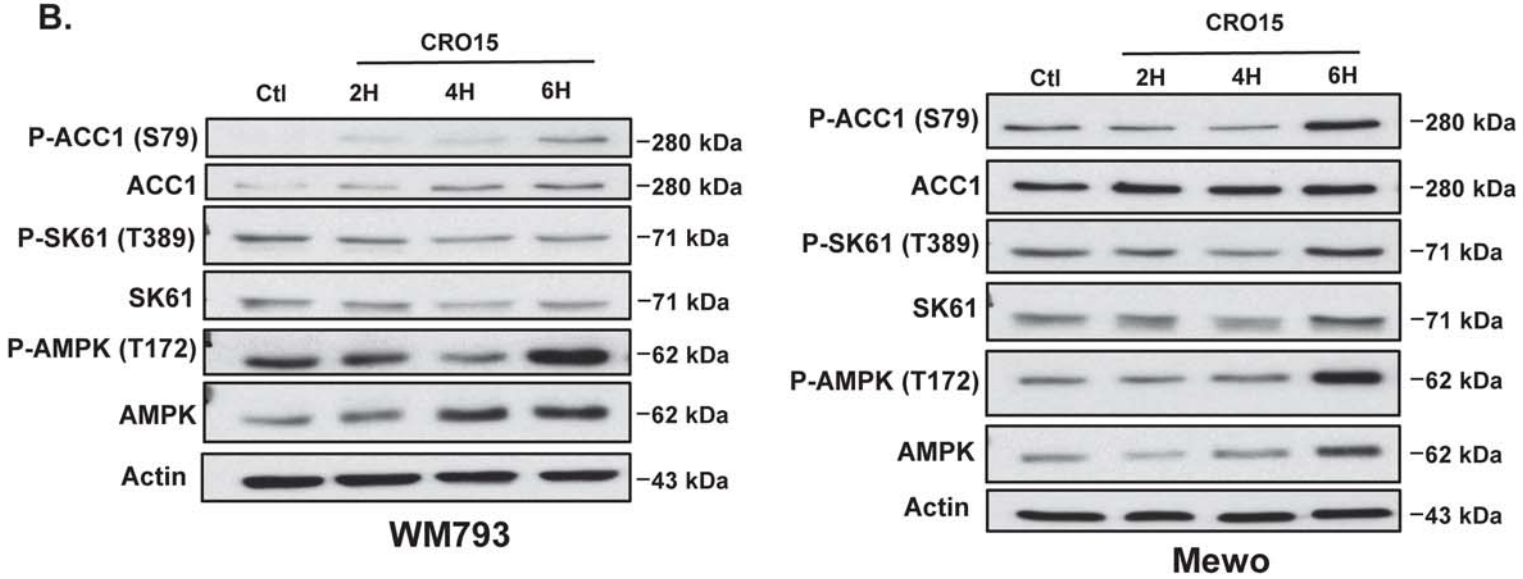
- Larkin, J. et al. Combined vemurafenib and cobimetinib in BRAF-mutated melanoma. *N. Engl. J. Med.* **371**, 1867–1876 (2014).
- Long, G. V. et al. Combined BRAF and MEK inhibition versus BRAF inhibition alone in melanoma. *N. Engl. J. Med.* **371**, 1877–1888 (2014).
- Aplin, A. E., Kaplan, F. M. & Shao, Y. Mechanisms of resistance to RAF inhibitors in melanoma. *J. Invest. Dermatol.* **131**, 1817–1820 (2011).
- Ascierto, P. A., Marincola, F. M. & Atkins, M. B. What's new in melanoma? Combination! *J. Transl. Med.* **13**, 213 (2015).
- Flaherty, K. T. et al. Combined BRAF and MEK inhibition in melanoma with BRAF V600 mutations. *N. Engl. J. Med.* **367**, 1694–1703 (2012).
- Eggermont, A. M. M., Spatz, A. & Robert, C. Cutaneous melanoma. *Lancet* **383**, 816–827 (2014).
- Zeiser, R., Schnitzler, M., Androva, H., Helliger, T. & Meiss, F. Immunotherapy for malignant melanoma. *Curr. Stem Cell Res. Ther.* **7**, 217–228 (2012).
- Weber, J. S. et al. Phase III study of ipilimumab for patients with metastatic melanoma. *J. Clin. Oncol.* **26**, 5950–5956 (2008).
- Brahmer, J. R. et al. Phase I study of single-agent anti-programmed death-1 (MDX-1106) in refractory solid tumors: safety, clinical activity, pharmacodynamics, and immunologic correlates. *J. Clin. Oncol.* **28**, 3167–3175 (2010).
- Larkin, J. et al. Combined Nivolumab and Ipilimumab or monotherapy in untreated melanoma. *N. Engl. J. Med.* **373**, 23–34 (2015).
- Cerezo, M. et al. Compounds triggering ER stress exert anti-melanoma effects and overcome BRAF inhibitor resistance. *Cancer Cell* **29**, 805–819 (2016).
- Evans, J. M. M., Ogston, S. A., Emslie-Smith, A. & Morris, A. D. Risk of mortality and adverse cardiovascular outcomes in type 2 diabetes: a comparison of patients treated with sulfonylureas and metformin. *Diabetologia* **49**, 930–936 (2006).
- Tomic, T. et al. Metformin inhibits melanoma development through autophagy and apoptosis mechanisms. *Cell Death Dis.* **2**, e199 (2011).
- Cerezo, M., Tomic, T., Ballotti, R. & Rocchi, S. Is it time to test biguanide metformin in the treatment of melanoma? *Pigment Cell Melanoma Res.* **28**, 8–20 (2015).
- Cerezo, M. et al. Metformin blocks melanoma invasion and metastasis development in a p53-dependent manner. *Mol. Cancer Ther.* **12**, 1605–1615 (2013).
- Montaudié, H. et al. Metformin monotherapy in melanoma: a pilot, open-label, prospective, and multicentric study indicates no benefit. *Pigment Cell Melanoma Res.* **30**, 378–380 (2017).
- Marie, S. K. N. et al. Maternal embryonic leucine zipper kinase transcript abundance correlates with malignancy grade in human astrocytomas. *Int. J. Cancer* **122**, 807–815 (2008).
- Pickard, M. R. et al. Dysregulated expression of Fau and MELK is associated with poor prognosis in breast cancer. *Breast Cancer Res.* **11**, R60 (2009).
- Janostiak, R. et al. MELK promotes melanoma growth by stimulating the NF- κ B pathway. *Cell Rep.* **21**, 2829–2841 (2017).
- Beke, L. et al. MELK-T1, a small-molecule inhibitor of protein kinase MELK, decreases DNA-damage tolerance in proliferating cancer cells. *Biosci. Rep.* **35**, e00267 (2015).
- Ryu, B., Kim, D. S., Deluca, A. M. & Alani, R. M. Comprehensive expression profiling of tumor cell lines identifies molecular signatures of melanoma progression. *PLoS ONE* **2**, e594 (2007).
- Meek, D. W. & Anderson, C. W. Posttranslational modification of p53: cooperative integrators of function. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **1**, a000950 (2009).
- Schadendorf, D. et al. Melanoma. *Nat. Rev. Dis. Prim.* **1**, 15003 (2015).
- Haq, R. Metabolic dysregulation in melanoma: cause or consequence? *Cancer Discov.* **4**, 390–391 (2014).
- Scott, D. A. et al. Comparative metabolic flux profiling of melanoma cell lines: beyond the Warburg effect. *J. Biol. Chem.* **286**, 42626–42634 (2011).
- Baenke, F. et al. Resistance to BRAF inhibitors induces glutamine dependency in melanoma cells. *Mol. Oncol.* **10**, 73–84 (2016).
- Hardie, D. G. AMPK: a key regulator of energy balance in the single cell and the whole organism. *Int. J. Obes.* **32**, S7–S12 (2008).
- Stapleton, D. et al. Mammalian AMP-activated protein kinase subfamily. *J. Biol. Chem.* **271**, 611–614 (1996).
- Kudo, N. et al. Characterization of 5'AMP-activated protein kinase activity in the heart and its role in inhibiting acetyl-CoA carboxylase during reperfusion following ischemia. *Biochim. Et. Biophys. Acta* **1301**, 67–75 (1996).
- Egan, D., Kim, J., Shaw, R. J. & Guan, K.-L. The autophagy initiating kinase ULK1 is regulated via opposing phosphorylation by AMPK and mTOR. *Autophagy* **7**, 643–644 (2011).

32. Schneider, A., Younis, R. H. & Gutkind, J. S. Hypoxia-induced energy stress inhibits the mTOR pathway by activating an AMPK/REDD1 signaling axis in head and neck squamous cell carcinoma. *Neoplasia* **10**, 1295–1302 (2008).
33. Dagon, Y., Avraham, Y. & Berry, E. M. AMPK activation regulates apoptosis, adipogenesis, and lipolysis by eIF2 α in adipocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **340**, 43–47 (2006).
34. Okoshi, R. et al. Activation of AMP-activated protein kinase induces p53-dependent apoptotic cell death in response to energetic stress. *J. Biol. Chem.* **283**, 3979–3987 (2008).
35. Ben-Levy, R., Hooper, S., Wilson, R., Paterson, H. F. & Marshall, C. J. Nuclear export of the stress-activated protein kinase p38 mediated by its substrate MAPKAP kinase-2. *Curr. Biol.* **8**, 1049–1057 (1998).
36. Henriques, A., Koliaraki, V. & Kollias, G. Mesenchymal MAPKAPK2/HSP27 drives intestinal carcinogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **115**, E5546–E5555 (2018).
37. Pavan, S. et al. HSP27 is required for invasion and metastasis triggered by hepatocyte growth factor. *Int. J. Cancer* **134**, 1289–1299 (2014).
38. Xu, L., Chen, S. & Bergan, R. C. MAPKAPK2 and HSP27 are downstream effectors of p38 MAP kinase-mediated matrix metalloproteinase type 2 activation and cell invasion in human prostate cancer. *Oncogene* **25**, 2987–2998 (2006).
39. Lizcano, J. M. et al. LKB1 is a master kinase that activates 13 kinases of the AMPK subfamily, including MARK/PAR-1. *EMBO J.* **23**, 833–843 (2004).
40. Gray, D. et al. Maternal embryonic leucine zipper kinase/murine protein serine-threonine kinase 38 is a promising therapeutic target for multiple cancers. *Cancer Res.* **65**, 9751–9761 (2005).
41. Liu, G. et al. Analysis of gene expression and chemoresistance of CD133+ cancer stem cells in glioblastoma. *Mol. Cancer* **5**, 67 (2006).
42. Spurgers, K. B. et al. Identification of cell cycle regulatory genes as principal targets of p53-mediated transcriptional repression. *J. Biol. Chem.* **281**, 25134–25142 (2006).
43. Giuliano, C. J., Lin, A., Smith, J. C., Palladino, A. C. & Sheltzer, J. M. MELK expression correlates with tumor mitotic activity but is not required for cancer growth. *Elife* **7**, e32838 (2018).
44. Lin, A., Giuliano, C. J., Sayles, N. M. & Sheltzer, J. M. CRISPR/Cas9 mutagenesis invalidates a putative cancer dependency targeted in on-going clinical trials. *Elife* **6**, e24179 (2017).
45. Wang, Y., Li, B. B., Li, J., Roberts, T. M. & Zhao, J. J. A conditional dependency on MELK for the proliferation of triple-negative breast cancer cells. *iScience* **9**, 149–160 (2018).
46. Liang, Y., Liu, J. & Feng, Z. The regulation of cellular metabolism by tumor suppressor p53. *Cell Biosci.* **3**, 9 (2013).
47. Ellisen, L. W. et al. REDD1, a developmentally regulated transcriptional target of p63 and p53, links p63 to regulation of reactive oxygen species. *Mol. Cell* **10**, 995–1005 (2002).
48. Shoshani, T. et al. Identification of a novel hypoxia-inducible factor 1-responsive gene, RTP801, involved in apoptosis. *Mol. Cell. Biol.* **22**, 2283–2293 (2002).
49. Sofer, A., Lei, K., Johannessen, C. M. & Ellisen, L. W. Regulation of mTOR and cell growth in response to energy stress by REDD1. *Mol. Cell. Biol.* **25**, 5834–5845 (2005).
50. Gottlob, K. et al. Inhibition of early apoptotic events by Akt/PKB is dependent on the first committed step of glycolysis and mitochondrial hexokinase. *Genes Dev.* **15**, 1406–1418 (2001).
51. Lehraiki, A. et al. Inhibition of melanogenesis by the antidiabetic metformin. *J. Investig. Dermatol.* **134**, 2589–2597 (2014).
52. Corazao-Rozas, P. et al. Mitochondrial oxidative stress is the Achilles's heel of melanoma cells resistant to Braf-mutant inhibitor. *Oncotarget* **4**, 1986–1998 (2013).
53. Rouaud, F., Boucher, J. L., Slama-Schwok, A. & Rocchi, S. Mechanism of melanoma cells selective apoptosis induced by a photoactive NADPH analogue. *Oncotarget* **7**, 82804–82819 (2016).
54. Botton, T. et al. Ciglitazone negatively regulates CXCL1 signaling through MITF to suppress melanoma growth. *Cell Death Differ.* **18**, 109–121 (2011).

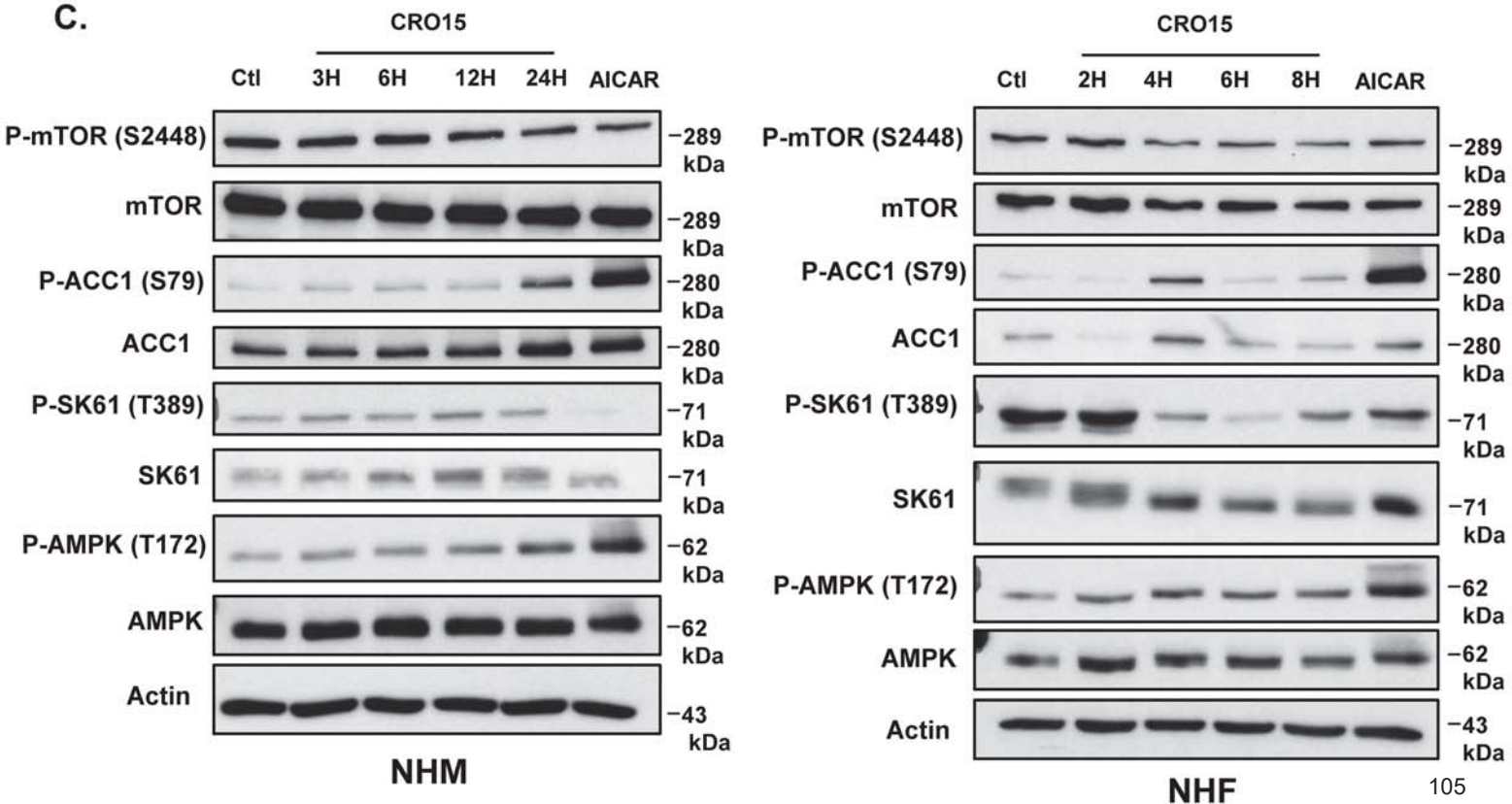
A.



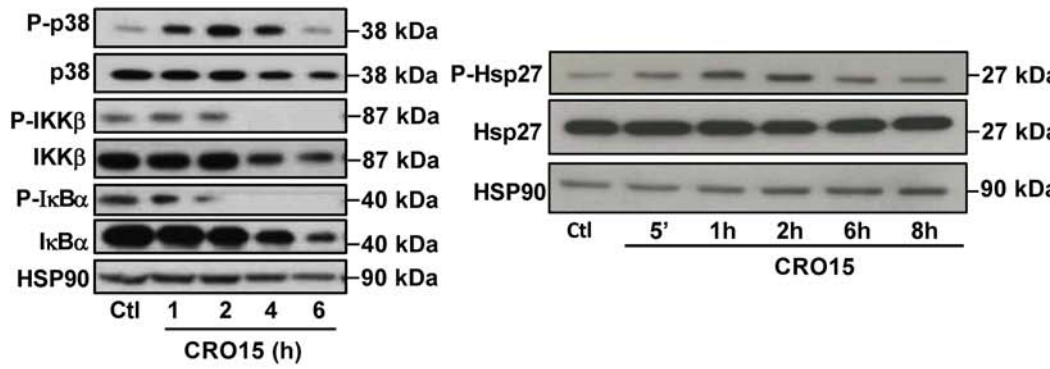
B.



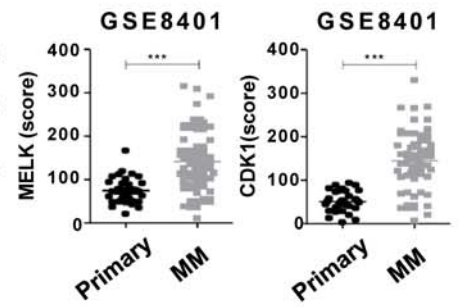
C.



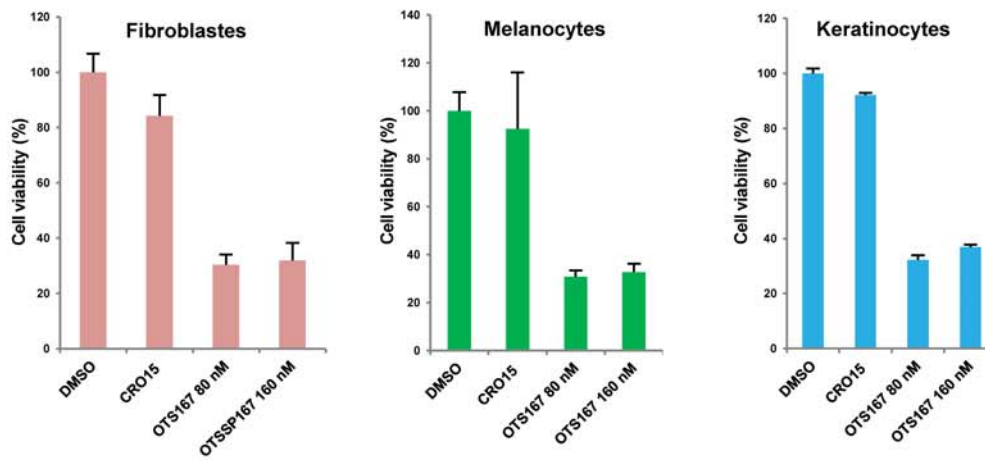
A.



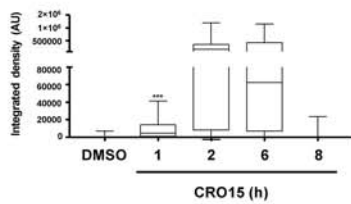
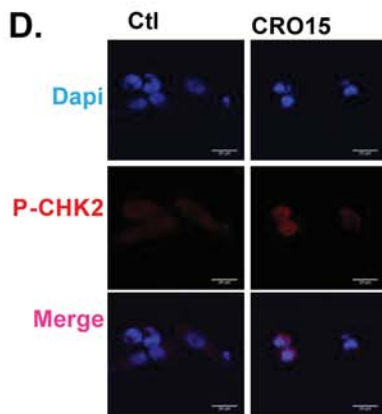
B.



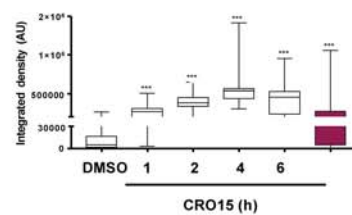
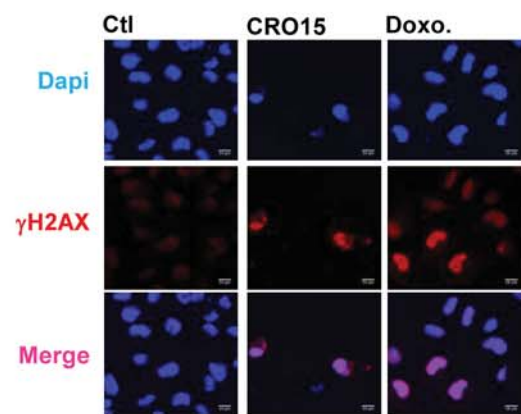
C.



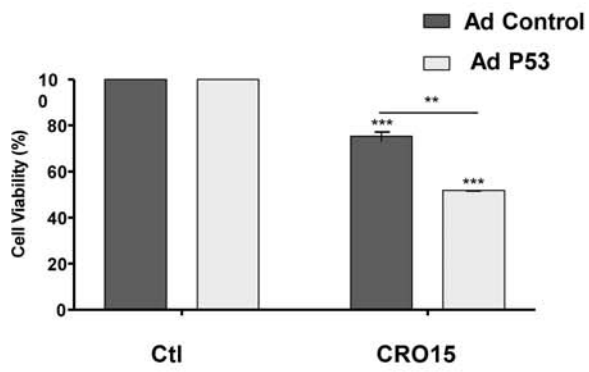
D.



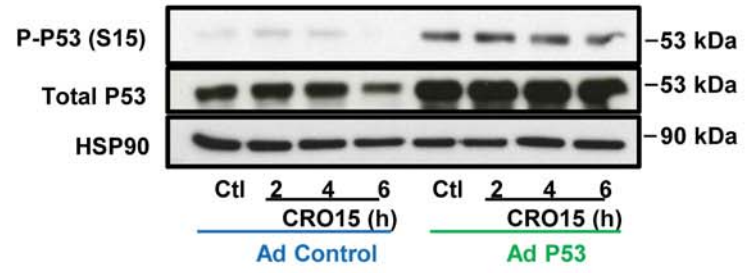
E.

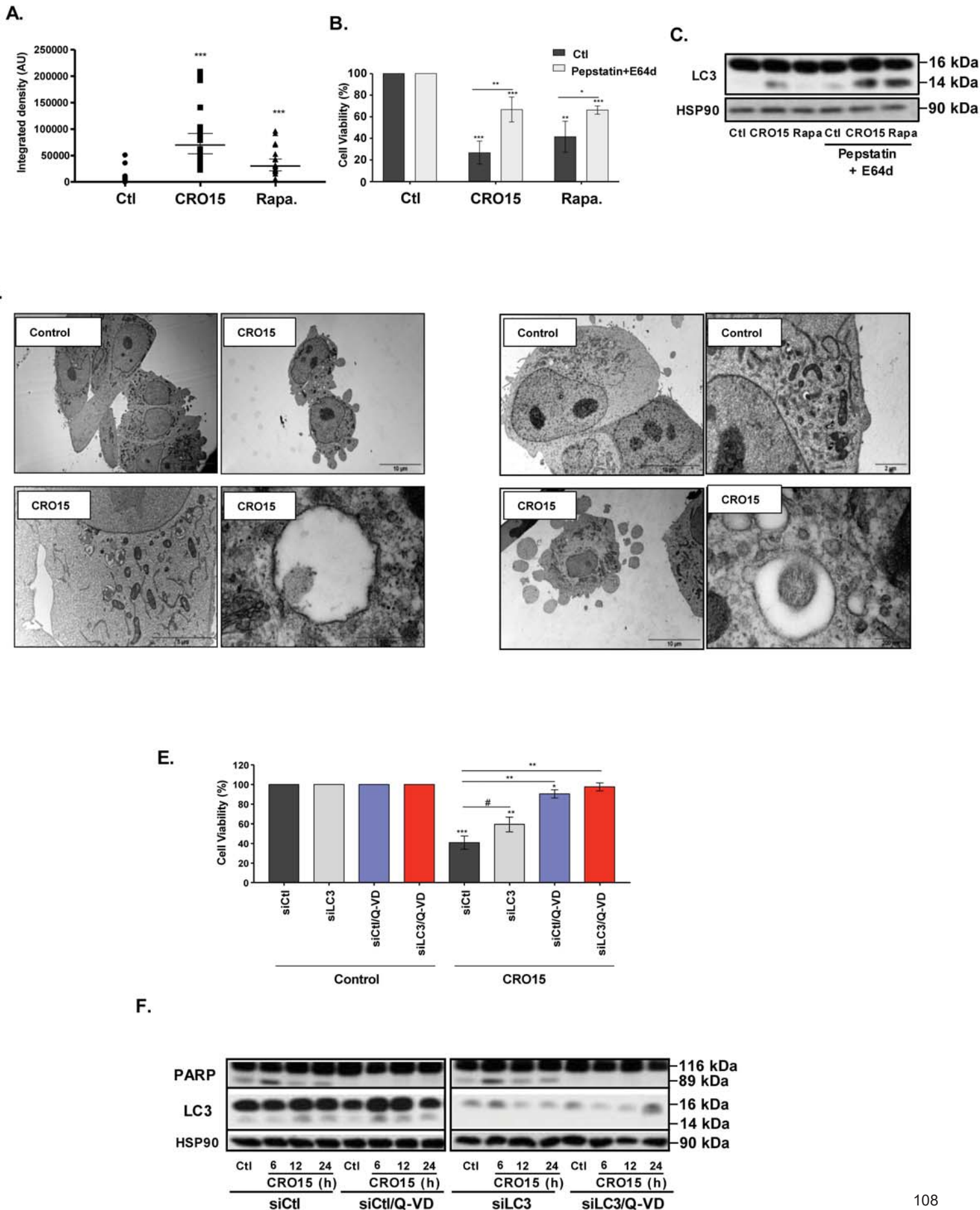


A.

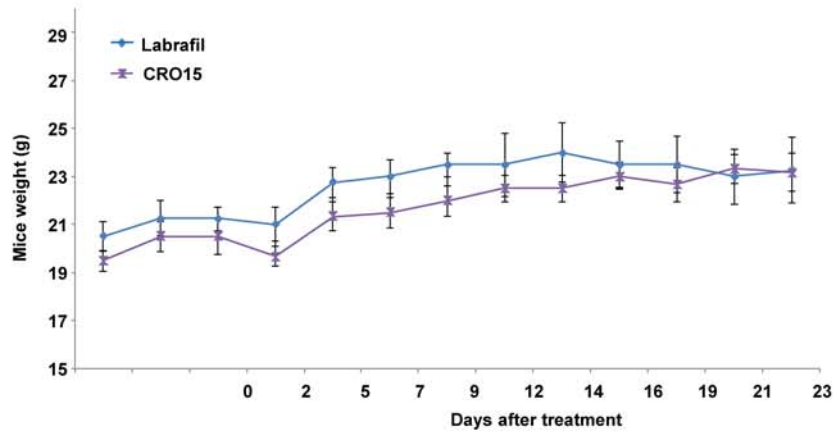


B.

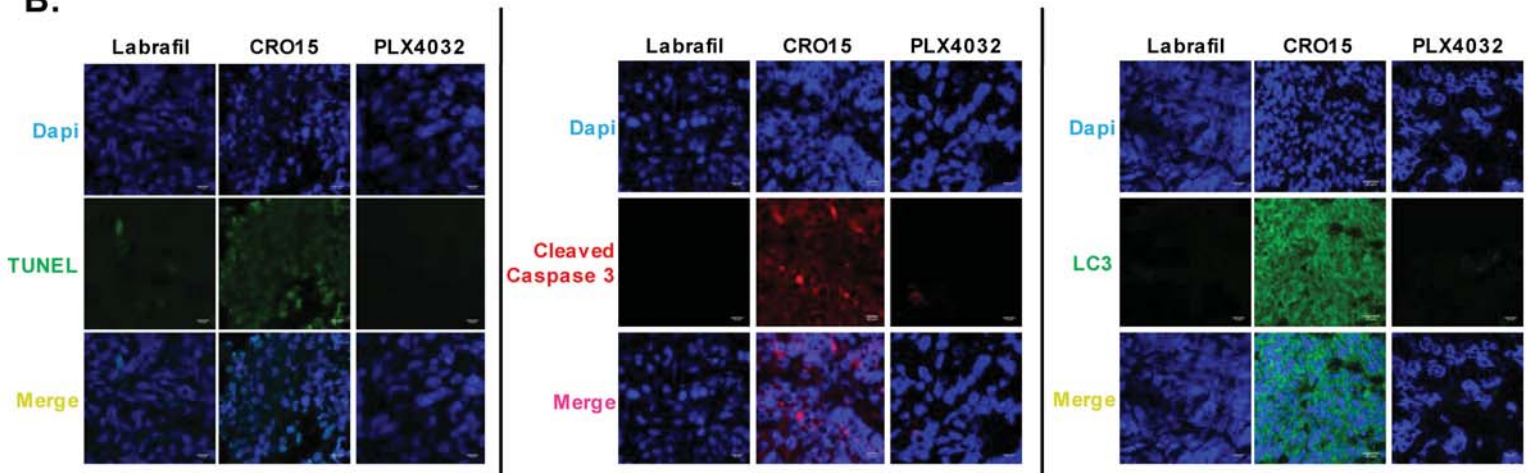


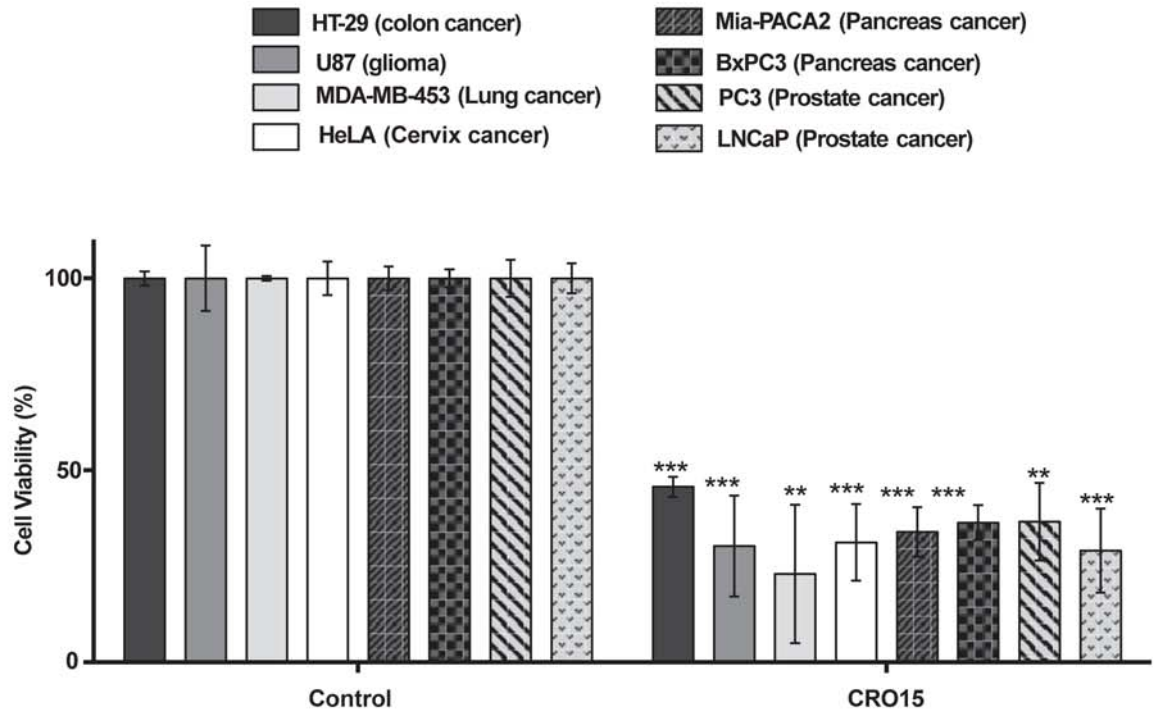


A.



B.





SUPPLEMENTAL INFORMATIONS

Discovery of a new molecule inducing melanoma cell death: dual AMPK/MELK targeting for novel melanoma therapies

Emilie Jaune^{1,2*}, Elisa Cavazza^{1,2*}, Cyril Ronco^{2,3,2}, Oleksandr Grytsai^{3,2}, Patricia Abbe^{1,2}, Nedra Tekaya^{1,2}, Marwa Zerhouni^{1,2}, , Guillaume Beranger^{1,2}, Lisa Kaminski^{4,2}, Frédéric Bost^{4,2}, Maeva Gesson^{1,2}, Meri Tulic^{1,2}, Paul Hofman^{5,6,7}, Robert Ballotti^{8,2}, Thierry Passeron^{1,9}, Thomas Botton^{1,2}, Rachid Benhida^{3,2}, Stéphane Rocchi^{1,2}.

¹INSERM, U1065, Equipe 12, Centre Méditerranéen de Médecine Moléculaire (C3M), Bâtiment ARCHIMED, 151 route de saint Antoine de Ginestière, 06204 Nice cedex 3, France.

² Université Cote d'Azur, Nice, France

³Institut de Chimie de Nice UMR-CNRS 7272, Université Nice Sophia Antipolis, Parc Valrose, 06108 Nice Cedex 2, France

⁴INSERM, U1065, Equipe 5, Centre Méditerranéen de Médecine Moléculaire (C3M), Bâtiment ARCHIMED, 151 route de saint Antoine de Ginestière, 06204 Nice cedex 3, France.

⁵UFR de Médecine, Université de Nice Sophia Antipolis, 06000 Nice, France

⁶Institute of Research on Cancer and Ageing of Nice (IRCAN), INSERM U1081, CNRS UMR7284, Nice 06107, France

⁷Laboratoire de pathologie clinique et expérimentale et Hospital-related biobank (BB-0033-00025), Hôpital Pasteur, 06002 Nice, France

⁸ INSERM, U1065, Equipe 1, Centre méditerranéen de Médecine Moléculaire (C3M), Bâtiment ARCHIMED, 151 route de saint Antoine de Ginestière, 06204 Nice cedex 3, France.

⁹ Service de Dermatologie, Hôpital Archet II, CHU, 06204 Nice, France.

Running title: New anti-melanoma compounds

Conflict of Interest statement: There is no conflict of interest

*Equal contribution to this work

Correspondence should be address to:

srocchi@unice.fr (S.R.)

benhida@unice.fr (R.B.)

Thomas.BOTTON@univ-cotedazur.fr (T.B.)

EXPERIMENTAL SUPPLEMENTAL PROCEDURES

Cell Cultures

Cells were grown in RPMI 1640 or in DMEM supplemented with 10% FCS and penicillin/streptomycin (100 U/ml/50 mg/ml) at 37°C and 5% CO₂. Fresh sterile tissues were obtained from surgical waste from patients diagnosed with metastatic melanoma at the Nice CHU hospital and treated as previously reported (Lehraiki et al., 2015). Written informed consent was obtained from each patient included in this study, and the study was approved by the hospital's ethics committee (Nice Hospital Center and University of Nice Sophia Antipolis, no. 210-2998).

Immunofluorescence Microscopy

Monolayers prepared for fluorescent staining were grown on glass coverslips. Immunofluorescence experiments were carried out as previously described (Rouaud et al., 2018). The confocal microscope was a Nikon A1R on an inverted Nikon Eclipse Ti stand (Nikon Instruments, Japan) using objectives Plan 2X dry, 0.1 NA and/or Plan Fluor 10X dry NA 0.30 and/or Plan Apo 20X NA 0.8 and/or Apo 40X water 1.3 NA and/or Plan Fluor 40X oil 1.3 NA and/or Plan Apo 63X oil 1.4 NA. The LASERs used were LASER diode 405 nm and/or Argon LASER 488 nm and/or DPSS 561 nm, HeNe 633 nm. The microscope was composed of 2 PMTs equipped with 450/50 and 700/75 filter set, 2 GaAsP equipped with 515/30 and 585/65 filter-set, and 1 external PMT for transmission. The microscope was equipped with an automated xy stage for mosaic acquisitions (Märzhäuser, Wetzlar, Germany), and z-acquisitions were performed using the microscope z-drive and/or piezo stage.

For each condition, a minimum of 30 cells or 3 sections of tumors were analysed. Quantification of integrated intensity by cells was analyzed as a macro on Fiji.

Mitochondrial Transmembrane Potential Measurement

Mitochondrial transmembrane potential was measured by TMRE (tetramethylrhodamine, ethyl ester) staining. TMRE is a cell-permeant, positively charged red-orange dye that readily accumulates in active mitochondria due to their relative negative charge. Depolarized or inactive mitochondria have decreased membrane potential and fail to sequester TMRE. Cells were plated in 6-well plates and treated with 5 µM CRO15 for 6H, with 10 mM metformin for 6, with DMSO as a negative control or with 20 µM CCCP for 20 mins as a positive control. Then, 50 nM TMRE was added for 20 min at 37°C. Cells were washed, resuspended in PBS/BSA buffer and analyzed at Ex/Em = 549/575 nm by flow cytometry.

Bioinformatic Analysis

Melanoma gene expression microarray datasets are downloaded from Gene Expression Omnibus (GEO) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo>) under series accession number GSE8401. A total of 83 samples, including 31 PM (primary melanoma) samples and 52 MM (metastatic melanoma) samples, were available in the microarray dataset. The probe files were downloaded for analysis markers in the progression of malignant melanoma on Box-plots represent Student's t-test: * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; **** $P < 0.0001$).

Luciferase Assay

Melanoma cells were seeded in a 24-well plate, and transient transfections were conducted the following day using 2 mL Lipofectamine (Gibco-BRL) and 0.3 mg of PG13-Luc, a p53-dependent firefly luciferase reporter gene in a 200 μ L final volume. The pCMVbGal plasmid was cotransfected to control the variability of transfection efficiency in the reporter assays. The day after transfection, metformin, CRO15 or actinomycin was added to the medium. 24 h after treatment, cells were harvested in 50 μ L of lysis buffer and soluble extracts assayed for luciferase and β -galactosidase activities. All transfections were repeated several times using different plasmid preparations. Luciferase assays were conducted exactly as previously described (Rocchi et al., 2001).

Flow Cytometry

Cells were treated for 24 h with 5 μ M CRO15, 5 μ M PLX4032 or 1 μ M staurosporine for 6 h. Cells were detached with Hqtase and resuspended in specific buffer. For Annexin V-DAPI analysis, cells were incubated in Annexin buffer (Hepes 2 M, NaCl 5 M, KCl 1 M, MgCl₂ 2 M, CaCl₂ 2 M and H₂O + 0.1 μ L DAPI/100 μ L) for 15 mins at 4°C in the dark. For caspase-3 active cell staining, a FITC Active Caspase-3 Apoptosis Kit from BD Pharmingen (550480) was used with the recommended protocol.

In Vivo Murine Cancer Model

Animal experiments were carried out in accordance with the Declaration of Helsinki and were approved by a local ethical committee CIEPAL (Comite Institutionnel d'Ethique Pour l'Animal de Laboratoire-Azur). Female immune-deficient BALB/c nu/nu (nude) mice were obtained at 5 weeks of age from Envigo Laboratory (Gannat, France). Mice were randomly allocated in the different experimental groups and inoculated subcutaneously with A375 or A375-resistant melanoma cells (1.0x10⁶ cells/mouse). After tumor apparition (\pm 4-5 days, 50 mm³), animals received intraperitoneal injection of Labrafil (Control), PLX4032 (0.7 mg/mouse/day) or CRO15 (0.7 mg/mouse/day) dissolved in Labrafil. The growth tumor curves were determined by measuring the tumor volume with a caliper and using the equation $V=(L*W^2)/2$. The variance is similar between the different groups except for the CRO15 group in which mice were responded homogeneously. This experiment wasn't conducted blind. At the end of the experiment, mice were euthanized by cervical dislocation, and tumors were taken for western blot and immunofluorescence experiments. TUNEL assay was performed using the *In Situ* Cell Death Detection Kit (Roche, Meylan, France).

Supplemental figure legends

Supplemental Figure 1: CRO15 inhibits ATP and activates AMPK

- A. A375 cells were treated with 5 μ M CRO15 for 6 h before cell lysates were analyzed with a malachite green phosphate kit.
- B. WM793 and Mewo cells were treated with 5 μ M CRO15 for the indicated times. Lysates were analyzed by western blotting with the indicated antibodies. One representative experiment of three is shown.
- C. NHM (Normal Human Melanocytes) and NHF (Normal Human Fibroblasts) isolated from foreskins were treated with AICAR 1 mM for 24h or with 5 μ M CRO15 for the indicated duration. Lysates were analyzed by western blotting with the indicated antibodies. One representative experiment of three is shown.
- S79 = Serine79; T389 = Threonine389; T172 = Threonine172; S2448 = Serine2448.

Supplemental Figure 2: CRO15 activates the DNA repair pathway

- A. A375 cells were treated with 5 μ M CRO15 for the indicated times. Lysates were analyzed by western blotting with the indicated antibodies; p-P38 (Thr180/Tyr182); p-IKK β (Ser180), p-Ik β α (Ser32). One representative experiment of three is shown.
- B. Bio-informatic analysis of MELK and CDK1 transcript expression in primary and metastasis melanomas.
- C. Primary human fibroblasts, melanocytes and keratinocytes were treated 48 h with 5 μ M CRO15 or MELK inhibitor OTS167 at the indicated concentrations. Cell viability was estimated by trypan blue staining.
- D. Immunofluorescence images of A375-resistant melanoma cells treated with DMSO or 5 μ M CRO15 for 6 h. Active CHK2 was labeled with antibody (red), and DNA was visualized with DAPI (blue). Integrated density was determined for each condition on Fiji. Data are given as the median \pm Min to max value of three independent experiments performed in triplicate. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.
- E. Immunofluorescence images of A375-resistant melanoma cells treated with DMSO, 5 μ M CRO15 for 6 h or 1 mM Doxorubicin for 24 h. γ -H2AX was labeled with antibody (red), and DNA was visualized with DAPI (blue). Integrated density was determined for each condition on Fiji. Data are given as the median \pm Min to max value of three independent experiments performed in triplicate. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

Supplemental Figure 3: CRO15 activates the p53 pathway

- A. SK-MEL-28 cells were infected with an adenovirus encoding a functional p53 protein for 24 h and then treated with 5 μ M CRO15. After 24 h, cell viability was determined by the trypan blue exclusion method. The results are expressed as percentages of the control and data given as the means \pm SEM of three independent experiments performed in triplicate. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.
- B. SK-MEL-28 cells were infected with an adenovirus encoding a functional p53 protein for 24 h and then treated with 5 μ M CRO15 for the indicated times. Lysates were analyzed by western blotting with the indicated antibodies. One representative experiment of three is shown.

Supplemental Figure 4: CRO15 induces autophagy and apoptosis

A. Integrated density from the experiment presented in 5B was determined for each condition on Fiji. Data are geometric means with 95% CI of three independent experiments performed in triplicate. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

B. A375 cells were pretreated with pepstatin and E64d for 2 h and then treated with 5 μM CRO15 or 400 nM rapamycin. After 24 h, cell viability was determined by the trypan blue exclusion method.

C. Lysates from cells treated as in B were analyzed by western blotting with the indicated antibodies. One representative experiment of three is shown.

D. A375 cells were treated with 5 μM CRO15 for 24 h and prepared for electronic microscopy analysis.

E. A375 cells were transfected with siLC3 and/or treated with 20 μM Q-VD before treatment with 5 μM CRO15. After 24 h, cell viability was determined by the trypan blue exclusion method.

F. A375 cells were transfected with siLC3 and/or treated with 20 μM Q-VD and then treated with 5 μM CRO15. Lysates were analyzed by western blotting with the indicated antibodies. One representative experiment of three is shown.

For B and E, the results are expressed as percentages of the control, and data are means \pm SEM of three independent experiments performed in triplicate. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

Supplemental Figure 5: CRO15 induces autophagy and apoptosis in a mouse model

A. Mice from 7E were weighed 3 times a week.

B. Immunofluorescence on xenografts on BRAF inhibitor-resistant tumor sections. LC3B (green) and active caspase 3 (red) were labeled with antibody, and apoptotic cells were visualized with TUNEL kit (green). DNA was visualized with DAPI (blue).

Supplemental Figure 6: CRO15 induces cell death in other cancer types

Indicated cancer cell lines were treated for 48 h with 5 μM CRO15. Cell viability was determined by the trypan blue exclusion method. The results are expressed as percentages of the control and data given as the means \pm SEM of three independent experiments performed in triplicate. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

B. Résultats non publiés

1. Contexte et hypothèse de travail

La voie AMPK, régulateur majeur du métabolisme cellulaire, est également largement impliquée dans la **réponse immunitaire antitumorale** *via* ses effets sur les lymphocytes et sur les cellules myéloïdes. Il a en effet été montré que la Metformine, à travers l'activation de l'AMPK, favorisait la génération de **lymphocytes T mémoires** (Pearce *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2020a) et **protégeait** les lymphocytes de l'apoptose tout en permettant le maintien de leur fonction cytotoxique (Eikawa *et al.*, 2015). La Metformine protège également les lymphocytes des effets de l'**hypoxie** dans le microenvironnement tumoral par inhibition de la respiration mitochondriale, et leur permet ainsi d'assurer leur fonction (Scharping *et al.*, 2017). Par ailleurs, l'activation de la voie AMPK dans les cellules cancéreuses permet la dégradation du ligand **PD-L1**, qui de ce fait ne joue plus son rôle inhibiteur sur les lymphocytes T cytotoxiques (Cha *et al.*, 2018). L'effet de la voie AMPK sur les populations immunitaires myéloïdes est beaucoup plus controversé (Kurelac *et al.*, 2020). Cependant, il a été montré qu'en présence de cellules tumorales, la Metformine était capable d'induire la repolarisation des macrophages M2 en macrophages M1, favorisant l'élimination de la tumeur (Chiang *et al.*, 2017; Ding *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2018a). Une étude récente a montré que le traitement de souris porteuses de tumeurs avec des microparticules chargées avec de la Metformine provoquait une diminution des macrophages M2 au sein de la tumeur. Cette diminution est associée à une augmentation du nombre de lymphocytes T cytotoxiques et à la régression de la croissance tumorale (Wei *et al.*, 2021). D'autre part, la Phenformine induit la diminution des MDSCs au sein de la tumeur de manière AMPK-dépendante (Kim *et al.*, 2017). En adéquation avec les effets de l'activation de la voie AMPK sur les cellules immunitaires, plusieurs études ont montré *in vivo* que la Metformine était capable de potentialiser la réponse aux immunothérapies par anticorps monoclonaux (anti-CTLA4, anti-PD1) (Cha *et al.*, 2018; Kim *et al.*, 2017; Wei *et al.*, 2021). Récemment, l'attention s'est également portée sur l'influence de la Metformine sur la modulation du **microbiote intestinal** (Cuesta-Zuluaga *et al.*, 2017; Wu *et al.*, 2017). Le biguanide provoque en effet une augmentation du taux de *Akkermansia muciniphila* dans ce microbiote. Or, ces bactéries (*A. muciniphila*) sont impliquées dans la réponse aux inhibiteurs de checkpoint chez les patients atteints de mélanome (Gopalakrishnan *et al.*, 2018). Cela suggère que la Metformine pourrait améliorer l'effet des ICI en modulant le microbiote intestinal. Enfin, une étude rétrospective sur des patients atteints de mélanome métastatique traités par immunothérapies traités ou non avec de la Metformine dans le cadre de leur diabète, montre que la Metformine améliore la survie globale et la survie sans progression (Afzal *et al.*, 2018).

D'autre part, même s'il existe peu de travaux sur la voie MELK dans la réponse immunitaire, il a été suggéré que la surexpression de MELK dans les cellules cancéreuses pouvait induire, la **polarisation des macrophages** vers un type M2 dans le milieu environnant *via* la diminution du micro-ARN miR34a (Zhang *et al.*, 2020b).

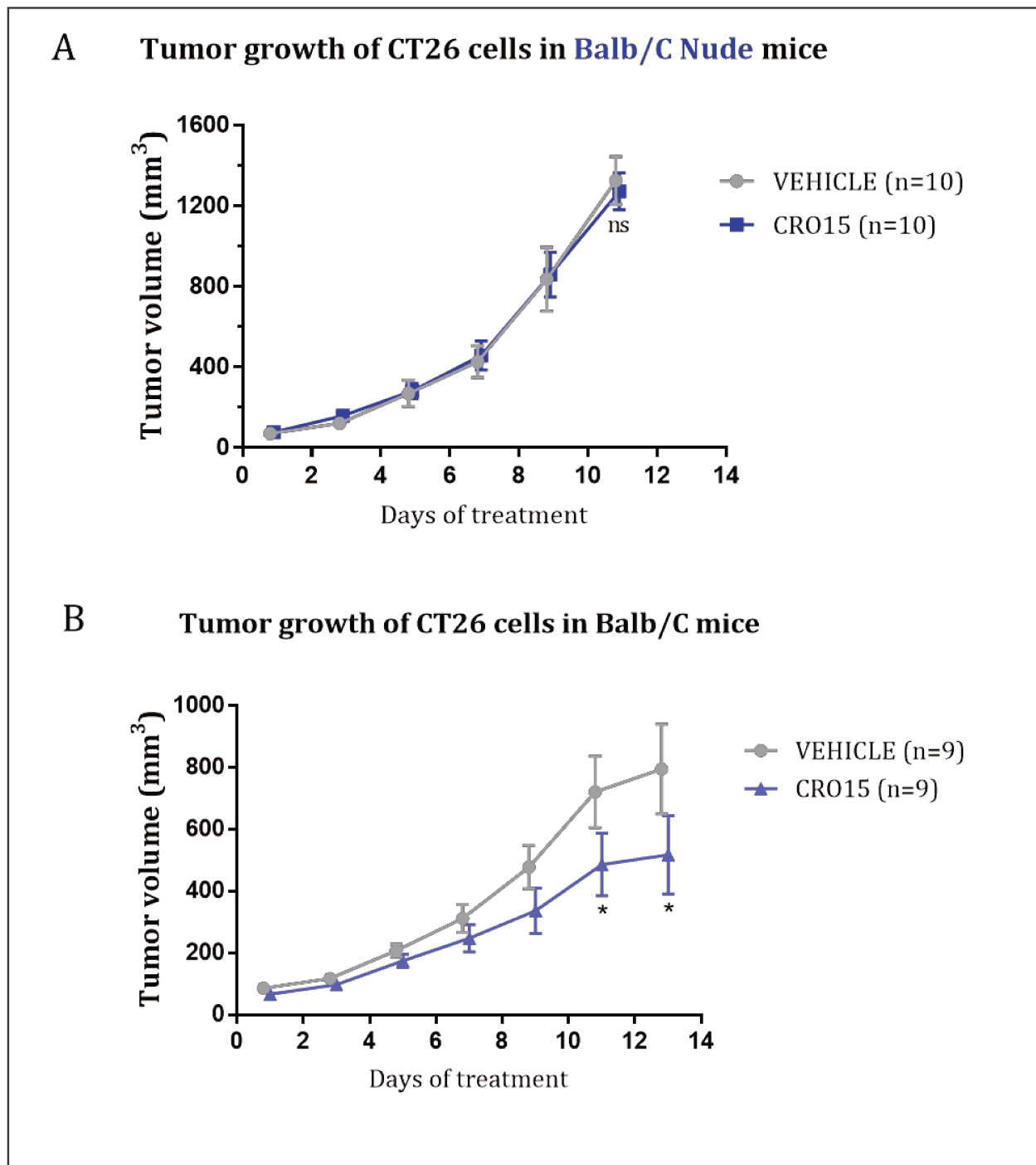


Figure R2: La réponse antitumorale de CRO15 est dépendante du contexte immunitaire de la souris

Des souris femelles **immuno-déficientes BALB/c Nude (A)** ou des **souris immunocompétentes BALB/c** de même fond génétique (**B**) ont été greffées avec 500000 cellules CT26 en sous-cutané. Lorsque les tumeurs ont atteint 50mm³ (6-8jours), les souris ont été randomisées et traitées tous les jours avec du **Labrafil** (Véhicule) ou du **CRO15** à raison de 0,7mg/souris/jour. La courbe moyenne du volume tumoral est représentée ici (+/-SEM) et a été déterminée en mesurant le volume tumoral de chaque souris avec un pied à coulisse. * : p < 0.05

Lors de notre étude, nous avons montré que CRO15, composé dérivé de la Metformine, était capable d'inhiber la respiration mitochondriale et d'activer la voie AMPK d'un côté et d'inhiber la kinase MELK de l'autre. Ce double effet provoque ainsi la mort des cellules de mélanome (Jaune*, Cavazza* *et al.*, 2021). Nous émettons donc l'hypothèse que par la modulation de ces voies, CRO15 serait lui aussi capable de **favoriser la réponse immunitaire antitumorale** en agissant sur les cellules immunitaires elles-mêmes ou en induisant un terrain favorable à leur activité.

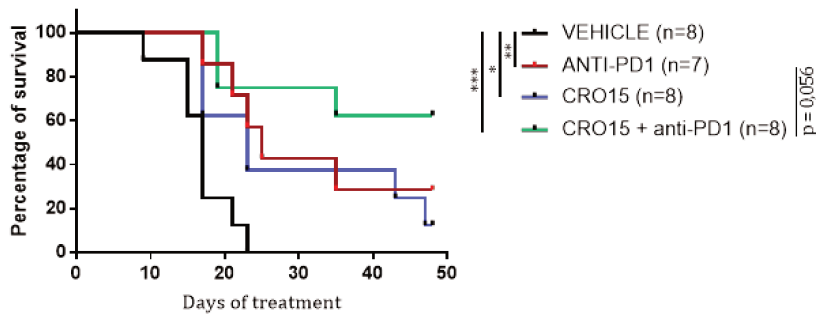
2. Résultats obtenus

2.1. **Choix du modèle d'étude**

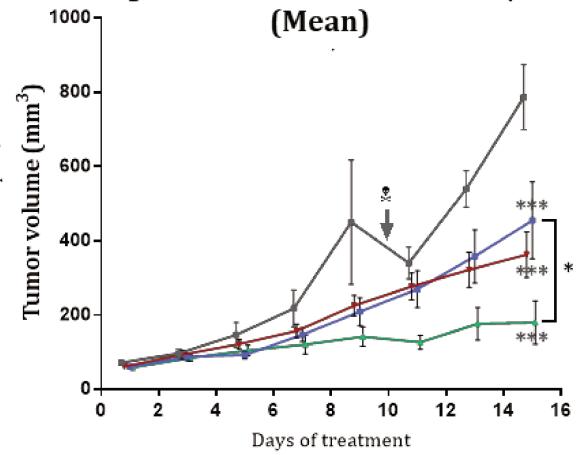
Afin d'étudier l'influence de CRO15 sur la réponse immunitaire antitumorale *in vivo*, nous nous sommes tout d'abord intéressés à des modèles syngéniques de **mélanome** dont nous disposions au laboratoire : les cellules **B16F10** (BRAF^{WT}/NRAS^{WT}/NF1^{WT}) issues d'un mélanome spontané chez la souris C57BL/6 (*Jackson Laboratories*, 1954), des cellules **Yumm1.7** (BRAF^{V600E}/PTEN^{-/-}/CDKN2A^{-/-}) établies à partir des tumeurs de **souris C57BL/6** génétiquement modifiées dans le laboratoire du Dr. Bosenberg (*Dankort et al.*, 2009; *Meeth et al.*, 2016) et des **cellules BP** (BRAF^{V600E}/PTEN^{-/-}) générées depuis des tumeurs de souris **C57BL/6** génétiquement modifiées dans le laboratoire du Dr. Wargo (*Cooper et al.*, 2014). Malheureusement, les premiers tests d'allogreffes avec ces lignées ne nous ont pas permis d'aller plus loin avec ces modèles de mélanome. En effet, la croissance rapide des tumeurs de B16F10 et de Yumm1.7 a engendré l'apparition de **nécroses**, rédhibitoires aux yeux de la structure du bien-être animal de notre laboratoire. Nous avons ainsi dû sacrifier les souris prématurément et n'avons pas pu obtenir de résultats interprétables sur ces lignées. Les **cellules BP** étaient moins nécrosantes mais ont montré une **réponse totale** ou quasi-totale au traitement par **anti-PD1**, ne permettant pas l'observation d'une potentialisation de réponse par notre composé.

Afin de pouvoir observer une telle potentialisation, nous nous sommes alors intéressés à un modèle d'adénocarcinome de colon, des **cellules CT26**, qui ont pour caractéristique d'être **immunogéniques** tout en induisant une réponse seulement **partielle** aux anti-PD1 (modèle parfois qualifié de « tiède ») (*Selby et al.*, 2016). Ce modèle, muté pour le gène *KRAS* et délété pour le gène *CDKN2A*, mais non muté pour le gène *TP53* (*Castle et al.*, 2014), est devenu un modèle fréquemment utilisé pour étudier la modulation de la réponse aux immunothérapies (*D'Alise et al.*, 2019; *Shi et al.*, 2019; *Tan et al.*, 2020; *Taniura et al.*, 2020). Les patients atteints de carcinome de colon sont aujourd'hui majoritairement traités par chirurgie, chimiothérapie et **thérapies ciblées** (anti-VEGF, anti-EGFR notamment) (<https://www.fondation-arc.org>). Cependant, le traitement par combinaison d'immunothérapies (Nivolumab + Ipilimumab) de patients présentant un type particulier de carcinome colique métastatique a prouvé son efficacité (*Overman et al.*, 2018) et cette bithérapie a été approuvée en 2018 par l'autorité de régulation sanitaire américaine (FDA). De plus, le **modèle murin CT26** présente certaines caractéristiques qui se rapprochent de celles du mélanome humain. Par exemple, les tumeurs de CT26 ont un phénotype **mésenchymateux** et l'**activité cytolytique** mesurée au sein de ces tumeurs est également comparable à celle observée dans les tumeurs de mélanome humaines (*Zhong et al.*, 2020).

A Survival curve of CT26-bearing Balb/C



B Tumor growth of CT26 cells in Balb/C mice (Mean)



C

Tumor growth of CT26 cells in Balb/C mice (Individual tumors)

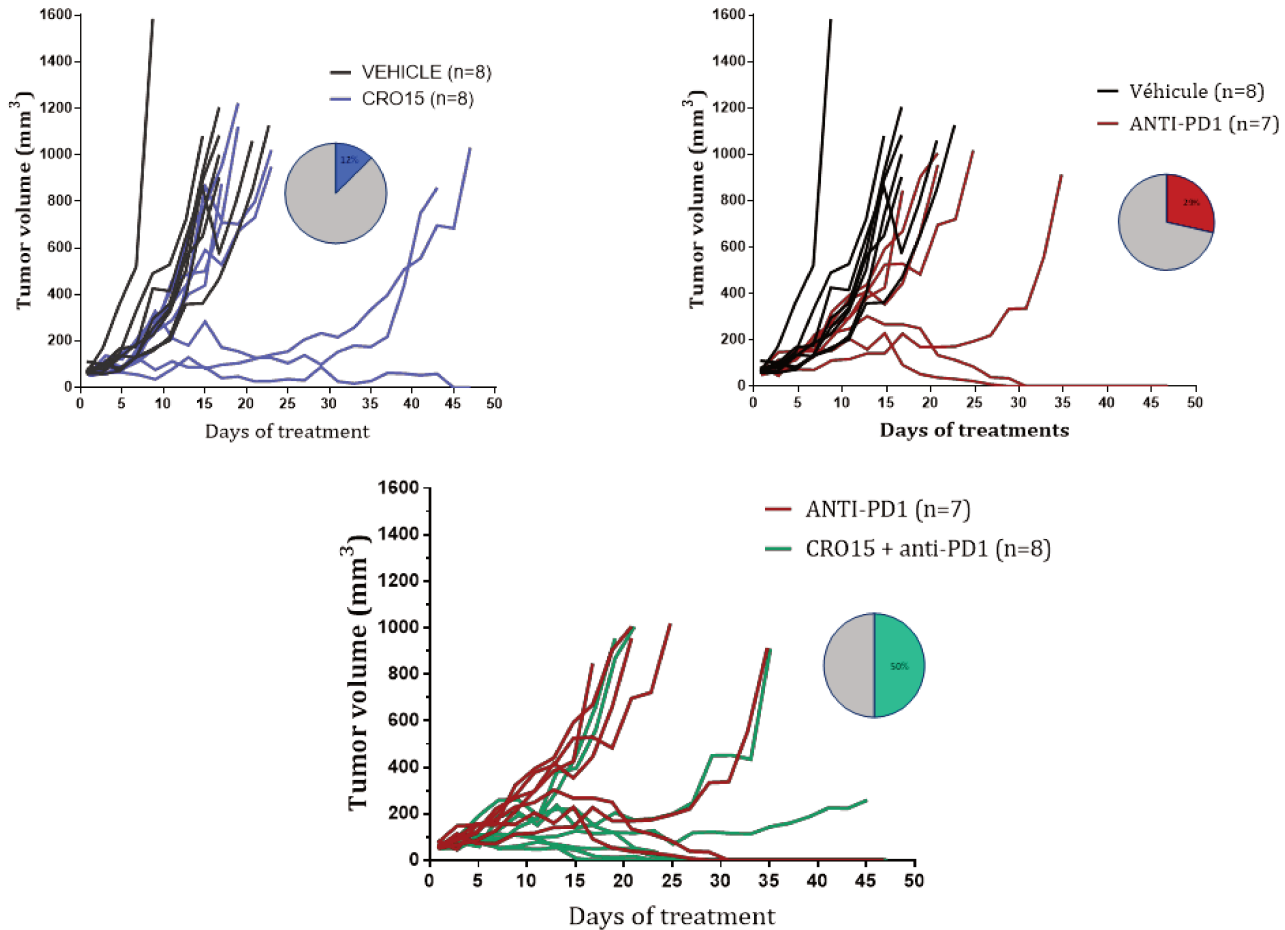


Figure R3 : CRO15 potentialise la réponse aux anti-PD1 dans les tumeurs de CT26

Des souris femelles **BALB/c** ont été greffées avec 500000 cellules CT26 en sous-cutané. Lorsque les tumeurs ont atteint 50mm³ (6-8jours), les souris ont été randomisées et traitées avec du **Labrafil** (Contrôle), du **CRO15** (0,7mg/souris/jour), des **anti-PD1** (clone RMPI-14, 0,125mg/souris, tous les 3 jours à raison de 4 injections totales), ou la combinaison **CRO15 et anti-PD1**.

A. Courbes de **survie des souris** établies sur 47 jours. Les tumeurs des souris sont mesurées trois fois par semaine au pied à coulisse et la souris est sacrifiée dès que la tumeur atteint au moins 900mm³. Un test **log-rank** (Mantel-Cox) a été utilisé pour calculer la significativité des différences de survie entre les groupes.

B. Courbes moyennes du **volume tumoral** +/-SEM sur **15 jours** de traitement, calculées à partir des volumes tumoraux de 7 à 8 souris dans chaque groupe. A partir du 15^{ème} jour, les souris commencent à être sacrifiées et la moyenne ne peut plus être suivie. Une souris (contrôle) a du être sacrifiée au jour 10 (**flèche**). Un test **two-way Anova** (avec test de comparaisons multiples Tukey's) a été utilisé pour calculer la significativité des résultats au 15^{ème} jour de traitement. **Etoiles grises** : significativité par rapport au contrôle.

C. Courbes **individuelles** de croissance tumorale. Les diagrammes représentent le **taux de réponse complète** obtenu dans chaque groupe (12% CRO15 ; 29% anti-PD1 ; 50% CRO15 + anti-PD1).

* : p < 0,05, ** : p < 0,01, *** : p < 0,001

Nous avons donc décidé, dans un premier temps, **d'investiguer l'effet de CRO15 sur la réponse immunitaire antitumorale dans ce modèle de CT26**. Le but, à moyen-terme, étant de revenir dans un autre modèle de mélanome murin que ceux testés jusqu'à présent, afin de vérifier que les potentiels effets observés s'appliquent également au mélanome.

2.2. CRO15 induit une réponse antitumorale chez la souris dépendante du contexte immunitaire

Afin d'évaluer la composante immunitaire potentielle dans la réponse antitumorale médiée par CRO15, nous avons comparé la croissance tumorale d'allogreffes de CT26 dans des souris **Balb/c immunocompétentes** et dans des souris **Balb/C immunodéficientes** (Nude) (*Figure R2*). Ces dernières possèdent un thymus non fonctionnel et ne peuvent pas générer de lymphocytes T effecteurs cytotoxiques. Dans les souris immunocompétentes, CRO15 induit une **diminution significative** de la **croissance tumorale** après onze à treize jours de traitement (*Figure R2.B*). La réponse modeste par rapport à celle précédemment observée dans le modèle de cellules humaines A375 (Jaune, Cavazza *et al.*, 2021), est en adéquation avec les résultats de viabilités obtenus *in vitro* qui montrent que les cellules murines, plus agressives, répondent moins bien au CRO15 que les cellules humaines de mélanome (*données non présentées ici*). *A contrario*, nous n'observons **aucun effet** de CRO15 sur la croissance tumorale dans les souris **Nude** (*Figure R2.A*). Cela indique donc que la réponse immunitaire cytotoxique, joue un rôle dans les effets antitumoraux de CRO15.

2.1. CRO15 potentialise la réponse immunitaire aux anti-PD1 dans un modèle de carcinome de colon

2.1.1. CRO15 améliore la réponse antitumorale aux anti-PD1 dans un modèle d'allogreffe de CT26

CRO15 semblant améliorer la réponse immunitaire antitumorale, nous nous sommes demandé s'il pouvait améliorer la réponse des CT26 aux anti-PD1. Pour cela, nous avons tout d'abord déterminé la **croissance tumorale** des tumeurs dans des souris Balb/c traitées avec du **CRO15**, des **anti-PD1**, la combinaison **CRO15 et anti-PD1** ou les contrôles associés (*Figure R3*). Après 47 jours de traitement, nous pouvons observer un **bénéfice significatif** de tous les groupes traités sur la **survie** des souris par rapport au contrôle. De plus, nous pouvons observer un bénéfice (*non significatif*) du **traitement combiné** (CRO15 + anti-PD1) par rapport au traitement par anti-PD1 seul ou au traitement par CRO15 seul (*Figure R3.A*). Nous avons également montré que chaque traitement seul, et à *fortiori* la combinaison de CRO15 et des anti-PD1 réduisait la **croissance tumorale** par rapport au contrôle, comme nous l'indique les différences significatives observées au 15^{ème} jour de traitement entre les moyennes des différents groupes (*Figure R3.B*). Nous semblons également voir un bénéfice du traitement **CRO15 et anti-PD1** par rapport au CRO15 seul ($p < 0,05$) et par rapport aux anti-PD1 seuls mais le design de cette expérience ne nous donne pas le pouvoir statistique suffisant pour mettre en

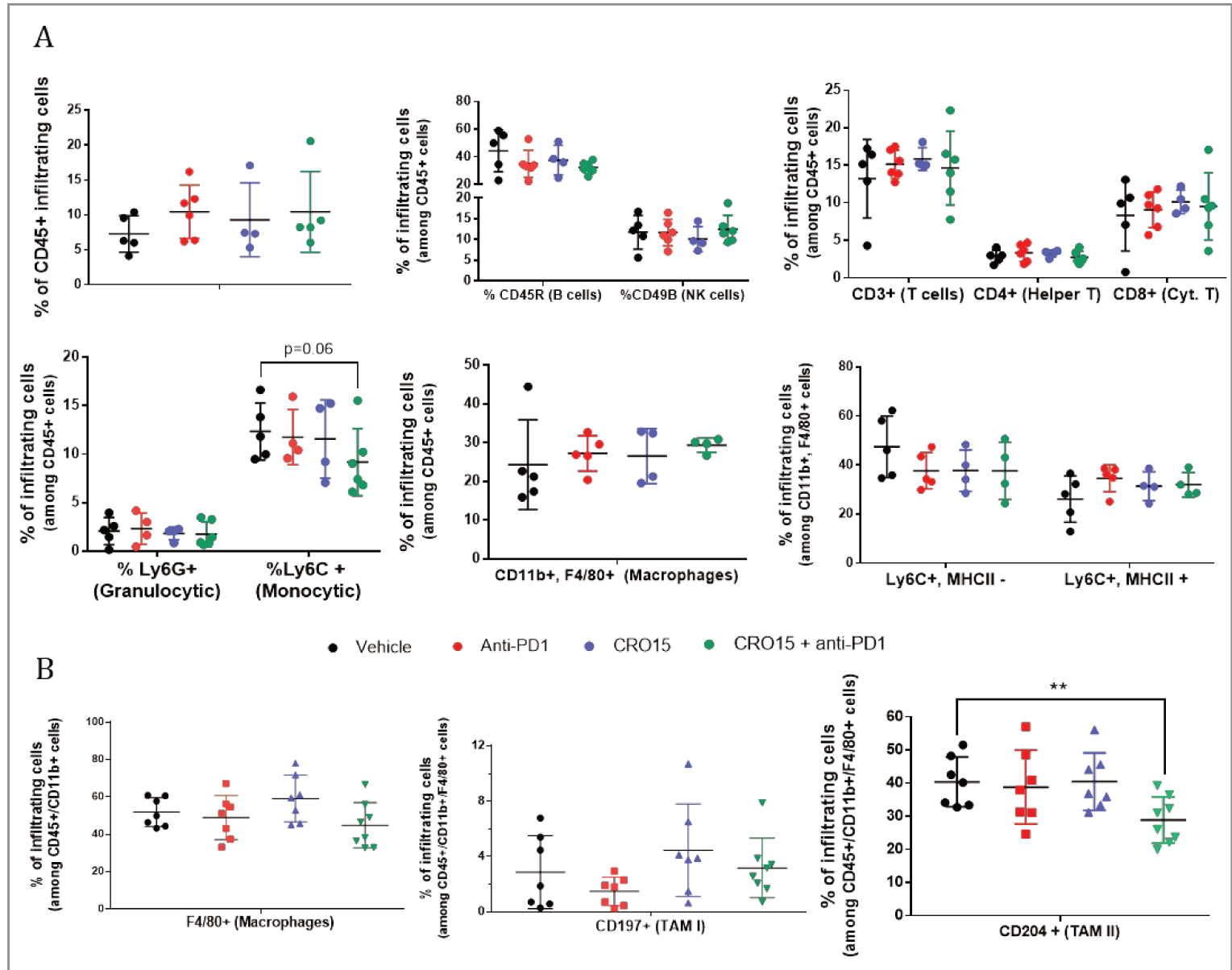


Figure R4 : CRO15 diminue l'infiltrat de cellules myéloïdes immunosuppressives dans des tumeurs de CT26

Des souris femelles **BALB/c** ont été greffées avec 500000 cellules CT26 en sous-cutané. Lorsque les tumeurs ont atteint 50mm³ (6-8jours), les souris ont été randomisées et traitées avec du **Labrafil** (Contrôle), du **CRO15** (0,7mg/souris/jour), des **anti-PD1** (clone RMPI-14, 0,125mg/souris, tous les 3 jours à raison de 4 injections totales), ou la combinaison **CRO15 et anti-PD1**. Au 11^{ème} jour de traitement, toutes les souris sont euthanasiées et les populations immunitaires sont analysées par cytométrie en flux.

