### recherche et développement

# HA15, une nouvelle molécule qui pousse les cellules cancéreuses au suicide

### Du diabète au mélanome

### Résumé

Le traitement du mélanome a considérablement progressé au cours de la dernière décennie, avec le développement de thérapies ciblées et d'immunothérapies pour réactiver l'immunité antitumorale. Malheureusement, plus de 50 % des patients sont actuellement en échec thérapeutique, notamment à cause de l'apparition de résistances aux traitements. L'identification de nouveaux agents thérapeutiques ayant un mode d'action original est d'un très grand intérêt pour contourner ces phénomènes de résistance. En s'inspirant de la structure d'un principe actif anti-diabétique, de nouvelles molécules actives contre les cellules de mélanome humain ont été identifiées. HA15, le représentant de cette nouvelle classe, agit en augmentant l'état de stress inhérent des cellules cancéreuses pour les pousser au suicide. Les cellules saines, qui supportent ce stress, ne sont pas affectées. HA15 est actif *in vitro* et *in vivo* sur des mélanomes sensibles et résistants, ainsi que sur des cellules d'autres cancers. Il constitue un prototype intéressant pour des applications thérapeutiques chez l'homme.

### **Mots-clés**

Chimie médicinale, chemobiologie, drug design, synthèse organique, mélanome, mécanisme d'action.

#### **Abstract**

### HA15, a new molecule which pushes cancer cells to suicide: from diabetes to melanoma

The treatment of melanoma has considerably advanced over the last decade, with the development of targeted therapies and immunotherapies to reactivate antitumor immune response. Unfortunately, more than 50% of patients are currently undergoing treatment failure, particularly due to the development of resistance to developed treatments. The identification of new therapeutic agents, particularly using novel modes of action, is highly desirable to circumvent these resistance phenomena. Based on the structure of an old antidiabetic drug, new active molecules against human melanoma cells have been identified. HA15, the lead compound of this new class, acts by increasing the inherent stress of cancer cells leading them to suicide. Healthy cells, which manage this stress, are not affected. The efficacy of HA15 *in vitro* and *in vivo* by eradicating both sensitive and resistant melanoma cells has been demonstrated. HA15 represents a prototype which could be applied for treatment of patients with metastatic melanoma.

### **Keywords**

Medicinal chemistry, chemical biology, drug design, organic synthesis, melanoma, mode of action.

### Le mélanome

Le mélanome est la forme la plus agressive du cancer de la peau, qui provient de la mutation maligne des mélanocytes. Ces cellules, localisées principalement dans l'épiderme cutané, les follicules pileux et les yeux, y produisent la mélanine, qui est responsable de leur pigmentation. Au niveau de la peau, les mélanocytes sont situés dans la couche basale de l'épiderme, à l'interface avec le derme (figure 1) [1]. Suite à une exposition aux rayons solaires, la mélanine produite joue un rôle protecteur pour notre corps en filtrant les radiations ultraviolettes (UV) et en limitant les dommages et mutations associés, provoquant le bronzage de notre peau. Cependant, chez les mélanocytes malins, des mutations sont survenues dans les gènes de régulation de croissance, qui entrainent leur prolifération continue et anarchique.

Bien que représentant moins de 5 % des cancers de la peau [2], le mélanome est responsable de 80 % des décès chez les personnes concernées [1b]. Dans les pays développés, le mélanome apparait avec une incidence et une mortalité respectives de 10,2 et 2,0 pour 100 000 personnes chez les hommes tandis qu'une incidence et une mortalité plus faibles sont observées chez les femmes (9,3 et 1,2 pour 100 000 habitants, respectivement). De façon marquante, la population caucasienne est la plus touchée par le mélanome et son incidence atteint près de 60 cas pour 100 000 habitants en Nouvelle-Zélande et

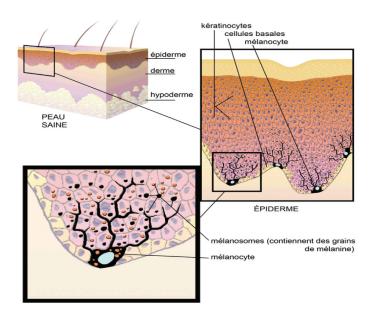


Figure 1 - Le derme et les mélanocytes.

en Australie [3]. Les facteurs génétiques de cette maladie sont faibles, avec seulement 5 à 10 % des patients présentant des antécédents familiaux de mélanome [4], et le principal facteur de risque est la brûlure solaire, en particulier durant l'enfance. Au contraire, une exposition solaire régulière et modérée

### Lexique

Les termes suivis d'un astérisque\* dans l'article sont définis ci-dessous.

**B-Raf** (« B-rapidly accelerated fibrosarcoma »): constituant majeur de la voie de signalisation MAPK, dont la mutation est en grande partie responsable de la survenue de mélanomes.

