



HAL
open science

Rôle de ICAT (inhibitor of β -catenin and TCF4) dans le développement normal et pathologique des mélanocytes

Mélanie Domingues

► To cite this version:

Mélanie Domingues. Rôle de ICAT (inhibitor of β -catenin and TCF4) dans le développement normal et pathologique des mélanocytes. Médecine humaine et pathologie. Université René Descartes - Paris V, 2014. Français. NNT: 2014PA05T011 . tel-01160394

HAL Id: tel-01160394

<https://theses.hal.science/tel-01160394>

Submitted on 5 Jun 2015

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Université Paris Descartes (Paris 5)

Ecole doctorale GC2iD

Génétique, Cellules, Immunologie, Infectiologie, Développement

Thèse de Doctorat

Pour obtenir le grade de Docteur de l'Université Paris Descartes

Spécialité Biologie Moléculaire et Cellulaire

Présentée par **Mélanie Domingues**

Soutenue publiquement le

10 Juin 2014

Rôle de ICAT (inhibitor of β -catenin and TCF4) dans le développement normal et pathologique des mélanocytes

Dr. Alexandre BENMERAH	Président
Dr. Robert BALLOTTI	Rapporteur
Dr. Philippe CHAVRIER	Rapporteur
Dr. Irwin DAVIDSON	Examineur
Dr. Lionel LARUE	Examineur
Dr. Jacky BONAVENTURE	Directeur de thèse

Pedras no caminho? Guardo todas, um dia vou construir um castelo...

Fernando Pessoa

Aos meus queridos avos que já partiram:

Ao meu avô José

À minha avó Pura

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier l'ensemble des membres de mon jury de thèse, le Dr Alexandre Benmerah, le Dr Robert Ballotti, le Dr Philippe Chavier et le Dr Irwin Davidson. Merci d'avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse. Merci pour le temps que vous avez ou allez consacrer à lire et à juger mon travail.

Je tiens évidemment à remercier Lionel pour m'avoir permis d'intégrer son laboratoire. Grâce à vous j'ai pu assister à différents congrès internationaux et j'ai pu rencontrer de nombreux chercheurs reconnus dans le domaine du mélanome mais également dans d'autres domaines, merci pour cette chance.

Cette thèse n'aurait jamais été la même sans mon incroyable directeur de thèse : le Dr Jacky Bonaventure. Une page ne suffirait pas pour vous dire combien je suis reconnaissante de vous avoir eu comme directeur de thèse, alors je vais essayer de ne pas trop m'étaler ! Jacky, merci pour votre patience et pour les innombrables conseils que vous m'avez donnés !! Merci de m'avoir toujours écouté, d'avoir considéré mes idées (même si elles n'étaient pas toujours géniales !!) et de m'avoir complètement intégré aux différents projets. Grâce à vous j'ai énormément appris et j'ai pu grandir scientifiquement.

Je tiens également à remercier l'ensemble des membres du laboratoire. En effet, durant ces cinq années j'ai rencontré des personnes formidables que je tiens à remercier!!!

Delphine, notre deuxième maman à tous ! Merci pour le temps que tu as passé à me faire découvrir l'animalerie et à m'apprendre comment gérer une lignée de souris !! Une chose est sûre, on se rend vraiment compte de la valeur de certaines personnes que lorsqu'elles ne sont plus là. Merci pour tout ce que tu faisais pour nous !!!

Sophie, l'une de mes premières collègues de bureau. Merci pour ta bonne humeur et ton énergie débordante au labo !!

Irina, tu as toujours été présente pour moi. Avec le temps, tu es devenue bien plus qu'une collègue de bureau. Merci pour tous nos fous rires et pour tous les bons (ou moins bons) moments partagés !!

Florian, que je considère comme un grand frère. Merci pour tous tes conseils avisés concernant la science mais également le reste. De toute façon ceci n'est qu'un au revoir, j'espère qu'on boira encore beaucoup de bières ensemble !!!

Stuart, mon post-doc Australien préféré !! Hope to see you soon ;)

Gwen, qui sait, malgré tout, voir le bon côté des choses et qui est toujours prête à aider les autres. Tout le monde devrait être comme toi !!

Laura Papon, ma collègue de paillasse du tout début !! Merci pour ton aide avec les manip et avec les souris. Merci pour ton soutien et ton amitié !!

Alain, tes goûts musicaux resteront dans toutes les mémoires je pense !! Merci pour la bonne humeur que tu apportais au labo.

Christine Longvert, merci pour les histoires croustillantes sur tes patients et pour ton soutien jusqu'à la fin de ma thèse !!

Valérie, toujours prête à aider son prochain !! Merci pour ton énorme gentillesse !!! Tu devrais peut-être l'être un peu moins d'ailleurs ;))

Alejandro, débarqué de Miami il y a plus de 3 ans mais toujours en plein décalage horaire !! Merci pour toutes nos discussions et pour ton avis réfléchi sur de nombreuses questions scientifiques. N'oublie pas que c'est grâce à moi que tu as rencontré la femme de ta vie, so you owe me one !!!

Roselyne, avec qui j'ai partagé le bureau pendant près de 3 ans !! En tout cas jusqu'à ce que la maîtresse nous change de place pour bavardage ;) Merci pour toutes les conversations et tous les petits ragots qui me permettaient de commencer la journée de bonne humeur. Tu resteras sans aucun doute ma collègue de bureau préférée !!

Maria, notre post-doc libanaise un peu délurée !! Merci pour ton aide avec le FACS et pour tes précieux conseils à la fin de ma thèse.

Madeleine, merci pour tout le moments cultures que tu nous a fait partager et pour la cascade de fous rires qu'ils ont déclenché !! Merci pour ta bonne humeur et ton soutien.

Juliette, ma nouvelle collègue de paillasse. Merci pour cette cohabitation qui s'est toujours bien passée et merci pour ta bonne humeur !!

Audrey, ma copine du sport, la seule qui a tenu jusqu'au bout !!! Merci pour tout ce que tu fais pour nous au labo maintenant que Delphine est partie !! Merci de nous ramener le soleil de Brive tous les Lundis matins après ton week-end !! Mais surtout merci pour tous les bons moments partagés et merci pour ton amitié !!

Leslie, ça a été un plaisir de partager le bureau avec toi. Merci pour toutes nos discussions et pour ta patience quand je n'arrêtais pas de te parler de mon manuscrit et de ma présentation de thèse !!

Zackie, le dernier arrivé dans ce bureau de filles !! Thank you very much for all your advices concerning the thesis. I'm sure you will do great with your french when I will not be here anymore !!

Et enfin, Laura Besnier, fraîchement arrivée au labo. Merci pour ta gentillesse et ta bonne humeur.

Je dois encore remercier toutes les filles pour **THE** soirées filles !! Avec le temps ces soirées sont devenues incontournables !!! Merci pour ces fous rires et ces excellentes soirées que l'on a partagées !! Merci à vous toutes d'être devenues de véritables amies !! Mais pas de panique, je ne pars pas tout de suite donc je pourrais encore venir aux prochaines soirées !!!

Ça a été un énorme plaisir et une grande chance de pouvoir travailler avec vous !!

Je tiens également à remercier l'ensemble du personnel de l'animalerie et surtout Yveline, Helena, Adlin et Jean-Didier. Merci de prendre soin de nos petites souris.

Je souhaite également remercier Elodie et Christophe pour leur aide avec les souris au P3. Merci Christophe pour ta bonne humeur constante.

Merci à Fabrice Cordelières pour son aide précieuse sur la plateforme d'imagerie cellulaire. Les microscopes sont des petites bêtes capricieuses parfois, mais avec Fabrice tout devenait beaucoup plus simple !!

Merci à Sophie Leboucher pour son aide sur la plateforme d'histologie. Merci d'avoir coupé mes blocs à ma place, ça m'a évité bien des problèmes vu tous les accidents qu'il y a eu au labo ;))

Au cours de ces derniers mois j'ai eu la chance de travailler avec Ahmed El Marjou et Patricia Duchambon sur la plateforme de production de protéines recombinantes. Je tiens à les remercier tous les deux pour leur accueil et pour leurs précieux conseils. Patricia, merci pour la confiance que vous m'avez accordée dès le premier jour !!

Je dois un ENORME merci à mes parents et à mon frère !!! Vous m'avez toujours soutenue et sans vous je ne serais jamais arrivée jusqu'ici !! Merci d'avoir toujours cru en moi et d'avoir eu les mots justes dans les moments plus difficiles.

Pour finir, je tiens à remercier mon CHÉRI pour m'avoir soutenue toute au long de ma thèse. Fred, merci de m'avoir supporté et merci d'avoir écouté patiemment mes longues explications sur les PCR, les Western-Blot (et j'en passe) qui ne fonctionnaient pas !!! Merci pour ton soutien sans faille !!!

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	4
TABLE DES MATIERES	7
TABLE DES ILLUSTRATIONS	10
LISTE DES ABREVIATIONS	12
RESUME	14
ABSTRACT	15
INTRODUCTION.....	16
PARTIE A : LA PEAU ET LES MÉLANOCYTES	17
1. <i>La peau : le mélanocyte et son environnement</i>	18
1.1 Structure de la peau	18
1.2 Cellules épidermiques non mélanocytaires.....	19
1.2.1 Kératinocytes	19
1.2.2 Cellules de Langerhans	20
1.2.3 Cellules de Merkel	20
1.3 Les Mélanocytes.....	20
1.3.1 Fonction.....	20
1.3.2 Mélanogenèse.....	21
2. <i>Développement normal des mélanocytes</i>	22
2.1 Origine embryonnaire.....	22
2.2 Migration et différenciation des mélanoblastes.....	23
3. <i>Développement pathologique des mélanocytes</i>	25
3.1 Disfonctionnement des mélanocytes	25
3.1.1 Défaut de développement des mélanocytes	25
3.1.2 Anomalies de fonctionnement des mélanocytes	26
3.1.3 Défaut de présence des mélanocytes : vitiligo	26
3.2 Transformation des mélanocytes: mélanome	27
3.2.1 Épidémiologie du mélanome	28
3.2.2 Facteurs de risque du mélanome	28
3.2.3 Transformation maligne des mélanocytes, un modèle cellulaire de progression tumorale.....	29
3.2.4 Mélanome: symptômes, diagnostic et traitement.....	33
PARTIE B : ICAT (INHIBITOR OF β -CATENIN AND TCF4)	37
1. <i>β-caténine, acteur essentiel de la voie Wnt</i>	38
1.1 Structure de β -caténine	38
1.2 β -caténine: une protéine multifonctionnelle	39
1.3 L'interaction avec les facteurs de transcription TCF/LEF.....	42
1.4 M-MITF : Une cible essentielle de β -caténine dans le lignage mélanocytaire	43

1.5 β -caténine dans le développement normal et pathologique des mélanocytes	44
2. <i>ICAT : un régulateur direct de la voie Wnt/β-caténine</i>	45
2.1 Structure de ICAT	47
2.2 Régulation transcriptionnelle de ICAT	51
3. <i>Rôle de ICAT au cours du développement embryonnaire et chez l'adulte</i>	52
4. <i>Autres régulateurs négatifs directs de la voie Wnt/β-caténine</i>	52
PARTIE C : MÉCANISMES CELLULAIRES ET MOLÉCULAIRES DE LA MIGRATION ET DE L'INVASION	54
1. <i>La migration 2D</i>	55
1.1 Aspects cellulaires	55
1.2 Aspects moléculaires	56
2. <i>La migration 3D</i>	58
2.1 Aspects cellulaires	58
2.1.1 Mode mésenchymateux	58
2.1.2 Mode amiboïde	59
2.1.3 Migration collective.....	60
2.2 Aspects moléculaires	61
2.3 La transition mésenchymateuse-amiboïde (TMA).....	63
3. <i>L'invasion</i>	63
4. <i>NEDD9, un régulateur de la migration et de l'invasion des cellules de mélanome</i> 67	
PARTIE D : PROJET DE THÈSE	70
RÉSULTATS.....	73
PRESENTATION DES RESULTATS.....	74
<i>Partie A : Rôle de ICAT durant le développement embryonnaire murin</i>	74
<i>Partie B : Rôle de ICAT dans la motilité des cellules de mélanome</i>	74
<i>Partie C : Analyse de la structure tridimensionnelle du complexe ICAT/β-caténine</i> 75	
PARTIE A : RÔLE DE ICAT DURANT LE DÉVELOPPEMENT EMBRYONNAIRE MURIN	76
1. <i>Contexte et objectifs du projet</i>	77
2. <i>Résultats</i>	77
2.1 Phénotypes des souris invalidées pour le gène <i>ICAT</i>	77
2.2 Etude du développement embryonnaire des mélanoblastes en absence de ICAT	78
PARTIE B : RÔLE DE ICAT DANS LA MOTILITÉ DES CELLULES DE MÉLANOME. 83	
1. <i>Contexte et objectifs du projet</i>	84
2. <i>Résultats</i>	84
ARTICLE 1 - β-CATENIN INHIBITOR ICAT MODULATES THE INVASIVE MOTILITY OF MELANOMA CELLS.....	85
PARTIE C : ANALYSE DE LA STRUCTURE TRIDIMENSIONNELLE DU COMPLEXE ICAT/ β -CATÉNINE	121
1. <i>Contexte et objectifs du projet</i>	122

<i>2. Résultats</i>	122
ARTICLE 2 - ICAT N-TERMINAL DOMAIN IS ESSENTIAL FOR THE NEGATIVE REGULATION OF β-CATENIN-MEDIATED TRANSCRIPTIONAL ACTIVITY	123
DISCUSSION.....	146
ROLE DE ICAT DURANT LE DEVELOPPEMENT EMBRYONNAIRE MURIN	148
ROLE DE ICAT DANS LA MOTILITE DES CELLULES DE MELANOME	153
ANALYSE DE LA STRUCTURE 3D DU COMPLEXE ICAT/β-CATENINE	159
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	162
ANNEXES.....	177
REVUE 1 - MIGRATION DES CELLULES DU LIGNAGE MELANOCYTAIRE	179
REVUE 2 - CELLULAR AND MOLECULAR MECHANISMS CONTROLLING THE MIGRATION OF MELANOCYTES	186

TABLE DES ILLUSTRATIONS

<i>Figure 1. Représentation schématique de la structure de la peau en trois dimensions.</i>	19
<i>Figure 2. Représentation schématique de la structure de l'épiderme.</i>	21
<i>Figure 3. Origine embryonnaire des cellules de crête neurale.</i>	23
<i>Figure 4. Développement des mélanocytes et des cellules de Schwann depuis les CCN.</i>	24
<i>Figure 5. Représentation schématique de la transformation des mélanocytes en mélanome.</i>	30
<i>Figure 6. Altérations moléculaires dans les mélanomes.</i>	32
<i>Figure 7. Règle de l'ABCDE.</i>	33
<i>Figure 8. Classification de Clark et indice de Breslow.</i>	34
<i>Figure 9. Mécanisme d'action du vemurafenib.</i>	35
<i>Figure 10. Structure tridimensionnelle de la région Armadillo et de l'hélice C de β-caténine.</i>	39
<i>Figure 11. Multilocalisation et multifonctionnalité de β-caténine.</i>	41
<i>Figure 12. Structure tridimensionnelle du complexe TCF/β-caténine Armadillo.</i>	43
<i>Figure 13. Alignement des séquences protéiques de ICAT de différentes espèces.</i>	46
<i>Figure 14. Régulation négative de la voie Wnt/β-caténine par ICAT.</i>	46
<i>Figure 15. Structure tridimensionnelle de ICAT lié à β-caténine.</i>	47
<i>Figure 16. Représentation schématique des résidus assurant l'interaction entre ICAT et β-caténine.</i>	48
<i>Figure 17. Alignement de la séquence consensus et des domaines de liaison à β-caténine de ICAT, LZIC, des membres des familles TCF et Cadhérine.</i>	50
<i>Figure 18. Interaction potentielle entre ICAT et l'hélice C de β-caténine.</i>	51
<i>Figure 19. Représentation schématique de l'activité Rho/Rac dans les cellules en migration.</i>	56

<i>Figure 20. Le cycle d'activation et d'inactivation des GTPases Rho.....</i>	<i>57</i>
<i>Figure 21. Caractéristiques majeures des modes de migration mésenchymateux et amiboïde.</i>	<i>59</i>
<i>Figure 22. Le cycle de vie d'un bleb.</i>	<i>60</i>
<i>Figure 23. Les différents modes de migration cellulaire.....</i>	<i>61</i>
<i>Figure 24. Représentation schématique des molécules régulant l'équilibre et l'interconvertibilité entre les modes de migration mésenchymateux et amiboïde.</i>	<i>62</i>
<i>Figure 25. Formation, caractéristiques moléculaires et fonction des invadopodes.....</i>	<i>66</i>
<i>Figure 26. Représentation schématique des domaines structuraux de NEDD9.</i>	<i>68</i>
<i>Figure 27. Phénotype des souris ICAT+/+ et ICAT+/-.....</i>	<i>77</i>
<i>Figure 28. Phénotype des embryons ICAT+/+ et ICAT-/- prélevés au stade de développement embryonnaire E15.5.</i>	<i>78</i>
<i>Tableau 1. La ségrégation des loci CTNNBIP1/ICAT et Dct::LacZ est possible.....</i>	<i>79</i>
<i>Figure 29. Visualisation des mélanoblastes des embryons E13.5 et E15.5.</i>	<i>80</i>
<i>Figure 30. Nombre de mélanoblastes/mm² des embryons E13.5 et E15.5.</i>	<i>81</i>
<i>Figure 31. Coupes troncales de la peau et nombre de mélanoblastes moyen par coupe des embryons E18.5.....</i>	<i>82</i>

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ADN	Acide désoxyribonucléique
AKT ou PKB	Protein kinase B
APC	Adenomatous Polyposis Coli
ARM	Armadillo
ARN	Acide Ribonucléique
Arp 2/3	Actin related protein 2/3
bHLH	basic helix-loop-helix
BMP	Bone morphogenic protein
BRAF	v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1
BrdU	Bromodeoxyuridine
CAS	Crk-associated substrate
CBP	CREB binding protein
CCN	Cellules de la Crête Neurale
Cdc42	Cell division control protein 42 homolog
CDK4/6	Cyclin dependent kinase 4/6
CDKN2A	Cyclin dependent kinase inhibitor 2A
CK1	Casein Kinase 1
CREB	cAMP Responsive element binding
Det	Daupachrome Tautomérase
DKK	Dickkopf
DMSO	Dimethylsulfoxyde
DOCK3	Dedicator of cytokinesis 3
Dvl	Dishevelled
EDN3	Endothelin 3
EdnrB	Endothelin receptor type 3
EMT	Epithelial-Mesenchyme Transition
ERK	Extracellular Responsive Kinase
FACS	Fluorescence-activated Cell Sorting
FAK	Focal adhesion kinase
FOXD3	Forkhead box D3
GAP	GTPase accelerating protein
GEF	Guanine nucleotide exchange factor
GDI	Guanine dissociation inhibitors
GFP	Green Fluorescent Protein
GS	Ganglions spinaux
GSK3	Glycogen Synthase Kinase 3
GST	Glutathione S-transferase
GTP	Guanosine triphosphate
ICAT	Inhibitor of β -catenin and Tcf4
kDa	KiloDalton
LEF	Lymphoid enhancer factor
LZ	Leucine zipper
MAPK	Mitogen activated Kinase-like Protein
Mb	Mégabase
MC1R	Melanocortin Receptor 1
MEC	Matrice Extracellulaire

MEK	Mitogen activated protein kinase kinase
MITF	Microphthalmia-associated Transcription Factor
MLC2	Myosin light chain 2
MMP	Matrix Metalloprotease
MSA	Migration Staging Area
NEDD9	Neural precursor Expressed Developmentally Down regulated 9
NLS	Nuclear Localization Signal
NRAS	Neuroblastoma RAS oncogene
OCA	Albinisme oculo-cutané
PAX3	Paired-box protein 3
PCS	Précurseur des cellules de Schwann
PI3K	Phosphoinositide-3 Kinase
pRB	protéine du rétinoblastome
PTEN	Phosphate and TENsin Homolog
Rac	Ras-related C3 botulinum toxin substrate
RGP	Radial Growth Phase
Rho	Ras homolog
ROCK	Rho-associated, coiled-coil containing protein kinase
SCP	Shwann Cell Precursor
Snail/SLUG	Zinc finger protein SNAI1/2
SOX	Sry-like HMG box containing gene
TCF	T-cell factor
TGFβ	Transforming Growth Factor β
TN	Tube neurale
TYR	Tyrosinase
TYRP1	Tyrosinase-related protein 1
UV	Ultra-violet
VGP	Vertical Growth Phase
WASP	Wiskott–Aldrich Syndrome Protein
WNT	Wingless-related MMTV Integration Site
WT	Wild-Type
X-gal	5Br-4Cl-3-indonyl-β-D-galactopyranoside

RÉSUMÉ

β -caténine, protéine multifonctionnelle et pivot de la voie de signalisation Wnt est impliquée dans de nombreux processus physiologiques, notamment le développement normal du lignage mélanocytaire. Les régulateurs négatifs directs de β -caténine sont peu nombreux et un nombre réduit d'études leur a été consacré. La protéine ICAT est l'un de ces régulateurs négatifs. En effet, elle se fixe au niveau des répétitions ARM 5 à 12 de β -caténine *via* un domaine N-terminal en hélices α et un domaine C-terminal semblable à un feuillet β , empêchant son interaction avec les facteurs de transcription TCF/LEF et donc la transcription des différents gènes cibles de β -caténine.

L'invalidation complète de ICAT chez la souris entraîne des anomalies développementales des dérivés des crêtes neurales responsables, dans certains cas, de la mort des animaux. Afin de déterminer la fonction de ICAT durant le développement des mélanocytes, qui sont également des dérivés des crêtes neurales, nous avons généré des embryons totalement invalidés pour le gène *ICAT* et exprimant le transgène *Dct::LacZ*. Cette invalidation n'affecte ni le nombre, ni la localisation des mélanoblastes. Ces résultats suggèrent que la prolifération et la migration de ces cellules aux stades étudiés (E13.5, E15.5 et E18.5) est normale en absence de ICAT.

La voie de signalisation Wnt étant dérégulée dans 30% des mélanomes, il nous a paru essentiel d'examiner le rôle de ICAT dans la formation et la progression des mélanomes. L'étude d'un panel de lignées cellulaires de mélanome humain nous a permis de corréliser une forte expression de ICAT à la formation de métastases chez des souris immunodéficientes. De plus chez l'Homme, une forte expression d'ARNm de ICAT dans certains mélanomes est associée à un temps de survie plus faible. La surexpression de ICAT dans différentes lignées humaines de mélanome conduit à une augmentation de la vitesse de migration des cellules en 2D et de leurs capacités invasives en 3D, sans affecter leur prolifération. L'ensemble de ces effets dépend entièrement de l'interaction de ICAT avec β -caténine. Au niveau cellulaire, une expression ectopique de ICAT induit une modification de la morphologie des cellules métastatiques, qui passent d'une forme allongée/mésenchymateuse à une forme arrondie/amiboïde, alors qu'elle n'affecte pas la morphologie allongée des cellules non métastatiques. Cette modification de morphologie cellulaire s'accompagne d'une diminution de l'expression de la protéine NEDD9, une cible de β -caténine, impliquée dans la voie de signalisation Rac communément associée à la migration mésenchymateuse. L'ensemble de ces résultats nous a permis de montrer pour la première fois que ICAT est un nouveau régulateur de la motilité et de l'invasion des cellules de mélanome.

L'étude de la structure tridimensionnelle du complexe ICAT/ β -caténine nous a permis de comprendre le mécanisme de compétition entre ICAT et les facteurs TCF/LEF pour la liaison à β -caténine. Par mutagenèse, nous avons mis en évidence que les résidus D66, F71 et E75 (domaine C-terminal de ICAT) sont impliqués dans la compétition avec LEF1 mais n'empêchent pas la formation d'un complexe stable ICAT/ β -caténine alors que les résidus Y15, K19, V22 du domaine N-terminal sont essentiels à la formation de ce complexe.

ABSTRACT

β -catenin is the central protein of the Wnt signaling pathway, which is involved in many physiological processes including normal melanocyte development. Few direct negative regulators of β -catenin have been described so far and their physiological role is still unclear. One of them, ICAT (inhibitor of β -catenin and TCF-4) has been identified in a yeast two-hybrid screen by using the Armadillo (ARM) region of β -catenin as bait. This small protein of 81 amino-acids, encoded by the highly conserved *CTNNBIP1* gene, binds to β -catenin through ARM repeats 5 to 12, preventing its interaction with TCF4 and thus, repressing TCF/LEF- β -catenin transcriptional activity *in vitro*.

Total invalidation of ICAT in mouse leads to premature death and cranio-facial anomalies, suggesting an important role in neural-crest cell differentiation. In order to determine the possible role of ICAT in melanoblasts development, ICAT *-/-* embryos, on a Dct::LacZ background were obtained. We observed that the total invalidation of the ICAT gene does not affect the number of melanoblasts and their localization at embryonic stages E13.5, E15.5 and E18.5, indicating that ICAT alone does not play a significant role in the proliferation and migration of melanoblasts during mouse development.

The Wnt signaling pathway is deregulated in 30% of melanomas, so we found it essential to study the role of ICAT in the formation and progression of melanoma. We observed that high ICAT levels in a panel of human melanoma cell lines correlated with their capacity to form metastases in nude mice and was associated, in some melanoma patients, with reduced distant metastasis-free survival. Ectopic expression of ICAT in various melanoma cell lines had no effect on their proliferation but increased their *in vitro* motility in 2D and matrigel invasion in 3D. These *in vitro* effects required stable protein interaction between ICAT and β -catenin. At the cellular level, ICAT promoted switching of metastatic melanoma cells from an elongated/mesenchymal towards a round/amoeboid phenotype but did not affect the elongated morphology of non-metastatic melanoma cells. Transition from a mesenchymal to an amoeboid movement was associated with decreased production of the scaffold protein NEDD9 and decreased levels of Rac1-GTP, a positive regulator of mesenchymal movement. *In vivo*, ectopic ICAT expression increased lung colonization by melanoma cells in nude mice. Our results indicate that ICAT-induced down-regulation of Rac signaling can increase motility and invasiveness of metastatic cells by promoting morphological variability allowing tumor cells to adapt to their microenvironment. We show, for the first time, that ICAT is a new potential modulator of melanoma cells invasion.

Based on a three-dimensional study of ICAT in complex with β -catenin we understood how ICAT competes with members of the TCF/LEF family at the nuclear level. By site directed mutagenesis, we demonstrated that D66, F71 and E75 residues (C-terminal domain of ICAT) are involved in the competition with LEF1 but are not essential in the formation of a stable ICAT/ β -catenin complex, while Y15, K19, V22 residues (N-terminal domain) are essential for the formation of this complex.

INTRODUCTION

*PARTIE A:
LA PEAU ET
LES MÉLANOCYTES*

1. La peau : le mélanocyte et son environnement

1.1 Structure de la peau

La peau est l'organe le plus grand du corps humain, elle représente environ 16% de son poids total. Elle forme la première barrière de protection de l'organisme contre la plupart des microorganismes et une grande partie des rayons UV. De plus, ses deux millions de pores contribuent à la régulation de la température du corps par la rétention ou l'élimination d'eau. Elle est composée de différentes couches de cellules qui ont chacune un rôle et une morphologie bien définis (Tortora, 2007). De la surface vers la profondeur on trouve l'épiderme, couche épithéliale superficielle, le derme, couche intermédiaire constitué de tissu conjonctif dense et enfin l'hypoderme, couche profonde constitué de tissu conjonctif lâche (**Figure 1**).

❖ L'épiderme

L'épiderme, la couche la plus superficielle, est composé d'un épithélium pavimenteux stratifié et non vascularisé. L'épiderme est une couche épithéliale fine localisée sur la lame basale de matrice extracellulaire qui sépare l'épiderme du derme. Il est composé de quatre types de cellules : les kératinocytes, qui synthétisent la kératine, les mélanocytes, qui produisent la mélanine responsable de la pigmentation de la peau, les cellules de Langerhans, qui participent à la réponse immunitaire de la peau et les cellules de Merkel qui sont des mécanorécepteurs.

❖ Le derme

Le derme est la couche la plus épaisse de la peau. Il est composé d'une couche mince superficielle (derme papillaire) de tissu conjonctif lâche et d'une autre plus épaisse (derme réticulaire) de fibres conjonctives résistantes constituées de collagène et d'élastine. De plus, le derme à la particularité d'être un tissu vascularisé et innervé composé majoritairement de fibroblastes et de macrophages. L'association de fibres de collagènes et d'élastine dans le derme réticulaire confère à la peau sa résistance, son extensibilité (capacité à s'étirer) et son élasticité (capacité à reprendre sa forme initiale après étirement).

❖ L'hypoderme

L'hypoderme est la couche la plus profonde de la peau. L'hypoderme est un tissu conjonctif lâche richement vascularisé et est principalement composé d'adipocytes spécialisés dans le stockage des graisses. Ce sont les glandes sudoripares, localisées au niveau de l'hypoderme, qui permettent la régulation de la température du corps. L'hypoderme joue également un rôle de protection des organes profonds et d'amortisseur des chocs.

Au niveau du derme et de l'hypoderme prennent également naissance ce qu'on appelle les annexes de la peau :

- les glandes sudoripares exocrines, qui fabriquent la sueur aqueuse
- les glandes sudoripares apocrines, responsables de l'odeur corporelle
- les glandes sébacées qui secrètent le sébum, film hydrolipidique qui protège l'épiderme
- les follicules pileux des poils et des cheveux, associés à une glande sébacée.

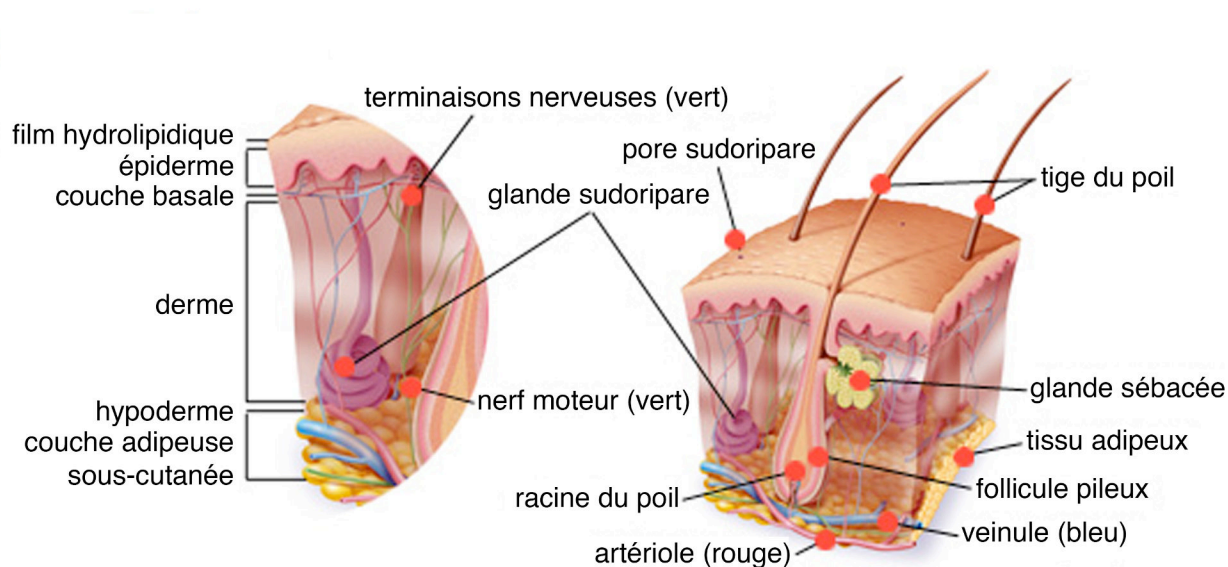


Figure 1. Représentation schématique de la structure de la peau en trois dimensions.

La peau humaine est constituée de trois couches principales dont les cellules interagissent afin d'assurer les différentes fonctions de la peau. L'épiderme est la couche la plus superficielle, le derme est la couche intermédiaire et l'hypoderme la couche la plus profonde. <http://www.arcagy.org/infocancer>.

1.2 Cellules épidermiques non mélanocytaires

1.2.1 Kératinocytes

Les kératinocytes, population majoritaire de l'épiderme, constituent 90% de la couche superficielle de la peau (épiderme) et des phanères (ongles, cheveux, poils, plumes, écailles). Ils synthétisent la kératine (kératinisation), une protéine fibreuse et insoluble dans l'eau, qui assure à la peau sa propriété d'imperméabilité et de protection extérieure.

1.2.2 Cellules de Langerhans

Les cellules de Langerhans sont des cellules dendritiques, elles constituent 2 à 4% de la population cellulaire épidermique. Elles sont rares dans la couche basale et sont situées préférentiellement en position suprabasale dans l'épiderme. Elles émettent de fins prolongements cellulaires entre les kératinocytes avec lesquels elles sont en contact étroit par l'intermédiaire d'une liaison entre deux molécules de E-cadhérine, présentes sur chacun des deux types cellulaires. Les cellules de Langerhans sont des cellules présentatrices d'antigènes qui sont capables de capter des antigènes cutanés, de les transporter de la peau jusqu'aux ganglions lymphatiques régionaux puis de les présenter aux lymphocytes T, participant ainsi à la réponse immunitaire.

1.2.3 Cellules de Merkel

Les cellules de Merkel, population cellulaire minoritaire de l'épiderme, se situent dans la couche basale de l'épiderme ainsi qu'au niveau du bulge dans les follicules pileux. Les cellules de Merkel sont des mécanorécepteurs responsables de la sensation tactile fine. Elles détectent, grâce à leurs microvillosités, les déformations localisées proches d'elles et libèrent des neuromédiateurs vers les fibres nerveuses. Chez l'adulte, le pourcentage de cellules de Merkel varie de 0,5 à 5% dans l'épiderme mais varie également au cours de la vie et selon les régions du corps. Au sein de l'épiderme, les cellules de Merkel sont des acteurs-clés du système neuro-endocrino-immuno-cutané. Elles envoient des prolongements dendritiques entre les kératinocytes et les cellules de Langerhans et peuvent former des synapses avec des neurones sensoriels.

1.3 Les Mélanocytes

1.3.1 Fonction

Les mélanocytes constituent environ 8% des cellules épidermiques. Ce sont des cellules dendritiques spécialisées dans la synthèse de mélanine responsable de la couleur de la peau, des yeux et des cheveux. Chez la souris, la majorité des mélanocytes se situent dans les follicules pileux, mais ils peuvent également se trouver au niveau du derme. Chez l'homme, les mélanocytes se localisent principalement dans l'épiderme où ils établissent des contacts avec les kératinocytes adjacents (**Figure 2**). Un mélanocyte est capable d'interagir avec 36 kératinocytes par l'intermédiaire de ses dendrites (Fitzpatrick and Breathnach, 1963; Yaar and Gilchrest, 2004). Ce sont ces dendrites qui

permettent le transfert de la mélanine aux kératinocytes. Le processus de production de la mélanine, la mélanogénèse, sera décrit au chapitre suivant.

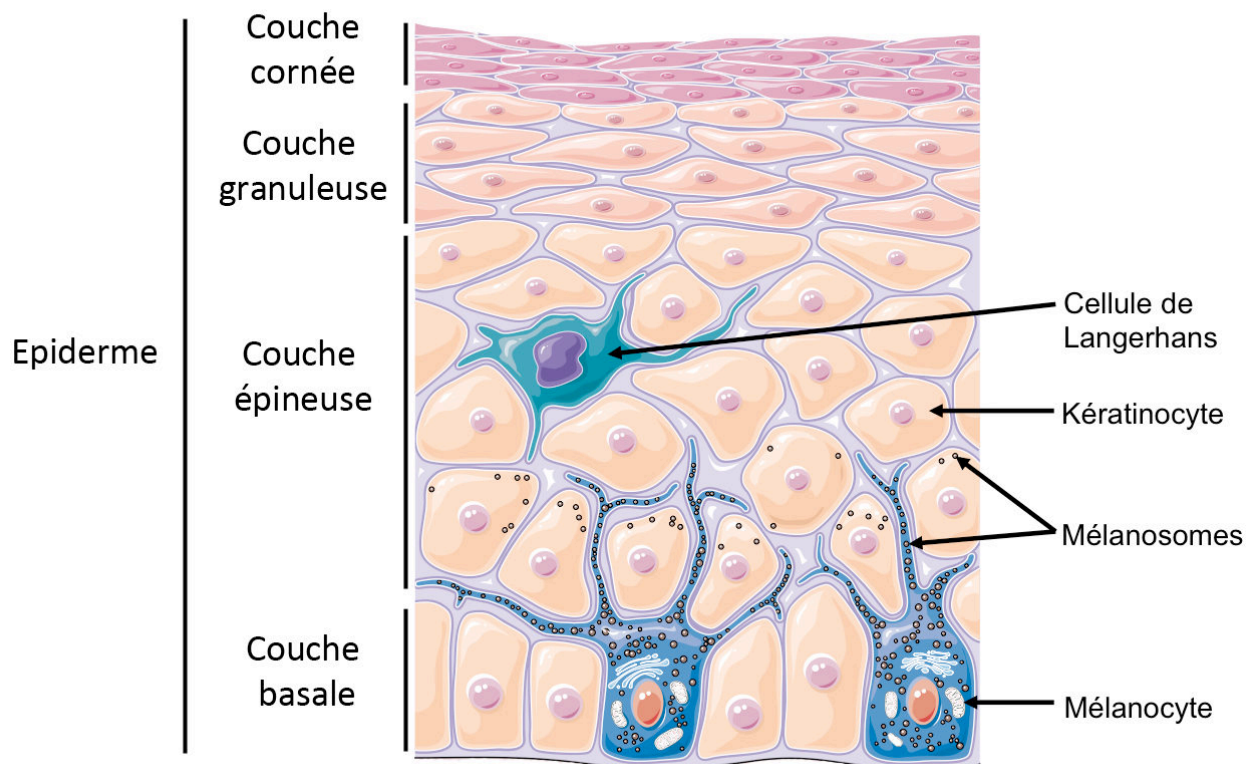


Figure 2. Représentation schématique de la structure de l'épiderme.

Les quatre couches de l'épiderme sont représentées : la couche cornée, la couche granuleuse, la couche épineuse et la couche basale. Le mélanocyte est situé au niveau de la couche basale de l'épiderme. Ses dendrites s'insinuent entre les kératinocytes adjacents pour transférer les mélanosomes, vésicules contenant la mélanine. <http://www.arcagy.org/infocancer>.

1.3.2 Mélanogénèse

La mélanine est produite dans des organelles spécialisés à l'intérieur des mélanocytes: les mélanosomes qui sont des organelles apparentés aux lysosomes (Orlow, 1995). La synthèse des pigments mélaniques fait intervenir trois enzymes: la tyrosinase (Tyr), la Dopachrome Tautomérase (Dct/Tyrp2) et la Tyrosinase-related protein (Tyrp1). Les mélanocytes produisent deux types de pigments : l'eumélanine de couleur marron/noire et la phéomélanine de couleur jaune orangée. L'équipe du Dr Wakamatsu K. a évalué les niveaux d'eumélanine et de phéomélanine chez des individus aux cheveux noirs, marron foncés, marron, marron clairs, blonds et roux. Son équipe a observé que le contenu d'eumélanine diminue dans cet ordre alors que la quantité de phéomélanine,

bien que très faible, reste constante. Chez les personnes aux cheveux roux des niveaux égaux de phéomélanine et d'eumélanine ont été retrouvés (Ito and Wakamatsu, 2011).

La production de mélanine peut être induite par différents facteurs internes tels que, l'âge, la région du corps ou encore des anomalies génétiques. Certains facteurs externes, comme le contact avec des toxines ou des infections microbiennes, peuvent également conduire à la production de mélanine. Cependant, le facteur externe le plus connu reste l'exposition aux rayons UV. En effet, une exposition prolongée aux rayons UV induit la production de mélanine et donc une augmentation de la pigmentation de la peau (bronzage). La mélanine est capable de protéger les cellules contre les effets délétères des rayonnements ultra-violet, notamment les dommages à l'ADN (Miyamura et al., 2007) en absorbant plus de 99% des rayons UV et en les restituant sous forme de chaleur (Meredith and Riesz, 2004). Cependant, seule l'eumélanine protège contre les rayons UV (Bliss et al., 1995).

2. Développement normal des mélanocytes

2.1 Origine embryonnaire

Le lignage mélanocytaire est établi à partir d'un nombre restreint de cellules de la crête neurale (CCN) qui sont des cellules progénitrices pluripotentes pouvant être considérées comme le quatrième feuillet embryonnaire. Les CCN émergent selon l'axe antéropostérieur au moment de la fermeture du tube neurale (**Figure 3**). Les voies de signalisation Wnt, BMP, FGF et Notch sont impliquées dans la formation des CCN. Ces différentes voies de signalisation agissent ensemble pour activer un ensemble de facteurs de transcription au cours des diverses étapes du développement des CCN. Ces facteurs de transcription peuvent être regroupés en quatre groupes : les facteurs qui dirigent la spécification des bords de la plaque neural, les facteurs qui dirigent la spécification des CCN, les facteurs qui dirigent la transition épithélio-mésenchymateuse des CCN, et les facteurs qui dirigent la différenciation des CCN en différents types cellulaires. Un certain nombre de facteurs sont utilisés de manière récurrente et contrôlent plusieurs de ces processus (Prasad et al., 2012). Parmi les facteurs de transcription régulant spécifiquement la différenciation des CCN en cellules pigmentaires on trouve Sox10, Mitf et Pax3 (Taylor and LaBonne, 2007).

Durant le développement, la fermeture du tube neural arrive dès le 8^{ème} jour de gestation (E8) chez la souris et au 22^{ème} jour de gestation chez l'homme. Une fois spécifiées, les CCN vont migrer puis se différencier en deux temps (**Figure 4**), pour finalement atteindre leurs localisations finales (Ernfors, 2010). Tout d'abord, une première vague de CCN migre dorsolatéralement, depuis le tube neural jusqu'à l'épiderme, se différenciant en mélanocytes (Dupin and Le Douarin, 2003). Puis, une

seconde vague de CCN migre dorsoventralement, se différenciant en précurseurs bipotents schwann-mélanocytes donnant naissance aux cellules de schwann du système nerveux ainsi qu'aux mélanocytes de la deuxième vague (Adameyko et al., 2009).

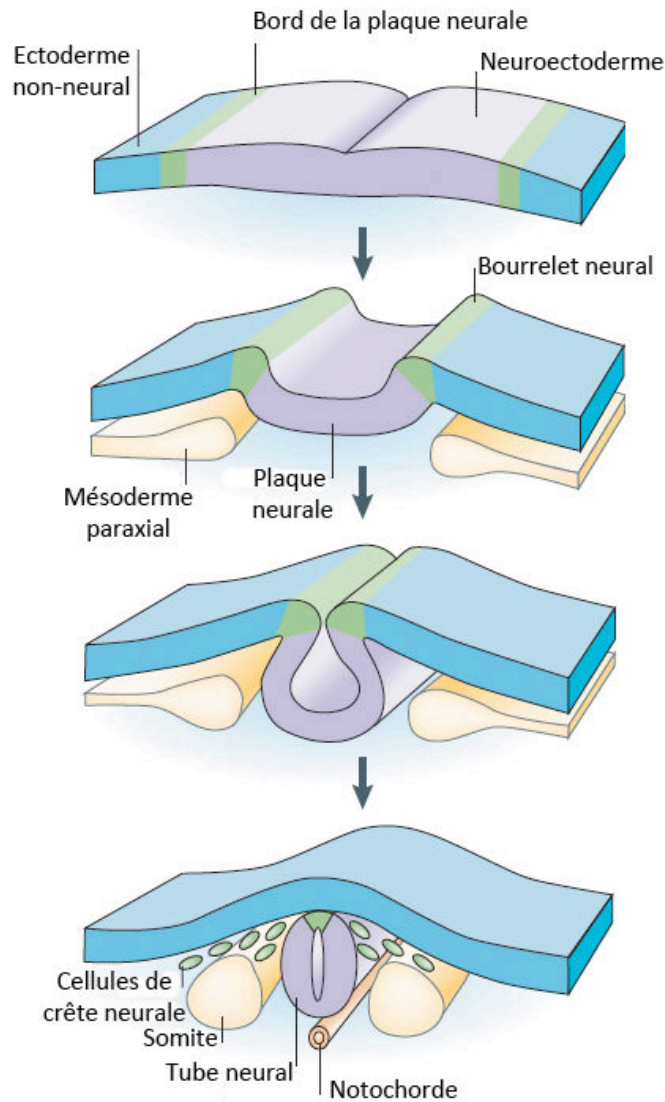


Figure 3. Origine embryonnaire des cellules de crête neurale.

Pendant la neurulation, les bords de la plaque neurale se soulèvent et se rejoignent, entraînant la formation du tube neural. Les cellules de crête neurale délaminent à partir du toit du tube neural au niveau de la jonction avec l'ectoderme. Adapté de (Gammill and Bronner-Fraser, 2003).

2.2 Migration et différenciation des mélanoblastes

Les mélanoblastes précurseurs émergent très tôt durant le développement embryonnaire. Chez la souris les premiers mélanoblastes se différencient à E8,5 (Wilson et al., 2004). Ces mélanoblastes précurseurs prolifèrent intensément et produisent des mélanoblastes progéniteurs dans la « Migration

Staging Area » (Wehrle-Haller and Weston, 1995). Après un jour de prolifération, les mélanoblastes progéniteurs forment les mélanoblastes qui migrent dorsolatéralement entre les somites et l'ectoderme (E10,5-E11) (Le Douarin and Kalcheim, 1999). Ils envahissent le derme, puis l'épiderme à partir du jour embryonnaire E13 et pénètrent dans les bulbes pileux naissants à partir de E15 (Luciani et al., 2011). Après leur arrivée dans les follicules pileux les mélanoblastes se divisent en deux populations distinctes : les mélanocytes différenciés responsables de la couleur du poil et les cellules souches mélanocytaires localisées dans la niche du follicule pileux, le « bulge » responsables du renouvellement des mélanocytes lors des cycles pileux suivants (Moore and Lemischka, 2006).

