

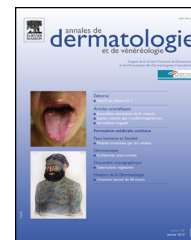


Disponible en ligne sur

**ScienceDirect**  
[www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)

Elsevier Masson France

**EM|consulte**  
[www.em-consulte.com](http://www.em-consulte.com)



MISE AU POINT

## Mécanismes de résistance aux inhibiteurs de BRAF

Mechanisms of resistance to anti-BRAF treatments

J. Charles<sup>a,b,1</sup>, C. Martel<sup>a,1</sup>, F. de Fraipont<sup>c</sup>,  
M.-T. Leccia<sup>a,b</sup>, C. Robert<sup>d</sup>, B. Busser<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Centre de recherche Inserm/UJF U823, institut Albert-Bonniot, BP 170, 38042 Grenoble cedex 9, France

<sup>b</sup> Dermatologie, CHU de Grenoble, CS 10217, 38043 Grenoble cedex 9, France

<sup>c</sup> Unité médicale de biochimie des cancers et biothérapies, institut de biologie et pathologie, CHU de Grenoble, CS 10217, 38043 Grenoble cedex 09, France

<sup>d</sup> Inserm U981, Institut Gustave-Roussy, 114, rue Edouard-Vaillant, 94805 Villejuif-Paris-Sud, France

Reçu le 8 mars 2014 ; accepté le 19 juin 2014

### MOTS CLÉS

Mutation ;  
BRAF ;  
Mélanome ;  
Thérapie ciblée ;  
Vemurafenib ;  
Dabrafenib ;  
Résistance

### Résumé

**Contexte.** — Environ un mélanome sur deux présente une mutation sur le codon 600 du gène *BRAF*. Les patients dont la tumeur est mutée V600 ont une réponse aux traitements par des inhibiteurs de BRAF (vemurafenib ou dabrafenib) le plus souvent rapide et spectaculaire, avec un gain significatif en termes de survie sans progression ou en survie globale. Cependant, s'il existe de rares patients longs répondeurs aux agents anti-BRAF en monothérapie, une résistance au traitement se développe dans la plupart des cas dans un délai médian de 6 mois.

**Objectifs.** — Il est essentiel de comprendre les mécanismes de résistance aux thérapies anti-BRAF afin d'optimiser leur efficacité et d'améliorer les taux de réponse, ainsi que la durée du bénéfice clinique. Cette revue de la littérature décrit les voies de signalisation impliquant BRAF. Les principaux mécanismes de résistance à ces traitements identifiés à ce jour sont décrits, ainsi que les stratégies thérapeutiques alternatives potentielles.

**Méthodes.** — Les mots clés (*resistance*, *BRAF*, *melanoma*, *targeted therapy*, vemurafenib, et dabrafenib) renseignés dans la base de données Pubmed/Medline ont permis de sélectionner

\* Auteur correspondant.

Adresse e-mail : [bbusser@chu-grenoble.fr](mailto:bbusser@chu-grenoble.fr) (B. Busser).

<sup>1</sup> Les deux auteurs ont contribué de façon équivalente à ce travail.

les principales références scientifiques utiles à l'élaboration de ce travail. Cette sélection a pris fin le 31 janvier 2014.

*Discussion.* — Le décryptage et la meilleure compréhension des mécanismes de résistance aux inhibiteurs de BRAF devraient permettre le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques destinées à contourner ces résistances et ainsi à améliorer les taux et les durées de réponse.

© 2014 Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

## KEYWORDS

BRAF;  
Mutation;  
Melanoma;  
Targeted therapy;  
Vemurafenib;  
Dabrafenib;  
Resistance

## Summary

*Context.* — In patients with melanoma positive for the BRAF V600 mutation, clinical response to specific BRAF inhibitors is usually rapid and striking, with significant benefits in terms of progression-free survival and overall survival. However, resistance to treatment almost invariably arises, typically within a median timeframe of 6 months. Indeed, very few patients exhibit long-lasting response to these targeted therapies.

*Aims.* — It is essential to better understand the mechanisms of resistance to targeted anti-BRAF therapies in order to increase both response rates and the duration of clinical response to treatment. This literature review describes the signaling pathways involving BRAF and presents recent data from clinical trials with these molecules. Furthermore, we aim to describe the main resistance mechanisms linked with targeted anti-BRAF therapies.

*Methods.* — The keywords (resistance, BRAF, melanoma, targeted therapy, vemurafenib, and dabrafenib) were used to extract relevant articles in the Medline/Pubmed database published before 31 January 2014.

*Discussion.* — Improved knowledge and understanding of the mechanisms of resistance to targeted anti-BRAF therapies should enable the development of new therapeutic strategies in order to overcome such resistance and allow more significant and sustained response rates to be achieved among melanoma patients.

© 2014 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

Durant les cinq dernières années, des avancées thérapeutiques majeures ont eu lieu dans la prise en charge du mélanome métastatique, tant sous l'angle des thérapies ciblées que des immunothérapies [1]. Cependant, avec près de 11 000 nouveaux cas et 1700 décès en France en 2012, le mélanome cutané demeure un problème crucial de santé publique et son pronostic reste extrêmement réservé au stade métastatique [2].

## La signalisation BRAF dans le mélanocyte

Dans le mélanocyte normal, l'initiation de la cascade de signalisation BRAF se fait par un facteur de croissance qui se lie à la partie extracellulaire d'un récepteur membranaire à activité tyrosine kinase (Fig. 1). Cela conduit à l'activation intracellulaire d'un des trois membres de la famille de RAS (isoformes H-, K-, et NRAS) qui va lui-même interagir avec les molécules de la famille RAF [3]. Les isoformes A-, C-, et BRAF sont des sérine-thréonine kinases, qui s'associent en homo- ou hétérodimères pour permettre la transduction du signal [4]. Les protéines RAF ainsi activées vont à leur tour phosphoryler en cascade les protéines MEK, puis ERK, qui appartiennent à la famille des *mitogen activated protein kinases* (MAPKinase, ou MAPK) (Fig. 1) [5]. Cette voie de signalisation régule des processus cellulaires importants, dont la mise en jeu de facteurs de transcription

capables d'activer la transcription de gènes impliqués dans la croissance, la prolifération et la survie mais aussi dans la migration cellulaire et l'angiogenèse [6].

## La mutation BRAF V600E

La protéine BRAF possède un rôle central dans la voie de signalisation des MAPK, et les mutations de BRAF peuvent entraîner un dérèglement de cette voie. Des mutations oncogéniques du gène *BRAF* sont présentes dans 40 à 50 % des mélanomes malins, principalement dans les mélanomes à extension superficielle (SSM), qui surviennent en zone cutanée présentant peu de dommages actiniques, chez le sujet jeune [1]. La mutation survient le plus souvent au niveau du codon 600 [7]. Des mutations somatiques ponctuelles du gène *BRAF* ont également été détectées dans d'autres tumeurs solides comme le carcinome papillaire de la thyroïde, le cancer de l'ovaire, du sein et du poumon ainsi que dans les cancers colorectaux [8]. Dans le mélanome, la mutation BRAF V600E est la plus fréquente; elle provient du remplacement de la valine du codon 600 [V] par un acide glutamique [E] [9]. Cette mutation a pour conséquence l'activation permanente et non régulée de la voie des MAPK précédemment décrite, sans qu'aucun signal activateur extrinsèque ne soit nécessaire en amont.