CTLA-4 (« cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4 ») : récepteur membranaire dont l'activation atténue la réponse immunitaire. GRP78 (« 78-kDa glucose-regulated protein ») : enzyme chaperonne essentielle du réticulum endoplasmique qui gère le contrôle qualité des protéines produites. En cas d'accumulation de protéines non repliées, elle active la « réponse aux protéines non repliées » (ou UPR : « unfolded protein response »).

MAPK (« mitogen-activated protein kinase ») : voie de signalisation responsable de la prolifération cellulaire en réponse à différents stimuli.

PD-1 (« programmed cell death protein 1 »): récepteur membranaire dont l'activation atténue la réponse immunitaire, notamment pour éviter les réactions autoimmunes.

 $\label{eq:permission} \begin{aligned} & \text{PPAR}\gamma(\text{``e} \text{ peroxisome proliferator-activated receptor }\gamma\text{'`s}): récepteur \\ & \text{présent dans le noyau des cellules agissant comme facteur de transcription des gènes cibles impliqués notamment dans le métabolisme et l'adipogenèse.} \end{aligned}$ 

d'une peau susceptible de bronzer a un certain effet protecteur [5]. Ainsi, bien qu'il puisse apparaitre partout, le mélanome aura plus tendance à se former sur des parties du corps d'ordinaire couvertes, mais exposées occasionnellement lors de bains de soleil, comme le torse et les jambes. La couleur de la peau joue également un rôle déterminant : les personnes à peau claire présenteront un risque sensiblement augmenté, plus que doublé chez les roux [6], alors qu'il sera dix fois moins important chez les personnes de couleur de peau non blanche [7].

La progression du mélanome cutané est caractérisée par une phase initiale de croissance radiale, suivie d'une phase de développement vertical au travers du derme. Le mélanome précoce est hautement localisé et peut être traité par chirurgie, éventuellement suivie de radiothérapie et/ou chimiothérapie adjuvantes. Dans ce cas, le pronostic vital des patients est positif, avec un taux de survie à vingt ans de 75 % si l'épaisseur de la tumeur est inférieure à 2 mm, et de 90 % lorsque celle-ci est inférieure à 1 mm [3]. À l'inverse, une fois que les cellules de mélanome atteignent la circulation sanguine, elles se propagent rapidement vers d'autres organes et présentent un haut risque d'invasion à l'origine de l'apparition de métastases. Au stade métastatique, la maladie est difficile à traiter et le pronostic des patients est alors extrêmement négatif [1a], avec des taux de survie à cinq ans variant de 5 à 19 % [1b-c, 8].

Jusque dans les années 2000, les mutations associées à la survenue d'un cancer de type mélanome étaient encore mal connues. De fait, seuls des traitements de chimiothérapie classique à base d'agents cytotoxiques non sélectifs étaient proposés aux patients atteints de mélanome métastatique (figure 2). Parmi eux, le plus utilisé a été l'agent alkylant dacarbazine, qui affecte la synthèse et la réplication de l'ADN. Les dommages produits conduisent à la mort de la cellule, et ralentissent ainsi la progression tumorale. Cependant, ce traitement était à l'origine de graves effets secondaires (principalement anorexie, nausées, vomissements et anémie), et était globalement inefficace puisque le taux de réponse des patients variait de 5 à 20 %, sans amélioration de l'espérance de vie des patients [9].

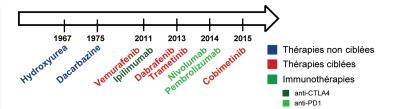


Figure 2 - Chronologie des traitements utilisés contre le mélanome métastatique.

Le développement de thérapies efficaces a été rendu possible par la compréhension des mécanismes de dérégulation des voies de signalisation du mélanome. Notamment, la découverte en 2002 de l'implication des MAPK\* [10], mutées dans plus de 80 % des mélanomes cutanés, a révolutionné la compréhension de cette maladie. Ces mutations sont responsables de son activation constitutive et in fine d'une prolifération cellulaire incontrôlée. En particulier, l'un des constituants de la voie MAPK, la protéine B-Raf\*, est muté dans environ 60 % des cas [11]. De fait, des équipes de chercheurs ont développé des inhibiteurs spécifiques de ces enzymes, ce qui a mené à la découverte puis à la commercialisation du vemurafenib (Zelboraf®, Roche, 2011), dabrafenib (Tafinlar®, GSK, 2013) et encorafenib (Novartis, en essais cliniques de phase III) pour les inhibiteurs de B-Raf, et du trametinib (GSK, 2013) et cobimetinib (Roche, 2015) pour les inhibiteurs de MEK, une autre enzyme de la voie MAPK (figure 3).



Figure 3 - Médicaments et principes actifs de thérapie ciblée disponibles sur le marché.

