

UNIVERSITE PARIS XIII –SORBONNE PARIS NORD

École doctorale Sciences, Technologies, Santé Galilée

**Prominine 2 : biomarqueur du mélanome métastatique
et nouvelle cible thérapeutique**

THÈSE DE DOCTORAT
Présentée par

Justine PARIS

INSERM UMRS 942

pour l'obtention du grade de DOCTEUR
Discipline : Sciences de la Vie et de la Santé

Soutenue le 16 novembre 2022 devant le jury d'examen constitué de :

Pr BOUSQUET Guilhem, Université Paris Sorbonne Nord, Président du jury
Dr REMY-TOURNEUR Léa, Université Paris Cité, Rapportrice
Dr ROGER Sébastien, Université de Tours, Rapporteur
Pr LEBBE Céleste, Université Paris Cité, Examinatrice
Pr FEUGEAS Jean-Paul, Université de Franche-Comté, Examineur
Dr LEBOEUF Christophe, Université Paris Cité, Directeur de thèse

Résumé

Malgré les immunothérapies qui ont amélioré le pronostic des patients présentant un mélanome métastatique, près de 50% des patients finissent par avoir une résistance au traitement. Le développement de nouvelles cibles thérapeutiques est donc essentiel. PROM2 a été identifié dans le mélanome métastatique humain comme un biomarqueur prédictif des métastases à distance, associées à une diminution de la survie.

Dans ce travail de thèse, nous avons pour objectif de valider PROM2 en tant que bio-cible pour le mélanome métastatique humain. Nous avons montré que la surexpression de PROM2 était liée *in vitro* et *in vivo* à un potentiel métastatique accru grâce à l'augmentation de l'expression des marqueurs de transition épithélio-mésenchymateuse et à la résistance à la ferroptose. En utilisant des oligonucléotides anti-sens ciblant *PROM2*, nous avons montré que nous pouvons diminuer l'expression de *PROM2*, conduisant à une diminution du potentiel d'invasion et de migration.

Nous avons également voulu savoir ces observations dans le mélanome étaient transposables à d'autres types de cancer. D'après nos premiers résultats dans le cancer du sein et dans le cancer du rein, il semble que ce soit le cas.

Nos résultats ouvrent la voie à d'autres études pour valider le traitement du mélanome métastatique, entre autres, en utilisant PROM2 comme bio-cible.

Abstract

Despite immunotherapies that improved patient's prognosis in human metastatic melanoma, almost 50% patient's eventually show resistance to treatment. The development of new therapeutic target is essential. Previously, PROM2 was identified in human metastatic melanoma as a biomarker predictive for distant metastases associated with decreased survival.

In this thesis work, we aimed to validate PROM2 as a bio-target for human metastatic melanoma. We showed that PROM2 overexpression was linked *in vitro* and *in vivo* to an increased metastatic potential through the increase of epithelia-mesenchymal transition marker expression and ferroptosis resistance. Using oligonucleotide anti-sense targeting *PROM2*, we showed that we can downregulate *PROM2* expression leading to a decreased invasion and migration potential.

We also wanted to find out whether these results in melanoma can be transposed to other types of cancer. Based on our initial results in breast and kidney cancer, this appears to be the case.

Our results open the way for further studies to validate the treatment of human metastatic melanoma, among others, using PROM2 as a bio-target.

Remerciement

Je tiens tout d'abord à remercier le Professeur Guilhem Bousquet, qui m'a accueillie au sein de l'unité de recherche UMR_S942 de l'Inserm. Je le remercie particulièrement pour m'avoir fait confiance et m'avoir confié ce projet. Je le remercie pour tout le temps qu'il m'a consacré, ce fut un réel plaisir de travailler avec lui. Enfin, je le remercie de me faire l'honneur d'être le Président du Jury de cette thèse.

Je remercie le Docteur Christophe Lebœuf, mon directeur de thèse, pour sa bienveillance et pour avoir travaillé à mes côtés ces trois dernières années.

Je remercie vivement le Docteur Léa Remy-Tourneur et le Docteur Sébastien Roger qui ont bien voulu accepter d'être les rapporteurs de cette thèse.

Je remercie chaleureusement le Professeur Céleste Lebbé et le Professeur Jean-Paul Feugeas de faire partie de mon jury de thèse.

Je remercie également mes collègues de laboratoire pour leur aide précieuse : Géraldine, Guillaume, Morad, Eurydice, Diaddin, Mélanie et Annie.

Merci à mes proches : mes parents, mon frère, ma famille ainsi que mes amis pour leur soutien.

Table des matières

Introduction	12
<i>Le mélanome</i>	12
1) Epidémiologie	13
2) Facteurs de risque	15
a. Les facteurs de risques environnementaux	16
b. Les nævus pigmentés	18
c. Le phénotype clair	19
d. Les antécédents personnels et familiaux.....	20
3) Diagnostic.....	21
4) Classification du mélanome cutané.....	22
5) Pronostic du mélanome	25
6) Traitement du mélanome cutané métastatique	26
a. Les chimiothérapies	26
b. Les immunothérapies	27
c. Thérapies ciblées	28
7) Mécanismes de résistance aux traitements du mélanome	29
a. La résistance intrinsèque (primaire)	29
b. La résistance acquise.....	30
<i>La maladie métastatique</i>	32
1) Formation d'une cellule cancéreuse métastatique	32
2) La niche pré-métastatique	32
3) La transition épithélio-mésenchymateuse	33
4) Intravasation et circulation des cellules tumorales	37
5) Résistance à la mort cellulaire : la ferroptose.....	39
<i>Prominine-2, nouvelle cible thérapeutique potentielle</i>	44
1) Structure de Prominine 2	44
2) La famille des prominines	44
3) Expression physiologique de PROM2.....	45
4) Rôle physiologique de PROM2 (Figure 14).....	45
a. Inhibition de l'endocytose cavéolaire	46
b. Résistance à la ferroptose.....	46
5) Expression anormale de PROM2 dans les cancers	47
6) Fonction biologique dans la carcinogénèse	49
a. Résistance aux traitements cancéreux.....	49
b. Biomarqueur de risque métastatique et de survie diminuée dans le mélanome.....	49
<i>Objectifs et stratégie envisagée</i>	52
Matériel et méthodes	54
<i>Échantillons humains</i>	54
<i>Lignées cellulaires de mélanome humain</i>	54
<i>Modulation de l'expression de PROM2 dans des lignées cellulaires de mélanome</i>	55
1) Etablissement de lignées de mélanome knock-out pour <i>PROM2</i>	55
2) Etablissement de lignées de mélanome surexprimant <i>PROM2</i>	55
3) Validation de la modulation de l'expression de <i>PROM2</i> dans les lignées de mélanomes	56

<i>Etude des caractéristiques des cellules</i>	56
1) Test de prolifération	56
2) Test de migration	57
3) Test d'invasion.....	57
a. Lignées cellulaires.....	57
b. Sphéroïdes formés à partir des lignées cellulaires.....	57
<i>Quantification de l'expression génique</i>	58
1) Q-RT-PCR.....	58
2) Digital Droplet PCR.....	59
a. Microdissection laser.....	59
b. ddPCR	59
<i>Quantification protéique</i>	60
1) Immunohistochimie.....	60
2) Western Blot	60
<i>Implication de PROM2 dans la ferroptose</i>	61
1) Test de viabilité.....	61
2) Quantification du fer ferreux (Fe ²⁺).....	62
3) Détection du Fe ²⁺ dans les sphéroïdes.....	62
4) Quantification de la peroxydation lipidique	62
<i>Modèles murins</i>	63
1) Xénogreffe ectopiques dérivées de mélanomes humains	63
2) Xénogreffe ectopiques dérivée de cellules de mélanome	64
3) Modèles murins métastatiques de cellules de mélanome	64
4) Boucle d'enrichissement de PROM2.....	64
5) Autorisations éthiques réglementaires	65
<i>Synthèse d'oligonucléotides anti-sens (ASO) anti-PROM2</i>	66
<i>Analyses statistiques</i>	67
Résultats	68
<i>Le niveau d'expression de PROM2 n'a aucun impact sur la prolifération du mélanome</i>	68
1) Modulation du niveau d'expression de <i>PROM2</i>	68
2) Impact de PROM2 sur la prolifération <i>in vitro</i>	70
3) Impact de PROM2 sur la prolifération <i>in vivo</i>	71
a. Xénogreffes de lignées cellulaires de mélanome en sous-cutanée.....	72
b. Modèles de PDX	73
<i>La surexpression de PROM2 est associée à un phénotype de transition épithélio-mésenchymateuse in vitro</i>	74
1) PROM2 promeut l'invasion et la migration <i>in vitro</i>	74
2) PROM2 induit un phénotype de transition épithélio-mésenchymateuse <i>in vitro</i>	75
3) Modèle 3D de sphéroïdes <i>in vitro</i>	77
<i>La surexpression de PROM2 dans les cellules est associée à un potentiel métastatique accru in vivo, liée à un phénotype épithélio-mésenchymateux</i>	79
1) PROM2 augmente le potentiel métastatique <i>in vivo</i>	79
2) PROM2 induit une augmentation des marqueurs de transition épithélio-mésenchymateuse <i>in vivo</i>	81
a. Modèles de lignées cellulaires.....	81

b. Modèles de PDX	85
<i>La surexpression de PROM2 est associée à une résistance à la ferroptose in vitro et in vivo ...</i>	88
1) Quantification du Fer dans les lignées cellulaires de mélanome <i>in vitro</i>	88
2) Modèles 3D de sphéroïdes	91
3) Modèles de PDX.....	92
<i>PROM2 est impliqué dans une boucle physiopathologique</i>	93
<i>Ciblage de PROM2 avec un oligonucléotide anti-sens pour prévenir les métastases</i>	96
1) Expression de PROM2 dans les tissus sains humains.....	96
2) Le traitement avec des oligonucléotides anti-sens ciblant <i>PROM2</i> diminue le niveau de <i>PROM2</i> dans les cellules de mélanome.....	98
Discussion.....	103
Perspectives.....	108
<i>Traitement par oligonucléotides anti-sens</i>	108
<i>Couplage avec des nanoparticules.....</i>	108
<i>Confirmation des résultats chez les patients.....</i>	108
<i>Perspectives dans les autres cancers</i>	109
Bibliographie.....	111

Table des figures

Figure 1 : Développement du mélanome	12
Figure 2 : Taux d'incidence et de mortalité du mélanome cutané dans le monde en 2020.	13
Figure 3 : Taux d'incidence et de mortalité du mélanome par continent en 2020.	14
Figure 4 : Schéma des différences cliniques, histo-pathologiques et moléculaires en fonction du sous-type de mélanome sur peau photoexposée.	17
Figure 5 : Critères ABCDE pour examiner une lésion pigmentaire.	22
Figure 6 : Pronostic associé à l'épaisseur des mélanomes.	25
Figure 7 : Estimation du taux de survie à 5 ans selon le stade TNM des patients atteints de mélanome cutané.	26
Figure 8 : Voie de signalisation MAPK et ses inhibiteurs.....	29
Figure 9 : Plasticité de la transition épithélio-mésenchymateuse.....	35
Figure 10 : La transition épithélio-mésenchymateuse dans le processus métastatique d'une cellule cancéreuse	37
Figure 11: Migration collective de cellules de la tumeur primaire.....	38
Figure 12 : Voie de signalisation de la ferroptose.....	43
Figure 13 : Schéma de la protéine membranaire pentaspan PROM2.....	44
Figure 14 : Rôle physiologique de PROM2 dans l'endocytose cavéolaire et la ferroptose.....	47
Figure 15 : Courbe de survie de patients présentant un mélanome métastatique avec ou non des métastases cérébrales.	50
Figure 16 : Expression en ARN de PROM2 dans les ganglions lymphatiques	51
Figure 17: Score immunohistochimique de PROM2 dans les ganglions lymphatiques métastastiques de mélanome	51
Figure 18 : Courbes de survie des patients.....	52
Figure 19 : Schéma du protocole expérimental de la boucle d'enrichissement PROM2	65
Figure 20 : Niveaux d'expression en ARN de PROM2	68
Figure 21: Niveaux d'expression en ARN de PROM2	69
Figure 22 : Immunofluorescence PROM2 des lignées cellulaires de mélanome.....	70
Figure 23 : Taux de prolifération in vitro des lignées cellulaires.....	71
Figure 24 : Croissance tumorale in vivo après xénogreffes	72
Figure 25 : Niveaux d'expression de PROM2.....	73
Figure 26 : Corrélation in vivo entre la prolifération et l'expression en ARN de PROM2.	74
Figure 27 : Invasion et migration des lignées cellulaires.....	75
Figure 28 : Niveaux d'expression en ARN d'un marqueur épithélial	76
Figure 29 : Western Blot des lignées cellulaires	77
Figure 30 : Images de l'ensemencement, de la formation et de l'expansion.....	78
Figure 31 : Coloration hématoxyline-éosine (HE) de métastases cardiaques.....	80
Figure 32 : Expression en ARNm des marqueurs de transition épithélio-mésenchymateuse	82
Figure 33 : Illustration de la microdissection laser d'une métastase pulmonaire.....	83
Figure 34 : Expression en ARN des cellules tumorales	84
Figure 35 : Immunomarquage ZEB1 et SNAI des cellules tumorales xénogreffées.....	85
Figure 36 : Nombre moyen de métastases dans les cinq modèles de xénogreffes	85
Figure 37 : Niveau d'expression en ARN du marqueur épithélial.....	86
Figure 38 : Immunomarquage ZEB1 et SNAI/SLUG de tumeur de xénogreffes	87
Figure 39 : Western Blot de tumeurs de xénogreffes de mélanomes	87
Figure 40 : Quantification du fer ferreux (Fe ²⁺) dans les lignées cellulaires.....	89
Figure 41 : Quantification du fer ferreux (Fe ²⁺) et de la viabilité cellulaire	90
Figure 42 : Quantification du fer ferreux (Fe ²⁺) et de la viabilité cellulaire	90

Figure 43 : Western Blot et ELISA sur les lignées cellulaires	91
Figure 44 : Quantification du fer dans les sphéroïdes	92
Figure 45 : Quantification du fer ferreux (Fe ²⁺) dans les xéno greffes	93
Figure 46 : Expression en ARN de PROM2 après détachement	94
Figure 47 : Expression en ARN de PROM2 dans la lignée cellulaire.....	94
Figure 48 : Echographie d'une souris présentant un globe vésical.....	95
Figure 49 : Niveau d'expression en ARN de PROM2,	96
Figure 50 : Immunomarquage PROM2 de tissus humains sains	97
Figure 51 : Expression en ARN de PROM2	98
Figure 52 : Expression de PROM2 des lignées knock-out et natives.....	99
Figure 53: Quantification de la migration et de l'invasion.....	101
Figure 54: Quantification du fer ferreux (Fe ²⁺) des lignées KO et natives.....	101
Figure 55 : Niveau d'expression en ARN du marqueur épithélial.....	102
Figure 56 : Boucle physiopathologique proposée pour laquelle un taux de PROM2 élevé favorise les métastases et protège contre la mort cellulaire.....	105
Figure 57 : Expression des marqueurs de transition épithélio-mésenchymateuse en fonction de l'expression de PROM2 dans les tumeurs de sein xéno greffées.....	110

Liste des tableaux

Tableau 1 : Echelle de Fitzpatrick – Classification du phototype.	20
Tableau 2 : Classification TNM (Tumeur, Ganglions, Métastases)	24
Tableau 3 : Association entre l'expression de PROM2 et la survie des patients dans les cancers humains	48
Tableau 4 : Séquences des ASO utilisés dans cette étude	66

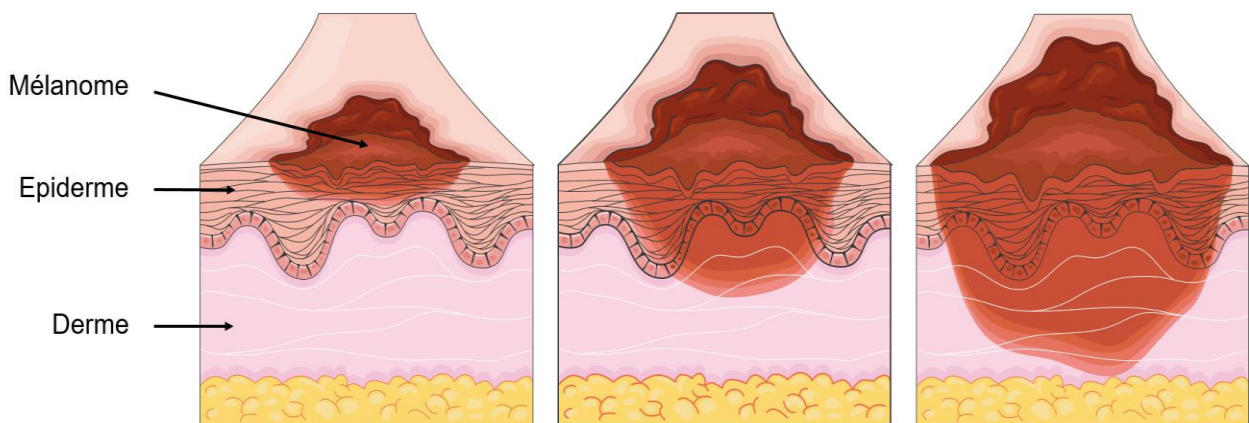
Liste des abréviations

ADN	Acide désoxyribonucléique
ASO	Oligonucléotides anti-sens
B2M	Bêta-2-microglobuline
BRAF	Murine sarcoma viral (v-raf) oncogene homolog B1
CAV1	Cavéoline-1
CDH1	E-Cadhérine
CDK4	Protéine cyclin-dépendant kinase 4
CDKN2A	Cyclin-dépendant kinase inhibitor 2A
c-KIT	Tyrosine protein kinase
CMH	Complexe d'histocompatibilité
Crispr-Cas9	Clustered regularly interspaced short palindromic repeats-CRISPR-protéine 9
CTLA-4	Antigène 4 associé aux lymphocytes T cytotoxiques
DFO	Déféroxamine
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
HE	Hématoxyline-éosine
IFN- γ	Interféron- γ
IHC	Immunohistochimique
KO	Knock-out
LAG-3	Lymphocyte activation gene 3
MAPK	Mitogen-activated protein kinases
MEK	Extracellular signal-regulated kinases
NF1	Neurofibromatosis
NRAS	Neuroblastoma RAS viral (v-ras) oncogene homolog
PD1/PDL-1	Mort programmée-1
PTEN	Phosphatase and TENsin homolog
PROM2	Prominine 2
PPP6C	Protein Phosphate 6 Catalytic Subunit
RAC1	Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1
TERT	Telomerase reverse transcriptase
TIM-3	T-cell immunoglobulin and mucin domain 3
TP53	Tumor Protein 53
UV	Ultraviolet
VIM	Vimentine

Introduction

Le mélanome

Le mélanome est une tumeur maligne qui prend son origine dans les mélanocytes, qui sont des cellules situées principalement dans la couche basale de l'épiderme. Ces cellules produisent la mélanine qui est responsable de la pigmentation de la peau. Les tumeurs qui se développent au niveau de la jonction de l'épiderme et du derme sont appelés mélanome cutané, ils représentent 95% des mélanomes [1]. C'est sur ce type de mélanome que se porte cette thèse, les mélanomes des muqueuses ou de la choroïde ne seront pas mentionnés. Le mélanome cutané se développe depuis la couche superficielle de la peau jusqu'en profondeur vers le derme et l'hypoderme (Figure 1). Il peut être à l'origine de métastases par migration des cellules cancéreuses notamment dans les ganglions lymphatiques [2]. Dans 70 à 80% des cas, le mélanome cutané apparaît sur de la peau saine. Il peut également apparaître sur un nævus préexistant (un nævus, aussi appelé grain de beauté, est une prolifération bénigne des mélanocytes).



*Figure 1 : Développement du mélanome
Progression d'un mélanome cutané de la couche superficielle de la peau (gauche)
jusqu'en profondeur du derme (droite).*

1) Epidémiologie

Le pays, l'âge, le sexe, l'ethnie ainsi que le mode de vie sont des facteurs influençant l'incidence du mélanome. En 2020, on dénombre dans le monde 57 043 décès (32 385 hommes et 24 658 femmes) et 324 635 nouveaux cas de mélanome (173 844 hommes et 150 791 femmes) [3, 4], provenant en majorité d'Europe, d'Amérique du Nord, d'Australie et de Nouvelle-Zélande [5] (Figure 2).

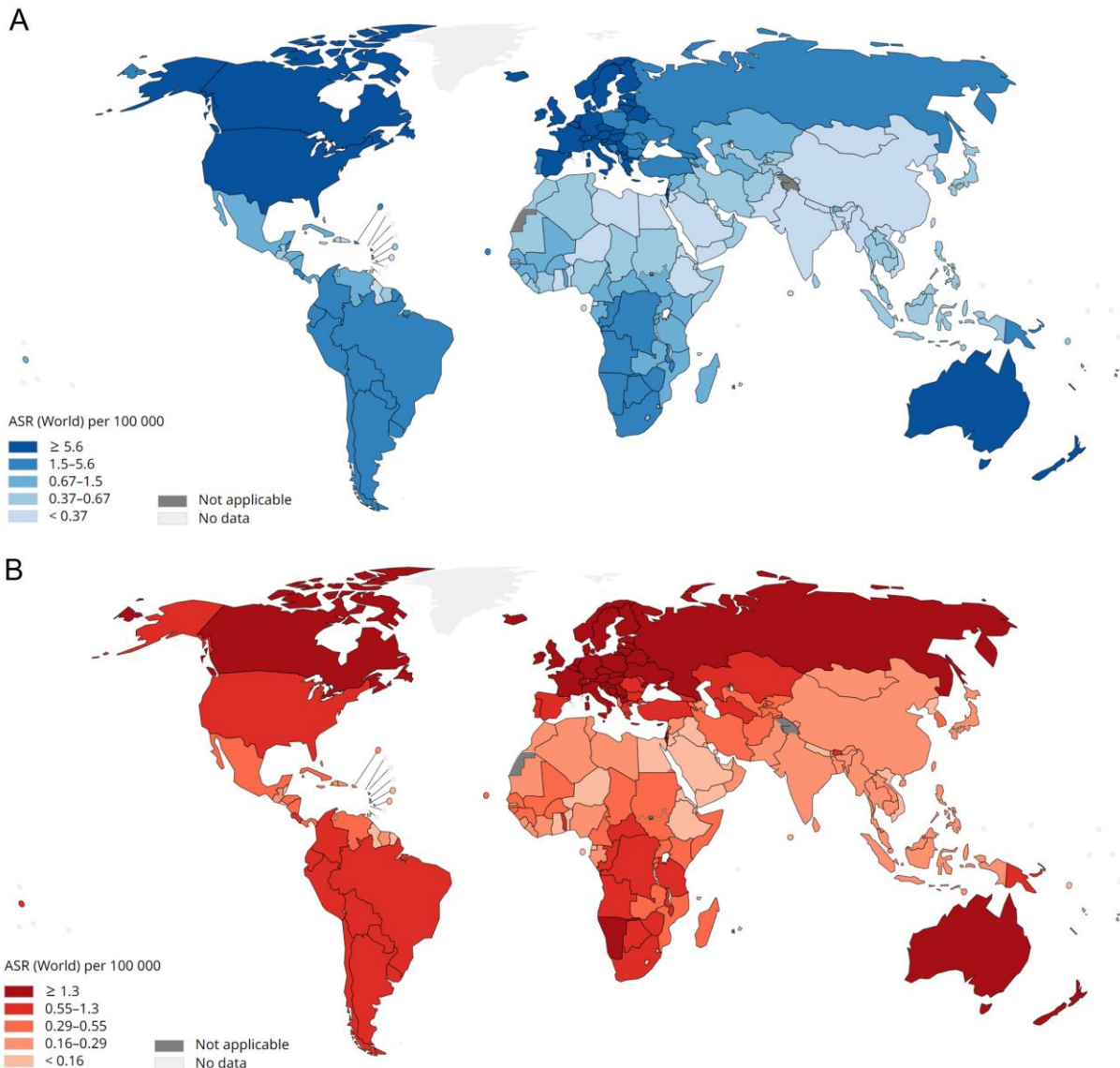


Figure 2 : Taux d'incidence et de mortalité du mélanome cutané dans le monde en 2020. Taux d'incidence du mélanome cutané dans le monde en 2020 (A) [6]. Taux de mortalité du mélanome cutané dans le monde en 2020 (B) [6].

L'incidence du mélanome est en constante augmentation depuis 1982 (entre 3 et 7% par an dans les populations blanches), principalement en raison d'une exposition excessive au soleil [7]. Le nombre de cas a été multiplié par 5 entre 1990 et 2018 (+ 371%). Cependant, ces dernières années, le taux d'incidence tend à se stabiliser en Australie, en Nouvelle-Zélande, aux Etats-Unis, au Canada, en Norvège et en Israël en raison des mesures de prévention [8-10].

L'augmentation de l'incidence s'explique principalement par les changements d'attitude envers l'exposition au soleil mais également par l'augmentation de la détection de mélanome de faible épaisseur [11], l'amélioration des techniques de surveillance [12] ainsi que le vieillissement de la population [9]. Tout cela s'ajoute à des dépistages plus réguliers [12], notamment en raison d'une prise de conscience de la population générale envers les risques de cancer de la peau [13].

En Europe, le taux d'incidence du mélanome s'élève à 11,4 pour 100 000 personnes en 2020 [3]. C'est le continent avec le plus de nouveaux cas (150 627) et de décès (26 360) (Figure 3).

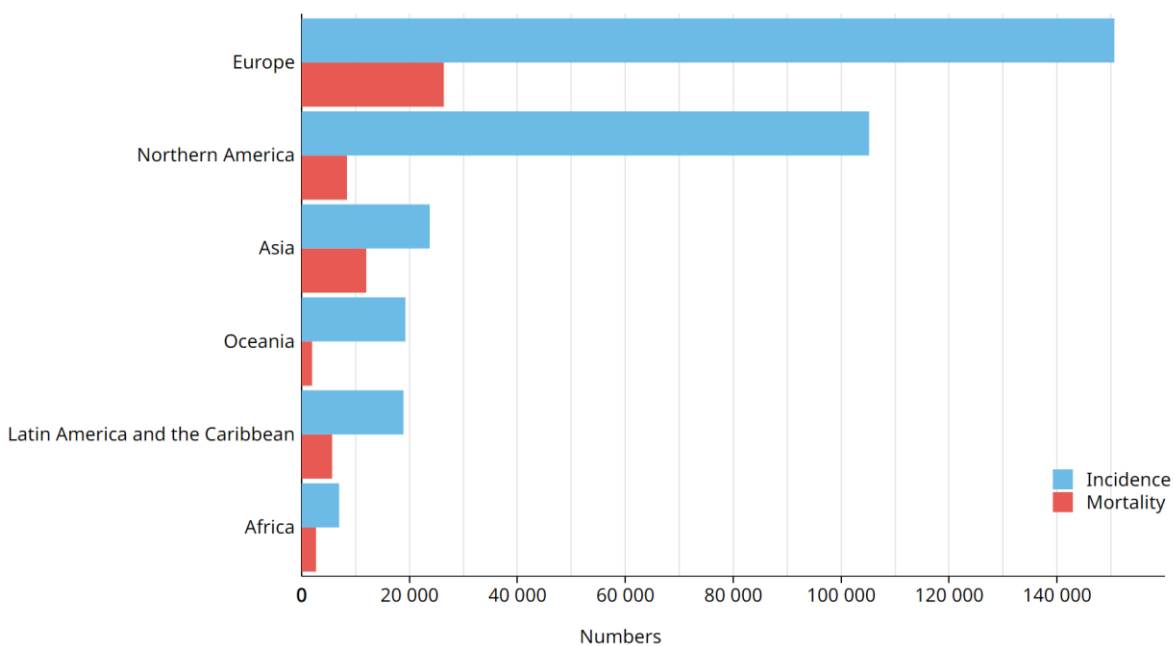


Figure 3 : Taux d'incidence et de mortalité du mélanome par continent en 2020.

En 2020, 16 449 cas de mélanomes ont été diagnostiqués en France, faisant de ce cancer le 9^{ème} cancer le plus fréquent (le 8^{ème} chez les hommes et le 6^{ème} chez les femmes). Il représente environ 4 % des nouveaux cas de cancer [3]. Tout comme dans les autres pays, l'incidence du mélanome en France augmente avec l'âge [2]. Elle est également plus élevée chez les hommes que chez les femmes après 55 ans, dans la population de moins de 55 ans ce sont les femmes qui présentent un taux d'incidence plus élevé [14]. L'âge médian de diagnostic est de 64 ans chez les hommes et de 61 ans chez les femmes [15]. On remarque également que les localisations privilégiées diffèrent selon le sexe. Les hommes développeront plus facilement un mélanome au niveau du tronc (dans 42% des cas) et les femmes au niveau des membres inférieurs (dans 39% des cas) [16].

Bien que le taux d'incidence du mélanome augmente fortement, le taux de mortalité reste relativement stable en raison de la prévention et des dépistages précoces [17]. L'épaisseur tumorale étant le principal facteur pronostic, plus le dépistage est effectué tôt plus les chances de survie sont importantes. A un stade précoce, un traitement chirurgical permet généralement la guérison, cependant le risque de métastase reste présent. En effet, le mélanome est un grand pourvoyeur de métastases. Environ 25% des patients développent des métastases avec seulement 20% de survie à 5 ans malgré les résultats spectaculaires des immunothérapies. Ce fort potentiel de dissémination métastatique fait du mélanome la forme la plus mortelle de cancer de la peau (75% des décès) alors qu'il représente seulement 10% des cancers de la peau.

En France, le mélanome représente 1,1% des décès par cancer avec 2 125 morts en 2020.

2) Facteurs de risque

Le mélanome est une maladie multifactorielle résultant de facteurs environnementaux, phénotypiques et génétiques. Il se forme principalement au niveau des zones exposées aux rayons ultraviolets (UV) car ces derniers constituent le principal facteur de risque de son

développement. D'autres facteurs de risques du mélanome sont également connus : la présence de nævi pigmentés, avoir un phénotype clair, les antécédents personnels et familiaux de cancer de la peau ainsi que l'immunodépression.

a. Les facteurs de risques environnementaux

L'exposition aux rayons UV est le seul facteur de risque environnemental connu du mélanome cutané [18, 19], dont le soleil est la source majeure. Selon leurs longueurs d'ondes, les UV solaires ont été classés en trois catégories : les UV-C (de 100 à 280 nm), les UV-B (de 280 à 315 nm) et les UV-A (de 315 à 400 nm). Les UV-C sont absorbés par la couche d'ozone, ils ne constituent donc pas un facteur de risque puisqu'ils n'atteignent pas la surface de la Terre. Les UV-B sont pour la plupart arrêtés par la couche d'ozone, ils constituent seulement 5% des UV qui atteignent la surface de la Terre. Ce sont ces UV-B qui sont responsables des coups de soleil et constituent donc un facteur de risque de mélanome cutané. Les UV-A, quant à eux, représentent 95% des UV qui atteignent la surface de la Terre. Ces UV-A pénètrent le derme et sont responsables du vieillissement de la peau. Ils sont donc également un facteur de risque de mélanomes cutanés [20].

Une autre source d'UV « facteur de risque » sont les UV artificiels, notamment les lampes UV présentes dans les cabines de bronzage [21]. Ces lampes à UV utilisent les UV-A et les UV-B pour mimer l'exposition au soleil. Elles augmentent considérablement le risque de cancers cutanés [22], ce risque est d'autant plus important si la première exposition a eu lieu avant l'âge de 35 ans [23].

Les UV-B et UV-A favorisent la carcinogénèse en causant des lésions sur l'acide désoxyribonucléique (ADN). Ils provoquent notamment des dimères de pyrimidine, un stress oxydatif, de l'inflammation, des mutations de gènes et une immunodépression [24, 25].

L'exposition solaire intentionnelle, dite active, est un facteur de risque de mélanome, contrairement à l'exposition solaire continue « passive » [18]. Les coups de soleil

douloureux avant l'âge de 20 sont associés à un fort risque de mélanome, de même que les coups de soleil sur le tronc [26]. On distingue deux types de mélanomes en fonction de l'exposition au soleil de la peau (chronique ou intermittente). Ils se différencient par le type et le nombre de mutation (majoritairement induites par les rayons UV), l'âge et le site anatomique d'apparition du mélanome, ainsi que par le degré d'exposition cumulée aux rayons UV.

Une exposition intermittente aux rayons UV présente un risque plus élevé de développer un mélanome qu'une exposition chronique [27]. Les mélanomes induits par une exposition chronique présentent un nombre important de mutations. Ils présentent souvent des mutations du gène neurofibromatosis (*NF1*), neuroblastoma RAS viral (*v-ras*) oncogene homolog (*NRAS*), tyrosine protein kinase (*c-KIT*) et murine sarcoma viral (*v-raf*) oncogene homolog B1 (*BRAF*) à l'exception de la mutation *BRAF V600E* [27]. Les mélanomes induits par une exposition intermittente aux rayons UV ont un nombre plus faible de mutations et sont souvent porteurs d'une mutation *BRAF V600E* (Figure 4).

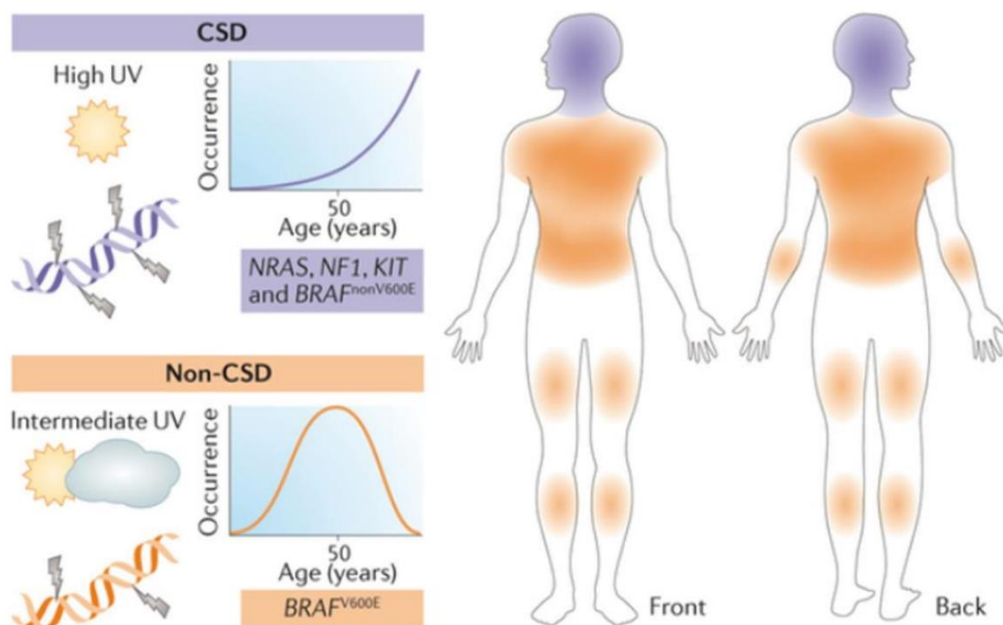


Figure 4 : Schéma des différences cliniques, histo-pathologiques et moléculaires en fonction du sous-type de mélanome sur peau photoexposée. Dommages induits par le soleil sur la peau des mélanomes induits par peau exposée de façon chronique (CSD pour « chronically sun-damaged ») et par peau exposée de façon intermittente (non-CSD pour « non chronically sun-damaged ») [27]

Le mélanome cutané est le cancer possédant la charge mutationnelle la plus élevée avec un taux moyen de mutations de 16,8 mutations/Mégabase (Mb) [28-30]. Cela s'explique par le caractère mutagène des rayons UV [8]. En moyenne, on comptabilise 150 à 200 mutations par mélanome, dont une dizaine sont récurrentes et considérées comme mutations « princeps ». Les principaux gènes affectés par les mutations sont des gènes suppresseurs de tumeurs tel que cyclin-dépendant kinase inhibiteur 2A (*CDKN2A*), Phosphatase and TENsin homolog (*PTEN*) ou encore Tumor Protein 53 (*TP53*).

Les mutations dues aux UV sont caractérisées par une signature de mutations de C en T ou de CC en TT (signature mutationnelle SBS1, SBS5 et SBS7a/b) [31, 32]. On retrouve ces signatures également dans les mutations des gènes oncogènes Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1 (*RAC1*), Telomerase reverse transcriptase (*TERT*) et Protein Phosphate 6 Catalytic Subunit (*PPP6C*). En revanche, les mutations des oncogènes *BRAF* et *NRAS* ne présentent pas ces signatures UV [33].

b. Les nævus pigmentés

Les nævus pigmentés sont des proliférations bénignes des mélanocytes. Les personnes caucasiennes présentent en moyenne 25 nævus sur leur peau mesurant 2 mm de diamètre ou plus [34, 35]. L'apparition de ces nævus communs, principalement au niveau du tronc et des extrémités, survient jusqu'à l'âge de 20 ans et tend à disparaître après l'âge de 60 ans. Ces nævus sont peu susceptibles de progresser en mélanome, néanmoins, plusieurs études ont montré que les personnes présentant un grand nombre de nævus ont plus de probabilité de développer un mélanome que celles en présentant peu [36-39]. En effet, le risque relatif de mélanome est de 6,9 pour les personnes présentant plus de 100 nævus en comparaison à celles qui en présente moins de 15 [40].

Les personnes présentant des nævus dysplasiques ou atypiques ont un risque six fois plus important de développer un risque de mélanome. Ce risque est même dix fois plus important

chez les personnes présentant cinq nævus atypiques [40]. Ces nævus atypiques surviennent chez les individus n'ayant pas d'antécédent personnel ou familiaux de mélanome et ont un risque faible de dégénérescence maligne.

c. Le phénotype clair

Un individu présentant un phénotype de peau claire est plus à risque de développer un mélanome cutané [41, 42]. Une méta-analyse a montré que les personnes ayant des yeux bleus, verts ou noisette ont entre 1,5 et 1,6 fois plus de risque de mélanome que les personnes ayant des yeux foncés. Le risque de mélanome est également 1,6, 2 et 3,6 fois plus élevé chez les personnes ayant respectivement des cheveux châtain, blonds ou roux, par rapport aux personnes ayant des cheveux foncés [18]. De la même façon, les personnes avec une peau claire ont un risque deux fois important de développer un mélanome que les personnes avec une peau foncée. Depuis sa création en 1975, la classification de Fitzpatrick permet de distinguer 6 phototypes [43], un phototype étant le phénotype traduisant la capacité de la peau à bronzer (Tableau 1). Les individus associés au phototype I, II et III présentent 1,8 à 2,1 fois plus de risque que les individus de phototype IV à développer un mélanome cutané [18].

Phototype	Couleur de peau / yeux / cheveux	Réaction au soleil
I	Peau très claire, taches de rousseur / cheveux blonds ou roux / yeux clairs	Ne bronze jamais / Coups de soleil systématiques
II	Peau très claire, tache de rousseur au soleil / cheveux châtain ou blonds / yeux clairs	Bronze difficilement / Coups de soleil fréquents
III	Peau claire / cheveux châtain	Bronze progressivement / Coups de soleil occasionnels
IV	Peau mate / cheveux châtain ou bruns / yeux foncés	Bronze bien / Coups de soleil peu fréquents
V	Peau foncée / cheveux foncés / yeux foncés	Bronze facilement / Coups de soleil rares
VI	Peau noire / cheveux foncés / yeux foncés	Jamais de coup de soleil

Tableau 1 : Echelle de Fitzpatrick – Classification du phototype.

d. Les antécédents personnels et familiaux

Les cancers sont le fait d'une balance entre facteurs génétiques constitutionnels et acquis. La prédisposition familiale est donc un autre facteur de risque du mélanome. On retrouve un contexte familial dans environ 10% des cas de mélanome cutané [44]. Le risque de développer un mélanome est deux fois plus élevé chez les sujets avec un antécédent familial apparenté au 1^{er} ou au 2nd degrés [40]. Cependant, cette prédisposition génétique ne peut être considérée comme l'unique facteur de risque. En effet, la transmission des comportements parentaux vis-à-vis de l'exposition au soleil peut également en être la cause [45].

La transmission familiale se fait selon un mode de transmission autosomique dominante [46]. Une mutation germinale délétère d'un des gènes de prédisposition au mélanome est retrouvée dans 2% des cas, qu'ils soient familiaux ou sporadique s'agissant d'un cas index de novo [47]. Le premier gène de forte pénétrance identifié a été le gène *CDKN2A* [48]. *CDKN2A* code pour les protéines p14 et p16, qui sont des protéines suppresseur de tumeur.

En France, on estime que 32% des familles avec au moins trois cas de mélanomes présentent une mutation sur *CDNK2A* contre 1% des cas chez les patients sans antécédent familiaux [49, 50]. Une autre mutation que l'on retrouve est celle du gène codant pour la protéine cyclin-dépendant kinase 4 (*CDK4*), impliquée dans la prolifération cellulaire [47, 51]. De nombreuses autres mutations associées au risque accru de mélanome ont pu être identifiées grâce aux progrès techniques. Tous ces gènes sont impliqués dans la détermination du phénotype pigmentaire et/ou dans la prolifération des mélanocytes mais sont de plus faibles pénétrances [52].

Les patients présentant plusieurs mélanomes primaires sont fréquemment porteurs d'une mutation génétique [53]. Un antécédent personnel augmente la susceptibilité de faire un second mélanome de 5 à 7% [54, 55].

3) Diagnostic

Des critères cliniques permettent de diagnostiquer le mélanome [56]. Il y a suspicion de mélanome lorsqu'au moins un de ces critères ABCDE s'applique à une lésion pigmentée : une forme Asymétrique (critère A), des Bords irréguliers (critère B), une Couleur non homogène (critère C), un Diamètre supérieur à 6 mm (critère D) et enfin sur l'Evolution de la lésion au cours du temps (critère E) (Figure 5, [57]).

Ce diagnostic doit par la suite être confirmé par un examen histologique après excision de la lésion. L'examen permet de confirmer la nature mélanocytaire de la prolifération. Les marqueurs PS100, Melan-A et HMB45 sont utilisés comme marqueurs immunohistochimiques pour l'analyse histologique. Les critères architecturaux et cytologiques permettent de compléter le diagnostic de malignité.

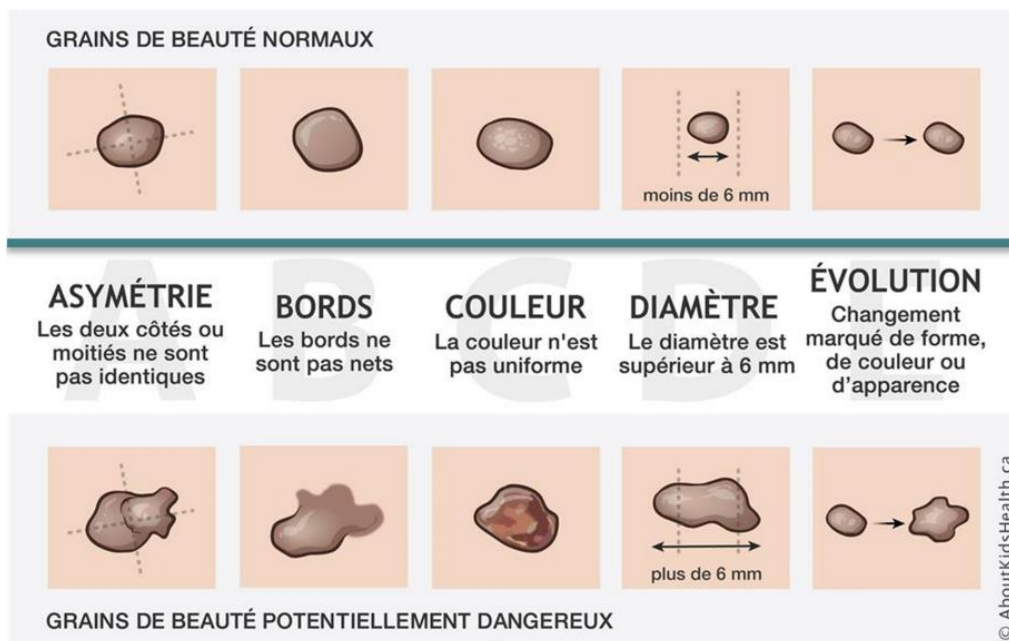


Figure 5 : Critères ABCDE pour examiner une lésion pigmentaire.

4) Classification du mélanome cutané

Le système TNM établi par l'American Joint Committee on Cancer (AJCC) et l'Union internationale contre le cancer (UICC) est le référentiel international utilisé en pratique clinique pour classifier les mélanomes [58].

Ce système permet de caractériser le stade du mélanome en fonction de l'épaisseur de la tumeur (T pour Tumeur), l'envahissement des ganglions lymphatiques (N pour Node, en français ganglion) et la présence de métastases (M pour Métastase) (Tableau 2). La détermination de la classification d'un mélanome peut se faire avant la chirurgie de façon clinique (cTNM) ou après la chirurgie de façon anatomopathologique (pTNM) [59].

Au stade III, le pronostic du patient dépend du caractère de l'atteinte ganglionnaire (microscopique ou macroscopique), de la quantité de ganglions atteints, de la localisation de la tumeur primitive, ainsi que de l'épaisseur, de la présence d'une ulcération et de l'activité mitotique de celle-ci [60, 61].

La technique de recherche du ganglion sentinelle permet de retrouver la présence de micro-métastases ganglionnaires. C'est un facteur pronostic associé à une meilleure survie sans

récidive [62]. La localisation, intra-parenchymateuse ou sous capsulaire, du ganglion sentinelle et sa charge tumorale permet d'établir un pronostic. On distingue 3 groupes pronostics d'après la classification d'Augsburg-Rotterdam : AR1 (métastases $\leq 0,1$ mm et infiltration $\leq 0,3$ mm), AR2 (métastases entre 0,1 et 1 mm, et infiltration entre 0,3 et 1 mm) et AR3 (métastases > 1 mm et infiltration > 1). La survie globale à 5 ans est de 100% pour un stade AR1, 75% pour un stade AR2 et moins de 40% pour un stade AR3 [61].

Au sein des métastases ganglionnaires de stade III, un profil d'expression des gènes associés à la réponse immune et l'infiltration de lymphocytes présentent un bon pronostic notamment grâce à la réponse de ces tumeurs aux immunothérapies [29, 63-66]. Egalement, notre équipe a montré qu'au stade III métastatique régional ganglionnaire, une expression forte du gène *PROM2* était associée à une survie globale diminuée [67].

Au stade IIIC inopérable ou au stade IV, le mélanome métastatique avancé présente un mauvais pronostic. La médiane de survie globale est estimée entre 6 et 9 mois [68]. Le nombre et la localisation métastatique ont une valeur pronostic. La présence de métastases à distance non viscérales présente un meilleur pronostic que la présence de métastases à distance viscérales [60]. La présence de métastases cérébrales réduit significativement la médiane de survie (entre 3 et 5 mois) [69, 70]. C'est un enjeu majeur, près de 50% des patients avec un mélanome de stade IV développent des métastases cérébrales. Notamment, les patients présentant une mutation *BRAF* ou *NRAF* lors du diagnostic ont un risque plus élevé de développer des métastases cérébrales [71].

Classification T	Epaisseur	Ulcération	Stade
T1	≤1 mm	a : index mitotique < 1 mm ² <u>et sans</u> ulcération	IA
		b : index mitotique ≥ 1 mm ² <u>ou avec</u> ulcération	IB
T2	1,01 – 2,00 mm	a : sans ulcération	IB
		b : avec ulcération	IIA
T3	2, 01 – 4,00 mm	a : sans ulcération	IIA
		b : avec ulcération	IIB
T4	> 4 mm	a : sans ulcération	IIB
		b : avec ulcération	IIC

Stades I et II, si absence de métastase (N0 et/ou M0)

Classification N	Nombre de ganglions envahis	Masse tumorale	Stade
N1	1 N+	a : micrométastase*	IIIA/B
		b : macrométastase**	IIIB/C
N2	2 ou 3 N+	a : micrométastase*	IIIA/B
		b : macrométastase**	IIIB/C
		c : métastase(s) en transit <u>sans</u> ganglion envahi	IIIB/C
N3	≥ 4 N+ <u>ou</u> agglomérat de N+ <u>ou</u> métastase(s) en transit <u>avec</u> ganglion envahis		IIIC

* *Micrométastases = N+ dans un ganglion sentinelle ou un ganglion non décelable cliniquement ou en échographie, enlevé lors d'un curage dit de principe.*

** *Macrométastases = N+ dans des ganglions décelables cliniquement ou en échographie, enlevés lors d'un curage dit de nécessité ou avec extension extra-capsulaire macroscopique.*

Stade IIIA : si T1-4a N1a/N2a et M0

Stade IIIB : si T1-4b N1a/N2a ou si T1-4a N1b/N2b/N2c et M0

Stade IIIC : si T1-4b N1b/N2b/N2c ou tout T N3 et M0

Classification M	Site des métastases	Taux sanguin de LDH	Stade
M1a	Métastases à distance : cutanées ou sous-cutanées ou ganglionnaires	normal	IV
M1b	Métastases pulmonaires	normal	
M1c	Autres métastases viscérales Toutes métastases à distance	normal élevé	IV

Tableau 2 : Classification TNM (Tumeur, Ganglions, Métastases) associé aux stades cliniques des mélanomes cutanés.

5) Pronostic du mélanome

En 1970, Breslow a montré à partir de 98 tumeurs de mélanome que l'épaisseur était inversement associée à la survie (Figure 6, [72]). Depuis, de nombreux travaux ont par la suite confirmé que le pronostic d'un patient atteint de mélanome cutané dépend principalement de son épaisseur, aussi appelé indice de Breslow [73].

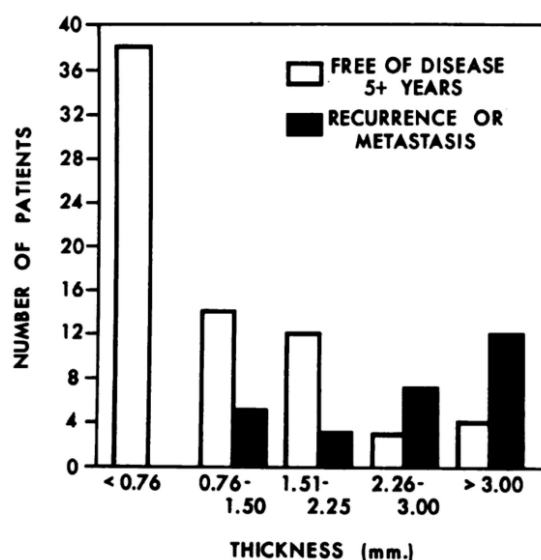


Figure 6 : Pronostic associé à l'épaisseur des mélanomes.

L'indice de Clark est également utilisé pour le pronostic. C'est un indice qui reflète le niveau d'infiltration de la tumeur au sein des différentes couches de la peau. Il est de I pour les tumeurs *in situ* et se situe entre II et V pour les tumeurs invasives [74].

L'ulcération (lorsque le derme et l'hypoderme sont atteints) est corrélée à l'indice de Breslow et à l'activité mitotique. Elle est associée à un moins bon pronostic [75].

D'autres facteurs peuvent également influencer le pronostic d'un mélanome, comme l'âge du patient [73, 75].

6) Traitement du mélanome cutané métastatique

Le traitement chirurgical d'exérèse est la première prise en charge d'un mélanome cutané. Lorsque le mélanome est détecté à un stade peu avancé, l'exérèse permet un très bon pronostic (Figure 7, [76]).

Stage	TNM Stage	Pathological Features	5y survival (%)
0	Tis NO MO	—	100
IA	T1a,b NO MO	<1 mm	93
IB	T2a NO MO	1–2 mm no ulcer	89
IIA	T2b NO MO	1–2 mm + ulcer	—
	T3a NO MO	2–3 mm no ulcer	78
IIB	T3b NO MO	3–4 mm + ulcer	65
	T4a	>4 mm no ulcer	—
IIC	T4b NO MO	>4 mm + ulcer	45
IIIA	T1-4a N1a, 2a, MO	Any thickness, microscopic nodal mets	67
IIIB	T4b N1a, 2a, MO T1-4 N1b, 2b, MO	>4 mm + ulcer or macroscopic nodal mets <4	53
IIIC	any T N3 MO	4+ lymph nodes or matted lymph nodes	26

Figure 7 : Estimation du taux de survie à 5 ans selon le stade TNM des patients atteints de mélanome cutané.

La Société française de dermatologie recommande pour les mélanomes *in situ* des marges latérales de 0,5 cm et pour les mélanomes de plus de 2 mm d'épaisseur des marges de 2 cm. Pour les mélanomes cutanés métastatiques inopérables, des traitements par chimiothérapies, immunothérapies et des thérapies ciblées sont utilisées [77].

a. Les chimiothérapies

Dans le cadre d'un traitement d'un mélanome métastatique, les chimiothérapies conventionnelles utilisées sont la dacarbazine, la fotémustine, le temozolomide, le paclitaxel ainsi que les sels de platine. Les chimiothérapies sont toxiques pour de nombreux constituants cellulaires, en particulier l'ADN, les protéines impliquées dans sa réplication et les mitochondries. Les chimiothérapies ne ciblent pas spécifiquement les cellules cancéreuses, cependant, ces dernières y sont plus sensibles car leur prolifération cellulaire

est plus rapide que celle des cellules saines. Néanmoins, avec seulement 5 à 20% de réponse, aucune chimiothérapie n'a montré une amélioration de la survie globale des patients atteints de mélanome [78].

b. Les immunothérapies

Les points de contrôle immunitaires sont des régulateurs du système immunitaire. Pour fonctionner correctement, le système immunitaire doit être capable d'identifier les substances étrangères tout en reconnaissant ce qui est soi. Cependant, certaines cellules tumorales peuvent se protéger contre les attaques en stimulant les antigènes cibles des points de contrôle immunitaire à leur surface [79]. L'immunothérapie pour le traitement des tumeurs a suscité beaucoup d'intérêt ces dernières années, avec des succès notables contre plusieurs cancers, y compris le mélanome. Ces approches sont basées sur la restauration de l'immunité à travers le blocage des points de contrôle immunitaires avec des inhibiteurs contre la mort programmée-1 (anti-PD1/PDL1) ou contre l'antigène 4 associé aux lymphocytes T cytotoxiques (CTLA-4), ces deux derniers étant deux récepteurs présent à la surface des lymphocytes T [80, 81]. Néanmoins, l'un des effets secondaires de la restauration de l'immunité peut être la survenue d'une réaction inflammatoire très importante du corps dans certain cas.

Les immunothérapies bloquant les points de contrôle immunitaires ont d'abord été approuvées pour le traitement du mélanome métastatique et sont maintenant largement utilisées pour le traitement d'un nombre croissant de cancers, bien qu'avec une efficacité variable [82]. En effet, au stade métastatique, les immunothérapies ont transformé le pronostic des patients (un anti-CTLA4 ipilimumab et deux anti-PD1 nivolumab et pembrolizumab). La combinaison de nivolumab et d'ipilimumab en première ligne métastatique permet un contrôle de près de 75% des patients avec 10 à 19% de répondeurs complets et potentiels long survivants [83, 84]. On peut d'ailleurs parler de chimio-curabilité,

ce qui n'était pas le cas avec les cytotoxiques classiques tel que la dacarbazine et la fotémustine [85]. Cependant, 61% des patients ont une résistance primaire, c'est-à-dire au début du traitement, ou acquise, qui survient après une réponse initiale, aux traitements par anti-PD1 dont les données de survie à long terme sont connues [86]. Avec l'association anti-PD1 anti-CTLA4, à savoir ipilimumab et nivolumab, les taux de réponse sont plus élevés mais plus de 50% des patients développeront quand même une résistance [87]. De plus en plus d'études suggèrent la contribution de mécanismes non génétiques intrinsèques aux cellules tumorales, semblables à la transition épithéliale-mésenchymateuse, dans l'acquisition de la résistance aux immunothérapies dans le mélanome [88-92]. En cas d'évolution du mélanome en métastases cérébrales, les patients présentent seulement entre 4 et 36% de réponses aux immunothérapies [93-99], et ce malgré l'utilisation de la radiothérapie en amont du traitement, permettant une meilleure pénétration du traitement à travers la barrière hémato-encéphalique [100]. En effet, en raison de la difficulté des traitements à diffuser à travers la barrière hémato-encéphalique [101] et de l'efflux des drogues du cerveau vers le sang [102], les métastases cérébrales constituent près de 50% des causes de décès par mélanome [103-106].

c. Thérapies ciblées

Les thérapies ciblées s'adressent aux patients porteurs d'une mutation *BRAF* sur le codon V600. Les inhibiteurs de *BRAF* induisent un blocage du signal d'activation de la voie mitogen-activated protein kinases (MAPK), une des principales voies de prolifération cellulaire (Figure 8, [107]), à travers l'inhibition de *BRAF* ou de l'extracellular signal-regulated kinases (MEK).

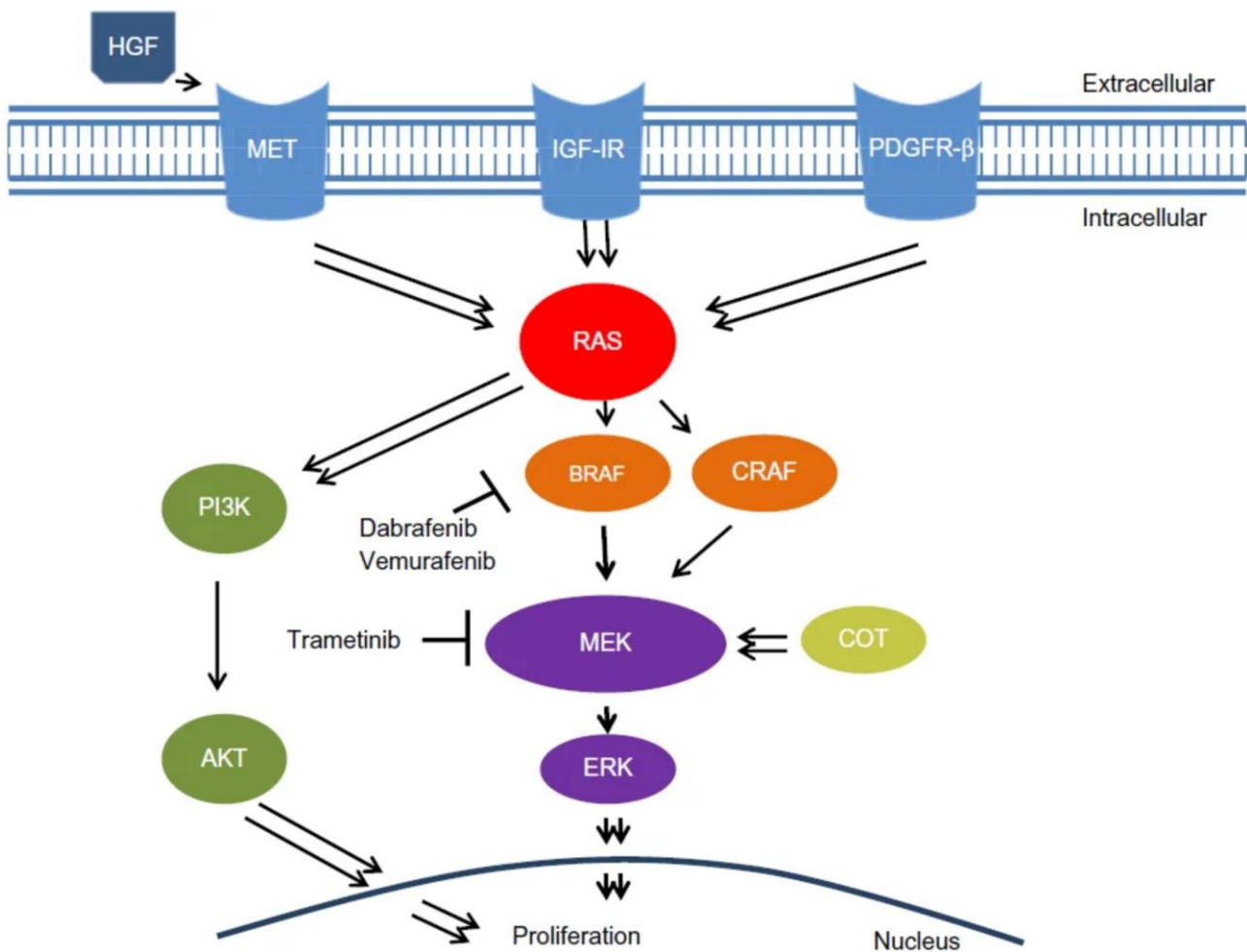


Figure 8 : Voie de signalisation MAPK et ses inhibiteurs
Les doubles flèches représentent plusieurs étapes dans la voie de signalisation.

7) Mécanismes de résistance aux traitements du mélanome

a. La résistance intrinsèque (primaire)

On considère qu'une résistance primaire se produit lorsqu'il n'y a pas d'induction d'une réponse immunitaire anti-tumorale efficace. La résistance primaire au blocage des points de contrôle immunitaire survient chez environ 40% à 65% des patients atteints de mélanome traités par anti-PD1, selon si l'administration du traitement se fait en amont ou après progression du cancer traités avec d'autres traitements [84, 108, 109]. Plus de 70 % des patients traités par des anti-CTLA-4 présentent également une résistance primaire [110, 111].

Les facteurs associés à la résistance primaire sont : des taux sériques élevés en lactate déshydrogénase [112], une absence d'expression de PD-L1 dans les cellules tumorales [113], l'absence d'infiltration des lymphocytes T [114], l'absence de lymphocytes T PD-1 et de macrophages PD-L1 [115], l'insuffisance des néo-antigènes [81], la présence d'une signature transcriptionnelle de résistance innée aux anti-PD-1 [88] ou l'absence d'une signature interféron [116], induisant une augmentation de la charge tumorale [117]. Cependant, on ignore actuellement si ces facteurs sont des conséquences ou ont un rôle mécanistique direct dans la résistance [118].

On observe également des résistances innées chez environ 15% des patients traités avec des thérapies ciblées ciblant *BRAF* [119, 120]. Cette résistance passe par la réactivation de la voie MAPK [121, 122], la perte de *PTEN* [123], la dérégulation de *CDK4* et/ou de la cycline D1 [124] ou les mutations de *HOXD8* [125].

b. La résistance acquise

On considère qu'une résistance acquise survient lorsqu'un patient ré-évolue après avoir présenté une réponse initiale à l'immunothérapie (ou tout autre traitement). À l'heure actuelle, peu de choses sont connues sur les mécanismes qui donnent lieu à une résistance acquise, mais beaucoup sont susceptibles d'être similaires à ceux de la résistance primaire [118, 126].

Une résistance acquise à l'immunothérapie peut se développer lorsqu'il existe une sélection darwinienne d'une sous-population de cellules tumorales présentant des marqueurs génétiques et épigénétiques leur permettant d'échapper au système immunitaire [127]. Un exemple de marqueur est la bêta-2-microglobuline (B2M), un des composants du complexe d'histocompatibilité (CMH) de classe I. La perte de l'expression de *B2M* a été constatée dans des lignées cellulaires de mélanome de patients [128] et dans des biopsies séquentielles obtenues chez un patient atteint de mélanome métastatique [129] traités par

immunothérapie. Cela entraîne une perte d'expression du CMH de classe I et, par conséquent, une diminution de la reconnaissance des cellules cancéreuses par les lymphocytes T CD8.

Les mutations JAK1/2 ont récemment été identifiées comme marqueurs génétiques de la résistance acquise aux immunothérapies dans le mélanome. La voie de signalisation JAK/STAT est responsable de la prolifération, de la différenciation, de la migration cellulaire et de l'apoptose cellulaire [130]. Les mutations de JAK1/2 dans les cellules tumorales entraînent une diminution de la sensibilité à l'interféron- γ (IFN- γ), empêchant l'arrêt de la croissance cellulaire induite par celui-ci [131].

Une résistance acquise peut également se produire lorsque les cellules tumorales modifient l'expression de leurs gènes en réponse à des molécules immunitaires dans le microenvironnement tumoral [127]. Par exemple, PD-L1 peut être surexprimé par les cellules tumorales en réponse à des cytokines immunitaires, tel que l'IFN- γ libéré par les lymphocytes T, limitant ainsi la fonction ces derniers [87, 132].

D'autres marqueurs de point de contrôle immunitaire tels que le lymphocyte activation gene 3 (*LAG-3*) et le T-cell immunoglobulin and mucin domain 3 (*TIM-3*) interfèrent avec l'activité des lymphocytes T [132, 133], entraînant une résistance acquise à l'immunothérapie lorsqu'ils sont surexprimés [134, 135].

Des résistances acquises contre les thérapies ciblées du mélanome peuvent survenir après quelques mois de traitements [119, 136]. La plupart de ces mécanismes de résistance impliquent une réactivation de la voie MAPK, en amont, en aval ou au niveau de *BRAF* [123, 137-141]. La seconde voie impliquée dans la résistance acquise est la voie PI3K/AKT [142, 143], une voie fortement liée avec la voie MAPK de par ses interactions avec celle-ci [144].

La maladie métastatique

1) Formation d'une cellule cancéreuse métastatique

Le développement de tumeurs secondaires dans une partie du corps éloigné de la tumeur primaire d'origine est appelé « métastase ». Les métastases sont la principale cause de l'échec des traitements anti-cancéreux et de la mortalité. Chez les patients atteints de cancer, un grand nombre de cellules cancéreuses sont libérées quotidiennement en circulation. Cependant, certains travaux expérimentaux sur le mélanome suggèrent que moins de 0,01% des cellules à potentiel métastatique sont susceptibles de s'implanter efficacement à distance [145, 146]. Le développement de métastases nécessite que les cellules cancéreuses quittent leur foyer primaire, circulent dans la circulation sanguine, subissent une pression dans les vaisseaux sanguins, s'acclimatent à un nouvel environnement cellulaire dans un foyer secondaire et échappent aux cellules immunitaires qui pourraient les détruire [147, 148]. Cette « activation de l'invasion et des métastases » est une caractéristique importante du cancer selon Hanahan et Weinberg [149]. En effet, l'invasion des tissus voisins et l'ensemencement sur des sites éloignés pour former des métastases reste une caractéristique centrale de la malignité cancéreuse. Après tout, les métastases constituent la principale cause de décès dans plus de 90 % des patients atteints de cancer [150].

Comprendre la dynamique de ce processus et identifier les composants moléculaires et cellulaires clés à chaque étape de la métastase tumorale permet de développer de nouvelles stratégies pour prévenir et contrôler les métastases tumorales via des thérapies ciblées.