## Les inhibiteurs de BRAF

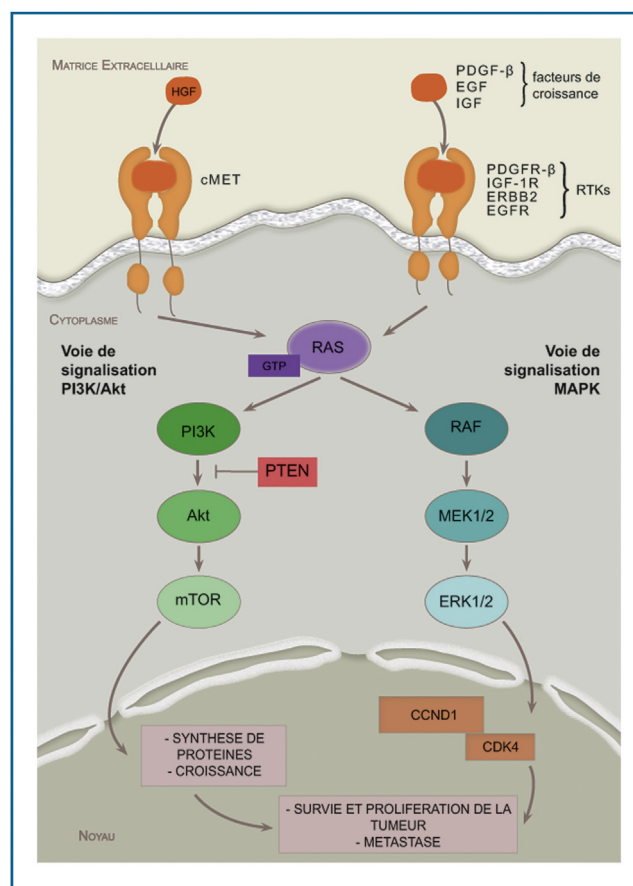
Le mélanome est une tumeur décrite comme étant particulièrement chimio- et radio-résistante et les possibilités thérapeutiques au stade métastatique de la maladie sont restées extrêmement limitées jusqu'à récemment. En effet, la chimiothérapie de référence dans le traitement du mélanome reste la dacarbazine, un agent alkylant ayant obtenu une autorisation de mise sur le marché (AMM) en 1975 et dont les taux de réponse sont de l'ordre de 10 % seulement [10,11]. L'ipilimumab, anticorps monoclonal anti-CTLA-4, a permis dans deux études de phase III d'augmenter de manière modérée la survie globale des patients au stade métastatique [12,13]. L'ipilimumab a obtenu une AMM en traitement de première ligne. Cependant si certains patients présentent des réponses prolongées, les taux de réponses au traitement demeurent faibles, de l'ordre de 10 %, et les effets secondaires dysimmunitaires sont parfois très sévères.

En parallèle, des thérapies ciblées capables d'inhiber sélectivement la croissance des cellules de mélanome porteuses de mutations oncogéniques activatrices ont vu le jour. Ces mutations présentes dans les cellules de mélanomes touchent principalement les gènes *BRAF*, *NRAS* et *KIT*. Nous aborderons ici uniquement les molécules inhibitrices de BRAF.

Le vemurafenib (PLX4032; RG7204; Zelboraf®) est le premier inhibiteur sélectif de BRAF développé en clinique il a obtenu une AMM française et européenne en février 2012. Cet inhibiteur compétitif de l'ATP (adénosine triphosphate) nécessaire à l'activité serine-thréonine kinase de BRAF est prescriptible en monothérapie dans le mélanome non résecable ou métastatique porteur d'une mutation BRAF V600.

Le vemurafenib a été évalué en première ligne dans l'étude de phase III « BRIM-3 », ouverte et randomisée, comparant le vemurafenib (960 mg × 2/j) à la dacarbazine chez 675 patients atteints de mélanome métastatique de stade IIIC non résecable ou de stade IV porteurs d'une mutation BRAF V600 [7,14]. Les données de cette étude ont montré un bénéfice significatif sur la survie globale avec un gain absolu de 3,6 mois en faveur du vemurafenib (survie globale de 13,2 mois dans le groupe vemurafenib versus 9,6 mois dans le groupe dacarbazine). Le taux de réponse globale incluant les réponses complètes et partielles était de 48,4 %. Les événements indésirables les plus fréquemment observés dans le groupe vemurafenib (incidence ≥ 30 %) ont été principalement des arthralgies, une asthénie, des éruptions cutanées, des réactions de photosensibilité, des nausées et une alopecie. Par ailleurs des carcinomes épidermoïdes ont été observés chez 24 % et 12 % des patients traités par vemurafenib, dans les études de phase II et III respectivement, justifiant ainsi une surveillance dermatologique spécifique chez les patients traités par cette molécule.

Le dabrafenib (GSK436 ; GSK2118436 ; Tafinlar®) est également une thérapie ciblée anti-BRAF ayant obtenu une AMM européenne et française en septembre 2013 pour le traitement du mélanome non résecable ou métastatique porteur d'une mutation V600. L'étude de phase III « BREAK-3 » [15], comparant le dabrafenib à la dacarbazine chez 250 patients,



**Figure 1.** Principales voies de signalisation intervenant dans le mélanocyte normal ou malin : la voie PI3K/AKT, à gauche, et la voie des MAPKines, à droite.

a en effet montré des taux de réponse au dabrafenib de 50 % et un bénéfice significatif sur la survie sans progression (5,1 mois dans le groupe dabrafenib versus 2,5 mois dans le groupe dacarbazine). L'étude a révélé des réponses positives au dabrafenib chez des patients présentant des métastases cérébrales, contrairement aux résultats obtenus avec le vemurafenib qui passe probablement moins bien la barrière hémato-encéphalique. Concernant les effets secondaires observés sous dabrafenib, ils sont similaires à ceux observés sous vemurafenib, avec cependant une fréquence inférieure de réactions phototoxiques et de lésions carcino-mateuses.

S'il existe de rares patients longs répondeurs à ces agents anti-BRAF en monothérapie, la plupart développent un échappement thérapeutique après quelques mois de traitement et les réponses cliniques les plus encourageantes sont observées chez les patients bénéficiant d'associations d'agents anti-BRAF et anti-MEK. Le décryptage des mécanismes de résistance que nous allons discuter ci-dessous apporte des données complémentaires orientant vers cette même perspective d'association de thérapies ciblées.

## Mécanismes de résistance aux inhibiteurs de BRAF

Deux types de résistances sont décrits :