Ces molécules, malgré des effets secondaires non négligeables comme l'apparition de lésions cutanées, ont suscité de profonds espoirs d'amélioration des thérapies alors proposées. En effet, leur taux de réponse est élevé (entre 80 et 90 %) [12] et ils engendrent une régression tumorale rapide tout en augmentant de manière significative la durée de vie des patients. Cependant, comme nous en discuterons plus tard, la plupart de ces patients développent une résistance rapide aux thérapies ciblées.

En parallèle de l'essor de ces traitements par des molécules ciblées, un nouveau concept thérapeutique a émergé à la fin des années 1990. Il consiste à stimuler le système immunitaire pour aider le corps à lutter contre plusieurs maladies, dont le SIDA et le cancer [13]. Cette découverte est liée à l'étude et la caractérisation des cytokines, les messagers/médiateurs cellulaires responsables d'un grand nombre de réponses biologiques, dont le principal est l'immunité. Ces immunothérapies agissent grâce à des anticorps qui vont cibler des récepteurs

membranaires comme CTLA-4\* et PD-1\*, qui permettent aux cellules cancéreuses d'être invisibles vis-à-vis du système immunitaire. L'inhibition de ces protéines permet alors de renforcer l'efficacité du système immunitaire du patient, et d'atténuer la croissance tumorale [14].

Cette nouvelle approche immunologique a révolutionné la prise en charge des patients atteints de mélanome, notamment ceux qui ne présentent pas de mutations de B-Raf, pour lesquels les inhibiteurs de la voie MAPK sont inactifs. Les taux de réponse des immunothérapies dans le traitement du mélanome sont modérés (15-30 %), par rapport aux inhibiteurs de la voie MAPK, mais la réponse parait plus durable, avec une survie globale à un an de 75 % [15]. Cependant, les effets secondaires liés à l'utilisation des immunothérapies sont encore plus drastiques que les thérapies ciblées et comprennent notamment des symptômes fiévreux, douleurs musculaires et articulaires, fatigue, nausées. De plus, le coût économique considérable de la plupart de ces traitements est un problème majeur pour les services de santé.

En dépit des efforts considérables déployés pour quérir ou limiter la progression du mélanome, la lutte contre l'apparition de résistances est certainement le plus grand défi pour les traitements futurs. En effet, les résistances sont des phénomènes multifactoriels complexes, qui dépendent notamment du type de thérapie administrée au patient. Les résistances aux agents de chimiothérapie ciblant l'ADN sont connues depuis longtemps et largement documentées [16]. Les thérapies ciblées de la voie MAPK sont particulièrement sujettes à l'apparition de résistances. En effet, après une phase initiale de forte régression qui montre des résultats spectaculaires avec une disparition quasi-totale des tumeurs après seulement quelques semaines de traitement, la plupart des patients - sinon tous - rechutent au bout de quelques mois [9c, 17]. De plus, ces cancers devenus résistants au cours du traitement sont plus agressifs et progressent plus rapidement que les cancers initiaux [18]. Les principales causes de résistances sont l'augmentation du nombre de copies de B-Raf pour compenser de hautes doses de vemurafenib [19] ou l'emprunt d'autres voies enzymatiques que MAPK pour permettre la prolifération cellulaire de manière alternative [20]. De manière analogue, les cellules cancéreuses sont capables de surexprimer le ligand des récepteurs PD-1 afin de compenser son inhibition par les immunothérapies [15].

Ainsi, en parallèle ou en combinaison avec les thérapies actuelles, la recherche et le développement de nouveaux principes actifs est primordial pour pallier les problèmes de résistance intrinsèques (c'est-à-dire augmenter les taux de réponse) et/ou restaurer la sensibilité des patients

à leur niveau précédant l'apparition de résistances. La découverte de traitements dénués de résistances, ou du moins présentant une réponse très durable, reste cependant l'idéal. Dans ce contexte, nous avons initié un projet de recherche visant à développer de nouvelles petites molécules pour contrecarrer les phénomènes de résistance *via* de nouveaux mécanismes d'action.

## Découverte d'une nouvelle famille de molécules anti-mélanome aux pouvoirs surprenants

Le point de départ de notre travail s'est basé sur la découverte qu'une molécule utilisée dans le traitement du diabète de type 2, la troglitazone, induisait une mort massive des cellules de mélanome par apoptose [21]. Ce principe actif est pourtant principalement connu pour augmenter la sensibilité à l'insuline et réguler l'homéostasie du glucose via l'activation d'un récepteur nucléaire nommé PPARγ\*. Nous avons montré ensuite que les effets antiprolifératifs de la troglitazone étaient indépendants des effets d'activation du récepteur PPARy, et par conséquent que les propriétés proapoptotiques et antidiabétiques pouvaient être dissociées (figure 4). De ces résultats préliminaires, nous avons démarré un programme de chimie médicinale visant à modifier la structure de la troglitazone, pour supprimer l'activation de PPARγ antidiabétique et obtenir une sélectivité totale envers l'apoptose des cellules néoplasiques [22].