2) La niche pré-métastatique

Une des étapes clé de la formation de métastases est l'entrée de cellules tumorales circulantes dans un foyer secondaire. Cette étape est grandement affectée par le

microenvironnement local que les cellules tumorales circulantes rencontrent, ce qui détermine si oui ou non la colonisation des cellules tumorales peut se produire. Les foyers secondaires ne reçoivent pas passivement les cellules cancéreuses envahissantes. En effet, le microenvironnement hôte, appelé niche pré-métastatique, est sélectivement amorcé par la tumeur primaire avant même l'initiation de métastases [151]. C'est l'hypothèse du « seed and soil » : les cellules tumorales pro-métastatiques (la « graine / seed ») colonisent des sites d'organes spécifiques (le « sol / soil ») où le micro-environnement est favorable aux métastases. Le développement d'une niche pré-métastatique est un processus en plusieurs étapes impliquant des facteurs sécrétoires et des vésicules extracellulaires qui induisent une augmentation de la perméabilité vasculaire, un remodelage de la matrice extra-cellulaire et une immunosuppression [151]. En plus de leur rôle dans l'amorçage de la niche pré-métastatique, les exosomes présentent des propriétés qui conduisent à l'organotropisme des cellules cancéreuses, c'est-à-dire que les cellules cancéreuses vont se diriger préférentiellement vers certains organes.

La nature de la cellule cancéreuse du foyer primaire détermine les différentes propriétés métastatiques en ce qui concerne la croissance et la réponse au traitement [152, 153]. Des études *in vivo* et *in vitro* montrent que les cellules cancéreuses métastatiques migrent individuellement [154]. Cependant, chez l'homme, on pense que l'ensemencement nécessite l'action conjointe d'un groupe de cellules tumorales se déplaçant ensemble [155], ce qui nous amène au rôle de la transition épithéliale-mésenchymateuse.

3) La transition épithélio-mésenchymateuse

La transition épithélio-mésenchymateuse est un processus de plasticité cellulaire embryonnaire réversible, par lequel une cellule épithéliale perd sa polarité et son adhésion à d'autres cellules, tout en gagnant en motilité et en caractéristiques mésenchymateuses [156]. La transition épithélio-mésenchymateuse est nécessaire lors de la délamination de la

crête neurale embryonnaire, d'où proviennent les mélanoblastes et les progéniteurs des mélanocytes [157, 158]. Ce processus est guidé par une reprogrammation transcriptionnelle, épigénétique et translationnelle intense, impliquant des facteurs de transcription associés à la transition épithélio-mésenchymateuse [159, 160].

Au cours du développement embryonnaire, les cellules peuvent faire la transition entre les états épithéiliaux et mésenchymateux d'une manière très plastique et dynamique. Un passage à l'état mésenchymateux, dans un processus de transition épithélio-mésenchymateuse, modifie les molécules d'adhésion exprimées par la cellule, lui permettant d'adopter un comportement migratoire et invasif. L'inverse de ce processus, la transition mésenchymateuse-épithéliale, est associée à une perte de cette liberté migratoire, les cellules adoptent une polarisation apico-basale et expriment les complexes jonctionnels qui caractérisent les tissus épithéiliaux [157].

La transition épithélio-mésenchymateuse a lieu en réponse à des facteurs de signalisation pléiotropes qui induisent l'expression de facteurs de transcription spécifiques (comme par exemple ceux des familles *ZEB*, *SNAI*, *TWIST*) et de miARN, ainsi que de régulateurs épigénétiques et post-traductionnels, dont beaucoup sont impliqués dans le développement embryonnaire, la cicatrisation des plaies, la fibrose et les métastases cancéreuses. En effet, les parallèles entre la plasticité cellulaire dans le développement embryonnaire et la progression du carcinome ont conduit à l'hypothèse que la transition épithélio-mésenchymateuse est un moteur central des tumeurs malignes dérivées de l'épithélium [161, 162]. Il a depuis été démontré que la transition épithélio-mésenchymateuse déclenche la dissociation des cellules des tumeurs primaires, qui migrent ensuite et se propagent vers des sites éloignés. C'est la transition mésenchymateuse-épithéliale qui déclenche alors l'arrêt de la migration, induisant ces mêmes cellules à proliférer et à ensemençer la nouvelle tumeur.

Ce processus présente une grande plasticité, les cellules ne font pas qu'osciller entre les états épithéliaux complets et mésenchymateux complets mais elles se déplacent plutôt à travers un spectre de phases intermédiaires. Cette plasticité permet aux cellules de s'attarder dans des étapes intermédiaires et de subir un programme de transition épithélio-mésenchymateuse partiel (Figure 9).

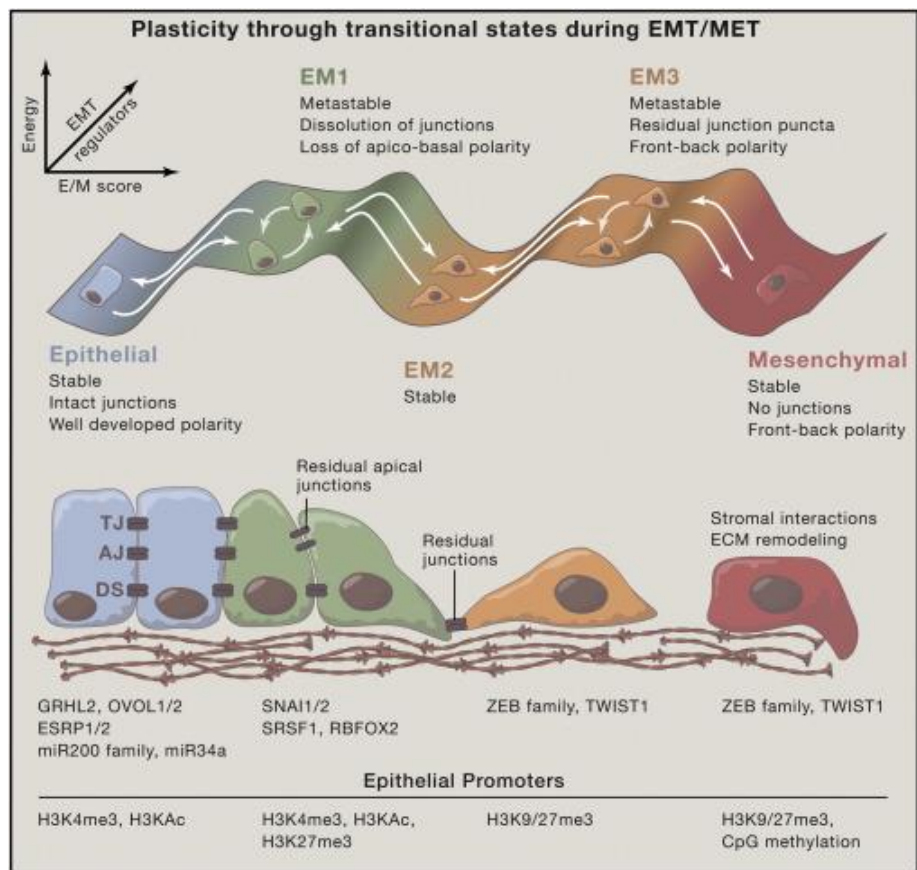


Figure 9 : Plasticité de la transition épithélio-mésenchymateuse
Schéma représentant différents stades de transition épithélio-mésenchymateuse d'une cellule, leurs caractéristiques et les marqueurs exprimés pendant celles-ci [156].

Un état partiel est associé avec de nombreux processus de développement, de cicatrisation des plaies, de fibrose et de cancer [163-169], évident par l'existence de phénotypes hybrides intermédiaires épithéliaux et mésenchymateux [170-173].

Les cellules portant ce phénotype hybride sont considérées comme « métastables » [174, 175], reflétant la flexibilité de ces cellules pour induire ou inverser le processus de transition [176]. Ces différentes phases intermédiaires présentent une expression de marqueurs différents, tel que *SNAI1* et *SNAI2*, *ZEB1* et *ZEB2* ainsi que *TWIST1* et *TWIST2*. L'E-

cadhérine (*CDH1*), les occludines et les cytokératines sont les marqueurs les plus couramment utilisés pour les études des marqueurs épithéliaux, et la N-cadhérine et la vimentine (*VIM*) pour les marqueurs mésenchymateux [157]. Les cellules de mélanome qui subissent une transition épithélio-mésenchymateuse présentant une augmentation de l'expression de *SNAI* sont beaucoup plus métastatiques que leurs cellules parentales, ce qui a été attribué à l'émergence de cellules CD4 régulatrices T exprimant Foxp3, un inducteur connu de l'immunosuppression dans les cellules régulatrices T [177].

La réactivation anormale de la transition épithélio-mésenchymateuse a été soigneusement caractérisée dans les cancers comme un processus de dédifférenciation en plusieurs étapes entraînant des métastases, une résistance aux médicaments et la rechute de la maladie [175, 178]. Malgré les nombreux travaux de recherche effectués sur le rôle de la transition épithélio-mésenchymateuse dans le cancer, son applicabilité dans le diagnostic et le traitement du cancer est restée limitée. Cela s'explique en partie en raison de l'hétérogénéité intrinsèque des cellules tumorales et du microenvironnement tumoral (par rapport à l'homogénéité relative des modèles de culture cellulaire sur lesquels sont effectués majoritairement les travaux de recherche). L'exécution de la transition épithélio-mésenchymateuse dans le cancer n'est pas homogène, ce qui renforce la nécessité de considérer la transition épithélio-mésenchymateuse comme un spectre d'états intermédiaires. Le front invasif tumoral, dans lequel le programme de transition est exécuté, a les caractéristiques d'un phénotype mésenchymateux, avec un système d'adhésion cellulaire affaibli. En revanche, la masse tumorale principale reste en grande partie épithéliale (Figure 10).

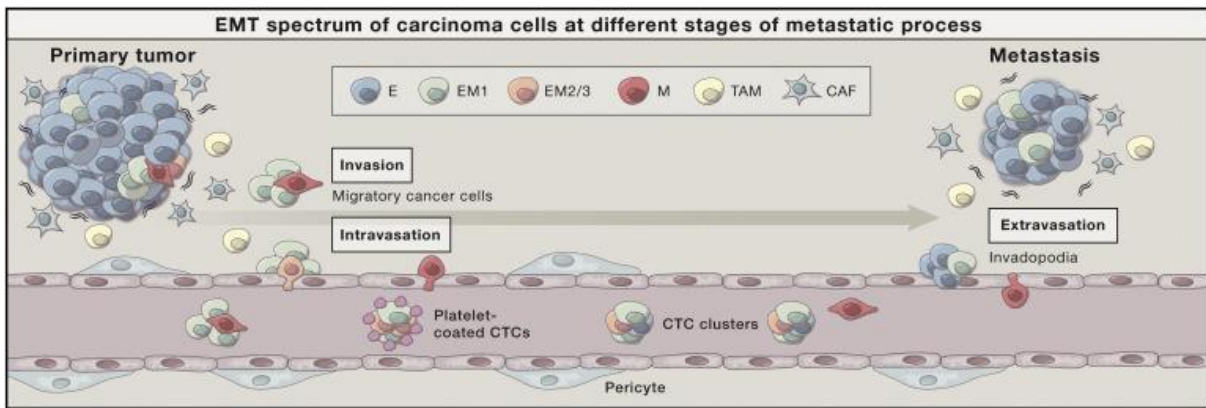


Figure 10 : La transition épithélio-mésenchymateuse dans le processus métastatique d'une cellule cancéreuse

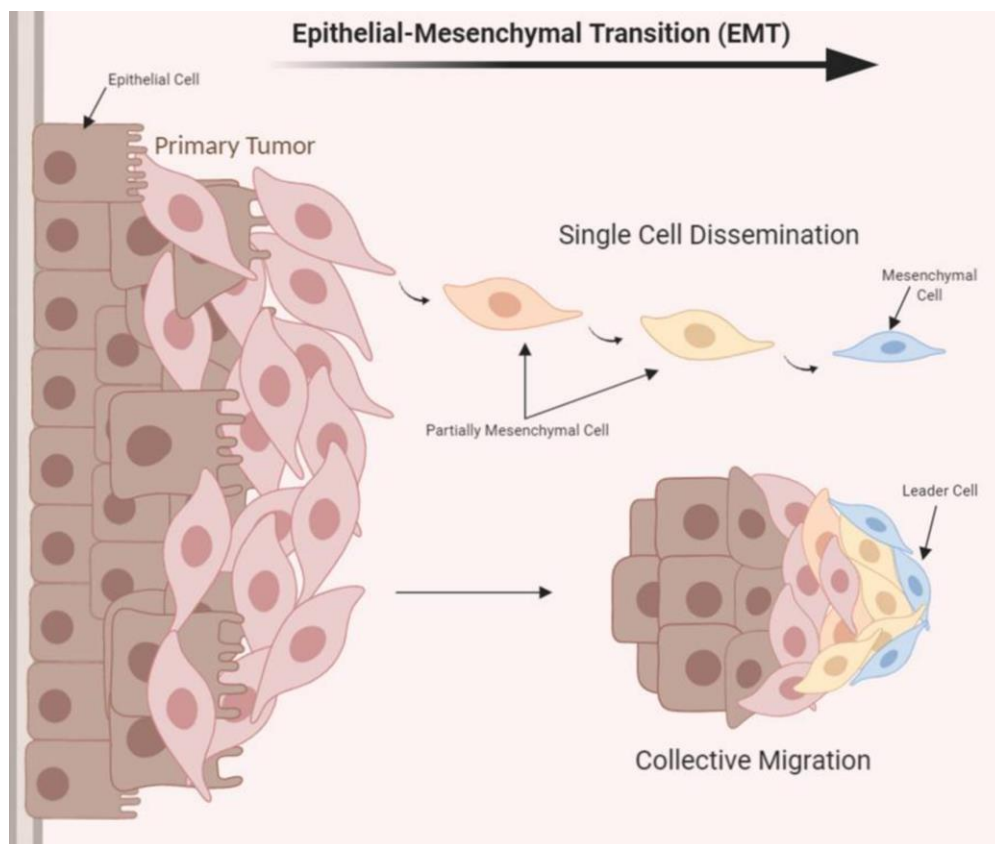
La transition épithélio-mésenchymateuse confère une résistance à la mort cellulaire induite par divers moyens à la fois dans les embryons et dans les cellules cancéreuses [157, 179], y compris celles qui subissent des traitements de type chimiothérapie [180]. Même dans les études qui trouvent une contribution limitée des cellules qui ont subi une transition épithélio-mésenchymateuse à l'établissement des métastases, le rôle de la transition épithélio-mésenchymateuse dans la chimiorésistance est clair [181, 182]. Néanmoins, les mécanismes moléculaires responsables de la résistance ne sont pas clairement identifiés. Deux hypothèses semblent se distinguer : i) la transition épithélio-mésenchymateuse pourrait provoquer la diminution de l'expression de gènes impliqués dans la mort cellulaire, ii) elle pourrait provoquer l'augmentation de l'expression de plusieurs protéines de transport de type ATP-Binding Cassette qui permettrait l'efflux d'un grand nombre de molécules, dont les chimiothérapies [178].

4) Intravasation et circulation des cellules tumorales

L'intravasation, c'est-à-dire la dissémination des cellules cancéreuses aux organes par le système vasculaire, est médiée activement ou passivement [183, 184]. Cela dépend du type de tumeur, du microenvironnement et de la vascularisation [185]. Pendant l'intravasation, les contraintes architecturales des tissus imposent certaines pressions mécaniques aux cellules tumorales envahissantes [186]. La compression nucléaire est particulièrement

difficile pour l'intégrité du noyau de la cellule. Cela provoque un réarrangement génomique, ce qui augmente le potentiel métastatique [186].

Le trajet circulatoire est difficile pour la plupart des cellules cancéreuses et peu de cellules arriveront à s'implanter dans un foyer secondaire. Les interactions entre les cellules tumorales et les composantes micro-environnementales de la circulation déterminent la survie et la capacité des cellules tumorales circulantes à éventuellement extravaser dans des sites éloignés [187-189]. La plupart des cellules tumorales circulantes circulent comme des cellules uniques, tandis que d'autres se déplacent en grappes (Figure 11, [190]).



*Figure 11: Migration collective de cellules de la tumeur primaire
Lorsque les cellules migrent en grappes, elles présentent des stades de transition
épithélio-mésenchymateuse différents.*

Cependant, les grappes de cellules circulantes sont beaucoup plus susceptibles de former des métastases [191]. En plus des cellules cancéreuses envahissantes, les grappes contiennent des cellules stromales et des composants immunitaires du microenvironnement d'origine qui contribuent à l'hétérogénéité de l'amas cellulaire et améliorent sa probabilité

de survie [173, 191-194]. Les neutrophiles participent à la formation des grappes et suppriment l'activation des leucocytes, ce qui augmente les chances de survie des cellules tumorales circulantes [195]. De plus, l'interaction des cellules tumorales circulantes avec les plaquettes conduit à la formation d'un bouclier de plaquettes autour des cellules cancéreuses qui empêche la détection de celles-ci par les cellules immunitaires et fournit la structure nécessaire pour supporter les contraintes physiques de la circulation [196-198].

Cependant, lorsque les cellules se détachent de leur matrice, elles subissent un stress qui augmente leur quantité de Fe^{2+} au sein de leur cytoplasme [199]. Cette augmentation de fer peut aboutir à une mort cellulaire avant même que la cellule n'ait pu atteindre un foyer secondaire.

5) Résistance à la mort cellulaire : la ferroptose

La mort cellulaire est cruciale pour le développement normal, l'homéostasie et la prévention des maladies hyperprolifératives telles que le cancer [200, 201]. Il existe de nombreux types de mort cellulaire, dont les plus connus sont l'apoptose, la nécrose, la nécroptose et l'autophagie [202]. Récemment, une nouvelle forme de mort cellulaire a été découverte : la ferroptose. Lors de ma thèse, je me suis particulièrement intéressée à cette dernière car la protéine PROM2, sujet de ma thèse, a été identifiée comme étant impliqué dans la ferroptose.

L'apoptose, également appelée mort cellulaire programmée, est le processus par lequel une cellule cesse de croître et de se diviser, et entre dans un processus qui entraîne finalement la mort contrôlée de la cellule sans déversement de son contenu dans le milieu environnant. L'initiation de l'apoptose dépend de l'activation d'une série de caspases. Il existe deux catégories de caspases, les caspases initiatrices et les caspases effectrices [203]. Une fois que les dommages cellulaires sont détectés, les caspases initiatrices (caspases 8 et 9) sont activées à partir de pro-caspases inactives et activent les caspases effectrices (caspases

3, 6 et 7). L'activation des caspases effectrices déclenche une cascade d'événements qui entraîne la fragmentation de l'ADN par l'activation des endonucléases, la destruction des protéines nucléaires et du cytosquelette, la réticulation des protéines, l'expression de ligands pour les cellules phagocytaires et la formation de corps apoptotiques [204, 205]. D'une manière générale, l'apoptose peut être distinguée de la forme non programmée de mort cellulaire (nécrose), à la fois visuellement au microscope et via un certain nombre de techniques de biologie moléculaire. Dans l'apoptose, les corps apoptotiques contenant le contenu de la cellule morte peuvent être phagocytés par les cellules environnantes [203], mais sont le plus souvent éliminés par les macrophages avant qu'ils ne se fragmentent, réduisant ainsi le risque de dommages collatéraux aux cellules environnantes. Contrairement à l'apoptose, la nécrose est une forme incontrôlée de mort cellulaire induite par une lésion externe, comme l'hypoxie ou l'inflammation [203]. Ce processus implique souvent une régulation positive de diverses protéines pro-inflammatoires, entraînant la rupture de la membrane cellulaire provoquant le déversement du contenu cellulaire dans les zones environnantes, entraînant une cascade d'inflammation et de lésions tissulaires. Contrairement à l'apoptose, la nécrose est une forme de mort cellulaire indépendante de l'énergie, où la cellule est si gravement endommagée par un choc soudain (rayonnement, chaleur, produits chimiques, hypoxie...) qu'elle est incapable de fonctionner. La cellule réagit généralement par gonflement (un processus connu sous le nom d'oncose) car elle ne parvient pas à maintenir l'homéostasie avec son environnement. En 2005, une nouvelle forme de mort cellulaire, qui présentait des caractéristiques de nécrose, mais qui semblait être programmée, a été identifiée. Cette forme de mort cellulaire a été appelée nécroptose (Degterev et coll., 2005). La nécroptose est une catégorie de nécrose fortement régulée (Li et coll., 2012a, b). Le processus de nécroptose est contrôlé dans un environnement déficient en apoptose par les protéines RIP1 et RIP3 interagissant avec les récepteurs. La voie d'activation de la nécroptose la plus connue est médiée par les récepteurs de mort (Oliveira

et coll., 2018), le plus souvent par le récepteur 1 du facteur de nécrose tumorale (TNFR1). Lorsqu'un ligand se lie à TNFR1, il recrute le complexe pro-survie I, qui se compose du domaine de mort associé au TNFR (TRADD) et RIP1, et de plusieurs ubiquines E3 ligases. Dans le complexe I, le RIP1 est polyubiquiné. La dé-ubiquitination ultérieure de RIP1 entraîne la formation de complexes IIa ou IIb. Le complexe IIa active la caspase 8 et entraîne l'apoptose, alors que lorsque la caspase 8 est inhibée, le complexe IIb se forme et active la nécroptose.

L'autophagie, quant à elle, est un processus par lequel des composants cellulaires tels que des macroprotéines ou même des organites entiers sont séquestrés dans les lysosomes pour être dégradés [206, 207]. Les lysosomes sont alors capables de digérer ces substrats, dont les composants peuvent soit être recyclés pour créer de nouvelles structures cellulaires et/ou organites, soit être utilisés comme source d'énergie. L'autophagie peut être initiée par une variété de facteurs de stress, notamment par la privation de nutriments ou peut résulter de signaux présents lors de la différenciation cellulaire, de l'embryogenèse et à la surface des organites endommagés [207]. Il a également été démontré que l'autophagie est impliquée à la fois dans le système immunitaire adaptatif et inné, où elle peut dégrader les agents pathogènes intracellulaires et délivrer des antigènes aux CMH de classe II et initier le transport des acides nucléiques viraux vers les récepteurs de type Toll [208]. Bien que l'autophagie soit souvent utilisée pour recycler les composants cellulaires, elle peut entraîner la destruction de la cellule et a ainsi été liée à l'élimination des cellules sénescents des tissus âgés et à la destruction des lésions néoplasiques [207]. L'absence d'autophagie et le développement potentiel d'un cancer ont été associés (en particulier chez les organismes âgés) à l'accumulation d'agrégats protéiques dans les neurones et au développement de maladies neurodégénératives, y compris dans la maladie d'Alzheimer [209].

Enfin, la ferroptose a été initialement découverte et établie dans les cellules tumorales, elle joue un rôle vital dans les processus pathologiques tels que les tumeurs, les maladies neurodégénératives et les lésions d'ischémie tissulaire [210]. La ferroptose est une mort cellulaire programmée dépendante du fer, qui est différente de la nécrose cellulaire traditionnelle, de l'apoptose et de l'autophagie à la fois d'un point de vue morphologique, biochimique et génétique. C'est un mode de mort cellulaire dans lequel se produit une peroxydation lipidique importante [211-213]. L'essence de la ferroptose est la mort oxydative des cellules causée par l'accumulation d'ions fer Fe^{2+} . Biologiquement, la caractéristique de la ferroptose est l'accumulation de lipides réactifs à l'oxygène dépendant du fer et l'activation du système de protéine kinase activée par les mitogènes [214]. Morphologiquement, une fois que la ferroptose se produit, le noyau de la cellule reste de taille normale mais présente un manque d'agglutination de la chromatine. Dans le même temps, les mitochondries rétrécissent et les crêtes mitochondriales sont réduites ou disparaissent. La membrane externe est brisée et la densité de la membrane bilatérale augmente dans les mitochondries. Le Fe^{2+} sert de forme dominante de fer dans le pool de fer labile intracellulaire. Ce pool de fer labile est régulé par l'homéostasie intracellulaire du fer. Les radicaux libres et les peroxydes générés après la réaction redox de Fe^{2+} et Fe^{3+} peuvent réagir avec les acides gras poly-insaturés contenant des phospholipides dans la membrane cellulaire pour faciliter la propagation de la peroxydation lipidique sur la membrane cellulaire. Ce processus produit beaucoup d'espèces réactives de l'oxygène et induit une ferroptose cellulaire [215-217]. L'application d'antioxydants lipidiques au niveau des membranes cellulaires, induisant une dégradation de ceux-ci, peut réduire considérablement l'apparition de la ferroptose cellulaire [218-220]. En outre, la peroxydation lipidique dépendante du fer peut être atténuée par GPX4, l'élimination des protéines piégeant les radicaux, les inhibiteurs spécifiques de la ferroptose et la chélation du fer. Des agents chélateurs du fer, telle que la deferoxamine,

peuvent avoir efficacement un rôle d'inhibiteur sur l'apparition de la ferroptose. Au contraire, la supplémentation de fer par érastine ou RSL3 aggrave ce processus [221] (Figure 12).

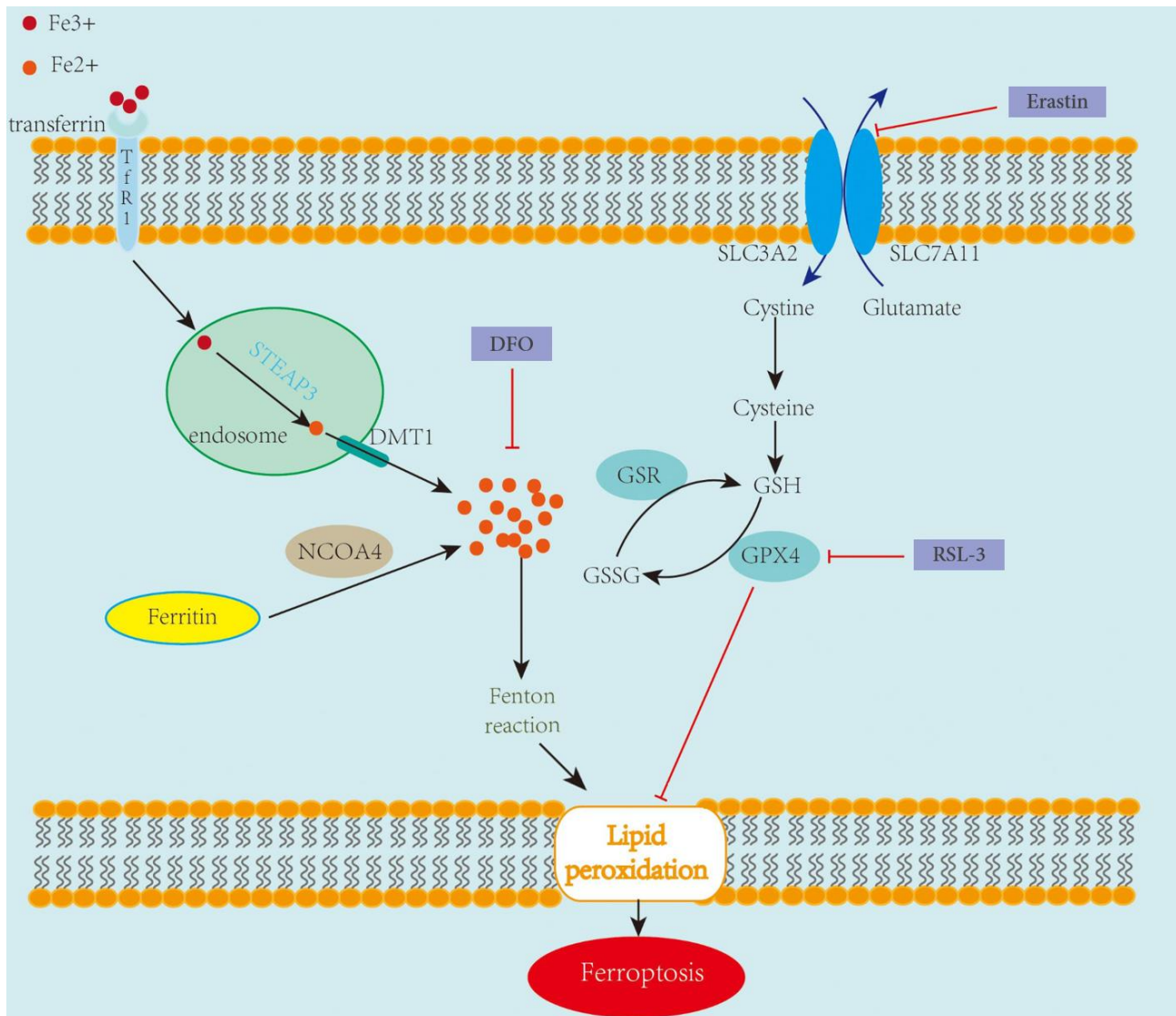


Figure 12 : Voie de signalisation de la ferroptose

La ferroptose est une mort cellulaire dépendante du fer caractérisée par l'accumulation de peroxydation lipidique. Les ions fer libres s'accumulent et se transforment en ions Fe²⁺ par une réaction de Fenton, conduisant à la formation de peroxydes lipidiques et finalement de ferroptose. Inhiber SLC7A11 (par un traitement à l'érastine) ou GPX4 (par un traitement au RSL-3) conduit à l'accumulation de peroxydation lipidique, entraînant la mort des cellules ferroptotiques. La deferoxamine (DFO), un chélateur du fer, permet d'inhiber la ferroptose. Image modifiée de Chen Y, and al. [222]

Dans le mélanome, la sensibilité à la ferroptose influence le potentiel métastatique des cellules tumorale. Cette sensibilité est augmentée lors de l'inhibition des points de contrôles immunitaires [223].

Prominine-2, nouvelle cible thérapeutique potentielle

1) Structure de Prominine 2

Prominine-2 (PROM2) a été identifiée en 2002 dans les cellules épithéliales de la prostate du rat, en tant que gène régulé par la testostérone [224].

PROM2 est une glycoprotéine transmembranaire de 112 kDa avec une structure tridimensionnelle proche de la prominine-1 (PROM1 ou CD133). PROM2 est composé de cinq segments transmembranaires et de deux grandes boucles extracellulaires glycosylées (Figure 13) [225]. Même si PROM2 est structurellement lié à PROM1, leurs protéines ne présentent que 32% d'identité de leurs acides aminés. PROM2, comme PROM1, est physiologiquement associé aux protubérances de la membrane plasmique.

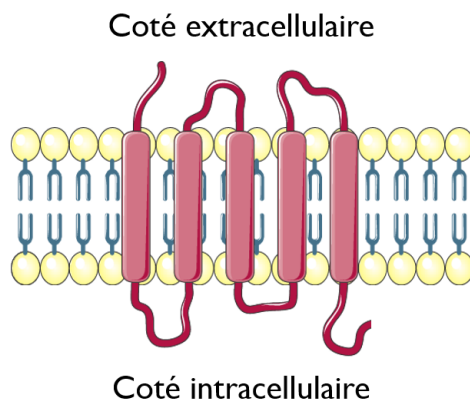


Figure 13 : Schéma de la protéine membranaire pentaspan PROM2

2) La famille des prominines

PROM2 est un paralogue de PROM1 et les deux sont des protéines liant le cholestérol. Leurs expressions tissulaires diffèrent car PROM2 n'est exprimé que dans les cellules épithéliales contrairement à PROM1, qui peut être exprimé dans différents types de cellules. Dans les tissus où ils sont tous deux exprimés, il existe une colocalisation de PROM2 avec PROM1 dans les protubérances de la membrane plasmique [225]. Il a été démontré que PROM2 compense la perte de PROM1 dans les cellules précurseurs de l'hippocampe des souris knock-out PROM1. Une régulation à la hausse de PROM2 est détectée chez les

souris déficientes en *PROM1*, indiquant un mécanisme compensatoire potentiel entre *PROM1* et *PROM2* [226]. En revanche, la perte de *PROM1* dans la rétine murine, qui conduit à la cécité, n'est pas compensée par *PROM2* [226]. Il n'y a pas de *PROM2* dans les cellules normales de la rétine, ce qui peut expliquer l'absence de compensation : *PROM2* remplace fonctionnellement l'absence de *PROM1* dans les tissus qui contiennent à la fois *PROM1* et *PROM2*. Il existe une homologie de 90% entre la séquence de *PROM2* chez l'homme, la souris et le rat [224].

3) Expression physiologique de *PROM2*

Chez l'homme, l'ARNm *PROM2* semble être physiologiquement exprimé dans divers tissus normaux, y compris la prostate, le placenta, le foie, les reins, la trachée, le tube digestif, l'œsophage, les glandes salivaires, la glande thyroïde, l'estomac, la moelle épinière, la glande mammaire et la glande surrénale [224, 227-229]. Il n'y a pas de différence majeure dans l'expression physiologique entre le rongeur et l'homme, sauf l'absence de *PROM2* dans les testicules des rongeurs [224, 226, 227, 230, 231]. L'expression de *PROM2* est limitée aux cellules épithéliales et est distribuée de manière non polarisée entre les membranes plasmiques apicale et basolatérale. Cependant, son expression est plus élevée dans les cils, les microvillosités et d'autres structures acétylées protubérantes tubuline-positives [232].

4) Rôle physiologique de *PROM2* (Figure 14)

PROM2 est associé à des membranes résistantes aux détergents de manière dépendante du cholestérol, ce qui suggère son incorporation dans les micro-domaines membranaires. *PROM2* se lie directement au cholestérol situé au niveau de la membrane plasmique [232].

a. Inhibition de l'endocytose cavéolaire

En utilisant des lignées cellulaires humaines et de hamster, PROM2 s'est avéré co-localisé avec des radeaux lipidiques dans les protrusions membranaires et réduire l'endocytose cavéolaire. Ce mécanisme a été restauré par l'ajout de cholestérol exogène [233]. L'endocytose cavéolaire est un processus cellulaire par lequel les constituants de la membrane plasmique sont internalisés dans de petites vésicules riches en cholestérol qui sont appelées cavéoles. La redistribution du cholestérol dans les protubérances en raison de l'expression de PROM2 l'éloigne des cavéoles, ce qui entraîne une augmentation de la phosphorylation de la cavéoline-1, qui inhibe l'endocytose dépendante de Cdc42. La surexpression de PROM2 entraîne des changements significatifs dans l'organisation et la fonction de la membrane plasmique : augmentation des protubérances, augmentation de la phosphorylation de la cavéoline-1, diminution des cavéoles au niveau de la membrane plasmique et diminution de l'endocytose cavéolaire en phase liquide [233].

Chez la souris, PROM2 est impliqué dans la régulation de l'endocytose cavéolaire au début de la grossesse. À ce stade, les cellules épithéliales de l'utérus subissent une transformation de la membrane plasmique avec perte d'adhérences focales pour faciliter l'implantation des blastocystes. L'internalisation des molécules d'adhésion au niveau de la membrane basale est entraînée par l'endocytose cavéolaire et directement associée à la redistribution latérale de PROM2, permettant la migration des cellules épithéliales utérines [234]. La fonction de réorganisation de la membrane peut être un mécanisme par lequel PROM2 affecte la différenciation ainsi que la migration cellulaire et l'invasion.

b. Résistance à la ferroptose

La ferroptose est une mort cellulaire régulée caractérisée par une accumulation létale d'espèces d'oxygène réactives aux lipides causé par une accumulation de fer, comme expliqué dans un paragraphe précédent. Le détachement des cellules de la matrice

extracellulaire est un stimulus pro-ferroptotique. Cependant, dans des conditions physiologiques, les cellules détachées expriment des gènes pro-survie, dont *PROM2*, qui stimule la formation de corps multi-vésiculaires contenant de la ferritine. Ces corps multi-vésiculaires exprimant *PROM2* transportent le fer hors de la cellule, inhibant ainsi la ferroptose [199].

Dans les cellules cancéreuses du sein MCF10, une augmentation de l'expression de l'ARNm de *PROM2* empêche la ferroptose à la suite du détachement des cellules. En revanche, la régulation négative de *PROM2* augmente la mort cellulaire *in vitro* [199].

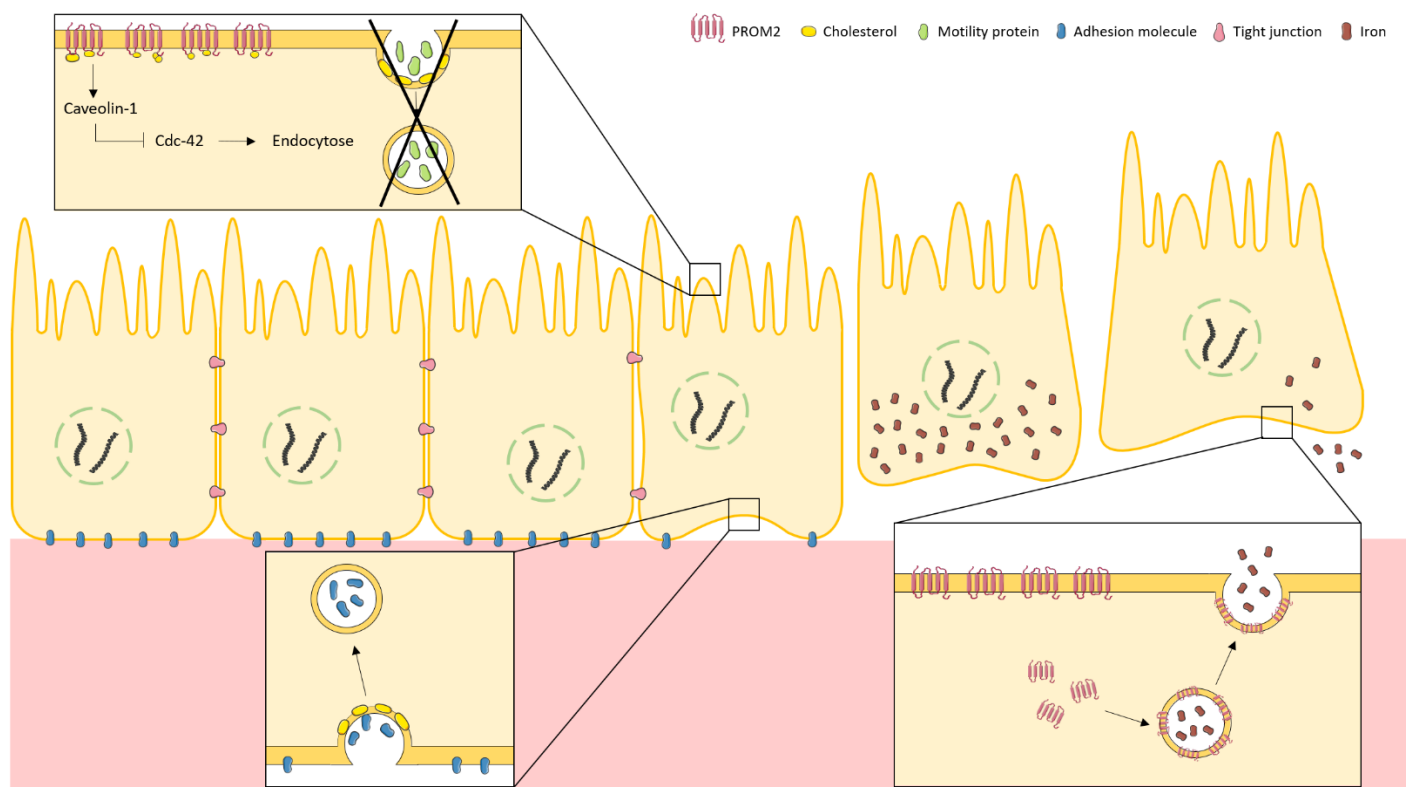


Figure 14 : Rôle physiologique de *PROM2* dans l'endocytose cavéolaire et la ferroptose.

5) Expression anormale de *PROM2* dans les cancers

PROM2 s'est avéré agir comme un oncogène ou un gène suppresseur de tumeur selon le type de cancer. La surexpression de l'ARNm et de la protéine *PROM2* est associée à une faible survie globale dans le mélanome et le cancer du poumon [67, 235, 236]. *PROM2* est également régulé à la hausse de manière omniprésente dans les cellules cancéreuses du

pancréas. Une expression plus élevée de *PROM2* est associée à des temps de survie globale raccourcis chez les patients diagnostiqués avec un cancer du pancréas [237]. En revanche, une faible expression de *PROM2* est associée à un mauvais pronostic dans le lymphome, le sarcome, le sang, le côlon et les cancers de l'œsophage (Tableau 3).

Type de cancers	Type d'échantillons	Expression de <i>PROM2</i> dans le cancer	Survie du patient	Références
Moelle osseuse	ARN de tumeurs	Elevée	-	[236]
Rein	ARN de tumeurs	Elevée	Mauvaise	[236, 238]
Poumon	ARN de tumeurs	Elevée	Mauvaise	[236]
Pancréas	ARN et protéines de tumeurs	Elevée	Mauvaise	[237]
Mélanome	ARN et protéines de ganglions lymphatiques métastatiques	Elevée	Mauvaise	[67]
Ovaire	ARN de tumeurs	Elevée / Faible	Mauvaise	[236]
Estomac	ARN de tumeurs	Faible	-	[236]
Colorectal	ARN de tumeurs	Faible	Mauvaise	[236]
Œsophages	ARN de tumeurs	Faible	Mauvaise	[236]
Oncocytome	ARN de tumeurs	Faible	-	[239]
Leucémie	ARN de tumeurs	Faible	Mauvaise	[236]
Yeux	ARN de tumeurs	Faible	Mauvaise	[236]
Lymphome	ARN de tumeurs	Faible	Mauvaise	[236]
Prostate	ARN de tumeurs	Faible	-	[236]
Sarcome	ARN de tumeurs	Faible	Mauvaise	[236]

*Tableau 3 : Association entre l'expression de *PROM2* et la survie des patients dans les cancers humains*

Dans notre laboratoire, nous avons effectué une analyse transcriptomique sur des cellules microdisséquées au laser de 51 ganglions lymphatiques métastatiques de mélanome. Nous avons montré que *PROM2* était significativement associé au risque de métastases à distance, en particulier de métastases cérébrales, et à une diminution de la survie [67]. Ce travail a servi de base à mon projet de thèse et sera expliqué plus en détail dans un paragraphe suivant.

6) Fonction biologique dans la carcinogénèse

a. Résistance aux traitements cancéreux

La surexpression de *PROM2* dans le cancer du pancréas est associée à la chimiorésistance à la gemcitabine à la fois *in vitro* et *in vivo* de modèles murins. *PROM2* active la voie de signalisation Akt. L'interaction *PROM2*-Akt induit la phosphorylation BAD et Caspase-9, qui inhibent l'apoptose induite par la gemcitabine [237]. Chez les patients atteints d'un carcinome de la tête et du cou, la surexpression de *PROM2* a été associée à la protéine tumorale p53 (TP53), suggérant un lien entre la voie de signalisation P53 et l'expression de *PROM2*. La mutation P53 est plus résistante au cisplatine que les cancers sans mutation *TP53*. *PROM2* s'est avéré être régulé à la hausse dans le cancer muté *TP53* et peut donc être impliqué dans la résistance au traitement [240].

b. Biomarqueur de risque métastatique et de survie diminuée dans le mélanome

Notre unité de recherche a effectué une étude préliminaire à laquelle j'ai participé, portant sur 101 patients atteints initialement de mélanomes métastatiques ganglionnaires (stade III), et dont les données cliniques évolutives étaient connues avec une médiane de suivi de 48 mois [67]. Les patients sélectionnés pour cette étude ont été divisés en 3 groupes en fonction de l'absence d'évolution métastatique à distance, de la survenue de métastases cérébrales au cours du suivi, ou bien d'autres localisations métastatiques mais sans

métastase cérébrale. Le premier groupe était constitué de patients avec seulement des métastases ganglionnaires, le second groupe était constitué de patients sans métastases cérébrales mais avec d'autres localisations métastatiques telles que les poumons ou le foie, et le troisième groupe était lui constitué de patients présentant des métastases à distance dont des métastases cérébrales. La médiane de survie était significativement plus courte chez les patients ayant des métastases cérébrales en comparaison des patients qui n'en présentaient pas (Figure 15).

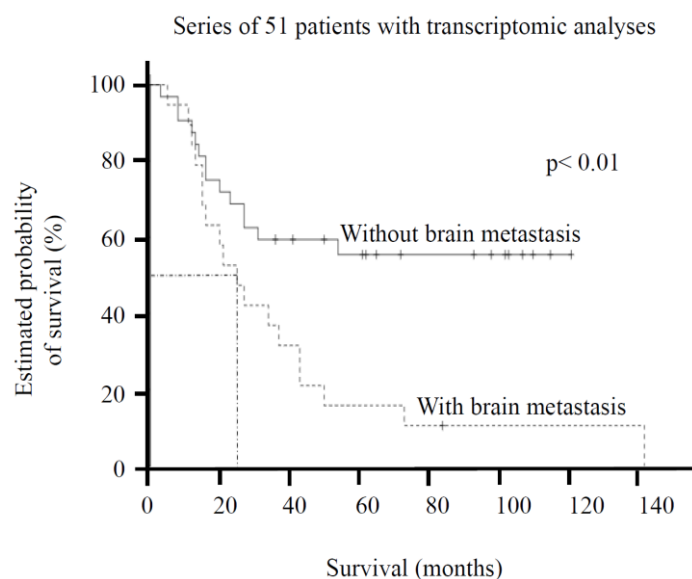


Figure 15 : Courbe de survie de patients présentant un mélanome métastatique avec ou non des métastases cérébrales.

A partir des prélèvements de fragments congelés des métastases ganglionnaires de ces 101 patients, une microdissection laser a été effectuée afin d'obtenir au minimum 1500 cellules tumorales avec une bonne qualité d'ARN, permettant une analyse transcriptomique à haut débit.

L'analyse comparative des patients ayant développé des métastases cérébrales par rapport à ceux n'en ayant pas développé a permis d'identifier plusieurs gènes surexprimés dont *PROM2*. Les données de transcriptome ont d'abord été confirmées en qRT-PCR : l'expression en ARN de *PROM2* était significativement plus forte dans les métastases ganglionnaires de patients qui ont développés des métastases cérébrales par rapport aux

patients qui n'en ont pas développé. Cette augmentation était significative et graduelle du premier groupe de patients au troisième groupe (Figure 16).

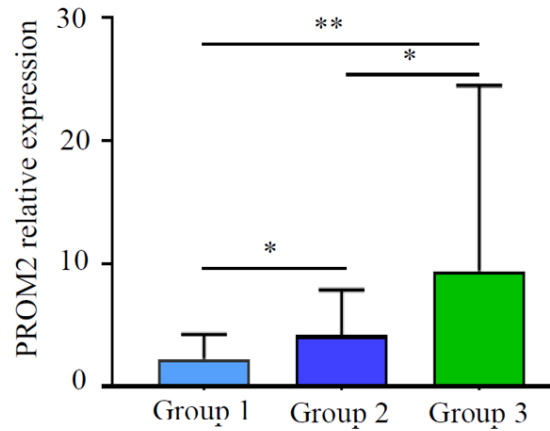


Figure 16 : Expression en ARN de PROM2 dans les ganglions lymphatiques métastatiques des patients avec seulement des métastases ganglionnaires de mélanomes (Group 1), des patients avec également d'autres localisations métastatiques (Group 2) dont cérébrales (Group 3).

Cela a également été démontré avec l'expression protéique de PROM2 par immunohistochimie sur des métastases ganglionnaires. Il a été montré que le score immunohistochimique était significativement plus élevé chez les patients avec des métastases cérébrales en comparaison aux autres patients (Figure 17).

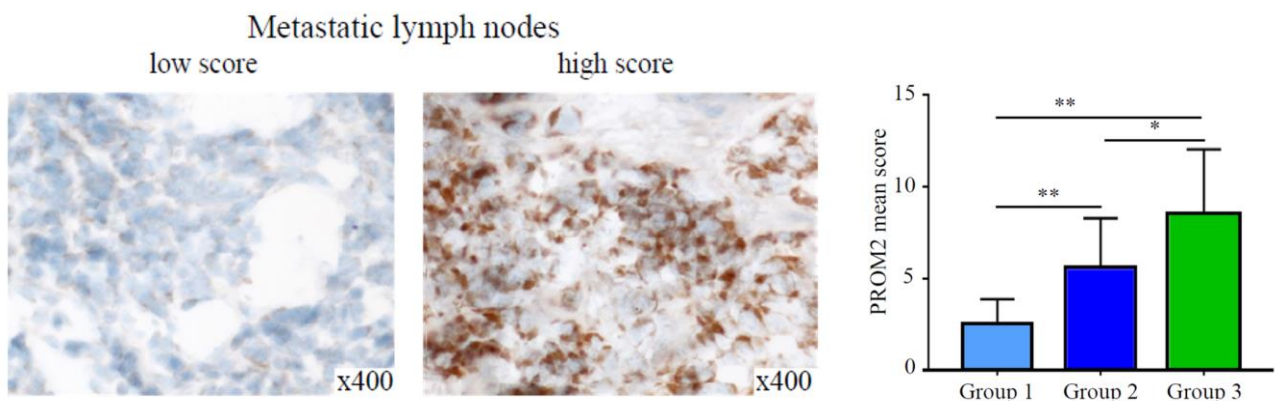


Figure 17: Score immunohistochimique de PROM2 dans les ganglions lymphatiques métastatiques de mélanome

A droite, illustrations d'immunomarquage PROM2 de ganglions lymphatiques métastatiques de mélanome présentant un score faible (low score) et un score élevé (high score) de PROM2. A gauche, histogramme de la moyenne des scores immunohistochimiques observés dans les ganglions lymphatiques métastatiques chez des patients avec seulement des métastases ganglionnaires de mélanomes (Group 1), des

patients avec également d'autres localisations métastatiques (Group 2) dont cérébrales (Group 3).

Une corrélation entre le score de PROM2 et la survie a pu être effectuée. La survie globale était plus longue pour le premier groupe avec les patients présentant uniquement des métastases ganglionnaires sans métastases à distance par rapport aux deux autres groupes de patients (Figure 18).

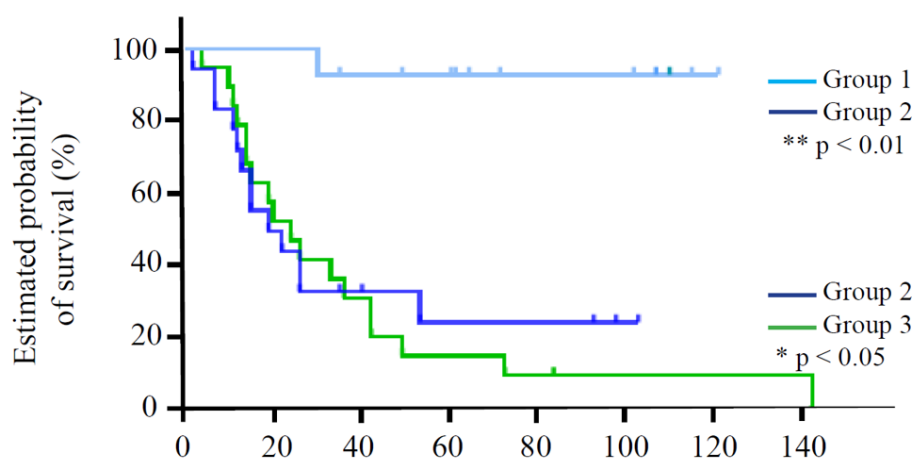


Figure 18 : Courbes de survie des patients présentant seulement des métastases ganglionnaires de mélanomes (Group 1), des patients avec également d'autres localisations métastatiques (Group 2) dont cérébrales (Group 3).

Cette étude a permis d'identifier *PROM2* comme biomarqueur prédictif du risque de métastases cérébrales et d'une survie significativement diminuée. Le score de *PROM2* permet de discerner le risque de métastases à distance. Ces résultats ouvrent des perspectives pour utiliser *PROM2* comme marqueur pronostique et surtout comme cible thérapeutique.

Objectifs et stratégie envisagée

L'objectif de ma Thèse de Sciences était de poursuivre le travail précédemment effectué par l'équipe de recherche. *PROM2* ayant été identifié comme bio-marqueur prédictif du

mélanome métastatique, ce travail a eu pour but de comprendre le rôle biologique, encore peu connu, de ce bio-marqueur.

Afin de valider l'implication de *PROM2* dans l'apparition de métastases ainsi que dans l'inhibition de la ferroptose, j'ai utilisé plusieurs modèles différents : des lignées cellulaires *in vitro*, en 3D sous forme de sphéroïdes, *in vivo* sous forme de xénogreffes et d'injections en intraveineuse, ainsi que des modèles animaux de souris Nude dérivées de patients.

Lors de ce travail, j'ai tout d'abord modulé l'expression du gène *PROM2* dans des lignées cellulaires afin d'obtenir les modèles biologiques nécessaire pour mes diverses expériences, à savoir l'étude de l'impact de l'expression de *PROM2* sur l'invasion, la migration, la transition épithélio-mésenchymateuse et la ferroptose.

Pour les modèles de xénogreffes de souris dérivées de patients, j'ai dû déterminer l'expression de *PROM2* dans chacun des modèles afin de poursuivre des expériences similaires à celles effectuées avec les lignées cellulaires de mélanomes.

Matériel et méthodes

Échantillons humains

Des échantillons de biopsie fixés au formol, provenant de patients atteints de mélanome métastatique ou de carcinome rénal métastatique à cellules claires, ont été inclus dans cette étude. Conformément à la loi française sur la bioéthique (2004-800; 8 juin 2004), tous les patients avaient été informés de l'utilisation à des fins de recherche de la partie de leurs échantillons restante après l'établissement du diagnostic, et aucun ne s'y est opposé. Le consentement a été obtenu de chaque patient.

Des xénogreffes issues de patients sont déjà mises en place depuis plus de dix ans dans l'unité de recherche UMR_S942, à partir de biopsies humaines de mélanome, de cancer du sein ou du rein. Le Comité de Protection des Personnes a approuvé cette étude (CPP Ile de France n°13218, [241]).

Lignées cellulaires de mélanome humain

La lignée cellulaire A375 de mélanome humain a été achetée auprès de Sigma Aldrich (Merck, Allemagne) et la lignée cellulaire Sk-Mel-28 a été achetée auprès d'American Type Culture Collection (ATCC, États-Unis). Les lignées cellulaires ont été cultivées dans une atmosphère humidifiée contenant 5 % de CO₂ à 37 °C. Les cellules ont été cultivées dans du Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) avec un taux élevé de glucose (Gibco) complété par 1% de pénicilline / streptomycine (Sigma Aldrich) et 10% de sérum de cheval (Gibco).

Modulation de l'expression de *PROM2* dans des lignées cellulaires de mélanome

Afin de moduler l'expression de *PROM2* dans des lignées cellulaires de mélanome, la technique du « Clustered regularly interspaced short palindromic repeats-CRISPR-protéine 9 » également appelé Crispr-Cas9 a été choisi. Cette technique utilise un ARN guide d'une vingtaine de paires de bases qui va se fixer sur la séquence cible. Une enzyme, la Cas9, va ensuite être utilisé comme une « paire de ciseaux » qui va découper les brins d'ADN dans le but de retirer ou d'ajouter des séquences de gènes. Ce mécanisme a permis de supprimer une partie de la séquence du gène *PROM2* afin de réaliser un knock-out et également d'introduire au niveau de la région du promoteur un enhancer permettant une augmentation de l'activité de ce même promoteur.

1) Etablissement de lignées de mélanome knock-out pour *PROM2*

Pour le knock-out, 4.10^5 cellules A375 ou Sk-Mel-28 ont étéensemencées dans des plaques 6 puits pour atteindre 70% de confluence. Le lendemain, les cellules ont été transfectées avec le kit d'élimination du gène humain prominine 2 par crispr (Origene) en utilisant Lipofectamine 3000 (Invitrogen) selon les instructions du fabricant. Après 48h, les cellules knock-out ont été sélectionnées en utilisant une dose croissante de puromycine pour tuer toutes les cellules non transfectées. Une dilution limite a ensuite été réalisée pour obtenir six clones. Les cellules knock-out *PROM2* ont été nommées A375 KO et Sk-Mel-28 KO.

2) Etablissement de lignées de mélanome surexprimant *PROM2*

Pour la surexpression de *PROM2*, 4.10^5 cellules A375 ou Sk-Mel-28 ont étéensemencées dans des plaques 6 puits pour atteindre 70% de confluence. Le lendemain, les cellules ont été transfectées avec le kit d'activation de la prominine 2 humaine par crispra (Origene) en

utilisant Lipofectamine 3000 (Invitrogen) selon les instructions du fabricant. Après une semaine, une dilution limite a été effectuée pour obtenir cinq clones. Les cellules A375 et Sk-Mel-28 surexprimant *PROM2* ont été nommées respectivement A375 PROM2 et Sk-Mel-28 PROM2.

3) Validation de la modulation de l'expression de *PROM2* dans les lignées de mélanomes

Le knock-out et la surexpression de *PROM2* ont été confirmés par RT-qPCR et immunofluorescence. Pour l'immunofluorescence, les lignées cellulaires ont été cultivées séparément sur des lames avec des chambres de culture (BD Falcon™). Ensuite, une méthode d'immunofluorescence indirecte a été réalisée en utilisant l'anticorps monoclonal anti-*PROM2* humaine (Clone 13A9, 1/50, Origene, USA) comme anticorps primaire. Les marquages ont été effectués avec le kit de détection Tyramide 488CF (Biotium, USA), un milieu de montage fluorescent avec DAPI a été utilisé pour la visualisation des noyaux (E19-18, GBI labs, USA). La fluorescence a été observée à un grossissement de 400x sur un microscope Provis AX70 (Olympus, Tokyo) avec un filtre FITC pour la détection du 488CF et un filtre DAPI pour la visualisation des noyaux.

Etude des caractéristiques des cellules

1) Test de prolifération

Pour chaque lignée cellulaire, transfectée ou non, 6000 cellules par puits ont étéensemencées dans des plaques de 96 puits. Trois puits de chaque lignée cellulaire ont été comptés chaque jour sur lame KOVA pendant 5 jours.

2) Test de migration

Les évaluations de la migration cellulaire ont été réalisées à l'aide de chambres de Boyden sur des plaques de 12 puits, avec un insert de culture cellulaire de 10,3 mm de diamètre et des pores membranaires de 8 μm (Becton Dickinson, France). La migration a été évaluée sur chaque lignée cellulaire, transfectée ou non. Pour chaque expérience, $3 \cdot 10^4$ cellules ont étéensemencées dans la chambre supérieure dans un milieu sans sérum de cheval et les chambres inférieures ont été remplies de milieu DMEM à haute teneur en glucose complété par 10% de sérum de cheval à 37 ° C dans une atmosphère de CO₂ à 5%. Après 24, 48 et 72 heures d'incubation, les cellules de la face supérieure ont été enlevées et les cellules de la face inférieure du filtre ont été fixées, colorées avec du crystal violet (Sigma Aldrich, États-Unis) et comptées. Dix champs ont été analysés sur chaque filtre et les résultats ont été exprimés sous forme de moyennes. Chaque procédure a été effectuée en trois exemplaires.

3) Test d'invasion

a. Lignées cellulaires

Pour l'évaluation de l'invasion des lignées cellulaires, le protocole suivi est le même que celui de l'évaluation de la migration, à la différence des chambres Boyden qui ont été au préalable recouvertes d'une fine couche de Matrigel (Falcon, MA, USA).

b. Sphéroïdes formés à partir des lignées cellulaires

Les sphéroïdes des trois lignées cellulaires ont été générés dans des micro-puits d'agarose d'un diamètre et d'une profondeur de 200 μm . Les micro-puits ont été fabriqués directement dans chaque puits d'une multi-plaque 96 puits en versant 50 μL d'agarose chaude à 2% (Sigma), puis en plaçant un tampon imprimé en 3D qui a 50 piliers de 200 μm de diamètre et de hauteur. L'agarose se solidifie en moins de 5 minutes à température ambiante, le tampon est ensuite retiré du puits, avec des micro-puits d'agarose fabriqués à l'intérieur.

Les cellules ont été centrifugées dans les micro-puits d'agarose de 200 µm à une densité de 200 cellules par puits. Pour les trois lignées cellulaires, il en a résulté la formation de sphéroïdes après 1 jour, qui se développent au cours des jours suivants. Les trois lignées cellulaires ont montré le même taux de croissance des sphéroïdes. Pour le test d'invasion, 50 µL par puits de collagène froid à 4°C à 2 mg/mL (Corning) ont été versés sur les sphéroïdes formés, puis placés à 37°C pour la gélification. 100µl de milieu complet ont ensuite été ajoutés au puits. Des images de l'invasion des sphéroïdes ont été prises à 24 heures puis 48 heures.

Quantification de l'expression génique

1) Q-RT-PCR

Pour les lignées cellulaires, l'ARN total a été extrait de 10⁶ cellules à l'aide de RNeasy-Mini-Kit (Qiagen, France) et quantifié sur NanoDrop (LabTech, France). Pour les xénogreffes tumorales, l'ARN total a été extrait de 20 coupes congelées de 5 µm. L'ARN total a été extrait à l'aide de RNeasy-Mini-Kit (Qiagen, France) et quantifié sur NanoDrop (LabTech, France). L'expression du gène *PROM2* humain a été évaluée à l'aide de l'amorce *PROM2* humaine Hs00376331_m1 (Thermofisher). L'expression des gènes de transition épithéliale à mésenchymateuse ont été évaluée à l'aide d'amorces humaines *ZEB1* (Hs00232783_m1), *ZEB2* (Hs00207691_m1), *SNAI1* (Hs00195591_m1), *SNAI2* (Hs00950344_m1), *TWIST1* (Hs01675818_s1), *TWIST2* (Hs02379973_s1), *CDH1* (Hs01023894_m1) et *VIM* (Hs00185584_m1) (Thermofisher). L'expression du gène *CAV1* humain a été évaluée à l'aide de l'amorce humaine *CAV1* Hs00971716_m1 (Thermofisher). Avant l'amplification par qPCR, l'ARN total a été transcrit inversement (ADNc) à l'aide d'amorces aléatoires et de l'enzyme transcriptase inverse GoScriptTM (Promega, France). Les réactions qPCR ont été réalisées à l'aide de sondes fluorescentes sur un système en temps réel CFX96 (Bio-Rad). Un échantillon blanc (pas d'ADNc) a été effectué et les

expériences ont été réalisées en trois exemplaires pour chaque gène. Les gènes de références *TBP* (Hs00427620_m1) et *GAPDH* (Hs02758991_g1) ont été utilisés pour normaliser les résultats de l'expression des gènes. Chaque test RT-qPCR a été effectué conformément aux directives MIQE [242] et réalisé en trois exemplaires.

2) Digital Droplet PCR

a. Microdissection laser

Pour chaque échantillon, des coupes de tissus de 7 µm d'épaisseur ont été microdisséquées au laser pour sélectionner un minimum de 300 cellules tumorales pour une surface minimale de 0,043 mm², à l'aide d'un système PALM-Microbeam/Zeiss (Carl Zeiss, Allemagne).

b. ddPCR

La PCR digitale en gouttelettes (ddPCR) a été réalisée à l'aide du système QX100 ddPCR (Biorad, Hercules, États-Unis). Le mélange contenait 20 ng d'ARN génomique, 10 µL de kit RT-ddPCR en une étape pour sondes (Bio Rad), 1 µL de sondes (*ZEB1*, *SNAI1* ou *TWIST1*) et 1 µL de sondes *GAPDH* par puits, et le volume final pour la réaction était de 20 µL. Les gouttelettes ont été produites par un générateur de gouttelettes QX200 (Biorad). La PCR a été réalisée sur le système en temps réel CFX96 (Bio Rad). La PCR a été réalisée avec une première étape de dénaturation à 95°C pendant 10 minutes, suivie de 40 cycles de dénaturation (94°C pendant 30 secondes) et d'hybridation (60°C pendant 1 minute). Un programme de courbe de fusion post-amplification a été initié par chauffage à 98°C pendant 10mn puis refroidissement jusqu'à 12°C. Chaque PCR incluait un contrôle des sondes sans échantillons. Les résultats de la ddPCR ont été générés à l'aide du lecteur de gouttelettes QX100 (Biorad) et analysés à l'aide du logiciel QuantaSoft (Biorad). Le rapport entre les gouttelettes positives pour les marqueurs de transition épithélio-mésenchymateuse et les gouttelettes *GAPDH* positives a été calculé.

Quantification protéique

1) Immunohistochimie

Une méthode d'immunomarquage indirecte a été réalisée sur des coupes de tissus de 5 µm d'épaisseur en utilisant des anticorps monoclonaux PROM2 anti-humains (Clone 13A9, 1/50, Origene, USA), des anticorps anti-ZEB1 (ab203829, 1/100, Abcam, UK), des anticorps anti-SNAIL+SLUG (ab180714, 1/100, Abcam, UK) comme anticorps primaires. Pour les marquages PROM2, l'anticorps a été directement biotinylé à l'aide du kit de couplage des anticorps avec de la biotine Mix-n-stain (MXBIOS20, Merck, Allemagne). Pour les marquages ZEB1 et SNAIL+SLUG, les anticorps primaires ont été couplés à un kit de détection OmniMap anti-lapin (Roche diagnostic, Meylan, France). Les témoins négatifs d'immunomarquages ont été faits en utilisant comme anticorps primaire un anticorps primaire non pertinent du même isotype. Pour les marquages PROM2, chaque échantillon a reçu un score en multipliant le grade d'intensité de la coloration (0 = pas de coloration, 1 = faible intensité, 2 = intensité moyenne, 3 = forte intensité) par le code numérique pour le pourcentage de cellules positives (0 = 0%, 1 = moins de 10%, 2 = 10–50%, 3 = 51–80%, 4 = plus de 81%). Les résultats ont été exprimés sous forme de moyenne. Pour toutes les coupes tissulaires pour les marquages ZEB1 et SNAIL+SLUG, les cellules marquées positivement ont été comptés sur cinq champs différents à un grossissement x200. Un microscope Provis AX70 (Olympus, Tokyo) avec un numéro oculaire à grand champ de 26,5 a été utilisé, fournissant une taille de champ de 0,344 mm² de cellules tumorales. Les résultats ont été exprimés sous forme de moyennes.