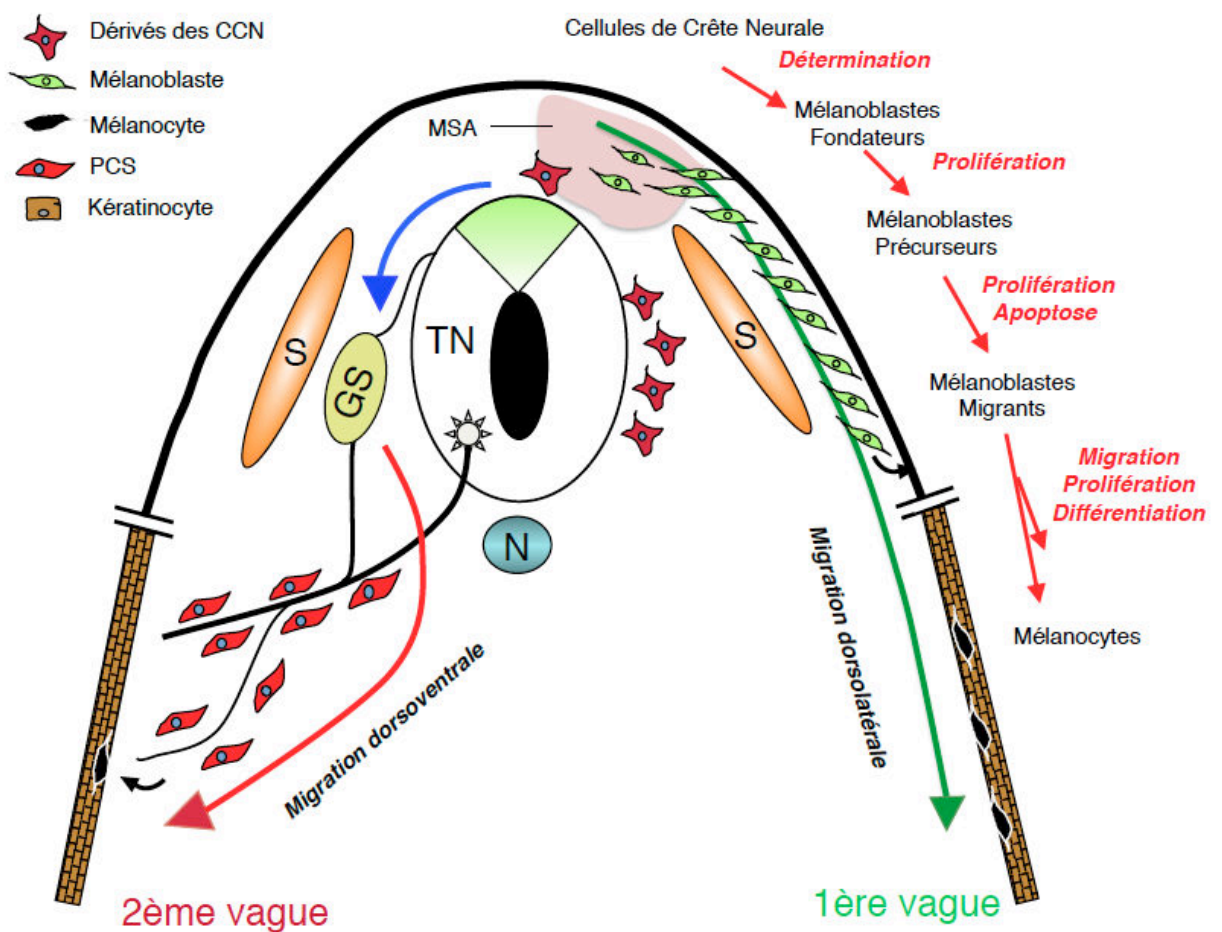


Figure 4. Développement des mélanocytes et des cellules de Schwann depuis les CCN.

Au niveau tronc les CCN migrent selon la voie dorsoventrale (flèche bleue) entre les somites (S) et le tube neural (TN). Ces cellules vont se différencier, entre autre, en neurones des ganglions spinaux (GS). Les mélanoblastes migrent selon la voie dorsolatérale (flèche verte) puis se différencient en mélanocytes de la première vague. Une deuxième vague de mélanocytes (flèche rouge) se différencie à partir des précurseurs de cellules de Schwann (PCS). CCN= cellules de crête neurale; MSA= migration staging area; N = notochorde. Adapté de (Bonaventure et al., 2013).

3. Développement pathologique des mélanocytes

Différents disfonctionnements des mélanocytes, notamment un défaut de développement ou encore des anomalies de fonctionnement, peuvent conduire à l'apparition de différentes maladies de la pigmentation. Les cellules peuvent également subir une transformation maligne qui conduira à l'apparition d'un cancer de la peau (un carcinome ou un mélanome).

3.1 Disfonctionnement des mélanocytes

3.1.1 Défaut de développement des mélanocytes

Les défauts de développement des mélanocytes conduisant à une réduction ou à une absence totale de pigmentation sont généralement causés par une perte de fonction des gènes codant pour des protéines impliquées dans le développement du lignage mélanocytaire, tels que *KIT*, *MITF* et *PAX3*.

Le Piébaldisme est une maladie héréditaire rare caractérisée par une absence de pigmentation de la peau du front et par une mèche de cheveux blancs au niveau du front. Cette maladie est parfois associée à des troubles oculaires et auditifs. Les patients atteints de Piébaldisme présentent une perte de fonction ou une mutation dominante négative du gène *KIT*, codant un récepteur Tyrosine kinase (Oiso et al., 2013).

Le syndrome de Waardenburg est causé par une anomalie de migration ou de différenciation des cellules de la crête neurale pendant le développement embryonnaire. Ce syndrome a été décrit pour la première fois en 1951 et il se caractérise par une surdité associée à des anomalies de pigmentation de la peau, des cheveux ou de l'iris (Waardenburg, 1951). Il existe quatre catégories du syndrome de Waardenburg, définies selon la présence ou l'absence de ces anomalies. Le type 1 (SW1) est caractérisé par une surdité congénitale, une hypopigmentation partielle des cheveux et un déplacement latéral de l'angle de l'œil (dystopia canthorum). Le type 2 (SW2) se différencie du type 1 par l'absence de « dystopia canthorum ». Le SW3 ou syndrome de Klein-Waardenburg est similaire au SW1 mais il est également caractérisé par des anomalies au niveau des membres supérieurs. Le SW4 ou syndrome de Waardenburg-Shah présente des caractéristiques de la maladie de Hirschsprung (anomalie de fonctionnement de la partie terminale de l'intestin se traduisant par une occlusion intestinale) en plus du SW2 (Wildhardt et al., 2013).

Le syndrome de Waardenburg est génétiquement hétérogène. Des mutations ponctuelles du gène *PAX3* sont décrites comme étant la cause la plus fréquente des SW1 et 3. Le SW1 peut être causé par des substitutions d'acides aminés conservés au niveau du domaine de liaison à l'ADN, des mutations du site d'épissage, des mutations non-sens et des insertions ou suppressions menant à une altération du cadre de lecture. Les mutations de *PAX3* dans le SW1 sont toutes hétérozygotes alors que dans le SW3 les mutations peuvent être hétérozygotes et homozygotes. Le SW2 résulte de mutations de *MITF* et *SOX10*. Le SW4 est, quand à lui, causé par des mutations dans différents gènes, tels que *EDN3*, *EDNRB* et *SOX10* (Wang et al., 2014).

3.1.2 Anomalies de fonctionnement des mélanocytes

Le défaut de fonctionnement des mélanocytes est la cause de différentes maladies, toutes caractérisées par une réduction ou une absence totale de pigmentation de la peau, des yeux et des cheveux. Entre autre, on trouve l'albinisme oculo-cutané (AOC) qui est défini par un ensemble de défauts héréditaires liés à une anomalie de la synthèse de la mélanine. Il existe quatre formes d'AOC qui résultent d'une perte de fonction de différents gènes : *TYR* pour AOC1, *OCA2* pour AOC2, *TYRP1* pour AOC3 et *SLC45A2* pour AOC4 (<http://www.espcr.org/micemut/>).

Parmi les maladies causées par une anomalie de fonctionnement des mélanocytes on trouve également les syndromes d'Hermansky-Pudlak, de Chediak-Higashi ou encore de Griscelli. Ces maladies sont provoquées par des défauts de biogenèse et de maturation des mélanosomes. Cependant, celles-ci sont bien plus graves et souvent fatales car elles combinent un AOC et une maladie systémique.

3.1.3 Défaut de présence des mélanocytes : vitiligo

Le vitiligo se manifeste par la disparition localisée des mélanocytes présents dans l'épiderme. Le vitiligo est une pathologie multifactorielle et polygénique induisant inévitablement la réduction voire la perte totale des mélanocytes de l'épiderme. Plusieurs théories ont été décrites pour expliquer cette perte, mais aucune ne peut encore l'expliquer entièrement. Ces théories, développées seules ou combinées les unes aux autres, impliquent : une déficience auto-immune (Ongenaes et al., 2003), une cytotoxicité neuronale (Tu et al., 2001) ou encore une balance redox déficiente associée à une altération du taux de calcium (Schallreuter et al., 1999). Enfin une théorie plus récente, « la mélanocytorrhagie » propose qu'un défaut d'adhésion des mélanocytes de la lame basale pourrait

être à l'origine de leur disparition (Gauthier et al., 2003). Le détachement des mélanocytes de la lame basale et des kératinocytes adjacents, serait suivi d'une migration transépidermale qui aboutirait à la disparition des cellules pigmentaires.

3.2 Transformation des mélanocytes: mélanome

Il existe trois catégories distinctes de cancer de la peau:

- ❖ Le carcinome basocellulaire qui est le cancer de la peau le plus fréquent, réunissant 75% des cas. Il se développe à partir des kératinocytes de la lame basale de l'épiderme et ne conduit pas à la formation de métastases. Les chances de guérison avoisinent les 100%.
- ❖ Le carcinome spinocellulaire qui est plus rare et représente environ 20% des cas de cancer de la peau. Il se développe à partir des kératinocytes superficiels de l'épiderme et contrairement au précédent, il peut s'étendre jusqu'aux ganglions ou même d'autres organes. Les chances de guérison s'élèvent à 90%.
- ❖ Le mélanome cutané qui est la forme la plus agressive mais également la plus rare avec seulement 5% des cas. Des études cliniques ont montré que 25% des mélanomes résultent de la transformation maligne des mélanocytes alors que les 75% restant se développent *de novo* et se détectent généralement à un stade avancé de la maladie (Bevona et al., 2003). Ce type de cancer se caractérise par une forte propension à former des métastases (Chin et al., 1997). En dépit des récents progrès dans le diagnostic de la maladie et de l'avènement de nouvelles molécules, telles que le vemurafenib et l'ipilimumab, ce cancer est responsable de 80% des décès suite à cancer cutané et il n'est guérissable que s'il est traité de façon précoce, avant dissémination (Kuphal and Bosserhoff, 2009). Bien que moins communs, il existe trois autres types de mélanome. Le mélanome acral qui se développe également à partir des mélanocytes de la peau mais uniquement au niveau de la surface sublingual, de la plante des pieds ou des paumes. Le mélanome muqueux qui se développe au niveau des muqueuses respiratoires, digestives et reproductrices. Et enfin, le mélanome uvéal qui se développe à partir des mélanocytes de la choroïde, du corps ciliaire ou de l'iris des yeux. Ces différents types de mélanome sont caractérisés par des mutations spécifiques, ce qui permet le développement de thérapies ciblées (Woodman et al., 2012). Dans la suite de l'introduction je m'intéresserai uniquement au mélanome cutané.

3.2.1 Épidémiologie du mélanome

Le nombre de nouveaux cas de mélanome dans le monde augmente plus rapidement que n'importe quel autre type de cancer et ce, en dépit des nombreuses campagnes de prévention et de détection. L'incidence du mélanome a triplé au sein de la population caucasienne durant les 20 dernières années, avec environ 132000 nouveaux cas chaque année (Organisation Mondiale de la Santé). Cependant des études récentes menées en Australie, en Europe, au Canada et aux Etats-Unis suggèrent que l'incidence du mélanome pourrait avoir atteint un pic (*©La situation du cancer en France en 2012*).

Avec environ 11000 nouveaux cas en France en 2012, dont 51% survenant chez la femme, le mélanome cutané se situe au 9^{ème} rang des cancers et représente 3,1% des cancers incidents (Données de l'Institut National du Cancer). Les taux de survie varient en fonction du sexe, ainsi à 1 an la survie est de 97% chez la femme et de 95% chez l'homme. À 5 ans les taux de survie sont respectivement de 89 et 83% (Siegel et al., 2014). Le taux de survie dépend également du stade de la maladie au moment du diagnostique. Environ 80% de ceux dont le mélanome a déjà métastasé au moment du diagnostique décèderont avant 5 ans (Siegel et al., 2014). On comprend alors facilement l'importance d'un diagnostique précoce de ce type de cancer.

3.2.2 Facteurs de risque du mélanome

Le mélanome, comme de nombreux autres cancers, est une maladie multifactorielle. Certains facteurs de risque pouvant mener à l'apparition de ce type de cancer ont pu être mis en évidence:

- ❖ L'exposition au soleil et aux rayonnements UV artificiels constitue le facteur environnemental prédominant conduisant à la formation des cancers de la peau et en particulier des mélanomes;
- ❖ Le type de peau ou phototype (pigmentation de la peau et degré de sensibilité aux rayonnements UV). Les phototypes sont classés selon une échelle allant de I à VI (peau blanche pâle, peau très claire, peau claire, peau mate, peau foncée, peau noire). Les personnes de phototype I présentent le plus grand risque de former des mélanomes (Osterlind et al., 1988);

- ❖ La présence de plus de 50 naevi de plus de 2mm, le syndrome de naevi dysplasiques et la présence de naevi congénitaux géants constituent également des facteurs de risque (Grulich et al., 1996);
- ❖ Les antécédents familiaux de mélanome (5 à 10% des cas) et la présence de mutations au niveau des gènes majeurs de susceptibilité : *CDK4*, *CDKN2A* et *MC1R* (Loo et al., 2003; Tucker and Goldstein, 2003).

3.2.3 Transformation maligne des mélanocytes, un modèle cellulaire de progression tumorale

La progression tumorale est un processus multi-étape caractérisé, selon Hanahan et Weinberg, par l'acquisition de huit capacités biologiques: le maintien de la signalisation proliférative indépendamment des facteurs de croissance, la reprogrammation du métabolisme énergétique, l'insensibilité à la destruction immunitaire, la résistance à la mort cellulaire programmée (apoptose) permettant l'immortalité répliquative, l'induction de l'angiogenèse, l'activation de l'invasion et la formation de métastases (Hanahan and Weinberg, 2000, 2011).

La transformation des mélanocytes en mélanome se déroule en plusieurs étapes (**Figure 5**). Les premières, considérées comme bénignes, vont de la formation de nævus, ou grain de beauté, jusqu'au stade RGP (*radial growth phase* ou phase de croissance horizontale). Au stade RGP, ils se multiplient de manière horizontale, sans franchir la lame basale. La croissance des mélanomes au stade RGP dépend des facteurs de croissance produits de manière exocrine par d'autres types cellulaires de la peau. Le passage de la phase RGP à la phase VGP (*vertical growth phase* ou phase de croissance verticale) est extrêmement important car les cellules se multiplient très activement de manière verticale, en pénétrant de plus en plus profondément dans le derme. À ce stade, elles sont devenues invasives, la lame basale est fragmentée et ne constitue plus un obstacle à l'invasion du derme. Très fréquemment, leur croissance devient indépendante des facteurs de croissance. La phase ultime de transformation est l'acquisition du pouvoir métastatique par les cellules malignes.

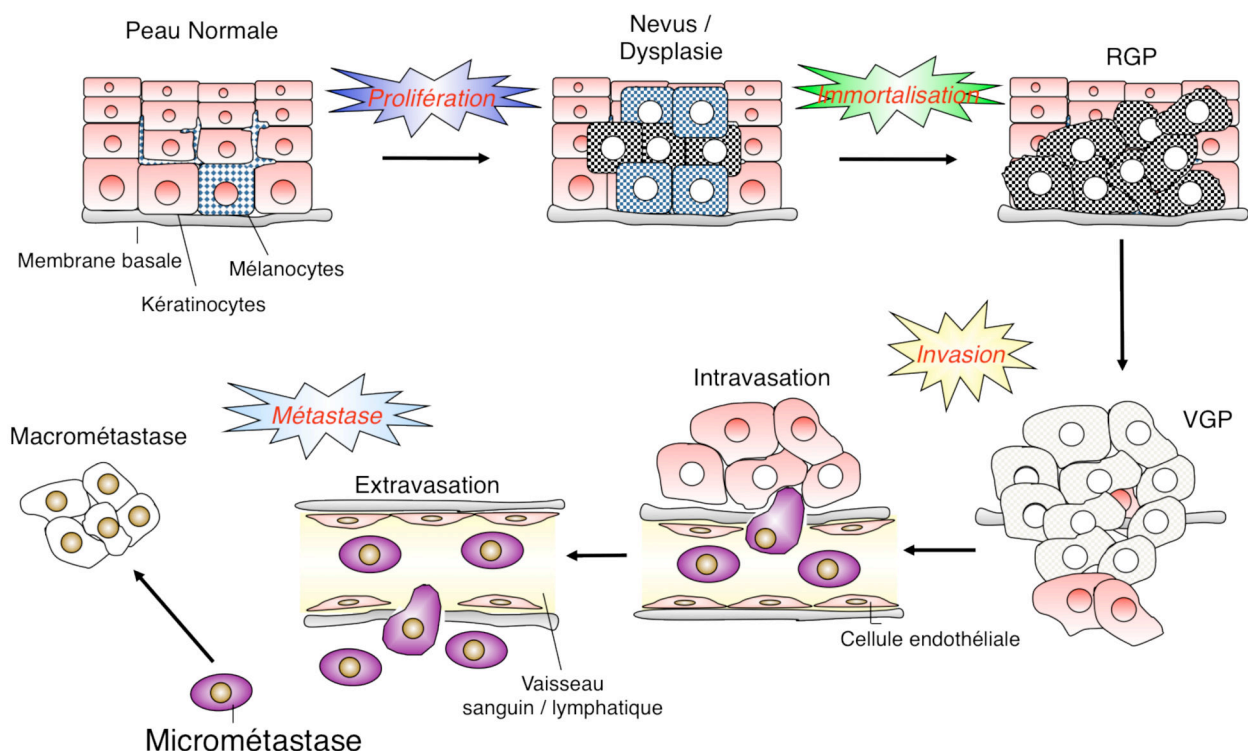


Figure 5. Représentation schématique de la transformation des mélanocytes en mélanome.

Dans la peau normale, les dendrites des mélanocytes s'insinuent entre les kératinocytes. Le naevus apparaît lorsque les mélanocytes commencent à proliférer et à s'agréger. Le naevus est dit dysplasique quand les mélanocytes prolifèrent de façon incontrôlée. La phase d'extension horizontale (RGP) est considérée comme le premier stade de tumorigénicité. La phase d'extension verticale (VGP) est considérée comme le premier stade vers le phénotype invasif, menant au mélanome métastatique. Les cellules subissent ensuite une intravasation pour s'infiltrer dans les systèmes vasculaires et lymphatiques, puis une extravasation pour envahir d'autres tissus et former des métastases. Adapté de (Larue and Beermann, 2007).

Au niveau moléculaire, les mélanomes cutanés peuvent être caractérisés par:

1) l'activation de la voie des MAP kinases, *via* une mutation activatrice du récepteur à tyrosine kinase *KIT* ou *via* des mutations activatrices de *B-RAF* ou *N-RAS*, 2) l'activation de la voie PI3K, 3) le contournement de la sénescence *via* la délétion du gène *CDKN2A* (**Figure 6**) ou 4) l'activation constitutive de la voie de signalisation Wnt/ β -caténine.

1) Le mélanome cutané, comme de nombreux autres cancers, est caractérisé par une dérégulation de la voie MAPK. En effet, le taux global de mutations activatrices de *B-RAF* chez les patients atteints de mélanome avoisine les 45%. *B-RAF* est majoritairement muté au niveau de l'exon 15, qui code la région catalytique de la protéine induisant une forte augmentation de son activité. La

substitution de la valine en position 600 (V600), plus spécifiquement la substitution V600E, représente environ 95% des mutations *B-RAF* retrouvées (Woodman et al., 2012). Des mutations de *N-RAS* sont également retrouvées dans environ 30% des mélanomes (Davies et al., 2002). La majorité des mutations affectent le résidu Q61 dans l'exon 2 (environ 80% des cas). Des mutations des résidus G12 et G13 dans l'exon 1 sont également retrouvées dans environ 20% des cas (Woodman et al., 2012). Les mutations activatrices de *N-RAS* et *B-RAF* sont dans la plupart des cas mutuellement exclusives. La présence simultanée des deux mutations n'a été observée que dans 1% des cas. Enfin, une étude récente a permis l'identification d'une mutation activatrice de *H-RAS* (Q61L) dans les métastases de mélanomes cutanés (Kunz et al., 2013). Le récepteur tyrosine kinase *KIT* est également muté dans 1% des cas de mélanome cutané. Cependant ce récepteur est muté dans 15-20% des cas de mélanome acral ou muqueux (Woodman et al., 2012).

2) La voie de signalisation PI3K-PTEN-AKT est impliquée dans de nombreux processus cellulaires tels que la prolifération, la migration, la survie cellulaire et la différenciation. Cette voie de signalisation peut être activée de différentes façons dans les mélanomes. Les deux voies les plus communes sont les mutations activatrices de *N-RAS* (15-20% des cas) et la perte d'expression de *PTEN* (20-30% des cas). Des études de séquençage ont permis l'identification d'autres événements génétiques conduisant à l'activation de la voie PI3K-PTEN-AKT dans les mélanomes. Parmi ces événements on compte notamment l'apparition de mutations activatrices de *AKT1* et *AKT3* dans 1-2% des cas. (Conde-Perez and Larue, 2012; Kwong and Davies, 2013).

3) La sénescence cellulaire, ou l'arrêt de la prolifération dans des cellules normales après un nombre défini de divisions, est contrôlée par des gènes suppresseurs de tumeurs tels que *CDKN2A*. En effet, dans des cellules normales l'activation de p16INK4a, protéine codée par le gène *CDKN2A*, inhibe l'activité des kinases CDK4/6, induisant un blocage de la transition G1-S et donc un arrêt du cycle cellulaire. La voie de signalisation p16-CDK4/6 est dérégulée dans environ 90% des mélanomes. Une délétion du gène *CDKN2A* est retrouvée dans 50% des mélanomes primaires (Curtin et al., 2005). À cela s'ajoute l'extinction de l'expression de ce gène, *via* la méthylation de son promoteur, dans 19% des cas de mélanomes invasifs (Straume et al., 2002). De plus, une étude menée sur des lignées cellulaires de mélanome a montré que 100% des lignées n'ayant pas d'altération de p16 avaient une autre altération au niveau de la voie p16-CDK4/6 (Gray-Schopfer et

al., 2006). Les différents membres de cette voie de signalisation deviennent donc des cibles thérapeutiques intéressantes (Bennett, 2008; Sheppard and McArthur, 2013).

4) L'implication de la voie de signalisation Wnt/ β -caténine sera détaillée dans la partie B de l'introduction.

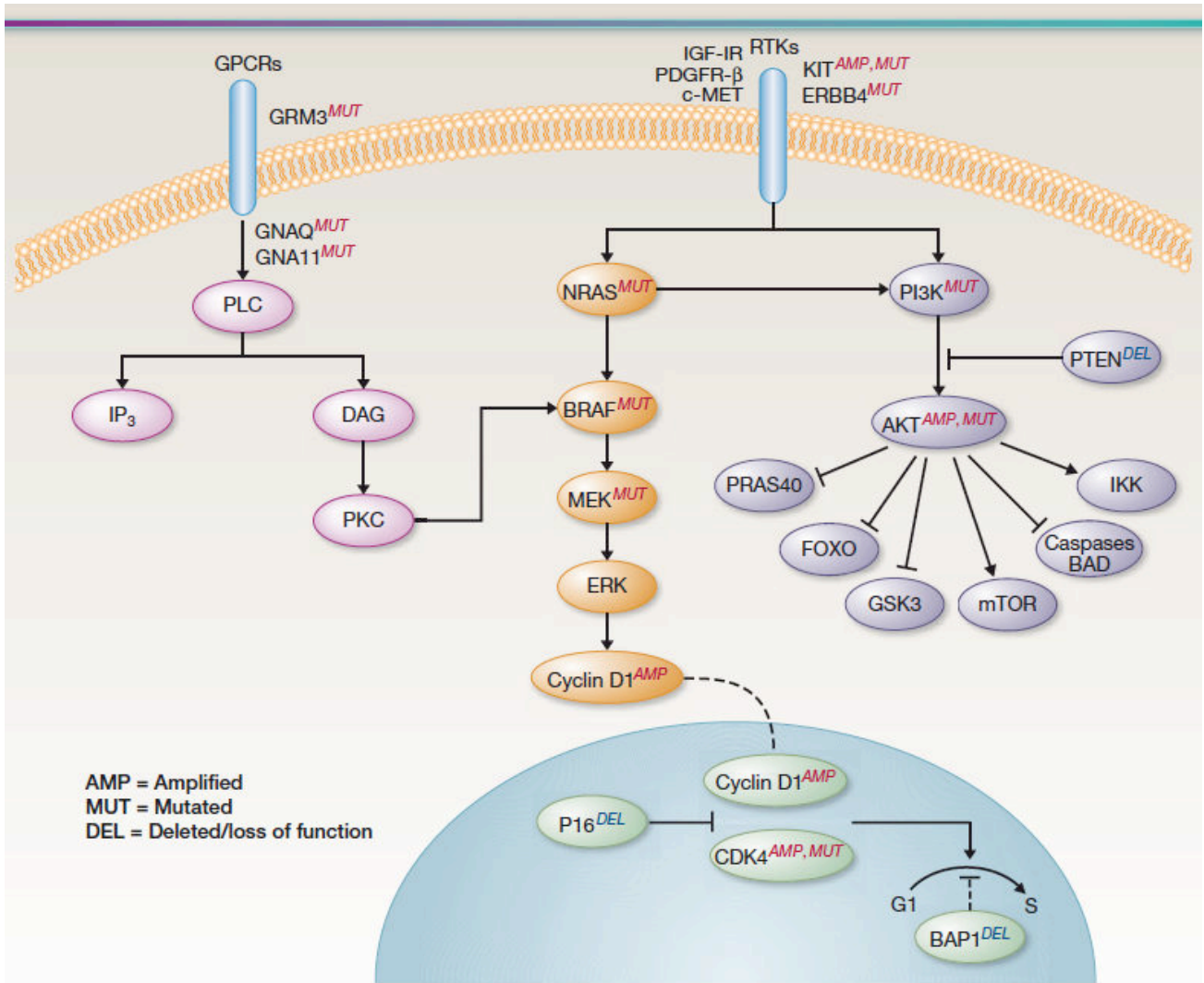


Figure 6. Altérations moléculaires dans les mélanomes.

Schéma représentant les principales voies de signalisation ainsi que les molécules affectées dans les mélanomes. AMP= amplification, MUT= mutation, DEL= perte de fonction. Adapté de Woodman et al., 2012.

3.2.4 Mélanome: symptômes, diagnostic et traitement

Les symptômes les plus fréquents d'un mélanome sont l'apparition d'un grain de beauté anormal, une lésion de la peau, un changement d'apparence ou une inflammation d'une zone de la peau. Les éléments cliniques permettant de repérer une lésion suspecte sont l'aspect clinique et l'évolution de la lésion selon les règles ABCDE. En effet, un mélanome se présente habituellement sous la forme d'une lésion asymétrique (A) à bords irréguliers (B) avec une couleur (C) inhomogène et un diamètre (D) supérieur à 5mm. Enfin, l'évolution (E) de la tumeur, qui se traduit habituellement par une extension progressive de la lésion, un changement de couleur, de taille mais aussi de forme (**Figure 7**).

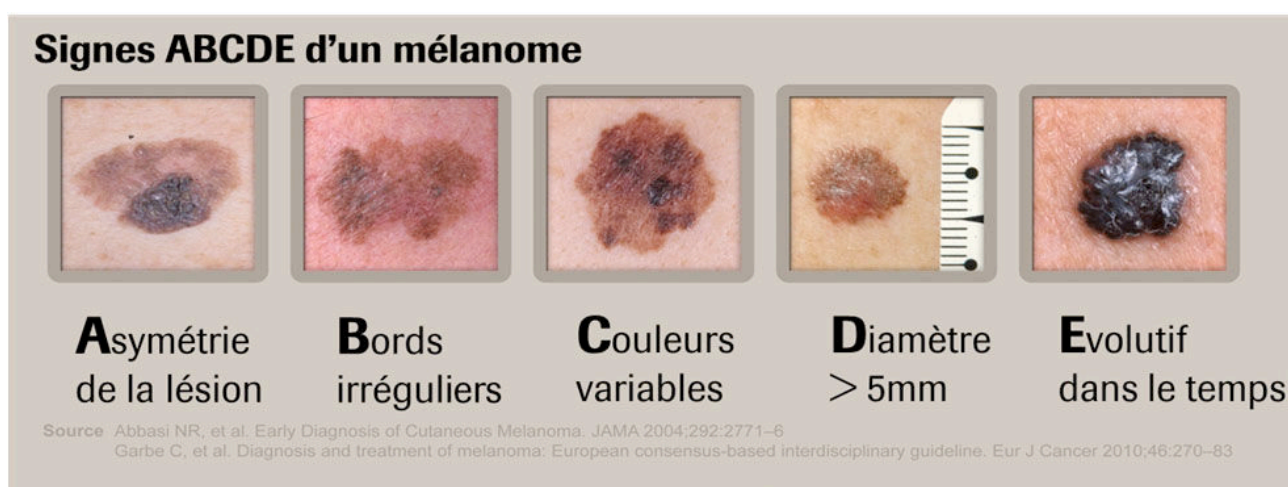


Figure 7. Règle de l'ABCDE.

Image récapitulative des cinq éléments cliniques permettant d'identifier une lésion suspecte de mélanome. Adapté de (Abbasi et al., 2004; Garbe et al., 2010).

Toute lésion suspecte de mélanome est excisée en vue d'un examen histopathologique afin de confirmer la nature mélanocytaire, d'évaluer le niveau d'invasion (classification de Clark) et de mesurer son épaisseur (indice de Breslow). La classification de Clark détermine le niveau de pénétration dans les différentes couches de la peau (Clark et al., 1984). Plus l'invasion est profonde plus le risque de former des métastases est élevé. L'indice de Breslow, quant à lui, décrit l'épaisseur de la tumeur et est étroitement corrélé avec le taux de survie (**Figure 8**). Le facteur de Breslow est le facteur pronostic le plus fréquemment utilisé.

Un traitement efficace n'est possible que grâce à un diagnostic précis et précoce. Le traitement est adapté aux données issues de l'analyse histologique de la tumeur primaire. Au stade de tumeur primaire une exérèse chirurgicale est suffisante. Cependant, à des stades plus avancés, l'immunothérapie et la chimiothérapie peuvent être proposées. En effet, les chimiothérapies utilisant

les molécules dacarbazine ou temozolomide ainsi que l'immunothérapie à base d'interleukine-2 sont encore utilisées pour certains patients (Mouawad et al., 2010). Toutefois, le taux de réponse constaté ne dépasse pas 20% et l'allongement de la durée de vie des patients reste minime en regard de la toxicité pour l'organisme des molécules utilisées (Mouawad et al., 2009).

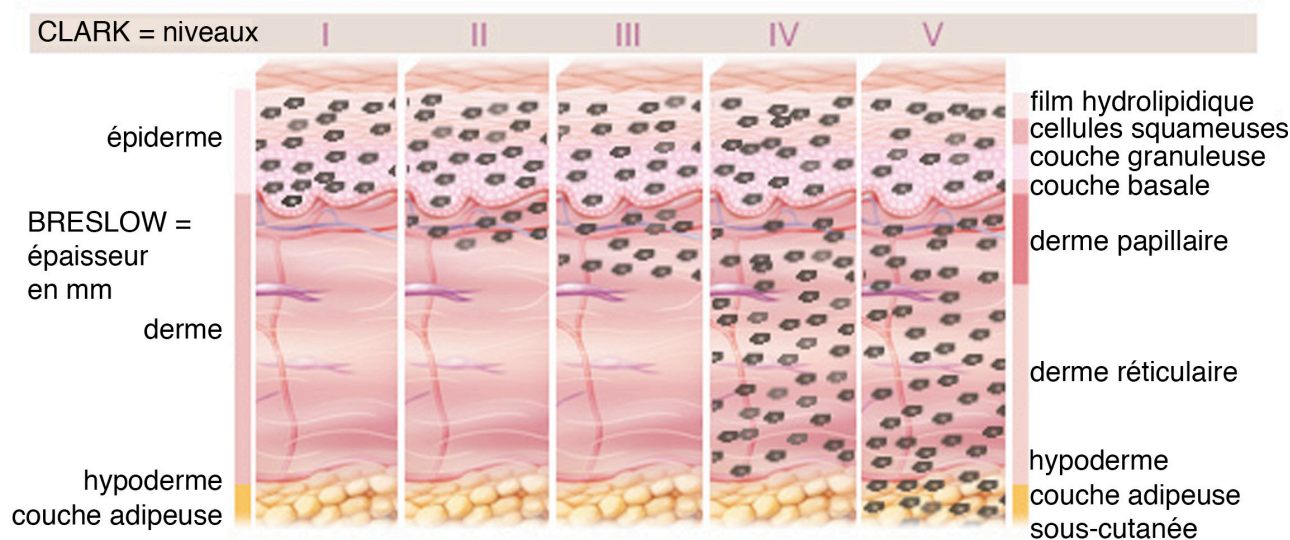


Figure 8. Classification de Clark et indice de Breslow.

La classification de Clark permet d'évaluer le niveau d'invasion d'une tumeur et l'indice de Breslow de mesurer son épaisseur. L'utilisation conjuguée de ces deux facteurs permet un meilleur pronostic du niveau d'invasion d'un mélanome. <http://www.arcagy.org/infocancer>.

Le traitement des mélanomes a évolué de façon significative ces trois dernières années (Coit and Olszanski, 2013). Concernant la chimiothérapie, un inhibiteur de B-RAF, le vemurafenib, a vu le jour. Cette molécule cible spécifiquement les mélanomes porteurs de la mutation B-RAF V600E, soit 50% des patients atteints d'un mélanome métastatique (**Figure 9**). Des essais cliniques ayant pour but de comparer l'efficacité du vemurafenib et du dacarbazine ont montré une augmentation significative du temps de survie des patients traités au vemurafenib (13,6 mois pour les patients traités au vemurafenib contre 9,7 mois pour les patients traités au dacarbazine). Environ 50% des patients mutés BRAF répondent positivement à ce traitement. Cependant, la durée de cette réponse est limitée (approximativement 6 mois) en raison de l'apparition de mécanismes de résistance. Un des mécanismes de résistance potentiel est la réactivation de la voie MAPK observée par une augmentation des niveaux de phosphorylation de ERK. L'apparition de mutations de N-RAS et MEK1 pourrait également contribuer à la résistance au vemurafenib (Trunzer et al., 2013). Certains tests préliminaires suggèrent que l'utilisation combinée du vemurafenib et d'un inhibiteur de MEK permet une réponse plus rapide et plus durable chez des patients ayant une mutation B-RAF.

Cependant, ces excellent résultats sont accompagnés d'un certain nombre d'effets secondaires. Les plus fréquents étant des éruptions cutanées, une photosensibilité ou encore de la fatigue. Un petit pourcentage de patients développe également des carcinomes spinocellulaires.

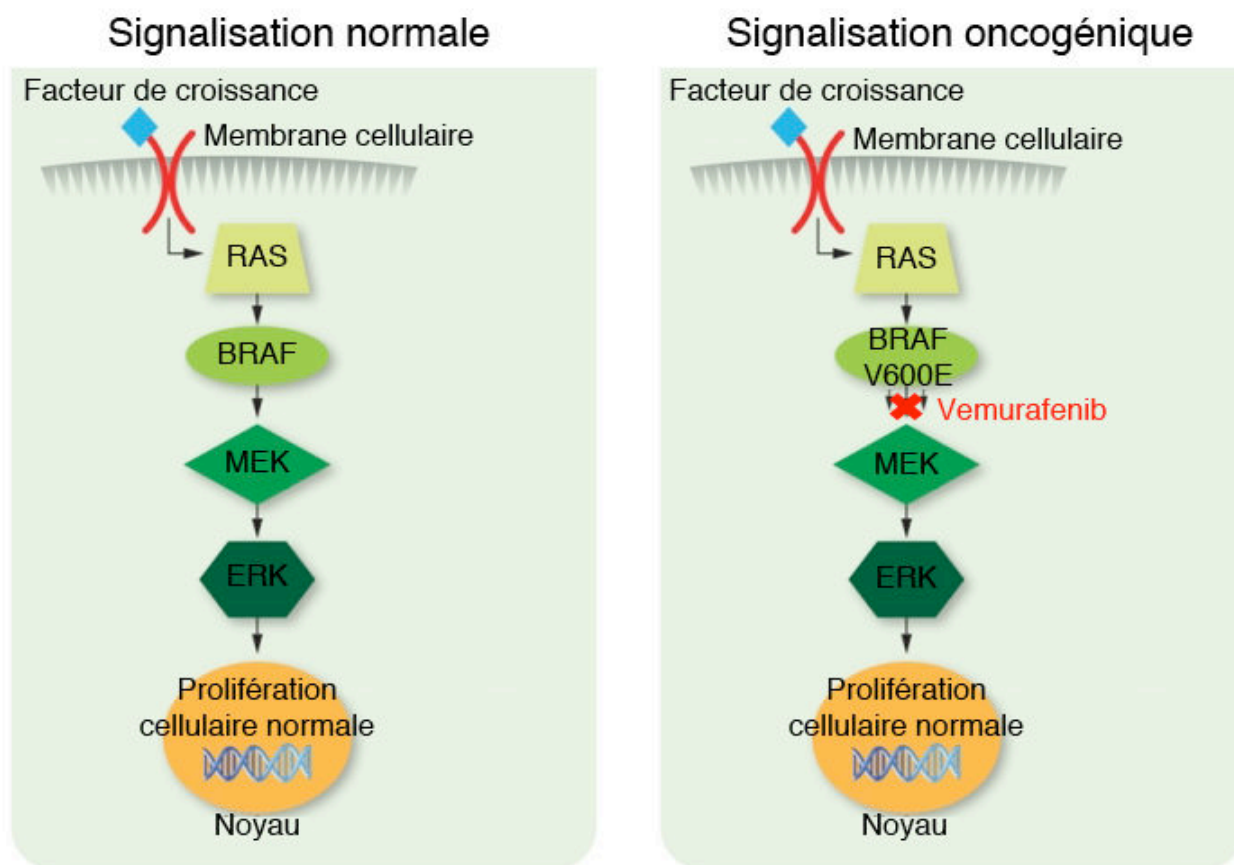


Figure 9. Mécanisme d'action du vemurafenib.

La cascade de signalisation RAS/RAF/MAPK est induite par l'activation de récepteurs membranaires et régule la transcription de nombreux gènes cibles impliqués dans la différenciation, la prolifération et la survie cellulaire. En présence de la forme mutante de B-RAF (B-RAF V600E) la voie de signalisation est activée de façon aberrante. La vemurafenib cible spécifiquement les mélanomes porteurs de la mutation B-RAF V600E et permet un rétablissement temporaire d'une voie de signalisation RAS/RAF/MAPK normale.

En ce qui concerne l'immunothérapie, une nouvelle molécule, l'ipilimumab, a été récemment développée. Cette molécule est un anticorps monoclonal qui module l'activation du système immunitaire. Ce traitement est le premier à montrer une amélioration de la survie chez des patients atteints de mélanomes de stade IV. Par exemple, un traitement combiné ipilimumab et dacarbazine permet une augmentation significative du temps de survie des patients (11,2 mois contre 9,1 mois pour des patients traités uniquement au dacarbazine). Cependant, les effets secondaires sont bien plus fréquents qu'avec la chimiothérapie seule. Une autre classe de modulateurs du système immunitaire est actuellement en phase d'essai : les anticorps PD-1 et PD-L1 (Coit and Olszanski, 2013).

Malgré ces nouveaux traitements prometteurs, à l'heure actuelle le pronostic des patients atteints d'un mélanome métastatique reste mauvais compte tenu du manque de thérapies réellement efficaces.

PARTIE B :
ICAT (INHIBITOR
OF β -CATENIN
AND TCF4)

1. β -caténine, acteur essentiel de la voie Wnt

1.1 Structure de β -caténine

Chez les vertébrés β -caténine est une protéine multifonctionnelle d'environ 88 kDa. La structure primaire de cette protéine consiste en:

- ❖ Une région N-terminale d'environ 130 acides aminés qui est cruciale pour la régulation du niveau cytoplasmique de β -caténine. En effet cette région contient quatre résidus sérine et thréonine (Ser33, Ser37, Thr41 et Ser45 chez l'homme) qui vont être phosphorylés de façon séquentielle par les kinases CK1 α et GSK3 β et constituer le site de reconnaissance pour la dégradation protéasomale (Aberle et al., 1997; Winston et al., 1999);
- ❖ Une région centrale de 550 acides aminés qui présente 12 domaines répétés de 42 acides aminés de type Armadillo (ARM), assurant les interactions protéine-protéine. Des mutants de délétion ont permis de montrer que la région de liaison de β -caténine aux cadhérines (Orsulic and Peifer, 1996; Pai et al., 1996), à APC (Hulsken et al., 1994), aux facteurs de transcription TCF/LEF (Behrens et al., 1996) mais également à des inhibiteurs physiologiques de β -caténine, tels que ICAT et Chibby (Tago et al., 2000; Takemaru et al., 2003), est localisée au niveau des domaines ARM (**Figure 10**);
- ❖ Une région C-terminale de 100 acides aminés qui porte la fonction de transactivation (van de Wetering et al., 1997).

De nombreuses études se sont intéressées à la détermination de la structure tridimensionnelle de β -caténine. Cependant la plupart de ces études ont défini uniquement la structure des répétitions ARM de β -caténine. Une étude récente menée par l'équipe de W. Xu, qui a défini la totalité de la structure de β -caténine chez le poisson zèbre (Xing et al., 2008), a montré que la partie N-terminale de la région C-terminale de β -caténine forme une hélice α (hélice C) qui semble jouer un rôle important dans la régulation transcriptionnelle des gènes cibles (**Figure 10**). L'hélice C se replie sur les résidus hydrophobes de la dernière répétition ARM de β -caténine et protège ainsi la partie C-terminale de la région ARM. Il est intéressant de noter que la séquence de l'hélice C est extrêmement conservée, comparé au reste de la région C-terminale, ce qui suggère que cette hélice C est certainement une structure partagée par d'autres espèces et d'autres membres de la famille des caténines.

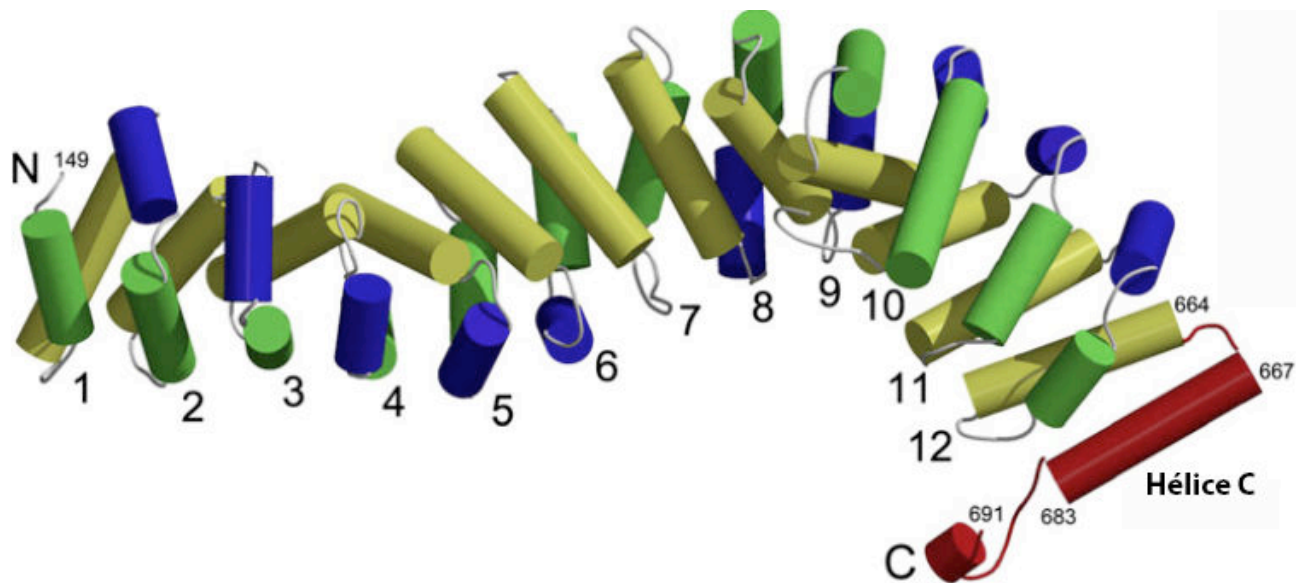


Figure 10. Structure tridimensionnelle de la région Armadillo et de l'hélice C de β -caténine.

Les 12 domaines Armadillo de la protéine β -caténine sont notés de 1 à 12. Chaque répétition est constituée de 3 hélices α , à l'exception de l'hélice 7 qui ne compte que les hélices 2 et 3. Les hélices sont représentées par des cylindres de couleur bleue (hélice 1), verte (hélice 2) et jaune (hélice 3). L'hélice C est représentée par des cylindres de couleur rouge. Adapté de Xing et al., 2008.