- A. Analyse des populations lymphoïdes et myéloïdes. Lors de l'euthanasie des souris, les tumeurs sont prélevées puis dissociées de manière enzymatique. Deux panels d'anticorps sont utilisés pour effectuer les marquages : un panel de type **lymphoïde** (CD45, CD3 ϵ , CD4, CD8, CD49b, CD45b, FoxP3) et un panel de type **myéloïde** (CD45, CD11b, Ly6C, Ly6G, F4/80, CD11c, MHCII). Un marqueur de viabilité est également utilisé.
- B. Analyse des **macrophages** infiltrant la tumeur sur une nouvelle expérience d'allogreffe. Les tumeurs sont prélevées et dissociées, puis marquées grâce à des anticorps reconnaissant les populations myéloïdes (CD45, CD11b, F4/80, CD197, CD204, MHCII). Un marqueur de viabilité est également utilisé.

(A et B) Un test **Mann-Whitney** a été utilisé pour calculer la significativité des différences observées.

* : p < 0,05, ** : p < 0,01, *** : p < 0,001

évidence la significativité de cet effet. Les tumeurs des souris traitées en monothérapie (CRO15 ou anti-PD1) croissent avec un léger délai par rapport aux tumeurs contrôles mais finissent, pour la plupart, par échapper aux traitements (*Figure R3.C*). De manière intéressante, dans le groupe CRO15, deux tumeurs (25%) montrent une **réponse prolongée** au traitement (environ 35 jours) puis finissent par y échapper. C'est également le cas pour une tumeur traitée par anti-PD1 (14%). Dans ces deux groupes, nous pouvons voir une réponse complète dans 12% (1/8, CRO15) et 28% (2/7, anti-PD1) des cas. En revanche, lorsque les traitements sont combinés, **25%** des tumeurs (2/8) montrent une **réponse prolongée** et **50%** (4/8) montrent une **réponse complète**. Cela suggère que le CRO15 potentialise la réponse aux anti-PD1 en augmentant notamment le **taux de réponse** (de 42% à 75%) ainsi que le **taux de réponse complète** (de 28% à 50%) chez les souris porteuses d'un carcinome de colon. Cette expérience *in vivo* de survie et de croissance tumorale a été réitérée et a montré des résultats similaires (*données non présentées*).

2.1.2. CRO15 diminue l'infiltrat tumoral des cellules myéloïdes immunosuppressives

Afin de comprendre les effets obtenus en termes de croissance tumorale, nous nous sommes intéressés aux **cellules immunitaires** qui infiltrent les tumeurs. Pour cela, une nouvelle expérience *in vivo* a été réalisée afin d'observer par **cytométrie de flux** les différentes populations de cellules immunitaires dans la tumeur. Onze jours après le début du traitement, soit peu de temps après la dernière injection d'anti-PD1, les tumeurs ont été prélevées, dissociées, et marquées à l'aide d'anticorps spécifiques des populations d'intérêt. Nous observons tout d'abord qu'il n'y a pas de franche augmentation du pourcentage total de cellules immunitaires (CD45+) dans les groupes traités par rapport au groupe contrôle (*Figure R4.A*). Parmi cette population, nous ne voyons pas de fluctuations des lymphocytes B (CD45R+) ou des cellules NK (CD49b+). De manière contre-intuitive par rapport aux résultats de croissance tumorale, nous ne voyons pas non plus d'augmentation franche des **lymphocytes T** totaux (CD3+), helper (CD4+) ou même **cytotoxiques** (CD8+) dans les groupes anti-PD1 ou combinaison par rapport au contrôle. En revanche, nous pouvons observer dans le panel de cellules myéloïdes (CD45+, CD11b+) une **diminution** ($p=0,06$) **des cellules Ly6C+**, qui sont des cellules **immunosuppressives** de type monocytaire qui pourraient correspondre phénotypiquement aux m-MDSC. De la même manière, bien qu'il n'y ait pas vraiment de différence entre les pourcentages des macrophages totaux (CD11b+, F4/80+) entre les groupes, nous pouvons observer au sein de cette population une **tendance** à la diminution des cellules « Ly6C+, **MHCII-** » et inversement à l'augmentation des cellules « Ly6C+, **MHCII+** » dans les groupes traités par rapport au contrôle. Ces populations pourraient correspondre aux macrophages tumoraux (TAM) de **type M2** et de **type M1**, respectivement. Pour valider cette hypothèse, nous avons réitéré cette expérience *in vivo* en utilisant des anticorps spécifiques des TAM de type I (CD197) et de type II (CD204) (Taniyama *et al.*, 2019; Zheng *et al.*, 2020). Nous constatons alors au sein des macrophages une **diminution significative des TAM de types II**, pro-tumoraux (qui passent de 40% en contrôle à 28% en combinaison CRO15 + anti-PD1) (*Figure R4.B*). Nous n'observons pas de modulation de la population TAM de type I, très peu représentée dans les

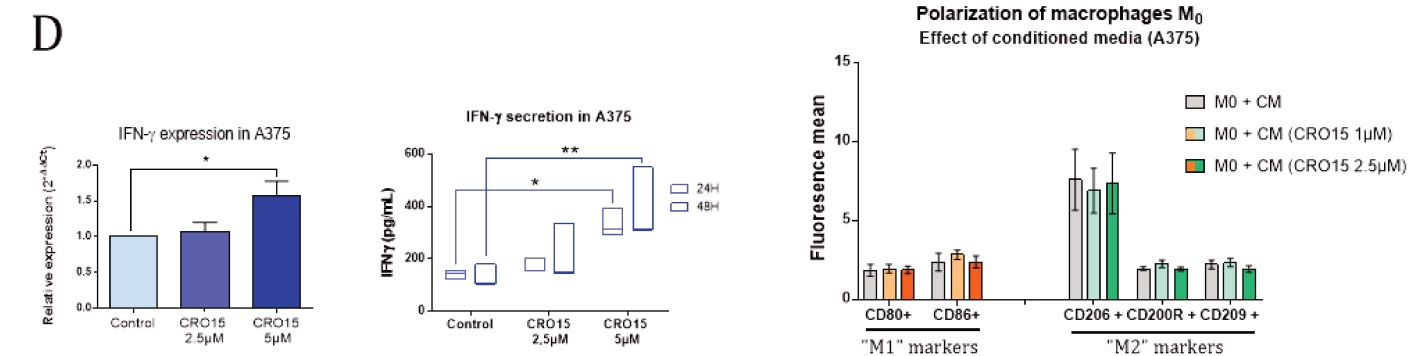
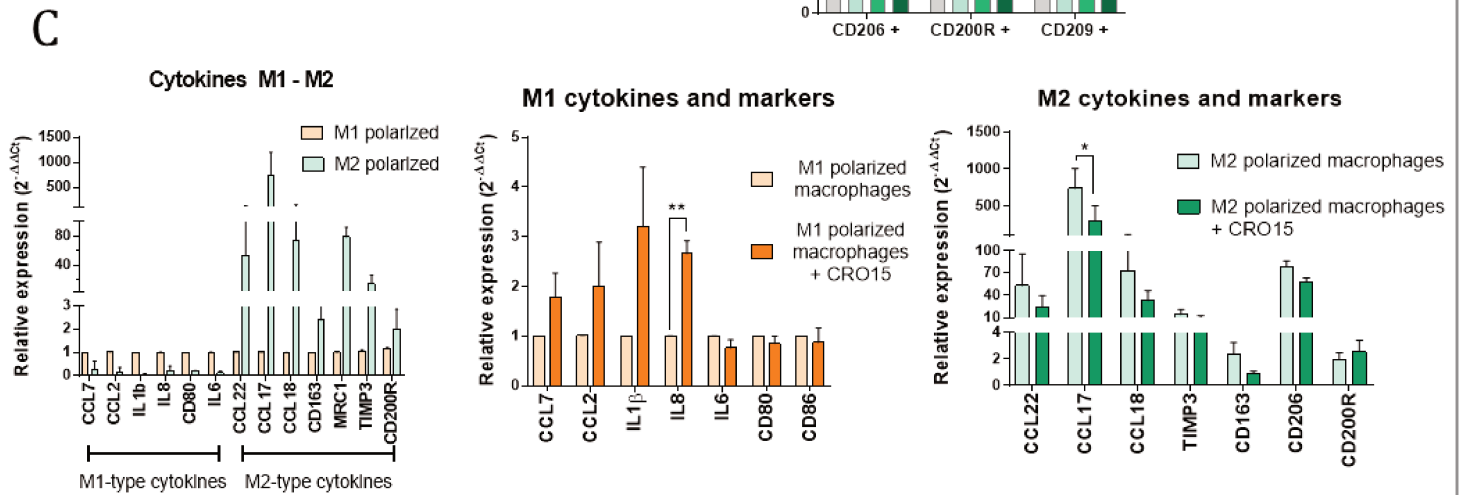
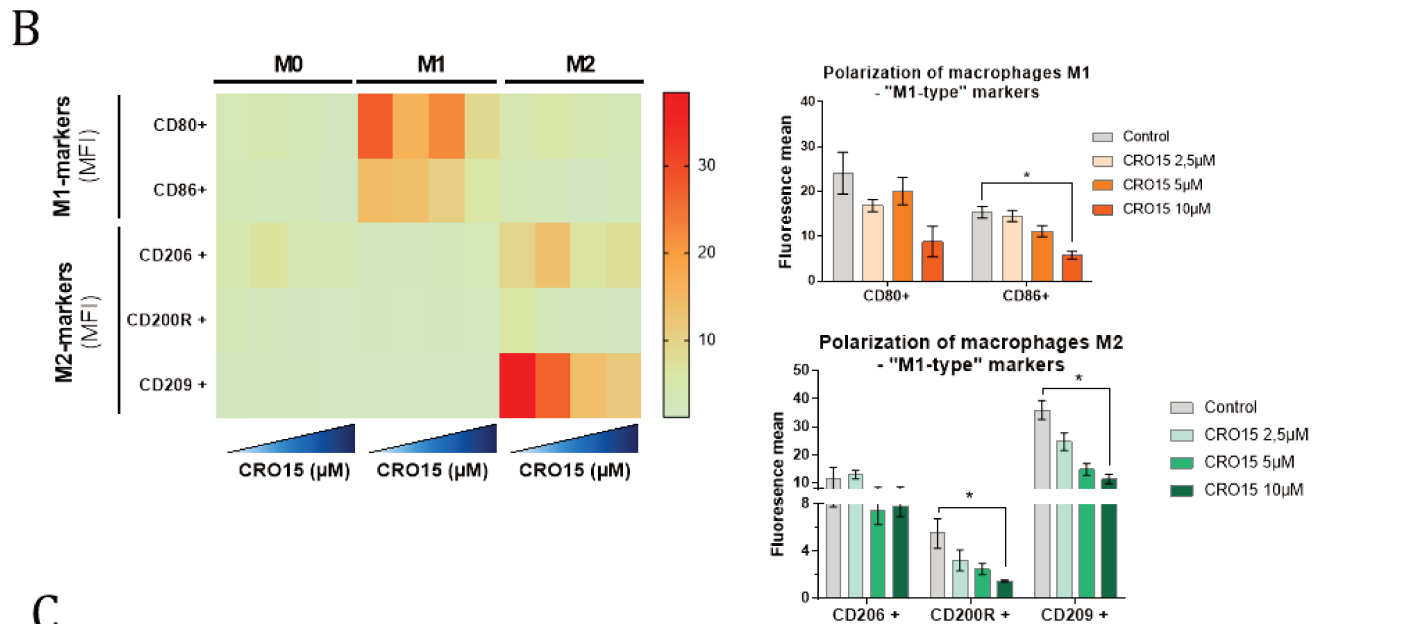
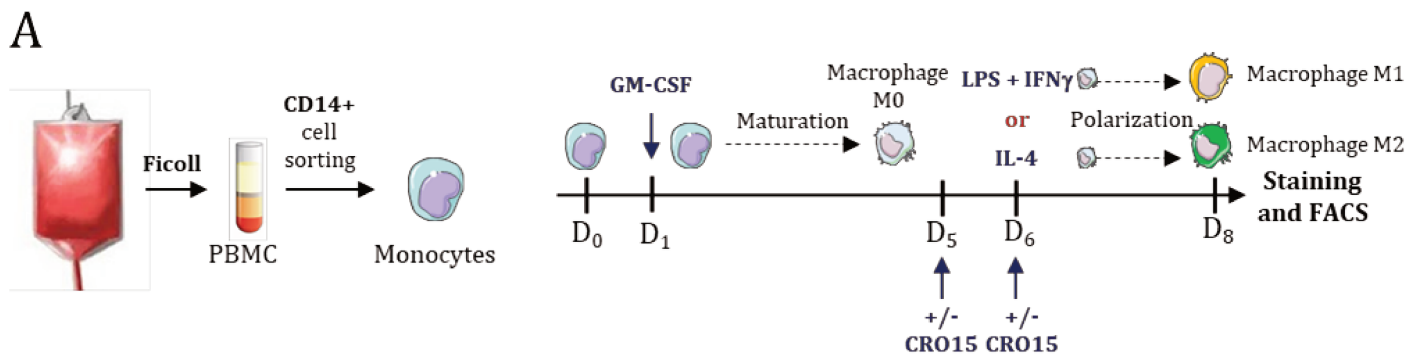


Figure R5 : CRO15 module la polarisation des macrophages *in vitro* par effet direct

Légende sur la page suivante

macrophages (moins de 5%). Dans leur ensemble, ces données nous indiquent que CRO15 semble avoir un effet sur les populations myéloïdes immunosuppressives infiltrant la tumeur (m-MDSC et TAM-II) en provoquant leur diminution au sein de la tumeur.

2.2. CRO15 module la polarisation des macrophages *in vitro*

Nous venons de voir que CRO15 semblait induire une diminution d'infiltrats de macrophages de type M2 *in vivo* au sein de la tumeur. Ce phénomène pourrait être expliqué par le fait que notre composé induit une diminution de la polarisation des macrophages M2. Afin d'évaluer cette hypothèse, nous avons analysé *in vitro* l'effet de CRO15 sur la polarisation de macrophages humains (*Figure R5*). Pour cela, après avoir isolé des monocytes depuis une poche de sang de patient sain, nous les avons différenciés en macrophages. Nous avons ensuite pré-traité des macrophages (M0) avec du CRO15 avant d'induire leur **polarisation**, puis nous avons observé les **marqueurs de surface** spécifiques des macrophages M1 ou M2 par cytométrie en flux (*Figure R5.A*). Par cette analyse, nous avons montré que le traitement par CRO15 avait peu d'influence sur l'expression des marqueurs de surface dans les macrophages non polarisés (M0). En revanche, il provoque une **diminution significative** de la moyenne d'intensité de fluorescence (MFI) de certains marqueurs M1 (CD86) dans les macrophages polarisés M1 ainsi que **des marqueurs M2** dans les **macrophages polarisés M2** (CD200R, CD209) (*Figure R5.B*). La diminution des marqueurs M2 en présence de CRO15 (10 μ M) semble légèrement plus accentuée que celle du marqueur M1 (diminution de la MFI de 71% (CD209) à 75% (CD200R) contre une diminution de 60% (CD86) par rapport au contrôle). Grâce à un marquage DAPI, nous avons évalué la viabilité des macrophages après traitement avec CRO15 et nous avons constaté que notre composé n'induisait pas de mort dans ces cellules aux doses utilisées (*données non représentées*). Ces données suggèrent que le CRO15 bloque la polarisation des macrophages *in vitro*, que ce soit vers un phénotype M1 ou vers un phénotype M2.

Ensuite, nous avons étudié les niveaux **d'expression des transcrits** de cytokines ou marqueurs de surface spécifiques des macrophages M1 et M2 afin d'appuyer nos données sur le phénotypage des macrophages (*Figure R5.C*). Nous pouvons tout d'abord constater que les macrophages M1 expriment plus fortement les cytokines et marqueurs « M1-spécifiques » que les marqueurs « M2-spécifiques », comme attendu. A l'inverse, les macrophages M2 expriment plus fortement les cytokines et marqueurs « M2-spécifiques ». Nous observons une tendance à l'augmentation (non significative) des transcrits de cytokines pro-inflammatoires IL1- β , CCL2 et CCL7. Les variations observées entre les différentes expériences ne permettent cependant pas vraiment d'affirmer ce phénomène. Nous observons de plus une augmentation reproductible et significative de la **cytokine pro-inflammatoire IL-8**. D'autre part, l'expression des transcrits de cytokines **anti-inflammatoires** « M2-spécifiques » a tendance à diminuer en réponse à CRO15. Cette diminution est significative pour le transcrit de la **cytokine CCL17**. De manière intéressante, l'expression transcriptionnelle des marqueurs de surface, qu'ils soient M1 ou M2, ne semble pas diminuée sous l'effet de CRO15. Cela suggère que la régulation de l'expression de ces marqueurs à la surface des macrophages serait post-transcriptionnelle.

- A. Schéma expérimental de l'isolement de monocytes et de la **polarisation de macrophages** humains depuis une poche de sang. Brièvement, le sang humain est déposé sur Ficoll et centrifugé pour récolter l'anneau de PBMC (*Peripheral Blood Mononuclear Cells*). Après lavages, les **monocytes** sont sélectionnés depuis les PBMC par tri positif sur billes magnétiques, puis ensemencés en plaques. Le lendemain, les monocytes sont mis à maturer en macrophages par l'ajout de **GM-CSF** (50 ng/mL). Cinq jours plus tard, les macrophages (M0) sont **polarisés** en M1 par ajout d'**IFN- γ** (20 ng/mL) et de **LPS** (100 ng/mL) ou en M2 par ajout d'**IL-4** (20 ng/mL). Les cellules sont pré-traitées une nuit avec du CRO15 (ou le contrôle) avant la polarisation puis traitées de nouveau la jour de la polarisation. 48H plus tard, les macrophages sont décollés, marqués et analysés par cytométrie de flux.
- B. A gauche, une Heatmap représente l'effet de CRO15 sur la polarisation des macrophages M0, M1 et M2. La **moyenne d'intensité de fluorescence (MFI)** pour chaque marqueur de surface spécifique des M1 (CD80, CD86) ou des M2 (CD206, CD200R, CD209) est évaluée par cytométrie de flux sur **chaque population** de macrophages (non polarisés M0, polarisés M1, polarisés M2), traitée ou non avec CRO15. A droite, des histogrammes représentent les MFI des marqueurs de surface dans les macrophages M1 et M2 traités ou non avec CRO15. La moyenne de trois expériences indépendantes est représentée ici. Un test **Kruskal-Wallis** a été effectué pour évaluer la significativité des différences observées.
- C. Analyse des **cytokines** et marqueurs de surface **M1 et M2** par qPCR sur les populations de macrophages M1 et M2 traités avec CRO15 (5 μ M), **24H** après l'induction de la polarisation. Brièvement, les cellules sont grattées et centrifugées, lavées et placées en tampon de lyse. L'extraction d'ARN est effectuée sur colonne (*RNeasy, QIAGEN*). Après reverse transcription, les ADNc sont dilués et utilisés pour la qPCR (SYBR Green). L'expression du gène d'intérêt est normalisée par le gène de ménage *L32*, et représentée en **quantité relative** ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) par rapport à l'expression du gène dans les macrophages M1 non traités. Un **test two-way Anova** avec multiples comparaisons par test Sidak a été utilisé pour évaluer la significativité des différences observées.
- D. Effet de milieux conditionnés (**CM**) de cellules de mélanome (A375) traités ou non par CRO15 sur la polarisation des macrophages. A gauche, l'expression d'IFN- γ dans les A375 en qPCR après 24H de traitement. Au milieu, la sécrétion d'IFN- γ par les A375 mesurée par ELISA après 24H et 48H de traitement. A droite, analyse par de l'évolution des moyennes d'intensité de fluorescence des marqueurs de surface M1 et M2 **cytométrie de flux**. Brièvement, les A375 sont traitées avec CRO15 (ou le contrôle) pendant 6H, puis du **milieu neuf** est mis en contact avec les cellules traitées pendant 24H. Le milieu conditionné (CM) est ensuite déposé sur des macrophages M0 pendant 48H et l'expression des marqueurs est évaluée par cytométrie de flux. La moyenne de trois expériences indépendantes est représentée ici.

* : $p < 0.05$, ** : $p < 0,01$, *** : $p < 0,001$

Enfin, CRO15 induit dans les cellules de mélanome (A375) l'expression et la sécrétion de l'IFN-gamma (IFN- γ), une cytokine aux fonctions immunitaires multiples, qui favorise notamment la polarisation des macrophages vers un phénotype M1 (*Figure R5.D*). Nous avons donc déterminé si CRO15 influençait la polarisation des macrophages M0 via le sécrétome des cellules de mélanome mais le **milieu conditionné** de cellules A375 traitées avec du CRO15 n'a pas d'effet sur la polarisation des macrophages. Dans l'ensemble, ces données suggèrent que notre composé induit une **diminution de la polarisation** des macrophages *in vitro* en diminuant globalement l'expression protéique des marqueurs de surface spécifiques. Cette diminution ne semble pas corrélée avec l'expression transcriptionnelle de ces marqueurs. De plus, la **diminution** des marqueurs phénotypiques à la surface des macrophages ne semble **atténuer** que **l'expression transcriptionnelle** de certaines **cytokines de type M2**, et non celle des cytokines de type M1. Même si l'ensemble des données obtenues nécessitent d'être complétées avec l'analyse de l'expression d'autres cytokines spécifiques et par l'évaluation de leur expression/sécrétion protéique, nos résultats suggèrent que **CRO15 inhibe la polarisation des macrophages M2 *in vitro***, expliquant au moins en partie la diminution de l'infiltrat M2 observée *in vivo* dans les souris.

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Comme nous l'avons vu précédemment, le **mélanome métastatique** est un cancer extrêmement agressif. Le taux de **réponse objective** chez les patients atteints de mélanome s'est considérablement amélioré ces 10-15 dernières années avec l'apparition de nouvelles thérapies. Les inhibiteurs de BRAF, qui font partie des **thérapies ciblées** contre le mélanome, montrent un taux de réponse objective de 75% chez les patients mutés *BRAF^{V600E}*. Cette réponse est cependant transitoire car les patients rechutent presque systématiquement dans les 6 à 9 mois suivant la réponse (Nazarian *et al.*, 2010; Wagle *et al.*, 2011). L'association des inhibiteurs de BRAF avec des inhibiteurs de MEK augmente la survie sans progression des patients de quelques mois. D'autre part, le traitement par **immunothérapie**, notamment les anticorps monoclonaux **anti-PD1**, permet une réponse à plus long-terme, mais chez seulement 33% à 40% des patients (Robert *et al.*, 2015b, 2015a). Là encore, des **résistances** au traitement peuvent apparaître chez ces patients et seulement 25,8% des patients avec un mélanome de grade III-IV montrent une réponse complète aux anti-PD1 (Betof Warner *et al.*, 2020). L'association d'un anti-PD1 avec un anti-CTLA4 permet d'augmenter ce taux de réponse (58%) mais au prix d'**effets indésirables sévères** (Larkin *et al.*, 2019). Finalement, plus de 50% des patients atteints de mélanome métastatique ne bénéficient pas de solution thérapeutique efficace à long-terme. Les efforts dans ce domaine doivent donc être poursuivis et l'**identification de nouvelles molécules candidates** est donc un élément incontournable pour la mise en place de nouvelles stratégies thérapeutiques dans le mélanome.

Dans ce cadre-là, nous avons développé au laboratoire en collaboration avec l'équipe du Dr. Rachid Benhida à l'Institut de Chimie de Nice une **nouvelle molécule** dérivée de la Metformine appelée **CRO15**. Nous avons montré dans un premier temps que CRO15 pouvait induire la **mort** des cellules de mélanome, sensibles ou résistantes aux inhibiteurs de BRAF. Cette mort cellulaire est due à la modulation indépendante de deux voies de signalisation : l'activation de la **voie AMPK** d'une part, et l'inhibition de la **kinase MELK** d'autre part (*Figure R1*). Ces mécanismes moléculaires et les effets cytotoxiques qui en découlent seront discutés dans une première partie. Des données préliminaires suggèrent également que notre composé, CRO15, pourrait **favoriser la réponse immunitaire antitumorale** et améliorer la réponse à l'immunothérapie, notamment par son action sur les cellules immunitaires myéloïdes. Ces éléments seront discutés dans une seconde partie.

A. *Caractérisation des effets cytotoxiques de CRO15 dans les cellules cancéreuses*

1. Dérégulation métabolique mitochondriale induite par CRO15

Le métabolisme des cellules cancéreuses est une caractéristique très importante dans la progression tumorale. Les adaptations métaboliques permettent en effet à ces cellules de **survivre** dans un environnement hostile (pauvre en oxygène, nutriments et glucose). Même si les cellules de mélanome ont un profil métabolique majoritairement **glycolytique**, qui leur permet de proliférer rapidement (Guerra *et al.*, 2020), elles sont capables

de switcher, notamment sous pression thérapeutique, vers un métabolisme utilisant la **phosphorylation oxydative (OXPHOS)**. Ceci leur permet de résister au traitement tout en arborant un phénotype hautement **invasif** caractérisé par une expression faible de marqueurs de différenciation des cellules (Bristot *et al.*, 2020; Ohanna *et al.*, 2018; Zhang *et al.*, 2016). Il a également été montré dans d'autres cancers que la **biogénèse et l'activité mitochondriale** étaient associés à l'expression des marqueurs de la TEM (Transition Epithelio-Mesenchymateuse) et à la capacité invasive des cellules (Jia *et al.*, 2018; Lin *et al.*, 2012). Cibler la plasticité métabolique des cellules cancéreuses pour les empêcher de s'adapter aux défis environnementaux semble donc être une bonne stratégie antitumorale. Nous avons montré dans cette étude que CRO15 induisait une diminution de la **respiration mitochondriale** basale ainsi qu'un défaut de la restauration de la respiration maximale après ajout d'un agent découplant. De plus, ce composé induit une diminution du potentiel mitochondrial, accompagné d'une diminution de la production d'ATP et d'une libération de cytochrome c dans le cytoplasme. Dans leur ensemble, ces résultats indiquent que CRO15 induit un **désordre mitochondrial** qui perturbe la respiration. Même si les expériences effectuées ne permettent pas exactement de déterminer la cible ou le complexe touché par CRO15, il semble que ce dernier n'ait pas exactement le même mode d'action que la Metformine, inhibiteur supposé du complexe I de la chaîne mitochondriale (Fontaine, 2018; Wheaton *et al.*, 2014). En effet, l'action de CRO15 sur l'inhibition de la respiration basale est moindre que celui observé avec la Metformine, alors que la restauration de la capacité respiratoire maximale semble plus affectée par notre composé. De plus, CRO15 induit une activation des voies de mort très **rapide** (quelques heures), contrairement à la Metformine. Des investigations plus poussées, comme des expériences d'inhibition sélective et indépendante des différents complexes ou des expériences de métabolomiques, permettraient de mieux comprendre la perturbation mitochondriale induite par CRO15 (Jones *et al.*, 2020).

2. CRO15 induit une activation de la voie AMPK qui provoque la mort des cellules cancéreuses

La dérégulation métabolique induite par CRO15 engendre une diminution de la production d'ATP dans les cellules cancéreuses. La modulation de la balance énergétique ATP/AMP provoque alors l'activation de la protéine **AMPK** par sa **phosphorylation** en thréonine 172 (Thr172). La kinase AMPK est un **senseur énergétique** capable de réguler de nombreuses voies métaboliques. Son rôle premier est de **restaurer l'homéostasie** énergétique de la cellule pour lui permettre de survivre en condition de stress (Hardie, 2018). Pour cela, elle va promouvoir les **voies cataboliques** comme l'oxydation des acides gras (Carling *et al.*, 1987), la glycolyse (Barnes *et al.*, 2002) ou la mitophagie (Laker *et al.*, 2017) et inhiber les **voies anaboliques** telles que la synthèse des lipides, du glycogène ou encore la synthèse des protéines *via* la phosphorylation de TSC2, inhibiteur de mTOR ou *via* la phosphorylation de la kinase eE2FK (Inoki *et al.*, 2003; Johanns *et al.*, 2017). Cependant, lorsque la balance énergétique ne parvient pas être restaurée et que l'activation de l'AMPK est **intense et soutenue**, la kinase va alors activer les voies de **mort cellulaire** (Chen *et al.*, 2011; Song *et al.*, 2014) telles que l'autophagie et l'apoptose. En effet, l'AMPK peut inhiber mTORC1, régulateur négatif majeur de l'**autophagie**, directement ou par le biais de l'activation de **REDD1** (Schneider *et al.*, 2008). L'AMPK peut

également directement phosphoryler et activer des acteurs de l'autophagie tels que ULK1 (Egan *et al.*, 2011) ou Vsp34 (Kim *et al.*, 2013). D'autre part, l'AMPK peut induire l'**apoptose** par phosphorylation d'**eiF2a** (Dagon *et al.*, 2006), par l'activation de **p53** (Okoshi *et al.*, 2008; Park *et al.*, 2012) ou encore par celle de la voie **JNK/p38** (Wu *et al.*, 2011). Dans le cancer, l'expression de l'AMPK peut donc à la fois favoriser la **survie** des cellules cancéreuses (Chaube *et al.*, 2015; Saito *et al.*, 2015) ou au contraire mener à l'**inhibition de leur prolifération** et l'induction de leur **mort**. Parallèlement, il a également été montré que l'AMPK pouvait inhiber la **TEM** des cellules tumorales par l'activation de Foxo3a (Chou *et al.*, 2014). La régulation fine de tous ces mécanismes par l'AMPK complexifie les prévisions de sa modulation dans un contexte cancéreux. Dans notre modèle, la phosphorylation de l'AMPK (Thr172) par CRO15 semble **en partie** responsable de la **mort** des cellules de mélanome.

Même si nous n'avons pas complètement élucidé le mécanisme qui relie l'activation de l'AMPK à la mort de ces cellules, il semble que ce phénomène soit lié à l'induction de l'expression de la protéine **REDD1**. De manière intéressante, l'extinction de **p53** atténuée mais n'abolit pas complètement l'induction de REDD1 CRO15-dépendante. En revanche, l'inhibition de l'activité catalytique de l'AMPK en parallèle de l'extinction de p53 **abolit complètement** l'expression de **REDD1** induite par CRO15 et restaure totalement la viabilité cellulaire. Cela suggère que l'AMPK induit l'expression de cette protéine de mort de façon en partie **p53-indépendante**. Etant donné le rôle prépondérant de l'hypoxie sur la régulation de REDD1 (Shoshani *et al.*, 2002), nous pouvons nous demander si la protéine **HIF-1 α** n'est pas impliquée dans l'activation de REDD1 par l'AMPK. En effet, les protéines AMPK et HIF-1 α sont étroitement interconnectées dans la régulation de l'homéostasie énergétique, notamment en réponse à l'hypoxie (Dengler, 2020; Moldogazieva *et al.*, 2020). Dans certains cas, la protéine AMPK semble plutôt inhiber l'activation de la protéine HIF-1 α (Faubert *et al.*, 2013; Lyu *et al.*, 2018) alors que dans d'autres, l'AMPK est nécessaire à l'induction de cette protéine (Jung *et al.*, 2008b; Malik *et al.*, 2017). Il serait donc intéressant de regarder l'expression de HIF1- α dans les cellules de mélanome traitées avec CRO15. D'une autre manière, l'AMPK pourrait induire **directement** l'expression de REDD1, comme cela a été montré dans l'étude de Schneider et ses collègues (Schneider *et al.*, 2008).

De manière intéressante, le traitement avec de **faibles doses** de CRO15 (0,5 μ M) ne semble pas induire d'effet pro-survie dans les cellules cancéreuses. Il serait cependant intéressant d'observer l'effet de notre molécule *in vitro*, à des doses croissantes, sur la **survie** des cellules sous l'influence d'un **stress métabolique** (restriction nutritionnelle, en glucose, *etc.*) (Saito *et al.*, 2015) afin de se rapprocher des conditions environnementales tumorales. Etant donné l'effet de CRO15 observé sur la croissance tumorale *in vivo*, nous pouvons supposer que notre molécule n'induit pas d'effet protecteur envers les cellules cancéreuses subissant un stress énergétique. Cet effet pourrait être expliqué par deux hypothèses complémentaires. D'une part, notre composé semble induire une activation soutenue de l'AMPK qui fait **pencher la balance** vers l'activation rapide des voies de mort. D'autre part, CRO15 agit par un **second mécanisme** antitumoral : l'inhibition de la kinase MELK.

3. Inhibition de la kinase MELK par CRO15

La protéine MELK est une sérine/thréonine **kinase** appartenant à la famille AMPK/Snf1, qui est **surexprimée** dans de nombreux types de cancers et semble jouer un **rôle oncogénique** important (Thangaraj *et al.*, 2020). Dans le mélanome en particulier, il a été montré que MELK était impliquée dans la **prolifération** des cellules tumorales *via* l'activation de la voie NF- κ B (Janostiak *et al.*, 2017). De plus, l'analyse de bases de données bio-informatiques (*GSE8401*) nous indique que l'expression de MELK est plus importante dans les mélanomes métastatiques que dans les mélanomes primaires (**Supp. Figure 2B de l'article**). Cet élément renforce l'idée que cette kinase joue un rôle important dans la progression tumorale du mélanome (Ryu *et al.*, 2007). Le rôle de MELK en tant qu'oncogène est cependant encore discuté aujourd'hui. En effet, des études ont montré que son extinction par la technologie CRISPR/Cas9 dans des cellules cancéreuses n'avait aucun impact sur la prolifération ou la mort des cellules (Giuliano *et al.*, 2018; Lin *et al.*, 2017). Il est donc important de déterminer l'impact d'une inhibition de MELK dans notre modèle de mélanome.

En effet, nous avons montré grâce à des expériences *in vitro* (Kinome et essai kinase) que CRO15 **inhibait l'activité de MELK**. Ensuite, des expériences de pull-down (sur lysats cellulaires) et de biotin-précipitation (*in cellulo*) avec une forme biotinyllée de CRO15 nous ont permis de confirmer **l'interaction** entre CRO15 et MELK. Nous n'avons cependant pas évalué lors de cette étude **l'aspect direct** de cette interaction *in cellulo*. Pour cela, il serait intéressant d'utiliser des techniques plus poussées qui permettent de mesurer « **l'engagement d'une cible** », dans notre cas, MELK, avec un ligand ou un composé. L'une de ces techniques, le CETSA (*Cellular Thermal Shift Assay*) est basée sur la modification de la **stabilité** d'une protéine sous l'effet de la chaleur lorsqu'elle est en interaction avec son ligand/composé. Elle a l'avantage de pouvoir être réalisée directement *in cellulo* et de ne pas nécessiter de modification de la protéine (Molina *et al.*, 2013; Stefaniak and Huber, 2020). Cette méthode serait donc un bon outil pour vérifier que l'interaction entre CRO15 et MELK est bien une interaction directe. Nous avons de plus observé que CRO15, en plus d'inhiber l'activité kinase de MELK, **diminuait son expression** au cours du temps. Très peu de choses sont connues sur la régulation de l'expression ou de la stabilité de MELK. Une seule étude, récente, a montré que l'expression de MELK pouvait être inhibée par le micro-ARN miR-1273g-3p dans des cellules de carcinome de colon (Zhao *et al.*, 2019a). Ce micro-ARN est lui-même ciblé par un **long ARN non codant** (LINC02418) qui empêche miR-1273g de se fixer à la séquence de l'ARNm de MELK et provoque par ce biais l'augmentation de son expression. Nous pourrions alors étudier si CRO15 induit dans nos cellules une augmentation de l'expression de miR-1273g. D'autre part, nous pouvons émettre l'hypothèse que notre molécule induit la dégradation de MELK médiée par le **protéasome**, comme cela a été montré pour un autre inhibiteur de l'activité kinase de MELK, le **MELK-T1**, induisant également une diminution de l'expression protéique de la kinase (Beke *et al.*, 2015). Une inhibition de ce système par l'ajout de MG-132 dans nos cellules avant le traitement par CRO15 permettrait de vérifier cette hypothèse.

Dans différents cancers, la surexpression de MELK est liée à la **régulation positive concomitante** de gènes importants dans la progression du **cycle cellulaire** (*CDK1*, *CCNB1/2*, *TOP2A*, *AURKB*, *PLK1*, and *BUB1*)

(McDonald and Graves, 2020). Au niveau mécanistique, il a été montré que MELK était capable de phosphoryler **CDC25B**, régulateur positif majeur du couple CDK1/Cycline-B qui permet l'entrée en phase G2/M (Davezac *et al.*, 2002). MELK peut également induire la progression du cycle cellulaire par phosphorylation de FOXM1 (Joshi *et al.*, 2013) ou par activation de la voie NF- κ B (Janostiak *et al.*, 2017). Plus récemment, il a été montré que MELK pouvait interagir avec et phosphoryler les protéines **PLK1** (*Polo-like kinase 1*) (Thr210) et **CDC25C** (Thr48), ce qui provoque la phosphorylation de CDK1 (Thr161) et l'entrée en mitose (Tang *et al.*, 2020). Dans notre étude, nous observons après un traitement des cellules par CRO15 une inhibition de la voie NF- κ B, ainsi qu'une diminution de l'expression des cibles mitotiques indirectes de MELK : **CDK1**, **CDK2** et **Cycline-E**. Cela semble confirmer l'effet de notre molécule sur l'inhibition de la kinase MELK. Etant donné les variations observées, CRO15 pourrait avoir un effet inhibiteur sur le cycle cellulaire, notamment sur l'entrée des phases **G1/S** et **G2/M**. L'analyse des différentes phases du cycle sous l'influence de CRO15 n'a pas été réalisée dans cette étude. Etant donné cependant l'induction **très précoce** (quelques heures) des mécanismes de mort cellulaire par CRO15, nous pouvons émettre l'hypothèse que cet arrêt du cycle, s'il existe, a un impact très transitoire et masqué par les effets de mortalité.

D'autre part, MELK a un rôle important dans l'augmentation de la **tolérance** des cellules cancéreuses face **aux dommages à l'ADN** en régulant les voies de réponses à ces altérations (DDR). Ainsi, il a été montré que l'inhibition de MELK dans différents modèles provoquait une augmentation des lésions sur l'ADN et l'accumulation de la protéine γ -**H2AX** en parallèle de l'activation d'ATM et de CHK2, qui aboutit à la phosphorylation de **p53** (Ser15). Cela peut alors mener à l'arrêt du cycle cellulaire en G1/S (Beke *et al.*, 2015; Chen *et al.*, 2020) ou encore à l'**apoptose** des cellules par le clivage de la caspase 3 (Wang *et al.*, 2018b). Dans notre modèle, nous avons montré en accord avec la littérature que CRO15 induisait en effet une augmentation rapide de la phosphorylation d'**ATM** (1H-2H), suivie par une accumulation de la forme phosphorylée de H2AX (γ -**H2AX**) (2H \rightarrow 8H). Cet effet concorde avec l'activation de **p53** (phosphorylation en **Ser15**) observée 2H à 4H après le traitement des cellules par CRO15. Comme nous l'avons vu dans l'introduction, p53 peut avoir un rôle direct dans l'induction de l'**apoptose** (par exemple par régulation des gènes Noxa, PUMA, Bcl-2) ou même de l'**autophagie** (Pitolli *et al.*, 2019). De manière intéressante, il a également été montré que l'activation de p53 pouvait également induire l'expression de **REDD1**. Cette protéine peut en effet être induite par un stress cellulaire tel que celui causé par des dommages à l'ADN (Ellisen *et al.*, 2002) ou encore par un traitement avec de la Metformine (Ben Sahra *et al.*, 2011), *via* un mécanisme **p53-dépendant**. Ici, la surexpression de la kinase MELK par adénovirus ou l'extinction la protéine p53 par siARN permet d'atténuer l'induction de REDD1 et de **restaurer en partie** la viabilité des cellules sous l'effet de CRO15. Cela suggère que l'induction de la protéine REDD1 par CRO15, responsable de la mort des cellules cancéreuses, est médiée non seulement par l'activation de l'AMPK mais aussi par la **modulation de l'axe MELK/p53**. Etant donné que CRO15 sensibilise les cellules cancéreuses à la mort induite par les voies de réponses aux dommages à l'ADN (DDR), il serait intéressant de combiner ce composé avec un inducteur de cassures double-brins de l'ADN, tel que la cisplatine.

4. Induction de la mort des cellules de mélanome par autophagie et apoptose liée à REDD1

Lorsque l'expression de la protéine REDD1 est induite par CRO15, les voies de morts par **autophagie** et par **apoptose** sont déclenchées dans la cellule. En effet, à partir de 4H de traitement avec du CRO15 (et jusqu'à 24H après), un **clivage** de la **caspase 3**, de la **caspase 9** ainsi que de la protéine **PARP** (témoin de l'activation des caspases) est observé dans les cellules de mélanome. L'induction de l'apoptose par CRO15 a été confirmée par cytométrie en flux (marquage Annexin-V/DAPI et caspase-3 active). L'induction de l'**autophagie** par CRO15 est, quant à elle, visible par la conversion de la protéine LC3-I en **LC3-II** (appelée aussi LC3-PE), en Western Blot ou par immunofluorescence. L'observation de bulles apoptotiques (apoptose) et de vacuoles à double-membrane (autophagie) par microscopie électronique dans des cellules traitées avec CRO15 appuie ces résultats. Lorsque l'expression de REDD1 est éteinte, le clivage de PARP et la conversion de LC3 sont abolis sous l'effet de CRO15 et la viabilité des cellules est **totale**ment restaurée. Cela nous indique que l'induction de l'expression REDD1 par CRO15 est **responsable** de la mort des cellules de mélanome par apoptose et autophagie. Dans la littérature, REDD1 peut provoquer la mort cellulaire par plusieurs moyens. Si cet effet peut passer par l'inhibition de la kinase pro-survie Akt (Dennis *et al.*, 2014), ou encore par la liaison avec la protéine pro-oxydante TXNIP (Alvarez-Garcia *et al.*, 2016), il est cependant majoritairement dépendant de l'**inhibition de mTOR** par l'activation de complexe TSC2 (DeYoung *et al.*, 2008; Sofer *et al.*, 2005). Dans notre modèle, nous pouvons observer une diminution de la **phosphorylation de mTOR** qui suit l'induction de l'expression de REDD1 après traitement au CRO15. De manière intéressante, l'AMPK est elle-même capable d'inhiber la phosphorylation de mTOR à travers la phosphorylation de TSC2 (Bolster *et al.*, 2002). Nous pourrions donc émettre l'hypothèse que l'activation de l'AMPK par CRO15 pourrait induire la mort des cellules indépendamment de REDD1. Cependant, la restauration complète de la viabilité sous l'effet du siREDD1 après un traitement avec CRO15 nous fait supposer que l'effet de l'AMPK sur la mort dépendante de l'inhibition de mTOR passe essentiellement par REDD1.

Il a été montré que l'inhibition de mTOR par REDD1 provoquait l'**autophagie** dans différents modèles (Gao *et al.*, 2020; Liu *et al.*, 2018b; Molitoris *et al.*, 2011; Qiao *et al.*, 2015). Dans certains cas (Molitoris *et al.*, 2011), cette autophagie peut être **protective** et prévenir la mort des cellules. Dans d'autres (Gao *et al.*, 2020), elle peut **promouvoir** la mort des cellules. Afin de statuer sur le rôle de l'autophagie induite par CRO15, nous avons bloqué le **flux autophagique** avec des inhibiteurs de protéases dans nos cellules traitées par CRO15 et nous avons constaté une restauration partielle de la viabilité. Une inhibition de l'autophagie avec un ARN interférant dirigé contre LC3 entraîne des résultats similaires. Ces données nous indiquent que l'autophagie induite par CRO15 n'est pas protectrice **et au contraire favorise la mort** des cellules de mélanome. .

D'autre part, REDD1 peut jouer un rôle **pro-apoptotique**. Sous l'effet d'un stress glycémique, cette protéine peut en effet induire la production de **ROS** et l'apoptose des cellules (Miller *et al.*, 2018). Dans un modèle de cancer du sein, c'est la présence de ROS qui induit l'expression de REDD1 et provoque l'apoptose des cellules *via* l'inhibition de mTOR et l'activation des protéines de stress JNK/p38 (Yun *et al.*, 2016). De manière intéressante, nous avons observé dans notre modèle une induction de la **phosphorylation de p38** par

CRO15 ([Supp. Figure 2 de l'article](#)). L'apoptose des cellules médiée par REDD1 pourrait donc passer par cette voie et il serait intéressant d'approfondir son analyse en réponse à CRO15.

Dans notre étude, il semble que l'induction de l'autophagie et de l'apoptose dans les cellules de mélanome soit **concomitante** (le clivage des caspases et la conversion de LC3 surviennent tous deux entre 4H et 6H après le traitement par CRO15) et **indépendante** l'une de l'autre. En effet, l'inhibition de l'autophagie n'empêche pas le clivage de PARP et celle de l'apoptose n'empêche pas la conversion de LC3. L'inhibition de l'apoptose (par QVD, un inhibiteur pan-caspases) ne restaure que partiellement la viabilité des cellules de mélanome. Le mécanisme de mort est donc différent de celui observé avec la Metformine par lequel l'autophagie prolongée provoque l'apoptose des cellules (Tomic *et al.*, 2011). Cela souligne le fait que même si CRO15 est dérivé de la Metformine et induit certains effets similaires à ceux observés avec ce biguanide, il possède son **propre mode d'action**. Tout comme l'extinction de REDD1, l'inhibition parallèle de **l'autophagie et de l'apoptose** restaure complètement la viabilité des cellules tumorales.

Le fait que REDD1 puisse être activé par deux mécanismes indépendants, par l'activation de **p53** ou l'activation de l'**AMPK**, est un élément très avantageux dans le cadre d'une thérapie anti-cancéreuse. En effet, sous pression thérapeutique, des **mécanismes d'échappements** par acquisition de **résistances** surviennent souvent dans les cellules cancéreuses. Dans le mélanome, relativement peu de tumeurs (17%) sont mutées **TP53**. Cependant, de nombreux autres cancers présentent des mutations inactivatrices ou des délétions de **TP53**, et ces dernières participent à la résistance aux différentes thérapies (Hientz *et al.*, 2016). Dans ce cas, l'activation de REDD1 par la voie AMPK permet tout de même de contourner le problème et d'induire un effet cytotoxique partiel dans les cellules cancéreuses. A l'inverse, des cellules cancéreuses avec une **plasticité métabolique** élevée, qui pourraient potentiellement échapper aux effets de l'activation de l'AMPK sur la mort cellulaire en adaptant leur métabolisme (Jia *et al.*, 2019), seraient tout de même affectées par CRO15 *via* l'inhibition de MELK et l'activation de p53.

Ainsi, nous avons montré que CRO15 n'était pas seulement efficace dans les cellules de mélanome mais également dans **d'autres types de cellules cancéreuses** telles que des cellules de prostate, de colon, du col de l'utérus, de poumon ou de pancréas ([Supp. Figure 6 de l'article](#)). Cet effet est plutôt cohérent avec le mode d'action de CRO15 et les données trouvées dans la littérature. En effet, **MELK** n'est pas surexprimée seulement dans le mélanome mais également dans beaucoup d'autres cancers (Gray *et al.*, 2005). D'autre part, **la voie AMPK** est essentielle au bon fonctionnement de la cellule de manière générale et peut donc être ciblée dans toute sorte de cancers. En accord avec ce principe, il a été montré que la Metformine avait un rôle anti-cancéreux dans de nombreux types de cancers, souvent de manière AMPK-dépendante (Bost *et al.*, 2012; Ikhlas and Ahmad, 2017).

Le **double effet** induit par CRO15, observé dans un grand nombre de types cancéreux, est donc un atout majeur pour augmenter les probabilités de succès thérapeutique.

Cibler des mécanismes généraux essentiels au bon fonctionnement de tout type cellulaire est un atout avec lequel il faut rester prudent. En effet, les grandes voies ciblées par CRO15 (AMPK, MELK, p53) sont également présentes dans les **cellules humaines normales**. Nous pourrions nous demander alors si notre composé ne génère pas de **toxicité** sur les cellules saines, et provoquerait par ce biais des effets secondaires. De façon intéressante, nous avons montré que bien que le CRO15 soit capable d'induire une faible activation de la voie AMPK dans des cellules de peau normales (mélanocytes, fibroblastes et kératinocytes) à la dose efficace utilisée contre les cellules cancéreuses, **il ne provoque pas leur mort**. De plus, aucun effet toxique notoire n'a été remarqué *in vivo* lors du traitement des souris par notre composé quotidiennement pendant plusieurs semaines, comme le montrent le bon état général des souris (*données non représentées*), la courbe de poids ascendante des souris, et **l'absence de toxicité hépatique** mesurée par dosage des transaminases. Les cellules cancéreuses possèdent un **métabolisme basal intense**, plus important que celui des cellules saines, qui leur permet de soutenir leur croissance exponentielle (DeBerardinis and Chandel, 2016). Nous pourrions donc émettre l'hypothèse que le niveau d'activation basal de la voie AMPK est plus important dans les cellules cancéreuses que dans les cellules saines. De la même manière, la kinase MELK est **exprimée majoritairement** lors de l'embryogénèse (Heyer *et al.*, 1999), dans les cellules souches progénitrices (Niesler *et al.*, 2007; Pickard *et al.*, 2009) ou dans les cellules **en cours de prolifération** (Badouel *et al.*, 2010; Saito *et al.*, 2012) mais est très peu exprimé ou absente dans les cellules différenciées non prolifératives. Globalement, il serait donc possible que l'activation de la voie AMPK dans les cellules saines n'atteigne **par le seuil nécessaire** à l'induction de la mort des cellules. Par ailleurs, on pourrait penser que les cellules normales, beaucoup moins dépendantes de MELK que les cellules cancéreuses prolifératives, ne subissent que très peu l'impact de l'inhibition de MELK. Indépendamment de cette hypothèse, nous pourrions également imaginer que la **voie d'entrée** du CRO15 dans la cellule **est favorisée** dans les cellules cancéreuses par rapport aux cellules saines, par exemple par l'expression d'un transporteur membranaire spécifique, en plus grande quantité dans les cellules touchées. Les transporteurs de la Metformine impliqués dans l'absorption de la molécule sont les **O.C.T 1 à 4** (*Organic Cation Transporters 1-4*), le PMAT (*Plasma Membrane Monoamine Transporter*), and les MATE1-2 (*Multidrug and toxin extrusion protein*) (Pernicova and Korbonits, 2014). Certains sont plus exprimés dans les cellules tumorales que dans leur contrepartie saine (Cho *et al.*, 2018b). Les premiers éléments sur l'absence de toxicité de CRO15 sur les cellules normales sont encourageants. Cependant, des tests supplémentaires tels que la détermination de la toxicité de la molécule *in vitro* sur d'autres types cellulaires, celle de la dose maximale tolérée (**MTD** : *Maximum Tolerated Dose*) *in vivo* chez la souris, ou encore l'évaluation de l'effet de CRO15 sur les différents organes *in vivo*, sont nécessaires pour valider l'absence de toxicité de cette molécule.

5. Effet de CRO15 sur les cellules de mélanome résistantes aux inhibiteurs de BRAF

Les cellules de mélanome résistantes aux thérapies, notamment aux inhibiteurs de BRAF, avec un phénotype différent (moins prolifératif et invasif) mais également un **métabolisme** différent. En effet, il a été montré que l'un des mécanismes de résistance de ces cellules passait par l'expression de l'histone déméthylase

JARID1B (*Jumonji/ARID domain-containing protein 1B*) associée à l'utilisation majoritaire d'un **métabolisme oxydatif** (OXPHOS) (Bristot *et al.*, 2020; Roesch *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2016). L'étude de Roesch et ses collègues montre que l'inhibition de l'OXPHOS dans la chaîne mitochondriale restaure la sensibilité des cellules à différents traitements dont le Vémurafenib. D'autre part, la surexpression de MELK, importante dans la progression du mélanome, est associée à la **résistance** aux chimiothérapie dans le cancer du côlon (Choi and Ku, 2011) et dans le myosarcome utérin (Zhang *et al.*, 2020b). Etant donné le rôle inhibiteur de CRO15 sur la respiration mitochondriale et l'activité de la kinase MELK, nous avons donc évalué la réponse à ce composé dans des cellules résistantes au Vémurafenib. Comme dans les cellules sensibles aux inhibiteurs de BRAF, le CRO15 **diminue la viabilité des cellules résistantes**. Cet effet, de manière cohérente par rapport aux éléments évoqués ci-dessus, semble même légèrement plus important dans les cellules résistantes que dans les cellules sensibles, sauf dans le cas des SkMel28 (mutées *TP53*). L'analyse des voies de signalisation et des voies de mort modulées par CRO15 dans ces cellules semble indiquer que notre composé provoque la mort des cellules de mélanome résistantes au Vémurafenib par le même mode d'action que dans les cellules sensibles.

Plusieurs études ont montré que la Metformine ou la Phenformine améliorait la réponse aux inhibiteurs de BRAF ou de MEK dans des cellules de mélanome présentant différents statuts mutationnels (Niehr *et al.*, 2011; Ryabaya *et al.*, 2019; Yuan *et al.*, 2013b). Une étude clinique a été effectuée dans le mélanome pour évaluer l'effet de la combinaison de la Metformine avec du Vemurafenib (NCT01638676). Etant donné l'efficacité de CRO15 dans les cellules résistantes aux inhibiteurs de BRAF à une dose 2000 fois moins importante que celle utilisée pour la Metformine, il serait donc potentiellement intéressant de tester notre composé en combinaison avec des thérapies ciblées (inhibiteurs de BRAF et/ou de MEK).

6. Effet de CRO15 dans les xénogreffes de cellules de mélanome

Des expériences *in vivo*, sur des xénogreffes de cellules de mélanome humaines dans des souris immunodéficientes, ont été réalisées pour évaluer l'efficacité de CRO15 sur un modèle un peu plus physio-pathologique. Elles ont montré sur les cellules sensibles comme résistantes aux inhibiteurs de BRAF que notre composé induisait une **diminution significative de la croissance tumorale**. L'analyse des tissus tumoraux révèlent que chez la souris, le CRO15 induit les mêmes processus de mort que ceux observés *in vitro* : l'**autophagie** et l'**apoptose** des cellules.

Toutefois, les **propriétés physico-chimiques** de notre composé, de structure générale hydrophobe, nécessitent de le dissoudre dans un solvant organique aprotique polaire tel que le DMSO (diméthylsulfoxyde) ou le DMA (Diméthylacétamide) et d'utiliser une formulation pour injection chez la souris à base de corps gras. Ici, en discussion avec les chercheurs en chimie de l'ICN avec qui nous collaborons, nous avons donc utilisé une formulation à base de DMA, de Tween80 et de macroglycérides linoléates (appelés aussi « Labrafil »). Cette composition était plutôt indiquée dans le cadre d'une injection en intra-péritonéal (*ip*), voie d'administration choisie pour cette étude. Nous pourrions en collaboration avec les chimistes de la galénique,

travailler à une nouvelle **formulation** qui permettrait de traiter les souris *per os* (en gavage) dans le but de se rapprocher d'une mode d'administration compatible chez l'Homme. En effet, il existe d'autres composés insolubles dans l'eau, tel que le **PLX4032** (Vemurafenib), utilisés en pré-clinique chez la souris en gavage avec une composition adaptée (2% Hydroxypropylcellulose, /0.5% hydroxypropyl methylcellulose/0.2% Tween80) (Bollag *et al.*, 2010) et en clinique chez l'Homme par prise orale (<https://www.vidal.fr/medicaments/zelboraf>). En alternative, il pourrait également être intéressant de travailler à l'amélioration du composé en termes de **solubilité** par exemple, tout en gardant l'activité/sélectivité de la molécule afin de conserver le **même mode d'action**, qui donne tout l'intérêt à notre molécule.

En conclusion de cette première partie, nous avons montré que le CRO15 provoquait la mort des cellules de mélanome par **apoptose** et **autophagie** induites par l'expression de la protéine **REDD1**. Cette expression est induite par l'activation de la kinase AMPK ou par celle de la protéine p53, elle-même provoquée par l'inhibition de MELK. Etant donné les effets importants de CRO15 sur la croissance et la prolifération des cellules de mélanome *in vivo*, ainsi que l'absence de toxicité apparente sur ces souris, cette étude apporte des **résultats encourageants** qui ont incité à poursuivre la caractérisation préclinique de la molécule et notamment d'évaluer l'effet de CRO15 sur la réponse immunitaire antitumorale.

B. Caractérisation du rôle de CRO15 dans la réponse immunitaire antitumorale

La Metformine, qui est d'abord l'anti-diabétique le plus utilisé au monde, a pour caractéristique d'activer la **voie AMPK**. Cette molécule est de plus en plus utilisée en recherche pour cette propriété, notamment pour étudier son rôle anticancéreux (Zhao *et al.*, 2021). Grâce à ces nombreuses études, il a été montré que l'activation de l'AMPK par la Metformine pouvait favoriser la réponse immunitaire antitumorale des cellules lymphoïdes et myéloïdes, et potentialiser la réponse aux immunothérapies (ICI) (Cha *et al.*, 2018; Dai *et al.*, 2021; Ding *et al.*, 2015; Eikawa *et al.*, 2015; Wei *et al.*, 2021). Nous avons montré que **CRO15**, dérivé de la Metformine, activait également la voie de l'AMPK (Jaune, Cavazza *et al.*, 2021). Par conséquent, nous avons étudié l'effet de notre molécule sur la **réponse immunitaire antitumorale**, seul et en combinaison avec des immunothérapies (anti-PD1). En général, la réponse aux anti-PD1 est plus liée à l'**immunogénicité** inhérente du modèle (charge mutationnelle ou néoantigènes) qu'à l'origine tissulaire de la tumeur (Gubin *et al.*, 2014; Selby *et al.*, 2016). En **première approche**, nous avons donc décidé d'évaluer les potentiels effets immunitaires de CRO15 sur un modèle murin de carcinome de colon (CT26) immunogénique et **partiellement** répondeur aux ICI, très utilisé pour étudier la modulation de la réponse aux immunothérapies (D'Alise *et al.*, 2019; Shi *et al.*, 2019; Tan *et al.*, 2020; Taniura *et al.*, 2020).

1. Importance du contexte immunitaire et du choix du modèle cellulaire dans la réponse antitumorale médiée par CRO15

Afin de déterminer l'importance de l'**environnement immunitaire** dans la réponse antitumorale induite par CRO15, nous avons comparé la réponse de la molécule dans des allogreffes de cellules CT26 sur des souris Balb/c immunodéprimées (Balb/C Nude, athymiques) ou complètement immunocompétentes (Balb/c). Nous avons alors constaté une diminution significative du volume tumoral en réponse au CRO15 **uniquement** dans les souris **immunocompétentes**, soulignant la plus-value d'un système immunitaire complet fonctionnel dans notre modèle. De manière notable, la réponse *in vivo* des tumeurs de CT26 au CRO15 semble **beaucoup moins marquée**, voire inexistante dans le cas des souris Balb/C Nude, que celle précédemment constatée sur des tumeurs de **A375** (cellules de mélanome humaines). D'une part, cela pourrait être expliqué par l'**agressivité** plus importante des CT26 par rapport aux A375 : les tumeurs CT26 du groupe contrôle atteignent 1cm³ au bout d'une semaine seulement après la randomisation, alors qu'il faut une vingtaine de jours aux tumeurs contrôles A375 pour atteindre cette taille. D'autre part, ces résultats sont cohérents avec les **ceux observés in vitro** au laboratoire. En effet, la **dose efficace** de CRO15 pour induire 70% à 80% de mort dans les cellules CT26 est environ **cinq fois plus importante** (25 µM) que celle observée pour les A375. En adéquation avec ces résultats, l'expression de **REDD1**, dont le niveau basal est beaucoup plus faible dans les CT26, n'est induite de manière significative qu'à partir de 25 µM de CRO15 (*données non présentées*). L'analyse de l'expression des protéines cibles de CRO15 dans les différents types de tumeurs, révèle que MELK est exprimé moyennement à fortement dans tous les mélanomes et les cancers colorectaux ([ENSG00000165304-MELK/pathology](#)). En revanche, les formes catalytiques $\alpha 1$ et $\alpha 2$ de l'**AMPK** sont exprimées moyennement à fortement chez **deux à trois fois plus fréquemment** dans le mélanome que dans le cancer colorectal ([ENSG00000162409-PRKAA2/pathology](#)). De plus, les cellules de carcinome colorectal mutées $KRAS^{G13D}$ présentent une **activation** de la kinase AMPK bien **moindre** que celle observée dans les cellules non mutées (sauvages), que ce soit de manière **basale** ou en réponse à un anti-EGFR (Ye *et al.*, 2020). Ce **défaut d'activation de l'AMPK**, qui les rend **résistantes** aux thérapies ciblées (anti-EGFR) par stabilisation de la protéine pro-survie MCL-1, semble être dû à une activation de la **glycolyse** dans ces cellules. De manière intéressante, les CT26 sont mutées $KRAS^{G12D}$ (Castle *et al.*, 2014). Ces deux mutations (G12D et G13D), situées à un codon d'écart, sont toutes deux **activatrices** de la protéine KRAS et engendrent des caractéristiques phénotypiques très similaires (Muñoz-Maldonado *et al.*, 2019). En accord avec toutes ces observations, nous pourrions émettre l'hypothèse que les cellules CT26 arborent un profil métabolique **glycolytique** qui provoque une activation basale plus faible de la voie AMPK. Cette hypothèse expliquerait qu'une dose plus importante de CRO15 soit nécessaire pour activer l'AMPK, induire l'expression de la protéine REDD1 et ainsi provoquer la mort des cellules de carcinome de colon. De manière intéressante, l'expérience d'allogreffes de **cellules de mélanome BP**, qui répondent fortement aux immunothérapies, dans des souris C57BL/6 a montré que la diminution de la croissance tumorale sous l'effet de CRO15 était bien plus importante avec une réduction de 75% de la moyenne du volume tumoral (CRO15 vs Contrôle) à 17 jours de traitement (*données non présentées*).

Enfin, bien que le résultat obtenu ici souligne l'importance d'un **environnement immunitaire complet** dans la réponse antitumorale provoquée par le CRO15, il faut noter que l'expérience contrôlée a été menée dans des souris Balb/C Nude. Ces souris présentent les avantages de présenter le même fond génétique que leur contrepartie immunocompétente et de ne pas produire de **lymphocytes T matures** (Jenkinson *et al.*, 1981), mais elles ne sont pas dépourvues de leur **système immunitaire inné** (Cheers and Waller, 1975). Dans notre expérience, l'absence de système immunitaire **adaptatif** est apparemment suffisante pour provoquer un amoindrissement important de la réponse antitumorale médiée par CRO15. Nous pourrions émettre l'hypothèse que l'effet de CRO15 sur le système immunitaire est directement dépendant de **l'activité effectrice des lymphocytes T**. En effet, la fonction des lymphocytes T est une composante très importante de la réponse immunitaire antitumorale, comme le souligne les différentes stratégies d'immunothérapies basées sur leur activation (Eggermont *et al.*, 2015; Ribas, 2021; Robert *et al.*, 2015a). Par ailleurs, il est concevable que CRO15 agissent plutôt sur les cellules du système immunitaire **inné**, mais que ces dernières aient besoin de la coopération des lymphocytes T pour provoquer leur effet antitumoral. La plupart du temps en effet, les stratégies basées sur l'amorçage de cellules immunitaires innées, telles que la **vaccination** par antigène tumoral induisant l'activation des cellules présentatrices d'antigène (CPA), nécessitent la présence de cellules immunitaires adaptatives afin d'établir une réponse antitumorale efficace à long-terme (Sayour and Mitchell, 2017; Shanker and Marincola, 2011).

2. Potentialisation par CRO15 de la réponse aux anti-PD1

Etant donné que CRO15 semble avoir un effet sur la réponse immunitaire antitumorale, nous avons voulu évaluer sa réponse en combinaison avec l'**immunothérapie** la plus utilisée actuellement : les anti-PD1. Nous avons alors montré que CRO15 potentialisait la réponse aux anti-PD1 en provoquant **une augmentation du taux de réponse global** au traitement mais également du **taux de réponse complète** observé chez les souris. Il en résulte une prolongation significative de **la survie** des souris traitées avec la combinaison CRO15 et anti-PD1, en comparaison des souris contrôles. De manière intéressante, la réponse des CT26 aux anti-PD1 est très variable et **hétérogène**. En effet, malgré une expérience effectuée sur des hôtes **génétiquement identiques**, chaque tumeur traitée réagit différemment, et régresse ou non en réponse à cette immunothérapie. Cet effet est également retrouvé dans la littérature (Kuczynski *et al.*, 2018), et pourrait être expliqué par **l'apparition de mutations** somatiques ou de variations du nombre de copies (CNV) de gènes pendant le **développement** de la tumeur *in vivo*, sous pression environnementale (Mosely *et al.*, 2017). Ces expériences d'allogreffes ont été répétées plusieurs fois (n=2 en survie, n=3 en croissance tumorale) et ont montré des résultats similaires.

Notre composé a d'abord été caractérisé en tant que molécule provoquant la **mort** des cellules tumorales. Etant donné que l'environnement immunitaire semble jouer un rôle dans la réponse au CRO15, nous pouvons nous demander si celui-ci n'induirait pas une « **mort cellulaire immunogénique** » (ICD : *Immunogenic Cell*

Death). L'ICD est définie comme « une forme de mort cellulaire régulée (RGD) suffisante pour **activer une réponse immunitaire adaptative** chez des hôtes syngéniques immunocompétents ». Elle est caractérisée par la **sécrétion** et/ou l'**exposition** à la membrane cellulaire de **DAMPs** (*Damages Associated Molecular Patterns*) ou cytokines particulières qui aident au recrutement et à la maturation des CPA, favorisent la phagocytose des cellules mourantes et facilitent le recrutement des lymphocytes T (Galluzzi *et al.*, 2020). Par ailleurs, l'**apoptose** ou la nécroptose dépendante des **caspases** (Aaes *et al.*, 2016; Casares *et al.*, 2005) et l'**autophagie** (Martins *et al.*, 2012; Michaud *et al.*, 2011) sont deux mécanismes de mort qui peuvent être impliqués dans l'ICD induite par des chimiothérapies. Il serait donc intéressant d'évaluer des marqueurs de l'ICD dans des cellules traitées par le CRO15, molécule capable de provoquer ces deux mécanismes de mort. Un résultat préliminaire nous a permis de montrer que CRO15 induisait la **sécrétion** de la protéine **HMGB1** (*High Mobility Group protein B1*) dans les cellules CT26 (*données non présentées*). Cette protéine étant l'une des DAMPs caractéristique d'une ICD, ce résultat est encourageant pour présager de l'induction d'une ICD par notre composé. Cependant, ce résultat à lui-seul ne suffit pas à affirmer cette hypothèse et devrait être accompagné de tests complémentaires tels que l'analyse *in vitro* de l'exposition de la calréticuline ou des tests de vaccination *in vivo* (Kepp *et al.*, 2014).

