



**Etude des mécanismes moléculaires de chimiorésistance  
du mélanomemalin aux vinca-alcaloïdes et aux  
inhibiteurs de kinases par une approche  
transcriptomique**

Laure-Anaïs Vincent

► **To cite this version:**

Laure-Anaïs Vincent. Etude des mécanismes moléculaires de chimiorésistance du mélanomemalin aux vinca-alcaloïdes et aux inhibiteurs de kinases par une approche transcriptomique. Cancer. Université Montpellier I, 2014. Français. <NNT : 2014MON13523>. <tel-01342573>

**HAL Id: tel-01342573**

**<https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-01342573>**

Submitted on 6 Jul 2016

**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

Pour obtenir le grade de  
**Docteur**

Délivré par l'**UNIVERSITE MONTPELLIER I**

Préparée au sein de l'école doctorale **CBS 2 - Sciences  
Chimiques et Biologiques pour la Santé**  
Et de l'unité de recherche UMR 5247 – IBMM – Institut des  
Biomolécules Max Mousseron

Spécialité : **Biologie Santé**

Présentée par **Laure-Anaïs VINCENT**

**ETUDE DES MECANISMES  
MOLECULAIRES DE CHIMIORESISTANCE  
DU MELANOME MALIN AUX VINCA-  
ALCALOÏDES ET AUX INHIBITEURS DE  
MAP KINASES PAR UNE APPROCHE  
TRANSCRIPTOMIQUE**

Soutenu le 12 décembre 2014 devant le jury composé de

Mme Laurence VIAN, PU, Université Montpellier I  
Mr Pierre CUQ, PU, Université Montpellier I  
Mr Joseph Ciccolini, MCU, Université de Marseille  
Mr Patrice Rat, PU, Université Paris Descartes

Présidente du Jury  
Directeur de Thèse  
Rapporteur  
Rapporteur



## Remerciements

*Je remercie tout d'abord les membres du jury d'avoir accepté de juger ce mémoire.*

*Merci Laurence de m'avoir fait l'honneur de présider ce jury. Je vous suis reconnaissante pour votre chaleureux accueil lors de notre première rencontre, alors que je cherchais un terrain de stage de master 2. Merci pour votre soutien tout au long de ce travail et pour votre bienveillance à mon égard.*

*Merci Patrice de vous être déplacé de si loin. J'espère que le soleil sera au rendez-vous. Si si, je sais quel temps il peut faire en décembre à Paris, et quelle température il peut régner dans les couloirs de la faculté avenue de l'Observatoire. Le Jardin botanique et le Jardin du Luxembourg sont tout de même bien agréables, et ce en toutes saisons ! Je tiens à vous remercier pour les excellents cours de toxicologie que vous dispensez. J'en garde un souvenir impérissable, avec dans le top 5 : le fugu (pour se faire peur), la dioxine (et son parapluie), la toxine botulique (pour les fadas), l'éthylène glycol (ça fait suuuuuper mal une colique néphrétique), et les produits multi-usages pour lentilles de contact (qui lavent et rincent en même temps, p'tet même que ça pourrait faire le café !)... Pour tout dire, je crois que je me souviens plus des sketches que des cours...*

*Merci infiniment Joseph de m'avoir soutenue et aidée durant tout ce travail et de l'être déplacé pour chacun de mes comités de thèse. Merci aussi pour ton sens de l'humour décapant et permanent. Je dois dire que tes mails m'ont fait pleurer de rire à maintes reprises, notamment ton excellente revue d'article... Et un bon fou rire, ça remonte le moral !*

*Merci Pierre, tout d'abord pour ton accueil plus que chaleureux lors de mon arrivée dans le laboratoire. Merci pour ta confiance sans limite qui m'a permis d'évoluer et de progresser dans mes travaux de recherche avec une totale liberté. J'espère que cette thèse aura été à la hauteur de cette confiance. Puisse-t-elle avoir ouvert quelques portes de recherche et autant d'histoires à découvrir et à partager. Merci pour ta patience de ces derniers mois et pour la formation éclairée en rédaction scientifique. Je te remercie aussi pour ta bonne humeur et les galères partagées à l'hôpital. Je pense que tu te souviens encore de ma première garde... Merci enfin pour ton amitié.*

*Je remercie infiniment toutes les personnes qui ont contribué à cette thèse, directement ou non.*

*Merci Michel pour ton implication dans ce travail, ton aide et ta patience. Les discussions n'ont pas toujours été simples entre biologie et mathématiques mais elles ont toujours été très enrichissantes. Tu as su m'expliquer quelques problématiques mathématiques et statistiques, informatiques aussi, ce qui n'était pas gagné ! Merci d'avoir accepté les aléas divers et variés de ces projets de recherche et d'avoir refait maintes analyses pour arriver, au final, à de beaux résultats. Je te suis aussi reconnaissante pour ton soutien amical et tes encouragements.*

*Merci Simon pour tous les « tuyaux » scientifiques et remarques pertinentes qui ont fait progresser ma réflexion et mes recherches.*

*Merci à toute l'équipe « autophagie et infections » du CPBS, Martine Biard-Piechaczyk, Fabien Blanchet, Coralie Daussy, Jamal Alfaisal, et tout particulièrement Véronique Heilmann. Sans vous, je crois que je serais encore en train de me battre avec IC3B!! Merci pour votre aide et votre accueil très amical. Je reviendrai avec un gâteau au chocolat pour fêter la fin de la thèse ☺*

*Merci à toute l'équipe de toxicologie : Audrey, Myriam, Chantal, Simon, Kamel, Françoise, Stéphanie, et Irène qui fait toujours un peu partie de ce labo. Merci pour votre bonne humeur, votre amitié et votre soutien. Merci à toi Chaker, le bureau des stagiaires est bien vide sans toi. Je te remercie pour ton amitié et tout ce que tu m'as transmis. Et bien sûr merci aux autres stagiaires : Zahraa, Lucka, Romain, et Adrien qui égayent ce labo.*

*Merci aussi à toutes les personnes rencontrées aux détours des couloirs de l'hôpital ou de la faculté, tout particulièrement le labo de parasito (Seb, Domi, Jean-Claude, Donika), de pharmacocinétique (Alex, Sonia, Florence, Litaty), Carine, Estelle, Hinda, et vous tous qui vous reconnaissez. Merci à mes co-internes avec qui j'ai passé de super moments : Alexis, Juju, Ian, Julie, Del, Sara, JB, Guillaume... Et merci à mes anciens profs et maîtres de stage qui m'ont donné goût à l'hôpital et à la recherche : Nathalie, Claude, Sophie, Amélie, Anne, Patrice, et Jean-Louis. Finalement, je n'ai pas quitté mes premiers amours : vive la signalisation cellulaire !*

*Je dédie ce mémoire à mes parents et à mon frère. Merci pour votre amour sans faille et sans limite, et pour votre soutien tout au long de mes études. Merci pour m'avoir supportée... et je sais de quoi je parle ! (Et voilà papa, bientôt un deuxième diplôme pour faire oublier que le premier a été si long à venir !) Vous m'avez transmis une certaine philosophie de la vie emplie de fraternité, de confiance, de liberté de penser, de curiosité, d'indépendance, de passion, de patience... Il me manque les mots pour dire à quel point je suis heureuse de vous avoir pour famille.*

*Merci aussi à toute ma famille, plus étendue, parisienne et charentaise, qui a fait ce que je suis devenue. Vous êtes trop nombreux pour que je vous cite tous, mais à tous, je vous suis reconnaissante pour cet amour insondable donc vous m'avez entouré. C'est toujours un plaisir de vous retrouver lors des grands repas de Noël et de discuter science, art, philosophie, politique ou vin et gastronomie. Ces moments de fraternité et d'amour, le soutien que vous m'avez apporté dans les moments difficiles, les grandes fêtes et rigolades, sont les piliers qui me maintiennent durant les tempêtes ou les petits coups de blues. Merci pour tout.*

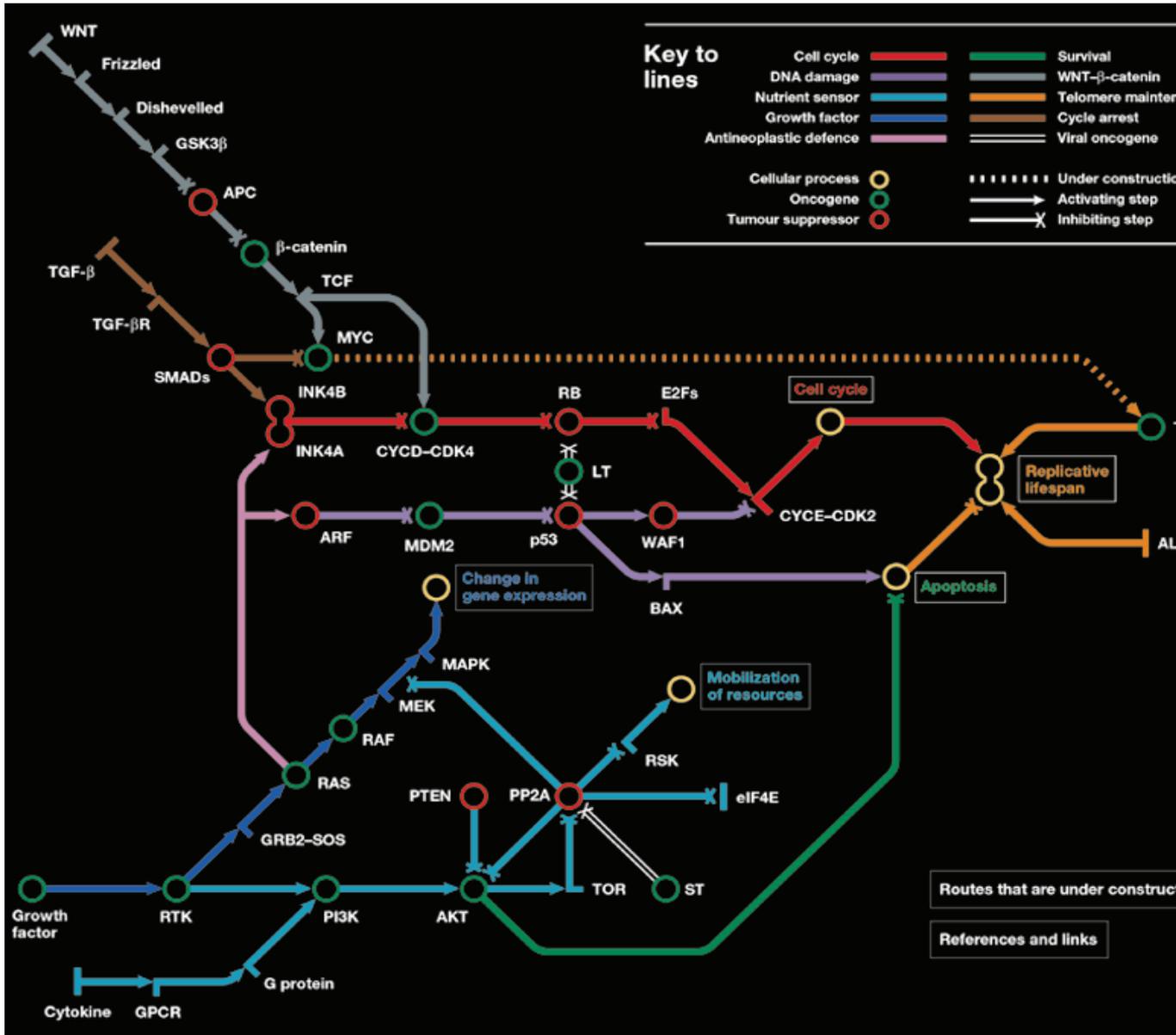
*La vie est faite de rencontres, elles nous marquent et nous font évoluer. Merci à tous mes amis et à toutes les rencontres, même fugaces, qui ont laissé un souvenir impérissable dans mon cœur et ma mémoire. Une pensée plus particulière à Nadège, mon amie de presque toujours. Merci pour ton amitié. Merci à Carlos pour ton amitié, ton soutien de toujours, et bien plus... Tu as su me donner confiance en moi et offrir un écho à ma sensibilité. Merci pour tout. Un grand coucou au club des 4 du Saint Laurent, Sylvain, Jean et Xav ! (le quatrième n'est pas barbu) Chouette, encore une occasion pour picoler ! Un grand merci à tous mes amis de Montpellier et de plus loin : Safia, Caro, Aurelie, Paul, Perrine, Kamel, Sonia, Virginie, Fabrice, Catherine, PG, Seb, Elsa, Jean-Yves, Caroline, Anne-Sophie, Juliette, Andrew, Aurélie, Sébastien, Cécile, Gwenaëlle,... Vous êtes un vrai rayon de soleil.*

*Et le meilleur pour la fin, Pascal, merci pour tout. Merci de m'avoir littéralement supportée (dans tous les sens du terme). Sans toi je serais dans un drôle d'état aujourd'hui. Tu as su me donner, en plus de ton amour, beaucoup de courage. « L'amour fait se rencontrer et se heurter deux plaisirs essentiels mais contraires : le plaisir de s'attacher et le plaisir d'être libre » J Salomé. C'est peut-être le plus beau cadeau que tu m'as fait, cette liberté dont tu as tant besoin, et un cocon qui m'a portée et pensée.*





# Sommaire



Source : <http://www.nature.com/nrc/poster/subpathways/index.html>

**A subway map of cancer pathways**

William C. Hahn & Robert A. Weinberg



<b>Liste des abréviations</b> .....	<b>13</b>
Institutions, groupes de travail et projets.....	13
Bases de données et logiciels.....	13
Noms communs.....	14
Gènes et protéines.....	15

## **INTRODUCTION**..... **17**

## **CONTEXTE MEDICAL & SCIENTIFIQUE**..... **21**

### **I Le mélanome malin**..... **23**

I.1 Définition.....	23
I.2 Epidémiologie.....	23
I.3 Facteurs de risque.....	25
I.3.1 Facteurs de risque extrinsèques ou environnementaux.....	26
I.3.2 Facteurs de risque intrinsèques ou génétiques.....	26
I.4 Cancérogénèse, pathogénèse et biologie du mélanome malin.....	27
I.4.1 Cancérogénèse.....	27
I.4.2 Cancérogénèse et pathogénèse du mélanome malin.....	29
I.4.3 Biologie du mélanome malin.....	31
I.5 Diagnostic et classifications.....	33
I.5.1 Diagnostic et classification cliniques.....	33
Diagnostic et classification histologiques.....	35
I.5.2 Diagnostic et classification moléculaires.....	40
I.6 Pronostic.....	42
I.7 Prévention.....	42
I.7.1 Prévention primaire.....	42
I.7.2 Prévention secondaire.....	43
I.8 Traitements.....	44
I.8.1 Traitement du mélanome primitif régional.....	44
I.8.2 Traitement du mélanome métastatique non résecable.....	44

### **II Résistance du mélanome aux chimiothérapies**..... **49**

II.1 Généralités sur les mécanismes de résistance.....	49
II.2 Transport et métabolisme cellulaire.....	50
II.2.1 Efflux cellulaire.....	50
II.2.2 Inactivation de l'agent anti-cancéreux.....	52
II.2.3 Séquestration lysosomiale.....	52
II.3 Altérations de la cible.....	53
II.4 Altérations des mécanismes de réparation de l'ADN (résistance directe).....	54
II.5 Altération de fonctions cellulaires entraînant indirectement une résistance.....	54
II.5.1 Altérations de l'apoptose.....	55
II.5.2 Mécanismes de réparation de l'ADN (résistance indirecte).....	57
II.5.3 Autophagie.....	57
II.5.4 Réponse au stress du réticulum endoplasmique.....	59
II.6 Adaptation cellulaire.....	60
II.6.1 Activation de voies de signalisation pro-survie.....	60
II.6.2 Redondance des voies de signalisation et activation d'oncogènes.....	61
II.7 Microenvironnement.....	62
II.8 Clones résistants et cellules souches cancéreuses.....	62

<b>III Les vinca-alcaloïdes .....</b>	<b>64</b>
III.1 Utilisation en clinique .....	64
III.2 Origine, structure et caractéristiques chimiques.....	64
III.3 Mécanismes d'action.....	66
III.4 Résistance.....	67
<b>IV Les inhibiteurs de MAPK .....</b>	<b>68</b>
IV.1 Utilisation en clinique .....	68
IV.2 Structure chimique .....	68
IV.3 Mécanismes d'action.....	69
IV.4 Résistance .....	70
<b>V La technologie des puces à ADN : transcriptomique .....</b>	<b>72</b>
V.1 Historique .....	72
V.1.1 Les « omiques ».....	72
V.1.2 Place de la transcriptomique dans les « omiques ».....	73
V.2 Apport et utilisation des biopuces .....	73
V.2.1 Apport des biopuces à ADN en cancérologie .....	73
V.2.2 Utilisations en cancérologie.....	74
V.2.3 Apport des puces à ADN dans l'étude des mécanismes de résistance.....	75
V.3 Principe.....	76
V.4 Démarche pour l'obtention des données de transcriptome .....	79
V.4.1 Conception de l'étude .....	80
V.4.2 Extraction des ARN totaux .....	81
V.4.3 Préparation des ARNc .....	81
V.4.4 Hybridation et scan .....	81
V.4.5 Analyse informatique : conversion des signaux et normalisation.....	81
V.5 Exploitation des données : analyse bioinformatique .....	83
V.5.1 Comparaison non supervisée des profils d'expression .....	83
V.5.2 Comparaison supervisée des profils d'expression .....	85
V.5.3 Enrichissement fonctionnel.....	86

## **PARTIE EXPERIMENTALE..... 91**

### **AXE DE RECHERCHE I..... 93**

#### **ETUDE DES MECANISMES MOLECULAIRES DE RESISTANCE DIFFERENTIELLE ACQUISE DU MM AUX VINCA-ALCALOÏDES (VAS) PAR UNE APPROCHE TRANSCRIPTOMIQUE..... 93**

##### **I Article 1 : Differential involvement of glutathione S-transferase mu 1 and multidrug resistance protein 1 in melanoma acquired resistance to vinca alkaloids.....95**

I.1 Contexte et problématique .....	96
I.2 Article .....	96

##### **II Recherche de déterminants moléculaires de la résistance acquise des cellules CAL1 aux VAs (manuscrit en préparation) .....107**

II.1 Contexte et problématique .....	107
II.2 Matériel et méthodes.....	108
II.2.1 Produits chimiques et inhibiteurs .....	108
II.2.2 Lignées cellulaires .....	108
II.2.3 Sélection des gènes discriminants.....	108

II.2.4 Etudes fonctionnelles .....	109
II.2.5 Analyse statistique .....	111
II.3 Résultats.....	111
II.3.1 Sélection de gènes discriminants.....	111
II.3.2 Etude du rôle des gènes sélectionnés dans la chimiorésistance aux VAs.....	118
II.4 Discussion.....	121
<b>III Article 2 : Lysosomes and unfolded protein response, determinants of differential resistance of melanoma cells to vinca-alkaloids.....</b>	<b>125</b>
III.1 Contexte et problématique.....	126
III.2 Article.....	126
III.3 Données supplémentaires non publiées .....	141
III.3.1 Etude de la pigmentation des lignées cellulaires CAL1 .....	141
III.3.1 Etude de l'effet de l'inhibition de la réponse au stress du RE par le TUDCA sur la sensibilité d'une autre lignée cellulaire de MM aux VAs.....	141
<b>IV Etude du rôle de l'autophagie dans la résistance différentielle des lignées CAL1 aux VAs.....</b>	<b>143</b>
IV.1 Contexte et problématique.....	143
IV.2 Matériel et méthodes .....	143
IV.2.1 Produits chimiques et inhibiteurs.....	143
IV.2.2 Lignées cellulaires .....	143
IV.2.3 Etude de l'autophagie .....	144
IV.3 Résultats .....	146
IV.4 Discussion .....	148
<b>AXE DE RECHERCHE II.....</b>	<b>151</b>
<b>ETUDE DES MECANISMES MOLECULAIRES DE RESISTANCE ACQUISE DU MM AUX INHIBITEURS DE MAP KINASES (IMAPK) PAR UNE APPROCHE TRANSCRIPTOMIQUE.....</b>	<b>151</b>
<b>I Contexte et problématique .....</b>	<b>153</b>
<b>II Matériel et méthodes .....</b>	<b>154</b>
II.1.1 Produits chimiques et inhibiteurs .....	154
II.1.2 Lignées cellulaires.....	154
II.1.3 Essai de viabilité cellulaire.....	154
II.1.4 Hybridation sur puces à oligonucléotides Affymetrix.....	155
II.1.5 Analyse des données des biopuces.....	156
<b>III Résultats .....</b>	<b>157</b>
III.1 Sélection des lignées résistantes .....	157
III.2 Analyse transcriptomique .....	158
III.3 Distances entre les profils d'expression.....	158
III.4 Enrichissement fonctionnel des gènes les plus altérés dans les lignées résistantes .....	159
<b>IV Discussion .....</b>	<b>164</b>
<b>CONCLUSION &amp; PERSPECTIVES.....</b>	<b>167</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE.....</b>	<b>175</b>



# Liste des abréviations

---

## Institutions, groupes de travail et projets

AFSSAPS	Agence Française de Sécurité Sanitaire des Produits de Santé	(France)
AFSSE	Agence Française de Sécurité Sanitaire Environnementale	(France)
AJCC	American Joint Committee on Cancer	(Etats-Unis)
ANSM	Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des produits de santé	(France)
DTP	Developmental Therapeutics Program	(Etats-Unis)
INCa	Institut National du Cancer	(France)
InVS	Institut de Veille Sanitaire	(France)
MMDM	Melanoma Molecular Disease Model	(Monde)
MMMP	Melanoma Molecular Map Project	(Monde)
NCI	National Cancer Institute	(Etats-Unis)
OMS	Organisation Mondiale de la Santé	(Monde)
SEER	Surveillance, Epidemiology, and End Results Program	(Etats-Unis)
UICC	Union for International Cancer Control	(Monde)

## Bases de données et logiciels

CCLC	Cancer Cell Line Encyclopedia
GO	Gene Ontology
GSEA	Gene Set Enrichment Analysis
IPA	Ingenuity Pathway Analysis
k-NN	K Nearest Neighbour
MeV	MultiExperiment Viewer
MGSA	Ontologizer's Model-based Gene Set Analysis
PCA	Analyse en Composante Principale
RDAM	Rank Difference Analysis of Microarray

RMA	Robust Multi-array Average
SAM	Significance of Analysis of Microarrays
SOMs	Self-Organising Maps
STRING	Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins
SVM	Support Vector Machine

## **Noms communs**

ARNm	ARN messenger
ARNc	ARN complémentaire
ADNc	ADN complémentaire
CI <sub>50</sub>	Concentration inhibitrice <sub>50</sub>
CIN	Chromosomal INstability
CSC	Cellules souches cancéreuses
CV	Coefficient de variation
DBF	Dabrafénib
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
FC	Fold Changes
FR	Facteur de Risque
iMAPK	Inhibiteur de MAPK
KO	Knockout
MDR	Multi-Drug Resistance (multirésistance)
MM	Mélanome Malin
MMR	DNA-mismatch repair (système de réparation des mésappariements)
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
PE	phycoérythrine
RE	Réticulum Endoplasmique
RR	Risque Relatif
RT-qPCR	PCR quantitative en temps réel
SD	Standard Deviation (Ecart type)
siNT	Non targetting siRNA

siRNA	RNA interférents
SVF	Sérum de veau fœtal
TMT	Tramétinib
UPR	Unfolded Protein Response
UV	Ultraviolet
VA	Vinca-Alcaloïdes
VCR	Vincristine
VDS	Vindésine
VMF	Vémurafenib
VRB	Vinorelbine

### **Lignées cellulaires humaines cancéreuses**

CAL1-wt	Lignée CAL1 parentale	(MM)
CAL1R-VAs	Lignées CAL1 résistantes aux vinca-alcaloïdes	(MM)
CAL1R-VCR	Lignée CAL1 résistante à la vincristine	(MM)
CAL1R-VDS	Lignée CAL1 résistante à la vindésine	(MM)
CAL1R-VRB	Lignée CAL1 résistante à la vinorelbine	(MM)
A375-wt	Lignée A375 parentale	(MM)
A375R-iMAPKs	Lignées A375 résistantes aux inhibiteurs de MAPKs	(MM)
A375R-VMF	Lignée A375 résistante au vémurafénib	(MM)
A375R-DBF	Lignée A375 résistante au dabrafénib	(MM)
A375R-TMT	Lignée A375 résistante au tramétinib	(MM)
MDA-MB-435		(MM)
MCF7		(Sein)

### **Gènes et protéines**

ABC	ATP-binding cassette (transporteur ABC)
ADAMTS1	ADAM metallopeptidase with ThromboSpondin type 1 motif 1

CCND1	Cycline D1
c-KIT	v-kit Hardy-Zuckerman 4 feline sarcoma viral oncogene homolog
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
GPR143	G protein-coupled receptor 143
GSH	Glutathion
GST	Glutathion S-Transférase
HS6ST2	Héparan Sulfate 6-O-SulfoTransférase 2
LDH	Lactate Déshydrogénase
MAP	Microtubule-Associated Protein
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinase
MDR1	Multi-Drug Resistance Protein 1
MGP	Matrix Gla Protein
MMP	Matrix MetalloProtease
MRP	Multidrug Resistance-related Protein
NF- $\kappa$ B	Nuclear Factor Of Kappa Light Polypeptide Gene Enhancer In B-Cells
NRU	Neutral Red Uptake
PCSK6	Proprotein Convertase Subtilisin/Kexin type 6
P-gp	P-glycoprotein
PRKCB	Protein Kinase C, Beta
SLC45A2	Solute Carrier Family 45, member 2
SLITRK6	SLIT and NTRK-like family, member 6
TIMP-1	Tissue Inhibitor of MetalloProteases 1
Topo II	Topoisomérase II

# Introduction

---



Avec une médiane de survie de 6 à 9 mois pour les formes métastatiques et une incidence en constante augmentation, le mélanome malin (MM) est un problème de santé publique mondial et un challenge thérapeutique [1–3]. La résistance aux agents anticancéreux constitue l'obstacle thérapeutique majeur du MM métastatique, qui présente un très faible taux de réponse aux chimiothérapies, utilisées seules ou en association, et dont le traitement par exérèse chirurgicale est impossible [3]. Deux types de chimiorésistances sont décrites : la résistance intrinsèque de la tumeur, à l'origine d'échecs thérapeutiques d'emblée, et la résistance acquise après exposition aux chimiothérapies, responsable d'échappements thérapeutiques. Cette dernière résistance, multifactorielle, peut impliquer de nombreux mécanismes cellulaires et moléculaires [4–6], et est induite indifféremment par chimiothérapies traditionnelles que par les nouvelles thérapies ciblées utilisées dans le traitement du MM métastatique [5,7,8].

La meilleure compréhension de la biologie des cancers associée à l'avènement des technologies « omiques » et au profilage génétique des tumeurs, de plus en plus systématique lors du diagnostic ou d'essais cliniques, a permis de mieux cerner les mécanismes à l'origine des résistances aux anti-cancéreux [9–12]. Ces mécanismes de résistance restent néanmoins complexes et multiples, notamment à cause de l'extrême plasticité des cellules cancéreuses [13]. Leur détermination est aujourd'hui considérée comme l'enjeu majeur de la recherche pour le traitement des cancers. L'objectif final est triple : a) identification de marqueurs biologiques de résistance permettant d'orienter le choix thérapeutique dans un contexte de médecine personnalisée, b) meilleure compréhension de mécanismes moléculaires de résistance permettant de proposer des associations thérapeutiques rationnelles, et c) identification de nouvelles cibles thérapeutiques.

Les travaux réalisés durant cette thèse se sont focalisés sur la recherche de nouveaux déterminants moléculaires de la chimiorésistance acquise du MM par une approche pharmaco-génomique. Deux axes de recherche ont été développés : i) résistance du MM aux chimiothérapies traditionnelles avec l'exemple des vinca-alcaloïdes (VAs) ; ii) résistance du MM aux nouvelles thérapies ciblées avec l'exemple des inhibiteurs de la voie des MAP kinases (iMAPK). A travers l'analyse transcriptomique de modèles cellulaires de MM rendus résistants aux chimiothérapies étudiées (exposition continue de longue durée), de potentiels déterminants moléculaires de résistance ont été mis en évidence (gènes ou fonctions cellulaires altérés dans les lignées résistantes). Puis, des analyses fonctionnelles *in vitro* ont permis de déterminer le rôle de ces altérations moléculaires dans la résistance de nos modèles cellulaires.



# **Contexte médical & scientifique**

---



# I Le mélanome malin

---

## I.1 Définition

Le mélanome malin (MM) est une tumeur maligne du système pigmentaire décrite pour la première fois en 1812 par René Laennec [14]. Cette tumeur se développe aux dépens des mélanocytes, cellules dérivant de la crête neurale et assurant la production de mélanine [15], pigment responsable de la coloration de la peau.

Localisé au niveau cutané dans 90% des cas, le MM peut aussi être retrouvé au niveau muqueux, choroïdien, et uvéal (tissus dérivant de la crête neurale) [16]. Cependant, le MM uvéal diffère substantiellement du MM cutané, aussi bien en termes d'épidémiologie que de prise en charge [15]. Les chapitres suivant concernant le MM se référeront donc au MM cutané.

Le MM est la plus agressive des tumeurs cutanées, sa gravité étant liée à sa forte capacité à métastaser, mettant en jeu le pronostic vital du patient si la lésion n'est pas détectée précocement. En outre, il s'agit d'une des tumeurs les plus résistantes aux thérapeutiques médicamenteuses [17].

## I.2 Epidémiologie

Le MM est un problème de santé publique majeur au niveau mondial [18,19] : d'une part son incidence est en constante augmentation, d'autre part il touche tous les âges de la vie (excepté l'enfance).

L'exemple des Etats-Unis reflète bien la tendance épidémiologique mondiale (données du Surveillance, Epidemiology, and End Results Program (SEER), du National Cancer Institute (NCI) [20], estimations pour l'année 2014 aux Etats-Unis) :

- Les cancers de la peau sont les cancers les plus fréquemment diagnostiqués.
- Le MM représente 5% des cancers cutanés et 4,6% de la totalité des cancers.
- L'âge médian de diagnostic est d'environ 60 ans.
- Le MM est le cancer le plus fréquent chez les jeunes adultes (25-29 ans) [21].
- L'incidence augmente de façon rapide et continue depuis 1975 (25-31% / 10 ans).
- Le taux de survie à 5 ans dépend du stade du MM (global : 90% ; MM métastatique : 20%)
- Le taux de mortalité est stable (2,7 décès pour 100 000 habitants).

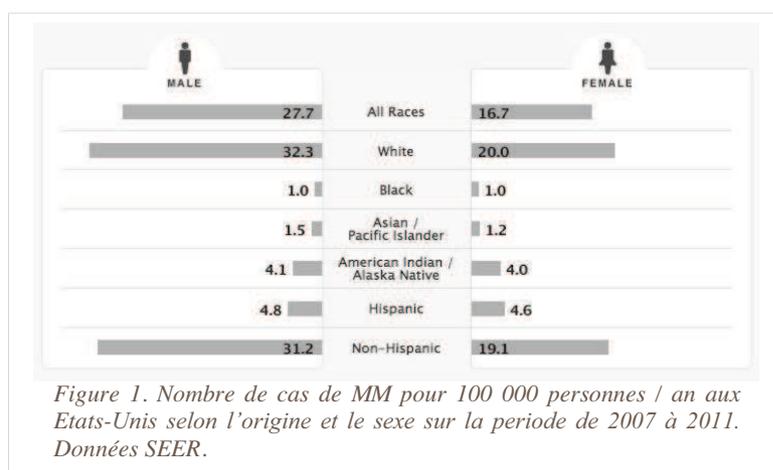


Figure 1. Nombre de cas de MM pour 100 000 personnes / an aux Etats-Unis selon l'origine et le sexe sur la période de 2007 à 2011. Données SEER.

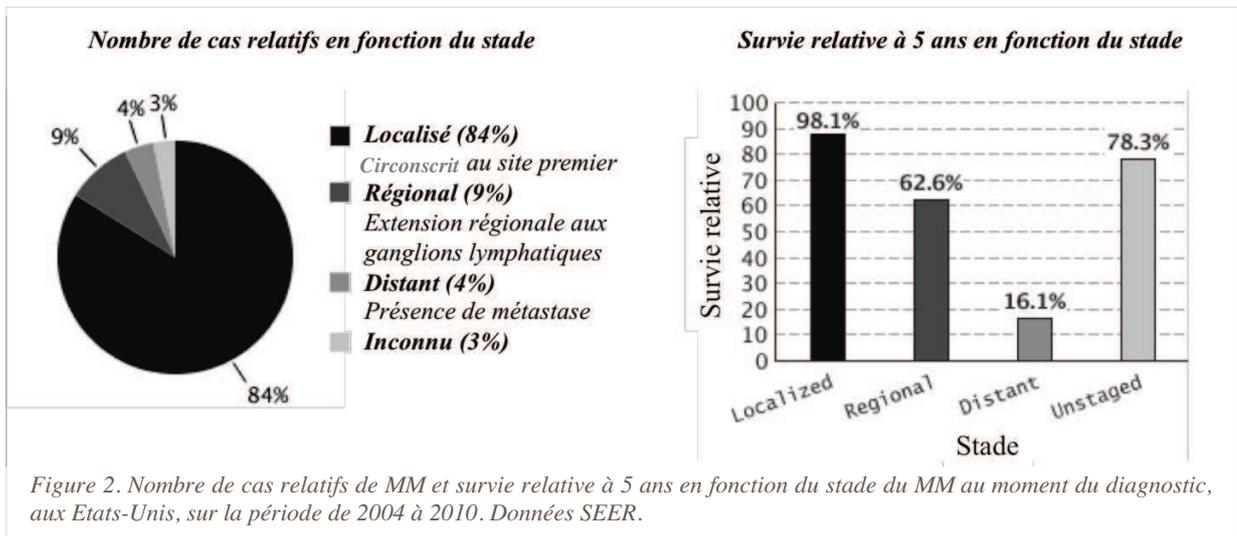
L'incidence du MM est en augmentation constante, probablement due aux progrès diagnostiques et aux changements des habitudes de vie. En effet, le développement économique et la généralisation des congés payés ont favorisé les expositions solaires occasionnelles et intenses à but récréatif, un des facteurs

de risque individuel majeur de MM. Cependant l'incidence varie au niveau mondial selon 2 facteurs : la génétique des populations, caractérisée par le phototype cutané, et la localisation géographique. Comme l'illustre la figure 1, le MM touche principalement les individus à peau claire (d'origine caucasienne), son incidence étant extrêmement faible chez la population à peau noire (d'origine africaine). En Europe, l'incidence diminue selon un gradient nord-sud, ce gradient étant précisément corrélé aux différences de phototypes cutanés [22]. Parallèlement, dans les pays développés (populations majoritairement à peau claire), l'incidence du MM varie selon le taux d'ensoleillement lié à la localisation géographique [2], l'incidence la plus élevée étant retrouvée dans les pays à fort taux d'ensoleillement. Ces deux facteurs de risque (génétique et environnemental) sont cumulés en Australie qui présente les taux d'incidence et de mortalité par MM les plus importants au monde [23] (Tableau 1).

	Incidence (cas/100 000 /an)	Mortalité (cas/100 000 /an)	Risque cumulé sur la durée de vie	Evolution de l'incidence sur 10 ans	Evolution de la mortalité sur 10 ans	Rang sur l'ensemble des cancers
<b>Australie (2001) [23]</b>						
Hommes	41,4	5,1	1 pour 25	(+) 22%	(+) 2%	4ème
Femmes	31,1	2,6	1 pour 35	(+) 12%	0%	3ème
<b>Etats-Unis (2001) [23]</b>						
Hommes	21,4	3,9	1 pour 53	(+) 31%	0%	5ème
Femmes	13,8	1,8	1 pour 78	(+) 25%	(-) 1%	7ème
<b>Angleterre (2000) [23]</b>						
Hommes	9,7	2,7	1 pour 147	(+) 59%	(+) 20%	12ème
Femmes	11,2	1,9	1 pour 117	(+) 41%	(+) 3%	7ème
<b>France (2005) [24]</b>						
Hommes	7,6	1,6	1 pour 167	(+) 27,5%	(+) 13%	12ème
Femmes	8,8	1,1	1 pour 154	(+) 19,5%	(+) 2,5%	8ème

Tableau 1. Comparaison des statistiques épidémiologiques du MM en Australie, aux Etats-Unis, en Angleterre, et en France.

Le taux de survie à 5 ans varie fortement selon le stade du MM au moment du diagnostic (Figure 2). Ainsi, le taux de survie global à 5 ans est de plus de 90%, reflétant la proportion importante de MM diagnostiqués à la phase précoce, localisés et curables par exérèse chirurgicale. A l’opposé, en cas de MM distant, le taux de survie à 5 ans chute à moins de 20%, illustrant le caractère agressif et chimiorésistant du MM métastatique.



Le taux de mortalité par MM est quant à lui stabilisé depuis les années 1990-2000, grâce aux campagnes d’information et de prévention mises en place par les institutions sanitaires nationales et internationales [25]. Ces campagnes ont permis de diagnostiquer la majorité des MM à un stade circonscrit, donc curable par exérèse chirurgicale.

### 1.3 Facteurs de risque

Le MM fournit un des meilleurs exemples d’implication croisée de facteurs environnementaux et génétiques dans le développement des cancers. Ainsi, l’incidence mondiale du MM est corrélée à deux facteurs de risque (FR) individuels majeurs, l’exposition solaire (FR environnemental) et le phototype cutané (FR génétique). Les FR de MM répertoriés sont listés ci-après et associés à leur risque relatif (RR, risque pour une personne présentant le FR de développer un MM par rapport à la population générale). Les antécédents seront abrégés « ATCD » dans les 2 paragraphes suivants.

### I.3.1 Facteurs de risque extrinsèques ou environnementaux

#### ■ Exposition solaire (exposition intense occasionnelle)

*ATCD d'érythème solaire avec cloques:*  $RR \times 2,5$  [23]

#### ■ Exposition aux UV (bancs et cabines de bronzage)

*Utilisation de banc UV, N=1 :*  $RR \times 1,2$  [26]

*Utilisation de banc UV, N=1, avant 35 ans :*  $RR \times 1,9$  [26]

*Chaque nouvelle utilisation :*  $RR + 1,8\%$  [26]

#### ■ Immunosuppression

*Transplantation d'organe :*  $RR \times 3$  [23]

*SIDA :*  $RR \times 1,5$  [23]

### I.3.2 Facteurs de risque intrinsèques ou génétiques

#### ■ Phototype cutané

*Peau claire (type I, cf. tableau 2) :*  $RR \times 1,7$  [23]

*Taches de rousseur :*  $RR \times 2,5$  [23]

*Yeux bleus :*  $RR \times 1,6$  [23]

*Cheveux roux :*  $RR \times 1,6$  [23]

#### ■ Naevi multiples et naevi atypiques

*Naevi bénins multiples (> 100) :*  $RR \times 11$  [23]

*Naevi atypiques multiples :*  $RR \times 11$  [23]

#### ■ Antécédents personnels de cancer de la peau

*ATCD personnel de MM :*  $RR \times 8,5$  [23]

*ATCD de cancer de la peau non MM :*  $RR \times 2,9$  [23]

#### ■ Antécédents familiaux de MM

*ATCD familiaux importants*

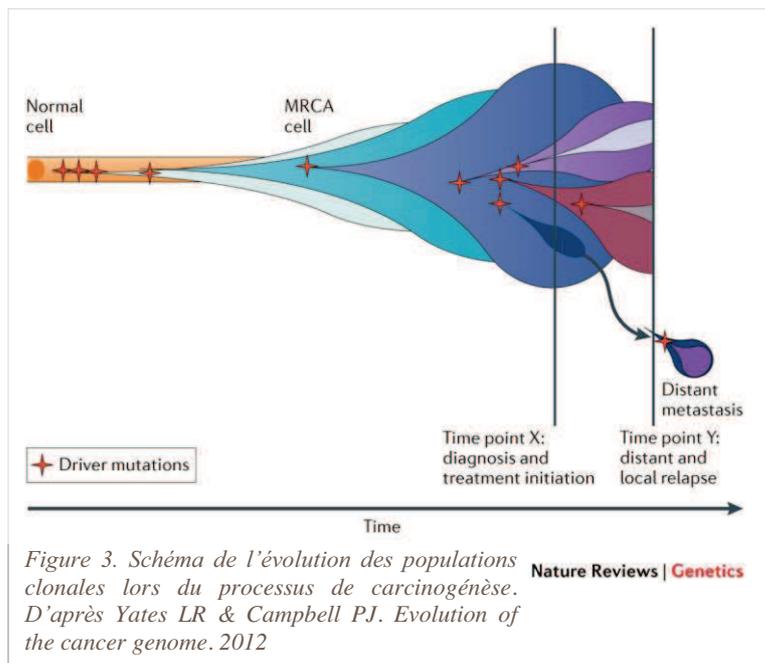
*(≥3 personnes affiliées au 1<sup>er</sup> degré atteintes) :*  $RR \times 35-70$  [23]

*ATCD familiaux faibles :*  $RR \times 3$  [23]

Phototype	Exemple d'origine		Carnation	Cheveux	Yeux	Réaction solaire
I	Irlandais		Très blanche Taches de rousseur	Roux / Bonds	Bleus / Verts	Brûle toujours Ne bronze jamais
II	Caucasiens		Claire Parfois taches de rousseur	Roux / Blonds / Châtains	Clairs / Bruns	Brûle facilement Bronze peu
III	Majorité des caucasiens		Intermédiaire	Châtains / Bruns	Bruns	Brûle parfois Bronze progressivement
IV	Asiatiques, Hispaniques		Mate	Bruns / Noirs	Noirs	Brûle peu Bronze toujours bien
V	Indiens, Moyen-orientaux		Brune	Noirs	Noirs	Brûle rarement Bronze intensément
VI	Africains		Brun foncé à noir	Noirs	Noirs	Ne brûle jamais Bronze intensément

Tableau 2. Définition des phototypes cutanés

## I.4 Cancérogénèse, pathogénèse et biologie du mélanome malin



### I.4.1 Cancérogénèse

La formation d'une tumeur maligne résulte d'un processus multi-étapes qui nécessite plusieurs années [27,28]. Selon le modèle classique, la cancérogénèse est initiée par l'accumulation de mutations touchant les gènes suppresseurs de tumeurs (mutations perte de fonction) et les proto-oncogènes (mutations activatrices). Ces mutations sont ensuite amplifiées par un

mécanisme d'expansion clonale [29] (Figure 3). Le terme de « mutation » est néanmoins à nuancer. En réalité, la cancérogenèse résulte de l'accumulation d'altérations géniques qui peuvent être de façon non exclusive : des mutations ou délétions ponctuelles, des amplifications géniques, des altérations épigénétiques ou des réarrangements chromosomiques. Ces altérations géniques et les expansions clonales qui en découlent surviennent de façon concomitante durant toute la durée du processus de cancérogenèse, aboutissant à la formation d'une tumeur polyclonale (figure 3). Néanmoins, la cancérogenèse peut être scindée schématiquement en trois phases : initiation, promotion et progression (Figure 4). La phase d'initiation, dépendante de facteurs extérieurs génotoxiques ou carcinogènes, se conclue par une immortalisation cellulaire. Cette immortalisation résulte de l'activation de deux leviers : la prolifération cellulaire (activation d'oncogènes) et la survie cellulaire par inhibition de l'apoptose (inactivation de gènes suppresseurs de tumeurs). Puis, sous l'effet de facteurs dits promoteurs tumoraux (cytokines, facteurs de croissance, hormones), la cellule immortalisée va proliférer de façon clonale. C'est la phase de promotion.

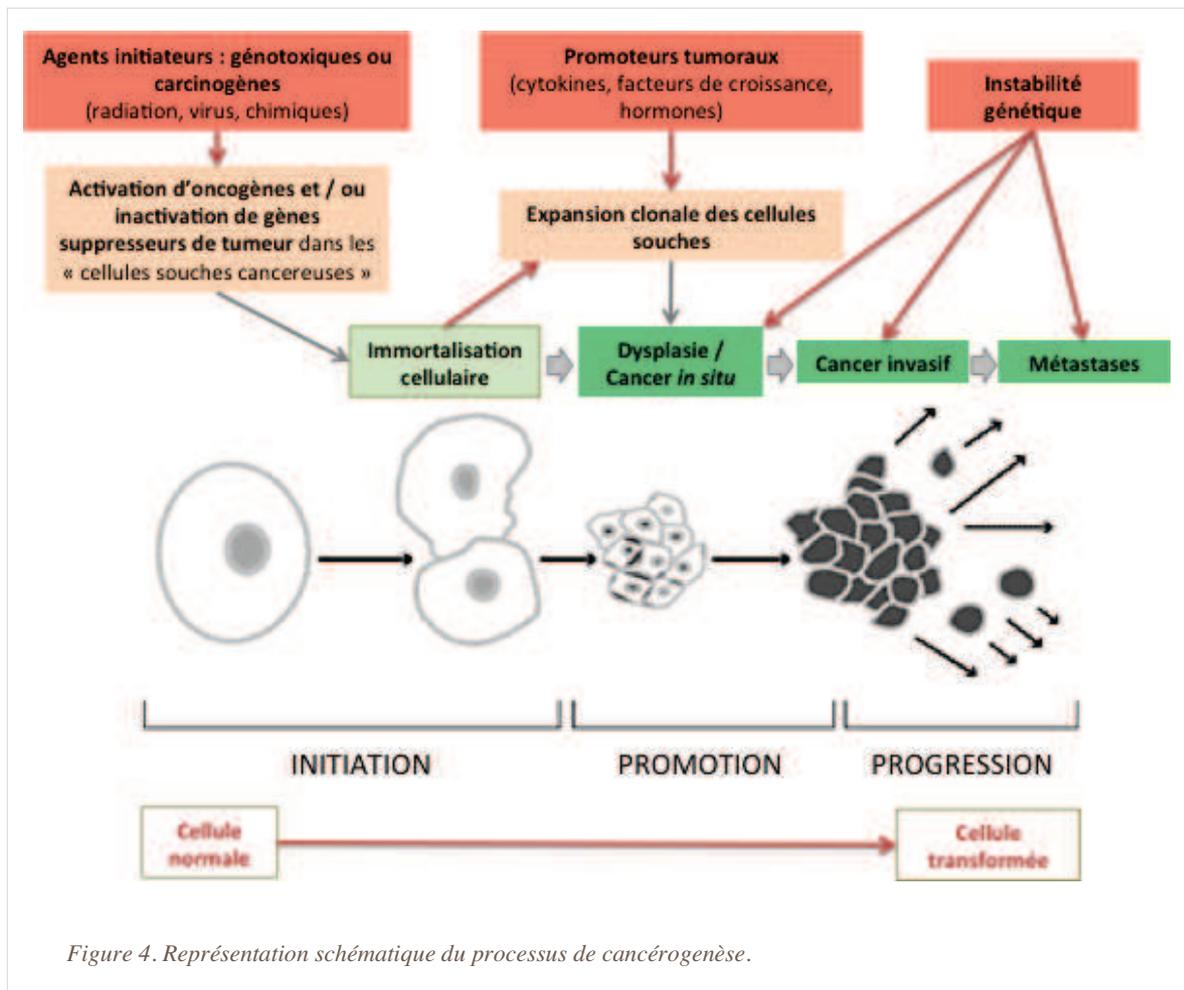


Figure 4. Représentation schématique du processus de cancérogenèse.

Enfin, durant la phase de progression, les cellules tumorales devenues génétiquement instables vont accumuler des altérations leur conférant les capacités biologiques

indispensables à la croissance autonome et à la dissémination du cancer. Ces altérations sont responsables des modifications morphologiques, biochimiques et biologiques caractéristiques des cellules cancéreuses ou « transformées ».

On définit habituellement 6 capacités biologiques propres aux cellules cancéreuses [30]:

1. Maintien de la prolifération cellulaire en l'absence de facteur de croissance
2. Echappement aux mécanismes de d'arrêt de croissance (dont l'inhibition de contact)
3. Résistance à l'apoptose
4. Immortalité réplivative
5. Induction de l'angiogénèse
6. Invasion et migration

A ces 6 capacités viennent se surajouter 4 caractéristiques qui favorisent l'évolution du cancer :

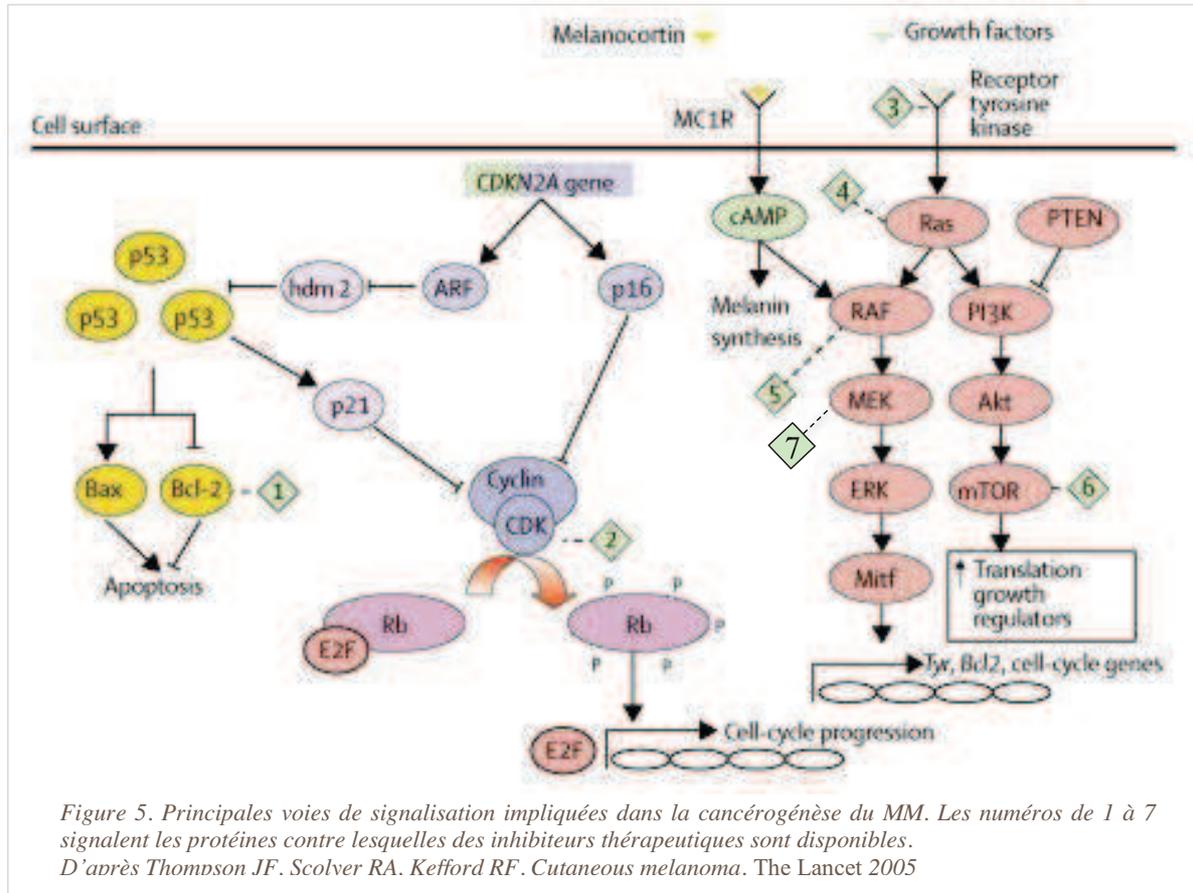
1. Instabilité génétique et chromosomique
2. Inflammation
3. Reprogrammation du métabolisme énergétique
4. Echappement au contrôle immunitaire

#### **1.4.2 Cancérogenèse et pathogénèse du mélanome malin**

L'agent « initiateur » de la cancérogenèse du MM est le rayonnement UV. En plus d'un effet mutagène direct sur l'ADN, les UV favorisent la production de facteurs de croissance par les cellules cutanées, réduisent les défenses immunitaires au niveau local, et engendrent un stress oxydant lui-même responsable de dommages à l'ADN [23]. L'accumulation d'altérations géniques en réponse à ces facteurs va d'une part promouvoir la prolifération des mélanocytes, d'autre part altérer leur capacité d'apoptose en réponse aux dommages à l'ADN. Le mélanocyte ainsi modifié sera plus sensible aux futures expositions aux UV, ce qui va permettre l'accumulation et la sélection d'altérations à l'origine de la transformation en cellule maligne [31].

Il est intéressant de noter que les altérations développées au cours de la cancérogenèse du MM surviennent sur le fond génétique particulier aux mélanocytes [32–34]. Ainsi, la mélanine synthétisée par les mélanocytes en réponse aux UV a pour but de protéger la peau contre les dommages occasionnés par ces rayons (notamment dommages à l'ADN). Les mélanocytes ont donc naturellement développé des mécanismes de résistance à l'apoptose en réponse aux dommages à l'ADN afin de pouvoir assurer leur fonction protectrice en présence d'UV. De plus, l'exposition aux UV induit la sécrétion de facteurs de croissance par les kératinocytes et fibroblastes cutanés, engendrant la prolifération des mélanocytes via l'activation des voies de signalisation cellulaire RAS/RAF/MEK et PI3K/AKT. Au final, la prolifération des mélanocytes permet d'augmenter les capacités de production de mélanine. Cette réponse des mélanocytes sains aux UV (échappement à

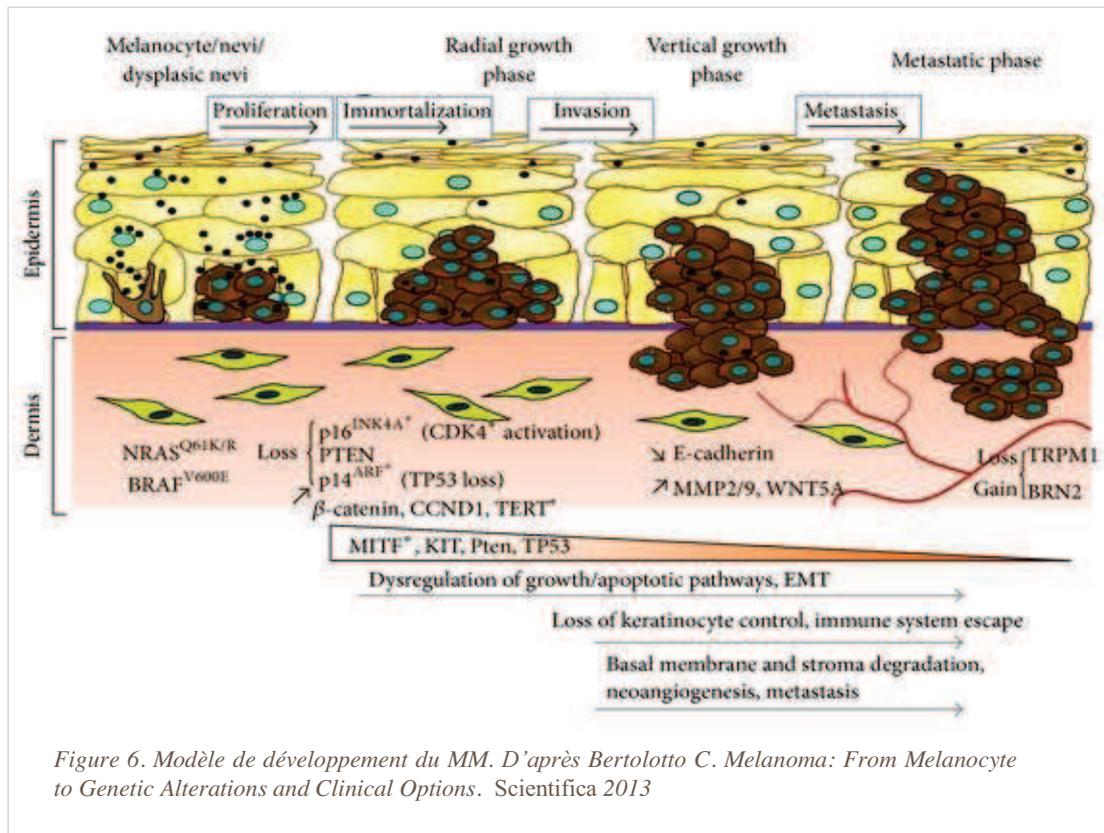
l'apoptose et prolifération) est donc simplement exacerbée lors du processus de transformation (Figure 5). Les altérations activatrices des voies RAS/RAF/MEK et PI3K/AKT permettent ainsi la prolifération des mélanocytes transformés indépendamment de la sécrétion de facteurs de croissance par kératinocytes et fibroblastes environnants, et favorisent la migration cellulaire. Les altérations activatrices majeures de ces voies de signalisation, dont le MM devient « dépendant » pour sa survie et sa prolifération, sont à l'origine de la récente classification moléculaire des MM et du développement de thérapies ciblées [35].



Par ailleurs, les mécanismes d'échappement à l'apoptose tiennent une place primordiale dans la pathogénèse du MM et sont à l'origine de son importante chimiorésistance [17]. L'une des explications de la résistance du MM à l'apoptose serait l'expression à un niveau élevé de protéines anti-apoptotiques tel que BCL-2 (B-cell lymphoma derived protein 2) et BCL-XL.

Lors de la cancérogénèse, la transformation cellulaire s'effectue parallèlement à la croissance tumorale. Dans le cas du MM, cette croissance s'opère schématiquement en trois phases successives (Figure 6) : phase d'extension radiale (limitée à l'épiderme), phase d'extension verticale (envahissement du derme), et phase métastatique (dissémination du MM) [34]. Cependant, dans environ 20% des cas, le MM se développe par dégénérescence d'un *naevus* (hyperplasie bénigne des mélanocytes) préexistant

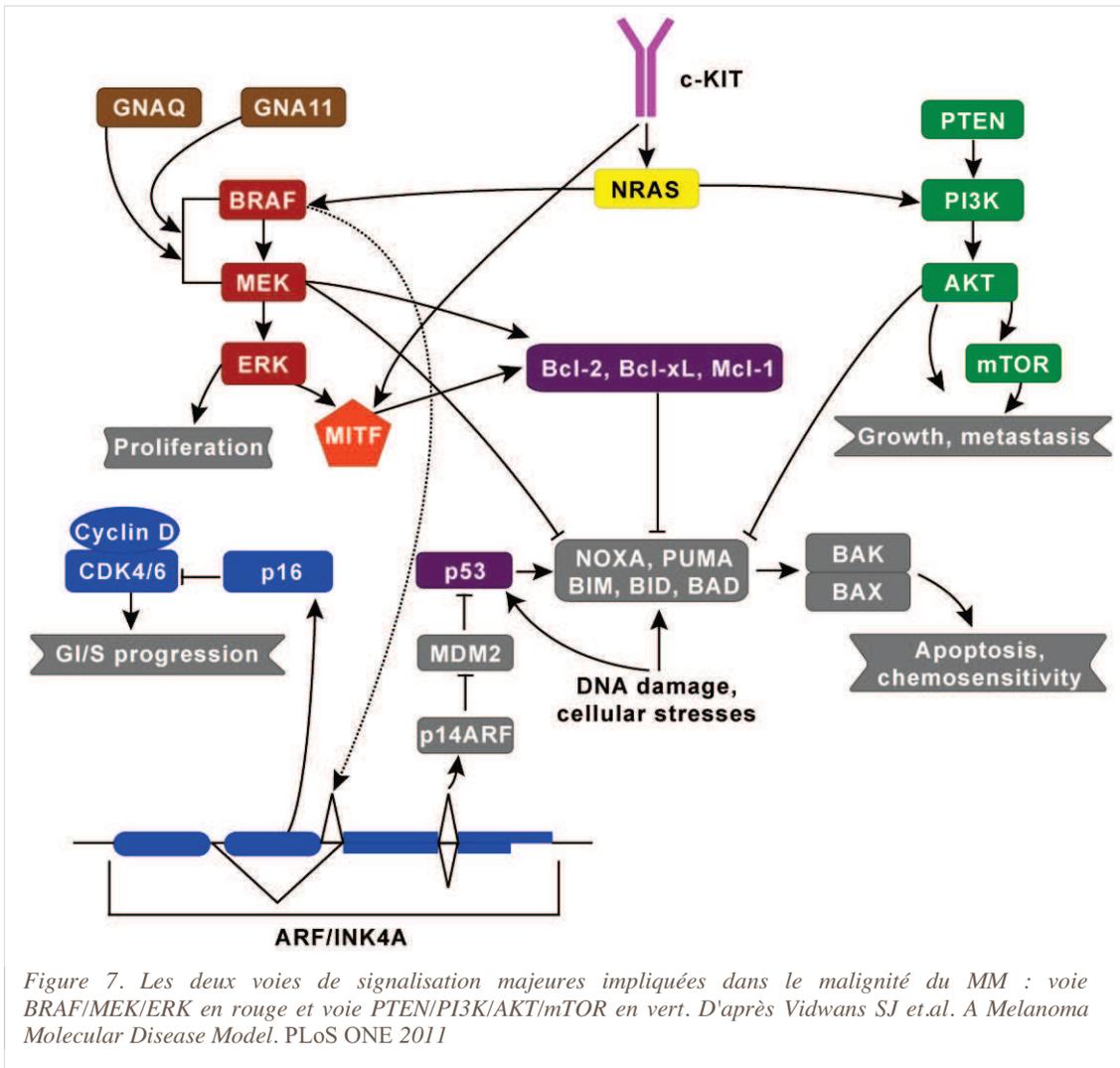
[36,37]. Les phases d'extension radiale et verticale sont alors confondues, rendant ce type de MM extrêmement agressif.



### 1.4.3 Biologie du mélanome malin

Récemment, l'utilisation massive des nouvelles biotechnologies et la généralisation des plates-formes « haut débit » (transcriptomique et protéomique notamment), associées au développement d'outils génomiques performants et simples à mettre en œuvre (ARN interférent par exemple) a augmenté le rythme des découvertes dans le domaine de l'oncologie moléculaire [38]. De nombreux travaux, basés sur le profilage génétique des MM, ont permis d'identifier les voies de signalisation majeures impliquées dans la malignité [35,39–47]:

- Voie de signalisation BRAF / MEK / ERK
- Voie de signalisation PTEN / PI3K / AKT / mTOR
- Voies de transduction des récepteurs tyrosine kinase (TKR) : VEGFR, HER, TGFBR
- Voies de régulation du cycle cellulaire : Rb / p53 / p16INKA / p14ARF / HDM2
- Voies apoptotiques : récepteurs : FAS, TRAILR, TNFR ; effecteurs : caspases
- Voie mitochondriale : famille protéique associée à Bcl-2
- Voie de dégradation cellulaire et protéines chaperonnes : protéasome et HSP
- Régulation épigénétique de l'expression génique : méthylation de l'ADN, acétylation des histones et microARN



Le recensement des altérations de ces voies de signalisation a d'une part donné naissance à la classification moléculaire des MM (cf. chapitre I.5.3), d'autre part permis le développement de nouvelles « thérapies ciblées » (cf chapitre I.8.2). Les altérations majoritairement retrouvées dans le MM sont les mutations activatrices des oncogènes BRAF, KIT et NRAS [41]. Ces altérations ont pour conséquence une activation constitutive des voies de signalisation BRAF / MEK / ERK ou PTEN / PI3K / AKT / mTOR, dont le MM devient « dépendant » pour son développement. On parle alors de voie de signalisation ou mutation « addictive ».

Deux sites internet présentent de façon exhaustive les voies de signalisation dérégulées dans le MM, ainsi que les molécules en développement ciblant ces voies :

- Melanoma Molecular Map Project (MMMP) : <http://www.mmmp.org>
- Melanoma Molecular Disease Model (MMDM) : <http://www.mmdm.cancercommons.org>

## I.5 Diagnostic et classifications

### I.5.1 Diagnostic et classification cliniques

#### I.5.1.1 Diagnostic clinique

L'examen clinique diagnostique du mélanome fait appel à trois méthodes : deux méthodes analytiques visuelles qui sont la règle ABCDE (la plus utilisée ; figure 7) et la liste révisée des 7 points du groupe de Glasgow (donnant une place prépondérante au concept d'évolution), et une méthode cognitive visuelle [48].

Une lésion est susceptible d'être un mélanome si elle présente :

■ Règle ABCDE = 5 critères

- Asymétrie (critère A)
- Bords irréguliers (critère B)
- Couleur inhomogène (critère C)
- Diamètre > 6 mm (critère D)
- Evolution (de taille, couleur ou épaisseur) (critère E)

■ Liste révisée des 7 points du groupe de Glasgow = 3 critères majeurs + 4 critères mineurs

- Changement de taille (lésion connue ou nouvelle) (critère majeur)
- Changement de forme (lésion connue) (critère majeur)
- Changement de couleur (lésion connue) (critère majeur)
- Plus grand diamètre  $\geq 7$  mm (critère mineur)
- Inflammation (critère mineur)
- Ulcération ou saignement (critère mineur)
- Changement dans la sensibilité de la lésion (critère mineur)

■ Méthode cognitive visuelle = pas de critère précis

Méthode fondée sur un processus de reconnaissance globale => une lésion mélanocytaire sera considérée comme suspecte si elle est cliniquement différente des autres *naevi* du patient qui, par opposition, présentent un aspect clinique homogène (recherche du « vilain petit canard »).

La sensibilité et la spécificité des méthodes diagnostiques visuelles sont très dépendants de l'expérience du clinicien et de sa connaissance de la sémiologie des MM. Elle peuvent dépasser 90% pour la règle ABCDE et la liste révisée en 7 points du groupe de Glasgow, les deux méthodes les plus efficaces [48,49]. L'identification par examen clinique des MM de petite taille et des formes nodulaires, qui ne rentrent pas dans le champ de la règle ABCDE, reste néanmoins difficile. Dans ce cas, la dermoscopie ou dermatoscopie peut fournir une aide au diagnostic. Cette technique, validée par la HAS en 2007 [50], repose sur la visualisation *in vivo* non invasive des structures cutanées épidermiques, dermo-épidermiques et dermiques non accessibles à l'œil nu grâce à un dermoscope (lentille grossissante associée à une source lumineuse). La sémiologie des images dermoscopiques est basée sur l'analyse de la distribution et de l'architecture de la mélanine dans l'épiderme et le derme, ainsi que sur l'analyse de la disposition et de l'aspect des vaisseaux capillaires cutanés (Figure 8).

**BÉNIN**  
(PAS INQUIÉTANT)

- **A comme Asymétrie**  
Grain de beauté de forme ni ronde ni ovale, dont les couleurs et les reliefs ne sont pas régulièrement répartis autour du centre.
- **B comme Bords irréguliers**  
Bords déchiquetés, mal délimités.
- **C comme Couleur non homogène**  
Présence désordonnée de plusieurs couleurs (noir, bleu, marron, rouge ou blanc).
- **D comme Diamètre**  
Diamètre en augmentation.
- **E comme Évolution**  
Changement rapide de taille, de forme, de couleur ou d'épaisseur.

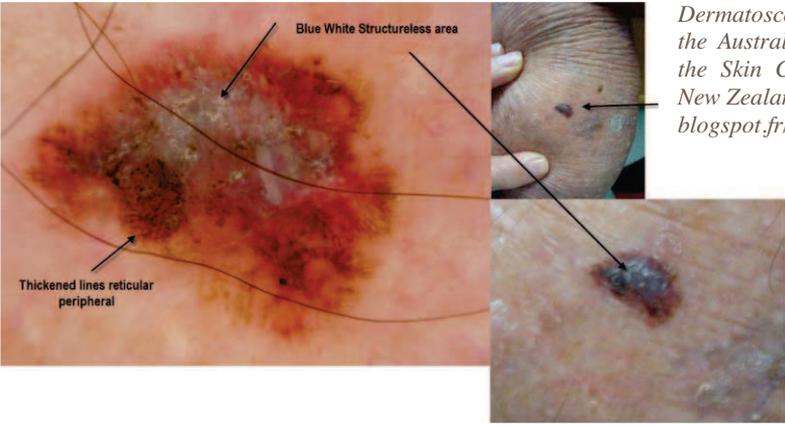
**MALIN**  
(INQUIÉTANT)



*Figure 8.*  
En haut à gauche : Illustration des critères de la méthode ABCDE. Source : service dermatologique de l'institut Gustave Roussy (Paris).