La majorité des études structurales ont montré que la répétition ARM 12 fait partie des répétitions ARM de β -caténine sur lesquelles les protéines APC, E-cadhérine et ICAT se fixent, suggérant que ces protéines pourraient également interagir avec l'hélice C. La superposition des structures tridimensionnelles des complexes β -caténine/E-cadhérine et β -caténine/APC a permis de montrer que la conformation tridimensionnelle de fixation de ces deux protéines à β -caténine ne permet pas leur interaction avec l'hélice C, invalidant l'implication de l'hélice C dans la liaison de ces deux protéines à β -caténine (Xing et al., 2008). Contrairement à la E-cadhérine et à APC, l'hélice C semble jouer un rôle dans l'interaction entre ICAT et β -caténine. Je reviendrai sur ce rôle dans le paragraphe 2 consacré à la structure de ICAT.

1.2 β -caténine: une protéine multifonctionnelle

β -caténine est une protéine multifonctionnelle qui sert différentes fonctions selon sa localisation subcellulaire et selon la ou les protéines avec lesquelles elle interagit (**Figure 11**).

Au niveau membranaire, β -caténine est impliquée dans l'adhésion cellulaire *via* son interaction avec les cadhérines (Butz and Larue, 1995). Outre leur rôle essentiel dans l'adhésion cellulaire, les

cadhérines sont également impliquées dans la régulation de la réserve de β -caténine disponible pour la signalisation intracellulaire (Gavard and Mege, 2005). En ce qui concerne la peau, le maintien de l'adhésion entre les mélanocytes et les kératinocytes se fait *via* la formation d'un complexe entre β -caténine et E-cadhérine (Hsu et al., 1996; Silye et al., 1998).

Au niveau cytoplasmique, β -caténine est la protéine centrale de la voie de signalisation Wnt. Cette voie de signalisation est essentielle à de nombreux processus cellulaires tels que la prolifération, la différenciation, la migration et la détermination du destin cellulaire lors du développement embryonnaire. Au sein de cette voie de signalisation la stabilité de β -caténine est régulée par un complexe de destruction composé des protéines Axine et APC et des kinases CK1 α et GSK3 β . En absence de signal Wnt, les deux kinases phosphorylent successivement les résidus Ser45, Thr41, Ser37 et Ser33 de β -caténine. La forme phosphorylée de β -caténine est reconnue par la protéine β -TrCP, une E3 ubiquitine ligase, et est finalement dégradée par le protéasome. La présence du signal Wnt entraîne la dissociation du complexe de destruction et l'inactivation de GSK3 β . Il en résulte une accumulation de β -caténine dans le cytoplasme qui est ensuite transloquée dans le noyau où elle interagit avec les facteurs de transcription TCF/LEF (Clevers, 2006).

Les mécanismes responsables de l'import/export de β -caténine au noyau n'ont pas encore été clairement identifiés. Cependant, il a été proposé que les protéines TCF et Pygopus, permettaient le maintien de β -caténine dans le noyau, bien que β -caténine puisse se localiser dans le noyau en absence de ces deux protéines (Stadeli et al., 2006). Inversement, β -caténine peut être exportée dans le cytoplasme par les protéines Axine et APC (Cong and Varmus, 2004; Rosin-Arbesfeld et al., 2000). Une fois dans le noyau β -caténine ne se lie pas directement à l'ADN, mais agit comme cofacteur de transcription en association avec TCF/LEF (T Cell Factor/Lymphoid Enhancer Factor). La formation de ce complexe permet, d'une part, de déplacer une protéine de la famille des corépresseurs Groucho et, d'autre part, de recruter les protéines Bcl-9 (Legless), Pygopus et CBP/p300 (protéine de remodelage de la chromatine) favorisant l'ouverture de la chromatine pour la transcription (Willert and Jones, 2006). Ce complexe est capable de réguler la transcription d'environ une centaine de gènes impliqués dans un grand nombre de processus biologiques tels que le développement, l'homéostasie, la prolifération, la différenciation, la motilité, l'apoptose ou encore la survie cellulaire. Environ une centaine de cibles directes ou indirectes de la voie Wnt/ β -caténine ont été identifiées. Une liste de ces gènes peut-être consultée sur le site:

http://www.stanford.edu/group/nusselab/cgi-bin/wnt/target_genes. De nombreux gènes cibles de β -caténine sont importants pour le lignage mélanocytaire. Cependant, je ne détaillerai que le rôle du facteur de transcription M-Mitf, essentiel à la différenciation, la prolifération et la survie du lignage mélanocytaire, dans le paragraphe 1.4 de ce chapitre.

Inversement, certains répresseurs transcriptionnels peuvent empêcher la transcription des gènes cibles de β -caténine. Par exemple, la protéine CtBP qui induit une condensation de la chromatine en recrutant les facteurs Polycomb (Chinnadurai, 2002), ou encore la protéine ICAT qui empêche la liaison des facteurs TCF/LEF à β -caténine (Tago et al., 2000). La répression transcriptionnelle par ICAT sera détaillée dans la partie 2 de ce chapitre.

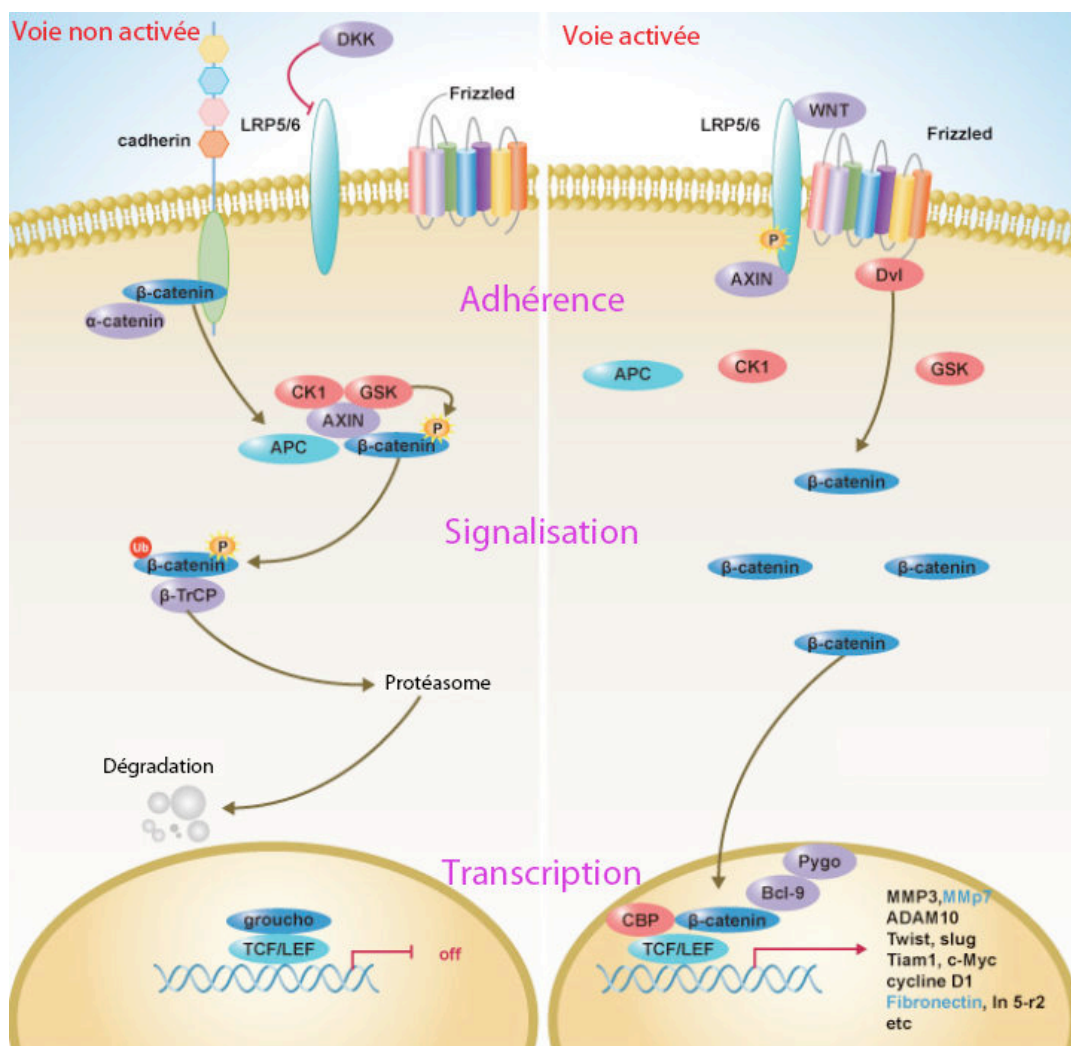


Figure 11. Multilocalisation et multifonctionnalité de β -caténine.

Les différentes fonctions de β -caténine dépendent de sa localisation subcellulaire. À la membrane, β -caténine est associée aux cadhérines et à α -caténine, étant ainsi impliquée dans l'adhésion cellule-cellule. Dans le cytoplasme, elle est associée à GSK3 β /Axine et APC et est ainsi impliquée dans la voie Wnt. Dans le noyau, elle interagit avec les facteurs TCF/LEF pour réguler la transcription de ses gènes cibles.

1.3 L'interaction avec les facteurs de transcription TCF/LEF

Parmi les nombreux partenaires de β -caténine on trouve les facteurs de transcription de la famille TCF/LEF. Les membres de cette famille sont des facteurs de transcription d'environ 44 KDa et ils sont au nombre de quatre chez l'homme et la souris (Lef1, Tcf1, Tcf3 et Tcf4). Ces protéines possèdent un domaine HMG de liaison à l'ADN très conservé et localisé au niveau C-terminal de la protéine. Les protéines TCF/LEF n'ont aucune activité transcriptionnelle intrinsèque et répriment la transcription des gènes cibles de la voie Wnt/ β -caténine en recrutant des corépresseurs sur les promoteurs des gènes cibles (Clevers, 2006; Hurlstone and Clevers, 2002). L'activation de la transcription des gènes cibles se fait lorsque β -caténine se fixe aux facteurs de transcription TCF/LEF. Les domaines d'interaction entre β -caténine et les protéines TCF/LEF ont fait l'objet de nombreuses études. L'équipe de W. Xu a montré en 2000 (Graham et al., 2000), que les membres de cette famille se fixent spécifiquement sur les répétitions ARM 3 à 10 de β -caténine (**Figure 12**). Une caractéristique clé de cette fixation est l'interaction entre les résidus conservés Asp16 et Glu24 de TCF/LEF et les résidus Lys435 et 312 de β -caténine, respectivement (Graham et al., 2000). L'élucidation de la structure tridimensionnelle du complexe TCF/ β -caténine a permis d'initier la mise au point de composés pharmacologiques capables de bloquer cette interaction, ce qui pourrait être une solution pour traiter des cancers qui résultent d'une activation inappropriée de la voie de signalisation Wnt/ β -caténine.

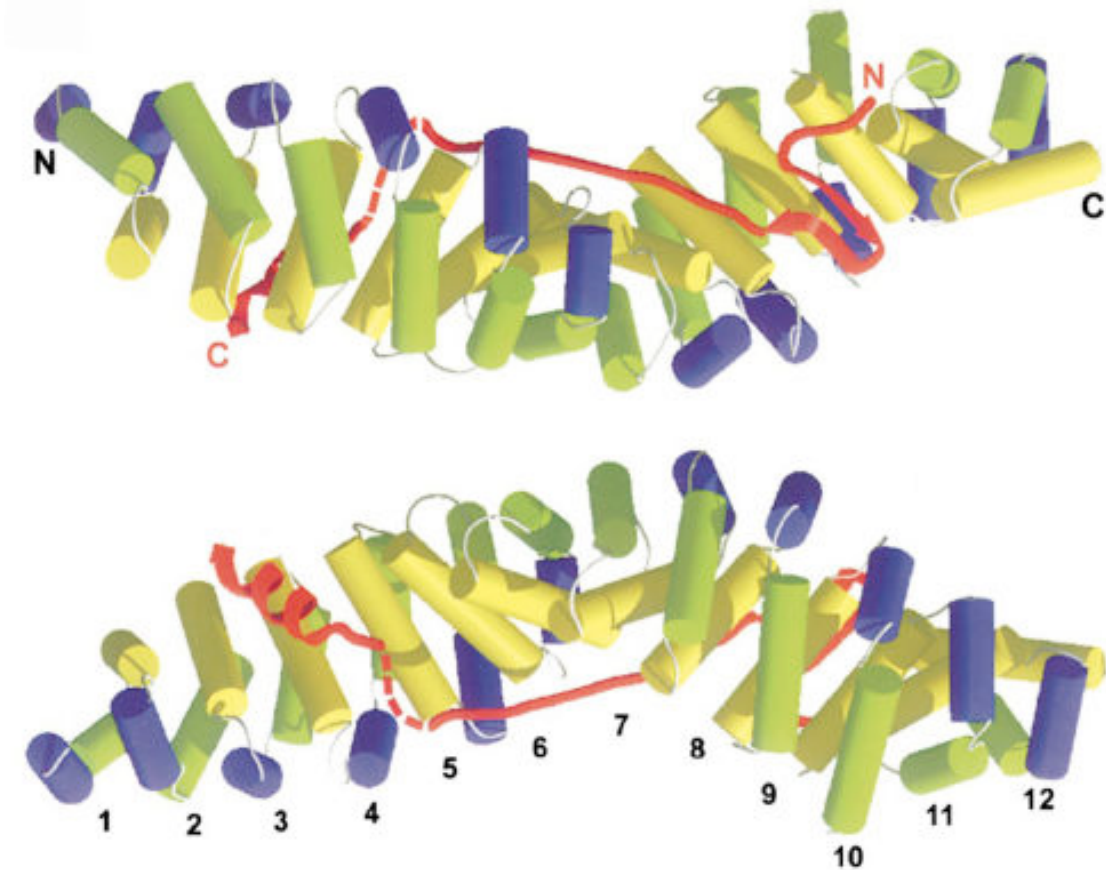


Figure 12. Structure tridimensionnelle du complexe TCF/ β -caténine Armadillo.

Deux vues du complexe TCF/ β -caténine Armadillo sont représentées avec une rotation de 180° . Les 12 domaines Armadillo de la protéine β -caténine sont notés de 1 à 12 et sont représentés par des cylindres bleus, jaunes et verts. Le domaine de liaison à β -caténine de la protéine Tcf3 de xénope est représenté en rouge. De la partie N-terminale vers la partie C-terminale cette protéine est composée d'une région en épingle à cheveux, une région plus étendue qui contient un feuillet β et une hélice α . Adapté de Graham et al., 2000.

1.4 M-MITF : Une cible essentielle de β -caténine dans le lignage mélanocytaire

La protéine β -caténine, *via* son interaction avec TCF/LEF, contrôle l'expression de nombreux facteurs de transcription appartenant à différentes cascades de signalisation dont M-Mitf. Le gène *Mitf* est composé, chez les mammifères, de 17 exons et code une protéine appartenant à la famille des facteurs bHLH/LZ (basic helix-loop-helix/leucine zipper). Au niveau de la partie 5', il possède neuf promoteurs et exons, exprimés spécifiquement dans certains tissus et utilisés de manière alternative pour produire les différentes isoformes de Mitf. Neuf isoformes majeures de la protéine Mitf ont été isolées: Mitf-A, B, C, D, E, H, J, Mc et M. L'isoforme M-Mitf est spécifique du lignage mélanocytaire (Denat and Larue, 2007). M-Mitf régule la différenciation ainsi que la survie et la

prolifération des mélanoblastes/mélanocytes. M-Mitf joue un rôle dans la différenciation des mélanocytes en régulant la transcription des enzymes majeures de la pigmentation (Bentley et al., 1994; Bertolotto et al., 1998; Bertolotto et al., 1996; Yasumoto et al., 1994; Yasumoto et al., 1997). M-Mitf régule, également, la morphologie dendritique et la migration des mélanocytes notamment en contrôlant l'organisation du cytosquelette et l'adhésion cellule-cellule (Levy et al., 2006). M-Mitf est donc capable de réguler simultanément des gènes contrôlant la différenciation et la prolifération cellulaire. M-Mitf est souvent désigné comme le régulateur maître de la mélanogenèse et certaines hypothèses suggèrent que l'expression de M-Mitf serait l'évènement clé de la régulation du développement des mélanoblastes.

1.5 β -caténine dans le développement normal et pathologique des mélanocytes

Comme je l'ai mentionné précédemment, les mélanocytes proviennent d'une population de cellules pluripotentes, les CCN. Les mélanocytes sont établis soit directement à partir des CCN migrant dorsolatéralement, soit à partir de précurseurs bipotents schwann-mélanocytes (Sommer, 2011). La voie de signalisation Wnt/ β -caténine joue un rôle central dans le développement des mélanocytes notamment *via* la transcription de M-Mitf, protéine essentielle au développement et à la survie des mélanocytes (Hari et al., 2002). En effet, différentes études ont montré que l'activation constitutive de β -caténine promeut la différenciation et la prolifération des mélanoblastes (Dorsky et al., 1998), alors qu'après inhibition de la voie Wnt les CCN adoptent préférentiellement un destin neuronal (Hari et al., 2002). Une étude menée par l'équipe de L. Sommer en 2012 a permis de mieux comprendre le rôle de β -caténine au cours du développement des mélanocytes. Selon son équipe, c'est le moment exact auquel la voie Wnt/ β -caténine est activée qui permet de déterminer si les CCN vont se différencier en neurones ou en mélanoblastes (Hari et al., 2012). En effet, l'activation de β -caténine favorise la production de mélanoblastes uniquement durant une étroite fenêtre de temps, après que les CCN délaminent à partir du toit du tube neural et avant qu'elles ne s'engagent dans la voie dorsolatérale.

Lors de la formation des mélanomes, la voie de signalisation Wnt/ β -caténine est également impliquée dans de nombreux processus conduisant à la transformation maligne des mélanocytes. En effet, des mutations activatrices du gène codant pour β -caténine ont été retrouvées dans 3,3% des biopsies et 8,5% des lignées de mélanome (Larue and Delmas, 2006). Il a également été montré que l'activation constitutive de β -caténine dans les mélanocytes murins inhibe l'expression de

p16INK4a, favorisant l'immortalisation des mélanocytes et donc la mélanomagenèse (Delmas et al., 2007). De plus, β -caténine est également capable d'induire une augmentation de la prolifération des cellules de mélanome *via* son interaction avec le facteur de transcription Brn2 (Goodall et al., 2004). Cependant, le rôle exact de β -caténine dans la formation/progression des mélanomes reste largement controversé. Certaines études ont montré que β -caténine diminue les capacités invasives des cellules de mélanome (Bachmann et al., 2005) et que la perte de β -caténine est de mauvais pronostic pour les patients, alors que d'autres études montrent qu'une surexpression de β -caténine conduit à la formation de métastases (Arozarena et al., 2011; Chien et al., 2009; Gallagher et al., 2012).

Récemment, une étude de l'équipe de D.Y. Li a montré que la voie Wnt non canonique joue également un rôle important dans la formation de métastases. En effet, selon cette équipe l'activation de la voie Wnt non canonique par le ligand Wnt5A peut induire, en fonction des récepteurs et corécepteurs présents, soit la dégradation soit la stabilisation de β -caténine. Cependant, dans les deux cas une augmentation des capacités invasives des cellules de mélanome a été observée (Grossmann et al., 2013). Une autre étude menée en 2012 montre que β -caténine joue également un rôle essentiel au niveau de l'efficacité des thérapies ciblées (Biechele et al., 2012; Webster and Weeraratna, 2013). Effectivement, il a été montré que l'efficacité de l'inhibiteur de B-RAF V600E (PLX4720) était augmentée en présence de β -caténine, suggérant que la manipulation de la voie Wnt/ β -caténine pourrait être combinée avec des inhibiteurs de B-RAF pour traiter le mélanome. Ces études soulignent la complexité du rôle de β -caténine et la nécessité d'une meilleure compréhension de l'implication de la voie Wnt dans les mélanomes.

2. ICAT : un régulateur direct de la voie Wnt/ β -caténine

La protéine ICAT a été découverte par l'équipe de T. Akiyama en 2000, chez le xénope, grâce à un crible double hybride qui a utilisé le domaine ARM de β -caténine comme appât (Tago et al., 2000). La protéine ICAT est une petite protéine de 81 acides aminés qui est codée par le gène *CTNNBIP1*, localisé sur le chromosome 4 chez la souris et sur le chromosome 1 chez l'Homme. La séquence de cette protéine est extrêmement conservée chez différentes espèces (**Figure 13**).

Homme	MNREGAPGKSPEEMYIQQKVRVLLMLRKMGSNLTASEEEFLRTYAGVVNSQLSQLP PH SIDQGAEDVVMAFSRSETEDRRQ	81
Souris	MNREGAPGKSPEEMYIQQKVRVLLMLRKMGSNLTASEEEFLRTYAGVV SS QLSQLPQHSIDQGAEDVVMAFSRSETEDRRQ	81
Rat	MNREGAPGKSPEEMYIQQKVRVLLMLRKMGSNLTASEEEFLRTYAGVVNSQLSQLPQHSIDQGAEDVVMAFSRSETEDRRQ	81
Xénope	MNR D GAPG K TPEEMYIQQKVRVLLMLRKMGSNLT P SEE A FL R S Y AGVVNSQLSQLPQHS L DQGAEDVVMAFSRSETEDRRQ	81
Poisson zèbre	MNRE E APGKSPEEMYIQQKVRVLLML K KMGSNLT P NE E AFL R NYAGVV H S Q M S QLPQ H PIDQGAEDVVMAFSRSETEDRRQ	81

Figure 13. Alignement des séquences protéiques de ICAT de différentes espèces.

Les acides aminés conservés et altérés sont représentés en noir et rouge respectivement.

Les résultats obtenus par l'équipe de T. Akiyama ont montré que ICAT est capable d'inhiber l'interaction entre β -caténine et TCF-4 et donc la transcription des gènes cibles de β -caténine (**Figure 14**). Cependant le mécanisme de compétition existant entre ICAT et TCF-4 pour la liaison à β -caténine n'a été élucidé que deux ans plus tard par les équipes de W. Xu et W. Weis *via* l'étude de la structure tridimensionnelle du complexe ICAT/ β -caténine (Daniels and Weis, 2002; Graham et al., 2002).

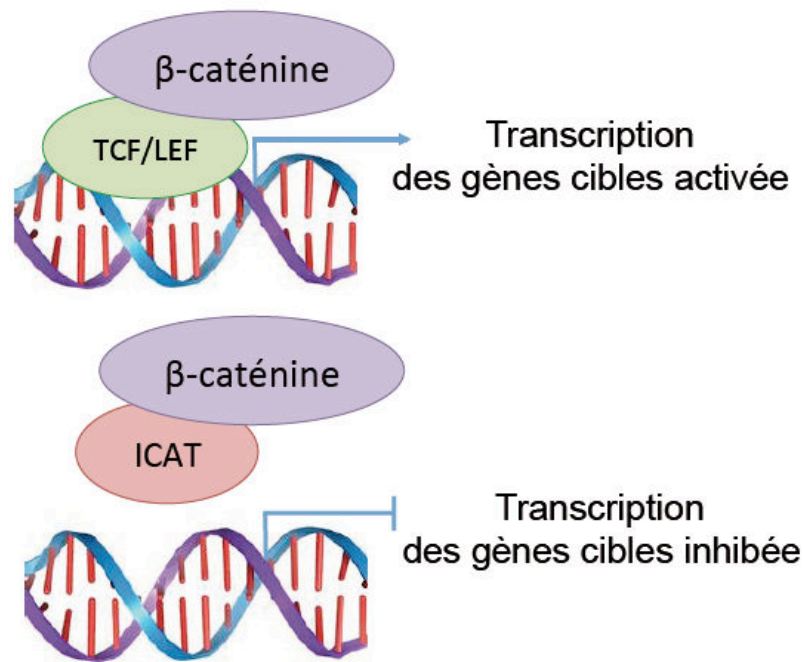


Figure 14. Régulation négative de la voie Wnt/ β -caténine par ICAT.

ICAT inhibe l'interaction entre les facteurs TCF/LEF et β -caténine et donc la transcription des gènes cibles de β -caténine.

2.1 Structure de ICAT

La structure de la protéine ICAT consiste en deux régions :

- ❖ une région N-terminale composée de trois hélices α (résidus 5 à 58), dénommées H1 (résidus 11 à 28), H2 (résidus 36 à 42) et H3 (résidus 46 à 55). Cette région interagit spécifiquement avec les répétitions Armadillo 10 à 12 de β -caténine;
- ❖ une région C-terminale qui adopte une structure semblable à un feuillet β (résidus 59 à 75) uniquement lorsque elle interagit avec les répétitions Armadillo 5 à 9 de β -caténine (**Figure 15**).

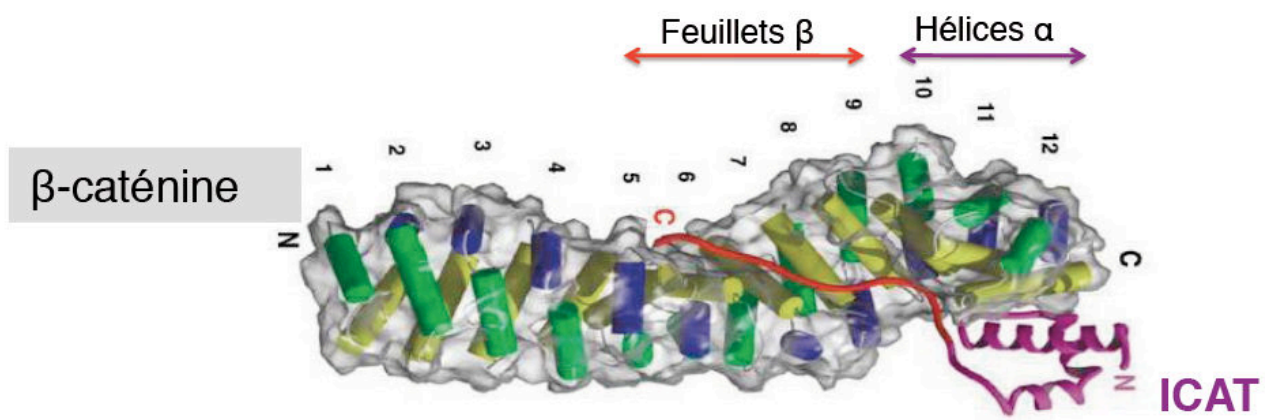


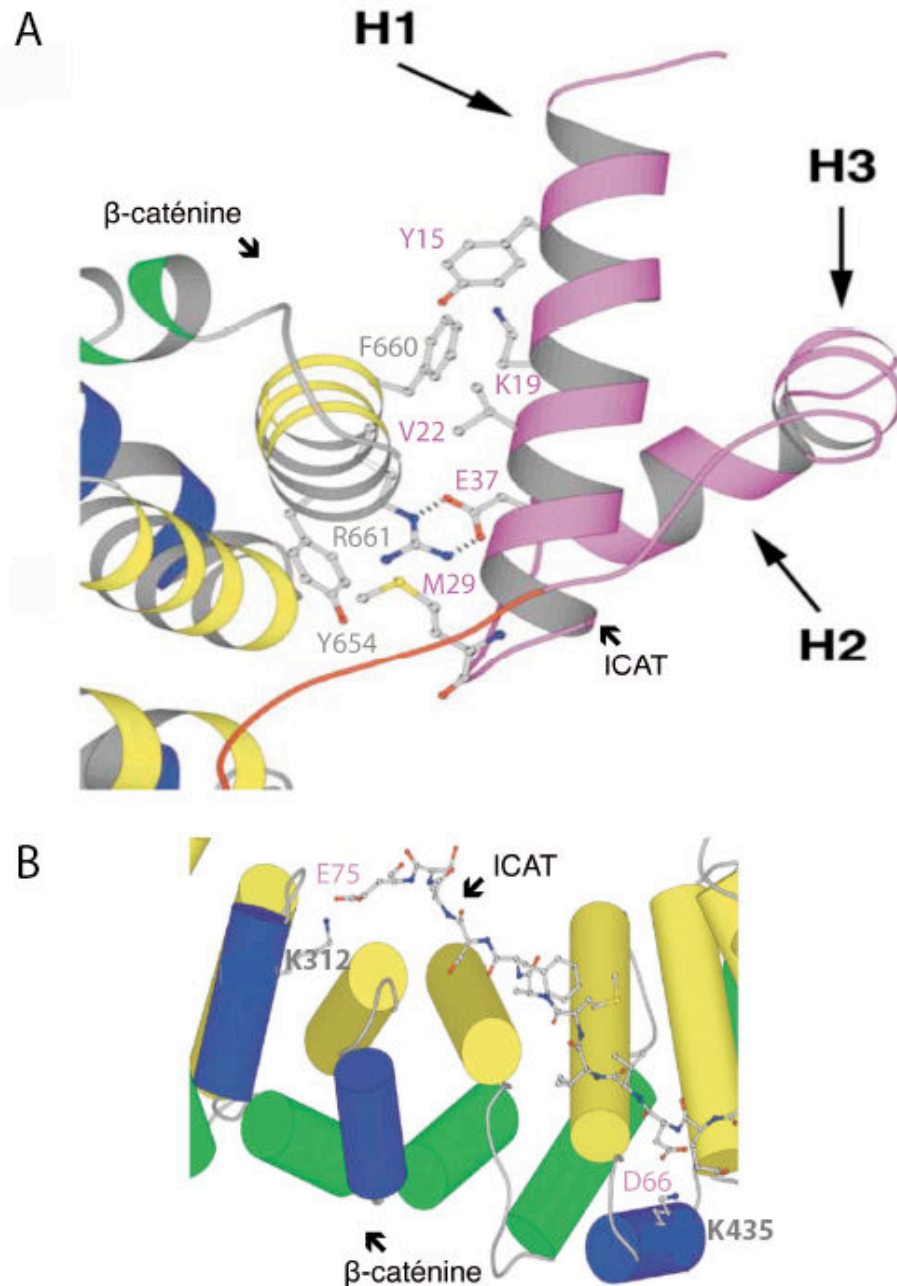
Figure 15. Structure tridimensionnelle de ICAT lié à β -caténine.

Les protéines ICAT et β -caténine s'orientent de façon antiparallèle pour interagir. La région N-terminale de ICAT interagit spécifiquement avec les répétitions ARM 10 à 12, alors que la région C-terminale interagit avec les répétitions ARM 5 à 9. Adapté de Graham et al., 2002.

Au niveau de la partie N-terminale les interactions se font 1) entre les résidus Tyr15, Lys19 et Val22 de l'hélice H1 et le résidu Phe660 de β -caténine *via* des liaisons hydrophobes, 2) entre le résidu Met29 et le résidu Tyr654 de β -caténine également *via* une liaison hydrophobe et 3) entre le résidu Glu37 de l'hélice H2 et le résidu Arg661 de β -caténine *via* une liaison hydrogène (**Figure 16A**). Au niveau C-terminale les interactions se font entre les résidus Asp66 et Glu75 et les Lys435 et 312 de β -caténine, respectivement (**Figure 16B**), *via* des liaisons électrostatiques et entre le résidu Phe71 et le résidu Arg386 de β -caténine *via* une liaison hydrophobe (Daniels and Weis, 2002; Graham et al., 2002).

De nombreuses études concernant l'interaction entre β -caténine et TCF-4, E-cadhérine ou encore APC ont permis l'identification de résidus clés au sein des différents ligands responsables de la liaison à β -caténine. La séquence consensus commune à la plupart des ligands de β -caténine, dont

ICAT, peut-être décrite par la formule $DX\theta\theta X\Phi X_{2-7}E$, où θ est un acide aminé aliphatique hydrophobe et Φ est un acide aminé aromatique (Figure 17A).



Seul les répétitions ARM 10 à 12 de β -caténine sont nécessaires à la fixation de ICAT, alors que l'interaction entre TCF/LEF et β -caténine se fait *via* les répétitions ARM 3 à 10 (Graham et al., 2000). Etant donné que les régions de fixation des deux protéines ne se superposent pas, il était difficile de comprendre pourquoi il existait une compétition entre ces deux protéines pour la liaison à β -caténine. Cependant, l'équipe de W. Xu a proposé une explication selon laquelle la fixation de ICAT à β -caténine se ferait de façon séquentielle. La région N-terminale de ICAT se fixerait d'abord à β -caténine ce qui permettrait, par la suite, la fixation de la région C-terminale aux Lys 312 et 435 de β -caténine. C'est la fixation de la partie C-terminale de ICAT qui permettrait de déplacer les facteurs TCF/LEF (Graham et al., 2002), car comme je l'ai mentionné précédemment, ces deux lysines sont également des résidus clés de l'interaction entre les membres de la famille TCF/LEF et β -caténine.

Les structures tridimensionnelles des complexes TCF/ β -caténine, E-cadhérine/ β -caténine et ICAT/ β -caténine montrent que TCF, E-cadhérine et ICAT se fixent à β -caténine de façon similaire (**Figure 17B**). Etant donné que ICAT est capable d'inhiber la liaison des facteurs de transcription TCF/LEF à β -caténine, différentes études ont été menées afin de savoir si ICAT est également capable d'inhiber la liaison des cadhérines à β -caténine (Gottardi and Gumbiner, 2004; Graham et al., 2002). Cependant, les résultats obtenus ont montré que ICAT est capable d'inhiber la liaison de la E-cadhérine à β -caténine *in vitro* uniquement. En effet, *in vivo* ICAT inhibe la liaison des facteurs TCF/LEF avec β -caténine sans affecter le complexe E-cadhérine/ β -caténine.

Selon l'équipe de W. Xu la différence entre les résultats *in vivo* et *in vitro* s'expliquerait par une différence de phosphorylation de la E-cadhérine. En effet, la phosphorylation peut multiplier l'affinité de la E-cadhérine pour β -caténine par trois. Etant donné que ICAT peut se localiser aussi bien dans le noyau que dans le cytoplasme, l'augmentation de l'affinité de la E-cadhérine pour β -caténine, *in vivo*, serait essentielle pour que ICAT n'affecte pas l'adhésion cellulaire.

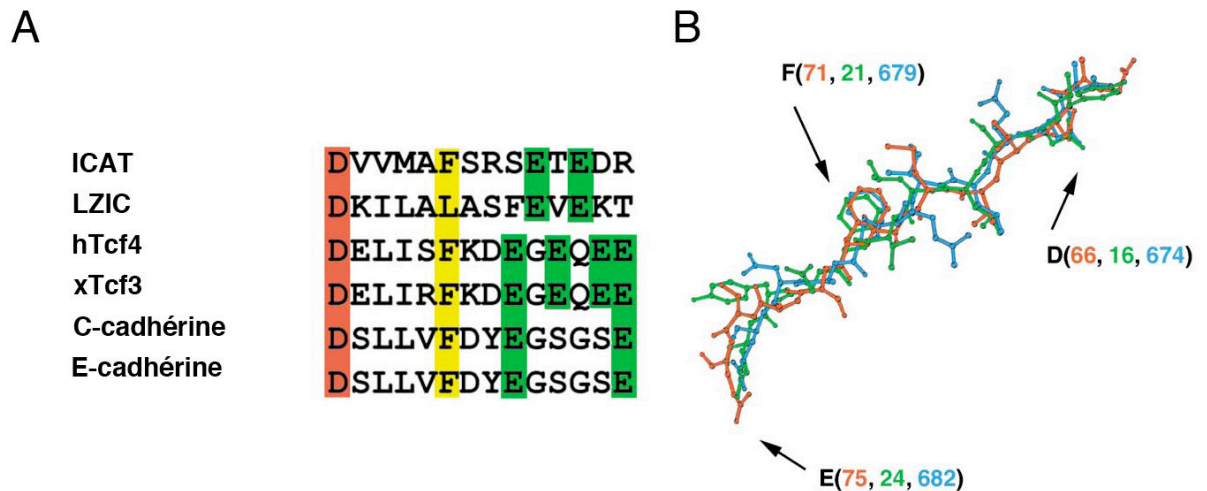


Figure 17. Alignement de la séquence consensus et des domaines de liaison à β -caténine de ICAT, LZIC, des membres des familles TCF et Cadhérine.

A: L'acide Aspartique (D) qui a été montré comme interagissant avec la Lysine 435 de β -caténine est présenté en rouge et la Phénylalanine (F) qui a été prédite comme interagissant avec l'Arginine 386 de β -caténine est présentée en jaune. Le regroupement d'acides glutamiques, en vert, peut interagir avec la Lysine 312 de β -caténine sous diverses conformations. LZIC = « leucine zipper and ICAT homologous protein ». hTCF4 = TCF4 humain ; xTcf3 = Tcf3 de xénope.

B: Les structures des protéines ICAT (rouge), XTcf3 (vert) et E-cadhérine (bleu) sont représentées. Les positions des trois acides aminés (D, F et E) impliqués dans l'interaction avec β -caténine sont représentées. Les structures de ces complexes ont été superposées en utilisant les domaines ARM 5 à 8 de β -caténine. Adapté de Graham et al., 2002.

Comme je l'ai mentionné précédemment l'hélice C de β -caténine semble jouer un rôle dans l'interaction entre ICAT et β -caténine. Une superposition des structures de β -caténine-R1C (forme de β -caténine contenant le domaine ARM et le domaine C-terminal) avec celles du complexe β -caténine/ICAT (forme de β -caténine contenant uniquement le domaine ARM) a révélée que l'hélice C de β -caténine est en contact avec l'hélice 1 de ICAT (**Figure 18**). L'implication de l'hélice C dans l'interaction entre ICAT et β -caténine est également consistante avec une étude calorimétrique qui montre que β -caténine-R1C se fixe sur ICAT avec six fois plus d'affinité que le domaine ARM de β -caténine seul (Xing et al., 2008). Cependant, des études supplémentaires pour mieux comprendre l'interaction entre ICAT et l'hélice C de β -caténine ainsi que les implications de cette interaction sont nécessaires.

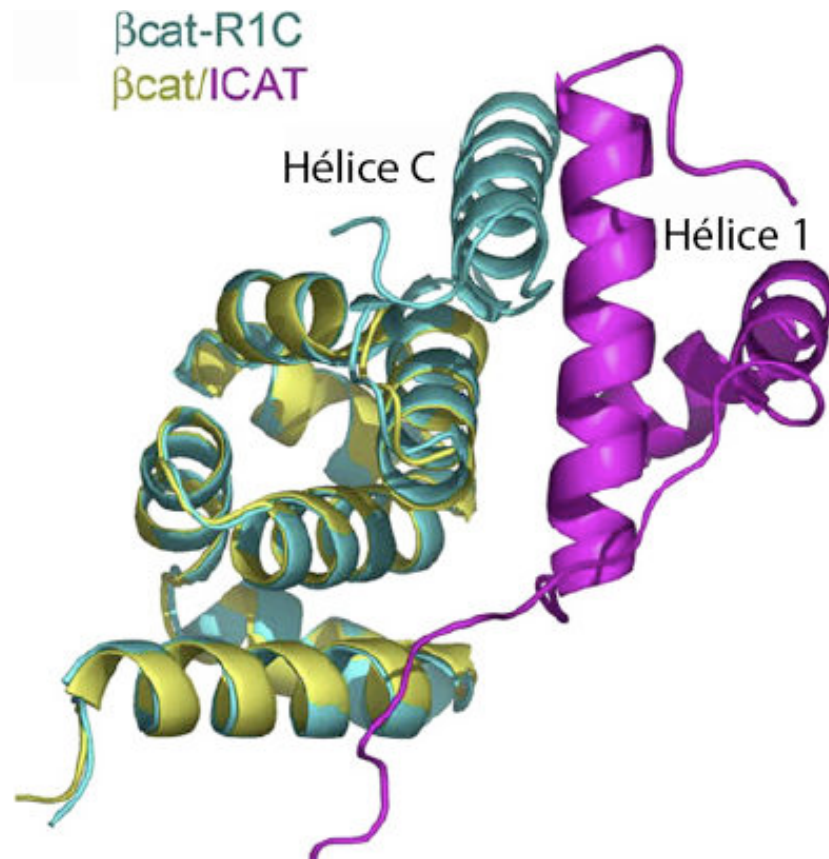


Figure 18. Interaction potentielle entre ICAT et l'hélice C de β -caténine.

La structure des répétitions ARM 10 à 12 et la région C-terminale de β -caténine-R1C (turquoise) est superposée avec celle du complexe ICAT/ β -caténine (jaune et violet). Adapté de Xing et al., 2008.

2.2 Régulation transcriptionnelle de ICAT

Très peu de travaux ont été consacrés à l'étude de la régulation transcriptionnelle de ICAT. Les voies de signalisation Wnt/ β -caténine et pRB/E2F sont fréquemment dérégulées dans de nombreux cancers. Bien que l'implication respective de ces deux voies de signalisation ait été largement documentée, leur interaction fonctionnelle n'a été caractérisée que plus récemment. En effet, il a dernièrement été décrit que E2F1 régule négativement la voie de signalisation Wnt/ β -caténine dans les cancers colorectaux. Une étude menée par l'équipe de Q. Yu en 2011 a montré que le lien entre ces deux voies de signalisation est la protéine ICAT (Wu et al., 2011). En effet, son équipe a montré que ICAT est une cible directe de E2F1 et que l'activation de ICAT par E2F1 est requise pour que la voie de signalisation E2F1 inhibe la voie Wnt/ β -caténine. Plus précisément, ils ont identifié trois sites de fixation potentiels de E2F1 sur le promoteur de ICAT (-1769/-1762, -402/-395 et -234/-226). Un essai luciférase leur a permis de montrer que la région du promoteur de ICAT se situant entre -500 et +56 est suffisante pour obtenir une réponse totale à E2F1 (Wu et al., 2011).

En ce qui concerne une possible régulation transcriptionnelle de ICAT par la voie Wnt/ β -caténine plusieurs observations ont montré que les niveaux de ICAT ne sont pas affectés par l'activation ou l'inactivation de la signalisation Wnt dans des cellules en culture, suggérant que ICAT n'est pas une cible directe de la voie Wnt/ β -caténine (Gottardi and Gumbiner, 2004).

3. Rôle de ICAT au cours du développement embryonnaire et chez l'adulte

ICAT agit comme un régulateur négatif de β -caténine et joue un rôle important au cours du développement cranio-facial et intestinal. Les souris homozygotes ICAT^{-/-} présentent des malformations de la partie antérieure du cerveau et de la face, associées à une rupture de la paroi intestinale. Ces anomalies entraînent une létalité à la naissance chez tous les animaux (Satoh et al., 2004). Ces résultats suggèrent une implication de ICAT dans la mise en place des dérivés des crêtes neurales céphaliques et entériques. Toutefois, le rôle de ICAT dans la formation du lignage mélanocytaire est inconnu. L'ARN messager de ICAT est exprimé de façon relativement constante durant la totalité du développement embryonnaire murin (Tago et al., 2000).

Chez l'homme, le gène *CTNNBIP1* est localisé en 1p36 dans une région chromosomique fréquemment réarrangée dans de nombreux types tumoraux dont les mélanomes. Bien qu'aucune mutation délétère de ICAT n'ait été identifiée dans des lignées de mélanome humain (Reifenberger et al., 2002), un rôle possible de ICAT dans la progression et l'invasion des mélanomes ne peut être exclu puisque des taux variables de ICAT ont été détectés chez des patients atteints de mélanome ayant métastasé ou non (Reifenberger et al., 2002; Winnepenninckx et al., 2006).

4. Autres régulateurs négatifs directs de la voie Wnt/ β -caténine

Les régulateurs négatifs physiologiques de la voie Wnt/ β -caténine sont peu nombreux et un nombre réduit d'études leur ont été consacrées. En 2003, trois ans après la découverte de ICAT, l'équipe de R. Moon découvre un autre inhibiteur de la voie Wnt/ β -caténine, la protéine Chibby (Cby). Cette protéine a été identifiée *via* un crible visant à trouver des protéines interagissant avec la partie C-terminale de β -caténine (Takemaru et al., 2003). Cby est une protéine de 14,5 KDa évolutionnairement conservée depuis la mouche jusqu'à l'Homme. Depuis, il a été montré que Cby

agit comme un régulateur négatif de la voie Wnt *via* deux mécanismes distincts. De façon similaire à ICAT, Cby inhibe la transcription des gènes cibles de β -caténine *via* une compétition avec les facteurs TCF/LEF pour la liaison à β -caténine. De plus, Cby inhibe également la transcription des gènes cibles de β -caténine en régulant l'import/export de β -caténine au noyau. En effet, il a été montré que Cby possède à la fois des signaux de localisation nucléaire (NLS) et des signaux d'export nucléaire (NES), ce qui lui permet de se déplacer entre le noyau et le cytoplasme. Cby interagit spécifiquement avec les protéines 14-3-3 ce qui facilite sa liaison au récepteur d'export CRM1 et inhibe sa liaison au récepteur d'import importine- α , promouvant ainsi la localisation cytoplasmique de Cby et de β -caténine (Li et al., 2008; Takemaru et al., 2009).

A ce jour aucune autre protéine physiologique régulant négativement la voie Wnt/ β -caténine n'a été découverte.

PARTIE C:
MÉCANISMES
CELLULAIRES ET
MOLECULAIRES DE LA
MIGRATION ET
DE L'INVASION

La migration cellulaire est un phénomène fondamental qui correspond au mouvement des cellules au sein de leur environnement. La migration permet la mise en place des tissus et des organes au cours du développement des organismes, l'acheminement des cellules immunitaires vers les lieux d'infections, la cicatrisation des tissus lésés ou encore la dissémination des cellules tumorales au cours des métastases. La machinerie cellulaire s'organise de façon à définir un axe de polarité avant-arrière dans la direction de la migration. La mise en place de cet axe de polarité et sa régulation par les facteurs extracellulaires jouent un rôle prépondérant dans l'initiation et le contrôle de la migration. *In vivo*, la migration a lieu essentiellement en trois dimensions (3D). Cependant nous aborderons également le cas de la migration en deux dimensions (2D) car, même si l'on sait désormais que la migration 2D diffère de la migration 3D, un grand nombre d'études sur la migration ont été réalisées en 2D. Dans cette partie je m'intéresserai plus particulièrement aux mécanismes de migration des cellules de mélanome en culture car très peu d'informations concernant les modes de migration des mélanocytes sont actuellement disponibles.