Il a été montré que la Metformine induisait de manière AMPK-dépendante une **diminution** de l'expression de **PD-L1** sur des cellules de tumeur mammaire en induisant sa **dégradation protéasomale** (Cha *et al.*, 2018). Cette diminution permet indirectement l'activation des lymphocytes T CD8+ et la potentialisation de la réponse aux anti-CTLA4 dans des modèles d'allogreffes chez la souris. Très récemment, une autre équipe a montré que l'activation de l'AMPK par un changement de régime alimentaire (faible en glucose) ou par l'activateur A-769662 provoquait cette fois-ci la **dégradation lysosomale** de PD-L1 en induisant sa **phosphorylation** en Ser283. Cette phosphorylation inhibe son interaction avec la protéine stabilisatrice CMTM4 (*CKLF-like MARVEL Transmembrane domain-containing protein 4*), entraînant sa dégradation lysosomale (Dai *et al.*, 2021). Dans cette étude, la dégradation de PD-L1 par activation de l'AMPK permet également de potentialiser la réponse aux anti-CTLA4, dans un modèle de CT26. De façon intéressante, nous avons montré que CRO15 induisait aussi une diminution de l'expression de PD-L1 *in vitro* dans les cellules A375 et CT26 mais n'avons pas observé de potentialisation des effets des anti-CTLA4 *in vivo* (*données non présentées*). Au lieu de cela, nous avons constaté une potentialisation de la réponse aux anti-PD1 des CT26. Etant donné que la dégradation de PD-L1 « mime » l'effet des anti-PD1 en empêchant l'interaction entre PD-L1 et PD-1, cet effet semble contre-intuitif. Cependant, il a été montré que le ligand PD-L1 n'exerce pas uniquement son activité inhibitrice sur les lymphocytes *via* sa liaison avec PD-1 mais également *via* sa liaison avec le ligand **co-stimulateur B7.1** (CD80) (Butte *et al.*, 2007; Yang *et al.*, 2011). Le ligand PD-L1 n'est pas seulement exprimé sur les cellules cancéreuses mais également sur certaines **cellules immunitaires** et notamment les cellules présentatrices de l'antigènes (cellules dendritiques, macrophages, lymphocytes B). Cette expression immune contribue également grandement, parfois exclusivement, à la réponse aux inhibiteurs de « checkpoint » (Kleinovink *et al.*, 2017; Tang and Zheng, 2018). Or, nous n'avons pas évalué l'effet de CRO15 sur l'expression de PD-L1 dans ces

populations de cellules. En accord avec ces éléments, une étude a montré que la **déstabilisation** de l'expression de PD-L1 par un inhibiteur de l'EGFR (Gefitinib) dans un modèle de cancer du sein potentialisait la réponse aux **anti-PD1 *in vivo*** (Li *et al.*, 2016). Dans notre modèle, il semble donc que le fait de cibler l'interaction de PD-L1 avec ces ligands par un **double-mécanisme**, le blocage de l'interaction par anticorps anti-PD1 et la dégradation de PD-L1 favorise la réponse immunitaire antitumorale. Nous ne pouvons cependant pas exclure l'hypothèse selon laquelle l'effet de CRO15 sur la réponse immunitaire serait totalement **indépendant** de son action sur la dégradation de PD-L1 dans les cellules tumorales. En effet, l'analyse des tumeurs de CT26 par cytométrie en flux indique que CRO15 modifie les infiltrats de cellules immunitaires dans la tumeur.

Une première expérience *in vivo* nous montre que la combinaison de traitement CRO15 + anti-PD1 chez les souris porteuses de tumeurs CT26 induit une diminution des **cellules myéloïdes Ly6C+** ($p=0,06$), cellules **immunosuppressives** de type monocytaire qui correspondent phénotypiquement aux **m-MDSC** (Bronte *et al.*, 2016). De manière intéressante, cet effet n'est observé que dans **une partie** des souris seulement en cas de traitement avec CRO15 seul. De plus, nous avons constaté dans une seconde expérience que la combinaison de traitement induisait une **diminution significative des TAM** (*Tumor Associated Macrophages*) **de type II** (CD45+/CD11b+/F4/80+/CD204+), pro-tumoraux. Ces données indiquent que la combinaison de CRO15 avec les anti-PD1 semble diminuer l'infiltrat intratumoral de populations **myéloïdes immunosuppressives**. Etant donné le nombre limité de canaux de détection sur le cytomètre de flux utilisé pour cette expérience qui réduit le nombre de combinaisons possibles pour un panel d'anticorps, nous avons fait le choix de sélectionner en plus des marqueurs myéloïdes classiques **un marqueur M1** (CD197 appelé aussi **CCR7**) et **un marqueur M2** (CD204) pour discriminer les différentes populations de TAMs (Laganà *et al.*, 2020; Miyasato *et al.*, 2017; Taniyama *et al.*, 2019; Zheng *et al.*, 2020). Au vu des résultats qui nous montrent une **très faible proportion** de macrophages M1 infiltrant la tumeur (moins de 5%) et leur absence de variation par les traitements, il aurait été peut-être plus intéressant d'évaluer un autre marqueur de macrophages M2 tel que le **CD206** ou le **CD163**. En effet, dans un environnement aussi complexe que celui d'une tumeur, des TAMs avec des **phénotypes** et des **fonctionnalités mixtes** et **variées** peuvent coexister (Biswas and Mantovani, 2010; Sica and Mantovani, 2012; Smith *et al.*, 2016). Sous l'influence de divers stimuli (cytokines, engagement avec un TLR), les macrophages peuvent alors subir une activation **M1** ou **M2**, qui représentent les **extrêmes d'un continuum** d'états d'activation différents (Sica and Mantovani, 2012). De ce fait, une méthodologie à plus grande échelle comme la cytométrie de masse (CyTOF), ou la cytométrie spectrale qui permet de tester jusqu'à 32 marqueurs, permettrait d'évaluer plus précisément les **différentes populations** de macrophages infiltrant la tumeur et leur **fonction** sous l'effet de nos traitements afin de valider les tendances observées par cytométrie en flux classique.

Les macrophages étant des cellules très plastiques qui peuvent rapidement changer d'état, nous avons émis l'hypothèse que CRO15 pouvait empêcher la **polarisation** des macrophages vers un phénotype M2. L'analyse *in vitro* de macrophages humains soumis à différents stimuli classiques de polarisation et traités avec du CRO15 nous a permis de confirmer une **diminution des marqueurs phénotypiques M2** : CD200R et CD209.

Cependant, en désaccord avec ce qui a été observé *in vivo* sur les TAMs, CRO15 induit également une diminution des **marqueurs phénotypiques M1** (notamment du CD86). *In vitro*, il semblerait donc que CRO15 **empêche la polarisation** des macrophages vers un phénotype M2, mais aussi M1. Physiologiquement, de nombreuses voies de signalisation sont impliquées dans la polarisation des macrophages telles que les voies Notch, PI3K/Akt/mTOR, NF- κ B ou encore les différentes voies JAK/STAT (Amici *et al.*, 2017). Le rôle de la voie AMPK sur la polarisation des macrophages est quant à lui plutôt ambigu et semble dépendre du **contexte cellulaire**. De manière générale, les études réalisées *in vitro* ou dans des modèles de pathologies inflammatoires (*eg.* colite, obésité) montrent que cette voie inhibe les **signaux pro-inflammatoires** des macrophages et favorise la polarisation vers un phénotype M2 (Jing *et al.*, 2018; Kim *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2020c). Cependant, dans le contexte du **cancer**, l'activation de la voie AMPK engendre souvent des effets anti-tumorigénique par **inhibition** de la **fonction immunosuppressive** des macrophages et leur **repolarisation** vers un phénotype M1 (Chen *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2018a; Wei *et al.*, 2021). La diminution de la polarisation des **macrophages M1** traités avec CRO15 *in vitro* pourrait donc être expliquée par une activation de la voie AMPK. Elle pourrait également être le résultat de l'inhibition de la kinase Melk qui régule positivement la **voie NF- κ B** canonique, qui a elle-même un **effet pro-inflammatoire** dans les macrophages (Litvak *et al.*, 2009; Sanjabi *et al.*, 2000). Dans le microenvironnement tumoral (MET) en revanche, la complexité des interactions avec les autres cellules ou avec les protéines extracellulaires aboutissent probablement à une régulation différente de ces voies de signalisation, expliquant le phénotype différent observé. Que ce soit dans un contexte physiologique ou tumoral, l'une des voies incontournable activée lors de la polarisation des macrophages/TAMs vers un phénotype M2 est la **voie PI3K γ** (Pathria *et al.*, 2019). En effet, la kinase PI3K γ est nécessaire à l'activation d'**Akt**, **mTORC1** et **S6K** qui activent le facteur de transcription **CEBP- β** (*CCAAT Enhancer Binding Protein Beta*), qui induit un programme transcriptionnel de gènes immunosuppresseurs (Kaneda *et al.*, 2016a). Dans cette étude, **l'inhibition de PI3K γ** repolarise les macrophages M2 vers un phénotype M1 et induit l'expression de molécules du CMH-II, la sécrétion de TNF α , d'IL-12 et de NOS-2 tout en diminuant celles des cytokines anti-inflammatoires IL-10 et Arginase-1 (Arg-1). De manière intéressante, CRO15, à travers l'activation de l'AMPK et l'induction de l'expression de la protéine **REDD1**, **inhibe** l'activation de **mTOR** dans les cellules tumorales. De plus, il a été montré que REDD1 pouvait inhiber directement la kinase **Akt** (Dennis *et al.*, 2014). Il serait donc très intéressant de vérifier si l'inhibition des protéines en aval de PI3K γ (Akt, mTOR, S6K) par CRO15 dans des macrophages M2 conduit à l'inhibition de CEBP- β . Cela pourrait expliquer le phénotype de polarisation en macrophages M2. De manière générale, l'une des perspectives à court-terme serait **d'examiner les voies de signalisation importantes** dans la **polarisation** et la **fonction** des macrophages qui pourraient être modulées par notre molécule (AMPK, PI3K/Akt/mTOR/CEBP β , NF- κ B, ou même Notch). Ces variations pourraient être évaluées dans différents modèles tels que des macrophages humains primaires (physiologiques mais avec une disponibilité limitée) ou des modèles de macrophages immortalisés : les cellules THP-1 (humaines) ou les cellules RAW264.7 (murines). Idéalement, afin de prendre en compte le MET, important dans cette réponse,

les TAMs provenant de tumeurs de CT26 greffées dans des souris traitées avec les différents traitements pourraient être isolés afin d'en extraire les protéines pour analyser ces voies de signalisation.

De nombreuses études ont également montré que le **profil métabolique** des macrophages joue un rôle critique dans la polarisation des macrophages (Covarrubias *et al.*, 2015; Huang *et al.*, 2016; Porta *et al.*, 2018). En effet, les **macrophages M1** dépendent majoritairement d'un catabolisme par **glycolyse aérobie**, pour promouvoir une production rapide d'ATP (Rodríguez-Prados *et al.*, 2010). A contrario, les **macrophages M2** utilisent un **métabolisme oxydatif** (OXPHOS) et favorisent l'**oxydation des acides gras** pour satisfaire une demande en énergie soutenue (Huang *et al.*, 2014; Vats *et al.*, 2006). De manière intéressante, l'étude de Vats et collègues, montre que l'inhibition de la phosphorylation oxydative (par inhibition des composants de la chaîne respiratoire mitochondriale ou par extinction de l'expression de la protéine **PGC-1 β**) **empêche l'activation** des macrophages **anti-inflammatoires M2**. D'autres part, dans l'étude de Huang et collègues, il est montré que l'activation des macrophages M2 est caractérisée par une augmentation de la **capacité respiratoire de réserve**, dépendant de l'oxydation des acides gras. Or, nous avons montré dans les cellules cancéreuses que **CRO15 inhibait la respiration basale** mitochondriale et induisait un défaut de **restauration de la capacité respiratoire maximale** après ajout d'un agent découplant. Ces éléments nous indiquent que notre composé pourrait agir sur la polarisation des macrophages M2 en inhibant leur **activité métabolique**. Pour le vérifier, nous pourrions mesurer, le taux de consommation d'oxygène (OCR) par des expériences de « *Seahorse* » dans des macrophages, traités ou non avec du CRO15. Nous pourrions également étudier l'évolution du profil glycolytique (ECAR : *Extracellular Acidification Rate*) des macrophages M1 sous l'effet de notre composé.

La voie PI3K γ /Akt/mTOR induit l'expression de l'**Arginase 1**, essentielle au métabolisme des acides aminés des macrophages M2 qui transforment grâce à cette enzyme la L-arginine en ornithine et urée, métabolites immunosuppresseurs (Kaneda *et al.*, 2016b). Nous pouvons donc nous demander si la potentielle inhibition de mTOR dans les macrophages par CRO15 pourrait atténuer l'expression de Arg-1 et empêcher l'activation de cette voie métabolique. Enfin, le **niveau d'oxygène** et la concentration de lactate dans le MET jouent également un rôle dans la polarisation des macrophages. En particulier, les **TAMs** intègrent le **niveau d'hypoxie** et de **lactate** dans le microenvironnement pour activer des voies de signalisation qui induisent l'expression de **gènes anti-inflammatoires/immunosuppresseurs** tels que *ARG1* et *MRC1* (CD206). Les zones **hypoxiques** sont donc associées à la présence de TAMs M2. A contrario, les zones en **normoxie** sont associées à la présence de macrophages au phénotype **pro-inflammatoire** (Carmona-Fontaine *et al.*, 2017). De plus, l'**hypoxie** provoque la sécrétion d'**exosomes** enrichis en chimiokines et cytokines qui favorisent la **migration** des TAMs vers la tumeur et leur **différenciation en M2** par induction de la phosphorylation oxydative dans ces cellules (Park *et al.*, 2019). Or, il a été montré que la Metformine, par son rôle inhibiteur de la phosphorylation oxydative, diminue la consommation d'oxygène par les cellules tumorales et donc l'hypoxie dans le MET (Scharping *et al.*, 2017). Nous pouvons donc émettre l'hypothèse que CRO15 pourrait réguler l'hypoxie

ambiante et favoriserait la génération de macrophages pro-inflammatoires par inhibition de la respiration mitochondriale.

D'autres facteurs que celui de la polarisation des macrophages peuvent également expliquer la diminution des macrophages M2 dans les tumeurs de souris traitées avec CRO15 et des anti-PD1. Le **recrutement** et la **migration** des macrophages dans la tumeur, notamment, peut jouer un rôle important dans ce phénotype. Ainsi, de nombreuses chimiokines, telles que CCL2 (MCP-1), CCL3, CCL4, CXCL12, IL-6, IL-1 β , CSF-1 ou encore VEGF-A, favorisent le recrutement de monocytes dans différents modèles de cancer (Pathria *et al.*, 2019). Parmi ces chimiokines, **CCL2**, exprimée par les cellules tumorales, les macrophages et les cellules stromales, permet à la fois le recrutement de MDSCs et de macrophages dans la tumeur (Connolly *et al.*, 2016; Lesokhin *et al.*, 2012) et leur polarisation vers un phénotype immunosuppresseur (Li *et al.*, 2017a). Il serait donc très intéressant d'évaluer la sécrétion de CCL2 dans notre modèle, sur des cellules CT26 ou des macrophages traités avec du CRO15.

Lors de l'étude des populations immunitaires infiltrant la tumeur *in vivo* et de la polarisation des macrophages *in vitro*, nous nous sommes principalement intéressés à l'influence de nos traitements sur le **phénotype** des macrophages. En général, l'expression de marqueurs de surface spécifiques est associée à la fonction de ces cellules (Gautier *et al.*, 2012). Cependant, il serait intéressant de vérifier si CRO15 induit également un **changement fonctionnel** dans ces macrophages. Pour cela, nous avons mesuré l'expression des cytokines M1/M2 dans des macrophages après 24H de traitement avec notre composé. De façon surprenante, nous n'observons pas de diminution de l'expression des ARNm correspondants aux différents marqueurs de surface observés. Il serait donc concevable que CRO15 régule l'expression des marqueurs de surface sur les macrophages de manière **post-transcriptionnelle**. Même s'il semble que la régulation de la polarisation des macrophages se fasse **essentiellement** de manière transcriptionnelle (Hörhold *et al.*, 2020; Tugal Derin *et al.*, 2013), certaines études ont montré que la régulation de la **traduction** des ARNm dans les macrophages pouvait influencer sur leur fonction pro-inflammatoire (Schott *et al.*, 2014). Par exemple, sous stimulation avec du LPS, la protéine Brd4 (*Bromodomain-containing factor 4*) régule négativement l'axe **MNK2-eiF4E**, qui induit lui-même la traduction de **I κ B α** . Celui-ci empêche alors la liaison de NF- κ B aux promoteurs de gènes inflammatoires. L'inhibition de la traduction d'I κ B α *via* la régulation négative de l'axe MNK2-eiF4E par Brd4 favorise donc la réponse inflammatoire des macrophages (Bao *et al.*, 2017). Une autre étude a montré que l'IFN- γ induisait, dans les macrophages amorcés avec un agoniste de TLR2, la **régulation négative** d'**eiF4E** par inhibition conjointe des kinases MNK et du complexe mTORC1. Cette régulation est alors associée à la **suppression de la traduction** de **HES1** (*Hes Family BHLH Transcription Factor 1*), répresseur de l'inflammation (Su *et al.*, 2015). Comme nous l'avons vu précédemment, CRO15 semble réguler l'expression des marqueurs de surface des macrophages de façon **post-transcriptionnelle**. De plus, CRO15 active la voie de l'AMPK et induit l'expression de REDD1, deux mécanismes impliqués dans l'**inhibition du complexe**

mTORC1. Etant donné que ce complexe est impliqué dans la traduction coiffe-dépendante des ARNm, il serait très intéressant d'évaluer l'action de notre composé dans les macrophages sur la régulation de l'assemblage du **complexe eIF4F** et par conséquent sur la régulation traductionnelle des différents acteurs de l'inflammation.

Même si l'expression des **cytokines anti-inflammatoires M2** a **tendance à diminuer** en présence de CRO15, cette diminution est faible et non significative pour la plupart des cytokines. *A contrario*, l'expression transcriptionnelle des cytokines pro-inflammatoires M1 ne semble par concorder avec le phénotype observé par cytométrie en flux. En effet, il semble que cette expression ait **tendance** à augmenter sous l'effet de CRO15, bien que l'hétérogénéité des résultats inter-expériences nous permette difficilement d'être conclusif. Enfin, il est possible que la **cinétique** choisie pour l'analyse de l'expression de ces cytokines ne soit **pas optimale** à l'observation des changements d'expression transcriptionnelle induits par le CRO15. Il serait donc nécessaire de répéter ces expériences avec des durées de traitements plus courtes (6h), ou au contraire plus longues (48h) pour se rapprocher des conditions d'analyse par cytométrie en flux. De plus, il serait indispensable d'évaluer **l'expression protéique** de ces cytokines par ELISA-Sandwich. En perspective, nous pourrions envisager d'effectuer des **tests fonctionnels de cytotoxicité** grâce à des modèle de coculture entre des cellules cancéreuses et des macrophages traités ou non avec du CRO15.

Nous avons par ailleurs montré que CRO15 induisait la sécrétion d'IFN- γ par les cellules cancéreuses. Nous pourrions alors évaluer l'effet **autocrine** (sur les cellules cancéreuses elles-mêmes) et **paracrine** (sur des macrophages ou des lymphocytes en culture) de cette sécrétion. Même si dans les conditions expérimentales utilisées, le sécrétome des cellules cancéreuses traitées avec CRO15 ne module pas la polarisation des macrophages, de nombreux autres mécanismes pourraient être examinés. En effet, l'IFN- γ peut provoquer l'augmentation de l'expression des molécules du CMH I sur les cellules cancéreuses (Zhang *et al.*, 2019) ou du CMH II sur de nombreux types cellulaires dont les cellules immunitaires (Wijdeven *et al.*, 2018), favorisant la **présentation antigénique** et donc la réponse immunitaire antitumorale. Il peut en revanche également favoriser l'expression de **molécules immunosuppressives** telles que l'IDO (*Indolaimine-2, 3-deoxygenase*), une enzyme de métabolisation du tryptophane qui contribue à l'immunotolérance et peut avoir un effet négatif direct sur la fonction des LT effecteurs (Sharma *et al.*, 2017). Quoi qu'il en soit, ces mécanismes importants mériteraient d'être évalués sous l'effet, direct ou indirect (milieu conditionnés) de notre molécule.

De manière très surprenante, n'avons pas observé **de variations** du pourcentage des **lymphocytes T CD3+**, et notamment des lymphocytes T CD8+ cytotoxiques, au sein des tumeurs de CT26 dans les souris Balb/C entre les différents groupes de traitement. Les lymphocytes T CD8+ cytotoxiques sont pourtant des **acteurs majeurs** de la réponse immunitaires antitumorales, qui sont en général augmentés en réponse aux anti-PD1 dans différents modèles de tumeurs (Duraiswamy *et al.*, 2013; Gao *et al.*, 2019; Tumeh *et al.*, 2014; Wei *et al.*, 2021). Même si notre composé n'a peut-être pas d'**effet direct** sur les lymphocytes, ceux-ci ont très probablement un rôle à jouer dans la réponse immunitaire médiée par le CRO15. En effet, nous avons vu précédemment que la réponse antitumorale de CRO15 dans les CT26 observée dans des souris Balb/C

immunocompétente était **supérieure à celle observée** dans des souris Balb/C Nude, **dépourvues de lymphocytes T** mais possédant un système immunitaire inné fonctionnel ([paragraphe B.1.](#)). Même si CRO15 semble principalement agir sur les populations immunitaires myéloïdes, ces dernières interagissent avec les lymphocytes T pour permettre l'élimination de la tumeur. Nous pourrions donc nous demander d'une part si nous nous trouvions dans la **bonne cinétique** de traitement lorsque nous avons analysé les TILs (*Tumor Infiltrating Lymphocytes*) dans les tumeurs, l'infiltration et l'activité des TILs étant fortement régulées par le MET (Lanitis *et al.*, 2017). D'autre part, il est possible que le **pourcentage global** de ces cellules ne varie pas mais que nos traitements favorisent **l'activation** des lymphocytes T ou préviennent leur « **épuisement** ». Une étude récente réalisée dans des modèles de CT26 et de MC38 a en effet montré que le pourcentage de lymphocytes T infiltrant la tumeur ne variait pas dans les souris traitées anti-PD1 mais que **l'expression du récepteur PD-1** sur les lymphocytes CD8+ diminuait en réponse à ce traitement (Shi *et al.*, 2019). En effet, dans un milieu où les lymphocytes T sont soumis à des stimuli chroniques (comme dans une tumeur), ils s'épuisent et expriment de nombreux **récepteurs inhibiteurs** tels que PD-1, TIM-3, LAG-3, BTLA (*Band T lymphocyte Attenuator*) ou encore TIGIT (*T-cell ImmunoGlobulin and Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibitory motif domain*) (Barber *et al.*, 2006; Fourcade *et al.*, 2012; Jin *et al.*, 2010; Joller *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2020d) tout en perdant leur fonction cytotoxique par inhibition de la sécrétion de TNF α , IFN γ ou de Granzyme B. Il serait donc indispensable d'évaluer plus précisément dans nos tumeurs le **degré d'épuisement ou d'activation** des lymphocytes par analyse de ces différents marqueurs par FACS ou immunofluorescence. Dans l'ensemble, ces résultats de cytométrie en flux devront être confirmés et **consolidés** sur un plus grand nombre de souris grâce à des marquages complémentaires, et si possible réalisés à différents temps de traitement. De plus, nous pouvons nous interroger sur l'effet de CRO15 en **périphérie** de la tumeur, dans les organes lymphoïdes secondaires tels que les ganglions drainant la tumeur ou la rate dans lesquels se déroulent l'activation et la différenciation des lymphocytes. Enfin, des expériences de **déplétion** de différentes populations immunitaires telle que les **LT CD8+** (anticorps déplétant anti-CD8) ou les **macrophages** (souris transgéniques CD11b-DTR traitées à la toxine diphtérique, par exemple (Cailhier *et al.*, 2005)) permettront de déterminer l'implication de chacune de ces populations de cellules immunitaires dans la réponse antitumorale médiée par CRO15.

Etant donné les résultats encourageants obtenus dans ce modèle immunogénique de carcinome de colon (CT26), la perspective serait désormais de valider les effets immunitaires observés dans un **modèle de mélanome**. Le choix du modèle va alors être important pour étudier la réponse immunitaire dans des conditions qui se rapprochent le plus de celles des patients atteints de mélanome. Ces dernières années, de nombreux modèles de mélanome se sont développés dans ce but (Patton *et al.*, 2021). Des modèles de souris génétiquement modifiées (GEM : *Genetically Engineered Mouses*) portant des **mutations** caractéristiques des tumeurs humaines de mélanome ont alors vu le jour pour évaluer les mécanismes de réponse aux thérapies ciblées (Dankort *et al.*, 2009; Deuker *et al.*, 2015; Petit *et al.*, 2019) mais aussi aux immunothérapies (Galvani *et al.*, 2020; Pérez-Guijarro *et al.*, 2020). De ces modèles ont été isolées des **lignées** (GDA : *GEM-Derived Allografts*) qui se greffent généralement sans rejet dans des souris syngéniques C57BL/6. C'est le cas des lignées **YUMM**

présentant différentes associations de mutations oncogéniques retrouvées dans le mélanome (Meeth *et al.*, 2016). Parmi elles se trouvent des lignées **sensibles** (Yumm 2.1, $BRAF^{V600E}/PTEN^{-}/CDNK2^{+}/BCAT^{loxex3}$), ou plutôt **résistantes** (Yumm 1.1, $BRAF^{V600E}/PTEN^{-}/CDNK2^{-}$) aux **anti-PD-1**. Il a été montré que dans les tumeurs solides, une forte charge mutationnelle était associée à la réponse aux immunothérapies (Klein *et al.*, 2021). De ce fait, certaines lignées ont été rendues **plus immunogéniques** par génération de **nouvelles mutations** grâce à des radiations UVs (Wang *et al.*, 2017b) ou par **expression d'un antigène** modèle (l'Ovalbumine) (Lelliott *et al.*, 2019) et répondent, au moins partiellement, aux inhibiteurs de point de contrôle immunitaire (ICI). Ces différentes lignées, de la plus sensible à la plus résistante aux ICI, pourraient être de **bons modèles** pour tester la réponse au CRO15 en combinaison aux anti-PD1. En effet, tout comme dans notre modèle de CT26, une lignée immunogénique **partiellement répondante** aux anti-PD1 permettrait d'évaluer la **potentialisation** de cette réponse par notre composé. D'autres part, l'utilisation d'une lignée résistante permettrait de déterminer si CRO15 a la capacité de « réchauffer » une tumeur dite « **froide** » pour la rendre sensible aux immunothérapies. Par ailleurs, il existe **des souris dites humanisées** (hu-CD34, Jackson Laboratory). Ces souris sont obtenues par transplantation de **cellules souches hématopoïétiques et progénitrices humaines CD34+** dans des souris receveuses complètement immunodéficientes NGS (*NOD scid gamma mouse* – Jackson Laboratory), irradiées (Wang *et al.*, 2018c). Elles permettent la génération de multiples lignées cellulaires immunitaires humaines, telles que les **lymphocytes T**, lymphocytes B, ou les **cellules myéloïdes** conventionnelles et plasmatiques (macrophages, cellules dendritiques). Des réponses lymphocytaires spécifiques, cytotoxiques et cytokiniques (production d'IFN- γ) sont observées dans ces souris humanisées (HuNSG) (Strowig *et al.*, 2009). Récemment, il a été montré que ce modèle pouvait être utilisé pour évaluer la **réponse aux anti-PD1** dans des xénogreffes dérivées de tumeurs de patients (PDX : *Patient-Derived Xenografts*) (Wang *et al.*, 2018c). Ce modèle serait donc le *nec plus ultra* pour tester l'efficacité de CRO15, en monothérapie ou en combinaison avec des anti-PD1, dans un modèle le plus physio-pathologique possible : le mélanome humain.

En conclusion de cette seconde partie, nous avons montré que le CRO15 induisait une modulation de la **réponse immunitaire antitumorale** et provoquait une **potentialisation de la réponse aux anti-PD1** dans un modèle de carcinome de colon. Les premiers résultats suggèrent que cette potentialisation est due à une diminution d'infiltrat des cellules myéloïdes immunosuppressives (notamment les macrophages M2) par notre composé. Les **mécanismes** impliqués dans cette réponse immunitaire, et notamment l'implication de l'activation de la voie AMPK ou l'inhibition de la kinase MELK, restent encore à déterminer. Pour finir, ces résultats devront être validés dans un modèle de mélanome le plus physiopathologique possible.

CRO15 est donc un composé particulièrement prometteur dont les effets antitumoraux sont médiés par des effets cytotoxiques et une potentialisation de la réponse immunitaire, qui pourraient ouvrir de nouvelles perspectives dans le **développement de nouveaux traitements** contre le mélanome et potentiellement d'autres tumeurs solides.

BIBLIOGRAPHIE

- Aaes, T.L., Kaczmarek, A., Delvaeye, T., De Craene, B., De Koker, S., Heyndrickx, L., Delrue, I., Taminau, J., Wiernicki, B., De Groote, P., et al. (2016). Vaccination with Necroptotic Cancer Cells Induces Efficient Anti-tumor Immunity. *Cell Reports* 15, 274–287.
- Afzal, M.Z., Mercado, R.R., and Shirai, K. (2018). Efficacy of metformin in combination with immune checkpoint inhibitors (anti-PD-1/anti-CTLA-4) in metastatic malignant melanoma. *Journal for ImmunoTherapy of Cancer* 6.
- Aguirre-Ghisso, J.A. (2007). Models, mechanisms and clinical evidence for cancer dormancy. *Nat Rev Cancer* 7, 834–846.
- Albregues, J., Shields, M., Ng, D., Park, C.G., Ambrico, A., Poindexter, M., Upadhyay, P., Uyeminami, D., Pommier, A., Küttner, V., et al. (2018). Neutrophil extracellular traps produced during inflammation awaken dormant cancer cells in mice. *Science* 361.
- Aljada, A., and Mousa, S.A. (2012). Metformin and neoplasia: Implications and indications. *Pharmacology & Therapeutics* 133, 108–115.
- Allen, M., and Jones, J.L. (2011). Jekyll and Hyde: the role of the microenvironment on the progression of cancer. *The Journal of Pathology* 223, 163–177.
- Alvarez-Garcia, O., Olmer, M., Akagi, R., Akasaki, Y., Fisch, K.M., Shen, T., Su, A.I., and Lotz, M.K. (2016). Suppression of REDD1 in osteoarthritis cartilage, a novel mechanism for dysregulated mTOR signaling and defective autophagy. *Osteoarthritis and Cartilage* 24, 1639–1647.
- Amaral, T., Sinnberg, T., Meier, F., Krepler, C., Levesque, M., Niessner, H., and Garbe, C. (2017). The mitogen-activated protein kinase pathway in melanoma part I – Activation and primary resistance mechanisms to BRAF inhibition. *European Journal of Cancer* 73, 85–92.
- Amici, S.A., Dong, J., and Guerau-de-Arellano, M. (2017). Molecular Mechanisms Modulating the Phenotype of Macrophages and Microglia. *Front. Immunol.* 8.
- Andtbacka, R.H.I., Kaufman, H.L., Collichio, F., Amatruda, T., Senzer, N., Chesney, J., Delman, K.A., Spidler, L.E., Puzanov, I., Agarwala, S.S., et al. (2015). Talimogene Laherparepvec Improves Durable Response Rate in Patients With Advanced Melanoma. *JCO* 33, 2780–2788.
- Arias-Lopez, C., Lazaro-Trueba, I., Kerr, P., Lord, C.J., Dexter, T., Irvani, M., Ashworth, A., and Silva, A. (2006). p53 modulates homologous recombination by transcriptional regulation of the RAD51 gene. *EMBO Rep* 7, 219–224.
- Armstrong, B.K., and Cust, A.E. (2017). Sun exposure and skin cancer, and the puzzle of cutaneous melanoma: A perspective on Fears et al. Mathematical models of age and ultraviolet effects on the incidence of skin cancer among whites in the United States. *American Journal of Epidemiology* 1977; 105: 420–427. *Cancer Epidemiology* 48, 147–156.
- Armstrong, B.K., and Kricger, A. (1993). How much melanoma is caused by sun exposure? *Melanoma Res.* 3, 395–401.
- Asati, V. (2016). PI3K/Akt/mTOR and Ras/Raf/MEK/ERK signaling pathways inhibitors as anticancer agents: Structural and pharmacological perspectives. *European Journal of Medicinal Chemistry* 28.
- Ascierto, P.A., Dummer, R., Gogas, H.J., Flaherty, K.T., Arance, A., Mandala, M., Liskay, G., Garbe, C., Schadendorf, D., Krajsova, I., et al. (2020). Update on tolerability and overall survival in COLUMBUS: landmark analysis of a randomised phase 3 trial of encorafenib plus binimetinib vs vemurafenib or encorafenib in patients with BRAF V600-mutant melanoma. *Eur J Cancer* 126, 33–44.
- Bader, J.E., Voss, K., and Rathmell, J.C. (2020). Targeting Metabolism to Improve the Tumor Microenvironment for Cancer Immunotherapy. *Molecular Cell* 78, 1019–1033.

- Badouel, C., Körner, R., Frank-Vaillant, M., Couturier, A., Nigg, E.A., and Tassan, J.-P. (2006). M-phase MELK activity is regulated by MPF and MAPK. *Cell Cycle* 5, 883–889.
- Badouel, C., Chartrain, I., Blot, J., and Tassan, J.-P. (2010). Maternal embryonic leucine zipper kinase is stabilized in mitosis by phosphorylation and is partially degraded upon mitotic exit. *Experimental Cell Research* 316, 2166–2173.
- Bao, Y., Wu, X., Chen, J., Hu, X., Zeng, F., Cheng, J., Jin, H., Lin, X., and Chen, L.-F. (2017). Brd4 modulates the innate immune response through Mnk2-eIF4E pathway-dependent translational control of I κ B α . *Proc Natl Acad Sci U S A* 114, E3993–E4001.
- Barakat, D.J., Mendonca, J., Barberi, T., Zhang, J., Kachhap, S.K., Paz-Priel, I., and Friedman, A.D. (2016). C/EBP β regulates sensitivity to bortezomib in prostate cancer cells by inducing REDD1 and autophagosome–lysosome fusion. *Cancer Letters* 375, 152–161.
- Barber, D.L., Wherry, E.J., Masopust, D., Zhu, B., Allison, J.P., Sharpe, A.H., Freeman, G.J., and Ahmed, R. (2006). Restoring function in exhausted CD8 T cells during chronic viral infection. *Nature* 439, 682–687.
- Barkan, D., and Chambers, A.F. (2011). β 1-Integrin: A Potential Therapeutic Target in the Battle against Cancer Recurrence. *Clin Cancer Res* 17, 7219–7223.
- Barnes, K., Ingram, J.C., Porras, O.H., Barros, L.F., Hudson, E.R., Fryer, L.G.D., Fougelle, F., Carling, D., Hardie, D.G., and Baldwin, S.A. (2002). Activation of GLUT1 by metabolic and osmotic stress: potential involvement of AMP-activated protein kinase (AMPK). *J Cell Sci* 115, 2433–2442.
- Bartkova, J., Hořejší, Z., Koed, K., Krämer, A., Tort, F., Zieger, K., Guldberg, P., Sehested, M., Nesland, J.M., Lukas, C., et al. (2005). DNA damage response as a candidate anti-cancer barrier in early human tumorigenesis. *Nature* 434, 864–870.
- Beke, L., Kig, C., Linders, J.T.M., Boens, S., Boeckx, A., van Heerde, E., Parade, M., De Bondt, A., Van den Wyngaert, I., Bashir, T., et al. (2015). MELK-T1, a small-molecule inhibitor of protein kinase MELK, decreases DNA-damage tolerance in proliferating cancer cells. *Bioscience Reports* 35.
- Ben Sahra, I., Laurent, K., Loubat, A., Giorgetti-Peraldi, S., Colosetti, P., Auberger, P., Tanti, J.F., Le Marchand-Brustel, Y., and Bost, F. (2008). The antidiabetic drug metformin exerts an antitumoral effect in vitro and in vivo through a decrease of cyclin D1 level. *Oncogene* 27, 3576–3586.
- Ben Sahra, I., Regazzetti, C., Robert, G., Laurent, K., Marchand-Brustel, Y.L., Auberger, P., Tanti, J.-F., Giorgetti-Peraldi, S., and Bost, F. (2011). Metformin, Independent of AMPK, Induces mTOR Inhibition and Cell-Cycle Arrest through REDD1. *Cancer Res* 71, 4366–4372.
- Benci, J.L., Xu, B., Qiu, Y., Wu, T., Dada, H., Victor, C.T.-S., Cucolo, L., Lee, D.S.M., Pauken, K.E., Huang, A.C., et al. (2016). Tumor Interferon Signaling Regulates a Multigenic Resistance Program to Immune Checkpoint Blockade. *Cell* 167, 1540-1554.e12.
- Bensimon, A., Aebersold, R., and Shiloh, Y. (2011). Beyond ATM: The protein kinase landscape of the DNA damage response. *FEBS Letters* 585, 1625–1639.
- van den Berg, J.H., Heemskerk, B., van Rooij, N., Gomez-Eerland, R., Michels, S., van Zon, M., de Boer, R., Bakker, N.A.M., Jorritsma-Smit, A., van Buuren, M.M., et al. (2020). Tumor infiltrating lymphocytes (TIL) therapy in metastatic melanoma: boosting of neoantigen-specific T cell reactivity and long-term follow-up. *J Immunother Cancer* 8, e000848.
- Berger, C., Jensen, M.C., Lansdorp, P.M., Gough, M., Elliott, C., and Riddell, S.R. (2008). Adoptive transfer of effector CD8⁺ T cells derived from central memory cells establishes persistent T cell memory in primates. *J Clin Invest* 118, 294–305.
- Berwick, M., Buller, D.B., Cust, A., Gallagher, R., Lee, T.K., Meyskens, F., Pandey, S., Thomas, N.E., Veierød, M.B., and Ward, S. (2016). Melanoma Epidemiology and Prevention. *Cancer Treat. Res.* 167, 17–49.

- Betof Warner, A., Palmer, J.S., Shoushtari, A.N., Goldman, D.A., Panageas, K.S., Hayes, S.A., Bajwa, R., Momtaz, P., Callahan, M.K., Wolchok, J.D., et al. (2020). Long-Term Outcomes and Responses to Retreatment in Patients With Melanoma Treated With PD-1 Blockade. *J Clin Oncol* 38, 1655–1663.
- Beullens, M., Vancauwenbergh, S., Morrice, N., Derua, R., Ceulemans, H., Waelkens, E., and Bollen, M. (2005). Substrate Specificity and Activity Regulation of Protein Kinase MELK*. *Journal of Biological Chemistry* 280, 40003–40011.
- Bhome, R., Al Saihati, H.A., Goh, R.W., Bullock, M.D., Primrose, J.N., Thomas, G.J., Sayan, A.E., and Mirnezami, A.H. (2016). Translational aspects in targeting the stromal tumour microenvironment: From bench to bedside. *New Horiz Transl Med* 3, 9–21.
- Biswas, S.K., and Mantovani, A. (2010). Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm. *Nature Immunology* 11, 889–896.
- Blache, C.A., Manuel, E.R., Kaltcheva, T.I., Wong, A.N., Ellenhorn, J.D.I., Blazar, B.R., and Diamond, D.J. (2012). Systemic Delivery of Salmonella typhimurium Transformed with IDO shRNA Enhances Intratumoral Vector Colonization and Suppresses Tumor Growth. *Cancer Res* 72, 6447–6456.
- Blagih, J., Coulombe, F., Vincent, E.E., Dupuy, F., Galicia-Vázquez, G., Yurchenko, E., Raissi, T.C., van der Windt, G.J.W., Viollet, B., Pearce, E.L., et al. (2015). The Energy Sensor AMPK Regulates T Cell Metabolic Adaptation and Effector Responses In Vivo. *Immunity* 42, 41–54.
- Blandino, G., Valerio, M., Cioce, M., Mori, F., Casadei, L., Pulito, C., Sacconi, A., Biagioni, F., Cortese, G., Galanti, S., et al. (2012). Metformin elicits anticancer effects through the sequential modulation of DICER and c-MYC. *Nature Communications* 3, 865.
- Blattner, C., Fleming, V., Weber, R., Himmelhan, B., Altevogt, P., Gebhardt, C., Schulze, T.J., Razon, H., Hawila, E., Wildbaum, G., et al. (2018). CCR5+ Myeloid-Derived Suppressor Cells Are Enriched and Activated in Melanoma Lesions. *Cancer Res* 78, 157–167.
- Bodmer, M., Meier, C., Krähenbühl, S., Jick, S.S., and Meier, C.R. (2010). Long-Term Metformin Use Is Associated With Decreased Risk of Breast Cancer. *Diabetes Care* 33, 1304–1308.
- Bogenrieder, T., and Herlyn, M. (2002). Cell-surface proteolysis, growth factor activation and intercellular communication in the progression of melanoma. *Crit Rev Oncol Hematol* 44, 1–15.
- 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.
- Bolster, D.R., Crozier, S.J., Kimball, S.R., and Jefferson, L.S. (2002). AMP-activated protein kinase suppresses protein synthesis in rat skeletal muscle through down-regulated mammalian target of rapamycin (mTOR) signaling. *J Biol Chem* 277, 23977–23980.
- Boreel, D.F., Span, P.N., Heskamp, S., Adema, G.J., and Bussink, J. (2021). Targeting Oxidative Phosphorylation to Increase the Efficacy of Radio- and Immune-Combination Therapy. *Clin Cancer Res* 1078-0432.CCR-20–3913.
- Bost, F., Sahra, I.B., Le Marchand-Brustel, Y., and Tanti, J.-F. (2012). Metformin and cancer therapy. *Curr Opin Oncol* 24, 103–108.
- Botton, T., Yeh, I., Nelson, T., Vemula, S.S., Sparatta, A., Garrido, M.C., Allegra, M., Rocchi, S., Bahadoran, P., McCalmont, T.H., et al. (2013). Recurrent BRAF kinase fusions in melanocytic tumors offer an opportunity for targeted therapy. *Pigment Cell & Melanoma Research* 26, 845–851.
- Botton, T., Talevich, E., Mishra, V.K., Zhang, T., Shain, A.H., Berquet, C., Gagnon, A., Judson, R.L., Ballotti, R., Ribas, A., et al. (2019). Genetic Heterogeneity of BRAF Fusion Kinases in Melanoma Affects Drug Responses. *Cell Reports* 29, 573-588.e7.
- Bowker, S.L., Majumdar, S.R., Veugelers, P., and Johnson, J.A. (2006). Increased cancer-related mortality for patients with type 2 diabetes who use sulfonylureas or insulin. *Diabetes Care* 29, 254–258.

- Bragazzi, N.L., Sellami, M., Salem, I., Conic, R., Kimak, M., Pigatto, P.D.M., and Damiani, G. (2019). Fasting and Its Impact on Skin Anatomy, Physiology, and Physiopathology: A Comprehensive Review of the Literature. *Nutrients* 11.
- Brenner, M., and Hearing, V.J. (2008). The Protective Role of Melanin Against UV Damage in Human Skin. *Photochem Photobiol* 84, 539–549.
- Bristot, I.J., Kehl Dias, C., Chapola, H., Parsons, R.B., and Klamt, F. (2020). Metabolic rewiring in melanoma drug-resistant cells. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 153, 102995.
- Britto, F.A., Cortade, F., Belloum, Y., Blaquièrre, M., Gallot, Y.S., Docquier, A., Pagano, A.F., Jublanc, E., Bendridi, N., Koechlin-Ramonatxo, C., et al. (2018). Glucocorticoid-dependent REDD1 expression reduces muscle metabolism to enable adaptation under energetic stress. *BMC Biology* 16, 65.
- Bronte and Gabrilovitch (2010). Myeloid-Derived Suppressor Cells. *Nature Review Immunology Poster Biolegend*.
- Bronte, V., Brandau, S., Chen, S.-H., Colombo, M.P., Frey, A.B., Greten, T.F., Mandruzzato, S., Murray, P.J., Ochoa, A., Ostrand-Rosenberg, S., et al. (2016). Recommendations for myeloid-derived suppressor cell nomenclature and characterization standards. *Nat Commun* 7.
- Brugarolas, J., Lei, K., Hurley, R.L., Manning, B.D., Reiling, J.H., Hafen, E., Witters, L.A., Ellisen, L.W., and Kaelin, W.G. (2004). Regulation of mTOR function in response to hypoxia by REDD1 and the TSC1/TSC2 tumor suppressor complex. *Genes Dev* 18, 2893–2904.
- Burkholder, B., Huang, R.-Y., Burgess, R., Luo, S., Jones, V.S., Zhang, W., Lv, Z.-Q., Gao, C.-Y., Wang, B.-L., Zhang, Y.-M., et al. (2014). Tumor-induced perturbations of cytokines and immune cell networks. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer* 1845, 182–201.
- Burnet, M. (1957). Cancer—A Biological Approach: I. The Processes Of Control. II. The Significance of Somatic Mutation. *Br Med J* 1, 779–786.
- Butte, M.J., Keir, M.E., Phamduy, T.B., Sharpe, A.H., and Freeman, G.J. (2007). Programmed Death-1 Ligand 1 Interacts Specifically with the B7-1 Costimulatory Molecule to Inhibit T Cell Responses. *Immunity* 27, 111–122.
- Cai, S.-L., Tee, A.R., Short, J.D., Bergeron, J.M., Kim, J., Shen, J., Guo, R., Johnson, C.L., Kiguchi, K., and Walker, C.L. (2006). Activity of TSC2 is inhibited by AKT-mediated phosphorylation and membrane partitioning. *Journal of Cell Biology* 173, 279–289.
- Cailhier, J.F., Partolina, M., Vuthoori, S., Wu, S., Ko, K., Watson, S., Savill, J., Hughes, J., and Lang, R.A. (2005). Conditional Macrophage Ablation Demonstrates That Resident Macrophages Initiate Acute Peritoneal Inflammation. *The Journal of Immunology* 174, 2336–2342.
- Callahan, M.K., Masters, G., Pratilas, C.A., Ariyan, C., Katz, J., Kitano, S., Russell, V., Gordon, R.A., Vyas, S., Yuan, J., et al. (2014). Paradoxical Activation of T Cells via Augmented ERK Signaling Mediated by a RAF Inhibitor. *Cancer Immunol Res* 2, 70–79.
- Campoli, M.R., Chang, C.-C., Kageshita, T., Wang, X., McCarthy, J.B., and Ferrone, S. (2004). Human High Molecular Weight-Melanoma-Associated Antigen (HMW-MAA): A Melanoma Cell Surface Chondroitin Sulfate Proteoglycan (MSCP) with Biological and Clinical Significance. *CRI* 24.
- Canevari, G., Re Depaolini, S., Cucchi, U., Bertrand, J.A., Casale, E., Perrera, C., Forte, B., Carpinelli, P., and Felder, E.R. (2013). Structural Insight into Maternal Embryonic Leucine Zipper Kinase (MELK) Conformation and Inhibition toward Structure-Based Drug Design. *Biochemistry* 52, 6380–6387.
- Cao, L.-S., Wang, J., Chen, Y., Deng, H., Wang, Z.-X., and Wu, J.-W. (2013). Structural Basis for the Regulation of Maternal Embryonic Leucine Zipper Kinase. *PLOS ONE* 8, e70031.
- Carling, D., Zammit, V.A., and Hardie, D.G. (1987). A common bicyclic protein kinase cascade inactivates the regulatory enzymes of fatty acid and cholesterol biosynthesis. *FEBS Letters* 223, 217–222.

- Carmona-Fontaine, C., Deforet, M., Akkari, L., Thompson, C.B., Joyce, J.A., and Xavier, J.B. (2017). Metabolic origins of spatial organization in the tumor microenvironment. *PNAS* *114*, 2934–2939.
- Carroll, K.C., Viollet, B., and Suttles, J. (2013). AMPK α 1 deficiency amplifies proinflammatory myeloid APC activity and CD40 signaling. *J Leukoc Biol* *94*, 1113–1121.
- Caruana, I., Savoldo, B., Hoyos, V., Weber, G., Liu, H., Kim, E.S., Ittmann, M.M., Marchetti, D., and Dotti, G. (2015). Heparanase promotes tumor infiltration and antitumor activity of CAR-redirectioned T lymphocytes. *Nature Medicine* *21*, 524–529.
- Casares, N., Pequignot, M.O., Tesniere, A., Ghiringhelli, F., Roux, S., Chaput, N., Schmitt, E., Hamai, A., Hervas-Stubbs, S., Obeid, M., et al. (2005). Caspase-dependent immunogenicity of doxorubicin-induced tumor cell death. *The Journal of Experimental Medicine* *202*, 1691–1701.
- Castle, J.C., Loewer, M., Boegel, S., de Graaf, J., Bender, C., Tadmor, A.D., Boisguerin, V., Bukur, T., Sorn, P., Paret, C., et al. (2014). Immunomic, genomic and transcriptomic characterization of CT26 colorectal carcinoma. *BMC Genomics* *15*, 190.
- Cekic, C., Day, Y.-J., Sag, D., and Linden, J. (2014). Myeloid expression of Adenosine A2A receptor suppresses T and NK cell responses in the solid tumor microenvironment. *Cancer Res* *74*, 7250–7259.
- Cerezo, M., and Rocchi, S. (2020). Cancer cell metabolic reprogramming: a keystone for the response to immunotherapy. *Cell Death & Disease* *11*, 1–10.
- Cerezo, M., Tichet, M., Abbe, P., Ohanna, M., Lehraiki, A., Rouaud, F., Allegra, M., Giaccherio, D., Bahadoran, P., Bertolotto, C., et al. (2013). Metformin Blocks Melanoma Invasion and Metastasis Development in AMPK/p53-Dependent Manner. *Molecular Cancer Therapeutics* *12*, 1605–1615.
- Cerezo, M., Guemiri, R., Druillennec, S., Girault, I., Malka-Mahieu, H., Shen, S., Allard, D., Martineau, S., Welsch, C., Agoussi, S., et al. (2018). Translational control of tumor immune escape via the eIF4F–STAT1–PD-L1 axis in melanoma. *Nat Med* *24*, 1877–1886.
- Cha, J.-H., Yang, W.-H., Xia, W., Wei, Y., Chan, L.-C., Lim, S.-O., Li, C.-W., Kim, T., Chang, S.-S., Lee, H.-H., et al. (2018). Metformin Promotes Antitumor Immunity via Endoplasmic-Reticulum-Associated Degradation of PD-L1. *Molecular Cell* *71*, 606–620.e7.
- Challier, J., Bruniquel, D., Sewell, A.K., and Laugel, B. (2013). Adenosine and cAMP signalling skew human dendritic cell differentiation towards a tolerogenic phenotype with defective CD8(+) T-cell priming capacity. *Immunology* *138*, 402–410.
- Chan, E.Y.W., Kir, S., and Tooze, S.A. (2007). siRNA screening of the kinome identifies ULK1 as a multidomain modulator of autophagy. *J Biol Chem* *282*, 25464–25474.
- Chang, B., Meng, J., Zhu, H., Du, X., Sun, L., Wang, L., Li, S., and Yang, G. (2018). Overexpression of the recently identified oncogene REDD1 correlates with tumor progression and is an independent unfavorable prognostic factor for ovarian carcinoma. *Diagnostic Pathology* *13*, 87.
- 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. *New England Journal of Medicine* *364*, 2507–2516.
- Chapuis, A.G., Lee, S.M., Thompson, J.A., Roberts, I.M., Margolin, K.A., Bhatia, S., Sloan, H.L., Lai, I., Wagener, F., Shibuya, K., et al. (2016). Combined IL-21–primed polyclonal CTL plus CTLA4 blockade controls refractory metastatic melanoma in a patient. *Journal of Experimental Medicine* *213*, 1133–1139.
- Chaube, B., Malvi, P., Singh, S.V., Mohammad, N., Viollet, B., and Bhat, M.K. (2015). AMPK maintains energy homeostasis and survival in cancer cells via regulating p38/PGC-1 α -mediated mitochondrial biogenesis. *Cell Death Discovery* *1*, 1–11.

- Cheers, C., and Waller, R. (1975). Activated Macrophages in Congenitally Athymic “Nude” Mice and in Lethally Irradiated Mice. *The Journal of Immunology* *115*, 844–847.
- Chen, D.-P., Ma, Y.-P., Zhuo, L., Zhang, Z., Zou, G.-M., Yang, Y., Gao, H.-M., and Li, W.-G. (2017a). 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ inhibits the proliferation of rat mesangial cells induced by high glucose via DDIT4. *Oncotarget* *9*, 418–427.
- Chen, M., Zhang, J., Hu, F., Liu, S., and Zhou, Z. (2015). Metformin affects the features of a human hepatocellular cell line (HepG2) by regulating macrophage polarization in a co-culture microenvironment. *Diabetes Metab Res Rev* *31*, 781–789.
- Chen, M.-B., Shen, W.-X., Yang, Y., Wu, X.-Y., Gu, J.-H., and Lu, P.-H. (2011). Activation of AMP-activated protein kinase is involved in vincristine-induced cell apoptosis in B16 melanoma cell. *J Cell Physiol* *226*, 1915–1925.
- Chen, S., Zhou, Q., Guo, Z., Wang, Y., Wang, L., Liu, X., Lu, M., Ju, L., Xiao, Y., and Wang, X. (2020). Inhibition of MELK produces potential anti-tumour effects in bladder cancer by inducing G1/S cell cycle arrest via the ATM/CHK2/p53 pathway. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* *24*, 1804–1821.
- Chen, S.C., Brooks, R., Houskeeper, J., Bremner, S.K., Dunlop, J., Viollet, B., Logan, P.J., Salt, I.P., Ahmed, S.F., and Yarwood, S.J. (2017b). Metformin suppresses adipogenesis through both AMP-activated protein kinase (AMPK)-dependent and AMPK-independent mechanisms. *Mol Cell Endocrinol* *440*, 57–68.
- Chesney, J., Puzanov, I., Collichio, F., Singh, P., Milhem, M.M., Glaspy, J., Hamid, O., Ross, M., Friedlander, P., Garbe, C., et al. (2018). Randomized, Open-Label Phase II Study Evaluating the Efficacy and Safety of Talimogene Laherparepvec in Combination With Ipilimumab Versus Ipilimumab Alone in Patients With Advanced, Unresectable Melanoma. *J Clin Oncol* *36*, 1658–1667.
- Chiang, C.-F., Chao, T.-T., Su, Y.-F., Hsu, C.-C., Chien, C.-Y., Chiu, K.-C., Shiah, S.-G., Lee, C.-H., Liu, S.-Y., and Shieh, Y.-S. (2017). Metformin-treated cancer cells modulate macrophage polarization through AMPK-NF- κ B signaling. *Oncotarget* *8*, 20706–20718.
- Chipuk, J.E., Kuwana, T., Bouchier-Hayes, L., Droin, N.M., Newmeyer, D.D., Schuler, M., and Green, D.R. (2004). Direct Activation of Bax by p53 Mediates Mitochondrial Membrane Permeabilization and Apoptosis. *Science* *303*, 1010–1014.
- Cho, S.S., Kim, K.M., Yang, J.H., Kim, J.Y., Park, S.J., Kim, S.J., Kim, J.K., Cho, I.J., and Ki, S.H. (2018a). Induction of REDD1 via AP-1 prevents oxidative stress-mediated injury in hepatocytes. *Free Radical Biology and Medicine* *124*, 221–231.
- Cho, Y., Kang, H.G., Kim, S.-J., Lee, S., Jee, S., Ahn, S.G., Kang, M.J., Song, J.S., Chung, J.-Y., Yi, E.C., et al. (2018b). Post-translational modification of OCT4 in breast cancer tumorigenesis. *Cell Death & Differentiation* *25*, 1781–1795.
- Cho, Y.-S., Yoo, J., Park, S., and Cho, H.-S. (2014). The structures of the kinase domain and UBA domain of MPK38 suggest the activation mechanism for kinase activity. *Acta Cryst D* *70*, 514–521.
- Choi, S., and Ku, J.-L. (2011). Resistance of colorectal cancer cells to radiation and 5-FU is associated with MELK expression. *Biochem Biophys Res Commun* *412*, 207–213.
- Choi, Y.J., and Anders, L. (2014). Signaling through cyclin D-dependent kinases. *Oncogene* *33*, 1890–1903.
- Chong, E.A., Melenhorst, J.J., Lacey, S.F., Ambrose, D.E., Gonzalez, V., Levine, B.L., June, C.H., and Schuster, S.J. (2017). PD-1 blockade modulates chimeric antigen receptor (CAR)-modified T cells: refueling the CAR. *Blood* *129*, 1039–1041.
- Chou, C.-C., Lee, K.-H., Lai, I.-L., Wang, D., Mo, X., Kulp, S.K., Shapiro, C.L., and Chen, C.-S. (2014). AMPK Reverses the Mesenchymal Phenotype of Cancer Cells by Targeting the Akt-MDM2-Foxo3a Signaling Axis. *Cancer Res* *74*, 4783–4795.

- Chung, S., Suzuki, H., Miyamoto, T., Takamatsu, N., Tatsuguchi, A., Ueda, K., Kijima, K., Nakamura, Y., and Matsuo, Y. (2012). Development of an orally-administrative MELK-targeting inhibitor that suppresses the growth of various types of human cancer. *Oncotarget* 3, 1629–1640.
- Cichorek, M., Wachulska, M., Stasiewicz, A., and Tyimińska, A. (2013). Skin melanocytes: biology and development. *Postepy Dermatol Alergol* 30, 30–41.
- Cirenajwis, H., Lauss, M., Ekedahl, H., Törngren, T., Kvist, A., Saal, L.H., Olsson, H., Staaf, J., Carneiro, A., Ingvar, C., et al. (2017). NF1-mutated melanoma tumors harbor distinct clinical and biological characteristics. *Mol Oncol* 11, 438–451.
- Clark, W.H. (1991). Tumour progression and the nature of cancer. *Br J Cancer* 64, 631–644.
- 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.
- Coelho, S.G., Yin, L., Smuda, C., Mahns, A., Kolbe, L., and Hearing, V.J. (2015). Photobiological implications of melanin photoprotection after UVB-induced tanning of human skin but not UVA-induced tanning. *Pigment Cell Melanoma Res* 28, 210–216.
- Connolly, K.A., Belt, B.A., Figueroa, N.M., Murthy, A., Patel, A., Kim, M., Lord, E.M., Linehan, D.C., and Gerber, S.A. (2016). Increasing the efficacy of radiotherapy by modulating the CCR2/CCR5 chemokine axes. *Oncotarget* 7, 86522–86535.
- Conway, T.C. and Vergara Correa, I.A. (2017). (71) Applicant: International Business Machines Corporation, Armonk, NY (US) (72) Inventors: Thomas C . Conway, Heidelberg West. 16.
- Cooper, Z.A., Juneja, V.R., Sage, P.T., Frederick, D.T., Piris, A., Mitra, D., Lo, J.A., Hodi, F.S., Freeman, G.J., Bosenberg, M.W., et al. (2014). Response to BRAF Inhibition in Melanoma Is Enhanced When Combined with Immune Checkpoint Blockade. *Cancer Immunology Research* 2, 643–654.
- Covarrubias, A.J., Aksoylar, H.I., and Horng, T. (2015). Control of macrophage metabolism and activation by mTOR and Akt signaling. *Seminars in Immunology* 27, 286–296.
- Cuesta-Zuluaga, J. de la, Mueller, N.T., Corrales-Agudelo, V., Velásquez-Mejía, E.P., Carmona, J.A., Abad, J.M., and Escobar, J.S. (2017). Metformin Is Associated With Higher Relative Abundance of Mucin-Degrading Akkermansia muciniphila and Several Short-Chain Fatty Acid-Producing Microbiota in the Gut. *Diabetes Care* 40, 54–62.
- Curran, M.A., Montalvo, W., Yagita, H., and Allison, J.P. (2010). PD-1 and CTLA-4 combination blockade expands infiltrating T cells and reduces regulatory T and myeloid cells within B16 melanoma tumors. *PNAS* 107, 4275–4280.
- 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. *New England Journal of Medicine* 353, 2135–2147.
- Cymerman, R.M., Shao, Y., Wang, K., Zhang, Y., Murzaku, E.C., Penn, L.A., Osman, I., and Polsky, D. (2016). De Novo vs Nevus-Associated Melanomas: Differences in Associations With Prognostic Indicators and Survival. *J Natl Cancer Inst* 108.
- Czarnecka, A.M., Bartnik, E., Fiedorowicz, M., and Rutkowski, P. (2020). Targeted Therapy in Melanoma and Mechanisms of Resistance. *Int J Mol Sci* 21.
- Dagon, Y., Avraham, Y., and Berry, E.M. (2006). AMPK activation regulates apoptosis, adipogenesis, and lipolysis by eIF2alpha in adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 340, 43–47.
- Dai, X., Bu, X., Gao, Y., Guo, J., Hu, J., Jiang, C., Zhang, Z., Xu, K., Duan, J., He, S., et al. (2021). Energy status dictates PD-L1 protein abundance and anti-tumor immunity to enable checkpoint blockade. *Molecular Cell*.

- D'Alise, A.M., Leoni, G., Cotugno, G., Troise, F., Langone, F., Fichera, I., De Lucia, M., Avalle, L., Vitale, R., Leuzzi, A., et al. (2019). Adenoviral vaccine targeting multiple neoantigens as strategy to eradicate large tumors combined with checkpoint blockade. *Nature Communications* *10*, 2688.
- Damsky, W., and Bosenberg, M. (2017). Melanocytic nevi and melanoma: unraveling a complex relationship. *Oncogene* *36*, 5771–5792.
- Damsky, W.E., Theodosakis, N., and Bosenberg, M. (2014). Melanoma metastasis: new concepts and evolving paradigms. *Oncogene* *33*, 2413–2422.
- Dankort, D., Curley, D.P., Cartlidge, R.A., Nelson, B., Karnezis, A.N., Damsky, W.E., You, M.J., DePinho, R.A., McMahon, M., and Bosenberg, M. (2009). Braf(V600E) cooperates with Pten loss to induce metastatic melanoma. *Nat Genet* *41*, 544–552.
- Dantonio, P.M., Klein, M.O., Freire, M.R.V.B., Araujo, C.N., Chiacetti, A.C., and Correa, R.G. (2018). Exploring major signaling cascades in melanomagenesis: a rationale route for targeted skin cancer therapy. *Bioscience Reports* *38*, BSR20180511.
- Davezac, N., Baldin, V., Blot, J., Ducommun, B., and Tassan, J.-P. (2002). Human pEg3 kinase associates with and phosphorylates CDC25B phosphatase: a potential role for pEg3 in cell cycle regulation. *Oncogene* *21*, 7630–7641.
- DeBerardinis, R.J., and Chandel, N.S. (2016). Fundamentals of cancer metabolism. *Sci Adv* *2*.
- Dengler, F. (2020). Activation of AMPK under Hypoxia: Many Roads Leading to Rome. *Int J Mol Sci* *21*.
- Dennis, M.D., Coleman, C.S., Berg, A., Jefferson, L.S., and Kimball, S.R. (2014). REDD1 enhances protein phosphatase 2A-mediated dephosphorylation of Akt to repress mTORC1 signaling. *Sci Signal* *7*, ra68.
- Deschemin, J.-C., Foretz, M., Viollet, B., and Vaulont, S. (2017). AMPK is not required for the effect of metformin on the inhibition of BMP6-induced hepcidin gene expression in hepatocytes. *Scientific Reports* *7*, 12679.
- 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.
- DeYoung, M.P., Horak, P., Sofer, A., Sgroi, D., and Ellisen, L.W. (2008). Hypoxia regulates TSC1/2–mTOR signaling and tumor suppression through REDD1-mediated 14–3–3 shuttling. *Genes Dev.* *22*, 239–251.
- Dhawan, P., Singh, A.B., Ellis, D.L., and Richmond, A. (2002). Constitutive activation of Akt/protein kinase B in melanoma leads to up-regulation of nuclear factor-kappaB and tumor progression. *Cancer Res.* *62*, 7335–7342.
- Dimitriou, F., Krattinger, R., Rameyte, E., Barysch, M.J., Micalletto, S., Dummer, R., and Goldinger, S.M. (2018). The World of Melanoma: Epidemiologic, Genetic, and Anatomic Differences of Melanoma Across the Globe. *Curr Oncol Rep* *20*, 87.
- Ding, L., Liang, G., Yao, Z., Zhang, J., Liu, R., Chen, H., Zhou, Y., Wu, H., Yang, B., and He, Q. (2015). Metformin prevents cancer metastasis by inhibiting M2-like polarization of tumor associated macrophages. *Oncotarget* *6*, 36441–36455.
- Dong, H., Strome, S.E., Salomao, D.R., Tamura, H., Hirano, F., Flies, D.B., Roche, P.C., Lu, J., Zhu, G., Tamada, K., et al. (2002). Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: A potential mechanism of immune evasion. *Nature Medicine* *8*, 793–800.
- D'Orazio, J., Jarrett, S., Amaro-Ortiz, A., and Scott, T. (2013). UV Radiation and the Skin. *Int J Mol Sci* *14*, 12222–12248.
- Du, T., Qu, Y., Li, J., Li, H., Su, L., Zhou, Q., Yan, M., Li, C., Zhu, Z., and Liu, B. (2014). Maternal embryonic leucine zipper kinase enhances gastric cancer progression via the FAK/Paxillin pathway. *Mol Cancer* *13*, 100.

- Dudley, M.E., Wunderlich, J.R., Robbins, P.F., Yang, J.C., Hwu, P., Schwartzentruber, D.J., Topalian, S.L., Sherry, R., Restifo, N.P., Hübicki, A.M., et al. (2002). Cancer Regression and Autoimmunity in Patients After Clonal Repopulation with Antitumor Lymphocytes. *Science* 298, 850–854.
- Dulgar, O., Kutuk, T., and Eroglu, Z. (2021). Mechanisms of Resistance to BRAF-Targeted Melanoma Therapies. *Am J Clin Dermatol* 22, 1–10.
- Dummer, R., Ascierto, P.A., Gogas, H.J., Arance, A., Mandalà, M., Liszkay, 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. *The Lancet Oncology* 19, 603–615.
- Duraiswamy, J., Kaluza, K.M., Freeman, G.J., and Coukos, G. (2013). Dual Blockade of PD-1 and CTLA-4 Combined with Tumor Vaccine Effectively Restores T Cell Rejection Function in Tumors. *Cancer Res* 73, 3591–3603.
- Duran, A., Linares, J.F., Galvez, A.S., Wikenheiser, K., Flores, J.M., Diaz-Meco, M.T., and Moscat, J. (2008). The Signaling Adaptor p62 Is an Important NF- κ B Mediator in Tumorigenesis. *Cancer Cell* 13, 343–354.
- Egan, D.F., Shackelford, D.B., Mihaylova, M.M., Gelino, S., Kohnz, R.A., Mair, W., Vasquez, D.S., Joshi, A., Gwinn, D.M., Taylor, R., et al. (2011). Phosphorylation of ULK1 (hATG1) by AMP-activated protein kinase connects energy sensing to mitophagy. *Science* 331, 456–461.
- Eggermont, A.M.M., Chiarion-Sileni, V., Grob, J.-J., Dummer, R., Wolchok, J.D., Schmidt, H., Hamid, O., Robert, C., Ascierto, P.A., Richards, J.M., et al. (2015). Adjuvant ipilimumab versus placebo after complete resection of high-risk stage III melanoma (EORTC 18071): a randomised, double-blind, phase 3 trial. *The Lancet Oncology* 16, 522–530.
- Eikawa, S., Nishida, M., Mizukami, S., Yamazaki, C., Nakayama, E., and Udono, H. (2015). Immune-mediated antitumor effect by type 2 diabetes drug, metformin. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 112, 1809–1814.
- El-Deiry, W.S., Tokino, T., Velculescu, V.E., Levy, D.B., Parsons, R., Trent, J.M., Lin, D., Mercer, W.E., Kinzler, K.W., and Vogelstein, B. (1993). WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell* 75, 817–825.
- Elgendy, M., Cirò, M., Hosseini, A., Weiszmann, J., Mazzarella, L., Ferrari, E., Cazzoli, R., Curigliano, G., DeCensi, A., Bonanni, B., et al. (2019). Combination of Hypoglycemia and Metformin Impairs Tumor Metabolic Plasticity and Growth by Modulating the PP2A-GSK3 β -MCL-1 Axis. *Cancer Cell* 35, 798-815.e5.
- Ellis, L.M., and Hicklin, D.J. (2008). VEGF-targeted therapy: mechanisms of anti-tumour activity. *Nature Reviews Cancer* 8, 579–591.
- Ellisen, L.W., Ramsayer, K.D., Johannessen, C.M., Yang, A., Beppu, H., Minda, K., Oliner, J.D., McKeon, F., and Haber, D.A. (2002). REDD1, a Developmentally Regulated Transcriptional Target of p63 and p53, Links p63 to Regulation of Reactive Oxygen Species. *Molecular Cell* 10, 995–1005.
- El-Mir, M.-Y., Nogueira, V., Fontaine, E., Avéret, N., Rigoulet, M., and Leverve, X. (2000). Dimethylbiguanide Inhibits Cell Respiration via an Indirect Effect Targeted on the Respiratory Chain Complex I*. *Journal of Biological Chemistry* 275, 223–228.
- Erdag, G., Schaefer, J.T., Smolkin, M.E., Deacon, D.H., Shea, S.M., Dengel, L.T., Patterson, J.W., and Slingluff, C.L. (2012). Immunotype and Immunohistologic Characteristics of Tumor Infiltrating Immune Cells are Associated with Clinical Outcome in Metastatic Melanoma. *Cancer Res* 72, 1070–1080.
- Evans, J.M.M., Donnelly, L.A., Emslie-Smith, A.M., Alessi, D.R., and Morris, A.D. (2005). Metformin and reduced risk of cancer in diabetic patients. *BMJ* 330, 1304–1305.
- Exley, M.A., Friedlander, P., Alatrakchi, N., Vriend, L., Yue, S., Sasada, T., Zeng, W., Mizukami, Y., Clark, J., Nemer, D., et al. (2017). Adoptive Transfer of Invariant NKT Cells as Immunotherapy for Advanced Melanoma: A Phase I Clinical Trial. *Clin Cancer Res* 23, 3510–3519.
- Fan, Y., Chiu, J.-F., Liu, J., Deng, Y., Xu, C., Zhang, J., and Li, G. (2018). Resveratrol induces autophagy-dependent apoptosis in HL-60 cells. *BMC Cancer* 18, 581.