En haut à droite: Mélanome cutané (type superficiel extensif), aisément identifiable par la méthode ABCDE ou la méthode cognitive visuelle. Source : www.CDC.gov

En bas à gauche : Comparaison des images dermoscopiques et « à l'œil nu » d'une lésion mélanomateuse. Source : Dermatoscopy made simple, teaching blog of the Australian Institute of Dermatology and the Skin Cancer College of Australia and New Zealand. <http://dermoscopymadesimple.blogspot.fr/2010/09/melanoma-in-situ.html>



### **I.5.1.2 Classification clinique**

Les MM sont classiquement divisés en 4 types selon la classification proposée par Clark en 1969 [51], les deux premiers types représentant 80% des mélanomes cutanés diagnostiqués [52]:

- Mélanome superficiel extensif : *Aspect d'une tache polychrome dont les contours et la surface sont irréguliers et qui correspond à la phase de développement horizontal du mélanome malin.*
- Mélanome nodulaire : *Caractérisé cliniquement par une tumeur mélanique saillante et histologiquement par une prolifération circonscrite qui envahit d'emblée le derme.*
- Mélanome acrolentigineux : *MM palmaire/plantaire, onguulaire et sublingual.*
- Mélanome de Dubreuilh : *MM des zones photo-exposées, visage principalement, chez le sujet âgé.*

## **Diagnostic et classification histologiques**

### **I.5.1.3 Diagnostic histologique**

L'examen anatomo-pathologique permet avant tout de confirmer ou d'infirmer le diagnostic clinique. Parallèlement, il fournit les indications indispensables à la classification du MM selon les critères anatomo-cliniques, à la détermination du pronostic, et à la prise en charge (marges de l'exérèse chirurgicale). Ces informations sont classées en critères obligatoires (i.e. obligatoirement présents dans tout compte rendu anatomo-pathologique), et facultatifs [53,54]:

- Critères obligatoires :
  - Diagnostic et typage clinico-pathologique
  - Epaisseur de la tumeur en mm (indice de Breslow)
  - Ulcération (présence ou absence)
  - Nombre de mitoses par mm<sup>2</sup> (indice mitotique)
  - Marges d'exérèse
  - Niveau d'invasion (niveau de Clark), particulièrement utile en cas de MM d'épaisseur  $\leq 1$  mm
  - Microsatellites (présence ou absence)

■ Critères facultatifs :

- Phase de croissance
- Régression (présence ou absence)
- Infiltration par les lymphocytes (degré)
- Vascularité
- Neurotropisme
- Micrométastase lymphatique (présence ou absence, examen du ganglion sentinelle)

### **I.5.1.4 Classification clinico-histologique et stadification**

L'évaluation du stade d'évolution du MM se fait principalement grâce aux informations fournies par l'examen anatomo-pathologique de la pièce d'exérèse. La stadification, qui définit l'extension du MM au moment du diagnostic, a deux objectifs principaux :

- Thérapeutique (oriente la prise en charge)
- Pronostic

#### ***I.5.1.4.1 Classifications***

Trois classifications sont utiles à la détermination finale du stade du MM :

- Classification de Breslow
- Classification de Clark
- Classification TNM (*Tumor Node Metastasis ou, en français, Tumeur Ganglion Métastase*)

■ Classification de Breslow ⇔ *épaisseur de la tumeur primaire*

La classification de Breslow (1928 – 1980) est basée sur l'épaisseur de la tumeur, en millimètres, exprimée en indice [55]. L'indice de Breslow sert à la fois pour la stadification et le pronostic du MM.

L'indice de Breslow est défini comme l'épaisseur maximum comprise entre les cellules superficielles de la couche granuleuse épidermique et la base de la tumeur (cellule maligne la plus profonde).

■ Classification de Clark ⇔ *degré d'invasion de la tumeur primaire*

La classification de Clark (1924 – 1997), est basée sur le concept de franchissement de barrières anatomiques [51]. Cette classification permet de définir 5 niveaux d'invasion dits de Clark (Figure 9) :

*Clark I : strictement intra-épidermique*

*Clark II : envahissement du derme papillaire*

*Clark III : envahissement de la jonction réticulo-papillaire du derme*

*Clark IV : envahissement du derme réticulaire*

*Clark V : envahissement de l'hypoderme*

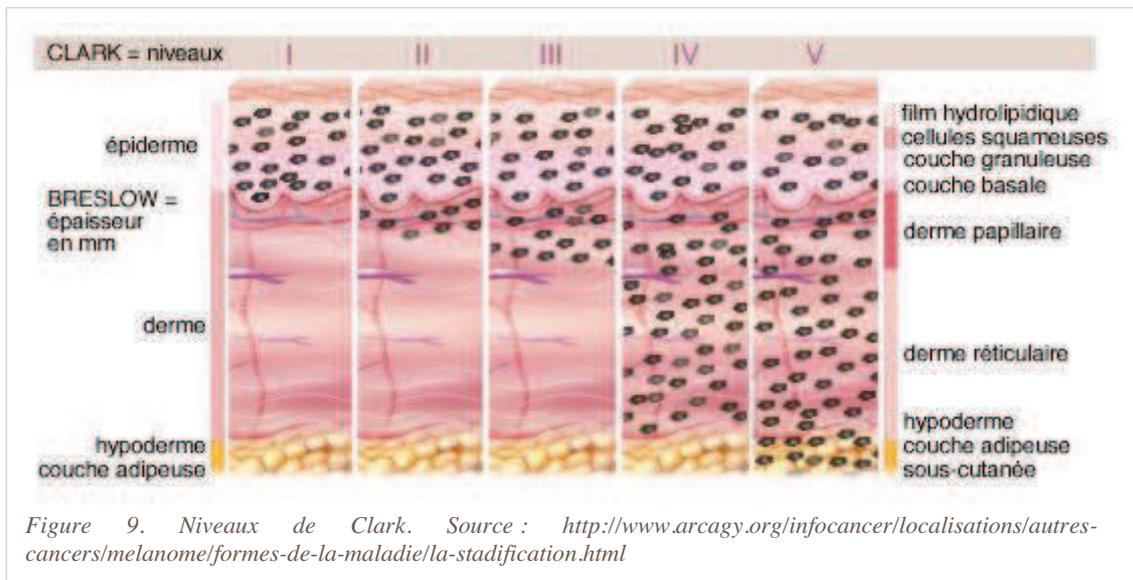


Figure 9. Niveaux de Clark. Source : <http://www.arcagy.org/infocancer/localisations/autres-cancers/melanome/formes-de-la-maladie/la-stadification.html>

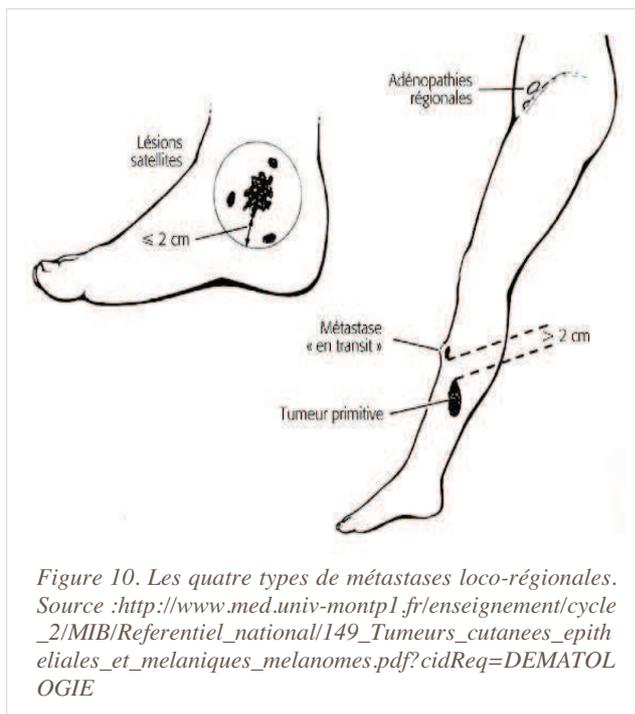
### ■ Classification TNM

⇔ *extension du MM*

La classification TNM (tableau 3), proposée conjointement par l’American Joint Committee on Cancer (AJCC) [56], et l’Union for International Cancer Control (UICC) [57], est utilisée de façon consensuelle à travers le monde. Cette classification est divisée en trois sous-classifications qui permettent de décrire le degré d’extension du MM au niveau du site primaire (T pour tumeur), des ganglions régionaux (N pour Node ou ganglion), et des organes distants (M pour métastase).

La classification T est principalement basée sur l’indice de Breslow, et sur la présence ou non d’ulcération. L’un des principaux changements de la classification TNM lors de sa révision en 2009 est la stratification des MM d’épaisseur  $\leq 1$  mm (T1) selon le nombre de mitoses /  $\text{mm}^2$ , et non plus selon le niveau d’invasion de Clark.

La classification N est basée sur l’invasion ganglionnaire et sur la présence de métastases loco-régionales. Quatre types de métastases loco-régionales sont définis (Figure 10):



- Micrométastase du ganglion régional : métastase ganglionnaire décelée à l'examen anatomopathologique du ganglion sentinelle tandis que le ganglion n'est pas palpable.
- Métastase satellites : métastase localisée à moins de 2 cm du site de la tumeur primaire.
- Métastase en transit : métastase localisée à plus de 2 cm du site de la tumeur primaire.
- Métastase du ganglion régional : ganglion cliniquement palpable (et/ou d'allure tumorale à l'échographie ganglionnaire) et métastatique.

<b>Classification T</b>	<b>Épaisseur (Indice de Breslow)</b>	<b>Ulcération / Mitoses</b>
T1	≤ 1 mm	a : sans ulcération et mitoses < 1 / mm <sup>2</sup> b : avec ulcération ou mitoses ≥ 1 / mm <sup>2</sup>
T2	1,01 - 2 mm	a : sans ulcération b : avec ulcération
T3	2,01 - 4,00	a : sans ulcération b : avec ulcération
T4	> 4 mm	a : sans ulcération b : avec ulcération

<b>Classification N</b>	<b>Nombre de ganglions envahis</b>	<b>Invasion métastatique</b>
N1	1	a : micrométastase b : macrométastase
N2	2 - 3	a : micrométastase b : macrométastase c : métastases en transit / nodules satellites <u>sans</u> envahissement ganglionnaire
N3	≥ 4 ou masse polyganglionnaire ou métastases en transit / nodules satellites <u>avec</u> ganglions envahis	

<b>Classification M</b>	<b>Site des métastases</b>	<b>Taux sérique de LDH</b>
M1a	Cutané, sous-cutané ou ganglionnaire au-delà de l'aire ganglionnaire régionale	Normal
M1b	Pulmonaire	Normal
M1c	Autres localisations viscérales Toutes métastases à distance	Normal Augmenté

Tableau 3. Classification TNM du MM, AJCC, version actualisée en 2009

La classification M repose sur la localisation des métastases distantes (situées après le premier relais ganglionnaire), et sur le taux de Lactate Déshydrogénase (LDH).

#### **1.5.1.4.2 Stadification**

La classification du stade, ou stadification, correspond à un standard international proposé conjointement par l'AJCC et l'UICC permettant de définir l'extension du MM (Tableau 4) [56,57]. Le système repose sur la classification TNM précédemment décrite. Les stades sont exprimés par un chiffre, allant de 0, pour le stade le moins avancé, à IV pour le plus avancé (métastatique).

<b>Stade I</b>	<b>Mélanome localisé (N0, M0) à faible risque évolutif</b>	
I A	T1a	
I B	T1b ou T2a	
<b>Stade II</b>	<b>Mélanome localisé (N0, M0) avec risque de rechute</b>	
II A	T2b ou T3a	
II B	T3b ou T4a	
II C	T4b	
<b>Stade III</b>	<b>Mélanome avec atteinte ganglionnaire régionale (N, M0)</b>	
III A	N1a ou N2a	(mélanome non ulcéré T1 – T4a)
III B	N1a ou N2a	(mélanome ulcéré T1 – T4b)
	N1b ou N2b	(mélanome non ulcéré T1 – T4a)
	N2c	(mélanome ulcéré ou non T1 – T4a / b)
III C	N1b ou N2b	(mélanome ulcéré T1 – T4b)
	N3	(mélanome ulcéré ou non)
<b>Stade IV</b>	<b>Mélanome avec métastase au-delà du premier relai ganglionnaire régional (M+)</b>	

Tableau 4. Stadification du MM, AJCC, version actualisée en 2009

## I.5.2 Diagnostic et classification moléculaires

### I.5.2.1 Diagnostic moléculaire

Dans une perspective de médecine translationnelle [58], la recherche de biomarqueurs diagnostiques, pronostiques, et prédictifs de réponse aux traitements, ainsi que l'identification de cibles moléculaires est devenue une priorité. L'objectif final est la mise en œuvre clinique d'un traitement personnalisé du MM.

L'analyse moléculaire des MM métastatiques (métastases, ou, à défaut, tumeur primaire) est aujourd'hui systématique et permet l'orientation de la prise en charge des patients relevant d'une thérapeutique systémique [3,59]. Les tests utilisés en routine visent principalement à identifier la présence de mutations activatrices des gènes BRAF (mutation BRAFV600), cKIT et RAF, afin de proposer aux patients, le cas échéant, des thérapies ciblées.

### Classification moléculaire

Une classification moléculaire du MM a été proposée en 2011 [42] :

Type	Voie altérée	Sous-type	Gène clé	Altération	Fréquence	Méthode diagnostique	Thérapies possibles
<b>I</b>	MAPK	I.1	BRAF	Mutation activatrice	BRAF : 40-70% des MM	Séquençage ciblé	Inhibiteurs de BRAF, MEK ou HSP90
		I.2	BRAF / PTEN	Mutation activatrice / Perte ou sous-expression	BRAF : 40-70% des MM	Séquençage ciblé & Immunohisto-chimie	Inhibiteurs de BRAF & inhibiteurs de PI3K, AKT ou mTOR
		I.3	BRAF / AKT	Mutation activatrice / Mutation activatrice	BRAF : 40-70% des MM	Séquençage ciblé & nombre de copies	Inhibiteurs de BRAF & inhibiteurs de AKT ou mTOR
		I.4	BRAF / CDK4	Mutation activatrice / Amplification	15% des Types I	Séquençage ciblé & nombre de copies / CGH	Inhibiteurs de BRAF & inhibiteurs de CDK
<b>II</b>	c-KIT	II.1	c-KIT	Mutation activatrice ou amplification	39% des MM mucosal, 36% des MM acral, 28% des MM cutanés sur zones exposées au soleil, 0% des MM sur zones non exposées	Séquençage ciblé / nombre de copies	Inhibiteurs de c-KIT (gleevec)

Type	Voie altérée	Sous-type	Gène clé	Altération	Fréquence	Méthode diagnostique	Thérapies possibles
III	GNAQ GNA11	III.1	GNAQ	Mutation activatrice	>85 des <i>naevi</i> bleus, >50% des <i>naevi</i> bleus malin, ~50% des MM uvéal	Séquençage ciblé	Inhibiteurs de MEK
		III.2	GNA11	Mutation activatrice			
IV	NRAS	IV.1	NRAS	Mutation activatrice	15-30% des MM	Séquençage ciblé	Inhibiteurs de BRAF, MEK, PI3K, AKT ou mTOR; inhibiteurs de Farnesyl transférase
V	MITF / PI3K / AKT	V.1	MITF	Amplification	10-16% des MM	Nombre de copies	Inhibiteurs de HDAC
		VI.1	PTEN	Perte ou sous-expression	5-40% des MM	Immuno-hystochimie	Inhibiteurs de PI3K, AKT ou mTOR
		VI.2	AKT	Mutation activatrice ou amplification	70% des MM métastatiques primaires (sous-type I,3 inclus)	Nombre de copies	Inhibiteurs de PI3K, AKT ou mTOR
		VI.3	PI3K	Activation ou surexpression		Immuno-hystochimie	Inhibiteurs de PI3K, AKT ou mTOR
VII	CDK	VII.1	ARF / INK4A	Inactivation ou perte	inactivé dans 10% des MM, délété dans 50% des MM	Séquençage ciblé / CGH	Inhibiteurs de CDK
		VII.2	CDK4	Amplification	4% des MM	Nombre de copies / CGH	Inhibiteurs de CDK
		VII.3	CCND1 / Cycline D1	Amplification	6-44 % des MM	Nombre de copies / CGH	Inhibiteurs de CDK
VIII	p53 / BCL2	VIII.1	BCL2	Surexpression		Immuno-hystochimie	ND
		VIII.2	p53	Mutation inhibitrice	10% des MM	Séquençage ciblé	ND

Tableau 5. Classification moléculaire du MM. D'après Vidwans SJ et.al. A Melanoma Molecular Disease Model. PLoS ONE 2011

Les altérations majeures retrouvées dans le MM sont les mutations activatrices des oncogènes BRAF, KIT et NRAS [41] :

- MM cutanés sur zones non habituellement exposées au soleil : 70% BRAF
- MM sur zones exposées, MM acral et muqueux : 30% kit et 15% BRAF
- Ensemble des MM : 15 % NRAS

## I.6 Pronostic

Le taux de survie à 10 ans d'un mélanome non métastasé est de 75 à 85%, et dépend des facteurs pronostics suivants (mauvais pronostic si présence ou valeur élevée), déterminés par l'examen anatomo-pathologique au moment de l'exérèse du MM [60]:

- Valeur de l'indice de Breslow (épaisseur)
- Présence d'ulcération
- Indice mitotique (nombre de mitoses/mm<sup>2</sup>)

La présence de métastases au moment du diagnostic est de mauvais pronostic. Le taux de survie dépend alors du type de métastases [60]:

- |                                               |   |                                                     |
|-----------------------------------------------|---|-----------------------------------------------------|
| ■ <u>Micrométastases du ganglion régional</u> | ↔ | taux de survie à 10 ans : 30 – 70 %                 |
| ■ <u>Métastases satellites</u>                | ↔ | 30 – 50 %                                           |
| ■ <u>Métastases en transit</u>                | ↔ | 30 – 50 %                                           |
| ■ <u>Métastases du ganglion régional</u>      | ↔ | 20 – 40 %                                           |
| ■ <u>Métastases distantes</u>                 | ↔ | médiane de survie 6-9 mois en absence de traitement |

## I.7 Prévention

Le MM en phase métastatique ne peut être traité par simple exérèse chirurgicale et est l'une des tumeurs les plus chimiorésistantes. La prévention, aussi bien primaire que secondaire, est donc primordiale pour en limiter l'incidence.

### I.7.1 Prévention primaire

L'OMS définit la prévention primaire (ou protection spécifique) comme les « mesures applicables à une maladie ou groupe de maladies pour en bloquer les causes avant qu'elles n'agissent sur l'homme ; en d'autres termes, pour empêcher la survenue de la maladie ».

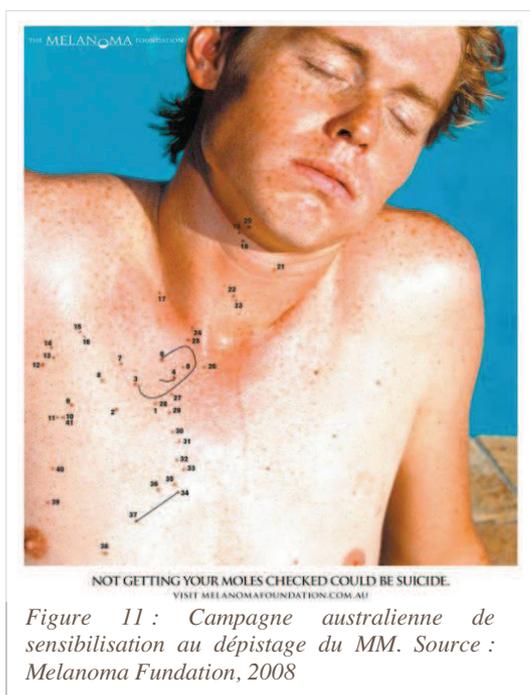
La prévention primaire repose donc sur l'éviction des causes et facteurs de risque. Il existe actuellement un large consensus pour affirmer que le MM est causé par l'exposition aux rayonnements UV solaires [61]. L'exposition récréative et intermittente au soleil est quant à elle le principal facteur de risque connu de mélanome. La prévention primaire du MM est donc principalement basée sur les conseils de protection solaire. Des campagnes de sensibilisation visant à informer des dangers des UV et des moyens de photoprotection sont ainsi menées dans le but de modifier les habitudes des populations. Trois conseils majeurs sont véhiculés:

1. Eviter les heures d'ensoleillement les plus nocives (12 à 16 heures en été).
2. Donner la priorité à la photoprotection vestimentaire, surtout chez les enfants.
3. Conseiller l'application de photoprotecteurs externes (Indice de Protection (IP) > 15) pour protéger les surfaces corporelles qui ne peuvent l'être par les vêtements et non pour accroître l'exposition au soleil.

Mais les mesures de prévention primaire ne se limitent pas à la sensibilisation des populations. Selon le rapport établi conjointement par l'AFSSE, l'ANSM (anciennement AFSSAPS) et l'InVS en mai 2005 portant sur l'évaluation des risques liés à l'exposition aux ultraviolets, « Les autorités de santé peuvent contribuer de manière significative à la réduction de l'exposition aux UV en créant des espaces ombragés aux arrêts d'autobus, dans les aires de jeu et dans les aires de repos, les écoles, en encourageant à l'école et dans les centres de récréation des mesures de photoprotection, et en responsabilisant les professionnels. »

Parallèlement, l'utilisation des sources artificielles de bronzage est formellement déconseillée par les instances sanitaires internationales, et est fortement réglementée (au niveau national comme international). La réglementation française se base sur le décret n° 97-617 du 30 mai 1997, relatif à la vente et la mise à disposition du public des appareils de bronzage utilisant des rayonnements ultraviolets. En résumé, les mesures prises par ce décret sont: l'interdiction d'utilisation pour les sujets de phototype I et les mineurs, l'interdiction des machines en libre-service et la formation des professionnels, la normalisation stricte des appareils, la déclaration obligatoire des appareils et un contrôle technique régulier par des organismes agréés.

## 1.7.2 Prévention secondaire



L'OMS définit la prévention secondaire comme « les mesures destinées à interrompre un processus morbide en cours pour prévenir de futures complications et séquelles, limiter les incapacités et éviter le décès ». La prévention secondaire du MM repose donc sur le dépistage précoce. On peut distinguer : l'auto-surveillance par le patient lui-même, qui a l'avantage de pouvoir être réalisée fréquemment mais qui nécessite une formation, et le dépistage précoce par le médecin lors de visites régulières.

Dans son rapport d'octobre 2006 portant sur les stratégies de diagnostic précoce du mélanome, l'HAS recommande un effort

diagnostique particulier à destination des populations à risque (i.e. ayant un ou plusieurs des facteurs de risque identifiés par les études épidémiologiques). Pour sensibiliser le reste de la population aux risques du MM, des campagnes de dépistage sont périodiquement menées. Ces campagnes présentent cependant deux inconvénients : elles ne touchent réellement que les personnes acceptant une démarche volontaire de dépistage, et leur impact limité dans le temps (6 mois à 2 ans selon l'HAS). La figure 11 présente un exemple de campagne de sensibilisation australienne : "Ne pas vérifier vos grains de beauté peut être suicidaire". Pour être efficace, le message se veut « ludique » et fait référence à un jeu qui consiste à relier des points numérotés pour dessiner une image (ici un pistolet...).

## **I.8 Traitements**

### **I.8.1 Traitement du mélanome primitif régional**

Le mélanome non métastasé (stades I et II A selon la classification de l'AJCC) est curable par exérèse chirurgicale. En pratique, l'exérèse se fait en deux temps : le mélanome est retiré, puis, une fois les résultats de l'analyse histologique obtenus, l'exérèse est reprise avec des marges saines adaptées, stipulées dans le compte rendu anatomo-pathologique [54,62].

Un traitement adjuvant peut être envisagé chez les patients à haut risque de dissémination [3]. Néanmoins, à cause de leurs effets secondaires, ces traitements altèrent considérablement la qualité de vie des patients (perte d'appétit, asthénie intense, dyspnée, syndrome grippal, troubles de l'humeur allant jusqu'à la dépression, troubles cardiovasculaires, hépatiques et sexuels, cytopénies). De plus, les données de la littérature concernant leur réelle efficacité sont controversées. L'interféron alpha est le plus souvent utilisé, à faible dose pour les mélanomes de stade II dont l'indice de Breslow est >1.5 mm, et à forte dose pour les mélanomes de stade III. L'utilisation des nouvelles immunothérapies (ipilimumab et anti-PD1 et PD-L1) dans cette indication est actuellement à l'étude.

### **I.8.2 Traitement du mélanome métastatique non résecable**

Les récents progrès dans la compréhension de la biologie et de l'immunologie du MM, ont permis l'approbation en 2011 de deux traitements, l'ipilimumab (immunothérapie) et le vémurafénib (thérapie ciblée), lesquels ont révolutionné la prise en charge du MM [63]. Le traitement des MM métastatiques non résecables (stades IIIC, IV) est aujourd'hui conditionné par l'émergence de thérapies ciblées (inhibiteurs de BRAF, MEK et c-KIT), les premières thérapies ayant pu démontrer une efficacité sur la survie globale. Un type

moléculaire des métastases ou, à défaut, de la tumeur primaire, doit donc être réalisé avant tout choix de traitement systémique (recommandations françaises, européennes et américaines [3,59,64,65]). Cependant, le manque de recul sur les effets à long terme de ces nouvelles thérapies empêche de recommander une stratégie thérapeutique unique, imposant une discussion du traitement au cas par cas en réunion de concertation pluridisciplinaire. Dans ses recommandations de décembre 2012, l'INCa préconise de privilégier l'inclusion des patients dans un essai thérapeutique « au regard du pronostic de la maladie, et malgré l'émergence des nouveaux traitements » [64].

### **I.8.2.1 Présence de mutation du gène BRAF**

#### ***I.8.2.1.1 Première ligne***

L'émergence des thérapies ciblées, à l'exemple du vémurafenib (inhibiteur de BRAF), a modifié le pronostic des mélanomes métastatiques. Son utilisation en monothérapie chez les patients porteur de la mutation BRAFV600, a montré une amélioration sur la survie globale (20 % à 6 mois) et sur la survie médiane sans progression (3 - 4 mois), comparativement à la chimiothérapie de référence (dacarbazine en monothérapie) [66]. De ce fait, le vémurafenib a bénéficié d'un processus accéléré d'autorisation par les autorités de santé américaines, européennes et françaises, et est actuellement utilisé en monothérapie, en première ligne de traitement du MM métastatique présentant une mutation activatrice du gène BRAF (BRAFV600) [67]. L'utilisation du vémurafénib est néanmoins limitée par l'apparition rapide de résistances (le plus souvent dans les 6 mois après l'initiation du traitement), et par les effets secondaires cutanés (photosensibilisation, développement de carcinomes épidermoïdes et rarement de mélanomes).

Un autre inhibiteur de BRAF, le dabrafénib, et un inhibiteur de MEK, le tramétinib, sont actuellement à l'essais et ont montré une efficacité comparable à celle du vémurafenib [68,69]. L'intérêt des inhibiteurs de MEK réside dans leur association avec un inhibiteur de BRAF. Cette approche est en cours d'évaluation : l'objectif étant d'augmenter le taux et la durée de réponse avec des profils de tolérance acceptables [70].

#### ***I.8.2.1.2 Deuxième ligne***

Selon les recommandations de l'INCa, lorsque l'échappement au vémurafénib est agressif, la dacarbazine reste le traitement de référence. La survie médiane étant estimée à moins de 3 mois dans cette situation, il n'est pas recommandé d'administrer de l'ipilimumab au regard de son délai d'action long (> 3 mois). Le consensus européen préconise quant à lui l'utilisation des chimiothérapies classiques en association afin d'augmenter le taux de réponse (jusqu'à 45%, tableau Y) [3].

Le changement de thérapie ciblée, voire la reprise de la même thérapie ciblée après quelques mois, est actuellement discuté et envisageable, notamment en cas de réponse dissociée entre les différents sites métastatiques. En pratique, des réponses ont été observées chez certains patients lors de la ré-administration du vémurafénib, même après un premier échappement.

### **I.8.2.2 Présence de mutation du gène KIT**

L'imatinib, un inhibiteur de tyrosine kinase, est en cours d'évaluation dans le traitement des MM présentant une mutation du gène c-KIT. Un essai de phase II a montré un taux de réponse encourageant de 23% dans cette indication [71]. L'utilisation des chimiothérapies classiques en association peut aussi être envisagée, notamment en cas d'échappement.

### **I.8.2.3 Cas particulier de l'immunothérapie**

Le blocage des molécules CTLA-4 et PD-1, exprimées à la surface des lymphocytes cytotoxiques, entraîne la levée de la régulation négative de la réponse immunitaire, permettant ainsi la cytolysse des cellules tumorales. L'immunothérapie par ipilimumab (anticorps monoclonal dirigé contre la protéine CTLA - 4) est approuvée en Europe et aux Etats-Unis dans le traitement du MM métastatique et peut être envisagée en 1<sup>ère</sup> ligne de traitement quelle que soit la classification moléculaire du MM. En effet, une réponse prolongée (24% > 2 ans, jusqu'à 5 ans) est observée chez les patients répondeurs (10%) [72,72,73]. Cette efficacité doit être nuancée par le délai d'action relativement long (> 3 mois) de l'ipilimumab. Son association avec les thérapies ciblées, qui ne présente pas de délai d'action, paraît donc logique et est de plus en plus envisagée. Par ailleurs, les anticorps anti-PD1 et anti-PD1-1 sont à l'étude et ont montré une efficacité et un taux de réponse important lors des essais de phase II: survie sans progression de 41% et 42%, taux de réponse de 28% et 17% respectivement, à 24 semaines [74,75].

L'immunostimulation est cependant non spécifique et conduit à des effets secondaires importants, compliquant la prise en charge : rash cutanés, colites, thyroïdites, hépatites, hypophysites et autres maladies auto-immunes.

En cas d'échappement, le consensus européen préconise une fois de plus l'utilisation des chimiothérapies classiques en association [3].

### **I.8.2.4 Absence de mutation des gènes BRAF ou KIT**

Les chimiothérapies ont pour but la régression de la masse tumorale et des symptômes associés au MM. Pour les patients ne présentant pas de mutation du gène BRAF, la

chimiothérapie de référence en 1<sup>ère</sup> ligne, en France, reste la dacarbazine ou la fotémustine en cas de métastase cérébrale. Néanmoins, les chimiothérapies classiques, dacarbazine compris, utilisées en monothérapie présentent un taux de réponse très faible (entre 5 et 26 %, tableau 5). L'association de ces chimiothérapies permet d'augmenter le taux de réponse jusqu'à 45% (tableau 6) et est préconisée par le consensus européen [3].

Chimiothérapie	Posologie	Taux de réponse (%)
Dacarbazine	250 mg/m <sup>2</sup> /j, 5 jours toutes les 3 – 4 semaines 800 - 1200 mg/m <sup>2</sup> /j, 1 jours toutes les 3 – 4 semaines	12.1 – 17.6 5.3 – 23
Temozolomide	150 - 200 mg/m <sup>2</sup> /j, 5 jours toutes les 4 semaines	13.5 – 21
Fotemustine	100 mg/m <sup>2</sup> /j, jours 1, 8 et 15, puis 5 semaines de pause, puis une simple dose toutes les 3 semaines	13.5 – 21
Paclitaxel	80 to 100 mg/m <sup>2</sup> , jours 1, 8, et 15 toutes les 4 semaines	16 – 26
Vindesine	3 mg/m <sup>2</sup> /j, toutes les 2 semaines	12 – 26

Tableau 5 : Exemples de taux de réponse de chimiothérapies utilisées en monothérapie dans le traitement du MM.  
Source : *Diagnosis and treatment of melanoma. European consensus-based interdisciplinary guideline – Update 2012* et Bhatia S, Tykodi SS, Thompson JA. *Treatment of Metastatic Melanoma: An Overview*. Oncol Williston Park N 2009

Association	Posologie	Taux de réponse (%)
DVC	Dacarbazine : 250 mg/m <sup>2</sup> /j, jours 1 – 5 Vindesine : 3 mg/m <sup>2</sup> /j, jour 1 Cisplatine : 100 mg/m <sup>2</sup> /j, jour 1, toutes les 3 – 4 semaines	31.4 – 45
DBC	Dacarbazine : 220 mg/m <sup>2</sup> /j, jours 1 – 3 Carmustine : 150 mg/m <sup>2</sup> /j, jour 1 Cisplatine : 25 mg/m <sup>2</sup> /j, jour 1 – 3	18.5–31.9
CarboTax	Carboplatine : AUC6 jour 1, réduit à AUC4 après 4 cycles Paclitaxel : 225 mg/m <sup>2</sup> /j, jour 1 toutes les 3 semaines, réduit à 175 mg/m <sup>2</sup> /j après 4 cycles	12,1

Tableau 6 : Exemples de taux de réponse de chimiothérapies utilisées en association dans le traitement du MM.  
Source : *Diagnosis and treatment of melanoma. European consensus-based interdisciplinary guideline – Update 2012*

Les chimiothérapies traditionnelles utilisées dans le traitement du MM appartiennent à 2 classes (Tableau 7) [3,59,76]:

#### ■ Alkylants

- Triazènes : *Dacarbazine (DTIC), Témzolomide*
- Nitrosourées : *Fotémustine, Carmustine (BCNU), Lomustine (CCNU)*
- Sels de platines : *Cisplatinium, Carboplatine*

#### ■ Poisons de fuseau

- Vinca-alcaloïdes : *Vindésine (VDS), Vincristine (VCR)*
- Taxanes : *Paclitaxel*

<b>Chimiothérapies</b>	<b>Principaux effets secondaires</b>
<i>Administration</i>	
Dacarbazine Deticène® (alkylant, triazène) <i>IVL à l'abri de la lumière</i>	Digestifs : vomissements, diarrhées Myélotoxicité : leucopénie, anémie, thrombopénie.
Fotémustine Muphoran® (alkylant, nitrosourée) <i>IVL 1 heure</i>	Myélotoxicité : leucopénie, anémie thrombopénie. Hépatiques : élévation des transaminases, phosphatases alcalines ou supérieur Digestifs : vomissements, diarrhées
Cisplatinium Cisplatine® (Alkylant, sel de platine) <i>IVL 4 heures</i>	Rénaux+++ : insuf. rénale/nécrose tubulaire (importance de l'hyperhydratation) Digestifs : nausées, vomissements+++ Neurologiques : neuropathie, hypoacousie Myélotoxicité : leucopénie, anémie thrombopénie.
Carboplatine Paraplatine® (Alkylant, sel de platine) <i>IVL</i>	Neurologiques : neuropathie, hypoacousie Digestifs : vomissements, diarrhées Myélotoxicité : leucopénie, anémie, thrombopénie.
Vindésine Eldisine® (poison du fuseau, vinca-alcaloïde) <i>IV</i>	Neurologiques : neuropathie périphérique ++, iléus paralytique. Digestifs : vomissements, diarrhées Myélotoxicité : leucopénie, anémie, thrombopénie. Bronchospasme
Vincristine Oncovin® (poison du fuseau, vinca-alcaloïde) <i>IV</i>	Neurologiques : liés à la dose totale et au rythme d'administration.
Temozolomide Temodal® (Alkylant, triazène) <i>Per os à jeûn</i>	Digestifs : vomissements, diarrhées Myélotoxicité : leucopénie, anémie, thrombopénie.

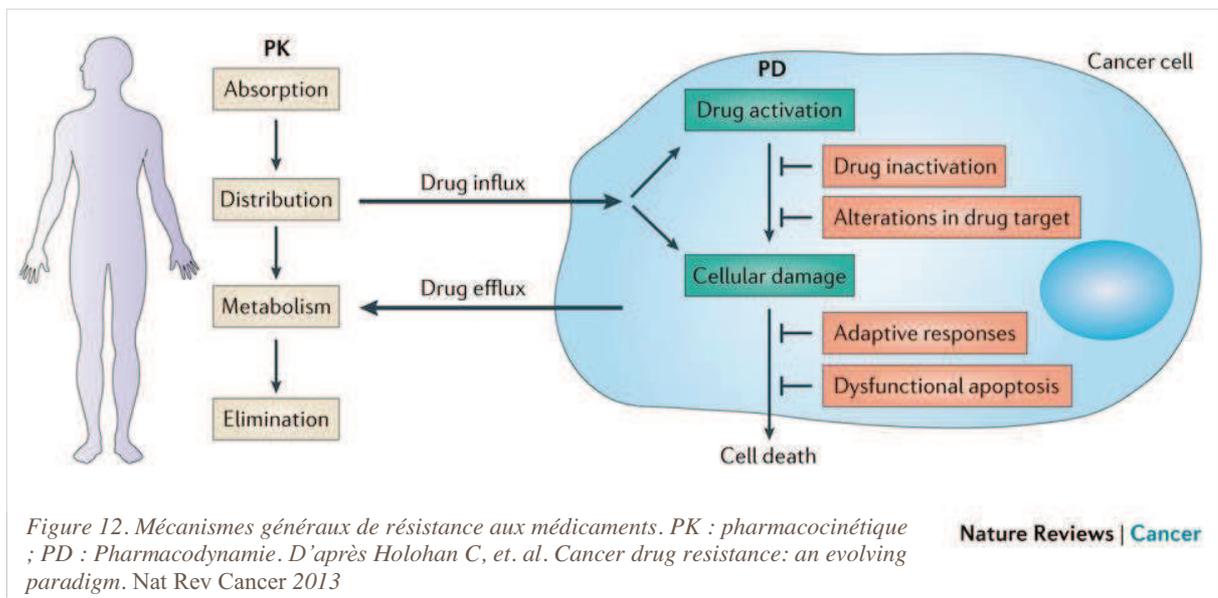
*Tableau 7 : Schémas d'administration et principaux effets secondaire des principales chimiothérapies utilisées dans le traitement du MM métastatique. Source : <http://www.reseau-melanome-ouest.com/melanome/les-differents-traitements.html>*

# II Résistance du mélanome aux chimiothérapies

## II.1 Généralités sur les mécanismes de résistance

Les mécanismes de résistance des cancers aux chimiothérapies « classiques » et aux thérapies « ciblées » partagent des caractéristiques communes [6] (Figure 12):

- Altération du médicament (métabolisme), ou de son transport cellulaire (efflux, séquestration, ...)
- Altération de la cible du médicament (qualitative ou quantitative)
- Altération des systèmes de réparation des dommages à l'ADN
- Echappement à l'apoptose
- Activation de voies pro-survie
- Activation des voies de réponse adaptative au médicament



La résistance aux agents anticancéreux peut être divisée en deux grandes catégories:

- **Résistance primaire ou intrinsèque** : préexistante avant toute exposition au traitement, rendant ce traitement inefficace.
- **Résistance secondaire ou acquise** : se développe au cours du traitement, dans des cellules cancéreuses initialement sensibles. Cette résistance est le reflet de l'adaptation des cellules au traitement par différents mécanismes: mutations, augmentation de l'expression de la cible, activation de variante compensatoire des voies de signalisation, etc.

Par ailleurs, la grande hétérogénéité cellulaire et moléculaire des tumeurs peut engendrer une résistance aux médicaments par le biais de mécanismes de sélection d'une sous-

population mineure de cellules résistantes, initialement présente dans la tumeur d'origine [77]. Les modifications épigénétiques et l'influence du microenvironnement de la tumeur ont également été identifiées comme des facteurs importants de chimiorésistance [78,79]. Plus récemment, une nouvelle explication de la chimiorésistance cancéreuse a été proposée. Elle serait due à la présence de « cellules souches cancéreuses », intrinsèquement très résistantes à de nombreuses chimiothérapies [80].

Ces mécanismes généraux de résistance des cancers aux chimiothérapies sont pour la plupart applicables au MM [5]. Cependant, le MM se caractérise par son extrême chimiorésistance, aussi bien primaire qu'acquise. La résistance primaire du MM est principalement due à son caractère réfractaire à l'apoptose [17]. La résistance acquise peut être reliée à la grande plasticité moléculaire du MM [13], et à l'hétérogénéité tumorale [81].

Les chapitres suivants décrivent les mécanismes cellulaires et moléculaires principalement responsables de la résistance (primaire et acquise) du MM aux chimiothérapies.

## **II.2 Transport et métabolisme cellulaire**

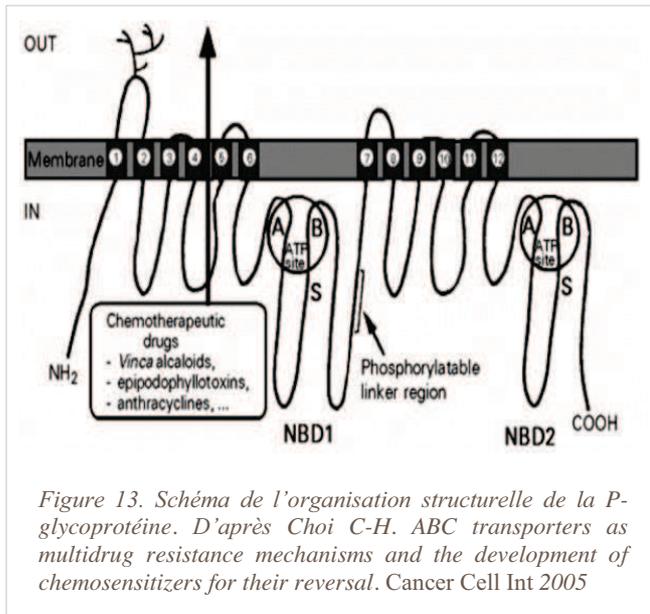
### **II.2.1 Efflux cellulaire**

Plusieurs protéines membranaires de transport cellulaire ont été associées à la chimiorésistance en favorisant l'efflux extracellulaire des agents anticancéreux. Parmi ces protéines, la famille des transporteurs ABC (ATP-binding cassette, ABC), un groupe de protéines transmembranaires régulant le flux à travers la membrane plasmique de nombreuses molécules structurellement indépendantes, joue un rôle dominant. Cette famille protéique comporte 49 membres, mais seulement deux ont été largement étudiés et mis en relation avec la multi-résistance médicamenteuse (MultiDrug Resistance, MDR) [82]:

- La multi-drug resistance protein 1 (MDR1), mieux connue sous le nom de glycoprotéine-P (P-gp) ou ABCB1
- La MDR-associated protein 1 (MRP1 ou ABCC1)

Ces deux protéines ont des spectres de substrats largement chevauchants, et permettent l'efflux extracellulaire de composés hydrophobes comme la plupart des chimiothérapies conventionnelles (vinca-alcaloïdes, inhibiteurs de topoisomérases, antimétabolites, etc), mais aussi des thérapies ciblées (inhibiteurs de tyrosine kinases [83]).

#### ■ Chimiorésistance via la P-gp



La P-gp a été le premier transporteur ABC identifié. Il s'agit d'une glycoprotéine transmembranaire de 170 kDa qui est exprimée dans presque tous les tissus à des niveaux faibles, mais se trouve à des niveaux beaucoup plus élevés à la surface des cellules des épithéliums ayant un rôle d'excrétion (côlon, intestin grêle, pancréas, canalicules biliaires, tubules rénaux proximaux) [84]. Parmi les nombreux substrats de la P-gp, on retrouve des chimiothérapies telles que les anthracyclines, les épipodophylotoxines et les vinca-

alcaloïdes [85]. La surexpression de la P-gp dans de nombreux cancers, MM inclus, confère une résistance intrinsèque à ces chimiothérapies par augmentation de l'efflux extracellulaire [86]. La P-gp peut aussi être induite par le traitement, et donc à l'origine d'une chimiorésistance acquise. L'augmentation d'efflux liée à une surexpression n'est pas le seul mécanisme de résistance associé à la P-gp. De récentes études ont montré que la localisation de la P-gp, au niveau soit de la membrane cytoplasmique soit de la membrane lysosomiale, joue un rôle important dans son activité [87]. Par ailleurs, le pH des lysosomes influencerait l'activité de la P-gp lorsqu'elle est exprimée au niveau lysosomal [88]. Ces dernières données suggèrent que la résistance aux agents anticancéreux présentant des caractéristiques de base faible (accumulation dans les lysosomes), tel que les vinca-alcaloïdes, peut dépendre d'une expression préférentielle de la P-gp au niveau lysosomal, ou d'une altération du pH lysosomal [89].

#### ■ Chimiorésistance via la MRP1

La deuxième protéine de transport jouant un rôle important dans la multi-résistance est la MRP1, le chef de file de la famille des MRP [90]. Les MRP sont des glycoprotéines transmembranaires de 190 kDa. A l'instar de la P-gp, les MRP agissent en tant que pompes à efflux dépendantes de l'énergie. La famille des MRP se compose de six membres. Les deux protéines majeures, MRP1 et MRP2, qui partagent un spectre similaire de substrats malgré des localisations cellulaires et des cinétiques d'activité différentes [91], sont fréquemment exprimées dans les MM [92]. Néanmoins, peu d'études se sont focalisées sur le rôle de la MRP1 dans la chimiorésistance du MM [5]. La surexpression de MRP1 dans des cellules de MM a été associée à la résistance à la daunorubicine et la doxorubicine [93]. Parallèlement, les précédents travaux du laboratoire ont montré une implication de la MRP1 dans la résistance à l'étoposide [94], et à la vincristine [95].

## II.2.2 Inactivation de l'agent anti-cancéreux

Un autre mécanisme de résistance des cancers aux chimiothérapies résulte de la détoxification intracellulaire d'agents anticancéreux par l'intermédiaire du métabolisme du glutathion (GSH). La conjugaison du glutathion à des substrats électrophiles ( $\text{RX} + \text{glutathion} \rightleftharpoons \text{HX} + \text{R-S-glutathion}$ ) est catalysée par les glutathion S-transférases (GSTs), une famille multigénique d'isoenzymes [96]. Les GSTs peuvent être cytosoliques, mitochondriales ou microsomales. Les GSTs cytosoliques, les mieux caractérisées, sont divisées en 4 classes en fonction de leur structure : Alpha (A), Mu (M), Pi (P), et Theta (T). Ces isoenzymes sont exprimées individuellement ou en groupe, à des taux différents, dans de nombreux tissus normaux dont l'estomac, l'intestin, le cerveau, le cœur, le foie, le pancréas, le sein, le rein et la peau. Les GSTs sont impliquées dans la détoxification des électrophiles endogènes et exogènes qui peuvent réagir avec des composants cellulaires tels que l'ADN. En plus de leur rôle de catalyseur de la conjugaison de substrats électrophiles au GSH, ces enzymes interviennent également dans un grand nombre de fonctions cellulaires. Elles ont une activité peroxydase et isomérase, peuvent inhiber la kinase Jun (et protégeant ainsi les cellules contre la mort cellulaire induite par  $\text{H}_2\text{O}_2$ ), et elles sont capables de se lier de façon non-catalytique à une large gamme de ligands endogènes et exogènes [96].

L'activité des GSTs, ainsi que la quantité de GSH, sont fréquemment augmentées dans les cellules cancéreuses. Cette augmentation de l'activité des GSTs est notamment impliquée dans la résistance aux alkylants [97] et plus particulièrement aux sels de platine [98]. Par ailleurs, le système GST / GSH est impliqué dans l'adaptation au stress oxydant résultant de la mélanogenèse. Cependant et de façon surprenante, peu d'études ont analysé le rôle de ce système dans la résistance cellulaire du MM aux chimiothérapies [99]. Les précédents travaux du laboratoire ont montré une implication de la GSTP1 dans la résistance à l'étoposide [94], et de la GSTM1 dans la résistance au chlorambucil et à la vincristine [95].

## II.2.3 Séquestration lysosomiale

Les agents anti-cancéreux lipophiles et présentant des caractéristiques de bases faibles (vinca-alcaloïdes notamment, mais aussi sunitinib et antracyclines) peuvent traverser librement les membranes, y compris lysosomiales, et se retrouvent ainsi piégés à l'intérieur des lysosomes où le pH est acide (protonation de la molécule). Ce mécanisme de séquestration lysosomiale peut faire intervenir des transporteurs impliqués dans la multi-résistance tels que la P-gp et les MRP [100,101].

### **II.3 Altérations de la cible**

Un des mécanismes classique résistance médicamenteuse est la conséquence d'altérations de la cible, telles que des mutations (empêchant la liaison du médicament) ou des modifications du niveau d'expression (notamment surexpression rendant le médicament inefficace lorsqu'il est administré aux concentrations usuelles).

Un exemple de mécanisme de résistance à des agents anti-cancéreux traditionnels est la modification quantitative ou qualitative de la topoisomérase II (Topo-II) [102]. La Topo II est une enzyme nucléaire essentielle pour la transcription et la recombinaison de l'ADN, ainsi que la ségrégation des chromatides lors de la mitose. La Topo-II constitue la cible intracellulaire de nombreux agents anticancéreux, dont l'étoposide. Des altérations de l'activité de la Topo II (activité augmentée), ainsi que des mutations de cette même enzyme, ont été décrites dans des cas de résistance de MM à la doxorubicine et à l'étoposide [5].

Par ailleurs, les cancers sont souvent fortement tributaires de mutations spécifiques activatrices d'oncogènes (mutations addictives), souvent des kinases, contre lesquelles sont développées des thérapies ciblées (inhibiteurs de kinases). Des mutations sur les résidus du site de liaison, induisant un changement conformationnel ou empêchant les interactions avec l'inhibiteur, sont un mécanisme commun de résistance aux agents qui ciblent ces kinases oncogènes. Ce type de résistance associée à la cible a initialement été observée pour l'imatinib, un inhibiteur très efficace de la kinase BCR-ABL1, oncogène qui provoque un des types de leucémie myéloïde chronique (LMC) [103]. La première mutation identifiée chez les patients atteints de LMC qui ont rechuté après traitement avec l'imatinib se trouvait dans le domaine kinase de BCR-ABL1 (mutation faux sens du résidu T315). Cette mutation empêche la liaison de l'imatinib tout en conservant l'activité catalytique de l'oncogène BCR-ABL1 [104]. Une deuxième génération d'inhibiteurs de BCR-ABL1 a donc été développée (nilotinib, dasatinib et bosutinib) pour le traitement des patients qui présentent une résistance acquise à l'imatinib. L'imatinib est envisagé dans le traitement des MM présentant une mutation activatrice du récepteur tyrosine kinase c-KIT. Actuellement en essais, l'imatinib pourrait voir son efficacité diminuée chez les patients atteints de MM premièrement répondeurs par le même mécanisme de résistance lié à une mutation dans le site actif de l'oncogène cible, en l'occurrence c-Kit. De telles mutations ont été décrites dans des lignées de MM résistantes à l'imatinib [105].

Enfin, la surexpression de BRAF, NRAS et MEK est impliquée dans la résistance du MM aux inhibiteurs de la voie des MAPK [6,106].

## **II.4 Altérations des mécanismes de réparation de l'ADN (résistance directe)**

De nombreux agents anticancéreux induisent des dommages à l'ADN, directement (exemple : alkylants), ou indirectement (exemple : inhibiteurs de la topoisomérase), la réponse cellulaire à ces dommages étant soit la réparation, soit la mort cellulaire (effet cytotoxique recherché). Les dommages à l'ADN induits par ces agents anticancéreux peuvent donc être contrecarrés par une modulation correspondante des mécanismes de réparation de l'ADN [107]. Ainsi, une sur-activation des voies de réparation de l'ADN dans les cellules tumorales peut inhiber l'apoptose normalement induite par les chimiothérapies. Ce mécanisme a été impliqué dans la résistance de lignées cellulaires de MM à la fotémustine, au cisplatine, et à l'étoposide [108].

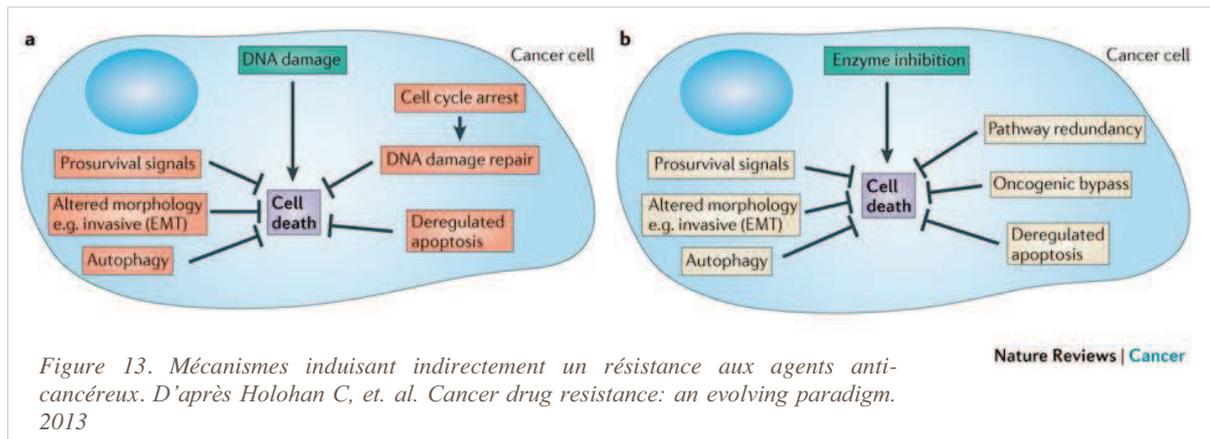
La surexpression de la O6-méthylguanine ADN-méthyltransférase (MGMT), une enzyme impliquée dans la réparation des dommages à l'ADN causés par alkylation, a été associée à la résistance de cellules mélanomateuses à la fotémustine [109,110].

Par ailleurs, une déficience dans le système de réparation des mésappariements (DNA-mismatch repair, MMR) a été observée dans de nombreux cancers humains. Cette déficience en MMR est à l'origine de résistances aux agents anti-cancéreux ciblant l'ADN par altération de la capacité des cellules à détecter les dommages à l'ADN, et donc à activer l'apoptose en réponse à ces dommages. Ce mécanisme a été impliqué dans la résistance du MM aux agents méthylants (procarbazine et témozolomide), aux agents alkylants (busulfan, cisplatine et carboplatine), aux anti-métabolites (6-thioguanine) et aux inhibiteurs de topoisomérase II (étoposide et doxorubicine) [111].

## **II.5 Altération de fonctions cellulaires entraînant indirectement une résistance**

Ces mécanismes de résistances ne touchent directement ni le médicament, ni la cible pharmacologique, mais impactent la réponse cellulaire aux dommages induits par le médicament, en d'autres termes la capacité cellulaire à déclencher l'apoptose en réponse aux dommages occasionnés par les cytotoxiques. Les mécanismes impliqués sont donc de deux sortes :

1. Altération des voies de signalisation de l'apoptose
2. Mise en jeu des fonctions cellulaires homéostatiques, i.e. régulant la survie cellulaire dans une balance pro-survie / pro-apoptose en fonction du niveau d'altérations détecté dans la cellule :
  - Mécanismes de réparation de l'ADN
  - Autophagie
  - Réponse au stress du réticulum endoplasmique

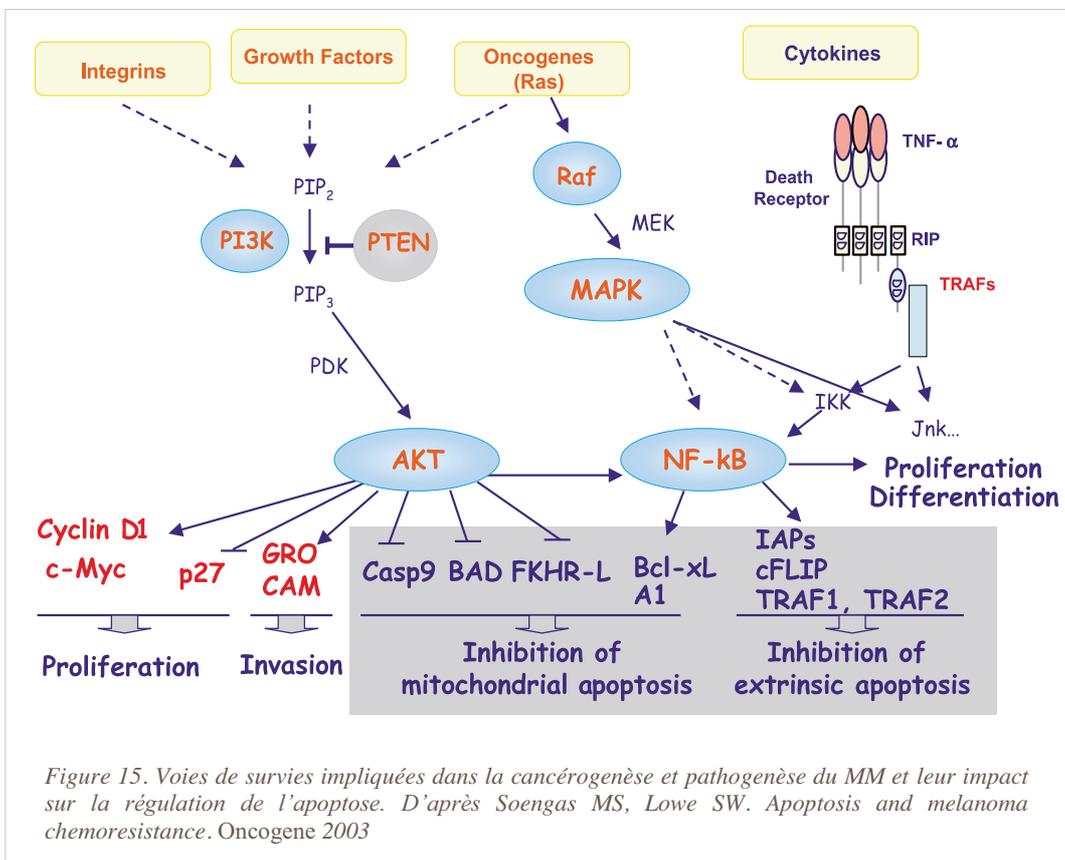
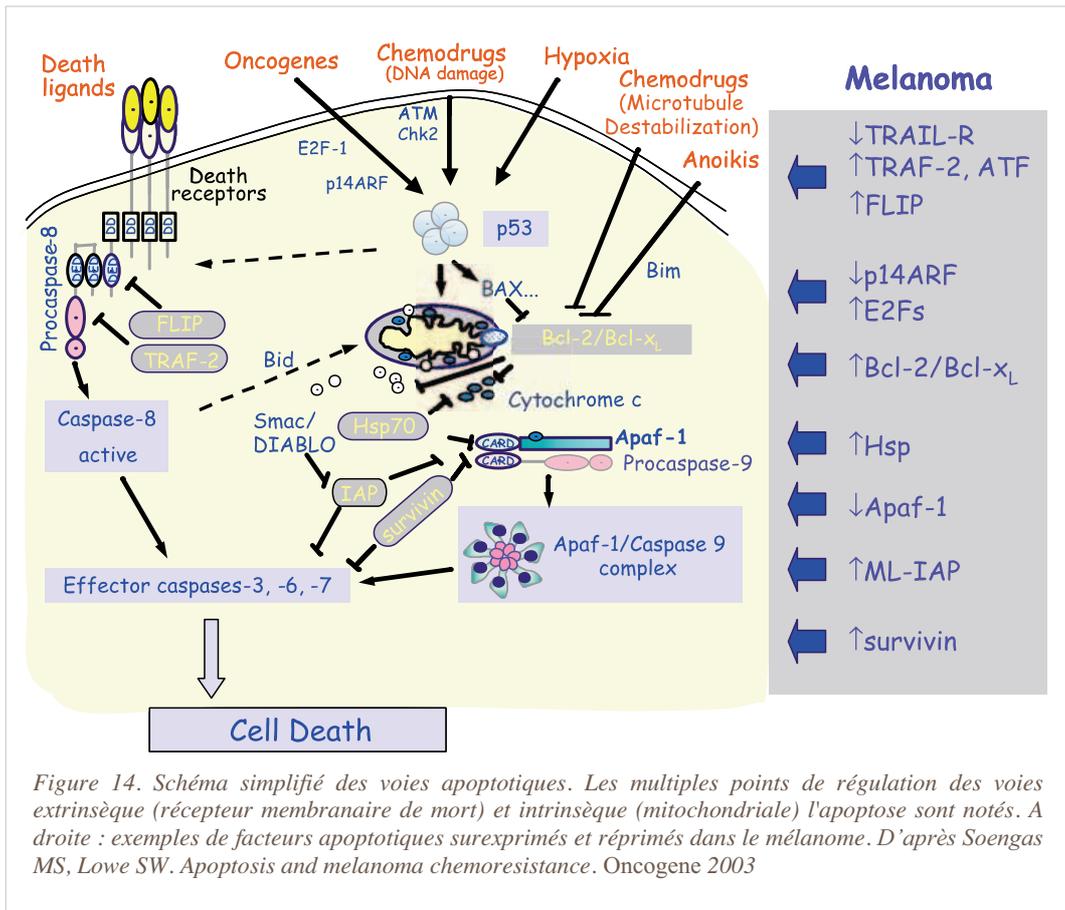


### II.5.1 Altérations de l'apoptose

L'altération de l'apoptose, ou plus exactement l'échappement constitutif à l'apoptose, est certainement l'une des caractéristiques les plus marquantes des cellules de MM. Cette échappement à l'apoptose est à l'origine de la chimiorésistance majeure du MM. La revue de Mariá S Soengas et Scott W Lowe parue en 2003 dans « *Oncogene* » détaille l'ensemble des altérations moléculaires et cellulaires à l'origine de l'apoptose inefficace dans cellules mélanomateuses, et leurs implications en terme de thérapeutique [17].

Le caractère réfractaire à l'apoptose des cellules de MM est le fruit de plusieurs mécanismes :

- Surexpression des facteurs anti-apoptotiques membres de la famille BCL2 dans les mélanocytes sains (survie en présence d'UV)
- Acquisition d'altérations sur les voies apoptotiques lors de la cancérogenèse du MM (Figure 14) :
  - Activation/surexpression de facteurs anti-apoptotiques (survivine, Mel-IAP et FLIPs)
  - Altérations inhibitrices de la voie pro-apoptotique p53 (p53, p14ARF et Apaf-1)
- Implication des mécanismes « pro-survie » impliqués dans la cancérogenèse du MM (Figure 15):
  - Voie PI3K/AKT/PTEN
  - Voie Raf/MAPK
  - Voie NF-kB



## **II.5.2 Mécanismes de réparation de l'ADN (résistance indirecte)**

Un mécanisme indirect de résistance des cancers aux chimiothérapies, lié à l'incapacité des cellules déficientes en MMR à détecter les dommages à l'ADN, est l'augmentation du taux de mutations dans le génome. Le système MMR est crucial pour le maintien de l'intégrité du génome, et des mutations dans les gènes MMR tels que MLH1 et MSH2 peut conduire au phénotype instabilité génomique [6]. Cette instabilité peut conduire à une hétérogénéité accrue des cancers et la résistance aux chimiothérapies. L'instabilité chromosomique (Chromosomal instability, CIN : altérations dans le nombre et la structure des chromosomes), la forme la plus commune de l'instabilité génomique, est impliquée dans la résistance acquise et intrinsèque aux taxanes [112,113]. NEK2, une sérine/thréonine kinase, semble jouer un rôle crucial dans ces mécanismes de résistance, et entraîne par ailleurs une régulation positive des transporteurs ABC par l'intermédiaire de AKT (autre mécanisme de résistance précédemment développé) [114]. De plus, la réduction (- 30 à 70%) de la quantité nucléaire des protéines hMLH1, hMSH2 and hMSH6, impliquées dans le système MMR, a été associée à la résistance de cellules de MM à la vindesine [110].

Dans certains cas, les dommages à l'ADN occasionnés par les agents anti-cancéreux induisent un arrêt du cycle cellulaire (et non une apoptose), ce qui peut laisser aux cellules le temps de réparer ces dommages et donc entraîner une multi-résistance de façon indirecte. C'est notamment le cas lors de l'altération de gènes suppresseurs de tumeurs tel que p53 ou CCND1 [115–117]. En plus d'une implication dans résistance aux chimiothérapies traditionnelles (cytotoxiques ciblant directement l'ADN ou autres cytotoxiques pouvant entraîner indirectement des dommages à l'ADN tels que les poisons du fuseau), des altérations de CCND1 ont été retrouvées dans des cellules de MM résistantes aux nouvelles thérapies ciblées (inhibiteurs de BRAF) [118].

## **II.5.3 Autophagie**

L'autophagie est une voie de dégradation lysosomiale des protéines et organites cellulaires permettant de maintenir la viabilité cellulaire et la biosynthèse lors de stress métaboliques tels que la privation en nutriments ou le stress du réticulum endoplasmique (accumulation de protéines mal conformées) [119] (Figure 16). Le rôle de l'autophagie dans le cancer est paradoxal puisqu'il fonctionne d'une part comme « suppresseur de tumeurs » (inhibe l'initiation de la tumorigenèse en supprimant les organites endommagés, ce qui diminue le risque d'instabilité génomique, et en induisant la sénescence cellulaire) et d'autre part comme mécanisme de résistance aux chimiothérapies (facilite la survie des cellules cancéreuses au cours des stress métaboliques provoqués par les agents anticancéreux) [120]. En effet, de nombreux traitements anticancéreux incluant à la fois chimiothérapies conventionnelles et thérapies ciblées, régulent positivement la voie autophagique [121].