2) Western Blot

Des analyses ont été effectuées sur des lignées cellulaires non modifiées, surexprimant et knock-out *PROM2*, ainsi que sur des tumeurs provenant des xénogreffes de mélanome dérivées de cinq patients. Les protéines totales ont été extraites de 20 sections de 5 µm

d'échantillons tumoraux congelés dans un tampon de lyse RIPA (Thermo Scientist, États-Unis) contenant des anti-protéases et des anti-phosphatases (Sigma-Aldrich, St Louis, États-Unis). La concentration en protéines a été mesurée par spectrophotométrie à l'aide du kit pierce BCA Protein Assay Kit (Biorad, Hercules, États-Unis). L'échantillon a été dilué dans de l'eau distillée et un tampon de charge pour atteindre 30 µg, puis chauffé à 95 ° C pendant 10 minutes pour la dénaturation des protéines. Les protéines ont été séparées par électrophorèse sur gel SDS-page à 10% de polyacrylamide (Biorad, Hercules, USA), transférées sur une membrane de nitrocellulose (0,45 µm) et colorées avec du rouge ponceau. Les sites non spécifiques des membranes étaient saturés de TBST contenant 5 % de lait. Les membranes ont ensuite été incubées pendant la nuit à 4°C sous agitation avec l'un des anticorps primaires suivants : PROM2 (1/5000, NBP-38032, Novus Bio), ZEB1 (1/500, ab203829, Abcam), SNAI/SLUG (1/1000, ab85936, Abcam), TSG100 (1/1000, SAB5700757, Sigma-Aldrich), 4HNE (1/800, ab46545, Abcam) et GAPDH (1/2500, ab9485, Abcam). Les membranes ont ensuite été incubées 1h à température ambiante avec des IgG anti-lapin de chèvre couplées à de la peroxydase (1/10000, A16023, Invitrogen). L'activité de la peroxydase a ensuite été révélée avec de l'ECL (Biorad, Hercules, USA). La GAPDH a été utilisée comme protéine de référence. La chimiluminescence a été détectée à l'aide de ChemiDoc (Biorad) et mesurée à l'aide d'Image Lab.

Implication de PROM2 dans la ferroptose

1) Test de viabilité

Pour l'évaluation de la viabilité cellulaire, les lignées cellulaires A375 ou Sk-Mel-28 ont étéensemencées séparément dans des plaques de culture tissulaire de 96 puits à une densité de 5000 cellules par puits. Après 24 heures d'incubation, les cellules ont été exposées à une concentration croissante de RSL3 ou d'érastine pendant 24 heures supplémentaires. La viabilité cellulaire a été déterminée par la conversion colorimétrique du tétrazolium MTT

(bromure de 3-[4,5-diméthylthiazol-2-yl]-2,5-diphényl-tétrazolium; Sigma), jaune soluble dans l'eau, au formazan violet, insoluble dans l'eau. Après incubation pendant 2 h à 37 °C avec 0,4 mg/ml de MTT, l'absorbance a été mesurée à 560 nm à l'aide d'un lecteur de microplaques (Thermofisher, France). Les expériences ont été réalisées en trois fois, des cellules non traitées ont été utilisées comme témoins positifs et un milieu sans cellules a été utilisé comme témoin négatif.

2) Quantification du fer ferreux (Fe²⁺)

Pour chaque lignée cellulaire, 4.10⁶ cellules A375 ou Sk-Mel-28 par puits ont étéensemencées dans des plaques 6 puits. Les cellules ont été traitées avec du RSL3, de l'érastine et de la déféroxamine pendant 24 heures. Ensuite, le fer ferreux a été quantifié à l'aide d'un kit de dosage du fer (Sigma Aldrich, États-Unis) selon les instructions du fabricant.

3) Détection du Fe²⁺ dans les sphéroïdes

Les sphéroïdes ont été formés de la même manière que pour le test d'invasion. Les sphéroïdes ont ensuite été incubés après ou non un traitement à l'érastine à 37°C pendant une heure avec une solution ferrouorange (BioTracker™ FerroOrange, Millipore) à une concentration de 2 µM, puis lavés deux fois avec un tampon HBSS pour éliminer tout le Fe²⁺ extracellulaire. Après cette incubation, les sphéroïdes ont été lavés deux fois avec de l'HBSS, et ont été observés avec un microscope à fluorescence (542 nm / 572 nm).

4) Quantification de la peroxydation lipidique

Pour chaque lignée cellulaire, les cellules ont été lysées à l'aide d'un tampon de lyse RIPA (Thermo Scientist, États-Unis) et la concentration totale de protéines a été mesurée par spectrophotométrie à l'aide du kit de dosage des protéines Pierce BCA (Biorad, Hercules,

États-Unis). La peroxydation lipidique a été quantifiée dans 100 µg de protéines à l'aide d'un kit de dosage de peroxydation lipidique (4-HNE) (ab238538, Abcam) selon les instructions du fabricant : une plaque a été recouverte pendant la nuit d'un conjugué 4-HNE, des échantillons et des anticorps anti-4HNE ont ensuite été ajoutés dans les puits, puis un anticorps secondaire HRP-conjugué a été ajouté et enfin la solution de substrat. La peroxydation lipidique a été mesurée à 450 nm.

Modèles murins

1) Xénogreffe ectopiques dérivées de mélanomes humains

Des souris femelles, âgées de cinq à huit semaines, nu/nu athymiques d'origine NMRI (R. Janvier, France) ont été utilisées comme receveuses de xénogreffes pour des tumeurs de mélanome humain. Les souris ont été hébergées dans l'animalerie, Université Paris 13, Bobigny, France.

Pour la xénogreffe initiale, des fragments de tumeur humaine de 5 mm³ ont été greffés par voie sous-cutanée chez 5 à 10 souris sous anesthésie à la xylazine (10 mg/kg) et à la kétamine (100 mg/kg). Pour les nouvelles greffes réalisées à partir de la greffe antérieure s'étant développée, des fragments de 10 mm³ ont été xénogreffés dans cinq nouvelles souris (passage). Un score clinique a été évalué quotidiennement et la croissance tumorale mesurée sur deux diamètres perpendiculaires avec un pied à coulisse. Le volume tumoral a été calculé avec la formule suivante : $V = L \times l^2/2$, L étant le plus grand diamètre (longueur), l le plus petit (largeur). Les souris ont été euthanasiées lorsque les tumeurs approchaient les 1500 mm³, correspondant à la limite éthiquement acceptable (environ 10% du poids de la souris). L'euthanasie des souris a été effectuée par dislocation cervicale.

Pour chaque souris, les tumeurs, ainsi que les différents organes, ont été systématiquement conditionnés pour analyses morphologiques. Les tumeurs ont été disséquées et coupées en trois fragments : un a été immédiatement congelé dans de l'azote liquide, un autre a été

fixée dans un tampon formolé (AFA) puis inclus dans de la paraffine, et le troisième fragment a été utilisée pour le nouveau passage.

2) Xénogreffe ectopiques dérivée de cellules de mélanome

Les souris ont été greffées par voie sous-cutanée avec $5 \cdot 10^6$ cellules A375, A375 PROM2, Sk-Mel-28 ou Sk-Mel-28 PROM2 dans 50 μL de matrigel sous anesthésie gazeuse à 2,5% d'isoflurane. Un score clinique a été évalué quotidiennement et la croissance tumorale mesurée 3 fois par semaine. Les souris ont été euthanasiées lorsque les tumeurs approchaient les 1500 mm^3 . Pour chaque souris, les tumeurs, ainsi que les différents organes, ont été systématiquement analysés.

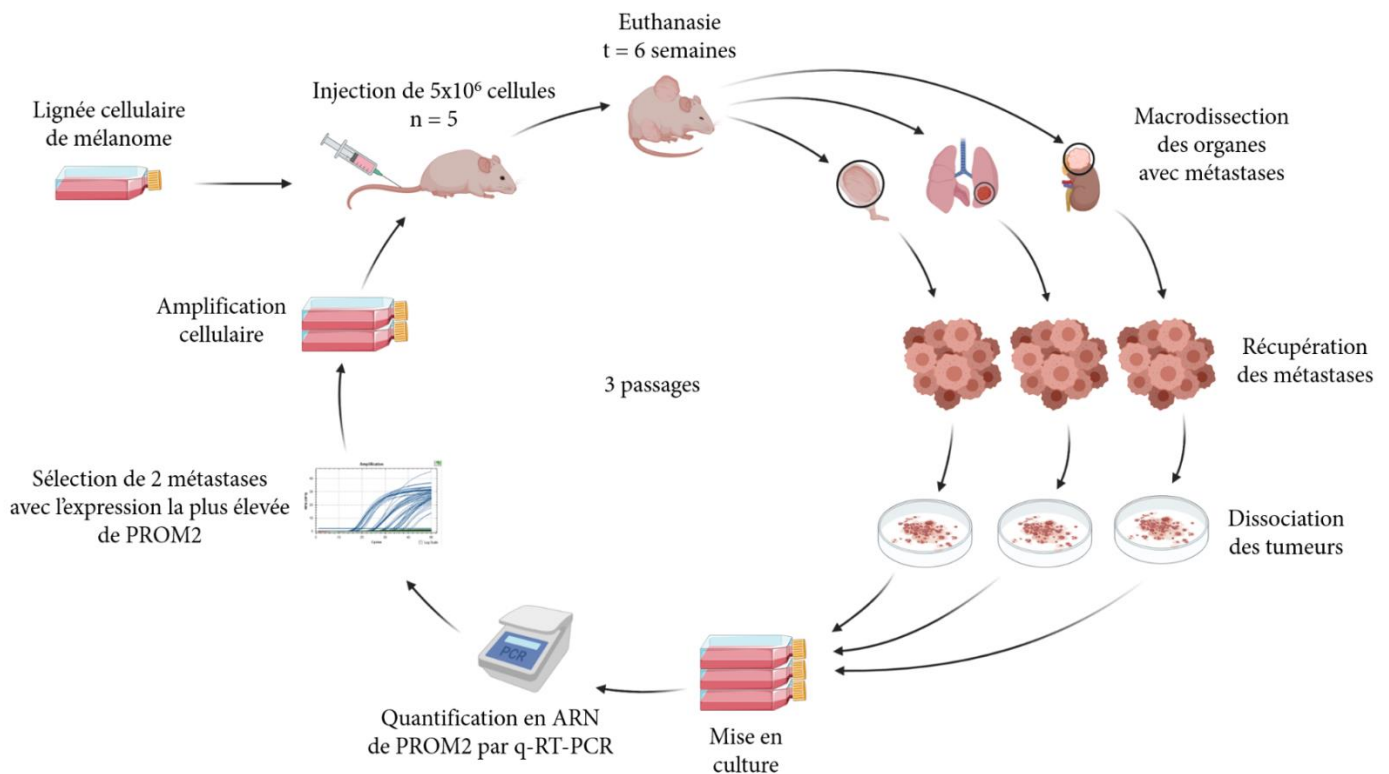
3) Modèles murins métastatiques de cellules de mélanome

Des souris ont été injectées par voie intraveineuse avec $5 \cdot 10^6$ cellules A375, A375 PROM2, Sk-Mel-28 ou Sk-Mel-28 PROM2 dans 100 μL de NaCl. Un score clinique a été évalué quotidiennement et les souris ont été euthanasiées à 8 semaines. Pour chaque souris, l'évaluation de l'extension métastatique dans chaque organe a été effectuée sur des lames avec des coupes de 2 μm de tissus inclus en paraffine colorées à l'hématoxyline-éosine. Le pourcentage de la surface tumorale du poumon a été quantifiée chez chaque souris.

4) Boucle d'enrichissement de PROM2

Nous avons injecté par voie intraveineuse 5 souris avec $5 \cdot 10^6$ cellules A375 PROM2 dans 100 μL de NaCl. Un score clinique a été évalué quotidiennement et une échographie de suivi a été effectuée chaque semaine. Les souris ont été euthanasiées à 6 semaines. Ces souris correspondent au passage 0. Lors de l'euthanasie, nous avons récupéré séparément les métastases de différents sites. Ces métastases ont été dissociées, filtrées sur un filtre de 70 μm et cultivées dans un milieu de lignée cellulaire A375. L'expression en ARNm

PROM2 à partir des différents sites métastatiques a été évaluée par Q-RT-PCR. 5.10^6 cellules issues des deux métastases avec les expressions les plus élevées en ARNm *PROM2* ont chacune été réinjectées par voie intraveineuse dans 5 nouvelles souris. Ces souris correspondent au passage 1. Ce motif a ensuite été reproduit jusqu'au passage 3 (Figure 19). Pour chaque souris, une analyse tissulaire complète a été réalisée. L'évaluation de l'extension métastatique dans chaque organe a été effectuée sur coupes histologiques colorées à l'hématoxyline-éosine. La quantification de la surface tumorale du poumon a été faite pour chaque souris.



*Figure 19 : Schéma du protocole expérimental de la boucle d'enrichissement *PROM2**

5) Autorisations éthiques réglementaires

Toutes les expérimentations sur les souris ont été approuvées par le ministère de l'Enseignement Supérieur, de la Recherche et de l'Innovation (numéro APAFIS #17190-2018101814245111) et nous avons également un avis favorable du comité d'éthique local.

Synthèse d'oligonucléotides anti-sens (ASO) anti-PROM2

Plusieurs ASOs ont été conçus pour être complémentaires à l'ARNm PROM2 (RefSeq ID NM_144707.4). Tous les ASOs ont été synthétisés avec un synthétiseur d'ADN/ARN ABI 394 utilisant de l'ADN et des phosphoramidites d'acide nucléique bloqué de chez Glen Research. Les ASOs ont été entièrement modifiés au phosphorothioate (PS) en utilisant le disulfure de phénylacétyle (ChemGenes Corporation) comme réactif sulfurant. Les séquences des deux ASO PROM2 et de l'ASO contrôle sélectionnés sont indiquées dans le tableau 1. Le clivage à partir du support solide et la déprotection des ASOs ont été effectués avec de l'ammoniac concentré aqueux à 55°C pendant 16 h. Les ASOs ont ensuite été purifiés à l'aide de cartouches Poly-Pak II (Glen Research) ou par Chromatographie en phase Liquide à Haute Performance (HPLC), dessalés à l'aide d'une colonne de dessalage Glen Pak 2.5 (Glen Research) et séchés par lyophilisation. Les ASOs ont été remis en suspension dans du PBS avant utilisation. Tous les ASOs ont été caractérisés par spectrométrie de masse MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization - Time of Flight) avec un appareil JEOL SpiralTOF.

Nom	Séquence ^a	Site cible ^b
<i>PROM2-ASO1</i>	<u>T</u> * <u>C</u> * <u>C</u> *A*T*T*T*G*T*A*A*T*G* <u>C</u> * <u>C</u> * <u>A</u>	3806-3821
<i>PROM2-ASO2</i>	<u>A</u> * <u>C</u> * <u>T</u> *T*G*T*T*G*C*T*G*G*T*T*T* <u>A</u>	3610-3625
<i>ASO-contrôle</i>	<u>G</u> * <u>G</u> * <u>C</u> *T*A*G*A*T*G*C*T*A*A* <u>C</u> * <u>C</u> * <u>T</u>	—

Tableau 4 : Séquences des ASO utilisés dans cette étude

[a] Les acides nucléotides bloqués sont soulignés et les modifications PS sont marquées par des astérisques ()*

[b] Position sur l'ARNm PROM2 (RefSeq ID NM_144707.4)

Pour les expériences, les cellules ont été traitées pendant 4 jours avec des concentrations d'ASO allant de 50 à 4000 nM.

Analyses statistiques

Les variables quantitatives ont été exprimées sous forme de moyennes \pm écart type, ou d'intervalles médians et interquartiles [Q1-Q3] selon leur distribution (respectivement normale ou non). Sous forme graphique, les résultats ont été présentés sous forme de graphiques en barres, de lignes de mesures répétées ou de diagrammes en boîte. La nature de la relation entre deux variables quantitatives d'intérêts a été évaluée à l'aide d'une régression non paramétrique par lissage de splines quantitativement exprimées sous forme de régression linéaire avec le coefficient R^2 . Quantitativement, la significativité statistique des résultats a été évaluée soit à l'aide du test ANOVA avec comparaison multiple des moyennes, du test de Kruskal-Wallis de plusieurs médianes, soit du test t de Student de deux moyennes, selon le cas. Les données ont été analysées à l'aide du logiciel statistique R (version 4.1.0; R Foundation for Statistical Computing, Vienne (Autriche); <http://www.r-project.org>). Tous les tests étaient bilatéraux, et la significativité statistique a été fixée à $P < 0,05$.

Résultats

Le niveau d'expression de PROM2 n'a aucun impact sur la prolifération du mélanome

1) Modulation du niveau d'expression de *PROM2*

Pour les deux lignées cellulaires transfectées avec des plasmides activant le promoteur de *PROM2*, nous avons sélectionné les deux clones qui surexprimaient le plus *PROM2* (Figure 20 A et B). Pour les lignées cellulaires KO, nous avons sélectionné les deux clones qui exprimaient le moins *PROM2* (Figure 20 C et D).

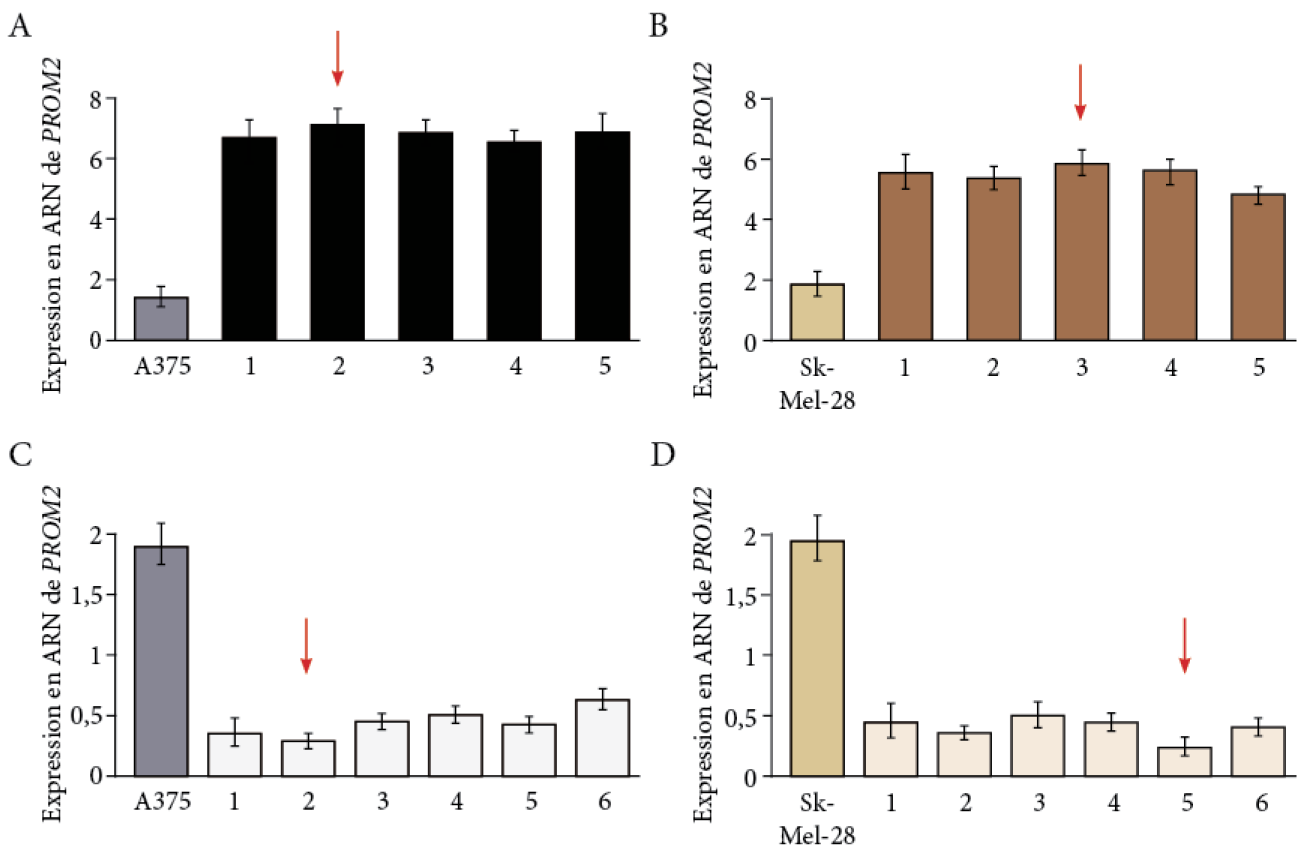


Figure 20 : Niveaux d'expression en ARN de *PROM2* obtenus par QPCR des différents clones surexprimant *PROM2* dans la lignée A375 (A) dans la lignée Sk-Mel-28 (B) et des différents clones KO pour *PROM2* dans la lignée A375 (C) dans la lignée Sk-Mel-28 (D). Les clones sélectionnés sont symbolisés par une flèche rouge.

Pour chaque lignée cellulaire de mélanome, l'expression en ARNm de *PROM2* a progressivement augmenté de manière significative du clone KO à la lignée cellulaire native, puis au clone surexprimé (Figure 21 A et B).

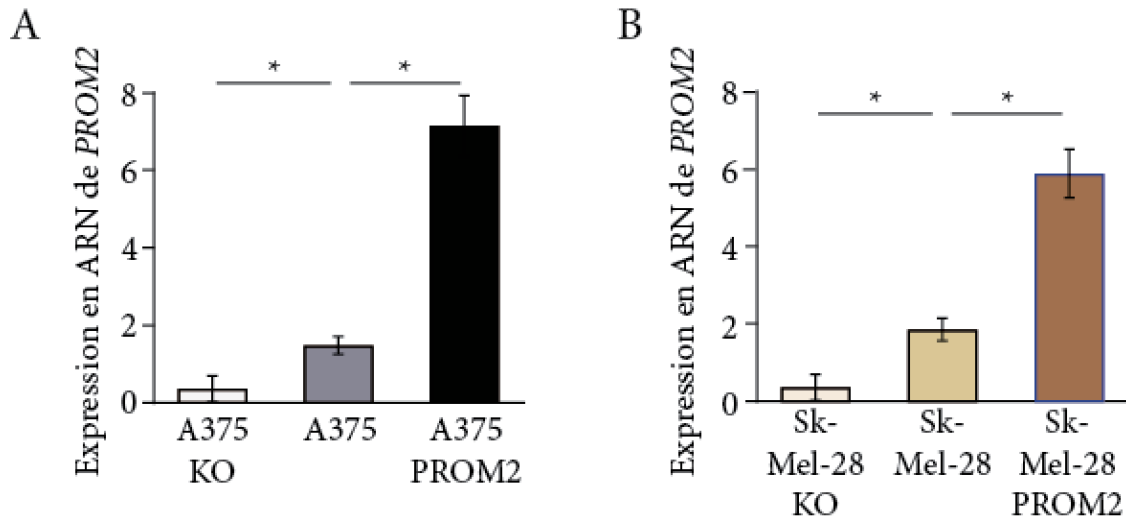


Figure 21: Niveaux d'expression en ARN de PROM2 obtenus par QPCR dans les cellules KO, native et surexprimant PROM2 pour la lignée A375 (A) et la lignée Sk-Mel-28 (B).

Au niveau protéique, le marquage par immunofluorescence de PROM2 a également montré une absence de marquage pour les lignées KO, indiquant une absence d'expression de PROM2 dans ces lignées (Figure 22 A et B).

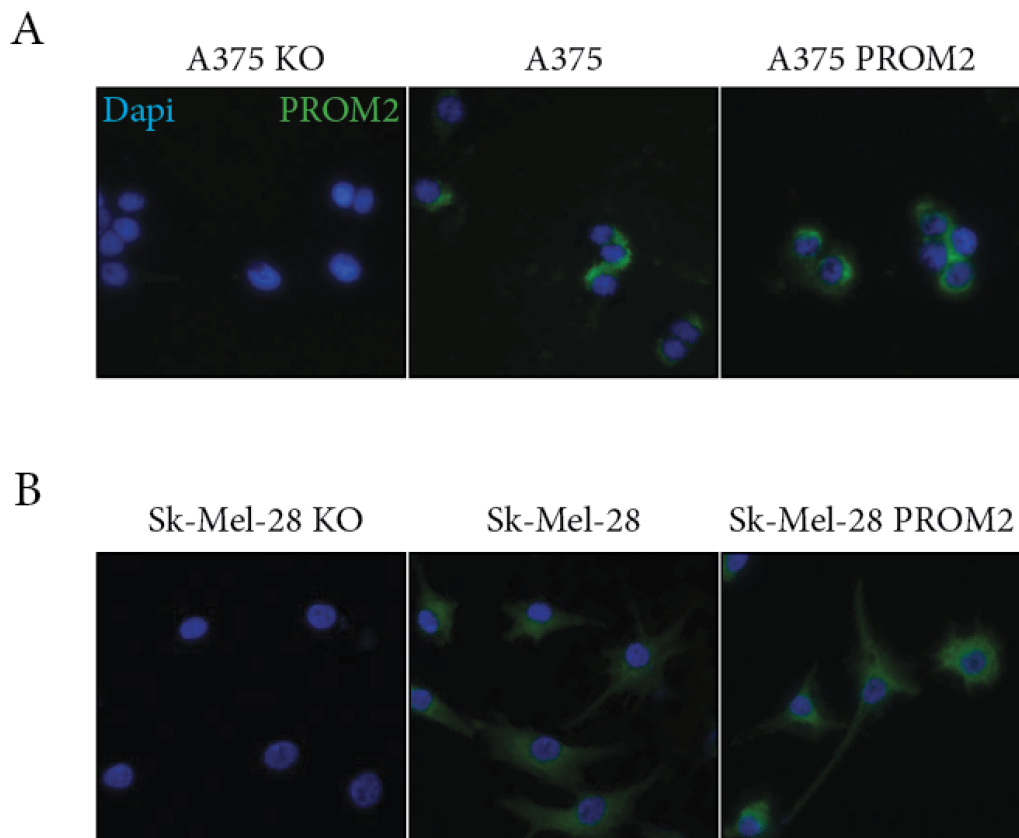


Figure 22 : Immunofluorescence PROM2 des lignées cellulaires de mélanome. Immunomarquage PROM2 (marquage en vert) des lignées cellulaires A375 KO, native et surexprimant PROM2 (A) et des lignées Sk-Mel-28 KO, native et surexprimant PROM2 (B). Les noyaux des cellules sont marqués en bleu.

2) Impact de PROM2 sur la prolifération in vitro

Pour chaque lignée cellulaire, la croissance du nombre de cellules a été observée sur 5 jours. Le niveau d'expression de *PROM2* n'a pas influencé la prolifération cellulaire *in vitro* pour les deux lignées A375 et Sk-Mel-28 (Figure 23).

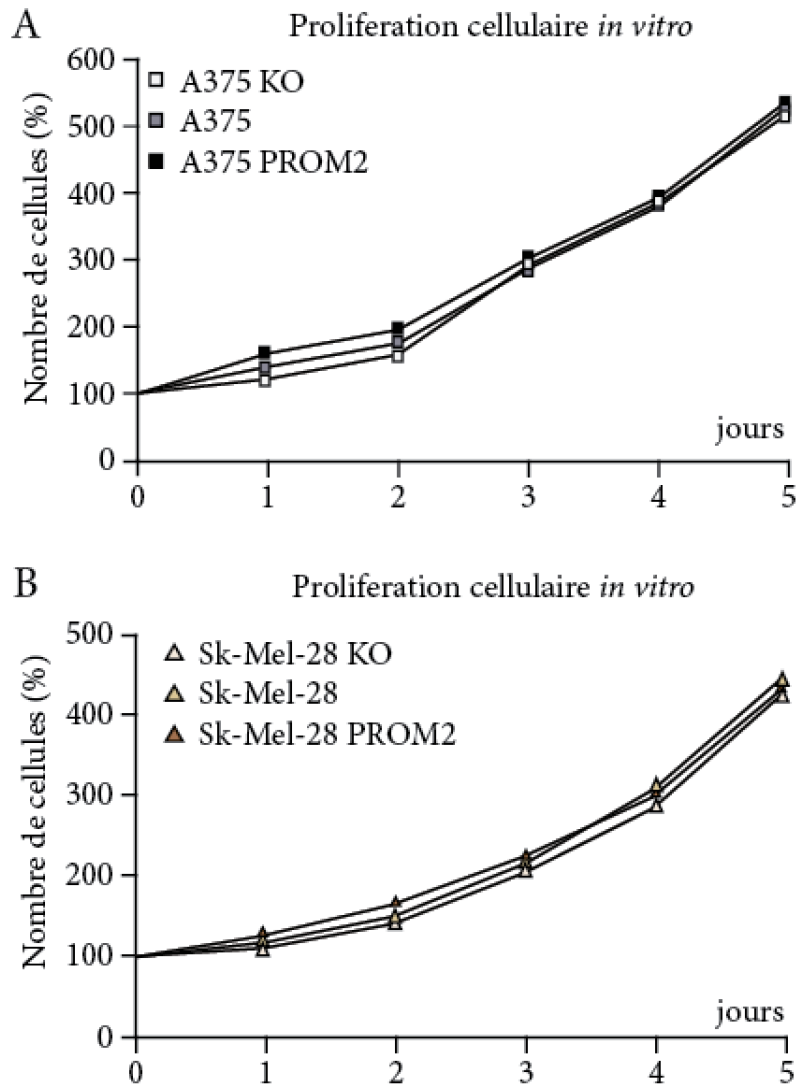


Figure 23 : Taux de prolifération *in vitro* des lignées cellulaires A375 KO, A375 et A375 PROM2 (A) et des lignées cellulaires Sk-Mel-28 KO, Sk-Mel-28 et Sk-Mel-28 PROM2 (B).

3) Impact de PROM2 sur la prolifération *in vivo*

Pour modéliser *in vivo* les effets de l'expression de *PROM2* observés chez des patients atteints de mélanome métastatique [67], deux types différents de modèles murins ont été utilisés : i) des xénogreffes obtenues à partir de deux lignées cellulaires de mélanome, A375 ou Sk-Mel-28, avec différents niveaux d'expression de *PROM2* ; ii) cinq xénogreffes dérivées de patients obtenues à partir d'un mélanome métastatique, à savoir XM1 à XM5.

a. Xénogreffes de lignées cellulaires de mélanome en sous-cutanée

Chaque lignée cellulaire de mélanome humain native et surexprimant *PROM2* a été xénogreffée dans 5 souris nudes et la taille de la tumeur a été mesurée tous les 3 jours. Ces mesures ont permis d'observer qu'après greffe sous-cutanée, l'expression de *PROM2* dans les deux lignées de mélanome humain n'influçait pas la vitesse de croissance tumorale (Figure 24).

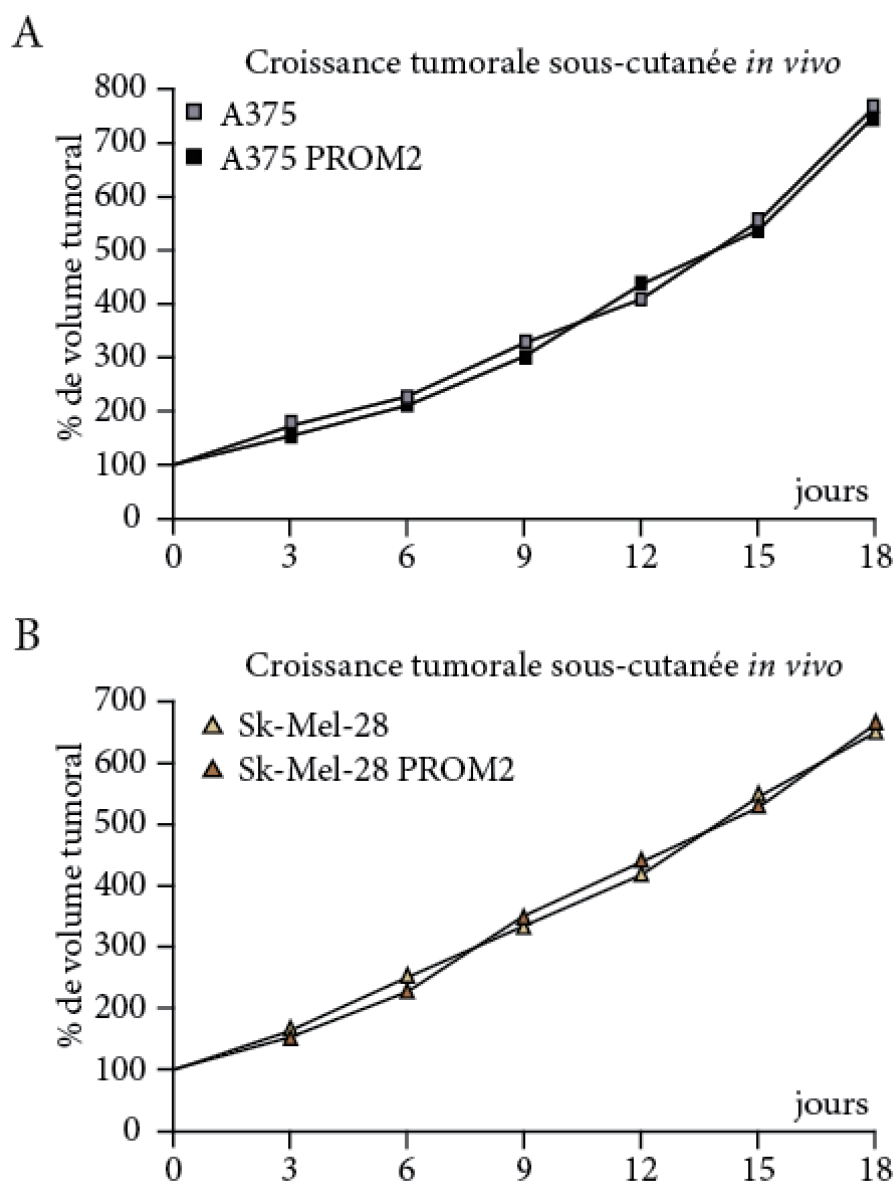


Figure 24 : Croissance tumorale *in vivo* après xénogreffes sous cutanées de cellules des lignées A375 et A375 *PROM2* (A) et des lignées Sk-Mel-28 et Sk-Mel-28 *PROM2* (B).

b. Modèles de PDX

L'expression de *PROM2* en ARNm et en protéines dans les cinq modèles de xénogreffes de mélanome dérivées de patients a été déterminé. Deux modèles, XM1 et XM2, présentaient une expression de *PROM2* significativement plus élevée par rapport aux autres (Figure 25).

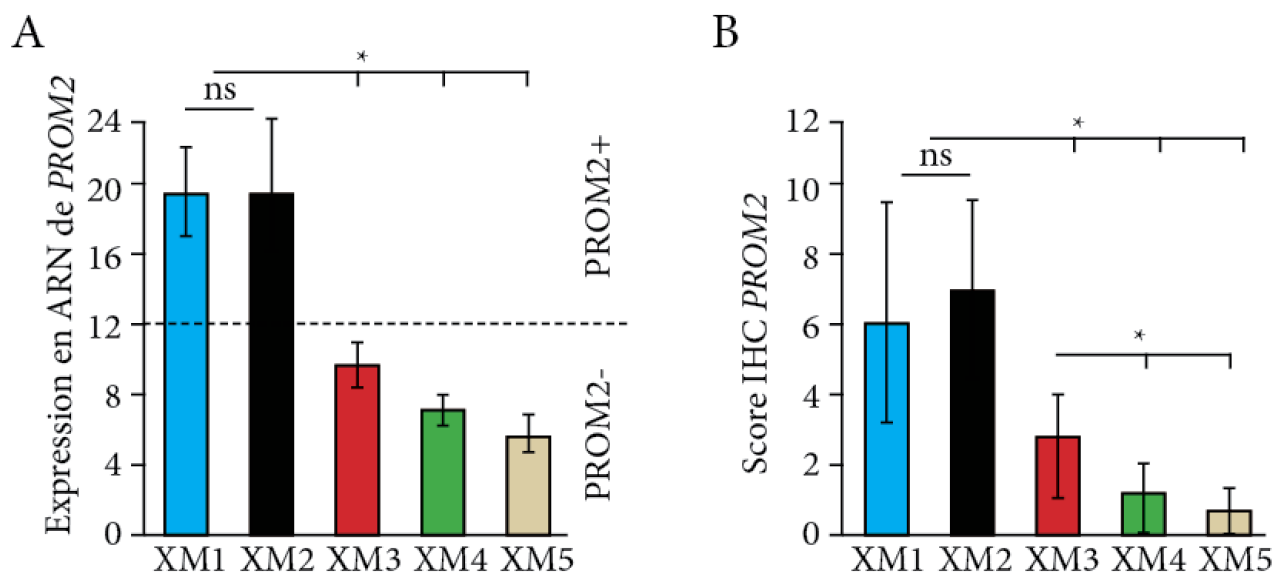


Figure 25 : Niveaux d'expression de *PROM2* en ARNm obtenus par QPCR (A) et score immunohistochimique (IHC) de *PROM2* (B) dans cinq modèles de xénogreffes de mélanome dérivées de patients. ns = non significatif.

Cependant, lorsque le taux de prolifération a été observé après greffe de tumeur, il n'y avait aucune corrélation entre l'expression en ARNm de *PROM2* et la croissance tumorale (Figure 26).

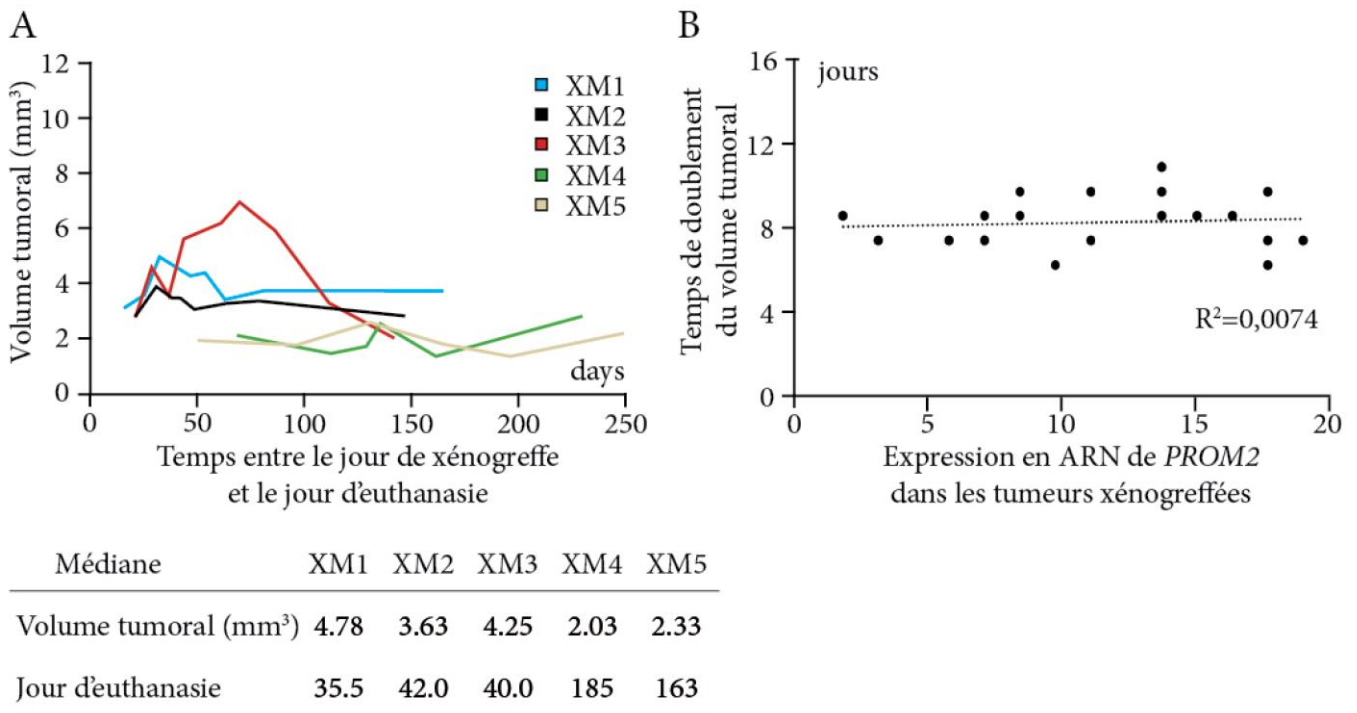


Figure 26 : Corrélation *in vivo* entre la prolifération et l'expression en ARN de *PROM2*. Corrélation entre le volume de la tumeur et le jour de l'euthanasie (A), Corrélation entre le taux de prolifération et l'expression en ARN de *PROM2* (B).

La surexpression de *PROM2* est associée à un phénotype de transition épithélio-mésenchymateuse *in vitro*

1) *PROM2* promeut l'invasion et la migration *in vitro*

Les effets de la modulation du niveau d'expression *PROM2* ont d'abord été évalué *in vitro* sur la migration et l'invasion, en utilisant les trois clones pour chaque lignée cellulaire A375 et Sk-Mel-28. Après 24h, 48h et 72h, nous avons pu observer que l'invasion cellulaire et la migration cellulaire ont progressivement augmenté entre les lignées A375 KO, A375 et A375 *PROM2* (Figure 27 A et B). Des résultats similaires ont été obtenus avec la lignée Sk-Mel-28 (Figure 27 C et D).

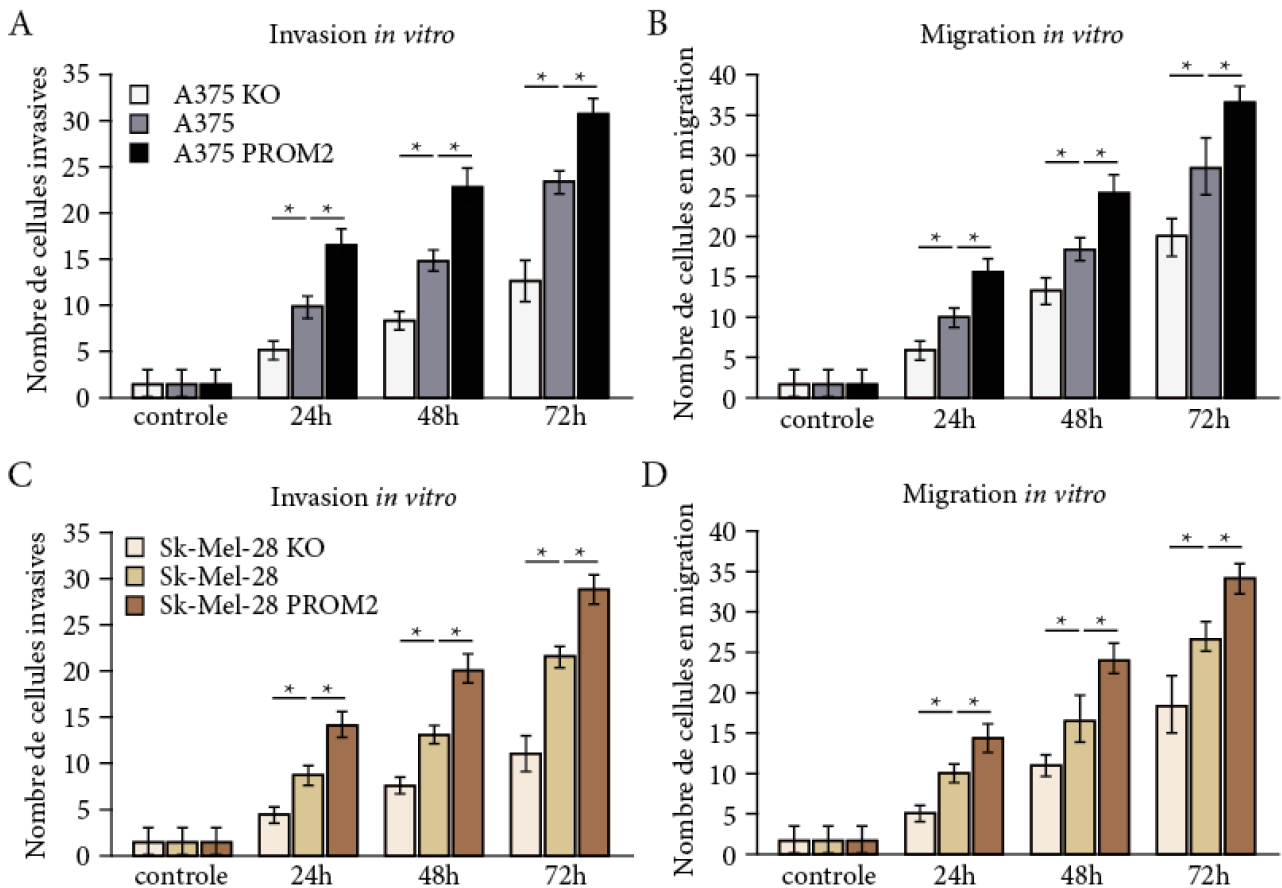


Figure 27 : Invasion et migration des lignées cellulaires.

Nombre moyen de cellules invasives par champs (objectif x40) des lignées cellulaires A375 KO, A375 et A375 PROM2 à 24, 48 et 72 heures (A). Nombre moyen de cellules en migration par champs (objectif x40) des lignées cellulaires A375 KO, A375 et A375 PROM2 à 24, 48 et 72 heures (B). Nombre moyen de cellules invasives par champs (objectif x40) des lignées cellulaires Sk-Mel-28 KO, Sk-Mel-28 et Sk-Mel-28 PROM2 à 24, 48 et 72 heures (C). Nombre moyen de cellules en migration par champs (objectif x40) des lignées cellulaires Sk-Mel-28 KO, Sk-Mel-28 et Sk-Mel-28 PROM2 à 24, 48 et 72 heures (D).

2) PROM2 induit un phénotype de transition épithélio-mésenchymateuse *in vitro*

Nous nous sommes ensuite demandé si cette augmentation des phénotypes invasifs et migrateurs liés à la surexpression de *PROM2* était également associée à un phénotype de transition épithéliale à mésenchymateuse. Pour les deux lignées cellulaires A375 et Sk-Mel-28, nous avons montré une diminution significative progressive de l'expression de l'ARNm *CDH1* (marqueur épithélial de l'e-cadhérine) tandis que l'expression de l'ARNm *VIM* (marqueur mésenchymateux de la vimentine) a augmenté progressivement des lignées KO, aux lignées natives, et aux lignées surexprimant *PROM2*. De plus, la surexpression de

PROM2 a significativement augmenté l'expression en ARNm des six gènes marqueurs de transition épithélio-mésenchymateuse *ZEB1*, *ZEB2*, *SNAI1*, *SLUG*, *TWIST1*, *TWIST2* (Figure 28).

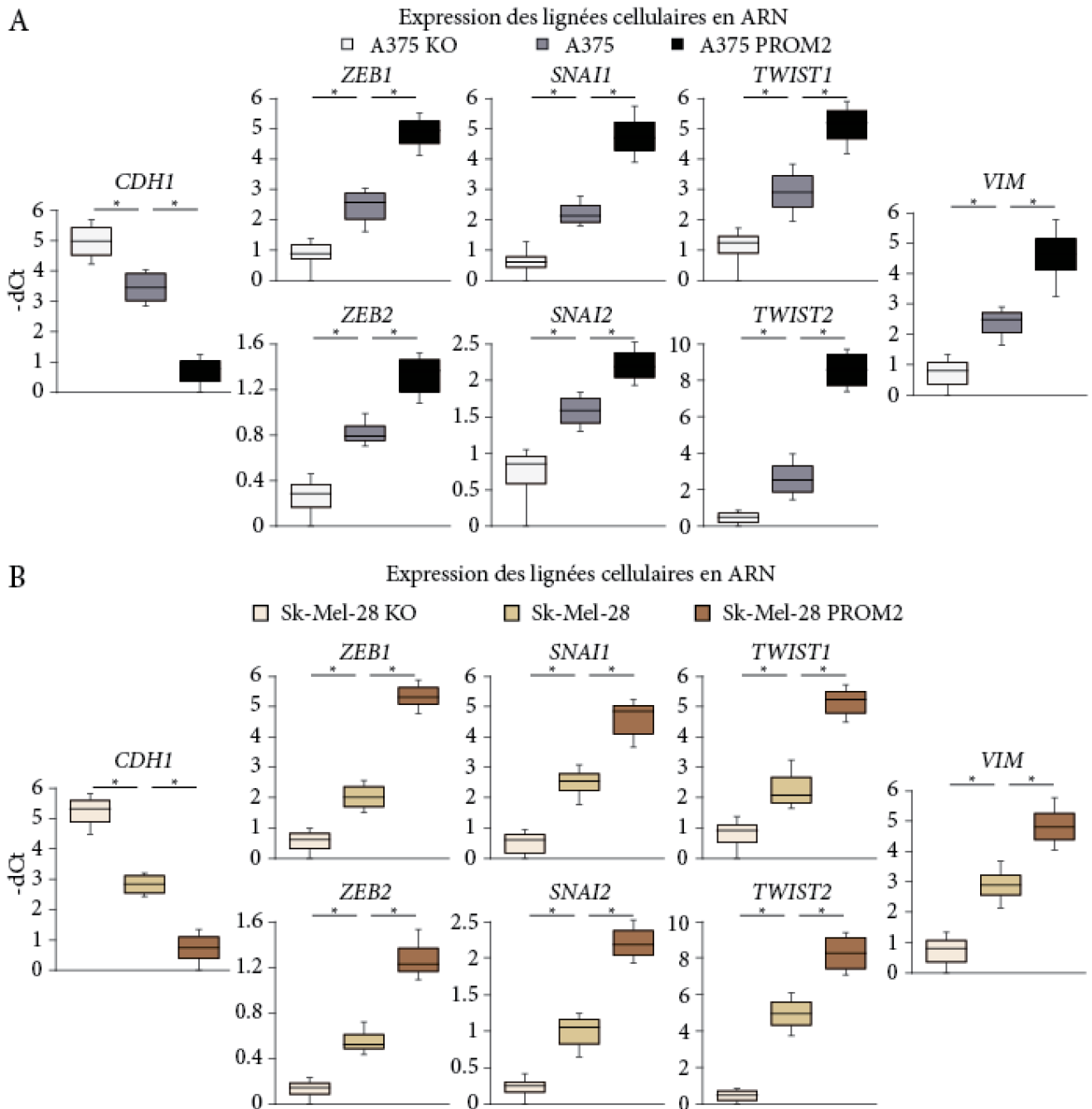


Figure 28 : Niveaux d'expression en ARN d'un marqueur épithélial (*CDH1*), des marqueurs de transition épithélio-mésenchymateuse (*ZEB1*, *ZEB2*, *SNAI1*, *SNAI2*, *TWIST1*, *TWIST2*) et d'un marqueur mésenchymateux (*VIM*) des lignées cellulaires A375 KO, A375 et A375 PROM2 (A) et des lignées cellulaires Sk-Mel-28 KO, Sk-Mel-28 et Sk-Mel-28 PROM2 (B).

Au niveau protéiques, en utilisant des western blot pour les marqueurs ZEB1 et SNAIL/SLUG, des résultats concordants avec ceux obtenus en ARNm ont été obtenus (Figure 29).

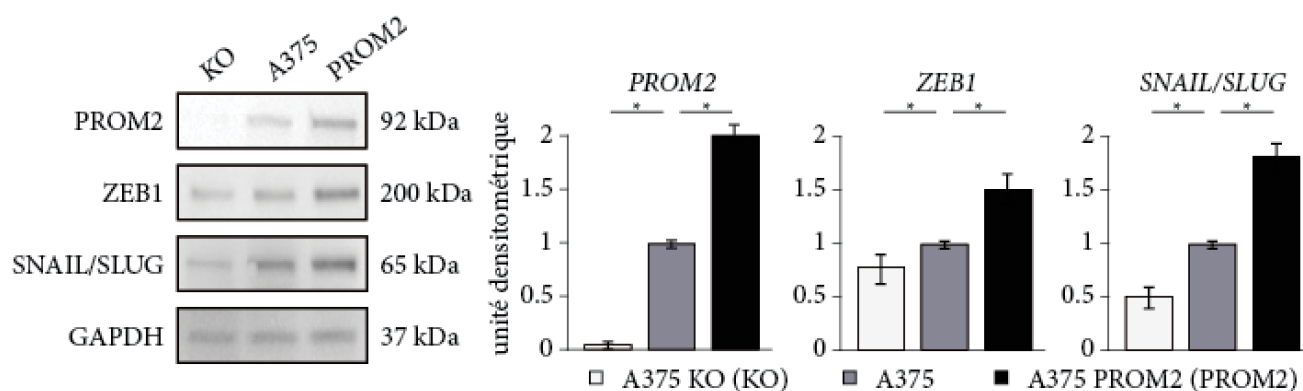


Figure 29 : Western Blot des lignées cellulaires A375 KO, A375 et A375 PROM2, et histogrammes des quantifications du niveau protéique pour PROM2, ZEB1 et SNAI1 normalisés avec la protéine de référence GAPDH.

3) Modèle 3D de sphéroïdes *in vitro*

Le potentiel de migration des sphéroïdes de la lignée cellulaire de mélanome A375 a également été évalué. Les trois clones de lignées cellulaires A375 ont étéensemencés dans des micro-puits pour former des sphéroïdes. Au jour 3, du collagène a été ajouté pour aider les sphéroïdes à migrer et le jour 5, la zone de migration des cellules a été évaluée. Nous avons observé que la zone de migration de la lignée cellulaire A375 PROM2 était plus élevée que dans les lignées cellulaires A375 et A375 KO (Figure 30).

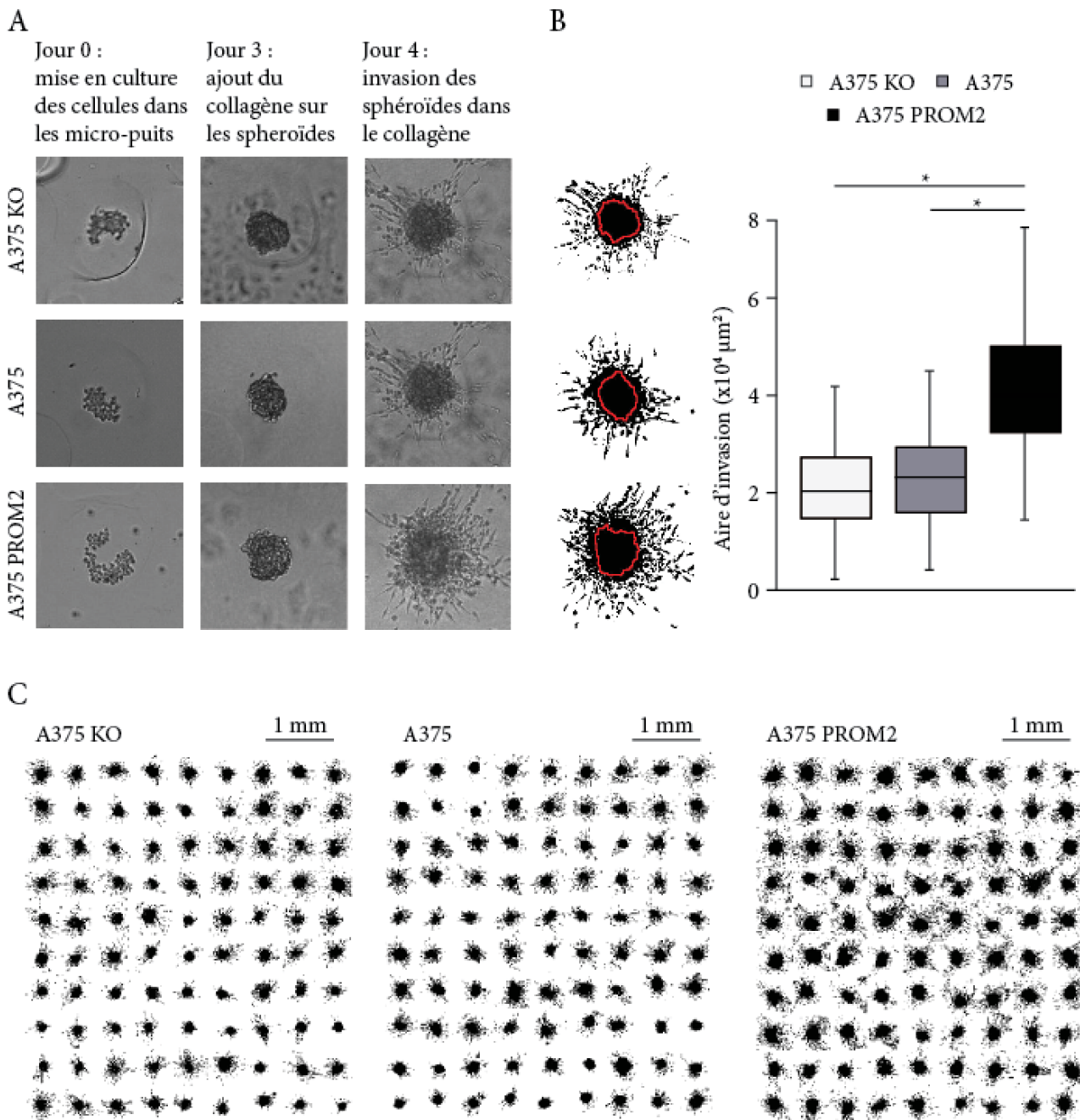


Figure 30 : Images de l'ensemencement, de la formation et de l'expansion après ajout de collagène des sphéroïdes des lignées cellulaires A375 KO, A375, A375 PROM2 (A). Quantification de la zone d'invasion, délimitée par le tracé rouge, des sphéroïdes des trois lignées cellulaires A375 KO, A375, A375 PROM2 (B). Images des 90 puits de chaque lignée utilisés pour la quantification de l'invasion (C).

La surexpression de *PROM2* dans les cellules est associée à un potentiel métastatique accru *in vivo*, liée à un phénotype épithélio-mésenchymateux

1) *PROM2* augmente le potentiel métastatique *in vivo*

Les souris xéno greffées par voie sous-cutanée avec des lignées cellulaires de mélanome ont été euthanasiées en moyenne 40 jours après la greffe en raison de la taille de la tumeur. À ce stade de développement, il n'y avait pas de métastase à distance quel que soit le clone greffé.

Nous avons également utilisé nos deux lignées cellulaires A375 et Sk-Mel-28 en injectant par voie intraveineuse $5 \cdot 10^6$ cellules dans des souris nues. Ces lignées natives ont induit un nombre limité de métastases pulmonaires huit semaines après l'injection. En revanche, la surexpression de *PROM2* a considérablement augmenté le potentiel métastatique de la lignée cellulaire du mélanome A375 et Sk-Mel-28, avec des métastases pulmonaires et pleurales massives, mais aussi des métastases cardiaques et musculaires (Figure 31 A). La surface moyenne des métastases pulmonaires et pleurales était de 58 ± 9 % pour les souris ayant reçu une injection de lignée cellulaire A375 *PROM2*, comparativement à 4 ± 3 % ($P < 0,01$) pour la lignée cellulaire native A375 (Figure 31 B). Pour les souris ayant reçu les lignées cellulaires Sk-Mel-28 et Sk-Mel-28 *PROM2*, les résultats étaient comparables avec une surface de $5 \pm 2\%$ et $49 \pm 8\%$ respectivement (Figure 31 C).

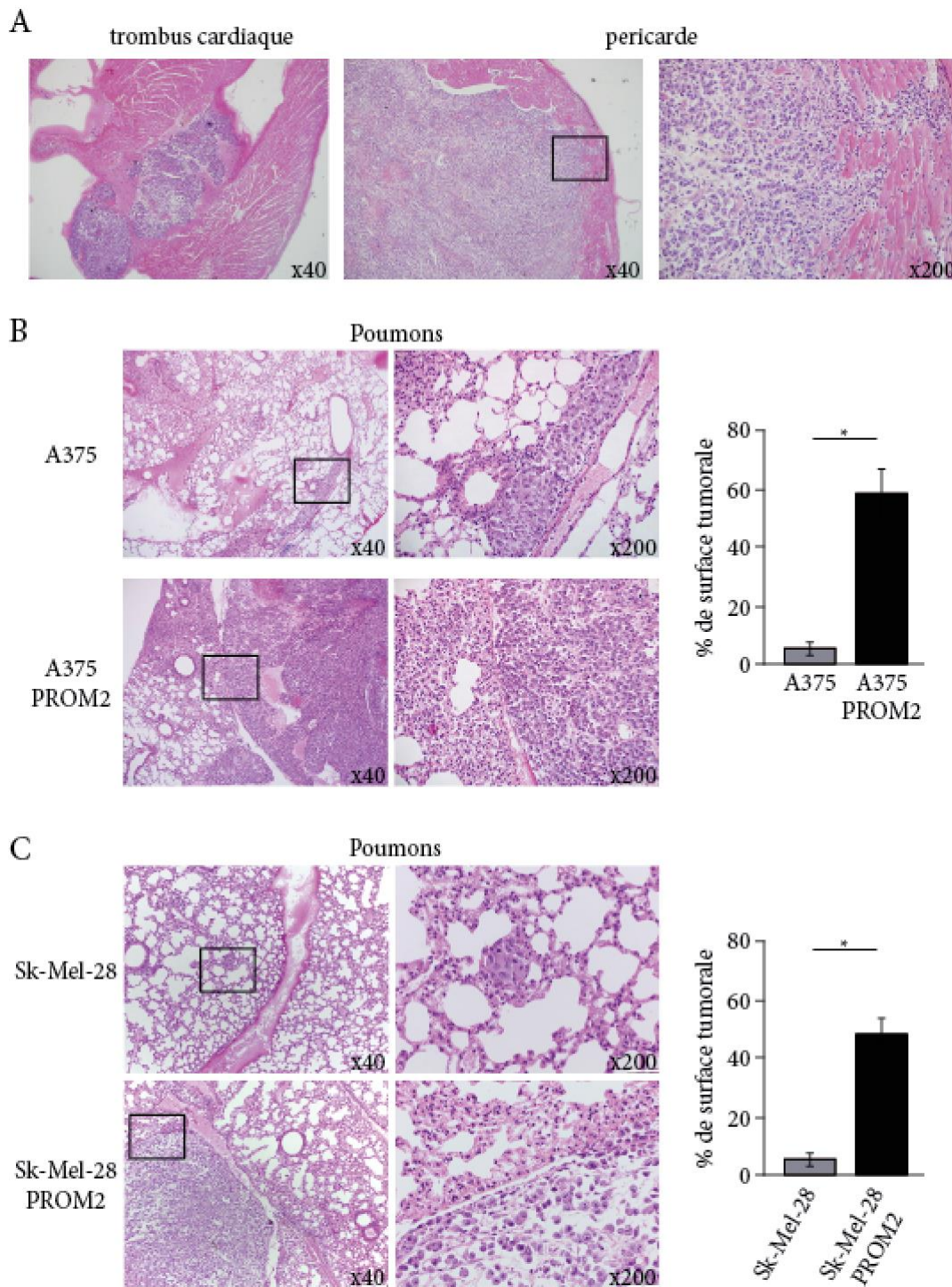


Figure 31 : Coloration hématoxyline-éosine (HE) de métastases cardiaques de souris injectées avec 5 millions de cellules de la lignée cellulaire A375 PROM2 (A). Coloration HE de coupes pulmonaires de souris injectées avec 5 millions de cellules des lignées cellulaires A375 ou A375 PROM2. L'histogramme montre la quantification de la surface moyenne des métastases pleurales (B). Coloration HE de coupes pulmonaires de souris injectées avec 5 millions de cellules des lignées cellulaires Sk-Mel-28 ou Sk-Mel-28 PROM2. L'histogramme montre la quantification de la surface moyenne des métastases pleurales (C).

2) PROM2 induit une augmentation des marqueurs de transition épithélio-mésenchymateuse *in vivo*

a. Modèles de lignées cellulaires

Nous nous sommes de nouveau demandé si cette augmentation du phénotype métastatique était associée à un phénotype de transition épithélio-mésenchymateuse. L'expression en ARNm des marqueurs de transition a d'abord été évaluée dans les xénogreffes sous-cutanées et avons trouvé des résultats similaires à ceux obtenus *in vitro*, à la fois pour la lignée cellulaire A375 et la lignée Sk-Mel-28 (Figure 32).

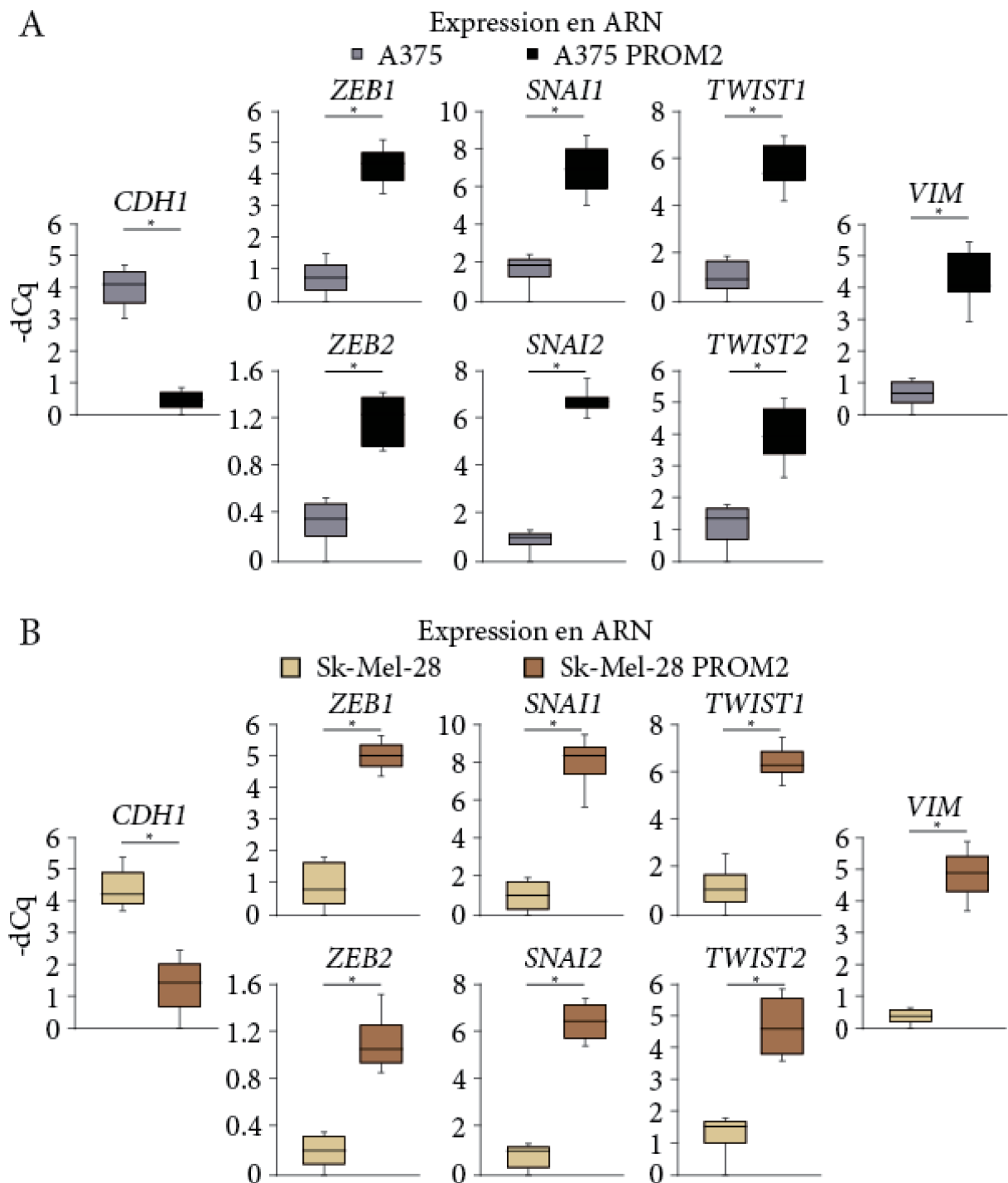


Figure 32 : Expression en ARNm des marqueurs de transition épithélio-mésenchymateuse dans les tumeurs de xénogreffes sous-cutanées des lignées cellulaires A375 et A375 PROM2 (A) et des lignées cellulaires Sk-Mel-28 et Sk-Mel-28 PROM2 (B).