- Fattore, L., Ruggiero, C.F., Liguoro, D., Mancini, R., and Ciliberto, G. (2019). Single cell analysis to dissect molecular heterogeneity and disease evolution in metastatic melanoma. *Cell Death & Disease* *10*, 1–12.
- Faubert, B., Boily, G., Izreig, S., Griss, T., Samborska, B., Dong, Z., Dupuy, F., Chambers, C., Fuerth, B.J., Viollet, B., et al. (2013). AMPK Is a Negative Regulator of the Warburg Effect and Suppresses Tumor Growth In Vivo. *Cell Metabolism* *17*, 113–124.
- Fenner, J., and Clark, R.A.F. (2016). Chapter 1 - Anatomy, Physiology, Histology, and Immunohistochemistry of Human Skin. In *Skin Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, M.Z. Albanna, and J.H. Holmes IV, eds. (Boston: Academic Press), pp. 1–17.
- Fitzpatrick, T.B. (1988). The Validity and Practicality of Sun-Reactive Skin Types I Through VI. *Arch Dermatol* *124*, 869–871.
- Fleming, V., Hu, X., Weber, R., Nagibin, V., Groth, C., Altevogt, P., Utikal, J., and Umansky, V. (2018). Targeting Myeloid-Derived Suppressor Cells to Bypass Tumor-Induced Immunosuppression. *Front Immunol* *9*.
- Fogarty, S., Ross, F.A., Ciruelos, D.V., Gray, A., Gowans, G.J., and Hardie, D.G. (2016). AMPK Causes Cell Cycle Arrest in LKB1-Deficient Cells via Activation of CAMKK2. *Mol Cancer Res* *14*, 683–695.
- Foltyn, M., Luger, A.-L., Lorenz, N.I., Sauer, B., Mittelbronn, M., Harter, P.N., Steinbach, J.P., and Ronellenfitsch, M.W. (2019). The physiological mTOR complex 1 inhibitor DDIT4 mediates therapy resistance in glioblastoma. *British Journal of Cancer* *120*, 481–487.
- Fontaine, E. (2018). Metformin-Induced Mitochondrial Complex I Inhibition: Facts, Uncertainties, and Consequences. *Front. Endocrinol.* *9*.
- Foretz, M., and Viollet, B. (2014). Les nouvelles promesses de la metformine - Vers une meilleure compréhension de ses mécanismes d'action. *Med Sci (Paris)* *30*, 82–92.
- Foretz, M., Hébrard, S., Leclerc, J., Zarrinpashneh, E., Soty, M., Mithieux, G., Sakamoto, K., Andreelli, F., and Viollet, B. (2010). Metformin inhibits hepatic gluconeogenesis in mice independently of the LKB1/AMPK pathway via a decrease in hepatic energy state. *J Clin Invest* *120*, 2355–2369.
- Fourcade, J., Sun, Z., Pagliano, O., Guillaume, P., Luescher, I.F., Sander, C., Kirkwood, J.M., Olive, D., Kuchroo, V., and Zarour, H.M. (2012). CD8+ T Cells Specific for Tumor Antigens Can Be Rendered Dysfunctional by the Tumor Microenvironment through Upregulation of the Inhibitory Receptors BTLA and PD-1. *Cancer Res* *72*, 887–896.
- Franklin, C., Livingstone, E., Roesch, A., Schilling, B., and Schadendorf, D. (2017). Immunotherapy in melanoma: Recent advances and future directions. *European Journal of Surgical Oncology (EJSO)* *43*, 604–611.
- Fridlender, Z.G., Sun, J., Kim, S., Kapoor, V., Cheng, G., Ling, L., Worthen, G.S., and Albelda, S.M. (2009). Polarization of Tumor-Associated Neutrophil (TAN) Phenotype by TGF- β : “N1” versus “N2” TAN. *Cancer Cell* *16*, 183–194.
- Fu, Z., and Tindall, D.J. (2008). FOXOs, cancer and regulation of apoptosis. *Oncogene* *27*, 2312–2319.
- Fullerton, M.D., Galic, S., Marcinko, K., Sikkema, S., Pulinilkunnil, T., Chen, Z.-P., O'Neill, H.M., Ford, R.J., Palanivel, R., O'Brien, M., et al. (2013). Single phosphorylation sites in Acc1 and Acc2 regulate lipid homeostasis and the insulin-sensitizing effects of metformin. *Nature Medicine* *19*, 1649–1654.
- Galluzzi, L., Vitale, I., Warren, S., Adjemian, S., Agostinis, P., Martinez, A.B., Chan, T.A., Coukos, G., Demaria, S., Deutsch, E., et al. (2020). Consensus guidelines for the definition, detection and interpretation of immunogenic cell death. *J Immunother Cancer* *8*, e000337.
- Galvani, E., Mundra, P.A., Valpione, S., Garcia-Martinez, P., Smith, M., Greenall, J., Thakur, R., Helmink, B., Andrews, M.C., Boon, L., et al. (2020). Stroma remodeling and reduced cell division define durable response to PD-1 blockade in melanoma. *Nature Communications* *11*, 853.

- 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. *European Journal of Cancer* *41*, 28–44.
- Gao, C., Wang, R., Li, B., Guo, Y., Yin, T., Xia, Y., Zhang, F., Lian, K., Liu, Y., Wang, H., et al. (2020). TXNIP/Redd1 signalling and excessive autophagy: a novel mechanism of myocardial ischaemia/reperfusion injury in mice. *Cardiovascular Research* *116*, 645–657.
- Gao, C.E., Zhang, M., Song, Q., and Dong, J. (2019). PD-1 inhibitors dependent CD8+ T cells inhibit mouse colon cancer cell metastasis. *Onco Targets Ther* *12*, 6961–6971.
- Gao, J., Shi, L.Z., Zhao, H., Chen, J., Xiong, L., He, Q., Chen, T., Roszik, J., Bernatchez, C., Woodman, S.E., et al. (2016). Loss of IFN- γ Pathway Genes in Tumor Cells as a Mechanism of Resistance to Anti-CTLA-4 Therapy. *Cell* *167*, 397–404.e9.
- Garbe, C., Peris, K., Hauschild, A., Saiag, P., Middleton, M., Bastholt, L., Grob, J.-J., Malvehy, J., Newton-Bishop, J., Stratigos, A.J., et al. (2016). Diagnosis and treatment of melanoma. European consensus-based interdisciplinary guideline – Update 2016. *European Journal of Cancer* *63*, 201–217.
- Garbe, C., Amaral, T., Peris, K., Hauschild, A., Arenberger, P., Bastholt, L., Bataille, V., del Marmol, V., Dréno, B., Fargnoli, M.C., et al. (2020). European consensus-based interdisciplinary guideline for melanoma. Part 1: Diagnostics – Update 2019. *European Journal of Cancer* *126*, 141–158.
- Gattinoni, L., Klebanoff, C.A., Palmer, D.C., Wrzesinski, C., Kerstann, K., Yu, Z., Finkelstein, S.E., Theoret, M.R., Rosenberg, S.A., and Restifo, N.P. (2005). Acquisition of full effector function in vitro paradoxically impairs the in vivo antitumor efficacy of adoptively transferred CD8⁺ T cells. *J Clin Invest* *115*, 1616–1626.
- Gautier, E.L., Shay, T., Miller, J., Greter, M., Jakubzick, C., Ivanov, S., Helft, J., Chow, A., Elpek, K.G., Gordonov, S., et al. (2012). Gene-expression profiles and transcriptional regulatory pathways that underlie the identity and diversity of mouse tissue macrophages. *Nature Immunology* *13*, 1118–1128.
- Gaziel-Sovran, A., Segura, M.F., Di Micco, R., Collins, M.K., Hanniford, D., de Miera, E.V.-S., Rakus, J.F., Dankert, J.F., Shang, S., Kerbel, R.S., et al. (2011). MiR-30b/30d regulation of GalNAc transferases enhances invasion and immunosuppression during metastasis. *Cancer Cell* *20*, 104–118.
- Ghiasvand, R., Rueegg, C.S., Weiderpass, E., Green, A.C., Lund, E., and Veierød, M.B. (2017). Indoor Tanning and Melanoma Risk: Long-Term Evidence From a Prospective Population-Based Cohort Study. *Am. J. Epidemiol.* *185*, 147–156.
- Gil, M., Yang, Y., Lee, Y., Choi, I., and Ha, H. (1997). Cloning and expression of a cDNA encoding a novel protein serine/threonine kinase predominantly expressed in hematopoietic cells. *Gene* *195*, 295–301.
- Giovannucci, E., Harlan, D.M., Archer, M.C., Bergenstal, R.M., Gapstur, S.M., Habel, L.A., Pollak, M., Regensteiner, J.G., and Yee, D. (2010). Diabetes and Cancer. *Diabetes Care* *33*, 1674–1685.
- Giuliano, C.J., Lin, A., Smith, J.C., Palladino, A.C., and Sheltzer, J.M. (2018). MELK expression correlates with tumor mitotic activity but is not required for cancer growth. *ELife* *7*, e32838.
- Gopalakrishnan, V., Spencer, C.N., Nezi, L., Reuben, A., Andrews, M.C., Karpinets, T.V., Prieto, P.A., Vicente, D., Hoffman, K., Wei, S.C., et al. (2018). Gut microbiome modulates response to anti-PD-1 immunotherapy in melanoma patients. *Science* *359*, 97–103.
- Gothié, E., and Pouyssegur, J. (2002). HIF-1 : régulateur central de l’hypoxie. *Med Sci (Paris)* *18*, 70–78.
- Gowans, G.J., Hawley, S.A., Ross, F.A., and Hardie, D.G. (2013). AMP Is a True Physiological Regulator of AMP-Activated Protein Kinase by Both Allosteric Activation and Enhancing Net Phosphorylation. *Cell Metabolism* *18*, 556–566.

- Gray, D., Jubb, A.M., Hogue, D., Dowd, P., Kljavin, N., Yi, S., Bai, W., Frantz, G., Zhang, Z., Koeppen, H., et al. (2005). Maternal embryonic leucine zipper kinase/murine protein serine-threonine kinase 38 is a promising therapeutic target for multiple cancers. *Cancer Res* 65, 9751–9761.
- Green, D.R. (1998). Apoptotic Pathways: The Roads to Ruin. *Cell* 94, 695–698.
- Grzywa, T.M., Paskal, W., and Włodarski, P.K. (2017). Intratumor and Intertumor Heterogeneity in Melanoma. *Transl Oncol* 10, 956–975.
- Gubin, M.M., Zhang, X., Schuster, H., Caron, E., Ward, J.P., Noguchi, T., Ivanova, Y., Hundal, J., Arthur, C.D., Krebber, W.-J., et al. (2014). Checkpoint blockade cancer immunotherapy targets tumour-specific mutant antigens. *Nature* 515, 577–581.
- Guerra, L., Bonetti, L., and Brenner, D. (2020). Metabolic Modulation of Immunity: A New Concept in Cancer Immunotherapy. *Cell Reports* 32, 107848.
- Guigas, B., and Viollet, B. (2016). Targeting AMPK: From Ancient Drugs to New Small-Molecule Activators. *Exp Suppl* 107, 327–350.
- Guo, D., Lui, G.Y.L., Lai, S.L., Wilmott, J.S., Tikoo, S., Jckett, L.A., Quek, C., Brown, D.L., Sharp, D.M., Kwan, R.Y.Q., et al. (2019). RAB27A promotes melanoma cell invasion and metastasis via regulation of pro-invasive exosomes. *International Journal of Cancer* 144, 3070–3085.
- Gwinn, D.M., Shackelford, D.B., Egan, D.F., Mihaylova, M.M., Mery, A., Vasquez, D.S., Turk, B.E., and Shaw, R.J. (2008). AMPK Phosphorylation of Raptor Mediates a Metabolic Checkpoint. *Molecular Cell* 30, 214–226.
- Habets, D.D.J., Coumans, W.A., El Hasnaoui, M., Zarrinpashneh, E., Bertrand, L., Viollet, B., Kiens, B., Jensen, T.E., Richter, E.A., Bonen, A., et al. (2009). Crucial role for LKB1 to AMPK α 2 axis in the regulation of CD36-mediated long-chain fatty acid uptake into cardiomyocytes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* 1791, 212–219.
- Haenssle, H.A., Mograby, N., Ngassa, A., Buhl, T., Emmert, S., Schön, M.P., Rosenberger, A., and Bertsch, H.P. (2016). Association of Patient Risk Factors and Frequency of Nevus-Associated Cutaneous Melanomas. *JAMA Dermatol* 152, 291–298.
- Hardie, D.G. (2011). Why Starving Cells Eat Themselves. *Science* 331, 410–411.
- Hardie, D.G. (2018). Keeping the home fires burning†: AMP-activated protein kinase. *Journal of The Royal Society Interface* 15, 20170774.
- Hardie, D.G., Schaffer, B.E., and Brunet, A. (2016). AMPK: An Energy-Sensing Pathway with Multiple Inputs and Outputs. *Trends in Cell Biology* 26, 190–201.
- Harlin, H., Meng, Y., Peterson, A.C., Zha, Y., Tretiakova, M., Slingluff, C., McKee, M., and Gajewski, T.F. (2009). Chemokine Expression in Melanoma Metastases Associated with CD8+ T-Cell Recruitment. *Cancer Res* 69.
- Harper, W.J., Adami, G.R., Wei, N., Keyomarsi, K., and Elledge, S.J. (1993). The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell* 75, 805–816.
- Hart, I.R., and Fidler, I.J. (1980). Role of Organ Selectivity in the Determination of Metastatic Patterns of B16 Melanoma. *Cancer Res* 40, 2281–2287.
- 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.
- Hawley, S.A., Selbert, M.A., Goldstein, E.G., Edelman, A.M., Carling, D., and Hardie, D.G. (1995). 5'-AMP Activates the AMP-activated Protein Kinase Cascade, and Ca²⁺/Calmodulin Activates the Calmodulin-dependent Protein Kinase I Cascade, via Three Independent Mechanisms (*). *Journal of Biological Chemistry* 270, 27186–27191.

- Hawley, S.A., Boudeau, J., Reid, J.L., Mustard, K.J., Udd, L., Mäkelä, T.P., Alessi, D.R., and Hardie, D.G. (2003). Complexes between the LKB1 tumor suppressor, STRADA β and MO25 α/β are upstream kinases in the AMP-activated protein kinase cascade. *Journal of Biology* 2, 28.
- Hayward, N.K. (2003). Genetics of melanoma predisposition. *Oncogene* 22, 3053–3062.
- Hebbard, L.W., Maurer, J., Miller, A., Lesperance, J., Hassell, J., Oshima, R.G., and Terskikh, A.V. (2010). Maternal Embryonic Leucine Zipper Kinase Is Upregulated and Required in Mammary Tumor-Initiating Cells In vivo. *Cancer Res* 70, 8863–8873.
- Héninger, E., Krueger, T.E.G., and Lang, J.M. (2015). Augmenting Antitumor Immune Responses with Epigenetic Modifying Agents. *Front. Immunol.* 6.
- Henke, E., Nandigama, R., and Ergün, S. (2020). Extracellular Matrix in the Tumor Microenvironment and Its Impact on Cancer Therapy. *Front Mol Biosci* 6.
- Hermeking, H., Lengauer, C., Polyak, K., He, T.-C., Zhang, L., Thiagalingam, S., Kinzler, K.W., and Vogelstein, B. (1997). 14-3-3 σ Is a p53-Regulated Inhibitor of G2/M Progression. *Molecular Cell* 1, 3–11.
- Heyer, B.S., Warsowe, J., Solter, D., Knowles, B.B., and Ackerman, S.L. (1997). New member of the Snf1/AMPK kinase family, Melk, is expressed in the mouse egg and preimplantation embryo. *Mol Reprod Dev* 47, 148–156.
- Heyer, B.S., Kochanowski, H., and Solter, D. (1999). Expression of Melk, a new protein kinase, during early mouse development. *Developmental Dynamics* 215, 344–351.
- Hientz, K., Mohr, A., Bhakta-Guha, D., and Efferth, T. (2016). The role of p53 in cancer drug resistance and targeted chemotherapy. *Oncotarget* 8, 8921–8946.
- Hirsch, H.A., Iliopoulos, D., and Struhl, K. (2013). Metformin inhibits the inflammatory response associated with cellular transformation and cancer stem cell growth. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110, 972–977.
- Hock, A.K., Vigneron, A.M., Carter, S., Ludwig, R.L., and Vousden, K.H. (2011). Regulation of p53 stability and function by the deubiquitinating enzyme USP42. *EMBO J* 30, 4921–4930.
- Hodi, F.S., O'Day, S.J., McDermott, D.F., Weber, R.W., Sosman, J.A., Haanen, J.B., Gonzalez, R., Robert, C., Schadendorf, D., Hassel, J.C., et al. (2010). Improved Survival with Ipilimumab in Patients with Metastatic Melanoma. *New England Journal of Medicine* 363, 711–723.
- Hodis, E., Watson, I.R., Kryukov, G.V., Arold, S.T., Imielinski, M., Theurillat, J.-P., Nickerson, E., Auclair, D., Li, L., Place, C., et al. (2012). A Landscape of Driver Mutations in Melanoma. *Cell* 150, 251–263.
- Holloway, S., and Jones, V. (2005). The importance of skin care and assessment. *Br J Nurs* 14, 1172–1176.
- Hölzel, M., Bovier, A., and Tüting, T. (2013). Plasticity of tumour and immune cells: a source of heterogeneity and a cause for therapy resistance? *Nature Reviews Cancer* 13, 365–376.
- Honda, R., Tanaka, H., and Yasuda, H. (1997). Oncoprotein MDM2 is a ubiquitin ligase E3 for tumor suppressor p53. *FEBS Letters* 420, 25–27.
- Hong, M., Clubb, J.D., and Chen, Y.Y. (2020). Engineering CAR-T Cells for Next-Generation Cancer Therapy. *Cancer Cell* 38, 473–488.
- Horak, P., Crawford, A.R., Vadysirisack, D.D., Nash, Z.M., DeYoung, M.P., Sgroi, D., and Ellisen, L.W. (2010). Negative feedback control of HIF-1 through REDD1-regulated ROS suppresses tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 4675–4680.
- Hörhold, F., Eisel, D., Oswald, M., Kolte, A., Röhl, D., Osen, W., Eichmüller, S.B., and König, R. (2020). Reprogramming of macrophages employing gene regulatory and metabolic network models. *PLOS Computational Biology* 16, e1007657.

- Horman, S., Browne, G., Krause, U., Patel, J., Vertommen, D., Bertrand, L., Lavoigne, A., Hue, L., Proud, C., and Rider, M. (2002). Activation of AMP-activated protein kinase leads to the phosphorylation of elongation factor 2 and an inhibition of protein synthesis. *Curr Biol* *12*, 1419–1423.
- Hossain, F., Al-Khami, A.A., Wyczechowska, D., Hernandez, C., Zheng, L., Reiss, K., Valle, L.D., Trillo-Tinoco, J., Maj, T., Zou, W., et al. (2015). Inhibition of Fatty Acid Oxidation Modulates Immunosuppressive Functions of Myeloid-Derived Suppressor Cells and Enhances Cancer Therapies. *Cancer Immunol Res* *3*, 1236–1247.
- Hou, A., Hou, K., Huang, Q., Lei, Y., and Chen, W. (2020). Targeting Myeloid-Derived Suppressor Cell, a Promising Strategy to Overcome Resistance to Immune Checkpoint Inhibitors. *Front Immunol* *11*.
- Hou, X., Yang, S., and Yin, J. (2018). Blocking the REDD1/TXNIP axis ameliorates LPS-induced vascular endothelial cell injury through repressing oxidative stress and apoptosis. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* *316*, C104–C110.
- Hu, W., Li, X., Zhang, C., Yang, Y., Jiang, J., and Wu, C. (2016). Tumor-associated macrophages in cancers. *Clin Transl Oncol* *18*, 251–258.
- Huang, W., and Racioppi, L. (2018). Calcium Calmodulin Kinase Kinase 2. *Encyclopedia of Signaling Molecules* 655–661.
- Huang, F., Goncalves, C., Bartish, M., Rémy-Sarrazin, J., Issa, M.E., Cordeiro, B., Guo, Q., Emond, A., Attias, M., Yang, W., et al. (2021). Inhibiting the MNK1/2-eIF4E axis impairs melanoma phenotype switching and potentiates anti-tumor immune responses (American Society for Clinical Investigation).
- Huang, H.-T., Seo, H.-S., Zhang, T., Wang, Y., Jiang, B., Li, Q., Buckley, D.L., Nabet, B., Roberts, J.M., Paulk, J., et al. (2017). MELK is not necessary for the proliferation of basal-like breast cancer cells. *Elife* *6*.
- Huang, S.C.-C., Everts, B., Ivanova, Y., O’Sullivan, D., Nascimento, M., Smith, A.M., Beatty, W., Love-Gregory, L., Lam, W.Y., O’Neill, C.M., et al. (2014). Cell-intrinsic lysosomal lipolysis is essential for alternative activation of macrophages. *Nature Immunology* *15*, 846–855.
- Huang, S.C.-C., Smith, A.M., Everts, B., Colonna, M., Pearce, E.L., Schilling, J.D., and Pearce, E.J. (2016). Metabolic Reprogramming Mediated by the mTORC2-IRF4 Signaling Axis Is Essential for Macrophage Alternative Activation. *Immunity* *45*, 817–830.
- Huber, V., Vallacchi, V., Fleming, V., Hu, X., Cova, A., Dugo, M., Shahaj, E., Sulsenti, R., Vergani, E., Filipazzi, P., et al. (2018). Tumor-derived microRNAs induce myeloid suppressor cells and predict immunotherapy resistance in melanoma. *J Clin Invest* *128*, 5505–5516.
- Hugo, W., Zaretsky, J.M., Sun, L., Song, C., Moreno, B.H., Hu-Lieskovan, S., Berent-Maoz, B., Pang, J., Chmielowski, B., Cherry, G., et al. (2016). Genomic and Transcriptomic Features of Response to Anti-PD-1 Therapy in Metastatic Melanoma. *Cell* *165*, 35–44.
- Hu-Lieskovan, S., Mok, S., Moreno, B.H., Tsoi, J., Robert, L., Goedert, L., Pinheiro, E.M., Koya, R.C., Graeber, T.G., Comin-Anduix, B., et al. (2015). Improved antitumor activity of immunotherapy with BRAF and MEK inhibitors in BRAFV600E melanoma. *Science Translational Medicine* *7*, 279ra41-279ra41.
- Hwang, J.-T., Kwak, D.W., Lin, S.K., Kim, H.M., Kim, Y.M., and Park, O.J. (2007). Resveratrol Induces Apoptosis in Chemoresistant Cancer Cells via Modulation of AMPK Signaling Pathway. *Annals of the New York Academy of Sciences* *1095*, 441–448.
- Ichim, G., and Tait, S.W.G. (2016). A fate worse than death: apoptosis as an oncogenic process. *Nature Reviews Cancer* *16*, 539–548.
- Ikhlas, S., and Ahmad, M. (2017). Metformin: Insights into its anticancer potential with special reference to AMPK dependent and independent pathways. *Life Sciences* *185*, 53–62.

- Imamura, K., Ogura, T., Kishimoto, A., Kaminishi, M., and Esumi, H. (2001). Cell Cycle Regulation via p53 Phosphorylation by a 5'-AMP Activated Protein Kinase Activator, 5-Aminoimidazole-4-Carboxamide-1- β -d-Ribofuranoside, in a Human Hepatocellular Carcinoma Cell Line. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 287, 562–567.
- Incio, J., Tam, J., Rahbari, N.N., Suboj, P., McManus, D.T., Chin, S.M., Vardam, T.D., Batista, A., Babykutty, S., Jung, K., et al. (2016). PIGF/VEGFR-1 Signaling Promotes Macrophage Polarization and Accelerated Tumor Progression in Obesity. *Clin Cancer Res* 22, 2993–3004.
- Inoki, K., Zhu, T., and Guan, K.-L. (2003). TSC2 Mediates Cellular Energy Response to Control Cell Growth and Survival. *Cell* 115, 577–590.
- Ip, W.K.E., Hoshi, N., Shouval, D.S., Snapper, S., and Medzhitov, R. (2017). Anti-inflammatory effect of IL-10 mediated by metabolic reprogramming of macrophages. *Science* 356, 513–519.
- Itakura, E., Huang, R.-R., Wen, D.-R., Paul, E., Wunsch, P.H., and Cochran, A.J. (2011). IL-10 expression by primary tumor cells correlates with melanoma progression from radial to vertical growth phase and development of metastatic competence. *Mod Pathol* 24, 801–809.
- Jackett, L.A., and Scolyer, R.A. (2019). A Review of Key Biological and Molecular Events Underpinning Transformation of Melanocytes to Primary and Metastatic Melanoma. *Cancers* 11, 2041.
- Jacobs, J.F., Nierkens, S., Figdor, C.G., de Vries, I.J.M., and Adema, G.J. (2012). Regulatory T cells in melanoma: the final hurdle towards effective immunotherapy? *The Lancet Oncology* 13, e32–e42.
- Jäger, S., Bucci, C., Tanida, I., Ueno, T., Kominami, E., Saftig, P., and Eskelinen, E.-L. (2004). Role for Rab7 in maturation of late autophagic vacuoles. *Journal of Cell Science* 117, 4837–4848.
- Jang, M., Park, R., Kim, H., Namkoong, S., Jo, D., Huh, Y.H., Jang, I.-S., Lee, J.I., and Park, J. (2018). AMPK contributes to autophagosome maturation and lysosomal fusion. *Scientific Reports* 8, 12637.
- Janjetovic, K., Harhaji-Trajkovic, L., Misirkic-Marjanovic, M., Vucicevic, L., Stevanovic, D., Zogovic, N., Sumarac-Dumanovic, M., Micic, D., and Trajkovic, V. (2011). In vitro and in vivo anti-melanoma action of metformin. *European Journal of Pharmacology* 668, 373–382.
- Janostiak, R., Rauniyar, N., Lam, T.T., Ou, J., Zhu, L.J., Green, M.R., and Wajapeyee, N. (2017). MELK Promotes Melanoma Growth by Stimulating the NF- κ B Pathway. *Cell Reports* 21, 2829–2841.
- Jaune, E., Cavazza, E., Ronco, C., Grytsai, O., Abbe, P., Tekaya, N., Zerhouni, M., Beranger, G., Kaminski, L., Bost, F., et al. (2021). Discovery of a new molecule inducing melanoma cell death: dual AMPK/MELK targeting for novel melanoma therapies. *Cell Death & Disease* 12, 1–20.
- Javelaud, D., Alexaki, V.-I., and Mauviel, A. (2008). Transforming growth factor- β in cutaneous melanoma. *Pigment Cell & Melanoma Research* 21, 123–132.
- Jenkinson, E.J., Van Ewijk, W., and Owen, J.J. (1981). Major histocompatibility complex antigen expression on the epithelium of the developing thymus in normal and nude mice. *J Exp Med* 153, 280–292.
- Ji, W., Arnst, C., Tipton, A.R., Bekier, M.E., Taylor, W.R., Yen, T.J., and Liu, S.-T. (2016). OTSSP167 Abrogates Mitotic Checkpoint through Inhibiting Multiple Mitotic Kinases. *PLoS One* 11, e0153518.
- Jia, D., Park, J.H., Jung, K.H., Levine, H., and Kaiparettu, B.A. (2018). Elucidating the Metabolic Plasticity of Cancer: Mitochondrial Reprogramming and Hybrid Metabolic States. *Cells* 7.
- Jia, D., Lu, M., Jung, K.H., Park, J.H., Yu, L., Onuchic, J.N., Kaiparettu, B.A., and Levine, H. (2019). Elucidating cancer metabolic plasticity by coupling gene regulation with metabolic pathways. *PNAS* 116, 3909–3918.
- Jin, M.-Z., and Jin, W.-L. (2020). The updated landscape of tumor microenvironment and drug repurposing. *Signal Transduction and Targeted Therapy* 5, 1–16.

- Jin, H.-O., Seo, S.-K., Kim, Y.-S., Woo, S.-H., Lee, K.-H., Yi, J.-Y., Lee, S.-J., Choe, T.-B., Lee, J.-H., An, S., et al. (2011). TXNIP potentiates Redd1-induced mTOR suppression through stabilization of Redd1. *Oncogene* *30*, 3792–3801.
- Jin, H.-O., Hong, S.-E., Kim, J.-H., Choi, H.-N., Kim, K., An, S., Choe, T.-B., Hwang, C.-S., Lee, J.-H., Kim, J.-I., et al. (2013). Sustained overexpression of Redd1 leads to Akt activation involved in cell survival. *Cancer Letters* *336*, 319–324.
- Jin, H.-T., Anderson, A.C., Tan, W.G., West, E.E., Ha, S.-J., Araki, K., Freeman, G.J., Kuchroo, V.K., and Ahmed, R. (2010). Cooperation of Tim-3 and PD-1 in CD8 T-cell exhaustion during chronic viral infection. *PNAS* *107*, 14733–14738.
- Jing, Y., Wu, F., Li, D., Yang, L., Li, Q., and Li, R. (2018). Metformin improves obesity-associated inflammation by altering macrophages polarization. *Mol Cell Endocrinol* *461*, 256–264.
- Johanns, M., Pyrdit Ruys, S., Houddane, A., Vertommen, D., Herinckx, G., Hue, L., Proud, C.G., and Rider, M.H. (2017). Direct and indirect activation of eukaryotic elongation factor 2 kinase by AMP-activated protein kinase. *Cellular Signalling* *36*, 212–221.
- Johnson, L.A., Morgan, R.A., Dudley, M.E., Cassard, L., Yang, J.C., Hughes, M.S., Kammula, U.S., Royal, R.E., Sherry, R.M., Wunderlich, J.R., et al. (2009). Gene therapy with human and mouse T-cell receptors mediates cancer regression and targets normal tissues expressing cognate antigen. *Blood* *114*, 535–546.
- Joller, N., Hafler, J.P., Brynedal, B., Kassam, N., Spoerl, S., Levin, S.D., Sharpe, A.H., and Kuchroo, V.K. (2011). Cutting Edge: TIGIT Has T Cell-Intrinsic Inhibitory Functions. *The Journal of Immunology* *186*, 1338–1342.
- Jones, A.E., Sheng, L., Acevedo, A., Veliova, M., Shirihai, O.S., Stiles, L., and Divakaruni, A.S. (2020). Forces, fluxes, and fuels: tracking mitochondrial metabolism by integrating measurements of membrane potential, respiration, and metabolites. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* *320*, C80–C91.
- Joshi, K., Banasavadi-Siddegowda, Y., Mo, X., Kim, S.-H., Mao, P., Kig, C., Nardini, D., Sobol, R.W., Chow, L.M.L., Kornblum, H.I., et al. (2013). MELK-Dependent FOXM1 Phosphorylation is Essential for Proliferation of Glioma Stem Cells. *STEM CELLS* *31*, 1051–1063.
- Jung, H., Seong, H.-A., and Ha, H. (2008a). Murine Protein Serine/Threonine Kinase 38 Activates Apoptosis Signal-regulating Kinase 1 via Thr838 Phosphorylation*. *Journal of Biological Chemistry* *283*, 34541–34553.
- Jung, S.-N., Yang, W.K., Kim, J., Kim, H.S., Kim, E.J., Yun, H., Park, H., Kim, S.S., Choe, W., Kang, I., et al. (2008b). Reactive oxygen species stabilize hypoxia-inducible factor-1 alpha protein and stimulate transcriptional activity via AMP-activated protein kinase in DU145 human prostate cancer cells. *Carcinogenesis* *29*, 713–721.
- Kalender, A., Selvaraj, A., Kim, S.Y., Gulati, P., Brûlé, S., Viollet, B., Kemp, B.E., Bardeesy, N., Dennis, P., Schlager, J.J., et al. (2010). Metformin, Independent of AMPK, Inhibits mTORC1 in a Rag GTPase-Dependent Manner. *Cell Metabolism* *11*, 390–401.
- Kaneda, M.M., Messer, K.S., Ralainirina, N., Li, H., Leem, C.J., Gorjestani, S., Woo, G., Nguyen, A.V., Figueiredo, C.C., Foubert, P., et al. (2016a). PI3K γ is a molecular switch that controls immune suppression. *Nature* *539*, 437–442.
- Kaneda, M.M., Cappello, P., Nguyen, A.V., Ralainirina, N., Hardamon, C.R., Foubert, P., Schmid, M.C., Sun, P., Mose, E., Bouvet, M., et al. (2016b). Macrophage PI3K γ Drives Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Progression. *Cancer Discov* *6*, 870–885.
- Kastan, M.B., Zhan, Q., el-Deiry, W.S., Carrier, F., Jacks, T., Walsh, W.V., Plunkett, B.S., Vogelstein, B., and Fornace, A.J. (1992). A mammalian cell cycle checkpoint pathway utilizing p53 and GADD45 is defective in ataxia-telangiectasia. *Cell* *71*, 587–597.
- Katiyar, S., Liu, E., Knutzen, C.A., Lang, E.S., Lombardo, C.R., Sankar, S., Toth, J.I., Petroski, M.D., Ronai, Z., and Chiang, G.G. (2009). REDD1, an inhibitor of mTOR signalling, is regulated by the CUL4A–DDB1 ubiquitin ligase. *EMBO Reports* *10*, 866–872.

- Kelly, B., Tannahill, G.M., Murphy, M.P., and O'Neill, L.A.J. (2015). Metformin Inhibits the Production of Reactive Oxygen Species from NADH:Ubiquinone Oxidoreductase to Limit Induction of Interleukin-1 β (IL-1 β) and Boosts Interleukin-10 (IL-10) in Lipopolysaccharide (LPS)-activated Macrophages. *J Biol Chem* 290, 20348–20359.
- Kepp, O., Senovilla, L., Vitale, I., Vacchelli, E., Adjemian, S., Agostinis, P., Apetoh, L., Aranda, F., Barnaba, V., Bloy, N., et al. (2014). Consensus guidelines for the detection of immunogenic cell death. *Oncoimmunology* 3.
- Kerr, J.F.R., Wyllie, A.H., and Currie, A.R. (1972). Apoptosis: A Basic Biological Phenomenon with Wide-ranging Implications in Tissue Kinetics. *Br J Cancer* 26, 239–257.
- Kim, M.P., and Lozano, G. (2018). Mutant p53 partners in crime. *Cell Death & Differentiation* 25, 161–168.
- Kim, H.J., Lee, S., Chun, K.H., Jeon, J.Y., Han, S.J., Kim, D.J., Kim, Y.S., Woo, J.-T., Nam, M.-S., Baik, S.H., et al. (2018). Metformin reduces the risk of cancer in patients with type 2 diabetes: An analysis based on the Korean National Diabetes Program Cohort. *Medicine* 97, e0036.
- Kim, J., Kundu, M., Viollet, B., and Guan, K.-L. (2011). AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. *Nature Cell Biology* 13, 132–141.
- Kim, J., Kim, Y.C., Fang, C., Russell, R.C., Kim, J.H., Fan, W., Liu, R., Zhong, Q., and Guan, K.-L. (2013). Differential regulation of distinct Vps34 complexes by AMPK in nutrient stress and autophagy. *Cell* 152, 290–303.
- Kim, J., Kwak, H.J., Cha, J.-Y., Jeong, Y.-S., Rhee, S.D., Kim, K.R., and Cheon, H.G. (2014). Metformin suppresses lipopolysaccharide (LPS)-induced inflammatory response in murine macrophages via activating transcription factor-3 (ATF-3) induction. *J Biol Chem* 289, 23246–23255.
- Kim, J., Yang, G., Kim, Y., Kim, J., and Ha, J. (2016). AMPK activators: mechanisms of action and physiological activities. *Experimental & Molecular Medicine* 48, e224–e224.
- Kim, S.H., Li, M., Troustil, S., Zhang, Y., Pasca di Magliano, M., Swanson, K.D., and Zheng, B. (2017). Phenformin Inhibits Myeloid-Derived Suppressor Cells and Enhances the Anti-Tumor Activity of PD-1 Blockade in Melanoma. *Journal of Investigative Dermatology* 137, 1740–1748.
- Kimball, S.R., Do, A.N.D., Kutzler, L., Cavener, D.R., and Jefferson, L.S. (2008). Rapid Turnover of the mTOR Complex 1 (mTORC1) Repressor REDD1 and Activation of mTORC1 Signaling following Inhibition of Protein Synthesis *. *Journal of Biological Chemistry* 283, 3465–3475.
- Kiuru, M. (2017). The NF1 gene in tumor syndromes and melanoma. *Laboratory Investigation* 97, 12.
- Klaeger, S., Heinzlmeir, S., Wilhelm, M., Polzer, H., Vick, B., Koenig, P.-A., Reinecke, M., Ruprecht, B., Petzoldt, S., Meng, C., et al. (2017). The target landscape of clinical kinase drugs. *Science* 358.
- Klebanoff, C.A., Gattinoni, L., Torabi-Parizi, P., Kerstann, K., Cardones, A.R., Finkelstein, S.E., Palmer, D.C., Antony, P.A., Hwang, S.T., Rosenberg, S.A., et al. (2005). Central memory self/tumor-reactive CD8+ T cells confer superior antitumor immunity compared with effector memory T cells. *PNAS* 102, 9571–9576.
- Klein, O., Kee, D., Markman, B., Carlino, M.S., Underhill, C., Palmer, J., Power, D., Cebon, J., and Behren, A. (2021). Evaluation of TMB as a predictive biomarker in patients with solid cancers treated with anti-PD-1/CTLA-4 combination immunotherapy. *Cancer Cell* 39, 592–593.
- Kleinovink, J.W., Marijt, K.A., Schoonderwoerd, M.J.A., van Hall, T., Ossendorp, F., and Fransen, M.F. (2017). PD-L1 expression on malignant cells is no prerequisite for checkpoint therapy. *Oncoimmunology* 6.
- Ko, Y., Choi, A., Lee, M., and Lee, J.A. (2016). Metformin displays in vitro and in vivo antitumor effect against osteosarcoma. *Korean J Pediatr* 59, 374–380.
- Kobayashi, T., Urabe, K., Winder, A., Jiménez-Cervantes, C., Imokawa, G., Brewington, T., Solano, F., García-Borrón, J.C., and Hearing, V.J. (1994). Tyrosinase related protein 1 (TRP1) functions as a DHICA oxidase in melanin biosynthesis. *EMBO J* 13, 5818–5825.

- Kochenderfer, J.N., Wilson, W.H., Janik, J.E., Dudley, M.E., Stetler-Stevenson, M., Feldman, S.A., Maric, I., Raffeld, M., Nathan, D.-A.N., Lanier, B.J., et al. (2010). Eradication of B-lineage cells and regression of lymphoma in a patient treated with autologous T cells genetically engineered to recognize CD19. *Blood* *116*, 4099–4102.
- Koebel, C.M., Vermi, W., Swann, J.B., Zerafa, N., Rodig, S.J., Old, L.J., Smyth, M.J., and Schreiber, R.D. (2007). Adaptive immunity maintains occult cancer in an equilibrium state. *Nature* *450*, 903–907.
- Koyama, S., Akbay, E.A., Li, Y.Y., Herter-Sprrie, G.S., Buczkowski, K.A., Richards, W.G., Gandhi, L., Redig, A.J., Rodig, S.J., Asahina, H., et al. (2016). Adaptive resistance to therapeutic PD-1 blockade is associated with upregulation of alternative immune checkpoints. *Nature Communications* *7*, 10501.
- Koyama-Honda, I., Itakura, E., Fujiwara, T.K., and Mizushima, N. (2013). Temporal analysis of recruitment of mammalian ATG proteins to the autophagosome formation site. *Autophagy* *9*, 1491–1499.
- Krantz, B.A., Dave, N., Komatsubara, K.M., Marr, B.P., and Carvajal, R.D. (2017). Uveal melanoma: epidemiology, etiology, and treatment of primary disease. *Clin Ophthalmol* *11*, 279–289.
- Kruse, J.-P., and Gu, W. (2008). SnapShot: p53 Posttranslational Modifications. *Cell* *133*, 930-930.e1.
- Kuang, D.-M., Zhao, Q., Peng, C., Xu, J., Zhang, J.-P., Wu, C., and Zheng, L. (2009). Activated monocytes in peritumoral stroma of hepatocellular carcinoma foster immune privilege and disease progression through PD-L1. *J Exp Med* *206*, 1327–1337.
- Kubbutat, M.H.G., Jones, S.N., and Vousden, K.H. (1997). Regulation of p53 stability by Mdm2. *Nature* *387*, 299–303.
- Kuczynski, E.A., Krueger, J., Chow, A., Xu, P., Man, S., Sundaravadanam, Y., Miller, J.K., Krzyzanowski, P.M., and Kerbel, R.S. (2018). Impact of Chemical-Induced Mutational Load Increase on Immune Checkpoint Therapy in Poorly Responsive Murine Tumors. *Mol Cancer Ther* *17*, 869–882.
- Kuner, R., Fälth, M., Pressinotti, N.C., Brase, J.C., Puig, S.B., Metzger, J., Gade, S., Schäfer, G., Bartsch, G., Steiner, E., et al. (2013). The maternal embryonic leucine zipper kinase (MELK) is upregulated in high-grade prostate cancer. *J Mol Med (Berl)* *91*, 237–248.
- Kunisada, Y., Eikawa, S., Tomonobu, N., Domae, S., Uehara, T., Hori, S., Furusawa, Y., Hase, K., Sasaki, A., and Udono, H. (2017). Attenuation of CD4+CD25+ Regulatory T Cells in the Tumor Microenvironment by Metformin, a Type 2 Diabetes Drug. *EBioMedicine* *25*, 154–164.
- Kurelac, I., Umesh Ganesh, N., Iorio, M., Porcelli, A.M., and Gasparre, G. (2020). The multifaceted effects of metformin on tumor microenvironment. *Seminars in Cell & Developmental Biology* *98*, 90–97.
- Kuske, M., Westphal, D., Wehner, R., Schmitz, M., Beissert, S., Praetorius, C., and Meier, F. (2018). Immunomodulatory effects of BRAF and MEK inhibitors: Implications for Melanoma therapy. *Pharmacological Research* *136*, 151–159.
- Kvistborg, P., Shu, C.J., Heemskerk, B., Fankhauser, M., Thruue, C.A., Toebes, M., Rooij, N. van, Linnemann, C., Buuren, M.M. van, Urbanus, J.H.M., et al. (2012). TIL therapy broadens the tumor-reactive CD8+ T cell compartment in melanoma patients. *OncoImmunology* *1*, 409–418.
- Kyrgidis, A., Tzellos, T.-G., and Triaridis, S. (2010). Melanoma: Stem cells, sun exposure and hallmarks for carcinogenesis, molecular concepts and future clinical implications. *J Carcinog* *9*.
- Lafarge, J.-C., Pini, M., Pelloux, V., Orasanu, G., Hartmann, G., Venteclef, N., Sulpice, T., Shi, G.-P., Clément, K., and Guerre-Millo, M. (2014). Cathepsin S inhibition lowers blood glucose levels in mice. *Diabetologia* *57*, 1674–1683.
- Laganà, A.S., Salmeri, F.M., Ban Frangež, H., Ghezzi, F., Vrtačnik-Bokal, E., and Granese, R. (2020). Evaluation of M1 and M2 macrophages in ovarian endometriomas from women affected by endometriosis at different stages of the disease. *Gynecol Endocrinol* *36*, 441–444.

- Laker, R.C., Drake, J.C., Wilson, R.J., Lira, V.A., Lewellen, B.M., Ryall, K.A., Fisher, C.C., Zhang, M., Saucerman, J.J., Goodyear, L.J., et al. (2017). Ampk phosphorylation of Ulk1 is required for targeting of mitochondria to lysosomes in exercise-induced mitophagy. *Nature Communications* 8, 548.
- Lakshmikanth, T., Burke, S., Ali, T.H., Kimpfler, S., Ursini, F., Ruggeri, L., Capanni, M., Umansky, V., Paschen, A., Sucker, A., et al. (2009). NCRs and DNAM-1 mediate NK cell recognition and lysis of human and mouse melanoma cell lines in vitro and in vivo. *J Clin Invest* 119, 1251–1263.
- Lanitis, E., Dangaj, D., Irving, M., and Coukos, G. (2017). Mechanisms regulating T-cell infiltration and activity in solid tumors. *Annals of Oncology* 28, xii18–xii32.
- Larkin, J., Chiarion-Sileni, V., Gonzalez, R., Grob, J.J., Cowey, C.L., Lao, C.D., Schadendorf, D., Dummer, R., Smylie, M., Rutkowski, P., et al. (2015). Combined Nivolumab and Ipilimumab or Monotherapy in Untreated Melanoma. *New England Journal of Medicine* 373, 23–34.
- Larkin, J., Chiarion-Sileni, V., Gonzalez, R., Grob, J.-J., Rutkowski, P., Lao, C.D., Cowey, C.L., Schadendorf, D., Wagstaff, J., Dummer, R., et al. (2019). Five-Year Survival with Combined Nivolumab and Ipilimumab in Advanced Melanoma. *New England Journal of Medicine* 381, 1535–1546.
- Le Page, Y., Chartrain, I., Badouel, C., and Tassan, J.-P. (2011). A functional analysis of MELK in cell division reveals a transition in the mode of cytokinesis during *Xenopus* development. *Journal of Cell Science* 124, 958–968.
- Lee, Y.-K., Park, S.Y., Kim, Y.-M., and Park, O.J. (2009). Regulatory Effect of the AMPK–COX-2 Signaling Pathway in Curcumin-Induced Apoptosis in HT-29 Colon Cancer Cells. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1171, 489–494.
- Leiter, U., Meier, F., Schittek, B., and Garbe, C. (2004). The natural course of cutaneous melanoma. *Journal of Surgical Oncology* 86, 172–178.
- Lelliott, E.J., Cullinane, C., Martin, C.A., Walker, R., Ramsbottom, K.M., Souza-Fonseca-Guimaraes, F., Abuhammad, S., Michie, J., Kirby, L., Young, R.J., et al. (2019). A novel immunogenic mouse model of melanoma for the preclinical assessment of combination targeted and immune-based therapy. *Sci Rep* 9, 1225.
- Lesokhin, A.M., Hohl, T.M., Kitano, S., Cortez, C., Hirschhorn-Cymerman, D., Avogadri, F., Rizzuto, G.A., Lazarus, J.J., Pamer, E.G., Houghton, A.N., et al. (2012). Monocytic CCR2+ Myeloid-Derived Suppressor Cells Promote Immune Escape by Limiting Activated CD8 T-cell Infiltration into the Tumor Microenvironment. *Cancer Res* 72, 876–886.
- Leu, J.I.-J., Dumont, P., Hafey, M., Murphy, M.E., and George, D.L. (2004). Mitochondrial p53 activates Bak and causes disruption of a Bak–Mcl1 complex. *Nature Cell Biology* 6, 443–450.
- Leuci, V., Donini, C., Grignani, G., Rotolo, R., Mesiano, G., Fiorino, E., Gammaitoni, L., D’Ambrosio, L., Merlini, A., Landoni, E., et al. (2020). CSPG4-Specific CAR.CIK Lymphocytes as a Novel Therapy for the Treatment of Multiple Soft-Tissue Sarcoma Histotypes. *Clin Cancer Res* 26, 6321–6334.
- Li, C.-W., Lim, S.-O., Xia, W., Lee, H.-H., Chan, L.-C., Kuo, C.-W., Khoo, K.-H., Chang, S.-S., Cha, J.-H., Kim, T., et al. (2016). Glycosylation and stabilization of programmed death ligand-1 suppresses T-cell activity. *Nature Communications* 7, 12632.
- Li, H., van der Leun, A.M., Yofe, I., Lubling, Y., Gelbard-Solodkin, D., van Akkooi, A.C.J., van den Braber, M., Rozeman, E.A., Haanen, J.B.A.G., Blank, C.U., et al. (2019). Dysfunctional CD8 T Cells Form a Proliferative, Dynamically Regulated Compartment within Human Melanoma. *Cell* 176, 775–789.e18.
- Li, K., Zhang, T.-T., Wang, F., Cui, B., Zhao, C.-X., Yu, J.-J., Lv, X.-X., Zhang, X.-W., Yang, Z.-N., Huang, B., et al. (2018). Metformin suppresses melanoma progression by inhibiting KAT5-mediated SMAD3 acetylation, transcriptional activity and TRIB3 expression. *Oncogene* 37, 2967–2981.
- Li, X., Yao, W., Yuan, Y., Chen, P., Li, B., Li, J., Chu, R., Song, H., Xie, D., Jiang, X., et al. (2017a). Targeting of tumour-infiltrating macrophages via CCL2/CCR2 signalling as a therapeutic strategy against hepatocellular carcinoma. *Gut* 66, 157–167.

- Li, X.H., Ha, C.T., Fu, D., and Xiao, M. (2012). Micro-RNA30c negatively regulates REDD1 expression in human hematopoietic and osteoblast cells after gamma-irradiation. *PLoS One* 7, e48700.
- Li, Y., Wang, M., Zhi, P., You, J., and Gao, J. (2017b). Metformin synergistically suppress tumor growth with doxorubicin and reverse drug resistance by inhibiting the expression and function of P-glycoprotein in MCF7/ADR cells and xenograft models. *Oncotarget* 9, 2158–2174.
- Li, Y.-C., Zou, J.-M., Luo, C., Shu, Y., Luo, J., Qin, J., Wang, Y., Li, D., Wang, S.-S., Chi, G., et al. (2017c). Circulating tumor cells promote the metastatic colonization of disseminated carcinoma cells by inducing systemic inflammation. *Oncotarget* 8, 28418–28430.
- Liang, J., Shao, S.H., Xu, Z.-X., Hennessy, B., Ding, Z., Larrea, M., Kondo, S., Dumont, D.J., Gutterman, J.U., Walker, C.L., et al. (2007). The energy sensing LKB1–AMPK pathway regulates p27 kip1 phosphorylation mediating the decision to enter autophagy or apoptosis. *Nature Cell Biology* 9, 218–224.
- Liao, H., Zhou, Q., Gu, Y., Duan, T., and Feng, Y. (2012). Luteinizing hormone facilitates angiogenesis in ovarian epithelial tumor cells and metformin inhibits the effect through the mTOR signaling pathway. *Oncology Reports* 27, 1873–1878.
- Liao, K.-F., Chiu, T.-L., Huang, S.-Y., Hsieh, T.-F., Chang, S.-F., Ruan, J.-W., Chen, S.-P., Pang, C.-Y., and Chiu, S.-C. (2018). Anti-Cancer Effects of Radix Angelica Sinensis (Danggui) and N-Butylidenephthalide on Gastric Cancer: Implications for REDD1 Activation and mTOR Inhibition. *CPB* 48, 2231–2246.
- Libby, G., Donnelly, L.A., Donnan, P.T., Alessi, D.R., Morris, A.D., and Evans, J.M.M. (2009). New Users of Metformin Are at Low Risk of Incident Cancer: A cohort study among people with type 2 diabetes. *Diabetes Care* 32, 1620–1625.
- Lin, Qian, Y., Shi, X., and Chen, Y. (2005). Induction of a Cell Stress Response Gene RTP801 by DNA Damaging Agent Methyl Methanesulfonate through CCAAT/Enhancer Binding Protein. *Biochemistry* 44, 3909–3914.
- Lin, A., Giuliano, C.J., Sayles, N.M., and Sheltzer, J.M. (2017). CRISPR/Cas9 mutagenesis invalidates a putative cancer dependency targeted in on-going clinical trials. *Elife* 6.
- Lin, C.-S., Lee, H.-T., Lee, S.-Y., Shen, Y.-A., Wang, L.-S., Chen, Y.-J., and Wei, Y.-H. (2012). High Mitochondrial DNA Copy Number and Bioenergetic Function Are Associated with Tumor Invasion of Esophageal Squamous Cell Carcinoma Cell Lines. *Int J Mol Sci* 13, 11228–11246.
- Lin, M.-L., Park, J.-H., Nishidate, T., Nakamura, Y., and Katagiri, T. (2007). Involvement of maternal embryonic leucine zipper kinase (MELK) in mammary carcinogenesis through interaction with Bcl-G, a pro-apoptotic member of the Bcl-2 family. *Breast Cancer Res* 9, 1–13.
- Linke, S.P., Sengupta, S., Khabie, N., Jeffries, B.A., Buchhop, S., Miska, S., Henning, W., Pedoux, R., Wang, X.W., Hofseth, L.J., et al. (2003). p53 interacts with hRAD51 and hRAD54, and directly modulates homologous recombination. *Cancer Res* 63, 2596–2605.
- Litvak, V., Ramsey, S.A., Rust, A.G., Zak, D.E., Kennedy, K.A., Lampano, A.E., Nykter, M., Shmulevich, I., and Aderem, A. (2009). Function of C/EBP δ in a regulatory circuit that discriminates between transient and persistent TLR4-induced signals. *Nature Immunology* 10, 437–443.
- Liu, B.L., Robinson, M., Han, Z.-Q., Branston, R.H., English, C., Reay, P., McGrath, Y., Thomas, S.K., Thornton, M., Bullock, P., et al. (2003). ICP34.5 deleted herpes simplex virus with enhanced oncolytic, immune stimulating, and anti-tumour properties. *Gene Therapy* 10, 292–303.
- Liu, H., Scholz, C., Zang, C., Scheffe, J.H., Habel, P., Regierer, A.-C., Schulz, C.-O., Possinger, K., and Eucker, J. (2012). Metformin and the mTOR Inhibitor Everolimus (RAD001) Sensitize Breast Cancer Cells to the Cytotoxic Effect of Chemotherapeutic Drugs In Vitro. *Anticancer Research* 32, 1627–1637.
- Liu, Q., Tong, D., Liu, G., Gao, J., Wang, L., Xu, J., Yang, X., Xie, Q., Huang, Y., Pang, J., et al. (2018a). Metformin Inhibits Prostate Cancer Progression by Targeting Tumor-Associated Inflammatory Infiltration. *Clin Cancer Res* 24, 5622–5634.

- Liu, X., Cai, S., Zhang, C., Liu, Z., Luo, J., Xing, B., and Du, X. (2018b). Deacetylation of NAT10 by Sirt1 promotes the transition from rRNA biogenesis to autophagy upon energy stress. *Nucleic Acids Research* *46*, 9601–9616.
- Liu, Y., Cai, P., Wang, N., Zhang, Q., Chen, F., Shi, L., Zhang, Y., Wang, L., and Hu, L. (2017). Combined blockade of Tim-3 and MEK inhibitor enhances the efficacy against melanoma. *Biochemical and Biophysical Research Communications* *484*, 378–384.
- Liu, Z., Li, T., Zhu, F., Deng, S., Li, X., and He, Y. (2019). Regulatory roles of miR-22/Redd1-mediated mitochondrial ROS and cellular autophagy in ionizing radiation-induced BMSC injury. *Cell Death & Disease* *10*, 1–19.
- Lizcano, J.M., Göransson, O., Toth, R., Deak, M., Morrice, N.A., Boudeau, J., Hawley, S.A., Udd, L., Mäkelä, T.P., Hardie, D.G., et al. (2004). LKB1 is a master kinase that activates 13 kinases of the AMPK subfamily, including MARK/PAR-1. *The EMBO Journal* *23*, 833–843.
- Long, G.V., Stroyakovskiy, D., Gogas, H., Levchenko, E., Braud, F. de, Larkin, J., Garbe, C., Jouary, T., Hauschild, A., Grob, J.-J., et al. (2015). Dabrafenib and trametinib versus dabrafenib and placebo for Val600 BRAF-mutant melanoma: a multicentre, double-blind, phase 3 randomised controlled trial. *The Lancet* *386*, 444–451.
- Long, J., Garner, T.P., Pandya, M.J., Craven, C.J., Chen, P., Shaw, B., Williamson, M.P., Layfield, R., and Searle, M.S. (2010). Dimerisation of the UBA Domain of p62 Inhibits Ubiquitin Binding and Regulates NF- κ B Signalling. *Journal of Molecular Biology* *396*, 178–194.
- Loubiere, C., Clavel, S., Gilleron, J., Harisseh, R., Fauconnier, J., Ben-Sahra, I., Kaminski, L., Laurent, K., Herkenne, S., Lacas-Gervais, S., et al. (2017). The energy disruptor metformin targets mitochondrial integrity via modification of calcium flux in cancer cells. *Scientific Reports* *7*, 5040.
- Lu, Y.-C., Yao, X., Crystal, J.S., Li, Y.F., El-Gamil, M., Gross, C., Davis, L., Dudley, M.E., Yang, J.C., Samuels, Y., et al. (2014). Efficient Identification of Mutated Cancer Antigens Recognized by T Cells Associated with Durable Tumor Regressions. *Clin Cancer Res* *20*, 3401–3410.
- Luo, Z., Zang, M., and Guo, W. (2010). AMPK as a metabolic tumor suppressor: control of metabolism and cell growth. *Future Oncol* *6*, 457–470.
- Lyu, X., Wang, J., Guo, X., Wu, G., Jiao, Y., Faleti, O.D., Liu, P., Liu, T., Long, Y., Chong, T., et al. (2018). EBV-miR-BART1-5P activates AMPK/mTOR/HIF1 pathway via a PTEN independent manner to promote glycolysis and angiogenesis in nasopharyngeal carcinoma. *PLOS Pathogens* *14*, e1007484.
- Ma, E.H., Poffenberger, M.C., Wong, A.H.-T., and Jones, R.G. (2017). The role of AMPK in T cell metabolism and function. *Curr Opin Immunol* *46*, 45–52.
- Ma, Y., Li, Y., Ling, S., Li, X., Kong, B., Hu, M., and Huang, P. (2020). Loss of heterozygosity for KrasG12D promotes REDD1-dependent, non-canonical glutamine metabolism in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Biochemical and Biophysical Research Communications* *526*, 880–888.
- Madhunapantula, S.V., and Robertson, G.P. (2017). Targeting protein kinase-b3 (akt3) signaling in melanoma. *Expert Opinion on Therapeutic Targets* *21*, 273–290.
- Mahmoud, F., Shields, B., Makhoul, I., Avaritt, N., Wong, H.K., Hutchins, L.F., Shalin, S., and Tackett, A.J. (2017). Immune surveillance in melanoma: From immune attack to melanoma escape and even counterattack. *Cancer Biol Ther* *18*, 451–469.
- Maiuri, M.C., Zalckvar, E., Kimchi, A., and Kroemer, G. (2007). Self-eating and self-killing: crosstalk between autophagy and apoptosis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* *8*, 741–752.
- Maksimovic, S., Nakatani, M., Baba, Y., Nelson, A.M., Marshall, K.L., Wellnitz, S.A., Firozi, P., Woo, S.-H., Ranade, S., Patapoutian, A., et al. (2014). Epidermal Merkel cells are mechanosensory cells that tune mammalian touch receptors. *Nature* *509*, 617–621.

- Malagelada, C., Jin, Z.H., and Greene, L.A. (2008). RTP801 Is Induced in Parkinson's Disease and Mediates Neuron Death by Inhibiting Akt Phosphorylation/Activation. *J. Neurosci.* 28, 14363–14371.
- Malik, A.R., Zippel Nina, Frömel Timo, Heidler Juliana, Zukunft Sven, Walzog Barbara, Ansari Nariman, Pampaloni Francesco, Wingert Susanne, Rieger Michael A., et al. (2017). AMP-Activated Protein Kinase $\alpha 2$ in Neutrophils Regulates Vascular Repair via Hypoxia-Inducible Factor-1 α and a Network of Proteins Affecting Metabolism and Apoptosis. *Circulation Research* 120, 99–109.
- Maranduca, M.A., Branisteanu, D., Serban, D.N., Branisteanu, D.C., Stoleriu, G., Manolache, N., and Serban, I.L. (2019). Synthesis and physiological implications of melanic pigments (Review). *Oncology Letters* 17, 4183–4187.
- Marie, S.K.N., Okamoto, O.K., Uno, M., Hasegawa, A.P.G., Oba-Shinjo, S.M., Cohen, T., Camargo, A.A., Kosoy, A., Carlotti, C.G., Toledo, S., et al. (2008). Maternal embryonic leucine zipper kinase transcript abundance correlates with malignancy grade in human astrocytomas. *International Journal of Cancer* 122, 807–815.
- Martins, I., Michaud, M., Sukkurwala, A.Q., Adjemian, S., Ma, Y., Shen, S., Kepp, O., Menger, L., Vacchelli, E., Galluzzi, L., et al. (2012). Premortem autophagy determines the immunogenicity of chemotherapy-induced cancer cell death. *Autophagy* 8, 413–415.
- Marzagalli, M., Ebelt, N.D., and Manuel, E.R. (2019). Unraveling the crosstalk between melanoma and immune cells in the tumor microenvironment. *Seminars in Cancer Biology* 59, 236–250.
- Matthews, N.H., Li, W.-Q., Qureshi, A.A., Weinstock, M.A., and Cho, E. (2017). Epidemiology of Melanoma. In *Cutaneous Melanoma: Etiology and Therapy*, W.H. Ward, and J.M. Farma, eds. (Brisbane (AU): Codon Publications), p.
- Matzinger, P. (1994). Tolerance, danger, and the extended family. *Annu. Rev. Immunol.* 12, 991–1045.
- McDonald, I.M., and Graves, L.M. (2020). Enigmatic MELK: The controversy surrounding its complex role in cancer. *Journal of Biological Chemistry* 295, 8195–8203.
- McDonald, I.M., Grant, G.D., East, M.P., Gilbert, T.S.K., Wilkerson, E.M., Goldfarb, D., Beri, J., Herring, L.E., Vaziri, C., Cook, J.G., et al. (2020). Mass spectrometry-based selectivity profiling identifies a highly selective inhibitor of the kinase MELK that delays mitotic entry in cancer cells. *Journal of Biological Chemistry* 295, 2359–2374.
- McGee, S.L., Denderen, B.J.W. van, Howlett, K.F., Mollica, J., Schertzer, J.D., Kemp, B.E., and Hargreaves, M. (2008). AMP-Activated Protein Kinase Regulates GLUT4 Transcription by Phosphorylating Histone Deacetylase 5. *Diabetes* 57, 860–867.
- McLellan, A.D., and Ali Hosseini Rad, S.M. (2019). Chimeric antigen receptor T cell persistence and memory cell formation. *Immunol Cell Biol* 97, 664–674.
- Mebratu, Y., and Tesfagzi, Y. (2009). How ERK1/2 activation controls cell proliferation and cell death: Is subcellular localization the answer? *Cell Cycle* 8, 1168–1175.
- Meeth, K., Wang, J.X., Micevic, G., Damsky, W., and Bosenberg, M.W. (2016). The YUMM lines: a series of congenic mouse melanoma cell lines with defined genetic alterations. *Pigment Cell & Melanoma Research* 29, 590–597.
- Meyer, C., Cagnon, L., Costa-Nunes, C.M., Baumgaertner, P., Montandon, N., Leyvraz, L., Michielin, O., Romano, E., and Speiser, D.E. (2014). Frequencies of circulating MDSC correlate with clinical outcome of melanoma patients treated with ipilimumab. *Cancer Immunol Immunother* 63, 247–257.
- Michaloglou, C., Vredeveld, L.C.W., Soengas, M.S., Denoyelle, C., Kuilman, T., van der Horst, C.M.A.M., Majoor, D.M., Shay, J.W., Mooi, W.J., and Peeper, D.S. (2005). BRAF E600 -associated senescence-like cell cycle arrest of human naevi. *Nature* 436, 720–724.
- Michaud, M., Martins, I., Sukkurwala, A.Q., Adjemian, S., Ma, Y., Pellegatti, P., Shen, S., Kepp, O., Scoazec, M., Mignot, G., et al. (2011). Autophagy-Dependent Anticancer Immune Responses Induced by Chemotherapeutic Agents in Mice. *Science* 334, 1573–1577.

- Michel, G., Matthes, H.W.D., Hachet-Haas, M., El Baghdadi, K., De Mey, J., Pepperkok, R., Simpson, J.C., Galzi, J.-L., and Lecat, S. (2014). Plasma membrane translocation of REDD1 governed by GPCRs contributes to mTORC1 activation. *Journal of Cell Science* *127*, 773–787.
- Miller, W.P., Toro, A., and Dennis, M.D. (2018). Deletion of REDD1 Prevents Hyperglycemia-Induced Reactive Oxygen Species Accumulation and Retinal Cell Death. *Diabetes* *67*.
- Miller, W.P., Toro, A.L., Barber, A.J., and Dennis, M.D. (2019). REDD1 Activates a ROS-Generating Feedback Loop in the Retina of Diabetic Mice. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* *60*, 2369–2379.
- Minata, M., Gu, C., Joshi, K., Nakano-Okuno, M., Hong, C., Nguyen, C.-H., Kornblum, H.I., Molla, A., and Nakano, I. (2014). Multi-Kinase Inhibitor C1 Triggers Mitotic Catastrophe of Glioma Stem Cells Mainly through MELK Kinase Inhibition. *PLOS ONE* *9*, e92546.
- Miyasato, Y., Shiota, T., Ohnishi, K., Pan, C., Yano, H., Horlad, H., Yamamoto, Y., Yamamoto-Ibusuki, M., Iwase, H., Takeya, M., et al. (2017). High density of CD204-positive macrophages predicts worse clinical prognosis in patients with breast cancer. *Cancer Sci* *108*, 1693–1700.
- Mo, X., Zhang, H., Preston, S., Martin, K., Zhou, B., Vadalía, N., Gamero, A.M., Soboloff, J., Tempera, I., and Zaidi, M.R. (2018). Interferon- γ signaling in melanocytes and melanoma cells regulates expression of CTLA-4. *Cancer Res* *78*, 436–450.
- Moldogazieva, N.T., Mokhosoev, I.M., and Terentiev, A.A. (2020). Metabolic Heterogeneity of Cancer Cells: An Interplay between HIF-1, GLUTs, and AMPK. *Cancers (Basel)* *12*.
- Molina, D.M., Jafari, R., Ignatushchenko, M., Seki, T., Larsson, E.A., Dan, C., Sreekumar, L., Cao, Y., and Nordlund, P. (2013). Monitoring Drug Target Engagement in Cells and Tissues Using the Cellular Thermal Shift Assay. *Science* *341*, 84–87.
- Molitoris, J.K., McColl, K.S., Swerdlow, S., Matsuyama, M., Lam, M., Finkel, T.H., Matsuyama, S., and Distelhorst, C.W. (2011). Glucocorticoid Elevation of Dexamethasone-induced Gene 2 (Dig2/RTP801/REDD1) Protein Mediates Autophagy in Lymphocytes*. *Journal of Biological Chemistry* *286*, 30181–30189.
- Montaudié, H., Cerezo, M., Bahadoran, P., Roger, C., Passeron, T., Machet, L., Arnault, J.-P., Verneuil, L., Maubec, E., Aubin, F., et al. (2017). Metformin monotherapy in melanoma: a pilot, open-label, prospective, and multicentric study indicates no benefit. *Pigment Cell & Melanoma Research* *30*, 378–380.
- Moravcevic, K., Mendrola, J.M., Schmitz, K.R., Wang, Y.-H., Slochower, D., Janmey, P.A., and Lemmon, M.A. (2010). Kinase Associated-1 Domains Drive MARK/PAR1 Kinases to Membrane Targets by Binding Acidic Phospholipids. *Cell* *143*, 966–977.
- Mosely, S.I.S., Prime, J.E., Sainson, R.C.A., Koopmann, J.-O., Wang, D.Y.Q., Greenawalt, D.M., Ahdesmaki, M.J., Leyland, R., Mullins, S., Pacelli, L., et al. (2017). Rational Selection of Syngeneic Preclinical Tumor Models for Immunotherapeutic Drug Discovery. *Cancer Immunol Res* *5*, 29–41.
- Mourmouras, V., Fimiani, M., Rubegni, P., Epistolato, M.C., Malagnino, V., Cardone, C., Cosci, E., Nisi, M.C.D., and Miracco, C. (2007). Evaluation of tumour-infiltrating CD4+CD25+FOXP3+ regulatory T cells in human cutaneous benign and atypical naevi, melanomas and melanoma metastases. *Br. J. Dermatol.* *157*, 531–539.
- Muñoz-Maldonado, C., Zimmer, Y., and Medová, M. (2019). A Comparative Analysis of Individual RAS Mutations in Cancer Biology. *Front Oncol* *9*.
- Murtola, T.J., Tammela, T.L.J., Lahtela, J., and Auvinen, A. (2008). Antidiabetic Medication and Prostate Cancer Risk: A Population-based Case-Control Study. *American Journal of Epidemiology* *168*, 925–931.
- Nakano, I., Paucar, A.A., Bajpai, R., Dougherty, J.D., Zewail, A., Kelly, T.K., Kim, K.J., Ou, J., Groszer, M., Imura, T., et al. (2005). Maternal embryonic leucine zipper kinase (MELK) regulates multipotent neural progenitor proliferation. *Journal of Cell Biology* *170*, 413–427.

- Nakano, I., Masterman-Smith, M., Saigusa, K., Paucar, A.A., Horvath, S., Shoemaker, L., Watanabe, M., Negro, A., Bajpai, R., Howes, A., et al. (2008). Maternal embryonic leucine zipper kinase is a key regulator of the proliferation of malignant brain tumors, including brain tumor stem cells. *Journal of Neuroscience Research* 86, 48–60.
- Narita, M., Nuñez, S., Heard, E., Narita, M., Lin, A.W., Hearn, S.A., Spector, D.L., Hannon, G.J., and Lowe, S.W. (2003). Rb-Mediated Heterochromatin Formation and Silencing of E2F Target Genes during Cellular Senescence. *Cell* 113, 703–716.
- 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.
- Nesbit, M., Schaider, H., Miller, T.H., and Herlyn, M. (2001). Low-Level Monocyte Chemoattractant Protein-1 Stimulation of Monocytes Leads to Tumor Formation in Nontumorigenic Melanoma Cells. *The Journal of Immunology* 166, 6483–6490.
- Niehr, F., von Euw, E., Attar, N., Guo, D., Matsunaga, D., Sazegar, H., Ng, C., Glaspy, J.A., Recio, J.A., Lo, R.S., et al. (2011). Combination therapy with vemurafenib (PLX4032/RG7204) and metformin in melanoma cell lines with distinct driver mutations. *J Transl Med* 9, 76.
- Nielsen, S.R., Quaranta, V., Linford, A., Emeagi, P., Rainer, C., Santos, A., Ireland, L., Sakai, T., Sakai, K., Kim, Y.-S., et al. (2016). Macrophage-secreted granulins support pancreatic cancer metastasis by inducing liver fibrosis. *Nat Cell Biol* 18, 549–560.
- Niesler, C.U., Myburgh, K.H., and Moore, F. (2007). The changing AMPK expression profile in differentiating mouse skeletal muscle myoblast cells helps confer increasing resistance to apoptosis. *Experimental Physiology* 92, 207–217.
- Nyati, S., Chandler, B., Olsen, E., Moubadder, L., Liu, M., Cameron, M., Wilder-Romans, K., Lawrence, T.S., Brown, P.H., Fang, F.Y., et al. (2018). Abstract 3218: Maternal embryonic leucine zipper kinase (MELK) confers radioresistance in triple-negative breast cancers (TNBC) through a nonhomologous end joining (NHEJ)-mediated pathway. *Cancer Res* 78, 3218–3218.
- Oakhill, J.S., Chen, Z.-P., Scott, J.W., Steel, R., Castelli, L.A., Ling, N., Macaulay, S.L., and Kemp, B.E. (2010). β -Subunit myristoylation is the gatekeeper for initiating metabolic stress sensing by AMP-activated protein kinase (AMPK). *PNAS* 107, 19237–19241.
- O'Donnell, J.S., Teng, M.W.L., and Smyth, M.J. (2019). Cancer immunoediting and resistance to T cell-based immunotherapy. *Nature Reviews Clinical Oncology* 16, 151–167.
- Ohanna, M., Cheli, Y., Bonet, C., Bonazzi, V.F., Allegra, M., Giuliano, S., Bille, K., Bahadoran, P., Giacchero, D., Lacour, J.P., et al. (2013). Secretome from senescent melanoma engages the STAT3 pathway to favor reprogramming of naive melanoma towards a tumor-initiating cell phenotype. *Oncotarget* 4, 2212–2224.
- Ohanna, M., Cerezo, M., Nottet, N., Bille, K., Didier, R., Beranger, G., Mograbi, B., Rocchi, S., Yvan-Charvet, L., Ballotti, R., et al. (2018). Pivotal role of NAMPT in the switch of melanoma cells toward an invasive and drug-resistant phenotype. *Genes Dev.* 32, 448–461.
- Ohki, R., Nemoto, J., Murasawa, H., Oda, E., Inazawa, J., Tanaka, N., and Taniguchi, T. (2000). Reprimo, a New Candidate Mediator of the p53-mediated Cell Cycle Arrest at the G2 Phase*. *Journal of Biological Chemistry* 275, 22627–22630.
- Okoshi, R., Ozaki, T., Yamamoto, H., Ando, K., Koida, N., Ono, S., Koda, T., Kamijo, T., Nakagawara, A., and Kizaki, H. (2008). Activation of AMP-activated protein kinase induces p53-dependent apoptotic cell death in response to energetic stress. *J Biol Chem* 283, 3979–3987.
- Old, L.J., and Boyse, E.A. (1964). Immunology of Experimental Tumors. *Annual Review of Medicine* 15, 167–186.
- Oliveras-Ferraro, C., Vazquez-Martin, A., and Menendez, J.A. (2009). Genome-wide inhibitory impact of the AMPK activator metformin on [kinesins, tubulins, histones, auroras and polo-like kinases] M-phase cell cycle genes in human breast cancer cells. *Cell Cycle* 8, 1633–1636.