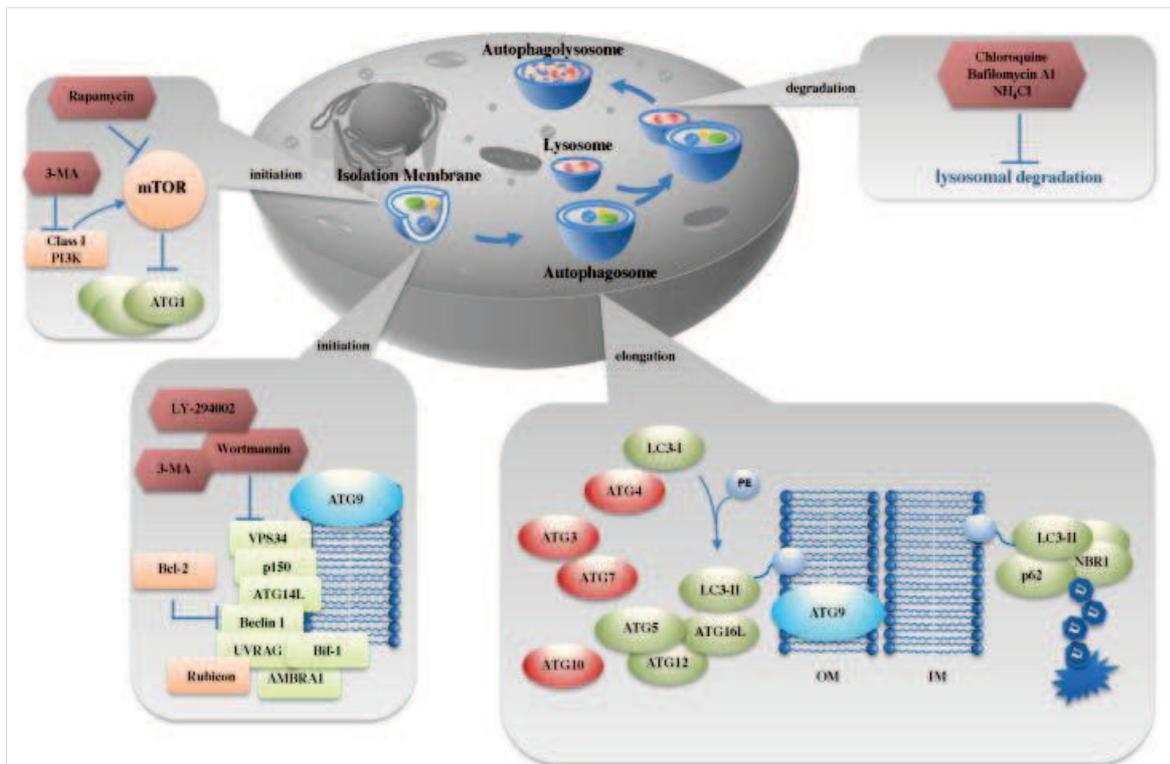
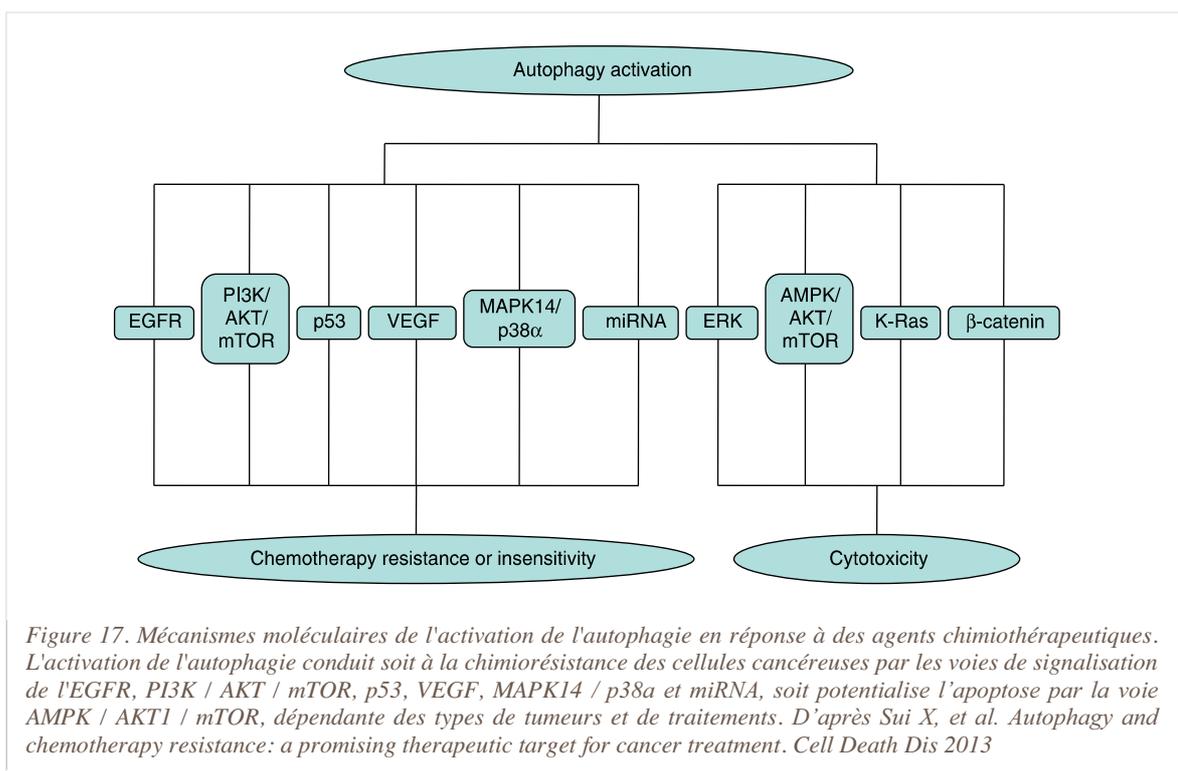


Figure 16. La voie autophagique : l'autophagie peut être divisée en trois étapes principales : initiation, élongation, et dégradation. La régulation de l'autophagie implique les cascades de signalisation de mTOR et de la PI3K (classe I et III) : mTOR inhibe l'autophagie en inhibant ATG1 / ULK1 ; et la PI3K de classe I active mTOR, donc inhibe l'autophagie. Au cours de l'étape d'initiation un complexe protéique incluant la protéine beclin 1 et la PI3K de classe III est formé. L'activation de ce complexe génère PI3P, ce qui initie la nucléation de la membrane autophagosomale. L'acteur principal dans l'élongation est LC3, qui est clivé par la protéase à ATG4 pour générer la forme LC3-I. LC3-I est alors « lipidée » par association à la phosphatidyléthanolamine (PE) par E1-like ATG7 et E2-like ATG3 donnant la forme LC3-II. Enfin, dans l'étape de dégradation, le contenu de l'autophagosome est dégradé après fusion avec un lysosome. Les composés chimiques qui ciblent les différents régulateurs de la voie autophagique sont indiqués dans le schéma (encadré rouges). D'après Liu H, He Z, Simon H-U. Targeting autophagy as a potential therapeutic approach for melanoma therapy. *Semin Cancer Biol* 2013

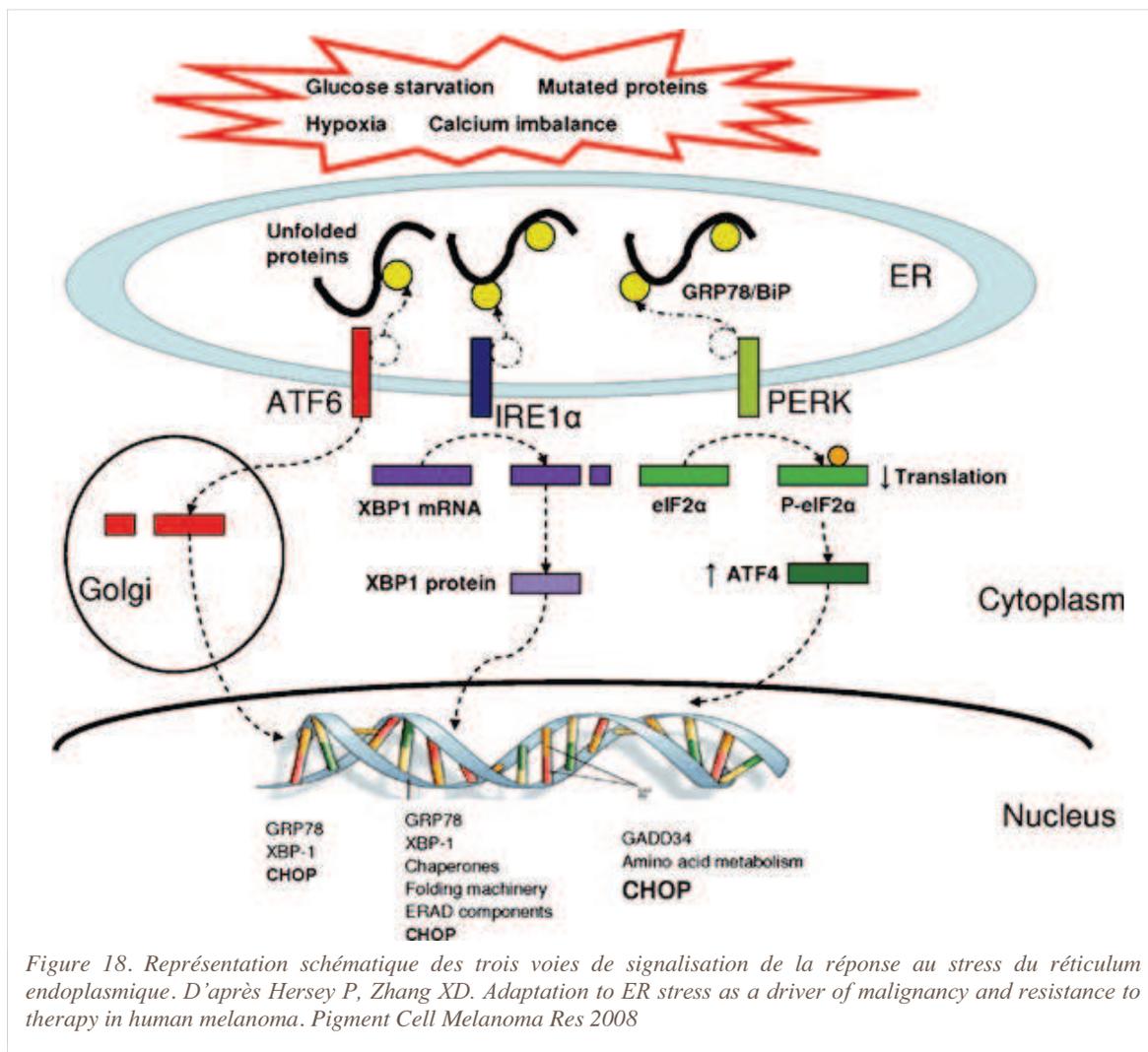
La capacité de l'autophagie à promouvoir la survie cellulaire lors d'un stress métabolique suggère que ce processus peut favoriser la résistance aux thérapies cytotoxiques, ce qui a été confirmé par plusieurs études [121,122]. Ainsi, l'autophagie est impliquée dans la résistance à des molécules aussi diverses que l'irinotecan, le cisplatine, l'oxaliplatine, le bevacizumab, le sorafenib, l'imatinib, le gefitinib, l'erlotinib, le topotécan, et le témozolomide [122] (Figure 17).

L'augmentation exponentielle des études relatant l'implication de l'autophagie dans la tumorigenèse ou la résistance des cancers aux chimiothérapies montre à quel point la régulation de ce processus biologique joue un rôle fondamental en cancérologie, à l'instar des altérations des voies apoptotiques ou des voies de réparation de l'ADN. En outre, l'autophagie est activée à un niveau élevé dans les cellules de MM, notamment celles présentant la mutation activatrice BRAFV600E [123,124]. L'autophagie a ainsi été impliquée dans la résistance du MM aux chimiothérapies classiques et aux thérapies ciblées (inhibiteurs de BRAF) [125].



## II.5.4 Réponse au stress du réticulum endoplasmique

L'autophagie à l'origine de la résistance aux inhibiteurs de BRAF peut notamment être induite en réponse à un stress du réticulum endoplasmique (RE) [126]. La voie de réponse au stress du RE (unfolded protein response, UPR) est une voie homéostatique activée en réponse à l'accumulation de protéines mal repliées afin de récupérer la fonction du RE. En cas de stress trop important, UPR déclenche l'apoptose cellulaire, relatant le rôle duel de UPR : mécanisme pro-survie ou pro-apoptotique [127]. UPR est fréquemment activé dans les cellules cancéreuses et impliqué dans de nombreux mécanismes de résistance aux chimiothérapies, en association avec l'autophagie et ou la dérégulation de voies apoptotiques [128]. Cette constatation est particulièrement vrai dans le cas du MM [129]. L'activation de l'une des trois branches de cette voie de signalisation (XBP1, cf. figure 18) a notamment été impliquée dans la résistance de cellules de MM aux anti-microtubules (vincristine et docetaxel) [130].



## II.6 Adaptation cellulaire

### II.6.1 Activation de voies de signalisation pro-survie

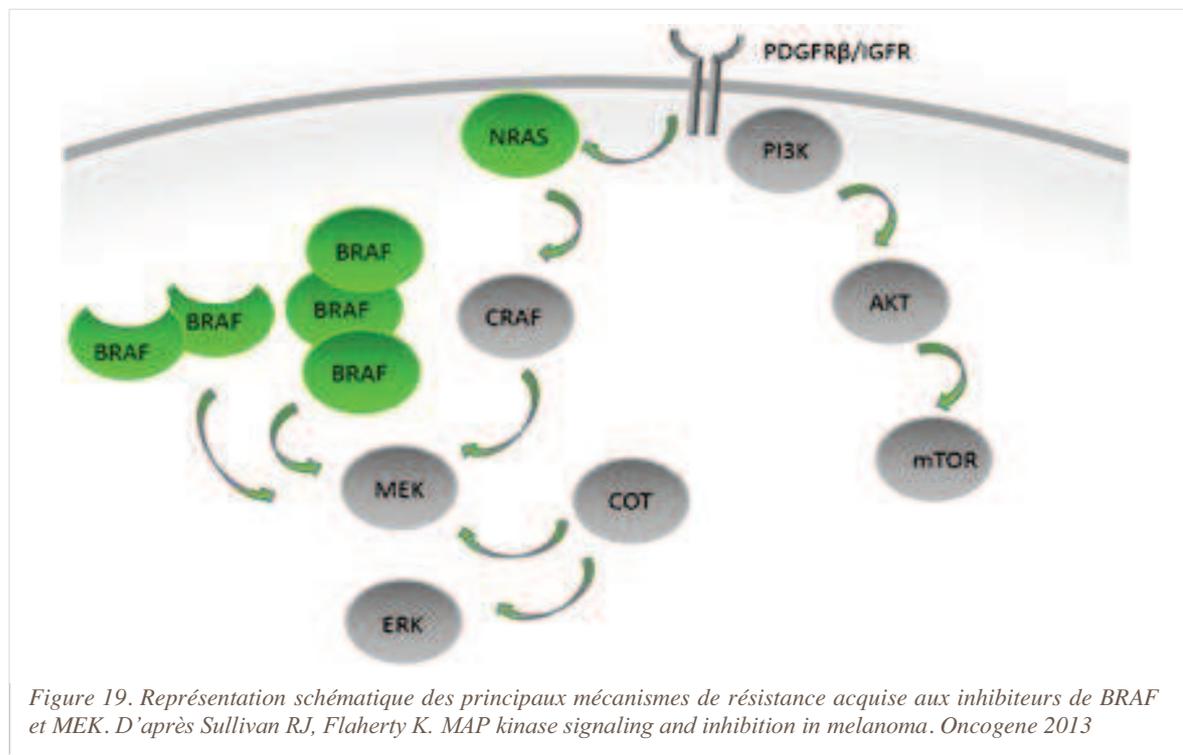
De nombreuses études ont fait état de l'activation de l'EGFR en tant que mécanisme de résistance à divers chimiothérapies [6]. L'EGFR a notamment été impliqué dans la résistance du MM aux inhibiteurs de BRAF [131,132] à la geldanamycine, aux inhibiteurs de topoisomères, aux agents alkylants, à l'acide betulinique, et à la vinorelbine [133–135].

Les métalloprotéines (ADAM, ADAMTS et MMP), des enzymes zinc-dépendantes associées à la membrane cytoplasmique qui clivent et activent les ligands (facteurs de croissance) pour divers récepteurs tyrosine kinases (RTK), peuvent aussi être à l'origine de résistances aux agents anti-cancéreux (notamment en induisant la voie EGFR) [6]. Ainsi une étude a rapporté la surexpression de MMP 2 et 9 dans des cellules de cancer du sein résistantes à la VCR [136]. Le mécanisme de résistance décrit dans cette étude impliquait la surexpression de EGFR.

Les intégrines sont des molécules d'adhésion exprimées à la surface cellulaire, qui relient les cellules à la matrice extracellulaire [137]. La surexpression des intégrines dans les cellules tumorales a été associée à un phénotype de chimiorésistance [6]. Les intégrines modulent de nombreuses voies de signalisation, incluant la voie PI3K-AKT, ERK et NF- $\kappa$ B [138], voies précédemment décrites comme à l'origine de résistance aux agents anti-cancéreux.

## II.6.2 Redondance des voies de signalisation et activation d'oncogènes

Ces mécanismes de résistance touchent les thérapies ciblées. En effet, ces thérapies ciblent un oncogène devenu constitutivement actif par le biais de mutation ou altération d'expression, et ont donc pour but d'inhiber la voie de signalisation dont le cancer est censé être dépendant pour sa croissance ou sa survie. En pratique, de rapides résistances acquises, à l'origine d'échappements thérapeutiques, sont observées. Ces résistances sont dues à une adaptation de la cellule qui va contourner l'inhibition en activant une autre branche ou une autre voie de signalisation aboutissant au même résultat (croissance ou survie). Ces mécanismes ont été appelés « oncogenic bypass » ou « kinome reprogramming » car la cible primaire de la drogue reste inchangée et continue d'être inhibée, mais une alternative (autre kinase) est activée en raison soit d'une boucle de rétroaction, soit d'une mutation génétique qui est sélectionnée pendant le traitement [6].



Le vémurafénib, qui inhibe la sérine / thréonine kinase BRAF activée *via* la mutation V600E dans la majorité des MM, présente un taux de réponse > 50% [139]. Malgré cette activité antitumorale robuste, la plupart des réponses à ces médicaments sont partielles et

une progression de la maladie apparaît généralement dans une médiane de 5-7 mois [63]. Les principaux mécanismes de résistance identifiés conduisent à la réactivation de la voie MAPK, le contournement de la voie MAPK par l'activation de la voie PI3K-AKT-mTOR, et l'activation de la voie du VEGF (Figure 19) [140–142].

## **II.7 Microenvironnement**

La protection du microenvironnement sert de refuge aux cellules cancéreuses contre les agents cytotoxiques, leur permettant ainsi d'échapper à l'apoptose et de développer une résistance acquise. La résistance *via* le microenvironnement, qui touche aussi bien les chimiothérapies conventionnelles que les thérapies ciblées, est développées dans la revue de McMillin, Negri, et Mitsiades parue dans Nature Rev. Drug Discov. en 2013 [143]. Les mécanismes de résistance associés au microenvironnement provenant de facteurs extérieurs à la cellule cancéreuse, ils ne seront pas développés dans ce manuscrit.

## **II.8 Clones résistants et cellules souches cancéreuses**

L'extraordinaire hétérogénéité génétique intratumorale révélée par séquençage explique pourquoi la résistance acquise aux agents anticancéreux est si fréquente. Un des mécanismes principal serait tout simplement la sélection d'une sous-population mineure de cellules intrinsèquement résistantes à la chimiothérapie. Une des solutions serait une combinatoire rationnelle de thérapies ciblées (et conventionnelles ?) [9,144] (Figure 20).

Un autre mécanisme serait lié à la présence de cellules souches cancéreuses (CSC) à l'origine et persistantes dans la tumeur. Les CSC sont considérées comme étant hautement résistantes aux chimiothérapies en raison de diverses caractéristiques essentielles, comprenant une expression élevée d'ABC transporteurs et de protéines anti-apoptotiques telles que BCL-2 et BCL-xL, une meilleure capacité de réparation des dommages de l'ADN, et une activation de voie de signalisation pro-survie (NF-kB entre autre) [6,145].

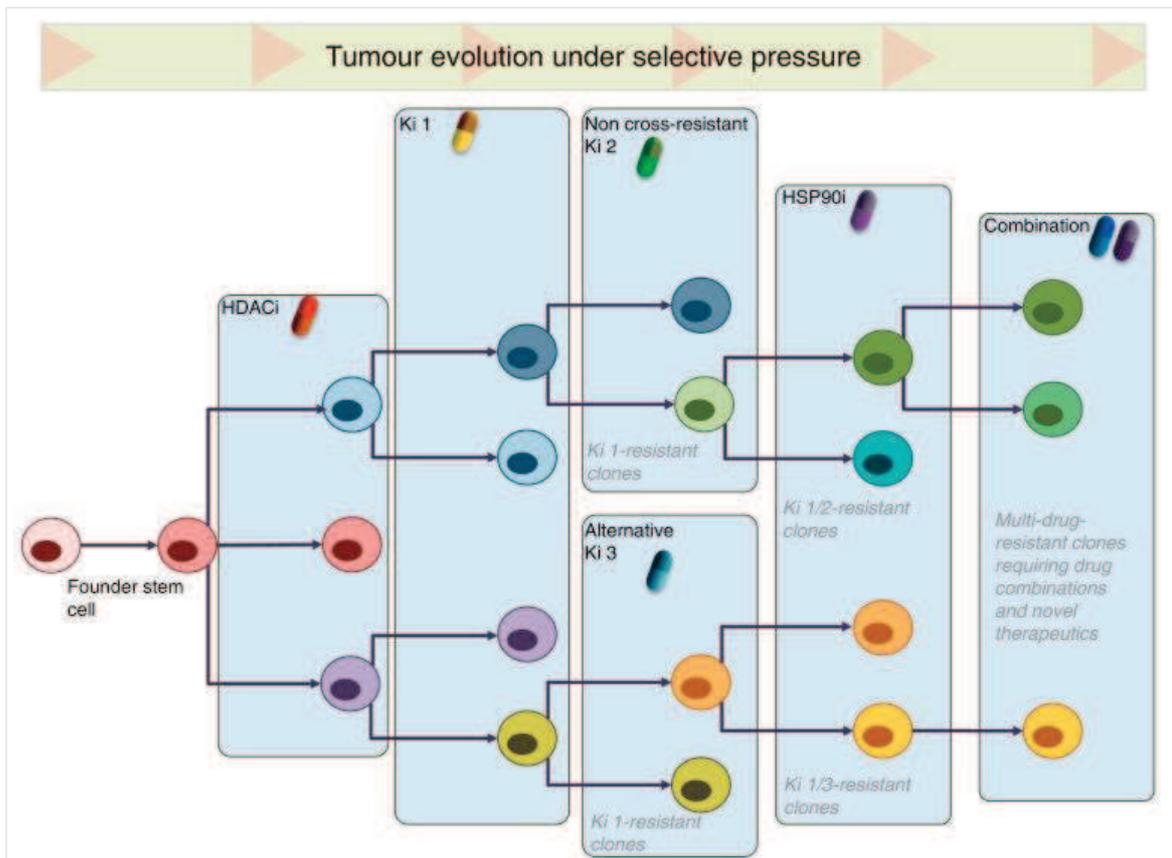


Figure 20. Représentation schématique de l'évolution clonale et l'hétérogénéité des cellules cancéreuses en réponse à une pression de sélection à partir de facteurs, y compris le traitement médicamenteux. D'après Workman P, Al-Lazikani B, Clarke PA. *Genome-based cancer therapeutics: targets, kinase drug resistance and future strategies for precision oncology. Curr Opin Pharmacol* 2013

# III Les vinca-alcaloïdes

---

Une revue de la littérature sur les vinca-alcaloïdes (VAs) est disponible dans le livre Holland-Frei Cancer Medicine, 6th edition, chapitre « the vinca alkaloids » par Eric Rowinsky [146].

## III.1 Utilisation en clinique

Les VAs sont largement intégrés dans des associations de chimiothérapies curatives ou palliatives, notamment avec les agents alkylants [146]. L'absence d'induction de myélosuppression par la VCR permet son utilisation à des doses complètes, en combinaison avec des agents myélosuppresseurs. Cet avantage est mis à profit dans divers schémas chimiothérapeutiques. Le large spectre des VAs a permis d'indiquer leur utilisation dans le traitement de la plupart des tumeurs solides ou hématologiques.

Les VAs sont notamment utilisés dans le traitement du MM ne présentant pas de mutation « addictive » contre laquelle une thérapie ciblée est développée, et en cas de résistance acquise aux thérapies ciblées [3] (cf. chapitre Traitement du MM).

## III.2 Origine, structure et caractéristiques chimiques



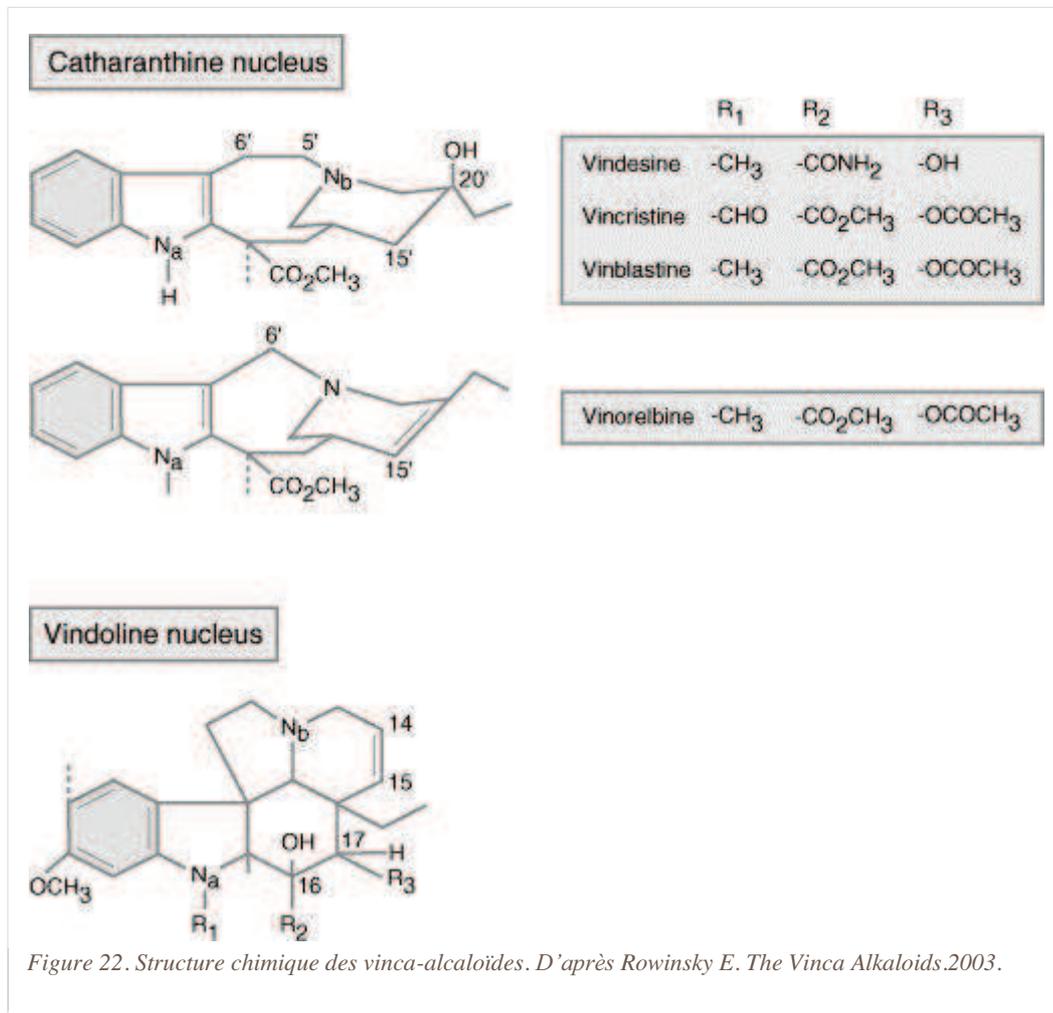
Figure 21. *Catharanthus roseus* G. Don

Les vinca-alcaloïdes sont des alcaloïdes naturels, extraits de la pervenche tropicale ou pervenche de Madagascar (*Catharanthus roseus* G. Don), ou héli-synthétiques. [147].

Du fait de l'utilisation médicinale de la pervenche comme antidiabétique, les VAs avaient été initialement sélectionnées pour leur activité hypoglycémique. Ce n'est qu'au cours des études précliniques que l'activité cytotoxique majeure de ces agents a été découverte. Les premières études

chez les rongeurs ayant mis en évidence l'activité myélosuppressive des VAs, leur développement a été réorienté vers la cancérologie [148].

Cinq VAs sont utilisés en clinique : la vinblastine (VBL), la vinorelbine (VRB), la vincristine (VCR) et la vindésine (VDS). Seuls VCR, VBL et VRB sont approuvés aux États-Unis [146,149]. Depuis 2008, un nouveau VAs synthétique, la vinflunine (VFL), est approuvé en Europe [150].



Les VAs ont des structures chimiques dimériques constituées de deux unités multicycliques : un noyau indole (catharanthine), et un noyau dihydroindole (vindoline) (Figure 22) [146]. La VCR, VBL et VDS sont des extraits naturels alors que la VRB est un dérivé héli-synthétique de la VBL (5'-norhydro-vinblastine). Structurellement, VCR et VBL ne diffèrent que d'une seule substitution sur le noyau vindoline : un groupement formyle ou méthyle, respectivement. La VDS (désacétyl-vinblastine) a initialement été identifiée comme un métabolite de la VBL.

Les VAs présentent des caractéristiques physico-chimiques communes : ce sont des agents lipophiles et des bases faibles.

### III.3 Mécanismes d'action

Les principaux mécanismes de cytotoxicité des VAs ont trait à leur interaction avec la tubuline et à la perturbation de la fonction des microtubules [151]. La déstabilisation des microtubules empêche la formation correcte du fuseau mitotique ce qui a pour conséquence un arrêt des cellules en métaphase, et peut conduire à une induction de l'apoptose [152].

Les VAs produisent aussi une large gamme d'effets biochimiques dans les cellules et les tissus, qui peuvent ou non être liés à leurs effets sur les microtubules : inhibition de la synthèse des protéines et des acides nucléiques, élévation du glutathion oxydé impactant le métabolisme des lipides et des membranes, élévation de l'adénosine monophosphate cyclique (AMPC), et inhibition de la AMPC phosphodiesterase, perturbation de la dynamique des organites et du flux autophagique [146,153–155].

Les VAs se lient aux monomères de tubuline sur des sites spécifiques ; il y a donc 2 sites de liaison par dimère de tubuline. Ces sites sont distincts de ceux des autres anti-microtubules : taxanes, colchicine, podophyllotoxine [151,156]. La liaison, rapide et réversible, a pour effet la déstabilisation des microtubules. L'affinité dépend de la position des dimères dans le microtubule : elle est plus élevée aux extrémités des microtubules qu'à leur surface.

A faibles concentrations ( $< 1 \mu\text{M}$ ), les VAs se fixent à leurs sites de haute affinité, à l'extrémité des microtubules, et perturbent la dynamique d'assemblage / désassemblage de l'extrémité positive. Ce blocage de l'instabilité dynamique des microtubules au niveau des extrémités du fuseau mitotique conduit à un arrêt des cellules en métaphase.

A plus fortes concentrations ( $>$  de 1 à 2  $\mu\text{M}$ ), les VAs se lient à leurs sites de faible affinité, à la surface des microtubules, ce qui conduit à la désagrégation des microtubules. Par un mécanisme d'auto-propagation, la liaison de quelques molécules de VAs à des sites de liaison de faible affinité affaiblit progressivement les interactions latérales entre les protofilaments, ce qui expose de nouveaux sites, jusqu'à la désagrégation totale des microtubules.

Les mécanismes précis qui conduisent à la mort cellulaire après un traitement par les VAs ne sont pas encore entièrement élucidés. Il semble que la plupart sont partagés avec les mécanismes de morts cellulaires induits par les taxanes, impliquant des protéines de régulation de l'apoptose telles que BCL-2, BCL-xL, la kinase c-Jun et p21 [157–160]. Cependant, la protéine p53 ne semblent pas impliquée [161]. Les agents anti-microtubules activent également RAS et ASK-1 (apoptosis signal regulating kinase), ce qui suggère que la désorganisation du réseau de microtubules est un mécanisme important dans la signalisation pro-apoptotique [162]. De surcroît, les VAs pourraient induire une apoptose indépendante de la voie classique, *via* la voie lysosomiale [163].

### **III.4 Résistance**

Les mécanismes de résistance aux VAs sont les suivants :

- Métabolisme cellulaire : activité des GST
- Transport cellulaire : surexpression des pompes d'efflux P-gp, MRP, et lung resistance protein (LRP) [82]
- Séquestration lysosomiale [164]
- Altération de la cible : altérations structurelles et fonctionnelles des  $\alpha$ - et  $\beta$ -tubuline, résultant de mutations génétiques, de modifications post-traductionnelles, ou de l'expression différentielle des isotypes de tubuline [165]; stabilité accrue des microtubules liée à une surexpression des Microtubule-Associated Protein (MAPs), notamment MAP4 [165]

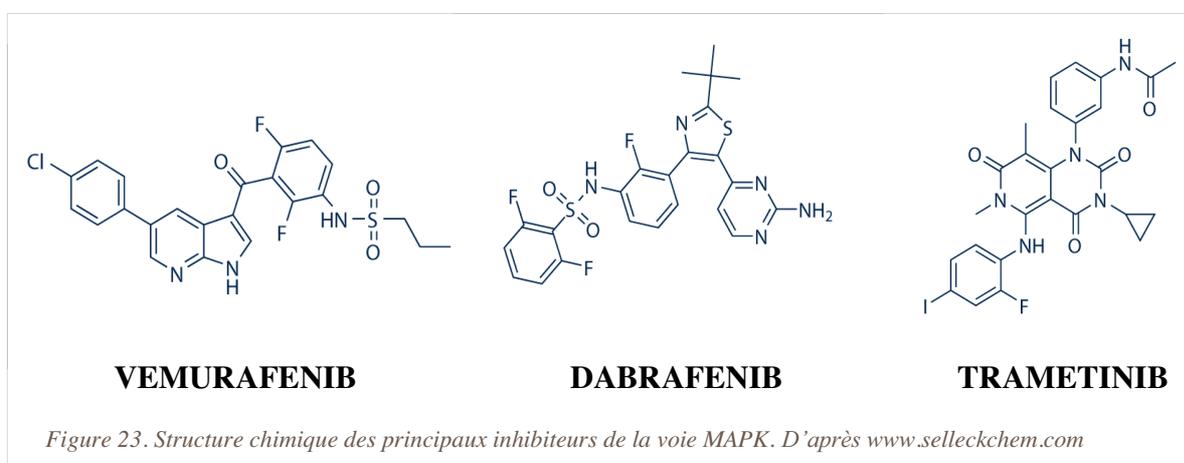
# IV Les inhibiteurs de MAPK

## IV.1 Utilisation en clinique

Les récents progrès dans la compréhension de la biologie et de l'immunologie du MM, ont permis l'approbation en 2011 de deux traitements, l'ipilimumab (immunothérapie) et le vémurafénib (thérapie ciblée), qui ont révolutionné la prise en charge du MM [63]. Plus de 50% des MM sont porteurs de mutations activatrices du gène BRAF, principalement au niveau du codon 600, qui se traduisent par une activation constitutive de la voie MAPK [42]. Les inhibiteurs sélectifs des mutants BRAF V600 (90% V600E), vémurafénib et dabrafénib, ont montré des réponses tumorales majeures, résultant dans l'amélioration de la survie globale et sans progression chez les patients atteints de MM métastatique, par rapport à la chimiothérapie de référence, la dacarbazine [66,68]. Une activité antitumorale est également décrite dans les métastases cérébrales. L'effet secondaire principal des inhibiteurs de BRAF est l'induction de carcinomes spinocellulaires cutanés, résultant de l'activation paradoxale de la voie MAPK dans les cellules présentant des mutations du gène RAS. Le tramétinib, un inhibiteur de MEK (en aval de BRAF dans la voie des MAPK), a également montré une augmentation de la survie globale par rapport à la dacarbazine, bien que les réponses tumorales aient été moins fréquentes qu'avec des inhibiteurs de BRAF [69]. L'association d'un inhibiteur de BRAF et d'un inhibiteur de MEK est aujourd'hui de plus en plus envisagée [70].

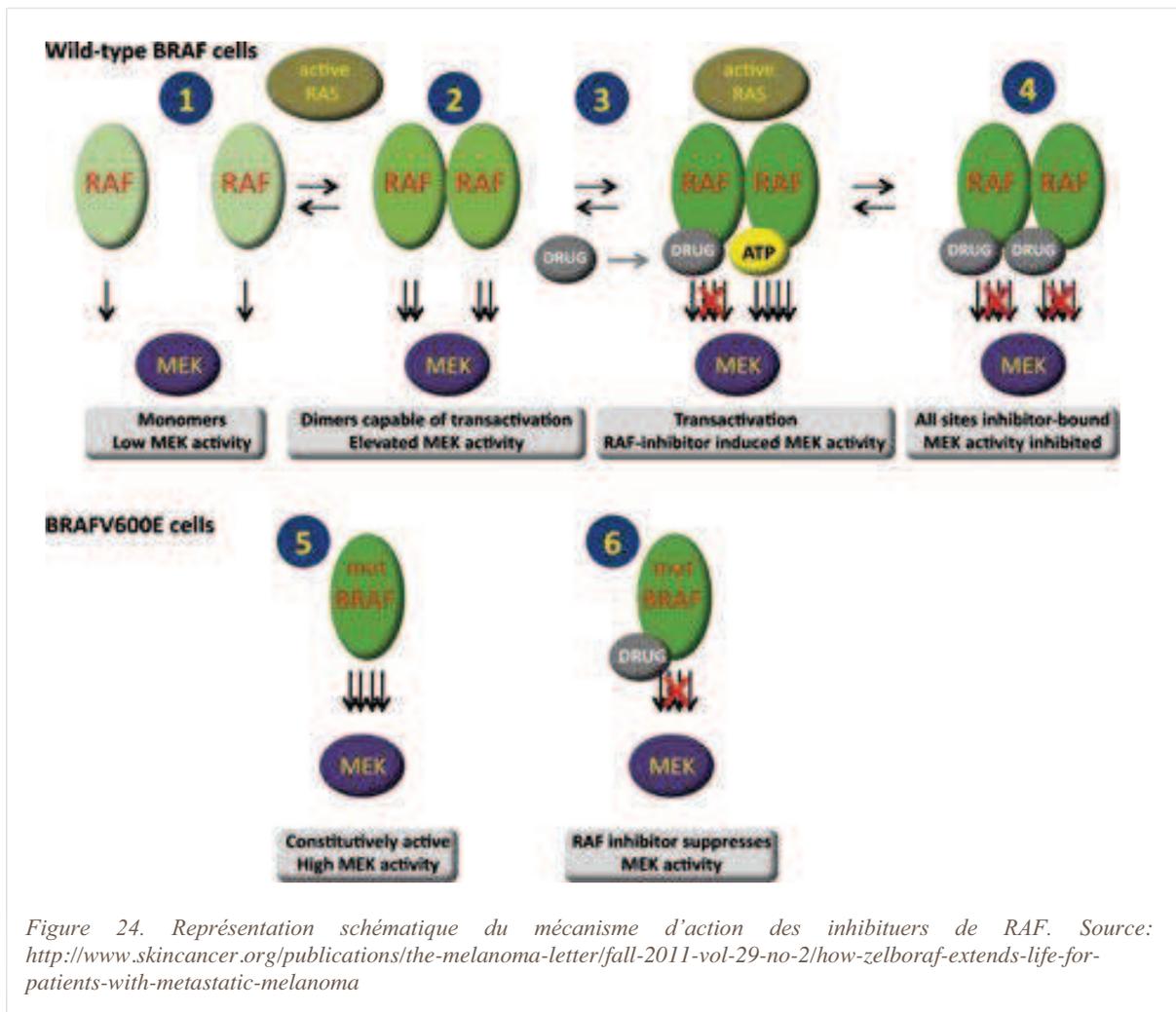
## IV.2 Structure chimique

Les inhibiteurs de MAPK sont de petites molécules polycycliques lipophiles (Figure 23).

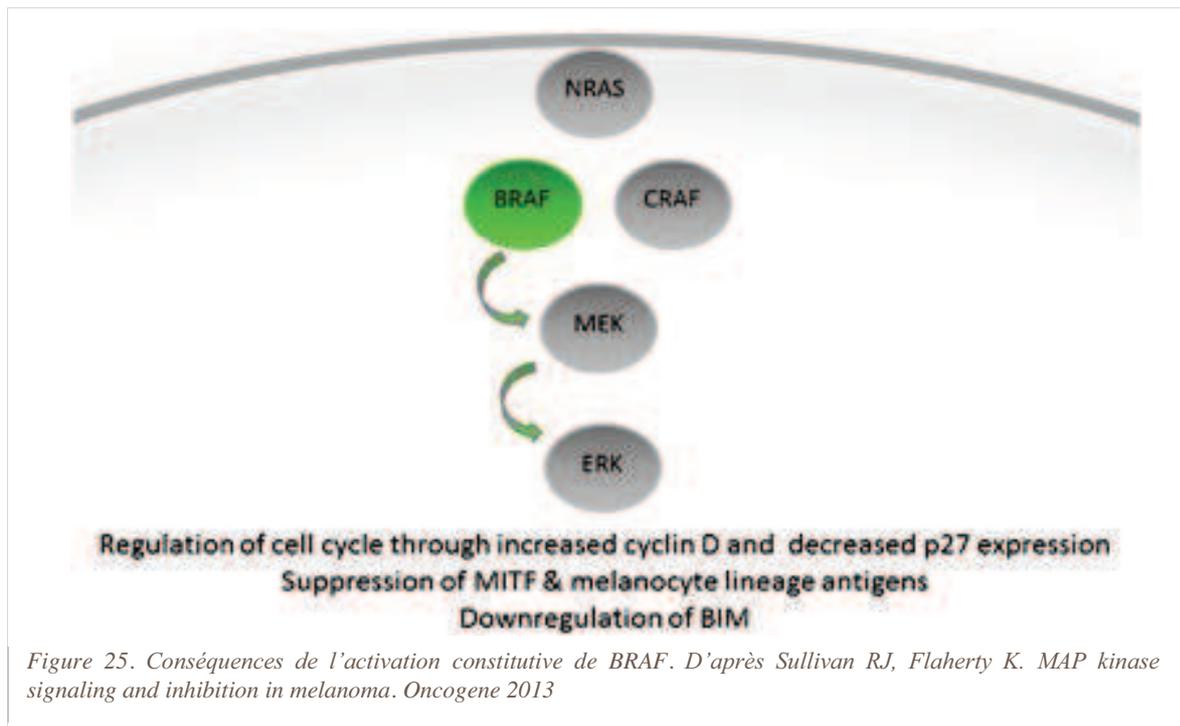


### IV.3 Mécanismes d'action

Les inhibiteurs de BRAF (vémurafénib, tramétinib) et de MEK (tramétinib) sont des petites molécules inhibitrices bloquant le site actif de ces kinases (Figure 24). Ils inhibent ainsi la cascade des MAPK qui est constitutivement activée dans les MM présentant des mutations activatrices du gène BRAF (Figure 25) [141].



Alors que seule une inhibition de la croissance cellulaire était attendue, l'inhibition de l'activité de la cascade des MAPK a montré une activité cytotoxique dans les cellules porteuses des mutations activatrices du gène BRAF. Cette activité cytotoxique pourrait être due à la dépendance des cellules cancéreuses portant cette mutation pour leur survie et leur prolifération. Une étude *in vitro* sur des cellules de MM présentant la mutation BRAFV600E (SKMEL19 et 451LU) a montré que le vémurafénib pourrait induire une apoptose *via* l'induction du stress du RE [166]. Dans une étude animale, l'inhibition de l'activité de BRAF dans des tumeurs de MM mutées a réduit la sécrétion de VEGF et la vascularisation, conduisant à l'apoptose des cellules tumorales [167].



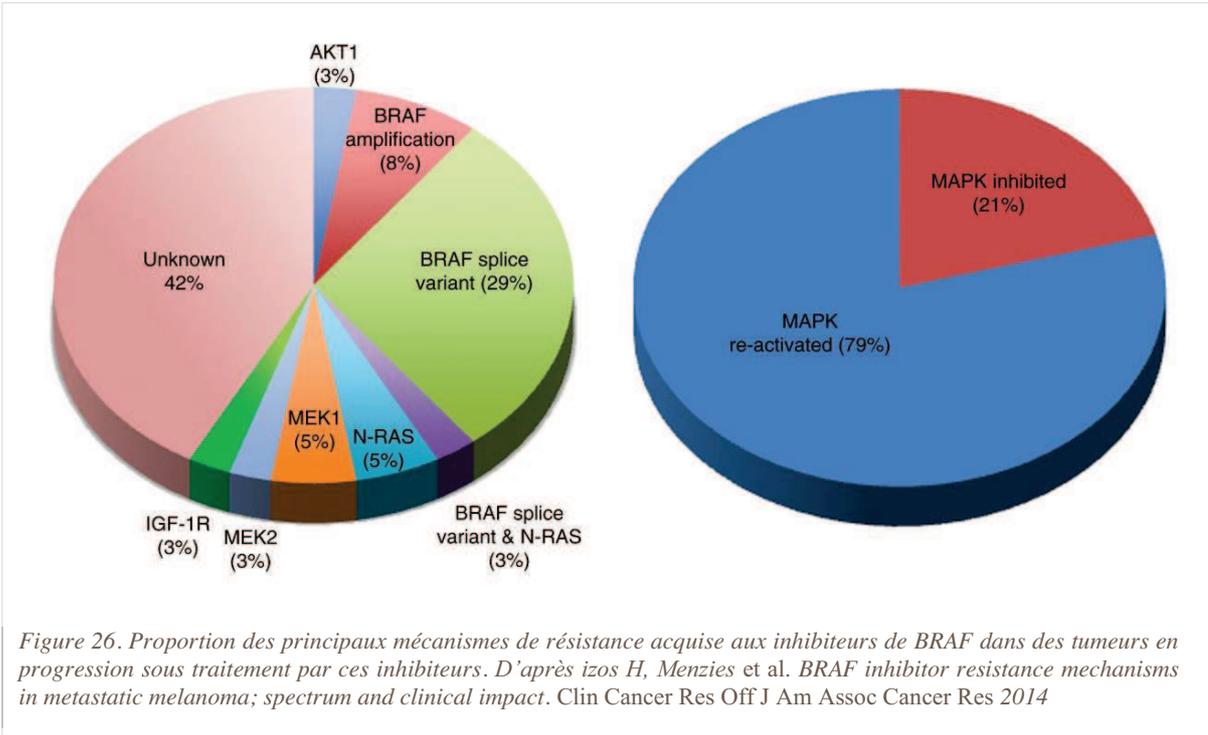
## IV.4 Résistance

Malgré cette activité antitumorale robuste, la plupart des réponses à ces médicaments sont partielles et une progression de la maladie apparaît généralement dans une médiane de 5-7 mois [63]. Les principaux mécanismes de résistance identifiés conduisent à la réactivation de la voie MAPK, Le contournement de la voie MAPK par l'activation de la voie PI3K-AKT-mTOR, et l'activation de la voie du VEGF (Figure 25) [140–142].

Les différents mécanismes pouvant conduire à la réactivation de la cascade des MAPK sont détaillés dans la revue de Lito P, Rosen N, et Solit DB, « *Tumor adaptation and resistance to RAF inhibitors* » paru dans *Nat Med* en 2013 [140].

Bien que la cascade des MAPK soit réactivée dans environ 80% des tumeurs présentant une progression sous inhibiteurs de BRAF, environ 40% des mécanismes de cette résistance acquise, y compris à l'origine de la réactivation de la voie MAPK, ne sont pas identifiés, ou pas identifiables de façon simple lors de l'analyse de prélèvements tumoraux (Figure 26) [142].

En outre l'autophagie pourrait jouer un rôle dans la résistance aux inhibiteurs de BRAF. Ainsi, des inhibiteurs de l'autophagie sont en développement et ont induit une sensibilisation *in vitro* de cellules de MM présentant la mutation BRAF V600E (U2OS) [168].



# V La technologie des puces à ADN : transcriptomique

---

## V.1 Historique

### V.1.1 Les « omiques »

Les technologies dites « omiques » sont apparues parallèlement au développement du projet « Génome Humain », initié en 1987 [169–171]. C’est cette même année que le terme « génomique » a été introduit dans le lexique scientifique, en tant que titre de la revue fondée par Victor McKusick et Frank Ruddle [172]. Le suffixe « omique » tire son origine du mot sanscrit « OM », qui désigne la complétude et la plénitude [173]. Ainsi, les technologies « omiques » visent à étudier l’ensemble exhaustif d’un champ biologique (suffixe « -ome ») : génome, protéome, transcriptome et métabolome. Selon le groupe de recherche OMICS-ETHICS [174] “les technologies « omiques » permettent de générer des quantités énormes de données à des niveaux biologiques multiples : du séquençage des gènes à l’expression des protéines et des structures métaboliques, ces données peuvent couvrir tous les mécanismes impliqués dans les variations qui se produisent dans les réseaux cellulaires et qui influencent le fonctionnement des systèmes organiques dans leur totalité”.

Ces technologies ont considérablement modifié l’échelle des données analysables, posant le problème de la surabondance des données et de leurs interprétation [175]. En plus d’augmenter le débit et le nombre des données, les technologies « omiques » ont fondamentalement modifié les procédures de recherche. Classiquement, les recherches scientifiques se basent sur une hypothèse (question), autour de laquelle le processus de recherche est articulé. Les données obtenues visent à confirmer ou infirmer cette hypothèse. Cependant, depuis l’avènement des technologies « omiques », il n’est plus nécessaire de poser une question précise pour débiter une recherche. La quantité et la transversalité des données générées dans le cadre d’une analyse « omique » permettent à cette seule analyse de servir de base à la formulation de diverses hypothèses biologiques qui seront confirmées ou infirmées par la suite [174,176]. De cette révolution est né le concept d’ « ère post-génome » ou « ère post-génomique » [177], proposant une nouvelle approche des questions scientifiques, par l’étude intégrative des systèmes, dans laquelle on s’applique à mesurer de manière globale les processus moléculaires impliqués dans la santé et la maladie [178]. L’inversion du modèle de recherche a permis de nombreuses découvertes sur le métabolisme cellulaire, les mécanismes physiopathologiques des maladies, et la compréhension des facteurs moléculaires influençant l’efficacité et la toxicité des médicaments. En ce sens, le développement des technologies « omiques » a révolutionné aussi bien la recherche fondamentale, que la recherche appliquée aux maladies.

## **V.1.2 Place de la transcriptomique dans les « omiques »**

Le profil d'expression génique d'une cellule détermine son phénotype et sa réponse à l'environnement. La régulation des gènes exprimés par la cellule est très dynamique afin de pouvoir répondre rapidement à des stimuli externes. Par conséquent, la mesure de l'expression des gènes peut fournir des clés pour la compréhension des mécanismes de régulation, des voies biochimiques de signalisation, ou plus largement des fonctions cellulaires induites en réponse à des pathologies ou à des traitements. Une mutation modifiant la fonctionnalité d'une protéine aura aussi des répercussions sur les voies de signalisation cellulaire, entraînant une modification secondaire du profil d'expression génique de la cellule. De même, les remaniements épigénétiques fréquemment observés dans les cancers modifient le profil d'expression des cellules. Le profilage transcriptomique donne ainsi accès à l'ensemble des altérations à l'origine de la cancérogénèse et de la résistance des cancers aux chimiothérapies.

Actuellement, de nouvelles techniques comme le séquençage à haut débit (high-throughput sequencing : HTS ; ou next-generation sequencing : NGS) tendent à supplanter l'utilisation des puces à ADN [179]. Cette technique permet d'avoir accès aux mutations et polymorphismes, ainsi qu'aux variations de nombre de copies de gènes. Néanmoins, les données obtenues par le biais du séquençage sont difficiles à intégrer, la question du caractère pathologique étant posée à chaque mutation ou variation observée dans une séquence génique. De plus, l'analyse informatique des données générées, extrêmement nombreuses, pose problème et est encore limitative [180]. La technologie des puces à ADN, plus ancienne, présente le double avantage de générer des données plus facilement exploitables et intégrables [181]. En outre, les logiciels et algorithmes utilisés dans le traitement des données sont efficaces ; les avantages et limites de chacun d'entre eux sont bien établis [182,183]. Parallèlement, de nombreuses bases de données intégratives se sont développées. Elles permettent de relier les altérations d'expression génique avec les connaissances actuelles en biologie moléculaire et cellulaire par le biais des annotations géniques. Ces bases de connaissances, de plus en plus complètes et transversales, permettent d'une part l'exploitation optimale des données générées par les biopuces [184,185], d'autre part l'intégration de l'ensemble des données issues des différents « omiques » (génomique, transcriptomique, protéomique, métabolomique, interactomique, ...).

## **V.2 Apport et utilisation des biopuces**

### **V.2.1 Apport des biopuces à ADN en cancérologie**

La publication initiale de la séquence du génome humain en février 2001 [186,187], complétée en 2003 (50 ans après la description de la structure en double hélice de l'ADN [188]), a révolutionné la recherche fondamentale, ainsi que les approches diagnostiques et thérapeutiques des cancers. Le séquençage et l'annotation du génome humain ont fourni la base indispensable à l'identification des anomalies moléculaires à l'origine des cancers. L'établissement du profil transcriptomique des cellules cancéreuses a notamment permis

de mieux comprendre les processus de cancérogénèse et d'évolution tumorale de chaque cancer [189,190]. De cette approche a émergé le concept de « dépendance oncogénique » des cancers [191] : lors de la progression maligne, la redondance des voies de signalisation dans les cellules normales est perdue dans les cellules cancéreuses suite à une sélection de voies oncogéniques critiques, dont le cancer devient « dépendant ». La meilleure compréhension de la biologie des cancers a servi de support au développement de thérapies rationnelles, ciblant préférentiellement les anomalies génétiques et les voies de signalisation dérégulées dans le cancer [192,193]. Ces nouvelles molécules sont caractérisées par leur meilleure efficacité et leur toxicité plus faibles que les chimiothérapies « conventionnelles », comme l'illustre le succès du mésylate d'imatinib (Glivec) dans le traitement de la leucémie myéloïde chronique [194], du trastuzumab (Herceptin) dans le cancer du sein [195], ou plus récemment du vémurafénib (Zelboraf) dans le MM [196]. Néanmoins, les thérapies « ciblées » ne peuvent être utilisées que chez les patients porteurs des anomalies visées, ce qui rend l'utilisation des puces à ADN particulièrement utile dans le diagnostic moléculaire des cancers [197,198]. Par ailleurs, le profilage génétique des cancers, de plus en plus systématique lors du diagnostic ou lors d'essais cliniques, a permis de mieux cerner les mécanismes à l'origine des résistances aux agents anticancéreux [9–11].

## **V.2.2 Utilisations en cancérologie**

Les applications des puces à ADN sont nombreuses et interviennent à tous les niveaux du processus de développement des traitements anticancéreux. Le profilage génétique permet ainsi :

- Une meilleure compréhension des changements d'expression de gènes qui contribuent à la progression maligne.
- La découverte d'indicateurs diagnostiques et pronostiques et de biomarqueurs de réponse.
- L'identification et la validation de nouvelles cibles moléculaires.
- Une meilleure compréhension du mode d'action moléculaire des traitements déjà développés, permettant l'optimisation de leur usage.
- La prévision des effets secondaires et toxiques potentiels lors des études précliniques.
- La confirmation du mode d'action moléculaire au cours des essais précoces dits de « tests d'hypothèses ».
- L'identification des gènes impliqués dans la sensibilité et la résistance aux médicaments.
- L'identification des patients les plus susceptibles de bénéficier du traitement lors des études pharmaco-génomiques.

Toutes ces applications sont discutées et développées dans les deux excellentes revues de Paul A. Clarke, Robert te Poele, et Paul Workman parues en 2001 [192] et 2004 [193].

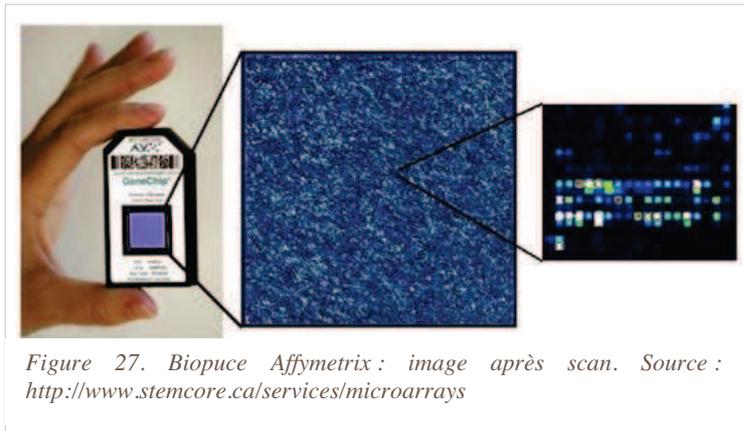
### V.2.3 Apport des puces à ADN dans l'étude des mécanismes de résistance

L'utilisation des puces à ADN est donc largement employée dans recherche des mécanismes et biomarqueurs de résistance des cancers aux chimiothérapies. Cette recherche peut se faire, soit au cours du développement des nouvelles molécules (études pharmaco-génomiques lors des essais cliniques), soit après la commercialisation des chimiothérapies (nouvelles données apportées par la généralisation du profilage génétique des tumeurs).

L'utilisation des biopuces est aussi particulièrement intéressante pour l'étude mécanistique de ces résistances sur modèles *in vitro*. Des modèles *in vitro* de la résistance acquise aux chimiothérapies peuvent être créés par l'exposition continue de lignées de cellules cancéreuses à un agent particulier jusqu'à ce qu'un sous-clone résistant soit sélectionné [193]. Le clone résistant peut ensuite être comparé à la lignée parentale par l'analyse de l'expression génique sur puces à ADN. Cependant, une observation récurrente lors de l'utilisation de cette approche est la complexité des changements d'expression génique au cours du développement de la résistance acquise. Il est ainsi difficile de savoir si tous les changements acquis au cours de la sélection des lignées ont un rôle dans la résistance, ou si seulement un ou deux gènes sont la clé de la résistance et les autres sont modifiés par voie de conséquence (régulation co-transcriptionnelle par exemple). En outre, plusieurs études suggèrent que l'acquisition de la résistance peut impliquer une série d'étapes qui requièrent chacune une classe différente de protéines [199–202]. Cette hypothèse expliquerait la complexité de la modification du profil transcriptomique dans les lignées résistantes [193].

Afin de valider l'implication des transcrits différentiellement exprimés dans les lignées résistantes, un knock-out (KO) génétique peut-être établi [193]. Cette approche permet de générer un modèle stable d'inhibition génique, et « propre », c'est-à-dire sans inhibition (ou activation) croisée d'autre voies de signalisation, ce qui est difficilement réalisable avec une petite molécule inhibitrice. Les approches par KO génétique peuvent donner des informations fonctionnelles sur les conséquences de l'inhibition de l'activité d'une protéine cible. Cependant, il faut noter que le retrait d'un composant d'un complexe multi-protéique par les approches KO peut avoir des effets substantiellement différents que ceux obtenus lors de l'inhibition simple de l'activité fonctionnelle de ladite protéine par un inhibiteur. Une alternative à l'approche par KO génétique stable est d'utiliser la stratégie d'inhibition d'expression par ARN anti-sens (small interfering RNA, siRNA), qui induisent le clivage de l'ARNm cible et donc sa dégradation. Cette approche a l'avantage d'être relativement rapide à mettre en place par rapport au temps nécessaire à l'isolation d'un clone recombinant KO. De plus, la nature transitoire d'un « KO » obtenu par transfection de siRNA peut être rapprochée de l'inhibition transitoire induite par traitement avec une petite molécule.

### V.3 Principe



L'expression génique d'une cellule peut être évaluée en mesurant la quantité soit du produit final (la protéine), soit de sa matrice (l'ARN messenger, ARNm). La technologie des puces à ADN mesure l'expression des gènes par l'intermédiaire de l'ARNm. Cette technologie exploite une caractéristique

remarquable des acides nucléiques qui leur permet de former un duplex dans un processus qui est réversible, mais qui se produit avec une fidélité absolue [193,203]. Ainsi, les ARNm extraits des échantillons à analyser (tissus, cellules), sont rétrotranscrits en ADN complémentaires (ADNc), puis éventuellement transcrits en ARN complémentaire (ARNc) pour être marqués (marquages radioactifs ou fluorescents), et finalement hybridés sur une matrice contenant des sondes complémentaires et spécifiques de chaque transcrit. Le signal obtenu à la suite de l'hybridation des cibles marquées à leurs sondes complémentaire donne une mesure du nombre de molécules hybridées, proportionnel à la quantité initiale d'ARNm [203–205]. Chaque spot de la matrice correspond à « une » sonde spécifique d'un transcrit.

Historiquement, les biopuces à ADN étaient composées de fragments d'ADN (ADNc, ADN génomique ou plasmidique), parfois de séquence inconnue, déposés sur une membrane poreuse en nylon. L'hybridation des ADNc, provenant de la rétrotranscription des ARNm contenus dans l'échantillon à analyser, et marqués par des groupes radioactifs, était détectée et quantifiée par autoradiographie ou *phosphorimaging* [193,203].

L'utilisation du verre comme support, de la fluorescence pour la détection, et le développement de nouvelles technologies de synthèse permettant la concentration des sondes nucléiques sur le support, ont permis premièrement la miniaturisation des biopuces et deuxièmement une augmentation de l'efficacité expérimentale [206]. Dans les biopuces miniaturisées, l'hybridation des cibles (ARNc) marquées par fluorescence est détectée à l'aide de scanners laser qui excitent les fluorochromes et recueillent leur émission aux longueurs d'ondes pertinentes. Deux technologies de puces sont disponibles : les puces « double couleur » et les puces « simple couleur » (technologie Affymetrix).

Dans la technologie « double couleur », la plus ancienne, deux conditions biologiques sont comparées. Ainsi, les ARNm provenant d'une condition (ex : le contrôle) sont rétrotranscrits en ADNc puis marqués par transcription *in vitro* (IVT) avec un fluorochrome vert, la cyanine 3 (Cy3 ; les bases dC sont substituées par leur équivalent fluorescent marqué Cy3) ; et les ARNm provenant de l'autre condition (ex : condition test)

sont marqués par un fluorochrome rouge, la cyanine 5 (Cy5) lors de l'IVT (Figure 28) [204,207]. Les ARNc provenant des deux conditions (« marqués » soit en vert soit en rouge), sont hybridés simultanément en concentration stœchiométrique. Après scan, l'image de la matrice présente des spots colorés :

- Vert : le gène est exprimé spécifiquement dans la première condition (ex : contrôle) ; *i.e.* le gène est sous-exprimé dans la condition test par rapport à la condition contrôle.
- Rouge : le gène est exprimé spécifiquement dans la condition test ; *i.e.* le gène est surexprimé dans la condition test par rapport à la condition contrôle.
- Orange avec différentes nuances (lecture précise par algorithmes informatiques) : le gène est exprimé dans les deux conditions. Il peut être soit sous-exprimé (orange tirant sur le vert), soit surexprimé (orange tirant sur le rouge), soit d'expression non modifiée (orange « pur ») dans la condition test par rapport au contrôle.

Dans la technologie à une couleur, (Affymetrix), un seul échantillon est hybridé. Un seul fluorochrome est utilisé, la phycoérythrine (PE) (Figures 28 et 29) [205,207,208]. Le résultat de l'hybridation donnera ainsi une valeur d'expression génique absolue et non un ratio d'expression entre deux conditions. Afin d'améliorer la sensibilité et de réduire la variabilité due à l'étape d'hybridation, les biopuces Affymetrix contiennent plusieurs sondes pour un même transcrit, réparties de façon homogène sur l'ensemble de la matrice. De la sorte, si un problème d'hybridation survient localement sur une petite surface de la matrice (rayure, microbulle, concentration en échantillon, ...) ce déséquilibre est moyenné et donc compensé par les autres sondes localisées à d'autres endroits de la matrice (Figure 30).

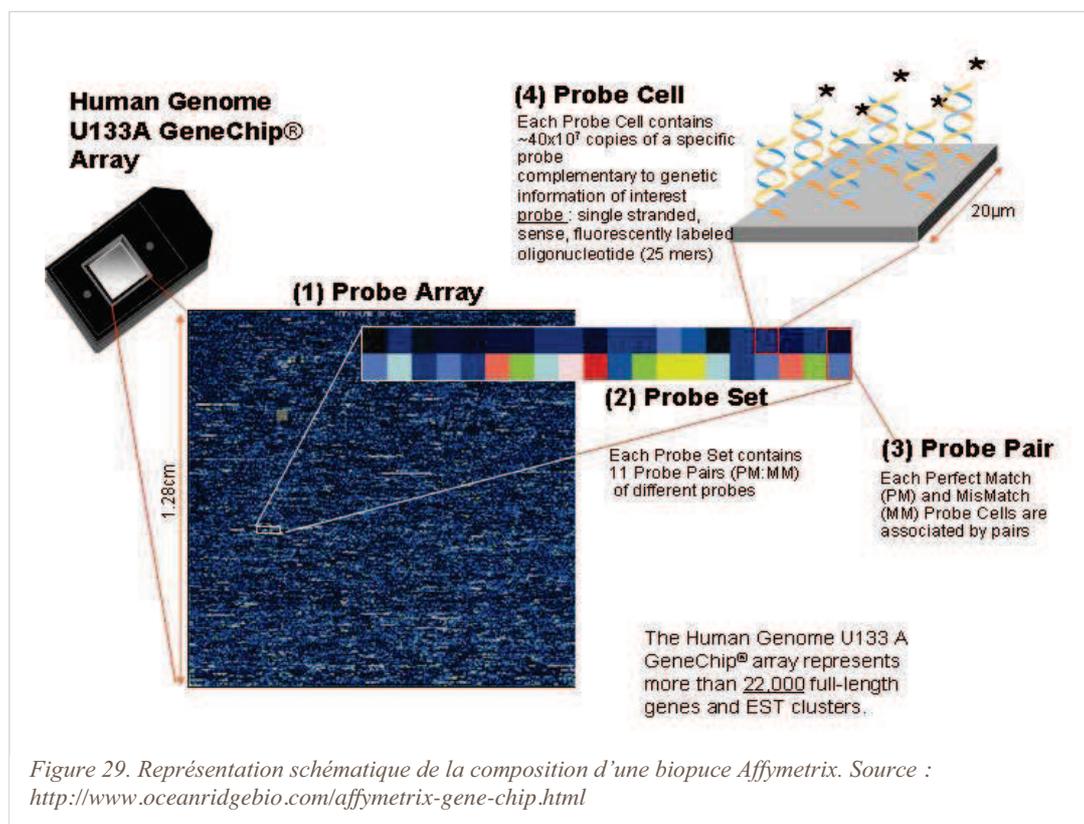


Figure 29. Représentation schématique de la composition d'une biopuce Affymetrix. Source : <http://www.oceanridgebio.com/affymetrix-gene-chip.html>

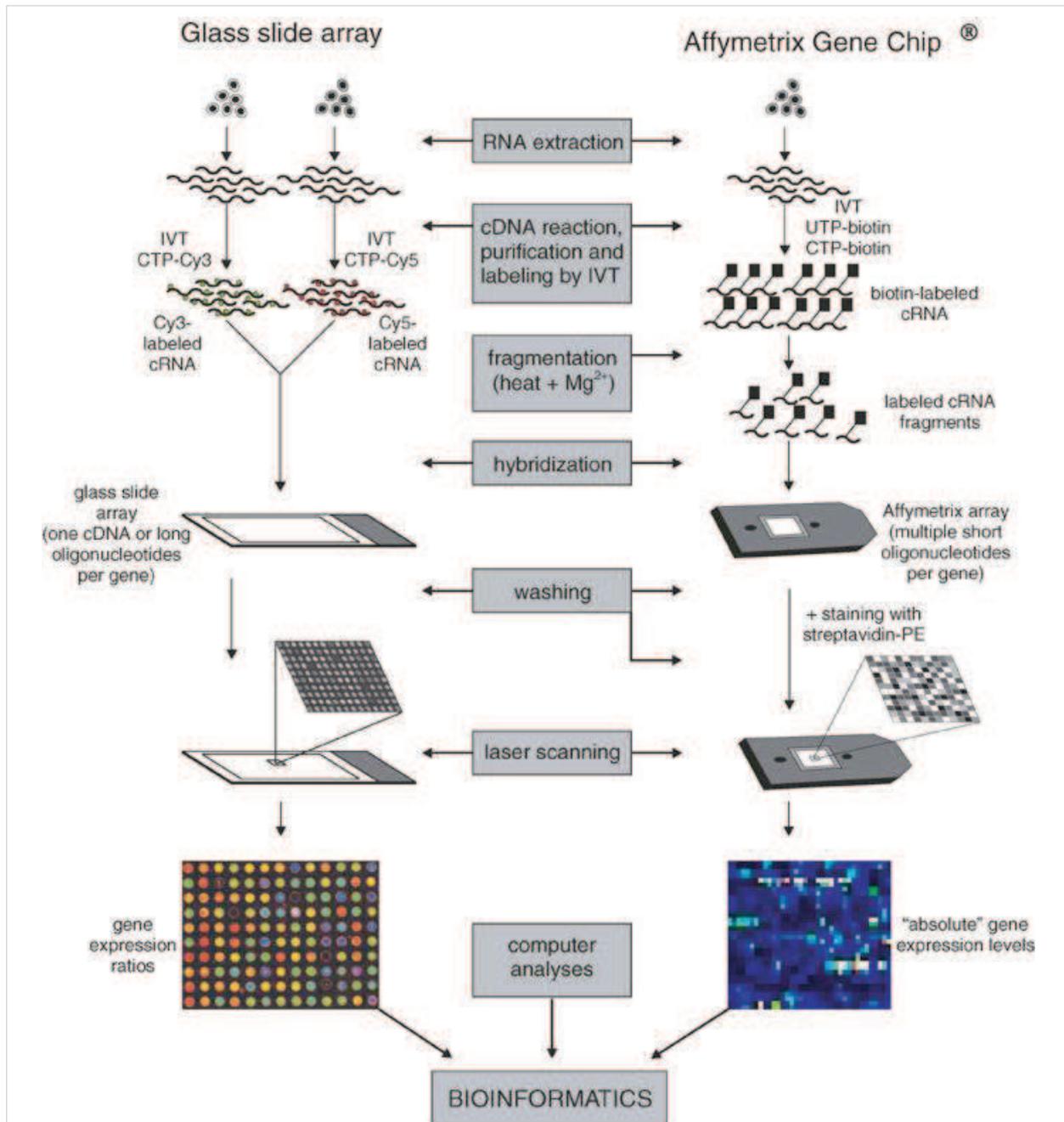


Figure 28. Principes des biopuces « double couleur » et « simple couleur » (Affymetrix). Double couleur : les deux populations de cellules, par exemple malades et normales, sont isolées, l'ARN est extrait, l'ADNc préparé puis une transcription in vitro (IVT) avec Cy3 (vert) ou Cy5 (rouge) est réalisée pour marquer les ARNc. Les deux échantillons d'ARNc marqués sont mélangés de façon stoechiométrique et hybridés sur un ensemble de lame de verre. La lame est balayée par un laser, puis chaque spot de l'image est analysé par ordinateur pour donner des intensités signal. Avec les biopuces Affymetrix, une seule population de cellule est utilisée comme matière de départ. L'ARN total est extrait et l'ADNc est préparé. L'ADNc est utilisé dans une réaction d'IVT pour générer de l'ARNc biotinylé. Après fragmentation, cet ARNc est hybridé à une biopuce, qui est ensuite lavée et incubée avec un conjugué streptavidine - phycoérythrine (PE), et ensuite scannée par un laser. Source : Staal FJT, et al. DNA microarrays for comparison of gene expression profiles between diagnosis and relapse in precursor-B acute lymphoblastic leukemia: choice of technique and purification influence the identification of potential diagnostic markers. Leukemia 2003

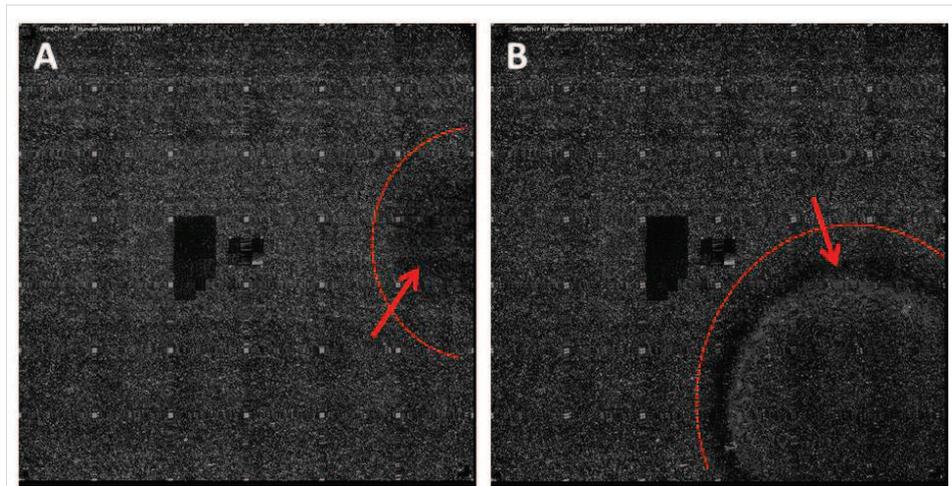


Figure 30. Artefacts d'hybridation sur puce Affymetrix U133 plus 2.0 PM. A, petite inhomogénéité d'hybridation ne devant pas entraîner de conséquence sur les résultats d'expression grâce à la présence d'autres sondes ciblant les mêmes transcrits dans d'autres zones de la puce. B, présence d'une bulle d'air importante faussant les résultats : les contrôles (petits carrés blancs) ne sont plus visibles.