Chez des souris injectées par voie intraveineuse avec les lignées cellulaires de mélanome, l'expression en ARNm des marqueurs de transition dans les métastases pulmonaires microdisséquées au laser a été évaluée (Figure 33).

Microdissection laser d'une métastase pulmonaire

Avant

Après

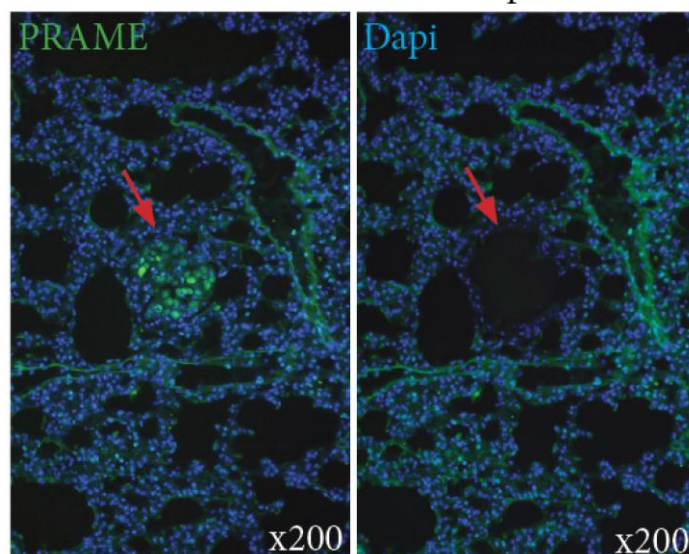


Figure 33 : Illustration de la microdissection laser d'une métastase pulmonaire de mélanome exprimant PRAME (marquage vert, flèche rouge), marquage des noyaux cellulaires en bleu.

Des niveaux significativement plus élevés ont été trouvés dans les métastases surexprimant *PROM2* par rapport à celles des lignées cellulaires natives. L'expression des marqueurs de transition était également beaucoup plus élevée dans les métastases pulmonaires dérivées du clone surexprimant *PROM2* par rapport aux tumeurs sous-cutanées obtenues avec le même clone (Figure 34).

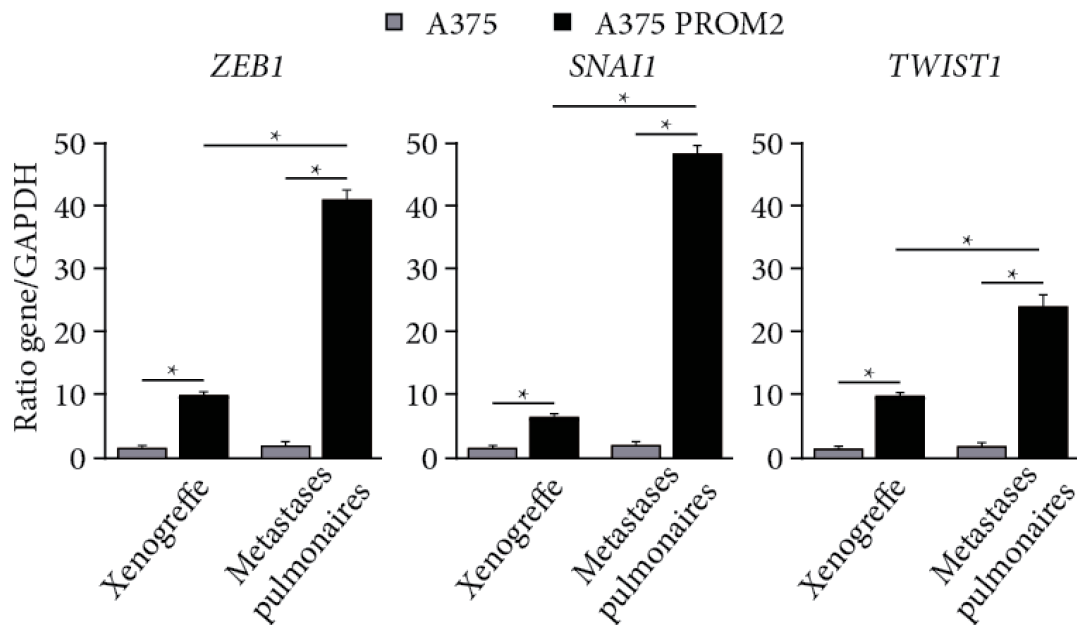


Figure 34 : Expression en ARN des cellules tumorales d'une souris injectée avec A375 ou A375 PROM2, avec une différence significative dans l'expression de ZEB1, SNAI1 et TWIST1.

Par immunomarquage, l'expression de ZEB1 et SNAIL/SLUG dans les tumeurs de xénogreffes a également été évaluée. Les comptages effectués ont montré que $77 \pm 4\%$ des cellules exprimaient ZEB1 et $81 \pm 7\%$, exprimaient SNAI / SLUG dans les tumeurs provenant de xénogreffes de cellules surexprimant *PROM2*. Ces pourcentages étaient significativement plus élevés que les pourcentages obtenus dans les tumeurs provenant de xénogreffes de cellules natives (Figure 35).

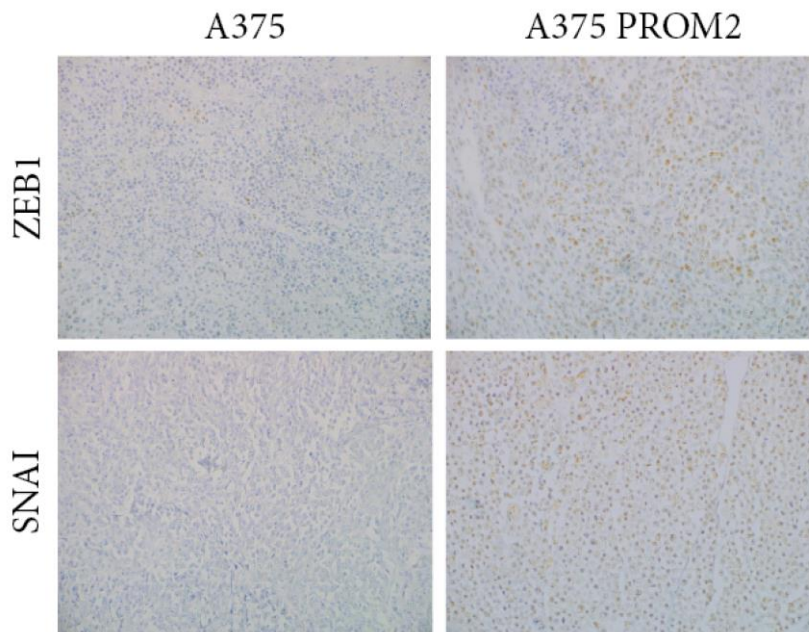


Figure 35 : Immunomarquage ZEB1 et SNAI des cellules tumorales xéno greffées de souris injectées avec A375 ou A375 PROM2.

b. Modèles de PDX

Dans les cinq modèles de xéno greffes de mélanome dérivées de patients, nous avons systématiquement analysé tous les organes et montré une augmentation du nombre de métastases dans XM1 et XM2 par rapport aux trois autres modèles, conformément aux niveaux d'expression de *PROM2* (Figure 36).

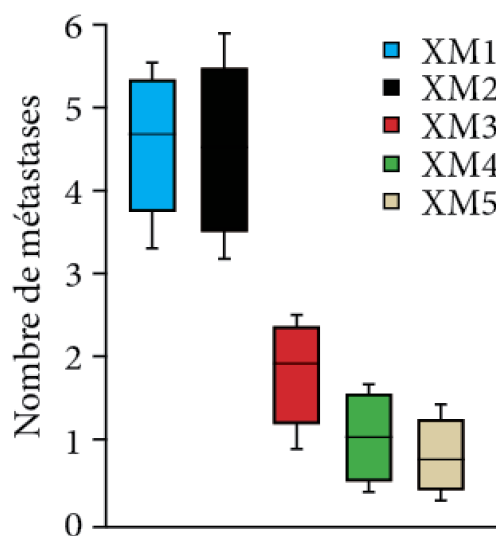


Figure 36 : Nombre moyen de métastases dans les cinq modèles de xéno greffes de mélanome dérivées de patients.

Étant donné que la médiane dCq pour l'expression en ARNm de *PROM2* dans les xénogreffes tumorales sous-cutanées était de 12, nous l'avons utilisée comme valeur seuil (< 12 = Expression faible, PROM2- ; ≥ 12 = Expression élevée, PROM2+). Dans l'ensemble, nous avons trouvé une différence significative entre les deux groupes pour l'expression en ARNm de *PROM2* ($P < 0,0001$). Lorsque nous avons évalué les marqueurs de transition dans ces deux groupes, l'expression de *CDH1* était significativement plus faible dans les tumeurs PROM2+ par rapport aux tumeurs PROM2- ($P = 0,002$), tandis que d'autres marqueurs, y compris *VIM*, avaient une expression plus élevée dans les tumeurs PROM2+ que dans les tumeurs PROM2- ($P = 0,002$) (Figure 37).

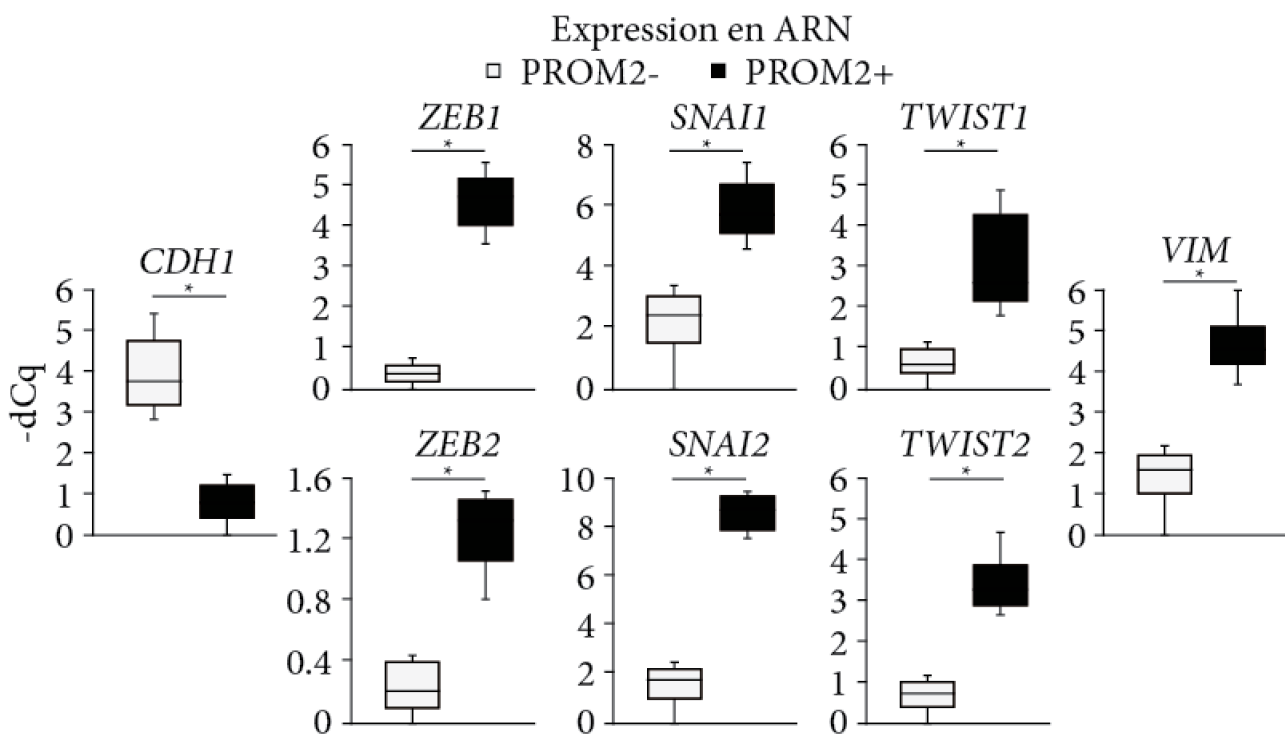


Figure 37 : Niveau d'expression en ARN du marqueur épithélial (CDH1), des marqueurs de transition épithélio-mésenchymateuse (ZEB1, ZEB2, SNAI1, SNAI2, TWIST1, TWIST2) et du marqueur mésenchymateux (VIM) de tumeurs de xénogreffes de mélanomes dérivés de patients exprimant PROM2 faiblement (PROM2-) ou fortement (PROM2+).

Dans les tumeurs PROM2+, par immunomarquages, nous avons également trouvé un nombre significativement plus élevé de cellules exprimant les marqueurs de transition épithélio-mésenchymateuse ZEB1 et SNAIL/SLUG (respectivement $68 \pm 5\%$ et $82 \pm 6\%$) par

rapport aux tumeurs PROM2- (respectivement $7 \pm 6\%$ et $11 \pm 4\%$, $P < 0,01$ pour les deux marqueurs) (Figure 37).

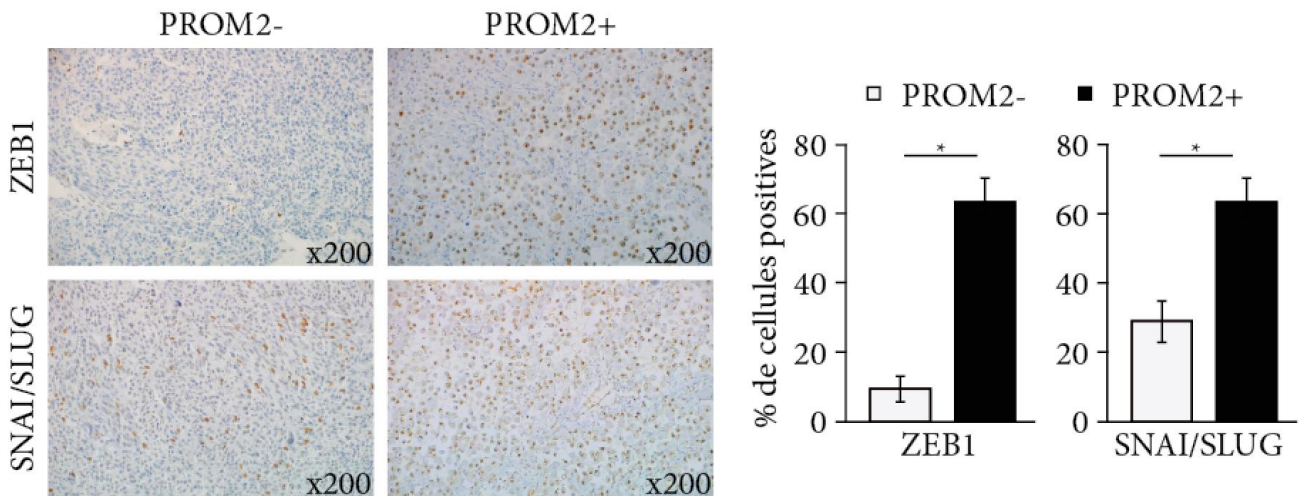


Figure 38 : Immunomarcage ZEB1 et SNAI/SLUG de tumeur de xéogreffes de mélanomes dérivés de patients exprimant PROM2 faiblement (PROM2-) ou fortement (PROM2+), avec un pourcentage de cellules exprimant ces marqueurs significativement plus élevés dans les tumeurs PROM2+.

La différence d'expression protéique de ZEB1 et SNAI/SLUG a été confirmée avec des Western Blot sur ces mêmes tumeurs PROM2- et PROM2+ (Figure 39).



Figure 39 : Western Blot de tumeurs de xéogreffes de mélanomes dérivées de patients exprimant PROM2 faiblement (PROM2-) ou fortement (PROM2+) pour les protéines PROM2, ZEB1, SNAI/SLUG, ainsi que la protéine de référence GAPDH.

La surexpression de *PROM2* est associée à une résistance à la ferroptose *in vitro* et *in vivo*

Étant donné que *PROM2* a été décrite comme ayant un rôle dans la résistance à la ferroptose dans des lignées cellulaires du cancer du sein surexprimant *PROM2* [199], nous avons émis l'hypothèse que l'augmentation du potentiel invasif des cellules de mélanome surexprimant *PROM2* était associée à ce mécanisme de résistance à la mort des cellules par ferroptose. Sous un stimulus de ferroptose, la quantité de fer ferreux (Fe^{2+}) augmente dans le cytoplasme et conduit à la production d'espèces réactives de l'oxygène, à la peroxydation des lipides membranaires puis à la mort cellulaire [243].

1) Quantification du Fer dans les lignées cellulaires de mélanome *in vitro*

Lorsque nous avons quantifié la quantité de Fe^{2+} dans les cellules de mélanome, nous avons constaté qu'elle diminuait graduellement et significativement entre les lignées KO, les lignées natives et les lignées surexprimant *PROM2*.

Lorsque nous avons ajouté aux cellules de la déféroxamine (DFO), un chélateur du fer inhibiteur de la ferroptose, la quantité de Fe^{2+} a diminué considérablement par rapport aux lignées cellulaires non traitées ($P < 0,05$). En revanche, lorsque nous avons ajouté aux cellules un activateur de ferroptose, RSL3 ou érastine, la quantité de Fe^{2+} a considérablement augmenté pour les lignées cellulaires KO et natives ($P < 0,05$) parallèlement à une augmentation de la mort cellulaire. Étonnamment, le niveau de Fe^{2+} n'a pas varié pour les lignées cellulaires surexprimant *PROM2* et cela est associé à une absence de mort cellulaire liée à la résistance à la ferroptose (Figure 40).

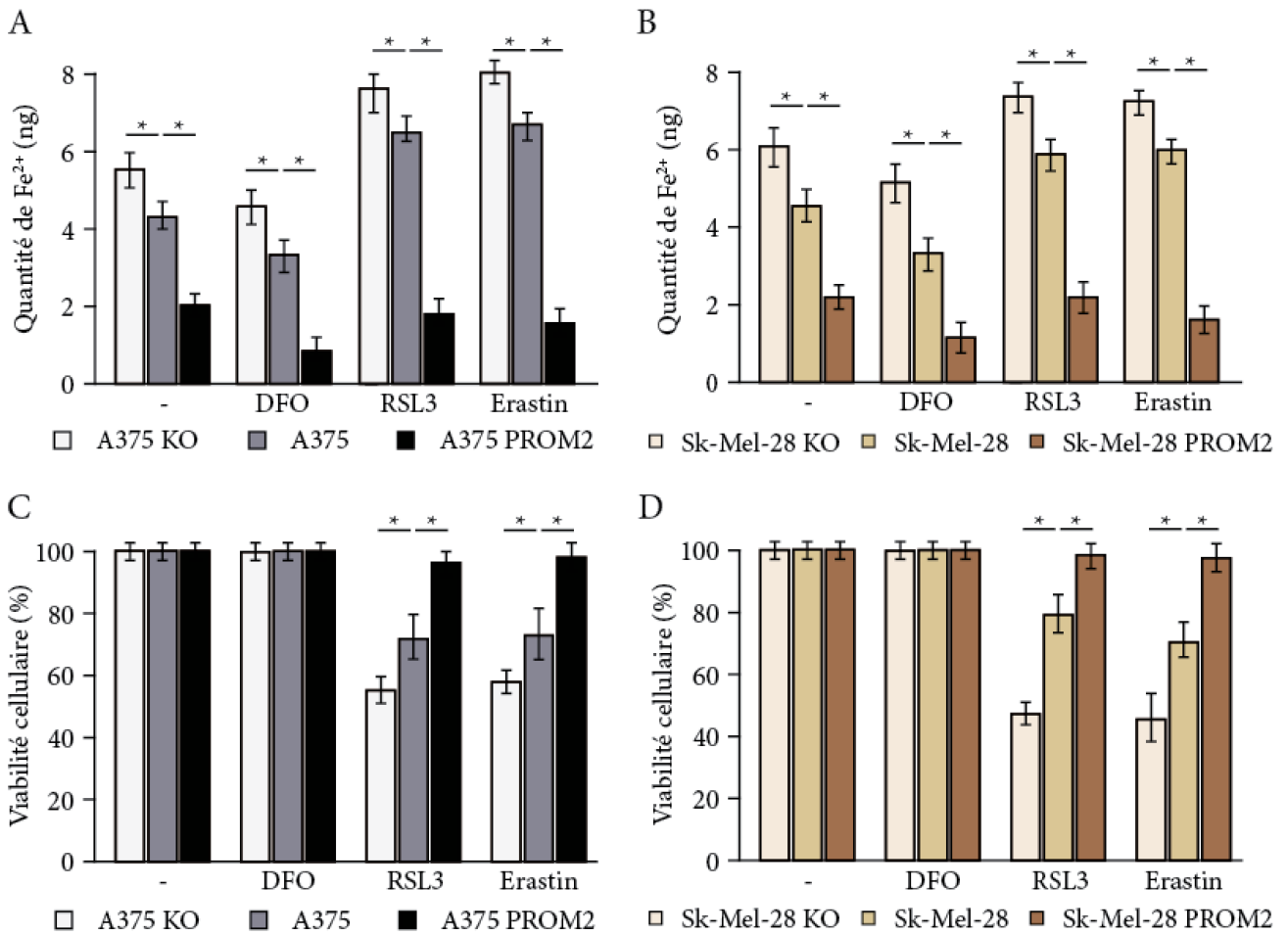


Figure 40 : Quantification du fer ferreux (Fe²⁺) dans les lignées cellulaires A375 KO, A375 et A375 PROM2 (A) et dans les lignées Sk-Mel-28 KO, Sk-Mel-28 et Sk-Mel-28 PROM2 (B) avec ajout de déféroxamine ou RSL3 ou Erastin pendant 24 heures. Viabilité cellulaire des lignées cellulaires A375 KO, A375 et A375 PROM2 (C) et dans les lignées Sk-Mel-28 KO, Sk-Mel-28 et Sk-Mel-28 PROM2 (D) avec ajout de déféroxamine ou rsl3 ou erastine pendant 24 heures.

En utilisant des concentrations croissantes de RSL3 et d'érastine dans les cellules A375 PROM2, il a été constaté que la quantité de Fe²⁺ augmente à partir d'une concentration de 1,5 µM pour RSL3 et de 20 µM pour l'érastine, ce qui est associée à une diminution significative de la viabilité cellulaire (Figure 41).

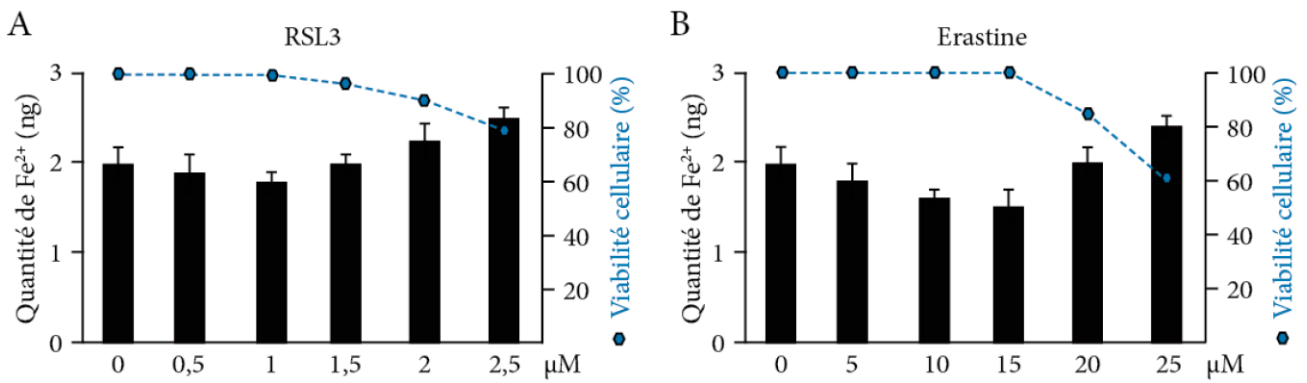


Figure 41 : Quantification du fer ferreux (Fe²⁺) et de la viabilité cellulaire de la lignée cellulaire A375 PROM2 traitée avec 0, 0,5, 1, 1,5, 2 et 2,5 de RSL3 (A) ou 0, 5, 10, 15, 20 et 25 d'erastine pendant 24 heures (B).

Pour la lignée cellulaire Sk-Mel-28 PROM2, la quantité de Fe²⁺ augmente à partir d'une concentration de 1,5 μM pour RSL3 et de 15 μM pour l'érastine, également associée à une diminution significative de la viabilité cellulaire (Figure 42).

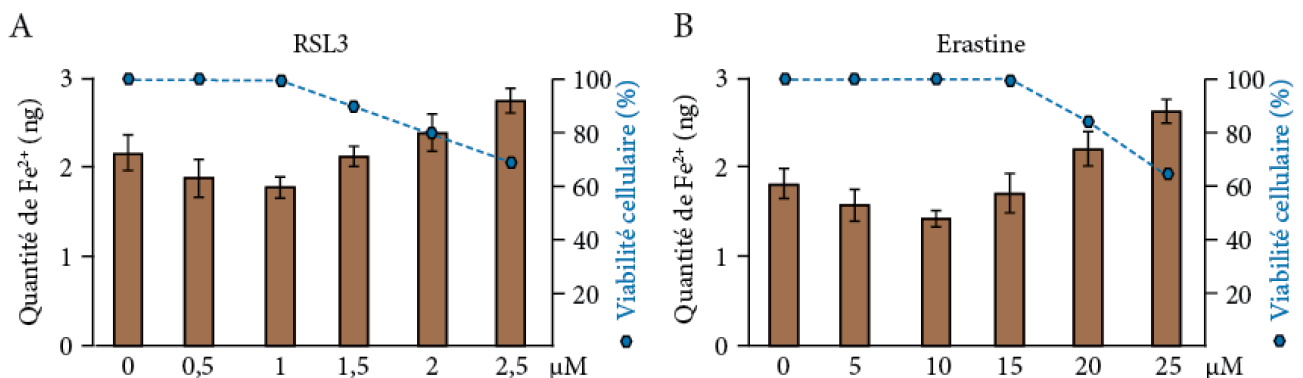


Figure 42 : Quantification du fer ferreux (Fe²⁺) et de la viabilité cellulaire de la lignée cellulaire A375 PROM2 traitée avec 0, 0,5, 1, 1,5, 2 et 2,5 de RSL3 (A) ou 0, 5, 10, 15, 20 et 25 d'erastine pendant 24 heures (B).

D'un point de vue protéique, par Western Blot avec TSG101, un marqueur de corps multi-vésiculaires aidant le Fe²⁺ à sortir de la cellule, et par ELISA avec le 4HNE, un marqueur de la peroxydation des lipides, nous avons observé que la quantité de corps multi-vésiculaire augmente des lignées KO aux lignées surexprimants PROM2 tandis que la peroxydation des lipides diminue (Figure 43).

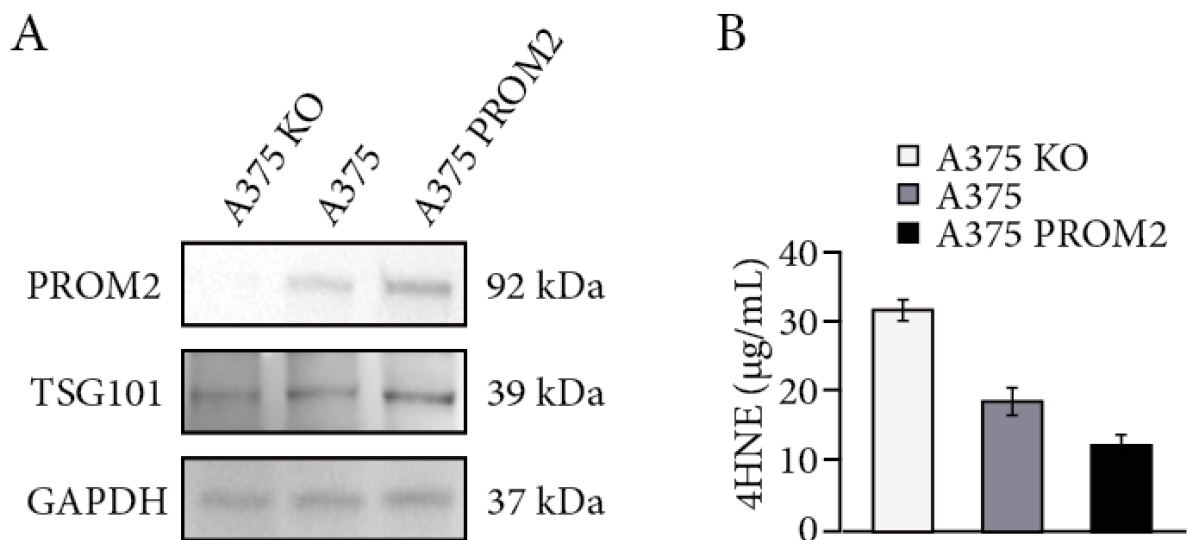
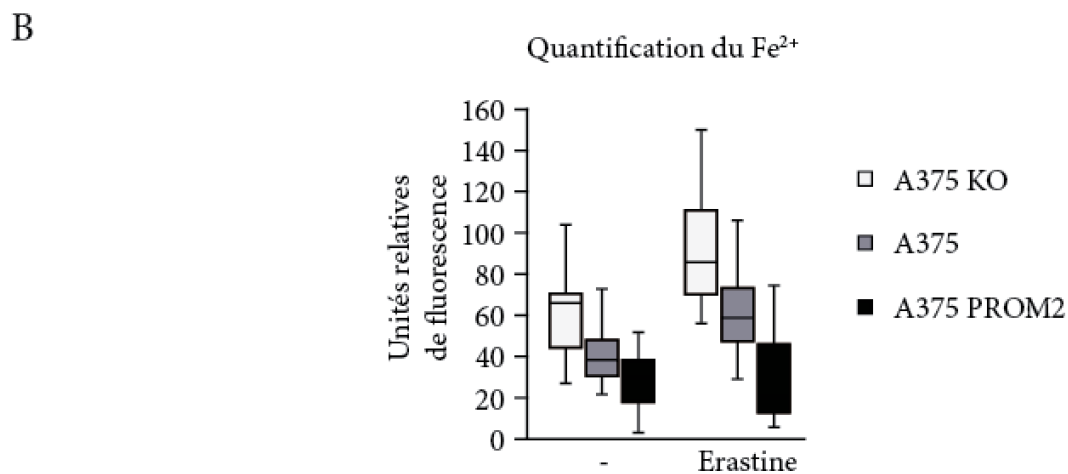
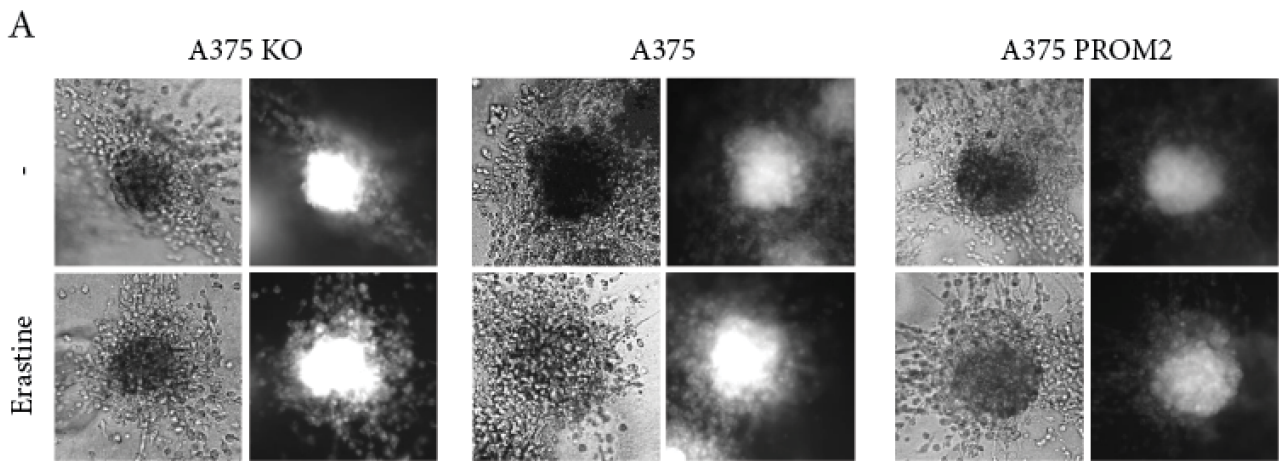


Figure 43 : Western Blot et ELISA sur les lignées cellulaires A375 KO, A375 et A375 PROM2 pour quantifier le TSG101 (marqueur des corps multivésiculaires) (A) et le 4HNE (marqueur de la peroxydation lipidique) (B).

2) Modèles 3D de sphéroïdes

Nous avons également évalué le niveau de Fe^{2+} dans les sphéroïdes de la lignée cellulaire de mélanome A375. Les trois clones de lignées cellulaires A375 ont étéensemencés dans des micro-puits pour former des sphéroïdes et le Fe^{2+} a été quantifié par fluorescence au FerroOrange. Nous avons observé que le Fe^{2+} diminuait significativement de A375 KO à A375 et à A375 PROM2. Comme observé dans l'expérience précédente, lorsque nous avons ajouté l'érastine aux sphéroïdes, la quantité de Fe^{2+} a significativement augmenté pour les lignées cellulaires A375 KO et A375 et n'a pas varié pour la lignée cellulaire A375 PROM2 (Figure 44).



*Figure 44 : Quantification du fer dans les sphéroïdes
Images (A) et quantification (B) de la fluorescence FerroOrange des sphéroïdes des lignées cellulaires A375 KO, A375 et A375 PROM2 traitées ou non avec de l'erastine.*

3) Modèles de PDX

Nous avons également quantifié le Fe²⁺ dans les cinq modèles de xénogreffes de mélanome dérivées de patients (sur un total de 25 tumeurs) et nous avons observé une quantité significativement plus faible de Fe²⁺ dans les modèles XM1 et XM2 par rapport aux trois autres modèles, et ce en corrélation avec les niveaux d'expression de l'ARNm *PROM2* (Figure 45).

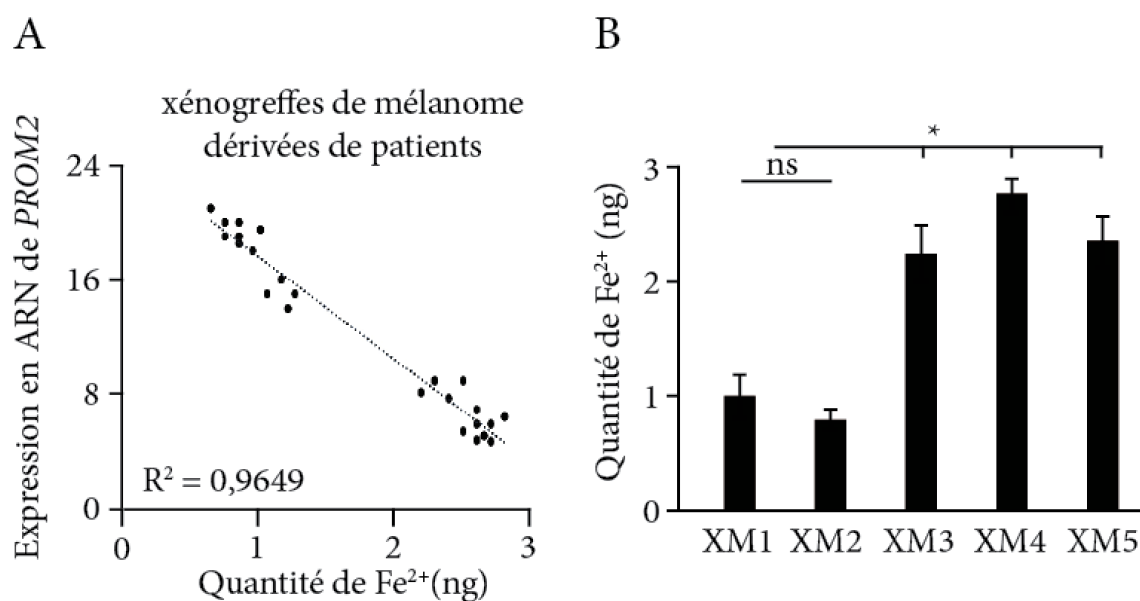


Figure 45 : Quantification du fer ferreux (Fe^{2+}) dans les xénogreffes de mélanome dérivées de patients en fonction de l'expression en ARN de *PROM2* (A) Quantification du fer ferreux (Fe^{2+}) des 5 modèles de mélanome (B).

L'ensemble de ces résultats montre qu'il y a un lien étroit entre l'expression de *PROM2* et la résistance à la ferroptose dans le mélanome humain.

PROM2 est impliqué dans une boucle physiopathologique

Lorsqu'une cellule tumorale se détache de son foyer primaire pour se diriger vers un foyer secondaire, elle subit un stress ferroptotique. Ce détachement de la matrice extracellulaire provoque une augmentation de l'expression de *PROM2* dans des cellules cancéreuses du sein [199]. Nous avons voulu confirmer si cela était également le cas dans nos cellules de mélanome humain de la lignée A375. Nous avons observé que, après 30 à 120 minutes de détachement des cellules, l'expression de *PROM2* augmentait graduellement en fonction du temps de détachement (Figure 46).

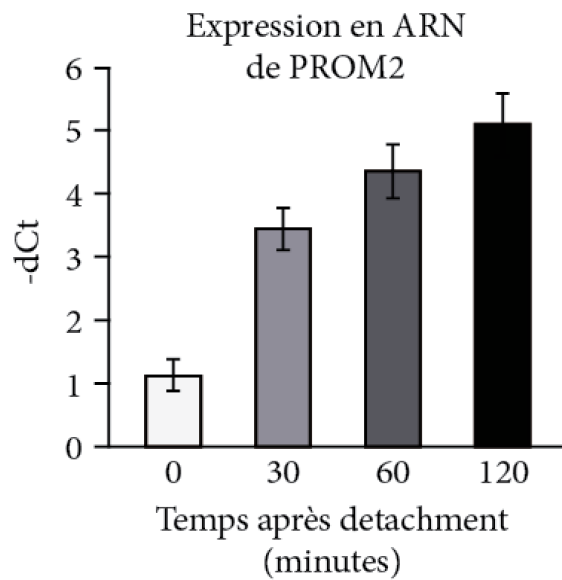


Figure 46 : Expression en ARN de *PROM2* après détachement pendant 0, 30, 60 et 120 minutes des cellules de la lignée A375.

Lorsque nous avons évalué l'expression de *PROM2* dans les métastases pulmonaires dérivées du clone A375 *PROM2* par digital droplet PCR, elle était quarante fois plus élevée que dans le clone injecté, comme observé pour l'expression des marqueurs EMT (Figure 47).

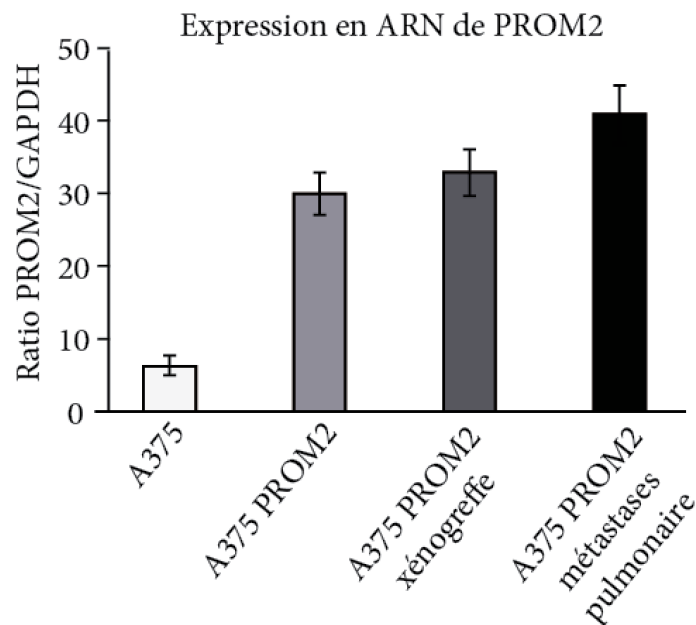


Figure 47 : Expression en ARN de *PROM2* dans la lignée cellulaire A375 et dans la lignée cellulaire, les xénogreffes et les métastases pulmonaires A375 *PROM2*.

Nous avons donc émis l'hypothèse que le processus métastatique lié à la surexpression de *PROM2* lui-même conduisait à une forte régulation positive de *PROM2*, aggravant ainsi le processus métastatique. Nous avons d'abord injecté par voie intraveineuse une nouvelle série de 5 souris nudes avec la lignée cellulaire A375 *PROM2* (passage 0). Après 6 semaines, au moment de l'euthanasie, les métastases pulmonaires ont été macrodisséquées et dissociées pour être cultivées en milieu normal (DMEM). Après une semaine de culture cellulaire et de prolifération, les cellules ont été réinjectées dans 5 souris (passage 1). Le même schéma d'enrichissement a été réalisé pour un total de 3 passages. Du passage 0 au passage 3, l'expression de *PROM2* a progressivement augmenté dans les lignées cellulaires et dans leurs métastases correspondantes. De plus, après chaque nouveau passage, il y avait une augmentation significative du nombre de localisations métastatiques. Au passage 3, à l'aide d'échographies, des métastases articulaires et des globes vésicaux ont pu être détectées chez certaines souris 4 semaines après l'injection intraveineuse (Figure 48).

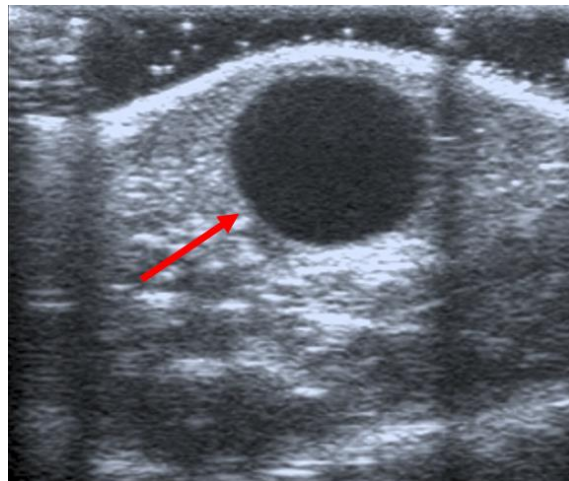


Figure 48 : Echographie d'une souris présentant un globe vésical

Étant donné que *PROM2* induit l'expression et la phosphorylation de la cavéoline-1 (*CAV1*) [233, 234], qui peut elle-même augmenter l'expression en ARNm de *SLUG*, *TWIST* et *VIM* [244-246], nous avons évalué l'expression de tous ces marqueurs à travers les passages dans les lignées cellulaires et les métastases dérivées. Parallèlement à l'augmentation de

l'expression de *PROM2*, nous avons montré une augmentation significative progressive de l'expression en ARNm des marqueurs *CAV1* et de transition épithélio-mésenchymateuse du passage 0 au passage 3 (Figure 49).

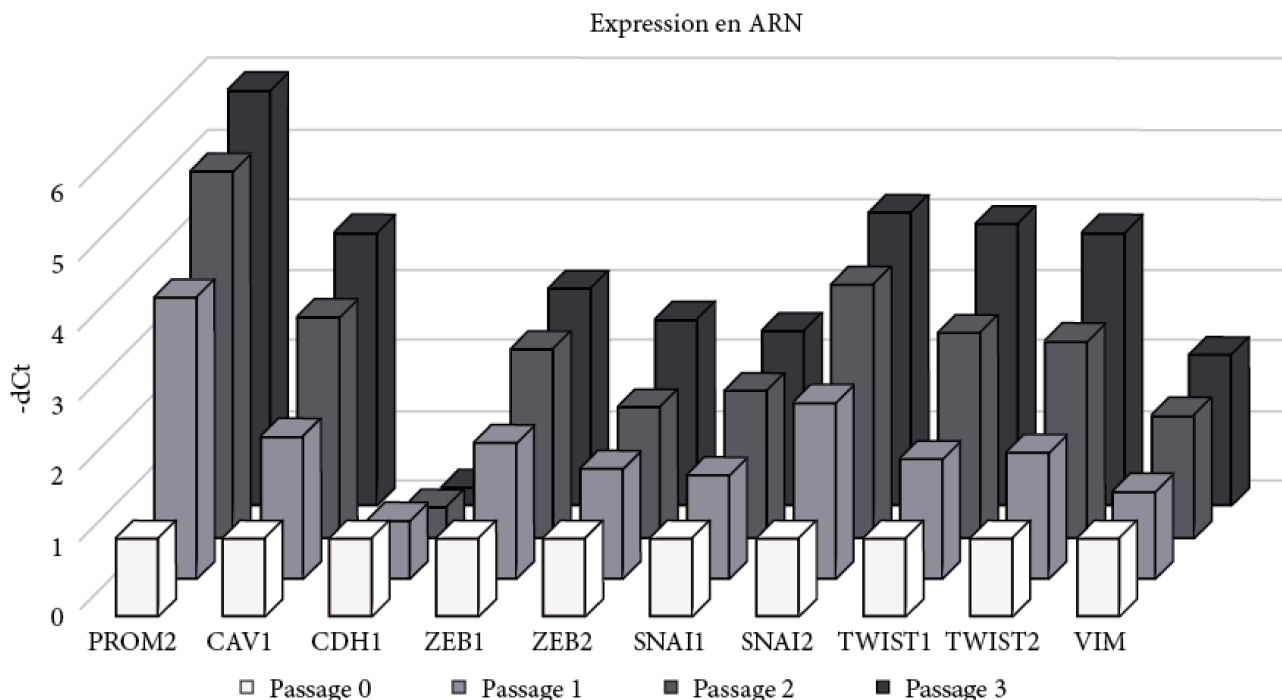


Figure 49 : Niveau d'expression en ARN de PROM2, de la cavéoline-1 (CAV1), du marqueur épithélial (CDH1), des marqueurs de transition épithélio-mésenchymateuse (ZEB1, ZEB2, SNAI1, SNAI2, TWIST1, TWIST2) et du marqueur mésenchymateux (VIM) dans les tumeurs des souris injectées avec la lignée A375 PROM2 du passage 0 au passage 3.

Ciblage de *PROM2* avec un oligonucléotide anti-sens pour prévenir les métastases

1) Expression de *PROM2* dans les tissus sains humains

Nous avons effectué des immunomarquages sur le cœur, le rein, le foie, le tube digestif et la peau humaine et nous avons pu observer que *PROM2* n'est pas exprimé dans les tissus sains humains, à l'exception de la peau (Figure 50).

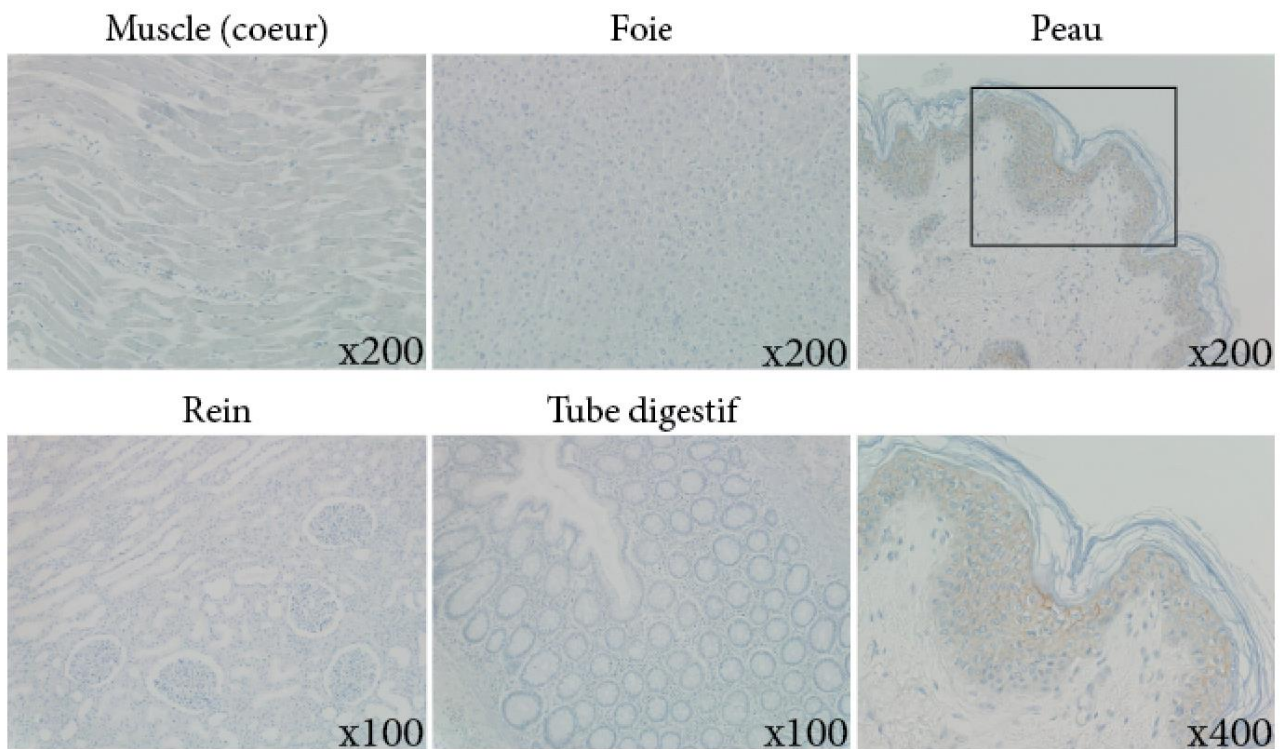


Figure 50 : Immunomarquage PROM2 de tissus humains sains (cœur, foie, rein, tube digestif et peau).

Nous avons décidé de développer un traitement ciblant *PROM2*. Nous avons choisi de développer un oligonucléotide anti-sens pour cibler la protéine *PROM2* intracellulaire dans le but de prévenir à la fois la migration et la résistance à la ferroptose des cellules de mélanome.

Afin de développer cet oligonucléotide, nous avons débuté une collaboration avec le Professeur Phan de l'Institut de la Biologie Structurale de l'Université Technologique Nanyang à Singapour. Nous leur avons envoyé nos lignées cellulaires afin qu'ils puissent développer un oligonucléotide anti-sens dirigé contre *PROM2*. Une fois la synthèse de cet oligonucléotide effectué, l'oligonucléotide anti-sens nous a été envoyé afin que l'on puisse le tester.

2) Le traitement avec des oligonucléotides anti-sens ciblant *PROM2* diminue le niveau de *PROM2* dans les cellules de mélanome

Nous avons pu observer que le traitement pendant quatre jours de la lignée cellulaire A375 *PROM2* avec des oligonucléotides anti-sens ciblant *PROM2* a considérablement diminué le niveau en ARNm de *PROM2* (Figure 51).

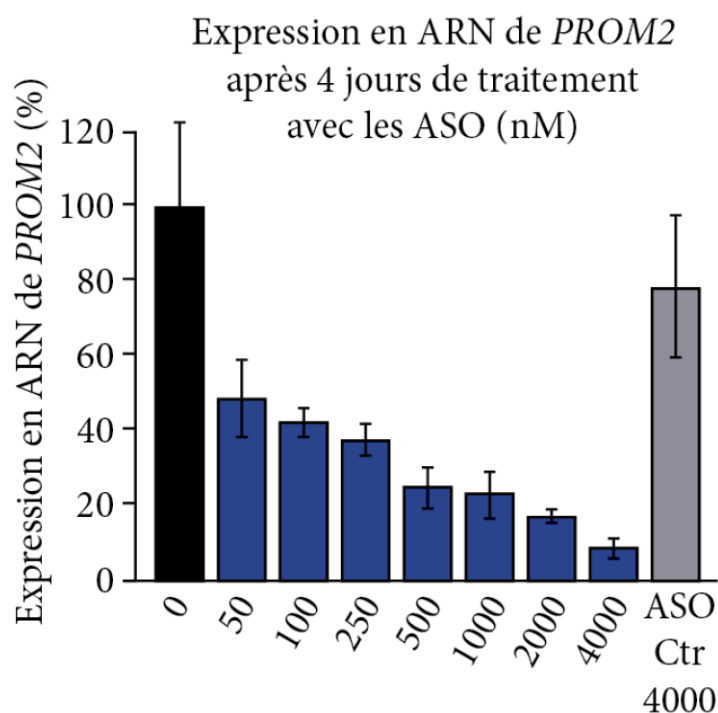


Figure 51 : Expression en ARN de *PROM2* dans les cellules A375 *PROM2* traitées pendant 4 jours avec 0, 50, 100, 250, 500, 1000, 2000 et 4000 nM d'oligonucléotides anti-sens dirigés contre *PROM2* (ASO).

Au regard de ces résultats, nous avons choisi de sélectionner deux doses de traitement par oligonucléotides anti-sens ciblant *PROM2* pour effectuer la suite de nos expériences : un traitement avec 50 nM et un autre avec 500 nM, correspondant respectivement à une diminution de 50% et 75% de l'expression de *PROM2*. Nous avons pu observer que l'expression en ARN de *PROM2* était similaire entre la lignée de mélanome A375 native et la lignée surexprimant *PROM2* traitées avec 50 nM d'oligonucléotides anti-sens ciblant *PROM2* pendant 4 jours. La lignée surexprimant *PROM2* traitée avec 500 nM

d'oligonucléotides quant à elle présente une expression intermédiaire entre la lignée native et la lignée knock-out pour *PROM2* (Figure 52).

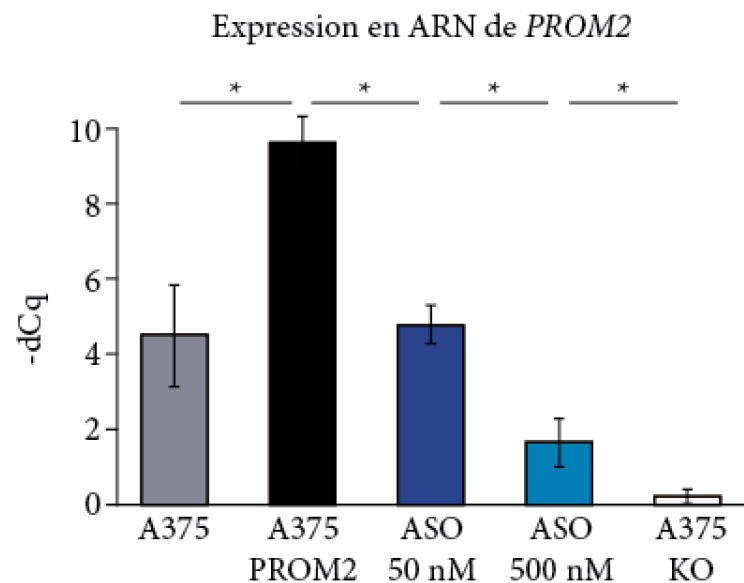
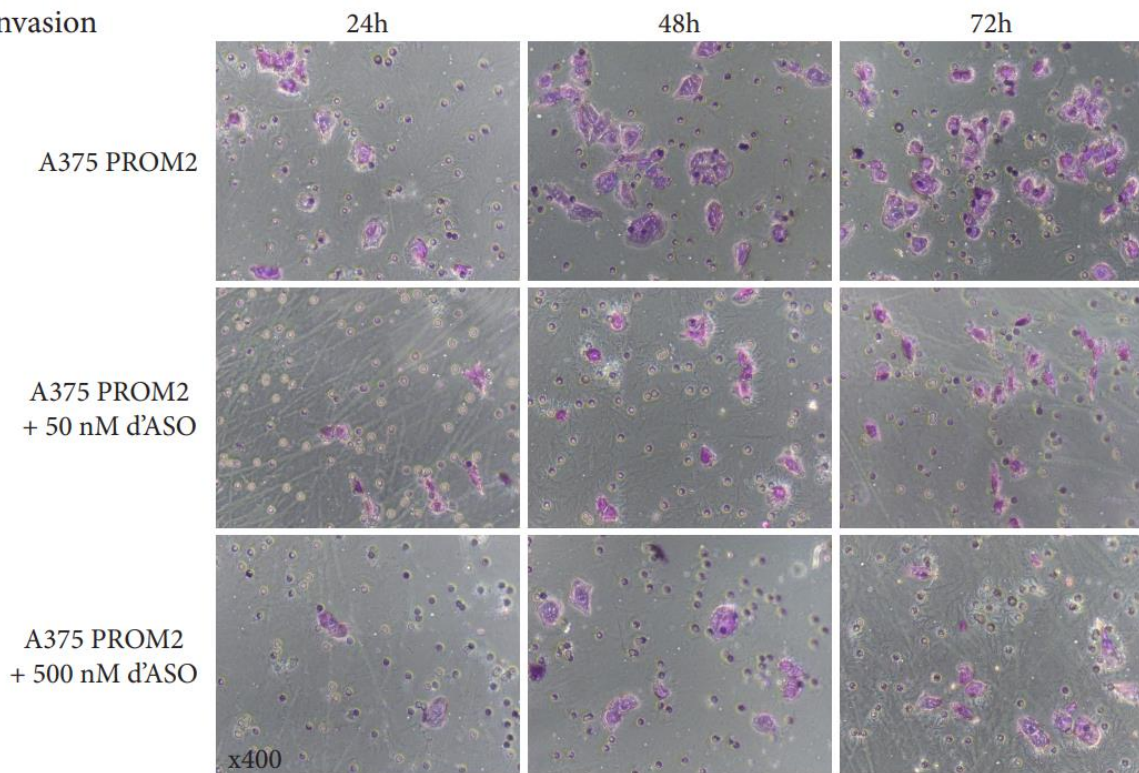


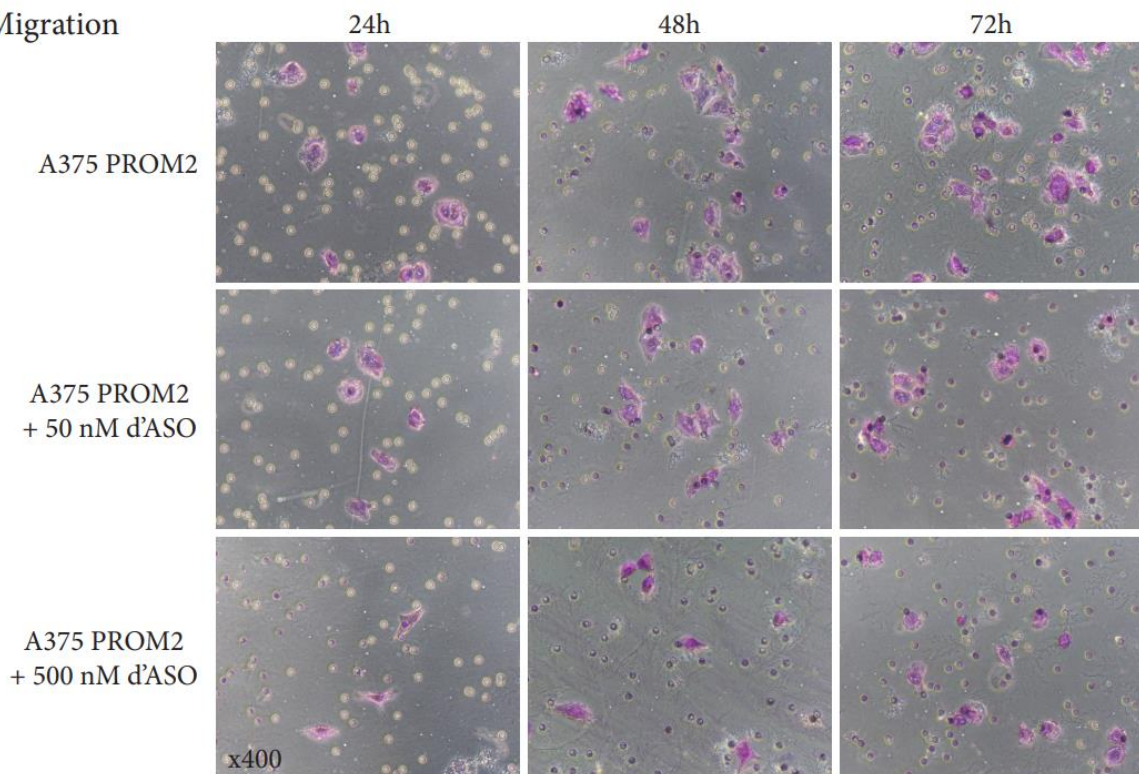
Figure 52 : Expression de PROM2 des lignées knock-out et natives ainsi que de la lignée surexprimant PROM2 après traitement pendant 4 jours avec 0, 50 ou 500 nM d'oligonucléotides anti-sens dirigés contre PROM2 (ASO).

Nous nous sommes ensuite interrogés sur les effets *in vitro* sur la migration et l'invasion du traitement par oligonucléotides anti-sens ciblant *PROM2* sur la lignée cellulaire A375 *PROM2*. Quatre jours après le traitement, la migration et l'invasion ont été évaluées à 24h, 48h et 72h, montrant que le traitement par oligonucléotides anti-sens ciblant *PROM2* a diminué à la fois la migration et l'invasion de la lignée cellulaire A375 *PROM2* (Figure 53).

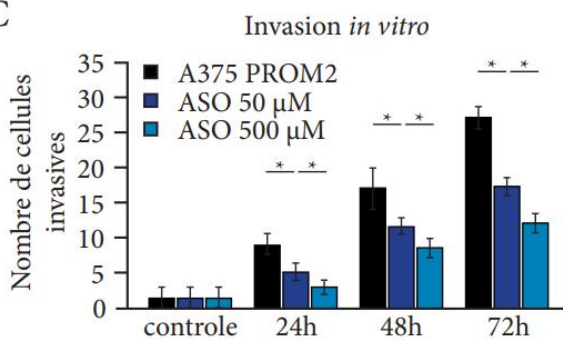
A Invasion



B Migration



C



D

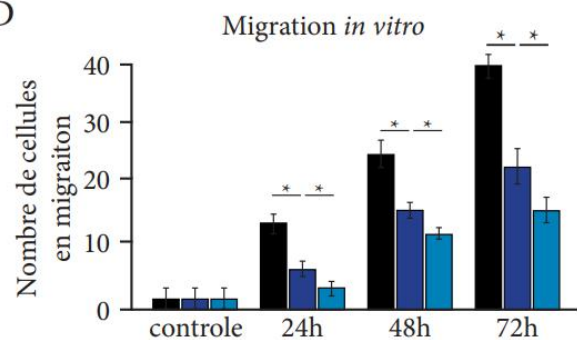


Figure 53: Quantification de la migration et de l'invasion

Image des cellules invasives (en violet) A375 PROM2 traités avec 0, 50 ou 500 nM d'oligonucléotides anti-sens (ASO) ciblant PROM2 (A). Image des cellules en migration (en violet) A375 PROM2 traités avec 0, 50 ou 500 nM d'ASO ciblant PROM2 (B). Histogramme du nombre moyen par champs de cellules invasives A375 PROM2 traités avec 0, 50 ou 500 nM d'ASO ciblant PROM2 (C). Histogramme du nombre moyen par champs de cellules en migration A375 PROM2 traités avec 0, 50 ou 500 nM d'ASO ciblant PROM2 (D).

Quatre jours après le traitement de la lignée cellulaire A375 PROM2, le fer ferreux était également plus élevé que dans les cellules surexprimant *PROM2* non traitées et les cellules de la lignée native (Figure 54).

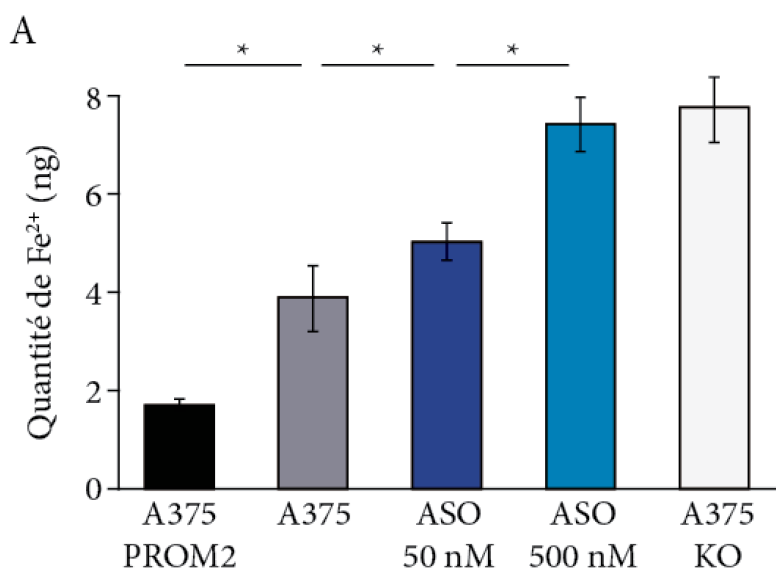


Figure 54: Quantification du fer ferreux (Fe²⁺) des lignées KO et natives A375, et de la lignée cellulaire A375 PROM2 traités avec 0, 50 ou 500 nM d'ASO ciblant PROM2.

Lorsque nous avons évalué l'effet de l'oligonucléotide anti-sens ciblant *PROM2* sur le phénotype de transition épithélio-mésenchymateuse de la lignée cellulaire A375 PROM2, nous avons également constaté une diminution de l'expression des marqueurs de transition par rapport aux cellules A375 PROM2 non traitées (Figure 55).