Pour plus de détails concernant les mécanismes cellulaires et moléculaires de la migration vous pouvez vous reporter aux articles de revue en annexe.

1. La migration 2D

1.1 Aspects cellulaires

La migration cellulaire en 2D est un processus qui a largement été documenté. Afin de se déplacer, les cellules doivent former des protrusions, c'est à dire étendre leur membrane plasmique au niveau du front de migration et ce, de façon coordonnée avec le reste du corps cellulaire. La formation de protrusions peut se produire de manière spontanée ou bien être induite par des signaux externes. Les cellules peuvent former différents types de protrusions en 2D: les lamellipodes et les filopodes. Ces structures sont caractérisées par une composition moléculaire différente et sont sollicitées de façon spécifique en fonction du microenvironnement (Ridley, 2011). La migration cellulaire est donc basée sur des cycles successifs d'extensions membranaires, d'adhésion, de traction du corps cellulaire et de rétraction de l'arrière de la cellule. Elle implique un équilibre entre forces d'adhésions et forces de tractions, caractérisé par une dissymétrie entre l'avant et l'arrière de la cellule (**Figure 19**). En effet, la protrusion du front de migration dépendante de Rac est

contrebalancée par la rétractation de l'arrière de la cellule dépendante de Rho/ROCK (Spiering and Hodgson, 2011).

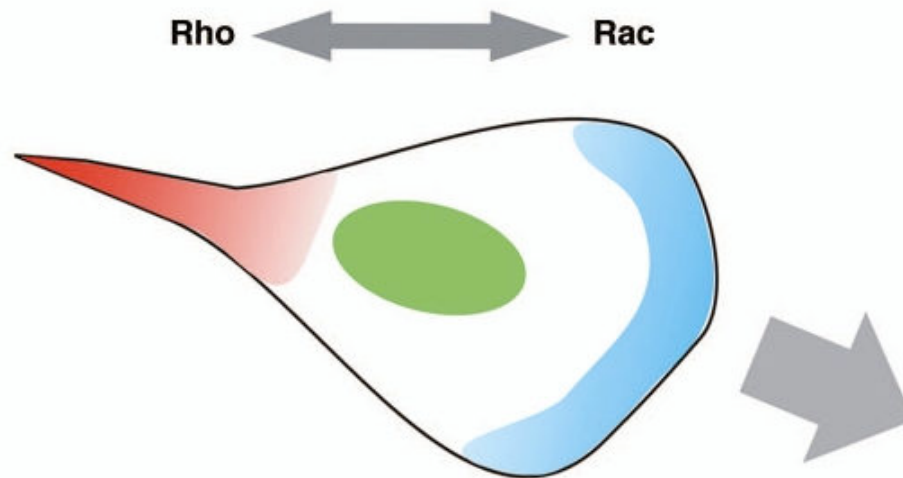


Figure 19. Représentation schématique de l'activité Rho/Rac dans les cellules en migration.

Rho est activé principalement à l'arrière de la cellule (en rouge) pour permettre la rétraction, alors que Rac est activé principalement à l'avant de la cellule (en bleu) et promeut l'extension membranaire. Adapté de Spiering and Hodgson, 2011.

1.2 Aspects moléculaires

De nombreuses molécules et voies de signalisation régulent la migration cellulaire et notamment la formation des lamellipodes et des filopodes. Cependant le cytosquelette d'actine ainsi que les régulateurs de la formation des filaments d'actine sont impliqués dans tous les types de protrusions. Les régulateurs de la formation des filaments d'actine sont eux même régulés par différentes molécules, parmi lesquelles les membres de la famille des petites GTPases Rho (**Figure 20**). En effet, les membres de cette famille sont des régulateurs clés de la migration cellulaire. La plupart des GTPases Rho sont régulées par des « guanine nucleotide exchange factor (GEFs) » qui favorisent leur activation et par des « GTPases accelerating proteins (GAPs) » qui favorisent leur inactivation (Raftopoulou and Hall, 2004; Spiering and Hodgson, 2011).

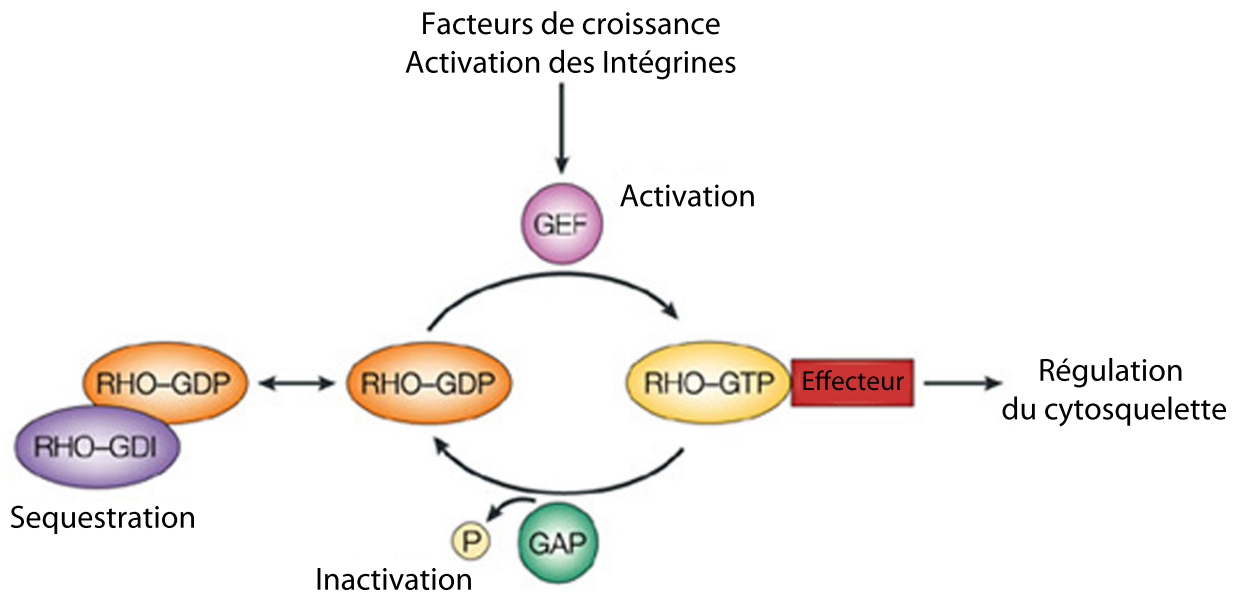


Figure 20. Le cycle d'activation et d'inactivation des GTPases Rho.

Les GTPases Rho alternent entre une forme inactive liée au GDP et une forme active liée au GTP. Ce cycle est finement régulé par les « guanine nucleotide exchange factor (GEFs) », les « GTPases accelerating proteins (GAPs) » et les « guanine dissociation inhibitors (GDIs) ». Sous leur forme active les GTPases Rho peuvent se lier à des molécules effectrices. Adapté de Raftopoulou and Hall 2003.

Parmi les membres types de cette famille on compte Rac et Cdc42 qui jouent un rôle déterminant dans l'assemblage des filaments d'actine qui forment les lamellipodes et les filopodes. Ces protéines induisent la polymérisation des filaments d'actine permettant l'extension du front de migration *via* l'activation des protéines de la famille WASP (Wiskott-Aldrich Syndrome Protein). C'est le complexe Arp2/3, après activation par les protéines de la famille WASP, qui régule la polymérisation de l'actine en se liant à chaque filament d'actine et en initiant la croissance d'un nouveau filament, générant ainsi un réseau dendritique branché (Chesarone and Goode, 2009). Récemment, les protéines de la famille des Formines, plus précisément les Formines mDia1 et mDia2 ont également été impliquées dans l'extension du front de migration au niveau des lamellipodes et des filopodes respectivement. En effet, ces protéines protègent les extrémités des filaments d'actine en se liant à l'extrémité d'un filament en formation, empêchant ainsi l'arrêt de la croissance de celui-ci (Ridley, 2011). Néanmoins, dans certaines lignées de mélanome, une réduction d'expression de M-MITF induirait une diminution du taux de Dia1 et augmenterait la migration de ces cellules (Carreira et al., 2006).

L'extension des lamellipodes s'arrête brusquement lorsque la cellule rencontre une autre cellule du même type *via* l'action de la protéine RhoA, un autre membre de la famille des petites GTPases Rho. En effet, RhoA active ROCK1 (Rho associated protein kinase 1) qui, *via* la Myosine

II, accentue la contractilité des filaments d'actine-myosine aboutissant à la formation de fibres de stress, ce qui inhibe la formation des lamellipodes. L'arrêt de l'extension des filopodes se fait lui, *via* l'action d'une protéine inhibitrice de mDia2 (DIP - Dia interacting protein), qui induit l'arrêt de la formation des filaments d'actine.

2. La migration 3D

Il est maintenant largement reconnu que les cellules tumorales peuvent migrer de façon collective ou de façon individuelle. De plus, des études récentes ont montré que les cellules tumorales individuelles peuvent adopter deux types de migration différents : le mode mésenchymateux et le mode amiboïde. Il est important de mentionner que ces deux modes de migration sont interconvertibles et que les cellules de mélanome changent spontanément de type de migration de façon à s'adapter à leur microenvironnement (Friedl and Wolf, 2010).

2.1 Aspects cellulaires

2.1.1 Mode mésenchymateux

Ce mode migratoire a de nombreux points communs avec les études effectuées en 2D. Notamment, la production de protrusions d'actine à l'avant de la cellule et la rétraction de l'arrière de la cellule afin de générer un déplacement. La production de protrusions membranaires permet l'accrochage de la cellule à la matrice extracellulaire et est responsable de la directionnalité du mouvement. Cependant, le recrutement de protéases aux lieux d'ancrage est ensuite nécessaire afin de dégrader la matrice extracellulaire (Sahai and Marshall, 2003). Les cellules utilisant ce mode migratoire sont caractérisées en 3D par l'alignement des cellules le long des fibres de la matrice extracellulaire, par une morphologie allongée très protrusive (**Figure 21**) et par une vitesse de migration relativement lente d'environ 0,1 $\mu\text{m}/\text{min}$ (Sanz-Moreno et al., 2008).

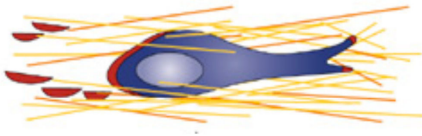

	Mésenchymateux	Amiboïde
		
Stratégie Migratoire	Génération d'un chemin «Path generating»	Découverte d'un chemin «Path finding»
Morphologie	Allongée avec de longues protrusions	Arrondie avec de petites protrusions (blebs)
Mécanisme	Dégradation de la MEC	Absence de dégradation de la MEC
Voie de signalisation	Dépendance de Rac	Dépendance de Rho/ROCK

Figure 21. Caractéristiques majeures des modes de migration mésenchymateux et amiboïde.

Les migrations mésenchymateuse et amiboïde diffèrent au niveau de la stratégie de migration adoptée, de la morphologie des cellules, du mécanisme de migration et également au niveau de la voie de signalisation qui les régule.

2.1.2 Mode amiboïde

L'étude de ce mode migratoire est bien plus récente et repose sur la notion que le déplacement cellulaire en 3D ne requiert pas nécessairement l'attachement de la cellule à son substrat (Lammermann and Sixt, 2009). Dans ce mode migratoire la cellule s'adapte à son environnement en se déformant de façon à se glisser dans les trous naturels de la matrice et par conséquent ne nécessite pas de protéolyse (**Figure 21**). Selon un premier modèle la déformation de la cellule intervient *via* la création de blebs. Les blebs sont des extensions courtes et sphériques de membrane plasmique dépourvues d'actine et qui ont une durée de vie très courte (environ 2 min). L'initiation du bleb résulte d'un détachement local de l'actine corticale ou de sa rupture (**Figure 22**). L'augmentation locale de la pression intracellulaire génère alors un afflux de cytosol au niveau de la membrane qui permet au bleb de s'étendre (Charras and Paluch, 2008). Le mécanisme par lequel les blebs génèrent la traction nécessaire à la migration est cependant encore mal connu. Selon un second modèle, la polarisation pourrait intervenir *via* la formation de petites protrusions qui seraient générées par la polymérisation de l'actine (Petrie et al., 2012). Les cellules tumorales sont capables d'utiliser les deux stratégies. L'utilisation d'un modèle ou de l'autre dépendrait du type cellulaire. Les cellules utilisant ce mode migratoire sont caractérisées par une morphologie arrondie et une vitesse de migration plus rapide entre 1 et 10 $\mu\text{m}/\text{min}$ (Sanz-Moreno et al., 2008).

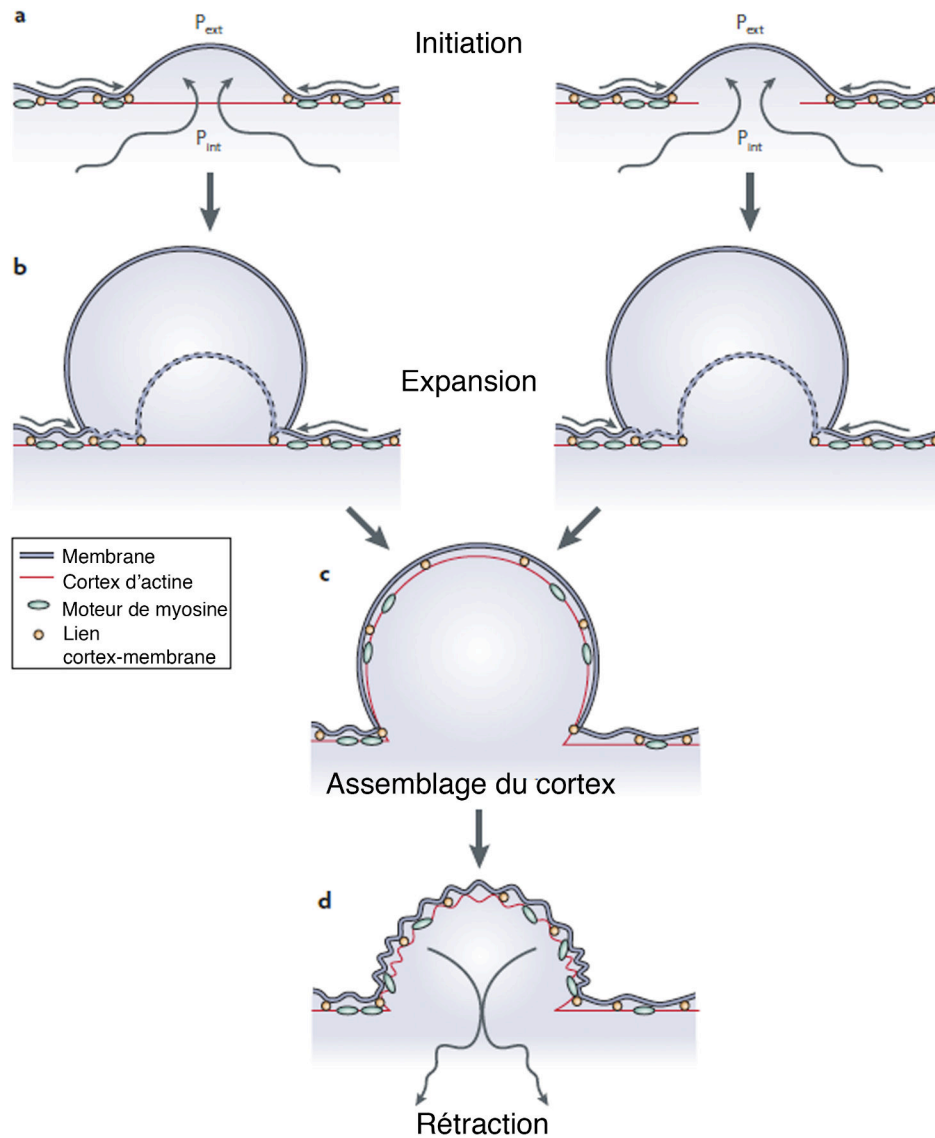


Figure 22. Le cycle de vie d'un bleb.

Le cycle de vie d'un bleb peut être divisé en trois parties : l'initiation, l'expansion et la rétraction. a : L'initiation du bleb résulte d'un détachement local de l'actine corticale (modèle de gauche) ou de sa rupture (modèle de droite). b : L'augmentation locale de la pression intracellulaire génère alors un afflux de cytosol à travers le cortex (modèle de gauche) ou à travers l'ouverture dans le cortex (modèle de droite), ce qui permet au bleb de s'étendre. c : l'expansion du bleb ralentit et un nouveau cortex d'actine se forme sous la membrane. d : la rétraction totale du bleb est précédée par le recrutement de la myosine au niveau du nouveau cortex. Adapté de Charras and Paluch, 2008.

2.1.3 Migration collective

La migration collective est impliquée dans de nombreux processus du développement et de la réparation tissulaire (la régénération tissulaire et la formation de nouveaux vaisseaux sanguins après une blessure par exemple). Dans le cas du cancer ce mode migratoire permet l'entrée dans le système

lymphatique tandis que l'entrée dans la circulation sanguine ne serait permise qu'à des cellules individuelles (Sanz-Moreno and Marshall, 2010).

La migration collective fait appel à des mécanismes similaires à ceux de la migration individuelle : polarisation, protrusion d'un front migration, attachement au substrat et contraction pour avancer. La différence majeure réside dans le fait que les cellules restent liées entre elles (**Figure 23**).

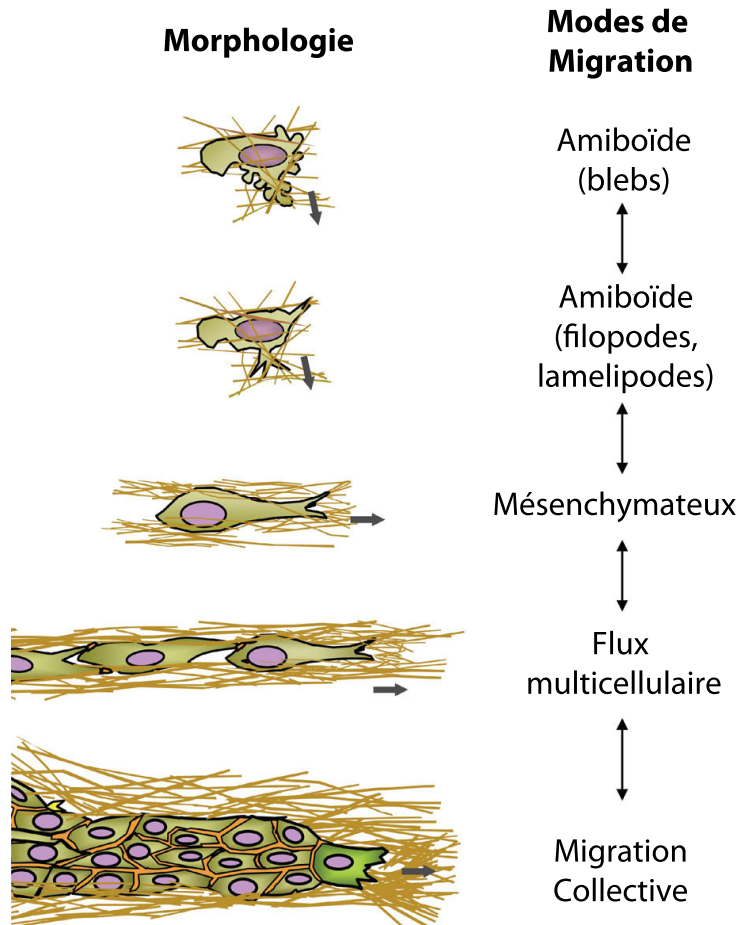


Figure 23. Les différents modes de migration cellulaire.

De façon à s'adapter à leur microenvironnement les cellules tumorales sont capables d'adopter différents modes de migration, principalement caractérisés par la morphologie cellulaire. Dans un environnement peu dense, les cellules peuvent migrer selon un mode amiboïde (formation de blebs ou de protrusions courtes). Dans un environnement plus dense, les cellules migrent selon un mode mésenchymateux. Si plusieurs cellules suivent une cellule « meneuse » on assiste à la formation d'un flux multicellulaire qui peut évoluer vers une migration collective si les jonctions cellule-cellule sont maintenues. Adapté de Friedl and Wolf, 2010.

2.2 Aspects moléculaires

Des études précédentes ont montré que les modes de migration mésenchymateux et amiboïde diffèrent au niveau des voies de signalisation qui les régulent. Cependant, les membres de la famille

des petites GTPases Rho sont également des régulateurs clés des deux types de migration cellulaire en 3D. Dans les cellules de mélanome il a été montré que c'est le complexe NEDD9-DOCK3 (GEF-guanine nucleotide exchange factor) qui permet l'activation de Rac (**Figure 20**). De façon similaire à ce qui se passe en 2D, Rac active ensuite le complexe WAVE2 (protéine de la famille WASP). Le complexe Arp2/3, après activation par le complexe WAVE2, est également impliqué dans la régulation de la polymérisation de l'actine.

Le mode de migration amiboïde est, quand à lui largement associé au niveau de phosphorylation de la myosine II (MLC2) ainsi qu'à la contractilité des filaments d'actine-myosine sous le contrôle de Rho/ROCK (**Figure 24**). Il a été montré qu'une diminution de Rac conduit à l'augmentation de la phosphorylation de MLC2, montrant ainsi que Rac régule de façon négative le mouvement amiboïde. La réduction de DOCK3 ou de NEDD9 conduit à une augmentation de la phosphorylation de MLC2, indiquant que Rac promeut le mouvement mésenchymateux et réprime le mouvement amiboïde en gardant des niveaux faibles de MLC2 phosphorylé. Il est donc évident que Rac et Rho ont des effets opposés sur la migration cellulaire des cellules de mélanome (Sanz-Moreno et al., 2008).

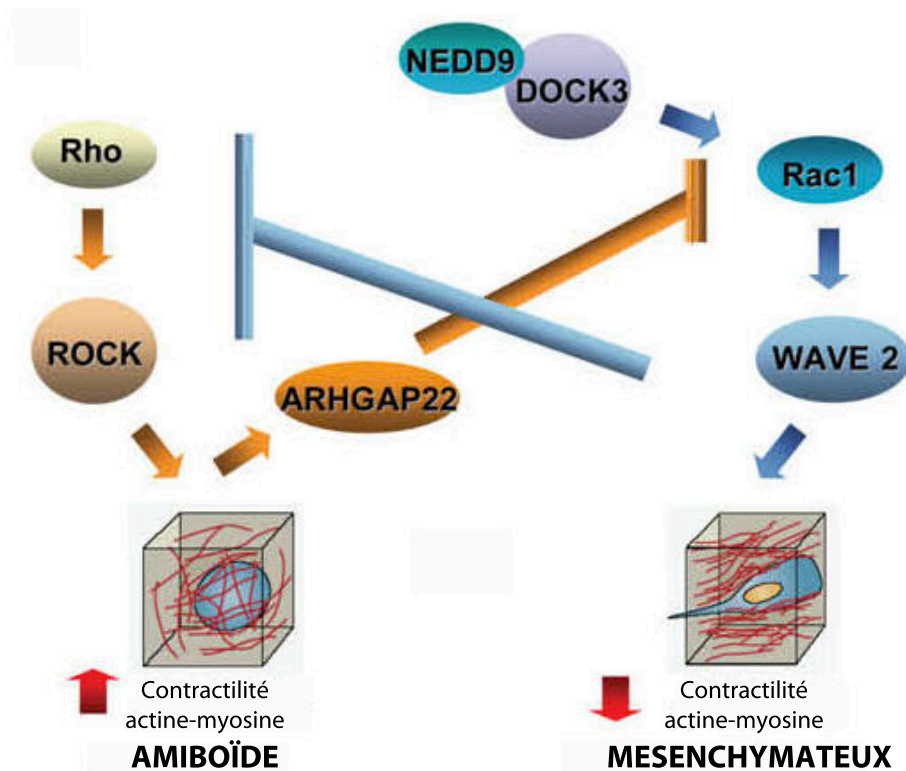


Figure 24. Représentation schématique des molécules régulant l'équilibre et l'interconvertibilité entre les modes de migration mésenchymateux et amiboïde.

En système 3D, les cellules tumorales peuvent adopter deux types de migration interconvertibles : le mode mésenchymateux et le mode amiboïde. Le mode mésenchymateux dépend de l'activation de Rac1 et WAVE2 par le complexe NEDD9-DOCK3. Le

mode amiboïde est dépendent de l'activation de la voie Rho/ROCK. Adapté de Sanz-Moreno et al., 2008.

2.3 La transition mésenchymateuse-amiboïde (TMA)

La mise en évidence de la transition mésenchymateuse-amiboïde a été faite pour la première fois par l'équipe de P. Friedl en 2003 (Friedl and Wolf, 2003). Son équipe a montré, *in vitro*, que des cellules tumorales HT1080 (fibrosarcome) et MDA-MB-231 (carcinome mammaire) migrent dans une matrice de collagène de type I fibreux selon un mode mésenchymateux. Cependant, ces cellules peuvent contourner un blocage de la protéolyse en adoptant un mode de migration amiboïde et poursuivre ainsi leur migration. Des résultats similaires ont été observés par l'équipe de C.J. Marshall sur des cellules de mélanome en culture. Les expériences, *in vitro*, dans du Matrigel™ ont montré que certaines lignées tumorales migraient en utilisant le mode amiboïde dépendant de ROCK alors que d'autres lignées migraient en utilisant le mode mésenchymateux indépendant de ROCK. Parmi les lignées migrant selon un mode mésenchymateux seules certaines sont capables d'effectuer la transition mésenchymateuse-amiboïde après inhibition de la protéolyse. D'autres équipes contestent l'existence de cette TMA et affirment que les cellules requièrent absolument la dégradation de la matrice (*via* la sécrétion de métalloprotéases) pour envahir le tissu adjacent à la tumeur. Selon eux le collagène ou le Matrigel™ utilisé pour les expériences *in vitro* n'est pas représentatif de la matrice extracellulaire présente *in vivo* (Sabeh et al., 2009).

Cependant, la question de savoir si de telles transitions interviennent *in vivo* reste importante. En effet, l'échec des thérapies basées sur les inhibiteurs des métalloprotéases (MMPs) lors d'essais cliniques suggère que les cellules tumorales seraient capables de migrer selon un mécanisme indépendant des MMPs. Une étude récente de l'équipe de E. Sahai a prouvé que les cellules de mélanome A375M étaient réellement capables de migrer selon un mécanisme indépendant des MMPs. Son équipe a mis au point un modèle informatique permettant de prédire le comportement migratoire des cellules de mélanome dans une matrice riche en collagène, extrêmement semblable à celle qui entoure les tumeurs *in vivo*. Avec ce modèle ils ont pu démontrer, à la fois *in silico* et *in vivo*, que dans cet environnement les cellules de mélanome adoptent préférentiellement un mode de migration amiboïde plutôt que mésenchymateux pour se déplacer (Tozluoglu et al., 2013).

3. L'invasion

Les cellules tumorales sont capables de migrer de la tumeur primaire vers d'autres sites pour y former des métastases. Pour y parvenir les cellules doivent se détacher de la masse primaire, envahir

le tissu environnant et traverser plusieurs barrières : le tissu adjacent, la membrane basale, l'endothélium vasculaire et le système lymphatique. Enfin elles doivent s'extravaser et coloniser de nouveaux tissus. La réussite de ce parcours suggère une formidable capacité d'adaptation de ces cellules.

Dans ce chapitre je détaillerai les mécanismes d'invasion utilisés par les cellules de mélanome. Les mélanomes sont des tumeurs cutanées hautement métastatiques. L'invasion des mélanomes résulte de la combinaison de différents mécanismes : la transition pseudo épithélio-mésenchymateuse, la perte de l'adhésion cellule-cellule, la perte de l'adhésion cellule-matrice, la dégradation de la matrice, la chimioattraction/répulsion et la migration. Au cours de la phase de croissance radiale, les mélanocytes prolifèrent de façon aberrante et réduisent leur interaction avec les kératinocytes, *via* une perte d'expression des cadhérines E et P et de la desmogléine. Cette phase est suivie d'une phase de croissance verticale marquant le début du phénomène de migration, puisque les cellules de mélanome migrent de l'épiderme vers le derme en franchissant la lame basale. Cette transmigration, inverse de la migration normale des mélanoblastes, est une étape clé de la formation des métastases et s'accompagne d'une expression *de novo* de l'intégrine $\alpha\beta 3$ (Pinon and Wehrle-Haller, 2011).

Selon les études effectuées en système 3D, la présence d'invadopodes, protrusions de la membrane plasmique riches en actine, serait essentielle au franchissement de la membrane basale (**Figure 25**). La formation des invadopodes dans des cellules de morphologie mésenchymateuse requiert la présence de cortactine qui stabilise les filaments d'actine et régule le trafic vésiculaire des métalloprotéases vers les invadopodes (Clark et al., 2007). Les vésicules contenant les métalloprotéases, notamment MT1-MMP/MMP14, MMP2 et MMP9, sont dirigées vers les invadopodes par le complexe d'exocytose, qui régule l'attachement des vésicules post-Golgiennes à la membrane cytoplasmique (Poincloux et al., 2009). Les métalloprotéases sont ensuite libérées à l'extrémité de l'invadopode (Ridley, 2011; Schoumacher et al., 2010) et sont capables de dégrader la Matrice extracellulaire (MEC) ce qui permet la progression des cellules de mélanome (Gaggioli and Sahai, 2007; Pichot et al., 2010). La dégradation de la MEC par les invadopodes distingue clairement ces structures des lamellipodes et des filopodes.

Cependant, l'absence d'invadopodes dans les mélanocytes normaux indique que les cellules de mélanome et les mélanocytes utilisent des protrusions membranaires et des protéines distinctes pour migrer (Li et al., 2010; Pichot et al., 2010). Les cellules de mélanome ne dégradent pas entièrement la membrane basale, mais créent, grâce à l'action des invadopodes, des petites perforations. Celles-ci vont ouvrir la voie à la dissémination des cellules dans le derme et à leur interaction avec les cellules

endothéliales, préambule à l'intravasation des capillaires sanguins. Les études transcriptomiques ont identifié de nombreux gènes dont l'expression est altérée dans les cellules de mélanome devenues invasives. Parmi les nombreuses molécules participant activement au processus d'invasion des cellules de mélanome, je citerai la protéine adaptatrice NEDD9 (Kim et al., 2006; Sanz-Moreno et al., 2008), dont l'expression est souvent amplifiée dans les mélanomes ayant métastasé. Le chapitre suivant sera entièrement dédié à la description de la protéine NEDD9 et de son rôle dans les mélanomes.

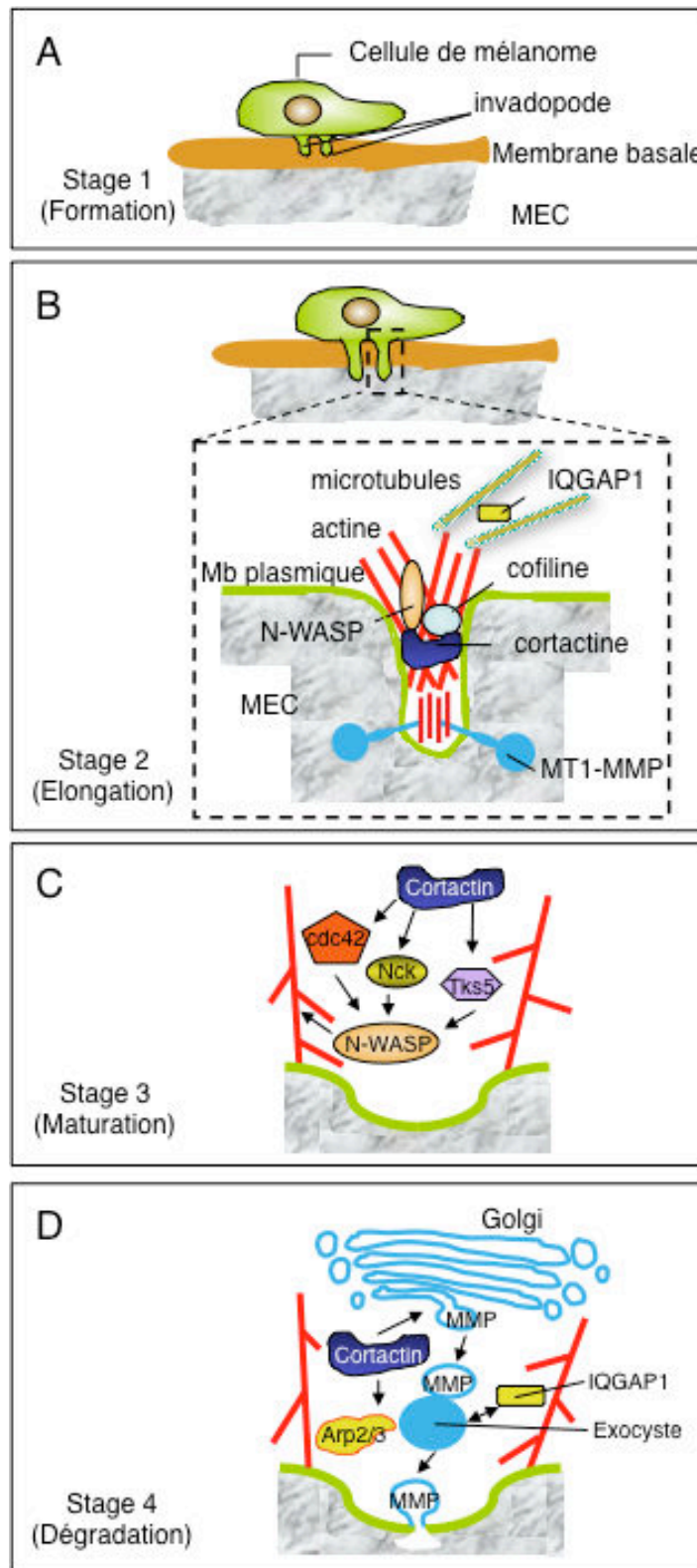


Figure 25. Formation, caractéristiques moléculaires et fonction des invadopodes.

A : Interaction entre une cellule tumorale et la membrane basale (Stage 1). B : Grossissement d'un invadopode montrant les principales molécules impliquées dans l'assemblage de l'actine et la dégradation de la MEC (Stage 2). C : La maturation d'un invadopode implique la cortactine et la polymérisation de l'actine *via* N-WASP (Stage 3). Nck est un régulateur de N-WASP et Tks5 (tyrosine kinase substrate with 5 SH3 domains). Cette protéine peut recruter et phosphoryler la

cortactine. D : Dégradation de la MEC par l'invadopode (Stage 4). La cortactine est impliquée dans le trafic vésiculaire des métalloprotéases (MMPs) vers les invadopodes *via* la régulation du trafic post-Golgien ou par la capture de ces vésicules au niveau de la membrane plasmique. La protéine IQGAP1 coordonne l'assemblage de l'actine. Les MMPs sont relâchées dans la MEC à travers de petites perforations dans la membrane plasmique. Adapté de Bonaventure et al., 2013.

4. NEDD9, un régulateur de la migration et de l'invasion des cellules de mélanome

La protéine « Neural precursor Expressed Developmentally Down regulated 9 » (NEDD9), aussi appelée HEF-1 ou CAS-L, fait partie de la famille des protéines Cas. Les membres de cette famille sont caractérisés par une organisation en différents domaines très conservés (**Figure 26**):

- ❖ un domaine N-terminal SH3 (Src homology 3),
- ❖ un domaine SH2 de liaison au substrat (SD) contenant plusieurs résidus Tyrosine, qui après phosphorylation, régulent l'interaction avec d'autres protéines SH2,
- ❖ un domaine riche en résidus Sérine composé d'un ensemble de 4 hélices (SRR),
- ❖ un domaine C-terminal également composé d'un ensemble de 4 hélices (Guerrero et al., 2012; O'Neill and Golemis, 2001).

La protéine NEDD9 est codée par le gène *NEDD9* localisé sur le chromosome 6 chez l'Homme. Le mécanisme de régulation transcriptionnel de ce gène est encore peu connu et seul quelques facteurs de transcription régulant directement *NEDD9* ont été identifiés à ce jour. Cependant, une étude menée par l'équipe de W. Liu en 2011 a permis l'identification de quatre sites de liaison à TCF sur le promoteur de *NEDD9* (Li et al., 2011b), suggérant ainsi que *NEDD9* serait un gène cible de la voie Wnt/ β -caténine. *NEDD9* pourrait donc être régulé négativement par ICAT.

La protéine NEDD9 existe sous plusieurs formes de différents poids moléculaire. Les formes de 105 et 115 kDa se localisent toutes deux au niveau des adhésions focales. La protéine de 115 kDa correspond à la forme hyper-phosphorylée de NEDD9 et elle est induite par la formation des adhésions focales, suggérant un rôle de cette forme hyper-phosphorylée lors de la migration cellulaire (O'Neill and Golemis, 2001).

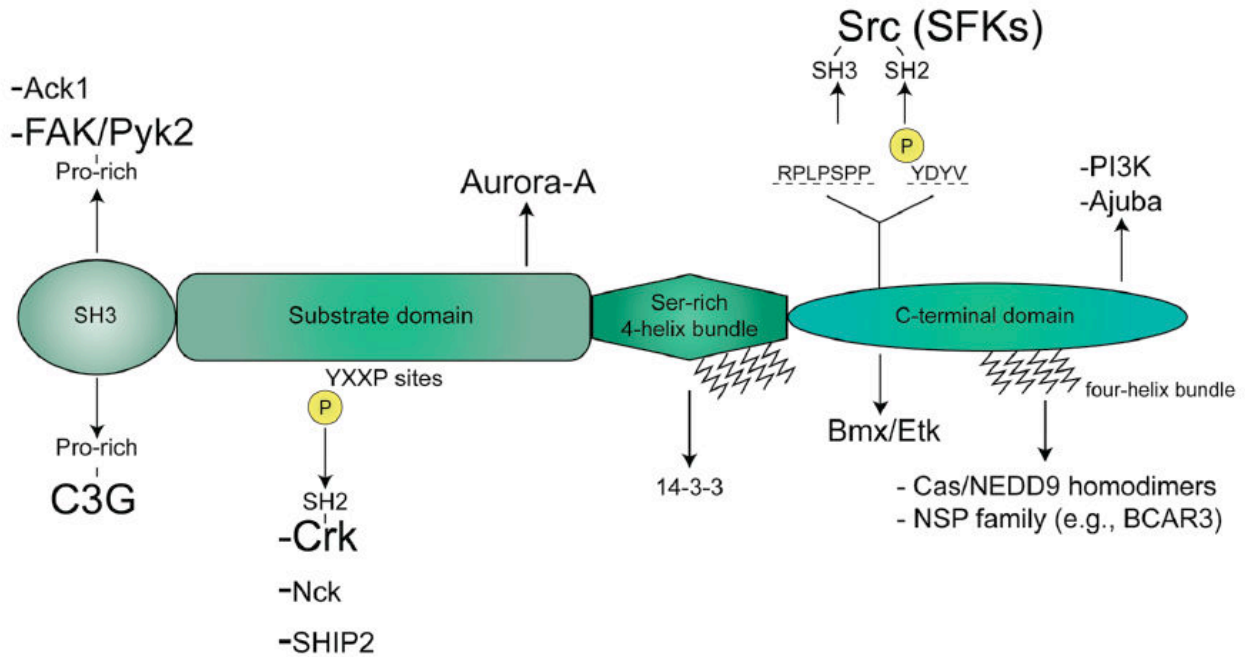


Figure 26. Représentation schématique des domaines structuraux de NEDD9.

Les différents domaines de NEDD9 sont représentés : un domaine N-terminal SH3, un domaine de liaison au substrat contenant de multiples motifs YXXP phosphorylés par les kinases de la famille Src (SFKs), un domaine riche en sérine et un domaine C-terminal contenant des sites de liaison pour les SFKs ainsi que pour d'autres membres de la famille Cas. Adapté de Guerrero et al., 2012.

NEDD9 est l'une des protéines essentielles aux cascades de signalisation intégrines-dépendantes qui régulent l'adhésion, la migration, l'invasion et la survie cellulaire. Les intégrines sont une famille de récepteurs transmembranaires qui assurent la liaison entre la MEC et le cytosquelette d'actine. Ces points d'adhésion entre la cellule et la matrice sont connus sous le nom d'adhésions focales. La formation d'adhésions focales est le point de départ des cascades de signalisation conduisant à l'activation de deux tyrosines kinases : « focal adhesion kinase » (FAK) et Src. De nombreuses voies de signalisation ont été décrites comme régulant l'activation de la migration cellulaire par FAK. La mieux décrite à ce jour est la phosphorylation de p130Cas, un autre membre de la famille Cas, par le complexe FAK/Src. La forme phosphorylée de p130Cas s'associe ensuite à la protéine adaptatrice Crk, permettant ainsi l'activation de la migration cellulaire *via* Rac (Bolos et al., 2010; Schaller, 2010; Zhao and Guan, 2011).

De façon similaire aux autres membres de la famille Cas, NEDD9 se localise principalement au niveau des adhésions focales. En 2006, l'équipe de L. Chin a montré que NEDD9 et FAK co-localisent au niveau des adhésions focales (Kim et al., 2006) suggérant un mécanisme similaire à celui observé avec p130Cas conduisant à l'activation de la migration cellulaire. Depuis, l'équipe de

CJ. Marshall a confirmé le rôle de NEDD9 dans la migration et l'invasion des cellules de mélanome comme je l'ai décrit dans le paragraphe sur les aspects moléculaires de la migration 3D (Sanz-Moreno et al., 2008).

De nombreuses études ont démontré une implication de NEDD9 dans différents types de cancer. En effet, une surexpression de NEDD9 est associée à la formation de métastases dans les mélanomes et les cancers du poumon (O'Neill et al., 2007). De plus, NEDD9 induit l'activation de nombreuses voies de signalisation oncogénique, telles que AKT, ERK et SRC dans les cancers du sein. Cependant, des études récentes menées sur des tumeurs mammaires ont montré une hyper-agressivité des cellules dérivées de tumeurs MMTV-PyTV ; Nedd9^{-/-} comparé aux cellules dérivées de tumeurs MMTV-PyTV ; Nedd9^{+/+} (Singh et al., 2010). En effet, il a été observé pour les cellules MMTV-PyTV ; Nedd9^{-/-} une augmentation: i) du nombre de colonies formées en agar mou, ii) de la formation de tumeurs après une réinjection au niveau mammaire et iii) de la formation de métastases pulmonaires après injection intraveineuse, montrant clairement que l'absence de Nedd9 favorise une augmentation de l'agressivité des tumeurs *in vivo*.

L'ensemble de ces informations suggère que NEDD9 est un régulateur complexe de la migration et de l'invasion cellulaire et qu'une surexpression de NEDD9 n'est pas systématiquement associée à la formation de métastases dans les cancers.

PARTIE D:
PROJET DE THÈSE

Le mélanome cutané est une forme particulièrement agressive de cancer de la peau qui se caractérise par une forte propension à former des métastases. En dépit de progrès récents dans le diagnostic de la maladie et de l'avènement de nouvelles molécules capables de bloquer temporairement la voie B-RAF/MAPK (vemurafenib), le pronostic pour les patients reste très mauvais avec un temps de survie dépassant rarement 13 mois suite à la découverte des métastases.

Plusieurs protéines ont été identifiées comme étant à l'origine des mélanomes. Entre elles, la protéine β -caténine qui est un effecteur essentiel de la voie de signalisation Wnt. Cependant des travaux *in vivo* et *in vitro* menés par plusieurs équipes ont abouti à des conclusions apparemment discordantes concernant le rôle de β -caténine dans la progression des mélanomes, en particulier lors de l'invasion tumorale (Arozarena et al., 2011; Chien et al., 2009; Gallagher et al., 2012).

Les régulateurs négatifs directs de β -caténine sont peu nombreux et leurs rôles restent mal connus. Ils pourraient cependant rendre compte de certains résultats contradictoires observés *in vitro* et *in vivo* avec β -caténine. Nous avons donc choisi de nous intéresser au produit du gène *CTNNB1PI* codant pour la protéine ICAT, qui est capable de se lier directement à β -caténine et d'entrer en compétition avec les facteurs de la famille TCF/LEF (Tago et al., 2000) provoquant une diminution de l'activation des gènes cibles de β -caténine. De plus, des taux variable de ICAT ont été détectés chez des patients atteints de mélanome ayant métastasé ou non, suggérant un rôle de ICAT dans la progression du mélanome et/ou la formation de métastases (Reifenberger et al., 2002; Winnepeninckx et al., 2006).

Comme nous l'avons vu au cours de l'introduction, la voie Wnt/ β -caténine est l'une des voies essentielles à l'induction de la formation des cellules de crête neurale dont dérivent les mélanocytes. Différentes données suggèrent que ICAT joue un rôle à part entière dans la mise en place des dérivés des crêtes neurales. Des souris totalement invalidées pour ICAT présentent des anomalies de développement de la partie antérieure du cerveau et de la face, ainsi qu'une rupture de la paroi intestinale, qui sont létales à la naissance (Satoh et al., 2004). Toutefois, le rôle de ICAT dans la formation du lignage mélanocytaire est inconnu. Nous nous sommes donc intéressés au rôle de ICAT au cours du développement mélanocytaire *via* l'analyse d'embryons de souris totalement invalidés pour ICAT.

La voie Wnt/ β -caténine est activée dans 30% des mélanomes, ce qui souligne l'importance de cette voie de signalisation dans ce type de tumeurs et l'intérêt de l'identification de régulateurs

négatifs de cette voie. ICAT étant l'un des rares régulateurs négatifs de la voie Wnt/ β -caténine, il nous a paru essentiel d'étudier le rôle de ICAT dans la formation des mélanomes. J'ai donc entrepris une série de travaux afin d'établir au niveau cellulaire (prolifération, migration et invasion) et moléculaire (molécules cibles et signalisation) les conséquences de la surexpression de la protéine ICAT, *in vitro*, sur des cellules de mélanome en culture mais également, *in vivo*, sur des souris immunodéficientes.