- Ouyang, J., Parakhia, R.A., and Ochs, R.S. (2011). Metformin Activates AMP Kinase through Inhibition of AMP Deaminase. *J Biol Chem* 286, 1–11.
- Overman, M.J., Lonardi, S., Wong, K.Y.M., Lenz, H.-J., Gelsomino, F., Aglietta, M., Morse, M.A., Van Cutsem, E., McDermott, R., Hill, A., et al. (2018). Durable Clinical Benefit With Nivolumab Plus Ipilimumab in DNA Mismatch Repair-Deficient/Microsatellite Instability-High Metastatic Colorectal Cancer. *J Clin Oncol* 36, 773–779.
- Owen, M.R., Doran, E., and Halestrap, A.P. (2000). Evidence that metformin exerts its anti-diabetic effects through inhibition of complex 1 of the mitochondrial respiratory chain. *Biochem J* 348 Pt 3, 607–614.
- Paget, S. (1889). THE DISTRIBUTION OF SECONDARY GROWTHS IN CANCER OF THE BREAST. *The Lancet* 133, 571–573.
- Palmieri, G., Colombino, M., Casula, M., Manca, A., Mandalà, M., and Cossu, A. (2018). Molecular Pathways in Melanomagenesis: What We Learned from Next-Generation Sequencing Approaches. *Curr Oncol Rep* 20.
- Pardoll, D. (2003). Does the immune system see tumors as foreign or self? *Annu. Rev. Immunol.* 21, 807–839.
- Park, S.-Y., and Nam, J.-S. (2020). The force awakens: metastatic dormant cancer cells. *Experimental & Molecular Medicine* 52, 569–581.
- Park, J.B., Lee, M.S., Cha, E.Y., Lee, J.S., Sul, J.Y., Song, I.S., and Kim, J.Y. (2012). Magnolol-induced apoptosis in HCT-116 colon cancer cells is associated with the AMP-activated protein kinase signaling pathway. *Biol Pharm Bull* 35, 1614–1620.
- Park, J.E., Dutta, B., Tse, S.W., Gupta, N., Tan, C.F., Low, J.K., Yeoh, K.W., Kon, O.L., Tam, J.P., and Sze, S.K. (2019). Hypoxia-induced tumor exosomes promote M2-like macrophage polarization of infiltrating myeloid cells and microRNA-mediated metabolic shift. *Oncogene* 38, 5158–5173.
- Park, J.-M., Jung, C.H., Seo, M., Otto, N.M., Grunwald, D., Kim, K.H., Moriarity, B., Kim, Y.-M., Starker, C., Nho, R.S., et al. (2016). The ULK1 complex mediates MTORC1 signaling to the autophagy initiation machinery via binding and phosphorylating ATG14. *Autophagy* 12, 547–564.
- Pathria, P., Louis, T.L., and Varner, J.A. (2019). Targeting Tumor-Associated Macrophages in Cancer. *Trends in Immunology* 40, 310–327.
- Patton, E.E., Mueller, K.L., Adams, D.J., Anandasabapathy, N., Aplin, A.E., Bertolotto, C., Bosenberg, M., Ceol, C.J., Burd, C.E., Chi, P., et al. (2021). Melanoma models for the next generation of therapies. *Cancer Cell* 39, 610–631.
- Pawlak, M.T., Bui, M., Amir, M., Burkhardt, D.L., Chen, A.K., and Dellavalle, R.P. (2012). Legislation restricting access to indoor tanning throughout the world. *Arch Dermatol* 148, 1006–1012.
- Pearce, E.L., Walsh, M.C., Cejas, P.J., Harms, G.M., Shen, H., Wang, L.-S., Jones, R.G., and Choi, Y. (2009). Enhancing CD8 T-cell memory by modulating fatty acid metabolism. *Nature* 460, 103–107.
- Pearlman, R.L., Montes de Oca, M.K., Pal, H.C., and Afaq, F. (2017). Potential therapeutic targets of epithelial–mesenchymal transition in melanoma. *Cancer Letters* 391, 125–140.
- Peinado, H., Alečković, M., Lavotshkin, S., Matei, I., Costa-Silva, B., Moreno-Bueno, G., Hergueta-Redondo, M., Williams, C., García-Santos, G., Ghajar, C.M., et al. (2012). Melanoma exosomes educate bone marrow progenitor cells toward a pro-metastatic phenotype through MET. *Nature Medicine* 18, 883–891.
- Peng, W., Chen, J.Q., Liu, C., Malu, S., Creasy, C., Tetzlaff, M.T., Xu, C., McKenzie, J.A., Zhang, C., Liang, X., et al. (2016). Loss of PTEN promotes resistance to T cell-mediated immunotherapy. *Cancer Discov* 6, 202–216.
- Pereira, F.V., Melo, A.C.L., Low, J.S., de Castro, Í.A., Braga, T.T., Almeida, D.C., Batista de Lima, A.G.U., Hiyane, M.I., Correa-Costa, M., Andrade-Oliveira, V., et al. (2018). Metformin exerts antitumor activity via induction of multiple death pathways in tumor cells and activation of a protective immune response. *Oncotarget* 9, 25808–25825.

- Pérez-Guijarro, E., Yang, H.H., Araya, R.E., El Meskini, R., Michael, H.T., Vodnala, S.K., Marie, K.L., Smith, C., Chin, S., Lam, K.C., et al. (2020). Multimodel preclinical platform predicts clinical response of melanoma to immunotherapy. *Nat Med* 26, 781–791.
- Perfettini, J.-L., Kroemer, R.T., and Kroemer, G. (2004). Fatal liaisons of p53 with Bax and Bak. *Nature Cell Biology* 6, 386–388.
- Pernicova, I., and Korbonits, M. (2014). Metformin—mode of action and clinical implications for diabetes and cancer. *Nature Reviews Endocrinology* 10, 143–156.
- Petit, V., Raymond, J., Alberti, C., Pouteaux, M., Gallagher, S.J., Nguyen, M.Q., Aplin, A.E., Delmas, V., and Larue, L. (2019). C57BL/6 congenic mouse NRASQ61K melanoma cell lines are highly sensitive to the combination of Mek and Akt inhibitors in vitro and in vivo. *Pigment Cell & Melanoma Research* 32, 829–841.
- Petti, C., Vegetti, C., Molla, A., Bersani, I., Cleris, L., Mustard, K.J., Formelli, F., Hardie, G.D., Sensi, M., and Anichini, A. (2012). AMPK activators inhibit the proliferation of human melanomas bearing the activated MAPK pathway. *Melanoma Research* 22, 341–350.
- Pickard, M.R., Green, A.R., Ellis, I.O., Caldas, C., Hedge, V.L., Mourtada-Maarabouni, M., and Williams, G.T. (2009). Dysregulated expression of Fau and MELK is associated with poor prognosis in breast cancer. *Breast Cancer Res* 11, R60.
- Pietra, G., Manzini, C., Rivara, S., Vitale, M., Cantoni, C., Petretto, A., Balsamo, M., Conte, R., Benelli, R., Minghelli, S., et al. (2012). Melanoma Cells Inhibit Natural Killer Cell Function by Modulating the Expression of Activating Receptors and Cytolytic Activity. *Cancer Research* 72, 1407–1415.
- Pinno, J., Bongartz, H., Klepsch, O., Wundrack, N., Poli, V., Schaper, F., and Dittrich, A. (2016). Interleukin-6 influences stress-signalling by reducing the expression of the mTOR-inhibitor REDD1 in a STAT3-dependent manner. *Cellular Signalling* 28, 907–916.
- Pinto, J.A., Rolfo, C., Raez, L.E., Prado, A., Araujo, J.M., Bravo, L., Fajardo, W., Morante, Z.D., Aguilar, A., Neciosup, S.P., et al. (2017). In silico evaluation of DNA Damage Inducible Transcript 4 gene (DDIT4) as prognostic biomarker in several malignancies. *Scientific Reports* 7, 1526.
- Pitolli, C., Wang, Y., Candi, E., Shi, Y., Melino, G., and Amelio, I. (2019). p53-Mediated Tumor Suppression: DNA-Damage Response and Alternative Mechanisms. *Cancers* 11, 1983.
- Porta, C., Sica, A., and Riboldi, E. (2018). Tumor-associated myeloid cells: new understandings on their metabolic regulation and their influence in cancer immunotherapy. *The FEBS Journal* 285, 717–733.
- Puente, C., Hendrickson, R.C., and Jiang, X. (2016). Nutrient-regulated Phosphorylation of ATG13 Inhibits Starvation-induced Autophagy. *J Biol Chem* 291, 6026–6035.
- Puissant, A., Fenouille, N., Robert, G., Jacquelin, A., Bassil, C.F., Colosetti, P., Luciano, F., and Auberger, P. (2014). A new posttranslational regulation of REDD1/DDIT4 through cleavage by caspase 3 modifies its cellular function. *Cell Death & Disease* 5, e1349–e1349.
- Puzanov, I., Milhem, M.M., Minor, D., Hamid, O., Li, A., Chen, L., Chastain, M., Gorski, K.S., Anderson, A., Chou, J., et al. (2016). Talimogene Laherparepvec in Combination With Ipilimumab in Previously Untreated, Unresectable Stage IIIB–IV Melanoma. *J Clin Oncol* 34, 2619–2626.
- Qian, B.-Z., Li, J., Zhang, H., Kitamura, T., Zhang, J., Campion, L.R., Kaiser, E.A., Snyder, L.A., and Pollard, J.W. (2011). CCL2 recruits inflammatory monocytes to facilitate breast tumor metastasis. *Nature* 475, 222–225.
- Qiao, S., Dennis, M., Song, X., Vadysirisack, D.D., Salunke, D., Nash, Z., Yang, Z., Liesa, M., Yoshioka, J., Matsuzawa, S.-I., et al. (2015). A REDD1/TXNIP pro-oxidant complex regulates ATG4B activity to control stress-induced autophagy and sustain exercise capacity. *Nature Communications* 6, 7014.

- Qiao, S., Koh, S.-B., Vivekanandan, V., Salunke, D., Patra, K.C., Zaganjor, E., Ross, K., Mizukami, Y., Jeanfavre, S., Chen, A., et al. (2020). REDD1 loss reprograms lipid metabolism to drive progression of RAS mutant tumors. *Genes Dev.* *34*, 751–766.
- Ramachandiran, S., Adon, A., Guo, X., Wang, Y., Wang, H., Chen, Z., Kowalski, J., Sunay, U.R., Young, A.N., Brown, T., et al. (2015). Chromosome instability in diffuse large B cell lymphomas is suppressed by activation of the noncanonical NF- κ B pathway. *International Journal of Cancer* *136*, 2341–2351.
- Reed, S.M., and Quelle, D.E. (2015). p53 Acetylation: Regulation and Consequences. *Cancers* *7*, 30–69.
- Regazzetti, C., Bost, F., Le Marchand-Brustel, Y., Tanti, J.-F., and Giorgetti-Peraldi, S. (2010). Insulin Induces REDD1 Expression through Hypoxia-inducible Factor 1 Activation in Adipocytes*. *Journal of Biological Chemistry* *285*, 5157–5164.
- Regazzetti, C., Dumas, K., Marchand-Brustel, Y.L., Peraldi, P., Tanti, J.-F., and Giorgetti-Peraldi, S. (2012). Regulated in Development and DNA Damage Responses -1 (REDD1) Protein Contributes to Insulin Signaling Pathway in Adipocytes. *PLOS ONE* *7*, e52154.
- Reuschel, E.L., Wang, J., Shivers, D.K., Muthumani, K., Weiner, D.B., Ma, Z., and Finkel, T.H. (2015). REDD1 Is Essential for Optimal T Cell Proliferation and Survival. *PLOS ONE* *10*, e0136323.
- Ribas, A. (2021). T Cells as the Future of Cancer Therapy. *Cancer Discov* *11*, 798–800.
- Ribas, A., Dummer, R., Puzanov, I., VanderWalde, A., Andtbacka, R.H.I., Michielin, O., Olszanski, A.J., Malvehy, J., Cebon, J., Fernandez, E., et al. (2017). Oncolytic Virotherapy Promotes Intratumoral T Cell Infiltration and Improves Anti-PD-1 Immunotherapy. *Cell* *170*, 1109–1119.e10.
- Ribero, S., Glass, D., and Bataille, V. (2016). Genetic epidemiology of melanoma. *Eur J Dermatol* *26*, 335–339.
- Rigel, D.S., Russak, J., and Friedman, R. (2010). The Evolution of Melanoma Diagnosis: 25 Years Beyond the ABCDs. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* *60*, 301–316.
- Robert, C., Thomas, L., Bondarenko, I., O'Day, S., Weber, J., Garbe, C., Lebbe, C., Baurain, J.-F., Testori, A., Grob, J.-J., et al. (2011). Ipilimumab plus Dacarbazine for Previously Untreated Metastatic Melanoma. *New England Journal of Medicine* *364*, 2517–2526.
- Robert, C., Karaszewska, B., Schachter, J., Rutkowski, P., Mackiewicz, A., Stroiakovski, D., Lichinitser, M., Dummer, R., Grange, F., Mortier, L., et al. (2014). Improved Overall Survival in Melanoma with Combined Dabrafenib and Trametinib (Massachusetts Medical Society).
- 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. (2015a). Pembrolizumab versus Ipilimumab in Advanced Melanoma (Massachusetts Medical Society).
- 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. (2015b). Nivolumab in Previously Untreated Melanoma without BRAF Mutation (Massachusetts Medical Society).
- Roberts, E.W., Broz, M.L., Binnewies, M., Headley, M.B., Nelson, A.E., Wolf, D.M., Kaisho, T., Bogunovic, D., Bhardwaj, N., and Krummel, M.F. (2016). Critical Role for CD103⁺/CD141⁺ Dendritic Cells Bearing CCR7 for Tumor Antigen Trafficking and Priming of T Cell Immunity in Melanoma. *Cancer Cell* *30*, 324–336.
- Rodenas, J.M., Delgado-Rodriguez, M., Herranz, M.T., Tercedor, J., and Serrano, S. (1996). Sun exposure, pigmentary traits, and risk of cutaneous malignant melanoma: a case-control study in a Mediterranean population. *Cancer Causes Control* *7*, 275–283.
- Rodríguez-Prados, J.-C., Través, P.G., Cuenca, J., Rico, D., Aragonés, J., Martín-Sanz, P., Cascante, M., and Boscá, L. (2010). Substrate Fate in Activated Macrophages: A Comparison between Innate, Classic, and Alternative Activation. *The Journal of Immunology* *185*, 605–614.

- 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 Multidrug Resistance in Melanoma by Blocking the Mitochondrial Respiratory Chain of Slow-Cycling JARID1Bhigh Cells. *Cancer Cell* 23, 811–825.
- Romaní-Aumedes, J., Canal, M., Martín-Flores, N., Sun, X., Pérez-Fernández, V., Wewering, S., Fernández-Santiago, R., Ezquerro, M., Pont-Sunyer, C., Lafuente, A., et al. (2014). Parkin loss of function contributes to RTP801 elevation and neurodegeneration in Parkinson's disease. *Cell Death Dis* 5, e1364.
- Roos, J.F., Qudsi, M., Samara, A., Rahim, M.M., Al-Bayedh, S.A., and Ahmed, H. (2019). Metformin for lung cancer prevention and improved survival: a novel approach. *European Journal of Cancer Prevention* 28, 311–315.
- Rosenberg, S.A., and Restifo, N.P. (2015). Adoptive cell transfer as personalized immunotherapy for human cancer. *Science* 348, 62–68.
- Rosenberg, S.A., Packard, B.S., Aebersold, P.M., Solomon, D., Topalian, S.L., Toy, S.T., Simon, P., Lotze, M.T., Yang, J.C., Seipp, C.A., et al. (1988). Use of Tumor-Infiltrating Lymphocytes and Interleukin-2 in the Immunotherapy of Patients with Metastatic Melanoma. *New England Journal of Medicine* 319, 1676–1680.
- Rosenberg, S.A., Yang, J.C., Sherry, R.M., Kammula, U.S., Hughes, M.S., Phan, G.Q., Citrin, D.E., Restifo, N.P., Robbins, P.F., Wunderlich, J.R., et al. (2011). Durable Complete Responses in Heavily Pretreated Patients with Metastatic Melanoma Using T-Cell Transfer Immunotherapy. *Clin Cancer Res* 17, 4550–4557.
- Ruchaud, S., Carmena, M., and Earnshaw, W.C. (2007). The Chromosomal Passenger Complex: One for All and All for One. *Cell* 131, 230–231.
- Rupp, L.J., Schumann, K., Roybal, K.T., Gate, R.E., Ye, C.J., Lim, W.A., and Marson, A. (2017). CRISPR/Cas9-mediated PD-1 disruption enhances anti-tumor efficacy of human chimeric antigen receptor T cells. *Scientific Reports* 7, 737.
- Russell, R.C., Tian, Y., Yuan, H., Park, H.W., Chang, Y.-Y., Kim, J., Kim, H., Neufeld, T.P., Dillin, A., and Guan, K.-L. (2013). ULK1 induces autophagy by phosphorylating Beclin-1 and activating Vps34 lipid kinase. *Nat Cell Biol* 15, 741–750.
- Ryabaya, O., Prokofieva, A., Akasov, R., Khochenkov, D., Emelyanova, M., Burov, S., Markvicheva, E., Inshakov, A., and Stepanova, E. (2019). Metformin increases antitumor activity of MEK inhibitor binimetinib in 2D and 3D models of human metastatic melanoma cells. *Biomed Pharmacother* 109, 2548–2560.
- Ryu, B., Kim, D.S., DeLuca, A.M., and Alani, R.M. (2007). Comprehensive Expression Profiling of Tumor Cell Lines Identifies Molecular Signatures of Melanoma Progression. *PLOS ONE* 2, e594.
- Saeedi, R., Parsons, H.L., Wambolt, R.B., Paulson, K., Sharma, V., Dyck, J.R.B., Brownsey, R.W., and Allard, M.F. (2008). Metabolic actions of metformin in the heart can occur by AMPK-independent mechanisms. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 294, H2497-2506.
- Saito, A., Kitayama, J., Horie, H., Koinuma, K., Ohzawa, H., Yamaguchi, H., Kawahira, H., Mimura, T., Lefor, A.K., and Sata, N. (2020). Metformin changes the immune microenvironment of colorectal cancer in patients with type 2 diabetes mellitus. *Cancer Sci* 111, 4012–4020.
- Saito, R., Nakauchi, H., and Watanabe, S. (2012). Serine/threonine kinase, Melk, regulates proliferation and glial differentiation of retinal progenitor cells. *Cancer Science* 103, 42–49.
- Saito, S., Furuno, A., Sakurai, J., Sakamoto, A., Park, H.-R., Shin-ya, K., Tsuruo, T., and Tomida, A. (2009). Chemical Genomics Identifies the Unfolded Protein Response as a Target for Selective Cancer Cell Killing during Glucose Deprivation. *Cancer Res* 69, 4225–4234.
- Saito, Y., Chapple, R.H., Lin, A., Kitano, A., and Nakada, D. (2015). AMPK Protects Leukemia-Initiating Cells in Myeloid Leukemias from Metabolic Stress in the Bone Marrow. *Cell Stem Cell* 17, 585–596.

- Sakamoto, K., McCarthy, A., Smith, D., Green, K.A., Grahame Hardie, D., Ashworth, A., and Alessi, D.R. (2005). Deficiency of LKB1 in skeletal muscle prevents AMPK activation and glucose uptake during contraction. *EMBO J* *24*, 1810–1820.
- Salerno, E.P., Olson, W.C., McSkimming, C., Shea, S., and Slingluff, C.L. (2014). T cells in the human metastatic melanoma microenvironment express site-specific homing receptors and retention integrins. *Int. J. Cancer* *134*, 563–574.
- Sancak, Y., Bar-Peled, L., Zoncu, R., Markhard, A.L., Nada, S., and Sabatini, D.M. (2010). Ragulator-Rag Complex Targets mTORC1 to the Lysosomal Surface and Is Necessary for Its Activation by Amino Acids. *Cell* *141*, 290–303.
- Sanders, M.J., Grondin, P.O., Hegarty, B.D., Snowden, M.A., and Carling, D. (2007). Investigating the mechanism for AMP activation of the AMP-activated protein kinase cascade. *Biochemical Journal* *403*, 139–148.
- Sanjabi, S., Hoffmann, A., Liou, H.-C., Baltimore, D., and Smale, S.T. (2000). Selective requirement for c-Rel during IL-12 P40 gene induction in macrophages. *PNAS* *97*, 12705–12710.
- Sarnaik, A., Khushalani, N.I., Chesney, J.A., Lewis, K.D., Medina, T.M., Kluger, H.M., Thomas, S.S., Domingo Musibay, E., Pavlick, A.C., Whitman, E.D., et al. (2020). Long-term follow up of lifileucel (LN-144) cryopreserved autologous tumor infiltrating lymphocyte therapy in patients with advanced melanoma progressed on multiple prior therapies. *JCO* *38*, 10006–10006.
- Sayour, E.J., and Mitchell, D.A. (2017). Manipulation of Innate and Adaptive Immunity through Cancer Vaccines. *J Immunol Res* *2017*.
- Schadendorf, D., Akkooi, A.C.J. van, Berking, C., Griewank, K.G., Gutzmer, R., Hauschild, A., Stang, A., Roesch, A., and Ugurel, S. (2018). Melanoma. *The Lancet* *392*, 971–984.
- Schafer, K.A. (1998). The Cell Cycle: A Review. *Vet Pathol* *35*, 461–478.
- Scharping, N.E., Menk, A.V., Whetstone, R.D., Zeng, X., and Delgoffe, G.M. (2017). Efficacy of PD-1 Blockade Is Potentiated by Metformin-Induced Reduction of Tumor Hypoxia. *Cancer Immunol Res* *5*, 9–16.
- Schietinger, A., Philip, M., Krisnawan, V.E., Chiu, E.Y., Delrow, J.J., Basom, R.S., Lauer, P., Brockstedt, D.G., Knoblaugh, S.E., Hämmerling, G.J., et al. (2016). Tumor-Specific T Cell Dysfunction Is a Dynamic Antigen-Driven Differentiation Program Initiated Early during Tumorigenesis. *Immunity* *45*, 389–401.
- Schneider, A., Younis, R.H., and Gutkind, J.S. (2008). Hypoxia-induced energy stress inhibits the mTOR pathway by activating an AMPK/REDD1 signaling axis in head and neck squamous cell carcinoma. *Neoplasia* *10*, 1295–1302.
- Schott, J., Reitter, S., Philipp, J., Haneke, K., Schäfer, H., and Stoecklin, G. (2014). Translational regulation of specific mRNAs controls feedback inhibition and survival during macrophage activation. *PLoS Genet* *10*, e1004368.
- Schreiber, R.D., Old, L.J., and Smyth, M.J. (2011). Cancer Immunoediting: Integrating Immunity's Roles in Cancer Suppression and Promotion. *Science* *331*, 1565–1570.
- Schumacher, T.N., and Schreiber, R.D. (2015). Neoantigens in cancer immunotherapy. *Science* *348*, 69–74.
- Schwarzer, R., Tondera, D., Arnold, W., Giese, K., Klippel, A., and Kaufmann, J. (2005). REDD1 integrates hypoxia-mediated survival signaling downstream of phosphatidylinositol 3-kinase. *Oncogene* *24*, 1138–1149.
- Seabright, A.P., Fine, N.H.F., Barlow, J.P., Lord, S.O., Musa, I., Gray, A., Bryant, J.A., Banzhaf, M., Lavery, G.G., Hardie, D.G., et al. (2020). AMPK activation induces mitophagy and promotes mitochondrial fission while activating TBK1 in a PINK1-Parkin independent manner. *FASEB J* *34*, 6284–6301.
- Selby, M.J., Engelhardt, J.J., Johnston, R.J., Lu, L.-S., Han, M., Thudium, K., Yao, D., Quigley, M., Valle, J., Wang, C., et al. (2016). Preclinical Development of Ipilimumab and Nivolumab Combination Immunotherapy: Mouse Tumor Models, In Vitro Functional Studies, and Cynomolgus Macaque Toxicology. *PLOS ONE* *11*, e0161779.

- Sengupta, S., and Harris, C.C. (2005). p53: traffic cop at the crossroads of DNA repair and recombination. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 6, 44–55.
- Seong, H.-A., Gil, M., Kim, K.-T., Kim, S.-J., and Ha, H. (2002). Phosphorylation of a novel zinc-finger-like protein, ZPR9, by murine protein serine/threonine kinase 38 (MPK38). *Biochem J* 361, 597–604.
- Seong, H.-A., Kim, K.-T., and Ha, H. (2003). Enhancement of B-MYB Transcriptional Activity by ZPR9, a Novel Zinc Finger Protein*. *Journal of Biological Chemistry* 278, 9655–9662.
- Seong, H.-A., Jung, H., and Ha, H. (2010). Murine Protein Serine/Threonine Kinase 38 Stimulates TGF- β Signaling in a Kinase-dependent Manner via Direct Phosphorylation of Smad Proteins*. *Journal of Biological Chemistry* 285, 30959–30970.
- Seong, H.-A., Jung, H., Manoharan, R., and Ha, H. (2012). PDK1 Protein Phosphorylation at Thr354 by Murine Protein Serine-Threonine Kinase 38 Contributes to Negative Regulation of PDK1 Protein Activity*. *Journal of Biological Chemistry* 287, 20811–20822.
- Seong, H.-A., Manoharan, R., and Ha, H. (2014). A crucial role for the phosphorylation of STRAP at Ser188 by MPK38 in STRAP-dependent cell death through ASK1, TGF- β , p53, and PI3K/PDK1 signaling pathways. *Cell Cycle* 13, 3357–3374.
- Settleman, J., Sawyers, C.L., and Hunter, T. (2018). Challenges in validating candidate therapeutic targets in cancer. *ELife* 7, e32402.
- Shain, A.H., and Bastian, B.C. (2016). From melanocytes to melanomas. *Nat Rev Cancer* 16, 345–358.
- 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. *New England Journal of Medicine* 373, 1926–1936.
- Shanker, A., and Marincola, F.M. (2011). Cooperativity of adaptive and innate immunity: implications for cancer therapy. *Cancer Immunol Immunother* 60, 1061–1074.
- Sharma, P., Hu-Lieskovan, S., Wargo, J.A., and Ribas, A. (2017). Primary, Adaptive, and Acquired Resistance to Cancer Immunotherapy. *Cell* 168, 707–723.
- Shi, G., Yang, Q., Zhang, Y., Jiang, Q., Lin, Y., Yang, S., Wang, H., Cheng, L., Zhang, X., Li, Y., et al. (2019). Modulating the Tumor Microenvironment via Oncolytic Viruses and CSF-1R Inhibition Synergistically Enhances Anti-PD-1 Immunotherapy. *Mol Ther* 27, 244–260.
- Shin, D.S., Zaretsky, J.M., Escuin-Ordinas, H., Garcia-Diaz, A., Hu-Lieskovan, S., Kalbasi, A., Grasso, C.S., Hugo, W., Sandoval, S., Torrejon, D.Y., et al. (2017). Primary Resistance to PD-1 Blockade Mediated by JAK1/2 Mutations. *Cancer Discov* 7, 188–201.
- Short, J.D., Dere, R., Houston, K.D., Cai, S.-L., Kim, J., Bergeron, J.M., Shen, J., Liang, J., Bedford, M.T., Mills, G.B., et al. (2010). AMPK-Mediated Phosphorylation of Murine p27 at T197 Promotes Binding of 14-3-3 Proteins and Increases p27 Stability. *Mol Carcinog* 49.
- Shoshani, T., Faerman, A., Mett, I., Zelin, E., Tenne, T., Gorodin, S., Moshel, Y., Elbaz, S., Budanov, A., Chajut, A., et al. (2002). Identification of a novel hypoxia-inducible factor 1-responsive gene, RTP801, involved in apoptosis. *Mol Cell Biol* 22, 2283–2293.
- Shu, Y., Sheardown, S.A., Brown, C., Owen, R.P., Zhang, S., Castro, R.A., Ianculescu, A.G., Yue, L., Lo, J.C., Burchard, E.G., et al. (2007). Effect of genetic variation in the organic cation transporter 1 (OCT1) on metformin action. *J Clin Invest* 117, 1422–1431.
- Sica, A., and Mantovani, A. (2012). Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. *J Clin Invest* 122, 787–795.

- Siddiquee, K.A.Z., and Turkson, J. (2008). STAT3 as a target for inducing apoptosis in solid and hematological tumors. *Cell Res* 18, 254–267.
- Simon, B., and Uslu, U. (2018). CAR-T cell therapy in melanoma: A future success story? *Experimental Dermatology* 27, 1315–1321.
- Simon, B., Wiesinger, M., März, J., Wistuba-Hamprecht, K., Weide, B., Schuler-Thurner, B., Schuler, G., Dörrie, J., and Uslu, U. (2018a). The Generation of CAR-Transfected Natural Killer T Cells for the Immunotherapy of Melanoma. *International Journal of Molecular Sciences* 19, 2365.
- Simon, B., Harrer, D.C., Schuler-Thurner, B., Schaft, N., Schuler, G., Dörrie, J., and Uslu, U. (2018b). The siRNA-mediated downregulation of PD-1 alone or simultaneously with CTLA-4 shows enhanced in vitro CAR-T-cell functionality for further clinical development towards the potential use in immunotherapy of melanoma. *Experimental Dermatology* 27, 769–778.
- Simpson, T.R., Li, F., Montalvo-Ortiz, W., Sepulveda, M.A., Bergerhoff, K., Arce, F., Roddie, C., Henry, J.Y., Yagita, H., Wolchok, J.D., et al. (2013). Fc-dependent depletion of tumor-infiltrating regulatory T cells co-defines the efficacy of anti-CTLA-4 therapy against melanoma. *Journal of Experimental Medicine* 210, 1695–1710.
- Sinha, I., Allen, J.E., Pinto, J.T., and Sinha, R. (2014). Methylseleninic acid elevates REDD1 and inhibits prostate cancer cell growth despite AKT activation and mTOR dysregulation in hypoxia. *Cancer Medicine* 3, 252–264.
- Smith, T.D., Tse, M.J., Read, E.L., and Liu, W.F. (2016). Regulation of macrophage polarization and plasticity by complex activation signals. *Integrative Biology* 8, 946–955.
- Sofer, A., Lei, K., Johannessen, C.M., and Ellisen, L.W. (2005). Regulation of mTOR and Cell Growth in Response to Energy Stress by REDD1. *Molecular and Cellular Biology* 25, 5834–5845.
- Sommermeier, D., Hudecek, M., Kosasih, P.L., Gogishvili, T., Maloney, D.G., Turtle, C.J., and Riddell, S.R. (2016). Chimeric antigen receptor-modified T cells derived from defined CD8 + and CD4 + subsets confer superior antitumor reactivity in vivo. *Leukemia* 30, 492–500.
- Song, X., Kim, S.-Y., Zhang, L., Tang, D., Bartlett, D.L., Kwon, Y.T., and Lee, Y.J. (2014). Role of AMP-activated protein kinase in cross-talk between apoptosis and autophagy in human colon cancer. *Cell Death & Disease* 5, e1504–e1504.
- Spranger, S., Bao, R., and Gajewski, T.F. (2015). Melanoma-intrinsic β -catenin signalling prevents anti-tumour immunity. *Nature* 523, 231–235.
- Stefaniak, J., and Huber, K.V.M. (2020). Importance of Quantifying Drug-Target Engagement in Cells. *ACS Med. Chem. Lett.* 11, 403–406.
- Steinberg, G.R., and Kemp, B.E. (2009). AMPK in Health and Disease. *Physiological Reviews* 89, 1025–1078.
- Steiner, J.L., Crowell, K.T., Kimball, S.R., and Lang, C.H. (2015). Disruption of REDD1 gene ameliorates sepsis-induced decrease in mTORC1 signaling but has divergent effects on proteolytic signaling in skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 309, E981-994.
- Steininger, J., Gellrich, F.F., Schulz, A., Westphal, D., Beisert, S., and Meier, F. (2021). Systemic Therapy of Metastatic Melanoma: On the Road to Cure. *Cancers (Basel)* 13.
- Stevens, A.M., Xiang, M., Heppler, L.N., Tošić, I., Jiang, K., Munoz, J.O., Gaikwad, A.S., Horton, T.M., Long, X., Narayanan, P., et al. (2019). Atovaquone is active against AML by upregulating the integrated stress pathway and suppressing oxidative phosphorylation. *Blood Advances* 3, 4215–4227.
- Strowig, T., Gurer, C., Ploss, A., Liu, Y.-F., Arrey, F., Sashihara, J., Koo, G., Rice, C.M., Young, J.W., Chadburn, A., et al. (2009). Priming of protective T cell responses against virus-induced tumors in mice with human immune system components. *Journal of Experimental Medicine* 206, 1423–1434.

- Su, X., Yu, Y., Zhong, Y., Giannopoulou, E.G., Hu, X., Liu, H., Cross, J.R., Rättsch, G., Rice, C.M., and Ivashkiv, L.B. (2015). Interferon- γ regulates cellular metabolism and mRNA translation to potentiate macrophage activation. *Nature Immunology* *16*, 838–849.
- Sujobert, P., Poulain, L., Paubelle, E., Zylbersztejn, F., Grenier, A., Lambert, M., Townsend, E.C., Brusq, J.-M., Nicodeme, E., Decroocq, J., et al. (2015). Co-activation of AMPK and mTORC1 Induces Cytotoxicity in Acute Myeloid Leukemia. *Cell Reports* *11*, 1446–1457.
- Sykes, S.M., Mellert, H.S., Holbert, M.A., Li, K., Marmorstein, R., Lane, W.S., and McMahon, S.B. (2006). Acetylation of the p53 DNA binding domain regulates apoptosis induction. *Mol Cell* *24*, 841–851.
- Tamargo-Gómez, I., and Mariño, G. (2018). AMPK: Regulation of Metabolic Dynamics in the Context of Autophagy. *Int J Mol Sci* *19*.
- Tan, C.Y., and Hagen, T. (2013). mTORC1 Dependent Regulation of REDD1 Protein Stability. *PLOS ONE* *8*, e63970.
- Tan, K.T., Yeh, C.-N., Chang, Y.-C., Cheng, J.-H., Fang, W.-L., Yeh, Y.-C., Wang, Y.-C., Hsu, D.S.-S., Wu, C.-E., Lai, J.-I., et al. (2020). PRKDC: new biomarker and drug target for checkpoint blockade immunotherapy. *J Immunother Cancer* *8*.
- Tang, F., and Zheng, P. (2018). Tumor cells versus host immune cells: whose PD-L1 contributes to PD-1/PD-L1 blockade mediated cancer immunotherapy? *Cell & Bioscience* *8*, 34.
- Tang, Q., Li, W., Zheng, X., Ren, L., Liu, J., Li, S., Wang, J., and Du, G. (2020). MELK is an oncogenic kinase essential for metastasis, mitotic progression, and programmed death in lung carcinoma. *Signal Transduct Target Ther* *5*.
- Taniura, T., Iida, Y., Kotani, H., Ishitobi, K., Tajima, Y., and Harada, M. (2020). Immunogenic chemotherapy in two mouse colon cancer models. *Cancer Sci* *111*, 3527–3539.
- Taniyama, D., Taniyama, K., Kuraoka, K., Yamamoto, H., Zaito, J., Saito, A., Sakamoto, N., Sentani, K., Oue, N., and Yasui, W. (2019). CD204-Positive Tumor-associated Macrophages Relate to Malignant Transformation of Colorectal Adenoma. *Anticancer Res* *39*, 2767–2775.
- Thangaraj, K., Ponnusamy, L., Natarajan, S.R., and Manoharan, R. (2020). MELK/MPK38 in cancer: from mechanistic aspects to therapeutic strategies. *Drug Discovery Today* *25*, 2161–2173.
- The Cancer Genome Atlas Network (2015). Genomic Classification of Cutaneous Melanoma. *Cell* *161*, 1681–1696.
- Thomas, A.J., and Erickson, C.A. (2008). The making of a melanocyte: the specification of melanoblasts from the neural crest. *Pigment Cell & Melanoma Research* *21*, 598–610.
- Thomas, L (1959). *Cellular and Humoral Aspects of the Hypersensitive States*. (New York, Hoeber & Harper), p.
- Thommen, D.S., Schreiner, J., Müller, P., Herzig, P., Roller, A., Belousov, A., Umana, P., Pisa, P., Klein, C., Bacac, M., et al. (2015). Progression of Lung Cancer Is Associated with Increased Dysfunction of T Cells Defined by Coexpression of Multiple Inhibitory Receptors. *Cancer Immunol Res* *3*, 1344–1355.
- Thompson, J.W., Nagel, J., Hoving, S., Gerrits, B., Bauer, A., Thomas, J.R., Kirschner, M.W., Schirle, M., and Luchansky, S.J. (2014). Quantitative Lys- ϵ -Gly-Gly (diGly) Proteomics Coupled with Inducible RNAi Reveals Ubiquitin-mediated Proteolysis of DNA Damage-inducible Transcript 4 (DDIT4) by the E3 Ligase HUWE1. *Journal of Biological Chemistry* *289*, 28942–28955.
- Togashi, Y., Shitara, K., and Nishikawa, H. (2019). Regulatory T cells in cancer immunosuppression — implications for anticancer therapy. *Nature Reviews Clinical Oncology* *16*, 356–371.
- Tokajuk, A., Krzyżanowska-Grycel, E., Tokajuk, A., Grycel, S., Sadowska, A., and Car, H. (2015). Antidiabetic drugs and risk of cancer. *Pharmacol Rep* *67*, 1240–1250.

- Tomic, T., Botton, T., Cerezo, M., Robert, G., Luciano, F., Puissant, A., Gounon, P., Allegra, M., Bertolotto, C., Bereder, J.-M., et al. (2011). Metformin inhibits melanoma development through autophagy and apoptosis mechanisms. *Cell Death & Disease* 2, e199–e199.
- Tonnessen-Murray, C.A., Lozano, G., and Jackson, J.G. (2017). The Regulation of Cellular Functions by the p53 Protein: Cellular Senescence. *Cold Spring Harb Perspect Med* 7, a026112.
- Tran, E., Turcotte, S., Gros, A., Robbins, P.F., Lu, Y.-C., Dudley, M.E., Wunderlich, J.R., Somerville, R.P., Hogan, K., Hinrichs, C.S., et al. (2014). Cancer Immunotherapy Based on Mutation-Specific CD4+ T Cells in a Patient with Epithelial Cancer. *Science* 344, 641–645.
- Trikha, P., Plews, R.L., Stiff, A., Gautam, S., Hsu, V., Abood, D., Wesolowski, R., Landi, I., Mo, X., Phay, J., et al. (2016). Targeting myeloid-derived suppressor cells using a novel adenosine monophosphate-activated protein kinase (AMPK) activator. *Oncoimmunology* 5.
- Trousil, S., Chen, S., Mu, C., Shaw, F.M., Yao, Z., Ran, Y., Shakuntala, T., Merghoub, T., Manstein, D., Rosen, N., et al. (2017). Phenformin Enhances the Efficacy of ERK Inhibition in NF1-Mutant Melanoma. *Journal of Investigative Dermatology* 137, 1135–1143.
- Tsao, H. (2004). Management of Cutaneous Melanoma. *The New England Journal of Medicine* 15.
- Tseng, H.-W., Li, S.-C., and Tsai, K.-W. (2019). Metformin Treatment Suppresses Melanoma Cell Growth and Motility Through Modulation of microRNA Expression. *Cancers (Basel)* 11.
- Tucci, M., Stucci, S., Passarelli, A., Giudice, G., Dammacco, F., and Silvestris, F. (2014). The immune escape in melanoma: role of the impaired dendritic cell function. *Expert Rev Clin Immunol* 10, 1395–1404.
- Tudor, D., Nenu, I., Filip, G.A., Olteanu, D., Cenariu, M., Tabaran, F., Ion, R.M., Gligor, L., and Baldea, I. (2017). Combined regimen of photodynamic therapy mediated by Gallium phthalocyanine chloride and Metformin enhances anti-melanoma efficacy. *PLOS ONE* 12, e0173241.
- Tugal Derin, Liao Xudong, and Jain Mukesh K. (2013). Transcriptional Control of Macrophage Polarization. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 33, 1135–1144.
- Tumeh, P.C., Harview, C.L., Yearley, J.H., Shintaku, I.P., Taylor, E.J.M., Robert, L., Chmielowski, B., Spasic, M., Henry, G., Ciobanu, V., et al. (2014). PD-1 blockade induces responses by inhibiting adaptive immune resistance. *Nature* 515, 568–571.
- Umansky, V., and Sevko, A. (2012). Melanoma-induced immunosuppression and its neutralization. *Seminars in Cancer Biology* 22, 319–326.
- Vadysirisack, D.D., Baenke, F., Ory, B., Lei, K., and Ellisen, L.W. (2011). Feedback Control of p53 Translation by REDD1 and mTORC1 Limits the p53-Dependent DNA Damage Response. *Mol Cell Biol* 31, 4356–4365.
- Valtorta, S., Dico, A.L., Raccagni, I., Gaglio, D., Belloli, S., Politi, L.S., Martelli, C., Diceglie, C., Bonanomi, M., Ercoli, G., et al. (2017). Metformin and temozolomide, a synergic option to overcome resistance in glioblastoma multiforme models. *Oncotarget* 8, 113090–113104.
- Van der Leest, R.J.T., Flohil, S.C., Arends, L.R., Vries, E. de, and Nijsten, T. (2015). Risk of subsequent cutaneous malignancy in patients with prior melanoma: a systematic review and meta-analysis. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology* 29, 1053–1062.
- Vara-Ciruelos, D., Dandapani, M., and Hardie, D.G. (2020). AMP-Activated Protein Kinase: Friend or Foe in Cancer? *Annu. Rev. Cancer Biol.* 4, 1–16.
- Vats, D., Mukundan, L., Odegaard, J.I., Zhang, L., Smith, K.L., Morel, C.R., Greaves, D.R., Murray, P.J., and Chawla, A. (2006). Oxidative metabolism and PGC-1 β attenuate macrophage-mediated inflammation. *Cell Metabolism* 4, 13–24.

- Vazquez-Martin, A., Oliveras-Ferraros, C., Cufí, S., Martin-Castillo, B., and Menendez, J.A. (2011). Metformin activates an Ataxia Telangiectasia Mutated (ATM)/Chk2-regulated DNA damage-like response. *Cell Cycle* 10, 1499–1501.
- Vega-Rubin-de-Celis, S., Abdallah, Z., Kinch, L., Grishin, N.V., Brugarolas, J., and Zhang, X. (2010). Structural Analysis and Functional Implications of the Negative mTORC1 Regulator REDD1. *Biochemistry* 49, 2491–2501.
- Viguiet, M., Lemaître, F., Verola, O., Cho, M.-S., Gorochoy, G., Dubertret, L., Bachelez, H., Kourilsky, P., and Ferradini, L. (2004). Foxp3 Expressing CD4+CD25high Regulatory T Cells Are Overrepresented in Human Metastatic Melanoma Lymph Nodes and Inhibit the Function of Infiltrating T Cells. *The Journal of Immunology* 173, 1444–1453.
- Villunger, A., Michalak, E.M., Coultas, L., Müllauer, F., Böck, G., Ausserlechner, M.J., Adams, J.M., and Strasser, A. (2003). p53- and Drug-Induced Apoptotic Responses Mediated by BH3-Only Proteins Puma and Noxa. *Science* 302, 1036–1038.
- Vousden, K.H., and Prives, C. (2009). Blinded by the Light: The Growing Complexity of p53. *Cell* 137, 413–431.
- Vulsteke, V., Beullens, M., Boudrez, A., Keppens, S., Eynde, A.V., Rider, M.H., Stalmans, W., and Bollen, M. (2004). Inhibition of Spliceosome Assembly by the Cell Cycle-regulated Protein Kinase MELK and Involvement of Splicing Factor NIPP1 *. *Journal of Biological Chemistry* 279, 8642–8647.
- Wagle, N., Emery, C., Berger, M.F., Davis, M.J., Sawyer, A., Pochanard, P., Kehoe, S.M., Johannessen, C.M., Macconail, 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, M., and Su, P. (2018). The role of the Fas/FasL signaling pathway in environmental toxicant-induced testicular cell apoptosis: An update. *Systems Biology in Reproductive Medicine* 64, 93–102.
- Wang, H., Yang, L., Wang, D., Zhang, Q., and Zhang, L. (2017a). Pro-tumor activities of macrophages in the progression of melanoma. *Human Vaccines & Immunotherapeutics* 13, 1556–1562.
- Wang, J., Perry, C.J., Meeth, K., Thakral, D., Damsky, W., Micevic, G., Kaech, S., Blenman, K., and Bosenberg, M. (2017b). UV-induced somatic mutations elicit a functional T cell response in the YUMMER1.7 mouse melanoma model. *Pigment Cell Melanoma Res* 30, 428–435.
- Wang, J., Sun, X., Ma, Q., Fu, G., Cong, L., Zhang, H., Fan, D., Feng, J., Lu, S., Liu, J., et al. (2018a). Metformin's antitumour and anti-angiogenic activities are mediated by skewing macrophage polarization. *J Cell Mol Med* 22, 3825–3836.
- Wang, J., Wang, Y., Shen, F., Xu, Y., Zhang, Y., Zou, X., Zhou, J., and Chen, Y. (2018b). Maternal embryonic leucine zipper kinase: A novel biomarker and a potential therapeutic target of cervical cancer. *Cancer Medicine* 7, 5665–5678.
- Wang, L.-W., Li, Z.-S., Zou, D.-W., Jin, Z.-D., Gao, J., and Xu, G.-M. (2008). Metformin induces apoptosis of pancreatic cancer cells. *World J Gastroenterol* 14, 7192–7198.
- Wang, M., Yao, L.-C., Cheng, M., Cai, D., Martinek, J., Pan, C.-X., Shi, W., Ma, A.-H., White, R.W. de V., Airhart, S., et al. (2018c). Humanized mice in studying efficacy and mechanisms of PD-1-targeted cancer immunotherapy. *The FASEB Journal* 32, 1537–1549.
- Wang, S., He, Z., Wang, X., Li, H., and Liu, X.-S. (2019). Antigen presentation and tumor immunogenicity in cancer immunotherapy response prediction. *ELife* 8.
- Wang, Y., Lee, Y.-M., Baitsch, L., Huang, A., Xiang, Y., Tong, H., Lako, A., Von, T., Choi, C., Lim, E., et al. (2014). MELK is an oncogenic kinase essential for mitotic progression in basal-like breast cancer cells. *ELife* 3, e01763.
- Wang, Y., Han, E., Xing, Q., Yan, J., Arrington, A., Wang, C., Tully, D., Kowolik, C.M., Lu, D.M., Frankel, P.H., et al. (2015). Baicalein upregulates DDIT4 expression which mediates mTOR inhibition and growth inhibition in cancer cells. *Cancer Letters* 358, 170–179.

Wang, Y., Begley, M., Li, Q., Huang, H.-T., Lako, A., Eck, M.J., Gray, N.S., Mitchison, T.J., Cantley, L.C., and Zhao, J.J. (2016). Mitotic MELK-eIF4B signaling controls protein synthesis and tumor cell survival. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *113*, 9810–9815.

Watanabe, C.K. (1918). STUDIES IN THE METABOLISM CHANGES INDUCED BY ADMINISTRATION OF GUANIDINE BASES. *Journal of Biological Chemistry* *33*, 253–265.

Weber, J.S., Minor, D.R., D'Angelo, S.P., Hodi, F.S., Gutzmer, R., Neyns, B., Hoeller, C., Khushalani, N.I., Miller, W.H., Grob, J.-J., et al. (2014). LBA3_PR - A Phase 3 Randomized, Open-Label Study of Nivolumab (Anti-Pd-1; Bms-936558; Ono-4538) Versus Investigator'S Choice Chemotherapy (Icc) in Patients with Advanced Melanoma After Prior Anti-Ctla-4 Therapy. *Annals of Oncology* *25*, v1.

Weerasekara, V.K., Panek, D.J., Broadbent, D.G., Mortenson, J.B., Mathis, A.D., Logan, G.N., Prince, J.T., Thomson, D.M., Thompson, J.W., and Andersen, J.L. (2014). Metabolic-Stress-Induced Rearrangement of the 14-3-3 ζ Interactome Promotes Autophagy via a ULK1- and AMPK-Regulated 14-3-3 ζ Interaction with Phosphorylated Atg9. *Mol Cell Biol* *34*, 4379–4388.

Wei, Z., Zhang, X., Yong, T., Bie, N., Zhan, G., Li, X., Liang, Q., Li, J., Yu, J., Huang, G., et al. (2021). Boosting anti-PD-1 therapy with metformin-loaded macrophage-derived microparticles. *Nature Communications* *12*, 440.

Wen, Y., Liu, Y., Chen, C., Chi, J., Zhong, L., Zhao, Y., and Zhao, Y. (2021). Metformin loaded porous particles with bio-microenvironment responsiveness for promoting tumor immunotherapy. *Biomater Sci* *9*, 2082–2089.

Wheaton, W.W., Weinberg, S.E., Hamanaka, R.B., Soberanes, S., Sullivan, L.B., Anso, E., Glasauer, A., Dufour, E., Mutlu, G.M., Budigner, G.S., et al. (2014). Metformin inhibits mitochondrial complex I of cancer cells to reduce tumorigenesis. *Elife* *3*, e02242.

Whitney, M.L., Jefferson, L.S., and Kimball, S.R. (2009). ATF4 is necessary and sufficient for ER stress-induced upregulation of REDD1 expression. *Biochemical and Biophysical Research Communications* *379*, 451–455.

Wijdeven, R.H., van Luijn, M.M., Wierenga-Wolf, A.F., Akkermans, J.J., van den Elsen, P.J., Hintzen, R.Q., and Neefjes, J. (2018). Chemical and genetic control of IFN γ -induced MHCII expression. *EMBO Reports* *19*, e45553.

Williams, A.B., and Schumacher, B. (2016). p53 in the DNA-Damage-Repair Process. *Cold Spring Harb Perspect Med* *6*, a026070.

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. *New England Journal of Medicine* *377*, 1345–1356.

Wu, H., Esteve, E., Tremaroli, V., Khan, M.T., Caesar, R., Mannerås-Holm, L., Ståhlman, M., Olsson, L.M., Serino, M., Planas-Fèlix, M., et al. (2017). Metformin alters the gut microbiome of individuals with treatment-naïve type 2 diabetes, contributing to the therapeutic effects of the drug. *Nature Medicine* *23*, 850–858.

Wu, N., Gu, C., Gu, H., Hu, H., Han, Y., and Li, Q. (2011). Metformin induces apoptosis of lung cancer cells through activating JNK/p38 MAPK pathway and GADD153. *Neoplasma* *58*, 482–490.

Xia, H., Kong, S.N., Chen, J., Shi, M., Sekar, K., Seshachalam, V.P., Rajasekaran, M., Goh, B.K.P., Ooi, L.L., and Hui, K.M. (2016). MELK is an oncogenic kinase essential for early hepatocellular carcinoma recurrence. *Cancer Letters* *383*, 85–93.

Xie, Z., Dong, Y., Scholz, R., Neumann, D., and Zou, M.-H. (2008). Phosphorylation of LKB1 at serine 428 by protein kinase C-zeta is required for metformin-enhanced activation of the AMP-activated protein kinase in endothelial cells. *Circulation* *117*, 952–962.

Xu, M.-C., Shi, H.-M., Wang, H., and Gao, X.-F. (2013). Salidroside protects against hydrogen peroxide-induced injury in HUVECs via the regulation of REDD1 and mTOR activation. *Molecular Medicine Reports* *8*, 147–153.

- Yang, J., Riella, L.V., Chock, S., Liu, T., Zhao, X., Yuan, X., Paterson, A.M., Watanabe, T., Vanguri, V., Yagita, H., et al. (2011). The Novel Costimulatory Programmed Death Ligand 1/B7.1 Pathway Is Functional in Inhibiting Alloimmune Responses In Vivo. *The Journal of Immunology* *187*, 1113–1119.
- Ye, H., Liu, Y., Wu, K., Luo, H., and Cui, L. (2020). AMPK activation overcomes anti-EGFR antibody resistance induced by KRAS mutation in colorectal cancer. *Cell Communication and Signaling* *18*, 115.
- Yee, D. (2006). Targeting insulin-like growth factor pathways. *British Journal of Cancer* *94*, 465–468.
- Yousef, M., and Tsiani, E. (2017). Metformin in Lung Cancer: Review of in Vitro and in Vivo Animal Studies. *Cancers (Basel)* *9*.
- Yu, C., Liu, X., Yang, J., Zhang, M., Jin, H., Ma, X., and Shi, H. (2019). Combination of Immunotherapy With Targeted Therapy: Theory and Practice in Metastatic Melanoma. *Front Immunol* *10*.
- Yuan, H.-X., Xiong, Y., and Guan, K.-L. (2013a). Nutrient Sensing, Metabolism, and Cell Growth Control. *Molecular Cell* *49*, 379–387.
- Yuan, J., Luo, K., Zhang, L., Cheville, J., and Lou, Z. (2010). USP10 Regulates p53 Localization and Stability by Deubiquitinating p53. *Cell* *140*, 384.
- Yuan, P., Ito, K., Perez-Lorenzo, R., Del Guzzo, C., Lee, J.H., Shen, C.-H., Bosenberg, M.W., McMahon, M., Cantley, L.C., and Zheng, B. (2013b). Phenformin enhances the therapeutic benefit of BRAF(V600E) inhibition in melanoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* *110*, 18226–18231.
- Yun, S.-M., Woo, S.H., Oh, S.T., Hong, S.-E., Choe, T.-B., Ye, S.-K., Kim, E.-K., Seong, M.K., Kim, H.-A., Noh, W.C., et al. (2016). Melatonin enhances arsenic trioxide-induced cell death via sustained upregulation of Redd1 expression in breast cancer cells. *Molecular and Cellular Endocrinology* *422*, 64–73.
- Zabierowski, S.E., and Herlyn, M. (2008). Learning the ABCs of Melanoma-Initiating Cells. *Cancer Cell* *13*, 185–187.
- Zadra, G., Photopoulos, C., Tyekucheva, S., Heidari, P., Weng, Q.P., Fedele, G., Liu, H., Scaglia, N., Priolo, C., Sicinska, E., et al. (2014). A novel direct activator of AMPK inhibits prostate cancer growth by blocking lipogenesis. *EMBO Molecular Medicine* *6*, 519–538.
- Zaretsky, J.M., Garcia-Diaz, A., Shin, D.S., Escuin-Ordinas, H., Hugo, W., Hu-Lieskovan, S., Torrejon, D.Y., Abril-Rodriguez, G., Sandoval, S., Barthly, L., et al. (2016). Mutations Associated with Acquired Resistance to PD-1 Blockade in Melanoma. *New England Journal of Medicine* *375*, 819–829.
- Zhang, G., Frederick, D.T., Wu, L., Wei, Z., Krepler, C., Srinivasan, S., Chae, Y.C., Xu, X., Choi, H., Dimwamwa, E., et al. (2016). Targeting mitochondrial biogenesis to overcome drug resistance to MAPK inhibitors. *J Clin Invest* *126*, 1834–1856.
- Zhang, J.-W., Zhao, F., and Sun, Q. (2018a). Metformin synergizes with rapamycin to inhibit the growth of pancreatic cancer in vitro and in vivo. *Oncology Letters* *15*, 1811–1816.
- Zhang, L., Li, J., Wang, Q., Meng, G., Lv, X., Zhou, H., Li, W., and Zhang, J. (2017a). The relationship between microRNAs and the STAT3-related signaling pathway in cancer. *Tumour Biol.* *39*, 1010428317719869.
- Zhang, S., Kohli, K., Black, R.G., Yao, L., Spadinger, S.M., He, Q., Pillarisetty, V.G., Cranmer, L.D., Tine, B.A.V., Yee, C., et al. (2019). Systemic Interferon- γ Increases MHC Class I Expression and T-cell Infiltration in Cold Tumors: Results of a Phase 0 Clinical Trial. *Cancer Immunol Res* *7*, 1237–1243.
- Zhang, Y., Kurupati, R., Liu, L., Zhou, X.Y., Zhang, G., Hudaihed, A., Filisio, F., Giles-Davis, W., Xu, X., Karakousis, G.C., et al. (2017b). Enhancing CD8+ T Cell Fatty Acid Catabolism within a Metabolically Challenging Tumor Microenvironment Increases the Efficacy of Melanoma Immunotherapy. *Cancer Cell* *32*, 377–391.e9.
- Zhang, Y., Zhou, X., Li, Y., Xu, Y., Lu, K., Li, P., and Wang, X. (2018b). Inhibition of maternal embryonic leucine zipper kinase with OTSSP167 displays potent anti-leukemic effects in chronic lymphocytic leukemia. *Oncogene* *37*, 5520–5533.

- Zhang, Z., Li, F., Tian, Y., Cao, L., Gao, Q., Zhang, C., Zhang, K., Shen, C., Ping, Y., Maimela, N.R., et al. (2020a). Metformin Enhances the Antitumor Activity of CD8+ T Lymphocytes via the AMPK–miR-107–Eomes–PD-1 Pathway. *The Journal of Immunology*.
- Zhang, Z., Sun, C., Li, C., Jiao, X., Griffin, B.B., Dongol, S., Wu, H., Zhang, C., Cao, W., Dong, R., et al. (2020b). Upregulated MELK Leads to Doxorubicin Chemoresistance and M2 Macrophage Polarization via the miR-34a/JAK2/STAT3 Pathway in Uterine Leiomyosarcoma. *Front. Oncol.* 10.
- Zhang, Z., Jiang, Z., Zhang, Y., Zhang, Y., Yan, Y., Bhushan, S., Meinhardt, A., Qin, Z., and Wang, M. (2020c). Corticosterone Enhances the AMPK-Mediated Immunosuppressive Phenotype of Testicular Macrophages During Uropathogenic *Escherichia coli* Induced Orchitis. *Front. Immunol.* 11.
- Zhang, Z., Liu, S., Zhang, B., Qiao, L., Zhang, Y., and Zhang, Y. (2020d). T Cell Dysfunction and Exhaustion in Cancer. *Front. Cell Dev. Biol.* 8.
- Zhao, H., Swanson, K.D., and Zheng, B. (2021). Therapeutic Repurposing of Biguanides in Cancer. *Trends Cancer*.
- Zhao, Y., Du, T., Du, L., Li, P., Li, J., Duan, W., Wang, Y., and Wang, C. (2019a). Long noncoding RNA LINC02418 regulates MELK expression by acting as a ceRNA and may serve as a diagnostic marker for colorectal cancer. *Cell Death Dis* 10.
- Zhao, Z., Zheng, L., Chen, W., Weng, W., Song, J., and Ji, J. (2019b). Delivery strategies of cancer immunotherapy: recent advances and future perspectives. *Journal of Hematology & Oncology* 12, 126.
- Zheng, X., Weigert, A., Reu, S., Guenther, S., Mansouri, S., Bassaly, B., Gattenlöhner, S., Grimminger, F., Pullamsetti, S., Seeger, W., et al. (2020). Spatial Density and Distribution of Tumor-Associated Macrophages Predict Survival in Non-Small Cell Lung Carcinoma. *Cancer Res* 80, 4414–4425.
- Zhong, W., Myers, J.S., Wang, F., Wang, K., Lucas, J., Rosfjord, E., Lucas, J., Hooper, A.T., Yang, S., Lemon, L.A., et al. (2020). Comparison of the molecular and cellular phenotypes of common mouse syngeneic models with human tumors. *BMC Genomics* 21, 2.
- Zhou, G., Myers, R., Li, Y., Chen, Y., Shen, X., Fenyk-Melody, J., Wu, M., Ventre, J., Doebber, T., Fujii, N., et al. (2001). Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action. *J Clin Invest* 108, 1167–1174.
- Zhu, Y., Knolhoff, B.L., Meyer, M.A., Nywening, T.M., West, B.L., Luo, J., Wang-Gillam, A., Goedegebuure, S.P., Linehan, D.C., and DeNardo, D.G. (2014). CSF1/CSF1R Blockade Reprograms Tumor-Infiltrating Macrophages and Improves Response to T-cell Checkpoint Immunotherapy in Pancreatic Cancer Models. *Cancer Res* 74, 5057–5069.
- Zitvogel, L., Tesniere, A., and Kroemer, G. (2006). Cancer despite immunosurveillance: immunoselection and immunosubversion. *Nature Reviews Immunology* 6, 715–727.
- (2012). IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans, volume 100 D, radiation: this publication represents the views and expert opinions of an IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, which met in Lyon, 02 - 09 June 2009 (Lyon: IARC).









ANNEXES

ARTICLE

<https://doi.org/10.1038/s41467-019-09963-8>

OPEN

Innate lymphocyte-induced CXCR3B-mediated melanocyte apoptosis is a potential initiator of T-cell autoreactivity in vitiligo

Meri K. Tulic ¹, Elisa Cavazza¹, Yann Cheli ², Arnaud Jacquelin ³, Carmelo Luci ⁴, Nathalie Cardot-Leccia⁵, Hanene Hadhiri-Bziouche¹, Patricia Abbe¹, Maéva Gesson ⁶, Laura Sormani¹, Claire Regazzetti¹, Guillaume E. Beranger ¹, Cedric Lereverend ², Caroline Pons¹, Abdallah Khemis⁷, Robert Ballotti², Corine Bertolotto², Stéphane Rocchi¹ & Thierry Passeron ^{1,7}

T-cells play a crucial role in progression of autoimmunity, including vitiligo, yet the initial steps triggering their activation and tissue damage remain unknown. Here we demonstrate increased presence of type-1 innate lymphoid cells (NK and ILC1)-producing interferon gamma (IFN γ) in the blood and in non-lesional skin of vitiligo patients. Melanocytes of vitiligo patients have strong basal expression of chemokine-receptor-3 (CXCR3) isoform B which is directly regulated by IFN γ . CXCR3B activation by CXCL10 at the surface of cultured human melanocytes induces their apoptosis. The remaining melanocytes, activated by the IFN γ production, express co-stimulatory markers which trigger T-cell proliferation and subsequent anti-melanocytic immunity. Inhibiting the CXCR3B activation prevents this apoptosis and the further activation of T cells. Our results emphasize the key role of CXCR3B in apoptosis of melanocytes and identify CXCR3B as a potential target to prevent and to treat vitiligo by acting at the early stages of melanocyte destruction.

¹Team 12, Université Côte d'Azur, INSERM U1065, Centre Méditerranéen de Médecine Moléculaire (C3M), Nice 06200, France. ²Team 1, Université Côte d'Azur, INSERM U1065, Centre Méditerranéen de Médecine Moléculaire (C3M), Nice 06200, France. ³Team 2, Université Côte d'Azur, INSERM U1065, Centre Méditerranéen de Médecine Moléculaire (C3M), Nice 06200, France. ⁴Team 8, Université Côte d'Azur, INSERM U1065, Centre Méditerranéen de Médecine Moléculaire (C3M), Nice 06200, France. ⁵Côte d'Azur University, Department of Pathology, CHU Nice, Nice 06200, France. ⁶Imaging Facility, Nice 06200, France. ⁷Côte d'Azur University, Department of Dermatology, CHU Nice, Nice 06200, France. Correspondence and requests for materials should be addressed to M.K.T. (email: meri.tulic@unice.fr) or to T.P. (email: passeron@unice.fr)

During the past decade significant advances in the understanding of vitiligo pathophysiology have been made. Large GWAS studies showed the role of allelic variations in genes involved in melanogenesis and immunity in vitiligo patients^{1–3}. The development of mouse models provided very useful clues on the implication of the adaptive immune system in the disappearance of melanocytes in the skin and hair follicles^{4–7}. Recent data emphasized the key role of the interferon gamma (IFN γ) pathway in vitiligo. It has been recently shown that under IFN γ stimulation, keratinocytes are stimulated to produce chemokines, such as CXCL9 or CXCL10, that further attract and activate CD8⁺ T cells⁸. Chemokine (C-X-C motif) receptor 3 (CXCR3) is the main receptor for these chemokines and it has been reported to be increased in vitiligo patients⁹. Targeting total CXCR3 by using depleting antibodies has provided encouraging results in vitiligo mouse model¹⁰. However, the initial source of IFN γ remains obscure. Using transcriptional analysis, we recently demonstrated a significant increase in CXCL10 in the non-lesional (NL) vitiligo skin compared to healthy controls¹¹. Significant increases were also seen for natural killer (NK) receptors including NKTR and KLRC1 as well as trends for increased EOMES (master regulator of NK cells), CCL20 and NK-related cytokines (TNF α and IL-15) which were all increased at least 1.5-fold but did not reach statistical significance¹¹. These data are in accordance with the first transcriptome analysis comparing gene expression profiles of skin from vitiligo patients with normal skin of healthy volunteers that showed an increased expression of genes associated with innate immune responses, particularly NK cell function, activity and cytotoxicity¹². These included multiple NK cell activation markers such as KLRK1 (also known as NKG2D), KLRC2 and KLRC4, ligands for NK receptor (CLEC2B), as well as markers of oxidative stress (CANP and POSTN) and innate immunity (DEFB103A). Interestingly, all of these genes were also upregulated in the NL skin of vitiligo patients, suggesting that the activation of the innate immunity may be present throughout the entire skin surface of vitiligo patients.

NK cells are part of the group 1 innate lymphoid cells (ILC1) that act as first line defense against microbial and viral infections, early cellular transformation and tumour growth¹³. NK cells have potent cytotoxic function and are able to discriminate and eliminate stressed-cells because of a large panel of activating and inhibitory receptors. Furthermore, NK cells also produce a wide array of cytokines and chemokines to recruit and instruct other immune cells for subsequent priming (adaptive response)^{14,15}. For this reason, NK cells are described as a bridge between innate and adaptive immune system. It's been known for almost 30 years that there is an increase in circulating NK cells in the blood of vitiligo patients¹⁶, yet their role in vitiligo skin remains largely unexplored. In addition to NK cells, the ILC family encompasses ILC1, ILC2, ILC3 and ILC regulatory subclasses. Similarities between ILCs subsets have led to suggestions that ILCs are the innate counterparts of T cell subsets. These are equivalent to

adaptive immune system T-helper (Th)1, Th2, Th17 and Treg-like, respectively. ILCs are scarce cells in normal human skin but are upregulated in atopic dermatitis (ILC2) and psoriasis skin (ILC3)¹⁷. Latest research suggests that ILCs are highly heterogeneous cell types between individuals and tissues and they can even convert to a different subtype during inflammation and disease (eg., ILC3 converting to ILC1 in colorectal cancer)¹⁸.

Together these data suggest that NK cells and innate immune system may play an important role in the early stages of vitiligo which may begin in normal-appearing, NL skin of the patient. On the other hand, it has been demonstrated that melanocytes from vitiligo patients have intrinsic defects¹⁹. Moreover, there have been some clues in the literature from work published over 20 years ago showing that melanocytes themselves can present antigens^{20,21}. Clinical and histological data showing a restrained immunity against melanocytes in halo nevi²² or in localized depigmentation of genital melanosis²³ strongly suggest the key role of melanocytes in initiating the anti-melanocytic immunity. However, the exact role of melanocytes in triggering the initial steps of auto-immunity in vitiligo is far from being fully understood.

We hypothesized that vitiligo is initiated by dysregulation in innate immunity and melanocytes, and that innate immune cells are the initial source of IFN γ production in the skin. Due to their potent IFN γ producing capacity, we chose to focus on NK/ILC1 in this study. Our objective was to assess the role of the innate immunity and melanocytes in the initial steps of vitiligo by using melanocytes and blood extracted from vitiligo patients compared to healthy volunteers. Here we show data suggesting that vitiligo is likely to be initiated in the normal-appearing skin of vitiligo subjects through activation of local innate lymphocyte-induced melanocyte apoptosis and subsequent activation of adaptive and memory immune responses. This apoptosis is mediated by melanocytic CXCR3B, identifying this isoform of CXCR3 chemokine receptor to be critical in melanocyte destruction and initiation of the disease.