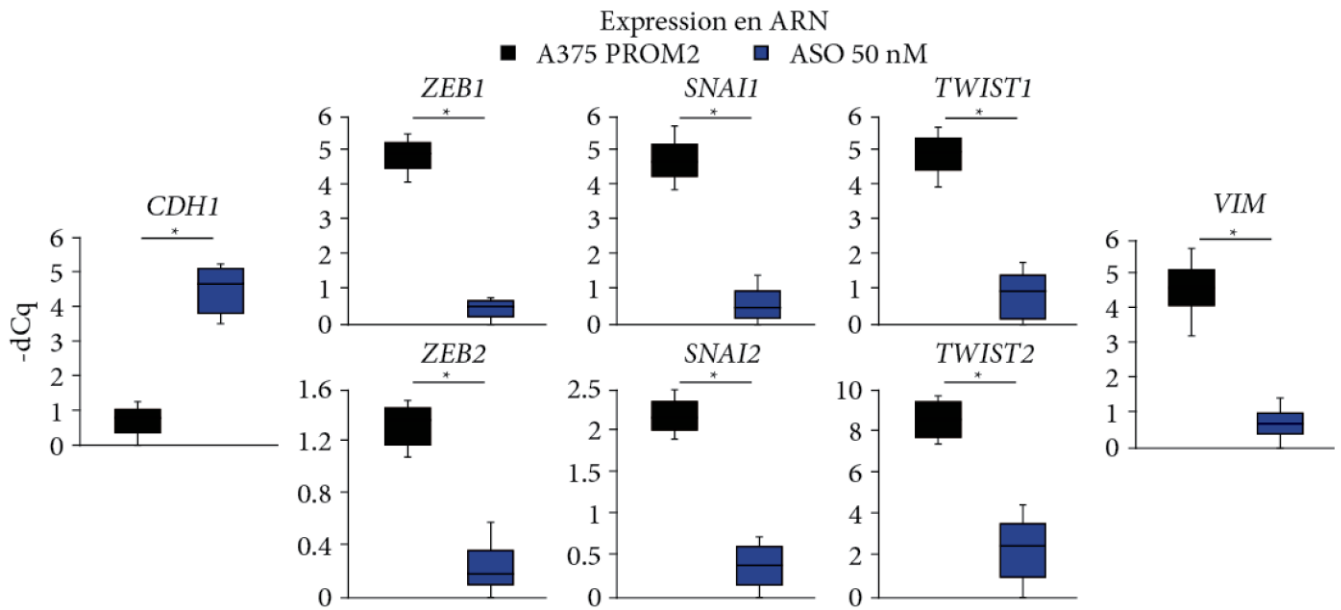


Figure 55 : Niveau d'expression en ARN du marqueur épithélial du marqueur épithélial (CDH1), des marqueurs de transition épithélio-mésenchymateuse (ZEB1, ZEB2, SNAI1, SNAI2, TWIST1, TWIST2) et du marqueur mésenchymateux (VIM) de la lignée cellulaire A375 PROM2 traités ou non avec 50 nM d'oligonucléotide anti-sens ciblant PROM2 (ASO).

Pour évaluer l'effet des oligonucléotides anti-sens ciblant *PROM2* *in vivo*, nous avons injectées $5 \cdot 10^6$ cellules de la lignée A375 PROM2 traitées pendant 4 jours avec ces derniers. Après 6 semaines, nous n'avons observé aucune charge tumorale dans les souris.

L'ensemble de ces résultats montre que le ciblage de *PROM2* par des oligonucléotides anti-sens réduit l'implantation des métastases de mélanome.

Discussion

Dans cette étude préclinique, il a été démontré que le processus métastatique du mélanome est étroitement lié à une expression élevée de *PROM2*, faisant de *PROM2* une bio-cible prometteuse. Dans une étude clinique, en utilisant des échantillons de biopsie de 101 patients atteints de métastases ganglionnaires de mélanome, notre unité de recherche avait montré qu'une expression élevée de *PROM2* était associée à un risque métastatique à distance et à une survie plus courte [67]. Dans deux grandes séries de ganglions lymphatiques métastatiques de mélanome, une expression élevée de *PROM2* s'est également avérée associée à une faible survie [247-249].

PROM2 peut agir comme un oncogène ou un gène suppresseur de tumeur selon le type de cancer, une expression élevée en ARNm *PROM2* étant associée à une survie plus courte dans les cancers métastatiques du pancréas, du rein, de l'ovaire et du poumon [236-238]. Ici, en utilisant des lignées cellulaires de mélanome injectées par voie intraveineuse chez des souris et des xénogreffes de mélanome dérivées de patients, nous avons démontré que la charge métastatique était étroitement liée à l'expression de *PROM2* et à l'expression de marqueurs de transition épithélio-mésenchymateuse. Il s'agit de résultats originaux, puisque le lien entre *PROM2* et l'expression des marqueurs de transition épithélio-mésenchymateuse n'a pas encore été rapporté. Ce travail de thèse a permis également de démontrer que l'expression de *PROM2* était associée à une résistance à la ferroptose. *In vitro*, la surexpression de *PROM2* a entraîné une résistance à la ferroptose des lignées cellulaires du cancer du sein [199]. Dans notre étude, nous avons montré que cette association était également vraie *in vivo* dans les xénogreffes de mélanome dérivées de patients qui sont des modèles précliniques pertinents car ils reflètent bien l'hétérogénéité tumorale des cancers métastatiques humains [250].

Dans le mélanome métastatique humain, *PROM2* semble être la pierre angulaire de deux caractéristiques du cancer [149, 251, 252] : le processus métastatique et la résistance à la

mort cellulaire, incluant la résistance aux thérapies ciblées et aux immunothérapies [253]. La combinaison de ces deux caractéristiques, à travers une boucle d'enrichissement, contribue à aggraver la charge métastatique. Le mécanisme par lequel l'expression des marqueurs de transition épithélio-mésenchymateuse est régulée à la hausse reste incertain, mais il semble étroitement lié à la modulation de l'expression PROM2 comme le montrent les ASO anti-PROM2. PROM2 est physiologiquement associée à l'endocytose cavéolaire médiée par cdc42-GTP en phosphorylant la cavéoline-1 [233, 234], et éventuellement en modulant son expression. Nous avons montré dans nos modèles que l'expression en ARNm *CAV1* augmentait lorsque l'expression de *PROM2* augmentait. Étant donné que la surexpression en ARNm et en protéine de *CAV1* peuvent induire une surexpression des marqueurs de transition épithélio-mésenchymateuse dans diverses lignées cellulaires cancéreuses [254-258], *CAV1* pourrait être intermédiaire entre *PROM2* et les marqueurs de transition épithélio-mésenchymateuse dans nos modèles de mélanome *in vitro* et *in vivo*. La surexpression de *PROM2* favorise ainsi l'invasion et la migration des cellules de mélanome, permettant le processus métastatique stricto sensu. Le décollement cellulaire, lui-même un stimulus ferroptotique, augmente l'expression de *PROM2*, empêchant la mort cellulaire, et amplifiant ainsi cette boucle physiopathologique (Figure 56).

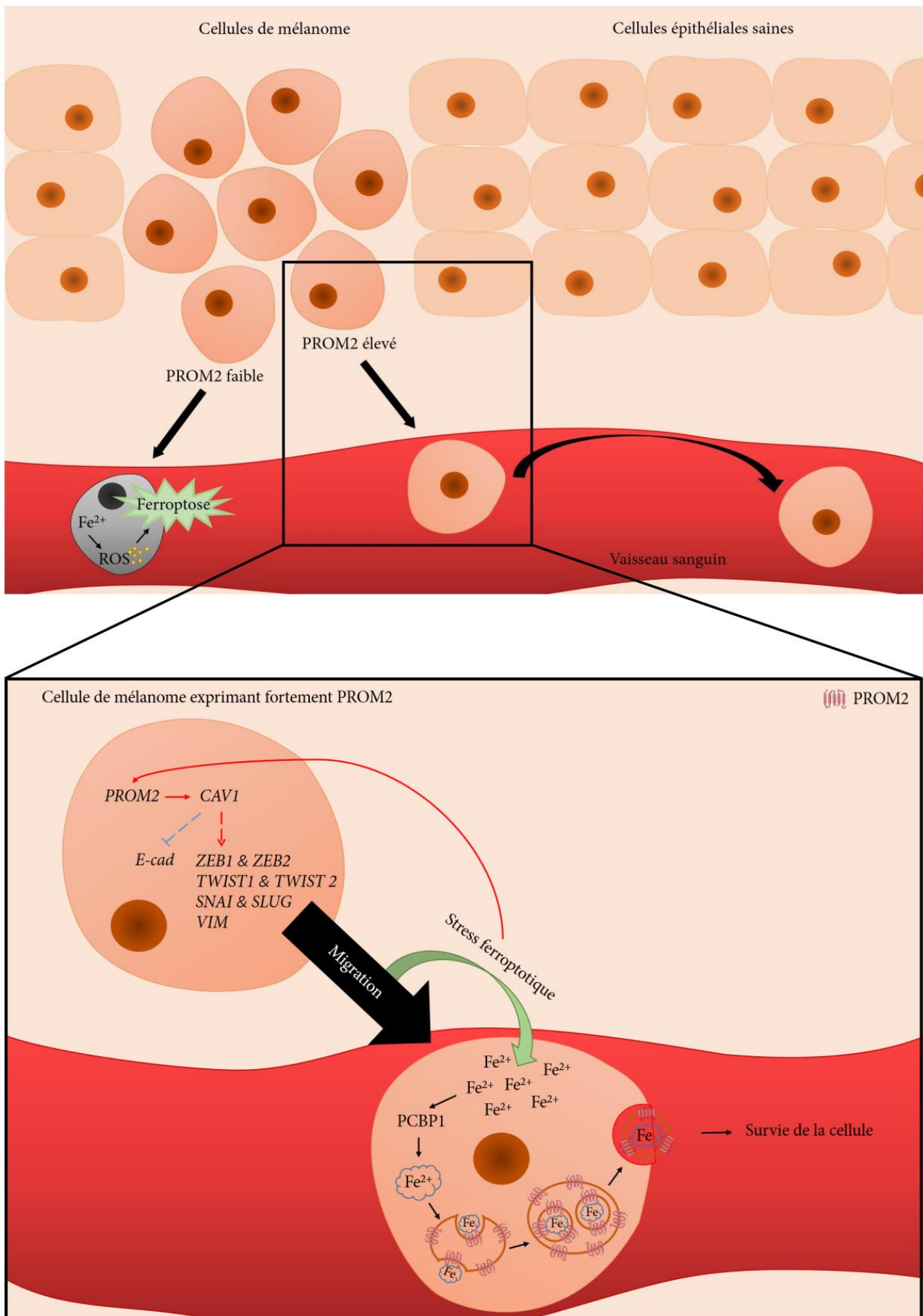


Figure 56 : Boucle physiopathologique proposée pour laquelle un taux de PROM2 élevé favorise les métastases et protège contre la mort cellulaire

Le détachement de la cellule de mélanome induit un stimulus de ferroptose. Les cellules de mélanome à faible expression de PROM2 sont sensibles à la ferroptose, provoquant la mort de la cellule. Dans les cellules de mélanome à forte expression de PROM2, PROM2 active la caveolin-1 qui permet une augmentation de l'expression des marqueurs de transition épithélio-mésenchymateuse. L'augmentation consécutive de l'expression des marqueurs de transition épithélio-mésenchymateuse induit un détachement et une migration des cellules de mélanome. Ce détachement induit un stimulus de ferroptose qui lui-même induit une augmentation de l'expression de PROM2. PROM2 favorise la migration et la résistance à la ferroptose des cellules de mélanome, et ce mécanisme peut être ciblé pour prévenir les métastases du mélanome.

Dans les lignées cellulaires, il a été rapporté que la résistance à la ferroptose est étroitement liée au type de phospholipide oxydé présent dans la membrane plasmique. En particulier, les acides gras monoinsaturés, tels que l'acide oléique et leur acétylation dépendante de l'ACSL3, diminuent le pool membranaire d'acides gras polyinsaturés protecteurs et induisent une résistance à la ferroptose [259]. Dans les modèles précliniques de mélanome, cela est particulièrement vrai dans la circulation lymphatique, favorisant ainsi la propagation métastatique [260]. Les acides gras monoinsaturés, par leur interaction avec PROM2 au niveau de différentes structures membranaires (membrane plasmique, corps microvésiculaires), pourraient faire le lien entre ces deux caractéristiques du cancer qui sont la propagation métastatique par la transition épithélio-mésenchymateuse et la résistance à la mort cellulaire ferroptotique au cours du processus métastatique.

De plus, PROM2 est un des composants de petites particules membranaires qui sont libérées dans les fluides physiologiques, tels que la salive [228] et l'urine [229, 261]. Comme PROM2 est un composant des corps microvésiculaires intra-cytoplasmiques, il pourrait contribuer à la signalisation cellule-cellule via les exosomes, favorisant la propagation métastatique. L'expression ou non de PROM2 par les exosomes reste à démontrer, ouvrant des perspectives pour l'utilisation de PROM2 comme biomarqueur plasmatique du pronostic.

Dans l'ensemble, nos résultats suggèrent que PROM2 est une cible thérapeutique prometteuse. Nous avons choisi une approche oligonucléotidique anti-sens pour plusieurs

raisons : i) l'expression de la protéine PROM2 est corrélée à l'expression de l'ARNm dans nos modèles de mélanome ; ii) la surexpression de la protéine PROM2 est associée au processus métastatique et à la résistance à la mort de la ferroptose pendant le décollement et la migration cellulaires, et pourrait être préférentiellement localisée dans les corps microvésiculaires cytoplasmiques des cellules cancéreuses [199, 261], iii) enfin PROM2 est une protéine pentaspan dont les données manquent sur les domaines fonctionnels, ce qui rend difficile la conception d'un anticorps monoclonal thérapeutique approprié. Les oligonucléotides anti-sens sont des thérapies prometteuses qui se sont largement développées au cours des deux dernières décennies [262]. Cependant, ils présentent certaines limites : i) leur dégradation après administration, qui peut toutefois être évitée par des modifications chimiques de l'oligonucléotide ou par un revêtement de nanoparticules ; ii) leur biodisponibilité et leur accès à la tumeur, qui peuvent être augmentés en utilisant des systèmes de ciblage actifs. Pour le mélanome, PRAME est une protéine membranaire exprimée par 87% des mélanomes métastatiques humains [263], et il pourrait être utilisé pour concevoir un conjugué anticorps-médicament avec un ASO anti-PROM2 ; iii) leur pénétration dans la cellule cancéreuse, nécessitant une ingénierie spécifique d'un ASO capable de diffusion gymnotique dans la cellule, comme nous l'avons réalisé ici. De plus, dans cette étude, nous avons développé un ASO anti-PROM2 à fort potentiel inhibiteur, même à de très faibles concentrations.

Perspectives

Traitement par oligonucléotides anti-sens

Ces résultats confirment que *PROM2* est une bio-cible pertinente pour le développement translationnel de traitement du mélanome métastatique. Dans la continuité de notre collaboration avec l'équipe du Professeur Phan de l'Institut de la Biologie Structurale de l'Université Technologique Nanyang à Singapour, nous allons designer un oligonucléotide anti-sens avec des modifications chimiques permettant d'augmenter sa durée de vie ayant pour objectif de pouvoir traiter des patients.

Couplage avec des nanoparticules

Les nanoparticules pourraient être utilisées comme système d'administration de l'oligonucléotide anti-sens dirigé contre *PROM2*, car il a été démontré que l'association de nanoparticules et d'oligonucléotides anti-sens permet une protection contre la dégradation et pénètre plus facilement dans les cellules [264], même dans les tumeurs difficiles d'accès [265]. Ce mode d'administration permettrait donc également de cibler des métastases de mélanome au niveau du cerveau, un organe à la fois difficile d'accès et très protégé par des systèmes d'efflux des traitements. Cela a d'ailleurs fait l'objet de l'écriture d'une revue lors de ma thèse [102].

Confirmation des résultats chez les patients

Avant d'aller plus loin sur la recherche d'un traitement efficace ciblant *PROM2*, une confirmation chez le patient de ce que l'on a pu observer *in vitro* dans des cellules humaines et *in vivo* chez la souris est nécessaire. Notre unité a eu l'opportunité d'obtenir des échantillons exceptionnels de biopsies séquentielles de plusieurs patients atteints de mélanome métastatique. Ces prélèvements nous permettrons de pouvoir confirmer chez le

patient la présence d'une boucle d'enrichissement *PROM2*. Pour cela, nous allons microdisséquer les cellules tumorales de ces biopsies et regarder à l'aide d'une droplet PCR l'expression en ARN de *PROM2* et des différents marqueurs de transition épithélio-mésenchymateuse.

Il serait également intéressant de pouvoir s'intéresser à l'expression de *PROM2* et des marqueurs de transition épithélio-mésenchymateuse dans des cellules tumorales circulantes.

Perspectives dans les autres cancers

La surexpression de *PROM2* est signe de mauvais pronostic dans plusieurs cancers, comme le cancer du rein [236, 238], des poumons [236] et du pancréas [237]. Nous faisons donc l'hypothèse que l'on peut transposer cette boucle d'enrichissement de *PROM2* à d'autres types de cancers et généraliser nos résultats. Nous possédons dans l'unité plusieurs modèles de souris xénotreffées de cancers du sein et de cancers du rein dérivées de patients. Nous possédons également une base de données transcriptomiques sur des prélèvements de patients de cancers du sein et de mélanome. Ces outils à notre disposition nous permettront de confirmer ou non cette hypothèse. Les résultats préliminaires dans les tumeurs xénotreffées de cancer du sein semble aller dans le sens de notre hypothèse (Figure 57).

Tumeurs xéno-gréffées de cancer du sein

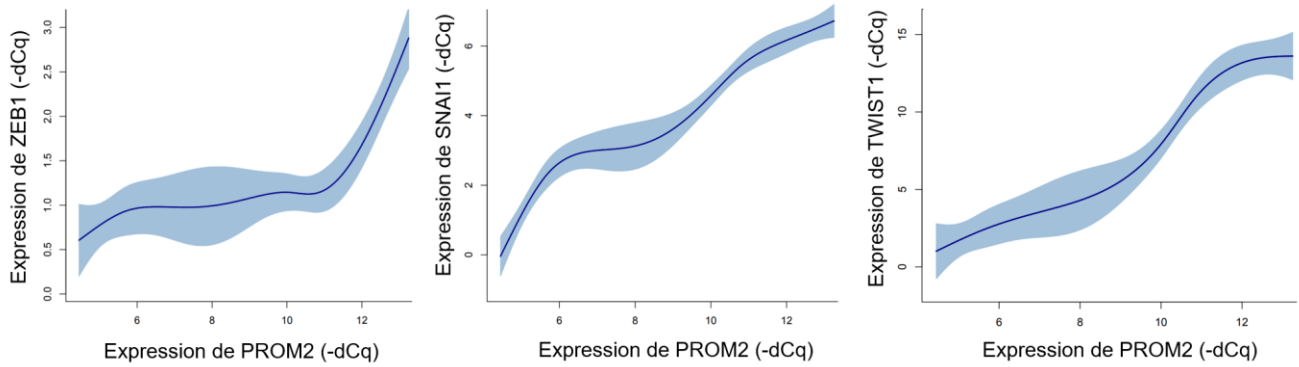


Figure 57 : Expression des marqueurs de transition épithélio-mésenchymateuse en fonction de l'expression de PROM2 dans les tumeurs de sein xéno-gréffées

Nos résultats ouvrent donc la voie à de futures études utilisant PROM2 comme bio-cible dans le mélanome métastatique, mais potentiellement dans d'autres types de cancer également.

Bibliographie

1. BW S, C.W., *World Cancer Report 2014*. 2014.
2. Miller, A.J. and M.C. Mihm, Jr., *Melanoma*. N Engl J Med, 2006. **355**(1): p. 51-65.
3. Cancer Today, W.H.O.
4. Sung, H., et al., *Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries*. CA Cancer J Clin, 2021. **71**(3): p. 209-249.
5. Matthews, N.H., et al., *Epidemiology of Melanoma*, in *Cutaneous Melanoma: Etiology and Therapy*, W.H. Ward and J.M. Farma, Editors. 2017: Brisbane (AU).
6. 2020, G.
7. France, S.P.
8. Erdmann, F., et al., *International trends in the incidence of malignant melanoma 1953-2008--are recent generations at higher or lower risk?* Int J Cancer, 2013. **132**(2): p. 385-400.
9. Whiteman, D.C., A.C. Green, and C.M. Olsen, *The Growing Burden of Invasive Melanoma: Projections of Incidence Rates and Numbers of New Cases in Six Susceptible Populations through 2031*. J Invest Dermatol, 2016. **136**(6): p. 1161-1171.
10. Olsen, C.M., et al., *Trends in Melanoma Incidence Rates in Eight Susceptible Populations through 2015*. J Invest Dermatol, 2019. **139**(6): p. 1392-1395.
11. Swerlick, R.A. and S. Chen, *The melanoma epidemic. Is increased surveillance the solution or the problem?* Arch Dermatol, 1996. **132**(8): p. 881-4.
12. Welch, H.G., S. Woloshin, and L.M. Schwartz, *Skin biopsy rates and incidence of melanoma: population based ecological study*. BMJ, 2005. **331**(7515): p. 481.
13. Bataille, V. and E. de Vries, *Melanoma--Part 1: epidemiology, risk factors, and prevention*. BMJ, 2008. **337**: p. a2249.
14. Binder-Foucard F, B.A., Delafosse P, Remontet L, Woronoff A-S, Bossard N., *Estimation nationale de l'incidence de la mortalité par cancer en France entre 1980 et 2012 - Partie I - tumeurs solides*. 2013.
15. INCA, *Les cancers en France*. 2019.
16. Crombie, I.K., *Distribution of malignant melanoma on the body surface*. Br J Cancer, 1981. **43**(6): p. 842-9.
17. Sacchetto, L., et al., *Trends in incidence of thick, thin and in situ melanoma in Europe*. Eur J Cancer, 2018. **92**: p. 108-118.
18. Gandini, S., et al., *Meta-analysis of risk factors for cutaneous melanoma: III. Family history, actinic damage and phenotypic factors*. Eur J Cancer, 2005. **41**(14): p. 2040-59.
19. Tsao, H. and A.J. Sober, *Ultraviolet radiation and malignant melanoma*. Clin Dermatol, 1998. **16**(1): p. 67-73.
20. Friedman, B., J.C. English, 3rd, and L.K. Ferris, *Indoor Tanning, Skin Cancer and the Young Female Patient: A Review of the Literature*. J Pediatr Adolesc Gynecol, 2015. **28**(4): p. 275-83.
21. Zhang, M., et al., *Use of tanning beds and incidence of skin cancer*. J Clin Oncol, 2012. **30**(14): p. 1588-93.
22. Boniol, M., et al., *Cutaneous melanoma attributable to sunbed use: systematic review and meta-analysis*. BMJ, 2012. **345**: p. e4757.
23. International Agency for Research on Cancer Working Group on artificial ultraviolet, I. and c. skin, *The association of use of sunbeds with cutaneous malignant melanoma and other skin cancers: A systematic review*. Int J Cancer, 2007. **120**(5): p. 1116-22.
24. Vink, A.A. and L. Roza, *Biological consequences of cyclobutane pyrimidine dimers*. J Photochem Photobiol B, 2001. **65**(2-3): p. 101-4.
25. Chen, H., Q.Y. Weng, and D.E. Fisher, *UV signaling pathways within the skin*. J Invest Dermatol, 2014. **134**(8): p. 2080-2085.
26. Kennedy, C., et al., *The influence of painful sunburns and lifetime sun exposure on the risk of actinic keratoses, seborrheic warts, melanocytic nevi, atypical nevi, and skin cancer*. J Invest Dermatol, 2003. **120**(6): p. 1087-93.

27. Shain, A.H. and B.C. Bastian, *From melanocytes to melanomas*. Nat Rev Cancer, 2016. **16**(6): p. 345-58.
28. Hodis, E., et al., *A landscape of driver mutations in melanoma*. Cell, 2012. **150**(2): p. 251-63.
29. Cancer Genome Atlas, N., *Genomic Classification of Cutaneous Melanoma*. Cell, 2015. **161**(7): p. 1681-96.
30. Lawrence, M.S., et al., *Mutational heterogeneity in cancer and the search for new cancer-associated genes*. Nature, 2013. **499**(7457): p. 214-218.
31. Brash, D.E., *UV signature mutations*. Photochem Photobiol, 2015. **91**(1): p. 15-26.
32. Roufas, C., I. Georgakopoulos-Soares, and A. Zaravinos, *Distinct genomic features across cytolytic subgroups in skin melanoma*. Cancer Immunol Immunother, 2021. **70**(11): p. 3137-3154.
33. Lo, J.A. and D.E. Fisher, *The melanoma revolution: from UV carcinogenesis to a new era in therapeutics*. Science, 2014. **346**(6212): p. 945-9.
34. Green, A.C., et al., *Reduced melanoma after regular sunscreen use: randomized trial follow-up*. J Clin Oncol, 2011. **29**(3): p. 257-63.
35. Gandini, S., et al., *Meta-analysis of risk factors for cutaneous melanoma: II. Sun exposure*. Eur J Cancer, 2005. **41**(1): p. 45-60.
36. Cho, E., B.A. Rosner, and G.A. Colditz, *Risk factors for melanoma by body site*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2005. **14**(5): p. 1241-4.
37. Nielsen, K., et al., *A prospective, population-based study of 40,000 women regarding host factors, UV exposure and sunbed use in relation to risk and anatomic site of cutaneous melanoma*. Int J Cancer, 2012. **131**(3): p. 706-15.
38. Morze, C.J., et al., *Good test-retest reproducibility for an instrument to capture self-reported melanoma risk factors*. J Clin Epidemiol, 2012. **65**(12): p. 1329-36.
39. Olsen, C.M., et al., *Association between Phenotypic Characteristics and Melanoma in a Large Prospective Cohort Study*. J Invest Dermatol, 2019. **139**(3): p. 665-672.
40. Gandini, S., et al., *Meta-analysis of risk factors for cutaneous melanoma: I. Common and atypical naevi*. Eur J Cancer, 2005. **41**(1): p. 28-44.
41. Belbasis, L., et al., *Non-genetic risk factors for cutaneous melanoma and keratinocyte skin cancers: An umbrella review of meta-analyses*. J Dermatol Sci, 2016. **84**(3): p. 330-339.
42. Rees, J.L., *Genetics of hair and skin color*. Annu Rev Genet, 2003. **37**: p. 67-90.
43. Fitzpatrick, T.B., *The validity and practicality of sun-reactive skin types I through VI*. Arch Dermatol, 1988. **124**(6): p. 869-71.
44. Halk, A.B., et al., *Surveillance for familial melanoma: recommendations from a national centre of expertise*. Br J Dermatol, 2019. **181**(3): p. 594-596.
45. Tucker, M.A., *Melanoma epidemiology*. Hematol Oncol Clin North Am, 2009. **23**(3): p. 383-95, vii.
46. Anderson, D.E. and M.D. Badzioch, *Hereditary cutaneous malignant melanoma: a 20-year family update*. Anticancer Res, 1991. **11**(1): p. 433-7.
47. Avril, M.F., et al., *[Recommendations for genetic testing and management of individuals genetically at-risk of cutaneous melanoma]*. Ann Dermatol Venereol, 2015. **142**(1): p. 26-36.
48. Hussussian, C.J., et al., *Germline p16 mutations in familial melanoma*. Nat Genet, 1994. **8**(1): p. 15-21.
49. Maubec, E., et al., *Familial melanoma: clinical factors associated with germline CDKN2A mutations according to the number of patients affected by melanoma in a family*. J Am Acad Dermatol, 2012. **67**(6): p. 1257-64.
50. Auroy, S., et al., *Sporadic multiple primary melanoma cases: CDKN2A germline mutations with a founder effect*. Genes Chromosomes Cancer, 2001. **32**(3): p. 195-202.
51. Zuo, L., et al., *Germline mutations in the p16INK4a binding domain of CDK4 in familial melanoma*. Nat Genet, 1996. **12**(1): p. 97-9.
52. Potrony, M., et al., *Update in genetic susceptibility in melanoma*. Ann Transl Med, 2015. **3**(15): p. 210.
53. Puig, S., et al., *Role of the CDKN2A locus in patients with multiple primary melanomas*. J Clin Oncol, 2005. **23**(13): p. 3043-51.
54. Levi, F., et al., *High constant incidence rates of second cutaneous melanomas*. Int J Cancer, 2005. **117**(5): p. 877-9.

55. Ferrone, C.R., et al., *Clinicopathological features of and risk factors for multiple primary melanomas*. JAMA, 2005. **294**(13): p. 1647-54.
56. de Giorgi, V., et al., *Melanocytic aggregation in the skin: diagnostic clues from lentiginos to melanoma*. Dermatol Clin, 2007. **25**(3): p. 303-20, vii-viii.
57. AboutKidsHealth, *Critères ABCDE*. 2019.
58. Balch, C.M., et al., *Final version of 2009 AJCC melanoma staging and classification*. J Clin Oncol, 2009. **27**(36): p. 6199-206.
59. Gershenwald, J.E., et al., *Melanoma staging: Evidence-based changes in the American Joint Committee on Cancer eighth edition cancer staging manual*. CA Cancer J Clin, 2017. **67**(6): p. 472-492.
60. Balch, C.M., et al., *Final version of the American Joint Committee on Cancer staging system for cutaneous melanoma*. J Clin Oncol, 2001. **19**(16): p. 3635-48.
61. van der Ploeg, A.P., et al., *Prognosis in patients with sentinel node-positive melanoma is accurately defined by the combined Rotterdam tumor load and Dewar topography criteria*. J Clin Oncol, 2011. **29**(16): p. 2206-14.
62. Morton, D.L., et al., *Final trial report of sentinel-node biopsy versus nodal observation in melanoma*. N Engl J Med, 2014. **370**(7): p. 599-609.
63. Bogunovic, D., et al., *Immune profile and mitotic index of metastatic melanoma lesions enhance clinical staging in predicting patient survival*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(48): p. 20429-34.
64. Mihm, M.C., Jr., C.G. Clemente, and N. Cascinelli, *Tumor infiltrating lymphocytes in lymph node melanoma metastases: a histopathologic prognostic indicator and an expression of local immune response*. Lab Invest, 1996. **74**(1): p. 43-7.
65. John, T., et al., *Predicting clinical outcome through molecular profiling in stage III melanoma*. Clin Cancer Res, 2008. **14**(16): p. 5173-80.
66. Jacquelot, N., et al., *Immunophenotyping of Stage III Melanoma Reveals Parameters Associated with Patient Prognosis*. J Invest Dermatol, 2016. **136**(5): p. 994-1001.
67. Nguyen, T.T., et al., *Increased risk of brain metastases among patients with melanoma and PROM2 expression in metastatic lymph nodes*. Clin Transl Med, 2020. **10**(8): p. e198.
68. Balch, C.M., G.C. Balch, and R.R. Sharma, *Identifying early melanomas at higher risk for metastases*. J Clin Oncol, 2012. **30**(13): p. 1406-7.
69. Falchook, G.S., et al., *Dabrafenib in patients with melanoma, untreated brain metastases, and other solid tumours: a phase 1 dose-escalation trial*. Lancet, 2012. **379**(9829): p. 1893-901.
70. Long, G.V., et al., *Dabrafenib in patients with Val600Glu or Val600Lys BRAF-mutant melanoma metastatic to the brain (BREAK-MB): a multicentre, open-label, phase 2 trial*. Lancet Oncol, 2012. **13**(11): p. 1087-95.
71. Jakob, J.A., et al., *NRAS mutation status is an independent prognostic factor in metastatic melanoma*. Cancer, 2012. **118**(16): p. 4014-23.
72. Breslow, A., *Thickness, cross-sectional areas and depth of invasion in the prognosis of cutaneous melanoma*. Ann Surg, 1970. **172**(5): p. 902-8.
73. Payette, M.J., M. Katz, 3rd, and J.M. Grant-Kels, *Melanoma prognostic factors found in the dermatopathology report*. Clin Dermatol, 2009. **27**(1): p. 53-74.
74. Clark, W.H., Jr., et al., *The histogenesis and biologic behavior of primary human malignant melanomas of the skin*. Cancer Res, 1969. **29**(3): p. 705-27.
75. Lyth, J., et al., *Prognostic instrument for survival outcome in melanoma patients: based on data from the population-based Swedish Melanoma Register*. Eur J Cancer, 2016. **59**: p. 171-178.
76. Duncan, L.M., *The classification of cutaneous melanoma*. Hematol Oncol Clin North Am, 2009. **23**(3): p. 501-13, ix.
77. dermatologie., S.f.d., *Patients atteints de mélanome de stade III inopérable ou de stade IV*.
78. Tsao, H., M.B. Atkins, and A.J. Sober, *Management of cutaneous melanoma*. N Engl J Med, 2004. **351**(10): p. 998-1012.
79. He, X. and C. Xu, *Immune checkpoint signaling and cancer immunotherapy*. Cell Res, 2020. **30**(8): p. 660-669.
80. Okazaki, T., et al., *A rheostat for immune responses: the unique properties of PD-1 and their advantages for clinical application*. Nat Immunol, 2013. **14**(12): p. 1212-8.

81. Snyder, A., et al., *Genetic basis for clinical response to CTLA-4 blockade in melanoma*. N Engl J Med, 2014. **371**(23): p. 2189-2199.
82. Waldman, A.D., J.M. Fritz, and M.J. Lenardo, *A guide to cancer immunotherapy: from T cell basic science to clinical practice*. Nat Rev Immunol, 2020. **20**(11): p. 651-668.
83. Tawbi, H.A., C. Chung, and K. Margolin, *Nivolumab and Ipilimumab in Melanoma Metastatic to the Brain*. N Engl J Med, 2018. **379**(22): p. 2178.
84. Larkin, J., et al., *Combined Nivolumab and Ipilimumab or Monotherapy in Untreated Melanoma*. N Engl J Med, 2015. **373**(1): p. 23-34.
85. Postow, M.A., et al., *Nivolumab and ipilimumab versus ipilimumab in untreated melanoma*. N Engl J Med, 2015. **372**(21): p. 2006-17.
86. Weiss, S.A., J.D. Wolchok, and M. Sznol, *Immunotherapy of Melanoma: Facts and Hopes*. Clin Cancer Res, 2019. **25**(17): p. 5191-5201.
87. Sharma, P., et al., *Primary, Adaptive, and Acquired Resistance to Cancer Immunotherapy*. Cell, 2017. **168**(4): p. 707-723.
88. Hugo, W., et al., *Genomic and Transcriptomic Features of Response to Anti-PD-1 Therapy in Metastatic Melanoma*. Cell, 2016. **165**(1): p. 35-44.
89. Liu, D., et al., *Evolution of delayed resistance to immunotherapy in a melanoma responder*. Nat Med, 2021. **27**(6): p. 985-992.
90. Holzel, M., A. Bovier, and T. Tuting, *Plasticity of tumour and immune cells: a source of heterogeneity and a cause for therapy resistance?* Nat Rev Cancer, 2013. **13**(5): p. 365-76.
91. Mehta, A., et al., *Immunotherapy Resistance by Inflammation-Induced Dedifferentiation*. Cancer Discov, 2018. **8**(8): p. 935-943.
92. Landsberg, J., et al., *Melanomas resist T-cell therapy through inflammation-induced reversible dedifferentiation*. Nature, 2012. **490**(7420): p. 412-6.
93. Nardin, C., et al., *Tolerance and outcomes of stereotactic radiosurgery combined with anti-programmed cell death-1 (pembrolizumab) for melanoma brain metastases*. Melanoma Res, 2018. **28**(2): p. 111-119.
94. Anderson, E.S., et al., *Melanoma brain metastases treated with stereotactic radiosurgery and concurrent pembrolizumab display marked regression; efficacy and safety of combined treatment*. J Immunother Cancer, 2017. **5**(1): p. 76.
95. Parakh, S., et al., *Efficacy of anti-PD-1 therapy in patients with melanoma brain metastases*. Br J Cancer, 2017. **116**(12): p. 1558-1563.
96. Skrepnik, T., et al., *Improved time to disease progression in the brain in patients with melanoma brain metastases treated with concurrent delivery of radiosurgery and ipilimumab*. Oncoimmunology, 2017. **6**(3): p. e1283461.
97. Silk, A.W., et al., *Ipilimumab and radiation therapy for melanoma brain metastases*. Cancer Med, 2013. **2**(6): p. 899-906.
98. Liniker, E., et al., *Activity and safety of radiotherapy with anti-PD-1 drug therapy in patients with metastatic melanoma*. Oncoimmunology, 2016. **5**(9): p. e1214788.
99. Gerber, N.K., et al., *Ipilimumab and whole brain radiation therapy for melanoma brain metastases*. J Neurooncol, 2015. **121**(1): p. 159-65.
100. van Vulpen, M., et al., *Changes in blood-brain barrier permeability induced by radiotherapy: implications for timing of chemotherapy? (Review)*. Oncol Rep, 2002. **9**(4): p. 683-8.
101. Angeli, E., et al., *How to Make Anticancer Drugs Cross the Blood-Brain Barrier to Treat Brain Metastases*. Int J Mol Sci, 2019. **21**(1).
102. Paris, J., E. Angeli, and G. Bousquet, *The Pharmacology of Xenobiotics after Intracerebro Spinal Fluid Administration: Implications for the Treatment of Brain Tumors*. Int J Mol Sci, 2021. **22**(3).
103. Budman, D.R., E. Camacho, and R.E. Wittes, *The current causes of death in patients with malignant melanoma*. Eur J Cancer (1965), 1978. **14**(4): p. 327-30.
104. Davies, M.A., et al., *Prognostic factors for survival in melanoma patients with brain metastases*. Cancer, 2011. **117**(8): p. 1687-96.
105. Sandru, A., et al., *Survival rates of patients with metastatic malignant melanoma*. J Med Life, 2014. **7**(4): p. 572-6.

106. Sampson, J.H., et al., *Demographics, prognosis, and therapy in 702 patients with brain metastases from malignant melanoma*. J Neurosurg, 1998. **88**(1): p. 11-20.
107. Kainthla, R., K.B. Kim, and G.S. Falchook, *Dabrafenib for treatment of BRAF-mutant melanoma*. Pharmgenomics Pers Med, 2014. **7**: p. 21-9.
108. Robert, C., et al., *Nivolumab in previously untreated melanoma without BRAF mutation*. N Engl J Med, 2015. **372**(4): p. 320-30.
109. Robert, C., et al., *Pembrolizumab versus Ipilimumab in Advanced Melanoma*. N Engl J Med, 2015. **372**(26): p. 2521-32.
110. Robert, C., et al., *Ipilimumab plus dacarbazine for previously untreated metastatic melanoma*. N Engl J Med, 2011. **364**(26): p. 2517-26.
111. Hodi, F.S., et al., *Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma*. N Engl J Med, 2010. **363**(8): p. 711-23.
112. Diem, S., et al., *Serum lactate dehydrogenase as an early marker for outcome in patients treated with anti-PD-1 therapy in metastatic melanoma*. Br J Cancer, 2016. **114**(3): p. 256-61.
113. Taube, J.M., et al., *Association of PD-1, PD-1 ligands, and other features of the tumor immune microenvironment with response to anti-PD-1 therapy*. Clin Cancer Res, 2014. **20**(19): p. 5064-74.
114. Tumeh, P.C., et al., *PD-1 blockade induces responses by inhibiting adaptive immune resistance*. Nature, 2014. **515**(7528): p. 568-71.
115. Vilain, R.E., et al., *Dynamic Changes in PD-L1 Expression and Immune Infiltrates Early During Treatment Predict Response to PD-1 Blockade in Melanoma*. Clin Cancer Res, 2017. **23**(17): p. 5024-5033.
116. Ayers, M., et al., *IFN-gamma-related mRNA profile predicts clinical response to PD-1 blockade*. J Clin Invest, 2017. **127**(8): p. 2930-2940.
117. Nishino, M., et al., *Immune-Related Tumor Response Dynamics in Melanoma Patients Treated with Pembrolizumab: Identifying Markers for Clinical Outcome and Treatment Decisions*. Clin Cancer Res, 2017. **23**(16): p. 4671-4679.
118. Gide, T.N., et al., *Primary and Acquired Resistance to Immune Checkpoint Inhibitors in Metastatic Melanoma*. Clin Cancer Res, 2018. **24**(6): p. 1260-1270.
119. Hauschild, A., et al., *Dabrafenib in BRAF-mutated metastatic melanoma: a multicentre, open-label, phase 3 randomised controlled trial*. Lancet, 2012. **380**(9839): p. 358-65.
120. McArthur, G.A., 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**(3): p. 323-32.
121. Blum, D., S. LaBarge, and B. Reproducibility Project: Cancer, *Registered report: Tumour micro-environment elicits innate resistance to RAF inhibitors through HGF secretion*. Elife, 2014. **3**.
122. Trunzer, K., et al., *Pharmacodynamic effects and mechanisms of resistance to vemurafenib in patients with metastatic melanoma*. J Clin Oncol, 2013. **31**(14): p. 1767-74.
123. Paraiso, K.H., et al., *PTEN loss confers BRAF inhibitor resistance to melanoma cells through the suppression of BIM expression*. Cancer Res, 2011. **71**(7): p. 2750-60.
124. Smalley, K.S., et al., *Increased cyclin D1 expression can mediate BRAF inhibitor resistance in BRAF V600E-mutated melanomas*. Mol Cancer Ther, 2008. **7**(9): p. 2876-83.
125. Van Allen, E.M., et al., *The genetic landscape of clinical resistance to RAF inhibition in metastatic melanoma*. Cancer Discov, 2014. **4**(1): p. 94-109.
126. Benboubker, V., et al., *Cancer Cell Phenotype Plasticity as a Driver of Immune Escape in Melanoma*. Front Immunol, 2022. **13**: p. 873116.
127. Restifo, N.P., M.J. Smyth, and A. Snyder, *Acquired resistance to immunotherapy and future challenges*. Nat Rev Cancer, 2016. **16**(2): p. 121-6.
128. Restifo, N.P., et al., *Loss of functional beta 2-microglobulin in metastatic melanomas from five patients receiving immunotherapy*. J Natl Cancer Inst, 1996. **88**(2): p. 100-8.
129. del Campo, A.B., et al., *Immune escape of cancer cells with beta2-microglobulin loss over the course of metastatic melanoma*. Int J Cancer, 2014. **134**(1): p. 102-13.
130. Dutta, P., et al., *Unphosphorylated STAT3 in heterochromatin formation and tumor suppression in lung cancer*. BMC Cancer, 2020. **20**(1): p. 145.

131. Zaretsky, J.M., et al., *Mutations Associated with Acquired Resistance to PD-1 Blockade in Melanoma*. N Engl J Med, 2016. **375**(9): p. 819-29.
132. Pardoll, D.M., *The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy*. Nat Rev Cancer, 2012. **12**(4): p. 252-64.
133. Mellman, I., G. Coukos, and G. Dranoff, *Cancer immunotherapy comes of age*. Nature, 2011. **480**(7378): p. 480-9.
134. Koyama, S., et al., *Adaptive resistance to therapeutic PD-1 blockade is associated with upregulation of alternative immune checkpoints*. Nat Commun, 2016. **7**: p. 10501.
135. Taube, J.M., et al., *Differential Expression of Immune-Regulatory Genes Associated with PD-L1 Display in Melanoma: Implications for PD-1 Pathway Blockade*. Clin Cancer Res, 2015. **21**(17): p. 3969-76.
136. Chapman, P.B., et al., *Improved survival with vemurafenib in melanoma with BRAF V600E mutation*. N Engl J Med, 2011. **364**(26): p. 2507-16.
137. Wagle, N., et al., *Dissecting therapeutic resistance to RAF inhibition in melanoma by tumor genomic profiling*. J Clin Oncol, 2011. **29**(22): p. 3085-96.
138. Villanueva, J., et al., *Acquired resistance to BRAF inhibitors mediated by a RAF kinase switch in melanoma can be overcome by cotargeting MEK and IGF-1R/PI3K*. Cancer Cell, 2010. **18**(6): p. 683-95.
139. Nazarian, R., et al., *Melanomas acquire resistance to B-RAF(V600E) inhibition by RTK or N-RAS upregulation*. Nature, 2010. **468**(7326): p. 973-7.
140. Shi, H., et al., *Melanoma whole-exome sequencing identifies (V600E)B-RAF amplification-mediated acquired B-RAF inhibitor resistance*. Nat Commun, 2012. **3**: p. 724.
141. Wilson, T.R., et al., *Widespread potential for growth-factor-driven resistance to anticancer kinase inhibitors*. Nature, 2012. **487**(7408): p. 505-9.
142. Irvine, M., et al., *Oncogenic PI3K/AKT promotes the step-wise evolution of combination BRAF/MEK inhibitor resistance in melanoma*. Oncogenesis, 2018. **7**(9): p. 72.
143. Chi, M., et al., *Insulin induces drug resistance in melanoma through activation of the PI3K/Akt pathway*. Drug Des Devel Ther, 2014. **8**: p. 255-62.
144. Candido, S., et al., *The PIK3CA H1047R Mutation Confers Resistance to BRAF and MEK Inhibitors in A375 Melanoma Cells through the Cross-Activation of MAPK and PI3K-Akt Pathways*. Pharmaceuticals, 2022. **14**(3).
145. Luzzi, K.J., et al., *Multistep nature of metastatic inefficiency: dormancy of solitary cells after successful extravasation and limited survival of early micrometastases*. Am J Pathol, 1998. **153**(3): p. 865-73.
146. Fidler, I.J., *Biological behavior of malignant melanoma cells correlated to their survival in vivo*. Cancer Res, 1975. **35**(1): p. 218-24.
147. Maitra, A., *Molecular envoys pave the way for pancreatic cancer to invade the liver*. Nature, 2019. **567**(7747): p. 181-182.
148. Massague, J. and A.C. Obenauf, *Metastatic colonization by circulating tumour cells*. Nature, 2016. **529**(7586): p. 298-306.
149. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *Hallmarks of cancer: the next generation*. Cell, 2011. **144**(5): p. 646-74.
150. Steeg, P.S., *Tumor metastasis: mechanistic insights and clinical challenges*. Nat Med, 2006. **12**(8): p. 895-904.
151. Peinado, H., et al., *Pre-metastatic niches: organ-specific homes for metastases*. Nat Rev Cancer, 2017. **17**(5): p. 302-317.
152. Tabassum, D.P. and K. Polyak, *Tumorigenesis: it takes a village*. Nat Rev Cancer, 2015. **15**(8): p. 473-83.
153. Gudem, G., et al., *The evolutionary history of lethal metastatic prostate cancer*. Nature, 2015. **520**(7547): p. 353-357.
154. Clark, A.G. and D.M. Vignjevic, *Modes of cancer cell invasion and the role of the microenvironment*. Curr Opin Cell Biol, 2015. **36**: p. 13-22.
155. Cheung, K.J. and A.J. Ewald, *A collective route to metastasis: Seeding by tumor cell clusters*. Science, 2016. **352**(6282): p. 167-9.
156. Nieto, M.A., et al., *Emt: 2016*. Cell, 2016. **166**(1): p. 21-45.

157. Thiery, J.P., et al., *Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease*. Cell, 2009. **139**(5): p. 871-90.
158. Mort, R.L., I.J. Jackson, and E.E. Patton, *The melanocyte lineage in development and disease*. Development, 2015. **142**(7): p. 1387.
159. De Craene, B. and G. Berx, *Regulatory networks defining EMT during cancer initiation and progression*. Nat Rev Cancer, 2013. **13**(2): p. 97-110.
160. Puisieux, A., T. Brabletz, and J. Caramel, *Oncogenic roles of EMT-inducing transcription factors*. Nat Cell Biol, 2014. **16**(6): p. 488-94.
161. Cano, A., et al., *The transcription factor snail controls epithelial-mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression*. Nat Cell Biol, 2000. **2**(2): p. 76-83.
162. Thiery, J.P., *Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression*. Nat Rev Cancer, 2002. **2**(6): p. 442-54.
163. Arnoux, V., et al., *Erk5 controls Slug expression and keratinocyte activation during wound healing*. Mol Biol Cell, 2008. **19**(11): p. 4738-49.
164. Blanco, M.J., et al., *Snail1a and Snail1b cooperate in the anterior migration of the axial mesendoderm in the zebrafish embryo*. Development, 2007. **134**(22): p. 4073-81.
165. Futterman, M.A., A.J. Garcia, and E.A. Zamir, *Evidence for partial epithelial-to-mesenchymal transition (pEMT) and recruitment of motile blastoderm edge cells during avian epiboly*. Dev Dyn, 2011. **240**(6): p. 1502-11.
166. Grande, M.T., et al., *Snail1-induced partial epithelial-to-mesenchymal transition drives renal fibrosis in mice and can be targeted to reverse established disease*. Nat Med, 2015. **21**(9): p. 989-97.
167. Leroy, P. and K.E. Mostov, *Slug is required for cell survival during partial epithelial-mesenchymal transition of HGF-induced tubulogenesis*. Mol Biol Cell, 2007. **18**(5): p. 1943-52.
168. Lovisa, S., et al., *Epithelial-to-mesenchymal transition induces cell cycle arrest and parenchymal damage in renal fibrosis*. Nat Med, 2015. **21**(9): p. 998-1009.
169. Grigore, A.D., et al., *Tumor Budding: The Name is EMT. Partial EMT*. J Clin Med, 2016. **5**(5).
170. Abell, A.N., et al., *MAP3K4/CBP-regulated H2B acetylation controls epithelial-mesenchymal transition in trophoblast stem cells*. Cell Stem Cell, 2011. **8**(5): p. 525-37.
171. Huang, R.Y., et al., *An EMT spectrum defines an anoikis-resistant and spheroidogenic intermediate mesenchymal state that is sensitive to e-cadherin restoration by a src-kinase inhibitor, saracatinib (AZD0530)*. Cell Death Dis, 2013. **4**: p. e915.
172. Jordan, N.V., G.L. Johnson, and A.N. Abell, *Tracking the intermediate stages of epithelial-mesenchymal transition in epithelial stem cells and cancer*. Cell Cycle, 2011. **10**(17): p. 2865-73.
173. Yu, M., et al., *Circulating breast tumor cells exhibit dynamic changes in epithelial and mesenchymal composition*. Science, 2013. **339**(6119): p. 580-4.
174. Lee, J.M., et al., *The epithelial-mesenchymal transition: new insights in signaling, development, and disease*. J Cell Biol, 2006. **172**(7): p. 973-81.
175. Tam, W.L. and R.A. Weinberg, *The epigenetics of epithelial-mesenchymal plasticity in cancer*. Nat Med, 2013. **19**(11): p. 1438-49.
176. Rosano, L., et al., *Endothelin-1 is required during epithelial to mesenchymal transition in ovarian cancer progression*. Exp Biol Med (Maywood), 2006. **231**(6): p. 1128-31.
177. Kudo-Saito, C., et al., *Cancer metastasis is accelerated through immunosuppression during Snail-induced EMT of cancer cells*. Cancer Cell, 2009. **15**(3): p. 195-206.
178. Shibue, T. and R.A. Weinberg, *EMT, CSCs, and drug resistance: the mechanistic link and clinical implications*. Nat Rev Clin Oncol, 2017. **14**(10): p. 611-629.
179. Vega, S., et al., *Snail blocks the cell cycle and confers resistance to cell death*. Genes Dev, 2004. **18**(10): p. 1131-43.
180. Singh, A. and J. Settleman, *EMT, cancer stem cells and drug resistance: an emerging axis of evil in the war on cancer*. Oncogene, 2010. **29**(34): p. 4741-51.
181. Fischer, K.R., et al., *Epithelial-to-mesenchymal transition is not required for lung metastasis but contributes to chemoresistance*. Nature, 2015. **527**(7579): p. 472-6.
182. Zheng, X., et al., *Epithelial-to-mesenchymal transition is dispensable for metastasis but induces chemoresistance in pancreatic cancer*. Nature, 2015. **527**(7579): p. 525-530.

183. Fouad, Y.A. and C. Aanei, *Revisiting the hallmarks of cancer*. Am J Cancer Res, 2017. **7**(5): p. 1016-1036.
184. Reymond, N., B.B. d'Agua, and A.J. Ridley, *Crossing the endothelial barrier during metastasis*. Nat Rev Cancer, 2013. **13**(12): p. 858-70.
185. Bockhorn, M., R.K. Jain, and L.L. Munn, *Active versus passive mechanisms in metastasis: do cancer cells crawl into vessels, or are they pushed?* Lancet Oncol, 2007. **8**(5): p. 444-8.
186. Denais, C.M., et al., *Nuclear envelope rupture and repair during cancer cell migration*. Science, 2016. **352**(6283): p. 353-8.
187. Pantel, K. and M.R. Speicher, *The biology of circulating tumor cells*. Oncogene, 2016. **35**(10): p. 1216-24.
188. Lu, X., et al., *VCAM-1 promotes osteolytic expansion of indolent bone micrometastasis of breast cancer by engaging alpha4beta1-positive osteoclast progenitors*. Cancer Cell, 2011. **20**(6): p. 701-14.
189. Gao, H., et al., *The BMP inhibitor Coco reactivates breast cancer cells at lung metastatic sites*. Cell, 2012. **150**(4): p. 764-79.
190. Fares, J., et al., *Molecular principles of metastasis: a hallmark of cancer revisited*. Signal Transduct Target Ther, 2020. **5**(1): p. 28.
191. Aceto, N., et al., *Circulating tumor cell clusters are oligoclonal precursors of breast cancer metastasis*. Cell, 2014. **158**(5): p. 1110-1122.
192. Zhang, Y., et al., *VN-NDP: A Neighbor Discovery Protocol Based on Virtual Nodes in Mobile WSNs*. Sensors (Basel), 2019. **19**(21).
193. Duda, D.G., et al., *Malignant cells facilitate lung metastasis by bringing their own soil*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(50): p. 21677-82.
194. Ankrum, J.A., J.F. Ong, and J.M. Karp, *Mesenchymal stem cells: immune evasive, not immune privileged*. Nat Biotechnol, 2014. **32**(3): p. 252-60.
195. Leach, J., J.P. Morton, and O.J. Sansom, *Neutrophils: Homing in on the myeloid mechanisms of metastasis*. Mol Immunol, 2019. **110**: p. 69-76.
196. Gay, L.J. and B. Felding-Habermann, *Contribution of platelets to tumour metastasis*. Nat Rev Cancer, 2011. **11**(2): p. 123-34.
197. Hu, C., et al., *Thrombocytosis is a significant indicator of hypercoagulability, prognosis and recurrence in gastric cancer*. Exp Ther Med, 2014. **8**(1): p. 125-132.
198. Placke, T., et al., *Platelet-derived MHC class I confers a pseudonormal phenotype to cancer cells that subverts the antitumor reactivity of natural killer immune cells*. Cancer Res, 2012. **72**(2): p. 440-8.
199. Brown, C.W., et al., *Prominin2 Drives Ferroptosis Resistance by Stimulating Iron Export*. Dev Cell, 2019. **51**(5): p. 575-586 e4.
200. Fuchs, Y. and H. Steller, *Programmed cell death in animal development and disease*. Cell, 2011. **147**(4): p. 742-58.
201. Thompson, C.B., *Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease*. Science, 1995. **267**(5203): p. 1456-62.
202. D'Arcy, M.S., *Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy*. Cell Biol Int, 2019. **43**(6): p. 582-592.
203. Elmore, S., *Apoptosis: a review of programmed cell death*. Toxicol Pathol, 2007. **35**(4): p. 495-516.
204. Martinvalet, D., P. Zhu, and J. Lieberman, *Granzyme A induces caspase-independent mitochondrial damage, a required first step for apoptosis*. Immunity, 2005. **22**(3): p. 355-70.
205. Poon, I.K., et al., *Apoptotic cell clearance: basic biology and therapeutic potential*. Nat Rev Immunol, 2014. **14**(3): p. 166-80.
206. Shintani, T. and D.J. Klionsky, *Autophagy in health and disease: a double-edged sword*. Science, 2004. **306**(5698): p. 990-5.
207. Mizushima, N., et al., *Autophagy fights disease through cellular self-digestion*. Nature, 2008. **451**(7182): p. 1069-75.
208. Levine, B. and V. Deretic, *Unveiling the roles of autophagy in innate and adaptive immunity*. Nat Rev Immunol, 2007. **7**(10): p. 767-77.
209. Nixon, R.A. and D.S. Yang, *Autophagy failure in Alzheimer's disease--locating the primary defect*. Neurobiol Dis, 2011. **43**(1): p. 38-45.

210. Stockwell, B.R., et al., *Ferroptosis: A Regulated Cell Death Nexus Linking Metabolism, Redox Biology, and Disease*. Cell, 2017. **171**(2): p. 273-285.
211. Chen, X., et al., *Targeting ferroptosis in pancreatic cancer: a double-edged sword*. Trends Cancer, 2021. **7**(10): p. 891-901.
212. Ding, H., et al., *Transferrin receptor 1 ablation in satellite cells impedes skeletal muscle regeneration through activation of ferroptosis*. J Cachexia Sarcopenia Muscle, 2021. **12**(3): p. 746-768.
213. Chu, B., et al., *ALOX12 is required for p53-mediated tumour suppression through a distinct ferroptosis pathway*. Nat Cell Biol, 2019. **21**(5): p. 579-591.
214. Dixon, S.J., et al., *Ferroptosis: an iron-dependent form of nonapoptotic cell death*. Cell, 2012. **149**(5): p. 1060-72.
215. Doll, S. and M. Conrad, *Iron and ferroptosis: A still ill-defined liaison*. IUBMB Life, 2017. **69**(6): p. 423-434.
216. Ruiz-de-Angulo, A., et al., *Chemically Programmed Vaccines: Iron Catalysis in Nanoparticles Enhances Combination Immunotherapy and Immunotherapy-Promoted Tumor Ferroptosis*. iScience, 2020. **23**(9): p. 101499.
217. Nieto-Garai, J.A., et al., *Role of Protein-Lipid Interactions in Viral Entry*. Adv Biol (Weinh), 2022. **6**(3): p. e2101264.
218. Yang, W.S., et al., *Peroxidation of polyunsaturated fatty acids by lipoxygenases drives ferroptosis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2016. **113**(34): p. E4966-75.
219. Doll, S., et al., *FSP1 is a glutathione-independent ferroptosis suppressor*. Nature, 2019. **575**(7784): p. 693-698.
220. Lin, Z., et al., *Lipid Metabolism in Ferroptosis*. Adv Biol (Weinh), 2021. **5**(8): p. e2100396.
221. Abrams, R.P., W.L. Carroll, and K.A. Woerpel, *Five-Membered Ring Peroxide Selectively Initiates Ferroptosis in Cancer Cells*. ACS Chem Biol, 2016. **11**(5): p. 1305-12.
222. Chen, Y., et al., *Ferroptosis: A Novel Therapeutic Target for Ischemia-Reperfusion Injury*. Front Cell Dev Biol, 2021. **9**: p. 688605.
223. Gagliardi, M., et al., *Ferroptosis: a new unexpected chance to treat metastatic melanoma?* Cell Cycle, 2020. **19**(19): p. 2411-2425.
224. Zhang, Q., et al., *Identification and characterization of a novel testosterone-regulated prominin-like gene in the rat ventral prostate*. Endocrinology, 2002. **143**(12): p. 4788-96.
225. Fargeas, C.A., et al., *Characterization of prominin-2, a new member of the prominin family of pentaspan membrane glycoproteins*. J Biol Chem, 2003. **278**(10): p. 8586-96.
226. Walker, T.L., et al., *Prominin-1 allows prospective isolation of neural stem cells from the adult murine hippocampus*. J Neurosci, 2013. **33**(7): p. 3010-24.
227. Jaszai, J., et al., *Robust expression of Prominin-2 all along the adult male reproductive system and urinary bladder*. Histochem Cell Biol, 2008. **130**(4): p. 749-59.
228. Jaszai, J., et al., *Prominin-2 is a novel marker of distal tubules and collecting ducts of the human and murine kidney*. Histochem Cell Biol, 2010. **133**(5): p. 527-39.
229. Santelli, A., et al., *Senescent Kidney Cells in Hypertensive Patients Release Urinary Extracellular Vesicles*. J Am Heart Assoc, 2019. **8**(11): p. e012584.
230. Jaszai, J., et al., *Differential expression of Prominin-1 (CD133) and Prominin-2 in major cephalic exocrine glands of adult mice*. Histochem Cell Biol, 2007. **128**(5): p. 409-19.
231. Pereira, M.F., et al., *Effects of the oestrogen receptor antagonist Fulvestrant on expression of genes that affect organization of the epididymal epithelium*. Andrology, 2014. **2**(4): p. 559-71.
232. Florek, M., et al., *Prominin-2 is a cholesterol-binding protein associated with apical and basolateral plasmalemmal protrusions in polarized epithelial cells and released into urine*. Cell Tissue Res, 2007. **328**(1): p. 31-47.
233. Singh, R.D., et al., *Prominin-2 expression increases protrusions, decreases caveolae and inhibits Cdc42 dependent fluid phase endocytosis*. Biochem Biophys Res Commun, 2013. **434**(3): p. 466-72.
234. Dowland, S.N., et al., *Prominin-2 Prevents the Formation of Caveolae in Normal and Ovarian Hyperstimulated Pregnancy*. Reprod Sci, 2018. **25**(8): p. 1231-1242.
235. Bao, L., et al., *Variations of chromosome 2 gene expressions among patients with lung cancer or non-cancer*. Cell Biol Toxicol, 2016. **32**(5): p. 419-35.

236. Saha, S.K., et al., *PROM1 and PROM2 expression differentially modulates clinical prognosis of cancer: a multiomics analysis*. *Cancer Gene Ther*, 2020. **27**(3-4): p. 147-167.
237. Li, W., et al., *PROM2 promotes gemcitabine chemoresistance via activating the Akt signaling pathway in pancreatic cancer*. *Exp Mol Med*, 2020. **52**(3): p. 409-422.
238. Zhang, B., et al., *Dysregulation of Long Non-coding RNAs and mRNAs in Plasma of Clear Cell Renal Cell Carcinoma Patients Using Microarray and Bioinformatic Analysis*. *Front Oncol*, 2020. **10**: p. 559730.
239. Rohan, S., et al., *Gene expression profiling separates chromophobe renal cell carcinoma from oncocytoma and identifies vesicular transport and cell junction proteins as differentially expressed genes*. *Clin Cancer Res*, 2006. **12**(23): p. 6937-45.
240. Kudo, I., et al., *Particular gene upregulation and p53 heterogeneous expression in TP53-mutated maxillary carcinoma*. *Oncol Lett*, 2017. **14**(4): p. 4633-4640.
241. Bousquet, G., et al., *Individual xenograft as a personalized therapeutic resort for women with metastatic triple-negative breast carcinoma*. *Breast Cancer Res*, 2014. **16**(1): p. 401.
242. Bustin, S.A., et al., *The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments*. *Clin Chem*, 2009. **55**(4): p. 611-22.
243. Tang, D. and G. Kroemer, *Ferroptosis*. *Curr Biol*, 2020. **30**(21): p. R1292-R1297.
244. Liang, W., et al., *CAV-1 contributes to bladder cancer progression by inducing epithelial-to-mesenchymal transition*. *Urol Oncol*, 2014. **32**(6): p. 855-63.
245. Gai, X., et al., *Caveolin-1 is up-regulated by GLI1 and contributes to GLI1-driven EMT in hepatocellular carcinoma*. *PLoS One*, 2014. **9**(1): p. e84551.
246. Cokakli, M., et al., *Differential expression of Caveolin-1 in hepatocellular carcinoma: correlation with differentiation state, motility and invasion*. *BMC Cancer*, 2009. **9**: p. 65.
247. Guan, J., R. Gupta, and F.V. Filipp, *Cancer systems biology of TCGA SKCM: efficient detection of genomic drivers in melanoma*. *Sci Rep*, 2015. **5**: p. 7857.
248. Jonsson, G., et al., *Gene expression profiling-based identification of molecular subtypes in stage IV melanomas with different clinical outcome*. *Clin Cancer Res*, 2010. **16**(13): p. 3356-67.
249. Cirenajwis, H., et al., *Molecular stratification of metastatic melanoma using gene expression profiling: Prediction of survival outcome and benefit from molecular targeted therapy*. *Oncotarget*, 2015. **6**(14): p. 12297-309.
250. Bousquet, G. and A. Janin, *Patient-Derived Xenograft: An Adjuvant Technology for the Treatment of Metastatic Disease*. *Pathobiology*, 2016. **83**(4): p. 170-6.
251. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *The hallmarks of cancer*. *Cell*, 2000. **100**(1): p. 57-70.
252. Hanahan, D., *Hallmarks of Cancer: New Dimensions*. *Cancer Discov*, 2022. **12**(1): p. 31-46.
253. Talty, R. and M. Bosenberg, *The role of ferroptosis in melanoma*. *Pigment Cell Melanoma Res*, 2022. **35**(1): p. 18-25.
254. Han, N., H. Li, and H. Wang, *MicroRNA-203 inhibits epithelial-mesenchymal transition, migration, and invasion of renal cell carcinoma cells via the inactivation of the PI3K/AKT signaling pathway by inhibiting CAV1*. *Cell Adh Migr*, 2020. **14**(1): p. 227-241.
255. Zhu, Q., et al., *CircAKT1 acts as a sponge of miR-338-3p to facilitate clear cell renal cell carcinoma progression by up-regulating CAV1*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2020. **532**(4): p. 584-590.
256. Lee, S., et al., *Extensive lymphatic spread of papillary thyroid microcarcinoma is associated with an increase in expression of genes involved in epithelial-mesenchymal transition and cancer stem cell-like properties*. *Cancer Med*, 2019. **8**(15): p. 6528-6537.
257. Zhu, Z., et al., *Kruppel-Like Factor 4 Inhibits Pancreatic Cancer Epithelial-to-Mesenchymal Transition and Metastasis by Down-Regulating Caveolin-1 Expression*. *Cell Physiol Biochem*, 2018. **46**(1): p. 238-252.
258. Phiboonchaiyanan, P.P., et al., *Benzophenone-3 increases metastasis potential in lung cancer cells via epithelial to mesenchymal transition*. *Cell Biol Toxicol*, 2017. **33**(3): p. 251-261.
259. Magtanong, L., et al., *Exogenous Monounsaturated Fatty Acids Promote a Ferroptosis-Resistant Cell State*. *Cell Chem Biol*, 2019. **26**(3): p. 420-432 e9.
260. Ubellacker, J.M., et al., *Lymph protects metastasizing melanoma cells from ferroptosis*. *Nature*, 2020. **585**(7823): p. 113-118.