La structure tridimensionnelle de ICAT n'a pu être découverte que grâce à sa liaison à β -caténine. En effet, la partie C-terminale de ICAT n'adopte aucune conformation en absence de liaison à β -caténine. Basé sur la structure cristallographique du complexe ICAT/ β -caténine (Daniels and Weis, 2002; Graham et al., 2002) certains acides aminés ont été prédits comme étant impliqués dans la liaison de ICAT à β -caténine. Dans ce contexte, j'ai entrepris une étude structure-fonction de la protéine ICAT, afin d'élucider les acides aminés directement impliqués dans l'interaction de ICAT avec β -caténine et de déterminer les effets de mutations spécifiques de ces acides aminés sur la fonction de la protéine.

RÉSULTATS

PRÉSENTATION DES RÉSULTATS

Partie A : Rôle de ICAT durant le développement embryonnaire murin

La première partie de ma thèse avait pour but d'analyser l'implication de ICAT dans le développement embryonnaire des mélanoblastes.

Les résultats obtenus n'ont cependant pas permis d'identifier ICAT comme une protéine essentielle au développement embryonnaire des mélanoblastes.

Partie B : Rôle de ICAT dans la motilité des cellules de mélanome

La seconde partie de ma thèse a consisté à comprendre le rôle de la protéine ICAT dans la migration et l'invasion des cellules de mélanome en culture ainsi que durant la formation de métastases chez des souris immunodéficientes.

Les résultats obtenus ont fait l'objet d'un article qui a été publié en 2014 dans le journal « Cancer Research » et sur lequel je suis premier auteur (Article 1).

β -catenin inhibitor ICAT modulates the invasive motility of melanoma cells

Mélanie J. Domingues, Florian Rambow, Bastien Job, Laura Papon, Wanguo Liu, Lionel Larue, Jacky Bonaventure.

Partie C : Analyse de la structure tridimensionnelle du complexe ICAT/ β -caténine

La troisième partie de ma thèse a porté sur l'étude de la structure tridimensionnelle du complexe ICAT/ β -caténine et plus particulièrement sur la validation des acides aminés de ICAT essentiels à la formation de ce complexe.

Les résultats obtenus jusqu'à présent seront présentés sous la forme d'un article (Article 2). Cependant, des expériences complémentaires, actuellement en cours, sont nécessaires pour compléter cette étude.

ICAT N-terminal domain is essential for the negative regulation of β -catenin-mediated transcriptional activity

Mélanie J. Domingues, Laura Papon, Lionel Larue, Jacky Bonaventure.

PARTIE A:
RÔLE DE ICAT
DURANT LE
DÉVELOPPEMENT
EMBRYONNAIRE
MURIN

1. Contexte et objectifs du projet

Nous avons choisi de nous intéresser au possible rôle de ICAT dans la formation du lignage mélanocytaire pour diverses raisons: (i) au niveau moléculaire, ICAT est un régulateur négatif de β -caténine; (ii) au niveau cellulaire, β -caténine est impliquée dans la prolifération, la migration et la différenciation des mélanoblastes (Larue and Delmas, 2006; Larue et al., 2003); (iii) au niveau développemental, le lignage mélanocytaire dérive des cellules de crête neurale et (iv) au niveau physiopathologique l'absence de ICAT entraîne des anomalies des dérivés céphaliques des crêtes neurales (Sato et al., 2004).

L'objectif de ce travail était donc de déterminer la fonction de ICAT dans le développement embryonnaire des mélanoblastes *via* une approche *in vivo*. Pour ce faire, nous avons produit et analysé des embryons de souris totalement invalidés pour *ICAT* portant le transgène *Dct::LacZ* (permettant la visualisation des mélanoblastes) à différents stades de développement embryonnaire.

2. Résultats

2.1 Phénotypes des souris invalidées pour le gène *ICAT*

Les souris adultes hétérozygotes *ICAT*^{+/-} sont phénotypiquement semblables aux souris sauvages *ICAT*^{+/+}, elles sont viables, fertiles et ne montrent pas d'anomalies comportementales évidentes (**Figure 27**). Cependant, les souris *ICAT*^{-/-} meurent à la naissance. Le phénotype de létalité embryonnaire se manifeste uniquement quand les deux allèles du gène *ICAT* sont invalidés, montrant qu'il s'agit d'une mutation récessive.



Figure 27. Phénotype des souris *ICAT*^{+/+} et *ICAT*^{+/-}.

Les souris adultes ICAT^{+/-} sont semblables aux souris ICAT^{+/+} et ne présentent aucun phénotype.

Nous avons tout d'abord croisé des souris ICAT^{+/-} entre elles et génotypé les descendants par PCR à différents stades embryonnaires (E13.5, E15.5 et E18.5) puisque les souris ICAT^{-/-} meurent à la naissance. Sur un total de 82 embryons obtenus, l'analyse génotypique a montré que l'inactivation complète du gène n'affecte en rien la distribution mendélienne attendue (22/82 soit 27% étaient WT, 42/82 soit 51% hétérozygotes et 18/82 soit 22% homozygotes). Phénotypiquement diverses anomalies cranio-faciales ont été observées chez les embryons ICAT^{-/-} (**Figure 28**): i) raccourcissement du museau, ii) absence complète ou partielle des yeux et iii) exencéphalie.

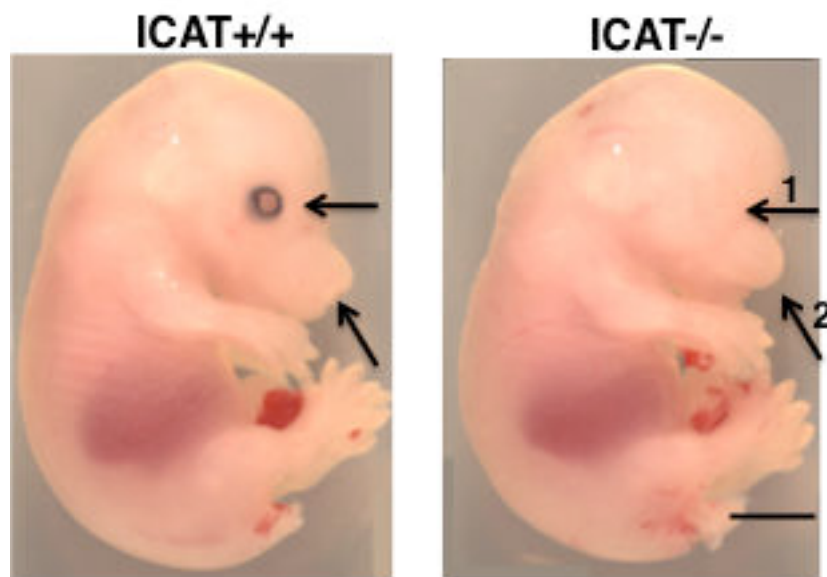


Figure 28. Phénotype des embryons ICAT^{+/+} et ICAT^{-/-} prélevés au stade de développement embryonnaire E15.5.

Absence d'yeux visibles (1) et raccourcissement du museau (2). Barre d'échelle = 2mm.

2.2 Etude du développement embryonnaire des mélanoblastes en absence de ICAT

Pour déterminer si ICAT est impliqué dans le développement du lignage mélanocytaire, nous avons croisé les souris homozygotes de la lignée transgénique Dct::LacZ avec des souris hétérozygotes pour l'inactivation d'ICAT (ICAT^{+/-}). Ce croisement a généré des souris ICAT^{+/-} portant le transgène Dct::LacZ. Ces souris ont ensuite été croisées entre elles et ont généré des souris totalement invalidées pour ICAT portant le transgène Dct::LacZ.

Le locus du gène *CTNNBIP1/ICAT* est localisé dans la partie télomérique du chromosome 4 et le transgène Dct::LacZ s'est intégré dans la région centromérique de ce chromosome. Ils sont

cependant, séparés par une distance physique de 60 Mb environ. Afin de vérifier si la ségrégation de ces deux loci se fait de façon indépendante nous avons calculé le pourcentage théorique de chaque génotype attendu (selon les lois de Mendel) et nous l'avons comparé avec le pourcentage de chaque génotype observé (**Tableau 1**). Les résultats obtenus à ce jour (sur 82 embryons) nous suggèrent que la ségrégation se fait de façon indépendante.

Génotype	Pourcentages théoriques	Pourcentages observés
ICAT+/+; LacZ/LacZ	1/16 = 6.25 %	8/82 = 10 %
ICAT -/-; LacZ/LacZ	1/16 = 6.25 %	4/82 = 5 %
ICAT+/-; LacZ/LacZ	1/8 = 12.5 %	9/82 = 11 %
ICAT+/+; LacZ/°	1/8 = 12.5 %	7/82 = 8.5 %
ICAT+/-; LacZ/°	1/4 = 25 %	22/82 = 27%
ICAT -/- ; LacZ/°	1/8 = 12.5 %	9/82 = 11%
ICAT+/+; °/°	1/16 = 6.25 %	7/82 = 8.5 %
ICAT+/- ; °/°	1/8 = 12.5 %	11/82 = 13 %
ICAT -/- ; °/°	1/16 = 6.25 %	5/82 = 6 %

Tableau 1. La ségrégation des loci *CTNNB1P1/ICAT* et *Dct::LacZ* est possible.

Le pourcentage de chaque génotype théorique a été calculé selon les lois de Mendel. Le pourcentage de chaque génotype observé a été calculé à partir des embryons obtenus et prélevés à différents stades de développement embryonnaire (E13.5, E15.5 et 18.5).

La coloration *in toto* par le X-gal, des embryons aux stades E13.5 (**Figure 29A**) et E15.5 (**Figure 29B**) permet la visualisation des mélanoblastes. L'observation des embryons à ces deux stades n'a pas révélé de différences objectives entre les embryons sauvages (ICAT+/+), hétérozygotes (ICAT+/-) et homozygotes (ICAT-/-) au niveau de la localisation des mélanoblastes.

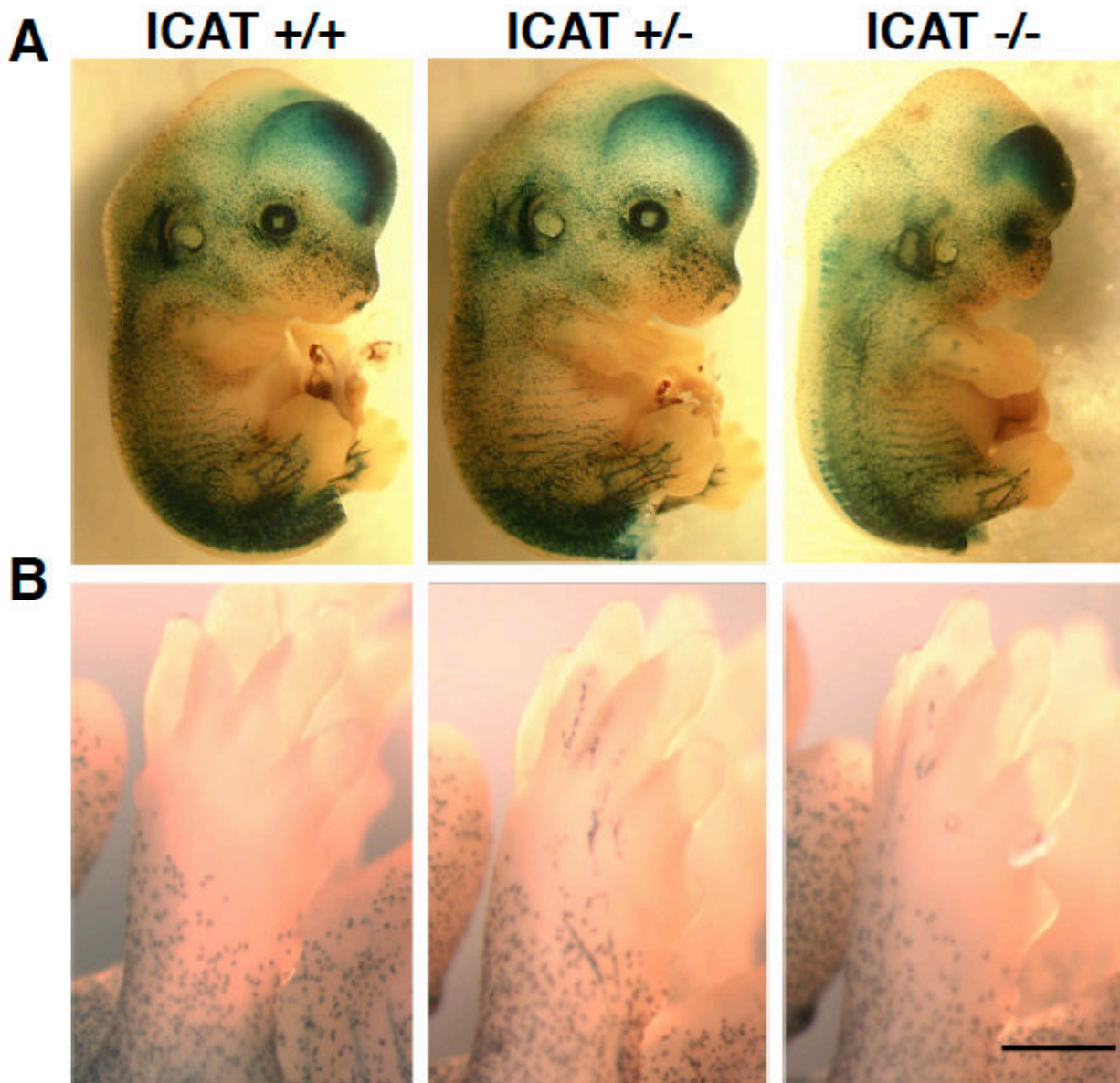


Figure 29. Visualisation des mélanoblastes des embryons E13.5 et E15.5.

A : Visualisation des mélanoblastes colorés au X-gal des embryons ICAT^{+/+}, ICAT^{+/-} et ICAT^{-/-} prélevés au stade de développement embryonnaire E13.5. Barres = 2mm. B: Visualisation des mélanoblastes colorés au X-gal de la patte avant droite des embryons ICAT^{+/+}, ICAT^{+/-} et ICAT^{-/-} prélevés au stade de développement embryonnaire E15.5. Barre d'échelle = 0,5 mm

De plus, le comptage des cellules LacZ positives au niveau troncal entre les somites 13 et 25 pour les embryons E13.5 et dans une zone définie du flanc droit pour les embryons E15.5 a donné des chiffres qui ne sont pas statistiquement différents entre les 3 génotypes (**Figure 30**).

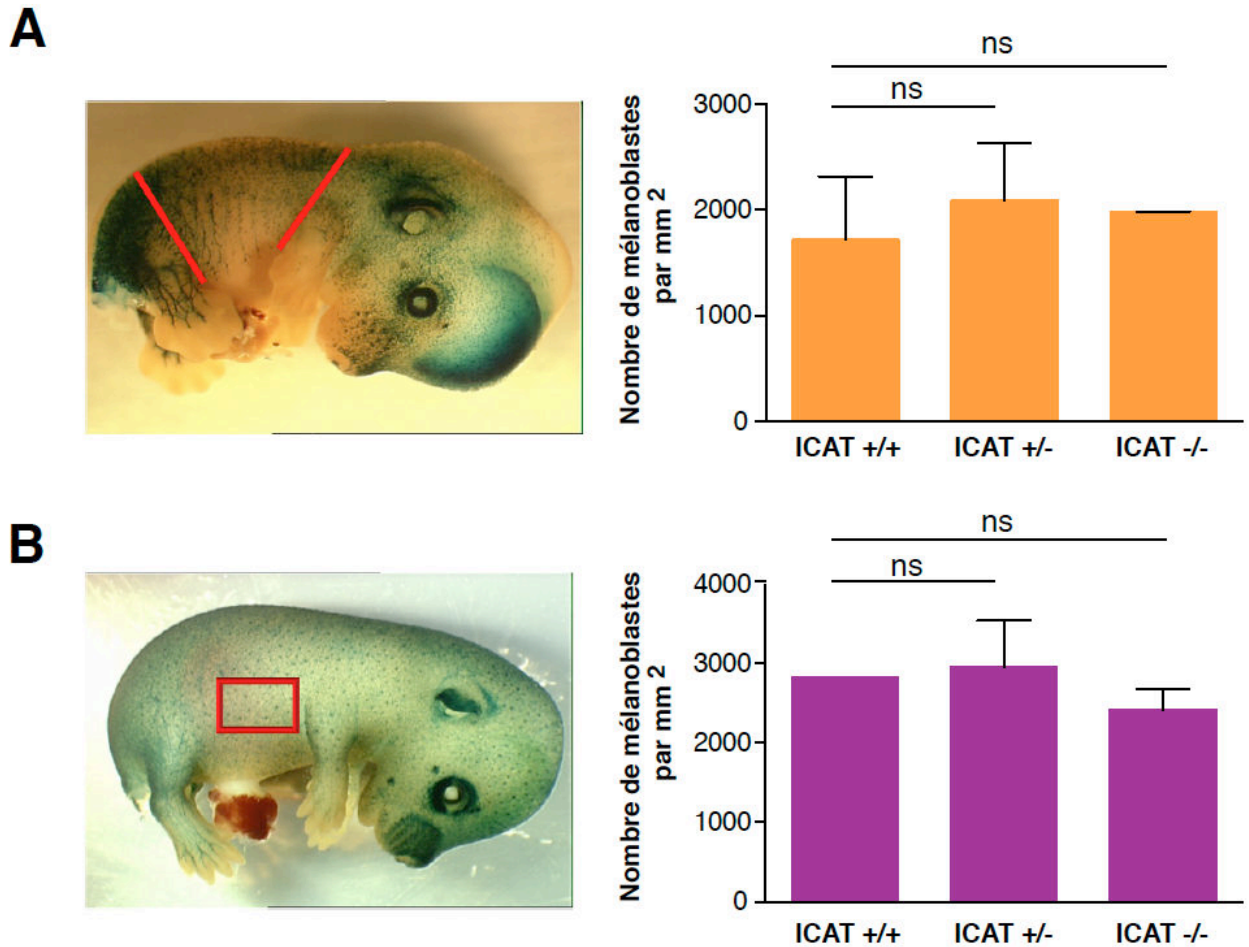


Figure 30. Nombre de mélanoblastes/mm² des embryons E13.5 et E15.5.

A : Pour les embryons prélevés au stade de développement embryonnaire E13.5 le comptage des mélanoblastes a été effectué entre les somites 13 et 25, délimités par des lignes rouges, sur chaque côté de l'embryon. B : Pour les embryons prélevés au stade de développement embryonnaire E15.5 le comptage des mélanoblastes a été effectué dans une zone définie sur le flanc droit, délimitée par un cadre rouge, sur chaque embryon. Les embryons utilisés pour le comptage des mélanoblastes étaient issus de la même portée. ns : non significatif.

Au stade de développement embryonnaire E18.5 la coloration *in toto*, par le X-gal, des embryons n'est plus possible car le X-gal ne pénètre plus dans la peau. Des coupes troncales de la peau des embryons ont donc été réalisées et une immunofluorescence avec un anticorps anti- β -gal a permis la visualisation des mélanoblastes (**Figure 31A**). Les mélanoblastes présents au niveau de l'épiderme, du derme et des follicules pileux ont été comptés. Cependant, aucune différence entre les trois génotypes n'a été révélée par ces comptages (**Figure 31B**).

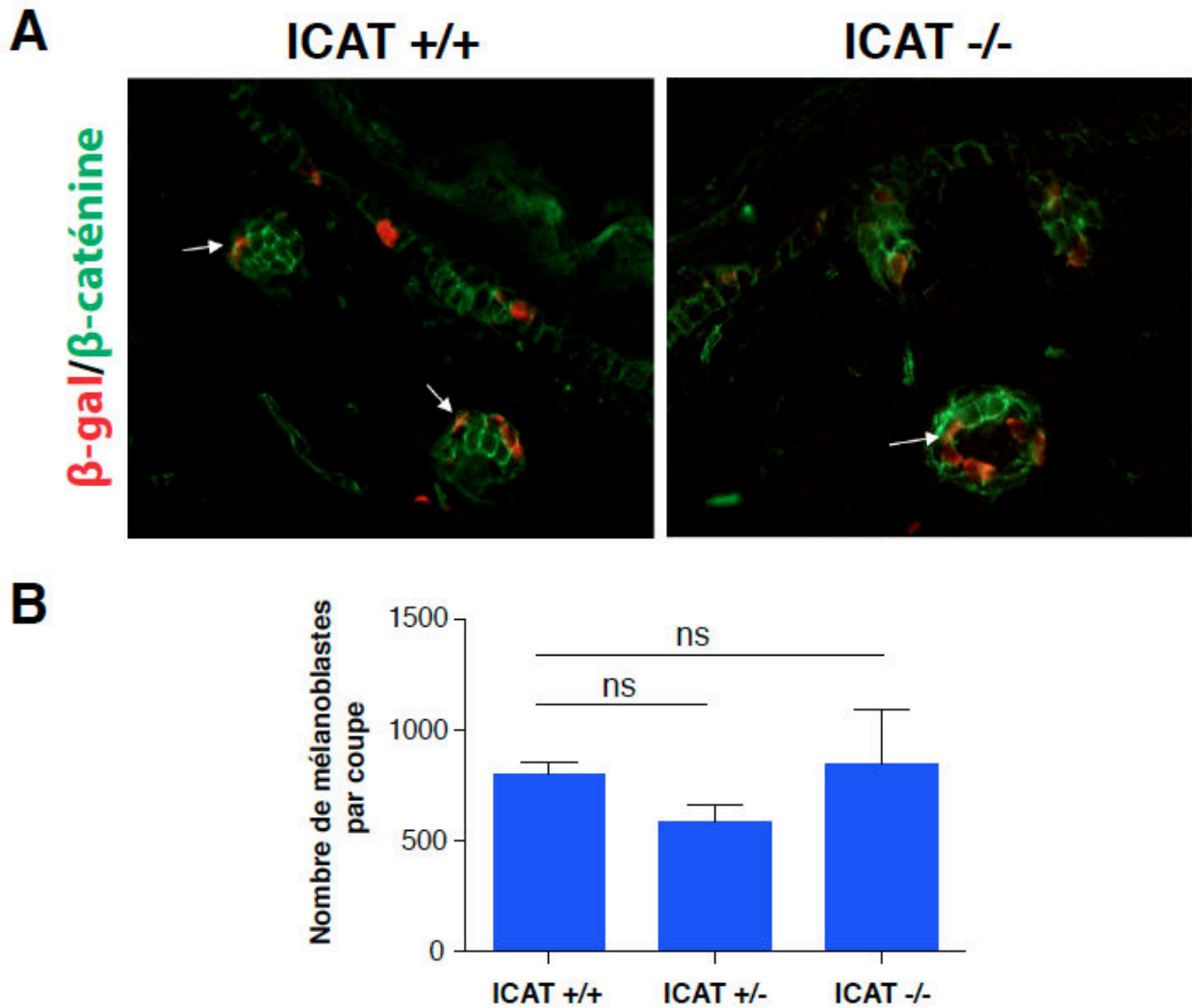


Figure 31. Coupes troncales de la peau et nombre de mélanoblastes moyen par coupe des embryons E18.5.

A : Visualisation des mélanoblastes (rouge) dans l'épiderme et les follicules pileux (flèches blanches). Les cellules de la peau (kératinocytes, mélanoblastes et fibroblastes) exprimant β -caténine apparaissent en vert. B : Le comptage des mélanoblastes a été effectué sur 3 coupes au minimum pour un même embryon. ns : non significatif.

Au vu des résultats obtenus, il semblerait que la protéine ICAT joue un rôle essentiel dans le développement embryonnaire de certains dérivés des crêtes neurales, tels que les dérivés céphaliques et entériques. Cependant, l'inactivation totale de *ICAT* n'a aucun effet sur le développement embryonnaire des mélanoblastes, pourtant également dérivés des CCN.

PARTIE B:

RÔLE DE ICAT DANS

LA MOTILITÉ DES

CELLULES DE

MÉLANOME

1. Contexte et objectifs du projet

Une activation anormale de la voie de signalisation Wnt/ β -caténine est associée à de nombreux cancers y compris les mélanomes. Une forte accumulation nucléaire de β -caténine a été observée dans des échantillons humains de mélanome et a été associée à une meilleure survie chez certains patients. Cependant des résultats contradictoires ont été obtenus *in vitro*, ce qui suggère que β -caténine peut aussi bien agir comme un facteur pro- ou anti- invasif selon sa quantité et sa localisation dans les cellules.

Comme nous l'avons vu dans l'introduction ICAT est l'un des facteurs capables de réguler directement β -caténine. Cependant, son rôle putatif dans la progression du mélanome et la formation des métastases reste encore inconnu. La formation des métastases est un processus complexe impliquant plusieurs étapes dont la motilité cellulaire. Des études récentes ont montré que les cellules tumorales individuelles peuvent adopter deux types de migration différents : le mode mésenchymateux et le mode amiboïde. Il est important de mentionner que ces deux modes de migration sont interconvertibles et que les cellules de mélanome peuvent changer spontanément de type de migration de façon à s'adapter à leur microenvironnement.

Pour mener à bien ce projet j'ai réalisé une série d'expériences visant à déterminer les conséquences de la surexpression de la protéine ICAT sur la prolifération, la migration et l'invasion des cellules de mélanome en culture ou après injection de cellules de mélanome surexprimant ICAT chez des souris immunodéficientes. J'ai également étudié les molécules cibles et les voies de signalisation impliquées dans la régulation de la migration cellulaire par ICAT.

2. Résultats

Les résultats obtenus ont fait l'objet d'un article qui a été publié en 2014 dans le journal « Cancer Research » et sur lequel je suis premier auteur (Article 1).

Article 1
 β -catenin inhibitor ICAT
modulates the invasive motility of
melanoma cells



Cancer Research

β -Catenin Inhibitor ICAT Modulates the Invasive Motility of Melanoma Cells

Mélanie J. Domingues, Florian Rambow, Bastien Job, et al.

Cancer Res Published OnlineFirst February 10, 2014.

Updated version Access the most recent version of this article at:
doi:[10.1158/0008-5472.CAN-13-0920](https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-13-0920)

Supplementary Material Access the most recent supplemental material at:
<http://cancerres.aacrjournals.org/content/suppl/2014/02/10/0008-5472.CAN-13-0920.DC1.html>

E-mail alerts [Sign up to receive free email-alerts](#) related to this article or journal.

Reprints and Subscriptions To order reprints of this article or to subscribe to the journal, contact the AACR Publications Department at pubs@aacr.org.

Permissions To request permission to re-use all or part of this article, contact the AACR Publications Department at permissions@aacr.org.

β -Catenin Inhibitor ICAT Modulates the Invasive Motility of Melanoma Cells

Mélanie J. Domingues^{1,2,3}, Florian Rambow^{1,2,3}, Bastien Job⁴, Laura Papon^{1,2,3}, Wanguo Liu⁵, Lionel Larue^{1,2,3}, and Jacky Bonaventure^{1,2,3}

Abstract

Inhibitor of β -catenin and TCF (ICAT) inhibits β -catenin transcriptional activity by competing with T-cell factor/lymphoid enhancer factor. We documented high ICAT levels in human melanoma cells, in which β -catenin signaling is frequently deregulated, finding a correlation with the capacity to form metastases in nude mice. Ectopic expression of ICAT in melanoma cells did not affect their proliferation but increased cell motility and Matrigel invasion of metastatic cells in a manner relying upon stable ICAT- β -catenin interaction. This effect was associated with conversion of an elongated/mesenchymal phenotype to a round/amoeboid phenotype in the absence of similar effects on elongated morphology of nonmetastatic melanoma cells. Transition from mesenchymal to amoeboid movement was associated with decreased levels of NEDD9 and activated Rac1, a positive regulator of mesenchymal movement. Ectopic ICAT promoted colonization of melanoma cells in the lungs of nude mice, suggesting an increase in metastatic potential. Together, our results showed that by downregulating Rac signaling in metastatic melanoma cells, ICAT increased their invasive motility by promoting a morphologic variation that facilitates a favorable adaptation to their microenvironment. *Cancer Res*; 74(7); 1–13. ©2014 AACR.

Introduction

β -Catenin is a multifunctional protein exhibiting various functions depending on its cellular localization and interactions with diverse protein ligands. In the cytoplasm and nucleus, β -catenin is the central protein of the canonical WNT signaling pathway. Aberrant WNT signaling is associated with many types of cancer including carcinomas and melanoma. Constitutive nuclear localization of β -catenin in mouse melanocytes promotes their immortalization and favors melanoma progression and invasion in an NRAS-driven melanoma model (1, 2). High nuclear β -catenin levels in melanoma samples have been associated in some patients with improved survival (3); however, conflicting findings for the *in vitro* invasion of melanoma cells have been reported (4, 5), suggesting that β -catenin may act as a pro- or anti-*in vitro* invasion factor.

Inhibitor of β -catenin and TCF (ICAT) is one of the few direct negative regulators of β -catenin (6). This small protein of 81 amino acids (encoded by the conserved *CTNNBIP1* gene) is

known to repress T-cell factor/lymphoid enhancer factor (TCF/LEF)- β -catenin transcriptional activity *in vitro* (7–9). Crystallographic analysis of the ICAT/ β -catenin complex identified two ICAT domains essential for interaction: (i) an amino-terminal domain composed of three α helices and (ii) a non-structured carboxy-terminal domain that adopts a β -sheet-like conformation upon interaction with β -catenin (7, 8, 10).

Total invalidation of the ICAT mouse gene leads to premature death of newborn animals associated with gut, kidney, and craniofacial anomalies, suggesting an important role in epithelial establishment/maintenance and neural crest cell differentiation (11). This phenotype is consistent with ICAT being involved, through β -catenin regulation, in the fate and migration of neural crest cells giving rise to many cell types including melanocytes (11, 12).

Variable ICAT expression has been detected in metastatic and nonmetastatic human melanoma samples (13, 14). However, whether ICAT plays a role in melanoma progression and/or metastasis formation is still unknown. Formation of metastases is a multistage process involving cell motility. The motility of melanoma cells through three-dimensional (3D) matrices *in vitro* relies on two interconvertible modes of movements involving Rac and Rho GTPases (15). Elongated cells display a Rac-dependent mesenchymal movement (16), whereas round/ellipsoid cells display Rho/Rho-associated, coiled-coil containing protein kinase (ROCK)-dependent amoeboid motility (17–20).

Mesenchymal movement in melanoma cells seemed to be driven, *in vitro*, by the neural precursor expressed, developmentally downregulated 9 (NEDD9) protein, a member of the CAS family (15). TCF/LEF binding sites have been found in the human promoter of *NEDD9* in colorectal cancer cells, identifying *NEDD9* as a novel target of the WNT/ β -catenin signaling pathway (21). Although increased *NEDD9* expression has been reported in

Authors' Affiliations: ¹Institut Curie, Normal and Pathological Development of Melanocytes; ²CNRS UMR3347; ³INSERM U1021, Orsay; ⁴INSERM IFR54, Institut Gustave-Roussy, Villejuif, France; and ⁵Department of Genetics, Louisiana State University Health Sciences Center/Stanley S. Scott Cancer Center, New Orleans, Louisiana

Note: Supplementary data for this article are available at Cancer Research Online (<http://cancerres.aacrjournals.org/>).

L. Larue and J. Bonaventure contributed equally to this article.

Corresponding Authors: Lionel Larue, Institut Curie, Bat 110, INSERM U1021, CNRS UMR3347, 91405 Orsay, France. Phone: 33-169-86-71-07; Fax: 33-169-86-71-09; E-mail: lionel.larue@curie.fr; and Jacky Bonaventure, jacky.bonaventure@curie.fr

doi: 10.1158/0008-5472.CAN-13-0920

©2014 American Association for Cancer Research.

human metastatic melanoma samples (22), recent observations on mammary tumors argue that NEDD9 may have a more complex role in tumor formation, invasion, and metastasis than originally thought (23, 24). Here, we show that ICAT-mediated downregulation of *NEDD9* expression converts the morphology of human Lu1205 melanoma cells toward a more rounded phenotype, leading to increased cell motility in 2D, invasiveness in 3D, and tumor cell colonization in the lungs of nude mice.

Materials and Methods

Cell lines

The human melanoma cell lines Lu1205 and WM852, obtained from Dr. M. Herlyn (Wistar Institute, Philadelphia, PA), Skmel3 and Mel501 from Dr. CR Goding (Ludwig Institute, Oxford, UK), and Dauv-1 from Florence Faure (Institut Curie, Paris, France) were authenticated in 2011 by comparative genomic hybridization array and transcriptomic analyses. Our results matched with publicly available datasets. Cells were maintained in RPMI 1640 medium (Gibco) supplemented with 10% FBS (Sigma), 5 mmol/L L-glutamine, 100 U/mL penicillin, and 100 µg/mL streptomycin. All cells were grown at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% carbon dioxide.

Plasmids and transfection

Plasmids, DNA constructs, transfections, production of recombinant proteins, dual luciferase assays, and flow cytometry were performed according to standard methods and are detailed in Supplementary Methods. Real-time quantitative PCR (RT-qPCR) and RNA silencing were performed as described previously (2). Primers and siRNA sequences are provided in Supplementary Tables S1 to S4.

Antibodies, immunoblotting, immunofluorescence, affinity precipitation, and in-gel zymography

A polyclonal anti-ICAT antibody was generated by immunizing a rabbit with a synthetic peptide (_N-AFSRSETEDRRQ-C) corresponding to residues 69-80 of the C-terminal end of human ICAT, coupled to the keyhole limpet hemocyanin carrier protein. Mouse monoclonal against human ICAT (clone 5C6) and phalloidin-FITC antibodies were from Sigma-Aldrich. Rabbit polyclonal antibody raised against phosphorylated myosin light chain (pMLC, T18/S19) was from Cell Signaling Technology. The Anti-Rac1 mouse monoclonal antibody was part of the Rac1 Activation Assay Biochem Kit (Cytoskeleton, Inc). NEDD9-specific monoclonal (clone 2G9), and polyclonal antibodies specific to β-catenin were from Abcam. The standard methods used for cell lysis, Western blotting, affinity precipitation, cell immunofluorescence, and in-gel zymography are described in Supplementary Methods.

Wound healing, time-lapse phase-contrast microscopy, and invasion assays

Wound healing assays were performed as described previously (2). For time-lapse microscopy, cells were first transiently transfected with ICAT-Flag cDNA constructs, pGFP empty vector as control or siRNAs. Cells were then seeded sparsely to minimize cell-cell interactions and migration analysis was performed using an inverted microscope equipped for fluorescence imaging (Life Imaging Services). Time-lapse recording

started 48 hours after transfection using a 20× lens. Fluorescent and phase-contrast images were collected at 4-minute intervals over 12 hours with a CDD camera (CoolSNAP fx, Photometrics) operated by Metamorph software (Molecular Devices). Analysis of cell migration was carried out by manually tracking individual cells in fluorescent frames, using the ImageJ software and a manual tracking plugin (<http://rsb.info.nih.gov/ij/plugins/track/track.html>). Inverted Matrigel invasion assays were performed as described previously (25).

Mice, subcutaneous and tail vein injections, and tissue preparation

Female nu/nu mice were housed in specific pathogen-free conditions at Institut Curie and when required they were sacrificed in accordance with French and European Union laws. Eight-week-old mice were tail-vein injected with 2×10^6 Lu1205-Luciferase (Lu1205-Luc) or Lu1205-ICAT-Luc cells. After sacrifice, lungs were collected and processed as described (26). Subcutaneous injections were performed as previously described (27).

IVIS analysis

Photon emissions from mice injected with Lu1205-Luc or Lu1205-ICAT-Luc cells were measured using an IVIS Spectrum Imaging System (Caliper Life Sciences). Mice were injected intraperitoneally with 10 µL/g of body weight of the D-Luciferin Firefly solution (15 mg/mL; Caliper Life Sciences) and then anesthetized before imaging. Images were collected using the field of view in the D position, 25 cm, medium binning with an F-stop of 1, and a maximum exposure time of 5 minutes. The luminescent signal was quantified with Living Image 4.3.1 software and expressed as photons/s/cm²/sr (sr, steradian). Mice were sacrificed when the photon emission reached 10⁷ photons/s/cm²/sr or after a 20% body weight lost.

Statistical analysis

Prism6 software (GraphPad) was used for statistical analyses. Single-cell migration and mRNA content differences were assessed using the Mann-Whitney test (two-tailed). Collective cell migration, cell invasion, cell number, proliferation rates, and luciferase activity differences were studied using two-way ANOVA test followed by Bonferroni posttest. Mice survival curves were drawn as Kaplan-Meier cumulative proportion surviving graphs, and corresponding *P* values were calculated with the log-rank (Mantel-Cox) test. Melanoma metastases expression profiles were normalized using *limma's normalize Quantiles* method under *R* v2.15.2. Hierarchical clustering of CTNNBIP1 expression profiles was performed using Euclidean distances and Ward's construction method. Differences in distant metastasis-free survival (DMFS) values between the two clusters were assessed using a Wilcoxon rank-sum test. All *P* values ≤0.05 were considered significant. All value sets were tested for normality using a Shapiro-Wilk normality test.

Results

High ICAT level expression in human melanoma cell lines is associated with formation of tumor metastases in nude mice

RT-qPCR analysis was used to compare ICAT mRNA levels in a series of 21 human melanoma cell lines. Cell lines

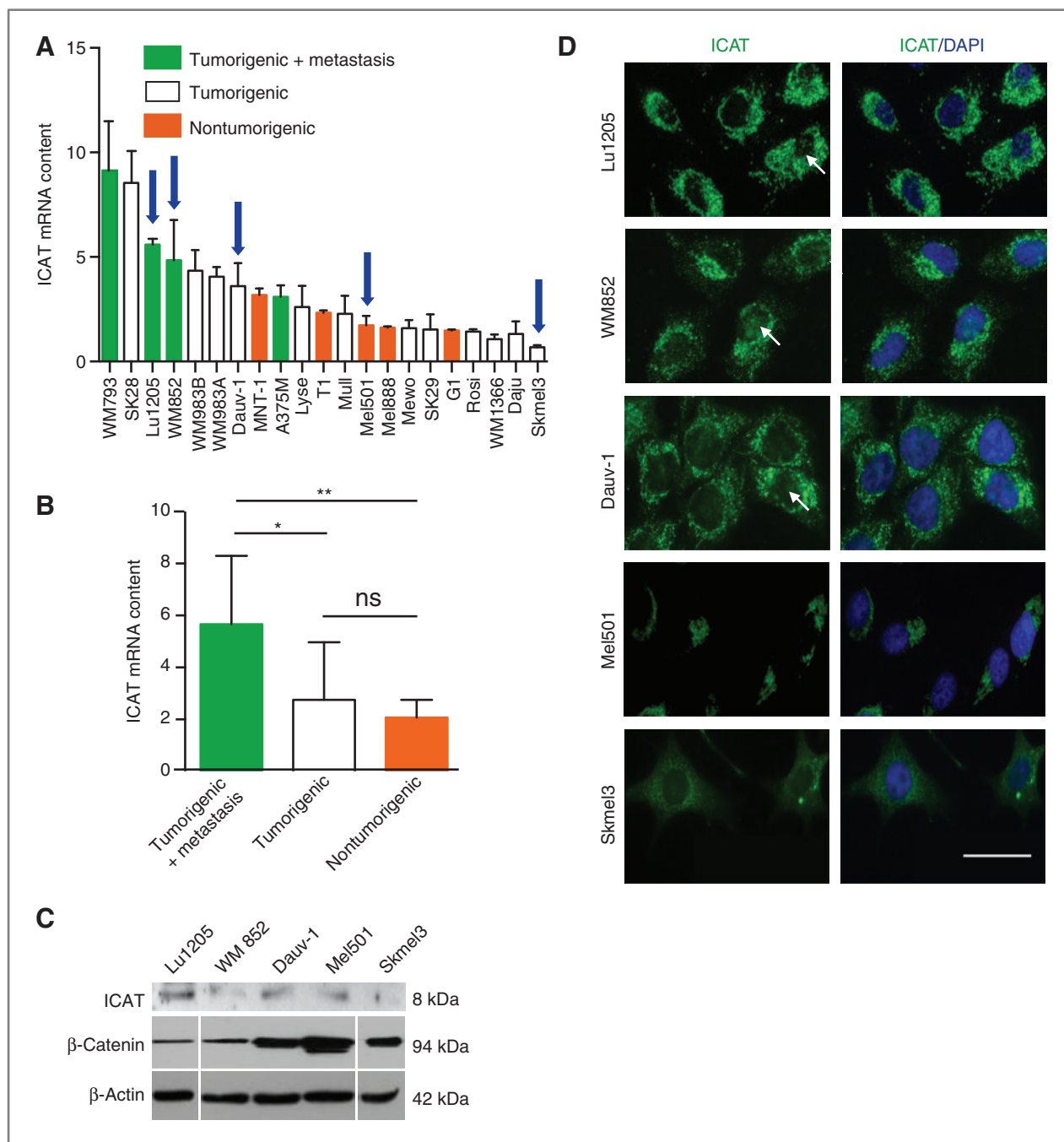


Figure 1. High ICAT expression in human melanoma cell lines forming metastasis in nude mice. **A**, analysis of endogenous ICAT expression in a panel of 21 human melanoma cell lines. RT-qPCR was used to assay ICAT mRNA, using TATA box binding protein (TBP) as an internal reference. RNA levels, means \pm SEM of three independent experiments. **B**, average values for ICAT expression in the group of cell lines forming s.c. tumors and metastases (green), compared with the groups of nonmetastatic cell lines forming (white) or not (orange) s.c. tumors. **C**, immunoprecipitation of endogenous ICAT (8 kDa) with an anti-ICAT antibody and Western blot analysis of β -catenin and β -actin (loading control) from five melanoma cell lines. **D**, immunofluorescence images of Lu1205, WM852, Dauv-1, Mel501, and Skmel3 cells incubated with an anti-ICAT monoclonal antibody (green) and 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI; blue). *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ns, not significant. Scale bar, 20 μ m.

forming metastases when s.c. injected in nude mice exhibited higher ICAT mRNA levels than nonmetastatic cell lines forming or not s.c. tumors (Fig. 1A and B). Presence and variable expression of the endogenous ICAT protein in five

representative melanoma cell lines was visualized after immunoprecipitation and revelation with an anti-ICAT polyclonal antibody (Fig. 1C). Differential expression of ICAT between the cell lines was further illustrated by

immunofluorescence staining of cells grown on collagen-coated supports (Fig. 1D). Although faint staining of the nuclei with an anti-ICAT monoclonal antibody was visible in some cells, the endogenous ICAT protein in the different cell lines was mainly cytoplasmic. Specificity of the ICAT staining pattern was validated by knocking down ICAT with an siRNA (Supplementary Fig. S1A and S1B). Electrophoretic analysis of β -catenin in the same cell lines showed that the main partner for interaction with ICAT was more abundant in Mel501, Skmel3, and Dauv-1 cells than in Lu1205 and WM 852 cells (Fig. 1C and Supplementary Fig. S1C). β -Catenin was located both in the nucleus and cytoplasm of Mel501 and Skmel3 cells, whereas in Lu1205 cells, it was present in the cytoplasm and at the cell-cell contact.

Transient exogenous ICAT expression increases melanoma cell motility

Because high ICAT levels in melanoma cells were apparently associated with metastasis formation in nude mice, we analyzed the possible involvement of ICAT in 2D cell motility using time-lapse video microscopy. The movement of single Lu1205, Mel501, and Skmel3 cells was monitored over a 12-hour time period. Both exogenous ICAT expression and ICAT knockdown experiments were performed. First, the different cell types were transiently cotransfected with human control pcDNA3 or ICAT-WT cDNA and plasmid pEGFP-N1 for visualization of transfected cells. Expression of exogenous ICAT was evaluated by RT-qPCR and Western blot analysis of transfected cells (Fig. 2A). Mock Lu1205 cells migrated faster than Mock Mel501, and faster than Skmel3 cells, which was correlated with the level of endogenous ICAT. Exogenous ICAT expression significantly increased the migration speed by 28% for Lu1205, 46% for Mel501, and 54% for Skmel3 cells (Fig. 2B, Supplementary Movies S1–S4). This increased migration speed was independent of cell proliferation and apoptosis as demonstrated by flow cytometry analysis (Supplementary Fig. S2). In a second set of experiments, endogenous ICAT expression was reduced through the use of an siRNA-targeting ICAT expression (si ICAT). ICAT mRNA transcripts were reduced by 80% in Lu1205, 65% in Mel501, and 81% in Skmel3 cells exposed to ICAT siRNA when compared with siScramble-transfected cells (Fig. 2C). The migration speed of these ICAT-depleted Lu1205, Mel501, and Skmel3 cells was approximately half that of the respective controls (Fig. 2D, Supplementary Movies S5 and S6), confirming that ICAT positively regulates motility of these melanoma cells.

Increased melanoma cell motility through ICAT exogenous expression requires ICAT/ β -catenin interaction

To assess whether ICAT/ β -catenin protein interaction was required for ICAT activation of melanoma cell motility, we generated an ICAT cDNA encoding a mutant protein unable to interact with β -catenin. On the basis of the 3D crystal structure of ICAT in complex with β -catenin (7, 8), three conserved ICAT residues among vertebrates (Y15, K19, and V22) predicted to form hydrophobic bonds with β -cate-

nin residue F660 (7) were mutated into aspartic acid (Y15D), glutamine (K19Q), and glutamic acid (V22E), respectively. The resulting triple mutant, referred to as ICAT-D15, Q19, E22 (DQE), failed to interact with β -catenin, thus behaving as a loss-of-function mutant (Supplementary Fig. S3A–S3C). Lu1205 and Mel501 cells were stably transfected with expression vectors for ICAT-WT and ICAT-DQE (Supplementary Fig. S3D and S3E).

Stable Lu1205 and Mel501 clones expressing exogenous and similar level of ICAT-WT and ICAT-DQE proteins were selected and further studied. Stable ectopic expression of ICAT in Lu1205 and Mel501 cells did not affect their proliferation or apoptosis (not shown), indicating that the exogenous ICAT protein had no significant effect on cell cycle and viability. The motility of the different representative clones grown on plastic (2D) was assessed using a wound-scratch assay. Closure of the wound was almost completed after 12 hours with ICAT-WT-expressing Lu1205 and Mel501 cells, whereas an open field was still visible with Mock or ICAT-DQE-expressing cells (Supplementary Fig. S4A–S4D). Additional stable clones gave similar results (not shown). Thus, increased melanoma cell motility associated with ICAT exogenous expression requires interaction between ICAT-WT and β -catenin through ICAT residues in helix 1.