Nous avons adopté une approche par fragments pour déceler le pharmacophore responsable de la mort des cellules de mélanome. Dans ce but, nous avons synthétisé différentes parties de la molécule de troglitazone, et successivement testé l'activité de ces fragments sur l'activation de PPARy et sur l'apoptose des cellules de mélanome. Grâce à des relations de structure-activité itératives, nous avons pu montrer que la partie thiazolidinedione (en vert) de la troglitazone était nécessaire à l'activité antiproliférative, tandis que la présence de la partie (1-méthylcyclohexyl)méthoxyle (en rouge) fournissait plutôt l'affinité envers les récepteurs PPARγ. Nous avons ensuite modifié la partie thiazolidinedione dans le but d'augmenter l'efficacité anticancéreuse, notamment en remplaçant certains groupements chimiques par des fonctions bioisostères. De manière très intéressante, nous avons alors montré que la partie thiazolidinedione pouvait être avantageusement remplacée par un noyau 2-aminothiazole, et qu'un lien direct entre les cycles aromatiques, sans le groupement méthylène, était bénéfique. Ceci a mené à l'identification de la structure N-(4-(3-aminophényl)-thiazol-2-yl)acétamide comme nouvelle structure de base (ou « hit ») active contre les cellules

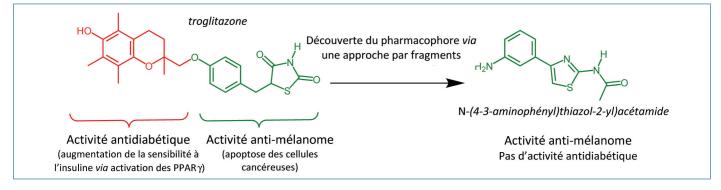


Figure 4 - Découverte d'une nouvelle structure de base *via* une approche par fragments. Dissociation des activités antidiabétique (activation des récepteurs PPARγ) et anti-mélanome (apoptose des cellules cancéreuses) par identification des pharmacophores respectifs puis modification de la structure moléculaire.

de mélanome, et dénuée de toute activation des récepteurs PPARy.

Une phase d'amélioration de cette structure de base (ou « hitto-lead ») a alors débuté. Plusieurs séries d'analogues ont été synthétisées dans le but d'explorer différentes variations autour de la structure. Si la modification de la structure même du N-(4-(3-aminophényl)-thiazol-2-yl)acétamide s'est avérée peu convaincante, le branchement de différents groupements au niveau de l'atome d'azote de l'aniline a montré des résultats très intéressants, notamment en plaçant un groupement benzène sulfonyle (figure 5). Puis l'étude de la substitution de ce nouveau noyau phényle a ensuite mis en lumière une relation de structure-activité très claire : à savoir un gain d'activité très fort lorsque le noyau phényle est substitué en para par des groupements hydrophobes encombrants, tels qu'un atome d'iode ou une chaine hydrocarbonée [22-23]. Des activités cellulaires submicromolaires ont alors été obtenues, et un premier composé « tête de série » (ou « lead ») a été défini : PB615 portant une chaine octyne (figure 5). Ce composé présente par ailleurs des propriétés pharmacologiques favorables qui ont pu mener à son étude in vivo chez la souris xénogreffée avec des cellules de mélanome humain. Le composé a alors montré un ralentissement de la croissance tumorale très conséquent. Cependant, la présence d'une longue chaine carbonée accentue le caractère hydrophobe et diminue la solubilité aqueuse des composés. Pour PB615, ce paramètre est un inconvénient qui a largement limité son étude et son application dans beaucoup de tests bioanalytiques.

La structure du composé PB615 a alors été revisitée et de nouveaux analogues ont été synthétisés pour pallier ce problème. Un bon compromis entre l'activité et la solubilité a finalement été trouvé avec l'introduction du groupement diéthylaminonaphtyle, que porte la molécule HA15. De plus, l'autofluorescence de ce composé s'est avérée très utile à des fins bioanalytiques, telles que le suivi du composé à l'intérieur de la cellule en microscopie de fluorescence ou la réalisation de tests d'affinités via des expériences de FRET.

La molécule HA15, bien que moins active que PB615 in vitro, a montré un profil pharmacologique qui respectait notre cahier des charges en termes de solubilité aqueuse, de distribution et de stabilité en milieu biologique. HA15 a également montré une efficacité tout aussi prometteuse que PB615 sur des souris xénogreffées de mélanome humain, avec une inhibition de

croissance de la masse tumorale d'environ 80 % [24]. De plus, HA15 présente une forte efficacité sur différentes lignées de cellules de mélanome, sensibles ou résistantes, et possédant différents statuts mutationnels. Ainsi, le composé HA15 a relevé le défi de la résistance aux inhibiteurs de B-Raf, face à laquelle les patients sont aujourd'hui en impasse thérapeutique.