261. Luo, W., et al., *LncRNA RP11-89 facilitates tumorigenesis and ferroptosis resistance through PROM2-activated iron export by sponging miR-129-5p in bladder cancer*. *Cell Death Dis*, 2021. **12**(11): p. 1043.
262. Raguraman, P., et al., *Antisense Oligonucleotide-Mediated Splice Switching: Potential Therapeutic Approach for Cancer Mitigation*. *Cancers (Basel)*, 2021. **13**(21).
263. Kaczorowski, M., et al., *PRAME Expression in Cancer. A Systematic Immunohistochemical Study of >5800 Epithelial and Nonepithelial Tumors*. *Am J Surg Pathol*, 2022. **46**(11): p. 1467-1476.
264. Lambert, G., E. Fattal, and P. Couvreur, *Nanoparticulate systems for the delivery of antisense oligonucleotides*. *Adv Drug Deliv Rev*, 2001. **47**(1): p. 99-112.
265. Zheng, T., et al., *Anti-MicroRNA-21 Oligonucleotide Loaded Spermine-Modified Acetalated Dextran Nanoparticles for B1 Receptor-Targeted Gene Therapy and Antiangiogenesis Therapy*. *Adv Sci (Weinh)*, 2022. **9**(5): p. e2103812.

ANNEXES

LETTER TO EDITOR

Increased risk of brain metastases among patients with melanoma and *PROM2* expression in metastatic lymph nodes

Dear Editor,

Brain metastases occur in the progression of metastatic melanoma in up to 44% of cases.¹ Despite evidence of clinical benefit of combined immunotherapies on melanoma brain metastases,² more than 50% of patients will have brain progression, challenging daily practice in oncology. Molecular markers predictive of the risk of melanoma brain metastases remain largely to be identified.³

In our study, we performed transcriptomic analyses on laser-microdissected tumor cells from metastatic lymph nodes of patients with melanoma, to identify biomarkers associated with the occurrence of brain metastases over a median follow-up of 48 months. We followed REMARK recommendations for tumor marker prognostic studies.⁴ All methods are fully detailed in Material and Method in the Supporting Information.

Among the 51 patients selected for the development cohort (Figure S1), after a median follow-up of 48 months from the time of regional lymph node disease, 19 (37%) developed brain metastases (Group 3), whereas 32 (63%) did not (Group 1 including patients with only regional lymph node metastases and who did not relapse, and Group 2 including patients without brain metastases but with other metastatic localizations) (Table S1 for patients' characteristics and Figure 1A). The median overall survival calculated from first diagnosis of regional lymph node metastasis was significantly shorter among patients with brain metastases than among patients without (39 vs 76 months, $P < .01$) (Figure S2). The median survival from the time of brain metastases was 13.3 months (range: 2-72 months).

Each metastatic lymph node was laser microdissected to select a minimum number of 1500 tumor cells. After RNA extraction, all samples had a RNA integrity number over 7, enabling transcriptomic analyses. On transcriptomic data, multivariate analysis was carried out to compare patients with and without brain metastases. We focused on the

PROM2 gene, also called prominin-2, with some of the highest *d*-scores at 4.6 and fold change of 3.3 (Table S2), and because *PROM2*, a membrane glycoprotein and a second member of the prominin family, induces membrane protrusions⁵ and could thus be implicated in invasive processes. Using reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-qPCR), the median expression of *PROM2* mRNA was significantly higher in metastatic lymph nodes from patients who subsequently developed brain metastases (Δ cycle threshold [Ct] = 4.9, interquartile range [IQR] = 6.3 vs Δ Ct = 2.1, IQR = 3.9; $P = .005$; Figure 1A).

We then analyzed transcriptomic data downloaded from three public databanks (the Cancer Genome Atlas SKCM and GSE22155 and GSE65904 cohorts⁶⁻⁸), and found that a high *PROM2* expression in melanoma metastatic lymph nodes was associated with poor survival (Figure S3).

Using immunohistochemistry (IHC) on the 51 metastatic lymph nodes of the development cohort, *PROM2* was only expressed by cancer cells and the mean "PROM2 IHC score" was significantly higher among patients with brain metastases compared to patients without (8.8 vs 4; $P < .01$) (Figure 1B). Overall survival was significantly longer among patients who had a "PROM2 IHC score" < 5 than among patients who reached the cutoff of 5 ($P < .01$; Figure 1C).

Across the three groups of patients, we observed a gradual, significant increase in *PROM2* mRNA and protein expression from Group 1 to Group 3 (Figure 2B). After a median follow-up of 80 months, overall survival was also much longer for Group 1 with only metastatic regional lymph nodes (Figure 2C).

Using multivariate regression, a "PROM2 IHC score" ≥ 5 (odds ratio at 28.2) and the presence of bone metastases were the two variables significantly associated with the risk of brain metastases (Table S3).

Between 2013 and 2014, 50 additional patients with stage III melanoma at diagnosis and a frozen biopsy sample from lymph node metastases were included in

This is an open access article under the terms of the [Creative Commons Attribution](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/) License, which permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

© 2020 The Authors. *Clinical and Translational Medicine* published by John Wiley & Sons Australia, Ltd on behalf of Shanghai Institute of Clinical Bioinformatics

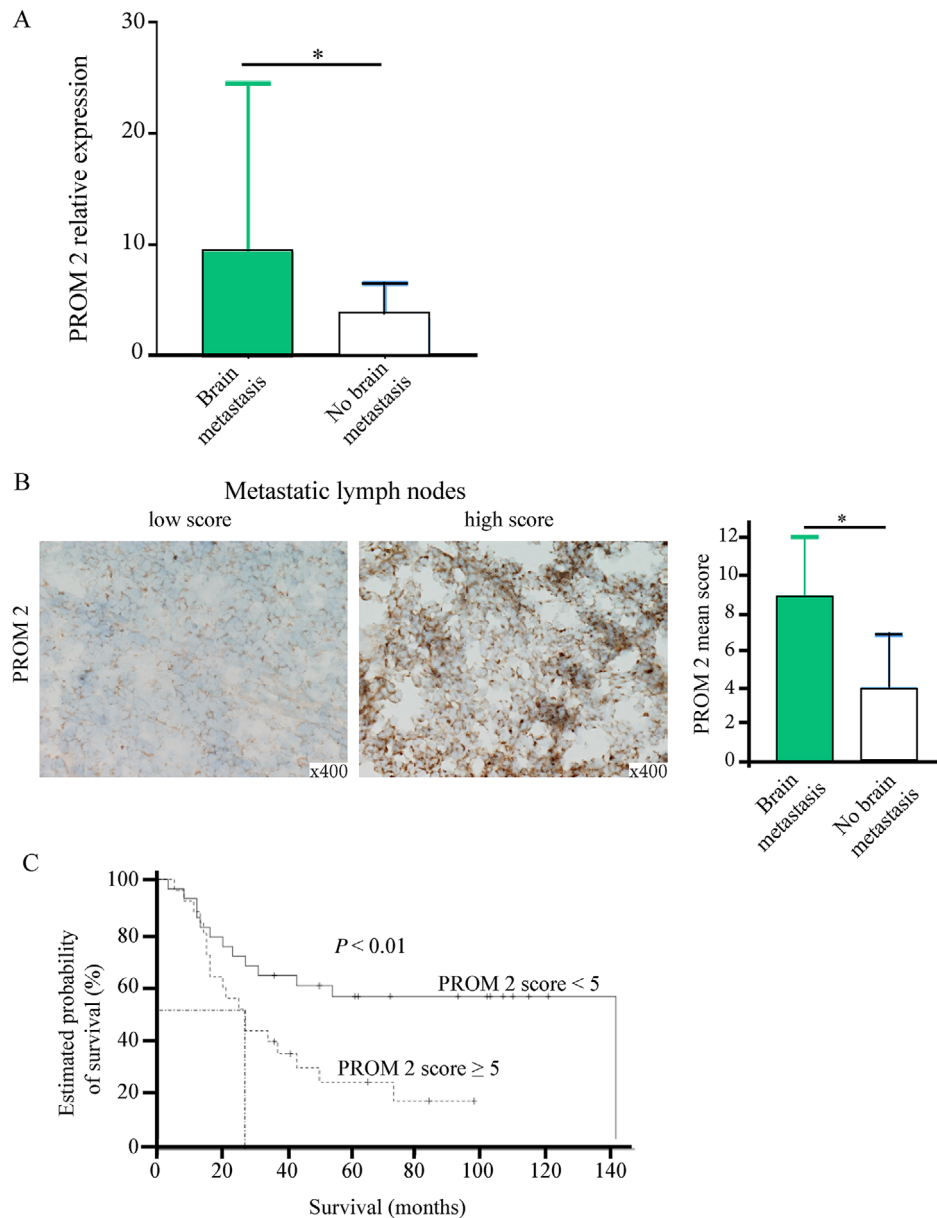


FIGURE 1 *PROM2* mRNA expression, “*PROM2* IHC score” in metastatic lymph nodes, and survival data in the development cohort. (A), *PROM2* mRNA expression is significantly higher in metastatic lymph nodes from patients with brain metastases than in those from patients without brain metastases ($P < .05$). (B), Using immunostaining on metastatic lymph nodes, the mean “*PROM2* IHC score” is significantly higher among patients with brain metastases than among those without ($P < .05$). (C), Survival according to the “*PROM2* IHC score” level in the development cohort of 51 patients. A “*PROM2* IHC score” ≥ 5 is significantly associated with a shorter survival

the validation cohort. After a median follow-up of 48 months from the time of the regional lymph node disease, 19 patients (38%) developed brain metastases, whereas 31 (62%) did not. There was no significant difference between the development and the validation cohorts (Table S4).

In this validation cohort, when *PROM2* mRNA expression was assessed on melanoma cancer cells laser microdissected from metastatic lymph nodes, it was significantly higher among patients who developed brain metastases (median $\Delta Ct = 5.1$, IQR = 2.3 vs $\Delta Ct = 2$, IQR = 4.6)

($P < .01$). The “*PROM2* IHC score” was also significantly higher in case of brain metastases (7.4 vs 2.1; $P < .01$). Using a cutoff of ≥ 5 for the “*PROM2* IHC score” in multivariate regression, the “*PROM2* IHC score” was the only factor associated with the risk of brain metastases.

In the two cohorts, in univariate analysis, a high “*PROM2* IHC score” ≥ 5 in metastatic lymph nodes was not associated with the risk of other metastatic sites (lung, liver, and bone), except for lung metastases in the validation cohort (Table S2). In both the development

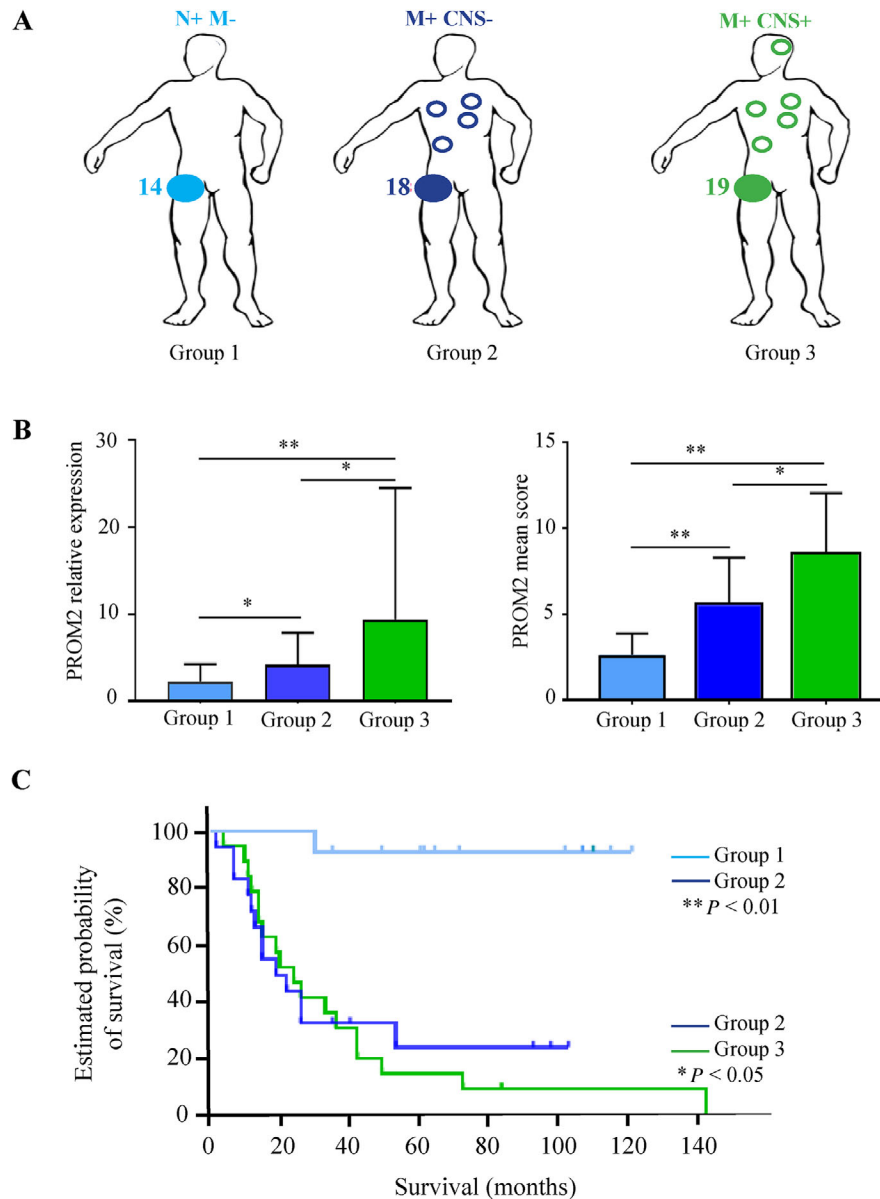


FIGURE 2 PROM2 expression and survival data according to subgroups in the development cohort. (A), Group 1 includes patients with only regional lymph node metastases; Group 2 includes patients without brain metastases but with other distant metastatic localizations; Group 3 includes patients with brain metastases. (B), *PROM2* mRNA expression and *PROM2* mean score in the three different groups. *PROM2* mRNA expression and *PROM2* mean score are gradually and significantly different in the three groups. (C), Survival curves according to the three different groups. * $P < .05$; ** $P < 0.01$

and validation cohorts, the presence of brain metastases and a “*PROM2* IHC score” of ≥ 5 were the only two factors significantly associated with mortality (Table 1; Figure S4).

In this study, among patients with resectable regional lymph node metastases from cutaneous melanoma, we identified *PROM2* as a biomarker significantly associated with the risk of distant metastases, particularly brain metastases, and a decreased survival. This association is strength of our study, with potential translational applications among patients with stage III melanoma. Indeed,

adjuvant treatment using immunotherapy or targeted anti-BRAF and anti-MEK (anti-Mitogen-activated protein kinase) therapies is recommended for patients with stage III disease. No other marker than regional lymph node involvement is currently included in the therapeutic decision. After validation in a larger cohort, the “*PROM2* IHC score” could be used to identify high- and low-risk patients with stage III melanoma more efficiently, and could thus be included in adjuvant clinical trials.

In the management of metastatic melanomas, 20% to 40% of patients remain insensitive to targeted

TABLE 1 Univariate and multivariate analyses of factors associated with mortality in the development and validation cohorts

Variables	Development cohort (n = 51)				Validation cohort (n = 50)			
	Univariate analysis HR [95% CI]	P-value	Multivariate analysis aHR [95% CI]	P-value	Univariate analysis HR [95% CI]	P-value	Multivariate analysis aHR [95% CI]	P-value
Age (years), mean ± SD	1.01 [0.98-1.03]	.37			0.98 [0.96-1.01]	.26		
Gender (women)	0.94 [0.46-1.93]	.88			0.82 [0.39-1.75]	.62		
Initial TNM classification		.01		–		.94		
IIIB	1 (reference)		–		1 (reference)			
IIIC	1.22 [0.57-2.60]		–		1.12 [0.53-2.34]			
IIID	7.26 [1.85-28.4]		–		0.86 [0.11-6.58]			
Primary site of melanoma		.49				.20		
Head and neck	1 (reference)				1 (reference)			
Trunk	0.91 [0.26-3.15]				0.42 [0.10-1.64]			
Upper limb	0.48 [0.13-1.75]				0.80 [0.19-3.26]			
Lower limb	0.46 [0.15-1.44]				1.08 [0.30-3.86]			
Unknown	0.49 [0.05-4.45]				–			
Metastatic site								
Brain	2.61 [1.28-5.34]	.008	–	–	5.20 [2.39-11.3]	<.0001	8.08 [2.49-26.2]	.0005
Lung	3.82 [1.78-8.18]	.0005	10.7 [2.86-39.9]	.0004	2.36 [1.13-4.96]	.02	–	–
Bone	2.00 [0.91-4.36]	.08	–	–	2.50 [1.17-5.37]	.01	–	–
Liver	1.85 [0.90-3.79]	.09	–	–	2.07 [0.99-4.31]	.05	–	–
Breslow index (mm), per 1 IQR of more	1.19 [1.04-1.36]	.01	–	–	0.93 [0.82-1.06]	.28		
Ulceration (yes)	2.75 [1.26-6.00]	.01	–	–	1.19 [0.53-2.65]	.67		
BRAF status:								
BRAF V600E (yes)	1.49 [0.73-3.04]	.26			1.49 [0.65-3.42]	.34		
PROM2 mRNA expression, per 1 IQR of more	1.02 [0.99-1.05]	.11	–	–	1.16 [1.03-1.31]	.01	–	–
PROM2 IHC score								
High (≥ 5)	2.41 [1.16-5.03]	.01	6.48 [1.65-25.5]	.007	3.60 [1.69-7.70]	.0001	3.95 [1.14-13.7]	.02
Interaction terms								
Lung metastases × PROM2 IHC score ≥5			0.12 [0.02-0.64]	.01				
Brain metastases × PROM2 IHC score ≥5							0.21 [0.04-1.10]	.06

Note. Univariate and multivariate Cox proportional hazard regression models were run with the sample of deceased patients. The assumptions of the model were verified. Hazard ratios (HRs) for continuous variables were expressed per 1 SD or 1 interquartile range (IQR) as appropriate. Variables yielding *P*-values under .2 in the univariate analysis were considered for inclusion in the multivariate analysis. A stepwise selection process of the lowest *P*-values was used for the multivariate analysis, also using interaction terms. aHR: adjusted hazard ratio.

treatments.^{9,10} Our study opens new perspectives for the use of PROM2 as a potential therapeutic target for the treatment of metastatic melanoma.

The role of PROM2 in the metastatic process has not been investigated, and further studies are required to elu-

cidate this role and to see whether PROM2, like PROM1, provides stemness properties.

Our findings open new perspectives for further studies to validate PROM2 as a useful biomarker in adjuvant clinical trials, and as a potential biotarget

for the treatment of metastatic melanoma in resort situations.

ACKNOWLEDGMENTS

We would like to thank Ms S. Leyshon and Ms A. Swaine for revising the English language. The study was supported by INSERM, University of Paris, and University Paris 13.

ETHICS APPROVAL AND CONSENT TO PARTICIPATE

All patients had been informed that a part of their remaining samples could be used for research after diagnosis had been established, and none opposed it. Written informed consent was obtained from each patient. The Clinical Research Board Ethics Committee approved this study (CPP-Ile-de-France#13218).

DATA AVAILABILITY STATEMENT

All data generated or analyzed during this study are included in this published article and its Supporting Information.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

GB, AJ, and MB conceived and designed the study. PT, BB, JD, CL, and SM provided patient clinical data. MB provided patient tumor samples. TTN and MEB carried out the laser microdissections. GG and JPF analyzed the transcriptomic data. TTN and ChL performed the immunostaining. FP did statistical analyses. AJ, GB, and MB provided financial support. AJ and GB provided administrative support. TTN, GB, and MB drafted the manuscript. All authors read and approved the final version of the manuscript.

Thuy Thi Nguyen^{1,2,3}

Guillaume Gapihan^{1,4}

Pauline Tetu⁵

Frédéric Pamoukdjian^{1,6,7}

Morad El Bouchtaoui¹

Christophe Lebœuf¹

Jean-Paul Feugeas^{8,9}

Justine Paris¹

Barouyr Baroudjian⁵

Julie Delyon^{5,10}

Samia Mourah^{4,10,11}

Céleste Lebbé^{4,5,10}

Anne Janin^{1,4}

Guilhem Bousquet^{1,2,7} 

Maxime Battistella^{4,10,12}

¹ INSERM U942, Universités de Paris et Sorbonne Paris Nord, Bobigny, France

² AP-HP Hôpital Avicenne, Oncologie Médicale, Bobigny, France

³ Medical Oncology Department A, National Cancer Hospital, Hanoi, Vietnam

⁴ Hôpital Saint-Louis, Université de Paris, Paris, France

⁵ Dermatologie, AP-HP Hôpital Saint Louis, Paris, France

⁶ Médecine Gériatrique, AP-HP Hôpital Avicenne, Bobigny, France

⁷ Université Sorbonne Paris Nord, Cardiovascular Markers in Stressed Conditions, MASCOT, Bobigny, France

⁸ INSERM U722, Paris, France

⁹ Université de Franche-Comté, Besançon, France

¹⁰ INSERM U976, Paris, France

¹¹ Solid Tumor Genomic Department, AP-HP, Hôpital Saint Louis, Paris, France

¹² Laboratoire de Pathologie, AP-HP Hôpital Saint-Louis, Paris, France

Correspondence

Maxime Battistella, Hôpital Saint-Louis, Université de Paris, 1 avenue Claude Vellefaux, Paris, F-75010, France.

Email: maxime.battistella@aphp.fr


Guilhem Bousquet, INSERM U942, Universités de Paris et Sorbonne Paris Nord, SMBH, Rue de Chablis, Bobigny, F-93000, France.

Email: guilhem.bousquet@aphp.fr

Guillaume Gapihan, Pauline Tetu, and Frédéric Pamoukdjian contributed equally to this work.

Guilhem Bousquet and Maxime Battistella are co-senior authors.

ORCID

Guilhem Bousquet  <https://orcid.org/0000-0001-5594-6694>

REFERENCES

1. Cagney DN, Martin AM, Catalano PJ, et al. Incidence and prognosis of patients with brain metastases at diagnosis of systemic malignancy: a population-based study. *Neuro Oncol.* 2017;19(11):1511-1521.
2. Tawbi HA, Forsyth PA, Algazi A, et al. Combined nivolumab and ipilimumab in melanoma metastatic to the brain. *N Engl J Med.* 2018;379(8):722-730.
3. Jilaveanu LB, Parisi F, Barr ML, et al. PLEKHA5 as a biomarker and potential mediator of melanoma brain metastasis. *Clin Cancer Res.* 2015;21(9):2138-2147.
4. McShane LM, Altman DG, Sauerbrei W, et al. REporting recommendations for tumour MARKer prognostic studies (REMARK). *British journal of cancer.* 2005;93(4):387-391.

5. Singh RD, Schroeder AS, Scheffer L, et al. Prominin-2 expression increases protrusions, decreases caveolae and inhibits Cdc42 dependent fluid phase endocytosis. *Biochem Biophys Res Commun*. 2013;434(3):466-472.
6. Cirenajwis H, Ekedahl H, Lauss M, et al. Molecular stratification of metastatic melanoma using gene expression profiling: prediction of survival outcome and benefit from molecular targeted therapy. *Oncotarget*. 2015;6(14):12297-12309.
7. Guan J, Gupta R, Filipp FV. Cancer systems biology of TCGA SKCM: efficient detection of genomic drivers in melanoma. *Sci Rep*. 2015;5:7857.
8. Jonsson G, Busch C, Knappskog S, et al. Gene expression profiling-based identification of molecular subtypes in stage IV melanomas with different clinical outcome. *Clin Cancer Res*. 2010;16(13):3356-3367.
9. Manzano JL, Layos L, Buges C, et al. Resistant mechanisms to BRAF inhibitors in melanoma. *Ann Transl Med*. 2016;4(12):237.
10. Gide TN, Wilmott JS, Scolyer RA, Long GV. Primary and acquired resistance to immune checkpoint inhibitors in metastatic melanoma. *Clin Cancer Res*. 2018;24(6):1260-1270.


SUPPORTING INFORMATION

Additional supporting information may be found online in the Supporting Information section at the end of the article.



Review

The Pharmacology of Xenobiotics after Intracerebro Spinal Fluid Administration: Implications for the Treatment of Brain Tumors

Justine Paris ^{1,†}, Eurydice Angeli ^{1,2,3,†} and Guilhem Bousquet ^{1,2,3,*} 

¹ Institut National de la Santé Et de la Recherche Médicale (INSERM), U942, 9 Rue de Chablis, 93000 Bobigny, France; justinesv.paris@gmail.com (J.P.); eurydice.angeli@gmail.com (E.A.)

² Assistance Publique Hôpitaux de Paris, Avicenne Hospital, Department of Medical Oncology, 93000 Bobigny, France

³ Sorbonne Paris Nord University, 99 Avenue Jean Baptiste Clément, 93430 Villetaneuse, France

* Correspondence: guilhem.bousquet@aphp.fr

† These authors are co-first authors.

Abstract: The incidence of brain metastasis has been increasing for 10 years, with poor prognosis, unlike the improvement in survival for extracranial tumor localizations. Since recent advances in molecular biology and the development of specific molecular targets, knowledge of the brain distribution of drugs has become a pharmaceutical challenge. Most anticancer drugs fail to cross the blood–brain barrier. In order to get around this problem and penetrate the brain parenchyma, the use of intrathecal administration has been developed, but the mechanisms governing drug distribution from the cerebrospinal fluid to the brain parenchyma are poorly understood. Thus, in this review we discuss the pharmacokinetics of drugs after intrathecal administration, their penetration of the brain parenchyma and the different systems causing their efflux from the brain to the blood.

Keywords: brain metastases; blood–brain barrier; intrathecal injection; glymphatic system; efflux receptor; neonatal Fc receptor



Citation: Paris, J.; Angeli, E.; Bousquet, G. The Pharmacology of Xenobiotics after Intracerebro Spinal Fluid Administration: Implications for the Treatment of Brain Tumors. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 1281. <https://doi.org/10.3390/ijms22031281>

Academic Editor: Alessandro Frati
Received: 31 December 2020
Accepted: 26 January 2021
Published: 28 January 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Since 1914 and the development of salvarsan to treat syphilis and its neurological damage, penetration of drugs into the brain has continued to be a pharmaceutical challenge [1]. The central nervous system is a sanctuary site, highly protected from the outside environment by the low permeability of the blood–brain barrier (BBB) and by efflux systems preventing brain penetration and diffusion of most xenobiotics [2]. Since recent advances in molecular biology and the development of specific molecular targets, knowledge of the brain distribution of drugs has become a pharmaceutical challenge.

Among the different cancer types, the incidence of brain metastases ranges from 9% to 30% across studies [3–7]. Melanoma, breast and lung cancers are the main providers of brain metastases which occur in 6 to 56% of patients [3], and lead to short survival of under a year [8]. To date, standard treatments are more or less limited to surgery and radiotherapy [9,10].

Systemic anticancer treatments, including the classic chemotherapies and targeted treatments, have a limited benefit on cancer brain metastases because they do not readily cross the BBB, thus obtaining only insufficient pharmacological concentrations in the brain [2].

To overcome this problem, direct intrathecal injections of drugs have been proposed for the treatment of carcinomatous meningitis and parenchymal brain metastases [11,12]. However, little is known about drug pharmacokinetics in the brain parenchyma after intracerebrospinal fluid administration.

In this review, we provide a summary of knowledge on drug penetration into the brain parenchyma after intracerebrospinal fluid injection and the different systems causing their efflux.

2. Turnover in the Glymphatic System

Brain extracellular spaces occupy 20% of the total brain volume [13], including fluid compartments with blood vessels, cerebrospinal fluid (CSF) and intracellular fluid.

On the cortical surface of the brain, the cerebral arteries extend into the pial arteries running through the subarachnoid and subpial spaces. When they penetrate the brain parenchyma, the pial arteries create a perivascular space filled with CSF and bordered by leptomeningeal cells, known as the Virchow–Robin space. As the pial arterioles penetrate the deeper brain parenchyma, the Virchow–Robin spaces become continuous with the basal lamina, which separate endothelial cells, pericytes and astrocytes. Unlike peripheral tissues, the central nervous system completely lacks lymphatic vessels [14].

Since 1981, various experiments have been carried out by H. F. Cserr's team to assess the clearance of physiological molecules and xenobiotics after their intracerebral administration. Despite major differences in molecular sizes and diffusion coefficients, efflux rates are roughly similar, whatever the molecule considered, suggesting a convective system of brain circulation and efflux, independent from the blood–brain barrier [15].

This system, called the glymphatic system, is driven by pressure gradients along arterial and venous perivascular spaces [16] (Figure 1a,b), and has an important role in the distribution and clearance of molecules and toxins. Radio-labelled tracer studies indicate that 40 to 80% of large proteins and solutes are removed from the brain by the glymphatic clearance system [13].

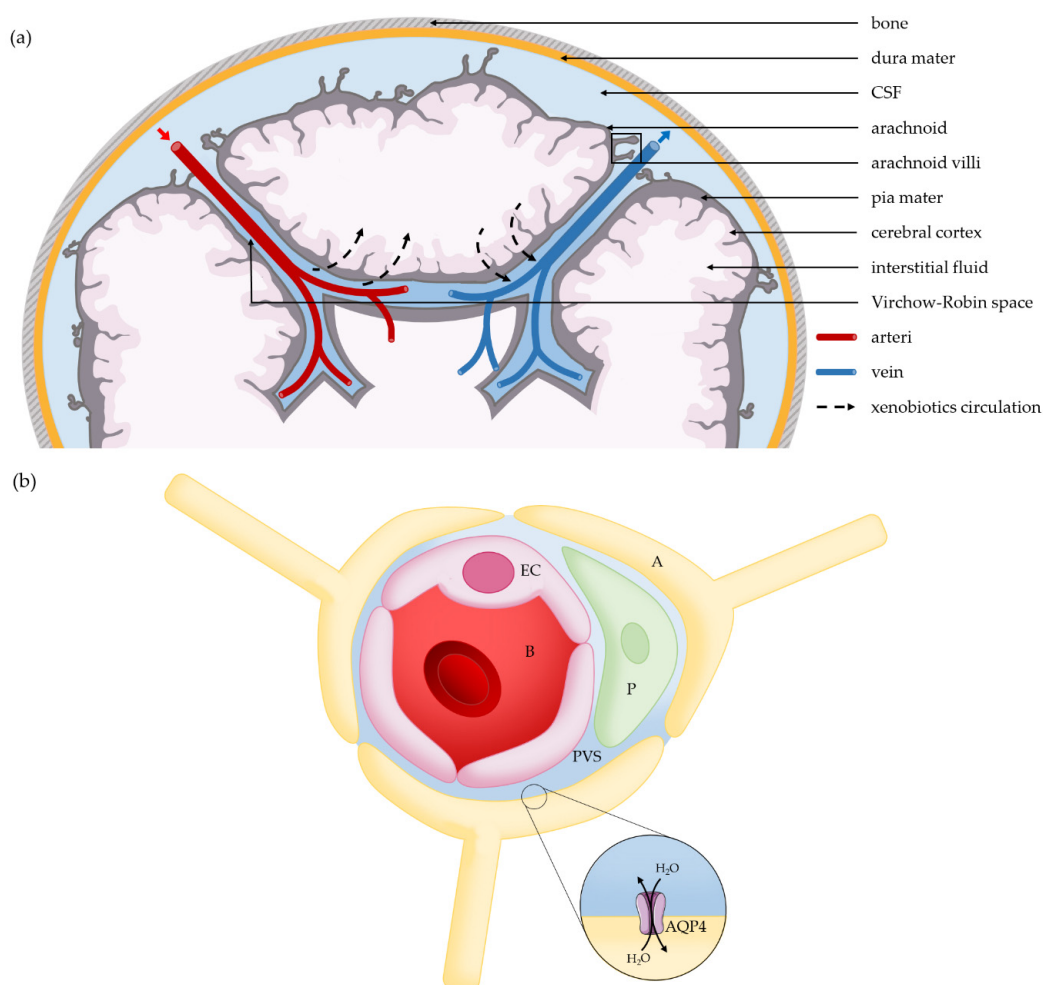


Figure 1. Anatomical structures of brain vasculature. (a) The glymphatic system: xenobiotics circulation, diffusion and efflux along perivascular spaces after intrathecal administration. (b) Cross section of a brain vessel: xenobiotics circulate along perivascular spaces of blood vessels. A: astrocyte, regulator of the hydrostatic pressure by water exchanges; AQP4: aquaporin 4; P: pericyte; EC: endothelial cell; PVS: perivascular space; B: blood. (Images modified from © SMART/CC-BY-3.0).

2.1. Transport through the Glymphatic System, Astrocyte Regulation Function

Illif et al. [17] studied the mouse brain distribution of fluorescent and radio-labelled tracers after intrathecal administration. First, they evidenced an absence of brain penetration when drugs were injected into the ventricles, while global brain penetration varied from 20 to 95% after injections into the cisterna magna. Low molecular weight molecules (TR-d3, 3kD) penetrate the brain interstitial fluid from perivascular spaces and the pial surface, while larger molecular weight molecules (FITC-d2000, 2000 kD) remain in the perivascular spaces of penetrating arteries and do not reach the interstitial fluid. Using two photon laser scanning microscopy, fluorescent dextran was able to penetrate brain parenchyma after injection into the cisterna magna and confirmed the passage of small molecules (TR-d3) into the brain interstitium, while larger molecules (FITC-d2000) remained confined to the paravascular spaces of penetrating arteries. After injection, the smaller tracers rapidly entered the brain via surface cortical arteries, in the space surrounding the arterial smooth muscle cells. They then reached the penetrating arterioles and the terminal capillary bed, circulating in a space bounded by astrocytic endfeet. Finally, fluorescent tracers rapidly reached deeper brain structures like the basal ganglia and the thalamus.

Perivascular astrocytes, which almost entirely cover the brain microvasculature [18], play a major role in CSF and brain interstitial fluid distribution and bulk flow. First, astrocytic endfeet may have a sieving function, allowing the passage of molecules smaller than 20 nm into the brain interstitium, corresponding to the space between two overlapping endfeet [18]. Secondly, they regulate the flow of water by the expression of aquaporin 4 at their endfeet. A knockout mouse model for aquaporin 4 showed a cessation of tracer movements from the distal paravascular space to the interstitium, and of interstitial bulk clearance from the brain parenchyma [17,19]. By creating an arterio-venous hydrostatic pressure gradient, aquaporin 4 facilitates the influx of subarachnoid CSF from para-arterial spaces into the brain interstitium and the clearance of brain interstitial fluid to the extracerebral area.

Other factors are responsible for hydrostatic pressure modifications in the glymphatic system and the accumulation of toxins. One study demonstrated a reduction of 80–90% for glymphatic flux in elderly mice compared to young mice, leading to an accumulation of tau and amyloid β peptide [20]. This can be due to a reduction of arterial pulsatility, because of the stiffening of the arterial wall in elderly people [21,22], or a reduction of CSF production [21,23,24]. In contrast, a sleeping state (anesthetized or naturally sleeping) significantly improves the performance of glymphatic activity, with a 90% higher CSF flow in the waking state as was demonstrated in rats [25].

2.2. Drug Diffusion in the Extracellular Space of Brain

Drug diffusion in the extracellular space responds to diffusion mechanisms, driven by the kinetic energy of molecules and their collision with water molecules. This is influenced by many biochemical and physical parameters [13]. Wolak et al. assessed drug diffusion ratios in the extracellular space of brain after intrathecal administration. They demonstrated that low molecular weight molecules, with a small hydrodynamic diameter and absence of fixation to negatively charged heparan sulfates, widely diffused in the extracellular space, reaching deep brain structures [13].

2.3. Clearance of the Cerebral Interstitial Fluid

Patlak et al. studied the efflux of radio-iodinated albumin after injection into the caudate nucleus, the internal capsule and the midbrain of rats [26]. After distribution in the interstitial fluid from the perivascular spaces, 62% of cerebral interstitial fluid drains into the CSF. Pharmacokinetic studies have demonstrated that tracers were cleared from the subarachnoid space: (i) to the blood through the arachnoid villi or fenestrated vessels of the choroid plexus [15,26,27], (ii) to the retropharyngeal lymph nodes through the cribriform plate or the sheath of olfactory nerves [28].

Using Tie2-GFP:NG2-DsRed double reporter mice that enable arteries and veins to be distinguished on tissue sections, other authors have observed that tracers accumulate

within the perivascular spaces of capillaries and parenchymal venules one hour after intracisternal injections [17]. The tracers then exited the brain via para-venous routes of the medial internal cerebral veins and the lateral-ventral caudal rhinal veins. These results demonstrate that interstitial cerebral fluid and CSF circulate and are cleared via the same para-arterial and para-venous spaces in the glymphatic system.

Finally, the glymphatic system plays a role in xenobiotic distribution in the brain after intracerebral or intrathecal administration. It also enables the elimination of molecules that are too large to cross the BBB or that lack specific receptors [29]. This convective system is closely regulated by the aquaporin 4 channels of astrocytic endfeet.

3. Efflux Systems and Drug Clearance

As the BBB restricts large hydrophilic molecules from entering the brain parenchyma, direct injection of xenobiotics into the cerebrospinal fluid is a promising method to bypass the lack of permeability of the blood–brain barrier [30,31]. However, this approach has limitations, since drug transporters are responsible for an active efflux of xenobiotics from brain to blood. These transporters, mainly ATP-binding cassette (ABC) transporters and neonatal Fc receptor (FcRn), are expressed by endothelial cells in the BBB. This efflux, by preventing drugs from reaching relevant concentrations in the brain parenchyma, could explain their limited efficacy after intravenous administration and also after intracerebrospinal fluid administration [32–37].

3.1. ABC Transporters

The ABC gene family codes for 48 ABC transporters, which use energy from ATP hydrolysis to transport substrates across biological membranes, and six of them are implicated in drug transport [38]. For the BBB, the most widely studied ABC efflux transporters are the P-glycoprotein (Pgp), the breast cancer resistance protein (BCRP) and the multidrug resistance protein (MRP) [39] (Figure 2).

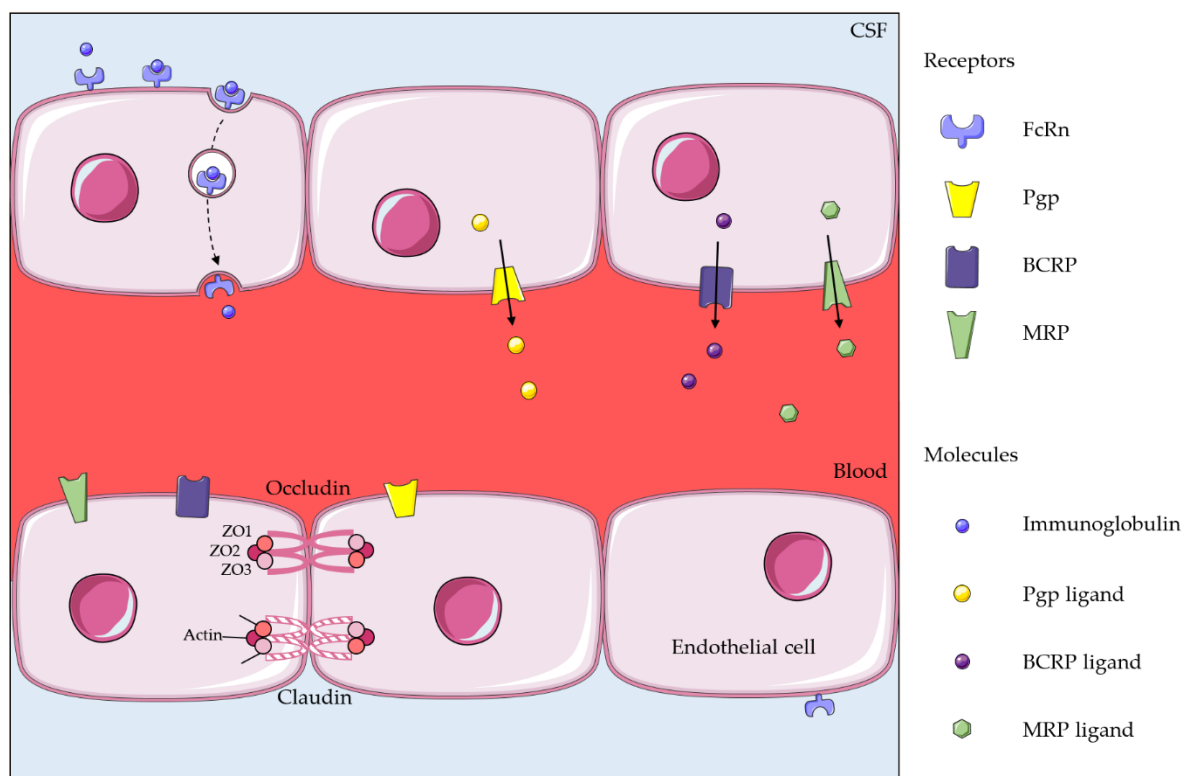


Figure 2. Efflux systems on the BBB (blood–brain barrier). Left side: transcytosis across endothelial cells of the BBB by FcRn. Middle and right side: ABC transporters at the luminal side of endothelial cells of the BBB. ZO: zonula occludens. (Images modified from © SMART/CC-BY-3.0).

In humans, the Pgp is a 170 kDa plasma membrane protein of the ABC subfamily B member 1. It is encoded by two members of the Pgp gene family, *MRD1* and *MRD3*. In *Mus musculus*, Pgp is encoded by three genes, *mrd1*, *mrd2* and *mrd3* [40]. Only *MRD1* proteins in humans, and *mrd1* and *mrd3* proteins in *Mus musculus*, enable multidrug transport through the BBB [41–44].

Pgp was identified in 1976 in Chinese hamster ovary cells [45]. In 1987, on a panel of eight mammalian cell lines, expression of the Pgp protein was associated with a multidrug resistance phenotype towards 15 anticancer drugs [46]. In human tissues obtained after surgery or autopsy procedures, following immunostaining, Pgp was mainly expressed by liver cells, renal tubule cells and gut endothelial cells, suggesting its role in the physiological elimination of xenobiotics [47,48]. In the human brain, Pgp was strongly expressed in the apical membrane of capillary endothelial cells [49–51], and also by astrocyte endfeet covering endothelial cells in the BBB [52]. This physiological expression at the BBB suggests a protective role of Pgp, promoting xenobiotic efflux from brain to blood. Even if Pgp shares the same function across species, its expression level at the BBB seems to be species dependent, and 3-times higher in human brain samples obtained from autopsy than in brain tissue obtained from Sprague Dawley laboratory rats [53]. Knockout mice lacking the functional homologue of human *MDR1* protein have an abnormal accumulation of drugs in the brain parenchyma [54]. Surprisingly, when in vitro cell lines are exposed to increasing concentrations of a drug, the expression level of Pgp also increases [55,56]. This could be explained by the fact that Pgp expression, in addition to its physiological expression, is also inducible. More recently, in vitro and in vivo preclinical studies have evidenced drug-inducible expression of Pgp in response to exposure to certain xenobiotics [57,58].

In cancer patients with brain metastases or primary brain tumours, Pgp expression at the BBB is challenging clinical practice, since Pgp recognizes various cancer drugs (Table 1). To favour BBB passage and prevent drug efflux linked to Pgp expression, Pgp inhibitors have been tested in preclinical models, with promising results [59,60]. The aim was to increase drug accumulation in the brain parenchyma, including anticancer drugs (Table 2). Typically for taxanes (paclitaxel or docetaxel), combining their administration with Pgp inhibitor increases their brain parenchyma penetration 2- to 6-fold. However, it appears that Pgp inhibitors are less effective in inhibiting Pgp at the BBB than in other localizations [61], so that the use of higher doses is required, thus possibly entailing greater toxicity. In humans, the data are still limited. In healthy volunteers, a pilot study has shown that oral administration of tariquidar, a third generation Pgp inhibitor, increases the brain distribution volume of (R)-¹¹C-verapamil by 24% compared to (R)-¹¹C-verapamil only [62].

Finally, an additional complexity is linked to the possible activation of Pgp activity through conformational change induction, as shown with oxygenated xanthenes [63,64].

BCRP is predominantly expressed in the luminal membrane of BBB endothelial cells [65,66]. It is implicated in drug resistance to several tyrosine kinase inhibitors, such as imatinib and gefitinib [67–69]. BCRP knockout mice showed an increased brain penetration of xenobiotics [70–74]. Even if Pgp is the main efflux transporter [75], BCRP and Pgp concomitantly act as efflux transporters, BCRP being more rapidly saturated than Pgp [76]. BCRP and Pgp have compensatory systems and probably need to be inhibited simultaneously to increase the brain distribution of drugs.

MRP is ubiquitously expressed in several tissues including the luminal membrane of BBB endothelial cells [77–79] and it acts as an anion transporter and also as a drug transporter [80]. Indeed, several drugs are both substrates for Pgp and MRP transporters (Table 1) as they have a synergistic and overlapping role in reducing the entrance of xenobiotics into the brain [81].

Table 1. ABC transporter substrates.

ABC Transporters (Corresponding Gene)	Substrates	Biological Effect	Reference
Pgp (<i>ABCB1</i>)	Anticancer drug		
	Paclitaxel	Microtubule polymer stabilizer	[82,83]
	Docetaxel	Microtubule-disruptive drug	[83,84]
	Vinblastine	Microtubule-disruptive drug	[83]
	Vincristine	Topoisomerase II inhibitor	[83]
	Mitoxantrone	Topoisomerase II inhibitor	[83]
	Etoposide (VP16)	Topoisomerase II inhibitor	[83]
	Doxorubicin	DNA intercalating agent	[83]
	Daunorubicin	DNA intercalating agent	[83]
	Afatinib	EGFR-TKI	[85]
	Erlotinib	EGFR-TKI	[85,86]
	Gefitinib	EGFR-TKI	[85,86]
	Osimertinib	EGFR-TKI	[85,86]
	Rociletinib	EGFR-TKI	[85]
	Anti-arrhythmic agent		
	Digoxin	Sodium pump inhibitor	[87]
	Anti-retroviral drug		
	Ritonavir	Protease inhibitor	[88]
	Saquinavir	Protease inhibitor	[88]
Anti-inflammatory			
Colchicine	Microtubule assembly inhibitor	[89]	
MRP (<i>ABCC1</i>)	Anticancer drug		
	Etoposide (VP16)	Topoisomerase II inhibitor	[83]
	Anti-inflammatory		
Colchicine	Microtubule assembly inhibitor	[89]	
MRP (<i>ABCC2</i>)	Anticancer drug		
	Vinblastine	Microtubule-disruptive drug	[83,90]
	Uricosuric drug		
Sulfinpyrazone	Degranulation of platelets inhibitor	[90]	
MRP (<i>ABCC3</i>)	Anticancer drug		
	Topotecan	Topoisomerase I inhibitor	[83]
	Camptotecin (CPT-11)	Topoisomerase I inhibitor	[91]
	Etoposide (VP16)	Topoisomerase II inhibitor	[83]
	Mitoxantrone	Topoisomerase II inhibitor	[83]
	Doxorubicin	DNA intercalating agent	[83]
	Daunorubicin	DNA intercalating agent	[83]
Methotrexate	Dihydrofolate reductase inhibitor	[92]	

EGFR-TKI: Epidermal Growth Factor Receptor Tyrosine Kinase Inhibitor.

Table 2. Brain exposure to xenobiotics combined with Pgp inhibitors in preclinical studies.

Pgp Inhibitor (Mechanism of Action)	Dose	Time Lapse before Drug Administration	Drug Tested	Dose	Time Lapse before Brain Analysis	Increased Brain Parenchyma Penetration	Species	Reference	
Cyclosporin A (Calcineurin inhibitor)	50 mg/kg p.o	1 h	Paclitaxel	10 mg/kg i.v	24 h	Anticancer drug 3 times	Mice	[93]	
	50 mg/kg p.o	1 h	Docetaxel	33 mg/kg i.v	24 h	2.3 times	Mice	[94]	
	20 mg/kg i.p	1 h	Escitalopram	0.1 mg/kg i.p	30 min	Antidepressant >2 times	Mice	[95]	
	20 mg/kg i.p	1 h	Escitalopram	1 mg/kg i.p	30 min	>1.75 times	Mice	[95]	
	200 mg/kg i.p	1 h	Nortriptyline	10 mg/kg i.p	1 h	1.5 times	Rats	[96]	
	25 mg/kg i.v	30 min	Imipramine	5 mg/kg i.v	4 h	1.84 times	Rats	[97]	
	100 mg/kg i.p	1 h	Oxycodone	1 mg/kg s.c	2 h	Opioid 1.4 times	Mice	[98]	
	Zosuquidar (MDR1 inhibitor)	25–80 mg/kg p.o	1 h	Paclitaxel	10 mg/kg i.v	24 h	Anticancer drug 2.1–5.6 times	Mice	[99]
		25 mg/kg i.p	30 min	Imatinib	25 mg/kg p.o	1 h	2–3 times	Mice	[100]
	Elacridar (MDR1 and BRCP inhibitor)	25 mg/kg p.o	2 h	Paclitaxel	10 mg/kg i.v	24 h	Anticancer drug 5 times	Mice	[94]
25 mg/kg p.o		2 h	Docetaxel	33 mg/kg i.v	24 h	3.6 times	Mice	[93]	
100 mg/kg p.o		2 h	Sunitinib	10 mg/kg p.o	1 h	12 times	Mice	[101]	
100 mg/kg p.o		15 min	N-desethyl sunitinib	5 mg/kg i.v	1 h	3.3 times	Mice	[102]	
5 mg/kg i.p		30 min	Lapatinib	100 mg/kg p.o	24 h	1.5 times	Rats	[103]	
100 mg/kg p.o		2 h 30 min	Vemurafenib	5 mg/kg p.o	4 h	3–5 times	Mice	[104]	
100 mg/kg p.o		2 h	Crizotinib	5 mg/kg p.o	4 h	2.2 times	Mice	[105]	
10 mg/kg i.v	30 min	Gefitinib	25 mg/kg p.o	2 h	4 times	Mice	[106]		
Valspodar (MDR1 inhibitor)	25 mg/kg p.o	1 h	Paclitaxel	10 mg/kg i.v	24 h	Anticancer drug 6.5 times	Mice	[93]	
	25 mg/kg p.o	1 h	Docetaxel	33 mg/kg i.v	24 h	3.5 times	Mice	[94]	
	10 mg/kg i.v	5 min	Vinblastine	brain perfusion	20 s	9.1 times	Rats	[107]	
	10 mg/kg i.v	5 min	Colchicine	brain perfusion	20 s	Anti-inflammatory 8.4 times	Rats	[107]	
Verapamil (Calcium channel inhibitor)	1 mg/kg i.v	5 min	Vinblastine	brain perfusion	20 s	Anticancer drug 3.7 times	Rats	[107]	
	1 mg/kg i.v	5 min	Colchicine	brain perfusion	20 s	Anti-inflammatory 3.7 times	Rats	[107]	
	20 mg/kg i.p	1 h 30 min	Imipramine	5 mg/kg i.v	4 h	Antidepressant 1.44 times	Rats	[97]	
	3 mg/kg i.p	1 h	Oxycodone	1 mg/kg s.c	2 h	Opioid 1.3 times	Mice	[98]	

per os (p.o); intravenous (i.v); intraperitoneal (i.p); subcutaneous (s.c).

3.2. FcRn

FcRn, a heterodimer belonging to the major histocompatibility class I complex, is physiologically and ubiquitously expressed in humans, particularly in placental endothelial cells and in epithelial cells from the gut [108,109]. FcRn enables IgG and albumin to escape endothelial catabolism and transcytosis, thus promoting their biodistribution in the body. In particular, FcRn receptor enables fetal immunity through transfer of maternal immunoglobulins across the placenta [110,111].

In 2002, FcRn receptor expression was demonstrated for the first time in microvascular endothelial cells from rat brain using immunocytochemistry [112]. FcRn is expressed in the abluminal side of the endothelial cells of the BBB, and is involved in the transcytosis of immunoglobulins from brain to blood [113]. In a rat model, intracranial administration of two variants of a recombinant human immunoglobulin G1, one with high FcRn affinity and the other with low FcRn affinity, led to a high brain-to-blood efflux of the high FcRn affinity immunoglobulins [113]. Once the Fc fragment of the immunoglobulin binds to the FcRn receptor, an endocytosis process allows the immunoglobulin to enter the cytoplasm of the endothelial cell, and to be further expelled to the luminal side by an exocytosis process, as shown *in vitro* using fluorescent imaging [114,115] (Figure 2). Saturation can be reached after addition of the Fc fragment but not the Fab fragment of immunoglobulins [33].

In cancer patients, several approaches are being explored to improve brain penetration of drugs. Two methods are being developed to overcome the blood–brain barrier: (i) disruption of the blood–brain barrier, including intrathecal administration [11,12,116], intra-arterial administration [2,117–122], mechanical disruption of the BBB using osmotherapy [123], radiation [124,125] or ultrasounds [126]; (ii) methods without disruption of the BBB, for instance nano functionalization of drugs to cross the BBB or intranasal administration [2,127]. To date, most clinical approaches use the intrathecal route with a lumbar or an Ommaya reservoir, since direct intrathecal injections of drugs have led to some clinical benefit for the treatment of carcinomatous meningitis and parenchymal brain metastases [11,12,128,129]. This approach is simple and safe in daily practice but requires strict asepsis [130].

Even if these innovative approaches enable drugs to penetrate brain parenchyma, efflux transporters prevent relevant pharmacological concentrations from being reached. This is particularly true for therapeutic monoclonal antibodies, probably via FcRn receptors. In a pilot clinical study, our research team demonstrated considerable and rapid efflux of trastuzumab, an anti-HER2 IgG1, from CSF to blood after intrathecal administration [129]. Injections three times a week were required to reach relevant trastuzumab concentrations in the CSF, providing clinical efficacy in halting brain metastasis progression. Engineering therapeutic Fab fragments could be a way to overcome this limitation.

4. Conclusions

Brain metastases remain a major therapeutic challenge, since standard treatments have limited efficacy. Since primary tumors and metastases, including brain metastatic localizations, frequently share common genomic signatures [2], we assume a similar theoretical efficacy of targeted therapies on brain and extracranial nervous system metastases on the condition that there is sufficient pharmacological exposure. As a result, the same drug screening methods can be used, especially pre-clinical *in vivo* models of patient-derived xenografts, particularly relevant tools for the treatment of metastatic cancers [131]. It is however interesting to note that orthotopic patient-derived xenografts of brain metastases encounter the same problems of low permeability of the blood–brain barrier to drugs after intravenous injection, and that their use for the preclinical development of drugs should probably involve the intrathecal route of drug administration.

The intrathecal route has been proposed to facilitate drug access to the brain parenchyma via the glymphatic system. Diffusion into deeper brain areas depends on the molecular weight and the biochemical characteristics of drugs, and also on efflux systems from the

BBB. Further studies are required to overcome these limitations and efficiently treat cancer brain metastases.

Author Contributions: Conceptualization, J.P., E.A. and G.B.; methodology, J.P., E.A. and G.B.; validation, G.B.; writing-original draft preparation, J.P. and E.A.; writing-review and editing, J.P. and E.A.; supervision, G.B.; project administration, G.B. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research received no external funding.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

Abbreviations

ABC	ATP-Binding Cassette
BBB	Blood–Brain Barrier
BCRP	Breast Cancer Resistance Protein
CSF	Cerebrospinal Fluid
FcRn	Neonatal Fc Receptor
MRD	Multidrug Resistance Protein
Pgp	P-Glycoprotein

References

- Pardridge, W.M. CNS drug design based on principles of blood-brain barrier transport. *J. Neurochem.* **1998**, *70*, 1781–1792. [[CrossRef](#)]
- Angeli, E.; Nguyen, T.T.; Janin, A.; Bousquet, G. How to Make Anticancer Drugs Cross the Blood-Brain Barrier to Treat Brain Metastases. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *21*, 22. [[CrossRef](#)]
- Nayak, L.; Lee, E.Q.; Wen, P.Y. Epidemiology of brain metastases. *Curr. Oncol. Rep.* **2012**, *14*, 48–54. [[CrossRef](#)]
- Suh, J.H.; Kotecha, R.; Chao, S.T.; Ahluwalia, M.S.; Sahgal, A.; Chang, E.L. Current approaches to the management of brain metastases. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **2020**, *17*, 279–299. [[CrossRef](#)]
- Scoccianti, S.; Ricardi, U. Treatment of brain metastases: Review of phase III randomized controlled trials. *Radiother. Oncol.* **2012**, *102*, 168–179. [[CrossRef](#)]
- Tsukada, Y.; Fouad, A.; Pickren, J.W.; Lane, W.W. Central nervous system metastasis from breast carcinoma. Autopsy study. *Cancer* **1983**, *52*, 2349–2354. [[CrossRef](#)]
- Sampson, J.H.; Carter, J.H., Jr.; Friedman, A.H.; Seigler, H.F. Demographics, prognosis, and therapy in 702 patients with brain metastases from malignant melanoma. *J. Neurosurg.* **1998**, *88*, 11–20. [[CrossRef](#)]
- Lowery, F.J.; Yu, D. Brain metastasis: Unique challenges and open opportunities. *Biochim. Biophys. Acta Rev. Cancer* **2017**, *1867*, 49–57. [[CrossRef](#)]
- Caroli, M.; Di Cristofori, A.; Lucarella, F.; Raneri, F.A.; Portaluri, F.; Gaini, S.M. Surgical brain metastases: Management and outcome related to prognostic indexes: A critical review of a ten-year series. *ISRN Surg.* **2011**, *2011*, 207103. [[CrossRef](#)]
- Ramakrishna, N.; Temin, S.; Chandralapaty, S.; Crews, J.R.; Davidson, N.E.; Esteva, F.J.; Giordano, S.H.; Gonzalez-Angulo, A.M.; Kirshner, J.J.; Krop, I.; et al. Recommendations on disease management for patients with advanced human epidermal growth factor receptor 2-positive breast cancer and brain metastases: American Society of Clinical Oncology clinical practice guideline. *J. Clin. Oncol.* **2014**, *32*, 2100–2108. [[CrossRef](#)]
- Bonneau, C.; Painsaud, G.; Tredan, O.; Dubot, C.; Desvignes, C.; Dieras, V.; Taillibert, S.; Tresca, P.; Turbiez, I.; Li, J.; et al. Phase I feasibility study for intrathecal administration of trastuzumab in patients with HER2 positive breast carcinomatous meningitis. *Eur. J. Cancer* **2018**, *95*, 75–84. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Stemmler, H.J.; Schmitt, M.; Harbeck, N.; Willems, A.; Bernhard, H.; Lassig, D.; Schoenberg, S.; Heinemann, V. Application of intrathecal trastuzumab (Herceptintrade mark) for treatment of meningeal carcinomatosis in HER2-overexpressing metastatic breast cancer. *Oncol. Rep.* **2006**, *15*, 1373–1377. [[PubMed](#)]
- Wolak, D.J.; Thorne, R.G. Diffusion of macromolecules in the brain: Implications for drug delivery. *Mol. Pharm.* **2013**, *10*, 1492–1504. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Jessen, N.A.; Munk, A.S.; Lundgaard, I.; Nedergaard, M. The Glymphatic System: A Beginner’s Guide. *Neurochem. Res.* **2015**, *40*, 2583–2599. [[CrossRef](#)]
- Cserr, H.F.; Ostrach, L.H. Bulk flow of interstitial fluid after intracranial injection of blue dextran 2000. *Exp. Neurol.* **1974**, *45*, 50–60. [[CrossRef](#)]
- Neuroscience Nedergaard, M. Garbage truck of the brain. *Science* **2013**, *340*, 1529–1530. [[CrossRef](#)]

17. Iloff, J.J.; Wang, M.; Liao, Y.; Plogg, B.A.; Peng, W.; Gundersen, G.A.; Benveniste, H.; Vates, G.E.; Deane, R.; Goldman, S.A.; et al. A paravascular pathway facilitates CSF flow through the brain parenchyma and the clearance of interstitial solutes, including amyloid beta. *Sci. Transl. Med.* **2012**, *4*, 147ra111. [[CrossRef](#)]
18. Mathiisen, T.M.; Lehre, K.P.; Danbolt, N.C.; Ottersen, O.P. The perivascular astroglial sheath provides a complete covering of the brain microvessels: An electron microscopic 3D reconstruction. *Glia* **2010**, *58*, 1094–1103. [[CrossRef](#)]
19. Zhou, J.; Kong, H.; Hua, X.; Xiao, M.; Ding, J.; Hu, G. Altered blood-brain barrier integrity in adult aquaporin-4 knockout mice. *Neuroreport* **2008**, *19*, 1–5. [[CrossRef](#)]
20. Kress, B.T.; Iloff, J.J.; Xia, M.; Wang, M.; Wei, H.S.; Zeppenfeld, D.; Xie, L.; Kang, H.; Xu, Q.; Liew, J.A.; et al. Impairment of paravascular clearance pathways in the aging brain. *Ann. Neurol.* **2014**, *76*, 845–861. [[CrossRef](#)]
21. Schroth, G.; Klose, U. Cerebrospinal fluid flow. I. Physiology of cardiac-related pulsation. *Neuroradiology* **1992**, *35*, 10–15. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Ziemann, S.J.; Melenovsky, V.; Kass, D.A. Mechanisms, pathophysiology, and therapy of arterial stiffness. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **2005**, *25*, 932–943. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Chen, R.L.; Kassem, N.A.; Redzic, Z.B.; Chen, C.P.; Segal, M.B.; Preston, J.E. Age-related changes in choroid plexus and blood-cerebrospinal fluid barrier function in the sheep. *Exp. Gerontol.* **2009**, *44*, 289–296. [[CrossRef](#)]
24. Fleischman, D.; Berdahl, J.P.; Zaydlov, J.; Stinnett, S.; Fautsch, M.P.; Allingham, R.R. Cerebrospinal fluid pressure decreases with older age. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e52664. [[CrossRef](#)]
25. Xie, L.; Kang, H.; Xu, Q.; Chen, M.J.; Liao, Y.; Thiagarajan, M.; O'Donnell, J.; Christensen, D.J.; Nicholson, C.; Iloff, J.J.; et al. Sleep drives metabolite clearance from the adult brain. *Science* **2013**, *342*, 373–377. [[CrossRef](#)]
26. Szentistvanyi, I.; Patlak, C.S.; Ellis, R.A.; Cserr, H.F. Drainage of interstitial fluid from different regions of rat brain. *Am. J. Physiol.* **1984**, *246*, F835–F844. [[CrossRef](#)]
27. Cserr, H.F.; Cooper, D.N.; Milhorat, T.H. Flow of cerebral interstitial fluid as indicated by the removal of extracellular markers from rat caudate nucleus. *Exp. Eye Res.* **1977**, *25*, 461–473. [[CrossRef](#)]
28. Bradbury, M.W.; Cserr, H.F.; Westrop, R.J. Drainage of cerebral interstitial fluid into deep cervical lymph of the rabbit. *Am. J. Physiol.* **1981**, *240*, F329–F336. [[CrossRef](#)]
29. Cserr, H.F.; Cooper, D.N.; Suri, P.K.; Patlak, C.S. Efflux of radiolabeled polyethylene glycols and albumin from rat brain. *Am. J. Physiol.* **1981**, *240*, F319–F328. [[CrossRef](#)]
30. Zagouri, F.; Sergentanis, T.N.; Bartsch, R.; Berghoff, A.S.; Chrysikos, D.; de Azambuja, E.; Dimopoulos, M.A.; Preusser, M. Intrathecal administration of trastuzumab for the treatment of meningeal carcinomatosis in HER2-positive metastatic breast cancer: A systematic review and pooled analysis. *Breast Cancer Res. Treat.* **2013**, *139*, 13–22. [[CrossRef](#)]
31. Hopkins, K.; Kemshead, J.T. Progress review: Intrathecal and intratumoral injection of radiolabelled monoclonal antibodies (MoAbs) for the treatment of central nervous system (CNS) malignancies. *J. Drug. Target.* **1993**, *1*, 175–183. [[CrossRef](#)]
32. Schinkel, A.H.; Wagenaar, E.; Mol, C.A.; van Deemter, L. P-glycoprotein in the blood-brain barrier of mice influences the brain penetration and pharmacological activity of many drugs. *J. Clin. Investig.* **1996**, *97*, 2517–2524. [[CrossRef](#)]
33. Zhang, Y.; Pardridge, W.M. Mediated efflux of IgG molecules from brain to blood across the blood-brain barrier. *J. Neuroimmunol.* **2001**, *114*, 168–172. [[CrossRef](#)]
34. Abbott, N.J. Blood-brain barrier structure and function and the challenges for CNS drug delivery. *J. Inherit. Metab. Dis.* **2013**, *36*, 437–449. [[CrossRef](#)]
35. Loscher, W.; Potschka, H. Drug resistance in brain diseases and the role of drug efflux transporters. *Nat. Rev. Neurosci.* **2005**, *6*, 591–602. [[CrossRef](#)]
36. Robey, R.W.; Pluchino, K.M.; Hall, M.D.; Fojo, A.T.; Bates, S.E.; Gottesman, M.M. Revisiting the role of ABC transporters in multidrug-resistant cancer. *Nat. Rev. Cancer* **2018**, *18*, 452–464. [[CrossRef](#)]
37. Loscher, W.; Potschka, H.; Sisodiya, S.M.; Vezzani, A. Drug Resistance in Epilepsy: Clinical Impact, Potential Mechanisms, and New Innovative Treatment Options. *Pharmacol. Rev.* **2020**, *72*, 606–638. [[CrossRef](#)]
38. Dean, M.; Rzhetsky, A.; Allikmets, R. The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *Genome Res.* **2001**, *11*, 1156–1166. [[CrossRef](#)]
39. Chen, Z.; Shi, T.; Zhang, L.; Zhu, P.; Deng, M.; Huang, C.; Hu, T.; Jiang, L.; Li, J. Mammalian drug efflux transporters of the ATP binding cassette (ABC) family in multidrug resistance: A review of the past decade. *Cancer Lett.* **2016**, *370*, 153–164. [[CrossRef](#)]
40. Ng, W.F.; Sarangi, F.; Zastawny, R.L.; Veinot-Drebot, L.; Ling, V. Identification of members of the P-glycoprotein multigene family. *Mol. Cell. Biol.* **1989**, *9*, 1224–1232. [[CrossRef](#)]
41. Ueda, K.; Cardarelli, C.; Gottesman, M.M.; Pastan, I. Expression of a full-length cDNA for the human “MDR1” gene confers resistance to colchicine, doxorubicin, and vinblastine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1987**, *84*, 3004–3008. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Tang-Wai, D.F.; Kajiji, S.; DiCapua, F.; de Graaf, D.; Roninson, I.B.; Gros, P. Human (MDR1) and mouse (mdr1, mdr3) P-glycoproteins can be distinguished by their respective drug resistance profiles and sensitivity to modulators. *Biochemistry* **1995**, *34*, 32–39. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Schinkel, A.H.; Roelofs, E.M.; Borst, P. Characterization of the human MDR3 P-glycoprotein and its recognition by P-glycoprotein-specific monoclonal antibodies. *Cancer Res.* **1991**, *51*, 2628–2635.
44. Devault, A.; Gros, P. Two members of the mouse mdr gene family confer multidrug resistance with overlapping but distinct drug specificities. *Mol. Cell. Biol.* **1990**, *10*, 1652–1663. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