Increased ICAT expression enhances melanoma cells invasive capacities in Matrigel

Because cell motility in 2D is not necessarily equivalent to that in 3D (2, 28, 29), we assessed whether increased ICAT expression affects the invasive capacities of melanoma cells in a 3D Matrigel system. Lu1205, Mel501, and Skmel3 cells, transiently transfected with control pcDNA3 (Mock), CMV::ICAT-WT or CMV::ICAT-DQE vectors, were submitted to an inverted Matrigel invasion assay. Mock Lu1205 cells were more invasive than Mel501 and than Skmel3 cells. Matrigel invasion of Lu1205, Mel501, and Skmel3 cells expressing exogenous ICAT-WT was greater than their respective controls (Fig. 3A–C). As expected, the ICAT-DQE mutant did not significantly affect the invasive capacities of transfected cells. Increased invasion potential can be due to the activation of matrix metalloproteinase (MMP). To test this hypothesis, we evaluated the endogenous level of MT1-MMP/MMP14 (30) by RT-qPCR and their activity by zymography in the presence and absence of ICAT-WT and ICAT-DQE in Lu1205, Mel501, and Skmel3 cells (Fig. 3D and E). Lu1205 and Mel501 cells showed similar amount of mRNA transcripts, whereas Skmel3 expressed approximately two times less MT1-MMP transcripts. The expression of pcDNA3 (Mock), CMV::ICAT-WT (ICAT-WT), or CMV::ICAT-DQE (ICAT-DQE) in the different cell lines did not affect the amounts of MT1-MMP transcripts, suggesting that ICAT-mediated invasion is MT1-MMP independent. These results were confirmed by *in-gel* gelatin zymography of conditioned media. Lu1205 and Mel501 cells transiently transfected with the same expression vectors showed similar amounts of proMMP2 and active MMP2. By contrast and in line with RT-qPCR data, Skmel3 cells had almost undetectable levels of MMPs.

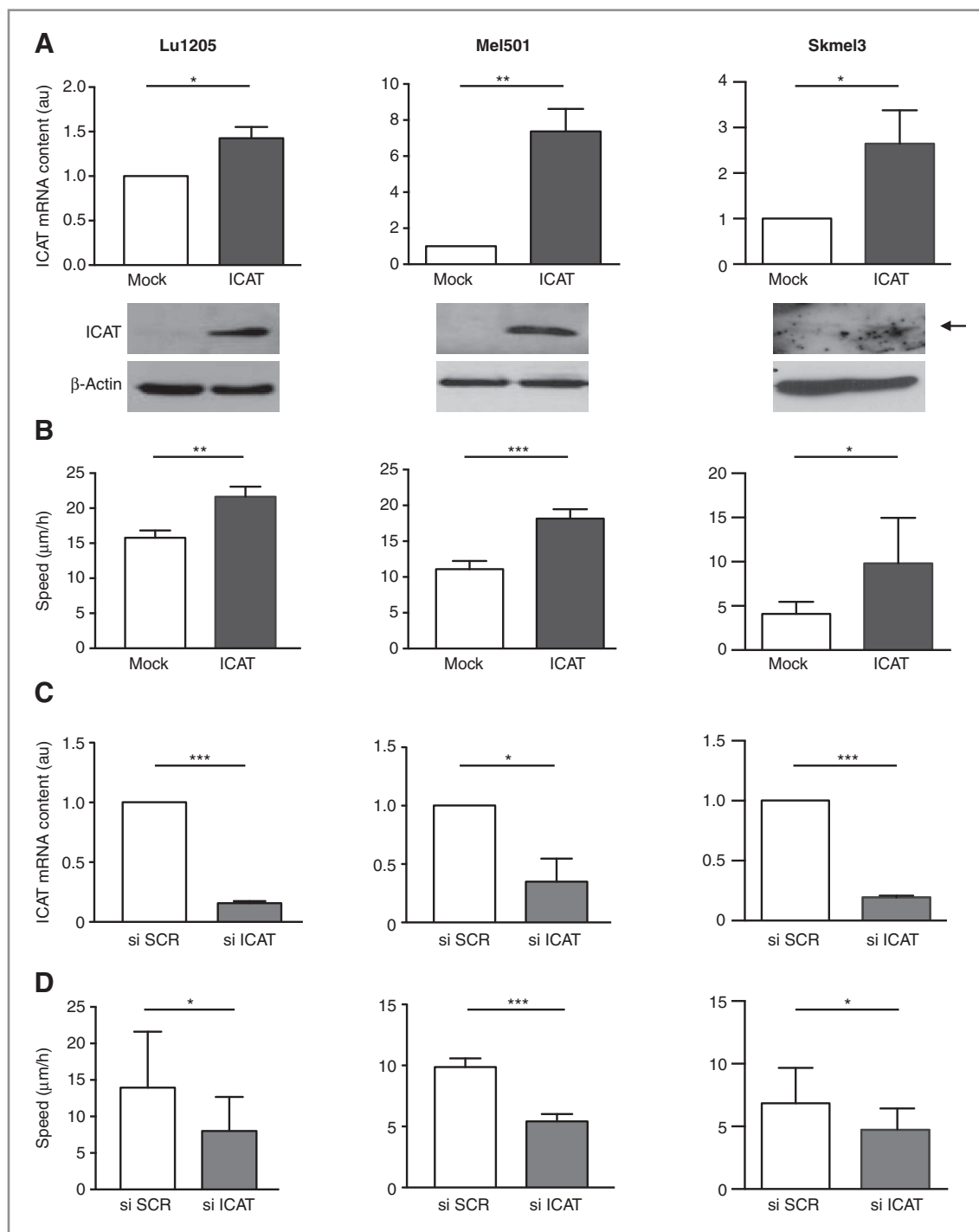


Figure 2. Motility of Lu1205, Mel501, and Skmel3 cell lines in 2D is ICAT expression dependent. **A**, RT-qPCR and Western blot analysis of ICAT in Lu1205, Mel501, and Skmel3 cell lines transiently transfected either with control pcDNA3 (Mock) or CMV::ICAT-WT (ICAT) expression vectors. **B**, 2D video microscopy of cells subjected to the single-cell migration assay for 12 hours. **C** and **D**, similar experiments using control si Scrambled (SCR) or si ICAT. TBP, internal reference for RT-qPCR; β -actin, loading control for Western blot. RNA levels, means \pm SEM of three independent experiments. The migration speeds are expressed as means \pm SEM of three independent experiments in which at least 50 cells were counted. The *P* values between the different cell lines were calculated (Lu1205 vs. Mel501, *P* = 0.003; Lu1205 vs. Skmel3, *P* < 0.0001; and Mel501 vs. Skmel3, *P* = 0.0001). *, *P* < 0.05; **, *P* < 0.01; ***, *P* < 0.001.

Together, these results indicate that increased exogenous ICAT expression did not affect melanoma cells proteolytic capacities. Hence, the increased invasiveness of Lu1205,

Mel501, and Skmel3 cells expressing exogenous ICAT was not a consequence of MMPs-mediated Matrigel degradation.

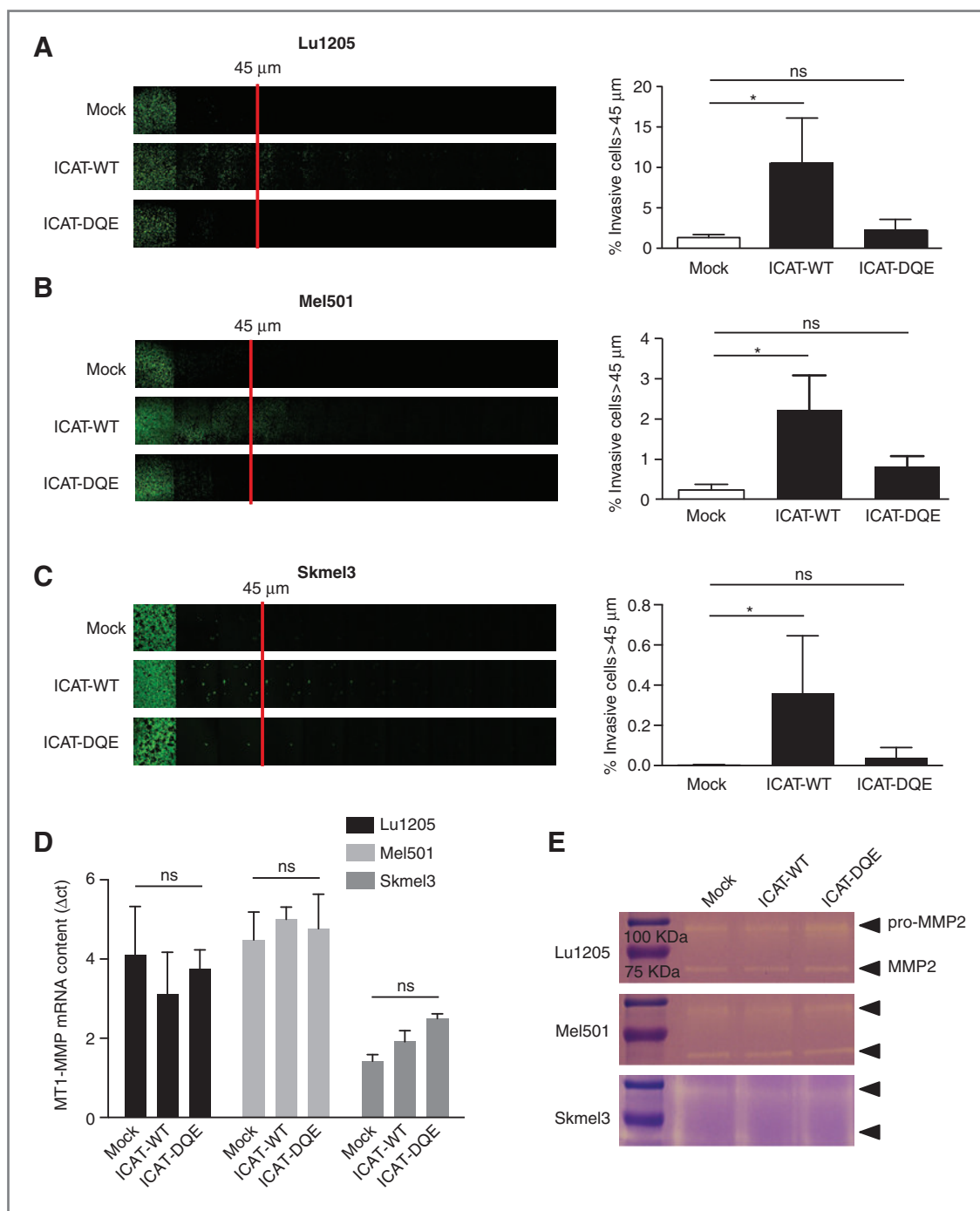


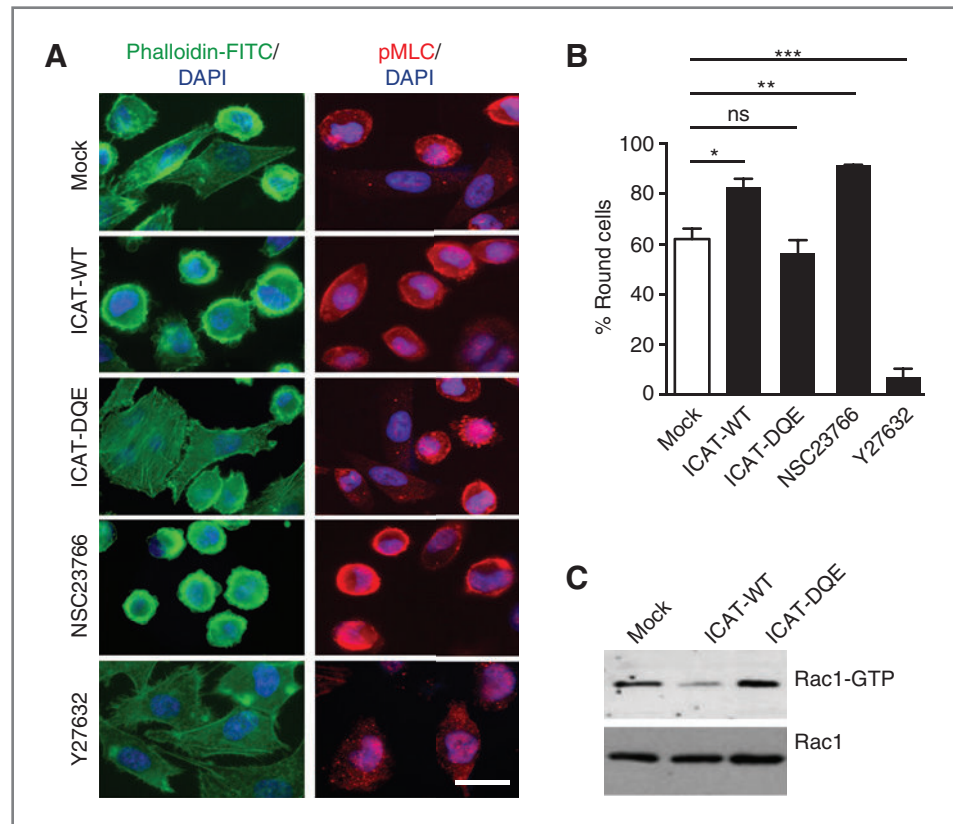
Figure 3. Exogenous ICAT expression increases the invasive capacities of Lu1205, Mel501, and Skmel3 cells in Matrigel. A–C, left, comparison of representative Matrigel invasion assays of Lu1205 (A), Mel501 (B), and Skmel3 (C) cells transiently transfected with Mock, ICAT-WT, or ICAT DQE expression vectors. Right, quantification of transfected cells invading the Matrigel by more than 45 μ m. D, RT-qPCR analysis of MT1-MMP mRNA levels in Lu1205, Mel501, and Skmel3 transfected with Mock, ICAT-WT, or ICAT-DQE. E, in-gel zymography of Lu1205, Mel501, and Skmel3 cells transfected with Mock, ICAT-WT, or ICAT-DQE; proMMP2 and activated MMP2 are shown. *, $P < 0.05$; ns, not significant.

Exogenous ICAT expression affects Lu1205 cell morphology in 2D

The actin cytoskeleton and regulators of actin dynamics are central to individual cell movement (19). The morphology of

Lu1205, Mel501, and Skmel3 cells transiently transfected with pcDNA3 (Mock), CMV::ICAT-WT, and CMV::ICAT-DQE before growing on collagen-coated plates was examined for polymerized actin after immunofluorescence staining. Both Mel501

Figure 4. Exogenous ICAT expression induces a mesenchymal to amoeboid transition in Lu1205 cells. **A**, immunofluorescence images of Lu1205 cells transiently transfected with Mock, ICAT-WT, and ICAT DQE expression vectors or treated for 24 hours with NSC23766 (Rac inhibitor) or Y27632 (Rho/ROCK inhibitor). Cells were incubated with anti-phalloidin-FITC (green) or anti-pMLC antibody (red) and DAPI (blue). **B**, percentage of Lu1205 round cells after transfection or inhibitor treatment. The values reported are means \pm SEM of three independent measures. **C**, Rac1 activation: representative pull-down assay of GTP-bound Rac1 by PAK-PDB beads versus total Rac1 in lysates of Lu1205 cells transiently transfected either with Mock, ICAT-WT, or ICAT-DQE. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$. Scale bar, 20 μ m.



and Skmel3 cells exhibited an elongated morphology that remained unchanged after exogenous ICAT expression (Supplementary Fig. S5A and S5B). By contrast, Lu1205 cells exhibited two types of morphology (Fig. 4A and B): approximately 40% of the cells were elongated (mesenchymal type) and the other 60% exhibited a round morphology (amoeboid type). Exogenous ICAT-WT expression significantly increased the proportion of round cells by 20%, whereas ICAT-DQE exogenous expression had no such effect. A round morphology is often associated with a bleb-driven type of motility (16). To assess the presence of blebs, Lu1205 cells were transiently transfected with a LifeAct-TagGFP2 plasmid allowing visualization of F-actin in living cells. Time-lapse microscopy revealed migrating cells exhibiting spherical protrusions devoid of actin with short lifetimes consistent with a bleb-associated movement (Supplementary Fig. S5C).

Members of the Rho family of small GTPases are key regulators of melanoma cell movement (15, 31). To assess the possible involvement of Rac and Rho in the increased motility of Lu1205 cells expressing exogenous ICAT-WT, two specific inhibitors were used. Treatment with the Rac inhibitor NSC23677 for 24 hours substantially increased the proportion of round cells to 92%, thus mimicking the effect of exogenous ICAT-WT. Inhibition of the Rho/ROCK pathway with the Y27632 inhibitor had the opposite effect, with more than 93% of cells showing an elongated morphology (Fig. 4A and B). ICAT exogenous expression was able to counteract Y27632 inhibitor effects with 26% of the cells showing a round morphology (Supplementary Fig. S6A and S6B). We performed pull-

down assays of Rac1-GTP with PAK-PDB beads to test for the effects of increased ICAT expression on Rac activation. In Mel501 and SkMel3, the level of Rac1-GTP (active Rac1) was lower than in Lu1205 cells (Supplementary Table S5) and it was reduced when exogenous ICAT was present (Supplementary Fig. S5D). The amount of Rac1-GTP (active Rac1) in Lu1205 cells was markedly reduced (40%) when the exogenous ICAT-WT protein was present, whereas ICAT-DQE protein had no such effect (Fig. 4C), indicating that increased ICAT-WT expression downregulates Rac signaling. Amoeboid movement is associated with high levels of pMLC II. Strong staining with anti-pMLC antibody of ICAT-WT-transfected cells was observed in round cells, whereas elongated cells showed a faint pMLC staining. Similarly, Rac inhibitor-treated cells showed abundant anti-pMLC labeling, whereas inhibition of Rho/ROCK signaling greatly reduced the staining (Fig. 4A). Hence, NSC23677 treatment of Lu1205 cells recapitulated the effects of increased ICAT expression. Rho and Rac inhibitors did not affect the elongated morphology of Mel501 and Skmel3 cells (Supplementary Table S5). Altogether, these findings suggest that increased ICAT expression *in vitro* in Lu1205 cells induces a switch toward a round morphology, through downregulation of Rac signaling, but this mechanism does not operate in Mel501 and Skmel3 cells.

NEDD9 is a downstream effector of ICAT in melanoma cells

As ICAT modulated the Rho/Rac signaling pathway in Lu1205 cells, we searched for β -catenin target genes involved

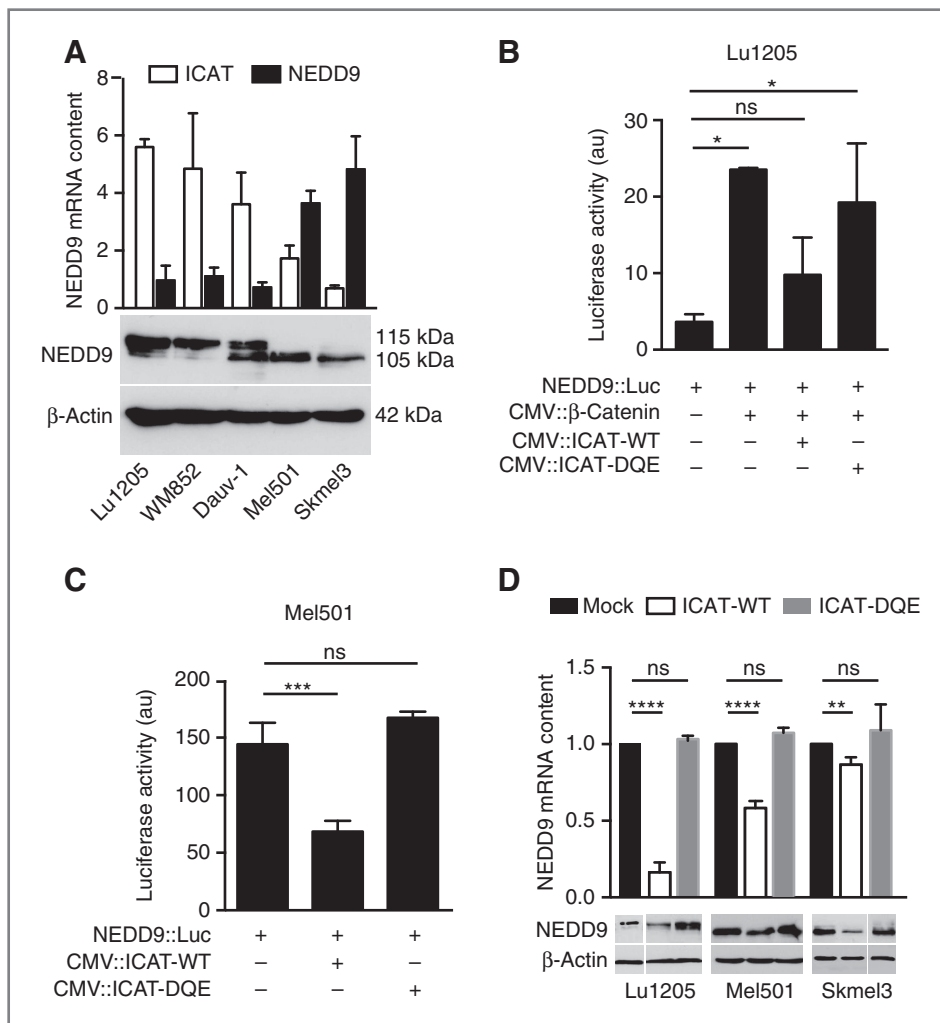


Figure 5. Increased ICAT expression reduces NEDD9 levels in a panel of five human melanoma cell lines. **A**, top, RT-qPCR quantification of NEDD9 and ICAT mRNA using TBP as an internal reference. The values reported for RNA levels are means \pm SEM of three independent experiments. Bottom, Western blot analysis of NEDD9 in the five melanoma cell lines; bands with a molecular weight of 105 and 115 kDa are visible. β -Actin, loading control. **B** and **C**, effect of transient exogenous ICAT expression on the NEDD9 promoter activity. Lu1205 (**B**) and Mel501 (**C**) cells were transiently transfected with a NEDD9::luciferase reporter in presence (Lu1205) or absence (Mel501) of CMV:: β -catenin. Lu1205 and Mel501 cells were also transfected with Mock, ICAT-WT, or ICAT-DQE expression vectors. Data, means \pm SEM of three independent experiments. **D**, top, RT-qPCR of NEDD9 mRNA levels in Lu1205, Mel501, and Skmel3 transfected with control Mock, ICAT-WT, or ICAT-DQE; TBP, internal reference. Values, means \pm SEM of three independent experiments. Bottom, Western blot analysis of NEDD9 levels in the three cell lines (β -actin, loading control). *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$; ****, $P < 0.0001$; ns, not significant.

in cell migration and able to regulate the Rho/Rac signaling pathway. *NEDD9*, a regulator of Rac driving mesenchymal movement (15) and promoting migration of colorectal cancer cells (21), emerged as a candidate. To test for a relationship between ICAT and NEDD9 in controlling melanoma cell motility, we quantified NEDD9 mRNA transcripts and proteins in five melanoma cell lines (Fig. 5A). NEDD9 mRNA was abundant in the two cell lines with a low endogenous ICAT content (Mel501 and Skmel3), but it was less expressed in Lu1205, WM852, and Dauv-1 cells exhibiting high endogenous ICAT content. At the protein level, marked differences were noted. In Mel501 and Skmel3 cells, one major band of 105 kDa was present. In Lu1205, WM852, and Dauv-1, at least two bands were visible, a lower band (105 kDa) similar to the one seen in Mel501 and Skmel3, and an upper band (115 kDa; Fig. 5A; Supplementary Table S5) that may correspond to a highly phosphorylated form of NEDD9 (32).

To test whether ICAT was able to inhibit *NEDD9* expression by competing with TCFs/LEFs for binding to β -catenin, Lu1205 and Mel501 cells were transiently transfected with the *NEDD9* promoter driving expression of the luciferase gene (21). A marked luciferase activity was observed in Lu1205 and Mel501

cells. Cotransfection with an ICAT-WT vector reduced luciferase activity by 60%, both in Lu1205 and Mel501, whereas the ICAT-DQE mutant had no significant effect (Fig. 5B and C). Importantly, analysis of Lu1205, Mel501, and Skmel3 cells transiently expressing exogenous ICAT-WT showed reduced levels of NEDD9 mRNA transcripts and protein (Fig. 5D). Such reduction was not seen in cells expressing exogenous ICAT-DQE. Accordingly, knockdown of ICAT in Lu1205 cells using an si ICAT increased NEDD9 protein expression (Supplementary Figs. S1B and S5E).

To clarify the role of NEDD9 on melanoma cell motility in 2D, NEDD9 was knocked down in Lu1205, Mel501, and Skmel3 cells using a pool of siRNAs. The resulting decreased expression of NEDD9, confirmed by RT-qPCR and Western blot analysis (Fig. 6A), was associated in Lu1205 cells with reduced Rac1 activation (Supplementary Fig. S5F) and increased migration speeds of transfected cells in tracking assays (Fig. 6B). In Lu1205 cells, ectopic NEDD9 expression by transient transfection with a pcDNA3-NEDD9 expression vector significantly decreased the migration speed of transfected cells (Fig. 6C and D). The modification of Lu1205 cell migration speed was associated with a switch from a round to an elongated morphology

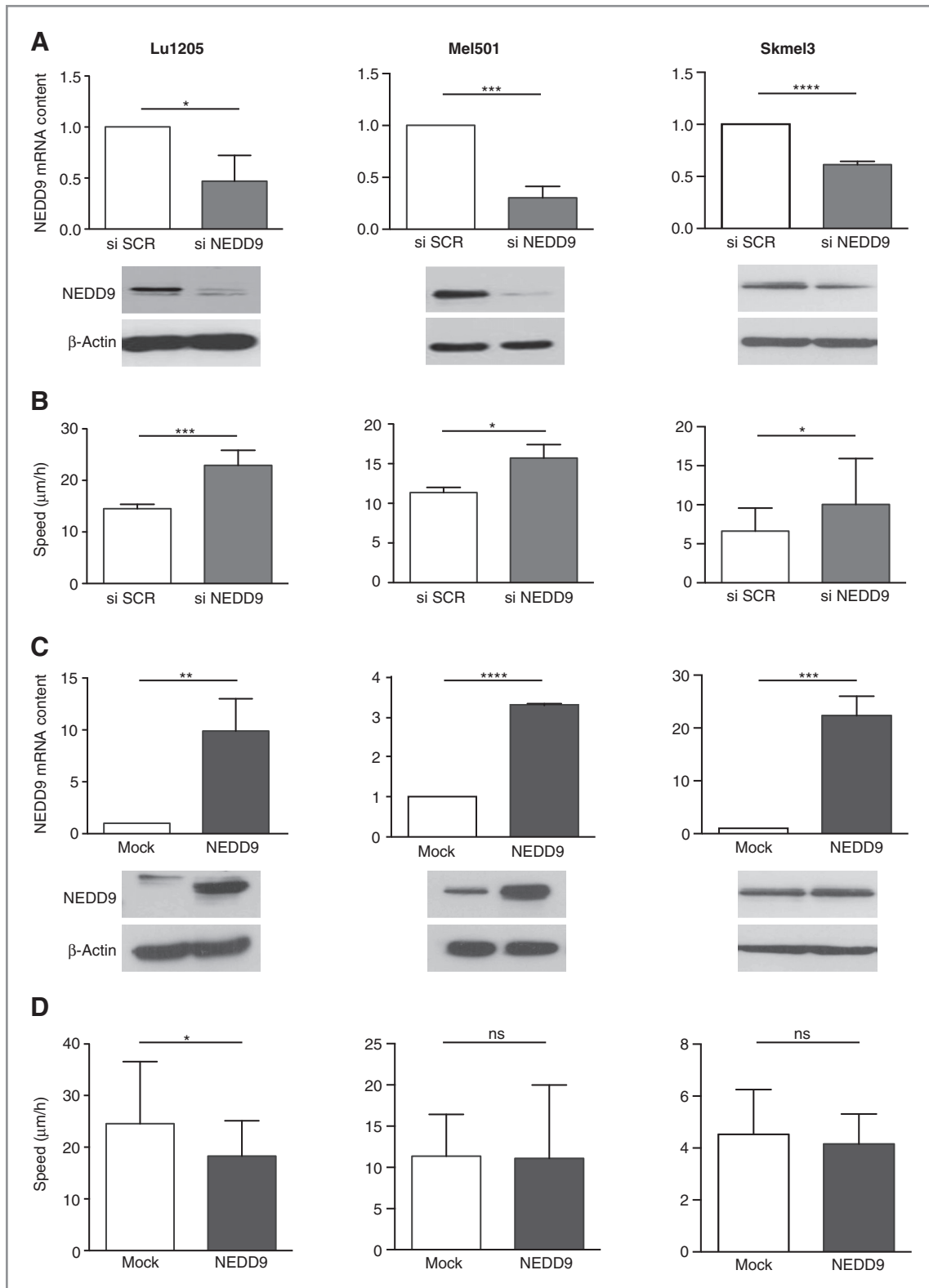


Figure 6. NEDD9 depletion increases Lu1205, Mel501, and Skmel3 cells migration speed. **A**, RT-qPCR and Western blot analysis of NEDD9 in Lu1205, Mel501, and Skmel3 cells transfected with control si SCR or si smart pool against NEDD9 (si NEDD9). **B**, cells were subjected to a single-cell migration assay followed by 2D video microscopy for 12 hours. Fifty cells were studied for each experiment. **C** and **D**, similar experiments in cells transfected with Mock or CMV::NEDD9 (NEDD9) expression vectors. RNA levels and migration speeds are expressed as means \pm SEM of three independent experiments. TBP, internal reference. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$; ****, $P < 0.0001$; ns, not significant.

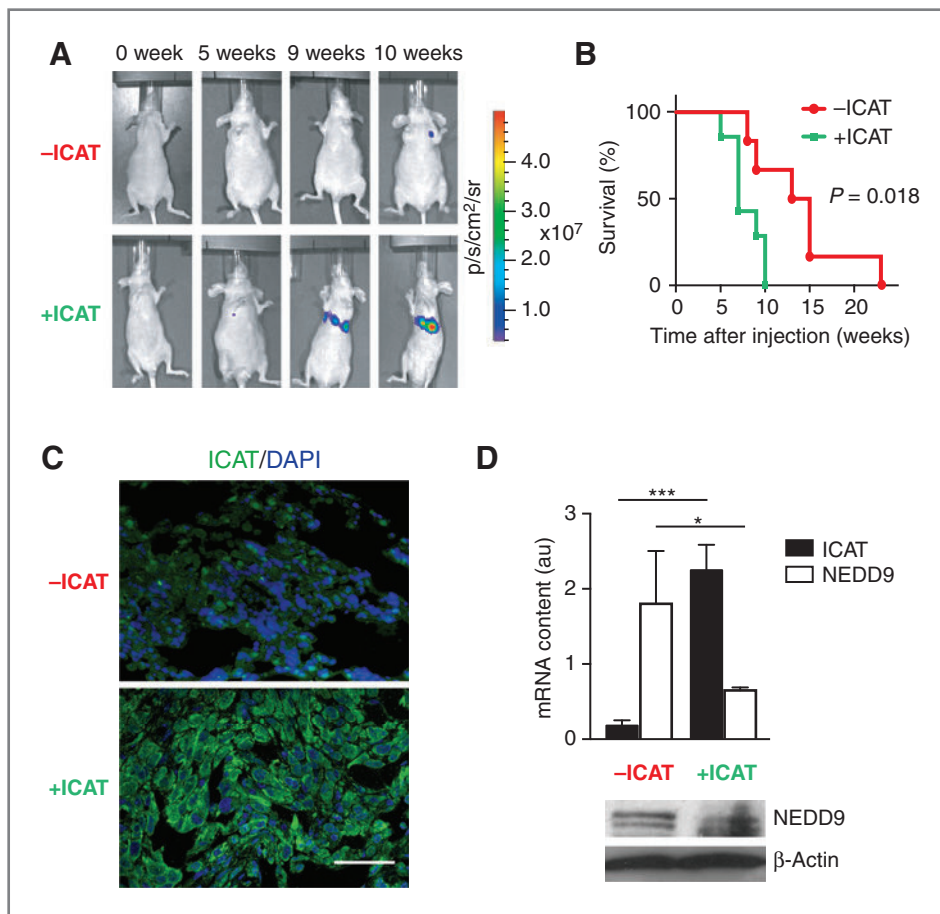


Figure 7. Increased ICAT expression reduces survival time of melanoma cell-injected nude mice. **A**, representative images of nude mice injected intravenously with Lu1205-Luc (-ICAT) or Lu1205-ICAT-Luc (+ICAT) cells analyzed with the IVIS Spectrum Imaging System. **B**, the Kaplan-Meier analysis of nude mice survival. **C**, immunofluorescence images of lung cryosections from mice injected with Lu1205-Luc (-ICAT) or Lu1205-ICAT-Luc (+ICAT) incubated with an anti-ICAT antibody (green) and DAPI (blue). **D**, RT-qPCR and Western blot analysis of ICAT and NEDD9 in the lungs of nude mice. *, $P < 0.05$; ***, $P < 0.001$. Scale bar, 50 μ m.

because 76% of cells expressing exogenous NEDD9 exhibited an elongated phenotype (Supplementary Fig. S5G). By contrast, increased NEDD9 expression had no effect on Mel501 and Skmel3 cells migration speed. This might be explained by an absence of impact of NEDD9 overexpression on Mel501 and Skmel3 elongated cellular morphology.

Increased ICAT expression accelerates tumor cell colonization in the lungs of nude mice

Because cell motility and invasive behavior are essential steps of the metastatic process (33), we next investigated whether increased ICAT expression could enhance the invasiveness of melanoma cells. Lu1205 cells were chosen as they were previously shown to form metastases in the lungs of nude mice after tail vein injection (26), whereas Mel501 and Skmel3 did not. Bioluminescent imaging was used to follow tumor formation. Representative luciferase-positive Lu1205-Luc (-ICAT) and Lu1205-ICAT-Luc (+ICAT) stable clones were generated. Two clones were selected based on their equivalent bioluminescent signal (in the range of 2×10^5 p/s/cm²/sr for 10^4 cells), and injected intravenously. Presence of luciferase-expressing cells was monitored with the IVIS spectrum system (Fig. 7A). Bioluminescence was detected in the lungs of 2 of 8 injected mice expressing exogenous ICAT (+ICAT), 5 weeks after injection. By week 9, a luminescent

signal was detectable in 7 of 8 animals. In the control group (-ICAT), luminescence was detected after 5 weeks in 1 of 8 mice. This number increased to 7 of 8 mice by week 15. The Kaplan-Meier analysis disclosed a significant difference between the survival time of mice injected with control cells and those injected with exogenous ICAT-expressing cells (Fig. 7B). Immunofluorescence staining with an anti-ICAT antibody showed higher ICAT signal in lung tumor nodules from ICAT-overexpressing cells compared with Mock cells (Fig. 7C). ICAT mRNA levels in the lungs of mice injected with ICAT-overexpressing cells were higher than in controls. In addition, NEDD9 mRNA transcripts and protein levels were decreased in presence of exogenous ICAT (Fig. 7D).

High ICAT expression is associated with reduced survival time of patients with melanoma

To assess whether our *in vitro* and *in vivo* findings had any relevance to human melanoma, we took advantage of publicly available transcriptomic data and clinical parameters from 22 patients with metastatic melanoma (34). On the basis of an unsupervised hierarchical clustering of ICAT/CTNNB1P1 expression, the cohort was divided into two clusters. Cluster 1 ($n = 8$) comprised metastases with high ICAT/CTNNB1P1 levels and cluster 2 ($n = 14$) comprised metastases with intermediate and low ICAT/CTNNB1P1 levels (Supplementary

Fig. S7A). Importantly, a significant 4-fold reduction in the DMFS time was observed in cluster 1 when compared with cluster 2, suggesting that high ICAT/CTNNB1 expression could be associated with decreased survival of some metastatic patients (Supplementary Fig. S7B). Using the same transcriptomic data, we investigated whether high ICAT levels correlated with low NEDD9 levels, as we observed *in vitro*. NEDD9 mRNA expression in patients with metastases and high β -catenin/ICAT levels was apparently lower than in patients with low β -catenin/ICAT levels. The correlation coefficient ($r = 0.381$) between β -catenin/ICAT levels and NEDD9 showed a trend suggesting that ICAT might also downregulate NEDD9 levels in some human melanoma samples (Supplementary Fig. S7C).

Discussion

WNT signaling is mediated through β -catenin, which serves as a hub for the recruitment of positive and negative regulators of transcription (35, 36). From a recent large-scale study of melanoma exomes, 7% of patients exhibited β -catenin/CTNNB1 "driver" mutations (37). However, it remains unclear whether β -catenin acts as an inhibitor, a promoter, or both during melanomagenesis and metastasis formation because of conflicting *in vitro* and *in vivo* results (1–5, 38, 39). It was recently inferred that a subtle balance in the level and activity of β -catenin is required in normal melanocytes to prevent melanoma formation (40). One of the regulators of this balance might be ICAT, a small acidic protein that sterically competes with members of the TCF/LEF family for binding to β -catenin (6, 7). Although no mutations in the *ICAT/CTNNB1* gene have been identified in human melanoma samples (13, 37, 41), the ability of ICAT to regulate β -catenin transcriptional activity may modulate the clinical outcome of patients depending on its level of expression.

In this study, we observed that human melanoma cell lines forming metastases in nude mice exhibited high endogenous ICAT expression, whereas most nonmetastatic melanoma cell lines expressed moderate or low levels of ICAT. Furthermore, based on publicly available transcriptomic data (34), we found that the highest ICAT transcriptional levels in tumor samples from patients with melanoma were associated with low distant metastasis-free survival times, thus emphasizing the putative role of ICAT in metastasis progression. Using three human melanoma cell lines expressing variable levels of endogenous ICAT, we demonstrate for the first time that ICAT when stably bound to β -catenin acts as a positive regulator of melanoma cell motility in a 2D system and increases their invasive capacities in 3D. These findings are consistent with our recent demonstration that presence of nuclear β -catenin in melanoma cells reduces their *in vitro* motility (2). Presence of blebs and increased MLC phosphorylation were observed in Lu1205 cells, whereas secretion of MMPs was unaffected. Together, this suggests that actomyosin contraction in Lu1205 cells expressing exogenous ICAT could generate hydrostatic pressure, causing the plasma membrane to detach from the actin cortex, resulting in bleb formation (42). Round blebby cells would squeeze through the impeding collagen fibers present in

Matrigel (43–45), thereby facilitating matrix invasion independently of proteases. Although widely accepted *in vitro* (16), tumor invasion through protease-independent mechanisms remains controversial *in vivo* (33, 46) but was recently supported by the visualization of bleb-driven tumor cell migration in primary explants of human carcinoma (42).

In vivo, tumor cell extravasation and tissue colonization are both characteristics of the metastatic process (33). Tail vein injection of melanoma cells leads to extravasation and lung colonization, partially mimicking metastasis formation. Using bioluminescence imaging, we visualized increased tumor colonization and accelerated formation of nodules in the lungs of nude mice grafted with Lu1205 cells overexpressing ICAT. The capacity of melanoma cells to metastasize may rely on their ability to change morphology and adapt their movement to the microenvironment so as to respond to signals transmitted by mediators emerging from the stroma (15, 47, 48). This model, implicating a Rho/Rac-mediated switch between mesenchymal and amoeboid movement, is supported by the high invasiveness of Lu1205 cells expressing exogenous ICAT. The absence of morphologic changes in elongated Mel501 or Skmel3 cells expressing ectopic ICAT and their poor invasiveness may account for their inability to form lung metastases in nude mice (not shown). In keeping with this result, Rac activity associated with mesenchymal movement inhibited lung colonization by circulating tumor cells (15) and amoeboid movement favored lung colonization by A375M melanoma cells in nude mice (43).

The molecular mechanisms by which ICAT increases melanoma cell motility and promotes tumor colonization are not fully elucidated. One of the downstream effectors of ICAT/ β -catenin, involved in cell motility (32), might be the scaffold protein NEDD9 previously reported to be overexpressed in 30% to 50% of metastatic melanomas samples (22). Surprisingly, high NEDD9 levels in Mel501 and SkMel3 cells were not associated with metastasis formation, whereas NEDD9 expression was lower in the metastatic Lu1205 and WM852 cells. Lu1205 cells mainly exhibited a round shape, which in the presence of ectopic NEDD9 expression shifted to an elongated morphology. By contrast, Mel501 and SkMel3 cells were almost exclusively elongated with numerous protrusions and NEDD9 overexpression had no morphologic incidence. Similar results have been previously reported in other melanoma cell lines in which NEDD9 overexpression increased the number of elongated cells in 3D, whereas NEDD9 reduction had the opposite effect (15). Likewise, involvement of NEDD9 in the motility of cell lines originating from different organs/tissues seemed to be cell-type and system dependent (29, 32, 49). Results with Lu205 cells implicate NEDD9 as a downstream effector of ICAT/ β -catenin activity. NEDD9 in complex with the guanine nucleotide exchange factor DOCK3 activates Rac1 to promote mesenchymal movement (15, 50). Reduction of NEDD9 level through increased ICAT activity results in less Rac1-GTP, thus favoring Rho/ROCK-driven amoeboid movement. This process does not seem to operate in the poorly motile Mel501 or Skmel3 cells that remain elongated even in the presence of Rac inhibitor. In these cells, ICAT/ β -catenin

targets (such as M-MITF) may play a more critical role than NEDD9.

Disclosure of Potential Conflicts of Interest

No potential conflicts of interest were disclosed.

Authors' Contributions

Conception and design: M.J. Domingues, L. Larue, J. Bonaventure

Development of methodology: W. Liu

Acquisition of data (provided animals, acquired and managed patients, provided facilities, etc.): M.J. Domingues, F. Rambow, L. Papon, W. Liu, L. Larue

Analysis and interpretation of data (e.g., statistical analysis, biostatistics, computational analysis): M.J. Domingues, F. Rambow, B. Job, L. Papon, L. Larue

Writing, review, and/or revision of the manuscript: M.J. Domingues, F. Rambow, B. Job, L. Papon, L. Larue, J. Bonaventure

Study supervision: L. Larue, J. Bonaventure

References

- Delmas V, Beermann F, Martinuzzi S, Carreira S, Ackermann J, Kumasaka M, et al. Beta-catenin induces immortalization of melanocytes by suppressing p16INK4a expression and cooperates with N-Ras in melanoma development. *Genes Dev* 2007;21:2923–35.
- Gallagher SJ, Rambow F, Kumasaka M, Champeval D, Bellacosa A, Delmas V, et al. Beta-catenin inhibits melanocyte migration but induces melanoma metastasis. *Oncogene* 2013;32:2230–8.
- Chien AJ, Moore EC, Lonsdorf AS, Kulikauskas RM, Rothberg BG, Berger AJ, et al. Activated Wnt/beta-catenin signaling in melanoma is associated with decreased proliferation in patient tumors and a murine melanoma model. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009;106:1193–8.
- Arozarena I, Bischof H, Gilby D, Belloni B, Dummer R, Wellbrock C. In melanoma, beta-catenin is a suppressor of invasion. *Oncogene* 2011;30:4531–43.
- Sinnberg T, Menzel M, Ewerth D, Sauer B, Schwarz M, Schaller M, et al. beta-Catenin signaling increases during melanoma progression and promotes tumor cell survival and chemoresistance. *PLoS ONE* 2011;6:e23429.
- Tago K, Nakamura T, Nishita M, Hyodo J, Nagai S, Murata Y, et al. Inhibition of Wnt signaling by ICAT, a novel beta-catenin-interacting protein. *Genes Dev* 2000;14:1741–9.
- Graham TA, Clements WK, Kimelman D, Xu W. The crystal structure of the beta-catenin/ICAT complex reveals the inhibitory mechanism of ICAT. *Mol Cell* 2002;10:563–71.
- Daniels DL, Weis WI. ICAT inhibits beta-catenin binding to Tcf/Lef-family transcription factors and the general coactivator p300 using independent structural modules. *Mol Cell* 2002;10:573–84.
- Tutter AV, Fryer CJ, Jones KA. Chromatin-specific regulation of LEF-1-beta-catenin transcription activation and inhibition in vitro. *Genes Dev* 2001;15:3342–54.
- Choi HJ, Huber AH, Weis WI. Thermodynamics of beta-catenin-ligand interactions: the roles of the N- and C-terminal tails in modulating binding affinity. *J Biol Chem* 2006;281:1027–38.
- Satoh K, Kasai M, Ishidao T, Tago K, Ohwada S, Hasegawa Y, et al. Anteriorization of neural fate by inhibitor of beta-catenin and T cell factor (ICAT), a negative regulator of Wnt signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101:8017–21.
- Dorsky RI, Moon RT, Raible DW. Control of neural crest cell fate by the Wnt signalling pathway. *Nature* 1998;396:370–3.
- Reifenberger J, Knobbe CB, Wolter M, Blaschke B, Schulte KW, Pietsch T, et al. Molecular genetic analysis of malignant melanomas for aberrations of the WNT signaling pathway genes CTNNB1, APC, ICAT and BTRC. *Int J Cancer* 2002;100:549–56.
- Winnepenninckx V, Lazar V, Michiels S, Dessen P, Stas M, Alonso SR, et al. Gene expression profiling of primary cutaneous melanoma and clinical outcome. *J Natl Cancer Inst* 2006;98:472–82.
- Sanz-Moreno V, Gadea G, Ahn J, Paterson H, Marra P, Pinner S, et al. Rac activation and inactivation control plasticity of tumor cell movement. *Cell* 2008;135:510–23.
- Friedl P, Wolf K. Plasticity of cell migration: a multiscale tuning model. *J Cell Biol* 2010;188:11–9.
- Charras G, Paluch E. Blebs lead the way: how to migrate without lamellipodia. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008;9:730–6.
- Fackler OT, Grosse R. Cell motility through plasma membrane blebbing. *J Cell Biol* 2008;181:879–84.
- Ridley AJ. Life at the leading edge. *Cell* 2011;145:1012–22.
- Yamazaki D, Kurisu S, Takenawa T. Involvement of Rac and Rho signaling in cancer cell motility in 3D substrates. *Oncogene* 2009;28:1570–83.
- Li Y, Bavarva JH, Wang Z, Guo J, Qian C, Thibodeau SN, et al. HEF1, a novel target of Wnt signaling, promotes colonic cell migration and cancer progression. *Oncogene* 2011;30:2633–43.
- Kim M, Gans JD, Nogueira C, Wang A, Paik JH, Feng B, et al. Comparative oncogenomics identifies NEDD9 as a melanoma metastasis gene. *Cell* 2006;125:1269–81.
- Simpson KJ, Selfors LM, Bui J, Reynolds A, Leake D, Khvorova A, et al. Identification of genes that regulate epithelial cell migration using an siRNA screening approach. *Nat Cell Biol* 2008;10:1027–38.
- Singh MK, Izumchenko E, Klein-Szanto AJ, Egleston BL, Wolfson M, Golemis EA. Enhanced genetic instability and dasatinib sensitivity in mammary tumor cells lacking NEDD9. *Cancer Res* 2010;70:8907–16.
- Lindsay CR, Lawn S, Campbell AD, Faller WJ, Rambow F, Mort RL, et al. P-Rex1 is required for efficient melanoblast migration and melanoma metastasis. *Nat Commun* 2011;2:555.
- Makhzami S, Rambow F, Delmas V, Larue L. Efficient gene expression profiling of laser-microdissected melanoma metastases. *Pigment Cell Melanoma Res* 2012;25:783–91.
- Moore R, Champeval D, Denat L, Tan SS, Faure F, Julien-Grille S, et al. Involvement of cadherins 7 and 20 in mouse embryogenesis and melanocyte transformation. *Oncogene* 2004;23:6726–35.
- Tang H, Li A, Bi J, Veltman DM, Zech T, Spence HJ, et al. Loss of scar/WAVE complex promotes N-WASP- and FAK-dependent invasion. *Curr Biol* 2013;23:107–17.
- Zhong J, Baquiran JB, Bonakdar N, Lees J, Ching YW, Pugacheva E, et al. NEDD9 stabilizes focal adhesions, increases binding to the extracellular matrix and differentially effects 2D versus 3D cell migration. *PLoS ONE* 2012;7:e35058.
- Sabeh F, Ota I, Holmbeck K, Birkedal-Hansen H, Soloway P, Balbin M, et al. Tumor cell traffic through the extracellular matrix is controlled by the membrane-anchored collagenase MT1-MMP. *J Cell Biol* 2004;167:769–81.