Un des paramètres les plus importants à la base de la recherche en cancérologie est la sélectivité des agents chimiothérapeutiques envers les cellules cancéreuses. En effet, tout principe actif anticancéreux est un poison qui doit être toxique pour les cellules cancéreuses, mais (idéalement) inoffensif pour les cellules saines. Une des difficultés majeures en cancérologie réside donc dans le fait d'atteindre des niveaux de sélectivité très hauts, ce qui se traduit par une limitation des effets secondaires dans l'organisme. Il s'avère que HA15 affiche une très bonne sélectivité in vitro envers les mélanocytes sains et les kératinocytes - les cellules les plus proches morphologiquement des cellules de mélanome. De plus, aucun signe majeur de toxicité aigüe n'a été repéré chez la souris (comme par exemple la perte d'appétit ou de poids, des tremblements ou un comportement anormal des animaux). De même, ces composés n'ont révélé aucune toxicité hépatique (absence d'hépatomégalie et de modification des transaminases hépatiques).

Par ailleurs, HA15 s'est avéré actif non seulement sur différentes cellules de mélanome, mais également sur des cellules cancéreuses provenant d'autres organes comme le sein, la prostate, le colon, le pancréas ou le cerveau. Ceci nous a mené à étudier le mécanisme d'action de cette nouvelle famille de composés afin de comprendre l'origine de leur activité et de leur sélectivité envers les cellules cancéreuses.

### Recherche du mécanisme d'action

Des études par microscopie électronique et de fluorescence, d'analyses transcriptomiques et de génomiques ont montré la localisation préférentielle de HA15 dans le réticulum endoplasmique, ainsi qu'une signature caractéristique d'un phénomène dénommé stress du réticulum endoplasmique. Par la suite, pour identifier la cible moléculaire de cette molécule, des expériences de colocalisation, de protéomique à l'aide de sondes d'affinité suivies par de la spectrométrie de masse,

Figure 5 - Création et relations de structure-activité de la molécule HA15.

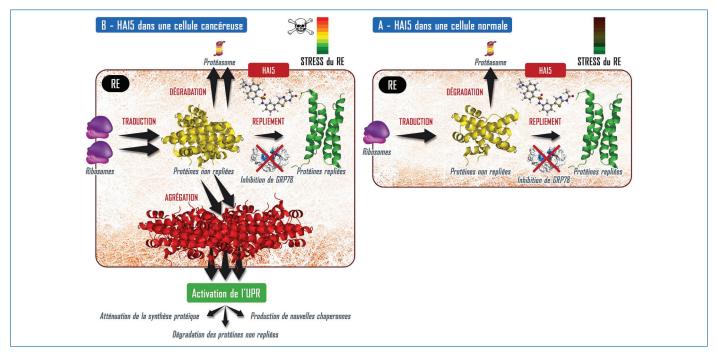


Figure 6 - Action de HA15 dans les cellules saines et cancéreuses. A) La cellule saine touchée par HA15 est privée d'une partie de sa capacité de repliement; elle devient légèrement stressée mais ce stress est soutenable : elle survit. B) La cellule cancéreuse touchée par HA15 est privée de son indispensable capacité de repliement; elle atteint des niveaux de stress insoutenables que l'UPR ne peut plus compenser : elle se suicide.

de calorimétrie différentielle à balayage (DSC) ont identifié la protéine GRP78\* comme cible spécifique de notre molécule dans les cellules de mélanome [24].

### Le réticulum endoplasmique

Le réticulum endoplasmique (RE) est l'organite des cellules eucaryotes qui synthétise les protéines. Cette « usine à protéines » de la cellule est le lieu d'assemblage des acides aminés en chaines protéiques suivant l'information venue du noyau. Le procédé de fabrication comporte plusieurs étapes : 1) la synthèse de la structure primaire d'acides aminés par les ribosomes par traduction des ARN messagers ; 2) la synthèse de la structure secondaire par repliement de la structure primaire grâce à des protéines chaperonnes ; et 3) le transport des protéines vers l'appareil de Golgi où sont opérées des finalisations telles que le clivage de précurseurs, des glycosylations, des sulfatations ou des phosphorylations.

En outre, le RE possède un système de « contrôle qualité », qui permet de réparer les défauts de fabrication (notamment des anomalies au niveau de la structure secondaire: mauvais repliement ou absence de repliement) avant de mettre en circulation les protéines. Si les anomalies ne sont pas réparables, les protéines sont éliminées par le protéasome.

Cependant, plusieurs facteurs peuvent déstabiliser l'équilibre au sein du RE et conduire à l'accumulation de protéines mal repliées, tels qu'une privation de glucose, des variations des conditions redox au sein du RE ou une mauvaise régulation de la concentration en calcium. Cette accumulation de protéines mal repliées, appelée stress du réticulum endoplasmique, est toxique pour la cellule à fortes concentrations.