## V.4 Démarche pour l'obtention des données de transcriptome

L'obtention de données d'expression par hybridation sur biopuce se déroule en plusieurs étapes [209–211] :

1. Conception de l'étude
2. Extraction des ARN totaux
3. Préparation des ARNc
4. Hybridation et scan
5. Analyse informatique des données (conversion des signaux et normalisation)

Etant donné la puissance et la sensibilité de ce type de technologies, ainsi que son coût, une attention particulière doit être apportée à chacune des étapes précédemment citées [212]. L'étape clé est la conception de l'étude [213,214].

De nombreux efforts ont été déployés en vue de l'établissement d'un consensus sur la réalisation d'expériences utilisant les biopuces, notamment parce que ces analyses génèrent des quantités colossales de données qui sont difficilement exploitables, interprétables et échangeables en l'absence d'un cadre minimum suivi et partagé par la communauté scientifique [212,215,216]. Dans le pire des cas, un mauvais design ou une expérience non paramétrée et non reproductible peut fournir des données erronées, qui incrémenteront les bases de données internationales et pourront fausser les analyses ultérieures. En outre, la divulgation complète des détails de la préparation des échantillons et de la manipulation est importante pour aider à l'interprétation des résultats, par l'équipe de recherche lors de l'analyse des résultats, puis par la communauté scientifique lors des publications [214]. Les consensus admis pour chacune des étapes d'obtention des données seront présentés pour les expériences effectuées sur puces Affimetrix.

## V.4.1 Conception de l'étude

La problématique de la conception d'une expérience de biopuces à ADN repose sur deux points [212–214] :

1. La réplication des échantillons biologiques est essentielle afin de pouvoir extrapoler des conclusions valables et non le reflet d'échantillons particuliers.
2. La répétition technique augmente la précision et fournit une base pour tester statistiquement les différences au sein des groupes de traitement.

Une expérience soigneusement conçue fournit une base solide pour l'analyse statistique et se prête à une interprétation simple et puissante. Les points communément admis sont les suivants [212–214]:

- Utiliser une réplication biologique adéquate : une erreur commune est de générer un excès de réplifications techniques avec peu ou pas de réplication biologiques.
- Un minimum de 5 réplicats biologiques par groupe devrait être analysé.
- Le regroupement (pool) d'échantillons biologiques peut être utile : la mise en commun d'ARNm issus de répétitions biologiques peut réduire la variabilité entre les puces. De nombreux chercheurs sont favorables à cette stratégie car la taille de l'échantillon peut être augmentée sans augmenter le nombre de puces. Par exemple, 15 cas répartis en 5 pools de 3, chaque pool exploité sur une biopuce distincte, est plus puissant que 5 cas sur 5 puces (mais moins puissant que 15 cas gérés séparément). Le regroupement des échantillons est notamment bénéfique lorsque l'identification d'une expression différentielle est le seul objectif, lorsque la variabilité biologique est élevée par rapport à l'erreur de mesure, et lorsque les échantillons biologiques sont peu coûteux par rapport au coût de la biopuce. Ces trois conditions sont réunies lors de l'étude des mécanismes de résistance acquise sur modèle *in vitro*. Cependant, le regroupement d'échantillons n'est pas bénéfique, par exemple, dans un objectif de classification. De plus, les mesures issues des pools ne correspondent pas nécessairement aux moyennes mathématiques des mesures des conditions qui composent le pool.
- Éviter la variabilité par des facteurs extérieurs : les mesures des puces à ADN peuvent être fortement influencées par des facteurs extérieurs. Si ces facteurs covarient avec la variable indépendante - par exemple avec les traitements différents qui sont appliqués aux séries d'échantillons - cela peut confondre l'étude et produire des conclusions erronées. Il est donc crucial que ces facteurs soient réduits au minimum ou, idéalement, éliminés. Par exemple, les matrices doivent être utilisées dans le même lot et traitées par un technicien sur le même jour. En cas d'impossibilité il est donc important de superviser les facteurs extérieurs (par exemple, en analysant un nombre égal d'échantillons à partir de deux lots de matrices), ou de les randomiser. Dans le cas de traitement de lignées cellulaires, il est crucial d'homogénéiser les conditions de culture et d'extraction (temps, manipulateur, nombre de repiquages, confluence, ...). Si le regroupement des échantillons peut lisser cette variabilité, il est néanmoins

nécessaire de traiter les réplicats de façon concomitante ou d'équilibrer au maximum la construction de l'étude.

- Toujours garder le but de l'expérience à l'esprit : les expériences qui sont construites pour répondre à une question particulière sont plus susceptibles d'être simples et interprétables que les expériences compilées à partir d'un ensemble aléatoire de conditions.

#### **V.4.2 Extraction des ARN totaux**

La préparation des ARNm consiste en l'extraction des ARN totaux des cellules ou tissus qui constituent les échantillons. Les ARN totaux doivent être extraits avec le plus grand soin pour éviter de générer de la variabilité « extérieure » (non due à la condition biologique testée). Les ARN totaux sont qualifiés et quantifiés puis regroupés (poolés) en concentration stœchiométrique le cas échéant.

#### **V.4.3 Préparation des ARNc**

Avant préparation des ARN en vue de l'hybridation, ceux-ci sont à nouveau qualifiés sur bioanalyseur Agilent puis rétrotranscrits en ADNc et finalement transcrits en ARNc biotinylés.

#### **V.4.4 Hybridation et scan**

L'hybridation et le scan se font la plupart du temps de façon successive sur une plateforme dédiée (biopuces commerciales).

#### **V.4.5 Analyse informatique : conversion des signaux et normalisation**

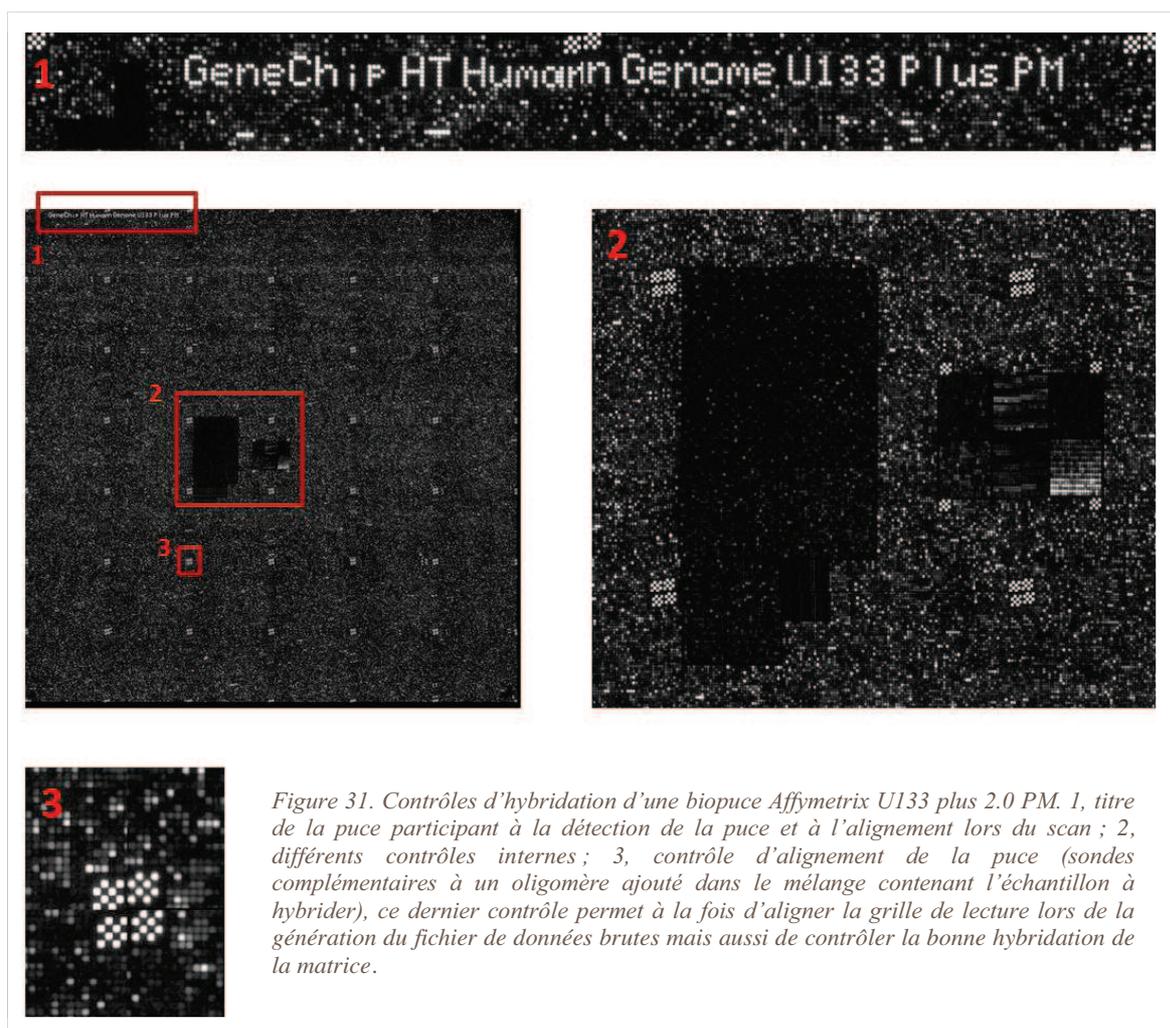
Trois étapes sont nécessaires pour obtenir des données (niveau d'expression de chaque gène proportionnel à la quantité de transcrit spécifique dans l'échantillon) exploitables suite à l'acquisition d'une image (scan) de la biopuce hybridée [193,217]:

1. Identifier correctement les spots sur la puce en superposant et en alignant une grille indiquant l'emplacement des spots, et leur correspondance. Pour cela, un logiciel aligne les spots contrôles répartis sur l'ensemble de la biopuce avec une grille annotée. Cette étape permet par ailleurs une validation de l'hybridation correcte de la biopuce puisque les spots contrôles ne sont visibles qu'après hybridation d'oligonucléotides spécifiques ajoutés dans le mélange initial d'ARNc à hybrider (Figure 31).

2. Estimer la valeur du signal (intensité du spot) et du bruit de fond. Les signaux sont donnés par des algorithmes qui calculent l'intensité du signal de chaque spot scanné à partir de leur taille (nombre de pixels), de leur forme, et de la valeur de l'intensité de chaque pixel, puis soustraient le bruit de fond issu du voisinage du spot.

Ces deux étapes permettent de générer un fichier brut (.CEL dans le cas de biopuces Affymetrix), qui pourra être exploité informatiquement en vue d'obtenir le profil d'expression génique de la lignée cellulaire ou du tissu étudié.

3. Transformer le fichier brut en fichier de données, et normaliser les données. Deux types de logiciels peuvent être utilisés [183]: les logiciels dédiés (Microarray Suite version 5.0 (MAS5) pour les biopuces Affymetrix pangénomiques), et les logiciels institutionnels pouvant exploiter les données issus de nombreuses biopuces (Robust Multi-array Average (RMA) étant le plus utilisé). Ces deux logiciels se basent sur des algorithmes différents et fournissent des résultats substantiellement différents. Néanmoins, aucun algorithme n'a pu démontrer sa supériorité [182,212].



La comparaison des données provenant de plusieurs biopuces nécessite une normalisation pour que les niveaux d'expression soient directement comparables. Les données doivent

être normalisées pour plusieurs raisons : quantités inégales d'ARN hybridées, différences en matière de marquage ou de détection, et biais systématiques entre les niveaux d'expression mesurés. Une première approche consiste à inclure des gènes dits "de ménage" qui sont supposés être exprimés de façon constitutive et relativement stable d'une expérience à l'autre. Une autre méthode consiste à supposer que la quantité totale d'ARNm cellulaire est constante [217].

## **V.5 Exploitation des données : analyse bioinformatique**

Une fois les profils d'expression obtenus, la seconde étape consiste à analyser informatiquement les données afin d'en tirer les conclusions biologiques relatives à l'expérience effectuée.

Plusieurs possibilités sont offertes, qui peuvent être réalisées de façon complémentaire pour une même analyse ou non :

- Comparaison non supervisée des profils d'expression : génération de matrices et dendrogrammes de distances ; regroupements (*clustering*) de gènes.
- Comparaison supervisée des profils d'expression : mise en évidence de gènes dont l'expression est régulée de façon différentielle dans la/les conditions testée(s) (maladie, résistance, ...).
- Enrichissement fonctionnel de gènes sélectionnés : mise en évidence de fonctions moléculaires ou cellulaires altérées dans la/les condition(s) testée(s) (maladie, résistance, ...).

### **V.5.1 Comparaison non supervisée des profils d'expression**

L'examen non supervisé des profils d'expression de façon correspond souvent à la première phase d'analyse de données transcriptomiques que les mathématiciens appellent «data exploration» et que les biologistes appellent "*data mining*". Le but de ce niveau d'analyse est la reconnaissance de tous les motifs ou structures non aléatoires nécessitant une exploration plus poussée [218].

Le profil d'expression génique de chaque condition biologique testée est ainsi comparé aux autres sans *a priori*. Cette démarche permet de classer et regrouper les conditions biologiques (échantillons) « proches », c'est-à-dire les conditions présentant un profil d'expression relativement similaire, en petits groupes homogènes. La hiérarchisation des conditions biologique et l'individualisation de groupes (un ou plusieurs groupes de conditions testées, incluant ou non la (les) condition(s) contrôle(s)) permet de formuler de premières hypothèses mécanistiques [218,219].

La comparaison non supervisée des profils d'expression présente l'avantage majeur de permettre de vérifier que l'expérience ne comporte pas de biais important. En effet, si les réplicats de chaque condition ne se regroupent pas, cela signifie que l'expérience comporte un biais qui est supérieur à la variation entre les conditions biologiques testées. Des lors, l'expérience est ininterprétable [212].

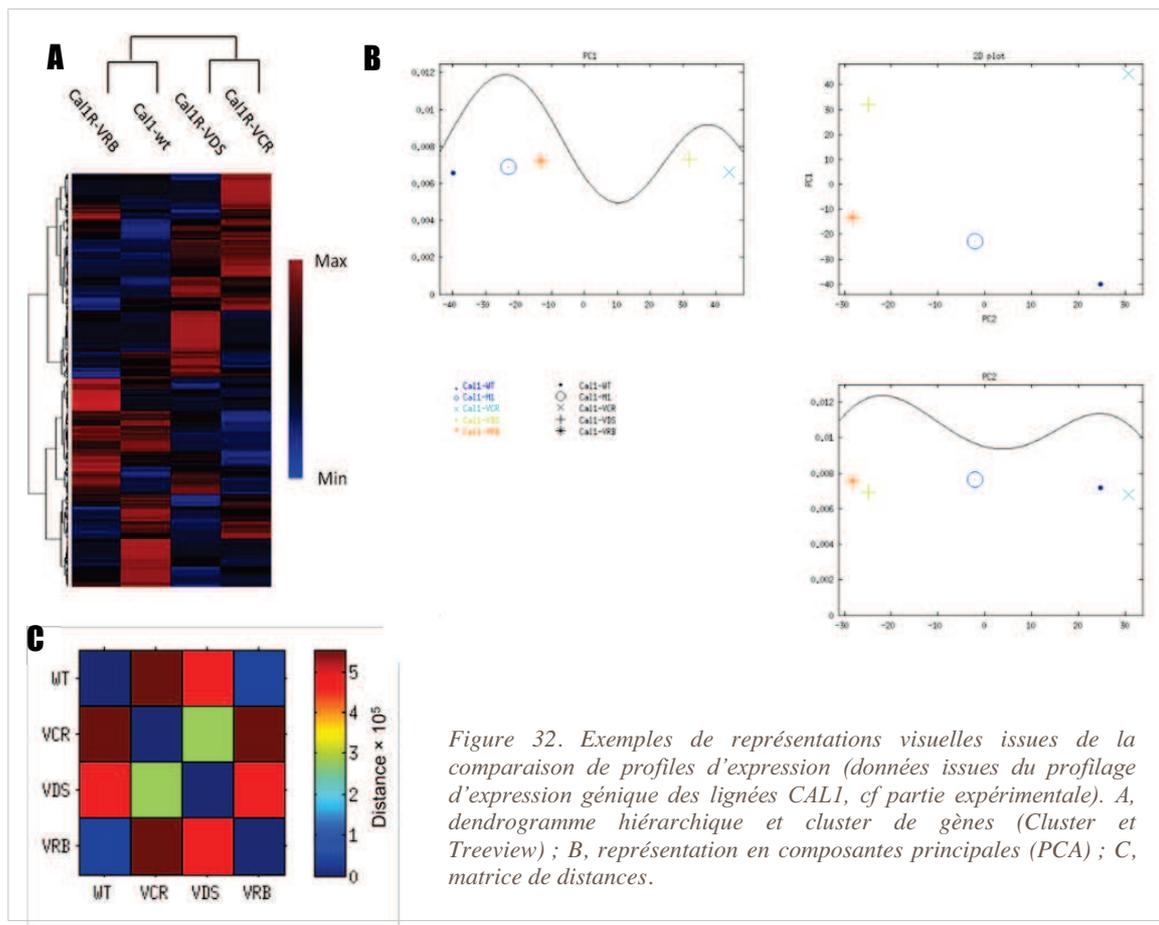
Une des stratégies classiques pour comparer des profils d'expression consiste à utiliser la classification hiérarchique, une approche couramment utilisée dans les expériences de phylogénie, couplée avec des représentations (matrice et/ou dendrogramme des distances) qui facilitent l'examen visuel des données [220] (Figure 27). Plusieurs études ont montré qu'il existe une co-régulation de la transcription des gènes codant pour des protéines d'une voie biochimique commune, fonctionnellement liées ou formant des complexes multi-protéiques. Cela a conduit à l'idée de base que les gènes ayant des profils d'expression similaires sont susceptibles d'être fonctionnellement liées [206]. Il est ainsi possible de regrouper les données provenant d'un ensemble de conditions biologiques (échantillons hybridés) et d'utiliser une stratégie de « *guilt by association* » (littéralement «culpabilité par association») pour identifier des groupes fonctionnels [221]. De cette manière, la fonction de gènes inconnus peut être prédite, et l'hypothèse peut ensuite être testée rigoureusement par des approches biochimiques classiques [193].

Un des logiciels les plus utilisés pour ce type d'analyse est la suite « Cluster et Treeview » [220,222]. Le logiciel Cluster permet de regrouper les gènes comme décrit précédemment et Treeview permet une visualisation du résultat sous forme de double dendrogramme des distances autour d'une carte thermique représentant le niveau d'expression de chaque gène dans chaque condition biologique (Figure 27). Les dendrogrammes des distances représentent d'un côté la hiérarchisation des conditions biologiques et de l'autre la hiérarchisation des gènes ou « *clustering* ». D'autres suites de logiciels proposent ce type d'approche : MultiExperiment Viewer (MeV), par exemple, est une suite complète open source pour l'interprétation des données de transcriptome.

Classiquement, ce type d'analyse se fait sur les 10 000 gènes les plus différentiellement exprimés entre les conditions biologiques. Cette convention part du principe que seuls les gènes dont l'expression est modifiée entre les différentes conditions biologiques sont pertinents pour la hiérarchisation de ces conditions, et que l'analyse de 10 000 transcrits est un bon reflet de ce qui se passe avec l'ensemble du transcriptome tout en permettant un temps d'analyse réduit. La plupart des logiciels se basent sur le signal d'expression pour construire les clusters de gènes, et non sur le  $\log_2$ , ce qui permet d'obtenir une plus grande variation d'expression et donc de mieux différencier les conditions testées (lors de l'analyse avec *a priori* et de l'enrichissement fonctionnel des données, le  $\log_2$  qui donne un poids égal à l'ensemble des signaux est préféré). Cependant, les signaux sont pondérés par la médiane, de sorte qu'on ne compare pas directement les signaux entre eux mais, pour chaque transcrit individuellement, un  $\text{ratio} = \text{signal} / \text{médiane de tous les signaux}$ . En d'autres termes les différences entre les conditions biologiques sont comparées de la

même façon, transcrit par transcrit, que ce transcrit soit globalement fortement exprimé ou non par rapport à l'ensemble du transcriptome.

La comparaison des profils d'expression peut aussi se faire sur un « point médian » résumant l'ensemble du profil d'expression de chaque condition. Les représentations générées sont alors soit des points sur un espace en trois dimensions (analyse en composante principale, PCA), soit une carte thermique en deux dimensions (matrice de distance) [223] (Figure 32).



D'autres approches mathématiques, plus ou moins complexes, peuvent être utilisées : *K means*, *self-organising maps* (SOMs) [224], *k nearest neighbour* (k-NN) [225], *significance of analysis of microarrays* (SAM) [226]. Le *clustering* peut aussi se faire selon une approche supervisée (support vector machine, SVM) [227]. Ces approches sont discutées dans la revue de Quackenbush J. « Computational analysis of microarray data » parue dans Nat Rev Genet en 2001 [228].

## V.5.2 Comparaison supervisée des profils d'expression

Après avoir récupéré les données de transcriptome, la seconde étape consiste à en extraire de l'information pour pouvoir transformer cette information en connaissance [229]. Ce processus d'exploitation des données commence classiquement par la comparaison des

profils d'expression génique et la sélection de gènes discriminants, c'est-à-dire de gènes dont l'expression est modifiée dans les conditions biologiques étudiées.

La plus simple des analyses consiste ainsi tout simplement à établir la liste de tous les gènes qui diffèrent entre les échantillons tests et contrôles. La plupart des chercheurs appliquent un seuil minimum global arbitraire : un ratio d'expression de 1,5 à 4 fois entre deux conditions est considéré comme biologiquement intéressant [193]. Néanmoins, ce seuil arbitraire est variable et ne peut être applicable à toute expérimentation. Par exemple, lors de l'étude de l'effet d'un agent anticancéreux, la réponse de la cellule à cet agent entraîne des modifications d'expression majeures. En revanche, lors de l'étude d'une maladie, les variations d'expression génique entre les cellules saines et les cellules malades sont en règle générale peut importantes. Une modification de l'expression de 1.5 fois peut alors être significative mais est difficile à différencier du bruit de fond du signal. Lorsque cela est possible, la réalisation de réplicats de l'expérience permet l'élimination des faux positifs grâce à l'utilisation de tests statistiques. Un t-test simple peut être utilisé pour déterminer la significativité entre le contrôle et le test. Cependant, dans la plupart des cas, plus de deux conditions sont testées et une analyse de la variance est nécessaire [230]. Dans certains cas, un test non paramétrique doit être utilisé. Par ailleurs, l'utilisation d'algorithmes plus complexes, tel que la méthode *Rank Difference Analysis of Microarrays* (RDAM) intégrant la sensibilité du test et le *false discovery rate* (FDR), permet d'extrapoler des données et ainsi de sortir les différences significatives d'expression du bruit de fond des signaux [231].

### **V.5.3 Enrichissement fonctionnel**

Le plus grand défi intellectuel dans l'utilisation des biopuces est d'extraire le sens et l'implication des données générées [229]. Comme les bases de données d'expression se développent, intégrant une quantité de plus en plus colossale d'informations, des méthodes de plus en plus sophistiquées et conviviales d'analyse sont nécessaires. Le «*Data mining*» a été défini comme «l'exploration et l'analyse, par des moyens automatiques ou semi-automatiques, de grandes quantités de données pour découvrir des caractéristiques significatives» [229]. Le «*data mining*» associé aux données des biopuces, pouvant inclure l'étape de *clustering*, est à ne pas confondre avec le «*data mining*» des bases de données d'interactions protéiques qui veut dire que l'information donnée (interaction entre deux protéines) est proposée parce que les deux protéines sont citées dans le même papier, sans lien fonctionnel nécessaire (ex : base de donnée *Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins*, STRING [232]).

Il existe deux approches générales pour l'extraction de données à partir de l'analyse de données d'expression à grande échelle [229,233]:



■ Le « test des hypothèses » est une approche « du haut vers le bas » dans laquelle l'induction ou la perturbation d'un processus biologique conduit à des résultats prévus, mais peut aussi révéler des phénomènes nouveaux. En d'autres termes, cette technique permet d'étiqueter les gènes sélectionnés avec leur fonction moléculaire.

■ La « découverte de connaissances » par l'analyse exploratoire des données est une approche « du bas vers le haut » dans laquelle les données sont autorisées à « parler pour elles-mêmes » après une étude statistique qui permet au final une visualisation des résultats. En d'autre terme, cette technique explore une liste de gènes discriminants précédemment sélectionnés pour en tirer les fonctions cellulaires ou moléculaires altérées (les

résultats associent un ensemble de gènes qui est défini par rapport à une fonction biologique).

Dans les deux cas, le succès de l'interprétation reposera sur l'intégration des données expérimentales avec des sources externes d'information [218].

### V.5.3.1 Le test des hypothèses: étiquetage des gènes discriminants avec leur fonction moléculaire

Cette méthode se base sur l'interrogation des bases de données répertoriant les connaissances en biologie moléculaire et cellulaire : Entrez Gene du NCBI [234] et Gene Ontologie [235] pour les plus connues. Les gènes sélectionnés sont étiquetés un à un, ce qui nécessite de ne traiter qu'un petit nombre de gènes à la fois. Ainsi, le test des hypothèses est la méthode de choix lorsque l'on veut donner du sens à un petit groupe de gènes identifié par une approche statistique puissante (exemple : recherche de marqueurs sur un grand nombre d'échantillons). Au-delà de quelques dizaines de gènes, la redondance des voies de signalisation et des fonctions biologiques fait que le nombre et le chevauchement des résultats fournis par ce type d'analyse deviennent trop importants pour permettre une compréhension satisfaisante de l'information.

### V.5.3.2 La découverte des connaissances : extraction des fonctions biologiques altérées

Les fonctions biologiques, qui intègrent de nombreuses fonctionnalités telles que le « *feed-back* », le « *feed-forward* », et la redondance, résultent généralement d'interactions complexes entre de nombreux composants. A titre d'exemple, la régulation transcriptionnelle est plus sophistiquée que la vision traditionnelle de simple « *on-off* » [221,236]. L'acquisition de suffisamment grands ensembles de données pour comprendre ces systèmes ou fonctions biologiques, complexes à l'échelle du transcriptome, est essentielle. En conséquence, l'analyse des données de transcriptome par la méthode « découverte des connaissances » nécessite des listes contenant de nombreux gènes discriminants (centaines à milliers). C'est le logiciel utilisé qui extraira l'information de ces listes en les confrontant aux bases internationales de connaissances. Typiquement, l'analyse se fait par comparaison de la liste de gènes issue de l'expérience avec l'ensemble du génome humain. Si, proportionnellement à la taille de la liste ou du génome, un groupe de gènes (définis pour leur appartenance à une même fonction biologique) est plus fortement représenté dans la liste que dans le génome, on dit que la fonction associée à ce groupe de gènes est « surreprésentée ». Cette approche permet ainsi de « découvrir » des hypothèses mécanistiques à l'origine du changement phénotypique retrouvé dans la condition étudiée par biopuce.

Une approche inverse, visant à vérifier si une fonction biologique donnée est surreprésentée dans la liste de gènes sélectionnés, peut aussi être réalisée par la méthode *gene set enrichment analysis* (GSEA) [237].

Ces approches se basent donc sur l'identification de fonctions biologiques qui définissent des groupes de gènes impliqués dans ces fonctions. La base de connaissances (ou « ontologie ») utilisée est donc principalement *Gene Ontology* (GO) [235] qui est issue du principal consortium international pour l'intégration des connaissances en génétique et biologie. Les données de GO sont des « termes », c'est-à-dire des groupes de gènes définis par leur appartenance à une fonction biologique. GO est le reflet de la complexité du vivant : cette base de connaissances comporte trois bases de données (*biological processes, molecular functions et cellular components*), chaque base de données hiérarchise les termes selon 12 niveaux du plus général au plus particulier. Les données contenues dans GO présentent donc un taux élevé de chevauchement ce qui rend difficile le questionnement « gène-à-gène » de cette base de connaissances. C'est pourtant la façon dont procèdent un grand nombre d'algorithmes contenus dans les logiciels dédiés à l'interrogation de GO (comme FatiGO [238]). Pour réellement tirer parti du nombre d'informations contenues dans GO des algorithmes plus complexes basés sur des approches mathématiques bayésiennes doivent être utilisés (par exemple l'algorithme *model-based gene set analysis*, MGSA [239], du logiciel Ontologizer [240]).

Le logiciel Ingenuity Pathway Analysis (IPA) est une alternative à l'utilisation de GO. La force de ce logiciel réside dans ses multiples bases de données internes et dans la puissance des algorithmes mathématiques utilisés. Le problème est le coût élevé de sa licence.

L'ensemble des logiciels disponibles pour l'enrichissement fonctionnel des données de transcriptome est détaillé dans la revue de Huang DW, Sherman BT, et Lempicki RA « *Bioinformatics enrichment tools: paths toward the comprehensive functional analysis of large gene lists* » publiée dans *Nucleic Acids Res* en 2009 [241].

### **V.5.3.3 Bases de données intégratives et transversales**

La myriade d'interactions entre les molécules simples, les circuits de régulation, et les différentes voies de signalisation dans les cellules normales et malignes, rendent la compréhension de la biologie du cancer si compliquée qu'une nouvelle discipline appelée «biologie des systèmes» a été consacrée à l'intégration de toute cette information [242].

Le premier groupe de travail sur la « biologie des systèmes » en cancérologie est le "Human Cancer Genome Project" de l'Institut national du cancer (NCI) des États-Unis (voir <http://www.genome.gov/Pages/About/NACHGR/May2005NACHGRAgenda/ReportoftheWorkingGrouponBiomedicalTechnology.pdf>), qui est devenu par la suite « The Cancer Genome Atlas » (TCGA). En parallèle, un International Cancer Genome Consortium a été lancé pour associer des chercheurs au niveau international [190].

Puis, des projets intégratifs de bases de données biologiques, chimiques et pharmacologiques se sont développés [185]. Ces projets visent à intégrer les caractéristiques moléculaires issues du profilage d'expression génique de très nombreuses lignées cellulaires cancéreuses et les données pharmacologiques d'agents anti-cancéreux, déjà disponibles ou en développement. Ces projets permettent donc de révéler les liens entre profil génétique et sensibilité aux médicaments.

Deux projets majeurs sont en développement :

- Le DTP Developmental Therapeutics Program du NCI/NIH [243]
- Le projet du Broad Institute [244]

Cette dernière approche a donné naissance à des projets de plus petite ampleur, visant à rassembler et à partager les connaissances sur un type de cancer. Ainsi, le *Melanoma Molecular Map Project* (MMMP) est « une multi-base de données interactive pour la recherche sur la biologie et le traitement du mélanome ». En plus d'un descriptif détaillé du MM (épidémiologie, facteurs de risque, techniques de diagnostic, thérapies, etc.), ce site comporte des bases de données et outils permettant une intégration transversale des données issues de tout type de recherche sur le MM :

- Targeted Therapy Database : base de données sur les thérapies ciblées, les protéines exprimées dans le mélanome et leur implication en thérapeutique (sensibilisation ou résistance aux thérapies, études, auteurs, modèles, niveau de preuve).

- Biomaps : base de données de voies de signalisation (descriptifs et schémas d'interactions protéiques).
- Biocards : base de données de biomolécules exprimées dans le MM (expression, fonction, valeur pronostique, altérations, implications en thérapeutique).
- Melanoma Molecular Profile : base de données de l'ensemble des biomolécules altérées dans le mélanome.
- Drug Development Database : base de données de molécules thérapeutiques en développement (identification, mécanisme d'action, résultats cliniques, interactions avec d'autres molécules thérapeutiques, interaction avec des biomolécules).

# Partie expérimentale

---



# **Axe de recherche I**

---

**Etude des mécanismes  
moléculaires de résistance  
différentielle acquise du MM aux  
vinca-alcaloïdes (VAs) par une  
approche transcriptomique**

---



# **I Article 1: Differential involvement of glutathione S-transferase mu 1 and multidrug resistance protein 1 in melanoma acquired resistance to vinca alkaloids**

---

**Fundam Clin Pharmacol. 2014 Oct 6. doi: 10.1111/fcp.12093.**

ATTAOUA Chaker <sup>a</sup>, VINCENT Laure-Anaïs <sup>a</sup>, ABDEL JAOUEDAida <sup>a</sup>, HADJ-KADDOUR Kamel <sup>a</sup>, BAÏ Qiang <sup>b</sup>, DE VOS John <sup>b,c</sup>, VIAN Laurence <sup>a</sup>, CUQ Pierre <sup>a\*</sup>

a Laboratoire de Toxicologie du Médicament, Institut des Biomolécules Max Mousseron (UMR5247), UFR des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques, Université Montpellier I, 15 avenue Charles Flahault, BP14491, 34093 Montpellier Cedex 05, France

b Institut de Recherche en Biothérapie, Hôpital Saint-Eloi, 80 avenue Augustin Fliche, 34295 Montpellier Cedex 5, France

c CHU Montpellier, Unit for Cell Therapy, Hôpital Saint-Eloi, Montpellier, F34000 France ; INSERM, U1040, Montpellier, F34000 France

**Key words:** glutathione S-transferases; multidrug resistance proteins; vinca alkaloids; melanoma

## **I.1 Contexte et problématique**

Les vinca-alcaloïdes (VAs) constituent l'ensemble des alcaloïdes anticancéreux extraits de *Vinca rosea* (vincristine (VCR), vinblastine (VBL) et vindésine (VDS)) et de leurs analogues d'hémisynthèse (vinorelbine (VRB), vinflunine (VFL)). Leur propriété d'inhibition de la polymérisation des microtubules leur confère un puissant pouvoir antimitotique (cytotoxique à forte dose) utilisé dans le traitement de nombreuses tumeurs hématologiques et solides [245,246]. Ainsi trois de ces molécules (VCR, VDS et VRB) ont une place centrale dans le traitement du MM, notamment pour les patients ne portant pas d'altération moléculaire contre laquelle une thérapie ciblée est disponible, ou pour les patients en rechute après l'utilisation de ces thérapies ciblées [3].

Cette première étude sur la résistance différentielle du MM aux VAs se base sur les précédents travaux du laboratoire ayant montré que la GSTM1 doit agir en synergie avec la MRP1 pour protéger efficacement les cellules CAL1- $\mu$ 1 (cellules humaines de MM CAL1 transfectées de façon stable avec le gène GSTM1) des effets toxiques induits par la VCR [94]. Pour étudier le rôle de ces protéines dans la résistance acquise du MM aux VAs, un modèle de lignées cellulaires de MM résistantes aux VAs (CAL1R-VAs) a été établi (exposition continue, 12 mois, de la lignée parentale CAL1-wt à la VCR, la VDS ou la VRB : CAL1R-VCR, CAL1R-VDS et CAL1R-VRB respectivement). Cette étude a démontré l'implication différentielle de la MRP1 et de la GSTM1 dans la résistance acquise des cellules CAL1 aux VAs, suggérant une résistance différentielle de ces cellules aux VAs : d'une part à la VCR et à la VDS, d'autre part à la VRB. Afin de confirmer cette hypothèse, une comparaison des profils transcriptomiques des lignées CAL1 (parentale et résistantes) a été réalisée.

Ma contribution à cette étude porte sur l'analyse des données de biopuces.

## **I.2 Article**

ORIGINAL  
ARTICLE

## Differential involvement of glutathione S-transferase mu 1 and multidrug resistance protein 1 in melanoma acquired resistance to vinca alkaloids

Chaker Attaoua<sup>a</sup>, Laure-Anaïs Vincent<sup>a</sup>, Aida Abdel Jaoued<sup>a</sup>, Kamel Hadj-Kaddour<sup>a</sup>, Qiang Bai<sup>b</sup>, John De Vos<sup>b,c</sup>, Laurence Vian<sup>a</sup>, Pierre Cuq<sup>a\*</sup><sup>a</sup>Laboratoire de Toxicologie du Médicament, Institut des Biomolécules Max Mousseron (UMR5247), UFR des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques, Université Montpellier I, 15 avenue Charles Flahault, BP14491, Montpellier 34093, France<sup>b</sup>Institut de Recherche en Biothérapie, Hôpital Saint-Eloi, 80 avenue Augustin Fliche, Montpellier 34295, France<sup>c</sup>CHU Montpellier, Unit for Cell Therapy, Hôpital Saint-Eloi, INSERM, U1040, Montpellier F34000 France**Keywords**

glutathione S-transferases, melanoma, multidrug resistance proteins, vinca alkaloids

Received 18 July 2014;  
revised 15 September 2014;  
accepted 29 September 2014\*Correspondence and reprints:  
pierre.cuq@univ-montp1.fr**ABSTRACT**

On account of its extreme intrinsic resistance to apoptosis and of its strong ability to become chemoresistant after a primary response to drugs, malignant melanoma (MM) is still a therapeutic challenge. We previously showed that glutathione S-transferase mu 1 (GSTM1) acts in synergy with multidrug resistance protein 1 (MRP1) to protect GSTM1-transfected human CAL1 melanoma cells from toxic effects of vincristine (VCR). Herein, we investigated the role of these proteins in the acquired resistance of CAL1 cells to vinca alkaloids (VAs). Resistant lines were established by continuous exposure (>1 year) of parental CAL1-wt cells to VCR, vindesine (VDS), or vinorelbine (VRB): CAL1R-VCR, CAL1R-VDS, CAL1R-VRB, respectively. All resistant lines displayed more than 10-fold increase in resistance to their selection VA, and specifically expressed GSTM1. Suggesting a direct interaction between this protein and VAs, each VA specifically decreased the GSTM1-mediated glutathione conjugation activity in cell lysates. Curcumin (GSTM1 inhibitor), BSO (glutathione synthesis inhibitor), and MK571 (MRP1 inhibitor) considerably reversed the acquired resistance to VCR and VDS, but not to VRB. Microarray data analysis revealed similar gene expression patterns of CAL1R-VCR and CAL1R-VDS, and a distinct one for CAL1R-VRB. These data suggest a differential involvement of GSTM1 and MRP1 in acquired resistance to VAs. A coordinated expression and activity of GSTM1 and MRP1 is required to protect CAL1 cells from VCR and VDS, while the simple expression of GSTM1 is sufficient, possibly by a direct drug/protein interaction, to confer resistance against VRB.

**INTRODUCTION**

Malignant melanoma (MM) is the most aggressive form of skin cancer, and its incidence is increasing all over the world [1]. While early stages of MM can be successfully treated by opportune and adequate surgical

excision of the malignancy, advanced stages are very refractory to therapies [2]. Lately, MM tumors were classified into molecular subtypes, and new strategies were developed: targeted therapies (kinase inhibitors), specifically targeting some specific molecules or pathways expressed in these malignant cells [3–5], and

immunotherapies stimulating immune response against MM [6,7]. Nevertheless, the conventional chemotherapy (antitubulin agents, alkylating agents, etc.) is still used in palliation of the disease, and in combination regimens, it could lead to 45% of response rate in metastatic MM [2].

Antitubulin agents, more precisely vinca alkaloids (VAs), are among the most active drugs for treatment of different cancers, including MM [8,9]. VAs are natural products (e.g., VCR) or semisynthetic derivatives (e.g., VDS and VRB) obtained from the pink periwinkle plant *Catharanthus roseus*, and whose cytotoxicity mechanisms are due to their interactions with tubulin and disruption of microtubule function [10]. In the treatment of metastatic MM, VAs are used either in single-agent chemotherapy with low overall response (12–26%) and limiting toxicities or, with an increased response rate (up to 45%), in multidrug combinations [2,11].

Unfortunately, MM is a chemotherapy-resistant tumor, and the currently available treatment options for patients with advanced stages of the disease remain limited and non-curative in most cases [12]. MM chemoresistance may be either preexistent, because of intrinsic survival characteristics of the paternal melanocytes supported by additional alterations manifested during tumor progression or triggered by drugs (acquired resistance) even after initial responses are observed [13]. A motivation for studying mechanisms of drug resistance is that it may suggest new therapeutic targets or rational combination strategies that delay or prevent the emergence of drug-resistant clones [14].

As for MM resistance to VAs, it has been shown that GSTM1 must act in synergy with MRP1 to efficiently protect CAL1- $\mu$ 1 cells (human MM CAL1-wt cells stably transfected with GSTM1 gene), from toxic effects of VCR [15]. GSTs are enzymes that catalyze the conjugation of electrophilic compounds, including anticancer drugs, with the cellular glutathione (GSH). The expression of high levels of these enzymes was reported to mediate tumor resistance to treatment [16–18]. However, GST overexpression is not always sufficient to confer significant protection against electrophilic drugs. In many cases, including MM, GSTs have to be coexpressed with MRPs (drug efflux pumps involved in cell detoxification), particularly MRP1 and MRP2, to protect cells from anticancer agents [15,19–22].

Herein, we studied the involvement of GSTM1 and MRP1 in MM acquired resistance to VAs. Therefore, we developed VA-resistant cell lines from parental

CAL1-wt cells by continuous exposure to VCR, VDS, or VRB. The established lines, exhibiting high levels of resistance to their selection VAs, were subsequently analyzed to search for the involvement of GSTM1 and MRP1 in this acquired phenotype. Finally, we investigated the gene expression patterns of parental and resistant CAL1 lines through a pangenomic study using microarray technology.

## MATERIALS AND METHODS

### Drugs and chemicals

VCR (100  $\mu$ M in H<sub>2</sub>O), VDS (100  $\mu$ M in H<sub>2</sub>O), VRB (100  $\mu$ M in H<sub>2</sub>O), 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB; 100 mM in ethanol), GSH (100 mM in H<sub>2</sub>O), ethacrynic acid (EA; 2.5 mM in H<sub>2</sub>O), curcumin (2.5 mM in ethanol), and DL-buthionine-(S,R)-sulfoximine (BSO; 5 mM in H<sub>2</sub>O) were from Sigma-Aldrich (St Quentin-Fallavier, France), and MK571 (10 mM in H<sub>2</sub>O) was purchased from Biomol International (Le Perray en Yvelines, France).

### Cell lines

CAL1 human MM cells were grown at 37 °C in a fully humidified 5% CO<sub>2</sub> atmosphere, in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% fetal calf serum. Parental CAL1 cells (CAL1-wt), established from metastasis of MM [23], expressed specific markers of the tumor, as MelanA, MAGE1, tyrosinase, and NA17 [15]. Vinca alkaloid-resistant CAL1 cells (CAL1R-VAs) were produced by continuous exposure, for more than 1 year, of CAL1-wt cells to IC<sub>50</sub> (4 nM) of VCR, VDS, or VRB.

### Analysis of GST and MRP expression

#### RT-PCR

Extraction of total cellular RNA was carried out using TRIzol reagent (Invitrogen; Villebon sur Yvette, France), and expression levels were assessed by RT-PCR using standard procedures and specific primers [15] (Table I). PCR products were run on agarose gels supplemented with ethidium bromide and visualized by ultraviolet illumination.

#### Western blot analysis

To assess expression of GSTs and MRPs, cells were washed with PBS, and then incubated for 5 min at 4 °C with RIPA lysis buffer (Sigma-Aldrich). Thereafter, lysates were centrifuged at 8000 *g* during 10 min at 4 °C, then supernatants recovered and frozen

**Table I** PCR primers, amplicon sizes, and number of amplification cycles.

Genes	Direction	Primer Sequences (5' → 3')	Amplicon (base pairs)	Number of cycles
β-actin	Forward	GGCATCGTGATGGACTCCG	650	23
	Reverse	GCTGGAAGGTGGACAGCGA		
GSTA1	Forward	CCTGCCTTTGAAAAAGTCTTAAAG	90	30
	Reverse	AAGTTCCACCAGATGAATGTCA		
GSTP1	Forward	CTCACTCAAAGCCTCCTGCCTAT	85	27
	Reverse	CAGGATGGTATTGGACTGGTACAG		
GSTM1	Forward	CTGGGCATGATCTGCTACAATC	136	32
	Reverse	CAAAAGTGATCTTGTTCTGCAA		
MRP1	Forward	GGACCTGGACTTCGTTCTCA	292	35
	Reverse	CGTCCAGACTTCTTCATCCG		
MRP2	Forward	CTGCCTCTTCAGAATCTTAG	241	35
	Reverse	ATAACCCAAAGTTGCAGGCT		
MRP3	Forward	CTCAATGTGGCAGACATCGG	178	35
	Reverse	GGGAGCTCACAAACGTGTGC		
MRP4	Forward	CCATTGAAGATCTTCTGG	240	35
	Reverse	GGTGTCAATCTGTGTGCA		
MRP5	Forward	GGGATAACTTCTCAGTGGGG	383	35
	Reverse	GGAATGGCAATGCTCTAAAG		

at  $-80^{\circ}\text{C}$ . Quantification of isolated proteins was performed according to Bradford method [24]. Twenty micrograms of extracted proteins were subjected to electrophoresis on 12% SDS-polyacrylamide gel. Proteins were transferred onto nitrocellulose membranes. The membranes were allowed to soak overnight at  $4^{\circ}\text{C}$  in 5% TBS-Tween20 (0.1%) containing 5% of milk. Next day, the membranes were washed with a TBS-Tween20 (0.1%) solution, and then incubated for 2 h with specific rabbit polyclonal primary antibodies anti-GST P1 or M1, 1 : 500 (Novocastrat-Tebu, Le Perray en Yvelines, France), mouse monoclonal primary antibody anti-β-actin 1 : 1000 (Sigma-Aldrich) or mouse and rat monoclonal primary antibodies (1 : 50) anti-MRP1 and MRP5, respectively (Monosan-Tebu, Le Perray en Yvelines, France). After that, membranes were incubated with secondary antibodies (anti-rabbit, anti-rat, or anti-mouse) peroxidase-conjugated 1 : 5000 (Sigma-Aldrich) for GSTs, MRPs, and β-actin detection. Specific proteins were visualized using X-ray films after incubation with enhanced chemiluminescence reagents (Amersham Biosciences, Orsay, France).

### Cytotoxicity assay

The effect of anticancer agents on cell viability was assessed using neutral red uptake (NRU) assay as previously described [15]. Briefly, aliquots of cell suspension ( $10^4$  cells/well) were seeded in 96-well microtiter plates and incubated for 24 h at  $37^{\circ}\text{C}$ . Thereafter,

cells were exposed to VCR, VDS, or VRB for 4 h at  $37^{\circ}\text{C}$  in DMEM supplemented with 1% FCS. When used, curcumin, MK571, and EA were added 15 min before exposure, while BSO was added 48 h before exposure; then, all were co-incubated with VA. After 72 h of incubation, cells were washed with PBS and 150 μL of neutral red solution (50 μg/mL of DMEM) was added in each plate well. After 3 h at  $37^{\circ}\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ , cells were washed with PBS and destained with 150 μL of glacial acetic acid (1%)/ethanol (50%) (v/v). Absorbance was measured at 540 nm using a microplate reader (Labsystems Multiscan MS; PAA, Farnborough, UK). The effect of the drugs on cell survival was expressed as a percentage of viability of treated cells compared with control ones. In accordance with the dose-response curves, the concentration of VA corresponding to 50% of cell viability ( $\text{IC}_{50}$  value) was estimated.

### Functional analysis of total GST activity

Evaluation of GST activity was performed as follows: cells were lysed in PBS, pH 6.5, by three freezing (in liquid nitrogen)/defrosting ( $37^{\circ}\text{C}$ ) cycles, and cytosols were recovered by centrifugation at  $4^{\circ}\text{C}$  for 10 min at 4000 g. The total GST activity was measured using CDNB as substrate [25]. Conjugation of reduced GSH to CDNB at  $25^{\circ}\text{C}$  and pH 6.5 was monitored spectrophotometrically at 340 nm. When used, VAs (VCR, VDS and VRB: 4 nM) and curcumin (30 μM)

were added, respectively, 4 h and 15 min before cell lysis, to cell culture medium and to the reaction mixture during GSH conjugation determination.

### Affymetrix GeneChip hybridization

To highlight the impact of VA-mediated selection on gene expression pattern, we performed a pangenomic transcriptome analysis on parental (CAL1-wt) and VA-selected (CAL1R-VCR, CAL1R-VDS, CAL1R-VRB) CAL1 cells, using Affymetrix Human Genome U133 Plus 2.00 GeneChips (Wooburn Green, UK). These microarrays contain more than 54 000 probe sets each and provide complete coverage of the human genome. Total RNAs were extracted using TRIzol reagent (Invitrogen) according to the manufacturer's protocol. The quality of purified RNA samples was checked with Agilent Bio-Analyzer (Agilent Technologies, Massy, France), and then total RNA from each cell line was prepared for hybridization according to the manufacturer's protocol. Expression profiles were, thereafter, created by scanning microarrays in the Affymetrix GeneChip Scanner 3000 7G.

### Data analysis and filtering

Microarray data were normalized and analyzed using Microarray Affymetrix Software 5.0 (MAS5) algorithm of Affymetrix Expression Console v1.1 (Affymetrix). MAS5 used Wilcoxon's test to label each transcript as 'present (P),' 'marginal (M),' or 'absent (A)' in cell lines, then a *P*-value risk was associated with each signal intensity. Fold changes were calculated by comparing transcript expression levels between each CAL1R-VA line and CAL1-wt one. Thereafter, transcripts were hierarchically classified according to the coefficients of variation (CV) of their signal intensities between all CAL1 cells (R and wt):  $CV = SD/mean$  (SD: standard deviation; mean: mean expression level of a transcript in all CAL1 cell lines). The 10 000 transcripts with highest CV values (> 20%) were considered as the most affected by cell exposure to VAs, and selected for the bioinformatic analysis.

### Hierarchical clustering (Cluster and TreeView)

Gene expression pattern of each CAL1 cell line was established using Cluster (v 3.0) and TreeView (v 1.60) softwares [26,27]. This integrated pair of programs provides computational and graphical environment for analyzing microarray experiment data. While Cluster software organized and analyzed data, TreeView

graphically browsed clustering results and generated hierarchical map.

## RESULTS

### Targeted study

#### *Sensitivity of selected CAL1R-VAs cells to VAs*

Chemotherapeutic drugs can affect different cellular functions including cell cycle and viability. To determine the impact of the continuous exposure (>1 year) of CAL1-wt cells to VCR, VDS, and VRB on their sensitivity to these VAs, we used the neutral red uptake assay (see 'Materials and Methods'). Table II shows that exposure to VAs significantly increased the resistance of CAL1R-VCR, CAL1R-VDS, and CAL1R-VRB (10, >100, and 10.5 times, respectively) to their selection agent (VCR, VDS, and VRB, respectively). In addition, each of these resistant lines developed a cross-resistance to all other VAs, by factors  $\geq 10$ , regarding CAL1-wt (Table II).

#### *Expression of GSTs and MRPs in CAL1R-VAs*

We previously reported, using CAL1-wt cells stably overexpressing GSTM1 after gene transfection, that GSTM1 and MRP1 are required to efficiently protect MM cells from VCR effects [15]. In this paper, we searched for a possible involvement of these proteins in acquired resistance to VAs. We first looked at the expression of GSTs and MRPs in VA-selected cells, both at mRNA (RT-PCR) and protein (Western blot) levels, in comparison with those in their parental counterpart (CAL1-wt). As shown in Figure 1, RT-PCR experiments revealed the expression, at comparable levels, of GSTP1, MRP1, and MRP5, and the absence of GSTA1, MRP2, MRP3, and MRP4 mRNAs in all cell lines

**Table II** VA sensitivities of CAL1 parental (CAL1-wt) and resistant to VCR (CAL1R-VCR), VDS (CAL1R-VDS), and VRB (CAL1R-VRB) cells.

Vinca alkaloids	IC <sub>50</sub> values (nM)			
	CAL1-wt	CAL1R-VCR	CAL1R-VDS	CAL1R-VRB
Vincristine	4	40 (×10)	>100	46 (×11.5)
Vindesine	4	49 (×12.25)	>100	40 (×10)
Vinorelbine	4	54 (×13.5)	>100	42 (×10.5)

IC<sub>50</sub> values were determined as described in 'Materials and Methods'. Resistance factors (IC<sub>50</sub> of drug in resistant cell line/IC<sub>50</sub> of drug in CAL1-wt) are mentioned in brackets when they can be calculated. Data are means  $\pm$  SEM of three separate experiments.

(CAL1-wt and CAL1R-VAs) whereas the GSTM1 mRNA was only detected in VA-resistant cells (CAL1R-VCR, R-VDS, and R-VRB). This mRNA expression pattern was confirmed at the protein level (Figure 1): GSTP1, MRP1, and MRP5 were expressed in all cell lines (CAL1-wt and CAL1R-VAs) while GSTM1 was exclusively expressed in resistant cells.

To assess the functionality of this GSTM1, exclusively expressed in selected CAL1R-VAs, the total GST activity was determined in cell lysates as described in 'Materials and Methods.' A significant GSH conjugation activity (~66 nmol CDNB/min/mg protein), due to GSTP1 expression, was measured in CAL1-wt cell lysates. As shown in Figure 2, the total GST activity has significantly increased (about 2-fold) in all VA-resistant cell lysates regarding their parental counterpart.

To ensure that this significant increase was due to GSTM1 expression, the total GST activities of parental (CAL1-wt) and selected (CAL1R-VAs) cells were determined in the presence of curcumin, a selective GSTM1 inhibitor [22]. As expected, curcumin had no effect on the total GSTP1-mediated, GSH conjugation activity of CAL1-wt lysates (Figure 2). Contrariwise, this GSTM1 inhibitor significantly reduced the total GST activity of VA-resistant cell lysates; the remaining activity was due to the curcumin insensitive GSTP1, expressed in VA-selected cells as well as in parental ones. Taken together, these data indicated the expres-

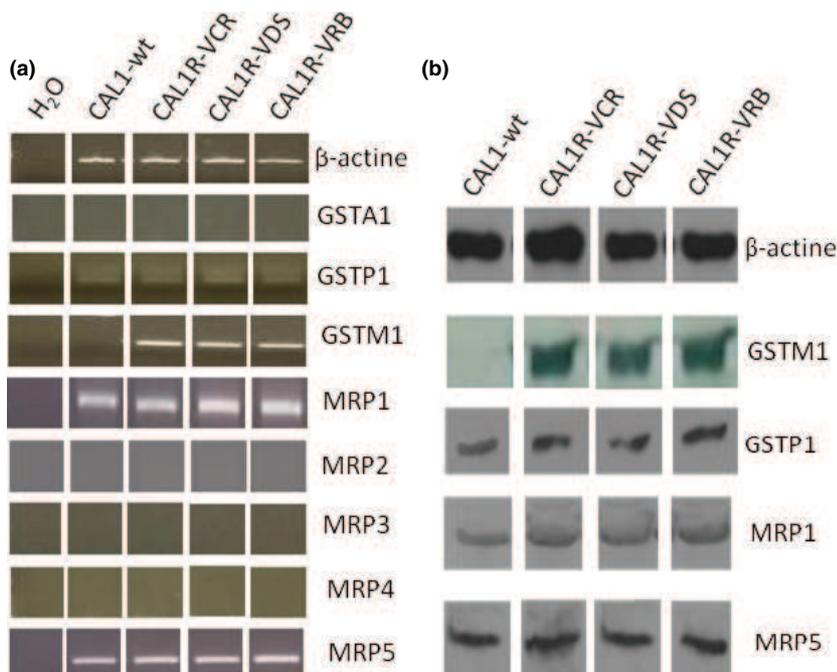
sion on a functional GSTM1 in all VA-resistant CAL1 cells.

#### Involvement of GSTM1 in the acquired resistance to VAs

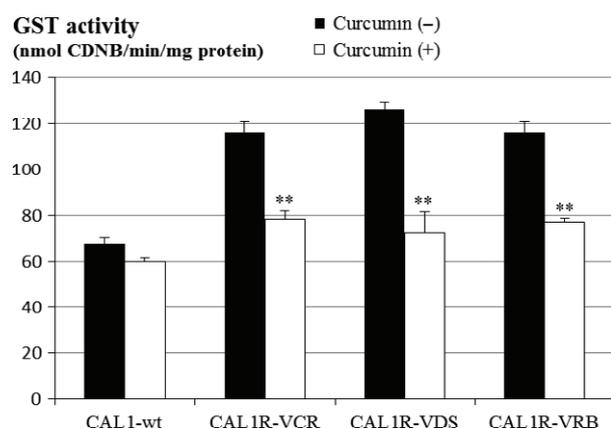
To study whether GSTM1 activity was required in CAL1R acquired resistance to VAs, we tested whether inhibition of the GSTM1 activity by curcumin (see above) would reverse cell resistance to selection VAs (e.g., VCR for CAL1R-VCR). As shown in Table III, curcumin induced a significant sensitization of CAL1R-VCR and CAL1R-VDS to VCR (2.6-fold) and VDS (>4-fold), respectively, whereas it had no effect on CAL1R-VRB sensitivity to VRB.

GST conjugation activity needs GSH. To confirm the requirement of GSH conjugation for the GSTM1-mediated resistance of CAL1R-VCR and CAL1R-VDS cells to VCR and VDS, respectively, we evaluated the sensitivity of each resistant line to its selection VA in the presence of BSO, a GSH synthesis inhibitor [15,28], to deplete cellular GSH before exposure to anticancer drugs. As shown in Table III, BSO significantly increased CAL1R-VCR and CAL1R-VDS sensitivities to VCR (3.4-fold) and VDS (>5-fold), respectively, whereas it had no effect on CAL1R-VRB sensitivity to VRB.

GSTP1 was expressed, at the same level, in both parental CAL1-wt and selected CAL1R-VAs. EA, a selective inhibitor of GSTP1 [19,29], had any effect on the VA sensitivity of both parental (data not shown)



**Figure 1** Expression of GSTs and MRPs in CAL1 lines. mRNAs and proteins were extracted from parental (CAL1-wt), and resistant to VCR (CAL1R-VCR), VDS (CAL1R-VDS), and VRB (CAL1R-VRB) cells. (a): RT-PCR; (b): Western blot.



**Figure 2** Effect of curcumin on total GST activity. Proteins were extracted from parental (CAL1-wt), and resistant to VCR (CAL1R-VCR), VDS (CAL1R-VDS), and VRB (CAL1R-VRB) CAL1 cells, and their GST activity was assessed in the absence (black) or presence (white) of curcumin (GSTM1 inhibitor). GST activities are expressed in nmoles of conjugated CDNB/min/mg of protein. Data are means  $\pm$  SEM of three separate experiments. \*\* $P < 0.01$  according to Student's *t*-test comparing values obtained in studied cells with those obtained in the absence of curcumin.

and VA-resistant cells (Table III). None of the inhibitors used (curcumin, BSO, EA) had any effect on cell viability when used alone (data not shown). Therefore, while GSTM1 expression and activity were required to protect selected cells against VCR and VDS, only GSTM1 expression seemed to be sufficient to efficiently protect cells against VRB.

It was previously reported that, in addition to their GSH conjugation activity, GSTs could contribute to drug resistance by simple drug/protein interactions keeping drugs away from their molecular targets

**Table III** Effects of inhibitors of GSTM1 (curcumin), GSTP1 (EA), GSH synthesis (BSO), and MRP1 (MK571) on the sensitivity of CAL1R-VCR, CAL1R-VDS, and CAL1R-VRB cells to their selection agents (VCR, VDS, and VRB, respectively).

Inhibitors	Fold sensitization		
	CAL1R-VCR	CAL1R-VDS	CAL1R-VRB
Curcumin	2.6*	>4*	0.8
BSO	3.4*	>5*	1.1
EA	1.1	1	0.8
MK571	2.4*	>10*	1

Fold sensitization =  $IC_{50}$  of drug in the absence of inhibitor/ $IC_{50}$  of drug in the presence of inhibitor. Data are means  $\pm$  SEM of three separate experiments.

\* $P < 0.01$  (Student's *t*-test).

[30,31]. Therefore, we wondered whether such a direct interaction could explain the protective role of GSTM1 against VAs without enzyme activity, nor GSH requirement.

To evidence a direct interaction between GSTM1 and VAs, we measured total GST activities of CAL1R-VA cell lysates in the presence of their selection agents. As shown in Figure 3, the total GST activity in resistant cells was reduced to that of their parental CAL1-wt cell counterpart when lysates were incubated in the presence of VAs. On the other hand, none of the VAs had any effect on the total GST activity in CAL1-wt cell lysates (Figure 3). Taken together, these data indicated a possible direct and selective interaction between GSTM1 and VAs.

#### Involvement of MRP1 in the acquired resistance to VAs

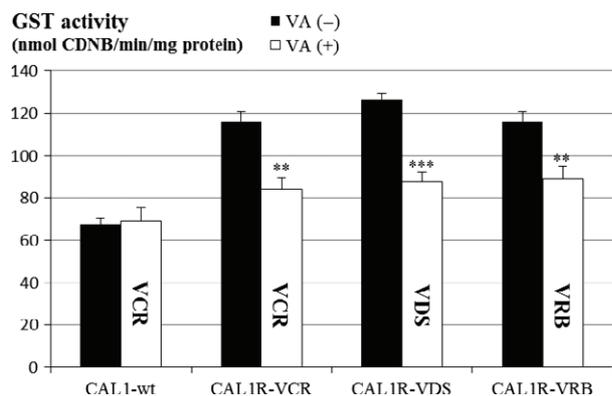
To investigate the involvement of MRP1, equally expressed in parental and selected CAL1 cells (see above), cells were pretreated with MK571, a selective inhibitor of MRP1 [19,32] before exposure to antineoplastic agents. As shown in Table III, MK571 significantly increased the sensitivity of CAL1R-VCR and CAL1R-VDS to their selection VA (2.4- and >10-folds, respectively), whereas it had any effect on CAL1R-VRB response to VRB. MK571 was devoid of effect on cell viability when used alone (data not shown). Therefore, MRP1 activity was required to efficiently protect cells against VCR and VDS, but not against VRB.

Taken together, these data suggested the combined requirement of GSTM1 and MRP1 activities in the detoxification process against VCR and VDS whereas only the expression of GSTM1 was required to protect cells from VRB.

#### Pangenomic study

To better understand the differential molecular mechanisms underlying this acquired resistance to VAs, we explored the transcriptomes of parental CAL1-wt and selected CAL1R-VA cells using Affymetrix<sup>®</sup> HG-U133 Plus 2.00 microarrays; these microarrays provide complete coverage of the human genome (>38 000 human genes) and an absolute measure of gene expression. RNA extraction, hybridization, normalization, filtering, and presentation of data were performed as described in 'Materials and Methods.'

To search for genes whose expression levels were highly modified by continuous exposure to VAs, we first eliminated, from the microarray data, all the tran-



**Figure 3** Effect of VAs on total GST activity. Proteins were extracted from parental (CAL1-wt), and resistant to VCR (CAL1R-VCR), VDS (CAL1R-VDS), and VRB (CAL1R-VRB) CAL1 cells, and their GST activity was assessed in the absence (black) or presence (white) of selection VAs (VCR, VDS, and VRB). GST activities are expressed in nmoles of conjugated CDNB/min/mg of protein. Data are means  $\pm$  SEM of three separate experiments. \*\* $P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.001$  according to Student's *t*-test comparing values obtained in studied cells with those obtained in the absence of VAs.

scripts that were not expressed neither in CAL1-wt nor in CAL1R-VAs cells. Thus, we highlighted 30 588 transcripts present, at least, in one of the studied cell lines. Calculated coefficients of variation (CVs) of these transcripts ranged from 0.43% to 150%. The 10 000 transcripts with the highest CVs ( $> 20\%$ ), considered as the most relevant to MM acquired resistance to VAs, were selected and submitted to clustering analysis using Cluster and TreeView softwares. As shown in Figure 4, the gene expression patterns of CAL1R-VCR and CAL1R-VDS were similar, and quite distinct from that of CAL1R-VRB, which was itself closer to that of parental CAL1-wt cells. These data showing differential molecular behavior of on one hand CAL1R-VCR and CAL1R-VDS cells, on the other hand CAL1R-VRB cells confirmed our targeted study (see above) showing a differential involvement of GSTM1 and MRP1 in acquired resistance to VAs.

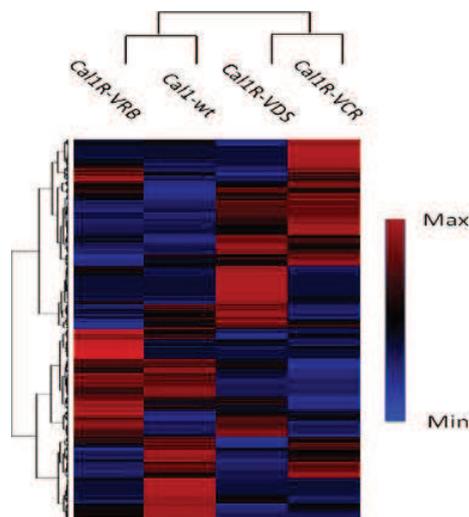
## DISCUSSION

MM is a very chemoresistant tumor; this resistance may be preexistent or induced by drugs (acquired resistance), even after initial responses are observed [13]. Using human CAL1 cells overexpressing GSTM1 by gene transfection, we previously demonstrated the coordinated role of GSTM1 and MRP1 in MM resistance

to vincristine (VCR) [15]. In this paper, we examined the role of these two detoxification proteins in MM acquired resistance to the main VAs: vincristine (VCR), vindesine (VDS), and vinorelbine (VRB).

To address this question *in vitro*, we developed vinca alkaloid-resistant cell lines (CAL1R-VAs) by continuous exposure of parental CAL1-wt cells, for more than one year, to 4 nM ( $IC_{50}$  value) of the different VAs to study (VCR, VDS, or VRB). Cell viability studies (NRU assay) on CAL1R-VAs showed that long-term exposure to VAs significantly increased the resistance of each cell line to its selection drug, but also to the other VAs. Such a cross-resistance phenomenon to VAs was previously observed *in vitro* in different tumoral cell lines (human lymphoblastic leukemia, human bladder carcinoma, and mouse leukemia cells) [33–35].

CAL1R-VCR cells, selected by long-term exposure of parental CAL1-wt cells to VCR ( $IC_{50}$  value), expressed high levels (mRNA, protein) of functional GSTM1, as shown by the selective reduction of the total GST activity in cell lysates by the GSTM1 inhibitor, curcumin. The specific reversal of the resistance to VCR by curcumin and BSO (GSH synthesis inhibitor) indicated that



**Figure 4** Similarity heat map of gene expression profiles of CAL1 lines. The 10 000 most differently expressed transcripts between parental (CAL1-wt), and resistant to VCR (CAL1R-VCR), VDS (CAL1R-VDS), and VRB (CAL1R-VRB) cells were hierarchically clustered by Cluster and TreeView softwares. Columns and rows correspond to CAL1 cell lines and gene clustering, respectively. Red and blue indicate up- and downregulation of each gene, respectively.

GSTM1 enzyme activity was necessary for efficiently protecting selected CAL1R-VCR cells from VCR cytotoxicity. Although GSH conjugates of VCR have not been evidenced, GSTM1 could render the cells resistant to VCR by clearing the oxidized metabolites of the drug that could be generated by cytochrome P450s [36,37]. In addition, the reduction, by MK571 (MRP1 inhibitor), of the CAL1R-VCR cell resistance to VCR indicated that MRP1 activity was also required to efficiently protect selected cells against VCR. Thus, as previously reported using CAL1 cells expressing GSTM1 after gene transfection (CAL1- $\mu$ 1 cells) [15], these data obtained with CAL1R-VCR cells confirmed the coordinated requirement of GSTM1 and MRP1 activities in the detoxification process against VCR.