45. Juliano, R.L.; Ling, V. A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. *Biochim. Biophys. Acta* **1976**, *455*, 152–162. [[CrossRef](#)]
46. Fojo, A.T.; Ueda, K.; Slamon, D.J.; Poplack, D.G.; Gottesman, M.M.; Pastan, I. Expression of a multidrug-resistance gene in human tumors and tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1987**, *84*, 265–269. [[CrossRef](#)]
47. Thiebaut, F.; Tsuruo, T.; Hamada, H.; Gottesman, M.M.; Pastan, I.; Willingham, M.C. Cellular localization of the multidrug-resistance gene product P-glycoprotein in normal human tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1987**, *84*, 7735–7738. [[CrossRef](#)]
48. Bello-Reuss, E.; Ernest, S. Expression and function of P-glycoprotein in human mesangial cells. *Am. J. Physiol.* **1994**, *267*, C1351–C1358. [[CrossRef](#)]
49. Cordon-Cardo, C.; O'Brien, J.P.; Casals, D.; Rittman-Grauer, L.; Biedler, J.L.; Melamed, M.R.; Bertino, J.R. Multidrug-resistance gene (P-glycoprotein) is expressed by endothelial cells at blood-brain barrier sites. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1989**, *86*, 695–698. [[CrossRef](#)]
50. Stewart, P.A.; Beliveau, R.; Rogers, K.A. Cellular localization of P-glycoprotein in brain versus gonadal capillaries. *J. Histochem. Cytochem.* **1996**, *44*, 679–685. [[CrossRef](#)]
51. Thiebaut, F.; Tsuruo, T.; Hamada, H.; Gottesman, M.M.; Pastan, I.; Willingham, M.C. Immunohistochemical localization in normal tissues of different epitopes in the multidrug transport protein P170: Evidence for localization in brain capillaries and crossreactivity of one antibody with a muscle protein. *J. Histochem. Cytochem.* **1989**, *37*, 159–164. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Pardridge, W.M.; Golden, P.L.; Kang, Y.S.; Bickel, U. Brain microvascular and astrocyte localization of P-glycoprotein. *J. Neurochem.* **1997**, *68*, 1278–1285. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Jette, L.; Tetu, B.; Beliveau, R. High levels of P-glycoprotein detected in isolated brain capillaries. *Biochim. Biophys. Acta* **1993**, *1150*, 147–154. [[CrossRef](#)]
54. Schinkel, A.H.; Smit, J.J.; van Tellingen, O.; Beijnen, J.H.; Wagenaar, E.; van Deemter, L.; Mol, C.A.; van der Valk, M.A.; Robanus-Maandag, E.C.; te Riele, H.P.; et al. Disruption of the mouse *mdr1a* P-glycoprotein gene leads to a deficiency in the blood-brain barrier and to increased sensitivity to drugs. *Cell* **1994**, *77*, 491–502. [[CrossRef](#)]
55. Riordan, J.R.; Deuchars, K.; Kartner, N.; Alon, N.; Trent, J.; Ling, V. Amplification of P-glycoprotein genes in multidrug-resistant mammalian cell lines. *Nature* **1985**, *316*, 817–819. [[CrossRef](#)]
56. Xu, D.; Knaust, E.; Pisa, P.; Palucka, K.; Lundeberg, J.; Arestrom, I.; Peterson, C.; Gruber, A. Levels of *mdr1* and *mrp* mRNA in leukaemic cell populations from patients with acute myelocytic leukaemia are heterogenous and inversely correlated to cellular daunorubicin accumulation. *Br. J. Haematol.* **1996**, *92*, 847–854. [[CrossRef](#)]
57. Chan, G.N.; Patel, R.; Cummins, C.L.; Bendayan, R. Induction of P-glycoprotein by antiretroviral drugs in human brain microvessel endothelial cells. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2013**, *57*, 4481–4488. [[CrossRef](#)]
58. Chan, G.N.; Saldivia, V.; Yang, Y.; Pang, H.; de Lannoy, I.; Bendayan, R. In vivo induction of P-glycoprotein expression at the mouse blood-brain barrier: An intracerebral microdialysis study. *J. Neurochem.* **2013**, *127*, 342–352. [[CrossRef](#)]
59. Fallacara, A.L.; Zamperini, C.; Podolski-Renic, A.; Dinic, J.; Stankovic, T.; Stepanovic, M.; Mancini, A.; Rango, E.; Iovenitti, G.; Molinari, A.; et al. A New Strategy for Glioblastoma Treatment: In Vitro and In Vivo Preclinical Characterization of Si306, a Pyrazolo[3,4-d]Pyrimidine Dual Src/P-Glycoprotein Inhibitor. *Cancers* **2019**, *11*, 848. [[CrossRef](#)]
60. Elkhayat, H.A.; Aly, R.H.; Elagouza, I.A.; El-Kabarity, R.H.; Galal, Y.I. Role of P-glycoprotein inhibitors in children with drug-resistant epilepsy. *Acta Neurol. Scand.* **2017**, *136*, 639–644. [[CrossRef](#)]
61. Choo, E.F.; Kurnik, D.; Muszkat, M.; Ohkubo, T.; Shay, S.D.; Higginbotham, J.N.; Glaeser, H.; Kim, R.B.; Wood, A.J.; Wilkinson, G.R. Differential in vivo sensitivity to inhibition of P-glycoprotein located in lymphocytes, testes, and the blood-brain barrier. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2006**, *317*, 1012–1018. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
62. Wagner, C.C.; Bauer, M.; Karch, R.; Feurstein, T.; Kopp, S.; Chiba, P.; Kletter, K.; Loscher, W.; Muller, M.; Zeitlinger, M.; et al. A pilot study to assess the efficacy of tariquidar to inhibit P-glycoprotein at the human blood-brain barrier with (R)-11C-verapamil and PET. *J. Nucl. Med.* **2009**, *50*, 1954–1961. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
63. Martins, E.; Silva, V.; Lemos, A.; Palmeira, A.; Puthongking, P.; Sousa, E.; Rocha-Pereira, C.; Ghanem, C.I.; Carmo, H.; Remiao, F.; et al. Newly Synthesized Oxygenated Xanthenes as Potential P-Glycoprotein Activators: In Vitro, Ex Vivo, and In Silico Studies. *Molecules* **2019**, *24*, 707. [[CrossRef](#)]
64. Sterz, K.; Mollmann, L.; Jacobs, A.; Baumert, D.; Wiese, M. Activators of P-glycoprotein: Structure-activity relationships and investigation of their mode of action. *ChemMedChem* **2009**, *4*, 1897–1911. [[CrossRef](#)]
65. Cooray, H.C.; Blackmore, C.G.; Maskell, L.; Barrand, M.A. Localisation of breast cancer resistance protein in microvessel endothelium of human brain. *Neuroreport* **2002**, *13*, 2059–2063. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
66. Eisenblatter, T.; Huwel, S.; Galla, H.J. Characterisation of the brain multidrug resistance protein (BMDP/ABCG2/BCRP) expressed at the blood-brain barrier. *Brain Res.* **2003**, *971*, 221–231. [[CrossRef](#)]
67. Litman, T.; Brangi, M.; Hudson, E.; Fetsch, P.; Abati, A.; Ross, D.D.; Miyake, K.; Resau, J.H.; Bates, S.E. The multidrug-resistant phenotype associated with overexpression of the new ABC half-transporter, MXR (ABCG2). *J. Cell Sci.* **2000**, *113 Pt 11*, 2011–2021.
68. Burger, H.; van Tol, H.; Boersma, A.W.; Brok, M.; Wiemer, E.A.; Stoter, G.; Nooter, K. Imatinib mesylate (STI571) is a substrate for the breast cancer resistance protein (BCRP)/ABCG2 drug pump. *Blood* **2004**, *104*, 2940–2942. [[CrossRef](#)]
69. Yanase, K.; Tsukahara, S.; Asada, S.; Ishikawa, E.; Imai, Y.; Sugimoto, Y. Gefitinib reverses breast cancer resistance protein-mediated drug resistance. *Mol. Cancer Ther.* **2004**, *3*, 1119–1125.
70. Agarwal, S.; Sane, R.; Ohlfest, J.R.; Elmquist, W.F. The role of the breast cancer resistance protein (ABCG2) in the distribution of sorafenib to the brain. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2011**, *336*, 223–233. [[CrossRef](#)]

71. Cisternino, S.; Mercier, C.; Bourasset, F.; Roux, F.; Scherrmann, J.M. Expression, up-regulation, and transport activity of the multidrug-resistance protein Abcg2 at the mouse blood-brain barrier. *Cancer Res.* **2004**, *64*, 3296–3301. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
72. Durmus, S.; Xu, N.; Sparidans, R.W.; Wagenaar, E.; Beijnen, J.H.; Schinkel, A.H. P-glycoprotein (MDR1/ABCB1) and breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) restrict brain accumulation of the JAK1/2 inhibitor, CYT387. *Pharmacol. Res.* **2013**, *76*, 9–16. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
73. Li, L.; Agarwal, S.; Elmquist, W.F. Brain efflux index to investigate the influence of active efflux on brain distribution of pemetrexed and methotrexate. *Drug. Metab. Dispos.* **2013**, *41*, 659–667. [[CrossRef](#)]
74. Sane, R.; Agarwal, S.; Mittapalli, R.K.; Elmquist, W.F. Saturable active efflux by p-glycoprotein and breast cancer resistance protein at the blood-brain barrier leads to nonlinear distribution of elacridar to the central nervous system. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2013**, *345*, 111–124. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
75. Kodaira, H.; Kusuhara, H.; Ushiki, J.; Fuse, E.; Sugiyama, Y. Kinetic analysis of the cooperation of P-glycoprotein (P-gp/Abcb1) and breast cancer resistance protein (Bcrp/Abcg2) in limiting the brain and testis penetration of erlotinib, flavopiridol, and mitoxantrone. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2010**, *333*, 788–796. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
76. Poller, B.; Wagenaar, E.; Tang, S.C.; Schinkel, A.H. Double-transduced MDCKII cells to study human P-glycoprotein (ABCB1) and breast cancer resistance protein (ABCG2) interplay in drug transport across the blood-brain barrier. *Mol. Pharm.* **2011**, *8*, 571–582. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
77. Nies, A.T.; Jedlitschky, G.; Konig, J.; Herold-Mende, C.; Steiner, H.H.; Schmitt, H.P.; Keppler, D. Expression and immunolocalization of the multidrug resistance proteins, MRP1-MRP6 (ABCC1-ABCC6), in human brain. *Neuroscience* **2004**, *129*, 349–360. [[CrossRef](#)]
78. Soontornmalai, A.; Vlaming, M.L.; Fritschy, J.M. Differential, strain-specific cellular and subcellular distribution of multidrug transporters in murine choroid plexus and blood-brain barrier. *Neuroscience* **2006**, *138*, 159–169. [[CrossRef](#)]
79. Zhang, Y.; Han, H.; Elmquist, W.F.; Miller, D.W. Expression of various multidrug resistance-associated protein (MRP) homologues in brain microvessel endothelial cells. *Brain. Res.* **2000**, *876*, 148–153. [[CrossRef](#)]
80. Barrand, M.A.; Bagrij, T.; Neo, S.Y. Multidrug resistance-associated protein: A protein distinct from P-glycoprotein involved in cytotoxic drug expulsion. *Gen. Pharmacol.* **1997**, *28*, 639–645. [[CrossRef](#)]
81. Seelig, A.; Blatter, X.L.; Wohnsland, F. Substrate recognition by P-glycoprotein and the multidrug resistance-associated protein MRP1: A comparison. *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther.* **2000**, *38*, 111–121. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
82. Sparreboom, A.; van Asperen, J.; Mayer, U.; Schinkel, A.H.; Smit, J.W.; Meijer, D.K.; Borst, P.; Nooijen, W.J.; Beijnen, J.H.; van Tellingen, O. Limited oral bioavailability and active epithelial excretion of paclitaxel (Taxol) caused by P-glycoprotein in the intestine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, *94*, 2031–2035. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
83. Allen, J.D.; Brinkhuis, R.F.; van Deemter, L.; Wijnholds, J.; Schinkel, A.H. Extensive contribution of the multidrug transporters P-glycoprotein and Mrp1 to basal drug resistance. *Cancer Res.* **2000**, *60*, 5761–5766. [[PubMed](#)]
84. van Waterschoot, R.A.; Lagas, J.S.; Wagenaar, E.; Rosing, H.; Beijnen, J.H.; Schinkel, A.H. Individual and combined roles of CYP3A, P-glycoprotein (MDR1/ABCB1) and MRP2 (ABCC2) in the pharmacokinetics of docetaxel. *Int. J. Cancer* **2010**, *127*, 2959–2964. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
85. Ballard, P.; Yates, J.W.; Yang, Z.; Kim, D.W.; Yang, J.C.; Cantarini, M.; Pickup, K.; Jordan, A.; Hickey, M.; Grist, M.; et al. Preclinical Comparison of Osimertinib with Other EGFR-TKIs in EGFR-Mutant NSCLC Brain Metastases Models, and Early Evidence of Clinical Brain Metastases Activity. *Clin. Cancer Res.* **2016**, *22*, 5130–5140. [[CrossRef](#)]
86. Soria, J.C.; Ohe, Y.; Vansteenkiste, J.; Reungwetwattana, T.; Chewaskulyong, B.; Lee, K.H.; Dechaphunkul, A.; Imamura, F.; Nogami, N.; Kurata, T.; et al. Osimertinib in Untreated EGFR-Mutated Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer. *N. Engl. J. Med.* **2018**, *378*, 113–125. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
87. Stephens, R.H.; O'Neill, C.A.; Warhurst, A.; Carlson, G.L.; Rowland, M.; Warhurst, G. Kinetic profiling of P-glycoprotein-mediated drug efflux in rat and human intestinal epithelia. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2001**, *296*, 584–591.
88. Richter, M.; Gyemant, N.; Molnar, J.; Hilgeroth, A. Comparative effects on intestinal absorption in situ by P-glycoprotein-modifying HIV protease inhibitors. *Pharm. Res.* **2004**, *21*, 1862–1866. [[CrossRef](#)]
89. Hendrikse, N.H.; Franssen, E.J.; van der Graaf, W.T.; Vaalburg, W.; de Vries, E.G. Visualization of multidrug resistance in vivo. *Eur. J. Nucl. Med.* **1999**, *26*, 283–293. [[CrossRef](#)]
90. Evers, R.; de Haas, M.; Sparidans, R.; Beijnen, J.; Wielinga, P.R.; Lankelma, J.; Borst, P. Vinblastine and sulfapyrazone export by the multidrug resistance protein MRP2 is associated with glutathione export. *Br. J. Cancer* **2000**, *83*, 375–383. [[CrossRef](#)]
91. Chu, X.Y.; Suzuki, H.; Ueda, K.; Kato, Y.; Akiyama, S.; Sugiyama, Y. Active efflux of CPT-11 and its metabolites in human KB-derived cell lines. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1999**, *288*, 735–741. [[PubMed](#)]
92. Hirohashi, T.; Suzuki, H.; Sugiyama, Y. Characterization of the transport properties of cloned rat multidrug resistance-associated protein 3 (MRP3). *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 15181–15185. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
93. Kemper, E.M.; van Zandbergen, A.E.; Cleypool, C.; Mos, H.A.; Boogerd, W.; Beijnen, J.H.; van Tellingen, O. Increased penetration of paclitaxel into the brain by inhibition of P-Glycoprotein. *Clin. Cancer Res.* **2003**, *9*, 2849–2855. [[PubMed](#)]
94. Kemper, E.M.; Verheij, M.; Boogerd, W.; Beijnen, J.H.; van Tellingen, O. Improved penetration of docetaxel into the brain by co-administration of inhibitors of P-glycoprotein. *Eur. J. Cancer* **2004**, *40*, 1269–1274. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
95. O'Brien, F.E.; O'Connor, R.M.; Clarke, G.; Dinan, T.G.; Griffin, B.T.; Cryan, J.F. P-glycoprotein inhibition increases the brain distribution and antidepressant-like activity of escitalopram in rodents. *Neuropsychopharmacology* **2013**, *38*, 2209–2219. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

96. Ejsing, T.B.; Linnet, K. Influence of P-glycoprotein inhibition on the distribution of the tricyclic antidepressant nortriptyline over the blood-brain barrier. *Hum. Psychopharmacol.* **2005**, *20*, 149–153. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
97. O'Brien, F.E.; Clarke, G.; Fitzgerald, P.; Dinan, T.G.; Griffin, B.T.; Cryan, J.F. Inhibition of P-glycoprotein enhances transport of imipramine across the blood-brain barrier: Microdialysis studies in conscious freely moving rats. *Br. J. Pharmacol.* **2012**, *166*, 1333–1343. [[CrossRef](#)]
98. Sadiq, M.W.; Uchida, Y.; Hoshi, Y.; Tachikawa, M.; Terasaki, T.; Hammarlund-Udenaes, M. Validation of a P-Glycoprotein (P-gp) Humanized Mouse Model by Integrating Selective Absolute Quantification of Human MDR1, Mouse Mdr1a and Mdr1b Protein Expressions with In Vivo Functional Analysis for Blood-Brain Barrier Transport. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0118638. [[CrossRef](#)]
99. Kemper, E.M.; Cleypool, C.; Boogerd, W.; Beijnen, J.H.; van Tellingen, O. The influence of the P-glycoprotein inhibitor zosuquidar trihydrochloride (LY335979) on the brain penetration of paclitaxel in mice. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **2004**, *53*, 173–178. [[CrossRef](#)]
100. Dai, H.; Marbach, P.; Lemaire, M.; Hayes, M.; Elmquist, W.F. Distribution of STI-571 to the brain is limited by P-glycoprotein-mediated efflux. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2003**, *304*, 1085–1092. [[CrossRef](#)]
101. Tang, S.C.; Lagas, J.S.; Lankheet, N.A.; Poller, B.; Hillebrand, M.J.; Rosing, H.; Beijnen, J.H.; Schinkel, A.H. Brain accumulation of sunitinib is restricted by P-glycoprotein (ABCB1) and breast cancer resistance protein (ABCG2) and can be enhanced by oral elacridar and sunitinib coadministration. *Int. J. Cancer* **2012**, *130*, 223–233. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
102. Tang, S.C.; Lankheet, N.A.; Poller, B.; Wagenaar, E.; Beijnen, J.H.; Schinkel, A.H. P-glycoprotein (ABCB1) and breast cancer resistance protein (ABCG2) restrict brain accumulation of the active sunitinib metabolite N-desethyl sunitinib. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2012**, *341*, 164–173. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
103. Karbownik, A.; Sobanska, K.; Plotek, W.; Grabowski, T.; Klupczynska, A.; Plewa, S.; Grzeskowiak, E.; Szalek, E. The influence of the coadministration of the p-glycoprotein modulator elacridar on the pharmacokinetics of lapatinib and its distribution in the brain and cerebrospinal fluid. *Investig. New Drugs* **2020**, *38*, 574–583. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
104. Durmus, S.; Sparidans, R.W.; Wagenaar, E.; Beijnen, J.H.; Schinkel, A.H. Oral availability and brain penetration of the B-RAFV600E inhibitor vemurafenib can be enhanced by the P-GLYCOprotein (ABCB1) and breast cancer resistance protein (ABCG2) inhibitor elacridar. *Mol. Pharm.* **2012**, *9*, 3236–3245. [[CrossRef](#)]
105. Tang, S.C.; Nguyen, L.N.; Sparidans, R.W.; Wagenaar, E.; Beijnen, J.H.; Schinkel, A.H. Increased oral availability and brain accumulation of the ALK inhibitor crizotinib by coadministration of the P-glycoprotein (ABCB1) and breast cancer resistance protein (ABCG2) inhibitor elacridar. *Int. J. Cancer* **2014**, *134*, 1484–1494. [[CrossRef](#)]
106. Agarwal, S.; Sane, R.; Gallardo, J.L.; Ohlfest, J.R.; Elmquist, W.F. Distribution of gefitinib to the brain is limited by P-glycoprotein (ABCB1) and breast cancer resistance protein (ABCG2)-mediated active efflux. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2010**, *334*, 147–155. [[CrossRef](#)]
107. Drion, N.; Lemaire, M.; Lefauconnier, J.M.; Scherrmann, J.M. Role of P-glycoprotein in the blood-brain transport of colchicine and vinblastine. *J. Neurochem.* **1996**, *67*, 1688–1693. [[CrossRef](#)]
108. Israel, E.J.; Taylor, S.; Wu, Z.; Mizoguchi, E.; Blumberg, R.S.; Bhan, A.; Simister, N.E. Expression of the neonatal Fc receptor, FcRn, on human intestinal epithelial cells. *Immunology* **1997**, *92*, 69–74. [[CrossRef](#)]
109. Antohe, F.; Radulescu, L.; Gafencu, A.; Ghetie, V.; Simionescu, M. Expression of functionally active FcRn and the differentiated bidirectional transport of IgG in human placental endothelial cells. *Hum. Immunol.* **2001**, *62*, 93–105. [[CrossRef](#)]
110. Leach, J.L.; Sedmak, D.D.; Osborne, J.M.; Rahill, B.; Lairmore, M.D.; Anderson, C.L. Isolation from human placenta of the IgG transporter, FcRn, and localization to the syncytiotrophoblast: Implications for maternal-fetal antibody transport. *J. Immunol.* **1996**, *157*, 3317–3322.
111. Roopenian, D.C.; Akilesh, S. FcRn: The neonatal Fc receptor comes of age. *Nat. Rev. Immunol.* **2007**, *7*, 715–725. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
112. Schlachetzki, F.; Zhu, C.; Pardridge, W.M. Expression of the neonatal Fc receptor (FcRn) at the blood-brain barrier. *J. Neurochem.* **2002**, *81*, 203–206. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
113. Cooper, P.R.; Ciabrone, G.J.; Kliwinski, C.M.; Maze, E.; Johnson, L.; Li, Q.; Feng, Y.; Hornby, P.J. Efflux of monoclonal antibodies from rat brain by neonatal Fc receptor, FcRn. *Brain Res.* **2013**, *1534*, 13–21. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
114. Ober, R.J.; Martinez, C.; Vaccaro, C.; Zhou, J.; Ward, E.S. Visualizing the site and dynamics of IgG salvage by the MHC class I-related receptor, FcRn. *J. Immunol.* **2004**, *172*, 2021–2029. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
115. Chen, Y.; Liu, L. Modern methods for delivery of drugs across the blood-brain barrier. *Adv. Drug. Deliv. Rev.* **2012**, *64*, 640–665. [[CrossRef](#)]
116. Rubenstein, J.L.; Fridlyand, J.; Abrey, L.; Shen, A.; Karch, J.; Wang, E.; Issa, S.; Damon, L.; Prados, M.; McDermott, M.; et al. Phase I study of intraventricular administration of rituximab in patients with recurrent CNS and intraocular lymphoma. *J. Clin. Oncol.* **2007**, *25*, 1350–1356. [[CrossRef](#)]
117. Zylber-Katz, E.; Gomori, J.M.; Schwartz, A.; Lossos, A.; Bokstein, F.; Siegal, T. Pharmacokinetics of methotrexate in cerebrospinal fluid and serum after osmotic blood-brain barrier disruption in patients with brain lymphoma. *Clin. Pharmacol. Ther.* **2000**, *67*, 631–641. [[CrossRef](#)]
118. Morikawa, N.; Mori, T.; Abe, T.; Kawashima, H.; Takeyama, M.; Hori, S. Pharmacokinetics of etoposide and carboplatin in cerebrospinal fluid and plasma during hyperosmotic disruption of the blood brain barrier and intraarterial combination chemotherapy. *Biol. Pharm. Bull.* **1999**, *22*, 428–431. [[CrossRef](#)]
119. Brightman, M.W.; Hori, M.; Rapoport, S.I.; Reese, T.S.; Westergaard, E. Osmotic opening of tight junctions in cerebral endothelium. *J. Comp. Neurol.* **1973**, *152*, 317–325. [[CrossRef](#)]

120. Knuutinen, O.; Kuitunen, H.; Alahuhta, S.; Isokangas, J.M.; Sonkajarvi, E.; Turpeenniemi-Hujanen, T.; Kuitinen, O. Case Report: Chemotherapy in Conjunction With Blood-Brain Barrier Disruption for a Patient With Germ Cell Tumor With Multiple Brain Metastases. *Clin. Genitourin. Cancer* **2018**, *16*, e993–e996. [[CrossRef](#)]
121. Fortin, D.; Gendron, C.; Boudrias, M.; Garant, M.P. Enhanced chemotherapy delivery by intraarterial infusion and blood-brain barrier disruption in the treatment of cerebral metastasis. *Cancer* **2007**, *109*, 751–760. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
122. Haluska, M.; Anthony, M.L. Osmotic blood-brain barrier modification for the treatment of malignant brain tumors. *Clin. J. Oncol. Nurs.* **2004**, *8*, 263–267. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
123. Chen, C.H.; Toung, T.J.; Sapirstein, A.; Bhardwaj, A. Effect of duration of osmotherapy on blood-brain barrier disruption and regional cerebral edema after experimental stroke. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **2006**, *26*, 951–958. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
124. Zeng, Y.D.; Liao, H.; Qin, T.; Zhang, L.; Wei, W.D.; Liang, J.Z.; Xu, F.; Dinglin, X.X.; Ma, S.X.; Chen, L.K. Blood-brain barrier permeability of gefitinib in patients with brain metastases from non-small-cell lung cancer before and during whole brain radiation therapy. *Oncotarget* **2015**, *6*, 8366–8376. [[CrossRef](#)]
125. Pollack, I.F.; Stewart, C.F.; Kocak, M.; Poussaint, T.Y.; Broniscer, A.; Banerjee, A.; Douglas, J.G.; Kun, L.E.; Boyett, J.M.; Geyer, J.R. A phase II study of gefitinib and irradiation in children with newly diagnosed brainstem gliomas: A report from the Pediatric Brain Tumor Consortium. *Neuro. Oncol.* **2011**, *13*, 290–297. [[CrossRef](#)]
126. Yang, F.Y.; Lin, G.L.; Horng, S.C.; Chang, T.K.; Wu, S.Y.; Wong, T.T.; Wang, H.E. Pulsed high-intensity focused ultrasound enhances the relative permeability of the blood-tumor barrier in a glioma-bearing rat model. *IEEE Trans. Ultrason. Ferroelectr. Freq. Control* **2011**, *58*, 964–970. [[CrossRef](#)]
127. Liu, X.F.; Fawcett, J.R.; Thorne, R.G.; DeFor, T.A.; Frey, W.H. 2nd, Intranasal administration of insulin-like growth factor-I bypasses the blood-brain barrier and protects against focal cerebral ischemic damage. *J. Neurol. Sci.* **2001**, *187*, 91–97. [[CrossRef](#)]
128. Nguyen, T.T.; Angeli, E.; Darrouzain, F.; Nguyen, Q.T.; Desvignes, C.; Rigal, M.; Nevine, O.; Nicolas, P.; Le, Q.V.; Winterman, S.; et al. A successful compartmental approach for the treatment of breast cancer brain metastases. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **2019**, *83*, 573–580. [[CrossRef](#)]
129. Bousquet, G.; Darrouzain, F.; de Bazelaire, C.; Ternant, D.; Barranger, E.; Winterman, S.; Madelaine-Chambin, I.; Thiebaut, J.B.; Polivka, M.; Paintaud, G.; et al. Intrathecal Trastuzumab Halts Progression of CNS Metastases in Breast Cancer. *J. Clin. Oncol.* **2016**, *34*, e151–e155. [[CrossRef](#)]
130. Hosoda, T.; Katayama, M. Epidemiology and prognosis of ommaya reservoir-related bacterial meningitis in adult patients with leptomeningeal metastases from solid tumors: A 10-year retrospective single-center study in Japan. *J. Infect. Chemother.* **2020**. [[CrossRef](#)]
131. Bousquet, G.; Janin, A. Patient-Derived Xenograft: An Adjuvant Technology for the Treatment of Metastatic Disease. *Pathobiology* **2016**, *83*, 170–176. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

PROM2 overexpression is associated with metastatic potential linked to EMT phenotype and ferroptosis resistance in human melanoma

Justine Paris¹, Guillaume Gapihan¹, Claire Wilhelm^{3,4}, Aurore Van De Walle^{3,4}, Anh Tuan Phan^{5,6}, Kah Wai Lim⁵, Van Nhan Tran⁵, Geraldine Falgarone^{1,2,7}, Celeste Lebbé, Clara Allayous, Maxime Battistella, Anne Janin¹, Christophe Leboeuf^{1,&}, Guilhem Bousquet^{1,2,7,&,#}

¹ Université Paris Cité, INSERM, UMR_S942 MASCOT, 75006 Paris, France

² APHP, Hôpital Avicenne, Oncologie médical, 93000 Bobigny, France

³ Laboratoire Physico Chimie Curie, Institut Curie, CNRS, PSL Research University, 75005 Paris, France

⁴ Laboratoire Matière et Systèmes Complexes (MSC), UMR 7057, CNRS, University of Paris, 75205 Paris, France

⁵ School of Physical and Mathematical Sciences, Nanyang Technological University, 637371, Singapore

⁶ NTU Institute of Structural Biology, Nanyang Technological University, 636921, Singapore

⁷ Université Sorbonne Paris Nord, 93430 Villetaneuse, France

& This authors are co-senior authors

Correspondance: Guilhem Bousquet, INSERM U942, Universités de Paris et Sorbonne Paris Nord, SMBH, Rue de Chablis, 93000 Bobigny, France ; Email : guilhem.bousquet@aphp.fr

Abstract

Despite immunotherapies that improved patient's prognosis in human metastatic melanoma, almost 50% patient's eventually show resistance to treatment. The development of new therapeutic target is essential. Previously, we identified PROM2 in human metastatic melanoma as a biomarker predictive for distant metastases associated with decreased survival. We aimed to validate PROM2 as a biotarget for human metastatic melanoma. We showed that PROM2 overexpression was linked *in vitro* and *in vivo* to an increased metastatic potential through the increase of EMT marker expression and ferroptosis resistance. Using oligonucleotide anti-sense targeting PROM2, we showed that we can downregulate PROM2 expression leading to a decreased invasion and migration potential. Our results open the way for further studies to validate the treatment of human metastatic melanoma using PROM2 as a bio-target.

Introduction

Melanoma incidence is constantly increasing since 1982 mainly due to an excessive sun exposure [1]. At a metastatic stage, immunotherapies such as ipilimumab, nivolumab and pembrolizumab have transformed patient's prognosis [2-6]. However, approximately 50% patients remain insensitive to targeted treatments or will develop an acquired resistance [7]. Therefore, it appears necessary to identify new targets for therapeutic purpose.

In a series of 101 melanoma lymph node metastases, using transcriptomic analyses on laser-microdissected melanoma cells, we identified prominin-2 (PROM2) as a biomarker predictive for distant metastases and decreased survival, and thus as a promising bio-target [8].

PROM2 is a 112 kDa glycoprotein composed of five transmembrane segments and two large glycosylated extracellular loops [9]. PROM2 is a paralogue of PROM1 (CD133), with only 32% of amino acids identity. Both are cholesterol-binding proteins and are physiologically associated with plasma membrane protrusions. In human, *PROM2* mRNA is physiologically expressed in various normal tissues but its expression is restricted to epithelial cells [10]. PROM2 is distributed in a non-polarized way between the apical and basolateral plasma membranes. However, its expression is higher in cilia, microvilli and other acetylated tubulin-positive protruding structures [10]. In addition, PROM2 is involved in the regulation of caveolar endocytosis, and its overexpression leads to significant changes in plasma membrane organization and function including increase of protrusions, and thus of invasive potential [11, 12].

Physiologically, PROM2 was also described as a ferroptosis inhibitor. Ferroptosis is a regulated cell death characterized by iron-dependent accumulation of lethal lipid reactive oxygen species [13]. Typically, cell detachment from the extracellular matrix is a ferroptotic stimuli. However, under physiological or pathological conditions, detached cells can express pro-survival factors,

including PROM2 which enables the formation of ferritin-containing multivesicular bodies, themselves responsible for iron transport out of the cell, thus inhibiting ferroptosis [14].

In this study, we intended to elucidate the biological roles of PROM2 in melanoma metastatic process.

Materials and methods

Melanoma cell lines

Human melanoma A375 cell line was purchased from Sigma Aldrich (Merck, Germany) and Sk-Mel-28 cell line was purchased from American Type Culture Collection (ATCC, USA). Cell lines were cultured in a humidified atmosphere containing 5% CO₂ at 37 °C. Cells were grown in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) with high glucose (Gibco) supplemented with 1% penicillin/streptomycin (Sigma Aldrich) and 10% horse serum (Gibco).

Modulation of *PROM2* in melanoma cell lines

For *PROM2* overexpression, 4.10⁵ A375 or Sk-Mel-28 cells were seeded into 6-well plates to reach 70% confluence. The following day, cells were transfected with human prominin 2 activation kit by crispra (Origene) using Lipofectamine 3000 (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. After one week, a limit dilution was performed to obtain five clones. *PROM2* over-expression was then confirmed using RT-qPCR and immunofluorescence. A375 and Sk-Mel-28 cells over-expressing *PROM2* were named A375 *PROM2* and Sk-Mel-28 *PROM2* respectively.

For knock-out, 4.10⁵ A375 or Sk-Mel-28 cells were seeded into 6 well plates to reach 70% confluence. The following day, cells were transfected with prominin 2 human gene knockout kit by crispr (Origene) using Lipofectamine 3000 (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. After 48h, knock-out cells were selected using an increasing dose of puromycin to kill all not transfected cells. A limit dilution was then performed to obtain six clones. *PROM2* underexpression was confirmed using RT-qPCR and immunofluorescence. *PROM2* knock-out cells were named A375 KO and Sk-Mel-28 KO.

Gene expression quantification

For cell lines, total RNA was extracted from 10⁶ cells using RNeasy-Mini-Kit (Qiagen, France) and quantified on NanoDrop (LabTech, France). For tumor xenografts, total RNA was extracted

from 20 frozen sections of 5µm. Total RNA was extracted using RNeasy-Mini-Kit (Qiagen, France) and quantified on NanoDrop (LabTech, France). Human *PROM2* gene expression was assessed using the human *PROM2* primer Hs00376331_m1 (Thermofisher). Epithelial to mesenchymal transition (EMT) gene expression was assessed using human *ZEB1* (Hs00232783_m1), *ZEB2* (Hs00207691_m1), *SNAI1* (Hs00195591_m1), *SNAI2* (Hs00950344_m1), *TWIST1* (Hs01675818_s1), *TWIST2* (Hs02379973_s1), *CDH1* (Hs01023894_m1) and *VIM* (Hs00185584_m1) primers (Thermofisher). Human *CAVI* gene expression was assessed using the human *CAVI* primer Hs00971716_m1 (Thermofisher). Total RNA was reverse-transcribed (cDNA) before qPCR amplification using random primers with GoScriptTM Reverse Transcriptase (Promega, France). The qPCR reactions were performed using fluorescent probes on a CFX96 Real Time System (Bio-Rad). A blank sample (no cDNA) was included and the experiments were performed in triplicate for each gene. The housekeeping genes *TBP* (Hs00427620_m1) and *GAPDH* (Hs02758991_g1) were used to normalize gene expression results. Each RT-qPCR assay was performed according to the MIQE guidelines [15] and conducted in triplicate.

Droplet digital PCR assay

For each sample, 7 µm-thick tissue sections were laser-microdissected to select a minimum of 300 tumor cells for a minimum surface area of 0.043 mm², using a PALM-Microbeam/Zeiss-system (Carl Zeiss, Germany).

The Droplet Digital Polymerase Chain Reaction (ddPCR) was performed using the QX100 ddPCR workflow system (Biorad, Hercules, USA). The mix contained 20ng of genomic RNA, 10µL of One-Step RT-ddPCR kit for Probes (Bio Rad), 1µL of EMT probes (either *ZEB1*, *SNAI1* or *TWIST1*) and 1µL of *GAPDH* probes per well, and the final volume for the reaction was 20µL. Droplets were generated by a QX200 Droplet Generator (Biorad). PCR was carried out on the CFX96 Real Time System (Bio Rad). PCR was performed with an initial denaturing

step at 95°C for 10mn, followed by 40 cycles of denaturing (94°C for 30s), and annealing (60°C for 1mn). A post-amplification melting curve program was initiated by heating to 98°C for 10mn and then cooling down to 12°C. Each PCR run included a no-template control. The results of ddPCR were generated using QX100 Droplet Reader (Biorad) and analysed using QuantaSoft software (Biorad). The ratio of EMT markers-positive droplets to GAPDH-positive droplets was calculated.

Immunofluorescence

Cell lines were grown separately on culture slides (BD Falcon™). Then, a double indirect immunofluorescence method was performed using anti-human PROM2 monoclonal antibody (Clone 13A9, 1/50, Origene, USA) as primary antibody. Stainings were performed with Tyramide detection kit 488CF (Biotium, USA), fluorescent mounting medium with DAPI was used for nucleus detection (E19-18, GBI labs, USA). Fluorescence staining was observed at 400x magnification on a Provis AX70 microscope (Olympus, Tokyo).

Immunostaining

An indirect immunoperoxidase method was performed on 5µm-thick tissue sections using anti-human PROM2 monoclonal antibody (Clone 13A9, 1/50, Origene, USA), anti-ZEB1 antibody (ab203829, 1/100, Abcam, UK), anti-SNAIL+SLUG antibody (ab180714, 1/100, Abcam, UK) as primary antibodies.

For PROM2 stainings, the antibody was directly biotinilated using Mix-n-stain Biotin Antibody Labelling Kit (MXBIOS20, Merck, Germany). For ZEB1 and SNAIL+SLUG stainings, the primary antibodies were coupled with anti-rabbit OmniMap detection kit (Roche diagnostic, Meylan, France). The systematic controls used were absence of primary antibody and use of an irrelevant primary antibody of the same isotype.

For PROM2 stainings, each sample was given a score by multiplying the stain intensity grade (0 = no staining, 1 = low intensity, 2 = medium intensity, 3 = strong intensity) by the numerical

code for the percentage of positive cells (0 = 0%, 1 = under 10%, 2 = 10–50%, 3 = 51–80%, 4 = over 81%). Results were expressed as mean \pm standard error of the mean (SEM).

For all tissue sections for ZEB1 and SNAIL+SLUG stainings, antibodies expressing cells were counted on five different fields at x200 magnification. A Provis AX70 microscope (Olympus, Tokyo) with wide-field eyepiece number 26.5 was used, providing a field size of 0.344mm² of tumor cells. Results were expressed as mean \pm standard error of the mean (SEM).

***In vitro* cells proliferation assay**

For each cell lines, transfected or not, 6000 cells were seeded in 96-well plates. Three wells of each cell line were counted each day on KOVA slide for 5 days.

***In vitro* cells migration and invasion assay**

Cell migration assessments were performed using Boyden chambers on 12-well plates, with cell culture insert of 10.3 mm diameter and membrane pores of 8 μ m size (Becton Dickinson, France). For invasion assays, we used Boyden chambers coated with Matrigel (Falcon, MA, USA). Migration and invasion were assessed on each cell line, transfected or not. For each experiment, 3.10⁴ cells were seeded in the upper chamber in medium without horse serum and lower chambers were filled with high glucose DMEM medium supplemented with 10% horse serum at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere.

After 24, 48 and 72 hours of incubation, cells on the upper face were removed and cells on the lower face of the filter were fixed, stained with crystal violet (Sigma Aldrich, USA), and counted. Ten fields were analysed on each filter, and results were expressed as mean \pm SEM. Each procedure was performed in triplicate.

***In vitro* spheroids invasion assay**

Spheroids of the three cell lines were generated in agarose microwells with a diameter and depth of 200 μ m. Microwells were fabricated directly within each well of a 96-wells multiplate by pouring 50 μ L of hot 2% agarose (Sigma) and then placing a 3D printed stamp that has 50 pillars

of 200µm diameter and height. Agarose solidifies within less than 5 minutes, at room temperature, the stamp is then pulled out of the well, with fabricated agarose microwells within. Cells were centrifuged into the 200 µm agarose microwells at a density of 200 cells per well. For all three cell lines, it resulted into spheroids formation after 1 day, that grows over the next days. The three cell lines showed same rate of spheroids growth.

For the invasion assay, 50 µL per well of 2 mg/mL cold collagen (Corning) was poured on the formed spheroids pattern, then placed at 37°C for gelation. 100µl of complete medium was then added to the well. Images of spheroids invasion were taken 24 hours and 48 hours later. Invasion area was quantified by image analysis.

Western Blot for protein quantification

Analyses were performed on PROM2 native, overexpressing and knock-out cell lines, and tumors from the five patients-derived melanoma xenografts. Total proteins were extracted from the 20 sections of 5 µm of frozen tumor samples using RIPA lysis buffer (Thermo Scientist, USA) containing anti-proteases and anti-phosphatases (Sigma-Aldrich, St Louis, USA). Protein concentration was measured by spectrophotometry using Pierce BCA Protein Assay Kit (Biorad, Hercules, USA). Sample were diluted in distillate water and loading buffer to reach 30 µg, then heated at 95°C during 10 minutes for protein denaturation. Proteins were separated by electrophoresis on SDS-page with 10% polyacrylamide gel (Biorad, Hercules, USA), transferred to a nitrocellulose membrane (0.45 µm) and stained with ponceau red. Non-specific sites of the membranes were saturated with TBST containing 5% of milk. Membranes were then incubated overnight at 4°C with either of the following primary antibodies: PROM2 (1/5000, NBP-38032, Novus Bio), ZEB1 (1/500, ab203829, Abcam), SNAI/SLUG (1/1000, ab85936, Abcam), TSG100 (1/1000, SAB5700757, Sigma-Aldrich), 4HNE (1/800, ab46545, Abcam) and GAPDH (1/2500, ab9485, Abcam) antibody. Membranes were then incubated 1h at room temperature with rabbit anti-human IgG coupled with peroxidase (1/20000, A16023,

Invitrogen). Peroxidase activity was subsequently revealed with ECL (Biorad, Hercules, USA). GAPDH was taken as a charge control. Chemiluminescence was detected using ChemiDoc (Biorad) and measured using Image Lab.

Melanoma patients-derived xenograft

Females, aged five to eight weeks, nu/nu athymic mice of NMRI (R. Janvier, France) background were used as xenograft recipients for human melanoma tumors. The mice were bred in the Animal facility, Université Paris 13, Bobigny, France. All the mouse experiments reported in this study were approved by the Animal Housing and Experiment Board of the French government.

For the initial xenograft, 5 mm³ human tumor fragments were grafted sub-cutaneously in 5 to 10 mice under xylasin (10 mg/kg body weight) and ketamin anaesthesia (100 mg/kg body weight). For each further passage, 10 mm³ fragments were xenografted into five mice.

A clinical score was assessed daily and tumor growth measured in two perpendicular diameters with a calliper. Tumor volume was calculated as $V = L \times l^2/2$, L being the largest diameter (length), l the smallest (width) [16, 17]. Mice were euthanized when the tumors approached 1500 mm³.

For each mouse, the tumors, as well as the different organs, were systematically analysed. Tumors were dissected and cut into three parts: one part was immediately snap-frozen in liquid nitrogen, one part was formalin-fixed and paraffin-embedded, and a third part was used for the new passage.

Metastatic models of melanoma cell lines

Mice were intravenously injected with either A375, A375 PROM2, Sk-Mel-28 or Sk-Mel-28 PROM2 5x10⁶ cells in 100 µL of NaCl. A clinical score was assessed daily and mice were euthanized at 8 weeks. For each mouse, assessment of metastatic extension in each organ was

performed 2 μm slides on hematoxylin-eosin stained paraffin-embedded tissue sections. The surface area of lung tumoral surface was quantified in each mouse.

Sub-cutaneous xenograft using melanoma cell lines

Mice were grafted sub-cutaneously with either A375, A375 PROM2, Sk-Mel-28 or Sk-Mel-28 PROM2 5×10^6 cells in 50 μL of matrigel under 2.5% isoflurane anaesthesia. A clinical score was assessed daily and tumor growth measured 3 times a week. Mice were euthanized when the tumors approached 1500 mm^3 . For each mouse, the tumors, as well as the different organs, were systematically analysed.

Ferrous iron quantification

For each cell lines, 4.10^6 A375 or Sk-Mel-28 cells were seeded into 6-well plates. Cells were treated with RSL3, errastin and deferoxamine (DFO) during 24 hours. Then, ferrous iron was quantified using an Iron Assay Kit (Sigma Aldrich, USA) according to manufacturer instruction.

Ferrous iron detection in spheroids

Spheroids were formed as the same way as for the invasion assay. The spheroids were further incubated after or not Erastin treatment at 37°C for one hour with FerroOrange solution (BioTracker™ FerroOrange, Millipore) at a concentration of $2\mu\text{M}$, and after washed twice with HBSS buffer to remove any extracellular Fe^{2+} . After this staining incubation, the spheroids were washed twice with HBSS, and were observed with fluorescence (542 nm / 572 nm).

Cell viability assay

For cell viability assessment, A375 or Sk-Mel-28 cell lines were seeded separately in 96-well tissue culture plates at a density of 5000 cells per well. After 24 h of incubation, the cells were exposed to increasing concentration of RSL3 or errastin for 24 additional hours. Cell viability was determined by the colorimetric conversion of yellow, water-soluble tetrazolium MTT (3-[4, 5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazolium-bromide; Sigma), to purple, water-

insoluble formazan. After incubation for 2 h at 37 °C with 0.4 mg/ml of MTT, the absorbance was measured at 560 nm using a microplate reader (Thermofisher, France). Experiments were performed in triplicate, untreated cells being used as positive controls and medium without cells as a negative control.

***In vivo* enrichment loop of PROM2**

We injected intravenously 5 mice with 5×10^6 A375 PROM2 cells in 100 μ L of NaCl. A clinical score was assessed daily and a follow-up ultrasound was performed weekly. Mice were euthanized at 6 weeks. These mice will correspond to passage 0. At euthanasia, we recovered separately the metastases from different sites. These metastases were dissociated, filtered on a 70 μ m filter and cultured in A375 cell line medium. PROM2 mRNA expression from the different metastatic sites was assessed by Q-RT-PCR. The cells from metastases with the two higher PROM2 mRNA expression were each reinjected intravenously into 5 new mice with 5×10^6 cells. These mice will correspond to passage 1. This pattern was then reproduced till passage 3. For each mouse, assessment of metastatic extension in each organ was performed 2 μ m slides on hematoxylin-eosin stained paraffin-embedded tissue sections. The surface area of lung tumoral surface was quantified in each mouse.

Statistical analysis

Results

PROM2 expression level has no impact on melanoma proliferation

To model in mice the effects of PROM2 expression observed in patients with metastatic melanoma [8], we used two different types of murine models: i) xenografts obtained from two melanoma cell lines, A375 or Sk-Mel-28, with various PROM2 expression levels; ii) five patient-derived xenografts obtained from metastatic melanoma, namely XM1 to XM5.

For the two cell lines transfected with plasmids activating *PROM2* promoter, we selected the two clones that overexpressed *PROM2* the most. For the KO cell lines, we selected the two clones that expressed *PROM2* the least. For each melanoma cell line, *PROM2* mRNA expression gradually increased significantly from the KO clone to the native cell line and then to the overexpressed clone (Figure 1A, Supplementary Figure 1A). At protein level, immunofluorescence staining for PROM2 also gradually increased (Figure 1B, Supplementary Figure 1B). For each cell line, PROM2 expression level did not influence cell proliferation neither *in vitro* nor *in vivo* after sub-cutaneous grafting (Figure 1C, Supplementary 1C).

We also determined *PROM2* expression at mRNA and protein levels in the five patient-derived melanoma xenografts, with two models, XM1 and XM2, having a significant higher expression compared to the others. However, when we looked at the proliferation rate after tumor grafting, there was no correlation with *PROM2* mRNA expression (Figure 1D).

PROM2 overexpression is associated with an EMT phenotype *in vitro*

We first assessed migration and invasion effects of *PROM2* expression level modulation *in vitro*, using the three clones for each cell line A375 and Sk-Mel-28. After 24h, 48h and 72h, cell invasion and cell migration gradually increased between A375 KO, A375 and A375 PROM2 (Figure 2A and 2B). Similar results were obtained with Sk-Mel-28 cell line (Supplementary Figure 2A and 2B).

We then wondered whether this increase of invasive and migrating phenotypes linked to *PROM2* overexpression was also associated with an epithelial to mesenchymal transition phenotype. For A375 cell line, we showed a gradual significant decrease in *CDH1* mRNA expression (e-cadherin epithelial marker) while *VIM* mRNA expression (vimentin mesenchymal marker) significantly increased gradually from A375 KO to A375 and to A375 *PROM2*. In addition, *PROM2* overexpression significantly increased mRNA expression of all six EMT markers *ZEB1*, *ZEB2*, *SNAIL*, *SLUG*, *TWIST1*, *TWIST2* (Figure 2C).

At protein level, using western blot for *ZEB1* and *SNAIL/SLUG* markers, we obtained concordant results to those obtain at mRNA level (Figure 2D).

A similar pattern was observed for the other cell line Sk-Mel-28 (Supplementary Figure 2C and 2D).

We also assessed the migration potential of spheroids from melanoma cell line. The three clones of A375 cells lines were seeded in micro-wells to form spheroids. At day 3, collagen was added to help spheroids to migrate and on day 5, the migration area of cells was assessed. We observed that the migration area of A375 *PROM2* cell line was higher than in A375 and A375 KO cell lines (Figure 2E).

***PROM2* overexpression in cells is associated with an increased metastatic potential *in vivo*, linked to an EMT phenotype**

Mice xenografted sub-cutaneously with melanoma cell lines were euthanized on average 40 days after grafting due to the size of the tumor. At this stage of development, there was no distant metastasis with any of the grafted clones.

Using A375 cell line, $5 \cdot 10^6$ cells injected intravenously in nude mice induced limited numbers of lung metastases eight weeks after injection. In contrast, *PROM2* overexpression (A375 *PROM2* clone) dramatically increased the metastatic potential of A375 melanoma cell line with massive lung and pleural metastases, but also heart and muscle metastases (Supplementary

Figure 3A). The mean surface area of lung and pleural metastases was of $58 \pm 9\%$ for mice injected with A375 PROM2 cell line compared to $4 \pm 3\%$ ($P < 0.01$) for A375 native cell line (Figure 3A). Similar results were found for mice injected with Sk-Mel-28 and Sk-Mel-28 PROM2 cell lines (Supplementary Figure 3B).

We again wondered whether this increased metastatic phenotype was associated with an EMT phenotype. We first assessed EMT marker mRNA expression in subcutaneous xenografts and found similar results to those obtained *in vitro*, both for A375 and Sk-Mel-28 cell lines (Supplementary Figure 3C and 3D). In mice injected intravenously with melanoma cell lines, we then assessed EMT marker mRNA expression in laser-microdissected lung metastases (Figure 3B), and found significant higher levels with A375 PROM2 compared to A375 native cell line. EMT expression was also much higher in lung metastases derived from A375 PROM2 clone compared to subcutaneous tumors obtained with the same clone (Figure 3B).

In the five patient-derived melanoma xenografts, we systematically analysed all organs and showed an increase in numbers of metastases in XM1 and XM2 compared to the three other models, in accordance with *PROM2* expression levels (Figure 3C). Since the median dCq for *PROM2* mRNA expression in subcutaneous tumor xenografts was 12, we used it as a cut-off value ($< 12 =$ Low expression, PROM2-; $\geq 12 =$ High expression, PROM2+). Overall, we found a significant difference between the two groups for *PROM2* mRNA expression ($P < 0.0001$). When we assessed EMT markers in these two groups, *CDH1* expression was significantly lower in PROM2+ than in PROM2- tumors ($P=0.002$) while other markers including *VIM* had a higher expression in PROM2+ tumors than in PROM2- tumors ($P=0.002$) (Figure 3D).

In PROM2+ tumors, using immunostainings, we also found a significantly larger number of cells expressing EMT markers ZEB1 and SNAIL/SLUG (respectively $68 \pm 5\%$ and $82 \pm 6\%$) compared to PROM2- tumors (respectively $7 \pm 6\%$ and $11 \pm 4\%$, $P < 0.01$ for both markers)

(Figure 3E). Western-blotting for ZEB1 and SNAIL/SLUG on tumors confirmed these results at protein level (Figure 3F).

PROM2 overexpression is associated with ferroptosis resistance *in vitro* and *in vivo*

Since PROM2 was reported to have a role in ferroptosis resistance in breast cancer cell lines overexpressing PROM2 [14], we hypothesize that the increase invasive potential of melanoma overexpressing PROM2 was associated with this iron cell death resistance mechanism. Under ferroptosis stimulus, ferrous iron (Fe^{2+}) amount increases in cytoplasm and lead to reactive oxygen species production, membrane lipid peroxidation and then cell death [6]. When we quantified the amount of Fe^{2+} in melanoma cells, we found that it significantly decreased from A375 KO to A375 and to A375 PROM2 (Figure 4A). When we added to cells DFO, a ferroptosis inhibitor, the amount of Fe^{2+} significantly decreased in the three cell lines ($P < 0.05$). In contrast, when we added to cells a ferroptosis activator, either RSL3 or erastin, the amount of Fe^{2+} significantly increased for A375 KO and A375 cell line ($P < 0.05$) in parallel to an increased cell death. Surprisingly, it did not vary for A375 PROM2 cell line and this was associated with an absence of cell death linked to ferroptosis resistance (Figure 4B). Using increasing concentrations of RSL3 and erastin in A375 PROM2 cells, we found that the amount of Fe^{2+} increased from a concentration of 1,5 μM for RSL3 and 20 μM for erastin and this was associated with a significant decrease in cell viability (Figure 4C). Similar results were found for Sk-Mel-28 cell lines (Supplementary Figure 4A to 4C).

We also assessed the level of Fe^{2+} in spheroids from melanoma cell line. The three clones of A375 cells lines were seeded in micro-wells to form spheroids and Fe^{2+} was quantified by FerroOrange fluorescence. We observed that Fe^{2+} significantly decreased from A375 KO to A375 and to A375 PROM2 (Figure 4D). As observed in the previous experiment, when we added erastin to the spheroids, the amount of Fe^{2+} significantly increased for A375 KO and A375 cell line and did not vary for A375 PROM2 cell line (Figure 4D).

Then, at protein level, using western blot for TSG101, a marker of microvesicular corpse helping ferrous iron to exit the cell, and 4HNE, a marker of lipid peroxidation, we showed that the amount of microvesicular corpse increased from A375 KO to A375 PROM2 while lipid peroxidation decreased (Figure 4E).

We also quantified Fe^{2+} in the five patient-derived melanoma xenografts (total of 25 tumors) and found a significant lower amount of Fe^{2+} in XM1 and XM2 compared to the three other models, in correlation with *PROM2* mRNA expression levels (Figure 4F).

Overall, there was a close link between *PROM2* expression and resistance to ferroptosis in human melanoma.

PROM2 is implicated in a pathophysiological loop

When we assessed *PROM2* expression in lung metastases derived from A375 PROM2 clone using ddPCR, strikingly, it was forty times higher than in the injected clone, as observed for EMT marker expression (Figure 5A). We thus hypothesized that metastatic process linked to *PROM2* overexpression itself led to *PROM2* regulation and increased expression, thus worsening metastatic process.

We first injected intravenously a new series of 5 nudes mice with A375 PROM2 cell line (passage 0). After 6 weeks, at the time of euthanasia, lung metastases were macrodissected and dissociated and cultured in normal medium (LM-P0). After one week of cell culture and proliferation, cells were reinjected into 5 mice (passage 1). The same enrichment pattern was done for a total of 3 passages (Figure 5B).

From passage 0 to passage 3, *PROM2* expression gradually increased in cell lines and in corresponding metastases (Figure 5C). In addition, after each new passage there was a significant increase in metastatic localization. At passage 3, using an ultrasound sonography, adrenal and articular metastases could be detected 4 weeks after intravenous injection (Figure 5D).

Since PROM2 induces caveolin-1 (CAV1) expression and phosphorylation [11, 12], which itself can increase mRNA expression of *SLUG*, *TWIST* and *VIM* [18-20], we assessed the expression of all these markers across passages in cell lines and derived metastases. In parallel with *PROM2* increased expression, we showed a gradual significant increased mRNA expression of *CAV1* and EMT markers from passage 0 to 3 (Figure 5E).

Targeting PROM2 with antisense oligonucleotide to prevent metastases

As we have confirmed by immunostaining that PROM2 is not highly expressed in human healthy tissues except for the skin (Figure 6A), we decided to develop a treatment against PROM2. We choose to develop an antisense oligonucleotide (ASO) to target intracellular PROM2 with the aim to prevent both migration and ferroptosis resistance of melanoma cells, as we need to target intracellular PROM2.

We showed that gymnotic treatment during four days of A375 PROM2 cell line with ASO targeting PROM2 drastically decreased mRNA level of PROM2, even with low quantity (Figure 6B). We then wondered the effects *in vitro* on migration and invasion of ASO treatment on A375 PROM2 cell line. Four days after treatment, migration and invasion were assessed at 24h, 48h and 72h, showing that treatment with ASO decreased both the migration and invasion of A375 PROM2 cell line (Figure 6C and 6D).

Four days after treatment of A375 PROM2 cell line, ferrous iron was also higher than in not treated cells. The amount of Fe²⁺ was even more higher with combined treatment of ASO and RSL3 or erastin (Figure 6E).

When we assessed the effect of ASO targeting PROM2 on the EMT phenotype of A375 PROM2 cell line, we also found a decreased expression of EMT markers compared to A375 PROM2 not treated cells (Figure 6F).

We wondered if these results were comparable *in vivo*. We intravenously injected 5.10⁶ of A375 PROM2 cells previously treated during four days with ASO targeting PROM2. Eight weeks

after injection, it dramatically decreased the metastatic potential of A375 PROM2 melanoma cell line (Figure 6G).

Overall, these results showed that ASO treatment decreasing PROM2 expression is enough to prevent metastasis and to restore ferroptosis sensitivity.

Discussion

In this preclinical study, we demonstrated that melanoma metastatic process is closely linked to high PROM2 expression, making PROM2 a promising bio-target. In a clinical study, using biopsy samples from 101 patients with melanoma lymph nodes metastases, we have shown that high PROM2 expression was associated with a distant metastatic risk and a shorter survival [8]. In two large series of melanoma metastatic lymph nodes, a high PROM2 expression was also found to be associated with poor survival [21-23].

PROM2 may act as an oncogene ~~or a tumor suppressor gene depending on the cancer type~~, high *PROM2* mRNA expression being associated with a shorter survival in metastatic pancreas, renal, ovarian and lung cancers [24-26]. Here, using melanoma cell lines injected intravenously in mice and patient derived melanoma xenografts, we demonstrated that the metastatic burden was closely linked to PROM2 expression through the expression of EMT markers. These are original results, since the link between PROM2 and EMT marker expression has not been reported yet. We also demonstrated that PROM2 expression was associated with ferroptosis resistance. *In vitro*, PROM2 overexpression led to ferroptosis resistance of breast cancer cell lines [14]. In our study, we showed that this association was also true *in vivo* in patient-derived melanoma xenografts which are relevant preclinical models since they reflect well tumor heterogeneity of human metastatic cancers [27].

In human metastatic melanoma, PROM2 appears to be the cornerstone of two cancer hallmarks [28-30] : metastatic processes and resistance to cell death. The combination of these two hallmarks, through an enrichment loop, contributes to worsening the metastatic burden. PROM2 is associated with caveolar endocytosis by modulating the expression of caveolin-1 [11, 12], and we demonstrated in our models that CAV1 expression is linked to PROM2 expression. Despite controversial data, and since CAV1 overexpression seems to induce EMT marker overexpression in various cancer cell lines, CAV1 could be the intermediate between

PROM2 and EMT markers in our melanoma *in vitro* and *in vivo* models. Thus, PROM2 promotes melanoma cell invasion and their migration to metastasize. Cell detachment, being itself a ferroptotic stimulus, increases PROM2 expression, thus closing this pathophysiological loop (Figure 7).

These results confirm that PROM2 is a relevant bio-target for further translational development in the treatment of patient metastatic melanoma. We believe that an antisense oligonucleotide is better suited than a therapeutic monoclonal antibody since targeting intracytoplasmic PROM2 seems crucial to prevent ferroptosis resistance. Antisense oligonucleotides are promising therapeutics largely developed this past two decades as it is less toxic and have an enhanced efficacy [31]. The major limitation of this treatment would be the extent to which antisense oligonucleotide diffuse through the cell. Nanoparticles could be used as a delivery system for *PROM2* antisense oligonucleotide as the association of nanoparticle and antisense oligonucleotide was shown to protect against degradation and to penetrate more easily into cells [32], even in challenging tumors [33].

Our findings open perspectives for further studies to validate PROM2 as a bio-target for the treatment of human metastatic melanoma.

Conflicts of Interest

The authors declare no conflict of interest.

Funding

This research received no external funding.