Results

Increased NK and ILC1 in vitiligo skin and blood. To characterize the innate immune cells present in the skin and blood of vitiligo patients and to examine whether these cells were the source of IFN γ , we used specific antibodies directed against NK and ILC1 subpopulation of innate immune cells and examined their presence in vitiligo patients compared to healthy controls²⁴. Characteristics of vitiligo and control populations are presented in Table 1. Our immunofluorescence results have shown that indeed, cytotoxic NK cells (defined as CD56 + Granzyme B+) containing IFN γ (CD56 + IFN γ +) were present in NL human vitiligo skin (Fig. 1a, b). Their presence was confirmed by immunohistochemistry, and these cells were located just under the epidermis of NL but not in lesional (L) skin (Fig. 1c). Semi-quantification of their detection has shown significantly higher

Table 1 Patient characteristics

Characteristics	Healthy	Vitiligo
Subjects (n)	8	14
Age (years), median (IQR)	51 (39–74)	48 (43–56)
Gender (male/female)	5/3	7/7
Disease duration	–	4 months–14 years
Family history (%)	–	1 (7%)
Auto-immune thyroid disease (%)	–	2 (14%)
Location of biopsy (n)	Inner arm (3), leg (2), back (1), abdomen (1) and buttock (1)	Inner arm (5), leg (3), back (2), abdomen (2) and buttock (2)

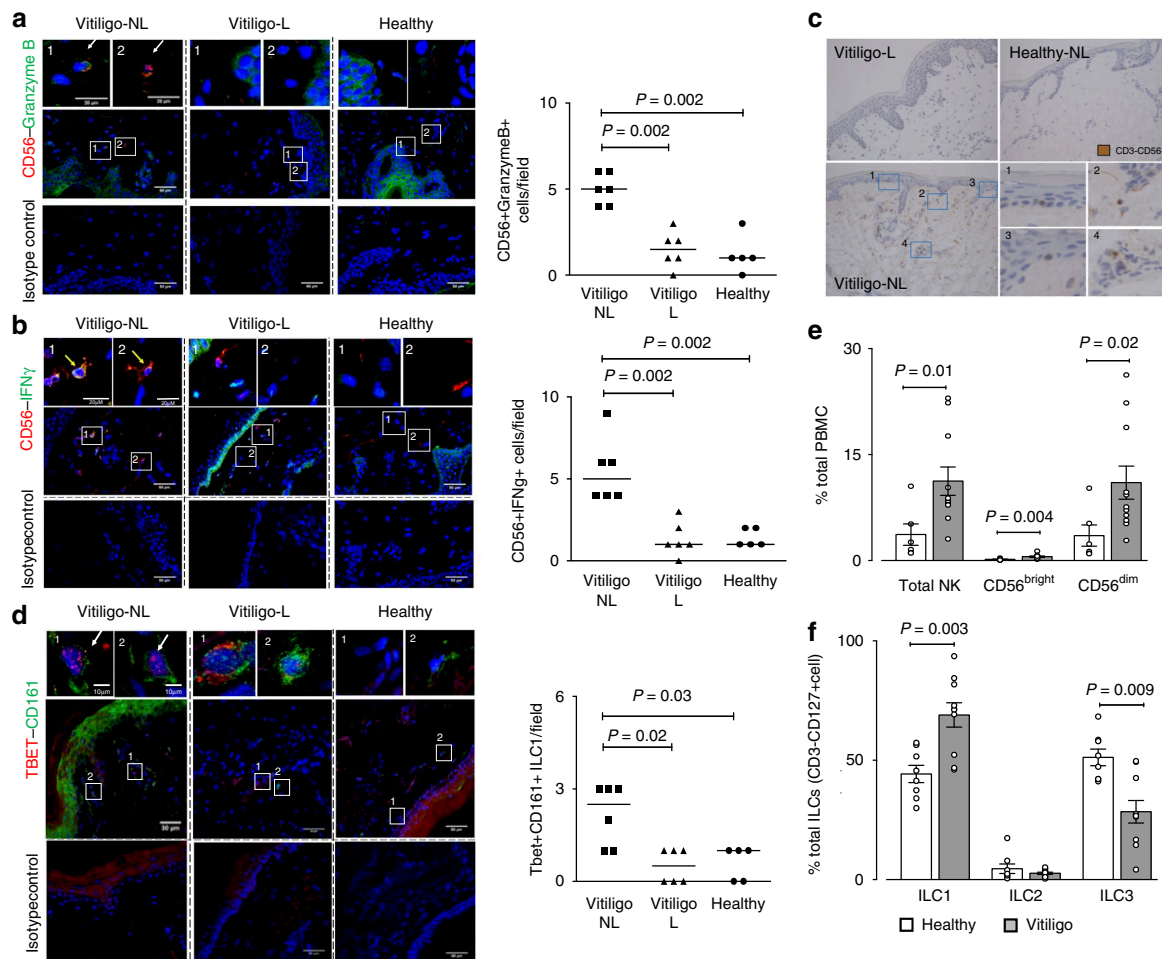


Fig. 1 Increased detection of innate immune cells in non-lesional skin of vitiligo patients. Immunofluorescence depicting NK cells (**a, b, c**) and ILC1 (**d, e**) in the skin and in the peripheral blood (**f, g**) of vitiligo patients ($n = 6$) and healthy controls ($n = 5$). Number of yellow-immunoreactive CD56 + GranzymeB+ NK cells and their semi-quantification in non-lesional (NL) and lesional (L) skin of vitiligo patient compared to healthy skin are shown in **a** and the number of CD56+IFN γ +NK in **b**. The presence of NK cells (CD3-CD56+) was confirmed by immunohistochemistry showing cells to be located just under the epidermis of non-lesional (NL) skin (**c** bottom left and magnified in 1-4) but less in lesional (L) (**c** top) or healthy skin (**c** top right). **d** Depicts Tbet+CD161+ILC1s in the skin and their quantification. In the peripheral blood total NK and separately, cytokine producing NKs (CD56^{bright}) and cytotoxic NKs (CD56^{dim}) were examined in 6 healthy and 11 vitiligo patients and results represented as % of total PBMC (**e**). The percentage of ILC1, ILC2 and ILC3 in the blood of healthy ($n = 8$) and vitiligo ($n = 10$) patients is shown in **f**. Results are shown as individual dot plots with a line at median (**a-d**) or as means \pm SEM (**e, f**)

number of CD56 + Granzyme B+ cells and CD56 + IFN γ +cells in NL compared to L skin of vitiligo patients ($n = 6$) and a higher number in NL skin of vitiligo patients compared to healthy skin ($n = 5$) (Fig. 1a, b). We have also detected presence of Tbet + CD161+ ILC1 in vitiligo skin (Fig. 1d) which were confirmed to be negative for CD3 and CD56 and positive for IL-7Ra CD127. Like NK cells, ILC1 cells were significantly more detected in NL vitiligo skin compared to L vitiligo skin or to healthy controls (Fig. 1d).

Next, we went on to examine whether similar differences in the number of innate immune cells was seen in the peripheral blood. Total NK cells make up ~1–5% of total PBMC in healthy subjects (Fig. 1e). The majority of NK cells were CD56^{dim}, that is, the cytotoxic phenotype (~90%). Total NK population (CD3-CD56+), cytokine-producing CD56^{bright} NK cells as well as cytotoxic CD56^{dim} NK populations were significantly increased in the blood of vitiligo patients ($n = 11$) compared to healthy controls ($n = 6$) (Fig. 1e and Supplementary Fig. 1a). The higher increase was observed for CD56^{bright} NK cells. ILCs are rare cells making up < 0.1% of total PBMC. In healthy subjects, ILC1 and ILC3 (defined

as Lin-CD127 + CRTh2-CD117– and Lin-CD127+CRTh2-CD117+cells, respectively), each made up 30–40% of total ILC population, with ILC2 (defined as Lin-CD127+CRTh2 + CD117+ cells) making up the rest (Fig. 1f and Supplementary Fig. 1b). We have shown the proportion of ILC1 in PBMC of vitiligo subjects ($n = 10$) to be significantly increased compared to controls ($n = 8$) while the proportion of ILC3 was significantly decreased and ILC2 remained unchanged (Fig. 1f). Together, these results have shown that there is increased presence of NK and ILC1 in the NL skin of vitiligo patients and in their peripheral blood.

Stressed NK/ILC1 produce IFN γ and induce melanocytic chemokines. Hydrogen peroxide can damage DNA, lipids, and proteins and induces damage-associated molecular pattern (DAMP) molecules that are one of the main activating factors for innate cells. It is well demonstrated that vitiligo melanocytes possess higher susceptibility to oxidative insults^{25,26}. We sorted NK and total ILCs from PBMC of healthy (C) and vitiligo (V) patients and examined their IFN γ responses 24, 48 and 72 h post stimulation

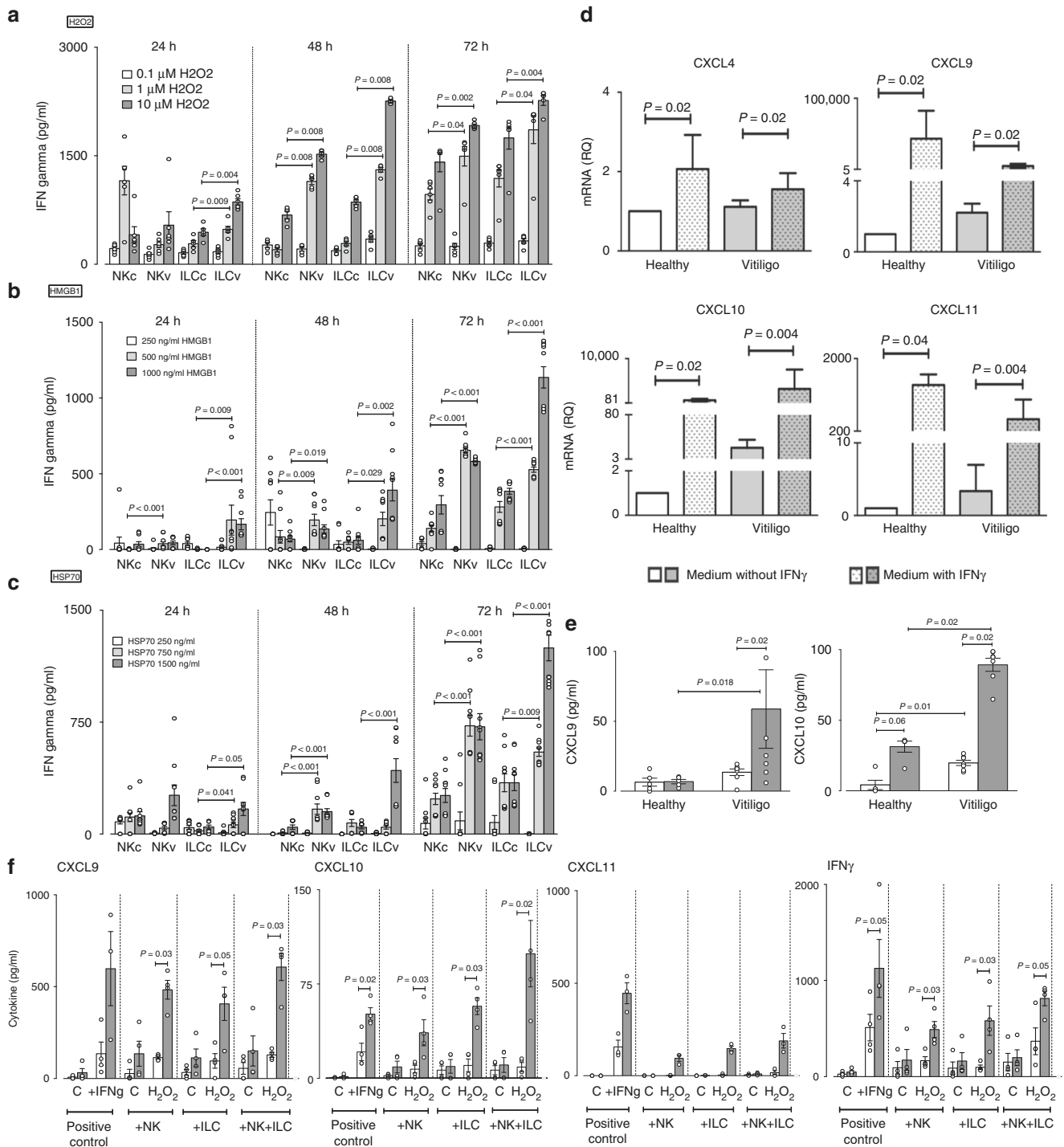


Fig. 2 Effect of stressed innate immune cells on melanocyte function. IFN γ production by sorted NK and ILCs from blood of healthy control ($n = 6-10$) and vitiligo ($v, n = 6-10$) subjects following in vitro stimulation with H_2O_2 (0.1-10 μM) (a), HMGB1 (250-1000 ng/ml) (b) or HSP70 (TKD, 250-1500 ng/ml) (c) for 24, 48 or 72 h. The effect of exogenous IFN γ (50 ng/ml) on CXCL4, CXCL9, CXCL10, CXCL11 mRNA (d) and CXCL9, CXCL10 protein (e) production by healthy ($n = 4-7$) and vitiligo melanocytes ($n = 7-9$). In f chemokine and IFN γ production was measured 24 h post stimulation of healthy (white bars, $n = 4$) or vitiligo (grey bars, $n = 4$) melanocytes with patient's own autologous NK or ILCs (alone or in combination) which were pre-stressed with H_2O_2 for 48 h before addition of innate cells to patients own melanocytes. Positive control condition represents melanocytes directly pre-stimulated with IFN γ (50 ng/ml) for the same duration of time. PCR results are normalized to house-keeping gene SB and expressed as fold change in expression relative to the pool of healthy skin samples. Results are shown as individual dot plots with a line either at median (a-c) or at mean \pm SEM (e, f)

with H_2O_2 (to induce oxidative stress in cells). Results have shown H_2O_2 to induce IFN γ production in both NK and ILCs and this effect was dose- and time-dependent (Fig. 2a). The stress-induced IFN γ production by NK and ILCs from vitiligo subjects were significantly higher compared to healthy subject's responses at the

same dose (Fig. 2a) suggesting vitiligo innate cells were more sensitive to oxidative stress compared to cells from healthy controls. Innate cells can be activated by many DAMPs. Among them, the role of HSP70 Heat Shock Protein (HSP70) and High Mobility Group Box (HMGB)1 in vitiligo pathogenesis have been suggested

by several studies^{27–29}. Thus, we reproduced the experiment with NK and total ILCs from PBMC of healthy (C) and vitiligo (V) patients and this time examined their IFN γ responses after stimulation with HMGB1 (Fig. 2b) or HSP70 (Fig. 2c). Similar to the results obtained following H₂O₂ stimulation, HMGB1- and HSP70-induced IFN γ production by NK and ILCs were dose- and time-dependent and responses from vitiligo melanocytes were significantly higher compared to responses in melanocytes from healthy individuals at the same dose.

Next, we set out to examine if primary melanocytes can directly respond to IFN γ . Stimulation of normal human melanocytes (NHM, $n = 5$) with IFN γ for 24 h significantly upregulated their production of CXCL9, CXCL10 and CXCL11 mRNA (Supplementary Fig. 2) ($P < 0.05$). The production of these chemokines was higher in normal human keratinocytes (NHK, $n = 6$), the known potent producers of chemokines, compared to NHM (Supplementary Fig. 2). Knowing that NHM upregulate their chemokine production following IFN γ stimulation, we asked whether this chemokine production varies between healthy and vitiligo melanocytes. Stimulation of healthy or vitiligo melanocytes with IFN γ induced a significant increase in mRNA expression of CXCL4, CXCL9, CXCL10 and CXCL11 (Fig. 2d). However, the production of CXCL9 and CXCL10 was much higher comparatively to CXCL11. Only very limited amount of CXCL4 were detected. Non-stimulated vitiligo melanocytes had significantly higher baseline (or constitutive) production of CXCL10 compared to healthy melanocytes (Fig. 2e). Stimulation with IFN γ significantly increased both CXCL9 and CXCL10 protein in the supernatant of vitiligo melanocytes, producing on average 4–5 fold more chemokines compared to healthy controls (Fig. 2e). Together, these results suggest vitiligo melanocytes are more sensitive to IFN γ stimulation and may have greater chemo-attractive properties.

Next, we wanted to examine if stressed innate immune cells can directly modulate melanocyte function. To do this, we sorted NK and ILC1 from the PBMCs of healthy and vitiligo patients, pre-stressed them in vitro with H₂O₂ for 48 h and transferred the innate cells (without media) to their own *autologous* primary melanocytes. Chemokine production was measured in the supernatant 24 h after co-culture. Results have shown that the addition of pre-stressed innate cells from healthy subjects to their own primary melanocytes did not cause any significant change in melanocyte chemokine production (Fig. 2f). However, addition of pre-stressed NKs or ILCs from vitiligo patients dramatically increased their own melanocyte production of CXCL9, CXCL10, CXCL11 and IFN γ (Fig. 2f). This effect was further increased when both pre-stressed NKs and ILCs were added together and these levels were equal to, or greater than the responses seen when exogenous IFN γ was added to melanocytes (positive control condition). This data suggest that stressed innate immune cells are capable of directly modulating melanocyte function by upregulating their chemokine responses and thereby their chemo-attractive properties. Importantly, these results show that vitiligo melanocytes (compared to healthy melanocytes) are much more sensitive to their own stressed innate immune cells. It is important to note that although the cells were stimulated for 48 h with H₂O₂ prior to transfer with melanocytes, these cells were still capable of producing IFN γ and effectively modulating melanocyte function (Fig. 2f). To examine if NKs and/or ILCs are directly capable of producing chemokines in response to stress, we measured the production of CXCL9, CXCL10 and CXCL11 by NKs and ILCs after stimulation with HMGB1 or HSP70. NK/ILC production of CXCL9, CXCL10 and CXCL11 following innate stress was negligible (and often undetectable in the case for CXCL10) compared to their IFN γ production following the same stress stimuli (Supplementary Fig. 3). Moreover, this NK/ILC

production of chemokines is also negligible compared to the chemokine production by melanocytes (Fig. 2f).

Human melanocytes express CXCR3B and it's regulated by IFN γ . CXCR3, a chemokine CXCL9, CXCL10 and CXCL11 receptor, is typically found on T cells, where the predominant isoform expressed is of the CXCR3A form³⁰. Whether CXCR3 is expressed on human melanocytes is unknown. Here we demonstrate that melanocytes isolated from healthy human skin express CXCR3, particularly the CXCR3B isoform (Fig. 3). This isoform is absent in mice and therefore not possible to study in animal models of vitiligo. In human skin, CXCR3B was detected at mRNA (Fig. 3a) and protein (Fig. 3b) level in cultured melanocytes and their numbers semi-quantitated in Fig. 3c. We demonstrated melanocytes isolated from vitiligo skin have significantly elevated expression of CXCR3B at baseline compared to healthy control skin (Fig. 3a). IFN γ significantly upregulated CXCR3B mRNA expression in both healthy and vitiligo patients (Fig. 3a). While IFN γ significantly increased the number of CXCR3B+ cells in healthy skin, IFN γ had no further effect on vitiligo melanocytes whose CXCR3B expression was already high (Fig. 3c). Expression of CXCR3B in healthy human keratinocytes was significantly lower than the expression in healthy melanocytes which was confirmed at both mRNA and protein level (Fig. 3a, b). Interestingly, IFN γ had no effect on keratinocyte expression of CXCR3B (Fig. 3a, b). Finally, we have demonstrated that there is an increased number of MITF + CXCR3B+ melanocytes in the NL skin of vitiligo patients compared to healthy skin ($P = 0.03$) (Fig. 3d). MITF (Microphthalmia-associated transcription factor), is a specific melanocyte marker and a master regulator of melanocyte development.

CXCL10 activates melanocytic CXCR3B to induce apoptosis.

From previously published literature in human breast cancer³¹ there is evidence to suggest that CXCR3B-mediated signal is pro-apoptotic. To examine the function of CXCR3 on viability of human vitiligo melanocytes, real-time detection of melanocyte death was monitored before and after exposure to CXCL10 using IncuCyte® live cell imaging system. Stimulation with CXCL10 caused a significant dose-dependent increase in melanocyte death compared to non-stimulated melanocytes but only in IFN γ primed melanocytes ($P = 0.006$, Fig. 4a). As CXCR3B-specific antagonists do not exist yet, initially we tested the effect of a broad CXCR3 antagonist AS612568 on CXCL10-induced melanocyte death. We have demonstrated AS612568 to inhibit melanocyte death induced by CXCL10 in a dose-dependent manner, completely abolishing CXCL10-induced effects at 2 μ M ($P = 0.045$, Fig. 4a). Following these positive results, we set out to use a more targeted approach transfecting the melanocytes with siCXCR3 (or siControl). The knockdown efficiency of our siCXCR3 was determined at both mRNA (Supplementary Fig. 4a) and protein (Supplementary Fig. 4b) level, achieving >80% silencing of the CXCR3B gene with 80 nM siCXCR3. Our results have shown that in IFN γ pre-treated, siControl transfected cells, CXCL10 significantly increased the death of melanocytes (demonstrated by increased number of yellow-immunoreactive cells in IncuCyte, Fig. 4b). This death was seen in melanocytes extracted from both healthy ($P = 0.008$) and NL vitiligo skin ($P = 0.03$) (Fig. 4c). Vitiligo melanocytes were significantly more sensitive to CXCL10-induced death compared to healthy melanocytes ($P = 0.004$), inducing ~2-fold difference in rate of melanocyte death (Fig. 4c). Transfection of melanocytes with siCXCR3 prior to CXCL10 stimulation, completely inhibited the CXCL10-induced death and restored baseline responses in both healthy ($P = 0.004$) and vitiligo ($P = 0.03$) melanocytes (also

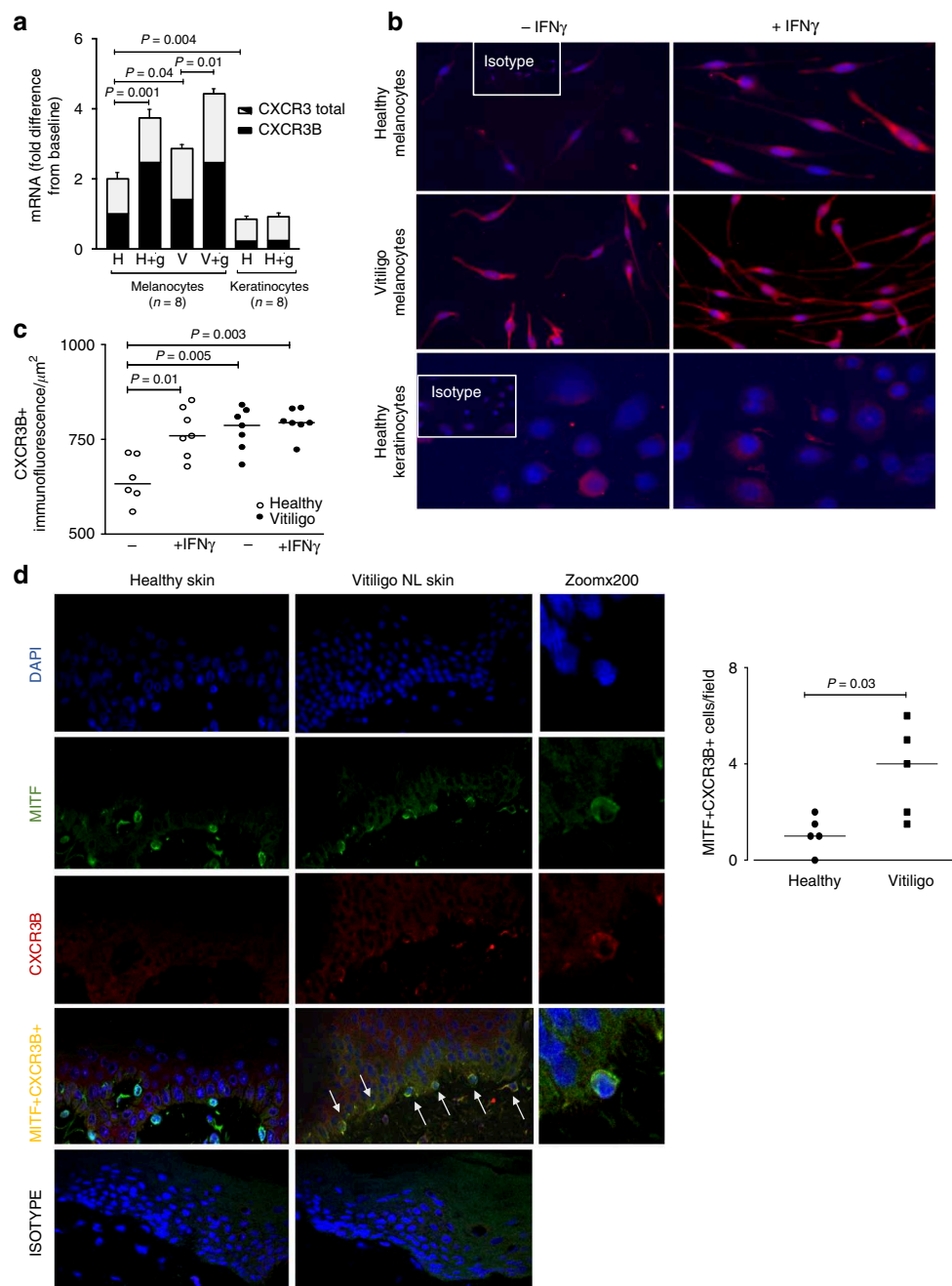
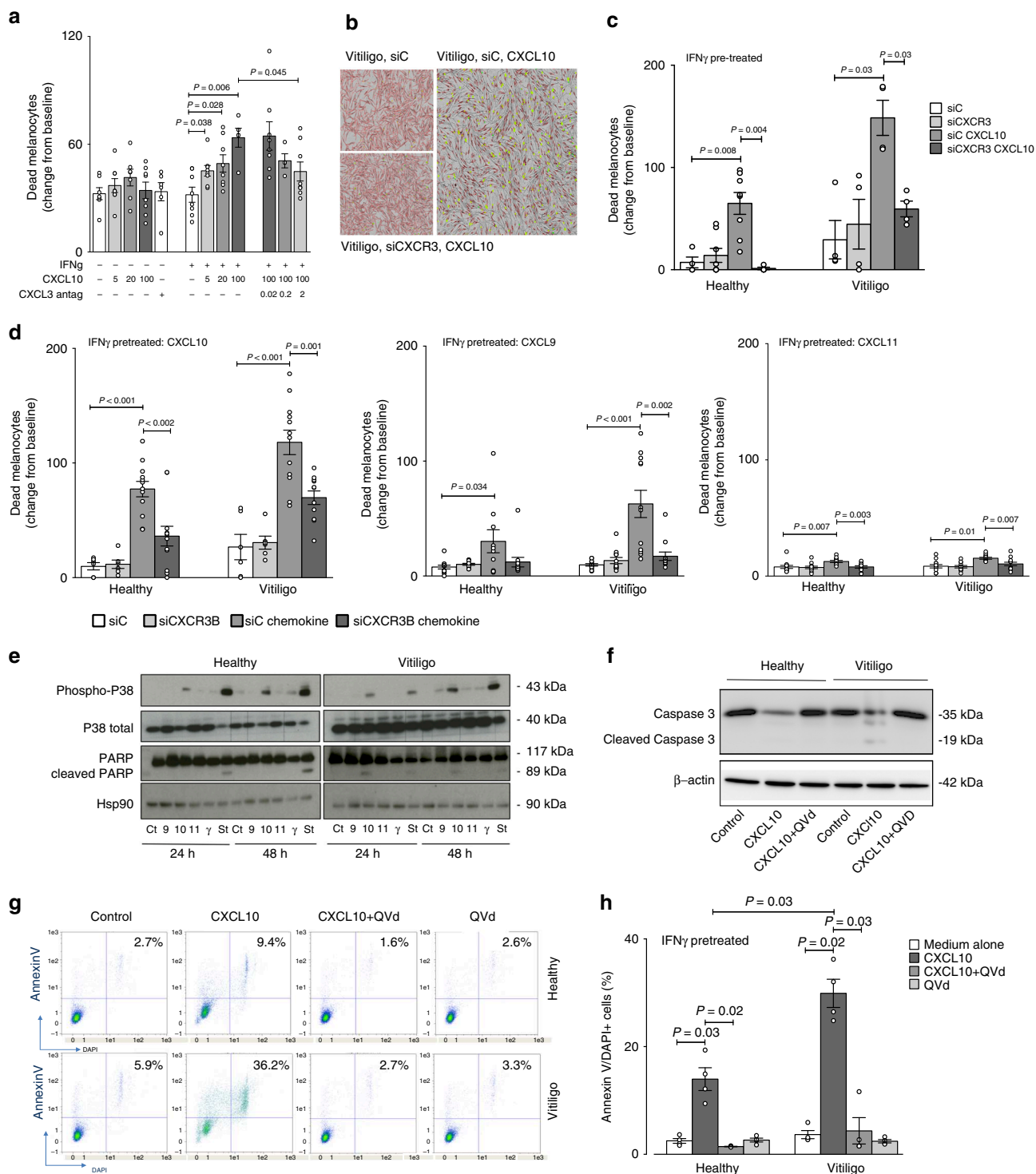


Fig. 3 Expression of CXCR3B in human melanocytes and their regulation by IFN γ . **a** Total CXCR3 mRNA (black + white bars) and CXCR3B mRNA (black bars) in healthy and vitiligo primary melanocytes ($n = 8$) and healthy keratinocytes ($n = 5$) before and after exposure to IFN γ 50 ng/ml for 24 h. Results are normalized to unstimulated melanocytes from healthy subjects and expressed as mean \pm SEM. **b** Immuno-detection of CXCR3B protein and **c** its semi-quantification in melanocytes extracted from healthy skin (open circles, $n = 6-7$) and skin from vitiligo patients (closed circles, $n = 7$) before and after IFN γ stimulation. **d** In situ detection of CXCR3B+ melanocytes (MIFC+CXCR3B+) in vitiligo non-lesional (NL) skin and their quantification ($n = 5$) compared to healthy skin ($n = 5$). Results are shown as individual dot plots with a line at median

visualised in Fig. 4b by reduction in yellow-stained dead cells). To more specifically examine the contributing role of CXCR3B, we repeated this experiment in both healthy and vitiligo melanocytes using custom design specific silencer RNA directed against the CXCR3B isoform (efficiency of the SiCXCR3B at protein level shown in Supplementary Fig. 4c). Transfection of melanocytes with siCXCR3B prior to CXCL10 stimulation, significantly reduced the CXCL10-induced death in both healthy ($P = 0.002$) and vitiligo ($P = 0.001$) melanocytes (Fig. 4d). In addition to CXCL10, we examined responses to CXCL9 and CXCL11. Treatment with CXCL9 and CXCL11 also induced a significant

melanocyte death in both healthy ($P = 0.034$ and $P = 0.007$, respectively) and vitiligo ($P = P < 0.001$ and $P = 0.01$) melanocytes that was almost completely prevented by the use of SiCXCR3B (Fig. 4d). Interestingly, CXCL9-induced melanocyte death was significantly lower compared with CXCL10-induced death in both healthy ($P < 0.001$) and vitiligo ($P = 0.0035$) patients. The difference was even more pronounced with CXCL11, that induced much lower cell death compared to CXCL10 ($P < 0.001$ for both healthy and vitiligo).

It has been shown that the activation of CXCR3B in breast cancer cells activates p38 MAPK and PARP pathway, inducing



cell apoptosis³¹. Studying the signalling pathway involved in chemokine-induced CXCR3B activation in melanocytes, we have shown that in melanocytes extracted from healthy patients and not pre-treated with IFN γ , only a slight activation of p38 but not PARP cleavage was seen following chemokine stimulation (Fig. 4e). This was in contrast to vitiligo patients where we observed increased activation of p38 and PARP cleavage. In accordance to the melanocyte cell death observed using IncuCyte experiment, the activation of the pathway is mostly observed after CXCL10 treatment compared to CXCL9 or CXCL11 stimulation (Fig. 4e). CXCL10-induced changes were of the similar magnitude as those seen following stimulation with positive

control staurosporine (St), a potent pro-apoptotic therapeutic agent (Fig. 4e). Interestingly, the absence of CXCL10-induced apoptosis in NHM without IFN γ pre-treatment (Fig. 4e) while a significant apoptosis is observed when they are pre-treated with IFN γ (Fig. 4c), is in accordance with the low basal expression of CXCR3B in NHM and its increased expression after IFN γ stimulation (Fig. 3b, c). To assess the role of apoptosis in CXCL10-induced melanocyte death, in parallel we have shown cleavage of caspase-3 in vitiligo patients but not in healthy controls and this effect to be reversed by QVd-Oph, a caspase inhibitor (Fig. 4f). To further understand this CXCL10-induced death mechanism, we pre-treated healthy and vitiligo

Fig. 4 CXCL10 activates melanocytic CXCR3B to induce apoptosis. **a** Effect of CXCL10 (5, 20, 100 pg/ml) on cell viability in unstimulated or IFN γ stimulated (50 ng/ml for 48 h) melanocytes from vitiligo patients, in presence or absence of CXCR3 antagonist AS612568 (0.02 μ M, 0.2 μ M or 2 μ M) ($n = 5-8$). Cell viability was monitored using IncuCyte[®] live cell fluorescence imaging system. **b** Illustrates live IncuCyte images of vitiligo melanocytes 24 h after exposure to CXCL10 in cells transfected with siC or siCXCR3. Melanocytes were tracked with CellTracker[™] Red CMPTX dye and dead cells tracked with IncuCyte[®] Cytotox Green reagent. Co-localised yellow cells represent dead melanocytes. The effect of siCXCR3 (or its siC) on CXCL10 (100 pg/ml)-induced death of healthy ($n = 4-8$) and vitiligo ($n = 4$) melanocytes are shown in **c**. In **d** healthy and vitiligo melanocytes ($n = 6-12$) were transfected with siCXCR3B (or its siC) and melanocyte death shown at 24 h following CXCL10, CXCL9 or CXCL11 (100 pg/ml) stimulation. In separate experiments, cell lysates was used to study the signalling pathway induced by chemokines, IFN γ (50 ng/ml) or Staurosporine (positive control, 1 μ g/ml) at 24 or 48 h post stimulation, measuring the expression levels of phosphorylated and total p38 and total and cleaved poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) by Western Blot analysis (**e**). HSP90 was used as an internal loading control. Representative blot of 3 separate experiments is shown. Total and cleaved caspase-3 activity (**f**) and proportion of apoptotic cells (counted as % Annexin V+DAPI+cells in FACS analysis) (**g**) from healthy ($n = 4$) and vitiligo ($n = 4$) melanocytes stimulated with 100 pg/ml CXCL10 for 24 h in presence or absence of QVd OPH (10 μ M, caspase inhibitor) (**h**). Results are shown as individual dot plots with a line at mean \pm SEM

melanocytes with IFN γ prior to CXCL10 and QVd stimulation, and using FACS, we have demonstrated CXCL10 to significantly increase the percentage of AnnexinV + DAPI+ apoptotic cells in both healthy (2.7–9.4%) and vitiligo melanocytes (5.9–36.2%) (Fig. 4g). The level of apoptosis was >3-fold greater in vitiligo ($P = 0.02$) compared to healthy cells ($P = 0.03$) and apoptosis was completely reversed by QVd in both groups ($P = 0.03$, Fig. 4g, h). IFN γ or QVd alone or CXCL10 in non IFN γ primed cells had no effect on apoptosis. It is interesting to note that as a comparison, we detected low expression of CXCR3B on CD4+ and CD8+ lymphocytes isolated from PMBCs of healthy patients (Supplementary Fig. 5a), however while CXCL10 stimulation of T cells had no effect on T cell death, CXCL10 stimulated proliferation of both CD4 and CD8 T cells (Supplementary Fig. 5b).

CXCR3B-induced melanocyte death triggers adaptive immunity. To examine whether CXCR3B-induced melanocyte death following pre-treatment with IFN γ and stimulation with CXCL10 may initiate adaptive melanocyte auto-immunity by their own presentation of antigens, we replenished media post CXCL10 stimulation and 3 days later stimulated melanocytes with their *autologous* T cells. Our IncuCyte[®] results have shown that there was significantly higher melanocyte death when T cells were present with CXCL10-stimulated melanocytes compared to melanocyte death seen with CXCL10 stimulation alone ($P = 0.02$) or addition of T cells alone ($P = 0.02$) (Fig. 5a). These results were reproducible and were of the similar magnitude as seen following stimulation of melanocytes with *allogenic* T cells (Supplementary Fig. 6). Interestingly, pre-incubation of T cells with CXCL10 for 24 h, prior to their addition to IFN γ -primed melanocytes did not induce melanocyte death while the same T cells added to IFN γ -primed melanocytes treated with CXCL10 did suggesting lack of direct effect of CXCL10 on the T cells (Supplementary Fig. 7). T cell enhanced melanocyte death in IFN γ -primed melanocytes was accompanied by increased melanocyte expression of co-stimulatory (CD40, CD80, HLA-DR) and adhesion (ICAM-1) molecules (Fig. 5b) and parallel increase in absolute number of CD3+ T cells in IncuCyte co-cultures with time ($P = 0.03$) (Fig. 5c). These CD3+ T cells were indeed shown to be Ki67+ proliferating cells (Fig. 5d). These data are supported by flow cytometric quantification of T cell proliferation which showed an increased number of dividing T cells (evaluated as %CD3+CFSE+ cells) when they were co-cultured with IFN γ -primed NHM stimulated with CXCL10 and responses were similar to that seen following PHA stimulation (Fig. 5e). This degree of proliferation was not seen when T cells were co-cultured with non-primed NHM exposed to CXCL10. Treatment with CXCR3 antagonist prevented the potentiating effect of T cells on CXCL10-induced melanocyte death ($P = 0.008$) (Fig. 5a), augmentation of T cell number ($P = 0.04$) (Fig. 5c) and T cell proliferation (Fig. 5d, e).

Discussion

Here we confirm the previously reported increased level of NK cells in the blood of vitiligo patients¹⁶, and extend it to ILC1. Our transcriptome data further suggest that NK and ILC1 cells are also increased in NL skin of vitiligo patients. Interestingly, this subtype is associated with the Th1 response which is known to be the key adaptive pathway in vitiligo^{7,13}. When these cells are cultured under stress conditions, they produce IFN γ which induces CXCLs production. Here we show that NK and ILCs from vitiligo patients produce higher amount of IFN γ under oxidative stress but also under the stimulation of the two main DAMPs implicated in vitiligo pathophysiology, namely HSP70 and HMGB1 compared to healthy subjects. Thus, not only vitiligo patients have an increased population of NK and ILC1 in their skin and their blood, but these cells are more sensitive to DAMPs compared to healthy individuals.

It has been previously shown that skin memory T regulatory cells express CXCR3, that these cells are expressed in vitiligo skin during the depigmenting process and they remain in the skin even after repigmentation³². Those cells can be an important source of IFN γ production and their presence in repigmented areas could explain the recurrences of vitiligo lesions which often affected the same skin locations. However, skin memory T regulatory cells need that the adaptive immunity occurs to be recruited and thus can't be the initial source of IFN γ production. Thus, they can't explain the initial steps that lead to the recruitment and activation of T cells against melanocytes and the development of the first clinical lesions. NK and ILC1 cells are potent producer of IFN γ under endogenous or exogenous stress conditions. Their significant increase in the blood and in the NL vitiligo skin argues for their key role in the initial production of IFN γ . Importantly, we showed that melanocytes express CXCR3, more particularly the CXCR3B isoform. Also known as G protein-coupled receptor 9 (GPR9), CD183, P-10 receptor, and MIG receptor, CXCR3 is a chemokine receptor expressed on autoreactive T cells that have been implicated in a range of physiological processes and related disorders. CXCR3 is largely absent from naive T cells but is upregulated upon activation with antigen and recruits activated cells to sites of tissue inflammation in response to its primary ligands: CXCL9, CXCL10, and CXCL11. CXCL9 and CXCL10 are strongly produced in many autoimmune and inflammatory diseases leading to the accumulation of CXCR3+T cells with Th1 phenotypes³³. CXCR3 has three isoforms in human: CXCR3A, CXCR3B and CXCR3Alt³⁴. Importantly, the isoform B is absent in rodents therefore the expression nor the role of CXCR3B could be investigated in vitiligo animal models, thus requiring to be studying in human samples. The isoform CXCR3A is expressed by T lymphocytes and has an important role in the adaptive immune system³⁰. CXCR3A activation induces differentiation and proliferation.

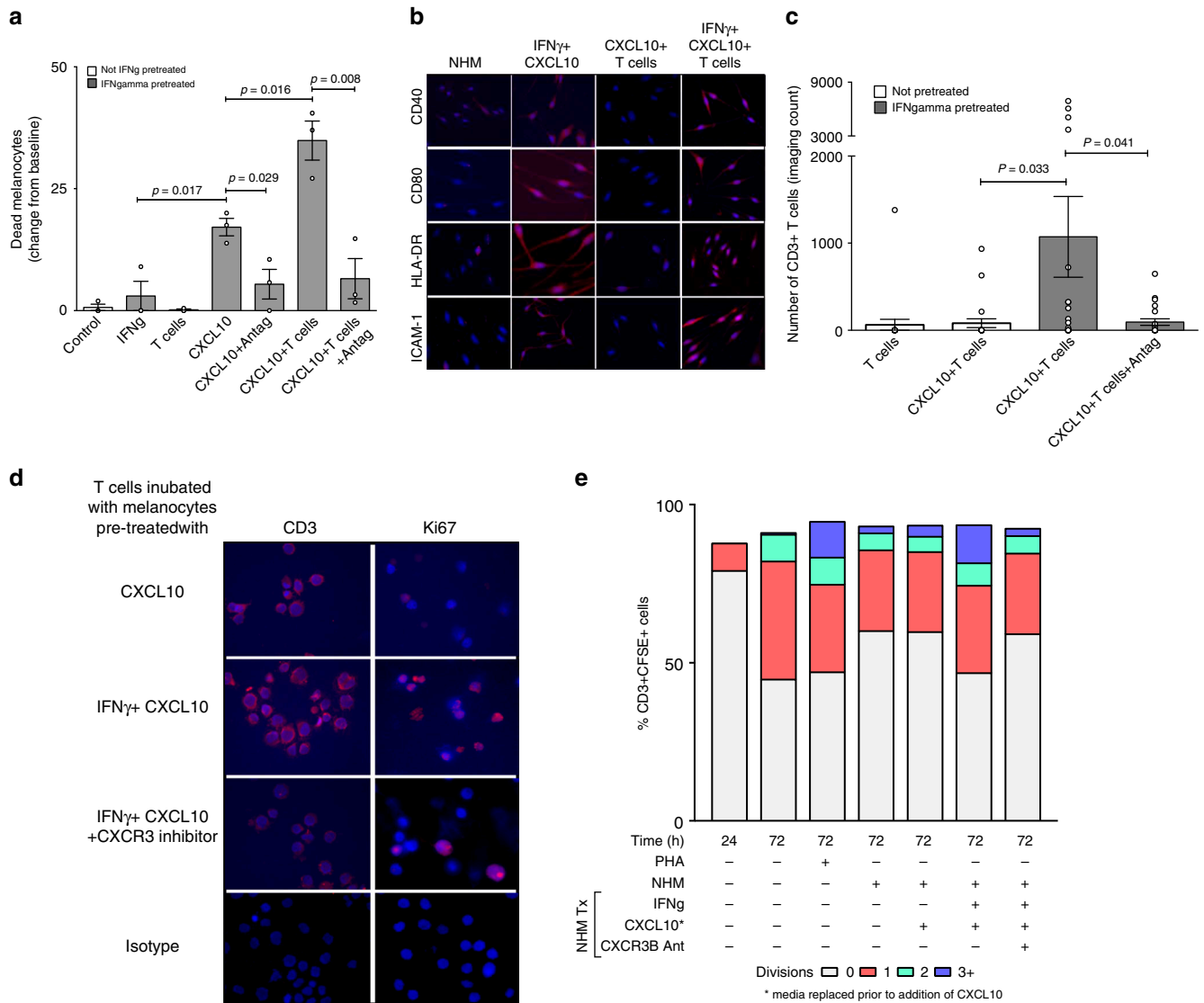


Fig. 5 T cells enhance CXCL10-induced melanocyte death by induction of adaptive immunity. **a** CXCL10-induced death of vitiligo melanocytes in presence or absence of patients own *autologous* T cells. As above, IFN γ -pretreated melanocytes were exposed to CXCL10 in presence or absence of CXCR3 antagonist AS612568 (2 μ M). The next day, media was replaced and 3 days later patient's own CD3+ T cell were sorted and added to the melanocytes ($n = 3$) prior to initiation of IncuCyte. **b** At the end of the experiment (~48 h), supernatant was collected, remaining cells trypsinised and cytospin sections prepared for immunofluorescence detection of co-stimulatory (CD40, CD80, HLA-DR) and adhesion (ICAM-1) molecules on melanocytes. **c** T cell-induced potentiation of melanocyte death in IFN γ -pretreated melanocytes (compared to untreated melanocytes) was associated with a parallel increase in the number of CD3+ T cells which was supported by increased expression of Ki67+ cells in the same cytospin sections. **d**. Results are shown as individual dot plots with a line at mean \pm SEM. **e** T cell proliferation was quantified by flow analysis measuring the percentage of CD3+CFSE+ cells undergoing 0, 1, 2 or 3+ divisions ($n = 3$). Labelled cells at time zero was used as a negative reference, unstimulated cells left in culture for 72 h before labelling as a control and cells stimulated with PHA for 72 h (Phytohemagglutinin, 5 μ g/ml) as a positive control

CXCR3B is only marginally expressed at the surface of immune cells and its activation induces apoptosis. We show here that CXCR3B expression is low at baseline in melanocytes extracted from healthy subjects and increases under IFN γ stimulation. Melanocytes from vitiligo patients have elevated basal expression of CXCR3B. Interestingly, we also observed a significant increase in CXCR3B expression in melanocytes from NL skin of vitiligo patients compared to the skin of healthy volunteers, reinforcing the data showing that melanocytes from vitiligo patients have intrinsic defects¹⁹. We demonstrate that CXCL10 activates the downstream pathway of CXCR3B in melanocytes of vitiligo patients, leading to their apoptosis. CXCL9, and in a much lesser extent CXCL11, are also able to induce some CXCR3B-induced apoptosis of melanocytes, but in a much less effective manner

compared to CXCL10. It has previously been demonstrated that CXCL10 has a much greater binding affinity for CXCR3B compared to CXCL9 or CXCL11 while the affinity is similar between the three chemokines for the CXCR3A isoform³⁵. This may be attributed to differences in special conformation between CXCR3A and CXCR3B³⁶.

We show that CXCL10-induced apoptosis occurs to a greater extent in melanocytes extracted from vitiligo patients and that this apoptosis can be prevented by using CXCR3 antagonists, by silencing CXCR3B, or by using caspase-inhibitors. Few data are available on the expression and the role of CXCR3B in non-immune cells, however CXCL10 was shown to inhibit angiogenesis by activating CXCR3B at the surface of endothelial cells and inducing their apoptosis³⁷. We further demonstrate that

under IFN γ and CXCL10 stimulation, several vitiligo melanocytes undergo apoptosis when the remaining ones become activated expressing CD40, CD80, HLA-DR (MHC-II) and ICAM-1 at their surface and present their own antigens, subsequently triggering T cell proliferation and the onset of the adaptive response by the lymphocytes. The fact that melanocytes may become antigen presenting cells upon IFN γ stimulation was suggested years ago²¹. We show here that not only vitiligo melanocytes undergo initial apoptosis through the CXCR3B activation at their surface but may also be the presenting cells that initiate the adaptive response against themselves. This CXCR3B-induced apoptosis that occurs before T cells are attracted could also explain the reduced number of melanocytes that is observed in NL vitiligo skin³⁸. Thus, both phenotypically normal melanocytes as well as NK and ILC cells from vitiligo patients respond differently to various stimuli when compared to cells from healthy donors. These data suggest that all these cells harbour genetic abnormalities. These results are in accordance with the genetic studies which reported allelic variations in innate and adaptive immune genes but also in melanocytic genes³⁹.

Taken together, our results shed light on the initial events that trigger the anti-melanocyte auto-immunity and give light to the melanocytes as a central player in the initiation of this process. Upon endogenous or exogenous stress, NK and ILC1 produce IFN γ that induce the production of chemokines by not only keratinocytes but by melanocytes. These chemokines attract and activate T cells and furthermore, CXCL10 induces the initial apoptosis of some melanocytes resulting in release of auto-antigens. Activated by the local production of IFN γ , the remaining melanocytes express co-stimulatory molecules (CD40, CD80, MHC-II, ICAM-1) and present their own antigens to the T cells attracted by the chemokines and initiate the adaptive response (Fig. 6). These results emphasize the key role of CXCR3B in the initial apoptosis of melanocytes and identify this receptor as a target to prevent and to treat vitiligo by acting at the very early steps in the destruction of melanocytes.

Methods

Biological samples and experimental outline. A total of 21 subjects were recruited for this study (Table 1). Fourteen vitiligo patients ($n = 14$) with stable disease were enrolled (Department of Dermatology, L'Archet Hospital, CHU Nice) after informed, written consent was obtained. Eight healthy controls ($n = 8$) were recruited from the same clinic who were surveilled for skin cancer (suspicious biopsy or familiar history) but were negative on examination. The two groups were matched for gender, age, and location. The study was approved by the National ethics committee (N12.034). From each vitiligo patient, we obtained 3×4 -mm skin punch biopsies (1 lesional, L and 2 non-lesional, NL) and for each healthy control 2 NL biopsies. Fifty (50) ml of blood was obtained from all subjects. L and NL skin was processed for immunohistochemistry and the remaining NL biopsy used to extract primary melanocyte from the skin which were then propagated in vitro. Blood was used to isolate peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) by Ficoll gradient centrifugation (Lymphoprep[®], Euromedex, France). Ten million PBMCs were used immediately for FACS analysis to examine the phenotype and frequency of NK/ILC in the blood (for markers see below). The remainder of PBMCs ($30\text{--}40 \times 10^6$) were frozen down in FCS 10% DMSO and kept at -156°C for subsequent sorting of NK/ILC populations and co-culturing with patients own *autologous* primary melanocytes extracted from their skin biopsies. Propagation of primary melanocytes in vitro takes 2–3 months to obtain sufficient number of melanocytes required for the experiment.

Immunofluorescence and immunohistochemistry. One L and NL skin biopsy from each patient was embedded in Tissue-Tek[®] O.C.T medium in cryomolds (Sakura Finetek, USA), snap-frozen in liquid nitrogen-cooled isopentane (2-methyl butane) and stored at -80°C before cutting. Tissue was cut with microtome into $7\ \mu\text{m}$ sections and fixed on Superfrost Plus slides. After 20 min of air-drying, sections were fixed in ice-cold acetone (30 min at -20°C) and saturated for 2 h at RT with PBS 5% BSA 3% normal goat serum. For detection of Granzyme B+ NK cells and IFN γ -producing NK cells, we incubated sections overnight at 4°C with specific primary antibodies directed against human CD3, CD56, Granzyme B or IFN γ (Abcam and all used at 1:100). The next day the signal was revealed by incubating for 1 h at RT with secondary antibodies conjugated to

fluorochromogens (1:1000) and slides mounted with Prolong[®] Gold Antifade Reagent with DAPI (ThermoFisher). CD3-CD56+ NK cells were visualized as red immunostained cells, Granzyme B and IFN γ as green and yellow as co-localised NK cells containing Granzyme B or IFN γ . In isotype controls, the primary antibody was omitted. To confirm immunofluorescence results, skin slides were stained with immunohistochemical markers directed against human CD3, CD56 and Granzyme B using automated staining protocols (Dako Autostainer Link 47) and results were interpreted by pathologist Dr. Nathalie Cardot-Leccia (Pasteur Hospital, CHU Nice). In situ ILC1 population was detected using anti-human CD161 (green) (Novus Biological, US) and anti-Tbet (BioLegend, London, UK) (red) with the use of True-Nuclear[®] Transcription Factor Buffer Set (Biolegend) for nuclear staining. CD161 + Tbet+ cells were visualized as red and confirmed to be CD3, CD19 and CD14 negative but CD127+. Semi-quantitative analysis of all immunofluorescence images and positive immunoreactive cells were counted over 10 non-overlapping fields in 5–8 patients/group using either Nikon A1R confocal microscope or Leica microscope, both at 40 \times objective.

FACS analysis of NK and ILC populations in the blood. Total NKs were defined as CD3-CD56+ cells. Cytotoxic or cytokine-producing NKs were differentiated based on their additional CD16 expression whereby CD56^{bright} CD16^{dim} cells are cytokine producing NKs and CD56^{dim} CD16^{bright} are cytotoxic NK cells. Gating strategy for ILC subpopulations initially involved gating all live PBMCs for negative Lineage selection (to exclude CD3+ T cells, CD19+ B cells, CD14+ macrophages, CD34+ eosinophil progenitors, CD123+ dendritic cells and TCR). Lin- cells were then selected for CD127 positivity which stains for all ILCs but not NK cells which are CD127-. Finally, CD117 (c-kit) and CRTh2 (prostaglandin D2 receptor, CD294) markers were used to delineate between the 3 ILC subclasses whereby ILC1 were defined as Lin-CD127 + CRTh2-CD117-, ILC2 as Lin-CD127 + CRTh2 + CD117+ and ILC3 as Lin-CD127 + CRTh2-CD117+ cells. All antibodies were purchased from Miltenyi (Paris, France). Gating strategies are shown in Supplementary Fig. 1.

Isolation of primary human melanocytes. On arrival, skin biopsies were rinsed in 70% ethanol followed by $2 \times$ PBS 1% Antibiotic-Antimycotic solution (Gibco), prior to dissociation of dermal-epidermal junctions by overnight digestion in a Dispase solution (Life Technologies) at 4°C . The next day, dermis was discarded and epidermis digested in a trypsin/EDTA solution for 20 min at 37°C . Cellular suspension was passed through a $70\ \mu\text{m}$ filter and melanocytes re-suspended in MCDB 153 medium (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) supplemented with 2% fetal bovine serum (FBS; Perbio, Cramlington, UK), $5\ \mu\text{g}/\text{ml}$ insulin (Sigma-Aldrich), $0.5\ \mu\text{g}/\text{ml}$ hydrocortisone (Sigma-Aldrich), $16\ \text{nM}$ tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) (Sigma-Aldrich), $1\ \text{ng}/\text{ml}$ fibroblast growth factor (FGF; Promega, Madison, WI, USA), $15\ \mu\text{g}/\text{ml}$ bovine pituitary extract (Invitrogen, Waltham, MA, USA) and $10\ \mu\text{M}$ forskolin (Sigma-Aldrich). Melanocytes were maintained at 37°C in 95% O₂/5% CO₂ atmosphere and supplemented with 0.08% G418 geneticin ($20\ \mu\text{g}/\text{ml}$, Invitrogen) for ~2 weeks to eliminate rapidly growing cells (i.e., keratinocytes hence selecting for melanocyte propagation). Once selected, melanocytes were grown in Cascade Biologics 254 medium (ThermoFisher Scientific) with Human Melanocyte Growth Supplement (HMGS, Gibco).

Response of NK and ILCs to stress. NK and total ILC were sorted (SH800S Cell Sorter, Sony Biotechnology) from PBMC of healthy and vitiligo patients using the same strategy as for FACS analysis (Supplementary Fig. 1). Sorted NKs were plated in round-bottom 96-well plates in RPMI 10% FCS prior to stimulation with three different stress-inducing DAMP molecules including H₂O₂ (0.1, 1, 10 μM) (Sigma-Aldrich Chimie, Lyon France), HMGB1 (250, 500 or 1000 ng/ml) or HSP70 (TKD peptide at 250, 750 or 1500 ng/ml) (both from Abcam, Cambridge, UK). Supernatant was collected at 24, 48 or 72 h post stimulation. IFN γ and chemokine (CXCL9, CXCL10 and CXCL11) production was measured using commercially available ELISA kits (PeproTech, NJ, USA).

Response of melanocytes and keratinocytes to exogenous IFN γ . NHM and NHK were isolated from neonatal foreskin obtained after circumcision as previously described. Cells were stimulated with IFN γ (50 ng/ml, Miltenyi Biotec) for 24 h. Cell pellets were harvested for extraction of RNA (using RNeasy kits, Qiagen) and $1\ \mu\text{g}$ RNA used to synthesize cDNA using the Reverse Transcription System (Promega) which was then used as a template for amplification by real-time qPCR with Sybr[™] Green reagent (Life Technologies, CA, USA) and specific primers directed against CXCL4, CXCL9, CXCL10 and CXCL11 genes. All measurements were performed in triplicate and results normalized to the expression of the SB34 housekeeping gene. In separate experiments, primary melanocytes from healthy and vitiligo skin biopsies were also stimulated with IFN γ and 24 h later both cell pellets and supernatants were collected for measurement of chemokine production at mRNA and protein level.

ILC and melanocyte co-culture. The supernatant from the NKs and total ILCs which were previously sorted from PBMCs and stressed with $1\ \mu\text{M}$ H₂O₂ for 48 h was replaced with fresh media prior to cells being directly added to their own primary *autologous* healthy or vitiligo melanocytes. Melanocytes were also

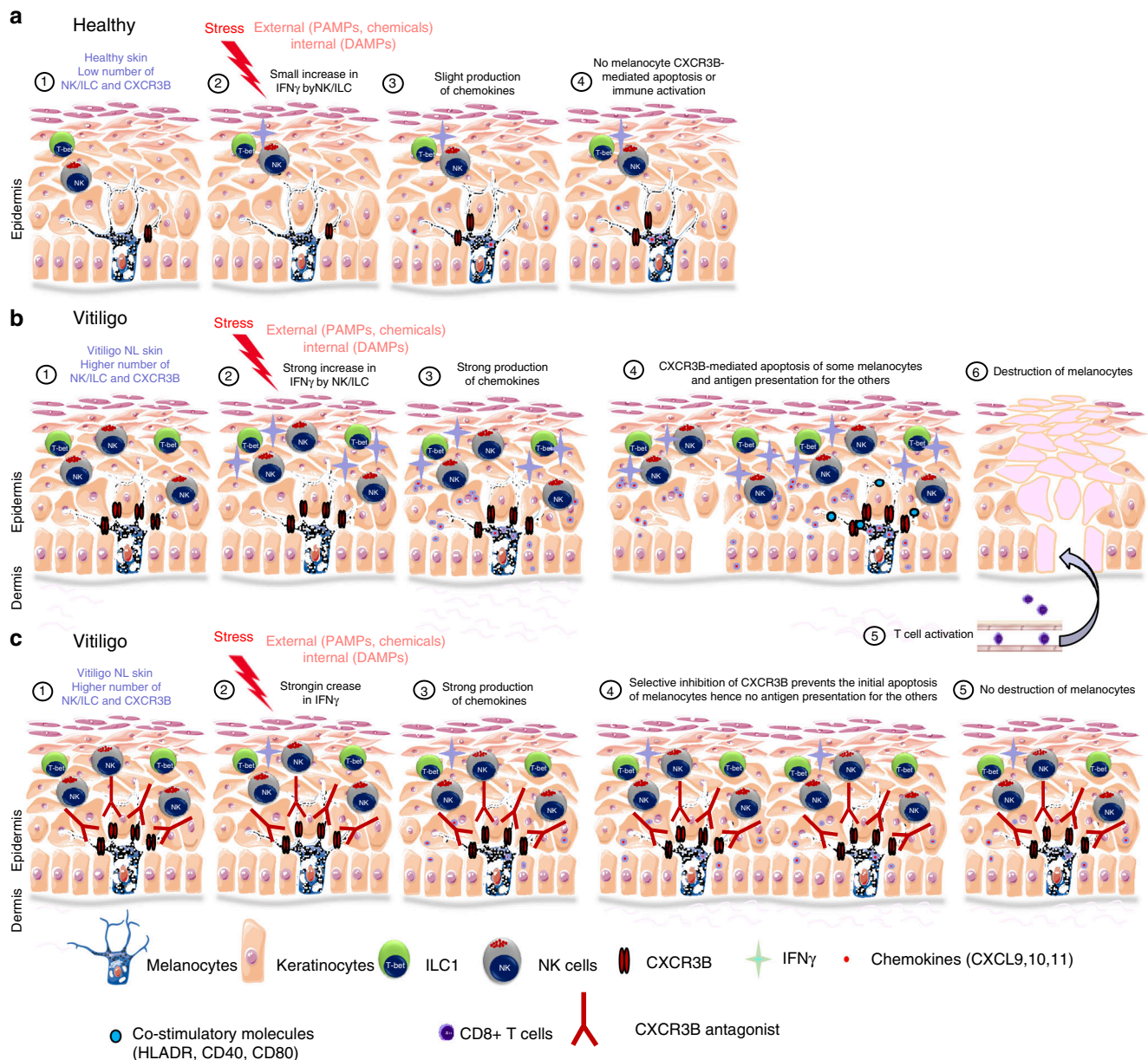


Fig. 6 Initial steps in the anti-melanocytic immune activation in vitiligo. **a** Schematic representation of normal skin. A low number of NK and ILC1 cells are present in the skin. External stress on the skin induces only a small increase in IFN γ by NK/ILC which is not sufficient to initiate their chemokines production, hence not initiating melanocyte apoptosis or immune activation. **b** Schematic representation of vitiligo skin. The basal number of NK and ILC1 cells is increased. Damage-associated molecular pattern (DAMP) molecules of genetically predisposed melanocytes can activate ILC1 and NK (1). Alternatively, ILC1 and NK can be also activated by external stress and pathogen-associated molecular pattern molecules (PAMP) (2). These NK and ILC cells are more sensitive to stress compared to healthy individuals and in response, they produce large amount of IFN γ (2) that induces the secretion of chemokines by keratinocytes and to a lesser extent by melanocytes (3). These chemokines (mostly CXCL10), bind chemokine receptor CXCR3B at the surface of melanocytes and induces their initial apoptosis and release of melanocytic antigens. The remaining melanocytes stimulated by IFN γ express co-stimulatory (CD40, CD80, HLA-DR) and adhesion (ICAM-1) molecules and start presenting their own antigens to the naive T cells attracted by the chemokines (5), thus initiating the initial steps involved in anti-melanocytic immunity in the skin (6). **c** Schematic representation of vitiligo skin treated with a selective inhibition of the B isoform of CXCR3. DAMPs and PAMPs induce a strong production of IFN γ by NK and ILC1 cells followed by a potent production of chemokines. However, the selective inhibition of CXCR3B prevents the initial melanocytic apoptosis and subsequent presentation of melanocytic antigens without impairing T cell function

incubated with *autologous* non-stressed NKs or total ILCs as controls. Positive controls were wells directly stimulated *ex vivo* with 50 ng/ml IFN γ . Supernatant was collected 24 h post incubation with innate cells or IFN γ to measure melanocyte production of CXCL9, CXCL10, CXCL11 and IFN γ by ELISA.

Detection of CXCR3B on human melanocytes. Melanocytes from healthy and vitiligo subjects were stimulated with 50 ng/ml IFN γ for 24 h and cell pellets harvested for RNA extraction. Real-time qPCR was performed using specific

primers directed against CXCR3 total or against CXCR3B and results normalized to the house-keeping gene SB 34 (Supplementary Table 1). CXCR3B mRNA levels were compared to expression in healthy human keratinocytes at baseline and following IFN γ stimulation. In separate experiments, melanocytes and keratinocytes were grown on cover slides in 12-well plates and stimulated with IFN γ as above. Twenty-four hours later, they were fixed with 1% paraformaldehyde, saturated in PBS 3% BSA containing 3% goat serum for 1 h and incubated overnight at 4 °C with primary antibody directed against CXCR3B (1:200) (Proteintech, USA). The next day, slides were washed 3× with PBS 3% BSA 0.1% Tween20 prior

to incubation for 1 h with secondary antibody (goat anti mouse AF594, 1:1000 at RT) and mounted with Prolong Gold Antifade reagent with DAPI (ThermoFisher, Waltham, USA). The number of CXCR3B+ immunoreactive cells (red) were counted over 10 non-overlapping fields and expressed as CXCR3B+ immunofluorescence *per* μm^2 . For in situ detection of CXCR3B+ melanocytes in the human skin, OCT frozen sections were permeabilised with PBS 0.3% Triton™ X-100 (Abcam, France) for 10 min prior to saturation with PBS 5% BSA 10% normal goat serum and 0.05% Triton™ X-100 for 2 h at RT. Slides were then incubated overnight at 4 °C with primary antibodies (polyclonal anti-MITF, 1:50, Sigma Aldrich and monoclonal anti-CXCR3B, 1:50, Proteintech) and the next day 1 h with secondary antibodies (anti-mouse AF594 and anti-rabbit AF488, both 1:1000) prior to mounting the slides and visualizing under confocal microscope (Nikon A1R using a $\times 60$ objective. For each slide (5 subjects *per* group), the number of MITF+CXCR3B+ cells (yellow immunostaining) were counted and averaged over six non-overlapping fields. CXCR3B staining in melanocytes was confirmed using another melanocyte marker gp100 (PMEL, premelanosome protein, 1:200, Abcam).

Live imaging of melanocyte viability and proliferation. Melanocytes were plated in 96-well plates (10,000/well) and stimulated with 50 ng/ml IFN γ for 48 h prior to transfection with 50 or 80 nM siCXCR3 or siC (SmartPool scramble sequence siRNA, Dharmacon, France) or with 80 nM custom-designed siCXCR3B or siC (ThermoFisher, France) using Lipofectamine™ RNAiMAX Reagent (Invitrogen, France) in optiMEM medium (Invitrogen). Next day, media was replaced and melanocytes stained with CellTracker® Red CMPTX dye for 20 min at 37 °C (1 μM , Molecular Probes, USA) before addition of 100 pg/ml recombinant human CXCL9, CXCL10 or CXCL11 (PeproTech) to melanocytes. Finally, Incucyte™ green Cytotox Reagent (100 nM, Essen Bioscience, Michigan, USA) was added to all wells and melanocyte death monitored in real-time using IncuCyte® Zoom live-cell imaging system (Essen Biosciences) which was inside a 37 °C humidified CO $_2$ incubator scanning the plate every 2 h. Multiple images were collected *per* well and quantification of dead melanocytes (yellow co-localised cells) was analysed using the integrated Zoom® software. In separate experiments, non-transfected cells were pre-incubated with IFN γ and 48 h later treated with CXCR3 antagonist AS612568 (0.02, 0.2, 2 μM , Calbiochem, China) and Cytotox® Reagent added just before live imaging. To try and mimic an in vivo situation, vitiligo melanocytes were stimulated with IFN γ (to upregulate their CD40 and CXCR3 expression) and 48 h later stimulated with CXCL10 (100 pg/ml). The next day, supernatant was removed and replaced with fresh media. In separate experiments, 24 h post CXCL10 stimulation, all media was replaced and melanocytes left in culture for another 72 h before adding either *allogeneic* PBMC (positive control experiments) or *autologous* non-stimulated and sorted CD3+ T cells (1 $\times 10^6$ /ml) prior to IncuCyte live imaging. At the end of the experiment (~40 h later), remaining melanocytes were trypsinized and co-stimulatory (CD40, HLA-DR, CD80) and adhesion cell markers (ICAM-1) on melanocytes, as well as proliferating T cells (CD3+ and Ki67+) were examined by immunofluorescence staining of cytospin sections. Monoclonal antibodies directed against human CD40 (G28.5, 1:100), HLA-DR (TU36, 1:200), CD80 (L307.4, 1:50) and ICAM-1 (HA58, 1:400) were purchased from BD Biosciences (San Diego, CA, USA). Ki67 rabbit monoclonal antibody (SP6, 1:200) was purchased from Abcam (Cambridge, UK). The number of CD3+ T cells in IncuCyte was counted from time-lapse images with Fiji software using a macro whereby a median filter was initially applied prior to application of 'Find Maxima' function to identify and count all non-stained dark spots in the images. Quantification of proliferation was performed using flow cytometry and CellTrace CFSE cell proliferation kit (Thermo Fisher Scientific, Illkirch, France). Briefly, 1 $\times 10^6$ cells were labelled with 5 μM of CFSE in 96-well plates and 72 h later, cells collected, stained with anti-CD3 conjugated to APC (BD Biosciences, 1:100) and fluorescence measured with MACSQuant Analyzer (Miltenyi, Paris, France). Labelled cells at time zero was used as a negative reference, unstimulated cells left in culture for 72 h before labelling as a control and cells stimulated with PHA for 72 h (Phytohemagglutinin, 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) as a positive control.

CXCL10-induced signalling in healthy and vitiligo melanocytes. Protein samples from primary melanocytes stimulated with CXCL9, CXCL10, CXCL11 (100 pg/ml) or IFN γ (50 ng/ml) for 24 h were extracted in buffer containing 50 mmol/L Tris-HCl (pH 7.5), 15 mmol/L NaCl, 1% Triton X-100 and 1 \times protease and phosphatase inhibitors. Cell lysates (30 mg) were separated on SDS-polyacrylamide gel (SDS-PAGE) and transferred onto a polyvinylidene difluoride membrane (Millipore Corp). The membranes were incubated with antibodies directed against total and active p38 and poly ADP-ribose polymerase (PARP) (Cell Signalling Technology, 1:1000) followed by peroxidase-linked secondary antibodies. HSP90 was used as house-keeping genes. Reactive protein bands were detected using chemiluminescent substrate (ECL System, Amersham) and Fujifilm LAS-4000 system. Staurosporine (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) was used as a positive control. In parallel experiments, to confirm the role of apoptosis in CXCL10-induced melanocyte death, cells were pretreated with IFN γ and stimulated with CXCL10 (100 pg/ml) in presence of absence of QVD OPH (10 μM , caspase inhibitor, Biosciences) for 24 h. Cell lysates were prepared for assessment of total and cleaved Caspase-3 activity (Cell Signalling Technology, 1:1000) by WB and remaining cells stained with Annexin V conjugate (Miltenyi, France) and DAPI for FACS analysis.

Statistical analyses. Statistical analyses were performed with Graphpad Prism® 6 software. Mann-Whitney non-parametric analysis was used to test unpaired differences between groups and Wilcoxon signed rank test for paired differences. Differences were considered significant at $P < 0.05$.

Data availability

The data that support the findings of this study are available from the corresponding author upon reasonable request.