The expression of a functional GSTM1 was also evidenced in the two other selected cell lines: CAL1R-VDS and CAL1R-VRB. Curcumin and MK571 (GSTM1 and MRP1 inhibitors, respectively) significantly reduced the CAL1R-VDS resistance to VDS. Thus, as described above for VCR, coordinated expression and activity of GSTM1 and MRP1 were required to efficiently protect CAL1 cells against VDS, a VA structurally similar to VCR. By contrast, none of the inhibitor used (curcumin, MK571, BSO) had any effect on the CAL1R-VRB resistance to VRB. Thereby, unlike for VCR and VDS, only the expression of GSTM1 seemed to be necessary to protect cells from VRB toxic effects. Taken together, these data suggested a differential involvement of GSTM1 and MRP1 in the acquired resistance of CAL1 MM cells to VAs.

One explanation for the protective role of GSTM1 against VRB in CAL1R-VRB cells, independent of its catalytic activity, could be a direct interaction between GSTM1 and this VA, trapping the drug away from its targets and thus reducing its toxicity. Such a direct interaction was previously demonstrated between GSTM1 and the 15-deoxy-delta [12,14] prostaglandin [31]; by sequestering this compound in the cytosol, GSTM1 was able to inhibit the activation of peroxisomal proliferator-activated receptor gamma (PPAR $\gamma$ ) and then the transcription of target genes.

To evidence such a direct interaction between GSTM1 and VAs, we measured the total GST activity of each CAL1R-VA cell line in the presence of its selection VA. The total GST activity of all VA-resistant cells was significantly reduced when lysates were incubated in the presence of the selection VA; the remaining GST activity corresponded to that of the parental CAL1-wt cells, expressing a functional GSTP1, but not GSTM1.

By contrast, none of the VAs had any effect on the total GST activity of CAL1-wt cell lysates. As GSH and protein concentrations were not limiting factors, these data indicated a possible direct and selective interaction between GSTM1 and VAs. As GSTM1 activity was required to protect cells against VCR and VDS, a direct interaction between GSTM1 and these two structurally related VAs was expected. Such a direct interaction can also explain the protective effect of GSTM1 against VRB. In this case, the interaction must be strong enough to make GSTM1 expression alone sufficient to protect cells from VRB effects. VRB is highly lipophilic compared to VCR and VDS [38]. It could strongly interact with the hydrophobic binding sites of the GST, located in a solvent-exposed open cleft between the subunits [39,40].

To better understand the global molecular background of the MM acquired resistance to VAs, the transcriptomes of CAL1-wt, CAL1R-VCR, CAL1R-VDS, and CAL1R-VRB cells were determined, using Affymetrix<sup>®</sup> pangenomic microarrays. Then, the 10 000 most differently expressed transcripts between cell lines (CV > 20%) were submitted to hierarchical clustering using Cluster and TreeView programs. The gene expression profiles of CAL1R-VCR and CAL1R-VDS were similar, and distinct from that of CAL1R-VRB, which was itself closer to that of parental CAL1-wt cells. Thus, in agreement with the targeted study, a differential molecular behavior of on one hand CAL1R-VCR and CAL1R-VDS cells, on the other hand CAL1R-VRB cells was evidenced by this pangenomic approach.

In conclusion, we report differential involvement of GSTM1 and MRP1 in acquired resistance of MM to VAs. Coordinated expression and activities of GSTM1 and MRP1 are required to protect cells from VCR and VDS, whereas GSTM1 expression alone is sufficient to confer resistance to VRB, probably by directly sequestering VRB away from its targets. This differential behavior of selected cells is confirmed by the global gene expression analysis. Further computational (functional enrichment) and functional (first *in vitro* using genetically modified cell lines, then *in vivo* using tumor-bearing mice models) studies will be used to identify new molecular pathways involved in differential resistance of MM to VAs.

## ACKNOWLEDGEMENT

This work was supported by grants from GEFLUC-LR.

## REFERENCES

- 1 Garbe C., Leiter U. Melanoma epidemiology and trends. *Clin. Dermatol.* (2009) **27** 3–9.
- 2 Garbe C., Peris K., Hauschild A. et al. Diagnosis and treatment of melanoma. European consensus-based interdisciplinary guideline – Update 2012. *Eur. J. Cancer* (2012) **48** 2375–2390.
- 3 Vidwans S.J., Flaherty K.T., Fisher D.E., Tenenbaum J.M., Travers M.D., Shrager J. A melanoma molecular disease model. *PLoS ONE* (2011) **6** e18257.
- 4 Chin L., Garraway L.A., Fisher D.E. Malignant melanoma: genetics and therapeutics in the genomic era. *Genes Dev.* (2006) **20** 2149–2182.
- 5 Gray-Schopfer V., Wellbrock C., Marais R. Melanoma biology and new targeted therapy. *Nature* (2007) **445** 851–857.
- 6 Shapira-Frommer R., Schachter J. Adoptive immunotherapy of advanced melanoma. *Curr. Treat. Options Oncol.* (2012) **13** 340–353.
- 7 Girotti M.R., Saturno G., Lorigan P., Marais R. No longer an untreatable disease: how targeted and immunotherapies have changed the management of melanoma patients. *Mol. Oncol.* (2014) **8** 1140–1158.
- 8 Risinger A.L., Giles F.J., Mooberry S.L. Microtubule dynamics as a target in oncology. *Cancer Treat. Rev.* (2009) **35** 255–261.
- 9 Seligmann J., Twelves C. Tubulin: an example of targeted chemotherapy. *Future Med. Chem.* (2013) **5** 339–352.
- 10 Moudi M., Go R., Yien C.Y.S., Nazre M. Vinca alkaloids. *Int. J. Prev. Med.* (2013) **4** 1231–1235.
- 11 Mouawad R., Sebert M., Michels J., Bloch J., Spano J.-P., Khayat D. Treatment for metastatic malignant melanoma: old drugs and new strategies. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* (2010) **74** 27–39.
- 12 Tentori L., Lacal P.M., Graziani G. Challenging resistance mechanisms to therapies for metastatic melanoma. *Trends Pharmacol. Sci.* (2013) **34** 656–666.
- 13 Soengas M.S., Lowe S.W. Apoptosis and melanoma chemoresistance. *Oncogene* (2003) **22** 3138–3151.
- 14 Lito P., Rosen N., Solit D.B. Tumor adaptation and resistance to RAF inhibitors. *Nat. Med.* (2013) **19** 1401–1409.
- 15 Depelle P., Cuq P., Mary S. et al. Glutathione S-transferase M1 and multidrug resistance protein 1 act in synergy to protect melanoma cells from vincristine effects. *Mol. Pharmacol.* (2004) **65** 897–905.
- 16 Ketterer B. A bird's eye view of the glutathione transferase field. *Chem. Biol. Interact.* (2001) **138** 27–42.
- 17 Salinas A.E., Wong M.G. Glutathione S-transferases—a review. *Curr. Med. Chem.* (1999) **6** 279–309.
- 18 Townsend D.M., Tew K.D. The role of glutathione-S-transferase in anti-cancer drug resistance. *Oncogene* (2003) **22** 7369–7375.
- 19 Depelle P., Cuq P., Passagne I., Evrard A., Vian L. Combined effects of GSTP1 and MRP1 in melanoma drug resistance. *Br. J. Cancer* (2005) **93** 216–223.
- 20 Smitherman P.K., Townsend A.J., Kute T.E., Morrow C.S. Role of multidrug resistance protein 2 (MRP2, ABCB2) in alkylating agent detoxification: MRP2 potentiates glutathione S-transferase A1-1-mediated resistance to chlorambucil cytotoxicity. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* (2004) **308** 260–267.
- 21 Morrow C.S., Smitherman P.K., Diah S.K., Schneider E., Townsend A.J. Coordinated action of glutathione S-transferases (GSTs) and multidrug resistance protein 1 (MRP1) in antineoplastic drug detoxification. Mechanism of GST A1-1- and MRP1-associated resistance to chlorambucil in MCF7 breast carcinoma cells. *J. Biol. Chem.* (1998) **273** 20114–20120.
- 22 Harbottle A., Daly A.K., Atherton K., Campbell F.C. Role of glutathione S-transferase P1, P-glycoprotein and multidrug resistance-associated protein 1 in acquired doxorubicin resistance. *Int. J. Cancer* (2001) **92** 777–783.
- 23 Olivier S., Formento P., Fischel J.L., Etienne M.C., Milano G. Epidermal growth factor receptor expression and suramin cytotoxicity *in vitro*. *Eur. J. Cancer* (1990) **26** 867–871.
- 24 Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* (1976) **72** 248–254.
- 25 Habig W.H., Pabst M.J., Jakoby W.B. Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.* (1974) **249** 7130–7139.
- 26 de Hoon M.J.L., Imoto S., Nolan J., Miyano S. Open source clustering software. *Bioinformatics* (2004) **20** 1453–1454.
- 27 Eisen M.B., Spellman P.T., Brown P.O., Botstein D. Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1998) **95** 14863–14868.
- 28 Bailey H.H. L-S, R-buthionine sulfoximine: historical development and clinical issues. *Chem. Biol. Interact.* (1998) **111–112** 239–254.
- 29 Ban N., Takahashi Y., Takayama T. et al. Transfection of glutathione S-transferase (GST)-pi antisense complementary DNA increases the sensitivity of a colon cancer cell line to adriamycin, cisplatin, melphalan, and etoposide. *Cancer Res.* (1996) **56** 3577–3582.
- 30 Sluis-Cremer N., Naidoo N.N., Kaplan W.H., Manoharan T.H., Fahl W.E., Dirr H.W. Determination of a binding site for a non-substrate ligand in mammalian cytosolic glutathione S-transferases by means of fluorescence-resonance energy transfer. *Eur. J. Biochem.* (1996) **241** 484–488.
- 31 Paumi C.M., Smitherman P.K., Townsend A.J., Morrow C.S. Glutathione S-transferases (GSTs) inhibit transcriptional activation by the peroxisomal proliferator-activated receptor gamma (PPAR gamma) ligand, 15-deoxy-delta 12,14-prostaglandin J2 (15-d-PGJ2). *Biochemistry* (2004) **43** 2345–2352.
- 32 Gekeler V., Ise W., Sanders K.H., Ulrich W.R., Beck J. The leukotriene LTD4 receptor antagonist MK571 specifically modulates MRP associated multidrug resistance. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (1995) **208** 345–352.

- 33 Beck W.T., Cirtain M.C., Look A.T., Ashmun R.A. Reversal of Vinca alkaloid resistance but not multiple drug resistance in human leukemic cells by verapamil. *Cancer Res.* (1986) **46** 778–784.
- 34 Danks M.K., Yalowich J.C., Beck W.T. Atypical multiple drug resistance in a human leukemic cell line selected for resistance to teniposide (VM-26). *Cancer Res.* (1987) **47** 1297–1301.
- 35 Etievant C., Barret J.M., Kruczynski A., Perrin D., Hill B.T. Vinflunine (20',20'-difluoro-3',4'-dihydrovinorelbine), a novel Vinca alkaloid, which participates in P-glycoprotein (Pgp)-mediated multidrug resistance *in vivo* and *in vitro*. *Invest. New Drugs* (1998) **16** 3–17.
- 36 Akan I., Akan S., Akca H., Savas B., Ozben T. Multidrug resistance-associated protein 1 (MRP1) mediated vincristine resistance: effects of N-acetylcysteine and Buthionine sulfoximine. *Cancer Cell Int.* (2005) **5** 22.
- 37 Rosazza J.P., Duffel M.W., el-Marakby S., Ahn S.H. Metabolism of the Catharanthus alkaloids: from *Streptomyces griseus* to monoamine oxidase. *B. J. Nat. Prod.* (1992) **55** 269–284.
- 38 Toso C., Lindley C. Vinorelbine: a novel vinca alkaloid. *Am. J. Health Syst. Pharm.* (1995) **52** 1287–1304.
- 39 Dirr H., Reinemer P., Huber R. Refined crystal structure of porcine class Pi glutathione S-transferase (pGST P1-1) at 2.1 Å resolution. *J. Mol. Biol.* (1994) **243** 72–92.
- 40 Reinemer P., Dirr H.W., Ladenstein R. et al. Three-dimensional structure of class pi glutathione S-transferase from human placenta in complex with S-hexylglutathione at 2.8 Å resolution. *J. Mol. Biol.* (1992) **227** 214–226.

# **II Recherche de déterminants moléculaires de la résistance acquise des cellules CAL1 aux VAs (manuscrit en préparation)**

---

## **II.1 Contexte et problématique**

L'identification de nouveaux gènes associés à la chimiorésistance pourrait fournir de nouvelles cibles thérapeutiques, ou de potentiels marqueurs de résistance, et ainsi ouvrir de nouvelles perspectives d'optimisation thérapeutique.

Afin d'identifier des déterminants moléculaires de la résistance acquise aux VAs, une comparaison des profils d'expression génique des lignées CAL1 (données transcriptomiques issues de la première partie de l'étude, exposée dans l'article 1) a été réalisée. Des gènes dont l'expression a fortement été altérée lors de la production des lignées résistantes ont été sélectionnés.

Deux types de gènes candidats ont été sélectionnés : les gènes dont l'expression était spécifiquement altérée dans l'ensemble des lignées résistantes, pour leur implication potentielle dans la résistance commune aux VAs ; les gènes dont l'expression était altérée spécifiquement dans l'un des deux groupes de lignées résistantes (CAL1R-VCR et CAL1R-VDS *versus* CAL1R-VRB ; cf. dendrogramme de l'article 1), pour leur implication potentielle dans la résistance différentielle aux VAs.

Le rôle potentiel de la surexpression des gènes candidats dans la résistance a été évalué *in vitro*, après inhibition sélective de l'expression de ces gènes par des siRNA : dans les cellules parentales pour les gènes sous-exprimés dans les lignées résistantes ; dans les cellules résistantes pour les gènes sur-exprimés dans les lignées résistantes. J'ai contribué à l'analyse fonctionnelle des gènes surexprimés dans les lignées résistantes.

## **II.2 Matériel et méthodes**

### **II.2.1 Produits chimiques et inhibiteurs**

La VCR (100  $\mu$ M dans H<sub>2</sub>O), VDS (100  $\mu$ M dans H<sub>2</sub>O), VRB (100  $\mu$ M dans H<sub>2</sub>O), et le 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) ont été fournis par Sigma-Aldrich (France).

### **II.2.2 Lignées cellulaires**

Les lignées utilisées (parentale : CAL1-wt ; résistantes : CAL1R-VRB, CAL1R-VCR, et CAL1R-VDS) ont été cultivées à 37°C, sous atmosphère humide enrichie de 5% de CO<sub>2</sub>, dans du milieu Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) contenant 4,5g de glucose, et additionné de 10% de sérum de veau fœtal (SVF), 1% L-glutamine (2mM), et 1% d'antibiotiques (mélange pénicilline 100U/ml et streptomycine 0,1g/L).

### **II.2.3 Sélection des gènes discriminants**

#### **II.2.3.1 Analyse des niveaux d'expression**

Afin de sélectionner les probesets, par extrapolation gènes, dont l'expression était la plus altérée dans les lignées résistantes, le profil d'expression de chaque lignée CAL1R-VA a été comparé avec le profil d'expression de la lignée CAL1-wt. L'analyse des niveaux d'expression des gènes a été réalisée après extraction et normalisation des données des biopuces (algorithme MAS5, cf. article 1), puis élimination du bruit de fond (signal  $\leq 10$ ). Les ratios d'expression (fold changes, FC) ont été calculés en comparant les intensités de signal des transcrits entre les lignées CAL1-wt et CAL1R-VAs (Ratio = valeur du signal dans CAL1-wt / valeur du signal dans CAL1R-VAs).

#### **II.2.3.2 Ingenuity Pathway Analysis (IPA)**

Les identifiants des gènes sélectionnés sur leur différence d'expression ont été téléchargés dans le logiciel Ingenuity Pathway Analysis (IPA) version 9.0 (<http://www.ingenuity.com/>). IPA permet de générer des réseaux d'interactions intermoléculaires entre les produits des gènes d'intérêt et de les intégrer à des réseaux fonctionnels connus en se basant sur une base de données bibliographique interne (Ingenuity® Knowledge Base). Contrairement aux autres logiciels disponibles, IPA croise l'information provenant de nombreuses bases de données, ce qui permet de ne pas restreindre l'information aux annotations fonctionnelles de Gene Ontology (GO). Les

réseaux générés sont représentés graphiquement. IPA restreint les réseaux générés à 35 molécules et attribue à chaque réseau un P-score [ $P\text{-score} = 2\log_{10}(P\text{-value})$ ] reflétant la probabilité que ce réseau soit généré de façon aléatoire. La valeur P est calculée à partir de la distribution hypergéométrique (test exact de Fisher). Autrement dit, si le réseau dispose d'un P-score de 10, les chances que ce réseau soit généré de façon aléatoire sont de moins de 1/1010.

## **II.2.4 Etudes fonctionnelles**

### **II.2.4.1 PCR quantitative en temps réel (RT-qPCR)**

La vérification du niveau d'expression des gènes identifiés à partir des données des biopuces, ainsi que la mesure de l'efficacité de l'inhibition de l'expression de ces gènes par siRNA, ont été réalisées par qRT-PCR. Les ARN totaux ont été extraits à l'aide de TRIzol™ selon le protocole du fabricant (Invitrogen™). La qualité de chaque échantillon a ensuite été vérifiée par électrophorèse en gel d'agarose à 1%. Les ARN totaux ont ensuite été quantifiés à l'aide d'un spectrophotomètre BioPhotometer (Eppendorf). La RT-qPCR a été réalisée selon les procédures du laboratoire [94] à l'aide d'amorces spécifiques (Tableau 1). Les amplifications par qPCR ont été réalisées avec le kit Quantifast™ SYBER® Green PCR (Qiagen) dans un Light-Cycler (Roche Diagnostics) selon le protocole suivant: 1) Prédénaturation initiale 95°C/10min ; 2) 45 cycles divisés en trois étapes: dénaturation 95°C/10s; appariement 60°C/6s; élongation 72°C/10s. La spécificité des amplifications a été vérifiée par l'analyse des courbes de fusion. Les résultats ont été normalisés sur la  $\beta$ -actine et exprimés en ratios [94].

### **II.2.4.2 Western-blot**

L'efficacité de la répression par siRNA des gènes sur les niveaux d'expression des protéines a été vérifiée par Western blot. Les cellules ont été lavées avec du PBS puis incubées dans du tampon de lyse RIPA (Sigma-Aldrich) pendant 5 min à 4°C. Les lysats ont ensuite été centrifugés à 8000g pendant 10min à 4°C, et le surnageant a été congelé à -80°C. Les protéines purifiées ont été quantifiées par la méthode de Lowry [247], modifiée pour permettre un dosage en présence de fortes concentrations de détergents (RIPA), à l'aide du kit DC Protein Assay (Biorad). Vingt microgrammes de protéines ont été séparés par électrophorèse SDS-PAGE dans un gel à 10% d'acrylamide. Les protéines ont été transférées sur des membranes de nitrocellulose. Les membranes ont été saturées par une solution de TBS-Tween 20 (0,1%)- BSA (5%), une nuit à 4°C. Puis, les membranes ont été lavées 3 fois par une solution de TBS-Tween 20 (0,1%), puis incubées pendant 1h à température ambiante avec des solutions contenant les anticorps polyclonaux de lapin ou de souris (Sigma-Aldrich) spécifiques des protéines codées par les gènes étudiés, ou anti- $\beta$ -actine (contrôle) dilués respectivement au 1/250, et 1/1000. Puis, les membranes ont été

lavées 3 fois par une solution de TBS-Tween 20 (0,1%), suivi par une incubation pendant 1h à température ambiante dans une solution contenant l'anticorps secondaire polyclonal anti-lapin ou anti-souris couplé à HRP (Sigma-Aldrich), dilué au 1/200000. Enfin, les membranes ont été lavées à l'aide d'une solution de TBS-Tween 20 (0,1%), et la fixation des anticorps a été révélée par autoradiographie à l'aide du kit de détection de chimioluminescence ECL (Amersham).

### **II.2.4.3 siRNA et réactif de transfection**

Les siRNA utilisés (siGENOME Non-Targeting siRNA contrôle négatif et siGENOME SMART pool human spécifiques) proviennent de Dharmacon (Dharmacon; Epsom, United Kingdom). La transfection a été réalisée à l'aide de Lipofectamine 2000 selon le protocole du fournisseur (Invitrogen).

### **II.2.4.4 Essai de viabilité cellulaire**

L'effet de la répression par siRNA des gènes sélectionnés sur la chimiosensibilité des cellules aux VAs a été évalué par un test de viabilité au rouge neutre (neutral red uptake, NRU). Dans un premier temps, les cellules CAL1 ont étéensemencées en plaque 6 puits à la densité de 400 000 cellules/puits, afin d'obtenir une densité cellulaire inférieure à 50% (20-30% en pratique) au moment de la transfection soit après 24h d'incubation. Puis les cellules ont été transfectées selon le protocole associé à l'utilisation de la lipofectamine (Invitrogen). La lipofectamine a été utilisée à la concentration de 5 $\mu$ L de lipofectamine dans 250 $\mu$ L de milieu OptiMem 1X. Les siRNA ont été utilisés aux concentrations optimales définies lors des études de cinétique d'inhibition. Après 24 d'incubation, les cellules ont étéensemencées en plaques 96 puits, à la densité de 7500 cellules/puits. Après à nouveau 24h d'incubation (soit 72h après la transfection) les cellules ont été exposées aux VAs (gamme de concentrations de 0 à 2000nM, 10 points, 6 puits par concentration) durant 4h. Après 72h, le milieu a été changé par du milieu additionné de rouge neutre à la concentration de 50 $\mu$ g/L. Après 2h d'incubation, la solution de rouge neutre a été rincée 2 fois par du PBS, puis remplacée par une solution de désorption (1% acide acétique – 50% éthanol 95° v/v) (100 $\mu$ l). L'absorbance a été mesurée à 540 nm sur spectrophotomètre Labsystems Multiskan MS (PAA, Farnborough, RU). La CI50 a été définie comme la diminution de 50% de la densité optique par rapport aux puits contrôles (milieu sans VA). L'absorbance relative a été calculée par la formule : (moyenne de l'absorbance dans les 6 puits tests / moyenne de l'absorbance dans les 6 puits contrôles)  $\times$  100.

## II.2.5 Analyse statistique

Les statistiques associées à l'analyse des données des biopuces sont décrites dans les paragraphes correspondants.

Les résultats des analyses fonctionnelles sont ainsi présentés : moyenne  $\pm$  écart-type (SD), et proviennent d'au minimum trois expériences indépendantes. L'analyse statistique a été réalisée à l'aide du test t de Student. Les  $CI_{50}$  (tests de viabilité cellulaire) ont été obtenues en utilisant un modèle de régression logistique sur le logiciel GraphPad Prism.

## II.3 Résultats

Pour plus de clarté, les sous-titres suivants seront utilisés :

- Résistance commune : résultats et discussion ayant trait à la résistance acquise commune aux VAs, *i.e.* issus de la comparaison des lignées résistantes par rapport à la lignée parentale.
- Résistance différentielle : résultats et discussion ayant trait à la résistance acquise différentielle aux VAs, *i.e.* issus de la comparaison des lignées résistantes entre elles.

### II.3.1 Sélection de gènes discriminants

#### II.3.1.1 Sélection en fonction des différences de niveaux d'expression

##### Résistance commune

Afin d'identifier les gènes pouvant être associés à la résistance aux VAs, les niveaux d'expression des gènes (intensité de signal) entre les lignées CAL1-wt et CAL1R-VAs ont été comparés. L'analyse des données des puces Affymetrix® a permis d'identifier 30500 transcrits présents dans au moins une des lignée étudiée. Pour chacun de ces transcrits, les ratios des intensités entre la lignée CAL1-wt et chaque lignée CAL1R-VAs ont été calculés. Puis les gènes différentiellement exprimés ont été sélectionnés et divisés en deux groupes : surexprimés (ratio  $> 2$ ) et sous-exprimés (ratio  $< 0,5$ ) dans les cellules résistantes. Dans chaque groupe, les transcrits communs aux trois lignées résistantes ont été sélectionnés. Parmi les 57 gènes retenus (16 surexprimés et 41 sous-exprimés dans les lignées résistantes), nous avons sélectionné les gènes dont le niveau d'expression est très fortement modifié dans les lignées résistantes. Puis, nous avons éliminé les gènes décrits dans la littérature pour leur implications dans la résistance aux VAs. Finalement, 18 gènes ont été retenus : 3 surexprimés (ratio  $> 10$ ), et 15 sous-exprimés (ratio  $< 0,1$ ) (Tableaux 1 A et B).

##### Résistance différentielle

Une démarche identique, appliquée à la sélection des gènes différentiellement exprimés entre les lignées résistantes (CAL1R-VCR et CAL1R-VDS *versus* CAL1R-VRB), a conduit à la sélection de 10 gènes (Tableaux 2 A et B).

La confirmation de l'expression différentielle de ces gènes par RT-qPCR ayant été réalisée par Chaker Attaoua, elle ne sera pas détaillée ici.

## A

Probe set ID	Symbole du gène	Cal1-wt signal	Cal1-RVCR signal	Cal1-RVDS signal	Cal1-RVRB signal	FC Cal1-RVCR/ Cal1-wt	FC Cal1-RVDS/ Cal1-wt	FC Cal1-RVRB/ Cal1-wt	Ratio moyen
230030_at	HS6ST2	1,2382	78,1457	39,8809	68,4479	63,1147	32,2100	55,2823	<b>50,202</b>
202291_s_at	MGP	28,1342	754,8401	937,1205	603,6174	26,8300	33,3089	21,4549	<b>27,198</b>
232176_at	SLITRK6	1,5381	36,9321	30,4133	22,3056	24,0109	19,7728	14,5017	<b>19,428</b>

## B

Probe set ID	Symbole du gène	Cal1-wt signal	Cal1-RVCR signal	Cal1-RVDS signal	Cal1-RVRB signal	Signal Cal1-RVCR/ Cal1-wt	Signal Cal1-RVDS/ Cal1-wt	Signal Cal1-RVRB/ Cal1-wt	Ratio moyen
206696_at	GPR143	799,8608	3,5425	3,7016	2,1679	0,0044	0,0046	0,0027	<b>0,004</b>
231771_at	GJB6	58,7190	0,5225	0,6577	0,4617	0,0089	0,0112	0,0079	<b>0,009</b>
221644_s_at	SLC45A2	143,2560	0,8336	1,8470	1,3989	0,0058	0,0129	0,0098	<b>0,009</b>
229332_at	HPDL	374,5439	3,8714	1,9333	7,5834	0,0103	0,0052	0,0202	<b>0,012</b>
215733_x_at	CTAG2	140,6241	3,5171	1,8765	1,0818	0,0250	0,0133	0,0077	<b>0,015</b>
205051_s_at	KIT	494,3282	9,3270	2,5537	12,8411	0,0189	0,0052	0,0260	<b>0,017</b>
204417_at	GALC	39,0361	0,8853	1,1804	0,8947	0,0227	0,0302	0,0229	<b>0,025</b>
209875_s_at	SPP1	1881,8180	18,1648	26,3210	98,3976	0,0097	0,0140	0,0523	<b>0,025</b>
224367_at	BEX2	81,7108	5,9963	0,6100	2,0820	0,0734	0,0075	0,0255	<b>0,035</b>
206039_at	RAB33A	115,3486	1,7586	0,7901	9,9129	0,0152	0,0068	0,0859	<b>0,036</b>
229661_at	SALL4	77,8296	2,0708	3,7956	3,3582	0,0266	0,0488	0,0431	<b>0,040</b>
209278_s_at	TFPI2	392,0225	12,1031	9,6230	26,9925	0,0309	0,0245	0,0689	<b>0,041</b>
204964_s_at	SSPN	35,5684	2,2530	1,1092	1,1249	0,0633	0,0312	0,0316	<b>0,042</b>
203417_at	MFAP2	237,9255	19,1456	11,9130	16,4993	0,0805	0,0501	0,0693	<b>0,067</b>
219113_x_at	HSD17B14	52,3925	4,8187	7,6997	3,0458	0,0920	0,1470	0,0581	<b>0,099</b>

**Tableau 1** : *Niveaux d'expression des transcrits des 18 gènes les plus différentiellement exprimés entre les lignées CAL1R-VAs et CAL1-wt. Les niveaux d'expression correspondent au signal associé à la détection du transcrit à l'aide des puces Affymetrix HG-U133 Plus 2.00. Ratio moyen = moyenne des ratios des signaux dans les lignées CAL1R-VAs / signal dans la lignée CAL1-wt. A : gènes surexprimés dans les lignées résistantes comparativement à la lignée parentale. B : gènes sous-exprimés dans les lignées résistantes comparativement à la lignée parentale.*

**A**

Probeset ID	Symbole du gène	Cal1-RVCR signal	Cal1-RVDS signal	Cal1-RVRB signal	FC Cal1-RVRB /Cal1-RVCR	FC Cal1-RVRB /Cal1-RVDS
207414_s_at	PCSK6	239,94	179,4	1,68	0,01	0,01
204301_at	KBTD11	108,62	47,54	12,65	0,12	0,27
201109_s_at	THBS1	49,03	34,12	19,39	0,4	0,36
232620_at	WDR93	22,63	28,17	10,14	0,45	0,36

**B**

Probeset ID	Symbole du gène	Cal1-RVCR signal	Cal1-RVDS signal	Cal1-RVRB signal	FC Cal1-RVRB /Cal1-RVCR	FC Cal1-RVRB /Cal1-RVDS
219107_at	BCAN	4,56	8,45	162,17	35,6	19,18
209685_s_at	PRKCB	6,15	11,39	86,39	14,05	7,58
232378_at	SLC5A9	3,63	1,87	36,05	9,93	19,24
210001_s_at	SOCS1	2,62	1,27	17,85	6,81	14,09
242998_at	RDH12	4,89	4,31	16,61	3,39	3,85
210179_at	KCNJ13	0,75	1,39	16,01	21,47	11,49

**Tableau 2** : *Niveaux d'expression des transcrits des 10 gènes les plus différenciellement exprimés entre les 2 groupes de lignées CALIR-VAs. Les niveaux d'expression correspondent au signal associé à la détection du transcrit à l'aide des puces Affymetrix HG-U133 Plus 2.00. A : gènes surexprimés dans les lignées CALIR-VCR et CALIR-VDS comparativement à la lignée CALIR-VRB. B : gènes sous-exprimés dans les lignées CALIR-VCR et CALIR-VDS comparativement à la lignée CALIR-VRB.*

### II.3.1.2 Sélection en fonction des interactions biologiques

Pour déterminer si les gènes sélectionnés interagissent au sein d'un même processus biologique, une analyse des réseaux génétiques a été réalisée à l'aide du logiciel IPA. Le logiciel IPA cartographie les gènes selon des réseaux intermoléculaires en se basant sur la littérature (multiples bases de données internes à IPA, cf. Matériels et Méthodes). Ces réseaux indiquent les relations fonctionnelles connues entre les produits des gènes impliqués.

#### Résistance commune

L'analyse IPA des gènes sous- ou surexprimés dans les lignées résistantes a mis en évidence un réseau d'interactions intermoléculaires impliquant 12 des 18 gènes

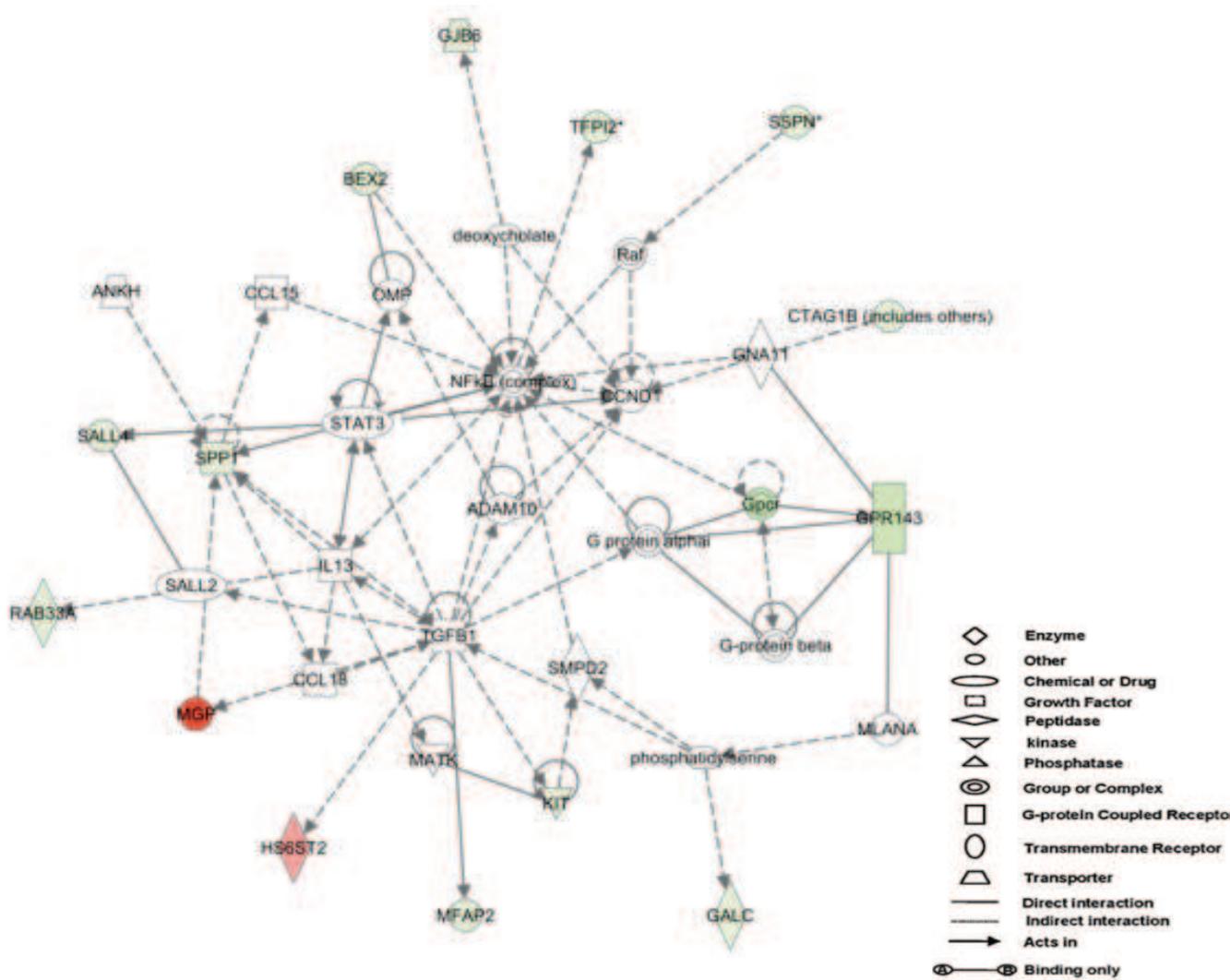
sélectionnés (P-score = 41) (Figure 1 et tableau 3). Ce réseau était associé aux voies de signalisation impliquant le facteur de transcription NF- $\kappa$ B (Nuclear Factor Of Kappa Light Polypeptide Gene Enhancer In B-Cells) et CCND1 (cycline D1), deux protéines impliquées dans la chimiorésistance du MM [248–250]. De plus, ce réseau était fortement associé à des fonctions cellulaires impliquant le cytosquelette : mouvement cellulaire, développement et fonctionnement du système hématopoïétique, migration des cellules immunitaires.

### Résistance différentielle

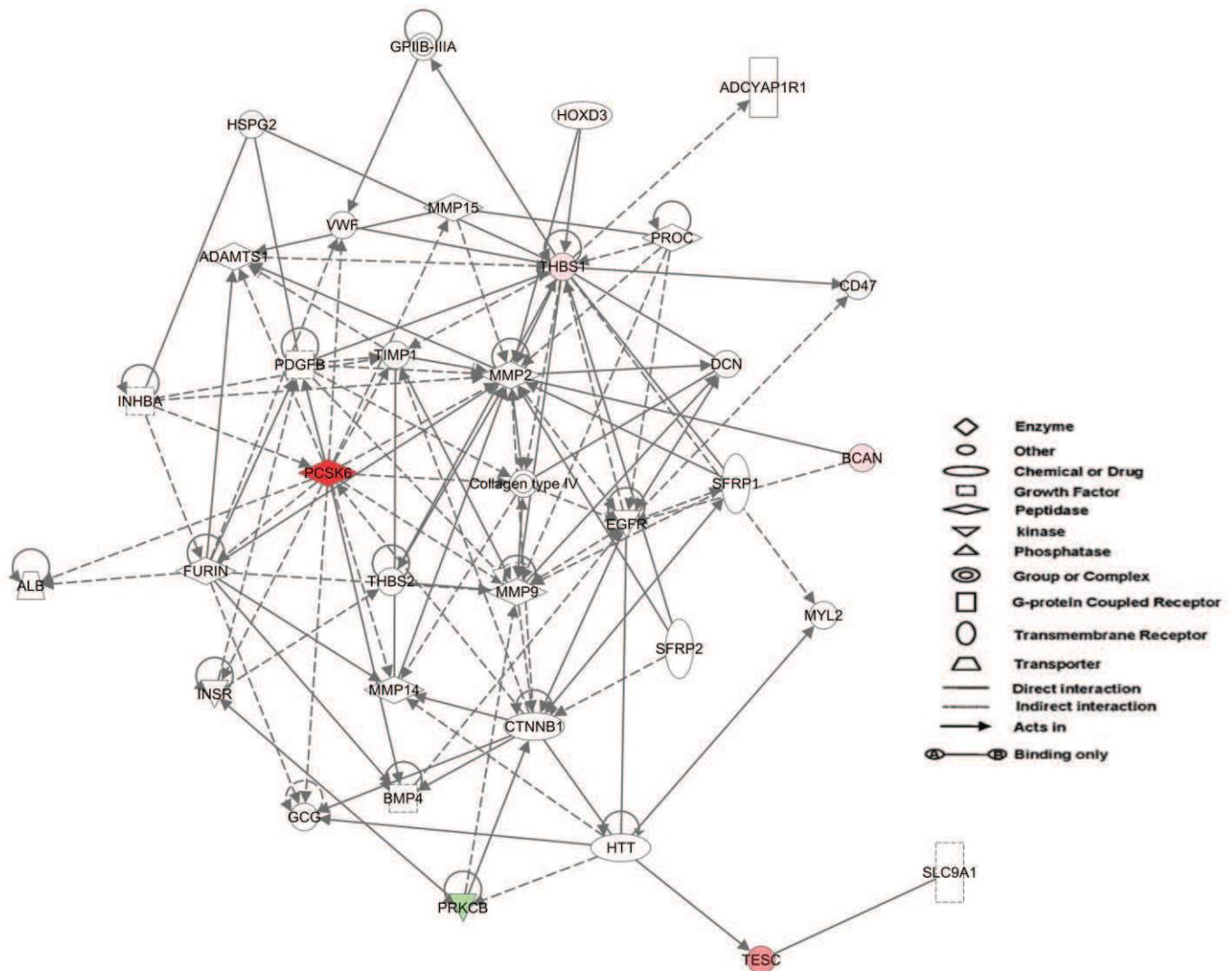
L'analyse IPA des gènes différentiellement exprimés dans les lignées résistantes a mis en évidence un réseau d'interactions intermoléculaires impliquant 5 des 7 gènes sélectionnés (P-score = 13) (Figure 2). Ce réseau impliquait 5 métalloprotéases dont 4 matrix metalloproteases (MMP 2, 9, 14 et 15), plus ADAMTS1 (ADAM metallopeptidase with thrombospondin type 1 motif 1), et un régulateur de métalloprotéases TIMP-1 (tissue inhibitor of metalloproteases 1). Ces protéines sont impliquées dans l'invasion des cancers, MM inclus [251,252]. De plus, ce réseau était partiellement centré sur l'EGFR (epidermal growth factor receptor), dont la cascade de signalisation est connue pour être associée à la chimiorésistance des cancers [253,254]. Finalement, ce réseau était fortement associé à des fonctions cellulaires impliquant le développement des tissus et organes, et le mouvement cellulaire, deux fonctions pouvant être reliées réciproquement à la croissance et à l'invasion cellulaire, à l'origine de l'agressivité des cellules cancéreuse [30].

Molécule	Exp. Value associée à la différence d'expression
MGP	↑ 28,987
HS6ST2	↑ 14,025
SLC45A2	↓ 1215,162
GPR143	↓ 366,068
KIT	↓ 83,113
SPP1	↓ 60,430
MFAP2	↓ 54,369
SALL4	↓ 45,669
BEX2	↓ 39,929
GJB6	↓ 35,890
RAB33A	↓ 31,933
CTAG1B	↓ 24,904

**Tableau 3 :** Produits des 12 gènes sous- ou surexprimés dans les 3 lignées résistantes impliqués dans le réseau généré par IPA. Exp. Value = score calculé par IPA, proportionnel à la significativité de l'implication des gènes dans le réseau. Les flèches correspondent au caractère surexprimé (↑) ou sous-exprimé (↓) des gènes selon les données des biopuces.



**Figure 1 :** Réseau d'interactions intermoléculaires généré par IPA à partir des 18 gènes les plus sous- ou surexprimés dans les lignées résistantes comparativement à la lignée parentale selon les données des biopuces. Ce réseau est fortement associé ( $P$ -score = 41) aux fonctions cellulaires suivantes : mouvement cellulaire, développement et fonctionnement du système hématopoïétique, migration des cellules immunitaires. Les produits des gènes sous-exprimés sont signalés en vert, ceux des gènes surexprimés sont signalés en rouge.



**Figure 2 :** Réseau d'interactions intermoléculaires généré par IPA à partir des 10 gènes les plus différenciellement exprimés entre les lignées résistantes (CAL1R-VCR et CAL1R-VDS versus CAL1R-VRB). Ce réseau est fortement associé ( $P$ -score = 13) aux fonctions cellulaires suivantes : mouvement cellulaire, développement des tissus et organes. Les produits des gènes sous-exprimés des les lignées CAL1R-VCR et CAL1R-VDS sont signalés en vert, ceux des gènes surexprimés sont signalés en rouge.

### //3.1.3 Choix des gènes candidats

#### Résistance commune

Afin de sélectionner des gènes potentiellement impliqués dans la chimiorésistance du MM aux VAs, nous avons croisé les informations apportées par les biopuces et par IPA. Nous avons ainsi retenu les 6 gènes qui sont, d'une part les plus sous- ou surexprimés dans les lignées résistantes comparativement à la lignée parentale, d'autre part les plus significativement impliqués dans le réseau généré par IPA. Parmi ces 6 gènes, 3 sont éteints dans les lignées résistantes (GPR143, KIT, et SLC45A2) et 3 sont fortement surexprimés (MGP, HS6ST2, et SLITRK6) (Tableau 4).

Probe set ID	Symbole du gène	Titre du gène	Localisation chromosomique	Fonction	Variation dans les lignées résistantes / wt
206696_at	GPR143	G protein-coupled receptor 143	chrXp22.3	Biogenèse organisation et transport du mélanosome	↓
221644_s_at	SLC45A2	solute carrier family 45, member 2	chr5p13.2	Impliqué dans la synthèse de la mélanine	↓
205051_s_at	KIT	v-kit Hardy-Zuckerman 4 feline sarcoma viral oncogene homolog	chr4q11-q12	hématopoïèse, mélanogenèse, et gamétogenèse	↓
202291_s_at	MGP	matrix Gla protein	chr12p13.1-p12.3	Remaniement vasculaire et de la matrice extra membranaire, calcification	↑
232176_at	SLITRK6	SLIT and NTRK-like family, member 6	chr13q31.1	Modulation de l'activité neuronale, développement du système nerveux	↑
230030_at	HS6ST2	heparan sulfate 6-O-sulfotransferase 2	chrXq26.2	Différenciation et prolifération cellulaire	↑

**Tableau 4** : *Symbole, titre, localisation chromosomique et fonctions principales des 6 gènes sélectionnés par l'analyse transcriptomique (biopuce + IPA) sous- ou sur-exprimés dans les 3 lignées résistantes.*

#### Résistance différentielle

La même démarche a été appliquée pour sélectionner les gènes potentiellement impliqués dans la résistance acquise différentielle aux VAs. Cependant, la résistance acquise étant définie par rapport aux cellules parentales, le niveau d'expression dans la lignée CAL1-wt doit être pris en considération pour pouvoir effectuer des tests fonctionnels visant à évaluer l'implication des gènes sélectionnés dans la résistance (réversion de la résistance après répression des gènes). Ainsi, nous avons sélectionnés les gènes surexprimés à la fois dans un des deux groupes de lignées résistantes (CAL1R-VCR et CAL1R-VDS ; CAL1R-VRB) et par rapport à la lignée CAL1-wt. Deux gènes ont été retenus : PCSK6

spécifiquement surexprimé dans les lignées CAL1R-VCR et CAL1R-VDS, et PRKCB spécifiquement surexprimé dans la lignée CAL1R-VRB (Tableau 5).

Probe set ID	Symbole du gène	Titre du gène	Localisation chromosomique	Fonction
207414_s_at	PCSK6	proprotein convertase subtilisin/kexin type 6	chr15q26.3	Endopeptidase sécrétée dans la matrice extracellulaire (substrats : transforming growth factor beta related proteins, proalbumin, and von Willebrand factor)
209685_s_at	PRKCB	Protein Kinase C, Beta	chr16p11.2	Serine/thréonine kinase impliquée dans de nombreuses voies de signalisations cellulaires. Activée par le calcium, ou le diacylglycerol.

**Tableau 5 :** *Symbole, titre, localisation chromosomique et fonctions principales des 2 gènes sélectionnés par l'analyse transcriptomique (biopuce + IPA) surexprimés spécifiquement dans un des deux groupes de lignées résistantes (CAL1R-VCR et CAL1R-VDS ; CAL1R-VRB).*

### II.3.2 Etude du rôle des gènes sélectionnés dans la chimiorésistance aux VAs

Afin de déterminer le rôle potentiel des gènes sélectionnés dans la résistance aux VAs, l'expression de ces gènes a été réprimée par transfection de siRNA spécifiques :

- dans les cellules CAL1-wt pour les 3 gènes éteints dans les lignées résistantes (GPR143, KIT, et SLC45A2) ; étude réalisée par Chaker Attaoua et non développée dans ce manuscrit.
- dans les cellules CAL1R-VAs pour les 3 gènes surexprimés dans les cellules résistantes (MGP, HS6ST2, et SLITRK6) et les 2 gènes différentiellement exprimés entre les lignées résistantes (PCSK6 et PRKCB, qui sont aussi sous-exprimés dans la lignée CAL1-wt).

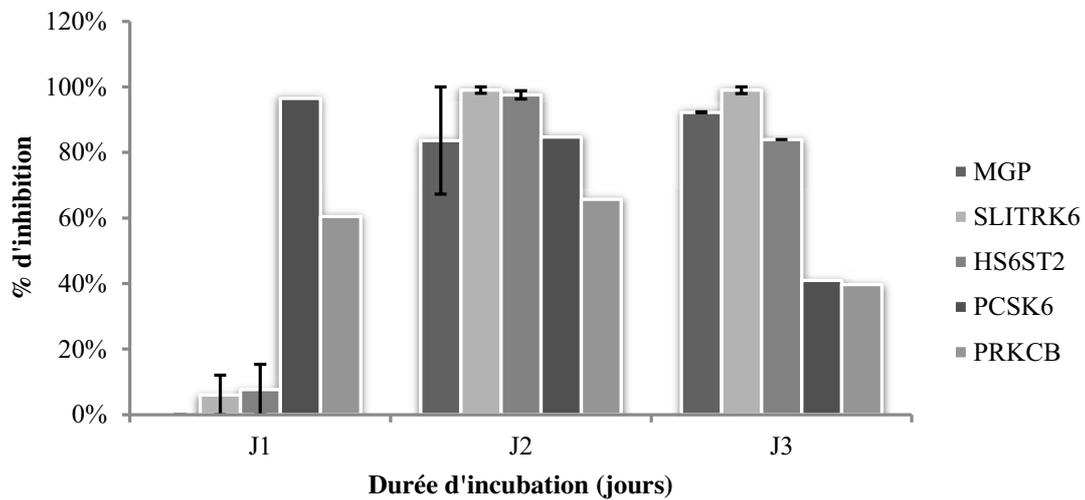
Après optimisation du protocole de transfection des siRNA, l'effet de l'inhibition de l'expression de ces gènes sur la sensibilité cellulaire aux VAs a été évalué par des tests de viabilité cellulaire (NRU).

#### II.3.2.1 Mise au point de l'inhibition de l'expression des gènes sélectionnés par siRNA

Seule la mise au point de la répression des 3 gènes surexprimés dans les cellules résistantes (MGP, HS6ST2, et SLITRK6) et des 2 gènes différentiellement exprimés entre les lignées résistantes (PCSK6 et PRKCB) sera développée.

Afin de déterminer la cinétique d'inhibition de l'expression des gènes cibles après transfection de siRNA, une première transfection a été réalisée avec une concentration

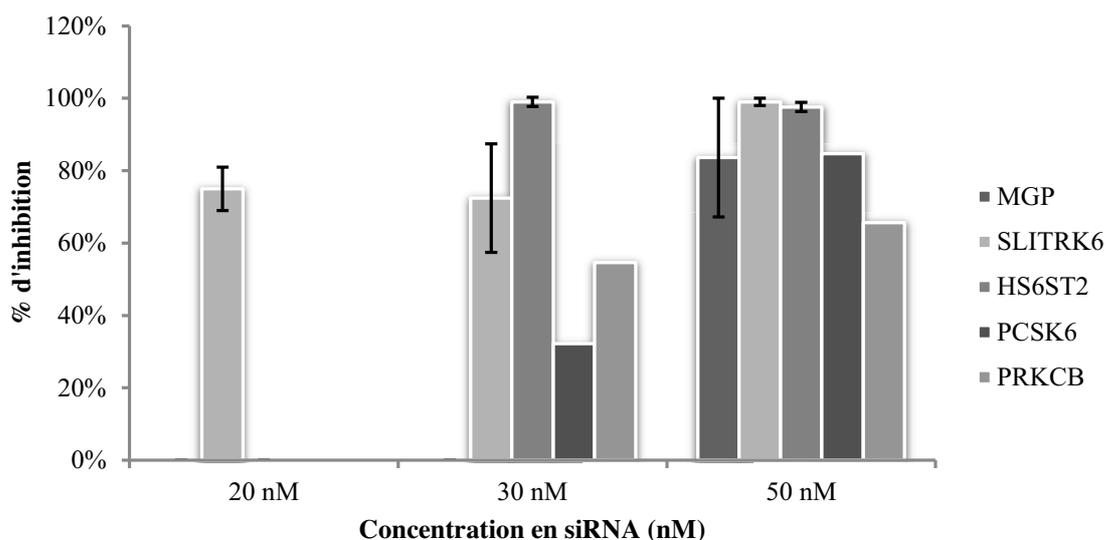
élevée en siRNA (50nM). L'ARN total des cellules a été extrait à J1, J2 et J3 de la transfection puis le niveau d'expression des gènes a été déterminé par RT-qPCR. Un taux d'inhibition de 65 à 98% était observé pour tous les gènes 48 heures après la transfection : nous avons donc choisi d'utiliser les cellules à J2 après transfection (Figure 3).



**Figure 3 :** *Cinétique d'inhibition de l'expression par siRNA des gènes étudiés en fonction du temps après la transfection (J0). % inhibition = [100- (100/Ratio normalisé)] (Cf. Matériel et méthodes) ± un écart type.*

Dans un second temps, la concentration minimale utilisable en siRNA (taux d'inhibition équivalent à celui obtenu avec 50nM) a été recherchée. Les lignées ont été transfectées par des concentrations en siRNA de 20 et 30 nM, les ARN totaux ont été extraits à J2 et les niveaux d'expression ont été déterminés par RT-qPCR. La concentration en siRNA n'a pu être diminuée sans affecter la répression, sauf pour siHS6ST2 dont le niveau de répression est équivalent à 30 et 50nM (Figure 4). Ce siRNA a donc été utilisé à 30nM lors des études fonctionnelles.

Enfin, l'effet de l'inhibition d'expression des gènes sur les niveaux d'expression des protéines codées par ces gènes a été déterminé par Western blot à J3 de la transfection, soit 24h après le jour d'inhibition maximale des ARNm. Cette analyse n'a donné aucun résultat interprétable pour les protéines codées par les gènes MGP, HS6ST2, SLITRK6, PCSK6 et PRKCB, probablement à cause du manque de spécificité et de sensibilité des anticorps disponibles.



**Figure 4 :** *Inhibition de l'expression par siRNA des gènes étudiés en fonction de la concentration en siRNA. % inhibition = [100- (100/Ratio normalisé)] (Cf. Matériel et méthode) ± un écart type.*

### II.3.2.2 Effet de l'inhibition de l'expression des gènes sélectionnés sur la sensibilité des cellules

#### CAL1 aux VAs

##### Résistance commune

L'effet de l'inhibition de l'expression des gènes sélectionnés sur la sensibilité cellulaire aux VAs a été évalué par un test de viabilité cellulaire. L'inhibition des gènes HS6ST2, SLITRK6, et MGP tend à sensibiliser les cellules Cal1R-VAs à leur VA de sélection (Tableau 6). Cette tendance est significative pour HS6ST2 dans la lignée CAL1R-VCR, pour SLITRK6 dans la lignée CAL1R-VRB et pour MGP dans les lignées CAL1R-VDS et CAL1R-VRB. Néanmoins il s'agit d'une sensibilisation minimale (ratio de sensibilisation ≤ 1.6).

siRNA	Ratio de sensibilisation		
	CAI1R-VCR	CAI1R-VDS	CAI1R-VRB
siHS6ST2	1,62 ± 0,29 (*)	1,34 ± 0,42	1,07 ± 0,35
siSLITRK6	1,02 ± 0,02	1,39 ± 0,35	1,24 ± 0,07 (**)
siMGP	1,00 ± 0,10	1,25 ± 0,10 (*)	1,18 ± 0,09 (*)

**Tableau 6 :** *Effet de l'inhibition par siRNA des gènes HS6ST2, SLITRK6, et MGP sur la sensibilité des cellules CAL1R-VCR, CAL1R-VDS et Cal1R-VRB à leur VA de sélection (VCR, VDS ou VRB respectivement). Ratio de sensibilisation = CI<sub>50</sub> control (siNT)/CI<sub>50</sub> en présence de siRNA spécifique. Les résultats sont la moyenne +/- SD de 3 expériences indépendantes. \*p<0.05 ; \*\*p<0.01 (test de Student)*

## Résistance différentielle

L'inhibition de l'expression des gènes PRKCB, et PCSK6 par transfection de siRNA spécifiques dans les cellules CAL1R-VAs n'a entraîné aucune modification de la résistance de ces cellules à leur VA de sélection (VCR, VDS ou VRB respectivement) (Tableau 7).

siRNA	Ratio de sensibilisation		
	CAL1R-VCR	CAL1R-VDS	CAL1R-VRB
siPRKCB	1,00 ± 0,10	1,58 ± 0,60	1,13 ± 0,14
siPCSK6	1,19 ± 0,31	1,01 ± 0,06	1,10 ± 0,21

**Tableau 7 :** *Effet de l'inhibition par siRNA des gènes PRKCB, et PCSK6 sur la sensibilité des cellules CAL1R-VCR, CAL1R-VDS et CAL1R-VRB à leur VA de sélection (VCR, VDS ou VRB respectivement). Ratio de sensibilisation =  $CI_{50}$  control (siNT)/ $CI_{50}$  en présence de siRNA spécifique. Les résultats sont la moyenne +/- SD de 3 expériences indépendantes. \* $p < 0.05$  ; \*\* $p < 0.01$  (test de Student)*

## **II.4 Discussion**

Le MM métastatique est l'un des cancers les plus agressifs, et il reste un défi thérapeutique notamment à cause de son fort potentiel à développer des résistances acquises après une première réponse. L'identification de marqueurs moléculaires de ces résistances pourrait permettre d'optimiser la prise en charge des patients.

Afin d'identifier des marqueurs moléculaires de la résistance acquise du MM aux VAs, nous avons réalisé un profilage transcriptomique de lignées de MM CAL1: lignée parentale CAL1-wt, et lignées résistantes aux VAs (CAL1R-VAs), établies par exposition continue des cellules CAL1-wt à VCR, VDS ou VRB (lignées CAL1R-VCR, CAL1R-VDS et CAL1R-VRB, respectivement). La comparaison des profils d'expression (cf. dendrogramme des distances, article 1) a permis de différencier deux groupes de lignées cellulaires (CAL1R-VCR et CAL1R-VDS ; CAL1R-VRB et CAL1-wt), suggérant une résistance différentielle des cellules CAL1 aux VAs : résistance d'une part à la VCR et à la VDS, d'autre part à la VRB seule.

Nous avons analysé les données des transcriptomes dans le but d'identifier des marqueurs moléculaires : i) de la résistance commune aux VAs (gènes dont l'expression est altérée dans l'ensemble des 3 lignées résistantes), ii) de la résistance différentielle au VAs (gènes dont l'expression est spécifiquement altérée dans un des 2 groupes de lignées résistantes précédemment identifiés).

L'analyse transcriptomique a été réalisée par une approche classique : i) normalisation par MAS5 (algorithme Affymétrie), ii) comparaison des profils d'expression par la méthode des « fold changes » (ratio d'expression à partir des signaux normalisés par MAS5), iii) sélection des gènes dont l'expression est la plus altérée dans les lignées résistantes, iv) vérification du niveau d'expression de ces gènes par RT-qPCR, et v) enrichissement fonctionnel des gènes sélectionnés par IPA (logiciel le plus utilisé pour ce type d'analyse).

Cette analyse a permis d'identifier 8 gènes potentiellement impliqués dans la résistance acquise des cellules CAL1 aux VAs : 6 gènes sous- ou surexprimés dans les trois lignées résistantes comparativement à la lignée parentale CAL1-wt ; 2 gènes spécifiquement surexprimés dans un des deux groupes de lignées résistantes (CAL1R-VCR et CAL1R-VDS ; CAL1R-VRB).

### Résistance commune aux VAs des lignées CAL1R-VAs

Six transcrits, fortement altérés dans l'ensemble des 3 lignées CAL1R-VAs, ont été sélectionnés lors de l'analyse transcriptomique : 3 gènes sous-exprimés (GPR143, KIT, et SLC45A2) et 3 gènes surexprimés (MGP, HS6ST2, et SLITRK6).

Les gènes sous-exprimés ayant été étudiés par Chaker Attaoua, ils ne seront pas discutés dans ce manuscrit. Nous nous focaliserons sur mon travail, l'étude du rôle potentiel des 3 gènes surexprimés dans la résistance acquise du MM aux VAs.

Ces gènes avaient été sélectionnés pour des études fonctionnelles parce que l'analyse IPA avait montré que les produits de ces 3 gènes interagissaient au sein d'un même réseau intermoléculaire dont les intervenants principaux, NF- $\kappa$ B et CCND1, étaient déjà connus pour être impliqués dans la chimiorésistance du MM [255,256].

L'activation de NF- $\kappa$ B, un régulateur majeur de la survie cellulaire, est fréquemment évoquée dans la résistance cancéreuse par mécanisme d'échappement à l'apoptose [255]. Ce mécanisme a été rapporté dans la résistance de différents modèles cellulaires (lymphome non-Hodgkinien, cancer gastrique) à la VCR [257–259]. Ainsi, une modulation de l'activité de NF- $\kappa$ B pourrait être impliquée dans la résistance commune des cellules CAL1 aux VAs. Cette modulation de l'activité de NF- $\kappa$ B pourrait mettre en jeu les gènes inclus dans le réseau intermoléculaire, et notamment MGP, HS6ST2, et SLITRK6.

Le rôle de la cycline D1 (CCND1), un régulateur majeur de la prolifération cellulaire, est aussi fréquemment mentionné dans la chimiorésistance tumorale, par échappement à l'apoptose [117]. Une surexpression, ou une activité accrue de CCND1, ont ainsi été rapportées dans la résistance de cellules Hs578T de cancer du sein à la vinblastine [260], un autre VA, et dans la résistance de cellules de cancers hématologiques à la VCR [261]. HS6ST2 code pour une enzyme (héparan sulfate 6-O-sulfotransférase 2) qui permet l'activation de facteurs de croissance tels que le FGF, impliqués dans la croissance cellulaire *via* CCND1 [262]. Ainsi, la surexpression de HS6ST2 pourrait jouer un rôle dans la résistance commune des lignées CAL1R-VAs aux VAs en stimulant indirectement l'activité ou l'expression de CCND1.

Indépendamment des voies de régulation de la survie ou de la prolifération cellulaire, MGP, HS6ST2, et SLITRK6 pourraient aussi intervenir dans la résistance commune aux VAs par des mécanismes spécifiques non encore décrits. A titre d'exemple, MGP a été retrouvé surexprimé dans 9 lignées cellulaires de MM présentant des caractéristiques de cellules souches cancéreuses, cellules connues pour être intrinsèquement chimiorésistantes [256]. La Matrix Gla Protein étant sécrétée, elle pourrait être un bon candidat de biomarqueur de résistance.

En opposition avec nos hypothèses, la répression de ces 3 gènes par siRNA n'a pas modifié de façon majeure la sensibilité des cellules CAL1R-VAs à leur VA de sélection : seule une tendance significative à la sensibilisation (1.2 à 1.6 fois) a pu être observée. MGP, HS6ST2, et SLITRK6 ne semblent donc pas jouer un rôle central, déterminant, dans la résistance acquise aux VAs. Mais en tenant compte de la redondance des voies de signalisation, notamment celles associées à NF- $\kappa$ B et CCND1, et de la multiplicité des mécanismes cellulaires et moléculaires de chimiorésistance [4], une implication, partielle, de ces 3 gènes dans la résistance acquise du MM aux VAs ne peut pas être exclue.

#### Résistance différentielle aux VAs des lignées CAL1R-VAs

Deux transcrits, altérés spécifiquement dans l'un des deux groupes de lignées résistantes, ont été sélectionnés lors de l'analyse transcriptomique : PCSK6, spécifiquement surexprimé dans les lignées CAL1R-VCR et CAL1R-VDS, et PRKCB, spécifiquement surexprimé dans la lignée CAL1R-VRB. PRKCB et PCSK6 (aussi nommé PACE 4) avaient été retenus parce qu'ils interagissaient au sein d'un même réseau intermoléculaire partiellement centré sur des métalloprotéases, et sur le récepteur à l'EGF (EGFR).

Le réseau généré par l'analyse IPA impliquait un grand nombre de protéines (6 protéines sur 35 que contenait le réseau) appartenant à la famille des métalloprotéases : 5 métalloprotéases (MMP 2, 9, 14, 15 et ADAMTS1), et un régulateur de métalloprotéases (TIMP-1). Ces protéines sont impliquées dans l'invasion et l'agressivité des cancers, MM inclus [251,252]. Comme déjà décrit dans la résistance à la VCR de la lignée MCF7 de cancer du sein [136], la surexpression des MMP 2 et 9 pourrait être impliquée dans la résistance aux VAs des cellules du 1<sup>er</sup> groupe (CAL1R-VCR et CAL1R-VDS).

L'EGFR avait été associé à la résistance de cancers, dont le MM, aux chimiothérapies [253,254]. L'expression de EGFR a déjà été corrélée à la résistance tumorale aux VAs : résistance à la VCR de la lignée MCF7 [136], et résistance à la VRB de lignées de cancer du sein [135] et de MM (cellules MDA-MB-435) [263–265].

La PCSK6, spécifiquement surexprimée dans les lignées CAL1R-VCR et CAL1R-VDS, est une enzyme capable d'activer par clivage de nombreux facteurs de croissance, notamment ceux de la famille du TGF- $\beta$  [266]. Aussi, PCSK6 pourrait être impliquée dans la résistance acquise aux VAs des cellules CAL1R-VCR et CAL1R-VDS, par un mécanisme faisant intervenir les voies de prolifération cellulaire, dont celle de l'EGFR.

L'activation du EGFR peut stimuler la prolifération cellulaire par activation de la cascade des MAPK *via* la PKC [267]. La protéine kinase C bêta, codée par PRKCB, étant surexprimée spécifiquement dans la lignée CAL1R-VRB, elle pourrait être impliquée dans la résistance différentielle aux VAs des cellules CAL1R-VRB, par un mécanisme faisant intervenir la voie de signalisation de l'EGFR.

En résumé, la voie de signalisation associée à l'EGFR pourrait jouer un rôle central dans la résistance différentielle des CAL1 aux VAs. Le basculement vers, d'un côté la résistance à VCR et à la VDS, ou de l'autre côté la résistance à la VRB, pourrait être déterminé par les protéines impliquées dans la transduction du signal, parmi lesquelles PCSK6 et PRKCB. La surexpression de PCSK6 serait corrélée à la résistance à la VCR et à la VDS tandis que la surexpression de la PRKCB serait corrélée à la résistance à la VRB.

En opposition avec nos hypothèses, la répression de PCSK6 et PRKCB par siRNA n'a pas modifié la sensibilité des cellules CAL1R-VAs à leur VA de sélection. PCSK6 et PRKCB ne sont donc pas directement impliquées dans la résistance aux VAs de nos lignées CAL1R-VAs. Mais en tenant compte de la complexité des voies de signalisation [268], notamment celle de l'EGFR, une implication partielle de PRKCB et PCSK6 dans la résistance acquise du MM aux VAs ne peut pas être exclue.

Pour conclure, l'étude transcriptomique des lignées CAL1R-VAs a permis de sélectionner de potentiels déterminants moléculaires de la résistance acquise du MM aux VAs : i) MGP, HS6ST2, et SLITRK6, dont la surexpression pourrait être corrélée (tendance significative) à la résistance commune aux VAs ; ii) PCSK6 et PRKCB dont une surexpression, sans corrélation lors des analyses fonctionnelles avec siRNA, est observée dans les lignées résistantes (CAL1R-VCR et CAL1R-VDS, CAL1R-VRB, respectivement).

Cette non-significativité pourrait être expliquée par la redondance des voies de signalisations à l'origine de la survie et de la prolifération cellulaires. Aussi, l'impact de ces gènes sur la résistance du MM aux VAs devrait être étudié conjointement au sein d'associations, d'interactions ou de signatures moléculaires mettant en jeu plusieurs gènes plutôt qu'isolément.

# **III Article 2 : Lysosomes and unfolded protein response, determinants of differential resistance of melanoma cells to vinca-alkaloids.**

---

## **Manuscrit soumis (Fundam Clin Pharmacol.)**

VINCENT Laure-Anais <sup>a</sup>, ATTAOUA Chaker <sup>a</sup>, BELLIS Michel <sup>b</sup>, ROZKYDALOVA Lucie <sup>a,c</sup>, HADJ-KADDOUR Kamel <sup>a</sup>, VIAN Laurence <sup>a</sup>, CUQ Pierre <sup>a\*</sup>

a Laboratoire de Toxicologie du Médicament, Institut des Biomolécules Max Mousseron (UMR5247), UFR des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques, Université Montpellier I, 15 avenue Charles Flahault, BP14491, 34093 Montpellier Cedex 05, France

b Institut de Recherche en Biothérapie, Hôpital Saint-Eloi, 80 avenue Augustin Fliche, 34295 Montpellier Cedex 5, France

c CHU Montpellier, Unit for Cell Therapy, Hôpital Saint-Eloi, Montpellier, F34000 France ; INSERM, U1040, Montpellier, F34000 France

**Key words:** melanoma, vinca alkaloids, neoplasm drug resistance, microarray analysis, lysosomes, unfolded protein response

### **III.1 Contexte et problématique**

L'article 1 a montré une implication différentielle de la GSTM1 et de la MRP1 dans la chimiorésistance acquise des lignées CAL1R-VAs aux VAs. L'activité coordonnée de GSTM1 et MRP1 n'étant requise que dans la résistance à la VCR et à la VDS, les mécanismes de détoxification et d'efflux apparaissent spécifiques au VA impliqué. La comparaison des profils transcriptomiques des lignées CAL1 (parentale et résistantes), distinguant deux groupes de lignées cellulaires (CAL1R-VCR et CAL1R-VDS ; CAL1R-VRB et CAL1-wt), conforte l'hypothèse d'une résistance acquise différentielle des lignées CAL1, d'une part à la VCR et à la VDS, d'autre part à la VRB seule.

La recherche de déterminants moléculaires par l'analyse comparative des profils d'expression des lignées CAL1 avait permis d'identifier 8 gènes potentiellement impliqués dans la résistance acquise aux VAs. Suggérant que ces gènes ne sont pas impliqués de façon directe, ou tout du moins de façon isolée, dans la résistance de ces lignées aux VAs, aucune corrélation fonctionnelle n'a pu être établie après invalidation par siRNA.

La résistance aux agents anticancéreux est souvent le résultat de mécanismes complexes, voire de mécanismes multiples et intriqués. Aussi, il est difficile d'isoler un gène unique impactant la sensibilité à un médicament. Il semble donc plus judicieux de rechercher des déterminants moléculaires de résistance aux seins de fonctions ou voies de signalisation cellulaires.