**Tableau 1** Mécanismes de résistance aux inhibiteurs de BRAF dans le mélanome.

| Types de résistance | Nom du mécanisme                                                   | Modèles utilisés pour mettre en évidence ces résistances | Références |
|---------------------|--------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------|------------|
| Acquises            | Mutations activatrices de MEK1 et de MEK 2                         | Modèle in vitro, modèle in vivo, tumeurs humaines        | [16–20]    |
|                     | Augmentation de l'expression RAF de type sauvage                   | Modèle in vitro                                          | [21]       |
|                     | Hyperexpression de la protéine agoniste COT                        | Modèle in vitro, tumeurs humaines                        | [23]       |
|                     | Surexpression des récepteurs membranaires PDGFR- $\beta$ et IGF-1R | Modèle in vitro                                          | [24,25]    |
|                     | Mutation activatrice de NRAS                                       | Modèle in vitro, tumeurs humaines                        | [25]       |
|                     | Surexpression de l'oncoprotéine BRAF V600E                         | Modèle in vitro, modèle in vivo, tumeurs humaines        | [27,28]    |
|                     | Variant d'épissage BRAF V600E                                      | Modèle in vitro                                          | [29]       |
|                     | Activation de STAT3 et sécrétion de PAX3                           | Modèle in vitro                                          | [30]       |
|                     | Mutations secondaires de BRAF-L505H                                | Modèle in vitro, modèle in vivo                          | [32,33]    |
|                     | Activation de la voie EGFR                                         | Modèle in vitro, tumeurs humaines                        | [34]       |
|                     | Répression de Bim-EL                                               | Modèle in vitro                                          | [35]       |
|                     | Stimulation de la voie FOX-D3                                      | Modèle in vitro, tumeurs humaines                        | [36,37]    |
|                     | Augmentation du métabolisme oxydatif                               | Modèle in vitro, tumeurs humaines                        | [38]       |
|                     | Augmentation de l'expression de PD-L1                              | Modèle in vitro                                          | [39,40]    |
|                     | Tumeurs humaines                                                   |                                                          |            |
| Intrinsèques        | Suppression de PTEN                                                | Modèle in vitro, modèle in vivo, tumeurs humaines        | [42–44]    |
|                     | Surexpression d'HGF et de MET                                      | Modèle in vitro, modèle in vivo, tumeurs humaines        | [46]       |
|                     | Amplification du gène <i>CCND1</i>                                 | Modèle in vitro, modèle in vivo                          | [48]       |
|                     | Perte/inactivation de NF1                                          | Modèle in vitro, modèle in vivo, tumeurs humaines        | [49,50]    |

- les résistances acquises concernent les patients traités par inhibiteurs de BRAF qui vont présenter une réponse objective initiale au traitement, puis rechuter après développement d'un mécanisme de résistance ; ces résistances ne peuvent donc pas être détectées avant l'introduction de la thérapie anti-BRAF ;
- les résistances intrinsèques concernent les patients d'emblée non-répondeurs aux inhibiteurs de BRAF ; le dépistage de ces résistances permettrait de sélectionner les patients à qui il faut proposer d'autres traitements.

Le **Tableau 1** résume les principaux mécanismes de résistance aux inhibiteurs de BRAF dans le mélanome et le **Tableau 2** montre les possibilités thérapeutiques qui permettraient de contourner chaque mécanisme de résistance, lorsqu'elles existent.

## Résistances acquises

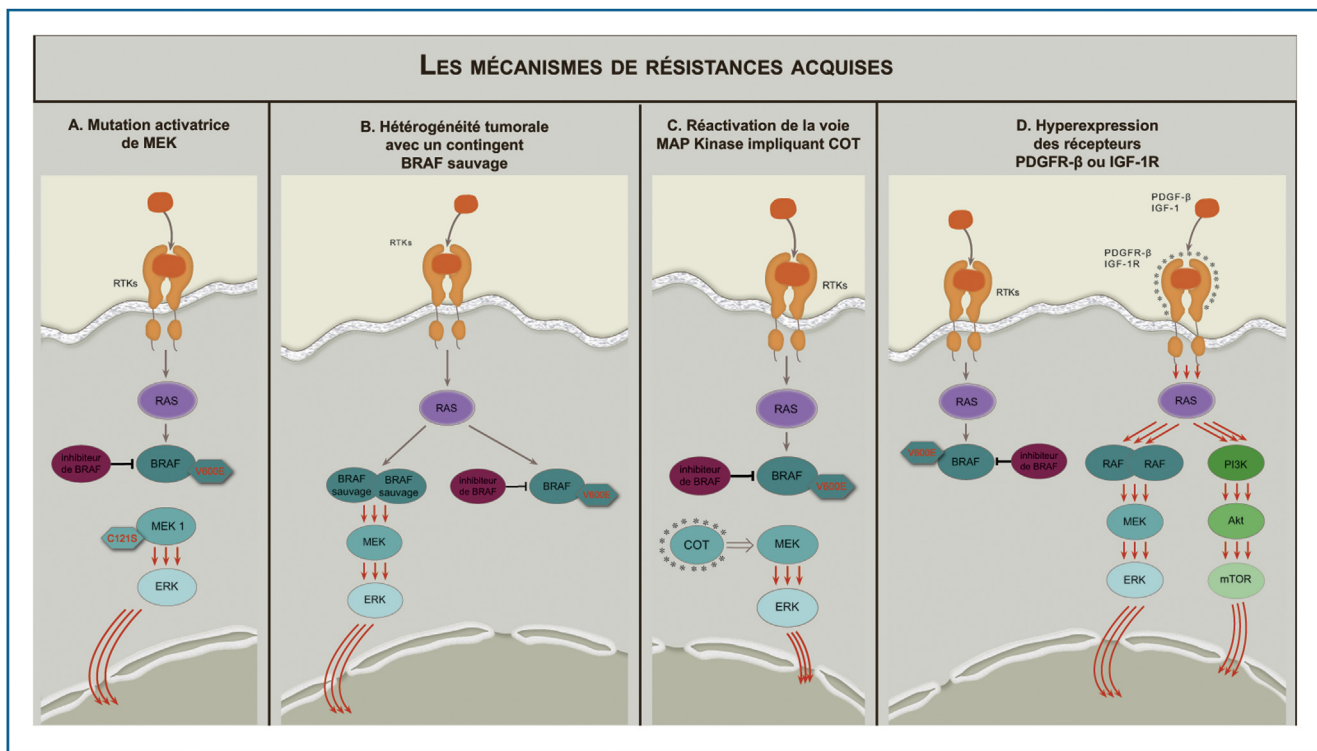
En dépit de la réponse clinique initialement observée chez la majorité des patients traités par inhibiteurs de BRAF, des phénomènes de résistance se développent et la rechute survient quasi-inéluctablement.

## Mutations activatrices de MEK1 et MEK2

Des mutations du gène *MAP2K1* confèrent aux mélanomes BRAF V600E une résistance au vemurafenib [16]. Ce gène code pour la kinase MEK1 située immédiatement en aval de BRAF dans la voie des MAPK (**Fig. 2A**). Le séquençage d'un mélanome traité par vemurafenib en rechute après une réponse spectaculaire au vemurafenib a en effet permis de détecter une mutation de MEK1 (C121S) absente initialement. Cette mutation confère à la fois une résistance au vemurafenib et à un inhibiteur de MEK (AZD6244) in vitro [17]. De même, d'autres mutations acquises de MEK1 et MEK2, telle la C125S, ont récemment été décrites comme capables de conférer une forte résistance aux inhibiteurs de BRAF ou, dans une moindre mesure, les mutations de MEK2 (V35M, L46F, et N126D). Toutes ont été identifiées sur des biopsies réalisées après traitement, lors de la rechute [18]. Enfin, deux autres mutations de MEK1 (P124L et Q56P) confèrent également une résistance au vemurafenib [19].

## Alternative thérapeutique

La combinaison du vemurafenib avec un inhibiteur de MEK (AZD6244) permet de contourner la résistance conférée par la mutation P124L de MEK1 [19].



**Figure 2.** Exemples de mécanismes de résistances acquises aux inhibiteurs de BRAF. A. Mutation activatrice de MEK. La mutation C121S de MEK1 est représentée par un losange bleu. B. Hétérogénéité tumorale avec un contingent BRAF sauvage. C. Réactivation de la voie MAP Kinase impliquant COT. La surexpression de COT est représentée par les astérisques. D. Surexpression des récepteurs PDGFR- $\beta$  ou IGF-1R. La surexpression de ces récepteurs tyrosine kinases est représentée par des astérisques.

### Mutation de MEK2 et amplification de BRAF

La mutation de MEK2 (Q60P) associée à une amplification de BRAF confère une résistance aux agents ciblant BRAF [20].