Received: 27 September 2018 Accepted: 5 April 2019

Published online: 16 May 2019

References

1. Spritz, R. A. Six decades of vitiligo genetics: genome-wide studies provide insights into autoimmune pathogenesis. *J. Invest. Dermatol.* **132**, 268–273 (2012).
2. Jin, Y. et al. Genome-wide association analyses identify 13 new susceptibility loci for generalized vitiligo. *Nat. Genet.* **44**, 676–680 (2012).
3. Jin, Y. et al. Genome-wide association studies of autoimmune vitiligo identify 23 new risk loci and highlight key pathways and regulatory variants. *Nat. Genet.* **48**, 1418–1424 (2016).
4. Chatterjee, S. et al. A quantitative increase in regulatory T cells controls development of vitiligo. *J. Invest. Dermatol.* **134**, 1285–1294 (2014).
5. Mosenson, J. A. et al. Mutant HSP70 reverses autoimmune depigmentation in vitiligo. *Sci. Transl. Med.* **5**, 174ra128 (2013).
6. Harris, J. E. et al. A mouse model of vitiligo with focused epidermal depigmentation requires IFN- γ for autoreactive CD8(+) T-cell accumulation in the skin. *J. Invest. Dermatol.* **132**, 1869–1876 (2012).
7. Rashighi, M. et al. CXCL10 is critical for the progression and maintenance of depigmentation in a mouse model of vitiligo. *Sci. Transl. Med.* **6**, 223ra223 (2014).
8. Richmond J. M. et al. Keratinocyte-derived chemokines orchestrate T cell positioning in the epidermis during vitiligo and may serve as biomarkers of disease. *J. Invest. Dermatol.* **137**, 350–358 (2017).
9. Wang, X. X. et al. Increased expression of CXCR3 and its ligands in patients with vitiligo and CXCL10 as a potential clinical marker for vitiligo. *Br. J. Dermatol.* **174**, 1318–1326 (2016).
10. Richmond, J. M. et al. CXCR3 depleting antibodies prevent and reverse vitiligo in mice. *J. Invest. Dermatol.* **137**, 982–985 (2017).
11. Regazzetti, C. et al. Transcriptional analysis of vitiligo skin reveals the alteration of WNT pathway: a promising target for repigmenting vitiligo patients. *J. Invest. Dermatol.* **135**, 3105–3114 (2015).
12. Yu, R. et al. Transcriptome analysis reveals markers of aberrantly activated innate immunity in vitiligo lesional and non-lesional skin. *PLoS ONE* **7**, e51040 (2012).
13. Sonnenberg, G. F. & Artis, D. Innate lymphoid cells in the initiation, regulation and resolution of inflammation. *Nat. Med.* **21**, 698–708 (2015).
14. Vivier, E., Tomasello, E., Baratin, M., Walzer, T. & Ugolini, S. Functions of natural killer cells. *Nat. Immunol.* **9**, 503–510 (2008).
15. Bernardini, G., Gismondi, A. & Santoni, A. Chemokines and NK cells: regulators of development, trafficking and functions. *Immunol. Lett.* **145**, 39–46 (2012).
16. Halder, R. M., Walters, C. S., Johnson, B. A., Chakrabarti, S. G. & Kenney, J. A. Jr. Aberrations in T lymphocytes and natural killer cells in vitiligo: a flow cytometric study. *J. Am. Acad. Dermatol.* **14**, 733–737 (1986).
17. Bruggen, M. C. et al. In situ mapping of innate lymphoid cells in human skin: evidence for remarkable differences between normal and inflamed skin. *J. Invest. Dermatol.* **136**, 2396–2405 (2016).
18. Simoni, Y. et al. Human innate lymphoid cell subsets possess tissue-type based heterogeneity in phenotype and frequency. *Immunity* **46**, 148–161 (2017).
19. Richmond, J. M., Frisoli, M. L. & Harris, J. E. Innate immune mechanisms in vitiligo: danger from within. *Curr. Opin. Immunol.* **25**, 676–682 (2013).
20. Le Poole, I. C. et al. A novel, antigen-presenting function of melanocytes and its possible relationship to hypopigmentary disorders. *J. Immunol.* **151**, 7284–7292 (1993).
21. Lu, Y., Zhu, W. Y., Tan, C., Yu, G. H. & Gu, J. X. Melanocytes are potential immunocompetent cells: evidence from recognition of immunological characteristics of cultured human melanocytes. Pigment cell research / sponsored by the European Society for Pigment Cell Research and the International Pigment Cell Society **15**, 454–460 (2002).
22. Yang, Y. et al. A similar local immune and oxidative stress phenotype in vitiligo and halo nevus. *J. Dermatol. Sci.* **87**, 50–59 (2017).
23. Harmelin, Y. et al. Localized depigmentation on genital melanosis: a clue for the understanding of vitiligo. *Br. J. Dermatol.* **168**, 663–664 (2013).
24. Vely, F. et al. Evidence of innate lymphoid cell redundancy in humans. *Nat. Immunol.* **17**, 1291–1299 (2016).

25. Schallreuter, K. U. et al. In vivo and in vitro evidence for hydrogen peroxide (H₂O₂) accumulation in the epidermis of patients with vitiligo and its successful removal by a UVB-activated pseudocatalase. *J. Invest. Dermatol Symp. Proc.* **4**, 91–96 (1999).
26. Jian, Z. et al. Impaired activation of the Nrf2-ARE signaling pathway undermines H₂O₂-induced oxidative stress response: a possible mechanism for melanocyte degeneration in vitiligo. *J. Invest. Dermatol.* **134**, 2221–2230 (2014).
27. Denman, C. J. et al. HSP70i accelerates depigmentation in a mouse model of autoimmune vitiligo. *J. Invest. Dermatol.* **128**, 2041–2048 (2008).
28. Mosenson, J. A. et al. Preferential secretion of inducible HSP70 by vitiligo melanocytes under stress. *Pigment Cell Melanoma Res.* **27**, 209–220 (2014).
29. Kim, J. Y., Lee, E. J., Seo, J. & Oh, S. H. Impact of high-mobility group box 1 on melanocytic survival and its involvement in the pathogenesis of vitiligo. *Br. J. Dermatol.* **176**, 1558–1568 (2017).
30. Korniejewska, A., McKnight, A. J., Johnson, Z., Watson, M. L. & Ward, S. G. Expression and agonist responsiveness of CXCR3 variants in human T lymphocytes. *Immunology* **132**, 503–515 (2011).
31. Balan, M. & Pal, S. A novel CXCR3-B chemokine receptor-induced growth-inhibitory signal in cancer cells is mediated through the regulation of Bach-1 protein and Nrf2 protein nuclear translocation. *J. Biol. Chem.* **289**, 3126–3137 (2014).
32. Boniface, K. et al. Vitiligo skin is imprinted with resident memory CD8 T cells expressing CXCR3. *J. Invest. Dermatol.* **138**, 355–364 (2018).
33. Kuo, P. T. et al. The role of CXCR3 and its chemokine ligands in skin disease and cancer. *Front. Med.* **5**, 271 (2018).
34. Berchiche, Y. A. & Sakmar, T. P. CXC chemokine receptor 3 alternative splice variants selectively activate different signaling pathways. *Mol. Pharm.* **90**, 483–495 (2016).
35. Lasagni, L. et al. An alternatively spliced variant of CXCR3 mediates the inhibition of endothelial cell growth induced by IP-10, Mig, and I-TAC, and acts as functional receptor for platelet factor 4. *J. Exp. Med.* **197**, 1537–1549 (2003).
36. Boye, K., Billottet, C., Pujol, N., Alves, I. D. & Bikfalvi, A. Ligand activation induces different conformational changes in CXCR3 receptor isoforms as evidenced by plasmon waveguide resonance (PWR). *Sci. Rep.* **7**, 10703 (2017).
37. Feldman, E. D. et al. Interferon gamma-inducible protein 10 selectively inhibits proliferation and induces apoptosis in endothelial cells. *Ann. Surg. Oncol.* **13**, 125–133 (2006).
38. Wagner, R. Y. et al. Altered E-cadherin levels and distribution in melanocytes precede clinical manifestations of vitiligo. *J. Invest. Dermatol.* **135**, 1810–1819 (2015).
39. Spritz, R. A. & Andersen, G. H. Genetics of vitiligo. *Dermatol Clin.* **35**, 245–255 (2017).

Acknowledgements

We gratefully acknowledge the Centre Méditerranéen de Médecine Moléculaire (C3M INSERM U1065) microscopy and imaging facility, particularly the expertise of platform

manager Maéva Gesson. InCuCyte was available with financial support from ITMO Cancer Aviesan (Alliance National pour les Sciences de la Vie et de la Santé, National Alliance for Life Science and Health) within the framework of the Cancer Plan. Special acknowledgements to Sonia Amroune and Raja Bahroumi for their assistance in the clinic with patient recruitment. This work was supported by the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM).

Author Contributions

M.K.T. conceived and performed the experiments and wrote the manuscript. E.C. was a Master 2 student on this project. Y.C., A.J. and C.L. assisted with cell sorting and FACS analyses and provided intellectual input. N.C.L. performed and interpreted IHC analysis. P.A., H.H.B., L.S. and C.L. performed the Western blot analyses. C.R., L.S., M.G., G.E.B. and C.P. provided technical assistance and support. A.K. helped collecting patient and control samples. Y.C., A.J., C.L., R.B., C.B. and S.R. provided expertise and feedback on manuscript draft. T.P. conceived experiments, supervised the study and wrote the manuscript. All authors have read and approved the final version of the manuscript.

Additional information

Supplementary Information accompanies this paper at <https://doi.org/10.1038/s41467-019-09963-8>.

Competing interests: The authors declare no competing interests.

Reprints and permission information is available online at <http://npg.nature.com/reprintsandpermissions/>

Journal peer review information: *Nature Communications* would like to thank Vitali Alexeev and other anonymous reviewers for their contribution to the peer review of this work. Peer review reports are available.

Publisher's note: Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2019

Discovery and Optimization of *N*-(4-(3-Aminophenyl)thiazol-2-yl)acetamide as a Novel Scaffold Active against Sensitive and Resistant Cancer Cells

Antoine Millet,^{†,‡} Magali Plaisant,^{‡,§,⊥} Cyril Ronco,^{†,⊥} Michaël Cerezo,^{‡,§} Patricia Abbe,^{‡,§} Emilie Jaune,^{‡,§} Elisa Cavazza,^{‡,§} Stéphane Rocchi,^{*,‡,§,||} and Rachid Benhida^{*,†}

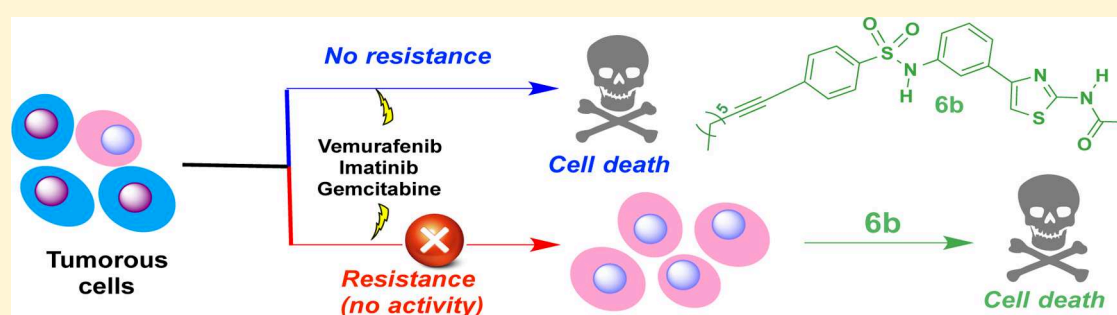
[†]Institut de Chimie de Nice, Université Nice Sophia Antipolis, UMR UNS-CNRS 7272, 06108 Nice Cedex 2, France

[‡]Centre Méditerranéen de Médecine Moléculaire (C3M), Equipe Biologie et Pathologie des Cellules Mélanocytaires: De La Pigmentation Cutanée au Mélanome, INSERM, U1065, Parc Valrose, 06108 Nice Cedex 2, France

[§]UFR de Médecine, Université de Nice Sophia Antipolis, 06107 Nice, France

^{||}Service de Dermatologie, Hôpital Archet II, CHU, 06200 Nice, France

S Supporting Information



ABSTRACT: Cancer is the second cause of deaths worldwide and is forecasted to affect more than 22 million people in 2020. Despite dramatic improvement in its care over the last two decades, the treatment of resistant forms of cancer is still an unmet challenge. Thus, innovative and efficient treatments are still needed. In this context, we report herein the synthesis and the evaluation of a new class of bioactive molecules belonging to the *N*-(4-(3-aminophenyl)(thiazol-2-yl)acetamide family. Structure–activity relationships could be driven and resulted in the discovery of lead compound **6b**. The latter display high in vitro potency against both sensitive and resistant cancer cell lines on three models: melanoma, pancreatic cancer, and chronic myeloid leukemia (CML). **6b** leads to cell death by concomitant induction of apoptosis and autophagy, shows good pharmacokinetic properties, and demonstrates a significant reduction of tumor growth in vivo on A375 xenograft model in mice.

INTRODUCTION

Cancer is one of the major causes of death with approximately 8.2 million lethal cases in 2012. According to the American Cancer Society, 14.1 million people affected by cancer have been inventoried in 2012, and this number is expected to reach 22 million cases over the next two decades, due in part to the increase in life expectancy.¹ Cancer is characterized by the uncontrolled growth of abnormal cells that have the potential to invade and to spread throughout the body with the consequence of threatening the survival of the organism.

Different strategies can be considered to relieve patients diagnosed with cancer, all having however their own limitations. When possible, surgery and radiation therapy are applied as first treatment to most tumor masses. Surgery is the most effective intervention for localized tumors but often damage large parts of healthy tissues or organs and the small tumors or the not visible metastases cannot be removed.² In all cases, a molecular treatment must be applied to kill the remaining cells,³ and those treatments are characterized by their general lack of efficiency

and a significant to crippling toxicity for radio- and chemotherapy agents. Ultimately, the overall efficacy of the responses to cancer remains quite limited, especially in advanced stages of the disease when metastases develop, for which treatments often only provide a means to delay death events for some months.

One of the major causes of the failure of cancer chemotherapies is drug resistance, which represents nowadays a critical clinical challenge in oncology.⁴ This phenomenon is encountered either at the first attempt when tumors do not respond to treatment (intrinsic resistance) or over the course of the treatment when tumors initially respond but then relapse (acquired resistance).⁵ Overall, tumor cell resistance is a complex process that expresses itself simultaneously at different levels: with first line nonspecific barriers that diminish intracellular drug concentration like efflux pumps or metabo-

Received: April 13, 2016

Published: August 30, 2016

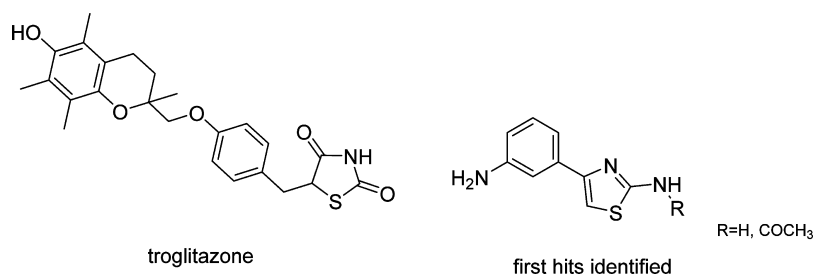
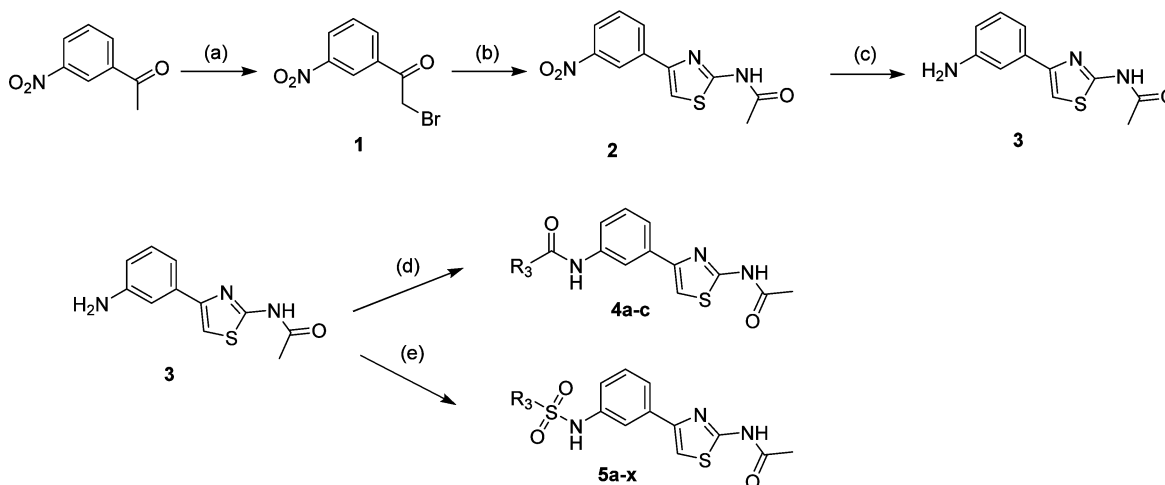


Figure 1. Structures of troglitazone and of the first hits identified.

Scheme 1. Synthesis of Analogues 4a–c and 5a–x^a



^aReagent and conditions: (a) Br₂, AlCl₃, diethyl ether, 0 °C to rt, 1 h (97%); (b) *N*-acetylthiourea, EtOH, 80 °C, 30 min (92%); (c) NaBH₄, Pd/C (10% mol), CH₂Cl₂/MeOH (50:50), 0 °C to rt, 1 h (83%); (d) acid chloride, pyridine, 0 °C, 2 h (61–82%); (e) sulfonyl chloride, triethylamine, CH₂Cl₂/DMF (9:1), 25 °C, (22–74%).

lism,^{5a} then with more specific and flexible defenses related to the signaling pathways or to the molecular target.⁶ The development of the targeted therapies in the past 15 years on which many hopes have relied is particularly prone to the apparition of acquired resistances.⁷ Immunotherapies, although recent advances have demonstrated promising results in terms of efficacy and benefit for patients,⁸ are also concerned by intrinsic and acquired resistances.⁹ Thus, in parallel or in combination with current therapies, the research and development of new drugs is of great importance to fight intrinsic resistance, to delay the emergence of resistant cell populations, or to restore their sensitivity to the level before the apparition of resistance.

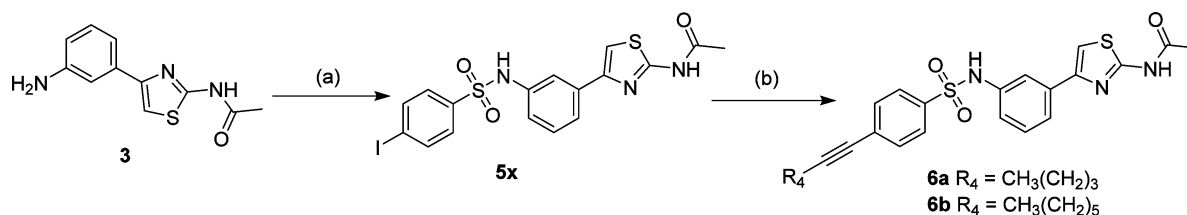
In this context, we describe herein the discovery and optimization of a new class of drug-like molecules with antiproliferative activity against tumor cells. On the basis of initial findings showing antiproliferative activity of the well-known antidiabetic drug troglitazone,¹⁰ a new scaffold was constructed by iterative structure–activity relationships: *N*-(4-(3-aminophenyl)thiazol-2-yl)acetamides. From this scaffold, a number of compounds was synthesized and were found to exhibit significant activity against a panel of cancer cell lines, both sensitive and resistant to respective standard treatment drugs. We focused on three important pathologies: (1) melanoma, which is an aggressive form of skin cancer displaying one of the highest mortality rates and for which resistance problems to recent B-raf inhibitors is a major concern,^{7b} (2) chronic myelogenous leukemia (CML), a largely studied and well characterized tumor cell model, as demonstrated by the

successful development of the kinase inhibitor imatinib, and (3) highly deadly pancreatic cancer, for which the keystone treatment proposed relies on the old nucleoside analogue gemcitabine, which displays low response rates, high toxicity, severe adverse effects, and very high resistance occurrence, leading to only few weeks enhancement in median survival.¹¹

From the initial hits structure, 29 active compounds divided into two series were synthesized and evaluated for their cytotoxic potential on a melanoma A375 cell lines model. The 10 most active compounds were screened on a panel of melanoma, CML, and pancreatic cancer cells, either sensitive or resistant to the standard drugs. The high cellular activities measured against these three cancers, especially their capacity to affect resistant cells, together with the selectivity observed over healthy cells, prompted us to study the pharmacological parameters of our lead compound **6b** in mice. No apparent toxicity was observable based on animal behavior, diet, and organs weight, and the pharmacokinetic profile proved amply favorable to *in vivo* studies, which were conducted on melanoma xenograft mice models and demonstrated the potent *in vivo* activity of compound **6b**.¹¹

RESULTS AND DISCUSSION

Chemistry. This work was initiated from the discovery in our laboratories that molecules belonging to thiazolidinediones (TZD) class were displaying non-negligible death induction of melanoma cell lines by apoptosis.¹⁰ TZD, and particularly its most representative derivative troglitazone (Figure 1), are known PPAR γ nuclear receptor ligands, which are previously

Scheme 2. Synthesis of Analogues 6a–b^a

^aReagents and conditions: (a) 4-iodosulfonyl chloride, triethylamine, $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{DMF}$ (9:1), 25 °C, 20 h (60%); (b) from **5x**, hex-1-yne or oct-1-yne, DMF, triethylamine, $\text{Pd}(\text{OAc})_2$, PPh_3 , 50 °C, 2 h (72–89%).

used in the treatment of type 2 diabetes to increase insulin signaling and regulate glucose homeostasis.^{12,13} The independence between $\text{PPAR}\gamma$ activation and the cytotoxic effects of TZD observed on melanoma was subsequently demonstrated.^{10a} From these promising preliminary results, we started a medicinal chemistry study aimed at modifying the TZD structure in order to overcome $\text{PPAR}\gamma$ activity and reach a full selectivity toward apoptosis of neoplastic cells. By iterative structure–activity relationships, we first showed that the thiazolidinedione part of troglitazone was necessary for the antiproliferative activity, whereas the presence of the (1-methylcyclohexyl)methoxy moiety rather provided affinity toward $\text{PPAR}\gamma$ receptors (data not shown). It was later found that the thiazolidinedione moiety could be advantageously replaced by a 2-aminothiazole ring and that the direct linkage, without the methylene group, to the phenyl ring was also beneficial. This leads to the identification of the first hits 4-(3-aminophenyl)thiazol-2-amine and *N*-(4-(3-aminophenyl)thiazol-2-yl)acetamide (Figure 1).

From these hit structures displaying moderate micromolar cellular activities (*vide infra*), we explored modifications on the aniline nitrogen atom by attaching linear, cyclic, or heteroaromatic groups linked by an amide or sulfonamide function.

The synthesis of all analogues was performed as depicted in Scheme 1. The phenyl-thiazole core was prepared via a Hantzsch aminothiazole synthesis according to our previously reported procedure.¹⁴ The first step consists in the α -bromination of *meta*-nitroacetophenone. The use of a catalytic amount of aluminum trichloride under strict control of temperature and reaction time allowed obtaining only the desired monobrominated derivative in quantitative yields.¹⁴ Then bromoketone **1** is reacted with acetylthiourea under Hantzsch conditions to afford 2-aminothiazole **2**. Palladium hydride reduction of the nitro group gave the corresponding aniline **3**. The different derivatives were obtained by coupling aniline **3** with various acid chlorides (**4a–c**) or sulfonyl chlorides (**5a–x**). Alternatively, a Sonogashira coupling between 4-iodoaryl **5x** derivative and the suitable terminal alkynes afforded compounds **6a** and **6b** (Scheme 2).

The structures of all synthesized derivatives are summarized in Table 1. The series A (**2**, **3**, **4a–c**, **5a–q**) was first designed to explore the introduction of various aromatic or heteroaromatic rings linked by an amide or sulfonamide function. Compounds of series B (**5r–x**, **6a–b**) were later synthesized to study the modulation in the *para* position of phenylsulfonamide group of **5f** with various hydrophobic groups. In total, 29 compounds were synthesized and tested for their cytotoxic properties.

Biological Evaluation. Cytotoxic Activity against Melanoma Sensitive Cells. The cytotoxic potency of the 22 compounds of series A was first evaluated using a cell viability

assay on A375 human melanoma cells upon single dose treatment. All cell viability values are summarized in Table 2.

The structure of this first series of compounds and the measured activity allowed us to define the first structure–activity relationship. Our results showed that all compounds present an activity in the medium to low micromolar range. Five-membered aromatic rings (**4b**, **5a–e**) as well as bicyclic heteroaromatics (**5l–q**) seem unfavorable, with viability values close to or higher than the parent aniline **3**. Alkyl or aryl groups without H-bond donating capability proved generally more active than **3**. Two interesting features are noteworthy. First, substitution with apolar groups on a phenyl ring seems favorable (**5g–k** vs **5f**) and *para* substitution preferred over *meta* position (**5h** vs **5g**, **5k** vs **5j**). Second, a sulfonamide is greatly preferred over an amide link (**5k** vs **4c**).

These first findings prompted us to prepare a second series of nine derivatives bearing apolar groups in *para* position of a phenyl ring and linked on the aniline by a sulfonamide. The activities of compounds of series B presenting different alkyl, halogen, or alkyne groups are summarized in Table 3.

With the exception of the bis-phenyl derivatives (**5v–w**), all compounds showed a strong activity better than the parent 4-tolyl group of **5h**. Three compounds (**5x**, **6a**, and **6b**) demonstrated activities below the threshold of the test with no cell survival at 10 μM after 48 h treatment.

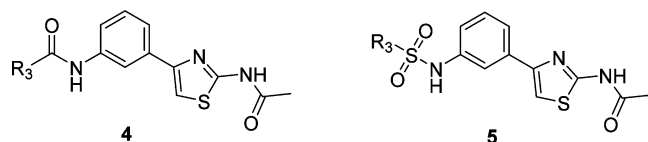
Over the two series, the general tendency proved that aliphatic substituents in *para* position are the best tolerated on this scaffold. This first cell viability screening allowed us to select 10 compounds (three of series A and seven of series B), displaying activities below 20% at 10 μM to study their cytotoxic potential against different sensitive and resistant cell lines.

On the basis of the initial SAR deduced from Tables 2 and 3, the 10 selected compounds (**4c**, **5h**, **5k**, **5r–u**, **5x**, **6a–b**) were evaluated against resistant melanoma cell lines as well as against one hematologic cancer (CML) and one solid cancer (pancreatic cancer), which are significantly affected by resistance phenomena.

Evaluation against Melanoma Sensitive and Resistant Cell Lines. The growth inhibition was tested for melanoma against human A375 sensitive cells and compared to the resistant cell lines A375 R5C3 (rendered resistant after *in vitro* excessive prolonged exposure to vemurafenib, the standard BRAf inhibitor) and A375 RIV (rendered resistant after *in vivo* excessive prolonged exposure to vemurafenib).¹⁵ The cell viability values are depicted in Table 4 and Chart 1.

We observed that at 10 μM , whatever the cell lines (sensitive or resistant), all the 10 compounds proved more active than the reference B-Raf inhibitor vemurafenib on A375 melanoma cells. An apparent correlation between the size of the apolar substituent in *para* position and the activity could be drawn,

Table 1. Structure of All Synthesized Analogues



Compound	R ₃	Compound	R ₃
Series A			
4a		5h	
4b		5i	
4c		5j	
5a		5k	
5b		5l	
5c		5m	
5d		5n	
5e		5o	
5f		5p	
5g		5q	
Series B			
5r		5w	
5s		5x	
5t		6a	
5u		6b	
5v			

the best compounds being those presenting a bulky iodine atom or hydrophobic aliphatic chains. Five derivatives (**5x**, **6a–b**) showed viabilities below 10% for all cell lines, with the best product being the alkyne **6b**, displaying no cell survival at 10

Table 2. Evaluation of the Activity of Series A Compounds

compd	% cell viability ^a	compd	% cell viability ^a
2	47.3 ± 14.3	5g	51.2 ± 11.9
3	38.4 ± 10.1	5h	19.8 ± 3.5
4a	40.0 ± 9.4	5i	26.3 ± 1.2
4b	29.2 ± 3.6	5j	20.4 ± 6.2
4c	18.3 ± 2.4	5k	3.3 ± 3.8
5a	29.6 ± 11.0	5l	46.5 ± 10.3
5b	45.7 ± 12.5	5m	65.5 ± 11.1
5c	37.5 ± 5.9	5n	60.7 ± 2.7
5d	36.8 ± 10.6	5o	29.2 ± 5.9
5e	29.2 ± 3.6	5p	59.5 ± 0.6
5f	72.2 ± 3.6	5q	29.6 ± 14.6

^aCell viability on A375 melanoma cells after a 48 h treatment with 10 μM of the indicated compounds relative to a DMSO control ± SD from three independent experiments, as determined by trypan blue exclusion assay.

Table 3. Evaluation of the Activity of Series B Compounds

compd	% cell viability ^a	compd	% cell viability ^a
5r	7.5 ± 1.2	5w	26.3 ± 1.2
5s	2.2 ± 3.8	5x	<1.0 ^b
5t	2.8 ± 4.8	6a	<1.0 ^b
5u	1.5 ± 2.6	6b	<1.0 ^b
5v	33.9 ± 14.0		

^aCell viability on A375 melanoma cells after a 48 h treatment with 10 μM of the indicated compounds relative to a DMSO control ± SD from three independent experiments, as determined by trypan blue exclusion assay. ^bNo viable cells.

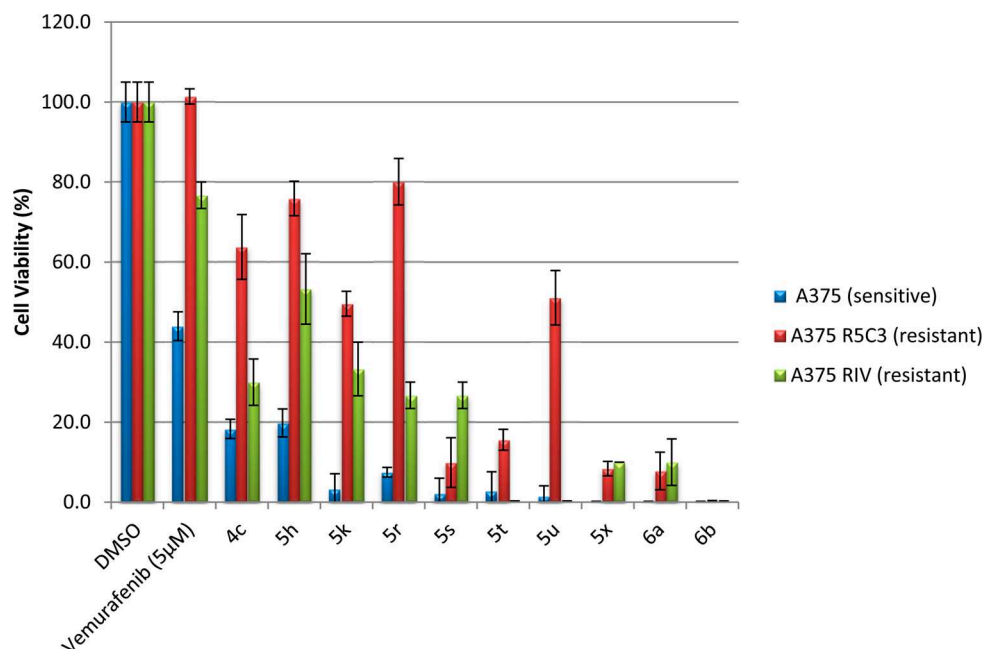
Table 4. Evaluation of the Activity against Sensitive and Resistant Melanoma Cell Lines

compd	cell viability at 10 μM for 48 h		
	% cell viability ^a A375 (sensitive)	% cell viability ^a A375 R5C3 (resistant)	% cell viability ^a A375 RIV (resistant)
4c	18.3 ± 2.4	63.8 ± 8.1	30.0 ± 5.8
5h	19.8 ± 3.5	75.9 ± 4.3	53.3 ± 8.8
5k	3.3 ± 3.8	49.6 ± 3.1	33.3 ± 6.7
5r	7.5 ± 1.2	80.1 ± 5.8	26.7 ± 3.3
5s	2.2 ± 3.8	9.9 ± 6.2	26.7 ± 3.2
5t	2.8 ± 4.8	15.6 ± 2.6	<1.0 ^b (27.7 ± 0.9) ^c
5u	1.5 ± 2.6	51.1 ± 6.8	<1.0 ^b (39.4 ± 1.9) ^c
5x	<1.0 ^b	8.4 ± 2.8	10.0 ± 0.1
6a	<1.0 ^b	7.8 ± 4.7	10.0 ± 5.8
6b	<1.0 ^b	<1.0 ^b (83.0 ± 7.5) ^c	<1.0 ^b (12.0 ± 1.2) ^c
vemurafenib (5 μM)	44 ± 3.6	101.4 ± 1.9	76.7 ± 3.3

^aCell viability on A375 melanoma cells after a 48h treatment with 10 μM of the indicated compounds relative to a DMSO control ± SD from three independent experiments, as determined by trypan blue exclusion assay. ^bNo viable cells. ^cCell viability after a 48h treatment with 1 μM due to high potency at 10 μM.

μM. The most interesting finding was their high activity on B-raf inhibitor resistant cells, compared to vemurafenib, which has no activity. This first finding suggests a new mechanism of action of these molecules different from the inhibition of the

Chart 1. Evaluation of the Activity against Sensitive and Resistant Melanoma Cell Lines



Raf pathway and therefore prompted us to test these compounds on other cancer cell lines.

Activity against Chronic Myeloid Leukemia Sensitive and Resistant Cell Lines. After the promising results obtained on melanoma cells, the 10 derivatives were tested against CML K562 cells, either sensitive or resistant to the standard BCR-ABL tyrosine kinase inhibitor imatinib. Indeed, if imatinib has proven to be very effective in achieving high remission rates for CML patients, up to 33% of them will develop acquired resistance, due in part to the well-known T315 mutation.¹⁶ The viability values for these cell lines are resumed in Table 5 and Chart 2.

The 10 derivatives demonstrated also high activity on CML cell lines at 10 μM . The activity of most derivatives proved in the same range for sensitive and resistant cells, implying a

Table 5. Activity against Sensitive and Resistant K562 CML Cell Lines

compd	cell viability at 10 μM for 48 h	
	% cell viability ^a K562 (sensitive)	% cell viability ^a K562 (resistant)
4c	53.9 \pm 6.0	89.7 \pm 3.7
5h	15.3 \pm 1.1	38.5 \pm 2.5
5k	31.0 \pm 5.9	25.6 \pm 2.8
5r	12.8 \pm 3.3	27.0 \pm 3.6
5s	51.6 \pm 3.4	60.9 \pm 11.5
5t	51.0 \pm 11.3	72.7 \pm 8.1
5u	19.4 \pm 3.3	35.1 \pm 12.6
5x	15.0 \pm 2.5	27.0 \pm 3.6
6a	26.9 \pm 4.6	35.1 \pm 8.0
6b	0.6 \pm 0.1	3.4 \pm 3.4
imatinib (1 μM)	9.7 \pm 0.5	85.5 \pm 17.7

^aCell viability on K562 CML cells after a 48 h treatment with 10 μM of the indicated compounds relative to a DMSO control \pm SD from three independent experiments, as determined by trypan blue exclusion assay.

different mode of action than BCR-ABL oncoprotein inhibition. The best activity values were obtained again for **6b** that leads to almost total mortality at the studied concentration.

Activity against Pancreatic Cancer Sensitive and Resistant Cell Lines. The choice to test our most active compounds on pancreatic cell lines was driven by the poor diagnosis and overall survival of patients affected by this cancer, and the few therapeutic options available in case of resistance.¹⁷ Indeed, the first-line treatment relied almost exclusively on the nucleoside analogue gemcitabine, which displays a narrow therapeutic window and growing resistance phenomena that dramatically reduce the global efficacy of the treatment.¹⁰ Therefore, the 10 most active compounds of our series were evaluated against pancreatic cancer sensitive BxPC-3 cells and MIA PaCa-2 cells resistant to gemcitabine. The activity of these compounds against these lines is depicted in Table 6 and Chart 3.

Our compounds proved particularly toxic to pancreatic cells and caused very high mortality at 10 μM for both sensitive and resistant cell lines.

Taking all these results together, we selected the most potent derivate **6b** as lead compound for further in vitro and in vivo studies of this new class of compounds.

Dose-Response Curves against Various Sensitive and Resistant Cell Lines. First, the dose-activity response of **6b** was evaluated at 10 different concentrations on the seven studied cell lines. The results are showed in Table 7 and Figure 2.

Toxicity and Selectivity of 6b over Noncancerous Cells. We next investigated the toxicity of **6b** on two noncancerous cell lines: human keratinocytes and rapid dividing human fibroblasts. The different cell lines were treated for 48 h with 5 μM and 10 μM of **6b**, respectively 10- and 20-fold more than the EC₅₀ on melanoma cells. The results are given in Table 8 and Chart 4.

At 5 μM , no or marginal toxic effect of **6b** was observed on normal cells, whereas cancer cells displayed almost no survival. At 10 μM , no significant toxicity was noted on keratinocytes and fibroblasts. Total mortality of cancer cells was reached at

Chart 2. Activity against Sensitive and Resistant K562 CML Cell Lines

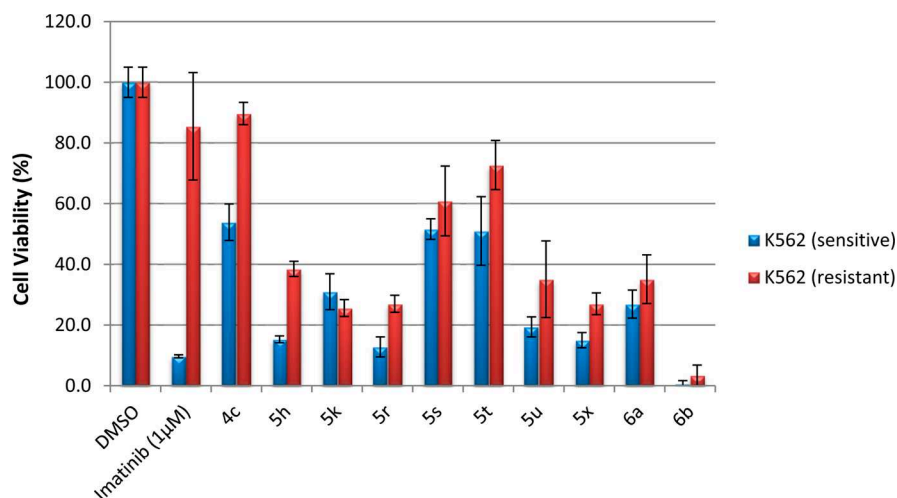


Table 6. Activity against BxPC-3 and MIA PaCa-2 Pancreatic Cancer Cell Lines

compd	cellular viability at 10 µM for 48 h	
	% cell viability ^a BxPC-3 (sensitive)	% cell viability ^a MIA PaCa-2 (resistant)
4c	1.5 ± 0.3	7.0 ± 1.4
5h	21.6 ± 1.8	49.1 ± 5.0
5k	0.6 ± 0.1	7.0 ± 0.7
5r	21.0 ± 5.3	40.7 ± 0.7
5s	4.3 ± 1.8	<1.0 ^b
5t	<1.0 ^b	<1.0 ^b
5u	<1.0 ^b	<1.0 ^b
5x	<1.0 ^b	15.8 ± 0.2
6a	<1.0 ^b	<1.0 ^b
6b	<1.0 ^b	<1.0 ^b
gemcitabine (0.1 µM)	2.0 ± 0.4	86.5 ± 1.2

^aCell viability on sensitive BxPC-3 and resistant MIA PaCa-2 pancreatic cells after a 48 h treatment with 10 µM of the indicated compounds relative to a DMSO control ± SD from three independent experiments, as determined by trypan blue exclusion assay. ^bNo viable cells.

this high dosage. These results show a good selectivity of **6b** toward cancer cells at its active concentration.

To demonstrate the effect of **6b** on A375 melanoma cells viability, a clonogenic survival assay was performed. Cells were plated at low density and treated with 5 or 10 µM of **6b**. After 10 days, cells were fixed and stained with crystal violet in order to visualize the cell colonies (Figure 3A). Treatment with **6b** at 5 and 10 µM induced a dose-dependent decrease in the formation of colonies with respectively 77% and 94% of clonogenicity inhibition (Figure 3B). Moreover, in the presence of **6b**, the colonies were less dense than the control colonies, which is consistent with the effect of **6b** on cell viability.

Preliminary Results for the Investigation of the Mode of Action of 6b. At this stage of the study, we were interested in the mechanism of action of our new family of compounds. To this end, we set up preliminary experiments aimed at investigating the mechanism of action of lead compound **6b** and particularly the mechanism of cell death. Flow cytometry analysis on A375 melanoma cells was performed following the activation of caspase 3, a key marker of apoptosis (Figure 4A).

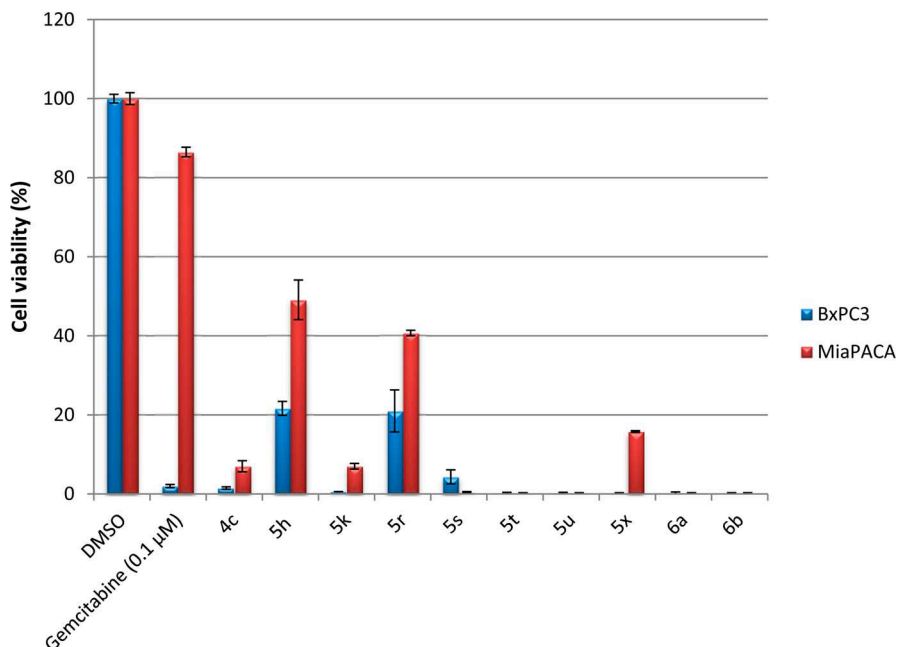
6b induces a strong activation of apoptosis with 48% of cells positive for active caspase 3. Western blot analyses on A375 melanoma cells were performed following the death related markers poly ADP-ribose polymerase (PARP), a DNA repair enzyme substrate of apoptosis-related caspase 3, and microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3 (LC3), a protein involved in autophagy mechanisms (Figure 4B). Indeed, recent data clearly pointed out the key role of autophagy in cancer initiation, progression, invasion, metastasis, and, particularly, in resistance events.¹⁸ Autophagy is a natural intracellular system that delivers cytoplasmic constituents to the lysosome for their degradation. It plays a wide variety of complex physiological roles including the regulation of cell homeostasis, metabolism, and tumor immune response. Although it is generally thought to be a protective mechanism for the cell, it may, under certain circumstances, also lead to cell death.^{18c} Indeed, depending on the context and the type of cancer, autophagy may suppress tumor growth or may allow cancer cells to overcome metabolic stress.¹⁹

We observed that **6b**-stimulated cells displayed an increase of the cleavage of the PARP enzyme, strongly arguing in favor of the induction of apoptosis by **6b** (Figure 4). We also analyzed whether **6b** might induce autophagy. During autophagy, LC3-I is converted to LC3-II through the ATG4-dependent insertion of a phosphoethanolamine moiety before being recruited into the membrane of the forming phagophore, a double membrane required for the recycling of protein aggregates and organelles. Increased LC3-II expression was detected after **6b** treatment, as shown in Figure 4. The significant conversion from LC3-I to LC3-II observed thus indicates a maturation of autophagosomes and a contribution of autophagy to the global death event.

To support these preliminary data, we studied LC3 expression by immunofluorescent staining of melanoma cells treated with DMSO or **6b** (Figure 5). Cells treated with **6b** showed a dramatic increase in LC3 staining compared with the control, characterized by the presence of LC3 puncta (green staining) in the cytoplasm of treated cells, reminiscent of autophagosome formation. These data clearly support that **6b** also induces strong induction of autophagy.

We then evaluated the respective contribution of apoptosis and autophagy in the cell death induced by **6b**. We thus performed viability assays using specific LC3-siRNAs and the

Chart 3. Activity against BxPC-3 and MIA PaCa-2 Pancreatic Cancer Cell Lines

Table 7. Dose–Response Values for 6b on the Studied Cancer Cell Lines^a

cell line	sensitivity	EC ₅₀ (μM, 48 h) ^a
A375	sensitive	0.56
A375 RIV	resistant	0.48
A375 R5C3	resistant	1.32
K562	sensitive	1.42
K562	resistant	1.62
BxPC-3	sensitive	0.38
MIA PaCa-2	resistant	0.64

^aMean of three independent experiments; standard error was below 10%. Cell viability depending on concentration plots measured at 10 different concentrations between 0.1 and 50 μM. Standard error was below 10%.

Table 8. Toxicity of Compound 6b on Healthy and Cancerous Cell Lines^a

cell lines	5 μM	10 μM
KHN ^b	91.2 ± 1.5	93.4 ± 1.9
FHN ^c	91.5 ± 0.9	85.1 ± 0.3
A375 sensitive	<1.0 ^d	<1.0 ^d
A375 RIV	0.3 ± 0.1	<1.0 ^d

^aCell viability after a 48 h treatment with 10 μM of the indicated compounds relative to a DMSO control ± SD from three independent experiments, as determined by trypan blue exclusion assay. ^bHuman keratinocytes. ^cHuman fibroblasts. ^dNo viable cells.

pan-caspase inhibitor QVD to block apoptosis and/or autophagy processes, respectively (Figure 6).

As presented on Western blot (Figure 6A), QVD and LC3-siRNAs inhibited PARP cleavage and LC3B-II expression,

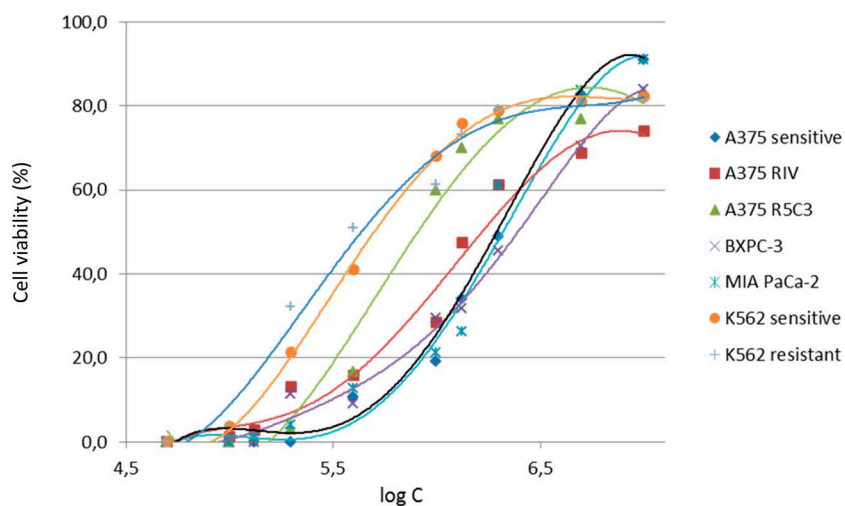


Figure 2. Inhibitory curves of 6b against various cancer cell lines. 6b displays a submicromolar EC₅₀ at 48 h on melanoma and pancreatic cancer cells and reaches 1.5 μM against CML cells.

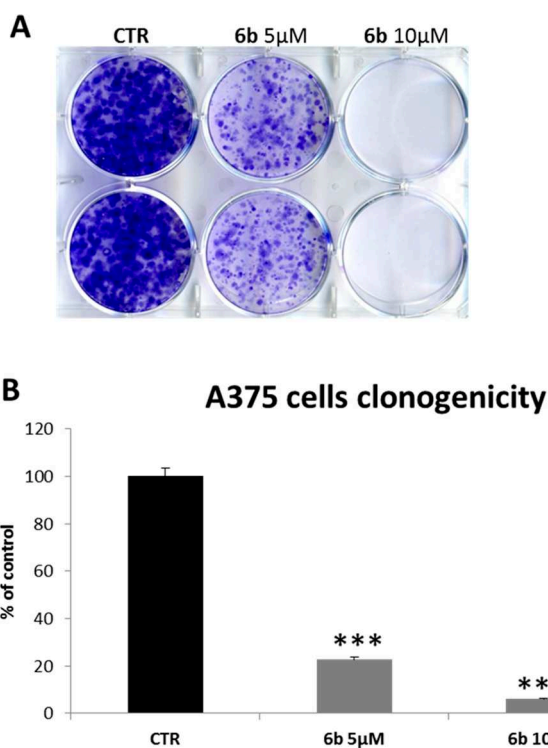
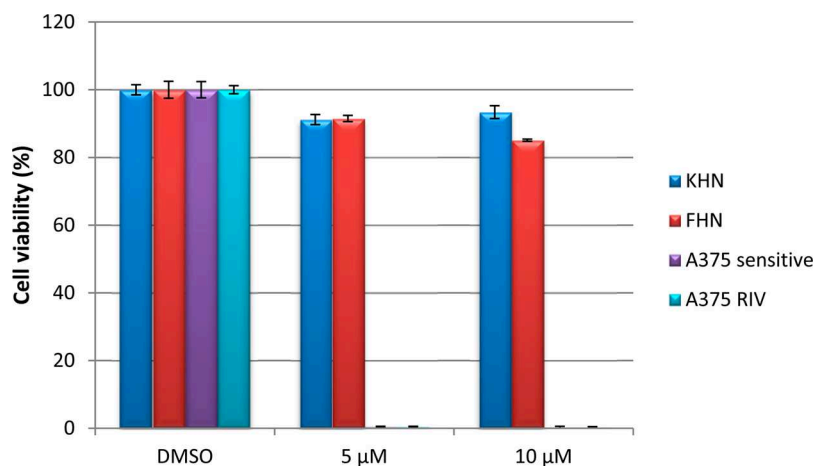
Chart 4. Toxicity of Compound **6b** on Healthy and Cancerous Cell Lines

Figure 3. Compound **6b** inhibits colony formation of A375 cells. Cells were plated at clonal density and maintained in growth medium (CTR). One day after cell plating, 5 or 10 μM of **6b** was added to the culture medium. (A) Photographs of colony formation of A375 cells 10 days after treatment. (B) Quantification of colony formation by measure of absorbance at 620 nm. The results are expressed as percentages of the control. Data are mean \pm SD of three independent experiments performed in triplicate. ***, $P < 0.001$.

respectively, in the presence or absence of **6b** treatment. Independently, inhibition of apoptosis or autophagy partially inhibited the cell death induced by **6b**, whereas concomitant inhibition of both mechanisms completely restored cell viability (Figure 6B). Taken together, these data clearly indicate that apoptosis and autophagy act simultaneously and contribute in similar proportions to **6b**-induced melanoma cell death. This result is particularly interesting, as autophagy has been recently proposed as a promising target to overcome resistance to classical apoptotic drugs.²⁰ Special efforts are currently

dedicated in our laboratories to further elucidate the mode of action of these compounds and the signaling pathways that might be involved.

Pharmacokinetic Profile of 6b. To evaluate the potential of lead compound **6b** for further medicinal chemistry development, we investigated its in vitro and in vivo pharmacokinetic properties.

As the chemical structure of the molecule presents no apparent weakness toward plasma hydrolases, we evaluated directly its stability on mouse microsomes. Therefore, in vivo pharmacokinetic experiments in mice were envisaged to study its distribution. **6b** was formulated in a diluted saline solution containing the emulsifier Kolliphor EL (see Experimental Section) and administered intravenously dosing at 1 mg/kg ($n = 3$ mice/group). As shown in Table 9, **6b** showed a good half-life time of over 45 min (Figure 7).

6b could be measured readily after dosing and until the end of the experiment (2 h postdose), showing a good plasma elimination half-life time $T_{1/2}$ of 47 min. The compound penetrated especially well into tissue components despite volume of distribution V_d values slightly lower than expected considering the lipophilic features of the molecule (Table 9).

The total clearance was moderate in plasma (43 mL/min/kg, liver blood flow is 90 mL/min/kg, so half of it is moderate at best), and thus the global exposure measured at the last time proved particularly high with an AUC_{2h} of 389 ng·h/mL for a 1 mg/kg dose. Furthermore, it is worth noting that all mice behaved normally after intravenous injection and presented no apparent sign of toxicity or behavior modification at this dose during the time of the study. Overall, the pharmacokinetic parameters of **6b** in mice proved very encouraging and fit the requirements for the in vivo evaluation of the compound on tumor growth in xenografts models.

In Vivo Evaluation of 6b in Mice Xenografted with Melanoma Cells. Finally, to assess the potential antineoplastic effect of our lead compound **6b** in vivo, xenograft experiments were performed. A375 melanoma cells (1.5×10^6 cells) were injected subcutaneously into six-week-old female athymic nude mice. After 5 days of tumor growth, the mice ($n = 6$ in each group) were treated by injection of either **6b** with 0.7 mg/mouse/day, or the vehicle (Labrafil) for the control group. The volume of the tumors was measured twice a week, and the animals were euthanized on day 31. Untreated control mice rapidly developed visible tumors, and a rapid tumor growth was observed throughout the course of the study (Figure 8A). The

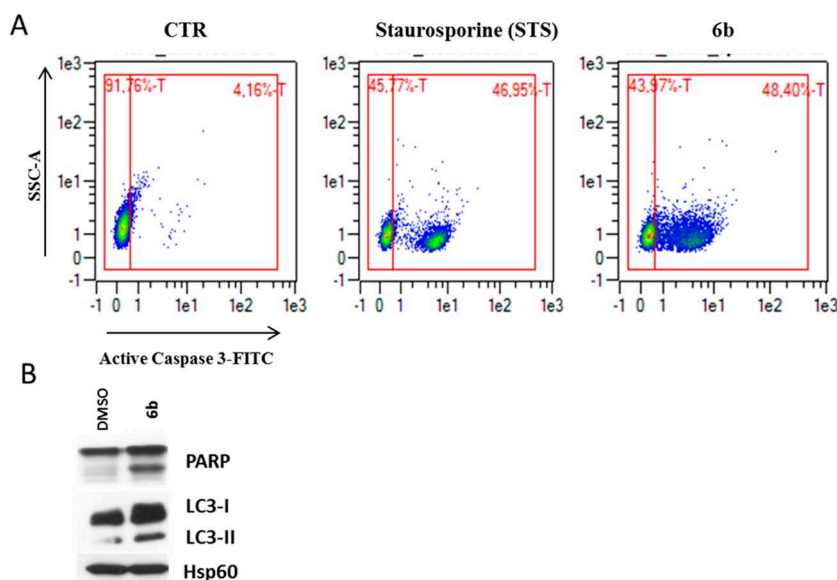


Figure 4. Compound **6b** induces concomitant apoptotic and autophagic phenomena. A: Flow cytometry analysis of A375 melanoma cells treated with 10 μM of **6b** for 48 h and labeled with FITC-conjugated antiactive caspase 3 antibody. The percentage of cells positively labeled with antiactive caspase 3 antibody (apoptotic cells) is indicated for each condition. Staurosporine was used as a positive control (1 μM for 12 h). B: Western blots showing the cleavage of PARP enzyme and the conversion LC3-I to LC3-II. A375 melanoma cells were treated for 24 h with 10 μM of **6b**. Cell lysates were separated by SDS-PAGE and analyzed by Western blot using the indicated antibody. HSP60 were used as a loading control. One representative experiment of three is shown.

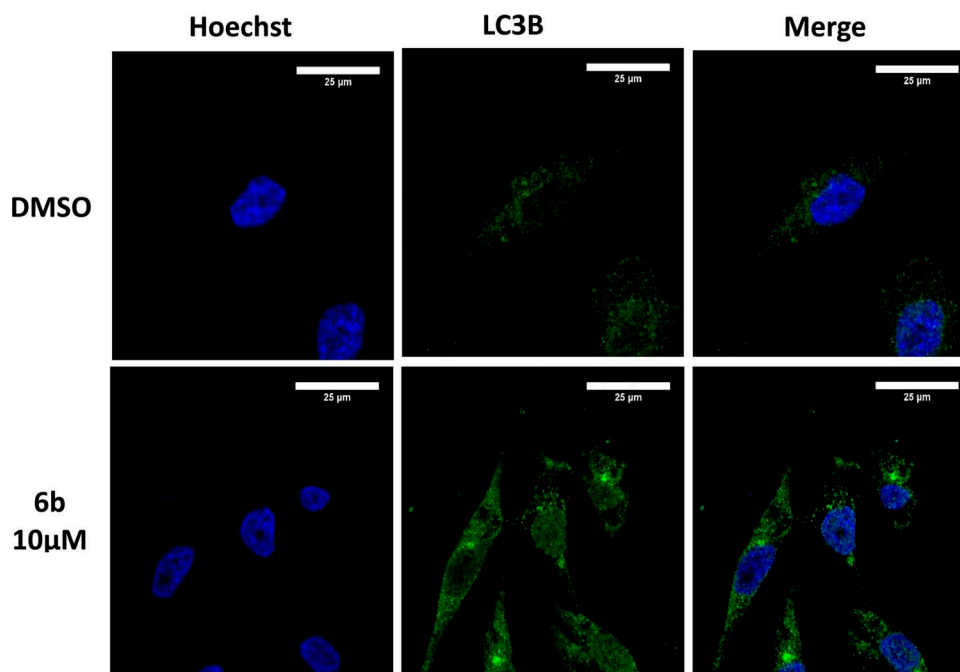


Figure 5. Immunofluorescence experiments on A375 melanoma cells showing the apparition of autophagosomes. Immunofluorescence pictures of A375 melanoma cells treated with DMSO or 10 μM of **6b** for 12 h. LC3B (LC3) was labeled with antibody (green), and DNA was visualized with Hoechst (blue).

treatment with **6b** proved very effective on tumor growth with mice showing a significantly attenuated development of tumors. In addition, the tumors from the mice treated with **6b** were markedly smaller compared to those of the untreated control mice group (Figure 8B,C). These data clearly demonstrate an antineoplastic activity of our lead compound *in vivo*. Furthermore, no apparent toxicity on animals was noticed over the course of the treatment based on their normal unmodified behavior compared to the controls and a constant

body mass, suggesting an absence of diet disturbance (Figure 8D).

To confirm the concomitant autophagic/apoptosis death observed in cellulo, Western blot analyses following the corresponding markers were performed on proteins extracted from the tumors (Figure 9). The Western blots of tumors 5–8 showed an increase of PARP cleavage compared with control tumors (tumors 1–4). Similar results were found concerning autophagy with an increase of LC3-II expression observed in

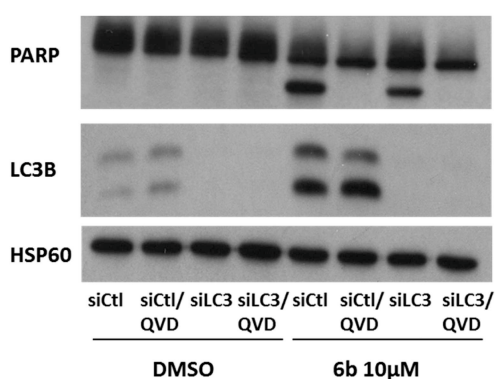
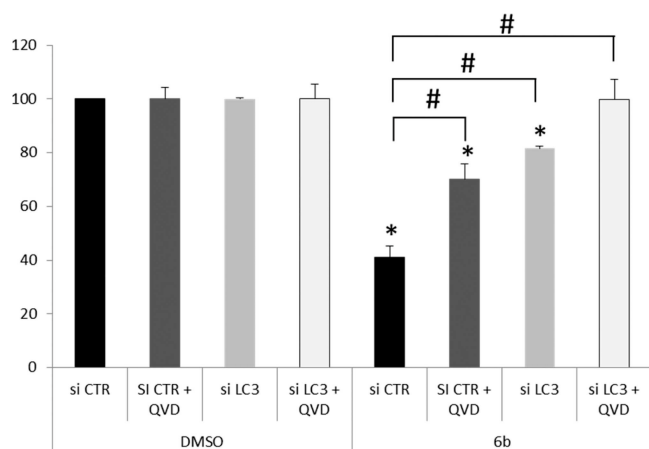


Figure 6. Analysis of the respective contribution of apoptosis and autophagy in the cell death. A375 melanoma cells were transfected with a siRNA against LC3 (siLC3) or a siRNA control (siCTR) and treated with a pan caspase inhibitor (QVD) or DMSO. Then 24 h after transfection, cells were treated with 10 μ M of **6b** or DMSO for 48 h. (top) Viability of the cells was estimated by Trypan blue staining. The results are expressed as percentages of the control. Data are mean \pm SD of three independent experiments performed in triplicate. *, $P < 0.05$; #, $P < 0.05$. (bottom) Cells were lysed and analyzed by Western blotting using the indicated antibodies. Hsp60 was used as a loading control. One representative experiment of three is shown.

Table 9. Pharmacokinetic Parameters of 6b

pharmacokinetic parameters	
in vitro ^a	
microsomal stability (min)	>45
in vivo ^b	
$T_{1/2}$ (min)	47 \pm 4
clearance (mL/min/kg)	43 \pm 4
V_d (L/kg)	2.91 \pm 0.46
AUC _{2h} (ng·h/mL)	389 \pm 35

^aMouse liver microsome stability $T_{1/2}$ measured at 37 °C. ^bIn vivo pharmacokinetic parameters in mice at a dose of 1 mg/kg administered intravenously.

tumors from mice treated with **6b**. This supports the fact that the reduction in tumor volume and weight observed in the **6b**-treated mice is, at least to some extent, the consequence of the induction of apoptosis and autophagy.

All in all, the significant in vivo antineoplastic efficacy and absence of toxicity are very promising and open the way to

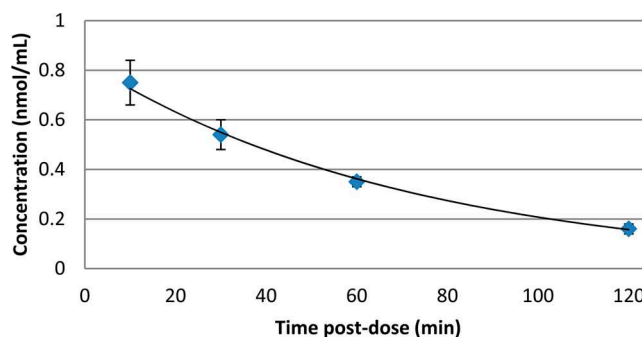


Figure 7. Concentration–time profile for compound **6b**. Plasma samples were collected at regular time after dosing, and quantification of **6b** was performed using UHPLC-MS/MS.

further in vivo investigations with the goal in mind of using these molecules as new antitumor agents.

CONCLUSION

From initial screenings and preliminary biological evaluation results on a melanoma cells model, the *N*-(4-(3-aminophenyl-(thiazol-2-yl)acetamide) scaffold was designed and two successive series of derivatives were synthesized that provided clear structure–activity relationships. The most active analogues were screened against a set of melanoma, leukemia, and pancreatic cancer cells either sensitive or resistant to standard treatments and proved active in the low micromolar range. The lead compound **6b** showed potent cellular activities against all tested cell lines. In addition, it displayed no toxicity toward normal cells, favorable pharmacokinetic parameters, and delayed significantly the tumor growth in vivo, with mice showing high tolerance for the compound.

In parallel, the efficiency of **6b** toward different cancer cell lines and the same activities observed on sensitive or resistant cells suggested a new mode of action of this class of compounds. Preliminary investigations suggest that **6b** promotes cell death by an original mechanism of action of concomitant apoptotic and autophagic deaths.

In summary, we describe herein a new class of drug-like molecules with highly favorable physicochemical and pharmacological properties showing high in vitro activities against both sensitive and resistant cell lines. We showed that these compounds act with an alternative mode of action, allowing them to overcome classical resistance phenomena to apoptosis. Furthermore, the notable in vivo efficacy and the absence of toxicity of **6b** make this class of molecules particularly interesting as tools for chemical biology purposes for exploring apoptotic and autophagic signaling as well as for medicinal chemistry programs with the final aim to propose an anticancer preclinical candidate.

EXPERIMENTAL SECTION

Reagents and Antibodies. Trypan blue, DMEM, RPMI, penicillin/streptomycin, trypsin, Hoechst, and siRNA against LC3 were purchased from Life Technologies (Waltham, MA, USA), fetal calf serum (FCS) from Hyclone, QVD from SM Biochemicals (Anaheim, CA, USA), and Labrafil M1944CS was from Gattefossé (Saint-Priest, France). MCDB 153 medium was purchased from Sigma-Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France) and KGM2 medium from Promocell (Heidelberg, Germany). PARP and LC3B antibodies were purchased from Cell Signaling (Beverly, MA, USA). Hsp60 antibody was from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA),

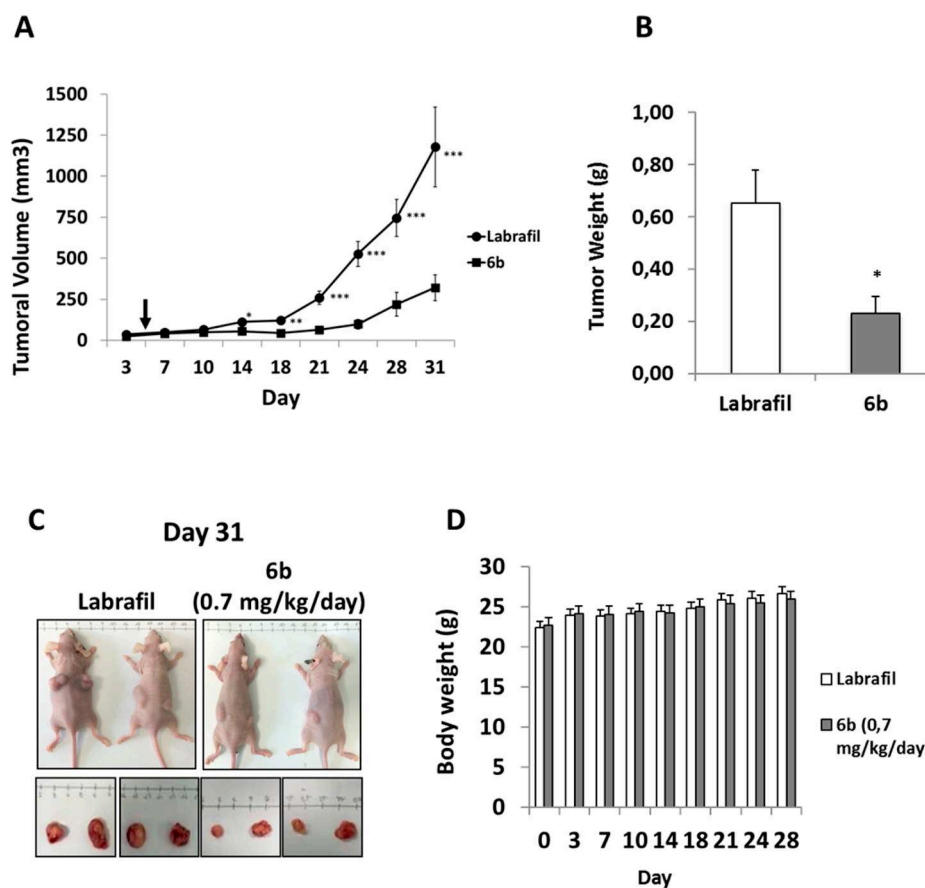


Figure 8. In vivo melanoma xenograft experiment of **6b**. (A) Inhibition of tumor growth by **6b** using an A375 xenograft model. A375 melanoma cells (1.5×10^6 cells) were injected subcutaneously in female immune-deficient BALB/c nu/nu (nude) mice. After 5 days, mice ($n = 6$ in each group) were treated with **6b** (0,7 mg/day) or Labrafil (the beginning of the treatment is stamped by an arrow, A). The tumor growth curves were determined by measuring the tumor volume. The bars indicate the mean \pm SD *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$ ***, $P < 0.001$. (B,C) Mice were euthanized, and tumors were weighed. The bars indicate the mean \pm SD *, $P < 0.05$. (D) Evolution of the mouse weight during the xenograft experiment.

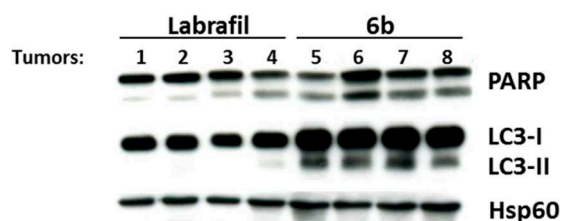


Figure 9. Protein extraction of tumors from mice treated with Labrafil or **6b** were performed (four tumors each). The PARP cleavage and the LC3 conversion were evaluated by Western blot using the suitable antibody. HSP60 were used as a loading control. One representative experiment of three is shown.

and Alexa Fluor 488 goat antirabbit antibody was from Life Technologies.

Cell Culture. Normal human melanocytes and fibroblasts were prepared and maintained as described.²⁰ Normal human keratinocytes prepared from foreskins of newborns were grown under 5% CO₂ at 37 °C in KGM2 medium. Informed consent was obtained from patients. Different melanoma and other cancer cell lines were purchased from American Tissue Culture Collection (Molsheim, France). Resistant melanoma cell lines A375 were a gift of Prof. P. Marchetti and prepared as previously described.¹⁵ Sensitive and resistant chronic myeloid leukemia K562 cells were obtained from P. Auberger. Cells were grown in RPMI 1640 (A375, BxPC-3, K562 cell lines) or in DMEM medium (fibroblasts and MIA PaCa-2) supplemented with

10% FCS and penicillin/streptomycin (100 U/mL/50 μ g/mL) at 37 °C and 5% CO₂. For each experiment, A375, BxPC-3, and MIA PaCa-2 cell lines were starved without serum during 14 h before drug stimulation. All the other cells were maintained in growth medium during drug stimulation.