Author Contributions

Conception and design: G. Bousquet

Development of methodology: J. Paris, G. Bousquet

Acquisition of data: J.Paris, G.Gapihan, C. Wilhem, A. Van der Walle, AT. Phan, VN. Tran, KW. Lim, C. Leboeuf

Analyses and interpretation of data: J. Paris, G. Bousquet

Writing, review: J. Paris, G. Bousquet

Revision of the manuscript: All authors

Administrative, technical, or material support: A. Janin, C. Leboeuf, G. Bousquet

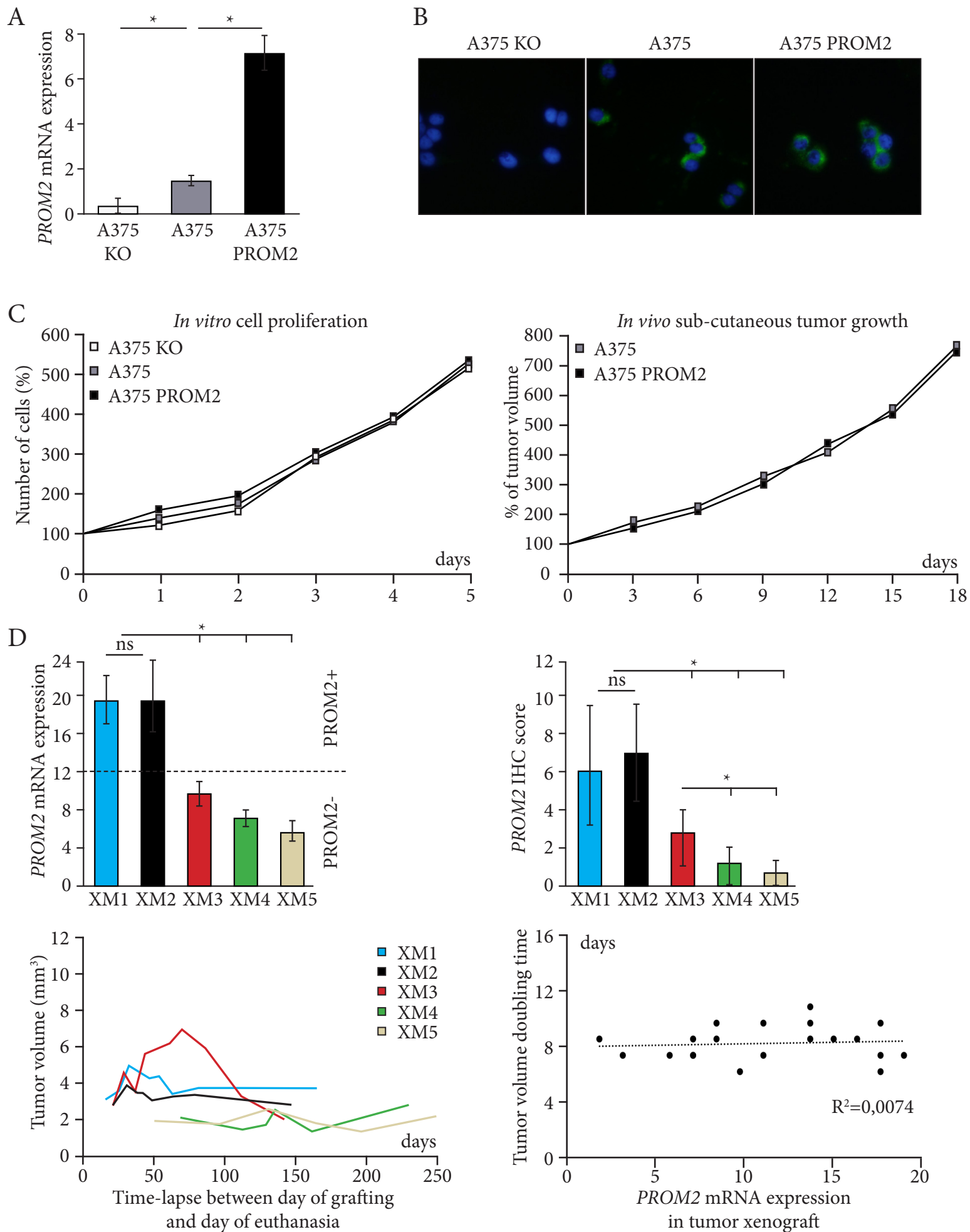
Study supervision: G. Bousquet

Acknowledgments

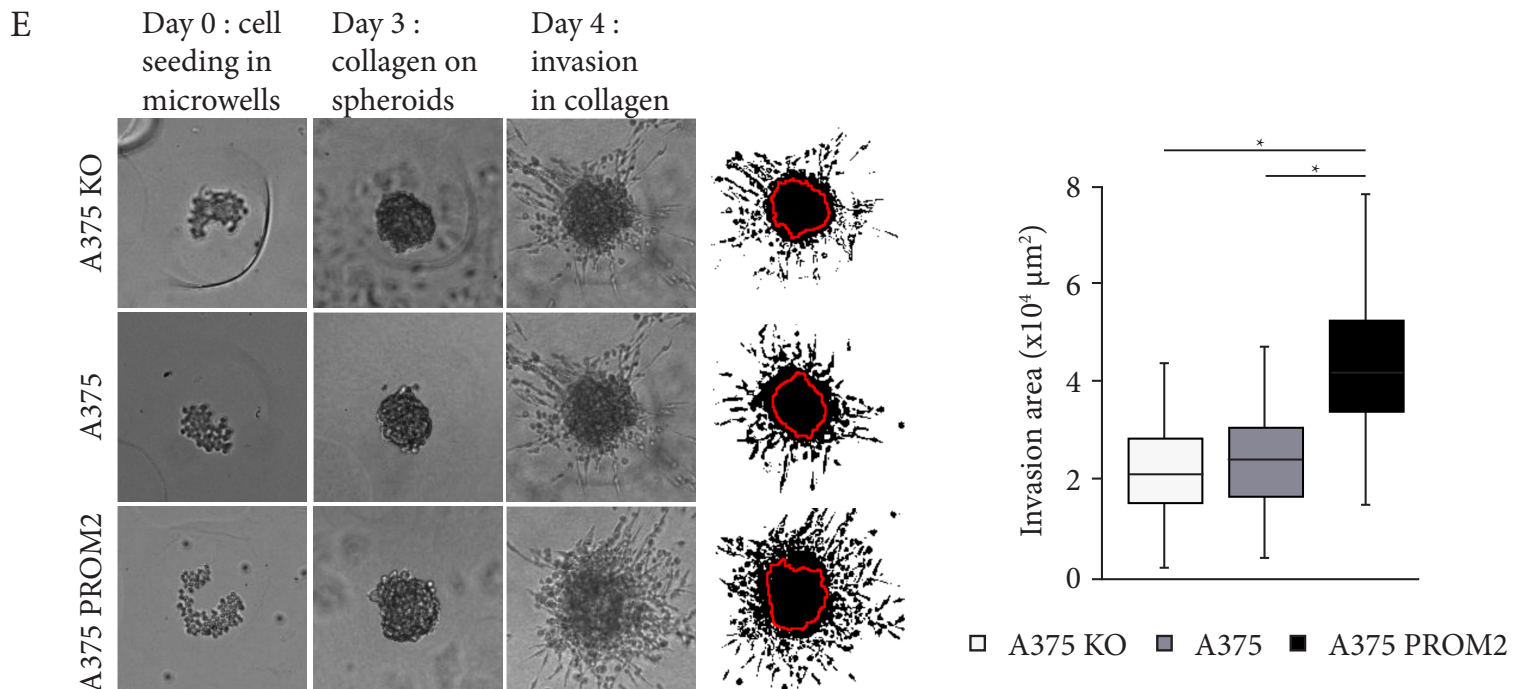
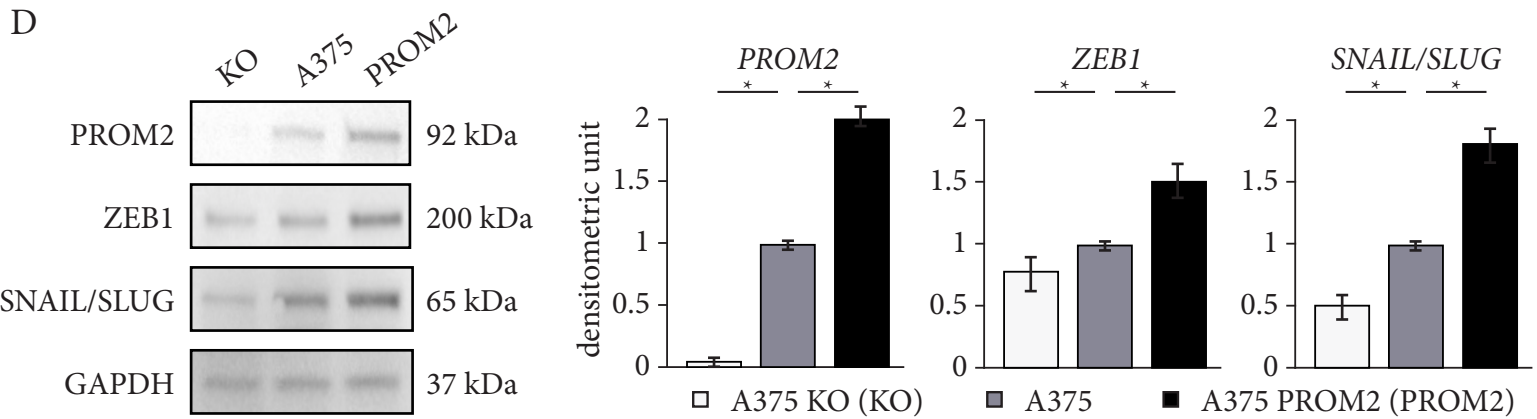
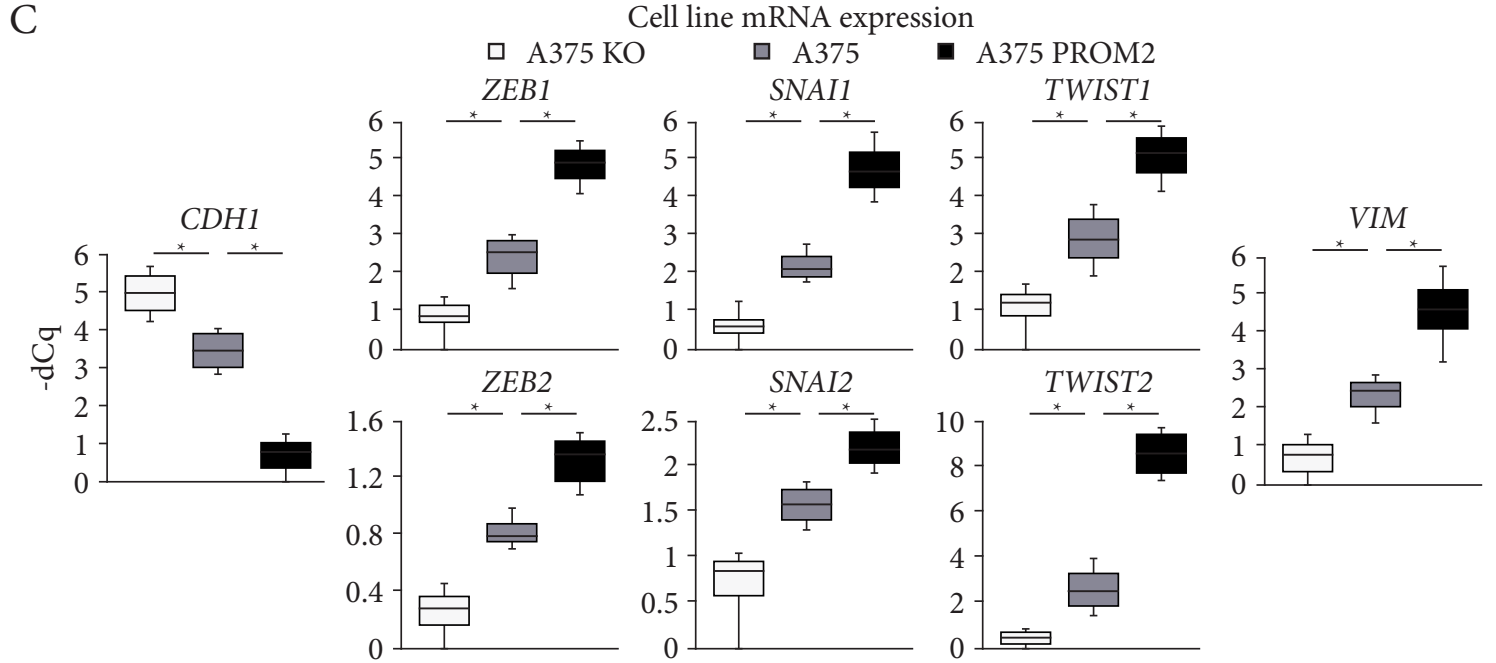
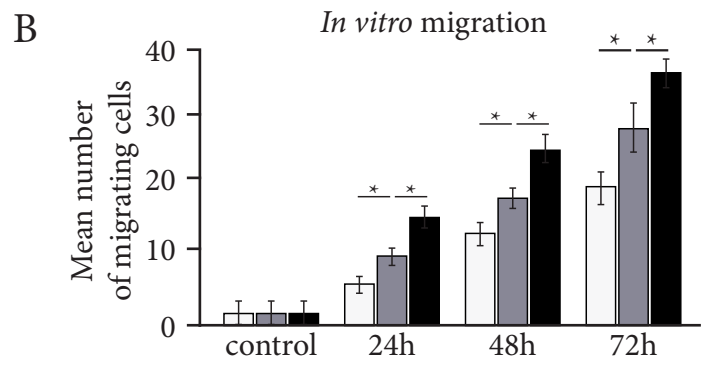
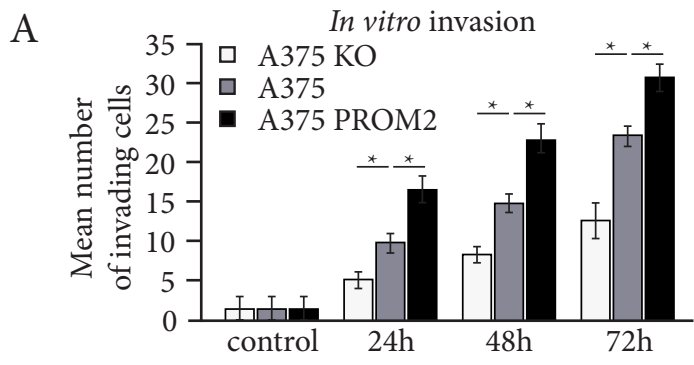
We thank Ms. Angela Swaine for the revision of English language.

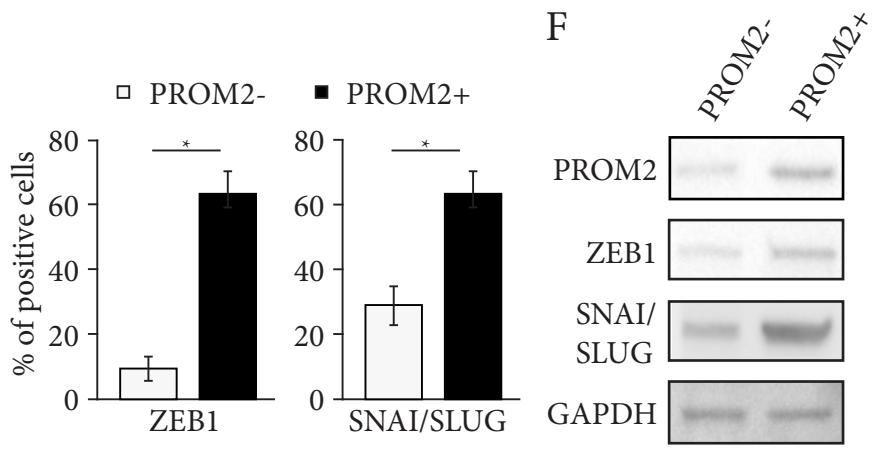
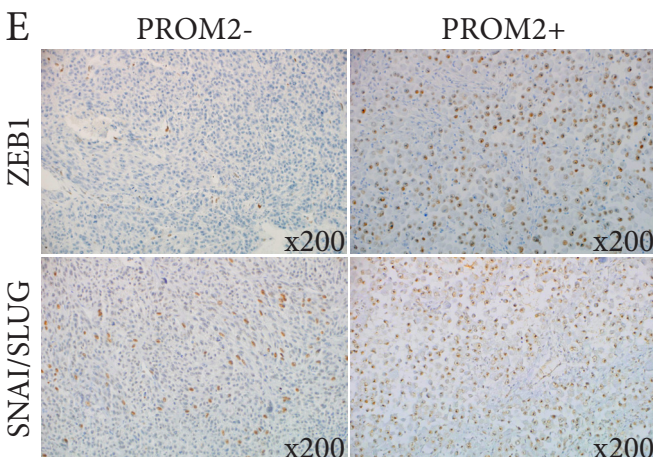
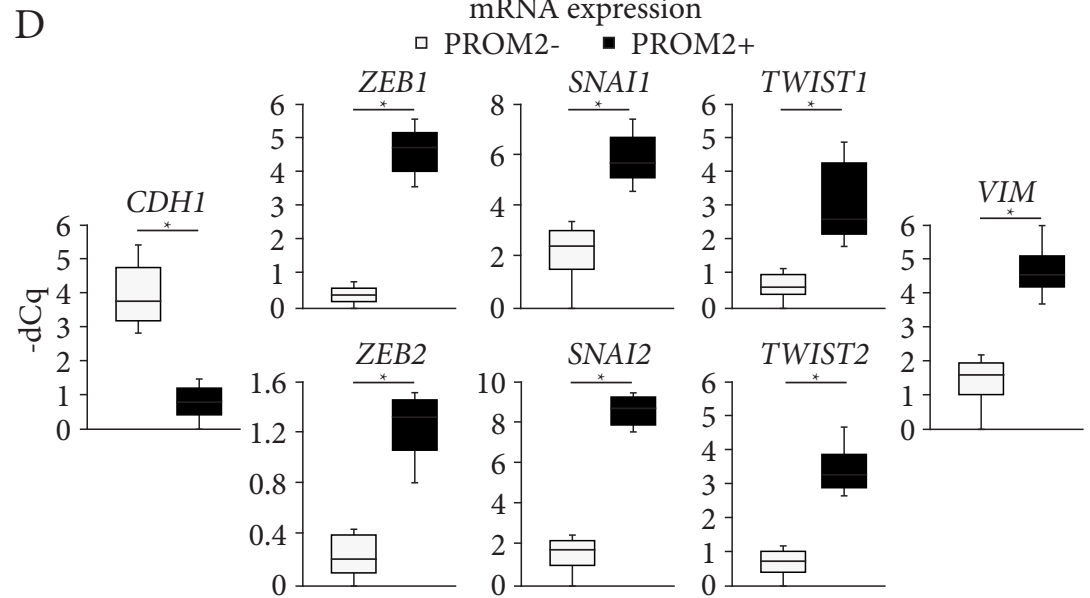
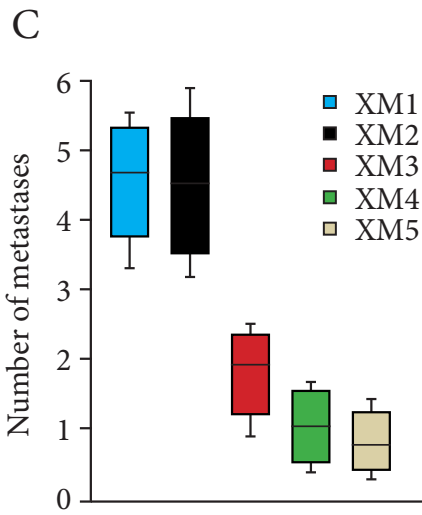
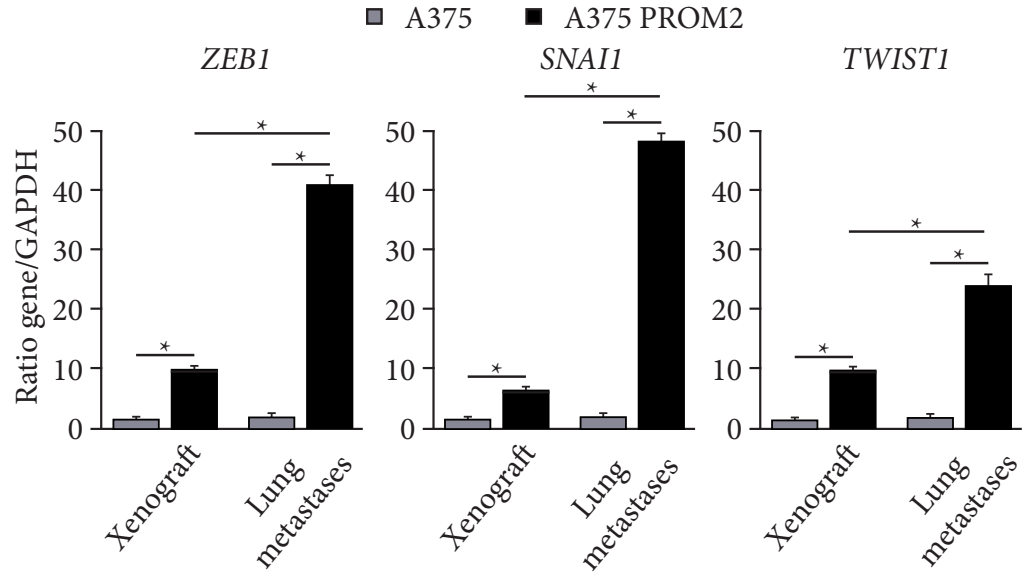
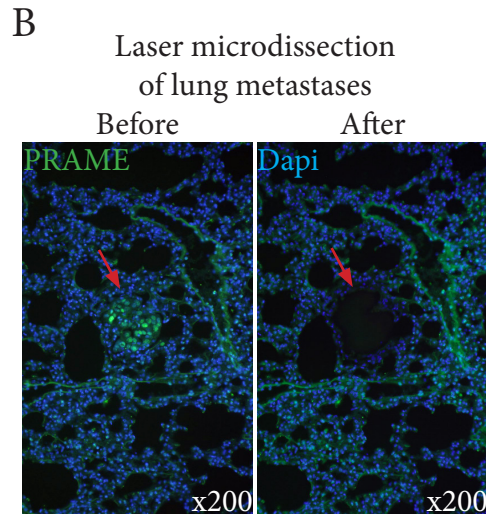
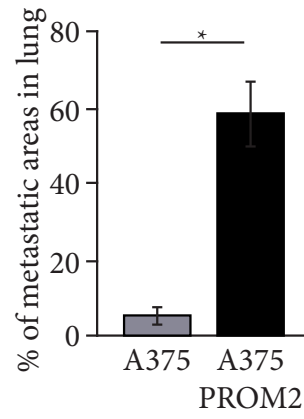
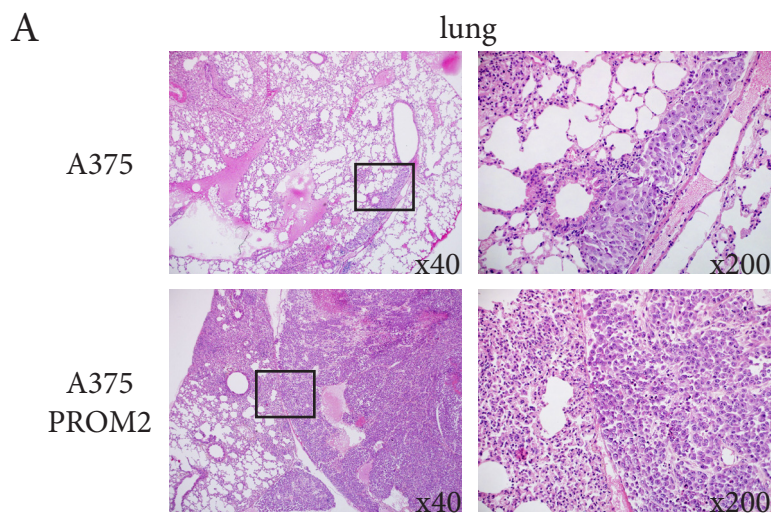
1. Guy, G.P., Jr., et al., *Vital signs: melanoma incidence and mortality trends and projections - United States, 1982-2030*. MMWR Morb Mortal Wkly Rep, 2015. **64**(21): p. 591-6.
2. Tawbi, H.A., C. Chung, and K. Margolin, *Nivolumab and Ipilimumab in Melanoma Metastatic to the Brain*. N Engl J Med, 2018. **379**(22): p. 2178.
3. Larkin, J., et al., *Combined Nivolumab and Ipilimumab or Monotherapy in Untreated Melanoma*. N Engl J Med, 2015. **373**(1): p. 23-34.
4. Robert, C., et al., *Pembrolizumab versus Ipilimumab in Advanced Melanoma*. N Engl J Med, 2015. **372**(26): p. 2521-32.
5. Eggermont, A.M.M., et al., *Adjuvant Pembrolizumab versus Placebo in Resected Stage III Melanoma*. N Engl J Med, 2018. **378**(19): p. 1789-1801.
6. Wolchok, J.D., et al., *Long-Term Outcomes With Nivolumab Plus Ipilimumab or Nivolumab Alone Versus Ipilimumab in Patients With Advanced Melanoma*. J Clin Oncol, 2022. **40**(2): p. 127-137.
7. Weiss, S.A., J.D. Wolchok, and M. Sznol, *Immunotherapy of Melanoma: Facts and Hopes*. Clin Cancer Res, 2019. **25**(17): p. 5191-5201.
8. Nguyen, T.T., et al., *Increased risk of brain metastases among patients with melanoma and PROM2 expression in metastatic lymph nodes*. Clin Transl Med, 2020. **10**(8): p. e198.
9. Fargeas, C.A., et al., *Characterization of prominin-2, a new member of the prominin family of pentaspan membrane glycoproteins*. J Biol Chem, 2003. **278**(10): p. 8586-96.
10. Florek, M., et al., *Prominin-2 is a cholesterol-binding protein associated with apical and basolateral plasmalemmal protrusions in polarized epithelial cells and released into urine*. Cell Tissue Res, 2007. **328**(1): p. 31-47.
11. Singh, R.D., et al., *Prominin-2 expression increases protrusions, decreases caveolae and inhibits Cdc42 dependent fluid phase endocytosis*. Biochem Biophys Res Commun, 2013. **434**(3): p. 466-72.
12. Dowland, S.N., et al., *Prominin-2 Prevents the Formation of Caveolae in Normal and Ovarian Hyperstimulated Pregnancy*. Reprod Sci, 2018. **25**(8): p. 1231-1242.
13. Tang, D. and G. Kroemer, *Ferroptosis*. Curr Biol, 2020. **30**(21): p. R1292-R1297.
14. Brown, C.W., et al., *Prominin2 Drives Ferroptosis Resistance by Stimulating Iron Export*. Dev Cell, 2019. **51**(5): p. 575-586 e4.
15. Bustin, S.A., et al., *The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments*. Clin Chem, 2009. **55**(4): p. 611-22.
16. Marangoni, E., et al., *A new model of patient tumor-derived breast cancer xenografts for preclinical assays*. Clin Cancer Res, 2007. **13**(13): p. 3989-98.
17. Varna, M., et al., *p53 dependent cell-cycle arrest triggered by chemotherapy in xenografted breast tumors*. Int J Cancer, 2009. **124**(4): p. 991-7.
18. Liang, W., et al., *CAV-1 contributes to bladder cancer progression by inducing epithelial-to-mesenchymal transition*. Urol Oncol, 2014. **32**(6): p. 855-63.
19. Gai, X., et al., *Caveolin-1 is up-regulated by GLI1 and contributes to GLI1-driven EMT in hepatocellular carcinoma*. PLoS One, 2014. **9**(1): p. e84551.
20. Cokakli, M., et al., *Differential expression of Caveolin-1 in hepatocellular carcinoma: correlation with differentiation state, motility and invasion*. BMC Cancer, 2009. **9**: p. 65.
21. Guan, J., R. Gupta, and F.V. Filipp, *Cancer systems biology of TCGA SKCM: efficient detection of genomic drivers in melanoma*. Sci Rep, 2015. **5**: p. 7857.
22. Jonsson, G., et al., *Gene expression profiling-based identification of molecular subtypes in stage IV melanomas with different clinical outcome*. Clin Cancer Res, 2010. **16**(13): p. 3356-67.
23. Cirenajwis, H., et al., *Molecular stratification of metastatic melanoma using gene expression profiling: Prediction of survival outcome and benefit from molecular targeted therapy*. Oncotarget, 2015. **6**(14): p. 12297-309.
24. Saha, S.K., et al., *PROM1 and PROM2 expression differentially modulates clinical prognosis of cancer: a multiomics analysis*. Cancer Gene Ther, 2020. **27**(3-4): p. 147-167.

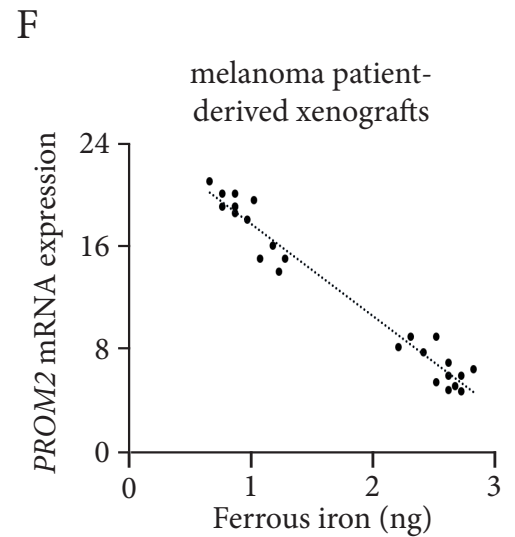
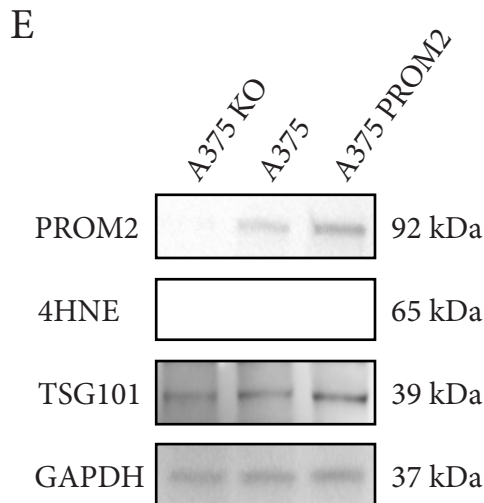
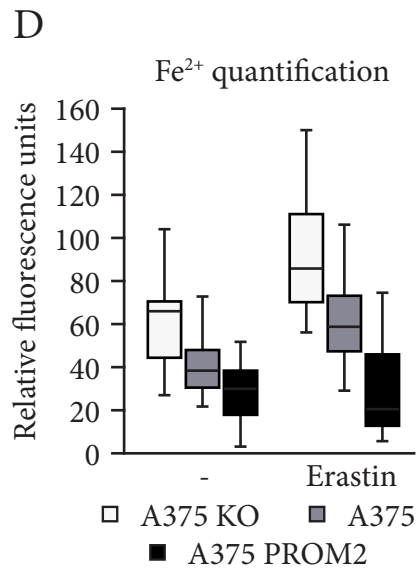
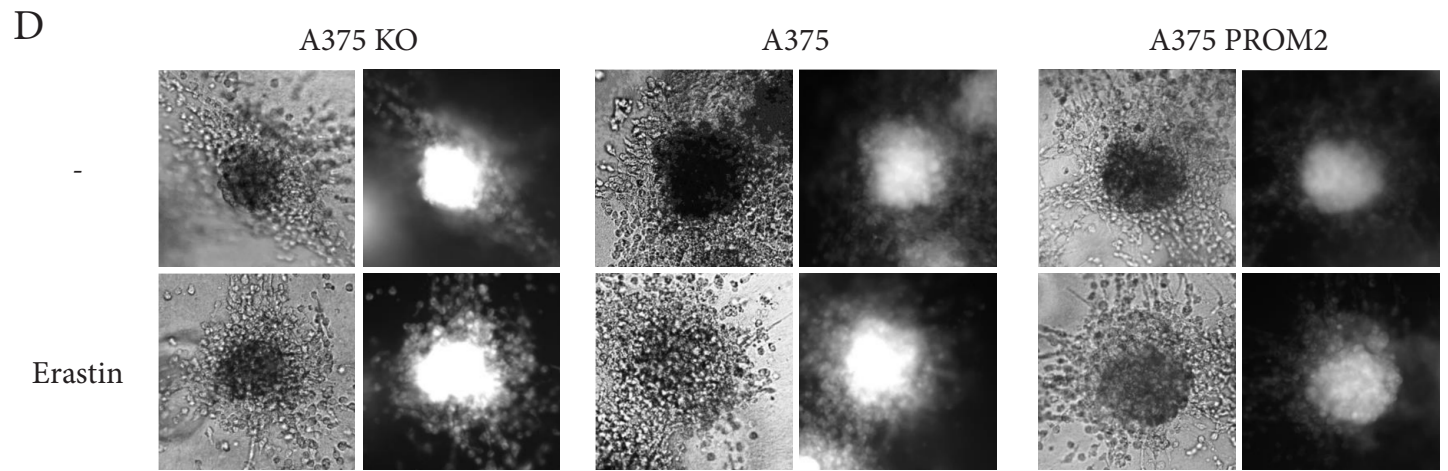
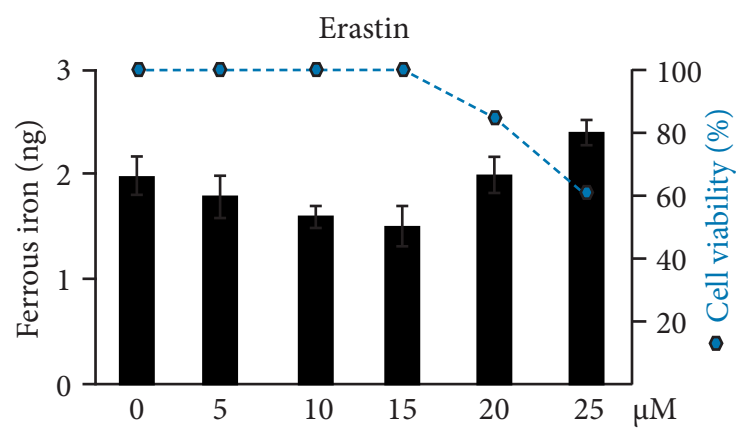
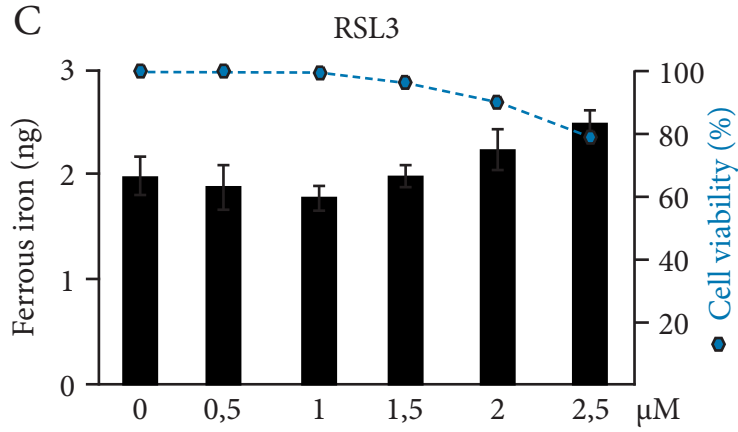
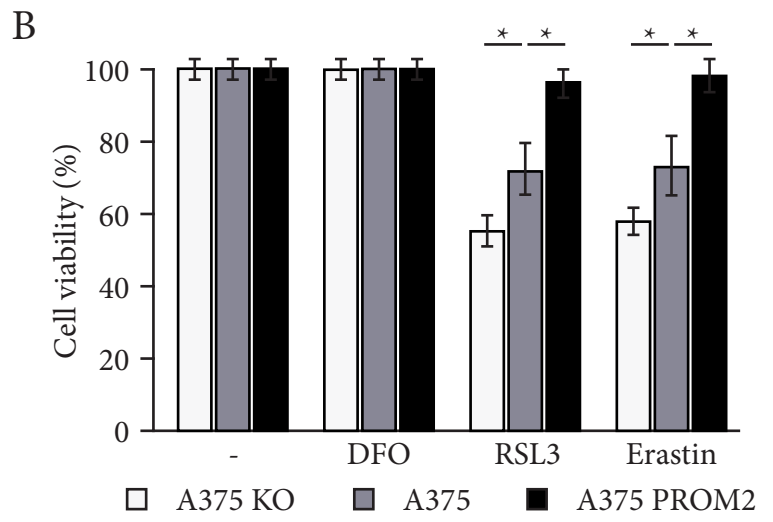
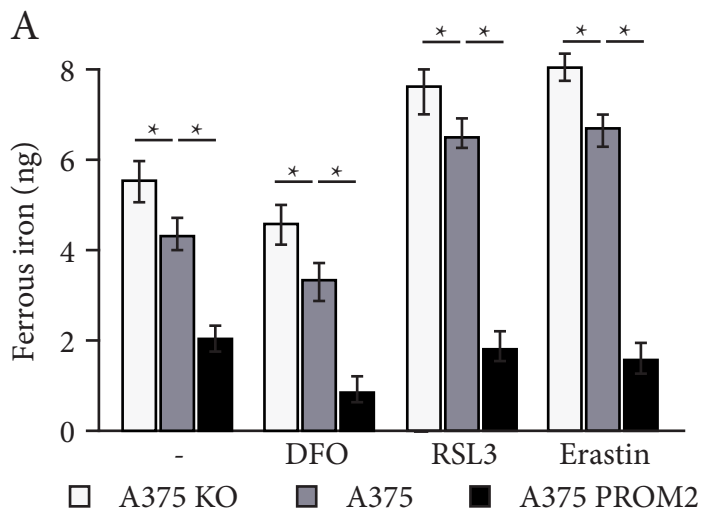
25. Li, W., et al., *PROM2 promotes gemcitabine chemoresistance via activating the Akt signaling pathway in pancreatic cancer*. *Exp Mol Med*, 2020. **52**(3): p. 409-422.
26. Zhang, B., et al., *Dysregulation of Long Non-coding RNAs and mRNAs in Plasma of Clear Cell Renal Cell Carcinoma Patients Using Microarray and Bioinformatic Analysis*. *Front Oncol*, 2020. **10**: p. 559730.
27. Bousquet, G. and A. Janin, *Patient-Derived Xenograft: An Adjuvant Technology for the Treatment of Metastatic Disease*. *Pathobiology*, 2016. **83**(4): p. 170-6.
28. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *The hallmarks of cancer*. *Cell*, 2000. **100**(1): p. 57-70.
29. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *Hallmarks of cancer: the next generation*. *Cell*, 2011. **144**(5): p. 646-74.
30. Hanahan, D., *Hallmarks of Cancer: New Dimensions*. *Cancer Discov*, 2022. **12**(1): p. 31-46.
31. Raguraman, P., et al., *Antisense Oligonucleotide-Mediated Splice Switching: Potential Therapeutic Approach for Cancer Mitigation*. *Cancers (Basel)*, 2021. **13**(21).
32. Lambert, G., E. Fattal, and P. Couvreur, *Nanoparticulate systems for the delivery of antisense oligonucleotides*. *Adv Drug Deliv Rev*, 2001. **47**(1): p. 99-112.
33. Zheng, T., et al., *Anti-MicroRNA-21 Oligonucleotide Loaded Spermine-Modified Acetalated Dextran Nanoparticles for B1 Receptor-Targeted Gene Therapy and Antiangiogenesis Therapy*. *Adv Sci (Weinh)*, 2022. **9**(5): p. e2103812.

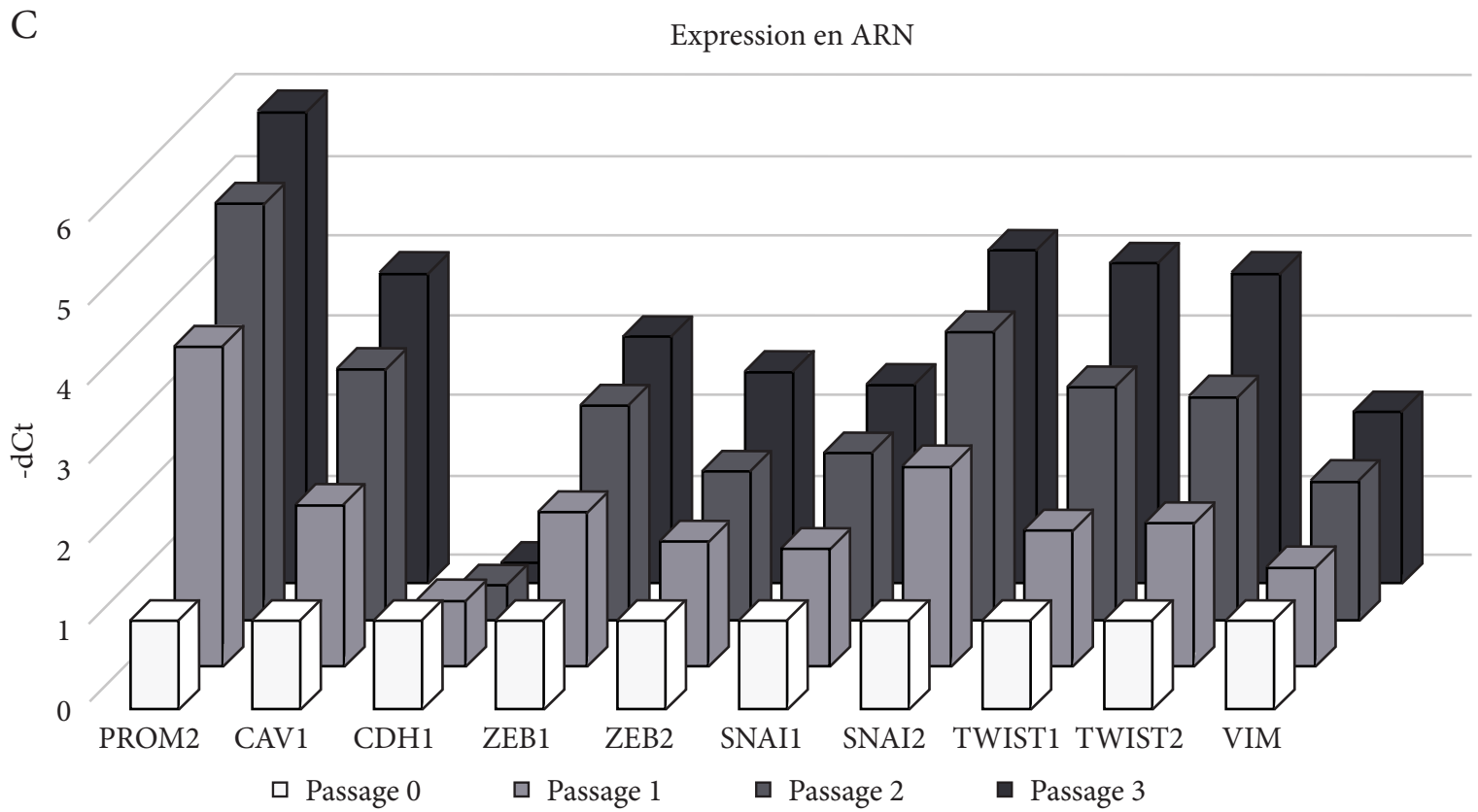
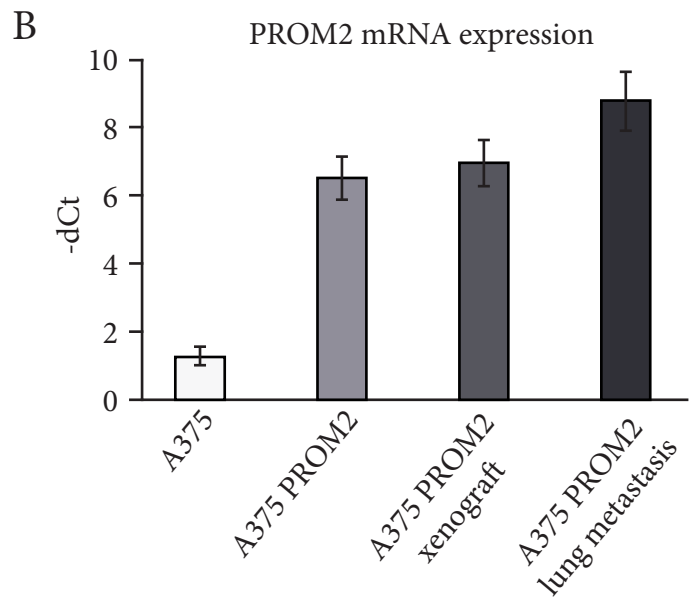
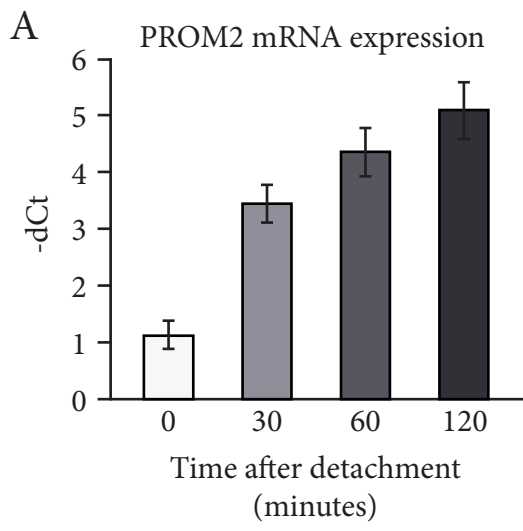


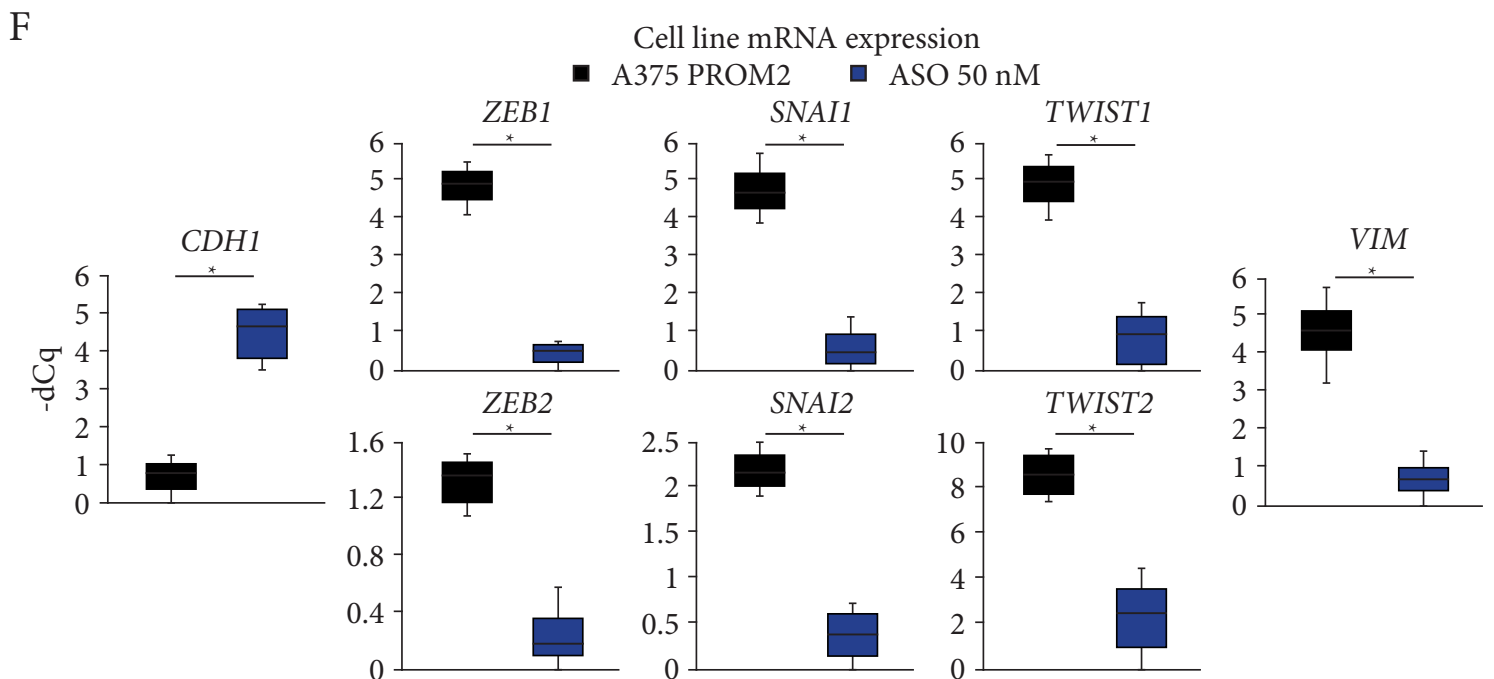
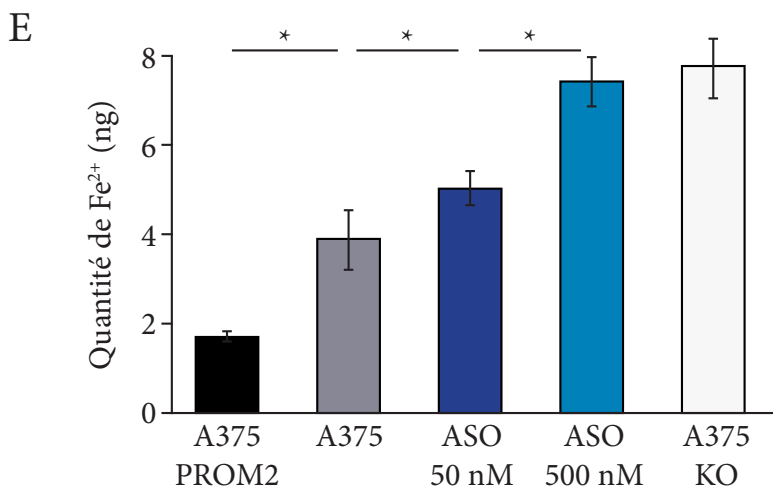
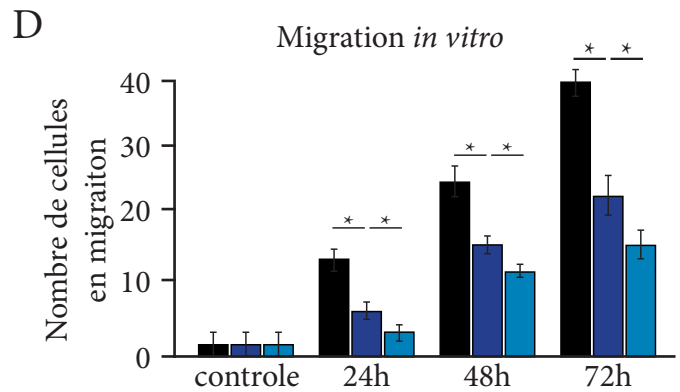
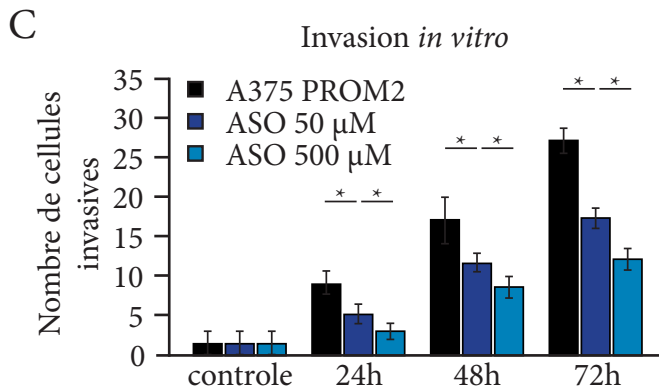
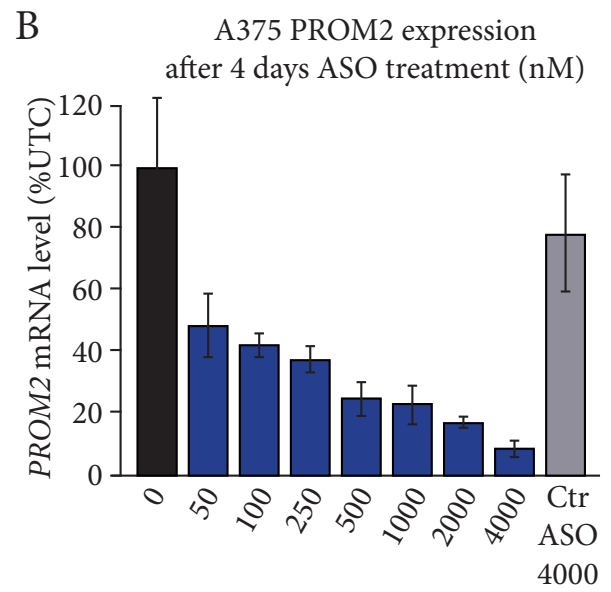
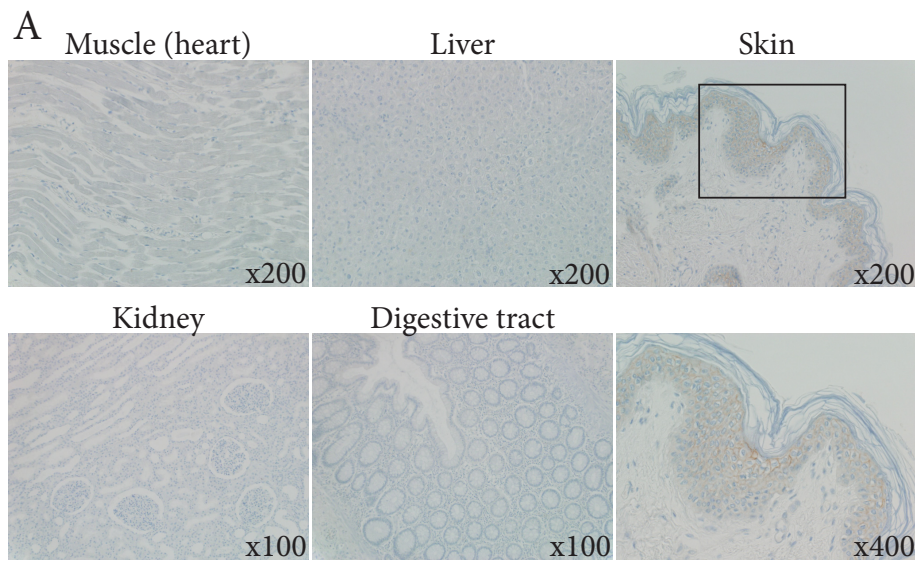
Median	XM1	XM2	XM3	XM4	XM5
Tumor volume (mm ³)	4.78	3.63	4.25	2.03	2.33
Euthanasia day	35.5	42.0	40.0	185	163

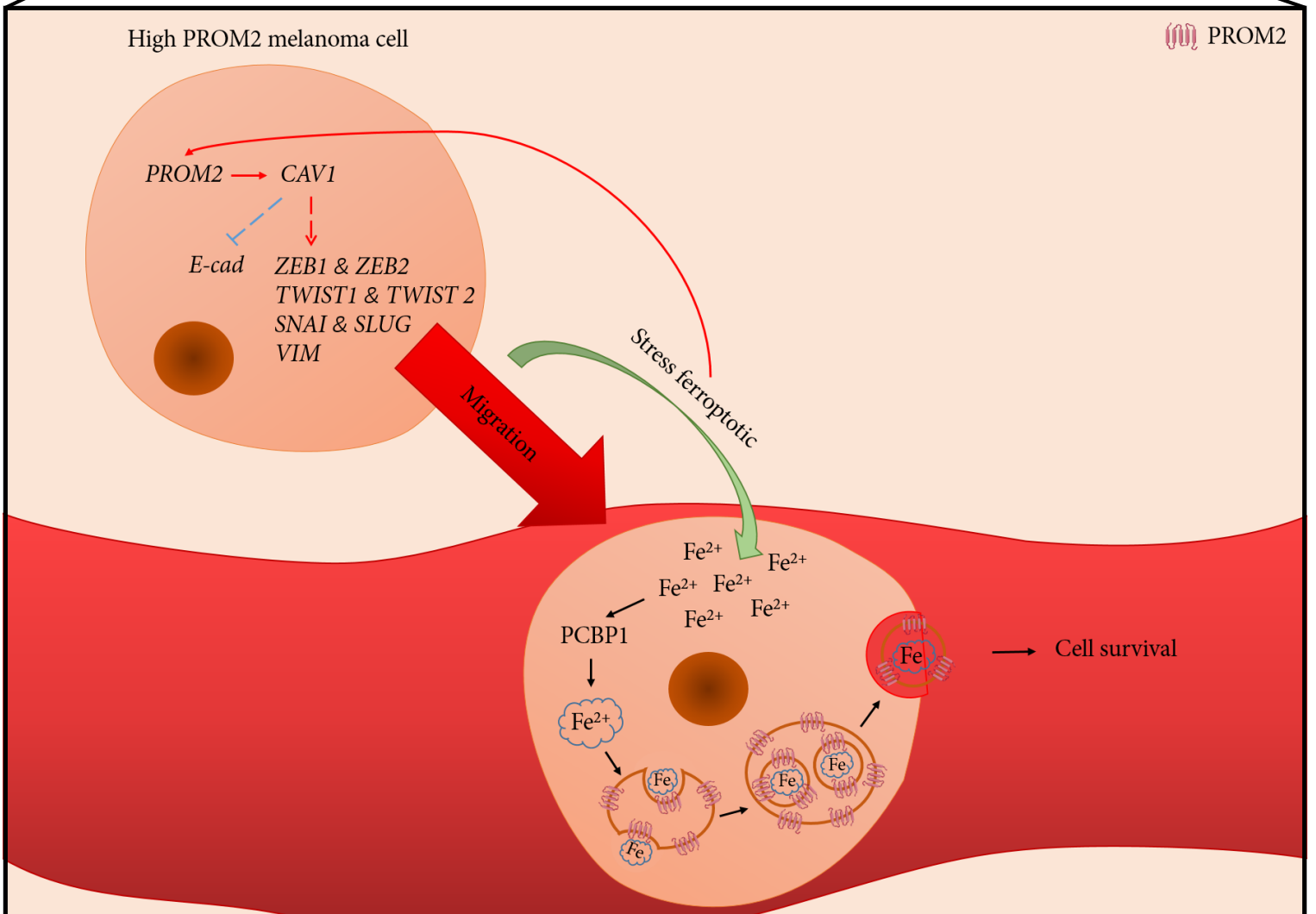
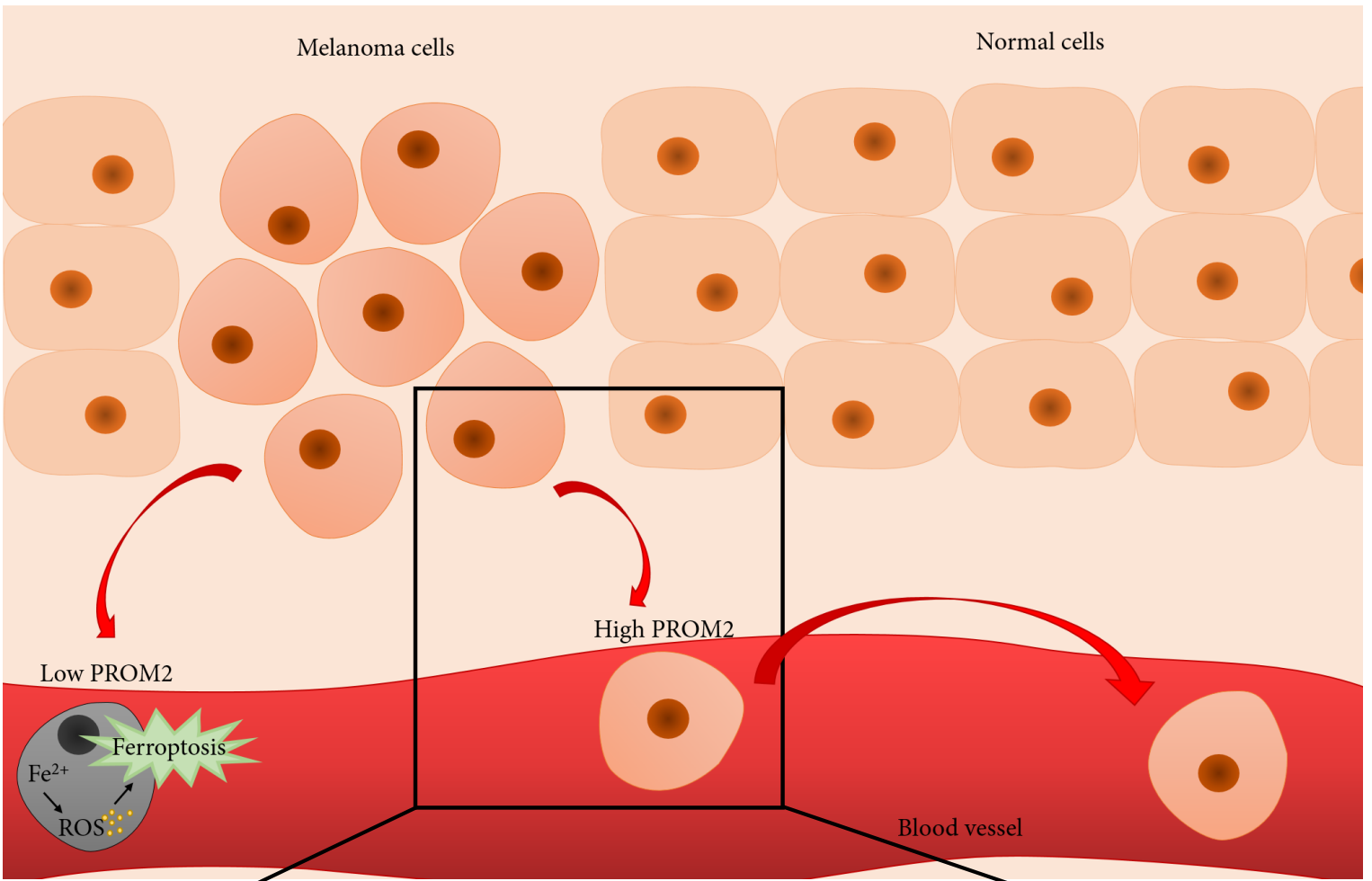




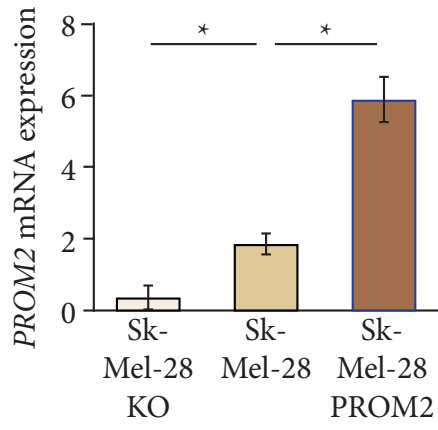




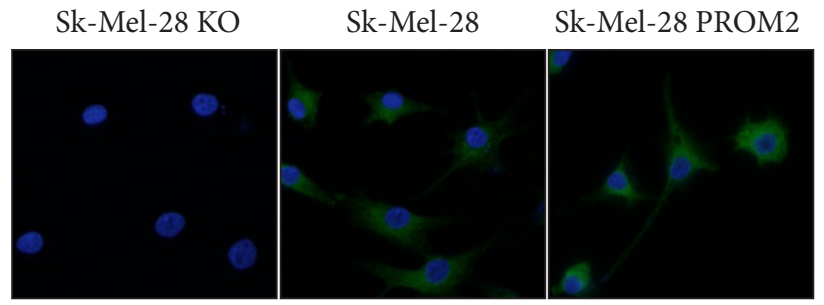




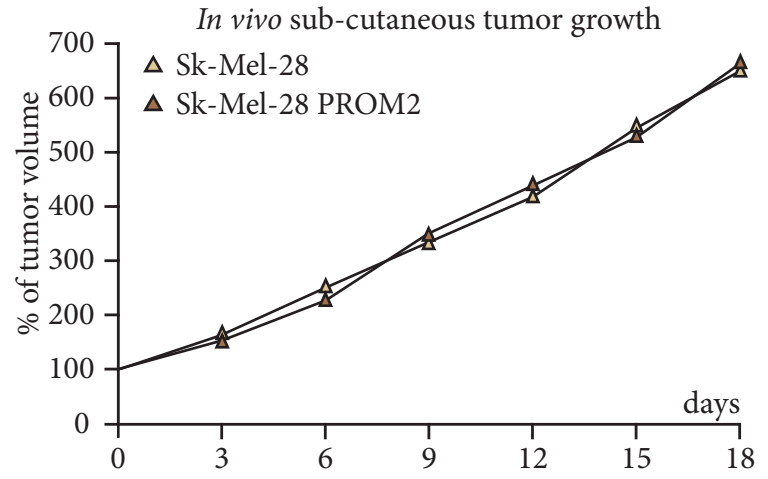
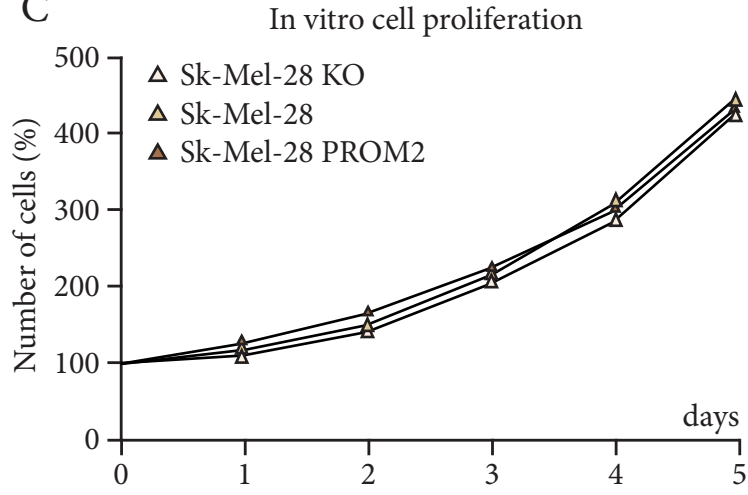
A



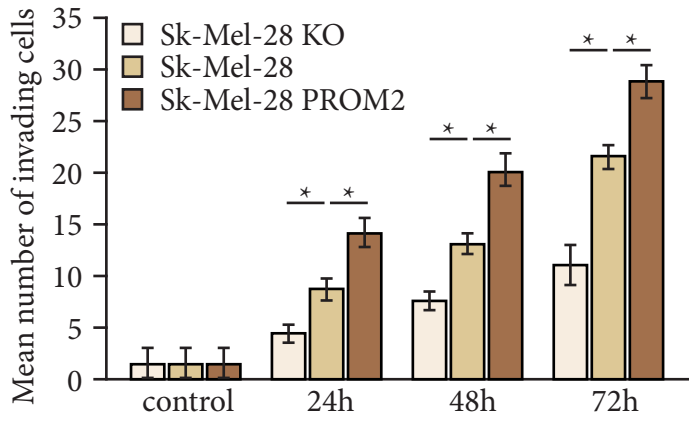
B



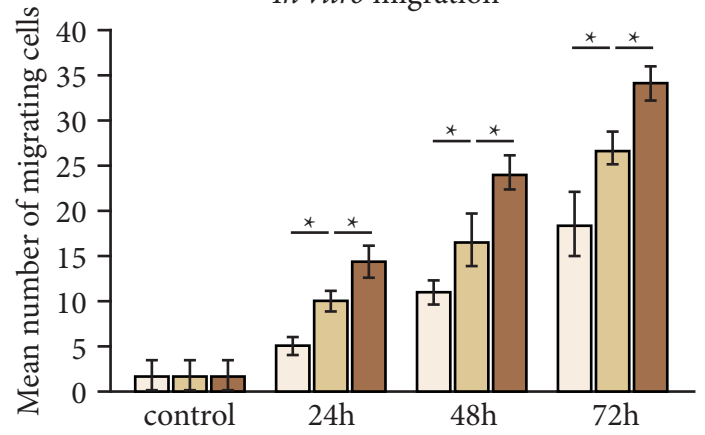
C



A

In vitro invasion

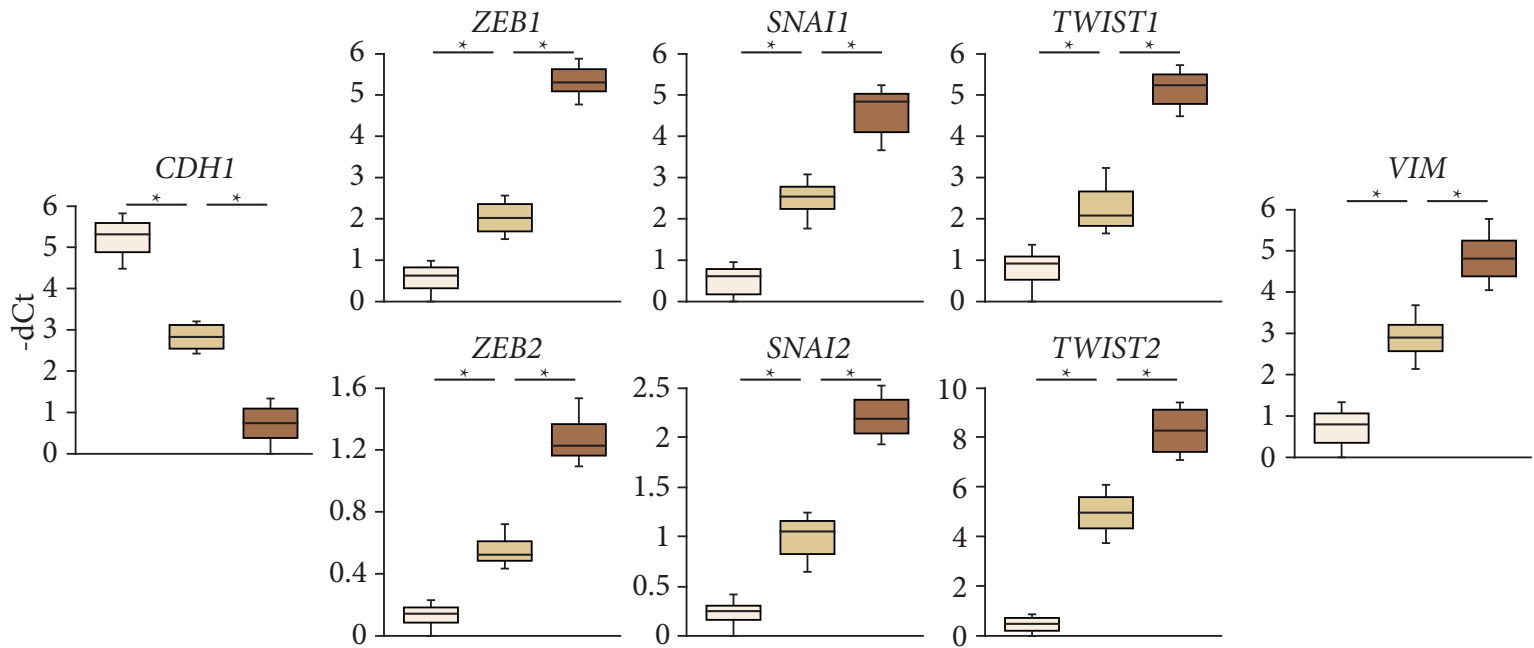
B

In vitro migration

C

Cell line mRNA expression

□ Sk-Mel-28 KO ■ Sk-Mel-28 ■ Sk-Mel-28 PROM2



D