### La réponse aux protéines non repliées

De forts niveaux de stress du RE entrainent le déclenchement d'un mécanisme de protection cellulaire dénommé « réponse aux protéines non repliées » (ou « unfolded protein response », UPR), qui vise à éliminer l'excédent de protéines malformées. Le système UPR est orchestré par une enzyme pivot : GRP78, qui est à la fois une chaperonne et aide au repliement des protéines, et joue d'autre part le rôle de senseur en déclenchant l'UPR (figure 6). La réponse UPR s'organise en trois axes: 1) l'atténuation de la translation protéique afin de ralentir la production de protéines; 2) le recrutement de nouvelles chaperonnes pour soutenir l'effort de travail de repliement et décroitre le stock de protéines non repliées; et 3) l'évacuation des déchets pour leur destruction par le protéasome. Deux issues sont alors possibles pour la cellule stressée: soit l'activation de l'UPR parvient à résoudre le stress (c'est-à-dire à éliminer l'excédent toxique de protéines malformées) en un laps de temps raisonnable et la cellule retrouve son fonctionnement normal, soit le stress est trop prononcé ou prolongé et ne peut pas être résolu: la cellule se « suicide » alors en entrant en apoptose.

### Stress du réticulum endoplasmique et cancer

Dans les cellules cancéreuses, la synthèse protéique est suractivée pour soutenir le rythme de croissance et de division cellulaire intense à l'origine de la prolifération cellulaire. Cette suractivation et cette rapidité de synthèse protéique entrainent une augmentation de la probabilité et du nombre d'anomalies de repliement. Si la production de protéines malformées dépasse la capacité du système « contrôle qualité » à les traiter, il résulte une accumulation de ces dernières au sein du RE: la cellule est stressée. En quelque sorte, les cellules cancéreuses deviennent « dépendantes » des protéines chaperonnes telles que GRP78. Ces protéines chaperonnes ont donc naturellement été identifiées comme cibles thérapeutiques dans le traitement du cancer [25].

Nos études ont montré que la cible de HA15 est précisément l'enzyme GRP78. Ainsi, HA15 augmente le niveau de stress des cellules en inhibant sa capacité globale de repliement et en provoquant l'accumulation de protéines mal repliées. Les cellules saines, de base peu stressées, sont capables de soutenir le stress induit par HA15, mais les cellules cancéreuses, stressées de manière inhérente, ne sont pas en mesure de soutenir

de stress supplémentaire et se mettent en apoptose. En quelque sorte, on pousse les cellules cancéreuses (stressées par nature) au « burn-out » puis au suicide (*figure* 6).

Il y a un intérêt certain à utiliser des molécules inductrices de stress car leur utilisation ne se limite pas au mélanome, et cette stratégie peut être appliquée *a priori* à n'importe quelle cellule cancéreuse. Ainsi, nous avons montré que HA15 est actif *in vitro* sur plusieurs autres cancers. Par ailleurs, le principal défi actuel est de contrer les phénomènes de résistance (et éviter l'apparition de nouvelles). Or, lors d'expériences de stimulation répétées *in vitro*, nous n'avons pas observé de résistance au composé HA15 alors que dans les mêmes conditions, l'inhibiteur de B-Raf standard vemurafenib induit des résistances au bout de trois mois.

Les raisons de cette absence de résistance restent à étudier. Intuitivement, il n'est pas déraisonnable de penser que les systèmes vivants tendent toujours à s'opposer aux contraintes auxquelles ils sont soumis. De fait, une pression très forte et très localisée telle que l'inhibition nanomolaire d'une enzyme spécifique possédant un statut mutationnel particulier (comme c'est le cas du vemurafenib sur B-Raf V600E) entraine une forte résistance de ce système pour se dégager de la contrainte imposée. A contrario, le dérèglement progressif d'un système impliquant de multiples acteurs protéigues touchant à la survie de la cellule comme l'UPR inflige peut-être une pression moins intense et moins directe mais une gêne plus généralisée, que la cellule aura plus de mal à contrer via les mécanismes de résistance classiques des thérapies ciblées comme la surexpression de la protéine visée ou la mutation de celle-ci. Dans ce sens, certains inhibiteurs sont peut-être victimes de leur trop grande efficacité et sélectivité. Une action moins intense mais plus globale et plus généralisée visant à gêner la cellule cancéreuse simultanément à différents niveaux, plutôt que bloquer de manière très efficace une seule voie, pourrait contribuer à surmonter les phénomènes de résistance.