Acknowledgments

The authors thank Drs. C. Gottardi (University of Chicago, Chicago, IL), E. Golemis (Fox Chase Cancer Center, Philadelphia, PA), M. Herlyn (Wistar Institute, Philadelphia, PA), and M. Piel (Institut Curie) for providing biologic materials. They also thank M.-C. Lienafa (Institut Curie) and A. Campbell (Beatson Institute, Glasgow, UK) for technical assistance. The authors also thank members of the animal colony and imaging facilities of the Institut Curie.

Grant Support

This work was supported by grants from "La Fondation ARC contre le Cancer" and INCa. M.J. Domingues is recipient of a fellowship from the Ministère de l'Éducation Nationale de la Recherche et de la Technologie (MENRT).

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked *advertisement* in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

Received March 28, 2013; revised January 7, 2014; accepted January 21, 2014; published OnlineFirst February 10, 2014.

31. Li A, Ma Y, Yu X, Mort RL, Lindsay CR, Stevenson D, et al. Rac1 drives melanoblast organization during mouse development by orchestrating pseudopod-driven motility and cell-cycle progression. *Dev Cell* 2011; 21:722–34.
32. Natarajan M, Stewart JE, Golemis EA, Pugacheva EN, Alexandropoulos K, Cox BD, et al. HEF1 is a necessary and specific downstream effector of FAK that promotes the migration of glioblastoma cells. *Oncogene* 2006;25:1721–32.
33. Sahai E. Illuminating the metastatic process. *Nat Rev Cancer* 2007; 7:737–49.
34. Jonsson G, Busch C, Knappskog S, Geisler J, Miletic H, Ringner M, et al. Gene expression profiling-based identification of molecular subtypes in stage IV melanomas with different clinical outcome. *Clin Cancer Res* 2010;16:3356–67.
35. Mosimann C, Hausmann G, Basler K. Beta-catenin hits chromatin: regulation of Wnt target gene activation. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2009;10:276–86.
36. Willert K, Jones KA. Wnt signaling: is the party in the nucleus? *Genes Dev* 2006;20:1394–404.
37. Hodis E, Watson IR, Kryukov GV, Arolid ST, Imielinski M, Theurillat JP, et al. A landscape of driver mutations in melanoma. *Cell* 2012; 150:251–63.
38. Luciani F, Champeval D, Herbette A, Denat L, Aylaj B, Martinozzi S, et al. Biological and mathematical modeling of melanocyte development. *Development* 2011;138:3943–54.
39. Yang PT, Anastas JN, Toroni RA, Shinohara MM, Goodson JM, Bosserhoff AK, et al. WLS inhibits melanoma cell proliferation through the beta-catenin signalling pathway and induces spontaneous metastasis. *EMBO Mol Med* 2012;4:1294–307.
40. Damsky WE, Curley DP, Santhanakrishnan M, Rosenbaum LE, Platt JT, Gould Rothberg BE, et al. beta-catenin signaling controls metastasis in Braf-activated Pten-deficient melanomas. *Cancer Cell* 2011; 20:741–54.
41. Krauthammer M, Kong Y, Ha BH, Evans P, Bacchiocchi A, McCusker JP, et al. Exome sequencing identifies recurrent somatic RAC1 mutations in melanoma. *Nat Genet* 2012;44:1006–14.
42. Tozluoglu M, Tournier AL, Jenkins RP, Hooper S, Bates PA, Sahai E. Matrix geometry determines optimal cancer cell migration strategy and modulates response to interventions. *Nat Cell Biol* 2013;15: 751–62.
43. Pinner S, Sahai E. PDK1 regulates cancer cell motility by antagonising inhibition of ROCK1 by RhoE. *Nat Cell Biol* 2008;10: 127–37.
44. Wolf K, Mazo I, Leung H, Engelke K, von Andrian UH, Deryugina EI, et al. Compensation mechanism in tumor cell migration: mesenchymal-amoeboid transition after blocking of pericellular proteolysis. *J Cell Biol* 2003;160:267–77.
45. Wolf K, Wu YI, Liu Y, Geiger J, Tam E, Overall C, et al. Multi-step pericellular proteolysis controls the transition from individual to collective cancer cell invasion. *Nat Cell Biol* 2007;9:893–904.
46. Sabeh F, Shimizu-Hirota R, Weiss SJ. Protease-dependent versus -independent cancer cell invasion programs: three-dimensional amoeboid movement revisited. *J Cell Biol* 2009;185:11–9.
47. Joyce JA, Pollard JW. Microenvironmental regulation of metastasis. *Nat Rev Cancer* 2009;9:239–52.
48. 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.
49. Kim SH, Xia D, Kim SW, Holla V, Menter DG, Dubois RN. Human enhancer of filamentation 1 is a mediator of hypoxia-inducible factor-1alpha-mediated migration in colorectal carcinoma cells. *Cancer Res* 2010;70:4054–63.
50. Ahn J, Sanz-Moreno V, Marshall CJ. The metastasis gene NEDD9 product acts through integrin beta3 and Src to promote mesenchymal motility and inhibit amoeboid motility. *J Cell Sci* 2012;125: 1814–26.

ICAT, Inhibitor of β -catenin and TCF4, a new modulator of melanoma cells motility and invasiveness

Mélanie Domingues^{1,2,3}, Florian Rambow^{1,2,3}, Bastien Job⁴, Laura Papon^{1,2,3}, Wanguo Liu⁵, Lionel Larue^{1,2,3}, Jacky Bonaventure^{1,2,3}

Supplementary information content:

Supplementary Methods.....	2
Supplementary Figure Legends	8
Supplementary Movie 1 to 6.....	10
Supplementary Tables.....	11

Supplementary Methods

Cell culture

The human melanoma cell lines Lu1205, Mel501, Skmel3, WM852 and Dauv-1 obtained from Dr M. Herlyn (Wistar Institute, Philadelphia, PA, USA) were maintained in RPMI 1640 medium (Gibco) supplemented with 10% foetal bovine serum (Sigma), 5 mM L-glutamine, 100 U/mL penicillin and 100µg/mL streptomycin. All cells were grown at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% carbon dioxide. NSC23766 (Rac inhibitor) and Y27632 (Rho/ROCK inhibitor), both from Sigma, were added to sub-confluent cells at final concentrations of 50 µM and 10 µM respectively. Cell viability, assessed after an overnight treatment, was not affected.

Plasmids, cDNA constructs and mutagenesis

The full-length mouse ICAT cDNA was amplified by RT-PCR using mRNA isolated from adult mouse skin with primers listed in Table S1. The 377 bp PCR product was cloned in the Topo TA cloning vector (Invitrogen) then, sub-cloned into the pEGFP C3 vector (Clontech) at the EcoRI restriction site. This allowed production of a 35 kDa ICAT-GFP fusion protein (#999). A 243 bp human ICAT cDNA cloned in the pFLAG-CMV2 vector was kindly provided by Dr C. Gottardi (Chicago IL, USA), this vector is referred to, in the manuscript, as CMV::ICAT WT (#979). A triple mutant form of ICAT in helix 1 (ICAT-DQE mutant) derived from the ICAT-Flag vector (#996) was created with primers shown in Table S2. The forward primer LL1806 containing three nucleotide changes (shown in red) when compared to the wild-type sequence was coupled with the reverse primer LL1521. A 186 bp PCR fragment was generated and then restriction digested with BspEI and BlnI. This 128 bp sub-fragment was exchanged with the equivalent wild-type fragment isolated from the CMV::ICAT WT or the ICAT-WT-GFP vectors. Presence of the triple mutation converting codons Y15, K19 and V22 into D15, Q19 and E22 was confirmed by sequencing of the construct. The CMV::β-catenin-NLS expression vector was used for overexpression of β-catenin in the nucleus (Delmas et al, 2007). The pEGFP-N1 (enhanced green fluorescent protein and neomycin phosphotransferase) plasmid was obtained from BD Biosciences, Clontech. The pCMV LifeAct-TagGFP2 (#1049) plasmid was provided by Dr M. Piel (Institut Curie, Paris) and the pcDNA3-NEDD9 (#1067) expression vector was a gift from Dr E. Golemis (Fox Chase Cancer Center, Philadelphia PA, USA). Lu1205 and Lu1205 cells expressing exogenous ICAT were transfected with the pGL4.5 Luc2/CMV/hygro vector

(Promega) and stable clones expressing luciferase were selected with hygromycin (300 µg/mL).

Transfections

Lipofectamine 2000 (Invitrogen) in Opti-MEM medium was used for both transient and stable transfections. To obtain stable clones expressing ICAT-WT-GFP, ICAT-DQE-GFP or GFP alone, cells were incubated with geneticin G418 (800 µg/mL) 72 hr after transfection for 15-20 days. Individual clones were isolated by aspiration, treated with trypsin and counted with a haemocytometer. Cells were diluted to a concentration of 10 cells/mL. Aliquots of 100µL were distributed into 96-well plates and grown at 37°C in the presence of G418. Single clones expressing different amounts of ICAT-GFP (WT or DQE) were selected and used for further analyses.

Production of recombinant wild-type and mutant GST-ICAT proteins in *E. coli*

The human ICAT cDNA (243 bp) in the bacterial expression vector pGEX-4T3 was kindly provided by C. Gottardi (USA). The ICAT-DQE pGEX-4T3 vector was generated as described in the Materials & Methods. The ICAT-WT and ICAT-DQE vectors were used to transform *E.coli* BL21 cells (Stratagene). Transformants were grown at 37°C for 2-3 hr to an OD₆₀₀ of 0.6-0.8 and induced with IPTG at 37°C for 3-4 hr. The bacterial cultures were centrifuged and the cell pellets sonicated. Cell lysates were incubated with glutathione Sepharose 4B beads overnight at 4°C. The beads were washed twice with 1X PBS, 0.3M NaCl, Triton 0.1%, protease inhibitors, twice with the same buffer containing 0.15M NaCl, and once with 1X PBS, Triton 0.1% and then re-suspended in one volume of 1X PBS.

Western blotting, immunoprecipitation and affinity precipitation

Total cell lysates were obtained by scraping confluent cells in the presence of RIPA supplemented with protease inhibitors (Complete, Roche) and phosphatase inhibitor tablets (Phostop, Roche); the lysates were centrifuged at 15,000g for 30 min at 4°C. Total protein concentrations in cell lysates were determined. Aliquots of 50 µg of total protein were resolved by SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose membranes (Protran, Whatman, Germany) and probed with the antibodies indicated. Immunoprecipitation was achieved by incubating total cell lysates with ICAT polyclonal antibody for 2h at 4°C. Immune complexes were bound to Protein G agarose beads. After washing with RIPA, beads were boiled for 10

min in loading buffer. For affinity precipitation, total cell lysates in RIPA (500 µg of total protein) were incubated with 30 µL of a 50% suspension of GST-ICAT-WT or GST-ICAT-DQE coupled to glutathione-Sepharose 4B beads (GE Healthcare) for 3 hr at 4°C. Precipitated proteins were washed five times and subjected to SDS-PAGE and western blotting. Rac1 activation assays were performed as described in the Rac1 Activation Assay Biochem Kit manual (Cytoskeleton, Inc, Tebu-Bio). Total cell lysates (800 µg of proteins) were incubated with 10 µg of PAK-PBD beads (p21 binding domain of the p21 activated kinase 1) that bind specifically to Rac-GTP. The beads were collected by centrifugation, washed briefly and boiled for 5 min in Laemmli sample buffer, then analyzed by SDS-PAGE and western blotting. Recombinant Rac1-His protein (24 kDa) was used as a standard.

Cell immunofluorescence and tissue immunostaining

For immunofluorescent staining, cultured cells were fixed in 4% PFA for 10 min at room temperature, then permeabilised in PBS/0.1% Triton-X100 for 10 min. The cells were washed three times for 5 min in PBS and incubated in blocking solution (PBS containing 5% goat serum) for 30 min at room temperature. Cells were then incubated in blocking solution overnight at 4°C with the primary antibodies indicated. The samples were washed three times in PBS for 5 min and incubated with the secondary antibody (anti-mouse Alexa Fluor 555, anti-mouse Alexa Fluor 488 or anti-rabbit Alexa Fluor 488, Invitrogen) for one hr. After several washes with PBS, slides were mounted and observed under an epifluorescence microscope. Lungs from mice inoculated with melanoma cells were collected at autopsy, rinsed in cold PBS, and fixed in 4% PFA overnight at 4°C. They were then incubated for 16 hr in 30% sucrose/PBS at 4°C, embedded in Tissue-Tek OCT compound (Sakura Finetek, CA, USA), and cut into 7 µm-thick sections. Sections were rinsed three times in PBT (PBS/0.1% Tween 20), boiled for 20 min in 10 mM sodium citrate pH6, and treated with blocking solution (PBT containing 5% Donkey Serum) for 20 min. The sections were then incubated in PBT overnight at 4°C with the primary antibodies indicated. Alexa Fluor 488 secondary antibody was used to detect bound primary antibodies. After several washes with PBT, slides were mounted and observed under an epifluorescence and a confocal microscope.

Antibodies

A rabbit polyclonal anti-ICAT antibody was generated by immunizing a rabbit with a 12 amino-acid synthetic peptide (NH₂-AFSRSETEDRRQ-COOH) corresponding to residues 69-80

of the C-terminal end of both human and mouse ICAT, coupled to the KLH carrier protein. Mouse monoclonal antibody against human ICAT (clone 5C6) and phalloidin-FITC were obtained from Sigma-Aldrich. Rabbit polyclonal antibody raised against phosphorylated myosin light chain (pMLC, T18/S19) was obtained from Cell Signaling. The Anti-Rac1 mouse monoclonal antibody was from the Rac1 Activation Assay Biochem Kit (Cytoskeleton, Inc, Tebu-Bio). NEDD9-specific mouse monoclonal antibody (clone 2G9), and rabbit polyclonal antibody specific to β -catenin were obtained from Abcam. The rabbit polyclonal antibody against Ki67 nuclear antigen was from Novacastra.

Real-time quantitative PCR (qPCR)

Total RNAs were isolated using RNeasy Mini Kit (Qiagen); cDNAs were synthesized from 1 μ g of total RNA using M-MLV Reverse Transcriptase (Invitrogen). Semi-quantitative real-time PCR was used to assay transcripts. Aliquots (2 μ L) of the reverse transcription products (cDNAs) were amplified in a reaction mixture (25 μ L) containing 2x iQ SYBR Green Supermix (BioRad) and 300nM (NEDD9, TBP, HPRT) or 600nM (ICAT, β -catenin, MT1-MMP) of forward and reverse primers using a Bio-Rad iCycler iQ Multi-Color Real-Time PCR Detection System. The thermal profile was: 95°C for 1 min 30 s and 40 cycles of 95°C for 30s and 60°C for 1 min. All samples were run in triplicate and relative expression was calculated by normalizing results to TBP mRNA by the $\Delta\Delta$ Ct method. The primers used are listed in Table S3.

RNA silencing

RNA interference assays were performed with a final concentration of 200 pmoles siRNA per 10^6 cells. Scramble (scr) and ICAT siRNAs were from MWG and the NEDD9 Smart pool was from Dharmacon, Thermo Scientific. The sequences of the si RNAs used are listed in Table S4. Cells (1×10^6 cells for Mel501 and 3×10^6 for Lu1205) were mixed with 100 μ L Amaxa Nucleofector solution (Lonza, Germany) in a single cuvette, subjected to nucleofection (program T30) and plated immediately thereafter in fresh RPMI/FBS medium.

Dual luciferase assays

Lipofectamine 2000 was used to transfect Mel501 and Lu1205 cells with the *Firefly* luciferase construct (pGL3 vector) with the (-2011 to +72) *NEDD9* promoter. Expression vectors for LEF1, for β -catenin and for ICAT-WT or ICAT-DQE were also transfected together with the promoter. The pRL-TK *Renilla* luciferase reporter construct was used as an

internal control for transfection efficiency. Forty-eight hr post-transfection, cells were lysed with passive lysis buffer and luciferase activities (*Firefly* and *Renilla*) were measured using the Dual Luciferase reporter Assay (Promega) in a TriStar luminometer (Berthold, Germany). *Firefly* luciferase activity was normalized to *Renilla* luciferase activity.

Flow cytometry

Cells were seeded in 6-well plates (2.5×10^5 cells/well for Mel501, 3×10^5 for Lu1205 and 3×10^5 for Skmel3). Forty-eight hours after transfection, cells were incubated with 10mM BrdU (BD Biosciences) for 1 hr. The cells were harvested, fixed in 70% ethanol at -20°C and permeabilised with 0.1% Triton X100 in TBS with 5% BSA for 20 min. The cells were then stained with a PE-conjugated anti-BrdU antibody (BD Biosciences) and PI to stain viable cells before analysis with a FACScalibur apparatus (Becton Dickinson) and FlowJo software. For the analysis of apoptotic cells, transfected cells were harvested and resuspended in 1X binding buffer (10X binding buffer BD biosciences #556454). The cells were then incubated with an Annexin V antibody for 45 min in the dark before analysis with a FACScalibur apparatus (Becton Dickinson) and FlowJo software.

In gel zymography

Cells were cultured in serum-depleted media for 24 hr. Conditioned media were then prepared in non-reducing buffer for SDS-PAGE. Gelatin (1 mg/mL) was embedded in the resolving gel during preparation of the acrylamide gel. After migration, SDS was removed from the gel by incubation in Triton-X100. The gel was then incubated in a digestion buffer (Tris 50 mM pH 7.5, CaCl_2 2 mM and NaN_3 0.02%) for 24 hr at 37°C and stained with Coomassie Blue. Destaining of the gel allowed the appearance of clear bands representing digestion areas.

Statistical analysis

Prism6 software (GraphPad, La Jolla, CA) was used for statistical analyses. Single-cell migration and mRNA content differences were assessed using the Mann-Whitney test (two-tailed). Collective cell migration, cell invasion, cell number, proliferation rates and luciferase activity differences were studied using two-way analysis of variance (ANOVA) test followed by Bonferroni's post-test. Mice survival curves were drawn as Kaplan-Meier Cumulative Proportion Surviving graphs, and corresponding p-values were calculated with the log-rank (Mantel-Cox) test. Melanoma metastases expression profiles were retrieved from ArrayExpress (GSE22154) and normalized using *limma*'s *normalize Quantiles* method under

R v2.15.2. Hierarchical clustering of CTNNBIP1 expression profiles was performed using Euclidean distances and Ward's construction method. Differences in DMFS values between the two clusters were assessed using Wilcoxon rank-sum test. All p-values ≤ 0.05 were considered significant. All value sets were tested for normality using a Shapiro-Wilk normality test.

Supplementary Figure Legends

Supplementary Figure S1. IF staining of ICAT and β -catenin in melanoma cells. (A) Reduced ICAT staining with an anti-ICAT monoclonal antibody in si ICAT-transfected Lu1205 cells. Incubation with the secondary antibody anti-mouse Alexa fluor 488 alone gives no detectable signal. (B) Western blot analysis of Lu1205 cells transfected with si scr and si ICAT after immunoprecipitation with an anti-ICAT polyclonal antibody. (C) Immunofluorescence images from Lu1205, Mel501 and Skmel3 cells incubated with an anti β -catenin antibody (green) and DAPI (blue). Scale bars: 10 μ m.

Supplementary Figure S2. Transient exogenous ICAT expression does not affect the proliferation rates and the viability of Lu1205, Mel501 and Skmel3 cells. (A) Lu1205, Mel501, and Skmel3 cells transiently transfected with control pcDNA3 (Mock), CMV::ICAT WT (ICAT WT) or CMV::ICAT DQE (ICAT DQE) expression vectors were labelled with an anti-BrdU FITC antibody and Propidium Iodide (PI). Left panel: Representative analysis of BrdU positive cells. Right panel: percentage of BrdU positive cells for each condition. (B) Lu1205, Mel501, and Skmel3 cells transiently transfected with control pcDNA3 (Mock), CMV::ICAT WT (ICAT WT) or CMV::ICAT DQE (ICAT DQE) expression vectors were labelled with an anti-Annexin-V FITC antibody and Propidium Iodide (PI). Left panel: Representative analysis of Annexin-V positive cells. Right panel: percentage of Annexin-V positive cells for each condition.

Supplementary Figure S3. ICAT DQE mutant does not bind to β -catenin. (A) Schematic representation of the ICAT WT protein bound to β -catenin. The three α helices H1, H2 and H3 of the N-terminal domain (amino-acids: 11-59) are shown as purple blocks. Point mutations in helix H1 were created, giving rise to the ICAT triple mutant Y15D, K19Q, V22D (ICAT DQE mutant). Positions of amino-acid substitutions are shown by arrows. WT and mutant ICAT cDNAs were expressed as glutathione S-transferase (GST) fusion proteins. (B) Coomassie blue staining of recombinant ICAT WT and ICAT DQE GST proteins. (C) Representative pull-down analysis of endogenous β -catenin by ICAT WT and ICAT DQE GST proteins in Mel501 cell lysates. (D and E) Upper panel: RT-qPCR analysis of ICAT levels in Lu1205 (D) or Mel501 (E) cells and respective stable clones overexpressing WT or mutant (DQE) ICAT, using TBP as an internal reference. RNA levels are expressed as mean \pm SEM of three independent experiments. Lu1205 and Mel501 control value is 1. Lower panel: Western blot analysis of ICAT in Lu1205 (D) or Mel501 (E) cells and respective stable clones expressing WT or mutant (DQE) ICAT-GFP protein. β -actin corresponds to the loading control. **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001.

Supplementary Figure S4. Stable exogenous ICAT expression increases Lu1205 and Mel501 cell lines migration. (A,B) The migration of Lu1205 (A) and Mel501 (B) cells (Mock) and two Lu1205 and Mel501 clones stably overexpressing ICAT-DQE-GFP (ICAT-DQE) or ICAT-WT-GFP (ICAT-WT), was measured in a scratch wound assay. Representative pictures of the scratch wound size 0 and 12 hr after wounding are shown. Red lines indicate the position of the migration front. (C,D) The percentage of closure for each wound was evaluated from microscopy images at 30 min intervals. Experiments were performed three times, with six replicates in each experiment. At 12 hr: **p<0.01, ns = not significant. Scale bar: 100 μ m.

Supplementary Figure S5. Exogenous ICAT expression does not affect the morphology of Mel501 and Skmel3 cells. The cells may have two morphologies (e= elongated and r = round), the ratio of these two morphologies depends on the cell type: Mel501 (e:r = 99:1) and Skmel3 (e:r = 99:1). (A,B) IF images from Mel501 (A) and Skmel3 (B) cells transfected with control (Mock) or CMV::ICAT-WT (ICAT WT) expression vectors. Cells were incubated with an anti-ICAT antibody (green) and DAPI (blue). (C) Representative images of LifeAct-transfected Lu1205 cells. Blebs are shown by white arrows. (D) Rac1 activation: representative pull-down assay of GTP-bound Rac1 by PAK-PDB beads vs. total Rac1 in lysates of Mel501 and Skmel3 cells transiently transfected either with control pcDNA3 (Mock) or CMV::ICAT-WT (ICAT-WT). Scale bar: 20 μ m. (E) WB showing increased NEDD9 level in si ICAT versus si SCR-transfected Lu1205 cells. ICAT was immunoprecipitated with an anti ICAT antibody. (F) Decreased Rac 1 activation in Lu1205 cells transfected with si NEDD9. β -catenin = loading control. (G) NEDD9 IF staining of Lu1205 cells transiently transfected with a pcDNA3-NEDD9 vector (T = transfected; NT = non-transfected). Scale bar : 20 μ m.

Supplementary Figure S6. (A) IF images of Lu1205 cells transiently transfected with pcDNA3 (Mock), CMV::ICAT WT (ICAT WT), CMV::ICAT DQE (ICAT DQE) expression vectors and treated for 24 hr with NSC23766 (Rac inhibitor) or Y27632 (Rho/ROCK inhibitor). Cells were incubated with an anti-phalloidin-FITC antibody (green) and DAPI (blue). B, Percentage of Lu1205 round cells after transfection and inhibitor treatment. The values reported are means \pm SEM of three independent measures. Note that overexpression of ICAT WT in the presence of Y27632 (ROCK inhibitor) increases slightly, but significantly ($p=0.03$), the number of round cells when compared to Y27632-treated cells. ns = non significant.

Supplementary Figure S7. (A) Heatmap representation of ICAT/CTNNBIP1 levels and unsupervised hierarchical clustering based on transcriptomic analysis of ICAT/CTNNBIP1 expression in 22 human melanoma metastases (31). (B) Significant decrease of median Distant Metastasis Free Survival (DMFS) time in cluster 1 (8 metastasis with high ICAT/CTNNBIP1 expression) compared to cluster 2 (14 metastases with intermediate to low ICAT/CTNNBIP1 expression). (C) Correlating NEDD9 mRNA expression levels with the expression ratio of β -catenin/ICAT shows a positive trend in metastatic melanoma (Jonsson et al., 2010). Note that tumors belonging to cluster 1 are in red and tumors belonging to cluster 2 are in green. * $p<0.01$

Supplementary Figure S8. Un-cropped immunoblot images. Original images used to generate panels in Figures 1, 2, 3, 4, and 5.

Supplementary Figure S9. Un-cropped immunoblot images. Original images used to generate panels in Figures 6, 7, S3 and S5.

Supplementary Movie 1 to 6

Supplementary movie S1: time-lapse video-microscopy with a 10x magnification objective, of Mel501 cells plated on plastic 48 hr after MOCK transfection.

Supplementary movie S2: time-lapse video-microscopy with a 10x magnification objective, of Mel501 cells plated on plastic 48 hr after ICAT transfection.

Supplementary movie S3: time-lapse video-microscopy with a 10x magnification objective, of Lu1205 cells plated on plastic 48 hr after MOCK transfection.

Supplementary movie S4: time-lapse video-microscopy with a 10x magnification objective, of Lu1205 cells plated on plastic 48 hr after ICAT transfection.

Supplementary movie S5: time-lapse video-microscopy with a 10x magnification objective, of Mel501 cells plated on plastic 48 hr after si ICAT transfection.

Supplementary movie S6: time-lapse video-microscopy with a 10x magnification objective, of Lu1205 cells plated on plastic 48 hr after si ICAT transfection.

Supplementary Tables

Supplementary Table S1: Primers used to amplify the full-length mouse ICAT cDNA.

Gene	Primer name	Sequence 5' - 3'
ICAT	LL1196	ATT TCC AGA AGC AGG TGT CCC C
	LL1549	GAA GAC GGT GGT TTG CTA CC

Supplementary Table S2: Primers used to create the ICAT DQE mutant.

Gene	Primer name	Sequence 5' - 3'
ICAT	LL1806	AAG AGT CCG GAG GAG ATG G AC ATT CAG CAG C AG GTC CGA G AG
	LL1521	CGC CAT CAC CAC GCC CTC TGC ACC CTG G

Supplementary Table S3: Primers used for real-time quantitative PCR.

Gene	Primer name	Sequence 5' - 3'
ICAT Human	LL1501	GGA AGA GTC CGG AGG AGA TG
	LL1923	CTC TGC ACC CTG GTC GAT
β -catenin	LL1725	TCA TGC ACC TTT GCG TGA G
	LL1726	ACC CCC TCC ACA AAT TGC T
TBP	LL521	CAC GAA CCA CGG CAC TGA TT
	LL522	TTT TCT TGC TGC CAG TCT GGA C
ICAT Mouse	LL1199	AGA TCG GAG ACG GAA GAC C
	LL1549	GAA GAC GGT GGT TTG CTA CC
HPRT	LL1615	CAA GCT TGC TGG TGA AAA GGA
	LL1616	TGC GCT CAT CTT AGG CTT TGT A
NEDD9	LL1507	TCA GTG CAG AGA AGC ATT GG
	LL1508	GAT GAG GGA GGG ATG TCG TA
MT1-MMP	LL2008	CCG AGG GCT TCC ATG GCG AC
	LL2009	ATT CCT GAC AGT CCA AGG CTC GGC

Supplementary Table S4: siRNA oligonucleotides sequence

siRNA	Sequence 5' - 3'
scramble	AAU UCU CCG AAC GUG UCA CGU
ICAT	GAU GGG AUC AAA CCU GAC A
NEDD9 (Smart pool)	AGG AAC UGG CCU UUC GCA A
	CUA CCA AAA UCA GGG AAU U
	CCU CUG GAC UGA UGC AGC A
	CCA AGA ACA AGA GGU AUA U

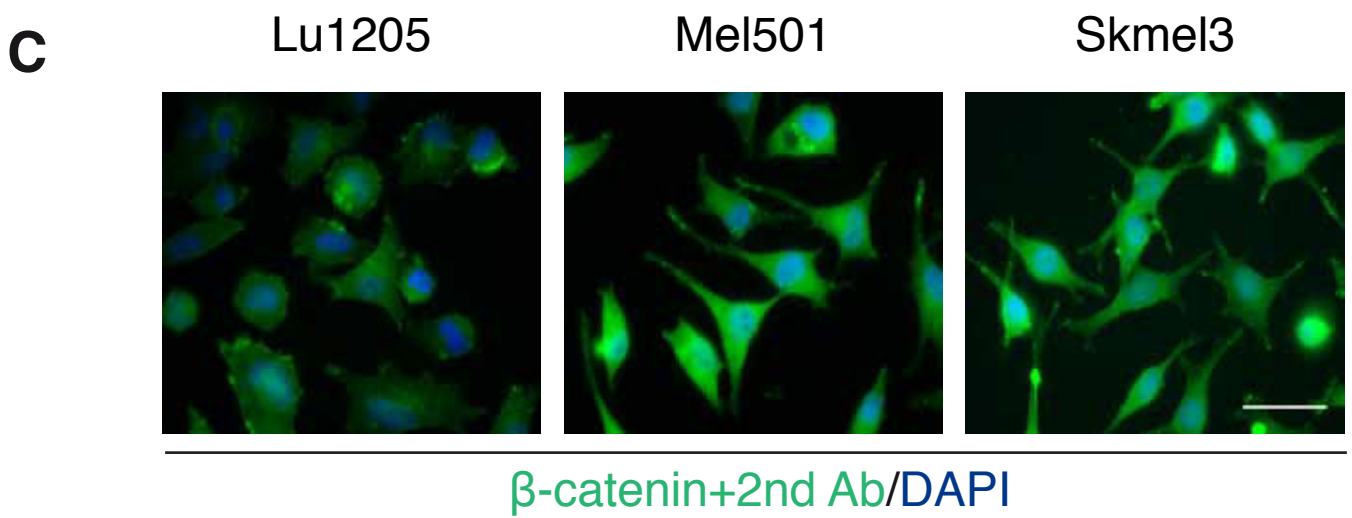
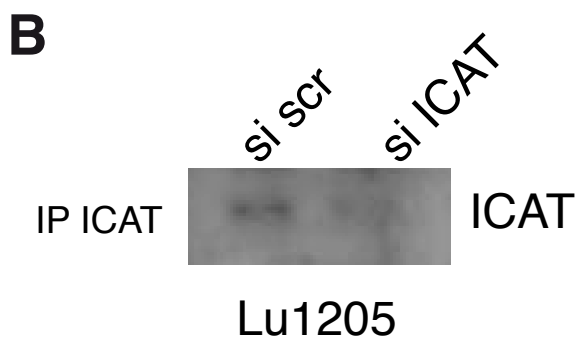
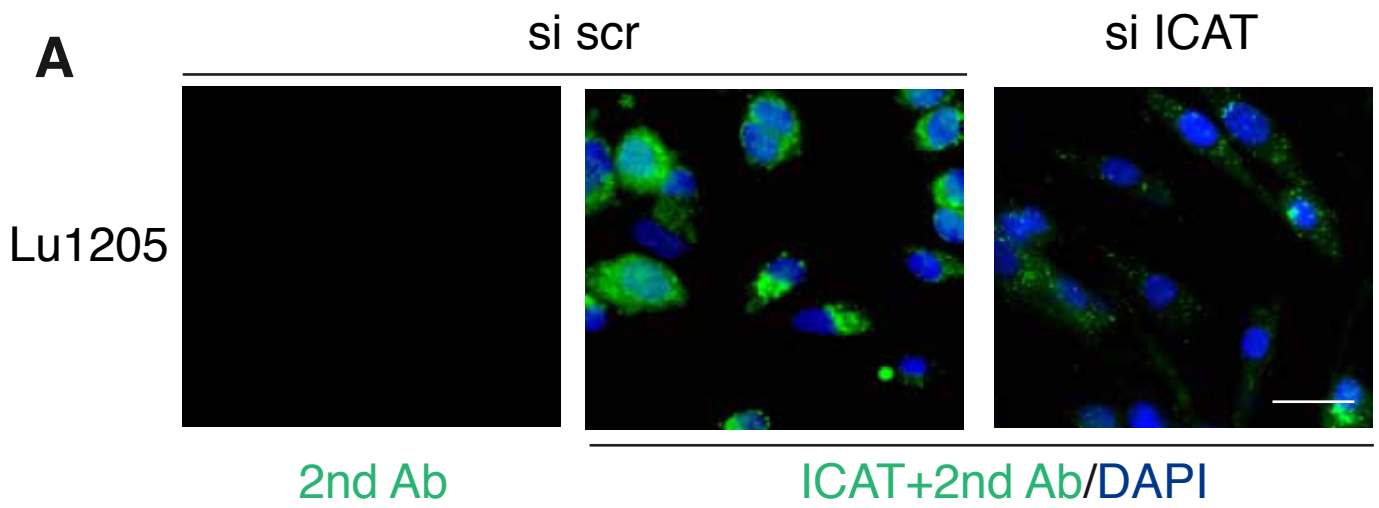
Supplementary Table S5:

Endogenous level of ICAT, β -catenin, NEDD9 and Rac-GTP, cell morphology and migration speed in metastatic melanoma cell lines differ from non-metastatic cell lines.

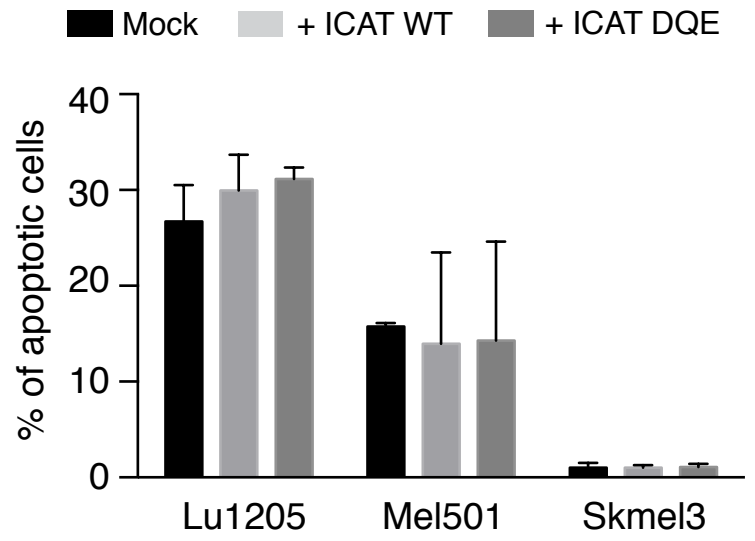
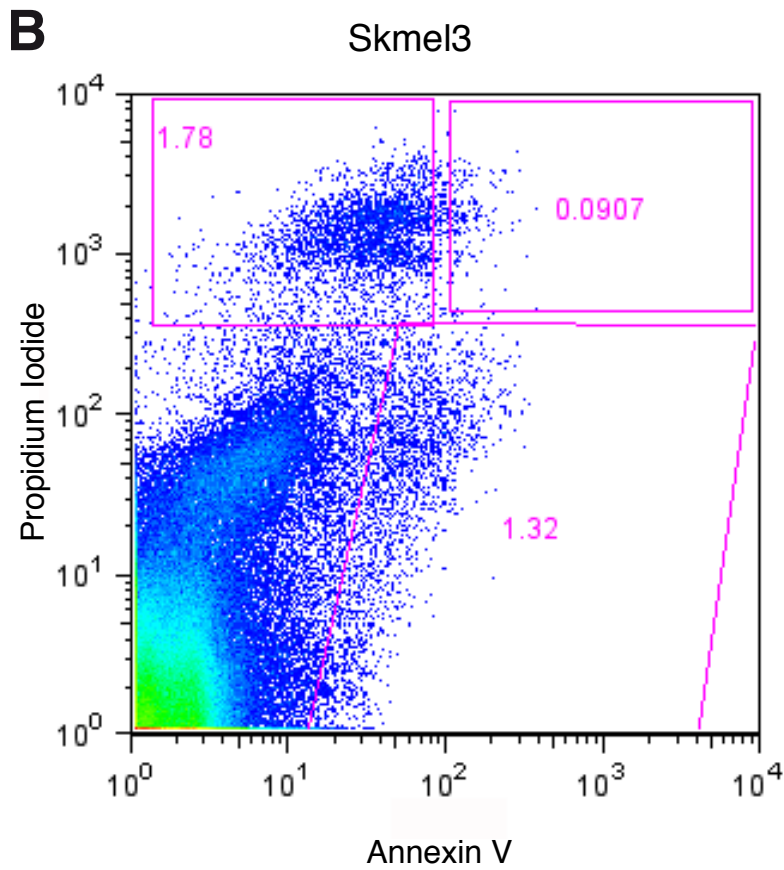
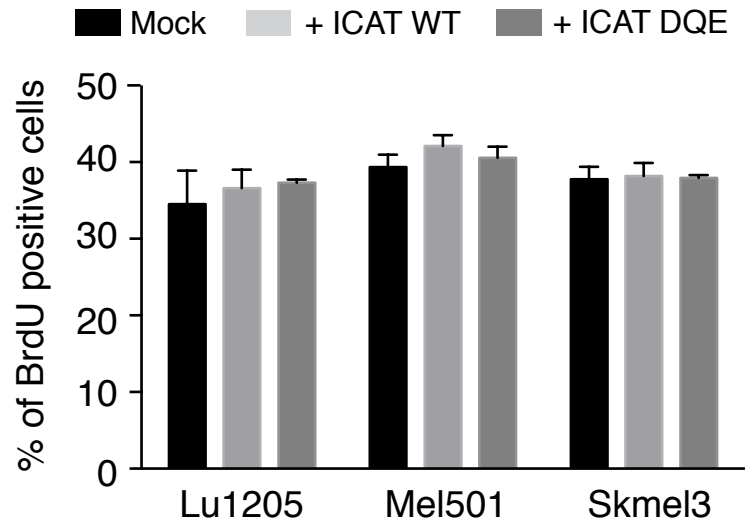
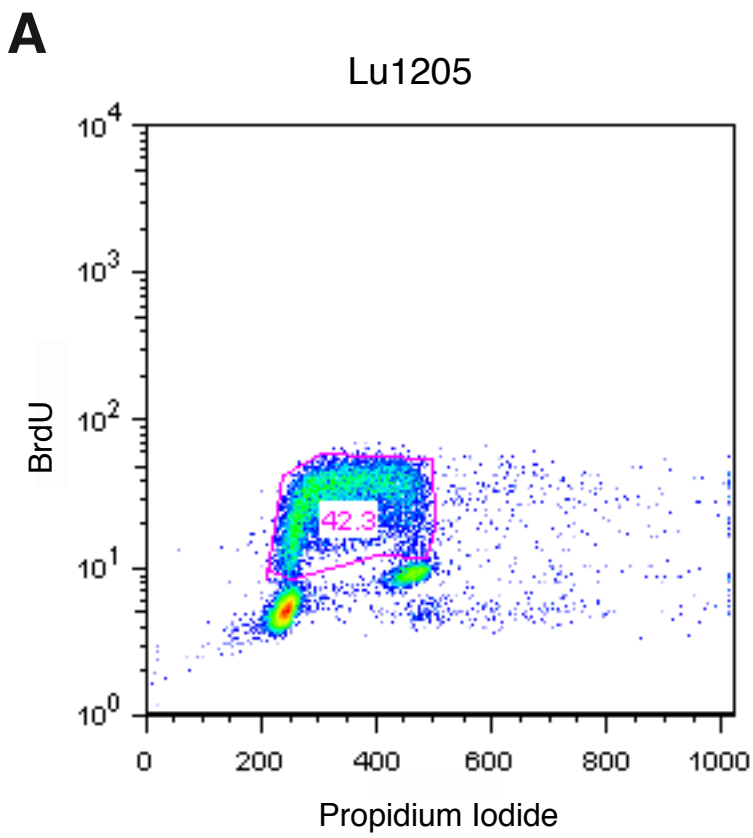
Note that the transcriptional β -catenin activity evaluated according to the TOP flash activity is higher in Dauv-1 and Mel501 than in Lu1205 cells (Gallagher et al., 2013).

* Transition from mesenchymal to amoeboid movement occurs upon ICAT overexpression or pharmacological inhibition of Rac.