Trypan Blue Exclusion Assays. For Trypan blue staining, 200 μ L of cells was aseptically transferred to a 1.5 mL clear Eppendorf tube and incubated for 3 min at room temperature with an equal volume of 0.4% Trypan blue solution. Viable cells were counted with a Malassez chamber, and the results are expressed as the percentage of the value of control cells. All the experiments are performed three times in triplicate.

Apoptosis Assays. Apoptosis was assessed by measuring the activation of caspase 3 using a FITC-conjugated monoclonal active caspase-3 antibody apoptosis kit (BD Life Science, Le Pont de Claix, France). According to the provider protocol, after **6b** treatment (10 μ M, 48 h), A375 melanoma cells were collected, fixed, permeabilized, and suspended again in 100 μ L of staining solution containing FITC-conjugated active caspase 3 antibody. After incubation at room temperature for 30 min, cells were washed and analyzed by flow cytometry. Positive cells for caspase 3 represent apoptotic cells. Staurosporine was used as a positive control. Analysis was performed using a fluorescence activated cell sorter (MACSQuant analyzer) and MACSQuantify software.

Western Blot Assays. Proteins were extracted in Fisher buffer containing TRIS-HCl pH 7.5 50 mM, NaCl 15 mM, Triton X-100 1%, and proteases and phosphatases inhibitors. Briefly, cell lysates (20 μ g) were separated by SDS-PAGE, transferred onto a PVDF membrane (Millipore, Molsheim, France), and then exposed to the appropriate

antibodies. Proteins were visualized with the ECL system from Amersham (Arlington, Heights, IL, USA). The Western blots shown are representative of at least three independent experiments.

siRNA Transfection. Transfection of duplex siRNAs (50 nmol/L) was carried out using lipofectamine RNAiMAX (Invitrogen, Washington, DC, USA) in Opti-MEM (Invitrogen) as described.¹² The day after transfection, **6b** was added to the medium and proteins were extracted 48 h after the addition of **6b**. Scramble sequence siRNAs were used as nonspecific controls.

Clonogenicity Assay. A375 cells were plated at a density of 100 cells/cm² in a 6-well plate. Compound **6b** (5 μ M or 10 μ M) was added 24 h after cell plating. The medium was renewed three times a week. Ten days after plating, the cells were fixed with 3% paraformaldehyde and stained with 0.4% crystal violet. Quantification was evaluated by the measure of absorbance at 620 nm.

Immunofluorescence Assays. A375 melanoma cells were grown on glass coverslips in 6-well dishes and treated for indicated times with 10 μ M of **6b**. Cells were then washed, fixed at room temperature for 20 min with 3% paraformaldehyde, and permeabilized by a 2 min treatment with a phosphate-buffered saline 1% Triton solution before being exposed to an anti-LC3B antibody for 1 h at room temperature. Cells were next incubated with Alexa Fluor 488 goat antirabbit antibody for 1 h at room temperature. Finally, coverslips were mounted in moviol immunofluorescence mounting medium with Hoechst and examined with the 60 \times objective using a Nikon A1R microscope equipped with epifluorescence illumination.

In Vivo Murine Cancer Model. Animal experiments were carried out in accordance with the French law and were approved by a local institutional ethical committee. Animals were maintained in a temperature-controlled facility (22 $^{\circ}$ C) on a 12 h light/dark cycle and were given free access to food (standard laboratory chow diet from UAR, Epinay-S/Orge, France). Mice were inoculated subcutaneously with A375 melanoma cells (1.5 \times 10⁶ cells per mouse in PBS). After 5 days, animals received an intraperitoneal injection of compound **6b** (0.7 mg/mice/day) dissolved in a mixture of Labrafil M1944CS, dimethylacetamide, and Tween 80 (90/9/1, vol/vol/vol) as previously described.²¹ The growth tumor curves were determined by measuring the tumor volume using the equation $V = (L \times W^2)/2$. At the end of experiment, mice were killed by CO₂ inhalation and tumors were weighed. Frozen tumors were disrupted with a tissue ruptor (Quiagen), and proteins were extracted in Fisher buffer. Western blot assays were performed as described above.

Statistical Analysis. Results are presented as mean \pm SE with experiment numbers indicated in the figure legends. Statistical significance was assessed using the Student's *t* test. $P \leq 0.05$ was accepted as statistically significant.

General Procedures. Methanol, ethanol, pyridine, DMF, ethyl acetate, diethyl ether, and dichloromethane were purchased from Sigma-Aldrich. DMF was dried by distillation under reduced pressure over MgSO₄, pyridine, and triethylamine and was distilled over CaH₂ under reduced pressure, while methanol, ethanol, diethyl ether, ethyl acetate, and dichloromethane were used as received. All chemicals were purchased from Aldrich, Merck, or Alfa Aesar and used without further purification. Thin layer chromatography (TLC) was performed on precoated Merck 60 GF254 silica gel plates and revealed first by visualization under UV light (254 and 360 nm) then spraying (ninhydrin or H₂SO₄/EtOH). ¹H and ¹³C NMR spectra were recorded on a Bruker Avance 200 MHz spectrometer. Mass spectra (ESI-MS) were recorded on a Bruker (Daltonics Esquire 3000+). HRMS spectra were recorded on a ThermoFisher Q Exactive (ESI-MS) at a resolution of 140000 at *m/z* 200. The purity of compounds was further assayed by HPLC analysis on a JASCO PU-2089 apparatus with Supelco analytical column Ascentis Express C18, 100 mm \times 4.6 mm 5 μ M. Eluent A: water with 1% formic acid. Eluent B: CH₃CN with 1% formic acid. Four different methods were used which are described as follows. Method 1: 0%B to 100%B over 10 min, 100%B for 5 min then from 100%B to 0%B over 1 min (16 min in total). Method 2: 25%B to 100%B over 13 min, 100%B for 5 min then from 100%B to 0%B over 1 min (19 min in total). Method 3: 25%B for 3 min then 25%B to 95%B over 5 min, 100%B for 5 min then from

100%B to 0%B over 1 min (14 min in total). Method 4: 25%B to 100%B over 14 min, 100%B for 5 min then from 100%B to 0%B over 1 min (19 min in total).

General Procedure for the Formation of Sulfonamides (I). To a solution of *N*-(4-(3-aminophenyl)thiazol-2-yl)acetamide (1 equiv) under argon in anhydrous DMF (0.2 M) were added anhydrous triethylamine (1.6 equiv) and the corresponding sulfonyl chloride (1.2 equiv). The reaction mixture was allowed to react at rt until complete conversion of the starting material (from 2 h to 48 h). DMF was removed under reduced pressure, and the crude material was purified by silica gel column chromatography to afford the pure corresponding sulfonamides.

General Procedure for the Formation of Amides (II). To a solution of *N*-(4-(3-aminophenyl)thiazol-2-yl)acetamide (1 equiv) under argon in anhydrous pyridine (0.3 M) was added the corresponding acyl chloride (1.1 equiv). The reaction mixture was allowed to react at rt until complete conversion of the starting material (approximately 2 h), and pyridine was removed under reduced pressure. The crude material was dissolved in 50 mL of ethyl acetate. The aqueous layer was washed twice with 1 M aq HCl solution (50 mL), then washed two times with saturated aq NaHCO₃ solution (50 mL) and brine (50 mL) and dried with MgSO₄ to afford the corresponding amide.

2-Bromo-1-(3-nitrophenyl)ethanone (1). To a suspension of commercially available 3-nitroacetophenone (4.82 g, 29.19 mmol) in anhydrous diethyl ether (25 mL) was added aluminum chloride (0.16 g, 1.20 mmol). The reaction mixture was then cooled to 0 $^{\circ}$ C before dropwise addition of bromine (1.50 mL, 29.19 mmol). The reaction was stirred for 1 h at room temperature until complete conversion of the starting material (¹H NMR monitoring) and quenched quickly to avoid dibrominated compound formation. After addition of water (30 mL), the mixture was extracted three times with diethyl ether (30 mL) and dried with MgSO₄ to afford compound **1** as a yellowish-brown solid (5.73 g, 97% yield). ¹H NMR (CDCl₃, 200 MHz): δ 4.50 (s, 2H, H₁), 7.73 (t, *J* = 8.0 Hz, 1H and H₇), 8.31 (ddd, *J* = 7.8, 1.7, 1.1 Hz, 1H, H₈), 8.43 (ddd, *J* = 8.2, 2.3, 1.1 Hz, 1H, H₆), 8.76 (t, *J* = 1.9 Hz, 1H, H₄). ¹³C NMR (CDCl₃, 200 MHz): δ 30.4, 123.9, 128.2, 130.4, 134.6, 135.2, 148.6, 189.5. MS-ESI (*m/z*): [M + H]⁺, 244.9.

***N*-(4-(3-Nitrophenyl)thiazol-2-yl)acetamide (2).** To a solution of 2-bromo-1-(3-nitrophenyl)ethanone (4.27 g, 17.50 mmol) in ethanol (technical grade, 150 mL) was added *N*-acetylthiourea (2.07 g, 17.50 mmol). The reaction mixture was heated to 80 $^{\circ}$ C for 30 min then allowed to cool down to room temperature. The precipitate was filtered and washed with an ice-cooled solution of 1:1 ethanol/diethyl ether, affording compound **2** as a yellow solid (4.24 g, 92% yield). ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 200 MHz): δ 2.17 (s, 3H, H₁), 7.72 (t, *J* = 8.2 Hz, 1H, H₁₀), 7.92 (s, 1H, H₄), 8.16 (dd, *J* = 8.1, 2.4 Hz, 1H, H₁₁), 8.33 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H, H₉), 8.71 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H, H₇), 12.38 (s, 1H, NH_{acetyl}). ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 50 MHz): δ 22.5, 110.4, 120.0, 122.3, 130.4, 131.7, 135.8, 146.3, 148.3, 158.4, 168.8. HRMS-ESI (*m/z*): [M + H]⁺ calcd for C₁₁H₁₀O₃N₃S, 264.0437; found, 264.0439. HPLC (λ_{254}) purity 95.1%; *t*_R 6.20 min (method 1).

***N*-(4-(3-Aminophenyl)thiazol-2-yl)acetamide (3).** To a suspension of *N*-(4-(3-nitrophenyl)thiazol-2-yl)acetamide (2.00 g, 7.60 mmol) and 10% Pd/C (0.20 g, 10 wt %) in methanol (76 mL) under stirring at 0 $^{\circ}$ C was added carefully by portions sodium borohydride (1.44 g, 38.00 mmol). The reaction mixture was stirred at 0 $^{\circ}$ C until complete dissolution of sodium borohydride and was then allowed to react 3 h at rt. After completion of the reaction monitored by TLC (CH₂Cl₂/MeOH 90:10), the crude mixture was filtered through a pad of Celite, concentrated under reduced pressure, and purified by silica gel column chromatography eluted with CH₂Cl₂/MeOH (99:1 to 95:5) to afford **3** as a yellow-white solid (6.31 mmol, 83%). ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 200 MHz): δ 2.16 (s, 3H, H₁), 5.13 (s, 2H, NH₂), 6.52 (dt, *J* = 6.4, 2.5 Hz, H₉), 7.16–6.94 (m, 3H, H₇, H₁₀ and H₁₁), 7.35 (s, 1H, H₄), 12.22 (s, 1H, NH_{acetyl}). ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 50 MHz): δ 22.5, 107.0, 111.3, 113.6, 113.6, 127.2, 134.9, 148.9, 149.6, 157.6, 168.6. HRMS-ESI (*m/z*): [M + H]⁺ calcd for C₁₁H₁₂N₃OS, 234.0696; found, 234.0700. HPLC (λ_{254}) purity >99%; *t*_R 3.78 min (method 1).

***N*-(3-(2-Acetamidothiazol-4-yl)phenyl)heptanamide (4a).** The general procedure for the formation of amide (II) was followed

using **3** (400.0 mg, 1.72 mmol) and *n*-heptanoyl chloride (290.0 μ L, 2.06 mmol) to afford the title compound as a yellow powder (481.6 mg, 82%). ¹H NMR (CD₃OD, 200 MHz): δ 0.99–0.84 (m, 3H, H₁₈), 1.47–1.26 (m, 6H, H₁₅, H₁₆ and H₁₇), 1.80–1.61 (m, 2H, H₁₄), 2.21 (s, 3H, H₁), 2.38 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H, H₁₃), 7.33 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H, H₁₀), 7.45 (ddd, *J* = 8.1, 2.1, 1.2 Hz, 1H, H₉), 7.62 (dt, *J* = 7.6, 1.5 Hz, 1H, H₁₁), 8.14 (t, *J* = 1.9 Hz, 1H, H₇). ¹³C NMR (acetone-*d*₆, 50 MHz): δ 14.4, 22.9, 23.3, 26.3, 29.7, 32.4, 37.8, 108.3, 117.9, 119.4, 121.6, 129.7, 136.2, 140.8, 150.4, 158.8, 169.2, 172.3. HRMS-ESI (*m/z*): [M + H]⁺ calcd for C₁₈H₂₄N₃O₂S, 346.1584; found, 346.1582. HPLC (λ_{280}) purity 96.0%; *t*_R 4.27 min (method 1).

N-(3-(2-Acetamidothiazol-4-yl)phenyl)furan-2-carboxamide (4b). The general procedure for the formation of amide (II) was followed using **3** (300.0 mg, 1.29 mmol) and 2-furoyl chloride (205.0 mg, 1.57 mmol) to afford the title compound as a yellow powder (259.6 mg, 61%). ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 200 MHz): δ 2.18 (s, 3H, H₁), 6.72 (dd, *J* = 3.5, 1.7 Hz, 1H, H₁₅), 7.47–7.31 (m, 2H, H₁₀, H₁₄), 7.53 (s, 1H, H₄), 7.63 (dd, *J* = 8.1, 1.7 Hz, 2H, H₁₁, H₉), 7.95 (dd, *J* = 1.7, 0.8 Hz, 1H, H₁₆), 8.39 (t, *J* = 1.9 Hz, 1H, H₇), 10.27 (s, 1H, NH_{amide}), 12.31 (s, 1H, NH_{acetyl}). ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 50 MHz): δ 22.53, 108.06, 112.18, 114.79, 118.04, 119.96, 121.24, 129.00, 134.80, 138.90, 145.78, 147.50, 148.67, 156.26, 157.99, 168.7. HRMS-ESI (*m/z*): [M + H]⁺ calcd for C₁₆H₁₄N₃O₃S, 328.0756; found, 328.0748. HPLC (λ_{280}) purity 93.0%; *t*_R 3.17 min (method 1).

N-(3-(2-Acetamidothiazol-4-yl)phenyl)-2-naphthamide (4c). The general procedure for the formation of amide (II) was followed using **3** (300.0 mg, 1.29 mmol) and 2-naphthoyl chloride (285 mg, 1.50 mmol) to afford the title compound as a yellow powder (369.9 mg, 74%). ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 200 MHz): δ 2.19 (s, 3H, H₁), 7.43 (t, *J* = 7.9 Hz, 1H, H₁₀), 7.79–7.53 (m, 5H, H₄, H₉, H₁₁ and H₂₀), 8.16–7.97 (m, 4H, H₁₉, H₁₅ and H₁₄), 8.52 (t, *J* = 1.8 Hz, 1H, H₇), 8.63 (s, 1H, H₁₈), 10.56 (s, 1H, NH_{amide}), 12.35 (s, 1H, NH_{acetyl}). ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 50 MHz): δ 22.5, 108.0, 118.1, 120.0, 121.2, 124.5, 126.9, 127.7, 127.9, 128.0, 128.1, 129.0, 132.1, 132.2, 134.3, 134.8, 139.6, 148.8, 158.0, 165.6, 168.7. HRMS-ESI (*m/z*): [M + H]⁺ calcd for C₂₂H₁₈N₃O₂S, 388.1114; found, 388.1112. HPLC (λ_{254}) purity >99%; *t*_R 4.27 min (method 1).

N-(4-(3-(Thiophene-2-sulfonamido)phenyl)thiazol-2-yl)acetamide (5a). The general procedure for the formation of sulfonamide (I) was followed using **3** (100.0 mg, 0.43 mmol), thiophene-2-sulfonyl chloride (94.0 mg, 0.52 mmol) as reagent, and triethylamine (97.0 μ L, 0.69 mmol). Purification by silica gel flash chromatography (CH₂Cl₂:EtOAc; 100:0 to 70:30) afforded the title compound as a white-yellowish powder (56.2 mg, 35%). ¹H NMR (acetone-*d*₆, 200 MHz): δ 2.28 (s, 3H, H₁), 7.21–7.04 (m, 2H, H₉ and H₁₃), 7.31 (t, *J* = 7.9 Hz, 1H, H₁₀), 7.41 (s, 1H, H₄), 7.55 (dd, *J* = 3.7, 1.3 Hz, 1H, H₁₄), 7.66 (dt, *J* = 7.7, 1.3 Hz, 1H, H₁₁), 7.80 (dd, *J* = 5.0, 1.3 Hz, 1H, H₁₂), 7.92 (t, *J* = 1.8 Hz, 1H, H₇), 9.18 (s, 1H, NH_{sulfonamide}), 11.18 (s, 1H, NH_{acetyl}). ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 50 MHz): δ 22.5, 108.5, 117.8, 120.0, 121.9, 127.6, 129.5, 132.4, 133.4, 135.3, 137.9, 148.1, 158.0, 168.7. HRMS-ESI (*m/z*): [M + H]⁺ calcd for C₁₅H₁₄N₃O₃S₂, 380.0192; found, 380.0189. HPLC (λ_{254}) purity >99%; *t*_R 6.83 min (method 2).

N-(4-(3-(1H-Imidazole-4-sulfonamido)phenyl)thiazol-2-yl)acetamide (5b). The general procedure for the formation of sulfonamide (I) was followed using **3** (100.0 mg, 0.43 mmol), imidazole-4-sulfonyl chloride (86.0 mg, 0.52 mmol) as reagent, and triethylamine. Purification by silica gel flash chromatography (CH₂Cl₂:CH₃OH; 100:0 to 85:15) afforded the title compound as a white powder (37.6 mg, 24%). ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 200 MHz): δ 2.16 (s, 3H, H₁), 7.06 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, H₉), 7.24 (t, *J* = 7.5 Hz, 1H, H₁₀), 7.55–7.41 (m, 2H, H₄ and H₁₁), 7.89–7.62 (m, 3H, H₇, H₁₃ and H₁₄), 10.28 (s, 1H, NH_{sulfonamide}), 12.28 (s, 1H, NH_{acetyl}), 12.72 (s, 1H, NH_{imidazole}). ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 50 MHz): δ 22.5, 108.2, 116.6, 118.8, 120.7, 121.9, 129.2, 135.0, 137.5, 138.2, 138.7, 148.4, 158.0, 168.7. HRMS-ESI (*m/z*): [M + H]⁺ calcd for C₁₄H₁₄N₅O₃S₂, 364.0533; found, 364.0530. HPLC (λ_{280}) purity 97.3%; *t*_R 2.98 min (method 2).

N-(4-(3-((5-Methylthiophene)-2-sulfonamido)phenyl)thiazol-2-yl)acetamide (5c). The general procedure for the formation of

sulfonamide (I) was followed using **3** (75.0 mg, 0.32 mmol), 5-methylthiophene-2-sulfonyl chloride (75.0 mg, 0.38 mmol) as reagent, and triethylamine. Purification by silica gel flash chromatography (CH₂Cl₂:EtOAc; 100:0 to 80:20) afforded the title compound as a white powder (47.5 mg, 37%). ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 200 MHz): δ 2.16 (d, *J* = 2.2 Hz, 3H, H₁), 2.41 (s, 3H, H₁₅), 6.81 (s, 1H, H₁₄), 7.06 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H, H₉), 7.38–7.26 (m, 2H, H₁₀ and H₁₃), 7.64–7.48 (m, 2H, H₁₁ and H₄), 7.74 (s, 1H, H₇), 10.47 (s, 1H, NH_{sulfonamide}), 12.28 (s, 1H, NH_{acetyl}). ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 50 MHz): δ 15.1, 22.5, 108.5, 117.5, 119.6, 121.7, 126.2, 129.5, 132.8, 135.2, 136.9, 138.1, 147.5, 148.2, 158.0, 168.7. HRMS-ESI (*m/z*): [M + H]⁺ calcd for C₁₆H₁₆N₃O₃S₂, 394.0348; found, 394.0347. HPLC (λ_{254}) purity >99%; *t*_R 7.28 min (method 2).

N-(4-(3-(1-Methyl-1H-imidazole-4-sulfonamido)phenyl)thiazol-2-yl)acetamide (5d). The general procedure for the formation of sulfonamide (I) was followed using **3** (75.0 mg, 0.32 mmol), 1-methylimidazole-4-sulfonyl chloride (70.0 mg, 0.39 mmol) as reagent, and triethylamine. Purification by silica gel flash chromatography (CH₂Cl₂:CH₃OH; 100:0 to 90:10) afforded the title compound as a white powder (64.2 mg, 53%). ¹H NMR (acetone-*d*₆, 200 MHz): δ 2.28 (s, 3H, H₁), 3.72 (s, 3H, H₁₅), 7.32–7.14 (m, 2H, H₁₀ and H₁₃), 7.37 (s, 1H, H₄), 7.64–7.55 (m, 3H, H₉, H₁₁ and H₁₄), 7.89 (s, 1H, H₇), 9.05 (s, 1H, NH_{sulfonamide}), 11.19 (s, 1H, NH_{acetyl}). ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 50 MHz): δ 22.4, 33.4, 108.6, 117.28, 119.3, 121.3, 125.9, 128.7, 129.4, 129.2, 135.6, 139.0, 139.2, 140.4, 149.0, 158.7, 169.5. HRMS-ESI (*m/z*): [M + H]⁺ calcd for C₁₅H₁₆N₅O₃S₂, 378.0689; found, 378.0687. HPLC (λ_{254}) purity 97.9%; *t*_R 4.28 min (method 2).

N-(4-(3-((2,4-Dimethylthiazole)-5-sulfonamido)phenyl)thiazol-2-yl)acetamide (5e). The general procedure for the formation of sulfonamide (I) was followed using **3** (75.0 mg, 0.32 mmol), 2,4-dimethyl-1,3-thiazole-5-sulfonyl chloride (82.0 mg, 0.39 mmol) as reagent, and triethylamine purification by silica gel flash chromatography (CH₂Cl₂:EtOAc; 80:20 to 50:50) afforded the title compound as a white powder (57.3 mg, 43%). ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 200 MHz): δ 2.17 (s, 3H, H₁), 2.37 (s, 3H, H₁₃), 2.56 (s, 3H, H₁₄), 7.05 (d, *J* = 7.1 Hz, 1H, H₉), 7.33 (t, *J* = 7.9 Hz, 1H, H₁₀), 7.53 (s, 1H, H₄), 7.64 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H, H₁₁), 7.74 (s, 1H, H₇), 10.66 (s, 1H, NH_{sulfonamide}), 12.27 (s, 1H, NH_{acetyl}). ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 50 MHz): δ 15.9, 18.9, 22.5, 108.6, 118.3, 120.4, 122.3, 128.6, 129.7, 135.4, 137.4, 148.0, 155.3, 158.1, 168.8, 168.9. HRMS-ESI (*m/z*): [M + H]⁺ calcd for C₁₆H₁₇N₄O₃S₂, 409.0457; found, 409.0455. HPLC (λ_{254}) purity >99%; *t*_R 6.23 min (method 2).

N-(4-(3-(Phenylsulfonamido)phenyl)thiazol-2-yl)acetamide (5f). The general procedure for the formation of sulfonamide (I) was followed using **3** (102.0 mg, 0.44 mmol) and benzenesulfonyl chloride (67.6 μ L, 0.53 mmol) as reagents and triethylamine. Purification by silica gel flash chromatography (CH₂Cl₂:EtOAc; 100:0 to 80:20) afforded the title compound as a white fine powder (28.8 mg, 37%). ¹H NMR (acetone-*d*₆, 200 MHz): δ 2.28 (s, 3H, H₁), 7.10 (ddd, *J* = 8.0, 2.2, 1.1 Hz, 1H, H₉), 7.30–7.20 (m, 1H, H₁₀), 7.37 (s, 1H, H₄), 7.64–7.46 (m, 4H, H₁₁, H₁₄ and H₁₅), 7.90–7.79 (m, 3H, H₇ and H₁₃), 9.12 (s, 1H, NH_{sulfonamide}), 11.21 (s, 1H, NH_{acetyl}). ¹³C NMR (acetone-*d*₆, 50 MHz): δ 22.5, 108.5, 117.6, 119.7, 121.6, 126.7 (2C), 129.3 (2C), 129.5, 132.9, 135.3, 138.2, 139.5, 148.1, 158.0, 168.7. HRMS-ESI (*m/z*): [M + H]⁺ calcd for C₁₇H₁₆N₃O₃S₂, 374.0628; found, 374.0627. HPLC (λ_{254}) purity 97.0%; *t*_R 3.65 min (method 3).

N-(4-(3-((3-Methylphenyl)sulfonamido)phenyl)thiazol-2-yl)acetamide (5g). The general procedure for the formation of sulfonamide (I) was followed using **3** (150.0 mg, 0.64 mmol), 2-naphthalenesulfonyl chloride (111.9 μ L, 0.77 mmol) as reagent, and triethylamine. Purification by silica gel flash chromatography (CH₂Cl₂:EtOAc; 100:0 to 70:30) afforded the titled compound as a white powder (185.8 mg, 74%). ¹H NMR (CD₃OD, 200 MHz): δ 2.21 (s, 3H, H₁), 2.31 (s, 3H, H₁₈), 6.98 (ddd, *J* = 8.0, 2.2, 1.1 Hz, 1H, H₉), 7.37–7.15 (m, 4H, H₄, H₁₀, H₁₁ and H₁₃), 7.64–7.51 (m, 3H, H₇, H₁₄ and H₁₅), 7.71 (t, *J* = 1.9 Hz, 1H, H₁₇). ¹³C NMR (CD₃OD, 50 MHz): δ 21.4, 22.7, 109.2, 119.9, 121.5, 123.4, 125.5, 128.6, 130.0, 130.5, 134.7, 137.1, 139.6, 140.6, 141.0, 150.5, 159.6, 171.0. HRMS-ESI (*m/z*): [M + H]⁺ calcd for C₁₈H₁₈N₃O₃S₂, 388.0784; found, 388.0784. HPLC (λ_{254}) purity >99%; *t*_R 7.52 min (method 2).

N-(4-(3-((4-Methylphenyl)sulfonamido)phenyl)thiazol-2-yl)acetamide (**5h**). The general procedure for the formation of sulfonamide (I) was followed using **3** (102.0 mg, 0.44 mmol), tosyl chloride (101.0 mg, 0.53 mmol) as reagent, and triethylamine. Purification by silica gel flash chromatography (CH₂Cl₂:EtOAc; 100:0 to 80:20) afforded the title compound as a white powder (122.7 mg, 72%). ¹H NMR (acetone-*d*₆, 200 MHz): δ 2.28 (s, 3H, H₁), 2.33 (s, 3H, H₆), 7.10 (ddd, *J* = 8.0, 2.2, 1.1 Hz, 1H, H₉), 7.34–7.20 (m, 3H, H₁₀ and H₁₄), 7.37 (s, 1H, H₄), 7.59 (ddd, *J* = 7.7, 1.6, 1.1 Hz, 1H, H₁₁), 7.75–7.66 (m, 2H, H₁₃), 7.87 (ddd, *J* = 2.2, 1.6, 0.5 Hz, 1H, H₇), 9.04 (s, 1H, NH_{sulfonamide}), 11.17 (s, 1H, NH_{acetyl}). ¹³C NMR (acetone-*d*₆, 50 MHz): δ 20.9, 22.5, 108.4, 117.4, 119.5, 121.5, 126.7 (2C), 129.5, 129.7 (2C), 135.2, 136.6, 138.3, 143.3, 148.2, 158.1, 168.8. HRMS-ESI (*m/z*): [M + H]⁺ calcd for C₁₈H₁₈N₃O₃S₂, 388.0784; found, 388.0788. HPLC (λ₂₅₄) purity 97.8%; t_R 3.90 min (method 3).

N-(4-(3-((2,3-Dihydro-1H-indene)-5-sulfonamido)phenyl)thiazol-2-yl)acetamide (**5i**). The general procedure for the formation of sulfonamide (I) was followed using **3** (75.0 mg, 0.32 mmol), indane-5-sulfonyl chloride (83.0 mg, 0.39 mmol) as reagent, and triethylamine. Purification by silica gel flash chromatography (CH₂Cl₂:EtOAc; 100:0 to 80:20) afforded the title compound as a white powder (98.1 mg, 74%). ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 200 MHz): δ 1.96 (p, *J* = 7.4 Hz, 2H, H₁₉), 2.14 (s, 3H, H₁), 2.82 (t, *J* = 7.4 Hz, 4H, H₁₈), 7.01 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H, H₉), 7.38–7.17 (m, 2H, H₁₀ and H₁₄), 7.76–7.41 (m, 5H, H₄, H₇, H₁₁, H₁₃ and H₁₇), 10.29 (s, 1H, NH_{sulfonamide}), 12.25 (s, 1H, NH_{acetyl}). ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 50 MHz): δ 22.5, 24.9, 32.0, 108.4, 117.2, 119.2, 121.3, 122.4, 124.8, 125.0, 129.5, 135.2, 135.2, 137.5, 138.4, 145.0, 148.1, 149.5, 158.0, 168.7. HRMS-ESI (*m/z*): [M + H]⁺ calcd for C₂₀H₂₀N₃O₃S₂, 414.0941; found, 414.0938. HPLC (λ₂₅₄) purity %; t_R min (method 1).

N-(4-(3-(Naphthalene-1-sulfonamido)phenyl)thiazol-2-yl)acetamide (**5j**). The general procedure for the formation of sulfonamide (I) was followed using **3** (100.0 mg, 0.43 mmol), 1-naphthalenesulfonyl chloride (120.0 mg, 0.53 mmol) as reagent, and triethylamine. Purification by silica gel flash chromatography (CH₂Cl₂:EtOAc; 100:0 to 70:30) afforded the title compound as a white powder (42.4 mg, 43%). ¹H NMR (CD₃OD, 200 MHz): δ 2.19 (s, 3H, H₁), 6.93–6.81 (m, 1H, H₉), 7.19–7.00 (m, 2H, H₄ and H₁₀), 7.76–7.37 (m, 5H, H₇, H₁₁, H₂₀ and H₁₈), 7.92 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H, H₁₉), 8.01 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H, H₁₅), 8.21 (dd, *J* = 7.4, 1.3 Hz, 1H, H₁₄), 8.77 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H, H₁₃). ¹³C NMR (CD₃OD, 50 MHz): δ 22.7, 109.1, 119.3, 120.9, 123.1, 125.2, 125.8, 128.1, 129.3, 129.6, 130.7, 130.3, 131.5, 135.6, 135.8, 135.9, 137.0, 139.3, 150.5, 159.5, 171.0. HRMS-ESI (*m/z*): [M + H]⁺ calcd for C₂₁H₁₈N₃O₃S₂, 424.0784; found, 424.0782. HPLC (λ₂₅₄) purity 97.6%; t_R 8.14 min (method 2).

N-(4-(3-(Naphthalene-2-sulfonamido)phenyl)thiazol-2-yl)acetamide (**5k**). The general procedure for the formation of sulfonamide (I) was followed using **3** (100.0 mg, 0.43 mmol), 2-naphthalenesulfonyl chloride (120.0 mg, 0.53 mmol) as reagent, and triethylamine. Purification by silica gel flash chromatography (CH₂Cl₂:EtOAc; 100:0 to 70:30) afforded the title compound as a white powder (91.1 mg, 50%). ¹H NMR (CD₃OD, 200 MHz): δ 2.21 (s, 3H, H₁), 6.99 (ddd, *J* = 8.0, 2.2, 1.1 Hz, 1H, H₉), 7.27–7.12 (m, 2H, H₄ and H₁₀), 7.67–7.50 (m, 3H, H₁₁, H₁₉ and H₂₀), 7.81–7.72 (m, 2H, H₇ and H₁₄), 8.00–7.87 (m, 3H, H₁₈ and H₁₃), 8.35 (d, *J* = 1.8 Hz, 1H, H₁₇). ¹³C NMR (CD₃OD, 50 MHz): δ 22.5, 108.4, 117.6, 119.6, 121.6, 122.0, 127.7, 128.0, 129.0, 129.2, 129.5, 131.5, 134.3, 135.2, 136.4, 138.5, 148.0, 158.0, 168.8. HRMS-ESI (*m/z*): [M + H]⁺ calcd for C₂₁H₁₈N₃O₃S₂, 424.0784; found, 424.0785. HPLC (λ₂₅₄) purity 96.0%; t_R 4.15 min (method 3).

N-(4-(3-((1-Methyl-1H-indole)-5-sulfonamido)phenyl)thiazol-2-yl)acetamide (**5l**). The general procedure for the formation of sulfonamide (I) was followed using **3** (102.0 mg, 0.44 mmol), 1-methyl-1H-indole-5-sulfonyl chloride (121.0 mg, 0.53 mmol) as reagent, and triethylamine. Purification by silica gel flash chromatography (CH₂Cl₂:EtOAc; 100:0 to 50:50) afforded the title compound as a pale-yellow fine powder (72.0 mg, 39%). ¹H NMR (acetone-*d*₆, 500 MHz): δ 2.28 (s, 3H, H₁), 3.83 (s, 3H, H₂₀), 6.57 (dd, *J* = 3.2, 0.9 Hz, 1H, H₁₉), 7.11 (ddd, *J* = 8.0, 2.3, 1.0 Hz, 1H, H₉), 7.20 (t, *J* = 7.9 Hz, 1H, H₁₀), 7.32 (s, 1H, H₄), 7.35 (d, *J* = 3.2 Hz, 1H, H₁₈), 7.47 (d, *J*

= 8.7 Hz, 1H, H₁₄), 7.52 (dt, *J* = 7.8, 1.3 Hz, 1H, H₁₁), 7.62 (dd, *J* = 8.7, 1.6 Hz, 1H, H₁₃), 7.88 (t, *J* = 1.9 Hz, 1H, H₇), 8.13 (s, H₁₇), 8.87 (s, 1H, NH_{sulfonamide}), 11.13 (s, 1H, NH_{acetyl}). ¹³C NMR (acetone-*d*₆, 125 MHz): δ 22.9, 33.2, 103.1, 108.6, 110.7, 118.8, 120.5, 120.6, 122.2, 122.4, 128.6, 130.1, 131.4, 132.7, 136.6, 139.3, 139.9, 149.9, 159.0, 169.2. HRMS-ESI (*m/z*): [M + H]⁺ calcd for C₂₀H₁₉N₄O₃S₂, 427.0891; found, 427.0893. HPLC (λ₂₅₄) purity >99%; t_R 7.21 min (method 2).

N-(4-(3-((2-Oxochromane)-6-sulfonamido)phenyl)thiazol-2-yl)acetamide (**5m**). The general procedure for the formation of sulfonamide (I) was followed using **3** (150.0 mg, 0.64 mmol), coumarin-6-sulfonyl chloride (189.0 mg, 0.77 mmol) as reagent, and triethylamine. Purification by silica gel flash chromatography (CH₂Cl₂:EtOAc; 90:10 to 50:50) afforded the title compound as a white-yellowish powder (23.2 mg, 8%). ¹H NMR (acetone-*d*₆, 500 MHz): δ 2.15 (s, 3H, H₁), 6.37 (d, *J* = 9.7 Hz, 1H, H₁₉), 6.697 (ddd, *J* = 8.0, 2.3, 1.0 Hz, 1H, H₉), 7.13 (t, *J* = 7.9 Hz, 1H, H₁₀), 7.25 (s, 1H, H₄), 7.31 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H, H₁₄), 7.49 (ddd, *J* = 7.8, 1.7, 1.0 Hz, 1H, H₁₁), 7.73 (t, *J* = 1.8 Hz, 1H, H₇), 7.85 (dd, *J* = 8.8, 2.3 Hz, 1H, H₁₃), 7.90 (d, *J* = 9.6 Hz, 1H, H₁₈), 8.00 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H, H₁₇), 9.02 (s, 1H, NH_{sulfonamide}), 10.99 (s, 1H, NH_{acetyl}). ¹³C NMR (acetone-*d*₆, 125 MHz): δ 22.9, 108.9, 118.5, 118.9, 119.7, 120.1, 121.3, 123.3, 128.9, 130.4, 131.0, 136.8, 136.9, 138.8, 143.8, 149.6, 157.5, 159.1, 159.7, 169.2. HRMS-ESI (*m/z*): [M + H]⁺ calcd for C₂₀H₁₆N₃O₃S₂, 442.0526; found, 442.0524. HPLC (λ₂₅₄) purity >99%; t_R 6.53 min (method 2).

N-(4-(3-((1-Methyl-1H-indole)-4-sulfonamido)phenyl)thiazol-2-yl)acetamide (**5n**). The general procedure for the formation of sulfonamide (I) was followed using **3** (92.0 mg, 0.44 mmol), 1-methyl-1H-indole-4-sulfonyl chloride (109.0 mg, 0.53 mmol) as reagent, and triethylamine. Purification by silica gel flash chromatography (CH₂Cl₂:EtOAc; 100:0 to 50:50) afforded the title compound as a pale-yellow fine powder (79.2 mg, 47%). ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 200 MHz): δ 2.15 (s, 3H, H₁), 3.79 (s, 3H, H₂₀), 7.05–6.89 (m, 2H, H₉ and H₁₉), 7.19 (ddd, *J* = 17.6, 8.8, 6.5 Hz, 2H, H₁₀ and H₁₅), 7.45–7.35 (m, 2H, H₂ and H₁₁), 7.79–7.50 (m, 4H, H₇, H₁₃, H₁₄ and H₁₈), 10.48 (s, 1H, NH_{sulfonamide}), 12.25 (s, 1H, NH_{acetyl}). ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 50 MHz): δ 22.5, 32.8, 99.9, 108.2, 115.1, 116.1, 118.1, 119.9, 120.6, 120.7, 123.8, 129.3, 129.3, 132.1, 135.0, 137.1, 138.4, 148.2, 158.0, 168.7. HRMS-ESI (*m/z*): [M + H]⁺ calcd for C₂₀H₁₉N₄O₃S₂, 427.0893; found, 427.0892. HPLC (λ₂₅₄) purity 97.2%; t_R 7.17 min (method 2).

N-(4-(3-(Benzo[*b*]thiophene-2-sulfonamido)phenyl)thiazol-2-yl)acetamide (**5o**). The general procedure for the formation of sulfonamide (I) was followed using **3** (100.0 mg, 0.43 mmol), 2-benzothienyl-1-sulfonyl chloride (120.0 mg, 0.52 mmol) as reagents, and triethylamine. Purification by silica gel flash chromatography (CH₂Cl₂:EtOAc; 100:0 to 50:50) afforded the title compound as a pale-yellow powder (41.3 mg, 22%). ¹H NMR (acetone-*d*₆, 500 MHz): δ 2.28 (s, 3H, H₁), 7.06 (ddd, *J* = 8.0, 2.2, 1.0 Hz, 1H, H₉), 7.20 (t, *J* = 7.9 Hz, 1H, H₁₀), 7.29 (s, 1H, H₄), 7.38 (dddd, *J* = 24.1, 8.2, 7.1, 1.2 Hz, 2H, H₁₇ and H₁₈), 7.65 (ddd, *J* = 7.8, 1.6, 1.1 Hz, 1H, H₁₁), 8.02–7.86 (m, 4H, H₇, H₁₃, H₁₆ and H₁₉), 9.37 (s, 1H, NH_{sulfonamide}), 11.14 (s, 1H, NH_{acetyl}). ¹³C NMR (acetone-*d*₆, 125 MHz): δ 22.9, 108.9, 119.7, 121.3, 123.5, 123.7, 126.5, 126.7, 128.3, 130.4, 130.7, 136.8, 138.6, 138.7, 141.6, 142.5, 149.7, 159.1, 169.2. HRMS-ESI (*m/z*): [M + H]⁺ calcd for C₁₉H₁₆N₃O₃S₂, 430.0348; found, 430.0346. HPLC (λ₂₅₄) purity >99%; t_R 8.27 min (method 2).

N-(4-(3-(Quinoline-8-sulfonamido)phenyl)thiazol-2-yl)acetamide (**5p**). The general procedure for the formation of sulfonamide (I) was followed using **3** (150.0 mg, 0.64 mmol), 8-quinoline-1-sulfonyl chloride (175.0 mg, 0.77 mmol) as reagents and triethylamine. Purification by silica gel flash chromatography (CH₂Cl₂:EtOAc; 90:10 to 50:50) afforded the title compound as a pale-yellow fine powder (72.3 mg, 26%). ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 200 MHz): δ 2.16 (s, 3H, H₁), 6.98–6.85 (m, 1H, H₉), 7.10 (t, *J* = 7.9 Hz, 1H, H₁₀), 7.43–7.30 (m, 2H, H₄ and H₁₁), 7.76–7.62 (m, 3H, H₇, H₁₄ and H₁₉), 8.23 (dd, *J* = 8.3, 1.3 Hz, 1H, H₁₅), 8.38 (dd, *J* = 7.3, 1.4 Hz, 1H, H₁₈), 8.49 (dd, *J* = 8.4, 1.7 Hz, 1H, H₁₃), 9.15 (dd, *J* = 4.2, 1.7 Hz, 1H, H₂₀), 10.20 (s, 1H, NH_{sulfonamide}), 12.25 (s, 1H, NH_{acetyl}). ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 50 MHz):

δ 22.5, 108.2, 117.1, 119.2, 121.2, 122.7, 125.6, 128.4, 129.1, 132.1, 134.3, 135.0, 135.2, 137.0, 138.3, 142.7, 148.2, 151.5, 158.0, 168.7. HRMS-ESI (m/z): $[M + H]^+$ calcd for $C_{20}H_{17}N_4O_3S_2$, 425.0737; found, 425.0735. HPLC (λ_{280}) purity 96.7%; t_R 7.02 min (method 2).

N-(4-(3-((2,3-Dihydrobenzo[*b*][1,4]dioxine)-6-sulfonamido)phenyl)thiazol-2-yl)acetamide (**5q**). The general procedure for the formation of sulfonamide (I) was followed using **3** (75.0 mg, 0.32 mmol), 1,4-benzodioxan-6-sulfonyl chloride (91.0 mg, 0.39 mmol) as reagent, and triethylamine. Purification by silica gel flash chromatography (CH_2Cl_2 :EtOAc; 100:0 to 80:20) afforded the title compound as a white powder (52.4 mg, 37%). 1H NMR (DMSO- d_6 , 200 MHz): δ 2.28 (s, 3H, H_1), 4.28 (s, 4H, H_{18}), 6.91 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H, H_{14}), 7.46–7.06 (m, 5H, H_4 , H_9 , H_{10} , H_{13} and H_{17}), 7.60 (dt, $J = 7.7$, 1.4 Hz, 1H, H_{11}), 7.87 (s, 1H, H_7), 8.97 (s, 1H, $NH_{sulfonamide}$), 11.18 (s, 1H, NH_{acetyl}). ^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 50 MHz): δ 22.5, 64.0, 64.3, 108.4, 115.6, 117.2, 117.6, 119.3, 120.3, 121.4, 129.5, 131.9, 135.2, 138.3, 143.2, 147.2, 148.1, 158.0, 168.7. HRMS-ESI (m/z): $[M + H]^+$ calcd for $C_{19}H_{18}N_3O_3S_2$, 432.0682; found, 432.0679. HPLC (λ_{254}) purity 97.5%; t_R 6.88 min (method 2).

N-(4-(3-((4-Ethylphenyl)sulfonamido)phenyl)thiazol-2-yl)acetamide (**5r**). The general procedure for the formation of sulfonamide (I) was followed using **3** (150.0 mg, 0.65 mmol), 4-ethylphenylsulfonyl chloride (124.6 μ L, 0.77 mmol) as reagent, and triethylamine. Purification by silica gel flash chromatography (CH_2Cl_2 :EtOAc; 100:0 to 70:30) afforded the title compound as a white powder (131.8 mg, 51%). 1H NMR (CD_3OD , 200 MHz): δ 1.15 (t, $J = 7.6$ Hz, 3H, H_{17}), 2.20 (s, 3H, H_1), 2.62 (q, $J = 7.6$ Hz, 2H, H_{16}), 6.99 (ddd, $J = 8.0$, 2.2, 1.1 Hz, 1H, H_9), 7.30–7.16 (m, 4H, H_4 , H_{10} and H_{14}), 7.58–7.51 (m, 1H, H_{11}), 7.73–7.63 (m, 2H, H_{13}). ^{13}C NMR (CD_3OD , 50 MHz): δ 15.7, 22.7, 29.8, 109.2, 119.9, 121.5, 123.3, 128.5 (2C), 129.6 (2C), 130.5, 137.1, 138.4, 139.6, 150.5, 151.3, 159.5, 171.0. HRMS-ESI (m/z): $[M + H]^+$ calcd for $C_{19}H_{20}N_3O_3S_2$, 402.0941; found, 402.0939. HPLC (λ_{254}) purity 98.8%; t_R 8.17 min (method 2).

N-(4-(3-((4-Butylphenyl)sulfonamido)phenyl)thiazol-2-yl)acetamide (**5s**). The general procedure for the formation of sulfonamide (I) was followed using **3** (150.0 mg, 0.65 mmol), 4-butylphenylsulfonyl chloride (150.2 μ L, 0.78 mmol) as reagent, and triethylamine. Purification by silica gel flash chromatography (CH_2Cl_2 :EtOAc; 100:0 to 80:20) afforded the title compound as a white powder (199.9 mg, 72%). 1H NMR (CD_3OD , 200 MHz): δ 0.86 (t, $J = 7.2$ Hz, 3H, H_{19}), 1.26 (h, $J = 7.0$ Hz, 2H, H_{18}), 1.59–1.41 (m, 2H, H_{17}), 2.20 (s, 3H, H_1), 2.58 (t, $J = 7.7$ Hz, 2H, H_{16}), 7.06–6.92 (m, 1H, H_9), 7.31–7.12 (m, 4H, H_4 , H_{10} and H_{14}), 7.55 (dt, $J = 7.9$, 1.2 Hz, 1H, H_{11}), 7.66 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H, H_{13}). ^{13}C NMR (CD_3OD , 50 MHz): δ 14.3, 22.7, 23.4, 34.5, 36.5, 109.2, 120.0, 121.7, 123.4, 128.4 (2C), 130.1 (2C), 130.4, 137.1, 138.3, 139.6, 149.9, 150.5, 159.5, 171.0. HRMS-ESI (m/z): $[M + H]^+$ calcd for $C_{21}H_{24}N_3O_3S_2$, 430.1254; found, 430.1252. HPLC (λ_{254}) purity >99%; t_R 9.55 min (method 2).

N-(4-(3-((4-Pentylphenyl)sulfonamido)phenyl)thiazol-2-yl)acetamide (**5t**). The general procedure for the formation of sulfonamide (I) was followed using **3** (127.0 mg, 0.54 mmol), 4-pentylphenylsulfonyl chloride (161.0 mg, 0.65 mmol) as reagent, and triethylamine. Purification by silica gel flash chromatography (CH_2Cl_2 :EtOAc; 100:0 to 80:20) afforded the title compound as a white powder (200.2 mg, 72%). 1H NMR (CD_3OD , 200 MHz): δ 0.83 (t, $J = 6.7$ Hz, 3H, H_{20}), 1.38–1.08 (m, 4H, H_{19} and H_{18}), 1.52 (p, $J = 7.3$ Hz, 2H, H_{17}), 2.20 (s, 3H, H_1), 2.57 (t, $J = 7.7$ Hz, 2H, H_{16}), 6.99 (ddd, $J = 8.0$, 2.2, 1.1 Hz, 1H, H_9), 7.31–7.13 (m, 4H, H_4 , H_{10} and H_{14}), 7.55 (dt, $J = 7.8$, 1.3 Hz, 1H, H_{11}), 7.75–7.61 (m, 3H, H_7 and H_{13}). ^{13}C NMR (CD_3OD , 50 MHz): δ 14.5, 22.7, 23.6, 32.0, 32.6, 36.7, 109.2, 120.0, 121.7, 123.4, 128.4 (2C), 130.1 (2C), 130.4, 137.1, 138.3, 139.6, 149.9, 150.5, 159.5, 171.0. HRMS-ESI (m/z): $[M + H]^+$ calcd for $C_{22}H_{26}N_3O_3S_2$, 444.1410; found, 444.1408. HPLC (λ_{254}) >99%; t_R 10.18 min (method 2).

N-(4-(3-((4-*tert*-Butylphenyl)sulfonamido)phenyl)thiazol-2-yl)acetamide (**5u**). The general procedure for the formation of sulfonamide (I) was followed using **3** (150.0 mg, 0.65 mmol), 4-*tert*-butylphenylsulfonyl chloride (180.0 mg, 0.77 mmol) as reagent, and

triethylamine. Purification by silica gel flash chromatography (CH_2Cl_2 :EtOAc; 100:0 to 80:20) afforded the title compound as a white powder (92.1 mg, 33%). 1H NMR (CD_3OD , 200 MHz): δ 1.27 (s, 9H, H_{17}), 2.21 (s, 3H, H_1), 7.06–6.95 (m, 1H, H_9), 7.29–7.13 (m, 2H, H_4 and H_{10}), 7.62–7.47 (m, 3H, H_{11} and H_{14}), 7.78–7.64 (m, 3H, H_7 and H_{13}). ^{13}C NMR (CD_3OD , 50 MHz): δ 22.7, 31.5 (3C), 36.1, 109.2, 119.9, 121.5, 123.3, 127.2 (2C), 128.3 (2C), 130.5, 137.1, 138.2, 139.7, 150.6, 158.0, 159.6, 171.0. HRMS-ESI (m/z): $[M + H]^+$ calcd for $C_{21}H_{24}N_3O_3S_2$, 430.1254; found, 430.1251. HPLC (λ_{254}) purity >99%; t_R 9.13 min (method 2).

N-(4-(3-((1,1'-Biphenyl)-4-sulfonamido)phenyl)thiazol-2-yl)acetamide (**5v**). The general procedure for the formation of sulfonamide (I) was followed using **3** (100.0 mg, 0.43 mmol), biphenyl-4-sulfonyl chloride (130.0 mg, 0.51 mmol) as reagent, and triethylamine. Purification by silica gel flash chromatography (CH_2Cl_2 :EtOAc; 80:20 to 60:40) afforded the title compound as a white powder (85.1 mg, 43%). 1H NMR (acetone- d_6 , 200 MHz): δ 2.28 (s, 3H, H_1), 7.19–7.10 (m, 1H, H_9), 7.28 (t, $J = 7.8$ Hz, 1H, H_{10}), 7.54–7.37 (m, 4H, H_4 , H_{19} and H_{18}), 7.73–7.58 (m, 3H, H_{11} and H_{17}), 7.94–7.76 (m, 5H, H_7 , H_{13} and H_{14}). ^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 50 MHz): δ 22.5, 108.5, 117.5, 119.5, 121.6, 127.1 (2C), 127.3 (2C), 127.4 (2C), 128.6, 129.1 (2C), 129.6, 135.3, 138.2, 138.2, 138.3, 144.3, 148.1, 158.0, 168.7. HRMS-ESI (m/z): $[M + H]^+$ calcd for $C_{23}H_{20}N_3O_3S_2$, 450.0941; found, 450.0935. HPLC (λ_{254}): Purity >99%; t_R : 9.07 min (method 2).

N-(4-(3-((4'-Methyl-[1,1'-biphenyl])-4-sulfonamido)phenyl)thiazol-2-yl)acetamide (**5w**). The general procedure for the formation of sulfonamide (I) was followed using **3** (102.0 mg, 0.44 mmol), 4'-methylbiphenyl-4-sulfonyl chloride (205.0 mg, 0.77 mmol) as reagent, and triethylamine. Purification by silica gel flash chromatography (CH_2Cl_2 :EtOAc; 100:0 to 70:30) afforded the title compound as a white powder (110.5 mg, 37%). 1H NMR (acetone- d_6 , 200 MHz): δ 2.27 (s, 3H, H_1), 2.34 (s, 3H, H_{20}), 7.19–7.12 (m, 1H, H_9), 7.31–7.22 (m, 3H, H_{10} and H_{18}), 7.38 (s, 1H, H_4), 7.65–7.49 (m, 3H, H_{11} and H_{17}), 7.81–7.71 (m, 2H, H_{14}), 7.97–7.80 (m, 3H, H_7 and H_{13}). ^{13}C NMR (acetone- d_6 , 50 MHz): δ 21.1, 22.9, 108.8, 119.3, 121.0, 122.9, 127.9 (2C), 128.0 (2C), 128.7 (2C), 130.3, 130.6 (2C), 136.8, 137.0, 139.3 (2C), 139.3, 146.0, 149.8, 159.0, 169.2. HRMS-ESI (m/z): $[M + H]^+$ calcd for $C_{24}H_{22}N_3O_3S_2$, 464.1097; found, 464.1093. HPLC (λ_{254}) purity 97.5%; t_R 9.52 min (method 2).

N-(4-(3-((4-Iodophenyl)sulfonamido)phenyl)thiazol-2-yl)acetamide (**5x**). The general procedure for the formation of sulfonamide (I) was followed using **3** (1.50 g, 6.44 mmol), 4-iodobenzenesulfonyl chloride (2.33 g, 7.73 mmol) as reagent, and triethylamine. Purification by silica gel flash chromatography (CH_2Cl_2 :EtOAc; 100:0 to 70:30) afforded the title compound as a white powder (1.85 g, 60%). 1H NMR (DMSO- d_6 , 200 MHz): δ 2.17 (s, 3H, H_1), 7.05–6.96 (m, 1H, H_9), 7.27 (t, $J = 7.9$ Hz, 1H, H_{10}), 7.62–7.45 (m, 3H, H_4 , H_{11} and H_{14}), 7.69 (t, $J = 1.9$ Hz, 1H, H_7), 7.99–7.88 (m, 1H, H_{13}), 10.45 (s, 1H, $NH_{sulfonamide}$), 12.26 (s, 1H, NH_{acetyl}). ^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 50 MHz): δ 22.5, 101.2, 108.5, 117.7, 119.8, 121.8, 128.3 (2C), 129.6, 135.3, 137.9, 138.2 (2C), 139.0, 148.0, 158.0, 168.7. HRMS-ESI (m/z): $[M + H]^+$ calcd for $C_{17}H_{15}IN_3O_3S_2$, 499.9594; found, 499.9591. HPLC (λ_{280}) purity 96.2%; t_R 4.15 min (method 1).

N-(4-(3-((4-(Hex-1-yn-1-yl)phenyl)sulfonamido)phenyl)thiazol-2-yl)acetamide (**6a**). To a mixture of DMF (1 mL) and Et_3N (3 mL) under argon was added 1-hexyne (57.5 μ L, 0.49 mmol) followed by **5x** (300 mg, 0.66 mmol), $Pd(OAc)_2$ (2.5 mg, 0.01 mmol), and PPh_3 (5.2 mg, 0.02 mmol). The reaction was heated to 50 °C for about 2 h until complete consumption of the starting material (TLC monitoring). The mixture was then cooled to rt and diluted with 0.5 M aqueous solution of NH_4Cl (100 mL). The aqueous layer was extracted three times with EtOAc (75 mL), and the combined organic layers were washed with brine (150 mL), dried with $MgSO_4$, and concentrated under reduced pressure. Purification by silica gel flash chromatography (CH_2Cl_2 :EtOAc; 100:0 to 70:30) afforded **6a** as an off-white powder (74.8 mg, 0.17 mmol, 25%). 1H NMR (CD_3OD , 200 MHz): δ 0.91 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H, H_{21}), 1.62–1.35 (m, 4H, H_{20} and H_{19}), 2.20 (s, 3H, H_1), 2.37 (t, $J = 6.8$ Hz, 2H, H_{18}), 6.97 (ddd, $J = 8.0$, 2.2, 0.9 Hz, 1H,

H₉), 7.27–7.16 (m, 2H, H₄ and H₁₀), 7.39 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H, H₁₄), 7.57 (dt, *J* = 7.8, 1.2 Hz, 1H, H₁₁), 7.76–7.64 (m, 2H, H₇ and H₁₃). ¹³C NMR (CD₃OD, 50 MHz): δ 14.1, 19.8, 22.7, 23.1, 31.9, 80.4, 95.4, 109.3, 120.2, 121.8, 123.6, 128.4 (2C), 130.4, 130.5, 132.9 (2C), 137.2, 139.3, 139.7, 150.5, 159.6, 171.0. HRMS-ESI (*m/z*): [M + H]⁺ calcd for C₂₃H₂₄N₃O₃S₂, 454.1254; found, 454.1249. HPLC (λ₂₈₀) purity >99%; *t*_R 8.08 min (method 1).

N-(4-(3-((4-(Oct-1-yn-1-yl)phenyl)sulfonamido)phenyl)thiazol-2-yl)acetamide (**6b**). To a mixture of DMF (1 mL) and Et₃N (3 mL) under argon was added 1-octyne (73.7 μL, 0.49 mmol) followed by **5x** (300 mg, 0.66 mmol), Pd(OAc)₂ (2.5 mg, 0.01 mmol), and PPh₃ (5.2 mg, 0.02 mmol). The reaction was heated to 50 °C for about 2 h until complete consumption of the starting material (TLC monitoring). The mixture was then cooled to rt and diluted with 0.5 M aqueous solution of NH₄Cl (100 mL). The aqueous layer was extracted three times with EtOAc (75 mL), and the combined organic layers were washed with brine (150 mL), dried with MgSO₄, and concentrated under reduced pressure. Purification by silica gel flash chromatography (CH₂Cl₂:EtOAc; 100:0 to 70:30) afforded **6b** as an off-white powder (11.2 mg, 0.23 mmol, 35%). ¹H NMR (CD₃OD, 200 MHz): δ 0.97–0.78 (m, 3H, H₂₃), 1.62–1.15 (m, 9H, H₂₂, H₂₁, H₂₀ and H₁₉), 2.19 (s, 3H, H₁), 2.34 (t, *J* = 6.8 Hz, 2H, H₁₈), 6.97 (ddd, *J* = 8.0, 2.1, and 0.9 Hz, 1H, H₉), 7.26–7.14 (m, 2H, H₄ and H₁₀), 7.38 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H, H₁₄), 7.56 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H, H₁₁), 7.74–7.65 (m, 3H, H₇ and H₁₃). ¹³C NMR (CD₃OD, 50 MHz): δ 14.5, 20.2, 22.7, 23.7, 29.7, 29.8, 32.6, 80.4, 95.4, 109.3, 120.1, 121.7, 123.6, 128.4 (2C), 130.3, 130.5, 132.9 (2C), 137.1, 139.3, 139.7, 150.4, 159.6, 171.0. HRMS-ESI (*m/z*): [M + H]⁺ calcd for C₂₅H₂₈N₃O₃S₂, 482.1567; found, 482.1565. HPLC (λ₂₈₀) purity 97.8%; *t*_R 8.86 min (method 1).

■ ASSOCIATED CONTENT

Supporting Information

The Supporting Information is available free of charge on the ACS Publications website at DOI: 10.1021/acs.jmedchem.6b00547.

Additional NMR spectra and HPLC chromatograms (PDF)

Molecular formula strings (CSV)

■ AUTHOR INFORMATION

Corresponding Authors

*For S.R.: phone, (33) 4 89 06 43 33; fax, (33) 4 89 06 43 33; E-mail, srocchi@unice.fr.

*For R.B.: phone, (33) 4 92 07 61 43; fax, (33) 4 92 07 61 89; E-mail, benhida@unice.fr.

Author Contributions

[†]A. Millet, M. Plaisant, and C. Ronco contributed equally.

Notes

The authors declare no competing financial interest.

■ ACKNOWLEDGMENTS

We sincerely thank P. Marchetti and J. Kluza (INSERM U837, équipe 4, Lille, France) for melanoma resistant cell lines and P. Auberger (INSERM U1065, team 2) for chronic leukemia cells. This research was supported by the INSERM, CNRS, University of Nice Sophia Antipolis (AM grant), INSERM Transfert (COPOC grant), Canceropole PACA and ARC (contract no. SFI 20121205378). M. Plaisant is a recipient of “contrat INSERM Transfert”. INSERM U1065, team 1 is “équipe labélisée ligue 2010”.

■ ABBREVIATIONS USED

CML, chronic myeloid leukemia; TZD, thiazolidinedione; PPAR_γ, peroxisome proliferator-activated receptor gamma;

SD, standard deviation; BCR-ABL, breakpoint cluster region-Abelson; EC₅₀, effective dose giving 50% target inhibition; KHN, human keratinocytes; FHN, human fibroblasts; PARP, poly ADP-ribose polymerase; DNA, deoxyribonucleic acid; LC3, microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3; ATG4, cysteine protease ATG4; SDS-PAGE, sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis; Hsp60, heat shock protein 60; siRNA, small interfering DNA; QVD, (3*S*)-5-(2,6-difluorophenoxy)-3-[[[(2*S*)-3-methyl-1-oxo-2-[(2-quinolinylcarbonyl)amino]butyl]amino]-4-oxo-pentanoic acid; siCTR, small interfering control; UHPLC-MS/MS, ultrahigh pressure liquid chromatography mass spectrometry; *T*_{1/2}; *V*_d, distribution volume; AUC_{2h}, area under the curve at 2 h

■ REFERENCES

- (1) American Cancer Society Global Cancer Facts & Figures, 3rd ed.; American Cancer Society: Atlanta, 2015.
- (2) Wyld, L.; Audisio, R. A.; Poston, G. J. The evolution of cancer surgery and future perspectives. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **2015**, *12*, 115–124.
- (3) Narayanan, D. L.; Saladi, R. N.; Fox, J. L. Ultraviolet radiation and skin cancer. *Int. J. Dermatol.* **2010**, *49*, 978–986.
- (4) (a) Gottesman, M. M. Mechanisms of cancer drug resistance. *Annu. Rev. Med.* **2002**, *53*, 615–627. (b) Holohan, C.; Van Schaeybroeck, S.; Longley, D. B.; Johnston, P. G. Cancer drug resistance: an evolving paradigm. *Nat. Rev. Cancer* **2013**, *13*, 714–726.
- (5) (a) Damia, G.; D’Incalci, M. Mechanisms of resistance to alkylating agents. *Cytotechnology* **1998**, *27*, 165–173. (b) Hazlehurst, L. A.; Dalton, W. S. Cancer drug resistance. In *Cancer Drug Discovery and Development*; Teicher, B. A., Ed.; Humana Press: Totowa, NJ, 2006; pp 377–387.
- (6) Smith, T.; Wolff, K. A.; Nguyen, L. Molecular biology of drug resistance in mycobacterium tuberculosis. In *Pathogenesis of Mycobacterium Tuberculosis and its Interaction with the Host Organism*; Pieters, J., McKinney, D. J., Eds.; Springer: Berlin, Heidelberg, 2013; pp 53–80.
- (7) (a) Hauschild, A.; Grob, J.-J.; Demidov, L. V.; Jouary, T.; Gutzmer, R.; Millward, M.; Rutkowski, P.; Blank, C. U.; Miller, W. H.; Kaempgen, E.; Martin-Algarra, S.; Karaszewska, B.; Mauch, C.; Chiarion-Sileni, V.; Martin, A.-M.; Swann, S.; Haney, P.; Mirakhur, B.; Guckert, M. E.; Goodman, V.; Chapman, P. B. Dabrafenib in BRAF-mutated metastatic melanoma: a multicentre, open-label, phase 3 randomised controlled trial. *Lancet* **2012**, *380*, 358–365. (b) Haarberg, H. E.; Smalley, K. S. M. Resistance to Raf inhibition in cancer. *Drug Discovery Today: Technol.* **2014**, *11*, 27–32.
- (8) Robert, C.; Schachter, J.; Long, G. V.; Arance, A.; Grob, J. J.; Mortier, L.; Daud, A.; Carlino, M. S.; McNeil, C.; Lotem, M.; Larkin, J.; Lorigan, P.; Neyns, B.; Blank, C. U.; Hamid, O.; Mateus, C.; Shapira-Frommer, R.; Kosh, M.; Zhou, H.; Ibrahim, N.; Ebbinghaus, S.; Ribas, A. Pembrolizumab versus ipilimumab in advanced melanoma. *N. Engl. J. Med.* **2015**, *372*, 2521–2532.
- (9) Kelderman, S.; Schumacher, T. N.; Haanen, J. B. Acquired and intrinsic resistance in cancer immunotherapy. *Mol. Oncol.* **2014**, *8*, 1132–1139.
- (10) (a) Botton, T.; Puissant, A.; Bahadoran, P.; Annicotte, J.-S.; Fajas, L.; Ortonne, J. P.; Gozzerino, G.; Zamoum, T.; Tartare-Deckert, S.; Bertolotto, C.; Ballotti, R.; Rocchi, S. In vitro and in vivo anti-melanoma effects of cigitazone. *J. Invest. Dermatol.* **2009**, *129*, 1208–1218. (b) Botton, T.; Puissant, A.; Cheli, Y.; Tomic, T.; Giuliano, S.; Fajas, L.; Deckert, M.; Ortonne, J. P.; Bertolotto, C.; Tartare-Deckert, S.; Ballotti, R.; Rocchi, S. Cigitazone negatively regulates CXCL1 signaling through MITF to suppress melanoma growth. *Cell Death Differ.* **2011**, *18*, 109–21.
- (11) Fryer, R. A.; Barlett, B.; Galustian, C.; Dalgeish, A. G. Mechanisms underlying gemcitabine resistance in pancreatic cancer and sensitisation by the iMiD lenalidomide. *Anticancer Res.* **2011**, *31*, 3747–3756.

(12) Cerezo, M.; Lehraiki, A.; Millet, A.; Rouaud, F.; Plaisant, M.; Jaune, E.; Botton, T.; Ronco, C.; Abbe, P.; Amdouni, H.; Passeron, P.; Hofman, H.; Mograbi, M.; Dabert-Gay, A. S.; Debayle, D.; Alcor, D.; Rabhi, N.; Annicotte, J.-S.; Héliot, L.; Gonzalez-Pisfil, M.; Robert, C.; Moréra, S.; Vigouroux, A.; Gual, P.; Ali, M. M. U.; Bertolotto, C.; Hofman, P.; Ballotti, R.; Benhida, R.; Rocchi, S. New compounds triggering endoplasmic reticulum stress exert anti-melanoma effects and overcome BRAF inhibitor resistance. *Cancer Cell* **2016**, *29*, 805–819.

(13) Auwerx, J. PPAR γ , the ultimate thrifty gene. *Diabetologia* **1999**, *42*, 1033–1049.

(14) Duca, M.; Malnuit, V.; Barbault, F.; Benhida, R. Design of novel RNA ligands that bind stem-bulge HIV-1 TAR RNA. *Chem. Commun.* **2010**, *46*, 6162–6164.

(15) Corazao-Rozas, P.; Guerreschi, P.; Jendoubi, M.; André, F.; Jonneaux, A.; Scalbert, C.; Garçon, G.; Mallet-Martino, M.; Balayssac, S.; Rocchi, S.; Savina, A.; Formstecher, P.; Mortier, L.; Kluza, J.; Marchetti, P. Mitochondrial oxidative stress is the Achilles' heel of melanoma cells resistant to Braf-mutant inhibitor. *Oncotarget* **2013**, *4*, 1986–1998.

(16) Bhamidipati, P. K.; Kantarjian, H.; Cortes, J.; Cornelison, A. M.; Jabbour, E. Management of imatinib-resistant patients with chronic myeloid leukemia. *Ther. Adv. Hematol.* **2013**, *4*, 103–117.

(17) Samulitis, B. K.; Pond, K. W.; Pond, E.; Cress, A. E.; Patel, H.; Wisner, L.; Patel, C.; Dorr, R. T.; Landowski, T. H. Gemcitabine resistant pancreatic cancer cell lines acquire an invasive phenotype with collateral hypersensitivity to histone deacetylase inhibitors. *Cancer Biol. Ther.* **2015**, *16*, 43–51.

(18) (a) Sannigrahi, M. K.; Singh, V.; Sharma, R.; Panda, N. K.; Khullar, M. Role of autophagy in head and neck cancer and therapeutic resistance. *Oral Dis.* **2015**, *21*, 283–291. (b) Sui, X.; Chen, R.; Wang, Z.; Huang, Z.; Kong, N.; Zhang, M.; Han, W.; Lou, F.; Yang, J.; Zhang, Q.; Wang, X.; He, C.; Pan, H. Autophagy and chemotherapy resistance: a promising therapeutic target for cancer treatment. *Cell Death Dis.* **2013**, *4*, e838. (c) Liu, B.; Wen, X.; Cheng, Y. Survival or death: disequilibrating the oncogenic and tumor suppressive autophagy in cancer. *Cell Death Dis.* **2013**, *4*, e892.

(19) (a) Carew, J. S.; Kelly, K. R.; Nawrocki, S. T. Autophagy as a target for cancer therapy: new developments. *Cancer Manage. Res.* **2012**, *4*, 357–365. (b) Kim, K. H.; Lee, M.-S. Autophagy - a key player in cellular and body metabolism. *Nat. Rev. Endocrinol.* **2014**, *10*, 322–337.

(20) Tomic, T.; Botton, T.; Cerezo, M.; Robert, G.; Luciano, F.; Puissant, A.; Gounon, P.; Allegra, M.; Bertolotto, C.; Bereder, J. M.; Tartare-Deckert, S.; Bahadoran, P.; Auberger, P.; Ballotti, R.; Rocchi, S. Metformin inhibits melanoma development through autophagy and apoptosis mechanisms. *Cell Death Dis.* **2011**, *2*, e199.

(21) Miot-Noirault, E.; Legault, J.; Cachin, F.; Mounetou, E.; Degoul, F.; Gaudreault, R. C.; Moins, N.; Madelmont, J. C. Antineoplastic potency of arylchloroethylurea derivatives in murine colon carcinoma. *Invest. New Drugs* **2004**, *22*, 369–378.