### Vers un candidat clinique

Malgré l'essor des thérapies ciblées ces dernières années, la plupart des patients atteints de mélanome métastatique - mais aussi de nombreux autres cancers - restent en échec thérapeutique, notamment à cause des phénomènes de résistance à des principes actifs, pourtant initialement très efficaces. Dans ce contexte, nous avons recherché de nouvelles molécules actives, possédant un mécanisme d'action original, et qui permettent de contourner ces phénomènes de résistance. Un aspect original de notre démarche a été de s'appuyer sur l'ancien antidiabétique troglitazone comme point de départ de notre étude, suite à la découverte de propriétés anti-mélanome de ce dernier. En effet, alors que la stratégie classique est de construire un principe actif à partir d'une structure de base (un « hit ») selon un processus dénommé « hit-to-lead », nous avons en guelque sorte fait l'inverse, et identifié un hit en « déconstruisant » un principe actif préconisé pour une autre application, avant de reconstruire une nouvelle molécule active à partir de ce hit.

Le « repositionnement » de principes actifs (c'est-à-dire l'utilisation d'un ancien principe actif pour une application nouvelle) ou la synthèse d'analogues de familles de molécules connues sont des pratiques courantes qui ont fait leurs preuves. Mais afin de créer de nouvelles familles de molécules, de nouveaux pharmacophores sont nécessaires, et donc de nouveaux hits sont requis. Au travers de cette étude, nous avons montré comment la modification de la structure moléculaire d'un principe actif préexistant pouvait être une source d'inspiration pour la conception de nouveaux pharmacophores, et l'obtention de nouveaux composés actifs sur d'autres pathologies.

Le HA15 est actuellement commercialisé par treize entreprises\* à des fins de recherche, et plus particulièrement pour étudier et déchiffrer les mécanismes de stress au niveau du réticulum endoplasmique dans différentes pathologies. La prochaine étape est de développer, en partenariat avec un industriel, un candidat médicament basé sur le prototype HA15 pour un traitement en seconde ligne dans le mélanome métastatique. D'autres pathologies dites « de niche » sont également à l'étude.

- \* Abachemscene, AbovChem, Ark Pharm, Arspichem, ATK Chemical, Atomax Chemicals, AURUM Pharmatech, Chemieliva Pharmaceutical, ChemShuttle, eNovation Chemicals, Haoyuan Chemexpress et Medchemexpress.
- [1] a) Cassileth P.A., Hyman G.A., Treatment of malignant melanoma with hydroxyurea, *Cancer Res.*, **1967**, *27*, p. 1843; b) Gray-Schopfer V., Wellbrock C., Marais R., Melanoma biology and new targeted therapy, *Nature*, **2007**, *445*, p. 851; c) Uong A., Zon L.I., Melanocytes in development and cancer, *J. Cell. Physiol.*, **2010**, *222*, p. 38.
- [2] Pflugfelder A. et al., Malignant melanoma S3-guideline "Diagnosis, Therapy and Follow-up of Melanoma", J. Dtsch Dermatol. Ges., 2013, 11, p. 563.
- [3] a) Balch C.M. *et al.*, Final version of 2009 AJCC melanoma staging and classification, *J. Clin. Oncol.*, **2009**, *27*, p. 6199; b) Narayanan D.L., Saladi R.N., Fox J.L., Ultraviolet radiation and skin cancer, *Inter. J. Dermatol.*, **2010**, *49*, p. 978.
- [4] a) Hanahan D., Weinberg R.A., The hallmarks of cancer, *Cell*, **2000**, *100*, p. 57; b) Hanahan D., Weinberg R.A., Hallmarks of cancer: the next generation, *Cell*, **2011**, *144*, p. 646.
- [5] Lee J., Strickland D., Malignant melanoma: social status and outdoor work, *Br. J. Cancer*, **1980**, *41*, p. 757.
- [6] Bliss J.M. *et al.*, Risk of cutaneous melanoma associated with pigmentation characteristics and freckling: systematic overview of 10 case-control studies, *Int. J. Cancer*, **1995**, *62*, p. 367. [7] Bataille V., de Vries E., Melanoma Part 1: Epidemiology, risk factors, and prevention, *BMJ (Clinical research ed.)*, **2008**, *337*:a2249.
- [8] Koç A., Wheeler L.J., Mathews C.K., Merrill G.F., Hydroxyurea arrests DNA replication by a mechanism that preserves basal dNTP pools, *J. Biol. Chem.*, **2004**, *279*, p. 223.
- [9] a) Carter S.K., Friedman M.A., 5-(3,3-Dimethyl-1-triazeno)-imidazole-4-carboxamide (DTIC, DIC, NSC-45388): a new antitumor agent with activity against malignant melanoma, *Eur. J. Cancer*, **1972**, *8*, p. 85; b) Chapman P.B. *et al.*, Improved survival with vemurafenib in melanoma with BRAF V600E mutation, *New Eng. J. Med.*, **2011**, *364*, p. 2507; c) Hauschild A. *et al.*, Dabrafenib in BRAF-mutated metastatic melanoma: a multicentre, open-label, phase 3 randomised controlled trial, *The Lancet*, **2012**, *380*, p. 358.
- [10] Fernández-Medarde A., Santos E., Ras in cancer and developmental diseases, *Genes Cancer*, **2011**, *2*, p. 344.
- [11] a) Cantwell-Dorris E.R., O'Leary J.J., Sheils O.M., BRAFV600E: implications for carcinogenesis and molecular therapy, *Mol. Cancer Ther.*, **2011**, *10*, p. 385; b) Garnett M.J., Marais R., Guilty as charged: B-Raf is a human oncogene, *Cancer Cell*, **2004**, *6*, p. 313; c) Rahman M., Salajegheh A., Smith R., Lam A.-Y., B-Raf mutation: a key player in molecular biology of cancer, *Exp. Mol. Pathol.*, **2013**, *95*, p. 336.
- [12] Flaherty K.T. *et al.*, Inhibition of mutated, activated B-Raf in metastatic melanoma, *New Eng. J. Med.*, **2010**, *363*, p. 809.
- [13] Malek T.R., Castro I., Interleukin-2 receptor signaling: at the interface between tolerance and immunity, *Immunity*, **2010**, *33*, p. 153.
- [14] Pardoll D.M., The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy, *Nat. Rev. Cancer*, **2012**, *12*, p. 252.
- [15] Kelderman S., Schumacher T.N., Haanen J.B., Acquired and intrinsic resistance in cancer immunotherapy, *Mol. Oncol.*, **2014**, *8*, p. 1132.
- [16] Holohan C., Van Schaeybroeck S., Longley D.B., Johnston P.G., Cancer drug resistance: an evolving paradigm, *Nat. Rev. Cancer*, **2013**, *13*, p. 714.
- [17] Haarberg H.E., Smalley K.S., Resistance to Raf inhibition in cancer, *Drug Discov. Today Technol.*, **2014**, *11*, p. 27.
- [18] Pellowska M., Merk D., Schubert-Zsilavecz M., Advances in personalized medicine: medicinal chemistry and pharmacology of vemurafenib and ivacaftor, *Die Pharmazie-An International Journal of Pharmaceutical Sciences*, **2013**, *68*, p. 484.