### Hétérogénéité tumorale avec un contingent BRAF sauvage

Les inhibiteurs de BRAF utilisés en clinique bloquent la signalisation des mélanomes mutés BRAF V600E. En revanche et de façon surprenante, ces traitements semblent augmenter la prolifération des cellules tumorales qui ont un génotype BRAF sauvage (non muté) et/ou NRAS muté [21]. En effet, ces dernières forment des homodimères CRAF-CRAF ou hétérodimères CRAF-BRAF toujours capables d'activer les MAPK en aval, malgré la présence d'inhibiteurs, ce qui rend ces cellules insensibles à l'inhibition de BRAF (Fig. 2B). Dans un contexte où la majorité des mélanomes sont hétérogènes, ce mécanisme permet de favoriser la croissance et la prolifération des sous-clones tumoraux BRAF sauvage (et/ou NRAS muté) par pression de sélection. Cela conduit in fine à l'acquisition paradoxale d'une résistance au traitement, puisque les contingents sélectionnés seront, par essence, non-répondeurs au traitement [21].

### Surexpression de COT

La protéine COT est un agoniste des MAPK capable d'activer les protéines ERK indépendamment de BRAF (Fig. 2C). Des biopsies réalisées sur des lésions de mélanome en rechute après traitement par vemurafenib ont montré de forts niveaux d'expression de l'ARNm de COT par rapport à

la tumeur primitive, ce qui suggère que COT participe à l'acquisition de la résistance aux traitements ciblant BRAF [22]. En outre, l'hyperexpression de COT est également retrouvée dans des lignées cellulaires mutées BRAF V600E avant tout traitement avec les inhibiteurs de BRAF, conférant ainsi une résistance de novo à ces lignées ; cela pourrait expliquer pourquoi 10 % des mélanomes BRAF V600E ont une résistance intrinsèque aux inhibiteurs de BRAF [22].

### Alternative thérapeutique

In vitro, un traitement par un inhibiteur de MEK (AZD6244 ou CI-1040) en combinaison avec un inhibiteur de BRAF entraîne une réduction de la croissance cellulaire et diminue l'activation des MAPK en aval [22]. Ceci plaide à nouveau en faveur de l'association d'inhibiteurs de RAF et de MEK pour réduire le risque d'émergence de résistances des mélanomes mutés BRAF V600E. Par ailleurs, la molécule XL888, un inhibiteur de la protéine du choc thermique HSP90, est également capable de contourner ce mécanisme de résistance [23].

### Surexpression de récepteurs PDGFR- $\beta$ et IGF1-R

Les études de Villanueva et al. montrent que le récepteur IGF1-R est surexprimé à la surface des cellules rendues résistantes au vemurafenib après une exposition prolongée à ce traitement. Ce récepteur à activité tyrosine kinase va activer une voie de signalisation alternative PI3K/AKT [24]. De façon similaire, une autre étude montre que la surexpression et l'activation du récepteur membranaire PDGFR $\beta$  est aussi

**Tableau 2** Combinaisons destinées à contourner certains mécanismes de résistance aux inhibiteurs de BRAF dans la prise en charge du mélanome.

| Mécanisme de résistance en cause                                                                     | Possibilité de combinaison aux anti-BRAF                                                                                                                                                                        |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Mutations de MEK1 et MEK2                                                                            | Inhibiteurs de MEK                                                                                                                                                                                              |
| Surexpression de COT                                                                                 | Inhibiteurs de MEK<br>Inhibiteurs d'HSP90                                                                                                                                                                       |
| Hyperactivation de la voie des MAPK : variant d'épissage, mutation NRAS, surexpression de BRAF V600E | Inhibiteurs de MEK<br>Inhibiteurs de ERK<br>Inhibiteurs d'HSP90                                                                                                                                                 |
| Activation de STAT3 et sécrétion de PAX3                                                             | Inhibiteurs de STAT3                                                                                                                                                                                            |
| Perte de PTEN                                                                                        | Inhibiteurs de PI3 K<br>Inhibiteurs de mTOR                                                                                                                                                                     |
| Signalisation HGF/MET                                                                                | Inhibiteurs de MET<br>Inhibiteurs de HGF                                                                                                                                                                        |
| Amplification CCND1                                                                                  | Inhibiteurs de CDK4/6                                                                                                                                                                                           |
| Augmentation de l'activation de STAT3 et de la sécrétion de PAX3                                     | Inhibiteurs de STAT3                                                                                                                                                                                            |
| Surexpression de l'oncoprotéine BRAF V600E                                                           | Inhibiteurs de MEK<br>Augmentation de la dose de BRAF                                                                                                                                                           |
| Perte/inactivation de NF1                                                                            | Traitements séquentiels<br>Inhibiteurs de MEK<br>Inhibiteurs de mTOR                                                                                                                                            |
| Hyperactivation et surexpression des récepteurs                                                      | Inhibiteurs de PI3 K<br>Inhibiteurs de mTOR                                                                                                                                                                     |
| récepteurs à activité tyrosine kinase (RTKs)                                                         | Inhibiteurs d'Akt<br>Inhibiteurs de l'IGF1-R<br>Inhibiteurs de l'EGFR<br>Inhibiteurs d' HSP90<br>(le ciblage des RTKs est possible avec des inhibiteurs de petites molécules ou avec des anticorps monoclonaux) |
| Répression de Bim-EL                                                                                 | Inhibiteurs de MEK<br>Inhibiteurs d'histone déacétylases                                                                                                                                                        |
| Stimulation de la voie FOX-D3                                                                        | Inhibiteurs ERBB-3                                                                                                                                                                                              |
| Augmentation du métabolisme oxydatif                                                                 | Pro-oxydants                                                                                                                                                                                                    |

un facteur de résistance acquise au vemurafenib in vitro [25] (Fig. 2D).

#### Alternative thérapeutique

Un traitement combinant des inhibiteurs de MEK avec un inhibiteur de l'IGF-1R ou un puissant inhibiteur de PI3 K induit la mort des cellules résistantes aux inhibiteurs de BRAF [24]. Le recrutement et l'activation de récepteurs

membranaires permettent de provoquer la résistance aux traitements ciblant BRAF. Ces récepteurs peuvent donc, logiquement, constituer des cibles à part entière pour freiner ou empêcher cette évolution vers la résistance. Une autre stratégie évidente serait alors de cibler directement le récepteur incriminé, soit par des petites molécules inhibitrices, soit par des anticorps monoclonaux. Des inhibiteurs de ce type sont actuellement testés dans des essais de phase précoce. Enfin, l'emploi d'inhibiteurs d'HSP90 semble également prometteur pour lutter contre les cellules résistantes par la voie PDGFR/IGF1-R [23].

#### Mutation activatrice de NRAS

Les mutations du gène *NRAS* (Q61K et Q61R) sont capables de conférer une résistance au vemurafenib [25]. L'activation constitutive de la voie MAPK qui en résulte favorise une signalisation faisant appel à CRAF et non BRAF, ce qui explique le phénomène de résistance.

#### Alternative thérapeutique

En cas d'acquisition d'une mutation de résistance de type *NRAS* Q61 K, l'emploi d'inhibiteurs de MEK ou d'AKT pourrait s'avérer utile [26]. Dans ce cas également, l'emploi d'un inhibiteur d'HSP90 parvient à contrer ce mécanisme de résistance [23].