Afin d'identifier les fonctions cellulaires potentiellement impliquées dans la résistance aux VAs des cellules CAL1R-VAs, nous avons ré-analysé les données transcriptomiques en utilisant une approche alternative, basée sur l'utilisation de logiciels « open source » et de projets coopératifs institutionnels, adaptée à la recherche de mécanismes de résistance sur modèle cellulaire, et robuste même en absence de réplicat.

Les étapes d'analyse étaient les suivantes : i) normalisation par RMA (Robust Multi-array Average), ii) comparaison des profils d'expression par la méthode RDAM (Rank Difference Analysis of Microarray, iii) sélection des gènes dont l'expression est la plus altérée dans les lignées résistantes (génération de listes de transcrits hiérarchisés selon leur degré d'altération), et iv) enrichissement fonctionnel des listes de gènes sélectionnés par MGSA (Ontologizer's model-based gene set analysis).

La nouvelle analyse des données transcriptomiques a été réalisée en collaboration avec Michel Bellis, biostatisticien.

### **III.2 Article**

ORIGINAL  
ARTICLELysosomes and unfolded protein response,  
determinants of differential resistance of  
melanoma cells to vinca alkaloidsLaure-Anais Vincent<sup>a</sup>, Chaker Attaoua<sup>a</sup>, Michel Bellis<sup>b</sup>, Lucie Rozkydalova<sup>a,c</sup>, Kamel Hadj-Kaddour<sup>a</sup>, Laurence Vian<sup>a</sup>, Pierre Cuq<sup>a\*</sup><sup>a</sup>Laboratoire de Toxicologie du Médicament, Institut des Biomolécules Max Mousseron (UMR5247), UFR des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques, Université de Montpellier, 15 Avenue Charles Flahault, BP14491, 34093 Montpellier Cedex 05, France<sup>b</sup>Centre de Recherche de Biochimie Macromoléculaire (CRBM), UMR 5237, CNRS, 1919 Route de Mende, 34293 Montpellier Cedex, France<sup>c</sup>Department of Pharmacology and Toxicology, Faculty of Pharmacy in Hradec Kralove, Charles University in Prague, Heyrovskeho 1203, 500 05 Hradec Kralove, Czech Republic

## Keywords

lysosomes,  
melanoma,  
microarray analysis,  
neoplasm drug resistance,  
unfolded protein response,  
vinca alkaloids

## ABSTRACT

On account of its strong ability to become chemoresistant after a primary response to drugs, malignant melanoma (MM) remains a therapeutic challenge. This study focuses on acquired resistance to vinca alkaloids (VAs) using VA-resistant MM cell lines (CAL1R-VCR, CAL1R-VDS, and CAL1R-VRB), established by long-term continuous exposure of parental CAL1-wt cells to vincristine (VCR), vindesine (VDS), or vinorelbine (VRB), respectively. Transcriptomic profiling using RMA and RDAM methods led to distinguish two cell groups: CAL1R-VCR and CAL1R-VDS, CAL1R-VRB, and CAL1-wt. MGSA of the specifically altered genes in the first group evidenced the GO terms 'lysosomal lumen' and 'vacuolar lumen' linked to underexpressed genes, and 'endoplasmic reticulum (ER) stress response' associated with overexpressed genes. A specific reduction of lysosomal enzymes, independent of acidic vacuole organelle (AVO) turnover, was observed (LTG probe) in CAL1R-VCR and CAL1R-VDS cells. It was associated with the specific lowering of cathepsin B and L, known to be involved in the lysosomal pathway of apoptosis. Confirming gene profiling, the same groups (CAL1R-VCR and CAL1R-VDS, CAL1-wt and CAL1R-VRB) could be distinguished regarding the VA-mediated changes on mean size areas and on acidic compartment volumes. These two parameters were reduced in CAL1R-VCR and CAL1R-VDS cells, suggesting a smaller AVO accumulation and thus a reduced sensitivity to lysosomal membrane permeabilization-mediated apoptosis. In addition, 'ER stress response' inhibition by tauroursodeoxycholic acid induced a higher VA sensitization of the first cell group. In conclusion, lysosomes and unfolded protein response could be key determinants of the differential resistance of MM to VAs.

Received 13 October 2014;  
revised 18 December 2014;  
accepted 24 December 2014\*Correspondence and reprints:  
pierre.cuq@univ-montp1.fr

## INTRODUCTION

With a median overall survival of 6–9 months in patients with metastatic disease, malignant melanoma (MM) is the most aggressive form of skin cancer and remains a therapeutic challenge [1,2]. Indeed, especially due to its low ability to perform efficient apoptosis, MM

is intrinsically resistant to chemotherapeutic agents [3,4]. The example of the standard chemotherapeutic agent dacarbazine, which presents remission rates of only 5–15% used in monotherapy, points out the lack of efficiency of the nonsurgical approaches for defeating MM [1,5,6]. The identification of numerous molecular alterations important to the strong cell death capacity

breakdown of MM led to the establishment of the 'melanoma molecular disease model' [7].

New cancer agents, so-called targeted therapies, have therefore been developed to specifically interfere with the major melanoma genetic aberrations, in order to block the addictive pathways responsible for tumor survival and growth, and thus to overcome classical MM resistance mechanisms [8–10]. As a reference vemurafenib, a specific BRAFV600E inhibitor presents an overall response rate of 50–60%, including 6% of complete response [11]. However, despite this major and prompt response, MM resistance to kinase inhibitors develops within 6–8 months, leading to disease progression and requiring sequential use of conventional chemotherapies [12]. Thus, conventional chemotherapies remain useful for treating non-BRAF-mutated patients and those with progressive disease under immunotherapy [1]. Better understanding the molecular events responsible for the tumor response to these conventional drugs would allow, in the context of bioguided medicine, their personalized administration.

To guide an integrated sequential therapeutic choice through molecular melanoma representation context, the molecular mechanisms of both intrinsic and acquired melanoma resistance to conventional chemotherapeutic agents remain to be elucidated. In this study, we focused on acquired MM resistance to vinca alkaloids (VAs): vincristine (VCR), vindesine (VDS), and vinorelbine (VRB). VAs are microtubule-destabilizing agents, leading to complete microtubule disassembly (at high concentrations), activation of spindle assembly checkpoints, mitotic arrest, and apoptotic cell death [11]. They were used for over 40 years in cancer therapy and are still used in MM treatment as combined agents in chemotherapy [1]. To date, several molecular mechanisms of resistance to antimicrotubule agents have been identified, including mutations or alterations in the expression of  $\beta$ -tubulin isotypes,  $\gamma$ -actin, and actin-associated proteins, alterations in the expression of microtubule-associated proteins (MAPs), or overexpression of xenobiotic detoxification enzymes and transporters [12,13]. We previously pointed to the differential involvement of glutathione S-transferase mu 1 and multidrug resistance protein 1 in resistance to VAs [14,15]. General mechanisms of multidrug resistance such as death pathway escape [16], macro-autophagy [17], response to stress [18], lysosomal accumulation, and/or elimination by exocytosis [19] could also be involved.

Although most studies have focused on a limited number of candidate genes, whole-genome investiga-

tions are required for data integration in the aim to identify genes and pathways that might predict drug resistance. Unfortunately, polychemotherapeutic and polychemoimmunotherapeutic approaches make the search for resistance mechanisms to one particular agent through patient biopsies rather difficult. To obtain an MM model of acquired resistance to VAs, we used three VA-resistant cell lines (CAL1R-VAs) established from parental CAL1-wt MM cells: CAL1R-VCR, CAL1R-VDS, and CAL1R-VRB [15]. Then, we performed transcriptomic profiling of each cell line using Affymetrix HG-U133 Plus 2.00 GeneChips (Santa Clara, CA, USA). To assess what impact the resistance process has on MM cells, we analyzed microarray data in the current knowledge context by confronting cell line expression gene profiles with knowledge databases. This method allows identifying subsets of differentially expressed genes and corresponding canonical pathways that might be involved in acquired resistance to VAs. Through this study, we not only confirmed the differential resistance of CAL1 cells to VAs, but also pointed out new pathways that might be helpful in better understanding MM resistance to guide therapeutic choice and therapy development.

## MATERIALS AND METHODS

### Drugs and chemicals

VCR (100  $\mu$ M in H<sub>2</sub>O), VDS (100  $\mu$ M in H<sub>2</sub>O), VRB (100  $\mu$ M in H<sub>2</sub>O), and chloroquine (2.5 mM in H<sub>2</sub>O) were from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Tauroursodeoxycholic acid sodium salt (TUDCA; 1 mg/mL culture medium) was from Calbiochem (Darmstadt, Germany).

### Cell lines

Parental CAL1-wt cells originated from human MM metastasis [20]. VA-resistant CAL1 cell lines, CAL1R-VCR, CAL1R-VDS, and CAL1R-VRB, were established by continuous exposure, for up to 1 year, of CAL1-wt cells to IC<sub>50</sub> (4 nM) of VCR, VDS, or VRB, respectively. Cells were grown at 37 °C in a fully humidified 5% CO<sub>2</sub> atmosphere, in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% fetal calf serum and 1% L-glutamine.

### RNA isolation and Affymetrix GeneChip processing

To identify gene expression profiles associated with VA resistance, we previously performed global

transcriptomic analysis of CAL1-wt, CAL1R-VRB, CAL1R-VCR, and CAL1R-VDS cell lines [15]. Briefly, total RNA was extracted from each cell line using TRIzol reagent (Invitrogen, Waltham, MA, USA) according to the manufacturer's protocol. Then, the quality of purified RNA sample was checked with an Agilent BioAnalyzer (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). Total RNA from each cell line was therefore prepared for hybridization with Affymetrix HG-U133 Plus 2.00 GeneChip according to the manufacturer's protocol.

### Statistical analysis of microarray data

#### *Rank Difference Analysis of Microarray (RDAM) method*

After hybridization, microarray data were processed with a robust multi-array average (RMA [21]) algorithm as implemented in Bioconductor [22], and resulting signals were analyzed using R<sub>DAM</sub> method [23] implemented in MATLAB (<https://github.com/mbellis/RDAMm/>). In the first step, signals were normalized by replacing the signal by its rank on a continuous scale of 0–100, which allows eliminating eventual systematic bias present on chips, making all chips comparable. In this unit system, variations between two biological conditions are expressed as rank differences on a continuous scale of –100 to 100. The distribution of rank differences is rank dependent, and the same rank differences, for example, calculated for a probeset, which vary from 10 to 20 in one case and from 60 to 70 in another case, do not necessarily have the same *P*-values and cannot be directly compared. A standardization procedure is therefore applied, which consists in this example of assigning identical zVar to rank differences that have the same position in the two rank difference distributions containing, respectively, rank variations from 10 to 100 and from 60 to 100. zVar are also expressed on a continuous scale of –100 to 100.

#### *Selection of probesets*

In absence of replicate, it is not possible to use false discovery rate (FDR) for selecting statistically significant variations. As our objective was not to find one target gene but to elucidate which cellular functions could be involved in VA resistance, we applied a top list enrichment analysis using model-based gene set analysis (MGSA [24]). This type of analysis is rather robust to noise [24], and it is not necessary to have a rigorous delimitation of responder genes. To estimate the number of responder genes in our experiment, we conducted an analysis on 1886 pairs of replicates

hybridized to Affymetrix HGU133 Plus 2.0 array, downloaded from GEO (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>), and analyzed with RMA algorithm. We calculated zVar in comparisons between the two replicates of each pair to recover a series of distributions of zVar corresponding to the null hypothesis (we assumed that there are no statistically significant variation between two replicates). Then, we studied the distribution of the 95th percentile of the absolute value of the standard score of zVar [ $zVar - \text{mean}(zVar) / \text{std}(zVar)$ ], which corresponds to a *P*-value of 5%, and observed that only 5% of them were superior to 1.74 standard deviations. In all the five primary comparisons we made (VCR vs. WT, VDS vs. WT, VRB vs. WT, VDS vs. VRB, and VCR vs. VRB), we noticed that top lists of 1637 probesets either increased or decreased (that is a total of 5% of probesets) have a minimal standard score close to 1.74 standard deviations ( $1.82 \pm 0.13$  and  $1.92 \pm 0.14$  for increased and decreased top lists, respectively), and concluded that the total number of responder probesets was close to 5% in each comparison. In a composite analysis of increased probesets, for example, in VCR and VDS against VRB and WT, we selected 2.5% of probesets that were increased in all four comparisons (VCR vs. WT, VDS vs. WT, VCR vs. VRB, and VDS vs. VRB) and that have the highest mean zVar. Similarly, we selected 2.5% of probesets that were decreased in all four comparisons.

### Bioinformatics analyses of microarray data

#### *Distances between cell lines in the signal space*

The 10 000 probesets with the most important coefficient of variation of their signal between all CAL1 cell lines were used to construct a high-dimensional space where each cell line is represented by a single point, whose coordinates are the signal values of these 10 000 probesets. Then, Euclidean distances between each pair of cell lines were calculated and represented either as a matrix of distances or as a dendrogram.

#### *Functional enrichment analysis*

We searched for selected gene lists using ONTOLOGIZER™ software [25] and Gene Ontology (GO) databases, for overrepresented GO terms to identify biological processes potentially involved in MM resistance to VAs. We used ONTOLOGIZER MGSA algorithm [24], a statistical model based on the Bayesian approach which permits us to identify 'active' categories (most representative overrepresented terms) within hundreds of overlapping terms included in the GO. The significance of the result

was expressed as ‘marginal posterior probability’ (MPP), which corresponded to the probability of a GO term to be active: A GO term was considered significant when its MPP score was  $>0.5$ .

### In vitro analyses

#### Acidic vesicular organelles (AVOs) imaging

CAL1 cells were seeded in 24-well plates ( $2 \times 10^5$  cells/well), then incubated for 24 h at 37 °C in the absence (negative control) or in the presence of VAs (VRB, VCR, or VDS; 500 nM), or chloroquine (25  $\mu$ M; positive control of AVO accumulation) [26,27]. To visualize the AVOs, cells were stained with neutral red (NR) to a final concentration of 50  $\mu$ g/mL for 30 min at 37 °C. After washing twice in PBS, live cells were visualized using an inverted microscope for transmitted light (Zeiss, Oberkochen, Germany) equipped with an APLACHROMAT 40 $\times$ /0.6 objective (Zeiss) and imaged using IMAGE J Software (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA).

#### Flow cytometry analysis

CAL1 cells were seeded in six-well plates ( $10^6$  cells/well), then incubated for 24 h at 37 °C in the absence (control) or in the presence of VAs (VRB, VCR, or VDS; 500 nM), or chloroquine (25  $\mu$ M; positive control of AVO accumulation) [26,27]. To determine acidic compartment volume, cells were stained with 50 nM of lysosomotropic LysoTracker<sup>®</sup> Green DND-26 (LTG; Cell Signalling, Danvers, MA, USA) for 20 min at 37 °C, washed, trypsinized, and suspended ( $10^6$  cells/mL). Cell suspensions were analyzed using a CyAn<sup>™</sup> ADP analyzer (Beckman Coulter, Villepinte, France), at the Montpellier RIO Imaging platform (<http://www.mri.cnrs.fr/>).

#### Cell survival assays

The effect of VAs on cell viability was assessed using 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) staining as previously described [28]. Briefly, cells were seeded at 7500 cells a well in 96-well microtiter culture dish for 24 h. Then, cells were treated with VCR, VDS, or VRB for 72 h (150  $\mu$ L in fresh medium per well, six wells per agent concentration). TUDCA (1 mg/mL), an inhibitor of endoplasmic reticulum stress, was added 1 h before exposure to VAs [29]. Untreated control cells were grown in a classic culture medium plus vehicle. After 72-h incubation, cells were stained with new medium containing 0.1 mg/mL of MTT (Sigma-Aldrich) at 37 °C for 2 h. Then, the medium was removed and 0.1 mL dimethyl

sulfoxide (DMSO; Sigma-Aldrich) was added. Eluted stains were measured at 540 nm using the microplate reader 352 Multiscan MS (Labsystems, Ramat-Gan, Israel). Cell survival rates were normalized to the absorbance values of untreated cells.

### Statistics

Results are given as the mean  $\pm$  standard deviation (SD) of at least three independent experiments. Statistical analysis was performed using the Student's *t*-test.  $CI_{50}$  from cell survival assays was obtained using a logistic regression model on GRAPHPAD PRISM software (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA).

## RESULTS

### VA-selected cell lines

To study the molecular mechanisms involved in the acquired resistance of MM to VAs, we established three VA-resistant melanoma cell lines, CAL1R-VCR, CAL1R-VDS, and CAL1R-VRB, through long-term exposure ( $>12$  months) of parental CAL1-wt cells to  $IC_{50}$  (4 nM) of VCR, VDS, and VRB, respectively [15]. Selected CAL1R-VAs cells presented a resistance ratio range of 10–100 to their selection agents with regard to the parental CAL1-wt cells (Table I); they also developed cross-resistance to all other VAs (resistance ratios  $\geq 10$ ).

### Transcriptomic profiling of VA-mediated resistance

#### Transcriptomic analysis

To identify the molecular processes involved in acquired resistance to VAs, we performed a transcriptomic profiling of the different CAL1 cell lines. As described above, RNAs were extracted and hybridized to Affymetrix HG-U133 Plus 2.00 GeneChips, providing complete coverage of the human genome [15]. Microarray data, normalized using RMA method, are available in line: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE61007>.

**Table I** Effects of VRB, VCR, and VDS on CAL1R-VA cells.

	Resistance ratio		
	VRB	VCR	VDS
CAL1R-VRB	42	46	40
CAL1R-VCR	54	40	49
CAL1R-VDS	$>100$	$>100$	$>100$

Resistance ratios are  $IC_{50}$  of VA in resistant cell line/ $IC_{50}$  of VA in CAL1-wt. Data are means of three independent experiments.

### Distances between gene expression profiles

To highlight the gene expression profile alterations due to long-term VA exposure, we generated a hierarchical tree by clustering the 10 000 probesets with the highest coefficient of variation in their signals. The matrix of distances (Figure 1a) and the dendrogram (Figure 1b), reflecting the relationships among expression profiles, allowed the visualization of two distinct cell groups: on the one hand CAL1R-VCR and CAL1R-VDS, and on the other hand CAL1-wt and CAL1R-VRB. This result suggested that different mechanisms might be involved in acquired resistance of CAL1 cells to the studied VAs: first to both VCR and VDS, and second to VRB alone.

### Selection of probesets

To identify molecular alterations potentially involved in differential resistance to VAs, we refined CAL1 gene expression profile comparisons. As described in Materials and methods, differential resistance was addressed using the mean of variation (zVar) which allows us to select probesets that are altered in comparisons between one group of resistant cell (either CAL1R-VCR + CAL1R-VDS or CAL1R-VRB) and the other group plus CAL1R-WT. Comparison of CAL1R-VCR and CAL1R-VDS vs. CAL1R-VRB cell lines allowed to study differential resistance, whereas comparing each resistant cell group with CAL1-wt allowed to take in account basal gene expression levels. The 5% probesets having the highest mean variation (i.e. 1637 first probesets of each top list, either up- or downregulated) were selected and submitted to further bioinformatics analysis after cleaning of unnamed and supernumerary redundant gene names.

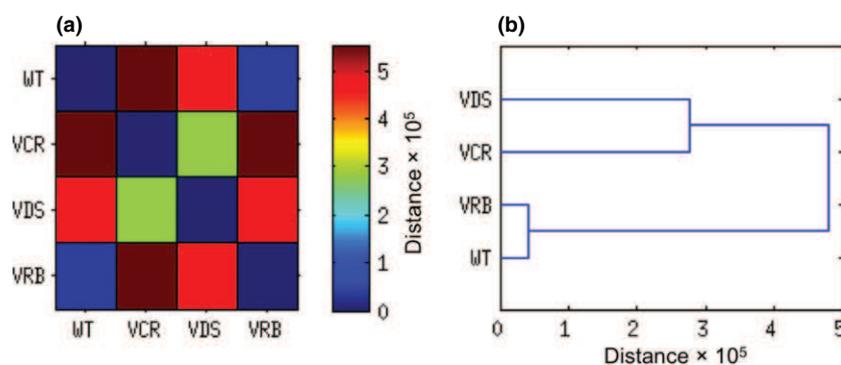
### Functional enrichment of responder gene lists

To determine which biological functions were altered in VA-selected cells, we performed functional enrichment

analysis (see Materials and methods). Typically, this type of analysis is performed by calculating an enrichment *P*-value independently on each GO term from the selected gene list and may deliver a large list of GO terms whose relationships among each other may not be readily graspable. The MGSA algorithm we used belongs to new strategies based on modeling the relationships between GO terms and the activation of genes which was recently developed and tries to return a set of core terms that together best 'explain' [24] the selected genes. The advantage of MGSA is that it delivers a small list of relevant terms with few redundancies and which is easily understandable.

ONTOLOGIZER analysis of the composite comparison of CAL1R-VRB vs. CAL1R-VCR, CAL1R-VDS, and CAL1-WT did not give any significant results. We thus focused on the composite comparison of CAL1R-VCR and CAL1R-VDS vs. CAL1R-VRB and CAL1-WT to search for biological functions whose alterations could explain differential resistance to VAs. Two significant ( $MPP \geq 0.5$ ) and two marginal ( $0.3 < MPP < 0.5$ ) active terms, strongly linked to gene alterations, were specifically evidenced: 'pigmentation' and 'lysosomal lumen'; and 'vacuolar lumen' and 'response to endoplasmic reticulum (ER) stress response', respectively (Table II). 'Pigmentation', 'lysosomal lumen', and 'vacuolar lumen' were associated with underexpressed genes in CAL1R-VCR and CAL1-VDS cells, whereas 'ER stress response' was linked with overexpressed genes in these cells. The classification as active of both 'vacuolar lumen' (a parental term) and 'lysosomal lumen' (its child term) suggested the major role of vacuolar modifications in acquired resistance to VAs. Strengthening this hypothesis, the two active terms shared the same annotated gene products, especially a group of lysosomal cathepsins: cathepsin B (CTSB), K (CTSK), L (CTSL1), and V (CTSL2). Moreover, 'vacuolar lumen' was linked to the sibling terms 'endosomal

**Figure 1** Comparison of gene expression profiles of CAL1 cell lines. The 10 000 probesets with the most important coefficient of variation of their signals between all CAL1 cell lines were used to compare each cell line. The distances between each pair of cell lines were calculated as described in Materials and methods and represented either as a matrix of distances (a) or as a dendrogram (b).



**Table II** GO term enrichment analysis of genes up- and downregulated in CAL1R-VCR and CAL1R-VDS cells using ONTOLOGIZER software.

GO active terms related to CAL1R-VCR and CAL1R-VDS cell lines							
Comparison	Variation	GO ID	GO term name	go database	Rank	MPP	Annotated gene products
Specific CAL1R-VCR and CAL1R-VDS _decrease	↓	GO:0043473	Pigmentation	BP	1	0.687	ATP7A, BBS4, BBS5, BCL2L11, CITED1, DCT, GNAQ, HPS5, KIT, MITF, MLPH, MYO5A, NF1, OCA2, RAB11A, SNAI2
	↓	GO:0043202	Lysosomal lumen	CC	2	0.508	BCAN, CTSB, CTSK, CTSL1, CTSL2, GALC, GLB1, GM2A, GNS, HEXB, HPSE, LGMN, LUM, SGSH, SMPD1
	↓	GO:0005775	Vacuolar lumen	CC	3	0.492	BCAN, CTSB, CTSK, CTSL1, CTSL2, GALC, GLB1, GM2A, GNS, HEXB, HPSE, LGMN, LUM, SGSH, SMPD1
Specific CAL1R-VCR and CAL1R-VDS _increase	↑	GO:0034976	Response to endoplasmic reticulum stress	BP	1	0.380	ASNS, BAX, CHAC1, DDIT3, DNAJB9, EDEM1, EIF2S1, FAM129A, GFPT1, HERPUD1, ITPR1, PLA2G6, PPP1R15A, SHC1, SRPRB, TNFRSF10B, TRIB3, XBP1

GO terms strongly linked to gene expression alterations in CAL1R-VCR and CAL1R-VDS are defined as active terms, with significant statistical probability if  $MPP > 0.5$ , and marginal statistical probability if  $0.4 < MPP < 0.5$ . Annotated gene products correspond to altered genes from our experiment, which are annotated with the corresponding GO term.

↓, Underexpressed genes in CAL1R-VCR and CAL1R-VDS; ↑, Overexpressed genes in CAL1R-VCR and CAL1R-VDS; BP, biological process; CC, cellular component; MF, molecular function; MPP, marginal posterior probability.

lumen' and 'vacuolar proton-transporting V-type ATPase complex' (see *Table I* in *Table S1*). Taken together, these results pointed out the potential key roles of acidic vacuolar organelles (AVOs), but also ER stress alterations in acquired differential resistance of CAL1 cells to VAs.

### Functional in vitro studies of VA-mediated resistance

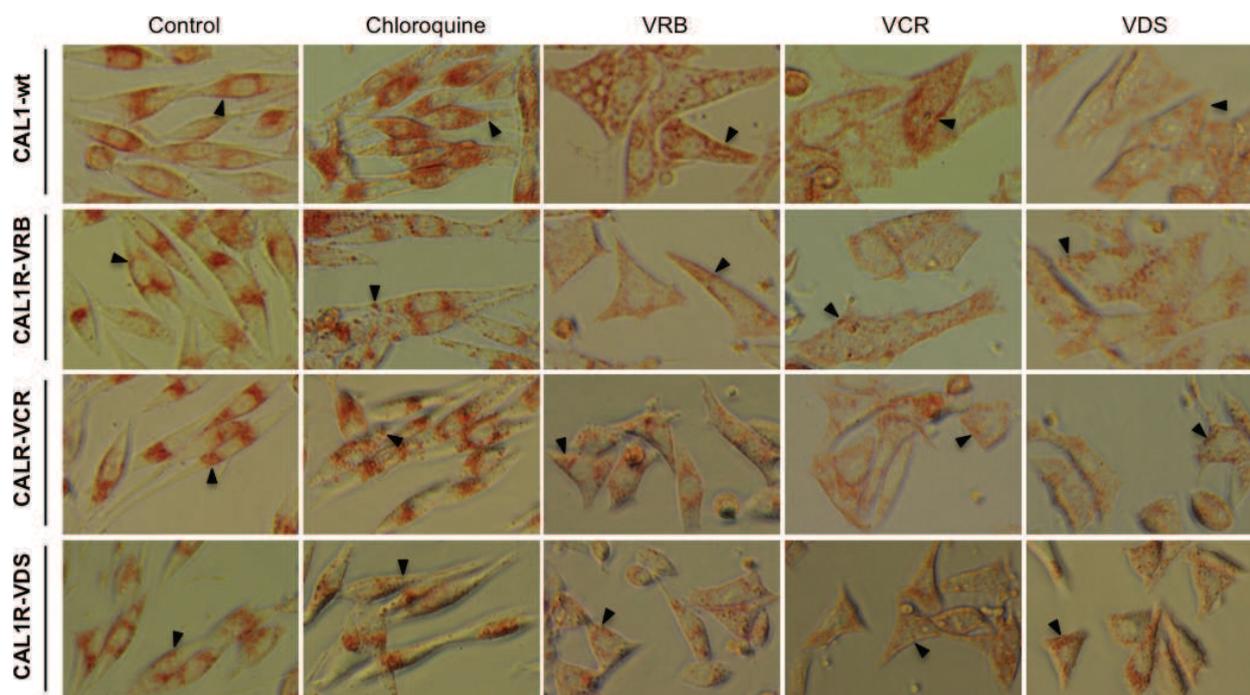
In our second step, we performed in vitro experiments with the aim of better understanding the mechanisms associated with gene expression alterations in CAL1R-VA cell lines: AVOs and ER stress response were particularly studied.

#### Morphology and AVOs of VA-selected cells

In standard culture conditions, all CAL1 cells presented the same fusiform morphology (*Figure 2*). Any significant difference in size areas was evidenced by flow cytometry (*Table III*). Microscopic imaging, after NR vital staining of acidic compartment [30], revealed thin red punctuations indicating small AVOs in close proximity to nuclei in all cell lines (*Figure 2*). By contrast, and in agreement with the above bioinformatics data identifying two cell groups, quantification by flow cytometry of the acidic compartment

using the LysoTracker<sup>®</sup> Green DND-26 lysosomotropic probe (LTG) revealed a significantly lower (about -20%) volume of this compartment in CAL1R-VCR and CAL1R-VDS compared to CAL1-wt and CAL1R-VRB cells (*Figure 3*).

To check whether the lowering of the acidic compartment volume was due to an alteration of AVO dynamics in CAL1R-VCR and CAL1R-VDS, we studied the effects of chloroquine (24 h, 25  $\mu$ M), a lysosomotropic agent known to disrupt lysosomal enzyme activities, and thus vacuolar content degradation, resulting in a break in AVO turnover [26]. Chloroquine is classically used as positive control of intracellular vesicular swelling [27,31]. The effects of chloroquine were equivalent in all CAL1 cell lines (parental and VA-selected). It affected neither global fusiform morphology (*Figure 2*) nor size (*Table IV*), whereas NR vital staining pointed out noticeable swelling and dispersion of AVOs in the cytoplasm (*Figure 2*). Moreover, even if the acidic compartment volumes were smaller in CAL1R-VCR and CAL1R-VDS cells than in CAL1-wt and CAL1R-VRB cells, they were similarly increased (about 6.8-fold) by chloroquine in all cell lines, as shown by the similar ratios (chloroquine treated/untreated) of LTG mean fluorescences (*Figure 3*). Taken together, these data indicated that the specific lowering of the



**Figure 2** Effect of VAs exposure on morphology and AVOs of CAL1 cells. Cells were incubated in the absence (control), or in the presence of VA (VRB, VCR, or VDS; 24 h, 500 nM). Chloroquine (24 h, 25  $\mu$ M) was used as positive control of AVO alteration. To image AVOs, CAL1 cells were stained with lysosomotropic neutral red probe (NR, 50  $\mu$ g/mL, 30 min), then visualized using phase-contrast microscopy at 400 $\times$  magnification. Black arrows point to AVOs in representative cells.

**Table III** Cellular size area quantification (arbitrary units) of CAL1 cells using flux cytometry analysis.

Mean size area/cell	
CAL1-wt	64.76 $\pm$ 4.05
CAL1R-VRB	59.10 $\pm$ 4.60
CAL1R-VCR	62.64 $\pm$ 4.74
CAL1R-VDS	64.89 $\pm$ 2.37

acidic compartment volume in CAL1R-VCR and CAL1R-VDS was not due to an alteration of AVO dynamics.

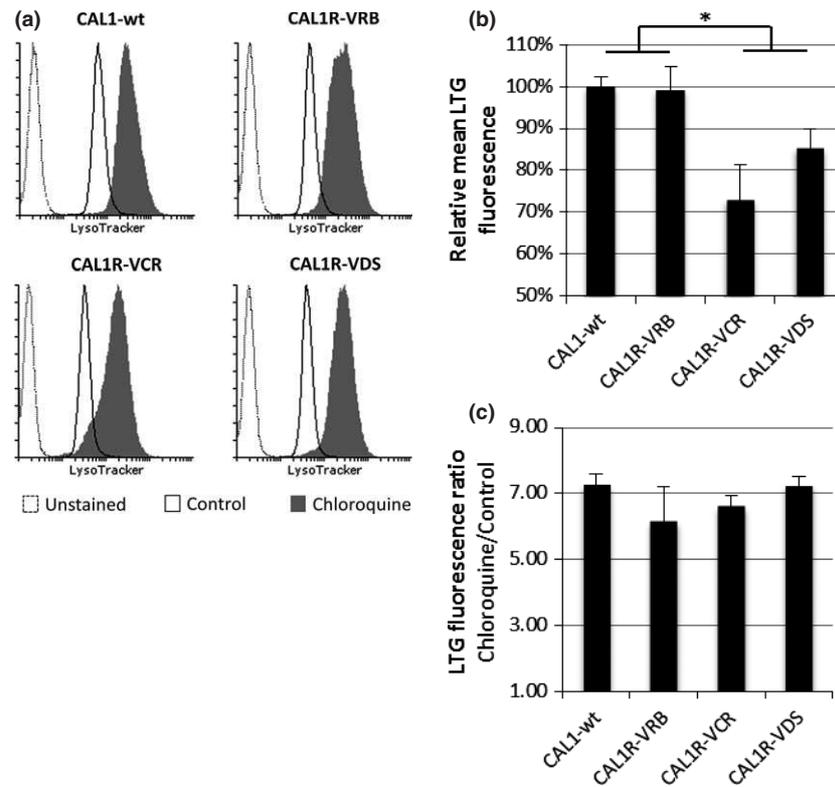
#### *Effects of VA treatment on morphology and AVOs in VA-selected cells*

Because VAs are weak bases able to accumulate in lysosomes [32], and to disrupt tubulin network along which organelles move [33], we then investigated the effects of VAs on cell morphology, AVO localization, and volume.

All the VAs tested (VRB, VCR, and VDS; 500 nM) significantly altered the global morphology of cultured

cells. After 24-h exposure, and regardless of the VA used, all cell lines (parental and VA-selected) lost their fusiform morphology and exhibited similar morphological characteristics with spread cytoplasm when plated (*Figure 2*). However, in agreement with our gene profiling, two cell groups could be distinguished regarding the importance of the VA-mediated changes on mean size areas: on the one hand CAL1R-VCR and CAL1R-VDS cells, and on the other hand parental CAL1-wt and CAL1R-VRB cells. As shown in *Table IV*, VA treatment, whatever the VA used, significantly decreased mean size areas of CAL1R-VCR and CAL1R-VDS cells (–15 to –27%), whereas no significant change was observed in CAL1R-VRB and CAL1-wt.

We then studied whether VAs could alter AVO localization and volume. Microscopic imaging of CAL1 cells after NR staining (*Figure 2*) revealed red punctuations bigger than those found in the control group and scattered throughout the cytoplasm, indicating that VA treatment altered both AVO size and localization in all CAL1 cells. Flow cytometry of LTG-labeled CAL1 cells (*Figure 4*) suggested that this VA-mediated AVO enlarging could be related to an increase in acidic



**Figure 3** Flow cytometry analysis of AVOs in CAL1 cells. CAL1 cells were incubated for 24 h in the absence (control), or in the presence of 25  $\mu\text{M}$  of chloroquine. To quantify acidic compartment volume, CAL1 cells were labeled with lysosomotropic LysoTracker<sup>®</sup> Green DND-26 probe (LTG, 50 nM, 20 min); then, total LTG fluorescence per cell was determined using flow cytometry. Representative histograms (a) are displayed. On the *y*-axis is the cell count in normalized scale, and the *x*-axis is the fluorescence intensity in log scale. (b) Quantification of acidic compartment volume of each untreated (control) CAL1 cell line is represented as relative mean LTG fluorescence, for example (mean LTG fluorescence per CAL1 cell/mean LTG fluorescence per CAL1-wt cell)  $\times$  100. (c) Quantification of acidic compartment volume alteration by chloroquine is represented as ratio of mean fluorescence in chloroquine-treated cells on mean fluorescence in control cells. Results are mean  $\pm$  SD from three independent experiments. \* $P < 0.05$  significantly different according to Student's *t*-test.

compartment volume. However, as above, two cell groups could be distinguished regarding, for each VA, the importance of the increase on acidic compartment volume: The increase was smaller in the first group (CAL1R-VCR and CAL1R-VDS) than in the second (CAL1-wt and CAL1R-VRB). Thus, VA treatment did not affect (VRB) or only slightly increased (VCR, VDS) acidic compartment volume of CAL1R-VCR and CAL1R-VDS cells, whereas it significantly increased (all VAs; at least 2.2-fold (VRB) and 3.5-fold (VCR, VDS) that of CAL1-wt and CAL1R-VRB cells. Additionally, the fact that, for all cell lines, the effects of VRB on acidic compartment volume were always significantly lower than that of VCR and VDS suggested that VRB was less able to alter AVO dynamics than VCR and

VDS. Taken together, these data suggested the involvement of AVO alterations in CAL1 differential resistance to VAs.

#### *ER stress response involvement in CAL1 cell differential resistance to VAs*

ER stress response, a homeostatic pathway also known as unfolded protein response (UPR), is activated upon protein-folding stress in order to recover ER function or to eliminate damaged cells by apoptosis, indicating the existence of dual mechanisms of balancing pro-survival and pro-apoptotic response [34]. To check whether the UPR was involved in CAL1R-VAs resistance to VAs, we studied the effects of TUDCA (72 h, 1 mg/mL) on CAL1 cellular sensitivities to VAs; TUDCA is an ER

**Table IV** Effect of VAs exposure on cellular size of CAL1 cells.

	Size area relative ratios (%)			
	Chloroquine	VRB	VCR	VDS
CAL1-wt	101 ± 6	106 ± 6	99 ± 2	97 ± 4
CAL1R-VRB	99 ± 2	95 ± 2	95 ± 2	96 ± 1
CAL1R-VCR	98 ± 3	75 ± 5**	85 ± 1**	83 ± 1**
CAL1R-VDS	99 ± 5	73 ± 2**	84 ± 2**	85 ± 3**

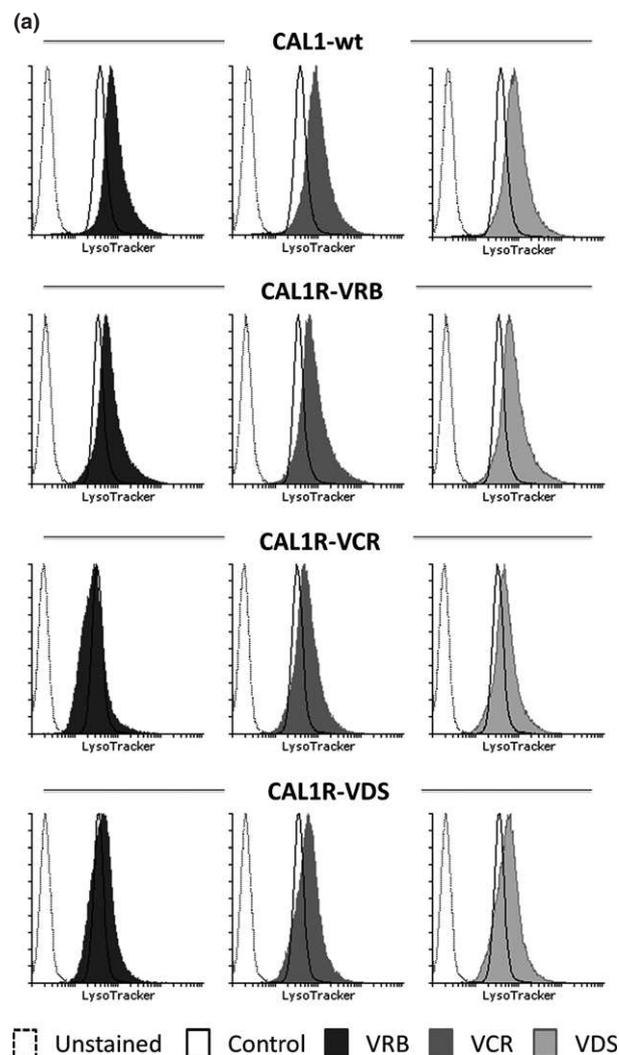
Cells were incubated in the absence (control), or in the presence of VA (VRB, VCR, or VDS; 24 h, 500 nM), or chloroquine (24 h, 25  $\mu$ M). Cellular size areas were quantified (arbitrary units) through flow cytometry analysis and expressed as relative ratios [RR = mean size area per treated cell  $\times$  100/mean size area per untreated (control) cell]. RR of 100% indicates no change of mean size area in treated cells. Results are mean  $\pm$  SD from three independent experiments.

\*\* $P < 0.01$ ; significantly different from control cell according to Student's *t*-test.

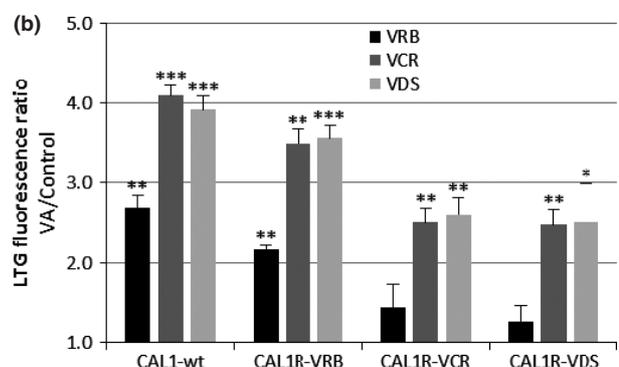
chemical chaperone known to efficiently reduce ER stress response in human cells and to disrupt all three branches of UPR pathway [35,36].

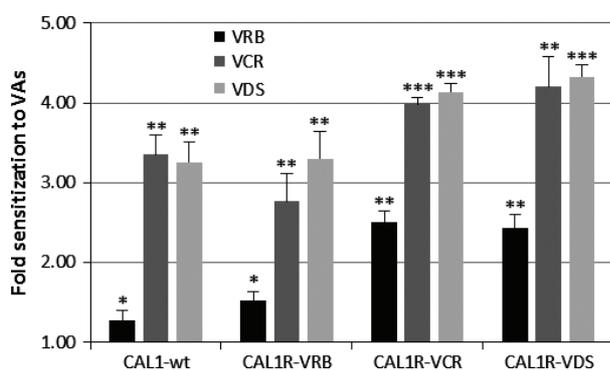
Suggesting the involvement of UPR in both primary and acquired resistances of CAL1 cells to VAs, UPR inhibition by TUDCA significantly reduced the VA resistance of both parental CAL1-wt and selected CAL1R-VAs cells, whatever the VA used (Figure 5). For all cell lines, the sensitizing effects of TUDCA were significantly higher for VCR and VDS than for VRB. However, in agreement with our above data, two cell groups could be distinguished regarding the importance of the sensitization to VAs by TUDCA: on the one hand CAL1R-VCR and CAL1R-VDS cells, and on the other hand parental CAL1-wt and CAL1R-VRB cells. Indeed, the VA-sensitizing effects of TUDCA were significantly higher in the first cell group (CAL1R-VCR and

CAL1R-VDS) than in the second one (CAL1-wt and CAL1R-VRB). Taken together, these results indicate the role of UPR in melanoma differential resistance to VAs. In agreement with our bioinformatics data, which linked the active GO term 'ER stress response' to



**Figure 4** Effect of VAs exposure on acidic compartment volume of CAL1 cells. Cells were incubated in the absence (control), or in the presence of VA (VRB, VCR, or VDS; 24 h, 500 nM). To quantify acidic compartment volume, CAL1 cells were labeled with lysosomotropic LysoTracker<sup>®</sup> Green DND-26 probe (LTG, 50 nM, 20 min); then, total LTG fluorescence per cell was determined using flow cytometry analysis. Representative histograms (a) are displayed. On the *y*-axis is the cell count in normalized scale, and the *x*-axis is the fluorescence intensity in log scale. (b) Quantification of acidic compartment volume alteration by VAs is represented as ratio of mean fluorescence in VA-treated cells on mean fluorescence in control cells. Results are mean  $\pm$  SD from three independent experiments. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  significantly different from control cells according to Student's *t*-test.





**Figure 5** Effects of ER stress inhibitor TUDCA on CAL1 cellular sensitivities to VAs. Fold sensitization is defined as  $IC_{50}$  of VA (VRB, VCR, or VDS) in the absence of inhibitor/ $IC_{50}$  of VA in the presence of inhibitor (TUDCA, 1 mg/mL). Results are mean  $\pm$  SD from three independent experiments. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  significantly different from untreated cells according to Student's *t*-test.

overexpressed genes in CAL1R-VCR and CAL1R-VDS cells, suggesting a higher ER stress, the VA-sensitizing effect of TUDCA was higher in these cells.

## DISCUSSION

In the current context of molecular classification of MM [7], molecular alterations induced by melanoma therapies should be understood to better drive patient treatment. Surprisingly, very few studies concern conventional chemotherapies, which are always useful when resistance to new therapies occurs [1]. We thus focused this study on molecular mechanisms of MM acquired resistance to microtubule-destabilizing compounds VAs, which are still used in MM treatment in combined chemotherapies [1,37]. Because this last practice makes the use of patient biopsies ineffective when pinpointing single-drug-related molecular alterations, we chose an *in vitro* approach using CAL1 cell lines [14]. To address the question of acquired resistance, we used three VA-resistant CAL1 cell lines (CAL1R-VCR, CAL1R-VDS, and CAL1R-VRB), previously established by continuous long-term exposure of parental CAL1-wt cells to the  $IC_{50}$  of VCR, VDS, or VRB, respectively [15]. All CAL1R-VAs cell lines consisted of polyclonal populations and presented both a resistance to their selection VA, and a cross-resistance to the other VAs.

To identify cellular functions, rather than target genes, which could be involved in acquired resistance to VAs, microarray data previously obtained from

CAL1R-VA cell lines [15] were analyzed using the association of three methods and algorithms (RMA, RDAM, and MGSA) [21,23,24]. Background correction and normalization of microarray data using RMA is widely accepted as one of the best methods for analyzing Affymetrix data [38]. Using RDAM method, variations in probeset expression between two biological conditions are expressed on a normalized continuous scale independent of the value of the signal [23], thus giving the same weight to weakly and highly expressed probesets. Finally, functional enrichment of top probeset lists using MGSA algorithm reduces data from hundreds of overlapping terms included in GO [24] to a small list of relevant GO terms, with few redundancies.

Supporting our previous study [15], the comparison of transcriptomic profiles of CAL1 cells after probeset selection, using RMA and RDAM methods, allowed the identification of two distinct cell groups: on the one hand CAL1R-VCR and CAL1R-VDS, and on the other hand CAL1-wt and CAL1R-VRB. This result again suggested that different mechanisms might be involved in acquired resistance of CAL1 cells to the studied VAs: first to both VCR and VDS, and second to VRB alone. The most differentially expressed probesets, by extrapolation genes, in resistant lines were selected by composite comparisons: The first centered on both CAL1R-VCR and CAL1R-VDS cell lines, and the second centered on the CAL1R-VRB cell line alone. MGSA of the specifically altered genes in both CAL1R-VCR and CAL1R-VDS cell lines evidenced four GO terms: 'pigmentation', 'lysosomal lumen', and 'vacuolar lumen' linked to underexpressed genes, and 'ER stress response' associated with overexpressed genes. By contrast, MGSA of the specifically altered genes in the CAL1R-VRB cell line did not give any significant results. As easily visualized on the matrix of distances showing the similarity of the expression profiles of CAL1R-VRB and CAL1-wt cells, the mean probeset variations were too close to allow identification of active GO terms using MGSA. Thus, our bioinformatics data suggested that the mechanisms responsible for acquired differential resistance of CAL1 cells to VAs might involve alterations of AVOs, ER stress response, and pigmentation.

Very few publications deal with the involvement of AVO alterations in cancer resistance to antimicrotubule agents [19,39–41]. The reduction of lysosomal enzymes, due to increased rate of lysosomal content secretion, was previously reported in CEM/VLB100 human lymphoblastic leukemia cells resistant to

vinblastine (VBL), another VA [19]. In accord with this paper's results, our bioinformatics data pointed out a specific underexpression of lysosomal enzymes in VA-resistant CAL1R-VCR and CAL1R-VDS cells. These data were further supported by flow cytometry analysis (LTG probe) showing significantly smaller acidic compartment volumes in CAL1R-VCR and CAL1R-VDS than in CAL1R-VRB and CAL1-wt cells, whereas all cell lines presented similar size areas and fusiform morphologies. By contrast, and indicating that AVO turnover was unaffected by VA-selection, the AVO dynamic disrupting agent chloroquine similarly increased acidic compartment volume in all cell lines. Thus, contrary to data previously observed in VBL-resistant leukemia cells [19], the specific reduction of lysosomal enzymes in CAL1R-VCR and CAL1R-VDS cells cannot be explained by an increase of AVO turnover in these cells.

One hypothesis to explain the role in differential resistance to VAs of the specific reduction, pointed out by *MGSA*, of lysosomal enzymes in CAL1R-VCR and CAL1R-VDS cells could be that key lysosomal enzymes were specifically affected in these cells. In fact, bioinformatics revealed a specific alteration of cathepsins (underexpression: cathepsin B, K, L, and V) in CAL1R-VCR and CAL1R-VDS cells. Unlike in our cell model, cathepsin B and L were previously found to be highly expressed in cancer cells [39]. Cathepsins B and L can destabilize lysosomal membranes via the cleavage of LAMP1 and LAMP2 [42]. When released into the cytoplasm after lysosomal membrane permeabilization (LMP), they are able to initiate the lysosomal pathway of apoptosis [43–45]. Furthermore, they were reported to be good response markers to agents, such as siramesine, targeting lysosomal cell death pathways [39]. VAs are able to accumulate in lysosomes [32]. Moreover, lysosomotropic and antimicrotubule agents such as VCR have been shown to induce LMP and so to initiate the lysosomal pathway of apoptosis [40,45,46]. Thus, the specific lowering of cathepsin B and L, reducing the ability of CAL1R-VCR and CAL1R-VDS cells to undergo an efficient lysosomal pathway of apoptosis, could be involved in the differential resistance of these cells to VAs.

Because VAs are able to disrupt tubulin network and to induce AVO accumulation [46], we then investigated the effects of VAs on cell morphology and AVOs (size and localization). All the VAs tested (VRB, VCR, and VDS; 500 nM, 24 h) induced the same changes on plated cells: All (parental and VA-selected) treated cells

lost their fusiform morphology and exhibited spread cytoplasm, with AVO size enlargement and dispersion. Similar changes were previously observed in HeLa cervix carcinoma and MCF-7 breast carcinoma cells after VCR treatment [46]. However, confirming our gene profiling data, the same two cell groups (CAL1R-VCR and CAL1R-VDS; CAL1-wt and CAL1R-VRB) could be distinguished regarding the VA-mediated changes, on the one hand by mean size areas, and on the other hand by acidic compartment volumes. Indeed, mean cell size areas were significantly decreased (by about 20%) by all VAs in the first group, whereas no significant change was observed in the second group. As described in VCR-treated MCF-7 and HeLa cells [46], an increase in acidic compartment volume was observed (LTG probe), indicating an AVO accumulation, in all VA-treated cells. The accumulation of AVOs was reported to precede VCR-induced destabilization of lysosomes in these cells, leading to LMP-mediated cell death. However, and paralleling the reduction of mean size area, this increase was significantly smaller (about 40%) in the first group than in the second one. Taken together, these results suggest that the smaller AVO accumulation in CAL1R-VCR and CAL1R-VDS cells, reducing their sensitivity to LMP-mediated apoptosis, could be involved in the differential resistance of these cells to VAs. This potential mechanism of resistance might be crossed with other drugs (e.g. paclitaxel, epothilone B, and discodermolide) that act on microtubules, and can also induce LMP-mediated apoptosis [45]. Surprisingly, the relationship between resistance and AVO alterations in a context of LMP-mediated apoptosis has not been described before and the general applicability of these findings remains to be confirmed.

The other active GO term identified from bioinformatics data was the specific ER stress response, for example, UPR: It was associated with overexpressed genes in CAL1R-VCR and CAL1R-VDS cells. UPR is involved in the recovery of ER function: Triggered by ER stress, UPR can activate autophagy, a homeostatic pathway leading to the delivery of cellular material to lysosomes for degradation and recycling [47]. Interestingly, UPR [48] and autophagy [49,50] were previously reported to be involved in the resistance of numerous cancer cells, including MM. Thus, an increased ER stress response may be involved in the VA resistance of CAL1 cells. To check this hypothesis, we studied the effects of TUDCA, a chemical chaperone known to efficiently reduce ER stress response [35,36], on CAL1 cellular sensitivities to VAs. Suggesting the

involvement of UPR in both primary and acquired resistances of CAL1 cells to VAs, UPR inhibition by TUDCA significantly reduced the VA resistance of both parental CAL1-wt and selected CAL1R-VAs cells, whatever the VA used. For all cell lines, the sensitizing effects of TUDCA were significantly higher for VCR and VDS than for VRB. However, two cell groups (CAL1R-VCR and CAL1R-VDS; CAL1-wt and CAL1R-VRB) could be again distinguished regarding the importance of the sensitization to VAs by TUDCA; the VA-sensitizing effects of TUDCA were significantly higher in the first cell group than in the second one. Taken together, these results point out the role of UPR in differential resistance of CAL1 melanoma cells to VAs. They are in agreement with a previous study showing the involvement of the XBP-1 branch of the UPR pathway in induced resistance to VCR of a panel of human melanoma cells [18].

In conclusion, this paper shows a differential resistance of MM cells to VAs: on the one hand to VCR and VDS, and on the other hand to VRB. The involvement of the 'lysosomes' and 'UPR' pathways, proposed by bioinformatics analysis of transcriptomic data, was confirmed by functional studies *in vitro*. Because both 'lysosomes' and 'UPR' may affect tumor ecology [51,52] and local immunity [53], with potential great impact in MM therapy, it will be very interesting to explore these hypotheses *in vivo* through xenograft model. Moreover, these data provide a rationale for studying the relationship between particular selected genes, such as cathepsins and XBP1s, and MM response to VAs. The expression level of these genes could provide biomarkers for guiding rational therapeutic and personalized medicine.

## ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by grants from GEFLUC-LR [Grant Number DC/MLP/09-011], and by HPC resources from GENCI-CINES (<http://www.cines.fr/>) [Grant Number c2014035038]. We thank Christophe Duperray from the Montpellier RIO Imaging Platform of Institut de Médecine Régénératrice et de Biothérapie (I.M.R.B.) for technical assistance in cytometry analysis.

## ABBREVIATIONS

AVO – Acidic vacuole organelle  
ER – Endoplasmic reticulum

LTG – LysoTracker® Green DND-26  
MGSA – Model-based gene set analysis  
MM – Malignant melanoma  
MTT – 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide  
NRU – Neutral red uptake  
GO – Gene ontology  
RDAM – Rank difference analysis of microarray  
RMA – Robust multi-array average  
TUDCA – Tauroursodeoxycholic acid  
UPR – Unfolded protein response  
VA – Vinca alkaloids  
VCR – Vincristine  
VDS – Vindesine  
VRB – Vinorelbine

## REFERENCES

- Garbe C., Peris K., Hauschild A., Saiag P., Middleton M., Spatz A. et al. Diagnosis and treatment of melanoma. European consensus-based interdisciplinary guideline – Update 2012. *Eur. J. Cancer* (2012) **48** 2375–2390.
- Garbe C., Leiter U. Melanoma epidemiology and trends. *Clin. Dermatol.* (2009) **27** 3–9.
- Soengas M.S., Lowe S.W. Apoptosis and melanoma chemoresistance. *Oncogene* (2003) **22** 3138–3151.
- Staunton M.J., Gaffney E.F. Tumor type is a determinant of susceptibility to apoptosis. *Am. J. Clin. Pathol.* (1995) **103** 300–307.
- Middleton M.R., Grob J.J., Aaronson N., Fierlbeck G., Tilgen W., Seiter S. et al. Randomized phase III study of temozolomide versus dacarbazine in the treatment of patients with advanced metastatic malignant melanoma. *J. Clin. Oncol.* (2000) **18** 158–166.
- Patel P.M., Suci S., Mortier L., Kruit W.H., Robert C., Schadendorf D. et al. Extended schedule, escalated dose temozolomide versus dacarbazine in stage IV melanoma: final results of a randomised phase III study (EORTC 18032). *Eur. J. Cancer* (2011) **47** 1476–1483.
- Widwans S.J., Flaherty K.T., Fisher D.E., Tenenbaum J.M., Travers M.D., Shrager J. A melanoma molecular disease model. *PLoS One* (2011) **6** e18257.
- Gray-Schopfer V., Wellbrock C., Marais R. Melanoma biology and new targeted therapy. *Nature* (2007) **445** 851–857.
- Romano E., Schwartz G.K., Chapman P.B., Wolchock J.D., Carvajal R.D. Treatment implications of the emerging molecular classification system for melanoma. *Lancet Oncol.* (2011) **12** 913–922.
- Tentori L., Lacial P.M., Graziani G. Challenging resistance mechanisms to therapies for metastatic melanoma. *Trends Pharmacol. Sci.* (2013) **34** 656–666.
- Jordan M.A. Mechanism of action of antitumor drugs that interact with microtubules and tubulin. *Curr. Med. Chem. Anticancer Agents* (2002) **2** 1–17.

- 12 Kavallaris M. Microtubules and resistance to tubulin-binding agents. *Nat. Rev. Cancer* (2010) **10** 194–204.
- 13 Nobili S., Landini I., Mazzei T., Mini E. Overcoming tumor multidrug resistance using drugs able to evade P-glycoprotein or to exploit its expression. *Med. Res. Rev.* (2012) **32** 1220–1262.
- 14 Depeille P., Cuq P., Mary S., Passagne I., Evrard A., Cupissol D. et al. Glutathione S-transferase M1 and multidrug resistance protein 1 act in synergy to protect melanoma cells from vincristine effects. *Mol. Pharmacol.* (2004) **65** 897–905.
- 15 Attaoua C., Vincent L.-A., Jaoued A.A., Hadj-Kaddour K., Baï Q., Vos J.D. et al. Differential involvement of glutathione S-transferase mu 1 and multidrug resistance protein 1 in melanoma acquired resistance to vinca alkaloids. *Fundam. Clin. Pharmacol.* (2015) **29** 62–71.
- 16 Groth-Pedersen L., Jäättelä M. Combating apoptosis and multidrug resistant cancers by targeting lysosomes. *Cancer Lett.* (2013) **332** 265–274.
- 17 Réz G., Csák J., Fellinger E., László L., Kovács A.L., Oliva O. et al. Time course of vinblastine-induced autophagocytosis and changes in the endoplasmic reticulum in murine pancreatic acinar cells: a morphometric and biochemical study. *Eur. J. Cell Biol.* (1996) **71** 341–350.
- 18 Jiang C.C., Yang F., Thorne R.F., Zhu B.K., Hersey P., Zhang X.D. Human melanoma cells under endoplasmic reticulum stress acquire resistance to microtubule-targeting drugs through XBP-1-mediated activation of Akt. *Neoplasia* (2009) **11** 436–447.
- 19 Warren L., Jardillier J.C., Ordentlich P. Secretion of lysosomal enzymes by drug-sensitive and multiple drug-resistant cells. *Cancer Res.* (1991) **51** 1996–2001.
- 20 Olivier S., Formento P., Fischel J.L., Etienne M.C., Milano G. Epidermal growth factor receptor expression and suramin cytotoxicity in vitro. *Eur. J. Cancer* (1990) **26** 867–871.
- 21 Irizarry R.A., Hobbs B., Collin F., Beazer-Barclay Y.D., Antonellis K.J., Scherf U. et al. Exploration, normalization, and summaries of high density oligonucleotide array probe level data. *Biostatistics* (2003) **4** 249–264.
- 22 Gentleman R.C., Carey V.J., Bates D.M., Bolstad B., Dettling M., Dudoit S. et al. Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics. *Genome Biol.* (2004) **5** R80.
- 23 Martin D.E., Demougin P., Hall M.N., Bellis M. Rank Difference Analysis of Microarrays (RDAM), a novel approach to statistical analysis of microarray expression profiling data. *BMC Bioinformatics* (2004) **5** 148.
- 24 Bauer S., Gagneur J., Robinson P.N. Going Bayesian: model-based gene set analysis of genome-scale data. *Nucleic Acids Res.* (2010) **38** 3523–3532.
- 25 Bauer S., Grossmann S., Vingron M., Robinson P.N. Ontologizer 2.0—a multifunctional tool for GO term enrichment analysis and data exploration. *Bioinformatics* (2008) **24** 1650–1651.
- 26 Solomon V.R., Lee H. Chloroquine and its analogs: a new promise of an old drug for effective and safe cancer therapies. *Eur. J. Pharmacol.* (2009) **625** 220–233.
- 27 Klionsky D.J., Abdalla F.C., Abeliovich H., Abraham R.T., Acevedo-Arozena A., Adeli K. et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy. *Autophagy* (2012) **8** 445–544.
- 28 Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* (1983) **65** 55–63.
- 29 Lee E.S., Lee H.-J., Lee Y.-J., Jeong J.-H., Kang S., Lim Y.-B. Chemical chaperones reduce ionizing radiation-induced endoplasmic reticulum stress and cell death in IEC-6 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (2014) **450** 1005–1009.
- 30 Sousa C., Sá e Melo T., Gèze M., Gaullier J.M., Mazière J.C., Santus R. Solvent polarity and pH effects on the spectroscopic properties of neutral red: application to lysosomal microenvironment probing in living cells. *Photochem. Photobiol.* (1996) **63** 601–607.
- 31 Yoon Y.H., Cho K.S., Hwang J.J., Lee S.-J., Choi J.A., Koh J.-Y. Induction of lysosomal dilatation, arrested autophagy, and cell death by chloroquine in cultured ARPE-19 cells. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* (2010) **51** 6030–6037.
- 32 Larsen A.K., Escargueil A.E., Skladanowski A. Resistance mechanisms associated with altered intracellular distribution of anticancer agents. *Pharmacol. Ther.* (2000) **85** 217–229.
- 33 Matteoni R., Kreis T.E. Translocation and clustering of endosomes and lysosomes depends on microtubules. *J. Cell Biol.* (1987) **105** 1253–1265.
- 34 Hetz C. The unfolded protein response: controlling cell fate decisions under ER stress and beyond. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* (2012) **13** 89–102.
- 35 Berger E., Haller D. Structure–function analysis of the tertiary bile acid TUDCA for the resolution of endoplasmic reticulum stress in intestinal epithelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (2011) **409** 610–615.
- 36 Malo A., Krüger B., Seyhun E., Schäfer C., Hoffmann R.T., Göke B. et al. Tauroursodeoxycholic acid reduces endoplasmic reticulum stress, trypsin activation, and acinar cell apoptosis while increasing secretion in rat pancreatic acini. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* (2010) **299** G877–G886.
- 37 Mouawad R., Sebert M., Michels J., Bloch J., Spano J.-P., Khayat D. Treatment for metastatic malignant melanoma: old drugs and new strategies. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* (2010) **74** 27–39.
- 38 Zhu Q., Miecznikowski J.C., Halfon M.S. Preferred analysis methods for Affymetrix GeneChips. II. An expanded, balanced, wholly-defined spike-in dataset. *BMC Bioinformatics* (2010) **11** 285.
- 39 Kallunki T., Olsen O.D., Jäättelä M. Cancer-associated lysosomal changes: friends or foes? *Oncogene* (2013) **32** 1995–2004.
- 40 Bröker L.E., Huisman C., Span S.W., Rodriguez J.A., Kruyt F.A.E., Giaccone G. Cathepsin B mediates caspase-independent cell death induced by microtubule stabilizing agents in non-small cell lung cancer cells. *Cancer Res.* (2004) **64** 27–30.
- 41 Leto G., Tumminello F.M., Crescimanno M., Flandina C., Gebbia N. Cathepsin D expression levels in nongynecological

- solid tumors: clinical and therapeutic implications. *Clin. Exp. Metastasis* (2004) **21** 91–106.
- 42 Fehrenbacher N., Bastholm L., Kirkegaard-Sørensen T., Rafn B., Böttzauw T., Nielsen C. et al. Sensitization to the lysosomal cell death pathway by oncogene-induced down-regulation of lysosome-associated membrane proteins 1 and 2. *Cancer Res.* (2008) **68** 6623–6633.
- 43 Guicciardi M.E., Leist M., Gores G.J. Lysosomes in cell death. *Oncogene* (2004) **23** 2881–2890.
- 44 Kroemer G., Jäättelä M. Lysosomes and autophagy in cell death control. *Nat. Rev. Cancer* (2005) **5** 886–897.
- 45 Boya P., Kroemer G. Lysosomal membrane permeabilization in cell death. *Oncogene* (2008) **27** 6434–6451.
- 46 Groth-Pedersen L., Ostenfeld M.S., Høyer-Hansen M., Nylandsted J., Jäättelä M. Vincristine induces dramatic lysosomal changes and sensitizes cancer cells to lysosome-destabilizing siramesine. *Cancer Res.* (2007) **67** 2217–2225.
- 47 Lamb C.A., Yoshimori T., Tooze S.A. The autophagosome: origins unknown, biogenesis complex. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* (2013) **14** 759–774.
- 48 Mann M.J., Hendershot L.M. UPR activation alters chemosensitivity of tumor cells. *Cancer Biol. Ther.* (2006) **5** 736–740.
- 49 Thorburn A., Thamm D.H., Gustafson D.L. Autophagy and cancer therapy. *Mol. Pharmacol.* (2014) **85** 830–838.
- 50 Goodall M.L., Wang T., Martin K.R., Kortus M.G., Kauffman A.L., Trent J.M. et al. Development of potent autophagy inhibitors that sensitize oncogenic BRAF V600E mutant melanoma tumor cells to vemurafenib. *Autophagy* (2014) **10** 1120–1136.
- 51 Masson O., Bach A.-S., Derocq D., Prébois C., Laurent-Matha V., Patingre S. et al. Pathophysiological functions of cathepsin D: targeting its catalytic activity versus its protein binding activity? *Biochimie* (2010) **92** 1635–1643.
- 52 Vellanki R.N., Zhang L., Volchuk A. OASIS/CREB3L1 is induced by endoplasmic reticulum stress in human glioma cell lines and contributes to the unfolded protein response, extracellular matrix production and cell migration. *PLoS One* (2013) **8** e54060.
- 53 Lee B.-R., Chang S.-Y., Hong E.-H., Kwon B.-E., Kim H.M., Kim Y.-J. et al. Elevated endoplasmic reticulum stress reinforced immunosuppression in the tumor microenvironment via myeloid-derived suppressor cells. *Oncotarget* (2014) **5** 12331–12345.

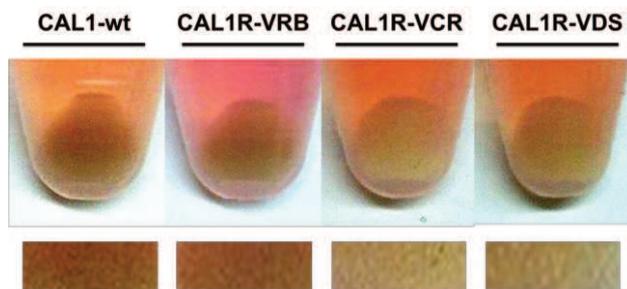
## SUPPORTING INFORMATION

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article:

**Table S1.** Complementary data of GO term enrichment analysis of genes up- and down-regulated in VA resistant cells using ONTOLOGIZER software.

### III.3 Données supplémentaires non publiées

#### III.3.1 Etude de la pigmentation des lignées cellulaires CAL1



**Figure III.1.** Effet de l'exposition continue aux VAs sur la pigmentation des lignées cellulaires CAL1.

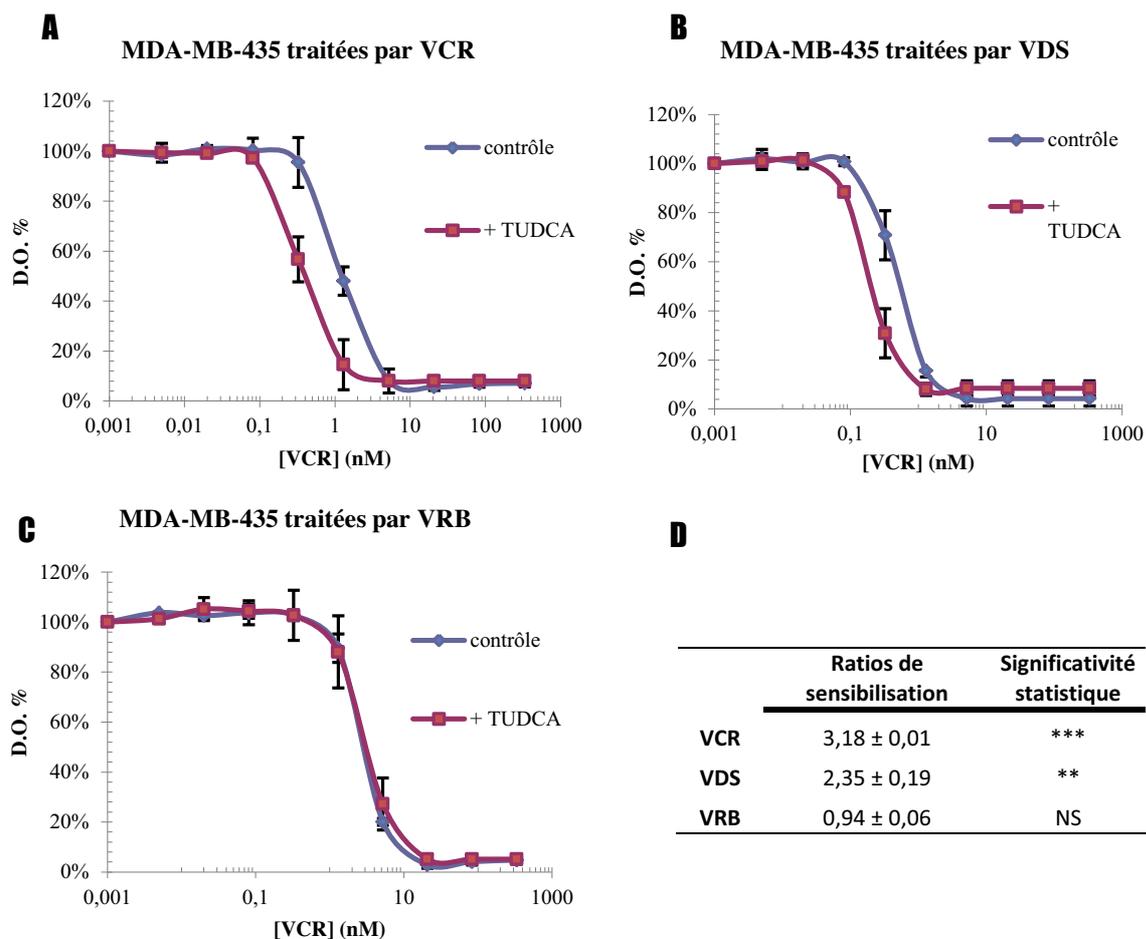
La pigmentation des cellules CAL1 est reflétée par l'intensité de la coloration des culots cellulaires [269]. Deux groupes de lignées CAL1 ont pu être distingués selon leur intensité de pigmentation (CAL1R-VCR et CAL1R-VDS ; CAL1-wt et CAL1R-VRB), l'intensité de coloration étant plus faible dans le premier groupe de lignées cellulaires (CAL1R-VCR et CAL1R-VDS) comparativement au deuxième groupe. Cette diminution de la pigmentation dans le premier groupe de lignées est discutée dans l'article.