[19] Thakur M.D. *et al.*, Modelling vemurafenib resistance in melanoma reveals a strategy to forestall drug resistance, *Nature*, **2013**, *494*, p. 251.

[20] Nazarian R. *et al.*, Melanomas acquire resistance to B-Raf (V600E) inhibition by RTK or N-RAS upregulation, *Nature*, **2010**, *468*, p. 973.

[21] a) Botton T. *et al.*, In vitro and in vivo anti-melanoma effects of ciglitazone, *J. Invest. Dermatol.*, **2009**, *129*, p. 1208; b) Tomic T. *et al.*, Metformin inhibits melanoma development through autophagy and apoptosis mechanisms, *Cell Death Dis.*, **2011**, *2*, e199.

[22] Millet A., Plaisant M., Ronco C., Cerezo M., Abbe,P., Jaune E., Cavazza E., Rocchi S., Benhida R., Discovery and optimization of N-(4-(3-aminophenyl)thiazol-2-yl)acetamide as a novel scaffold active against sensitive and resistant cancer cells, *J. Med. Chem.*, **2016**, *59*, p. 8276.

[23] Ronco C., Millet A., Plaisant M., Abbe P., Hamouda-Tekaya N., Rocchi S., Benhida R., Structure activity relationship and optimization of N-(3-(2-aminothiazol-4-yl)aryl)benzenesulfonamides as anti-cancer compounds against sensitive and resistant cells, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2017**, *27*, p. 2192.

[24] Cerezo M., Lehraiki A., Millet A., Rouaud F., Plaisant M., Jaune E., Botton T., Ronco C., Abbe P., Amdouni H., Compounds triggering ER stress exert anti-melanoma effects and overcome BRAF inhibitor resistance, *Cancer Cell*, **2016**, *29*, p. 805.

[25] Chatterjee S., Burns T.F., Targeting heat shock proteins in cancer: a promising therapeutic approach, *Int. J. Mol. Sci.*, **2017**, *18*, p. 1978.

### Rachid BENHIDA,

directeur de recherche au CNRS, responsable de l'équipe « Molécules bioactives », Université Nice-Côte d'Azur – UM6P Polytechnic University.

### Cyril RONCO,

maitre de conférences, Institut de Chimie de Nice, Université Nice-Côte d'Azur.

### Stéphane ROCCHI,

directeur de recherche Inserm, Centre Méditerranéen de Médecine Moléculaire, Université Nice-Côte d'Azur.

\*rachid.benhida@unice.fr, cyril.ronco@unice.fr, stephane.rocchi@unice.fr