#### Surexpression de l'oncoprotéine BRAF mutée V600E

Dans une expérience de xénogreffe chez l'animal, des mélanomes humains rendus résistants au vemurafenib ont développé une addiction à ce traitement pour continuer à proliférer. Cette dépendance vis-à-vis de la voie de signalisation des MAPK est due au fort niveau d'expression de BRAF muté V600E. Lorsque le traitement est arrêté, une régression tumorale est observée [27]. De même, une autre étude confirme sur des lignées cellulaires que la résistance acquise au vemurafenib passe par une surexpression de BRAF V600E. De plus, 20% des patients dont les mélanomes sont devenus résistants présentent une amplification du nombre de copies du gène *BRAF V600E* [28].

#### Alternative thérapeutique

Un traitement séquentiel par vemurafenib pourrait permettre de prévenir l'apparition de résistance [27]. Il s'agirait ainsi d'une stratégie touchant à l'optimisation du schéma de prescription des anti-BRAF, en optant pour des doses discontinues. L'association de molécules anti-MEK aux anti-BRAF semble également efficace pour contrer la résistance acquise par amplification du gène *BRAF V600E* [28].

#### Variant d'épissage de BRAF V600E

À partir de lignées rendues résistantes au vemurafenib, une forme anormalement courte de la protéine BRAF a été trouvée. Cette petite protéine BRAF de 61 kDa correspond à la perte des transcrits des exons 4 à 8, qui codent pour le site de liaison aux protéines RAS. Cette forme tronquée de BRAF ne répond donc plus aux signaux classiques d'activation et demeure réfractaire non seulement à une régulation classique, mais également aux inhibiteurs de BRAF [29].

### Alternative thérapeutique

Ce mécanisme de résistance est dû à un changement de structure de la protéine de BRAF elle-même. Les inhibiteurs de MEK utilisés en combinaison avec le vemurafenib pourraient retarder ou empêcher ce phénomène de résistance.

### Activation de STAT3 et sécrétion de PAX3

La protéine STAT3 est impliquée dans la régulation de différents processus cellulaires comme la croissance, la différenciation, la survie ou l'apoptose. Elle est recrutée lors de l'activation de la voie de signalisation JAK-STAT, après avoir été activée par phosphorylation sur résidus tyrosine par les kinases de la famille JAK. Cette phosphorylation entraîne sa dimérisation et une translocation dans le noyau où elle joue un rôle de facteur de transcription. STAT3 est aussi un transactivateur direct du promoteur de PAX3, un facteur de transcription impliqué dans l'activation du récepteur MET dans le mélanome.

Dans l'étude de Liu et al., il est démontré que les lignées cellulaires BRAF V600E ou NRAS Q61 K résistantes au vemurafenib ont une activation de STAT3 et une surexpression de PAX3, suite à une augmentation de la sécrétion de facteur de croissance fibroblastique 2 (FGF2) [30].

### Alternative thérapeutique

L'emploi d'inhibiteurs de STAT3 en association aux anti-BRAF est une stratégie prometteuse pour contrer ce phénomène de résistance [30,31].

### Mutation secondaire de BRAF

Contrairement à ce qui avait initialement été suggéré, une mutation secondaire de la protéine BRAF elle-même est capable d'induire une résistance aux anti-BRAF. En effet, deux études ont rapporté la présence d'une mutation de substitution de BRAF qui remplace la leucine en position 505 par une histidine (BRAF-L505H) [32,33].

### Activation de la voie de signalisation EGFR

Il a été démontré que ce récepteur membranaire aux facteurs de croissance de la famille de l'*Epidermal Growth Factor* (EGF) était fortement activé in vitro et dans des tumeurs résistantes aux inhibiteurs de BRAF [34].

### Alternative thérapeutique

L'emploi d'inhibiteurs de l'EGFR en association aux anti-BRAF est suggéré pour contourner cette résistance.

### Réduction épigénétique de Bim-EL

Après avoir rendu des cellules de mélanome mutées V600E résistantes aux anti-BRAF, il a notamment été démontré une diminution du niveau d'expression de la protéine pro-apoptotique Bim-EL.

### Alternative thérapeutique

L'association d'anti-BRAF avec des inhibiteurs de MEK ou des inhibiteurs d'histone déacétylases (HDACi) comme le vorinostat ont restauré un niveau d'expression de Bim-EL, ainsi qu'une sensibilité des cellules au traitement [35].

### Stimulation de la voie FOX-D3

Les mélanomes devenus résistants au vemurafenib in vitro «uprégulent» la protéine FOX-D3 [36], qui est alors directement responsable de la transcription d'ERBB3 [37].

### Alternative thérapeutique

Une restauration de la sensibilité aux inhibiteurs de BRAF a pu être obtenue en associant le vemurafenib au lapatinib. Ce dernier agit directement sur la voie EGFR/ERBB2, et indirectement sur la voie d'ERBB3 [37].

### Augmentation du métabolisme oxydatif

Le traitement par vemurafenib augmente le niveau de respiration mitochondriale et la production d'espèces réactives de l'oxygène dans les cellules de mélanome. Une fois devenues résistantes à ce traitement, les cellules présentent une addiction à ce métabolisme oxydatif mitochondrial [38].

### Alternative thérapeutique

De façon paradoxale, l'emploi de traitements pro-oxydants comme l'elesclomol induit la mort des cellules résistantes au vemurafenib. Le mécanisme le plus probable est que cela place les cellules au-delà d'un seuil oxydatif compatible avec leur survie [38].

### Augmentation de l'expression de PD-L1

Des lignées de mélanomes rendues résistantes au vemurafenib réactivent paradoxalement la voie des MAPKines, ce qui aboutit à l'expression de niveaux élevés du ligand PD-L1 (pour *programmed death-1-ligand 1*), une protéine membranaire présente à la surface de certaines cellules tumorales, interagissant avec des récepteurs membranaires de cellules immunitaires tel PD-1. Cette surexpression de PD-L1 n'est à proprement parler pas un mécanisme de résistance à part entière, mais une conséquence de la réactivation de la voie des MAPKines qui découle de la résistance aux anti-BRAF. Il semble donc que les inhibiteurs de BRAF soient capables de moduler indirectement le niveau d'immunité anti-tumorale [39]. Ceci pose les bases d'un rationnel d'association entre les anti-BRAF et les molécules modulatrices de l'immunité anti-tumorale, notamment celles ciblant les voies PD-L1/PD-1 [39]. Ces premiers essais d'association entre molécules immunomodulatrices et inhibitrices de BRAF ont pour l'instant été écourtés du fait de toxicités trop importantes [40].