#### III.3.1 Etude de l'effet de l'inhibition de la réponse au stress du RE par le TUDCA sur la sensibilité d'une autre lignée cellulaire de MM aux VAs.

Afin de vérifier si la réponse au stress du RE (UPR : *unfolded protein response*) pouvait être un mécanisme général de résistance du MM, nous avons évalué l'effet de son inhibition par le TUDCA dans la lignée MDA-MB-435, issue de métastase de MM [263–265] et incluse dans le panel DTP NCI60 [270].

Comme le montre la figure III.2, l'inhibition de l'UPR par le TUDCA (1mg/ml) a augmenté de façon significative la sensibilité des cellules MDA-MB-435 à la VCR et à la VDS (ratios de sensibilisation de 3,18 et 2,35, respectivement). En revanche, aucun effet n'a été observé sur la sensibilité à la VRB.

De façon similaire, l'inhibition de la réponse au stress du RE par le TUDCA avait induit une plus grande sensibilisation des cellules CAL1 (parentale et résistantes) à la VCR et à la VDS comparativement à la VRB. Ainsi, une activité élevée de la voie de réponse au stress du RE, donc de l'UPR, pourrait être un mécanisme significatif dans la sensibilité différentielle du MM aux VAs.



**Figure III.2.** *Effet de l'inhibition de l'UPR par le TUDCA sur la sensibilité des cellules MDA-MB-435 aux VAs, respectivement à la VCR (A), à la VDS (B) et à la VRB (C). D, ratio de sensibilisation =  $CI_{50}$  du VA (VCR, VDS, ou VRB) en l'absence de l'inhibiteur /  $CI_{50}$  du VA en présence de l'inhibiteur (TUDCA, 1mg/ml). Les résultats sont la moyenne  $\pm$  SD de trois expériences indépendantes. NS : non significatif, \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  selon le test de Student.*

# **IV Etude du rôle de l'autophagie dans la résistance différentielle des lignées CAL1 aux VAs**

---

## **IV.1 Contexte et problématique**

L'étude précédemment exposée (article 2) a montré l'implication d'altérations lysosomiales et du stress du RE (unfolded response protein, UPR) dans la résistance différentielle des cellules CAL1 aux VAs. L'autophagie, une voie de dégradation lysosomiale fréquemment activée par l'UPR, et connue pour être à l'origine de la chimiorésistance de nombreux cancers dont le MM [122], pourrait donc jouer un rôle central dans cette résistance.

Afin d'étudier le rôle de l'autophagie dans la résistance des lignées CAL1R-VAs, nous avons dans un premier temps cherché à déterminer si l'autophagie était différentiellement régulée au sein de ces lignées. Puis nous avons cherché à déterminer si l'inhibition du flux autophagique par la chloroquine, un inhibiteur de la dégradation des autophagosomes [154], avait un impact sur la sensibilité des cellules CAL1 aux VAs.

## **IV.2 Matériel et méthodes**

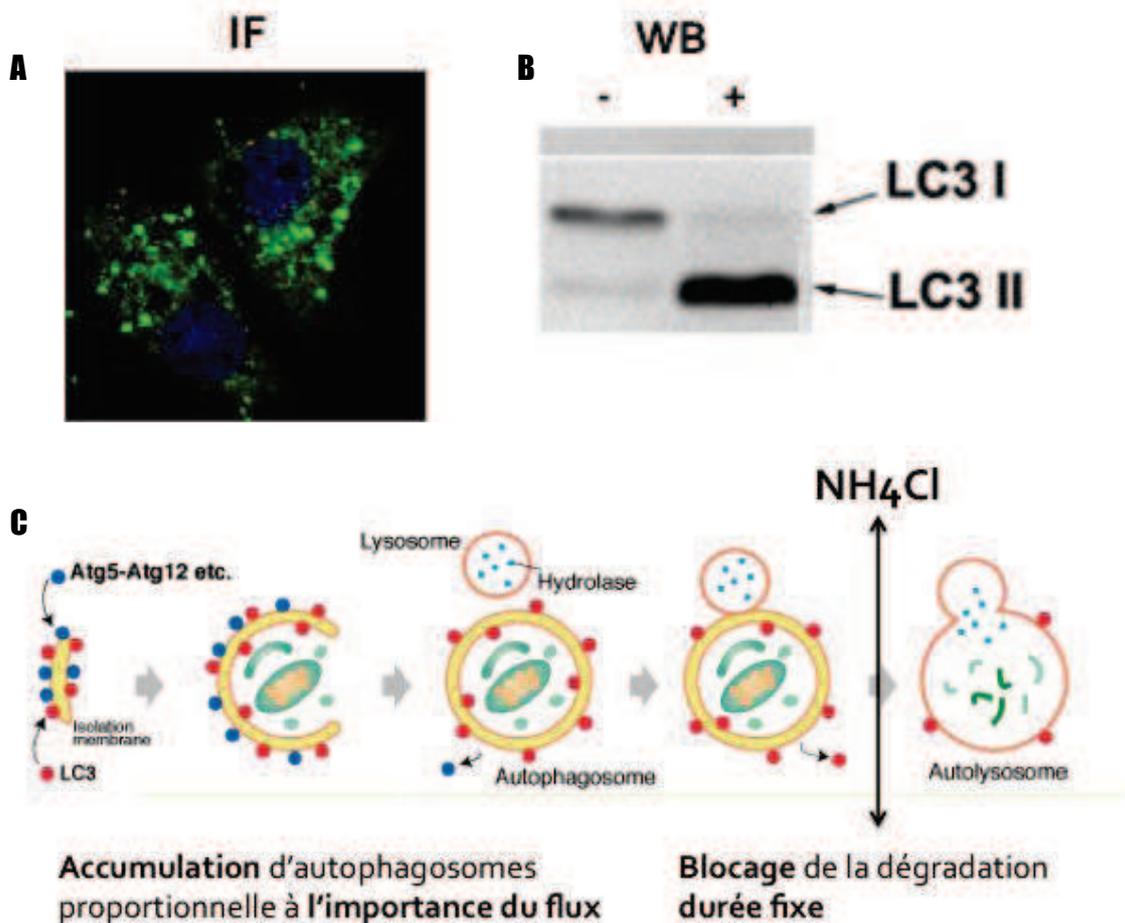
### **IV.2.1 Produits chimiques et inhibiteurs**

La VCR (100  $\mu$ M dans H<sub>2</sub>O), VDS (100  $\mu$ M dans H<sub>2</sub>O), VRB (100  $\mu$ M dans H<sub>2</sub>O), et la chloroquine ont été fournis par Sigma-Aldrich (France).

### **IV.2.2 Lignées cellulaires**

Les lignées utilisées (parentale : CAL1-wt ; résistantes : CAL1R-VRB, CAL1R-VCR, et CAL1R-VDS) ont été cultivées à 37°C, sous atmosphère humide enrichie de 5% de CO<sub>2</sub>, dans du milieu Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) contenant 4,5g de glucose, et additionné de 10% de sérum de veau fœtal (SVF), 1% L-glutamine (2mM), et 1% d'antibiotiques (mélange pénicilline 100U/ml et streptomycine 0,1g/L).

## IV.2.3 Etude de l'autophagie



**Figure IV.1.** *Exemples de tests utilisés pour étudier l'autophagie. A : immunofluorescence (marquage de la protéine LC3 par un anticorps spécifique et révélation par un anticorps secondaire couplé à un fluorochrome vert). Les ponctuations vertes correspondent au autophagosomes. B : western blot (marquage de la protéine LC3 par un anticorps spécifique et révélation par un anticorps secondaire couplé à HRP). Les bandes supérieures correspondent à l'isoforme cytoplasmique LC3-I et les bandes inférieures correspondent à l'isoforme membranaire LC3-II. La conversion LC3-I vers LC3-II est visible après ajout (+) d'un inhibiteur de flux autophagique (chloroquine, NH<sub>4</sub>Cl, ...). Cette conversion correspond à la consommation de LC3-I pour former LC3-II qui est accumulée quand le flux est bloqué. C : représentation schématique du blocage du flux autophagique par l'inhibiteur de dégradation NH<sub>4</sub>Cl.*

L'étude de l'autophagie dans les cellules CAL1 a été réalisée selon les recommandations internationales relatives à l'utilisation et à l'interprétation des tests pour suivre l'autophagie. Ces recommandations imposent l'utilisation de deux tests pour mettre en

évidence l'autophagie. Nous avons réalisé les deux tests les plus couramment utilisés : l'immunofluorescence et le western blot. Ces tests sont basés sur la quantification des autophagosomes à l'aide d'un marqueur spécifique : LC3. La forme cytoplasmique LC3-I est clivée et « lipidée » par association à la phosphatidyléthanolamine pour donner la forme LC3-II qui sera enchâssée spécifiquement dans les membranes des autophagosomes. La visualisation de LC3 par immunofluorescence permet d'évaluer le niveau d'autophagie dans les cellules par la quantification (comptage manuel) du nombre d'autophagosomes par cellule (Figure IV.1. A). La visualisation de LC3 par western blot permet d'évaluer le niveau d'autophagie par quantification de la bande correspondant à LC3-II (Figure IV.1. B). La quantification de l'accumulation des autophagosomes après ajout d'un inhibiteur de flux (chloroquine 50 $\mu$ M ou NH<sub>4</sub>Cl 10mM) pendant une durée fixe (1h à 3h) permet d'évaluer l'importance du flux autophagique dans la cellule (Figure IV.1. C). La quantification du niveau d'autophagie dans les cellules doit toujours être accompagnée d'une quantification du flux. En effet, une réduction de l'autophagie entre deux conditions biologiques peut résulter de l'augmentation du flux : à un temps T, il y a moins d'autophagosomes dans la cellule si la dégradation est très rapide.

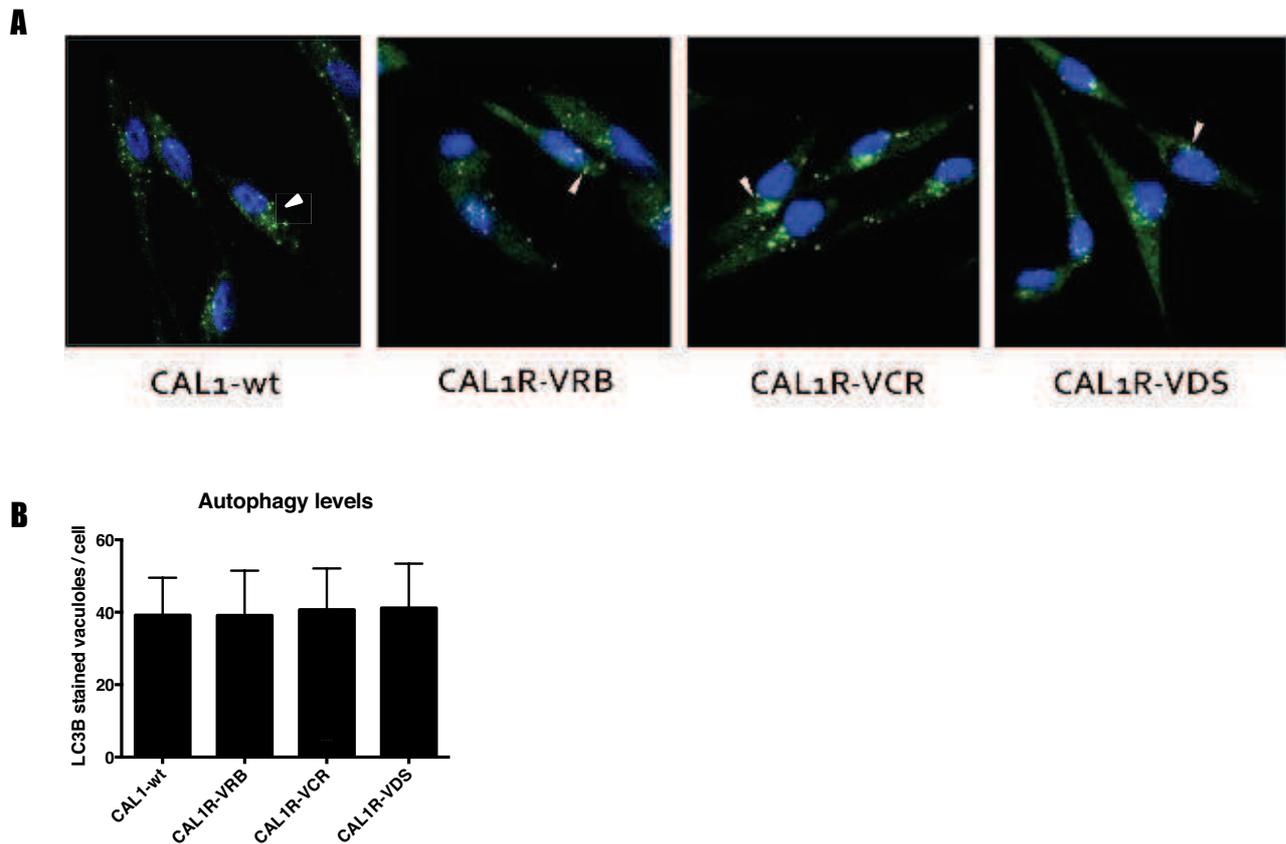
#### **IV.2.3.1 Immunofluorescence**

Le niveau d'autophagie a été évalué par détection de la protéine LC3 selon le protocole du fournisseur de l'anticorps anti-LC3B (Sigma-Aldrich). Les cellules CAL1 ont été ensemencées en plaques 24 puits à la densité de 100 000 cellules par puits, sur des lamelles de verre déposées dans le fond de chaque puits. Après adhésion, les cellules ont été rincées deux fois au PBS puis fixées 10 min à -20°C par immersion dans un mélange méthanol / acétone 1:1. Après rinçage (PBS, 3 fois 15 min), les cellules ont été incubées pendant une nuit à 4°C avec un anticorps polyclonal de lapin anti-LC3-B (Sigma-Aldrich) dilué à 1:100 dans du sérum de singe. Puis, les cellules ont été rincées (PBS, 3 fois 15 min) et incubées 2h à l'abri de la lumière en présence de l'anticorps secondaire conjugué à un fluorochrome vert Alexa-fluor 488 à la concentration de 1:500 dans du sérum de singe, puis colorées au DAPI. Après rinçage, les lamelles ont été montées sur lames et le milieu de montage a polymérisé à 4°C durant 24h. Les lames ont ensuite été visualisées en utilisant un microscope confocal Zeiss Axiovert 200 équipé d'un objectif Zeiss 20x LD PLAN NEOFLUAR 0.3 PH1 et les images ont été travaillées à l'aide du logiciel Image J (National Institutes of Health, Bethesda). Le comptage des autophagosomes dans les cellules a été réalisé sur un microscope droit Zeiss Axioimager Z2 équipé d'un objectif Zeiss 63X Plan Apo 1.4 oil. Le comptage a été réalisé sur 30 cellules pour chaque lignée. Les résultats correspondent à la moyenne +/- SD.

### **IV.2.3.2 Western blot**

Le niveau et le flux d'autophagie dans les cellules CAL1 ont été confirmés par western blot. L'étude de l'expression et de la conversion du marqueur d'autophagosomes LC3 (LC3-I vers LC3-II) par western blot a été réalisée selon les recommandations relatives à l'étude de l'autophagie [271]. Les cellules ont été incubées 1h en présence de NH<sub>4</sub>Cl (10 mM dans du DMEM, solution stock 1 M dans l'eau [271]), un inhibiteur du flux autophagique (par alcalinisation des lysosomes ce qui entraîne un blocage de la dégradation enzymatique). Ensuite les cellules ont été lavées avec du PBS puis lysées dans du tampon RIPA (Sigma-Aldrich) pendant 5 min à 4°C. Les protéines extraites ont directement été quantifiées (pas de congélation) par la méthode de Lowry [247], modifiée pour permettre un dosage en présence de fortes concentrations de détergents (RIPA), à l'aide du kit DC Protein Assay (Biorad). Vingt microgrammes de protéines ont été séparés par électrophorèse SDS-PAGE dans un gel à 10% de Prosieve (Lonza). Le Prosieve, permettant de créer un gel ayant les caractéristiques d'un gradient d'acrylamide, est particulièrement adapté à la séparation des deux isoformes de LC3B (LC3B-I ~18 kDa et LC3B-II ~16 kDa). Les protéines ont ensuite été transférées sur des membranes de PVDF Immobilion-P (Milipore). Les membranes ont été saturées par une solution de PBS-Tween 20 (0,1%) - caséine (5%) 30 min à température ambiante. Puis, les membranes ont été incubées toute une nuit à 4°C en présence de l'anticorps spécifique anti-LC3B (anticorps de lapin, polyclonal, Sigma-Aldrich) à la concentration de 1:1000 dans la caséine. Après rinçage au PBS-Tween 20 (3 fois 10 min), les membranes ont été incubées 2h en présence de l'anticorps secondaire anti-lapin couplé à HRP (Sigma-Aldrich) à la concentration de 1:20 000 dans la caséine. Après rinçage au PBS-Tween 20 (3 fois 10 min), les membranes ont été révélées à l'aide du kit de chimioluminescence ECL Super Signal West Pico (Pierce). Puis les membranes ont été rincées et réincubées avec un anticorps anti-GAPDH (anticorps de lapin, polyclonal, Sigma-Aldrich) à la concentration de 1:1000 dans la caséine, puis révélées selon le même protocole (incubation 2h en présence de l'anticorps secondaire anti-lapin couplé à HRP, rinçage et révélation à l'aide du kit ECL). Les images des membranes ont été capturées par une G:Box associée au logiciel GeneSys, puis les bandes correspondant aux protéines d'intérêt ont été quantifiées grâce au logiciel GeneSys. Le niveau de l'autophagie dans les cellules a été évalué par la quantification de LC3-II en absence d'inhibiteur. Le flux autophagique a été évalué par la quantification de l'accumulation de LC3-II en présence d'inhibiteur (NH<sub>4</sub>Cl): ratio LC3-II en présence d'inhibiteur / LC3-II en absence d'inhibiteur.

## **IV.3 Résultats**

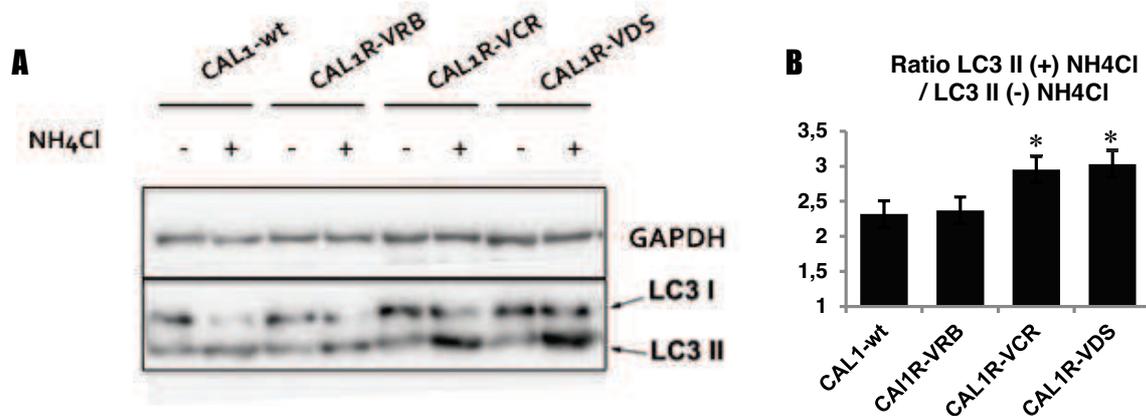


**Figure IV.2.** *Evaluation du niveau d'autophagie dans les cellules CAL1.* A, visualisation des autophagosomes (détection par immunofluorescence indirecte de la protéine LC3, ponctuations vertes) par microscopie confocale. B, quantification du nombre d'autophagosomes par cellules (moyenne du nombre d'autophagosomes dans 30 cellules par lignée).

Comme le montre la figure IV.2, le niveau d'autophagie (immunofluorescence) dans les cellules CAL1, en absence de tout traitement, était important et identique dans toutes les lignées (parentales et résistantes, environ 40 ponctuations correspondant aux autophagosomes par cellules).

Cependant, les deux groupes de lignées cellulaires (CAL1R-VCR et CAL1R-VDS ; CAL1R-VRB et CAL1-wt) précédemment identifiés (articles 1 et 2) ont à nouveau pu être distingués selon l'importance du flux autophagique. Le flux autophagique est proportionnel à l'accumulation d'autophagosomes, donc de LC3-II (visualisation par western blot), en présence d'un inhibiteur de flux ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 10mM [271]). Le flux autophagique (ratio LC3-II avec inhibiteur / LC3-II sans inhibiteur) était significativement plus important dans le premier groupe de lignées (CAL1R-VCR et CAL1R-VDS) que dans le deuxième (ratios : 2,9 et 2,4 respectivement). L'étude de l'expression protéique de LC3 par western blot a aussi révélé que le niveau de LC3-I (la forme cytoplasmique de LC3) en absence de traitement était plus élevé dans le premier groupe de lignées que dans le deuxième. Aussi, le niveau plus élevé du flux autophagique dans ces lignées pourrait

être dû à une expression plus importante de LC3 totale. Ce résultat est en accord avec les données d'expression obtenues par l'analyse transcriptomique qui montre une surexpression spécifique de LC3B dans les lignées CAL1R-VCR et CAL1R-VDS (ratio d'expression moyen = 1,59).



**Figure IV.3.** *Evaluation du flux autophagique dans les cellules.* Les cellules CAL1 ont été incubées en absence (contrôle) ou en présence d'inhibiteur de flux autophagique (NH<sub>4</sub>Cl, 10mM, 1h). A, l'expression protéique de LC3 dans les lignées CAL1 a été déterminée par western blot comme décrit dans Matériels et Méthodes. Le niveau d'autophagie dans les cellules est quantifié par l'importance de la bande correspondant à LC3-II (isoforme membranaire de LC3). B, la quantification du flux autophagique est donnée par le ratio LC3-II en présence d'inhibiteur / LC3-II en absence d'inhibiteur.

#### IV.4 Discussion

L'article 2 a montré une implication de l'UPR et des lysosomes dans la résistance différentielle des lignées CAL1R-VAs aux VAs. Ainsi, l'autophagie, une voie de dégradation lysosomiale fréquemment activée par l'UPR, et connue pour être à l'origine de la chimiorésistance de nombreux cancers dont le MM [122], pourrait jouer un rôle central dans cette résistance différentielle. Pour confirmer cette hypothèse, nous avons dans un premier temps cherché à déterminer si l'autophagie était différenciellement régulée dans les lignées CAL1. Le niveau de base de l'autophagie (immunofluorescence), en absence de traitement, était élevé et équivalent dans l'ensemble des lignées CAL1 (parentale et résistantes). Cependant, les deux groupes de lignées cellulaires (CAL1R-VCR et CAL1R-VDS ; CAL1R-VRB et CAL1-wt) précédemment identifiés (articles 1 et 2) ont à nouveau pu être distingués selon l'importance du flux autophagique, le flux étant plus important dans le premier groupe de lignées cellulaires que dans le deuxième. Or, un flux autophagique important peut être un mécanisme de résistance cellulaire aux agents anti-cancéreux [122]. Donc, l'augmentation du flux autophagique dans les lignées CAL1R-VCR et CAL1R-VDS pourrait être impliqué dans les résistance de ces lignées

aux VAs. De plus, ce premier groupe de lignées surexprimait LC3B (analyse transcriptomique et western blot) comparativement au deuxième groupe de lignées (CAL1R-VRB et CAL1-wt). Cette surexpression de LC3B pourrait être à l'origine du flux autophagique plus important dans ces lignées [272]. Par ailleurs, une étude a montré que ATF4 (une des protéines activées en réponse au stress du RE) induit l'autophagie en se liant directement à un site liaison de réponse à l'AMP cyclique sur promoteur de LC3B, ce qui permet une expression accrue de LC3B [273]. Donc la surexpression de LC3B, et l'augmentation du flux autophagique dans les lignées CAL1R-VCR et CAL1R-VDS pourrait être la conséquence de l'activité plus élevée de leur voie de réponse au stress du RE (analyse transcriptomique, cf article 2). Ainsi, la résistance différentielle du MM aux VAs pourrait impliquer une activation de la réponse au stress du RE, et une activation secondaire de l'autophagie due à une régulation positive de LC3 par les éléments de réponse au stress du RE.



# **Axe de recherche II**

---

**Etude des mécanismes  
moléculaires de résistance acquise  
du MM aux inhibiteurs de MAP  
kinases (iMAPK) par une approche  
transcriptomique**

---



# I Contexte et problématique

---

Plus de 50% des MM sont porteurs de la mutation activatrice BRAF V600E, se traduisant par une activation constitutive de la voie des MAPK [42]. Les inhibiteurs sélectifs des mutants BRAF V600E, vemurafénib (VMF) et dabrafénib (DBF), ont montré des réponses tumorales majeures [66,68]. Le tramétinib (TMT), un inhibiteur de MEK (en aval de BRAF dans la voie des MAPK), a également montré une augmentation de la survie globale par rapport à la dacarbazine [69]. Malgré cette activité antitumorale majeure, la plupart des réponses à ces médicaments sont partielles et une progression de la maladie apparaît généralement dans une médiane de 5-7 mois [63], soulignant la nécessité de comprendre les limites de ces thérapies afin d'élaborer des stratégies plus efficaces.

Les principaux mécanismes de résistance identifiés conduisent à la réactivation de la voie MAPK, le contournement de la voie MAPK par l'activation de la voie PI3K-AKT-mTOR, et l'activation de la voie du VEGF [140–142]. Bien que la cascade des MAPK soit réactivée dans environ 80% des tumeurs présentant une progression sous inhibiteurs de BRAF, environ 40% des mécanismes de cette résistance acquise (y compris ceux à l'origine de la réactivation de la voie MAPK) restent inconnus malgré l'analyse de prélèvements tumoraux [142]. De plus, les mécanismes à l'origine de la résistance au TMT sont encore mal connus.

Parmi les autres mécanismes potentiellement à l'origine de la résistance du MM aux inhibiteurs de MAPK (iMAPKs), l'autophagie pourrait jouer un rôle important [168]. Or, la régulation de fonctions cellulaires, telles que l'autophagie, est difficilement identifiable par séquençage. Aussi, l'étude mécanistique de la résistance acquise de modèles cellulaires de MM aux iMAPK pourrait permettre d'identifier de nouveaux déterminants moléculaires de la résistance du MM aux iMAPK.

Pour étudier la résistance acquise du MM aux iMAPK, un modèle de lignées cellulaires de MM porteuses de la mutation BRAF V600E, résistantes aux iMAPK (A375R-iMAPKs) a été établi (exposition continue, 4 mois, de la lignée parentale A375-wt au VMF, DBF ou TMT : A375R-VMF, A375R-DBF, et A375R-TMT, respectivement). Puis les fonctions cellulaires altérées lors de la sélection des lignées A375R-iMAPKs ont été recherchées par la méthode développée dans l'article 2. Le profilage transcriptomique des lignées A375R-iMAPKs a permis d'identifier différentes fonctions cellulaires dont l'implication dans la résistance de ces lignées devra être confirmée par des études fonctionnelles *in vitro*.

## II Matériel et méthodes

---

### II.1.1 Produits chimiques et inhibiteurs

Les inhibiteurs de MAPK ont été fournis par Selleck Chemicals : vémurafenib (VMF) dabrafenib (DBF) et tramétinib (TMT). Le 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) provenait de Sigma-Aldrich.

### II.1.2 Lignées cellulaires

Les lignées utilisées dérivent de la lignées A375, un modèle cellulaire classique de MM [274]. Cette lignée exprime la mutation BRAF V600E, rendant la kinase BRAF constitutivement active, et contre laquelle ont été développés les iMAPK [275]. L'ensemble des altérations moléculaires exprimées par cette lignée est répertorié dans la base de données CCLE du Broad Institute.

Les lignées résistantes aux iMAPK (A375R-iMAPK) ont été établies par exposition continue des A375 (4 mois) à la  $CI_{50}$  des iMAPK (200nM, 400nM, et 4nM respectivement pour le VMF, le DBF et le TMT). Les cellules résistantes au VMF, DBF, et TMT ont été nommées respectivement A375R-VMF, A375R-DBF, A375R-TMT.

Les cellules ont été cultivées à 37°C, sous atmosphère humide enrichie de 5% de CO<sub>2</sub>, dans du milieu Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) contenant 4,5g de glucose, et additionné de 10% de sérum de veau fœtal (SVF), 1% L-glu (2mM), et 1% d'antibiotiques (mélange pénicilline 100U/ml et streptomycine 0,1g/L).

### II.1.3 Essai de viabilité cellulaire

La sensibilité des lignées A375 (parentale et résistantes) aux iMAPK a été évaluée par un test de viabilité cellulaire au 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT). Les cellules ont d'abord étéensemencées en plaques 96 puits à la densité de 2500 cellules/puits, dans du milieu de culture DMEM sans antibiotiques. Après 24h, le milieu a été changé par un milieu additionné ou non d'iMAPK (gamme de concentrations de 0 à 15000 nM, 10 points, 6 puits par concentration). Les cellules ont ainsi été incubées en présence d'iMAPK durant 72h. Après 72h, le milieu a été changé par du milieu additionné de MTT à la concentration de 15mg / 100ml. Après 2h d'incubation, la solution de MTT a été retirée et directement remplacée (sans lavage) par du DMSO (100µl). L'absorbance a été mesurée à 540 nm sur spectrophotomètre Labsystems Multiskan MS (PAA, Farnborough, RU). La  $CI_{50}$  a été définie comme la diminution de 50% de la densité optique par rapport aux puits contrôles (milieu sans iMAPK). L'absorbance relative a été

calculée par la formule : (moyenne de l'absorbance dans les 6 puits tests / moyenne de l'absorbance dans les 6 puits contrôles) × 100.

#### **II.1.4 Hybridation sur puces à oligonucléotides Affymetrix**

Afin d'identifier les altérations moléculaires potentiellement associées à la résistance acquise aux iMAPK, nous avons effectué un profilage transcriptomique de chaque lignée A375 : A375-wt, A375R-VMF, A375R-DBF, et A375R-TMT.

##### **II.1.4.1 Conception de l'étude**

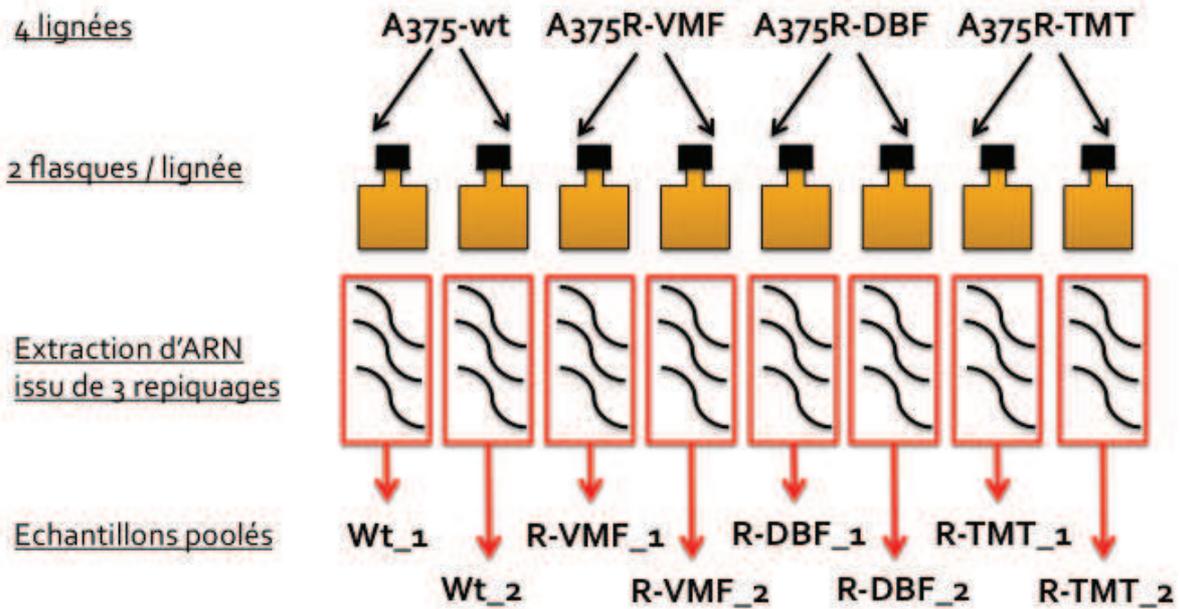
Pour chaque condition, deux réplicats ont été réalisés afin de permettre une analyse statistique plus puissante. Ces deux réplicats ont été réalisés de façon concomitante pour éviter d'ajouter un facteur de variabilité (Figure 1). Chaque réplicat était constitué d'un pool d'ARN totaux extraits à partir de cellules issues de trois repiquages différents afin de lisser la variation biologique inhérente aux manipulations [212].

##### **II.1.4.2 Extraction des ARNm totaux**

Les ARN totaux ont été extraits des cellules A375 puis purifiés à l'aide des kits « Quiagen QIAshredder » et « RNeasy Mini Kit » selon les protocoles du fabricant, puis quantifiés sur NanoDrop (ThermoFischer). Parallèlement, la qualité des ARN extraits a été vérifiée sur gel d'agarose à 1%. Puis les ARN totaux issus de différentes extractions ont été regroupés de façon stœchiométrique, selon le design de l'étude décrit précédemment, en une solution finale à 150ng d'ARN / $\mu$ l.

##### **II.1.4.3 Hybridation**

La qualité des échantillons d'ARN purifiés a été de nouveau vérifiée sur BioAnalyzer Agilent (Agilent Technologies). Une fois la qualité des ARN validée, les échantillons ont été préparés en vue de l'hybridation sur biopuce Affymetrix HG-U133 plus 2,00 PM selon le protocole du fabricant. Cette puce à ADN contient 54 656 sondes correspondant aux 47 400 transcrits humains, et permet donc d'étudier l'ensemble du transcriptome humain. Le signal des biopuces après hybridation, proportionnel à la quantité d'ARNm spécifiquement hybridé sur chaque sonde, a été analysé par scanner confocal « Affymetrix GeneChip3000 7G ». L'ensemble de ces opérations a été réalisé sur la plateforme Affymetrix de l'Institut de Recherche en Biothérapie de Montpellier (IRBM), CHRU-INSERM-UM1 (<http://irb.chu-montpellier.fr/>).



**Figure 1.** *Représentation schématique de la conception de l'étude.*

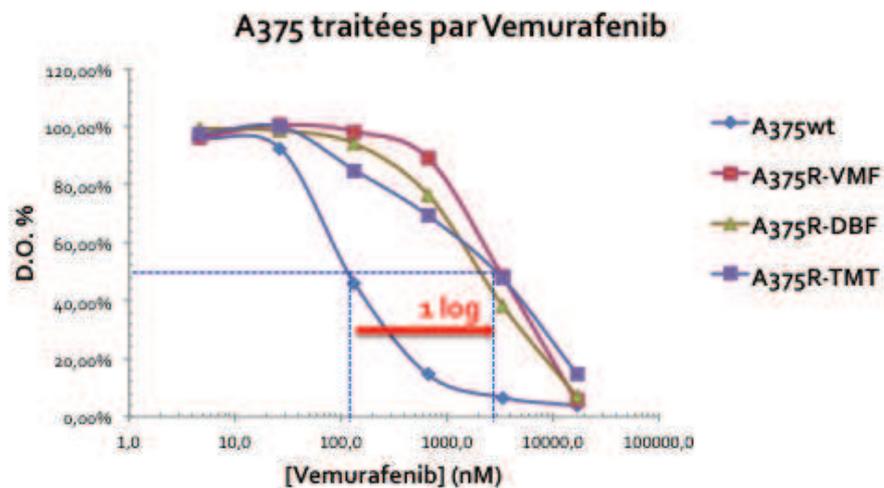
## II.15 Analyse des données des biopuces

L'analyse des données des biopuces a été réalisée selon la méthodologie développée dans l'article 2. Brièvement, cette méthode comportait les étapes suivantes : i) normalisation par RMA (Robust Multi-array Average), ii) comparaison des profils d'expression par la méthode RDAM (Rank Difference Analysis of Microarray, iii) sélection des gènes dont l'expression est la plus altérée dans les lignées résistantes (génération de listes de transcrits hiérarchisés selon leur degré d'altération), et iv) enrichissement fonctionnel des listes de gènes sélectionnés par MGSA (Ontologizer's model-based gene set analysis). L'analyse statistique des données des biopuces (comparaison de profils d'expression et analyse MGSA) a été réalisée par Michel Bellis.

# III Résultats

## III.1 Sélection des lignées résistantes

Afin d'étudier les mécanismes moléculaires impliqués dans la résistance acquise du MM iMAPKs, nous avons établi trois lignées cellulaires de MM résistantes aux iMAPK (A375R-iMAPKs) par exposition continue, 4 mois, de la lignée parentale A375-wt (porteuse de la mutation BRAF V600E) au VMF, DBF ou TMT (CI<sub>50</sub>) : A375R-VMF, A375R-DBF, et A375R-TMT, respectivement. Les cellules A375R-iMAPKs présentaient des facteurs de résistance d'environ 10 fois à leurs agents de sélection (Tableau 1). Ces cellules ont également développé une résistance croisée à tous les iMAPK (facteurs de résistance de 2 à 10).



**Figure 2.** *Effet de l'exposition continue aux iMAPK sur la sensibilité cellulaire des lignées A375R-iMAPK au VMF*

	Facteur de résistance		
	Vemurafenib	Dabrafenib	Trametinib
A375R-VMF	×10	×10	×2
A375R-DBF	×10	×10	×3
A375R-TMT	×10	×10	×10

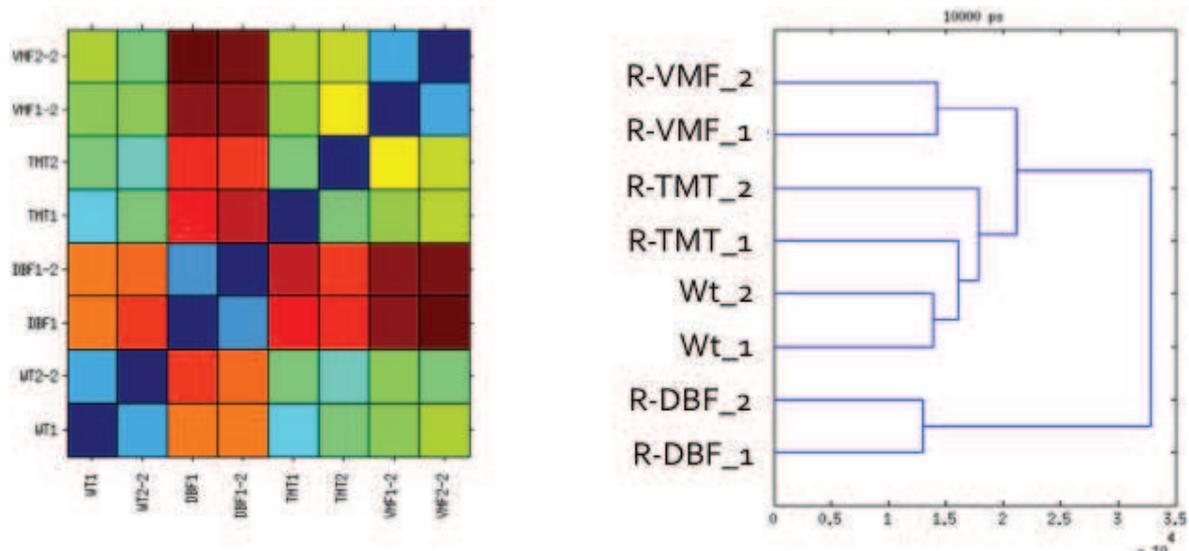
**Tableau 1.** *Effet de l'exposition continue au VMF, DBF ou TMT sur la sensibilité cellulaire des lignées A375R-iMAPK aux iMAPK. Le ratio de résistance est défini par CI<sub>50</sub> de l'iMAPK dans la lignée résistante / CI<sub>50</sub> de l'iMAPK dans la lignée A375-wt.*

## III.2 Analyse transcriptomique

Afin d'identifier les fonctions biologiques potentiellement impliquées dans la résistance acquise aux iMPAK, nous avons réalisé une analyse transcriptomique des lignées A375 (parentale et résistantes). Nous avons choisi les biopuces Affymetrix HG-U133 plus 2,00 GeneChips qui permettent une couverture complète du génome humain.

## III.3 Distances entre les profils d'expression

Afin de mettre en évidence les altérations d'expression génique dues à la sélection des lignées résistantes, nous avons réalisé une comparaison des profils d'expression de chaque lignée A375 (parentale et résistantes). La matrice de distances (Figure 3A) et le dendrogramme des distances (Figure 3B), qui reflètent les relations entre les profils d'expression, individualisent 3 groupes de lignées cellulaires : i) A375R-VMF, ii) A375R-TMT et A375-wt, iii) A375R-DBF. Ce résultat suggère que les mécanismes de résistance au VMF, au DBF ou au TMT sont différents. Ces mécanismes ne seraient donc communs ni à la voie ciblée (MAPK), ni à la cible moléculaire (BRAF ou MEK).



**Figure 3.** *Comparaison des profils d'expression génique des lignées cellulaires A375. Les distances entre chaque paire de lignées cellulaires ont été calculées comme décrit dans l'article 2 et représentée soit par une matrice des distances (A) soit par un dendrogramme des distances (B).*

### **III.4 Enrichissement fonctionnel des gènes les plus altérés dans les lignées résistantes**

Les fonctions cellulaires altérées lors de la sélection des lignées A375R-iMAPKs, ont été recherchées par la méthode développée dans l'article 2. Les gènes les plus différentiellement exprimés entre les lignées A375R-iMAPKs et la lignée A375-wt ont été recherchés et hiérarchisés selon le degré d'altération (les gènes les plus dérégulés sont retrouvés en tête de liste). Ainsi, 3 listes ont été générées : i) A375R-VMF *versus* A375-wt ; ii) A375-R-TMT *versus* A375-wt ; iii) A375R-DBF *versus* A375-wt. Puis les gènes se trouvant en tête de ces listes ont été analysés par MGSA (voir matériels et méthodes de l'article 2). Dans la présente étude, nous avons cherché à optimiser l'analyse MGSA dont les résultats peuvent varier en fonction de deux paramètres : la partie aléatoire (graine) du modèle mathématique utilisé, et la taille de la liste de gènes. Pour rendre l'analyse MGSA plus robuste et éviter les variations de résultats dues à la partie aléatoire du modèle mathématique utilisé, l'analyse a été répétée 10 fois et nous avons conservés les résultats présentant un score moyen supérieur à 0,15. Pour éviter les variations de résultats du au choix de la taille de la liste de gènes, l'analyse MGSA a été réalisée, pour chaque lignée, sur des listes de 500 à 5000 gènes, en incrémentant 500 gènes à chaque fois. Nous avons conservés les résultats présents dans au moins deux listes. Les termes « actifs » donnés par cette analyse, et correspondant aux fonctions cellulaires altérées dans les lignées résistantes, sont présentés dans les tableaux 2, 3 et 4. Les termes appartenant à la même arborescence GO ont été regroupés.

Comparaison : A375R-VMF versus A375-wt					
	nombre de listes	taille des listes dans lesquelles ont été retrouvé le terme	identifiant GO du terme	Base de donnée GO	Définition GO du terme
Listes de gènes surexprimés dans la lignée résistante	2	3000 5000	GO0005739	CC	mitochondrion
	2	3000 4500	GO0005840	CC	ribosome
	2	4500 5000	GO0019866	CC	organelle inner membrane
	2	2500 4000	GO0007165	PB	signal transduction
	2	2000 4000	GO0040011	PB	locomotion
Listes de gènes sous-exprimés dans la lignée résistante	7	1000 1500 2000 2500 3000 4000 5000	GO0042611	CC	MHC protein complex
	3	500 1000 2000	GO0042613	CC	MHC class II protein complex
	3	1000 2000 2500	GO0004861	MF	cyclin-dependent protein serine/threonine kinase inhibitor activity
	2	3000 4500	GO0031098	PB	stress-activated protein kinase signaling cascade
	3	2000 2500 4000	GO0035735	PB	intraciliary transport involved in cilium morphogenesis
	3	1500 3000 4500	GO0001503	PB	ossification
	3	1500 3000 4500	GO0005881	CC	cytoplasmic microtubule
	2	2000 4000	GO0033233	PB	regulation of protein sumoylation
	2	1500 3000	GO0060538	PB	skeletal muscle organ development

**Tableau 2.** *Enrichissement fonctionnel par analyse MGSA des gènes altérés dans la lignée A375R-VMF comparativement à la lignée A37*

Comparaison : A375R-DBF versus A375-wt					
nombre de listes	taille des listes dans lesquelles ont été retrouvé le terme	identifiant GO du terme	Base de donnée GO	Définition GO du terme	
Listes de gènes surexprimés dans la lignée résistante	7	1000 1500 2500 3000 3500 4000 4500	GO0060337	PB	type I interferon signaling pathway
	5	1000 1500 2500 3000 4500	GO0034340	PB	response to type I interferon
	5	1000 1500 2500 3000 4500	GO0071357	PB	cellular response to type I interferon
	7	1500 2500 3000 3500 4000 4500 5000	GO0007156	PB	homophilic cell adhesion
	4	1500 2000 3500 5000	GO0098609	PB	cell-cell adhesion
	2	2000 5000	GO0022610	PB	biological adhesion
	4	2000 3000 3500 4000	GO0000323	CC	lytic vacuole
	3	2000 3000 3500	GO0005764	CC	lysosome
	2	3500 5000	GO0005773	CC	vacuole
	2	4000 4500	GO0044437	CC	vacuolar part
	3	2000 3500 5000	GO0031982	CC	vesicle
	2	2000 5000	GO0031988	CC	membrane-bounded vesicle
	2	3500 5000	GO0043230	CC	extracellular organelle
	2	3500 5000	GO0070062	CC	extracellular vesicular exosome
	4	1500 3000 4000 4500	GO0043062	PB	extracellular structure organization
	5	1500 3000 3500 4000 4500	GO0030198	PB	extracellular matrix organization
	3	2500 3000 4500	GO0043001	PB	Golgi to plasma membrane protein transport
	2	2500 3000	GO0006893	PB	Golgi to plasma membrane transport
	2	3500 4000	GO0043065	PB	positive regulation of apoptotic process
	2	3500 4000	GO0043068	PB	positive regulation of programmed cell death
	2	2500 3000	GO0019838	MF	growth factor binding
	2	1500 4500	GO0048008	PB	platelet-derived growth factor receptor signaling pathway
	2	4000 4500	GO0005777	CC	peroxisome
	2	1500 2500	GO0042611	CC	MHC protein complex
	2	1500 2500	GO0061035	PB	regulation of cartilage development
	2	2000 3500	GO0001503	PB	ossification
	2	1000 1500	GO0001655	PB	urogenital system development
	2	2000 3500	GO0070887	PB	cellular response to chemical stimulus

**Tableau 3 A.** *Enrichissement fonctionnel par analyse MGSA des gènes altérés (surexprimés) dans la lignée A375R-DBF comparativement à la lignée A375-wt*

Comparaison : A375R-DBF versus A375-wt					
nombre de listes	taille des listes dans lesquelles ont été retrouvé le terme	identifiant GO du terme	Base de donnée GO	Définition GO du terme	
Listes de gènes sous-exprimés dans la lignée résistante	3	1500 2500 3000	GO0006364	PB	rRNA processing
	3	2000 2500 3000	GO0005681	CC	spliceosomal complex
	3	4000 4500 5000	GO0044822	MF	poly(A) RNA binding
	2	2500 3500	GO0000375	PB	RNA splicing, via transesterification reactions
	2	2500 3000	GO0000377	PB	RNA splicing, via transesterification reactions with bulged adenosine as nucleophile
	2	2500 3000	GO0042254	PB	ribosome biogenesis
	7	2000 2500 3000 3500 4000 4500 5000	GO0000278	PB	mitotic cell cycle
	4	2500 3000 3500 4500	GO0006281	PB	DNA repair
	4	3000 3500 4500 5000	GO0006310	PB	DNA recombination
	4	1500 2000 2500 4500	GO0071897	PB	DNA biosynthetic process
	3	1500 2000 2500	GO0006260	PB	DNA replication
	2	500 1000	GO0022616	PB	DNA strand elongation
	3	3000 3500 4500	GO0005730	CC	nucleolus
	5	2500 3000 3500 4000 4500	GO0031965	CC	nuclear membrane
	3	2000 4000 5000	GO0044428	CC	nuclear part
	2	2000 4000	GO0031981	CC	nuclear lumen
	2	3000 3500	GO0005814	CC	centriole
	3	2500 3000 3500	GO0044450	CC	microtubule organizing center part
	5	2000 2500 4000 4500 5000	GO0005813	CC	centrosome
	8	1500 2000 2500 3000 3500 4000 4500 5000	GO0009112	PB	nucleobase metabolic process
	2	1500 2000	GO0006144	PB	purine nucleobase metabolic process
	2	2000 2500	GO0031072	MF	heat shock protein binding
	4	2000 4000 4500 5000	GO0009266	PB	response to temperature stimulus
	6	1000 2000 2500 3000 3500 5000	GO0071294	PB	cellular response to zinc ion
	2	4500 5000	GO0017016	MF	Ras GTPase binding
	2	1500 2500	GO0031290	PB	retinal ganglion cell axon guidance
	3	4000 4500 5000	GO0048738	PB	cardiac muscle tissue development
	3	3500 4000 4500	GO0072655	PB	establishment of protein localization to mitochondrion
	2	4000 5000	GO0071806	PB	protein transmembrane transport

**Tableau 3 B.** *Enrichissement fonctionnel par analyse MGSA des gènes altérés (sous-exprimés) dans la lignée A375R-DBF comparativement à la lignée A375-wt*

Comparaison : A375R-TMT versus A375-wt						
	nombre de listes	taille des listes dans lesquelles ont été retrouvé le terme	identifiant GO du terme	Base de donnée GO	Définition GO du terme	
Listes de gènes surexprimés dans la lignée résistante	5	1500 3000 4000 4500 5000	GO0009611	PB	response to wounding	
	2	2000 3500	GO0006950	PB	response to stress	
	2	1000 2500	GO0071276	PB	cellular response to cadmium ion	
	5	1500 3000 4000 4500 5000	GO0009888	PB	tissue development	
	3	2000 3500 5000	GO0048856	PB	anatomical structure development	
	2	2000 3500	GO0044707	PB	single-multicellular organism process	
Listes de gènes sous-exprimés dans la lignée résistante	2	2000 4000	GO0012506	CC	vesicle membrane	
	2	2000 4000	GO0030659	CC	cytoplasmic vesicle membrane	
	2	2500 3000	GO0032588	CC	trans-Golgi network membrane	
	4	1500 2500 3000 4500	GO0042611	CC	MHC protein complex	
	3	1000 2500 4500	GO0042613	CC	MHC class II protein complex	
	3	2000 4000 5000	GO0032502	PB	developmental process	
	3	2000 4000 5000	GO0044767	PB	single-organism developmental process	
	3	1500 2500 3000	GO0030278	PB	regulation of ossification	
	2	1500 4500	GO0045667	PB	regulation of osteoblast differentiation	
	2	2500 3000	GO0030552	MF	cAMP binding	
2	1000 2500	GO0010839	PB	negative regulation of keratinocyte proliferation		

**Tableau 4.** *Enrichissement fonctionnel par analyse MGSA des gènes altérés dans la lignée A375R-TMT comparativement à la lignée A375-wt*

## IV Discussion

---

Le vémurafénib (VMF), le dabrafénib (DBF) et le tramétinib (TMT), des thérapies ciblées bloquant l'activation constitutive de la cascade des MPAK dans les MM présentant une mutation activatrice du gène BRAF, ont montré des réponses tumorales majeures associées à une augmentation de la survie globale par rapport à la dacarbazine [66,68,69]. Malgré cette activité antitumorale majeure, la plupart des réponses à ces médicaments sont partielles et une progression de la maladie apparaît rapidement [63].

La meilleure compréhension des mécanismes à l'origine de ces résistances acquises permettrait d'optimiser la prise en charge thérapeutique du MM. La présente étude se propose d'identifier de nouveaux déterminants moléculaires de la résistance acquise du MM aux iMAPK par une approche pharmaco-génomique sur modèle *in vitro* de MM.

Trois lignées cellulaires de MM porteuses de la mutation BRAF V600E, résistantes aux iMAPK (A375R-iMAPKs) ont été établies par exposition continue, 4 mois, de la lignée parentale A375-wt au VMF, DBF ou TMT (A375R-VMF, A375R-DBF, et A375R-TMT respectivement). Comme illustré par la matrice des distances et le dendrogramme des distances, les profils d'expression des lignées A375R-iMAPKs étaient tous distincts, suggérant que les mécanismes de résistance au VMF, au DBF ou au TMT sont différents. Ces mécanismes ne seraient donc communs ni à la voie ciblée (MAPK), ni à la cible moléculaire (BRAF ou MEK).

Les fonctions cellulaires altérées lors de la sélection des lignées A375R-iMAPKs ont été recherchées par la méthode développée dans l'article 2. Comme les mécanismes de résistance de ces lignées semblaient indépendants et non communs à l'ensemble des lignées résistantes, les listes de gènes sélectionnés provenaient de la comparaison de chacune des lignées résistantes avec la lignée A375-wt. Les termes GO identifiés lors de l'analyse MGSA de ces listes indiquent les fonctions cellulaires altérées dans les A375R-iMAPKs et donc potentiellement à l'origine de leur résistance aux iMAPK.

Les fonctions biologiques altérées dans les lignées A375R-iMAPK, et pouvant jouer un rôle dans la résistance, étaient les suivantes :

### Fonctions altérées dans la lignée A375R-VMF :

- Fonctions associées à des gènes surexprimés : ribosomes mitochondriaux, transduction du signal, locomotion.
- Fonctions associées à des gènes sous-exprimés : complexe MHC classe II, activité inhibitrice de kinases cycline-dépendantes, microtubule, sumoylation des protéines.

### Fonctions altérées dans la lignée A375R-DBF :

- Fonctions associées à des gènes surexprimés : voie de signalisation à l'interféron de type I, adhésion cellulaire, lysosomes, exosomes, réseau membranaire trans-Golgi et transport vésiculaire, apoptose, voie de signalisation du récepteur au PDGF, péroxysome, complexe CMH, réponse cellulaire aux stimuli chimiques.
- Fonctions associées à des gènes sous-exprimés : épissage des ARN, mitose et voie de réparation de l'ADN, centriole, métabolisme des bases puriques, liaison aux protéines de choc thermique, réponse cellulaire au zinc, liaison à Ras, transport protéique transmembranaire, adressage des protéines à la mitochondrie.

Fonctions altérées dans la lignée A375R-TMT :

- Fonctions associées à des gènes surexprimés : réponse cellulaire au stress, développement tissulaire.
- Fonctions associées à des gènes sous-exprimés : réseau membranaire trans-Golgi et transport vésiculaire, complexe protéique MHC class II, liaison à l'AMP cyclique, régulation négative de la prolifération des kératinocytes.

Les principaux mécanismes de résistance aux iMAPK identifiés à ce jour conduisent à la réactivation de la voie MAPK, au contournement de la voie MAPK par l'activation de la voie PI3K-AKT-mTOR, et à l'activation de la voie du VEGF [140–142]. L'altération de fonctions biologiques précédemment décrites dans les cellules A375R-iMAPKs pourrait constituer de nouveaux mécanismes de résistance du MM. Pour vérifier l'implication de ces voies dans la chimiorésistance des cellules A375R-iMAPKs, des études fonctionnelles *in vitro* seront réalisées, notamment grâce à l'usage d'inhibiteurs chimiques ou par répression spécifique de gènes clés par siRNA.



# Conclusion & Perspectives

---



Le mélanome malin (MM) métastatique, le plus agressif des cancers cutanés, non curable par exérèse chirurgicale, reste un challenge thérapeutique [1–3]. La résistance, aussi bien innée que acquise, du MM aux agents anticancéreux constitue le principal obstacle thérapeutique [3]. Cette dernière résistance, multifactorielle, peut impliquer de nombreux mécanismes cellulaires et moléculaires [4–6], et est induite indifféremment par les chimiothérapies traditionnelles que par les nouvelles thérapies ciblées utilisées dans le traitement du MM métastatique [5,7,8].

Grace à l'avènement des technologies « omiques », la biologie du MM est de mieux en mieux connue [9–12]. Les mécanismes de résistance restent néanmoins complexes et multiples [13]. Leur détermination est aujourd'hui considérée comme l'enjeu majeur de la recherche pour le traitement des cancers. L'objectif final est triple : a) identification de marqueurs biologiques de résistance permettant d'orienter le choix thérapeutique dans un contexte de médecine personnalisée, b) meilleure compréhension de mécanismes moléculaires de résistance permettant de proposer des associations thérapeutiques rationnelles, et c) identification de nouvelles cibles thérapeutiques.

Très peu d'études concernent les chimiothérapies classiques, qui sont pourtant toujours utiles en cas de résistance aux nouvelles thérapies [3]. La première étude réalisée durant cette thèse s'est ainsi focalisée sur la recherche de nouveaux déterminants moléculaires de la résistance acquise du MM aux VAs par une approche pharmaco-génomique. Les VAs, cytotoxiques appartenant à la classe des anti-microtubules, gardent une place centrale dans le traitement du MM pour les patients ne portant pas d'altération moléculaire contre laquelle une thérapie ciblée est disponible, ou pour les patients en rechute après l'utilisation de ces thérapies ciblées [3]. Ils sont utilisés en association dans des chimiothérapies combinées avec un taux de réponse pouvant aller jusqu'à 45% [3]. Parce que cette pratique rend inefficace l'utilisation de biopsies de patients pour identifier des altérations moléculaires induites par une molécule unique, nous avons choisi une approche *in vitro* utilisant des lignées cellulaires de MM CAL1 [276]. Trois lignées cellulaires résistantes aux VAs (CAL1R-VAs) ont été établies par exposition continue, 12 mois, de la lignée parentale CAL1-wt à la VCR, la VDS ou la VRB : CAL1R-VCR, CAL1R-VDS et CAL1R-VRB respectivement.

Une implication différentielle de la GSTM1 et de la MRP1 a été démontrée dans la chimiorésistance acquise des lignées CAL1R-VAs aux VAs, une activité coordonnée de GSTM1 et MRP1 n'étant requise que dans la résistance à la VCR et à la VDS mais pas dans la résistance à la VRB [276]. Afin de confirmer l'hypothèse d'une résistance différentielle aux VAs, un profilage transcriptomique des lignées CAL1 (parentale et résistantes) a été réalisé. La comparaison des profils d'expression génique, distinguant deux groupes de lignées cellulaires (CAL1R-VCR et CAL1R-VDS ; CAL1R-VRB et CAL1-wt), conforte l'hypothèse d'une résistance différentielle des lignées CAL1, d'une part à la VCR et à la VDS, d'autre part à la VRB seule.

Afin d'identifier des déterminants moléculaires de la résistance acquise aux VAs, des gènes dont l'expression a fortement été altérée lors de la production des lignées résistantes

ont été sélectionnés. La comparaison des profils d'expression a permis d'identifier 5 gènes : 3 gènes (MGP, HS6ST2, et SLITRK6) surexprimés dans les trois lignées résistantes comparativement à la lignée parentale CAL1-wt ; 2 gènes (PCSK6 et PRKCB) spécifiquement surexprimés dans un des deux groupes de lignées résistantes (CAL1R-VCR et CAL1R-VDS ; CAL1R-VRB). Le rôle potentiel de la surexpression des gènes candidats dans la résistance a été évalué *in vitro*, après inhibition sélective de l'expression de ces gènes par des siRNA. La surexpression de MGP, HS6ST2, et SLITRK6, pourrait être corrélée (tendance significative) à la résistance commune aux VAs. Cependant, la surexpression de PCSK6 et PRKCB dans les lignées résistantes (CAL1R-VCR et CAL1R-VDS, CAL1R-VRB, respectivement) n'a pas été corrélée lors des analyses fonctionnelles avec la résistance différentielle de ces lignées aux VAs. Cette non-significativité pourrait être expliquée par la redondance des voies de signalisation à l'origine de la survie et de la prolifération cellulaires. Il est ainsi difficile d'isoler un gène unique impactant la sensibilité à un médicament. Il semble donc plus judicieux de rechercher des déterminants moléculaires de résistance aux seins de fonctions ou voies de signalisation cellulaire.

Afin d'identifier les fonctions cellulaires potentiellement impliquées dans la résistance des cellules CAL1R-VAs, nous avons ré-analysé les données transcriptomiques. Cette nouvelle analyse a permis de mettre au point et de valider une méthode d'analyse transcriptomique optimisée pour la recherche d'hypothèses mécanistiques, basée sur l'utilisation de logiciels « open source » (RMA, RDAM et MGSA [183,231,239]), et robuste même en absence de réplicat. La description de cette méthode, aussi bien adaptée à la recherche de mécanisme de résistance que de mécanismes d'action d'agents anticancéreux sur modèle *in vitro*, fera l'objet d'un futur papier. Cette méthode exploite la faculté des agents anticancéreux, due à leur agressivité, à induire des changements d'expression génique majeurs. De plus et contrairement aux méthodes d'analyse transcriptomique utilisées classiquement, la recherche des altérations moléculaires induites par les agents étudiés est ici focalisée sur l'identification de fonctions cellulaires et non de gènes isolés. Cette méthode est donc particulièrement efficace dans l'identification d'hypothèses mécanistiques qui pourront être vérifiées par la suite par des études fonctionnelles *in vitro* adaptées.

Confortant la première analyse transcriptomique, la comparaison des profils d'expression des cellules CAL1 a de nouveau distingué deux groupes de lignées cellulaires (CAL1R-VCR et CAL1R-VDS ; CAL1R-VRB et CAL1-wt), suggérant que des mécanismes différents sont à l'origine de la résistance des lignées CAL1R-VAs à la VCR et à la VDS d'une part, et à la VRB d'autre part.

L'analyse bioinformatique (MGSA) des gènes spécifiquement altérés dans les deux lignées CAL1R-VCR et CAL1R-VDS a mis en évidence quatre termes Gene Ontology (GO): "pigmentation", "lumière lysosomiale" et "lumière vacuolaire" (pouvant être regroupé en un terme composite « lumière des organites acides») associés aux gènes sous-exprimés dans ces lignées, et "réponse au stress du RE" associé aux gènes surexprimés. En revanche, l'analyse MGSA des gènes spécifiquement modifiés dans la lignée cellulaire

CAL1R-VRB n'a pas donné de résultats significatifs, probablement à cause de la similitude des profils d'expression entre CAL1R-VRB et CAL1-WT. Les analyses fonctionnelles *in vitro* ont permis de confirmer l'implication des organites acides, par extrapolation lysosomes, et de la réponse au stress du RE (ou unfolded protein response, UPR) dans la résistance différentielle des lignées CAL1 aux VAs.

L'ensemble des résultats issus des études fonctionnelles sur le compartiment acide des lignées CAL1 suggère que la voie lysosomiale de l'apoptose pourrait jouer un rôle central dans la résistance différentielle du MM aux VAs. Ce mécanisme pourrait impliquer des altérations spécifiquement retrouvées dans le premier groupe de lignées (CAL1R-VCR et CAL1R-VDS) par rapport au deuxième groupe de lignées (CAL1R-VRB et CAL1-wt): i) la sous-expression des cathepsines B, K, L et V, ii) la plus petite taille du compartiment acide, et iii) la réduction de la taille et la moindre accumulation d'organites acide en réponse à un traitement par VAs (VCR, VDS et VRB à forte concentration). Afin d'étudier cette hypothèse, le rôle de la voie lysosomiale de l'apoptose dans la mort cellulaire induite par les VAs doit d'abord être confirmé. En effet, bien qu'une étude sur des cellules HeLa et MCF-7 traitée par VCR [277] décrive ce mécanisme, et que cette étude ait été reprise par plusieurs revues pour justifier la capacité d'induction de ce type d'apoptose par les VAs [278,279], aucune autre étude sur les VAs ne permet de conforter ce résultat. Les seules études relatant l'activation de la voie lysosomiale de l'apoptose par des anti-microtubule traitent des taxanes [280]. Dans un second temps, le rôle de chacune des cathepsines dans la résistance différentielle pourra être étudié, notamment par une approche d'étude fonctionnelle après répression génique par siRNA.

L'autre fonction cellulaire identifiée par l'analyse bioinformatique était la réponse au stress du RE, ou *unfoled protein response* (UPR). L'inhibition de UPR par le TUDCA [281,282], a réduit significativement la résistance de l'ensemble des lignées CAL1 (parentale et résistantes) à tous les VAs (VCR, VDS et VRB). Cependant, les deux mêmes groupes de lignées (CAL1R-VCR et CAL1R-VDS ; CAL1R-VRB et CAL1-wt) pouvaient être à nouveau distingués selon l'importance de la sensibilisation aux VAs par le TUDCA : la sensibilisation étaient significativement plus élevés dans le premier groupe de cellules que dans le second. De plus les effets du TUDCA sur sensibilisation aux VAs étaient significativement plus élevés pour VCR et VDS que pour VRB. Ces résultats, suggérant une implication de UPR dans la résistance différentielle aux VAs, sont en accord avec une étude précédente montrant l'implication de la branche XBP-1 de UPR dans la résistance acquise à la VCR d'un panel de cellules de MM [130]. Afin de vérifier si ce mécanisme est spécifique aux cellules CAL1, l'effet de l'inhibition de UPR par le TUDCA a été étudié sur une autre lignée de MM : MDA-MB-435. De façon marquante, le TUDCA a significativement sensibilisé cette lignée à la VCR et à la VDS mais pas à la VRB, suggérant qu'une activité UPR élevée pourrait être un mécanisme significatif de résistance différentielle du MM aux VAs. Il serait intéressant de confirmer ce résultat dans d'autres lignées, y compris des lignées non MM.

Le mécanisme de résistance associé à l'UPR pourrait impliquer l'autophagie, une voie de dégradation lysosomiale fréquemment activée par l'UPR, et connue pour être à l'origine de la chimiorésistance de nombreux cancers dont le MM [122]. Afin d'étudier le rôle de l'autophagie dans la résistance des lignées CAL1R-VAs, nous avons dans un premier temps cherché à déterminer si l'autophagie était différentiellement régulée dans ces lignées. Le niveau de base de l'autophagie était élevé et équivalent dans l'ensemble des lignées CAL1 (parentale et résistantes). Cependant, le flux autophagique était significativement plus important dans les lignées CAL1R-VCR et CAL1R-VDS que dans les lignées CAL1R-VRB et CAL1-wt, et associé à une surexpression de LC3B. Ainsi, l'augmentation du flux autophagique dans le premier groupe de lignées cellulaires pourrait être due à la surexpression de LC3B, une protéine clé de l'autophagie [272], consécutive à une activité plus élevée de la voie de réponse au stress du RE dans ces lignées [273]. Ainsi, la résistance différentielle du MM aux VAs pourrait impliquer une activation de la réponse au stress du RE, et une activation secondaire de l'autophagie due à une régulation positive de LC3 par les éléments de réponse au stress du RE. Cette hypothèse devra être confirmée par des études mécanistiques.