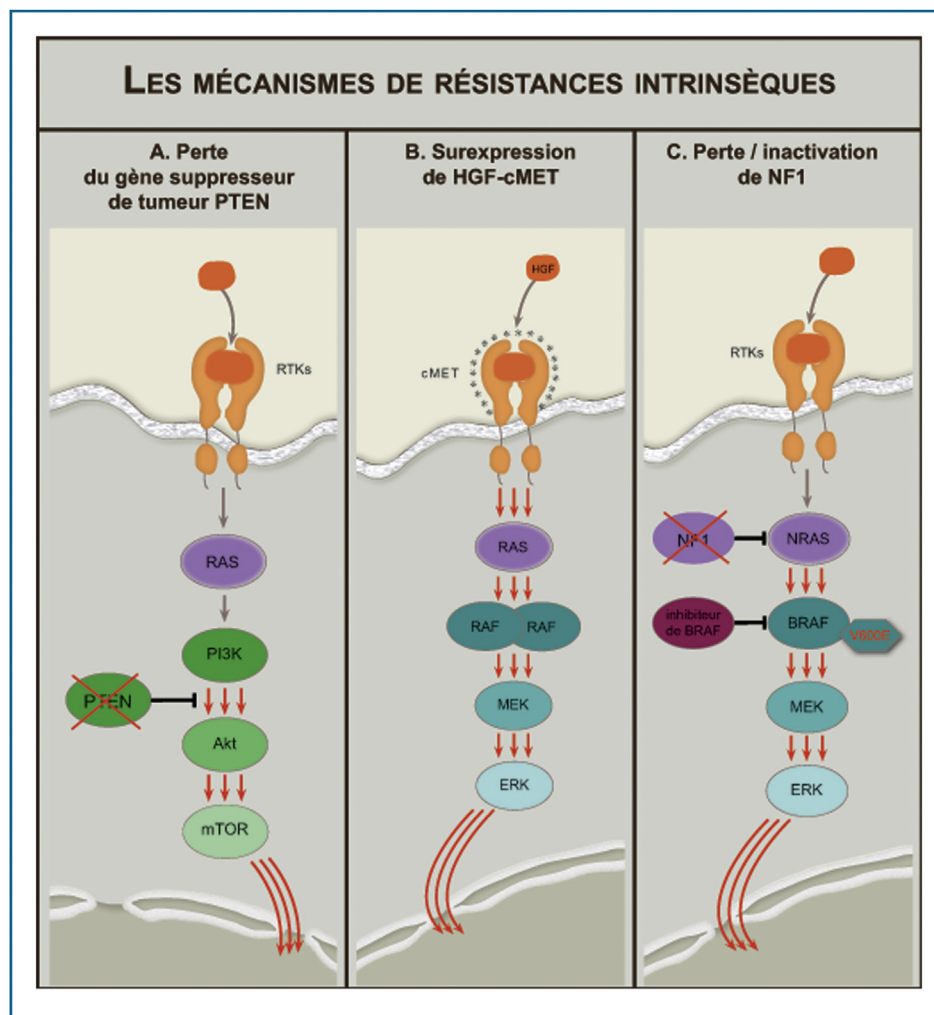
### Alternative thérapeutique

Les inhibiteurs de MEK empêchent l'augmentation du niveau d'expression de PD-L1. De plus, l'emploi de molécules inhibitrices de PD-L1 a également un effet synergique avec les anti-BRAF [39].

Enfin, des résultats préliminaires obtenus sur un patient, mais également confirmés in vitro, montrent qu'une amplification de MITF, protéine dont l'activité est régulée par les MAPK dans les mélanocytes normaux et malins, peut conduire à une résistance aux anti-BRAF [18].

### Résistances intrinsèques

La résistance primaire à l'inhibition BRAF est présente chez moins de 10% des patients atteints de mélanome BRAF mutés V600 traités par vemurafenib. Plusieurs



**Figure 3.** Exemples de mécanismes de résistance intrinsèques aux inhibiteurs de BRAF. A. Perte du gène suppresseur de tumeur PTEN. B. Surexpression de HGF et/ou son récepteur cMET. La surexpression est représentée par les astérisques. C. Mutation activatrice de NRAS Q61 K, représentée par un losange violet.

mécanismes de résistance intrinsèque ont déjà été décrits, parmi lesquels certains sont communs avec les résistances acquises.

### Suppression de PTEN

PTEN est un gène suppresseur de tumeur régulant négativement la voie PI3K/AKT (Fig. 1) [41]. Les mutations de BRAF associées à une perte de PTEN sont trouvées dans environ 20% des mélanomes [42]. Il a été rapporté que la perte de PTEN dans des lignées cellulaires de mélanome BRAF V600E était associée à une résistance à l'apoptose des cellules traitées par anti-BRAF (Fig. 3A) [43]. En conséquence, la détermination complémentaire du statut de PTEN pourrait constituer un biomarqueur prédictif de mauvaise efficacité lors d'un traitement par inhibiteurs de BRAF. De plus, la perte ou l'inactivation de PTEN, objectivée avant le début d'un traitement par dabrafenib, est associée à une plus courte survie sans progression chez les patients atteints de mélanome [44].

### Alternative thérapeutique

Les résistances impliquant cette voie pourraient être contrées par l'ajout d'inhibiteurs de PI3 K, ou d'AKT, ou de la voie mTOR. L'association de ces inhibiteurs semble même encore plus prometteuse [45].

### Surexpression d'HGF et de MET

Le facteur de croissance des hépatocytes (HGF) et son récepteur MET interviennent dans la résistance intrinsèque aux inhibiteurs de BRAF (Fig. 3B). La présence d'HGF atténue la sensibilité des cellules de mélanome au vemurafenib [46]. Les cellules voisines du stroma tumoral vont sécréter ce facteur de croissance pour le compte de la tumeur, ce qui active le récepteur MET à la surface des cellules de mélanome et les voies PI3 K/AKT en aval, induisant la résistance au traitement. Il s'agit donc d'un mécanisme original faisant appel au microenvironnement tumoral. Par ailleurs, les patients inclus dans l'essai BRIM-2 ayant de fortes concentrations sanguines d'HGF ont moins bien répondu au vemurafenib [46]. Ainsi, il est suggéré d'utiliser le niveau du récepteur

ou de ce ligand comme biomarqueurs prédictifs de la non-réponse aux inhibiteurs de BRAF.

### Alternative thérapeutique

L'association d'inhibiteurs de HGF ou de MET à l'inhibition de BRAF permet de rétablir la sensibilité aux inhibiteurs de BRAF [47].

### Amplification du gène *CCND1*

L'amplification du gène *CCND1* entraîne une surexpression de la cycline D1, qui facilite la prolifération tumorale de certains mélanomes. Une résistance primaire au vemurafenib peut être présente lorsque des tumeurs BRAF V600E ont une amplification du gène *CCND1*. Cette anomalie pourrait exister chez 17% des patients atteints de mélanome BRAF V600E [48].

### Perte/inactivation de NF1

Des mutations du gène *NF1* sont souvent mises en évidence dans le mélanome [16]. *NF1* est un gène qui code pour la neurofibromine, protéine impliquée dans la régulation négative de RAS. Des mutations de *NF1* associées à une perte de fonction sont présentes dans des mélanomes et entraînent une résistance au vemurafenib [49]. Un crible « perte de fonction » à haut-débit a identifié *NF1* comme gène le plus impliqué dans la résistance aux inhibiteurs de BRAF (Fig. 3C), et des patients porteurs d'une inactivation de *NF1* n'ont pas tiré profit d'un traitement par vemurafenib [50].

### Alternative thérapeutique

Plusieurs approches sont envisagées pour permettre de contourner la résistance induite par l'absence de neurofibromine liée à la perte ou l'inactivation de son gène *NF1*. Il a été proposé de tester des inhibiteurs de MEK ou de mTOR [49], ou d'utiliser des inhibiteurs de BRAF irréversibles associés ou non à des inhibiteurs d'ERK [50]. Les inhibiteurs irréversibles de BRAF forment une nouvelle génération de molécules inhibitrices de BRAF qui se lient de façon permanente et irréversible au site de fixation de l'ATP de la partie kinase.

### Mutations de MEK1

Très récemment, une étude a révélé que l'on trouvait des mutations de MEK1 chez des patients ne répondant pas ou de manière très courte aux anti-BRAF [18]. Ainsi, les mutations de MEK1 peuvent donc être responsables de résistance à la fois intrinsèques et adaptatives.

De façon similaire, parmi les mécanismes de résistances intrinsèques décrits ci-dessus, la participation de COT et l'hyperactivation de l'EGFR pourraient également être des mécanismes de résistance acquise.

## Conclusion et perspectives

L'émergence des thérapies ciblées a réellement marqué le début d'une nouvelle ère dans la prise en charge du mélanome. Cependant, des résistances acquises ou intrinsèques existent et commencent à être décryptées. Ces résistances sont directement liées à la grande instabilité génétique des cellules tumorales qui peut, de plus, être favorisée et révélée par la pression de sélection exercée

par l'utilisation des nouvelles molécules. La prescription de molécules anti-BRAF en monothérapie dans le traitement du mélanome métastatique, avec une durée d'efficacité limitée dans le temps pour la grande majorité des patients, est un exemple caractéristique des nouvelles situations auxquelles sont désormais confrontés en routine les cliniciens. Dans la prise en charge du mélanome, les stratégies qui se dessinent pour faire face aux résistances sont principalement les traitements séquentiels ou intermittents et les combinaisons de différentes thérapies ciblées. De plus, une caractérisation moléculaire plus complète de la tumeur devrait permettre d'identifier d'emblée les patients susceptibles de ne pas répondre au traitement mais aussi d'objectiver précocement l'émergence de mécanismes de résistance, reposant sur des investigations moléculaires complémentaires répétées tout au long du traitement ou lors de la rechute. L'enjeu scientifique et médical d'une meilleure sélection des patients éligibles aux traitements (ou aux combinaisons de traitements lors d'une rechute) sera indéniablement de développer des marqueurs robustes capables de documenter la résistance à ces traitements. Ces marqueurs pourraient être de différente nature et de ce fait, recherchés par différentes méthodes. Par exemple, pour rechercher une mutation de *NRAS* ou de *MEK*, il faut disposer d'ADN tumoral et de technologies de biologie moléculaire (appareils PCR et séquenceurs). Sur cet ADN, on peut rechercher également des amplifications des gènes (ex. : *CCND1*) ou la perte de gènes (ex. : *PTEN*) par des techniques respectivement d'hybridation in situ en fluorescence ou FISH, et d'hybridation génomique comparative ou CGH. La documentation d'autres mécanismes de résistance comme la présence de variants d'épissage de BRAF ou la surexpression de récepteurs (ex. : *PDGFR/IGF1-R*) ou de ligands (ex. : HGF) nécessiteront d'utiliser des techniques reposant sur l'analyse de l'ARN, (ex. : RT-PCR), ou sur l'analyse des protéines (protéomique, immunohistochimie ou dosages immunologiques). Dans l'hypothèse où l'utilité de ces biomarqueurs sera validée par des essais randomisés sur des cohortes prospectives, les laboratoires de biologie médicale pourraient concrètement avoir à documenter les causes de résistance dans un avenir relativement proche.

L'ensemble de ces avancées concernant la caractérisation tumorale en biologie moléculaire et le développement de nouvelles molécules capables de contrer les mécanismes de résistance devraient donc permettre une prise en charge personnalisée, optimisée et plus durablement efficace pour nos patients atteints de mélanome.

## Déclaration d'intérêts

Les auteurs déclarent ne pas avoir de conflits d'intérêts en relation avec cet article.

## Références

- [1] Eggermont AM, Spatz A, Robert C. Cutaneous melanoma. *Lancet* 2014;383:816–27.
- [2] © Mélanome cutané métastatique – Rapport intégral. Boulogne-Billancourt: Coll. Avis & Recommandations, INCa; 2013.
- [3] Fischer A, Hekman M, Kuhlmann J, Rubio I, Wiese S, Rapp UR. B- and C-RAF display essential differences in their binding to