Par ailleurs, il pourrait être intéressant d'étudier l'implication de l'AMPK $\alpha$  dans la résistance différentielle des lignées CAL1 aux VAs. En effet, cette enzyme qui peut être activée secondairement à une activation de la réponse au stress du RE est surexprimée spécifiquement dans le premier groupe de lignées cellulaires. De plus, cette enzyme est connue pour réguler l'autophagie et la croissance cellulaire [283], deux mécanismes impliqués dans la chimiorésistance des cancer [6].

Le deuxième axe de recherche de cette thèse concernait l'identification de nouveaux déterminants moléculaires de la résistance acquise du MM aux iMAPK, par une approche pharmaco-génomique. Les iMAPK (VMF, DBF, et TMT) sont des thérapies ciblées bloquant l'activation constitutive de la cascade des MAPK dans les MM présentant une mutation activatrice du gène BRAF. Malgré une activité antitumorale majeure, la plupart des réponses à ces médicaments sont partielles et une progression de la maladie apparaît rapidement [63]. La meilleure compréhension des mécanismes à l'origine de ces résistances acquises permettrait d'optimiser la prise en charge thérapeutique du MM.

Pour étudier la résistance acquise du MM aux iMAPKs, trois lignées cellulaires de MM (porteuses de la mutation BRAF V600E) résistantes aux iMAPK (A375R-iMAPKs) ont été établies par exposition continue de la lignée parentale A375-wt au VMF, DBF ou TMT (A375R-VMF, A375R-DBF, et A375R-TMT respectivement). Puis une analyse transcriptomique de ces lignées (selon la méthodologie développée lors de l'étude sur les VAs) a été réalisée. Les profils d'expression des lignées A375R-iMAPKs étaient tous distincts suggérant que les mécanismes de résistance au VMF, au DBF ou au TMT sont différents. Ces mécanismes ne seraient donc communs ni à la voie ciblée (MAPK), ni à la cible moléculaire (BRAF ou MEK).

L'analyse MGSA a permis d'identifier des fonctions cellulaires altérées dans les A375R-iMAPKs et donc potentiellement à l'origine de leur résistance aux iMAPK. Ces fonctions

biologiques sont toutes différentes des principaux mécanismes de résistance aux inhibiteurs de MAPK identifiés à ce jour (réactivation de la voie MAPK, contournement de la voie MAPK par l'activation de la voie PI3K-AKT-mTOR, et activation de la voie du VEGF [140–142]). Aussi, les altérations des fonctions biologiques précédemment citées dans les cellules A375R-iMAPKs pourraient constituer de potentiels nouveaux mécanismes de résistance du MM aux VAs. En outre, l'altération de certaines de ces fonctions (régulation des kinases cyclines dépendantes, adhésion cellulaire, lysosomes, exosomes, apoptose, voie de signalisation du récepteur au PDGF, mitose et voie de réparation de l'ADN, transport protéique transmembranaire, liaison aux protéines de choc thermique, réponse cellulaire au stress) a déjà été impliqué dans la chimiorésistance cancéreuse [6]. Pour vérifier l'implication de ces voies dans la résistance des cellules A375R-iMAPKs, des études fonctionnelles *in vitro* doivent être réalisées. L'implication de ces fonctions cellulaires dans la résistance aux iMPAK pourra être testée grâce à l'usage d'inhibiteurs chimiques ou par répression spécifique de gènes clés par siRNA.



# Bibliographie

---



- 1 Tsao H, Atkins MB, Sober AJ. Management of cutaneous melanoma. *N Engl J Med* 2004; **351**:998–1012.
- 2 Houghton AN, Polsky D. Focus on melanoma. *Cancer Cell* 2002; **2**:275–278.
- 3 Garbe C, Peris K, Hauschild A, Saiag P, Middleton M, Spatz A, *et al.* Diagnosis and treatment of melanoma. European consensus-based interdisciplinary guideline - Update 2012. *Eur J Cancer Oxf Engl 1990* Published Online First: 13 September 2012. doi:10.1016/j.ejca.2012.06.013
- 4 Gottesman MM. Mechanisms of cancer drug resistance. *Annu Rev Med* 2002; **53**:615–627.
- 5 Helmbach H, Rossmann E, Kern MA, Schadendorf D. Drug-resistance in human melanoma. *Int J Cancer J Int Cancer* 2001; **93**:617–622.
- 6 Holohan C, Van Schaeybroeck S, Longley DB, Johnston PG. Cancer drug resistance: an evolving paradigm. *Nat Rev Cancer* 2013; **13**:714–726.
- 7 Dummer R, Flaherty KT. Resistance patterns with tyrosine kinase inhibitors in melanoma: new insights. *Curr Opin Oncol* 2012; **24**:150–154.
- 8 Tentori L, Lacal PM, Graziani G. Challenging resistance mechanisms to therapies for metastatic melanoma. *Trends Pharmacol Sci* 2013; **34**:656–666.
- 9 Workman P, Al-Lazikani B, Clarke PA. Genome-based cancer therapeutics: targets, kinase drug resistance and future strategies for precision oncology. *Curr Opin Pharmacol* 2013; **13**:486–496.
- 10 Alaoui-Jamali MA, Dupré I, Qiang H. Prediction of drug sensitivity and drug resistance in cancer by transcriptional and proteomic profiling. *Drug Resist Updat* 2004; **7**:245–255.
- 11 Lee C-H, Macgregor PF. Using microarrays to predict resistance to chemotherapy in cancer patients. *Pharmacogenomics* 2004; **5**:611–625.
- 12 Longley DB, Johnston PG. Molecular mechanisms of drug resistance. *J Pathol* 2005; **205**:275–292.
- 13 Hendrix MJC, Seftor EA, Hess AR, Seftor REB. Molecular plasticity of human melanoma cells. *Oncogene* 2003; **22**:3070–3075.
- 14 Laennec R. Sur les mélanoses. *Bull Faculté de Méd Paris* 1812; **1**:23–26.
- 15 Melanoma (PDQ®). Natl. Cancer Inst. <http://www.cancer.gov/cancertopics/pdq/treatment/melanoma/HealthProfessional/page1> (accessed 26 Aug2014).
- 16 Whiteman DC, Pavan WJ, Bastian BC. The melanomas: a synthesis of epidemiological, clinical, histopathological, genetic, and biological aspects, supporting distinct subtypes, causal pathways, and cells of origin. *Pigment Cell Melanoma Res* 2011; **24**:879–897.
- 17 Soengas MS, Lowe SW. Apoptosis and melanoma chemoresistance. *Oncogene* 2003; **22**:3138–3151.
- 18 OMS | Cancers cutanés. WHO. <http://www.who.int/uv/faq/skincancer/fr/index1.html> (accessed 24 Aug2014).
- 19 The Lancet. Skin cancer: prevention is better than cure. *The Lancet* 2014; **384**:470.
- 20 SEER - National Cancer Institute. SEER - Natl. Cancer Inst. <http://www.seer.cancer.gov/statfacts/html/melan.html> (accessed 24 Aug2014).
- 21 Bleyer A. Young adult oncology: the patients and their survival challenges. *CA Cancer J Clin* 2007; **57**:242–255.
- 22 Civatte J, Bazex J. BEH (buletin épidémiologique hebdomadaire) Numéro thématique-Le bronzage artificiel: une menace bien réelle, mais évitable, pour la santé.

[http://medecine.foxoo.com/\\_internautas/0000023709/photos/beh%2018-19%20mai%202012%20240512.pdf](http://medecine.foxoo.com/_internautas/0000023709/photos/beh%2018-19%20mai%202012%20240512.pdf) (accessed 24 Aug2014).

- 23 Thompson JF, Scolyer RA, Kefford RF. Cutaneous melanoma. *The Lancet* 2005; **365**:687–701.
- 24 Belot A, Grosclaude P, Bossard N, Jouglu E, Benhamou E, Delafosse P, Guizard AV, Molinié F, Danzon A, Bara S, Bouvier AM, Trétarre B, Binder-Foucard F, Colonna M, Daubisse L, Hédelin G, Launoy G, Le Stang N, Maynadié M, Monnereau A, Troussard X, Faivre J, Collignon A, Janoray I, Arveux P, Buemi A, Raverdy N, Schwartz C, Bovet M, Chérié-Challine L, Estève J, Remontet L, Velten M. Cancer incidence and mortality in France over the period 1980-2005. *Rev Epidemiol Sante Publique* 2008; **56**:159–175.
- 25 Garbe C, Leiter U. Melanoma epidemiology and trends. *Clin Dermatol* 2009; **27**:3–9.
- 26 Boniol M, Autier P, Boyle P, Gandini S. Cutaneous melanoma attributable to sunbed use: systematic review and meta-analysis. *BMJ* 2012; **345**:e4757.
- 27 Cairns J. Mutation selection and the natural history of cancer. *Nature* 1975; **255**:197–200.
- 28 Nowell PC. The clonal evolution of tumor cell populations. *Science* 1976; **194**:23–28.
- 29 Yates LR, Campbell PJ. Evolution of the cancer genome. *Nat Rev Genet* 2012; **13**:795–806.
- 30 Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* 2011; **144**:646–674.
- 31 Satyamoorthy K, Herlyn M. Cellular and molecular biology of human melanoma. *Cancer Biol Ther* 2002; **1**:14–17.
- 32 Haass NK, Herlyn M. Normal human melanocyte homeostasis as a paradigm for understanding melanoma. *J Investig Dermatol Symp Proc Soc Investig Dermatol Inc Eur Soc Dermatol Res* 2005; **10**:153–163.
- 33 Haass NK, Smalley KSM, Li L, Herlyn M. Adhesion, migration and communication in melanocytes and melanoma. *Pigment Cell Res Spons Eur Soc Pigment Cell Res Int Pigment Cell Soc* 2005; **18**:150–159.
- 34 Bertolotto C. Melanoma: From Melanocyte to Genetic Alterations and Clinical Options. *Scientifica* 2013; **2013**:635203.
- 35 Curtin JA, Fridlyand J, Kageshita T, Patel HN, Busam KJ, Kutzner H, *et al.* Distinct Sets of Genetic Alterations in Melanoma. *N Engl J Med* 2005; **353**:2135–2147.
- 36 Elder DE. Precursors to melanoma and their mimics: nevi of special sites. *Mod Pathol Off J U S Can Acad Pathol Inc* 2006; **19 Suppl 2**:S4–20.
- 37 Goldstein AM, Tucker MA. Dysplastic Nevi and Melanoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2013; **22**:528–532.
- 38 Hoek KS. DNA microarray analyses of melanoma gene expression: a decade in the mines. *Pigment Cell Res* 2007; **20**:466–484.
- 39 Bittner M, Meltzer P, Chen Y, Jiang Y, Seftor E, Hendrix M, *et al.* Molecular classification of cutaneous malignant melanoma by gene expression profiling. *Nature* 2000; **406**:536–540.
- 40 Fecher LA, Cummings SD, Keefe MJ, Alani RM. Toward a molecular classification of melanoma. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol* 2007; **25**:1606–1620.
- 41 Thompson JF, Scolyer RA, Kefford RF. Cutaneous melanoma in the era of molecular profiling. *Lancet* 2009; **374**:362–365.
- 42 Vidwans SJ, Flaherty KT, Fisher DE, Tenenbaum JM, Travers MD, Shrager J. A

Melanoma Molecular Disease Model. *PLoS ONE* 2011; **6**:e18257.

- 43 Winnepenninckx V, Lazar V, Michiels S, Dessen P, Stas M, Alonso SR, *et al.* Gene expression profiling of primary cutaneous melanoma and clinical outcome. *J Natl Cancer Inst* 2006; **98**:472–482.
- 44 Carr KM, Bittner M, Trent JM. Gene-expression profiling in human cutaneous melanoma. *Oncogene* 2003; **22**:3076–3080.
- 45 Davies MA, Samuels Y. Analysis of the genome to personalize therapy for melanoma. *Oncogene* 2010; **29**:5545–5555.
- 46 Gray-Schopfer V, Wellbrock C, Marais R. Melanoma biology and new targeted therapy. *Nature* 2007; **445**:851–857.
- 47 Romano E, Schwartz GK, Chapman PB, Wolchock JD, Carvajal RD. Treatment implications of the emerging molecular classification system for melanoma. *Lancet Oncol* 2011; **12**:913–922.
- 48 Whited JD, Grichnik JM. Does this patient have a mole or a melanoma? *JAMA* 1998; **279**:696–701.
- 49 HAS. Strategie de diagnostic précoce du mélanome - synthèses et perspectives.pdf. [http://www.has-sante.fr/portail/upload/docs/application/pdf/melanome\\_synthese.pdf](http://www.has-sante.fr/portail/upload/docs/application/pdf/melanome_synthese.pdf) (accessed 20 Sep2014).
- 50 HAS. Rapport\_Dermoscopie - rapport\_dermoscopie.pdf. [http://www.has-sante.fr/portail/upload/docs/application/pdf/rapport\\_dermoscopie.pdf](http://www.has-sante.fr/portail/upload/docs/application/pdf/rapport_dermoscopie.pdf) (accessed 20 Sep2014).
- 51 Clark WH, From L, Bernardino EA, Mihm MC. The Histogenesis and Biologic Behavior of Primary Human Malignant Melanomas of the Skin. *Cancer Res* 1969; **29**:705–727.
- 52 Greenwald HS, Friedman EB, Osman I. Superficial spreading and nodular melanoma are distinct biological entities: a challenge to the linear progression model. *Melanoma Res* 2012; **22**:1–8.
- 53 Ruitter DJ, Spatz A, van den Oord JJ, Cook MG, Pathology Committee of the European Organization Research and Treatment of Cancer (EORTC) Melanoma Group. Pathologic staging of melanoma. *Semin Oncol* 2002; **29**:370–381.
- 54 Bichakjian CK, Halpern AC, Johnson TM, Foote Hood A, Grichnik JM, Swetter SM, *et al.* Guidelines of care for the management of primary cutaneous melanoma. American Academy of Dermatology. *J Am Acad Dermatol* 2011; **65**:1032–1047.
- 55 Breslow A. Thickness, cross-sectional areas and depth of invasion in the prognosis of cutaneous melanoma. *Ann Surg* 1970; **172**:902–908.
- 56 Balch CM, Gershenwald JE, Soong S-J, Thompson JF, Atkins MB, Byrd DR, *et al.* Final version of 2009 AJCC melanoma staging and classification. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol* 2009; **27**:6199–6206.
- 57 TNM | UICC. <http://www.uicc.org/resources/tnm/publications-resources> (accessed 27 Sep2014).
- 58 Marincola FM. Translational Medicine: A two-way road. *J Transl Med* 2003; **1**:1.
- 59 Coit DG, Andtbacka R, Anker CJ, Bichakjian CK, Carson WE, Daud A, *et al.* Melanoma, version 2.2013: featured updates to the NCCN guidelines. *J Natl Compr Cancer Netw JNCCN* 2013; **11**:395–407.
- 60 Balch CM, Gershenwald JE, Soong S-J, Thompson JF, Atkins MB, Byrd DR, *et al.* Final version of 2009 AJCC melanoma staging and classification. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol* 2009; **27**:6199–6206.
- 61 Armstrong BK, Kricger A. How much melanoma is caused by sun exposure? *Melanoma*

Res 1993; **3**:395–401.

62 Négrier S, Saiag P, Guillot B, Verola O, Avril MF, Bailly C, *et al.* [Guidelines for clinical practice: Standards, Options and Recommendations 2005 for the management of adult patients exhibiting an M0 cutaneous melanoma, full report. National Federation of Cancer Campaign Centers. French Dermatology Society. Update of the 1995 Consensus Conference and the 1998 Standards, Options, and Recommendations]. *Ann Dermatol Vénéréologie* 2005; **132**:10S3–10S85.

63 Jang S, Atkins MB. Which drug, and when, for patients with BRAF-mutant melanoma? *Lancet Oncol* 2013; **14**:e60–69.

64 INCa. [Recommandation-melanome-metastatique-rapport-integral-2013.pdf](http://www.inca.org/Recommandation-melanome-metastatique-rapport-integral-2013.pdf). 2012.file:///C:/Users/laure/Desktop/ttmt%20m%C3%A9lanome/Recommandation-melanome-metastatique-rapport-integral-2013.pdf

65 NCCN Continuing Education. <http://education.nccn.org/node/16295> (accessed 19 Oct2014).

66 McArthur GA, Chapman PB, Robert C, Larkin J, Haanen JB, Dummer R, *et al.* Safety and efficacy of vemurafenib in BRAF(V600E) and BRAF(V600K) mutation-positive melanoma (BRIM-3): extended follow-up of a phase 3, randomised, open-label study. *Lancet Oncol* 2014; **15**:323–332.

67 Chapman PB. Treating metastatic melanoma in 2014: what just happened and what is next? *Am Soc Clin Oncol Educ Book ASCO Am Soc Clin Oncol Meet* 2014; **34**:16–19.

68 Hauschild A, Grob J-J, Demidov LV, Jouary T, Gutzmer R, Millward M, *et al.* Dabrafenib in BRAF-mutated metastatic melanoma: a multicentre, open-label, phase 3 randomised controlled trial. *Lancet* 2012; **380**:358–365.

69 Flaherty KT, Robert C, Hersey P, Nathan P, Garbe C, Milhem M, *et al.* Improved survival with MEK inhibition in BRAF-mutated melanoma. *N Engl J Med* 2012; **367**:107–114.

70 Flaherty KT, Infante JR, Daud A, Gonzalez R, Kefford RF, Sosman J, *et al.* Combined BRAF and MEK inhibition in melanoma with BRAF V600 mutations. *N Engl J Med* 2012; **367**:1694–1703.

71 Guo J, Si L, Kong Y, Flaherty KT, Xu X, Zhu Y, *et al.* Phase II, open-label, single-arm trial of imatinib mesylate in patients with metastatic melanoma harboring c-Kit mutation or amplification. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol* 2011; **29**:2904–2909.

72 Wolchok JD, Neyns B, Linette G, Negrier S, Lutzky J, Thomas L, *et al.* Ipilimumab monotherapy in patients with pretreated advanced melanoma: a randomised, double-blind, multicentre, phase 2, dose-ranging study. *Lancet Oncol* 2010; **11**:155–164.

73 Hodi FS, O’Day SJ, McDermott DF, Weber RW, Sosman JA, Haanen JB, *et al.* Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. *N Engl J Med* 2010; **363**:711–723.

74 Topalian SL, Hodi FS, Brahmer JR, Gettinger SN, Smith DC, McDermott DF, *et al.* Safety, activity, and immune correlates of anti-PD-1 antibody in cancer. *N Engl J Med* 2012; **366**:2443–2454.

75 Brahmer JR, Tykodi SS, Chow LQM, Hwu W-J, Topalian SL, Hwu P, *et al.* Safety and activity of anti-PD-L1 antibody in patients with advanced cancer. *N Engl J Med* 2012; **366**:2455–2465.

76 Bhatia S, Tykodi SS, Thompson JA. Treatment of Metastatic Melanoma: An Overview. *Oncol Williston Park N* 2009; **23**:488–496.

77 Swanton C. Intratumor heterogeneity: evolution through space and time. *Cancer Res* 2012; **72**:4875–4882.

78 Taylor ST, Hickman JA, Dive C. Epigenetic determinants of resistance to etoposide regulation of Bcl-X(L) and Bax by tumor microenvironmental factors. *J Natl Cancer Inst* 2000;

92:18–23.

79 Maier S, Dahlstroem C, Haefliger C, Plum A, Piepenbrock C. Identifying DNA methylation biomarkers of cancer drug response. *Am J Pharmacogenomics Genomics-Relat Res Drug Dev Clin Pract* 2005; **5**:223–232.

80 Valent P, Bonnet D, De Maria R, Lapidot T, Copland M, Melo JV, *et al.* Cancer stem cell definitions and terminology: the devil is in the details. *Nat Rev Cancer* 2012; **12**:767–775.

81 Lito P, Rosen N, Solit DB. Tumor adaptation and resistance to RAF inhibitors. *Nat Med* 2013; **19**:1401–1409.

82 Gottesman MM, Fojo T, Bates SE. Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters. *Nat Rev Cancer* 2002; **2**:48–58.

83 Shukla S, Chen Z-S, Ambudkar SV. Tyrosine kinase inhibitors as modulators of ABC transporter-mediated drug resistance. *Drug Resist Updat Rev Comment Antimicrob Anticancer Chemother* 2012; **15**:70–80.

84 Choi C-H. ABC transporters as multidrug resistance mechanisms and the development of chemosensitizers for their reversal. *Cancer Cell Int* 2005; **5**:30.

85 Gottesman MM, Pastan I. Biochemistry of multidrug resistance mediated by the multidrug transporter. *Annu Rev Biochem* 1993; **62**:385–427.

86 Thomas H, Coley HM. Overcoming multidrug resistance in cancer: an update on the clinical strategy of inhibiting p-glycoprotein. *Cancer Control J Moffitt Cancer Cent* 2003; **10**:159–165.

87 Warren L, Malarska A, Jardillier JC. The structure of P-glycoprotein and the secretion of lysosomal enzymes in multidrug-resistant cells. *Cancer Chemother Pharmacol* 1995; **35**:267–269.

88 Daniel C, Bell C, Burton C, Harguindey S, Reshkin SJ, Rauch C. The role of proton dynamics in the development and maintenance of multidrug resistance in cancer. *Biochim Biophys Acta* 2013; **1832**:606–617.

89 Yamagishi T, Sahni S, Sharp DM, Arvind A, Jansson PJ, Richardson DR. P-glycoprotein mediates drug resistance via a novel mechanism involving lysosomal sequestration. *J Biol Chem* 2013; **288**:31761–31771.

90 Kavallaris M. The role of multidrug resistance-associated protein (MRP) expression in multidrug resistance. *Anticancer Drugs* 1997; **8**:17–25.

91 König J, Nies AT, Cui Y, Leier I, Keppler D. Conjugate export pumps of the multidrug resistance protein (MRP) family: localization, substrate specificity, and MRP2-mediated drug resistance. *Biochim Biophys Acta* 1999; **1461**:377–394.

92 Schadendorf D, Makki A, Stahr C, van Dyck A, Wanner R, Scheffer GL, *et al.* Membrane transport proteins associated with drug resistance expressed in human melanoma. *Am J Pathol* 1995; **147**:1545–1552.

93 Berger W, Hauptmann E, Elbling L, Vetterlein M, Kokoschka EM, Micksche M. Possible role of the multidrug resistance-associated protein (MRP) in chemoresistance of human melanoma cells. *Int J Cancer J Int Cancer* 1997; **71**:108–115.

94 Depeille P, Cuq P, Passagne I, Evrard A, Vian L. Combined effects of GSTP1 and MRP1 in melanoma drug resistance. *Br J Cancer* 2005; **93**:216–223.

95 Depeille P, Cuq P, Mary S, Passagne I, Evrard A, Cupissol D, *et al.* Glutathione S-transferase M1 and multidrug resistance protein 1 act in synergy to protect melanoma cells from vincristine effects. *Mol Pharmacol* 2004; **65**:897–905.

96 Sheehan D, Meade G, Foley VM, Dowd CA. Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications for classification of non-mammalian members of an ancient

enzyme superfamily. *Biochem J* 2001; **360**:1–16.

97 Zhang K, Mack P, Wong KP. Glutathione-related mechanisms in cellular resistance to anticancer drugs. *Int J Oncol* 1998; **12**:871–882.

98 Meijer C, Mulder NH, Timmer-Bosscha H, Sluiter WJ, Meersma GJ, de Vries EG. Relationship of cellular glutathione to the cytotoxicity and resistance of seven platinum compounds. *Cancer Res* 1992; **52**:6885–6889.

99 Schadendorf D, Jurgovsky K, Kohlmus CM, Czarnetzki BM. Glutathione and related enzymes in tumor progression and metastases of human melanoma. *J Invest Dermatol* 1995; **105**:109–112.

100 Ouar Z, Lacave R, Bens M, Vandewalle A. Mechanisms of altered sequestration and efflux of chemotherapeutic drugs by multidrug-resistant cells. *Cell Biol Toxicol* 1999; **15**:91–100.

101 Gotink KJ, Broxterman HJ, Labots M, de Haas RR, Dekker H, Honeywell RJ, *et al.* Lysosomal sequestration of sunitinib: a novel mechanism of drug resistance. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res* 2011; **17**:7337–7346.

102 Beck WT, Danks MK, Wolverson JS, Granzen B, Chen M, Schmidt CA, *et al.* Altered DNA topoisomerase II in multidrug resistance. *Cytotechnology* 1993; **11**:115–119.

103 Daley GQ, Van Etten RA, Baltimore D. Induction of chronic myelogenous leukemia in mice by the P210bcr/abl gene of the Philadelphia chromosome. *Science* 1990; **247**:824–830.

104 Gorre ME, Mohammed M, Ellwood K, Hsu N, Paquette R, Rao PN, *et al.* Clinical resistance to STI-571 cancer therapy caused by BCR-ABL gene mutation or amplification. *Science* 2001; **293**:876–880.

105 Todd JR, Becker TM, Kefford RF, Rizos H. Secondary c-Kit mutations confer acquired resistance to RTK inhibitors in c-Kit mutant melanoma cells. *Pigment Cell Melanoma Res* 2013; **26**:518–526.

106 Shi H, Moriceau G, Kong X, Lee M-K, Lee H, Koya RC, *et al.* Melanoma whole-exome sequencing identifies (V600E)B-RAF amplification-mediated acquired B-RAF inhibitor resistance. *Nat Commun* 2012; **3**:724.

107 Bouwman P, Jonkers J. The effects of deregulated DNA damage signalling on cancer chemotherapy response and resistance. *Nat Rev Cancer* 2012; **12**:587–598.

108 Runger TM, Emmert S, Schadendorf D, Diem C, Epe B, Hellfritsch D. Alterations of DNA repair in melanoma cell lines resistant to cisplatin, fotemustine, or etoposide. *J Invest Dermatol* 2000; **114**:34–39.

109 Passagne I, Evrard A, Depeille P, Cuq P, Cupissol D, Vian L. O(6)-methylguanine DNA-methyltransferase (MGMT) overexpression in melanoma cells induces resistance to nitrosoureas and temozolomide but sensitizes to mitomycin C. *Toxicol Appl Pharmacol* 2006; **211**:97–105.

110 Lage H, Christmann M, Kern MA, Dietel M, Pick M, Kaina B, *et al.* Expression of DNA repair proteins hMSH2, hMSH6, hMLH1, O6-methylguanine-DNA methyltransferase and N-methylpurine-DNA glycosylase in melanoma cells with acquired drug resistance. *Int J Cancer* 1999; **80**:744–750.

111 Fink D, Aebi S, Howell SB. The role of DNA mismatch repair in drug resistance. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res* 1998; **4**:1–6.

112 Swanton C, Nicke B, Schuett M, Eklund AC, Ng C, Li Q, *et al.* Chromosomal instability determines taxane response. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009; **106**:8671–8676.

113 Duesberg P, Stindl R, Hehlmann R. Explaining the high mutation rates of cancer cells to drug and multidrug resistance by chromosome reassortments that are catalyzed by aneuploidy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; **97**:14295–14300.

- 114 Zhou W, Yang Y, Xia J, Wang H, Salama ME, Xiong W, *et al.* NEK2 induces drug resistance mainly through activation of efflux drug pumps and is associated with poor prognosis in myeloma and other cancers. *Cancer Cell* 2013; **23**:48–62.
- 115 Enoch T, Norbury C. Cellular responses to DNA damage: cell-cycle checkpoints, apoptosis and the roles of p53 and ATM. *Trends Biochem Sci* 1995; **20**:426–430.
- 116 Fan S, el-Deiry WS, Bae I, Freeman J, Jondle D, Bhatia K, *et al.* p53 gene mutations are associated with decreased sensitivity of human lymphoma cells to DNA damaging agents. *Cancer Res* 1994; **54**:5824–5830.
- 117 Hochhauser D. Modulation of chemosensitivity through altered expression of cell cycle regulatory genes in cancer. *Anticancer Drugs* 1997; **8**:903–910.
- 118 Yadav V, Burke TF, Huber L, Van Horn RD, Zhang Y, Buchanan SG, *et al.* The CDK4/6 Inhibitor LY2835219 Overcomes Vemurafenib Resistance Resulting from MAPK Reactivation and Cyclin D1 Upregulation. *Mol Cancer Ther* 2014; **13**:2253–2263.
- 119 Lamb CA, Yoshimori T, Tooze SA. The autophagosome: origins unknown, biogenesis complex. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2013; **14**:759–774.
- 120 White E. Deconvoluting the context-dependent role for autophagy in cancer. *Nat Rev Cancer* 2012; **12**:401–410.
- 121 Thorburn A, Thamm DH, Gustafson DL. Autophagy and Cancer Therapy. *Mol Pharmacol* 2014; **85**:830–838.
- 122 Sui X, Chen R, Wang Z, Huang Z, Kong N, Zhang M, *et al.* Autophagy and chemotherapy resistance: a promising therapeutic target for cancer treatment. *Cell Death Dis* 2013; **4**:e838.
- 123 Corazzari M, Fimia GM, Lovat P, Piacentini M. Why is autophagy important for melanoma? Molecular mechanisms and therapeutic implications. *Semin Cancer Biol* 2013; **23**:337–343.
- 124 Liu H, He Z, Simon H-U. Targeting autophagy as a potential therapeutic approach for melanoma therapy. *Semin Cancer Biol* 2013; **23**:352–360.
- 125 BRAF inhibitor resistance can be overcome by blocking autophagy. *Cancer Discov* 2014; **4**:OF10.
- 126 Ma X-H, Piao S-F, Dey S, McAfee Q, Karakousis G, Villanueva J, *et al.* Targeting ER stress-induced autophagy overcomes BRAF inhibitor resistance in melanoma. *J Clin Invest* 2014; **124**:1406–1417.
- 127 Hetz C. The unfolded protein response: controlling cell fate decisions under ER stress and beyond. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2012; **13**:89–102.
- 128 Mann MJ, Hendershot LM. UPR activation alters chemosensitivity of tumor cells. *Cancer Biol Ther* 2006; **5**:736–740.
- 129 Hersey P, Zhang XD. Adaptation to ER stress as a driver of malignancy and resistance to therapy in human melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res* 2008; **21**:358–367.
- 130 Jiang CC, Yang F, Thorne RF, Zhu BK, Hersey P, Zhang XD. Human melanoma cells under endoplasmic reticulum stress acquire resistance to microtubule-targeting drugs through XBP-1-mediated activation of Akt. *Neoplasia N Y N* 2009; **11**:436–447.
- 131 Wang J, Huang SK, Marzese DM, Hsu SC, Kawas NP, Chong KK, *et al.* Epigenetic Changes of EGFR Play an Important Role in BRAF Inhibitor Resistant Cutaneous Melanomas. *J Invest Dermatol* Published Online First: 22 September 2014. doi:10.1038/jid.2014.418
- 132 Gross A, Niemetz-Rahn A, Nonnenmacher A, Tucholski J, Keilholz U, Fusi A. Expression and activity of EGFR in human cutaneous melanoma cell lines and influence of vemurafenib on the EGFR pathway. *Target Oncol* Published Online First: 15 May 2014. doi:10.1007/s11523-014-

- 133 Puyo S, Le Morvan V, Robert J. Impact of EGFR gene polymorphisms on anticancer drug cytotoxicity in vitro. *Mol Diagn Ther* 2008; **12**:225–234.
- 134 Qiu L, Wang Q, Di W, Jiang Q, Schefeller E, Derby S, *et al.* Transient activation of EGFR/AKT cell survival pathway and expression of survivin contribute to reduced sensitivity of human melanoma cells to betulinic acid. *Int J Oncol* 2005; **27**:823–830.
- 135 Ning Y-L, Qi C-J, Lu X-Z, Zhu Y-L, Qian K-Q, Zhao J-Z. The predictive value of epidermal growth factor receptor expression for sensitivity to vinorelbine in breast cancer. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2011; **109**:499–505.
- 136 Li Q-Q, Wang W-J, Xu J-D, Cao X-X, Chen Q, Yang J-M, *et al.* Up-regulation of CD147 and matrix metalloproteinase-2, -9 induced by P-glycoprotein substrates in multidrug resistant breast cancer cells. *Cancer Sci* 2007; **98**:1767–1774.
- 137 Ruoslahti E, Pierschbacher MD. New perspectives in cell adhesion: RGD and integrins. *Science* 1987; **238**:491–497.
- 138 Danen EHJ. Integrins: regulators of tissue function and cancer progression. *Curr Pharm Des* 2005; **11**:881–891.
- 139 Chapman PB, Hauschild A, Robert C, Haanen JB, Ascierto P, Larkin J, *et al.* Improved survival with vemurafenib in melanoma with BRAF V600E mutation. *N Engl J Med* 2011; **364**:2507–2516.
- 140 Lito P, Rosen N, Solit DB. Tumor adaptation and resistance to RAF inhibitors. *Nat Med* 2013; **19**:1401–1409.
- 141 Sullivan RJ, Flaherty K. MAP kinase signaling and inhibition in melanoma. *Oncogene* 2013; **32**:2373–2379.
- 142 Rizos H, Menzies AM, Pupo GM, Carlino MS, Fung C, Hyman J, *et al.* BRAF inhibitor resistance mechanisms in metastatic melanoma; spectrum and clinical impact. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res* Published Online First: 24 January 2014. doi:10.1158/1078-0432.CCR-13-3122
- 143 McMillin DW, Negri JM, Mitsiades CS. The role of tumour–stromal interactions in modifying drug response: challenges and opportunities. *Nat Rev Drug Discov* 2013; **12**:217–228.
- 144 Al-Lazikani B, Banerji U, Workman P. Combinatorial drug therapy for cancer in the post-genomic era. *Nat Biotechnol* 2012; **30**:679–692.
- 145 Dean M. ABC transporters, drug resistance, and cancer stem cells. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2009; **14**:3–9.
- 146 Rowinsky E. The Vinca Alkaloids. Published Online First: 2003. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gate1.inist.fr/books/NBK12718/> (accessed 28 Oct2014).
- 147 Johnson IS, Armstrong JG, Gorman M, Burnett JP. The Vinca Alkaloids: A New Class of Oncolytic Agents. *Cancer Res* 1963; **23**:1390–1427.
- 148 Johnson IS. Historical background of Vinca alkaloid research and areas of future interest. *Cancer Chemother Rep* 1968; **52**:455–461.
- 149 Moudi M, Go R, Yien CYS, Nazre M. Vinca alkaloids. *Int J Prev Med* 2013; **4**:1231–1235.
- 150 Bennouna J, Delord J-P, Campone M, Nguyen L. Vinflunine: a new microtubule inhibitor agent. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res* 2008; **14**:1625–1632.
- 151 Himes RH. Interactions of the catharanthus (Vinca) alkaloids with tubulin and microtubules. *Pharmacol Ther* 1991; **51**:257–267.

- 152 Jordan MA, Thrower D, Wilson L. Mechanism of Inhibition of Cell Proliferation by Vinca Alkaloids. *Cancer Res* 1991; **51**:2212–2222.
- 153 Réz G, Csák J, Fellingner E, László L, Kovács AL, Oliva O, *et al.* Time course of vinblastine-induced autophagocytosis and changes in the endoplasmic reticulum in murine pancreatic acinar cells: a morphometric and biochemical study. *Eur J Cell Biol* 1996; **71**:341–350.
- 154 Klionsky DJ, Abdalla FC, Abeliovich H, Abraham RT, Acevedo-Arozena A, Adeli K, *et al.* Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy. *Autophagy* 2012; **8**:445–544.
- 155 Matteoni R, Kreis TE. Translocation and clustering of endosomes and lysosomes depends on microtubules. *J Cell Biol* 1987; **105**:1253–1265.
- 156 Correia JJ, Lobert S. Physicochemical aspects of tubulin-interacting antimetabolic drugs. *Curr Pharm Des* 2001; **7**:1213–1228.
- 157 Wang TH, Wang HS, Ichijo H, Giannakakou P, Foster JS, Fojo T, *et al.* Microtubule-interfering agents activate c-Jun N-terminal kinase/stress-activated protein kinase through both Ras and apoptosis signal-regulating kinase pathways. *J Biol Chem* 1998; **273**:4928–4936.
- 158 Toh HC, Sun L, Koh CH, Aw SE. Vinorelbine induces apoptosis and caspase-3 (CPP32) expression in leukemia and lymphoma cells: a comparison with vincristine. *Leuk Lymphoma* 1998; **31**:195–208.
- 159 Wang LG, Liu XM, Kreis W, Budman DR. The effect of antimicrotubule agents on signal transduction pathways of apoptosis: a review. *Cancer Chemother Pharmacol* 1999; **44**:355–361.
- 160 Poruchynsky MS, Wang EE, Rudin CM, Blagosklonny MV, Fojo T. Bcl-xL is phosphorylated in malignant cells following microtubule disruption. *Cancer Res* 1998; **58**:3331–3338.
- 161 Fan S, Cherney B, Reinhold W, Rucker K, O'Connor PM. Disruption of p53 function in immortalized human cells does not affect survival or apoptosis after taxol or vincristine treatment. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res* 1998; **4**:1047–1054.
- 162 Shtil AA, Mandlekar S, Yu R, Walter RJ, Hagen K, Tan TH, *et al.* Differential regulation of mitogen-activated protein kinases by microtubule-binding agents in human breast cancer cells. *Oncogene* 1999; **18**:377–384.
- 163 Groth-Pedersen L, Ostensfeld MS, Høyer-Hansen M, Nylandsted J, Jäättelä M. Vincristine induces dramatic lysosomal changes and sensitizes cancer cells to lysosome-destabilizing siramesine. *Cancer Res* 2007; **67**:2217–2225.
- 164 Ouar Z, Lacave R, Bens M, Vandewalle A. Mechanisms of altered sequestration and efflux of chemotherapeutic drugs by multidrug-resistant cells. *Cell Biol Toxicol* 1999; **15**:91–100.
- 165 Drukman S, Kavallaris M. Microtubule alterations and resistance to tubulin-binding agents (review). *Int J Oncol* 2002; **21**:621–628.
- 166 Beck D, Niessner H, Smalley KSM, Flaherty K, Paraiso KHT, Busch C, *et al.* Vemurafenib potently induces endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis in BRAFV600E melanoma cells. *Sci Signal* 2013; **6**:ra7.
- 167 Sharma A, Trivedi NR, Zimmerman MA, Tuveson DA, Smith CD, Robertson GP. Mutant V599EB-Raf regulates growth and vascular development of malignant melanoma tumors. *Cancer Res* 2005; **65**:2412–2421.
- 168 Goodall ML, Wang T, Martin KR, Kortus MG, Kauffman AL, Trent JM, *et al.* Development of potent autophagy inhibitors that sensitize oncogenic BRAF V600E mutant melanoma tumor cells to vemurafenib. *Autophagy* 2014; **10**:1120–1136.
- 169 Palca J. Interest in the human genome project reaches new heights. *Nature* 1987; **325**:651.

- 170 Lewin R. National Academy looks at human genome project, sees progress. *Science* 1987; **235**:747–748.
- 171 Mapping the human genome. *Lancet* 1987; **1**:1121–1122.
- 172 McKusick VA, Ruddle FH. Toward a complete map of the human genome. *Genomics* 1987; **1**:103–106.
- 173 Lederberg J, McCray A. 'Ome Sweet 'Omics - A Genealogical Treasury of Words. *Geneal Treas Words Sci* 2001; **15**:8.
- 174 OMICS-ETHICS. <http://www.omics-ethics.org/fr/definition-sciences-omiques> (accessed 18 Oct2014).
- 175 Nicholson JK. Reviewers peering from under a pile of “omics” data. *Nature* 2006; **440**:992.
- 176 Yang Y, Adelstein SJ, Kassis AI. Integrated bioinformatics analysis for cancer target identification. *Methods Mol Biol Clifton NJ* 2011; **719**:527–545.
- 177 Young DB. TB research; entering the post-genomic era. *Mol Med Today* 1997; **3**:6–7.
- 178 Wilke RA, Mareedu RK, Moore JH. The Pathway Less Traveled: Moving from Candidate Genes to Candidate Pathways in the Analysis of Genome-Wide Data from Large Scale Pharmacogenetic Association Studies. *Curr Pharmacogenomics Pers Med* 2008; **6**:150–159.
- 179 Chang F, Li MM. Clinical application of amplicon-based next-generation sequencing in cancer. *Cancer Genet* 2013; **206**:413–419.
- 180 Daber R, Sukhadia S, Morrissette JJD. Understanding the limitations of next generation sequencing informatics, an approach to clinical pipeline validation using artificial data sets. *Cancer Genet* 2013; **206**:441–448.
- 181 Ulahannan D, Kovac MB, Mulholland PJ, Cazier J-B, Tomlinson I. Technical and implementation issues in using next-generation sequencing of cancers in clinical practice. *Br J Cancer* 2013; **109**:827–835.
- 182 Zhu Q, Miecznikowski JC, Halfon MS. Preferred analysis methods for Affymetrix GeneChips. II. An expanded, balanced, wholly-defined spike-in dataset. *BMC Bioinformatics* 2010; **11**:285.
- 183 Irizarry RA, Hobbs B, Collin F, Beazer-Barclay YD, Antonellis KJ, Scherf U, *et al.* Exploration, normalization, and summaries of high density oligonucleotide array probe level data. *Biostat Oxf Engl* 2003; **4**:249–264.
- 184 Stoeckert CJ, Causton HC, Ball CA. Microarray databases: standards and ontologies. *Nat Genet* 2002; **32**:469–473.
- 185 Workman P, Clarke PA, Al-Lazikani B. Personalized Medicine: Patient-Predictive Panel Power. *Cancer Cell* 2012; **21**:455–458.
- 186 Lander ES, Linton LM, Birren B, Nusbaum C, Zody MC, Baldwin J, *et al.* Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 2001; **409**:860–921.
- 187 Venter JC, Adams MD, Myers EW, Li PW, Mural RJ, Sutton GG, *et al.* The Sequence of the Human Genome. *Science* 2001; **291**:1304–1351.
- 188 Watson JD, Crick FHC. Molecular Structure of Nucleic Acids: A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid. *Nature* 1953; **171**:737–738.
- 189 Vogelstein B, Papadopoulos N, Velculescu VE, Zhou S, Diaz LA, Kinzler KW. Cancer Genome Landscapes. *Science* 2013; **339**:1546–1558.
- 190 Garraway LA, Lander ES. Lessons from the Cancer Genome. *Cell* 2013; **153**:17–37.
- 191 Weinstein IB. Addiction to Oncogenes--the Achilles Heal of Cancer. *Science* 2002;

297:63–64.

- 192 Clarke PA, te Poele R, Wooster R, Workman P. Gene expression microarray analysis in cancer biology, pharmacology, and drug development: progress and potential. *Biochem Pharmacol* 2001; **62**:1311–1336.
- 193 Clarke PA, Poele R te, Workman P. Gene expression microarray technologies in the development of new therapeutic agents. *Eur J Cancer* 2004; **40**:2560–2591.
- 194 Druker BJ. STI571 (Gleevec) as a paradigm for cancer therapy. *Trends Mol Med* 2002; **8**:S14–18.
- 195 Slamon D, Pegram M. Rationale for trastuzumab (Herceptin) in adjuvant breast cancer trials. *Semin Oncol* 2001; **28**, **Supplement 3**:13–19.
- 196 Ravnan MC, Matalka MS. Vemurafenib in patients with BRAF V600E mutation-positive advanced melanoma. *Clin Ther* 2012; **34**:1474–1486.
- 197 Agwa E, Ma PC. Overview of various techniques/platforms with critical evaluation of each. *Curr Treat Options Oncol* 2013; **14**:623–633.
- 198 Braun-Falco M, Schempp W, Weyers W. Molecular diagnosis in dermatopathology: What makes sense, and what doesn't. *Exp Dermatol* 2009; **18**:12–23.
- 199 Wang W, Marsh S, Cassidy J, McLeod HL. Pharmacogenomic dissection of resistance to thymidylate synthase inhibitors. *Cancer Res* 2001; **61**:5505–5510.
- 200 Lamendola DE, Duan Z, Yusuf RZ, Seiden MV. Molecular description of evolving paclitaxel resistance in the SKOV-3 human ovarian carcinoma cell line. *Cancer Res* 2003; **63**:2200–2205.
- 201 Reinhold WC, Kouros-Mehr H, Kohn KW, Maunakea AK, Lababidi S, Roschke A, *et al.* Apoptotic susceptibility of cancer cells selected for camptothecin resistance: gene expression profiling, functional analysis, and molecular interaction mapping. *Cancer Res* 2003; **63**:1000–1011.
- 202 Watts GS, Futscher BW, Isett R, Gleason-Guzman M, Kunkel MW, Salmon SE. cDNA microarray analysis of multidrug resistance: doxorubicin selection produces multiple defects in apoptosis signaling pathways. *J Pharmacol Exp Ther* 2001; **299**:434–441.
- 203 Southern EM. DNA Microarrays. In: *DNA Arrays*. Rampal JB (editor). . Humana Press; 2001. pp. 1–15.
- 204 Cheung VG, Morley M, Aguilar F, Massimi A, Kucherlapati R, Childs G. Making and reading microarrays. *Nat Genet* 1999; **21**:15–19.
- 205 SPOT YOUR GENES – AN OVERVIEW OF THE MICROARRAY | SCQ. <http://www.scq.ubc.ca/spot-your-genes-an-overview-of-the-microarray/> (accessed 29 Oct2014).
- 206 Lockhart DJ, Winzeler EA. Genomics, gene expression and DNA arrays. *Nature* 2000; **405**:827–836.
- 207 Staal FJT, van der Burg M, Wessels LFA, Barendregt BH, Baert MRM, van den Burg CMM, *et al.* DNA microarrays for comparison of gene expression profiles between diagnosis and relapse in precursor-B acute lymphoblastic leukemia: choice of technique and purification influence the identification of potential diagnostic markers. *Leukemia* 2003; **17**:1324–1332.
- 208 GeneChip® Human Genome U133 Plus 2.0 Array | Affymetrix. [http://www.affymetrix.com/catalog/131455/AFFY/Human-Genome-U133-Plus-2.0-Array#1\\_1](http://www.affymetrix.com/catalog/131455/AFFY/Human-Genome-U133-Plus-2.0-Array#1_1) (accessed 29 Oct2014).
- 209 Duggan DJ, Bittner M, Chen Y, Meltzer P, Trent JM. Expression profiling using cDNA microarrays. *Nat Genet* 1999; **21**:10–14.
- 210 Hegde P, Qi R, Abernathy K, Gay C, Dharap S, Gaspard R, *et al.* A concise guide to

- cDNA microarray analysis. *BioTechniques* 2000; **29**:548–550, 552–554, 556 passim.
- 211 Eisen MB, Brown PO. DNA arrays for analysis of gene expression. *Methods Enzymol* 1999; **303**:179–205.
- 212 Allison DB, Cui X, Page GP, Sabripour M. Microarray data analysis: from disarray to consolidation and consensus. *Nat Rev Genet* 2006; **7**:55–65.
- 213 Yang YH, Speed T. Design issues for cDNA microarray experiments. *Nat Rev Genet* 2002; **3**:579–588.
- 214 Churchill GA. Fundamentals of experimental design for cDNA microarrays. *Nat Genet* 2002; **32**:490–495.
- 215 Brooksbank C, Quackenbush J. Data Standards: A Call to Action. *OMICS J Integr Biol* 2006; **10**:94–99.
- 216 Brazma A, Hingamp P, Quackenbush J, Sherlock G, Spellman P, Stoeckert C, *et al.* Minimum information about a microarray experiment (MIAME)—toward standards for microarray data. *Nat Genet* 2001; **29**:365–371.
- 217 Quackenbush J. Microarray data normalization and transformation. *Nat Genet* 2002; **32 Suppl**:496–501.
- 218 Bittner M, Meltzer P, Trent J. Data analysis and integration: of steps and arrows. *Nat Genet* 1999; **22**:213–215.
- 219 Kerr G, Ruskin HJ, Crane M, Doolan P. Techniques for clustering gene expression data. *Comput Biol Med* 2008; **38**:283–293.
- 220 Eisen MB, Spellman PT, Brown PO, Botstein D. Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; **95**:14863–14868.
- 221 Young RA. Biomedical Discovery with DNA Arrays. *Cell* 2000; **102**:9–15.
- 222 Hoon MJL de, Imoto S, Nolan J, Miyano S. Open source clustering software. *Bioinformatics* 2004; **20**:1453–1454.
- 223 Jombart T, Devillard S, Balloux F. Discriminant analysis of principal components: a new method for the analysis of genetically structured populations. *BMC Genet* 2010; **11**:94.
- 224 Tamayo P, Slonim D, Mesirov J, Zhu Q, Kitareewan S, Dmitrovsky E, *et al.* Interpreting patterns of gene expression with self-organizing maps: methods and application to hematopoietic differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; **96**:2907–2912.
- 225 Golub TR, Slonim DK, Tamayo P, Huard C, Gaasenbeek M, Mesirov JP, *et al.* Molecular classification of cancer: class discovery and class prediction by gene expression monitoring. *Science* 1999; **286**:531–537.
- 226 Tusher VG, Tibshirani R, Chu G. Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; **98**:5116–5121.
- 227 Brown MP, Grundy WN, Lin D, Cristianini N, Sugnet CW, Furey TS, *et al.* Knowledge-based analysis of microarray gene expression data by using support vector machines. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; **97**:262–267.
- 228 Quackenbush J. Computational analysis of microarray data. *Nat Rev Genet* 2001; **2**:418–427.
- 229 Bassett DE, Eisen MB, Boguski MS. Gene expression informatics —it’s all in your mine. *Nat Genet* 1999; **21**:51–55.
- 230 Baldi P, Long AD. A Bayesian framework for the analysis of microarray expression data: regularized t -test and statistical inferences of gene changes. *Bioinforma Oxf Engl* 2001; **17**:509–519.

- 231 Martin DE, Demougin P, Hall MN, Bellis M. Rank Difference Analysis of Microarrays (RDAM), a novel approach to statistical analysis of microarray expression profiling data. *BMC Bioinformatics* 2004; **5**:148.
- 232 STRING: functional protein association networks. <http://string-db.org/> (accessed 31 Oct2014).
- 233 Brown PO, Botstein D. Exploring the new world of the genome with DNA microarrays. *Nat Genet* 1999; **21**:33–37.
- 234 Maglott D, Ostell J, Pruitt KD, Tatusova T. Entrez Gene: gene-centered information at NCBI. *Nucleic Acids Res* 2005; **33**:D54–58.
- 235 Gene Ontology Consortium | Gene Ontology Consortium. <http://geneontology.org/> (accessed 31 Oct2014).
- 236 Bassett DE, Eisen MB, Boguski MS. Gene expression informatics —it’s all in your mine. *Nat Genet* 1999; **21**:51–55.
- 237 Hung J-H, Yang T-H, Hu Z, Weng Z, DeLisi C. Gene set enrichment analysis: performance evaluation and usage guidelines. *Brief Bioinform* 2012; **13**:281–291.
- 238 Al-Shahrour F, Díaz-Uriarte R, Dopazo J. FatiGO: a web tool for finding significant associations of Gene Ontology terms with groups of genes. *Bioinforma Oxf Engl* 2004; **20**:578–580.
- 239 Bauer S, Gagneur J, Robinson PN. GOing Bayesian: model-based gene set analysis of genome-scale data. *Nucleic Acids Res* 2010; **38**:3523–3532.
- 240 Bauer S, Grossmann S, Vingron M, Robinson PN. Ontologizer 2.0--a multifunctional tool for GO term enrichment analysis and data exploration. *Bioinforma Oxf Engl* 2008; **24**:1650–1651.
- 241 Huang DW, Sherman BT, Lempicki RA. Bioinformatics enrichment tools: paths toward the comprehensive functional analysis of large gene lists. *Nucleic Acids Res* 2009; **37**:1–13.
- 242 Hornberg JJ, Bruggeman FJ, Westerhoff HV, Lankelma J. Cancer: a Systems Biology disease. *Biosystems* 2006; **83**:81–90.
- 243 Developmental Therapeutics Program NCI/NIH. <http://dtp.nci.nih.gov/> (accessed 31 Oct2014).
- 244 Broad Institute of MIT and Harvard. <http://www.broadinstitute.org/> (accessed 31 Oct2014).
- 245 Jordan MA, Thrower D, Wilson L. Mechanism of inhibition of cell proliferation by Vinca alkaloids. *Cancer Res* 1991; **51**:2212–2222.
- 246 Jordan MA. Mechanism of action of antitumor drugs that interact with microtubules and tubulin. *Curr Med Chem Anti-Cancer Agents* 2002; **2**:1–17.
- 247 Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; **193**:265–275.
- 248 Levati L, Ruffini F, Muzi A, Umezawa K, Graziani G, D’Atri S, *et al.* Placenta growth factor induces melanoma resistance to temozolomide through a mechanism that involves the activation of the transcription factor NF- $\kappa$ B. *Int J Oncol* 2011; **38**:241–247.
- 249 Schitteck B, Psenner K, Sauer B, Meier F, Iftner T, Garbe C. The increased expression of Y box-binding protein 1 in melanoma stimulates proliferation and tumor invasion, antagonizes apoptosis and enhances chemoresistance. *Int J Cancer J Int Cancer* 2007; **120**:2110–2118.
- 250 Greten FR, Karin M. The IKK/NF- $\kappa$ B activation pathway—a target for prevention and treatment of cancer. *Cancer Lett* 2004; **206**:193–199.
- 251 Okazaki I, Nabeshima K. Introduction: MMPs, ADAMs/ADAMTSs research products to

- achieve big dream. *Anticancer Agents Med Chem* 2012; **12**:688–706.
- 252 Frank A, David V, Aurelie T-R, Florent G, William H, Philippe B. Regulation of MMPs during melanoma progression: from genetic to epigenetic. *Anticancer Agents Med Chem* 2012; **12**:773–782.
- 253 Mimeault M, Hauke R, Mehta PP, Batra SK. Recent advances in cancer stem/progenitor cell research: therapeutic implications for overcoming resistance to the most aggressive cancers. *J Cell Mol Med* 2007; **11**:981–1011.
- 254 Puyo S, Le Morvan V, Robert J. Impact of EGFR gene polymorphisms on anticancer drug cytotoxicity in vitro. *Mol Diagn Ther* 2008; **12**:225–234.
- 255 Li F, Sethi G. Targeting transcription factor NF-kappaB to overcome chemoresistance and radioresistance in cancer therapy. *Biochim Biophys Acta* 2010; **1805**:167–180.
- 256 Giri DK, Pantazis P, Aggarwal BB. Cellular resistance to vincristine suppresses NF-kappa B activation and apoptosis but enhances c-Jun-NH2-terminal protein kinase activation by tumor necrosis. *Apoptosis Int J Program Cell Death* 1999; **4**:291–301.
- 257 Wang W, Luo H. [Reversal of chemoresistance to vincristine in gastric cancer cells by NF-kappaB inhibitor]. *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi* 2005; **27**:335–338.
- 258 Al-Katib A, Arnold AA, Aboukameel A, Sosin A, Smith P, Mohamed AN, *et al.* I-kappa-kinase-2 (IKK-2) inhibition potentiates vincristine cytotoxicity in non-Hodgkin's lymphoma. *Mol Cancer* 2010; **9**:228.
- 259 Kim J-H, Yoo H-I, Kang HS, Ro J, Yoon S. Salinomycin sensitizes antimitotic drugs-treated cancer cells by increasing apoptosis via the prevention of G2 arrest. *Biochem Biophys Res Commun* 2012; **418**:98–103.
- 260 Hirose M, Kuroda Y. p53 may mediate the mdr-1 expression via the WT1 gene in human vincristine-resistant leukemia/lymphoma cell lines. *Cancer Lett* 1998; **129**:165–171.
- 261 Backen AC, Cole CL, Lau SC, Clamp AR, McVey R, Gallagher JT, *et al.* Heparan sulphate synthetic and editing enzymes in ovarian cancer. *Br J Cancer* 2007; **96**:1544–1548.
- 262 Zimmerer RM, Korn P, Demougin P, Kampmann A, Kokemüller H, Eckardt AM, *et al.* Functional features of cancer stem cells in melanoma cell lines. *Cancer Cell Int* 2013; **13**:78.
- 263 Ellison G, Klinowska T, Westwood RFR, Docter E, French T, Fox JC. Further evidence to support the melanocytic origin of MDA-MB-435. *Mol Pathol MP* 2002; **55**:294–299.
- 264 Garraway LA, Widlund HR, Rubin MA, Getz G, Berger AJ, Ramaswamy S, *et al.* Integrative genomic analyses identify MITF as a lineage survival oncogene amplified in malignant melanoma. *Nature* 2005; **436**:117–122.
- 265 Ross DT, Scherf U, Eisen MB, Perou CM, Rees C, Spellman P, *et al.* Systematic variation in gene expression patterns in human cancer cell lines. *Nat Genet* 2000; **24**:227–235.
- 266 Tsuji A, Sakurai K, Kiyokage E, Yamazaki T, Koide S, Toida K, *et al.* Secretory proprotein convertases PACE4 and PC6A are heparin-binding proteins which are localized in the extracellular matrix. Potential role of PACE4 in the activation of proproteins in the extracellular matrix. *Biochim Biophys Acta* 2003; **1645**:95–104.
- 267 Liebmann C. Regulation of MAP kinase activity by peptide receptor signalling pathway: Paradigms of multiplicity. *Cell Signal* 2001; **13**:777–785.
- 268 Shapiro P. Ras-MAP kinase signaling pathways and control of cell proliferation: relevance to cancer therapy. *Crit Rev Clin Lab Sci* 2002; **39**:285–330.
- 269 Tan B, Anaka M, Deb S, Freyer C, Ebert LM, Chueh AC, *et al.* FOXP3 over-expression inhibits melanoma tumorigenesis via effects on proliferation and apoptosis. *Oncotarget* 2014; **5**:264–276.

- 270 Shoemaker RH. The NCI60 human tumour cell line anticancer drug screen. *Nat Rev Cancer* 2006; **6**:813–823.
- 271 Klionsky DJ, Abdalla FC, Abeliovich H, Abraham RT, Acevedo-Arozena A, Adeli K, *et al.* Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy. *Autophagy* 2012; **8**:445–544.
- 272 Kim J-H, Hong S-K, Wu P-K, Richards AL, Jackson WT, Park J-I. Raf/MEK/ERK can regulate cellular levels of LC3B and SQSTM1/p62 at expression levels. *Exp Cell Res* 2014; **327**:340–352.
- 273 Rzymiski T, Milani M, Pike L, Buffa F, Mellor HR, Winchester L, *et al.* Regulation of autophagy by ATF4 in response to severe hypoxia. *Oncogene* 2010; **29**:4424–4435.
- 274 Giard DJ, Aaronson SA, Todaro GJ, Arnstein P, Kersey JH, Dosik H, *et al.* In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors. *J Natl Cancer Inst* 1973; **51**:1417–1423.
- 275 Mackiewicz J, Mackiewicz A. Recent advances in melanoma treatment - American Society of Clinical Oncology (ASCO) 2012 perspective. *Contemp Oncol Pozn Pol* 2012; **16**:197–200.
- 276 Attaoua C, Vincent L-A, Jaoued AA, Hadj-Kaddour K, Baï Q, Vos JD, *et al.* Differential involvement of glutathione S-transferase mu 1 and multidrug resistance protein 1 in melanoma acquired resistance to vinca alkaloids. *Fundam Clin Pharmacol* Published Online First: 6 October 2014. doi:10.1111/fcp.12093
- 277 Groth-Pedersen L, Ostensfeld MS, Høyer-Hansen M, Nylandsted J, Jäättelä M. Vincristine induces dramatic lysosomal changes and sensitizes cancer cells to lysosome-destabilizing siramesine. *Cancer Res* 2007; **67**:2217–2225.
- 278 Boya P, Kroemer G. Lysosomal membrane permeabilization in cell death. *Oncogene* 2008; **27**:6434–6451.
- 279 Kroemer G, Jäättelä M. Lysosomes and autophagy in cell death control. *Nat Rev Cancer* 2005; **5**:886–897.
- 280 Bröker LE, Huisman C, Span SW, Rodriguez JA, Kruyt FAE, Giaccone G. Cathepsin B mediates caspase-independent cell death induced by microtubule stabilizing agents in non-small cell lung cancer cells. *Cancer Res* 2004; **64**:27–30.
- 281 Berger E, Haller D. Structure–function analysis of the tertiary bile acid TUDCA for the resolution of endoplasmic reticulum stress in intestinal epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2011; **409**:610–615.
- 282 Malo A, Krüger B, Seyhun E, Schäfer C, Hoffmann RT, Göke B, *et al.* Tauroursodeoxycholic acid reduces endoplasmic reticulum stress, trypsin activation, and acinar cell apoptosis while increasing secretion in rat pancreatic acini. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2010; **299**:G877–886.
- 283 Mihaylova MM, Shaw RJ. The AMP-activated protein kinase (AMPK) signaling pathway coordinates cell growth, autophagy, & metabolism. *Nat Cell Biol* 2011; **13**:1016–1023.



## ETUDE DES MECANISMES MOLECULAIRES DE CHIMIORESISTANCE DU MELANOME MALIN AUX VINCA-ALCALOÏDES ET AUX INHIBITEURS DE MAP KINASES PAR UNE APPROCHE TRANSCRIPTOMIQUE

Le mélanome malin (MM) métastatique, un des cancers les plus intrinsèquement résistants aux agents anti-cancéreux et présentant une forte capacité à développer des résistances acquises, constitue un défi thérapeutique. La meilleure compréhension des mécanismes impliqués dans cette chimiorésistance permettrait d'identifier des cibles thérapeutiques ou de guider le choix du traitement pour une meilleure efficacité. Les travaux réalisés durant cette thèse se sont focalisés sur l'identification de nouveaux déterminants moléculaires de la résistance acquise du MM vis-à-vis (i) des vinca-alcaloïdes (VAs, chimiothérapie classique), (ii) des inhibiteurs de MAP kinases (iMAPK, thérapie ciblée). Pour la première étude, un modèle de lignées cellulaires de MM résistantes aux VAs (CAL1R-VAs) a été établi (exposition continue, 12 mois, de la lignée parentale CAL1-wt à la VCR, la VDS ou la VRB : CAL1R-VCR, CAL1R-VDS et CAL1R-VRB respectivement). La comparaison des profils d'expression a permis de distinguer deux groupes de lignées cellulaires (CAL1R-VCR et CAL1R-VDS ; CAL1R-VRB et CAL1-wt), suggérant une résistance différentielle du MM aux VAs : d'une part à la VCR et à la VDS, d'autre part à la VRB. L'analyse des données transcriptomiques par une démarche associant successivement trois méthodes - RMA (Robust Multi-array Average), RDAM (Rank Difference Analysis of Microarrays) et MGSA (model-based gene set analysis) – a permis d'identifier des fonctions cellulaires altérées lors de la sélection des lignées CAL1R-VAs, et donc potentiellement à l'origine de la résistance de ces lignées. Des analyses fonctionnelles *in vitro* ont permis de confirmer l'implication des lysosomes et de la réponse au stress du réticulum endoplasmique (RE) dans la résistance différentielle des cellules CAL1 aux VAs. Ainsi, une sous-expression des cathepsines B et L (bioinformatique) et une réduction du volume du compartiment acide (*in vitro*) ont été observées spécifiquement dans le premier groupe de lignées (CAL1R-VCR et CAL1R-VDS), suggérant une sensibilité réduite de ces lignées à la voie lysosomiale de l'apoptose. Par ailleurs, l'inhibition de la voie de réponse au stress du RE par l'acide tauroursodésoxycholique (TUDCA) a induit une sensibilisation différentielle de l'ensemble des lignées CAL1 aux VAs, suggérant l'implication de cette voie dans la résistance différentielle primaire et acquise aux VAs. De plus, l'inhibition de la réponse au stress du RE a induit une sensibilisation d'une autre lignée cellulaire de MM, MDA-MB-435, à la VCR et à la VDS mais pas à la VRB. Ainsi, la voie de réponse au stress du RE semble impliquée dans la résistance différentielle du MM aux VAs. Ce mécanisme pourrait mettre en jeu l'autophagie, dont le flux était significativement augmenté dans le premier groupe de lignées. La même démarche d'analyse transcriptomique a été appliquée pour l'étude des mécanismes moléculaires de résistance acquise du MM aux iMAPK. Des lignées cellulaires de MM résistantes aux trois iMAPK majeurs ont été établies par exposition continue de la lignée parentale A375-wt, portant la mutation activatrice BRAF V600E, au vémurafenib (VMF, inhibiteur de BRAF), dabrafenib (DBF, inhibiteur de BRAF), et tramétinib (TMT, inhibiteur de MEK): A375R-VMF, A375R-DBF et A375R-TMT respectivement. La comparaison des profils transcriptomiques n'a pas permis de regrouper les lignées résistantes entre elles, suggérant que les mécanismes de résistance au VMF, au DBF ou au TMT sont différents. Ces mécanismes ne seraient donc communs ni à la voie ciblée (MAPK), ni à la cible moléculaire (BRAF ou MEK). L'identification des fonctions cellulaires altérées procurera un rationnel pour l'étude mécanistique de nouveaux déterminants de la résistance du MM aux iMAPK.

**Mots clés :** Mélanome, résistance, chimiothérapie, analyse transcriptomique, vinca-alcaloïdes, thérapie ciblée

## TRANSCRIPTOMIC STUDY OF MOLECULAR MECHANISMS OF MELANOMA CHEMORESISTANCE TO VINCA-ALKALOIDS AND KINASE INHIBITORS

Malignant melanoma (MM), one of the most intrinsically resistant cancers to anticancer agents and presenting a strong ability to develop acquired resistance, remains a therapeutic challenge. A better understanding of the mechanisms involved in MM chemoresistance should provide therapeutic targets or guide therapeutic choice for improved efficiency. This thesis has focused on the identification of new molecular determinants of MM acquired resistance to (i) vinca alkaloids (VAs, conventional chemotherapy), and to (ii) MAP kinases inhibitors (MAPKi, targeted therapy). In the first study, MM cell lines resistant to VAs (CAL1R-VAs) were established (continuous exposure, 12 months, of CAL1-wt parental line to the VCR, VDS or VRB: CAL1R-VCR, CAL1R-VDS and CAL1R-VRB respectively). Comparison of expression patterns led to distinguish two groups of cell lines (CAL1R-VCR and CAL1R-VDS; CAL1R-VRB and CAL1-wt), suggesting a differential resistance of MM to VAs: one the one hand to VCR and VDS, on the other hand to VRB only. The analysis of transcriptome data by a process involving successively three methods - RMA (Robust Multi-array Average), RDAM (Rank Difference Analysis of Microarrays) and MGSA (model-based gene set analysis) – allowed the identification of functions altered during the resistant cell line selection, and therefore potentially involved in resistance mechanisms of these cell lines. *In vitro* functional analyzes confirmed the involvement of the lysosomes and of the response to endoplasmic reticulum (ER) stress (unfolded protein response, UPR) in the differential resistance of CAL1 cells to VAs. Thus, an under-expression of cathepsins B and L (bioinformatics), and a reduction of the acidic compartment volume (*in vitro*) were specifically observed in the first cell group (CAL1R-VCR and CAL1R-VDS), suggesting a reduced sensitivity of these lines to the lysosomal pathway of apoptosis. Furthermore, UPR inhibition using tauroursodeoxycholic acid (TUDCA) induced a differential sensitization of all the CAL1 lines to VAs, suggesting the involvement of this pathway in the primary and acquired differential resistance to VAs. Moreover, TUDCA-inhibition of UPR induced sensitization another MM cell line, MDA-MB-435, to VCR and VDS but not to VRB. Thus, a UPR up-regulation could be a significant mechanism of differential resistance of MM to VAs. This mechanism could involve autophagy, whose flow was significantly increased in the first group of lines. The same transcriptome analysis strategy was applied to study (ii) the molecular mechanisms of MM acquired resistance to MAPKi. MM cell lines resistant to the three major MAPKi were established by continuous exposure of the parental A375-wt line, carrying the activating mutation BRAF V600E, to vemurafenib (VMF, BRAF inhibitor), dabrafenib (DBF, BRAF inhibitor), or trametinib (TMT, MEK inhibitor): A375R-VMF, A375R-DBF and A375R-TMT, respectively. Comparison of transcriptomic profiles showed separate expression profiles, suggesting that the molecular mechanisms responsible for resistance to VMF, DBF or TMT were different. These mechanisms cannot therefore be common to the targeted pathway (MAPK) or to the molecular target (BRAF or MEK). The identification of the altered cellular functions will provide a rationale for mechanistic studies of new determinants of MM resistance to MAPKi.

**Key words:** melanoma, resistance, chemotherapy, microarray, vinca-alkaloids, targeted therapy

### DISCIPLINE

Oncologie & pharmaco-toxicologie cellulaire

### INTITULE ET ADRESSE DE L'U.F.R. OU DU LABORATOIRE :

Institut des biomolécules Max Mousseron (IBMM), Equipe F16  
Laboratoire de toxicologie du médicament, UFR des sciences pharmaceutiques et biologiques, Université de Montpellier  
15 avenue Charles Flahault, BP14491, 34093 Montpellier Cedex 05