- Ras: the isotype-specific N terminus of B-Raf facilitates Ras binding. *J Biol Chem* 2007;282:26503–16.
- [4] Beeram M, Patnaik A, Rowinsky EK. Raf: a strategic target for therapeutic development against cancer. *J Clin Oncol* 2005;23:6771–90.
  - [5] Garnett MJ, Rana S, Paterson H, Barford D, Marais R. Wild-type and mutant B-Raf activate C-Raf through distinct mechanisms involving heterodimerization. *Mol Cell* 2005;20:963–9.
  - [6] Gray-Schopfer V, Wellbrock C, Marais R. Melanoma biology and new targeted therapy. *Nature* 2007;445:851–7.
  - [7] Chapman PB, Hauschild A, Robert C, Haanen JB, Ascierto P, Larkin J, et al. Improved survival with vemurafenib in melanoma with BRAF V600E mutation. *N Engl J Med* 2011;364:2507–16.
  - [8] Davies H, Bignell GR, Cox C, Stephens P, Edkins S, Clegg S, et al. Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature* 2002;417:949–54.
  - [9] Busser B, Leccia MT, Gras-Combe G, Bricault I, Templier I, Claeys A, et al. Identification of a novel complex BRAF mutation associated with major clinical response to Vemurafenib in a patient with metastatic melanoma. *JAMA Dermatol* 2013;149:1403–6.
  - [10] Middleton MR, Grob JJ, Aaronson N, Fierlbeck G, Tilgen W, Seiter S, et al. Randomized phase III study of temozolomide versus dacarbazine in the treatment of patients with advanced metastatic malignant melanoma. *J Clin Oncol* 2000;18:158–66.
  - [11] Avril MF, Aamdal S, Grob JJ, Hauschild A, Mohr P, Bonerandi JJ, et al. Fostemurine compared with dacarbazine in patients with disseminated malignant melanoma: a phase III study. *J Clin Oncol* 2004;22:1118–25.
  - [12] Hodi FS, O'Day SJ, McDermott DF, Weber RW, Sosman JA, Haanen JB, et al. Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. *N Engl J Med* 2010;363:711–23.
  - [13] Robert C, Thomas L, Bondarenko I, O'Day S, Weber J, Garbe C, et al. Ipilimumab plus dacarbazine for previously untreated metastatic melanoma. *N Engl J Med* 2011;364:2517–26.
  - [14] Young K, Minchom A, Larkin J. BRIM-1, -2 and -3 trials: improved survival with vemurafenib in metastatic melanoma patients with a BRAF (V600E) mutation. *Future Oncol* 2012;8:499–507.
  - [15] Hauschild A, Grob JJ, Demidov LV, Jouary T, Gutzmer R, Millward M, et al. Dabrafenib in BRAF-mutated metastatic melanoma: a multicentre, open-label, phase 3 randomised controlled trial. *Lancet* 2012;380:358–65.
  - [16] Hodi FS, Watson IR, Kryukov GV, Arolt ST, Imielinski M, Theurillat JP, et al. A landscape of driver mutations in melanoma. *Cell* 2012;150:251–63.
  - [17] Wagle N, Emery C, Berger MF, Davis MJ, Sawyer A, Pochanard P, et al. Dissecting therapeutic resistance to Raf inhibition in melanoma by tumor genomic profiling. *J Clin Oncol* 2011;29:3085–96.
  - [18] Van Allen EM, Wagle N, Sucker A, Treacy DJ, Johannessen CM, Goetz EM, et al. The genetic landscape of clinical resistance to Raf inhibition in metastatic melanoma. *Cancer Discov* 2014;4:94–109.
  - [19] Emery CM, Vijayendran KG, Zipser MC, Sawyer AM, Niu L, Kim JJ, et al. MEK1 mutations confer resistance to MEK and B-Raf inhibition. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009;106:20411–6.
  - [20] Villanueva J, Infante JR, Krepler C, Reyes-Urbe P, Samanta M, Chen HY, et al. Concurrent MEK2 Mutation and BRAF Amplification Confer Resistance to BRAF and MEK Inhibitors in Melanoma. *Cell Rep* 2013;4:1090–9.
  - [21] Poulidakos PI, Zhang C, Bollag G, Shokat KM, Rosen N. Raf inhibitors transactivate Raf dimers and ERK signalling in cells with wild-type BRAF. *Nature* 2010;464:427–30.
  - [22] Johannessen CM, Boehm JS, Kim SY, Thomas SR, Wardwell L, Johnson LA, et al. COT drives resistance to Raf inhibition through MAP kinase pathway reactivation. *Nature* 2010;468:968–72.
  - [23] Paraiso KH, Haarberg HE, Wood E, Rebecca VW, Chen YA, Xiang Y, et al. The HSP90 inhibitor XL888 overcomes BRAF inhibitor resistance mediated through diverse mechanisms. *Clin Cancer Res* 2012;18:2502–14.
  - [24] Villanueva J, Vultur A, Lee JT, Somasundaram R, Fukunaga-Kalabis M, Cipolla AK, 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;18:683–95.
  - [25] Nazarian R, Shi H, Wang Q, Kong X, Koya RC, Lee H, et al. Melanomas acquire resistance to B-Raf (V600E) inhibition by RTK or N-RAS upregulation. *Nature* 2010;468:973–7.
  - [26] Flaherty KT, Robert C, Hersey P, Nathan P, Garbe C, Milhem M, et al. Improved survival with MEK inhibition in BRAF-mutated melanoma. *N Engl J Med* 2012;367:107–14.
  - [27] Das Thakur M, Salangsang F, Landman AS, Sellers WR, Pryer NK, Levesque MP, et al. Modelling vemurafenib resistance in melanoma reveals a strategy to forestall drug resistance. *Nature* 2013;494:251–5.
  - [28] Shi H, Moriceau G, Kong X, Lee MK, Lee H, Koya RC, et al. Melanoma whole-exome sequencing identifies (V600E) B-Raf amplification-mediated acquired B-Raf inhibitor resistance. *Nat Commun* 2012;3:724.
  - [29] Poulidakos PI, Persaud Y, Janakiraman M, Kong X, Ng C, Moriceau G, et al. Raf inhibitor resistance is mediated by dimerization of aberrantly spliced BRAF (V600E). *Nature* 2011;480:387–90.
  - [30] Liu F, Cao J, Wu J, Sullivan K, Shen J, Ryu B, et al. Stat3-targeted therapies overcome the acquired resistance to vemurafenib in melanomas. *J Invest Dermatol* 2013;133:2041–9.
  - [31] Lesinski GB. The potential for targeting the STAT3 pathway as a novel therapy for melanoma. *Future Oncol* 2013;9:925–7.
  - [32] Choi J, Landrette SF, Wang T, Evans P, Bacchiocchi A, Bjornson R, et al. Identification of PLX4032-resistance mechanisms and implications for novel Raf inhibitors. *Pigment Cell Melanoma Res* 2014;27:253–62.
  - [33] Wagenaar TR, Ma L, Roscoe B, Park SM, Bolon DN, Green MR. Resistance to vemurafenib resulting from a novel mutation in the BRAFV600E kinase domain. *Pigment Cell Melanoma Res* 2014;27:124–33.
  - [34] Girotti M, Pedersen M, Sanchez-Laorden B, Viros A, Turajlic S, Niculescu-Duvaz D, et al. Inhibiting EGF receptor or SRC family kinase signaling overcomes BRAF inhibitor resistance in melanoma. *Cancer Discov* 2013;3:158–67.
  - [35] Shao Y, Aplin AE. BH3-only protein silencing contributes to acquired resistance to PLX4720 in human melanoma. *Cell Death Differ* 2012;19:2029–39.
  - [36] Basile KJ, Abel EV, Aplin AE. Adaptive upregulation of FOXD3 and resistance to PLX4032/4720-induced cell death in mutant B-Raf melanoma cells. *Oncogene* 2012;31:2471–9.
  - [37] Abel EV, Basile KJ, Kugel 3rd CH, Witkiewicz AK, Le K, Amaravadi RK, et al. Melanoma adapts to Raf/MEK inhibitors through FOXD3-mediated upregulation of ERBB3. *J Clin Invest* 2013;123:2155–68.
  - [38] Corazao-Rozas P, Guerreschi P, Jendoubi M, Andre F, Jonneaux A, Scalbert C, et al. Mitochondrial oxidative stress is the Achilles' heel of melanoma cells resistant to Braf-mutant inhibitor. *Oncotarget* 2013;4:1986–98.
  - [39] Jiang X, Zhou J, Giobbie-Hurder A, Wargo J, Hodi FS. The activation of MAPK in melanoma cells resistant to BRAF inhibition promotes PD-L1 expression that is reversible by MEK and PI3K inhibition. *Clin Cancer Res* 2013;19:598–609.
  - [40] Schilling B, Paschen A. Immunological consequences of selective BRAF inhibitors in malignant melanoma: Neutralization of myeloid-derived suppressor cells. *Oncoimmunology* 2013;2:e25218.

- [41] Sansal I, Sellers WR. The biology and clinical relevance of the PTEN tumor suppressor pathway. *J Clin Oncol* 2004;22:2954–63.
- [42] Dankort D, Curley DP, Cartlidge RA, Nelson B, Karnezis AN, Damsky Jr WE, et al. Braf (V600E) cooperates with PTEN loss to induce metastatic melanoma. *Nat Genet* 2009;41:544–52.
- [43] Paraiso KH, Xiang Y, Rebecca VW, Abel EV, Chen YA, Munko AC, et al. PTEN loss confers BRAF inhibitor resistance to melanoma cells through the suppression of BIM expression. *Cancer Res* 2011;71:2750–60.
- [44] Nathanson KL, Martin AM, Wubbenhorst B, Greshock J, Letrero R, D'Andrea K, et al. Tumor genetic analyses of patients with metastatic melanoma treated with the BRAF inhibitor dabrafenib (GSK2118436). *Clin Cancer Res* 2013;19:4868–78.
- [45] Deng W, Gopal YN, Scott A, Chen G, Woodman SE, Davies MA. Role and therapeutic potential of PI3K-mTOR signaling in de novo resistance to BRAF inhibition. *Pigment Cell Melanoma Res* 2012;25:248–58.
- [46] Wilson TR, Fridlyand J, Yan Y, Penuel E, Burton L, Chan E, et al. Widespread potential for growth-factor-driven resistance to anticancer kinase inhibitors. *Nature* 2012;487:505–9.
- [47] Straussman R, Morikawa T, Shee K, Barzily-Rokni M, Qian ZR, Du J, et al. Tumour micro-environment elicits innate resistance to RAF inhibitors through HGF secretion. *Nature* 2012;487:500–4.
- [48] Smalley KS, Lioni M, Dalla Palma M, Xiao M, Desai B, Egyhazi S, et al. Increased cyclin D1 expression can mediate BRAF inhibitor resistance in BRAF V600E-mutated melanomas. *Mol Cancer Ther* 2008;7:2876–83.
- [49] Maertens O, Johnson B, Hollstein P, Frederick DT, Cooper ZA, Messiaen L, et al. Elucidating distinct roles for NF1 in melanomagenesis. *Cancer Discov* 2013;3:338–49.
- [50] Whittaker SR, Theurillat JP, Van Allen E, Wagle N, Hsiao J, Cowley GS, et al. A genome-scale RNA interference screen implicates NF1 loss in resistance to RAF inhibition. *Cancer Discov* 2013;3:350–62.