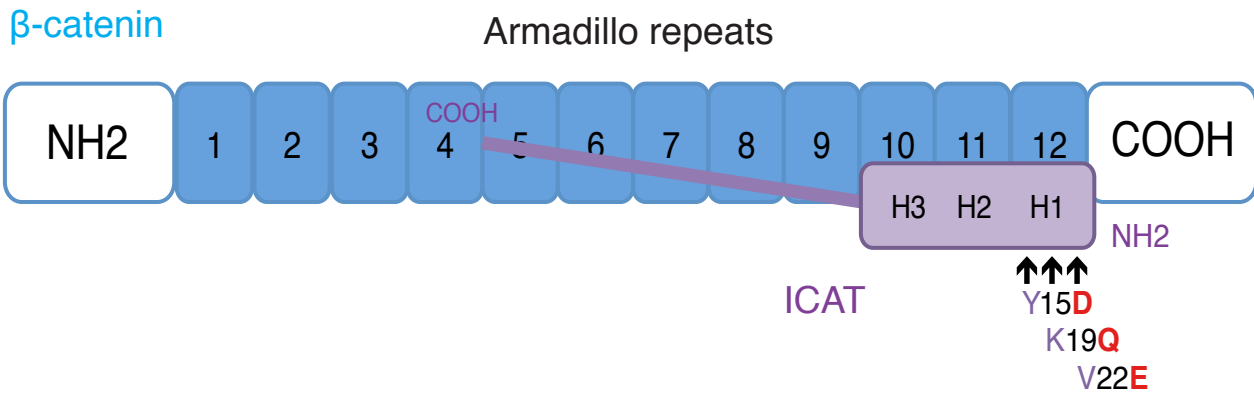
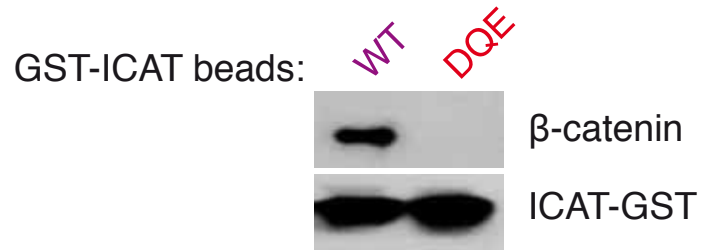
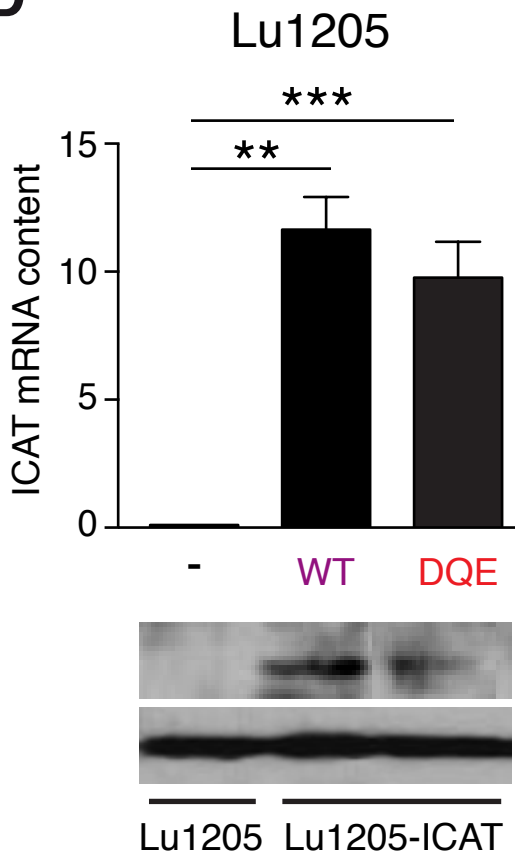
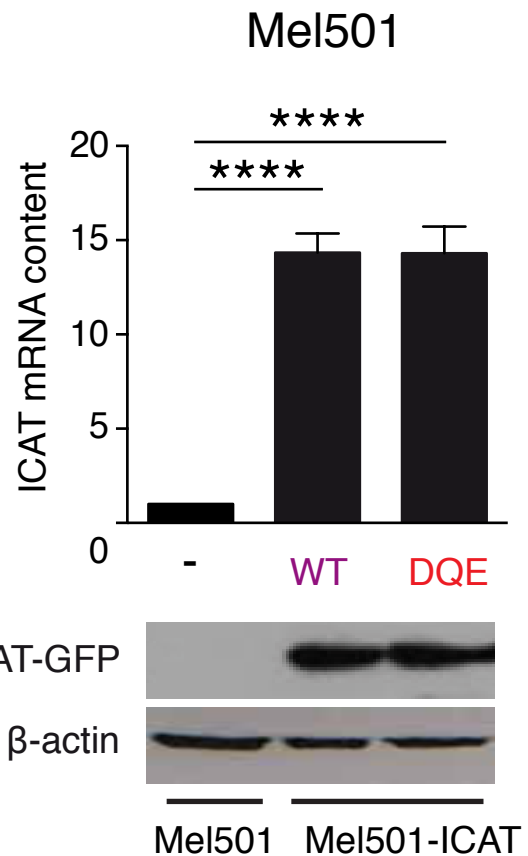
Cell line	ICAT level	β -cat level	NEDD9 105 / 115 (kDa)	Rac1 -GTP level	Cell morphology (round : elongated ratio)	Mesenchymal to amoeboid transition*	Migration speed μ m/h
Lu1205	+++	+	+ / ++	++	60 : 40	Yes	15.7
WM852	+++	+	+ / ++	+++	30 : 70	Yes	21.6
Dauv-1	++	++	++ / ++	+++	10 : 90	No	10.0
Mel501	+	+++	+++ / -	+/-	1 : 99	No	11.9
Skme13	+/-	++	++ / -	+/-	1 : 99	No	4.1



Domingues_FigS1



Domingues_FigS2

A**B****C****D****E**

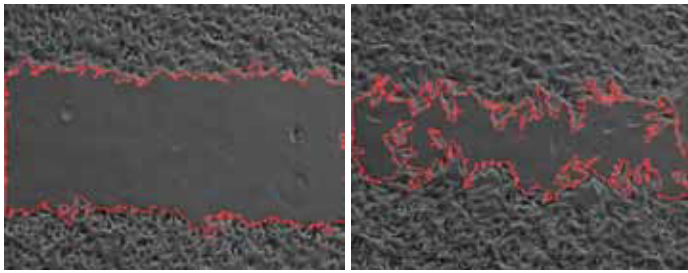
A

Lu1205

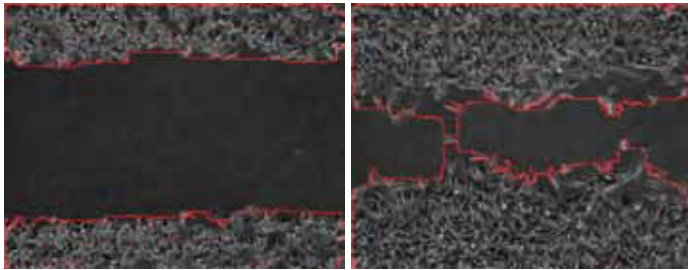
0 h

12 h

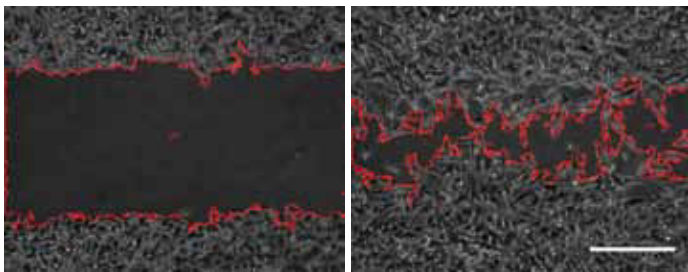
Mock



ICAT DQE



ICAT WT

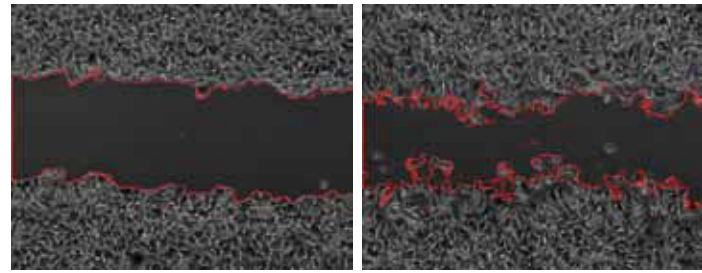
**B**

Mel501

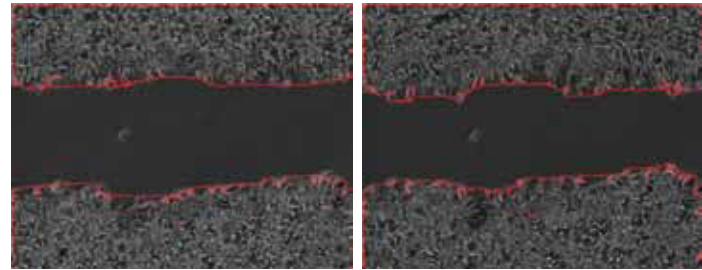
0 h

12 h

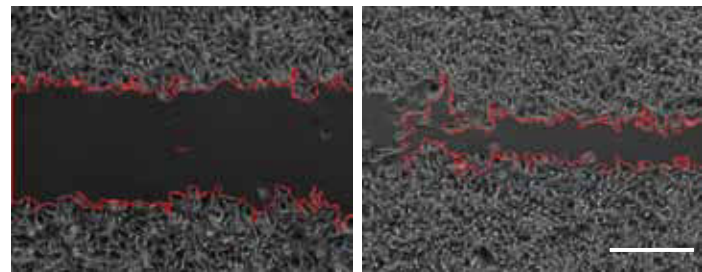
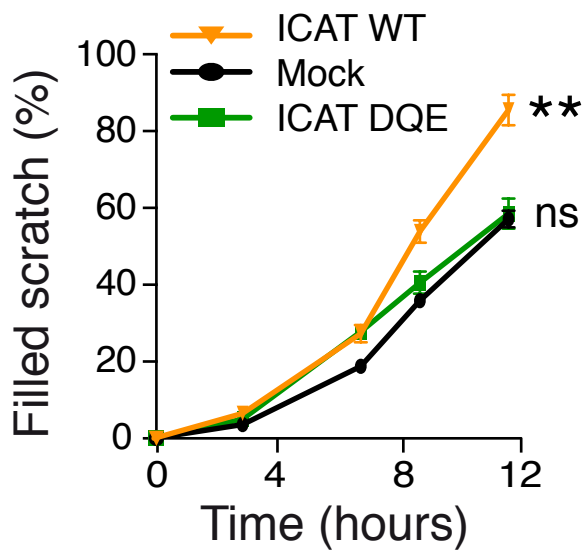
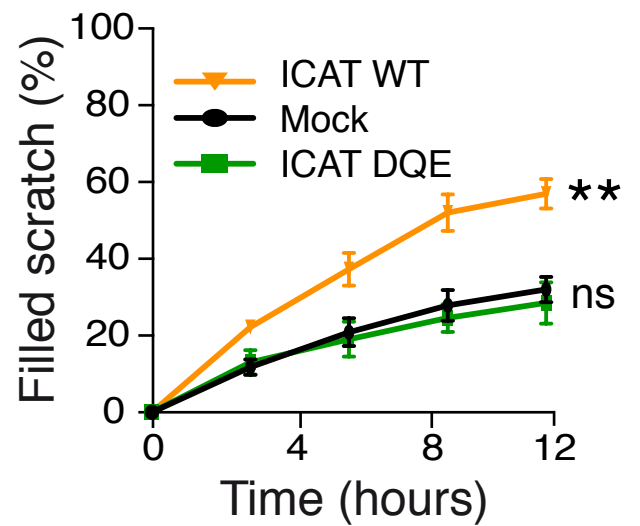
Mock

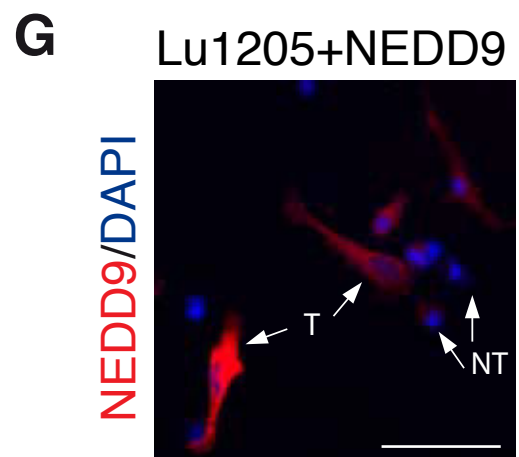
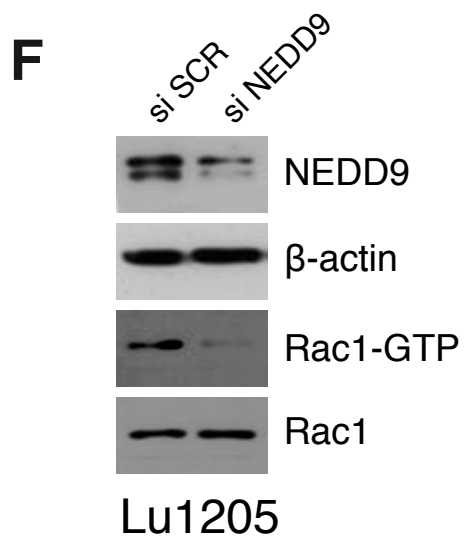
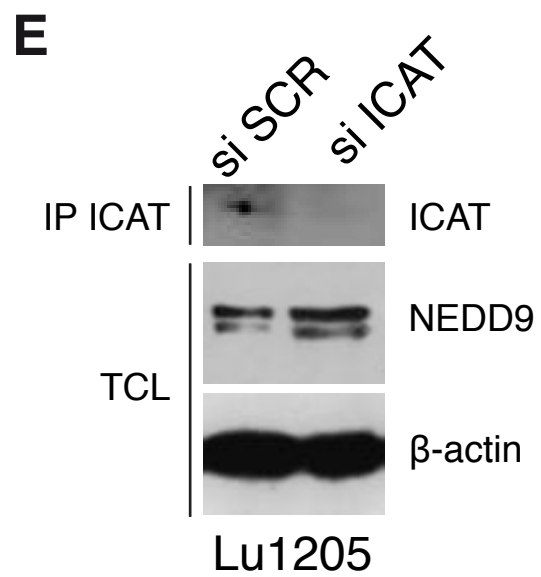
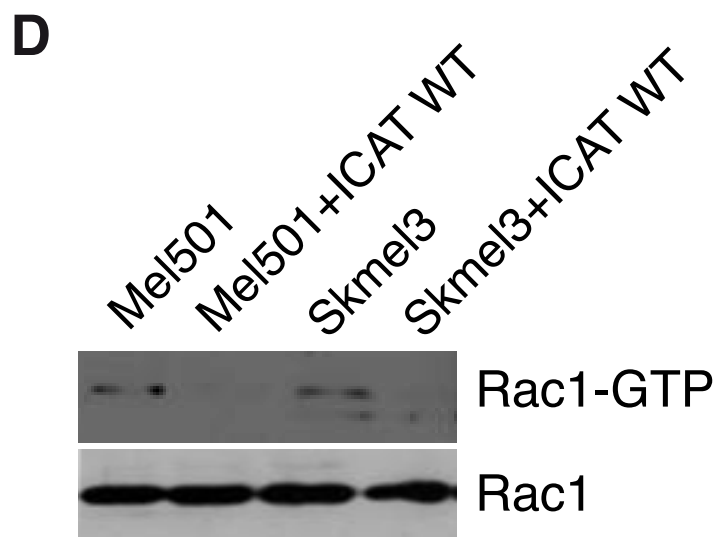
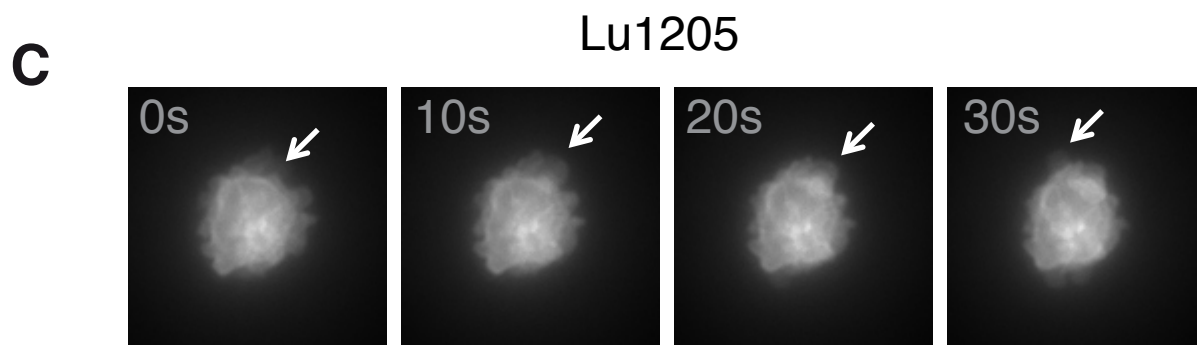
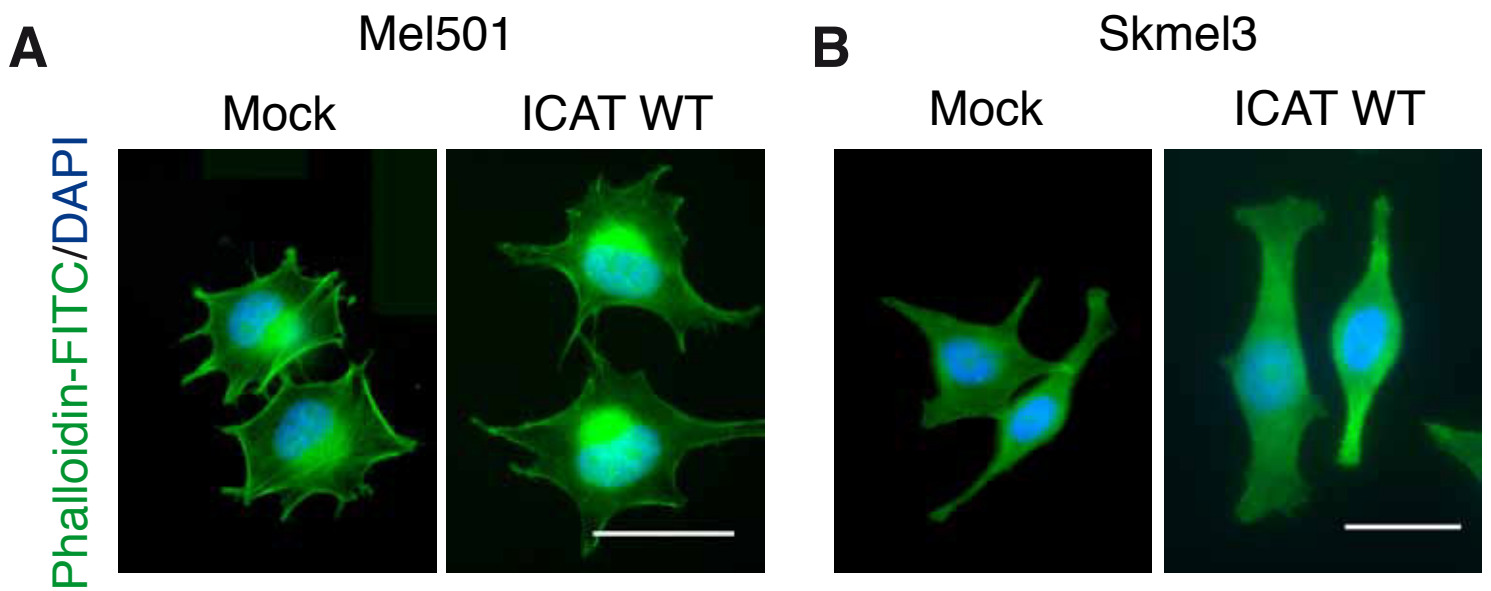


ICAT DQE



ICAT WT

**C****D****Domingues_FigS4**



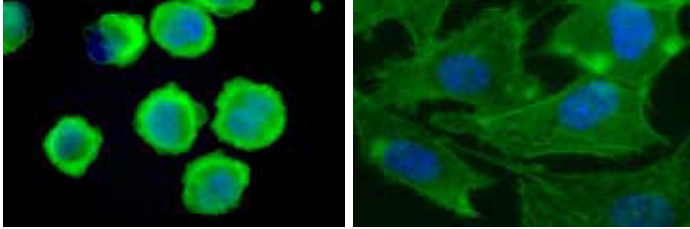
A

Phalloidin-FITC/DAPI

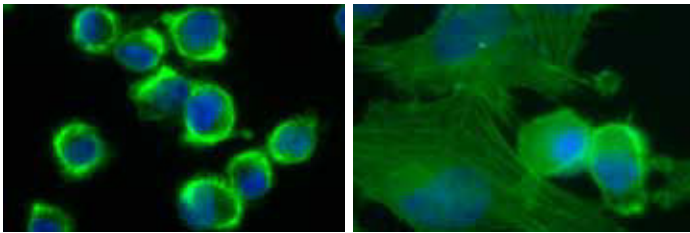
NSC23766

Y27632

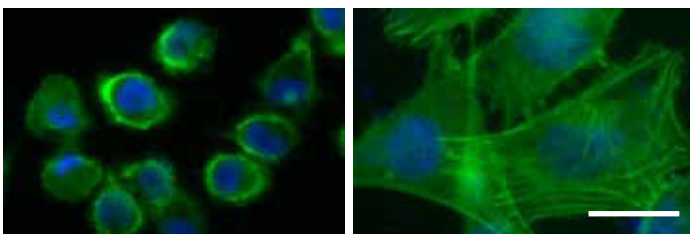
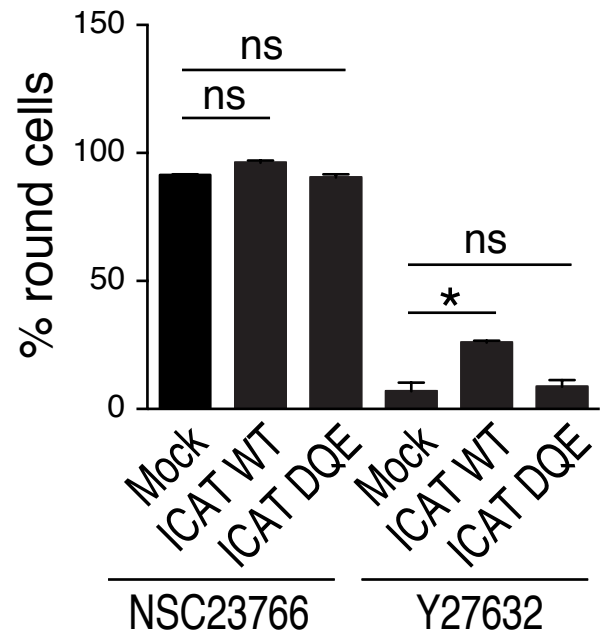
Mock

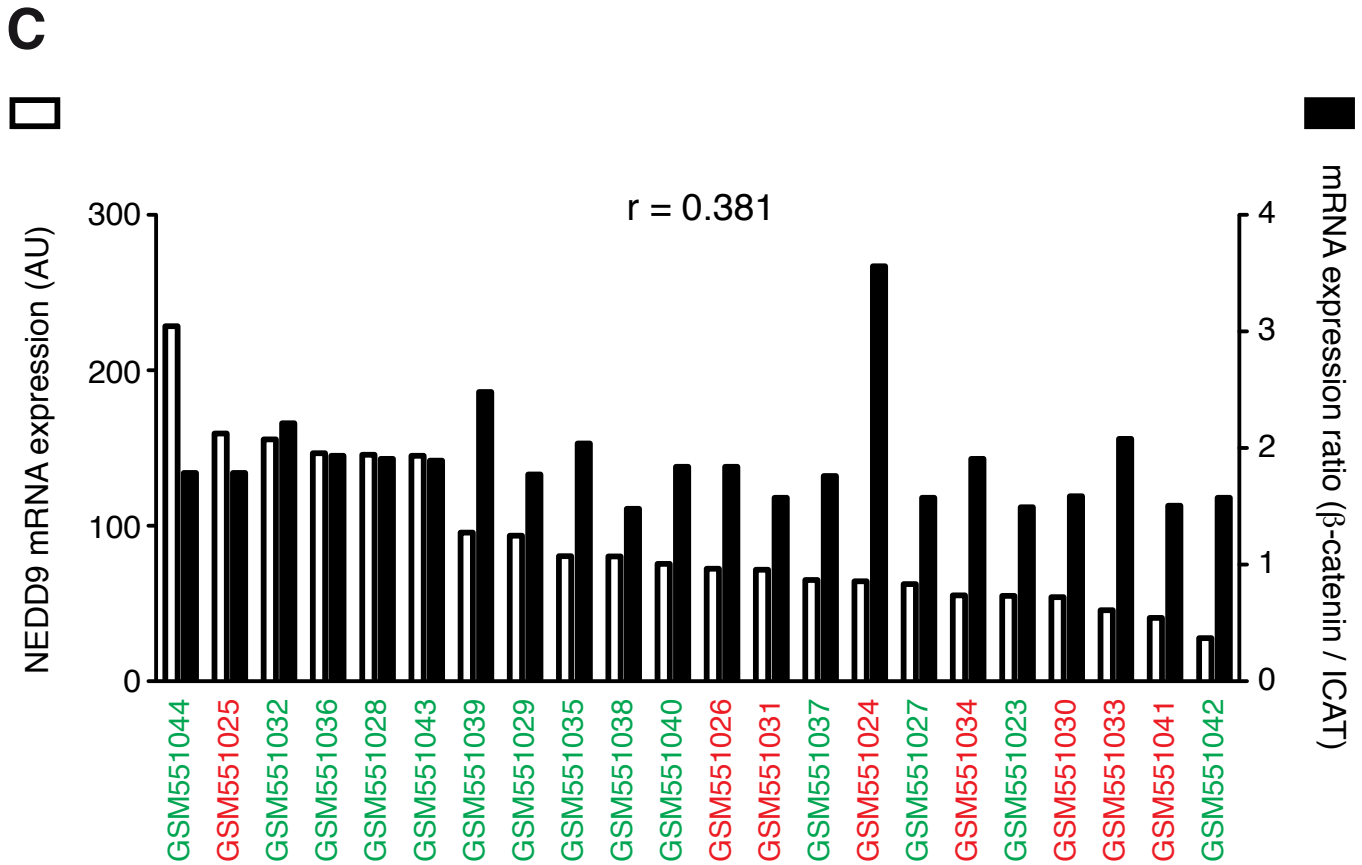
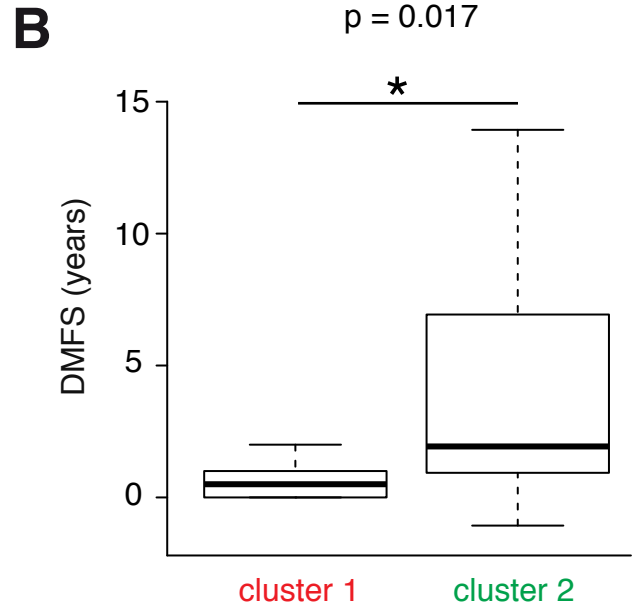
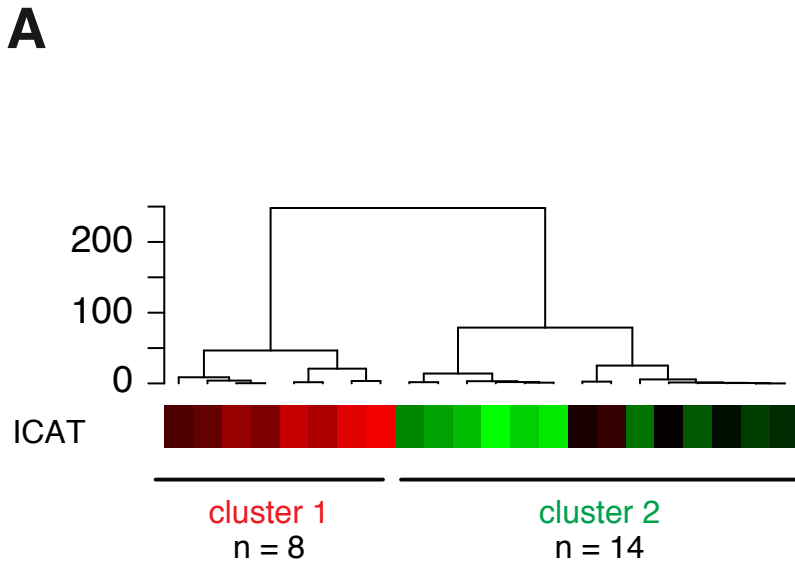


ICAT WT



ICAT DQE

**B****Domingues_FigS6**



Domingues_FigS7

Fig 1

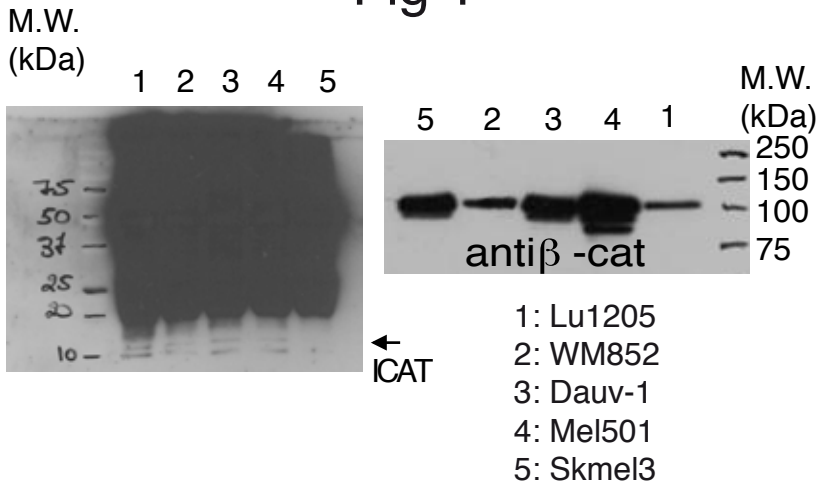


Fig 2

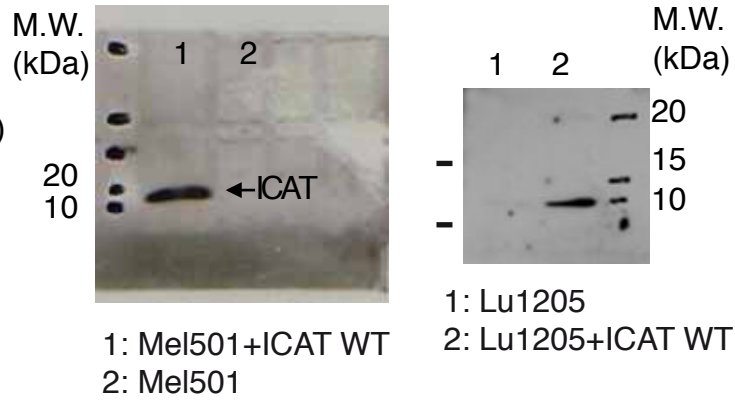


Fig 2

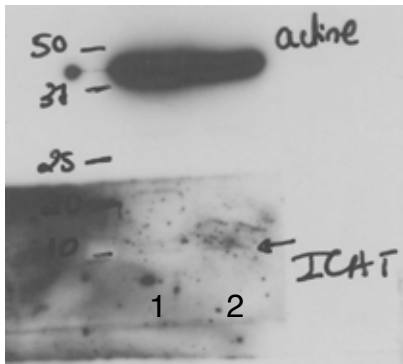


Fig 3

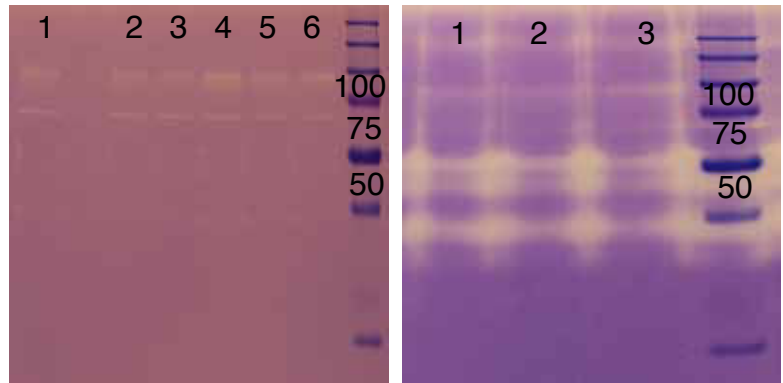


Fig 4

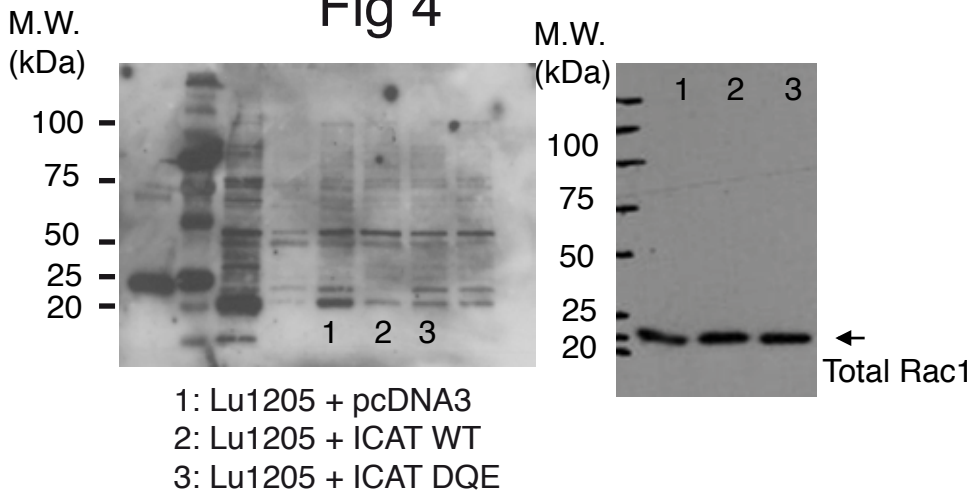


Fig 5

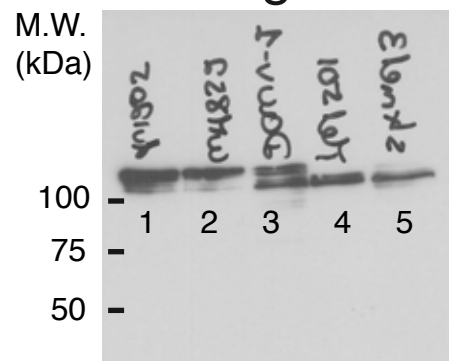


Fig 6

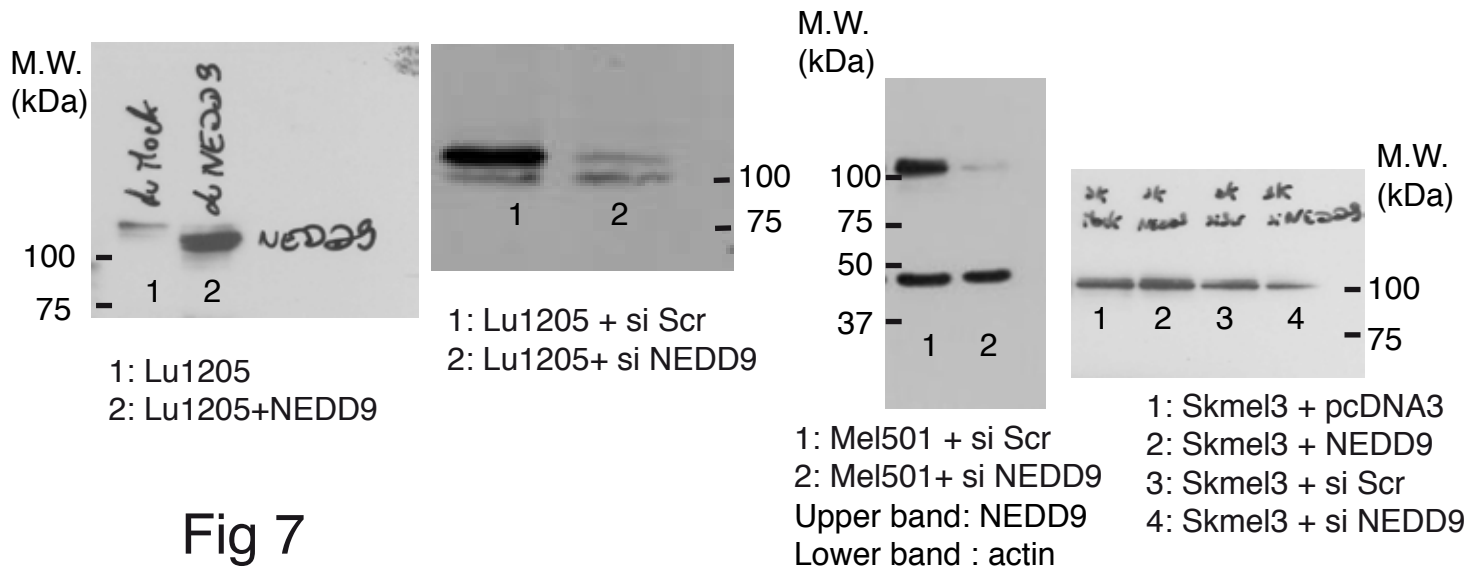
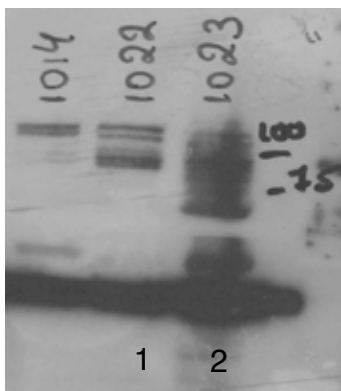


Fig 7



1: Lu1205 injected nude mice (lung extract)
2: Lu1205-ICAT WT injected nude mice (lung extract)

Fig S3

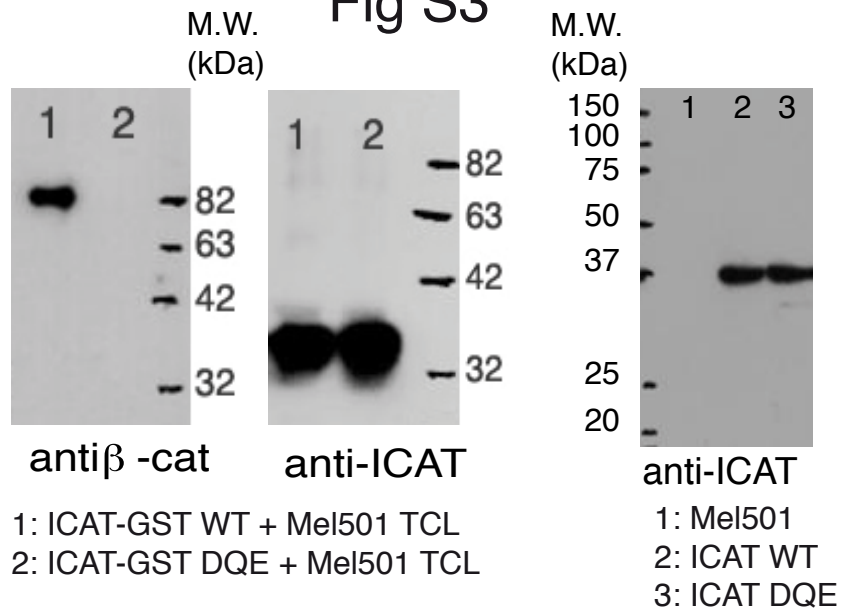
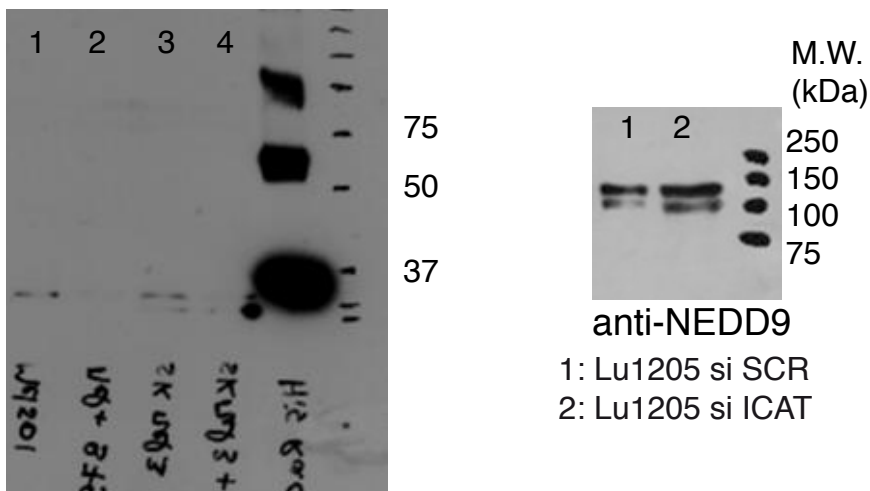


Fig S5



1: Mel501
2: Mel501 + ICAT WT
3: Skmel3
4: Skmel3 + ICAT WT

PARTIE C:
ANALYSE DE LA
STRUCTURE
TRIDIMENSIONNELLE
DU COMPLEXE
ICAT/ β -CATÉNINE

1. Contexte et objectifs du projet

Comme je l'ai mentionné dans l'introduction ICAT est capable d'inhiber l'interaction entre β -caténine et les facteurs de transcription TCF/LEF et donc la transcription des gènes cibles de β -caténine. L'étude de la structure tridimensionnelle du complexe ICAT/ β -caténine a permis d'élucider le mécanisme de compétition entre ICAT et les facteurs TCF/LEF pour la liaison à β -caténine. En effet, ICAT se fixe au niveau des répétitions ARM 5 à 12 de β -caténine *via* un domaine N-terminal en hélices α et un domaine C-terminal formant une structure comparable à un feuillet β , empêchant ainsi la liaison des facteurs TCF/LEF qui eux se fixent au niveau des répétitions ARM 3 à 10. Les acides aminés de ICAT impliqués dans l'interaction avec β -caténine n'ont jusqu'à ce jour été prédits que *via* des analyses informatiques.

Cette étude avait pour but de déterminer quels sont les acides aminés de ICAT essentiels à son interaction avec β -caténine et de rechercher si ICAT est capable de moduler l'expression de différents gènes cibles de β -caténine tels que *M-MITF* et *NEDD9*. Dans ce but, nous avons immunoprécipité la protéine β -caténine avec la protéine ICAT-WT ou mutante afin de déterminer quels acides aminés étaient essentiels à l'interaction entre ICAT et β -caténine. Nous avons également mesuré l'activité luciférase associée aux promoteurs *M-MITF* et *NEDD9* en présence de la protéine ICAT-WT ou mutante, dans des mélanocytes murins en culture et dans des cellules de mélanome.

2. Résultats

Les résultats obtenus jusqu'à présent seront présentés sous la forme d'un article (Article 2). Cependant, des expériences complémentaires sont nécessaires pour compléter cette étude. Ces expériences sont actuellement en cours.

*Article 2
ICAT N-Terminal domain is
essential for the negative
regulation of β -catenin-mediated
transcriptional activity*

ICAT N-terminal domain is essential for the negative regulation of β-catenin-mediated transcriptional activity

Mélanie Domingues^{1,2,3}, Laura Papon^{1,2,3}, Lionel Larue^{1,2,3}, Jacky Bonaventure^{1,2,3}

Authors affiliations: ¹Institut Curie, Normal and Pathological Development of Melanocytes, Orsay, France, ²CNRS UMR3347, Orsay, France, ³INSERM U1021, Orsay, France.

Abstract

ICAT (Inhibitor of β-catenin and TCF) is a small acidic protein of 81 amino acids that negatively regulates β-catenin co-transcriptional activity by competing with TCF/LEF factors for binding to armadillo repeats of β-catenin. Competition between LEF/TCF and ICAT would occur through the overlapping β-catenin region encompassing Arm repeats 5-7. Site directed mutagenesis was used to introduce point mutations in the sequence of the carboxy and amino terminal regions of ICAT. Residues D66, F71 and E75 located in the carboxy terminal domain appeared to be critical for competition with LEF1. However, their substitution does not prevent the formation of a stable ICAT/β-catenin protein complex, whereas residues Y15, K19 and V22 in the amino terminal domain proved to be essential for stable interaction with β-catenin. These results indicate that ICAT anchors to β-catenin through its N-terminal end and mediates competition with LEF1 through its C-terminal end.

Introduction

The multifunctional protein β-catenin is a key regulator of the canonical Wnt signaling pathway involved in multiple normal and pathological biological phenomena (Clevers and Nusse, 2012; Mosimann et al., 2009). The central core region of this 781 amino-acid protein is composed of 12 Armadillo (Arm) repeats forming a positively charged groove involved in the binding of many β-catenin partners including the two transcriptional inhibitors Chibby and ICAT (Graham et al., 2002; Huber et al., 1997; Takemaru et al., 2003; Takemaru et al., 2008). ICAT (Inhibitor of β-catenin and

TCF) has been identified through a two-hybrid screen using β-catenin core domain as bait (Tago et al., 2000). The highly conserved CTNNBIP1 gene (Sato et al., 2004) encodes this 81 amino-acid protein, only present in vertebrates where it is ubiquitously expressed during development. At the cellular level, ICAT localizes mostly in the cytoplasm but also in the nucleus of normal and cancer cells (Domingues et al., 2014; Gottardi and Gumbiner, 2004). In the nuclear compartment, ICAT is able to compete with members of the TCF/LEF family for binding to β-catenin, thus negatively regulating its co-transcriptional activity (Tutter et al., 2001). Crystallographic analyses of ICAT in complex with β-catenin have shown that the two proteins interact in an anti parallel orientation. Two main regions in this small acidic protein have been identified (Daniels and Weis, 2002; Graham et al., 2002). The N-terminal part is made up of a bundle of three α helices with helix 1 (H1) directly interacting with Arm repeats 10-12 of β-catenin. The intrinsically unstructured C-terminal part adopts a β-sheet like structure when bound to the positively charged groove formed by Arm repeats 5-8 of β-catenin (Daniels and Weis, 2002; Graham et al., 2002). The consensus peptide DXθθΦX₂₋₇E, where θ is an aliphatic hydrophobic amino acid and Φ is an aromatic residue (mainly Phenylalanine), has been identified in several β-catenin ligands including ICAT (Graham et al., 2002). Slight variations in this consensus sequence would account for differences in ligand binding affinities (Choi et al., 2006), although the exact contribution of residues D, Φ and E in conferring binding energy to the groove is still elusive. In TCF4 (now referred to as TCF7L2), conflicting results on the importance of residue F21 have been reported, and residue E24 was found to be dispensable for binding to the K312 charged residue of β-catenin (Fasolini et al., 2003; Gail et al., 2005).

The Wnt/β-catenin signaling pathway is frequently altered in diverse cancers (Clevers and Nusse, 2012). Given its physiological function as an inhibitor of the β-catenin-LEF/TCF transcriptional complex, ICAT or synthetic peptide mimics could emerge as putative therapeutic agents in colorectal or hepatocellular cancer cells in which β-catenin is constitutively activated (Anastas and Moon, 2013). In this context, further investigating the three dimensional structure of the ICAT/β-catenin complex seems to be crucial for the development of such agents. In order to better understand and validate predictions from the ICAT/β-catenin crystal structure, ICAT mutants were generated by creating point mutations in the two main domains of the protein. Analysis of their interaction with β-catenin and their consequences on the transcriptional activity of M-MITF and NEDD9, two direct targets of the Wnt/β-catenin pathway (Li et al., 2011) indicate that residues Y15, K19 and V22 in ICAT helix H1 are critical for the interaction with β-catenin, whereas residues located in the consensus sequence of the C-terminal end are important for competition with LEF1 but do not abolish ICAT/β-catenin interaction.

Materials and Methods

Cell culture

The human melanoma cell lines Lu1205 and Mel501, obtained respectively from Dr M. Herlyn (Wistar Institute, Philadelphia, PA, USA) and C. Goding (Ludwig Institute, Oxford UK) were maintained in RPMI 1640 medium (Gibco) supplemented with 10% foetal bovine serum (Sigma), 5 mM L-glutamine, 100 U/mL penicillin and 100µg/mL streptomycin. Immortal mouse melanocytes Melan-a were kindly provided by Dr D. Bennett (St. George's, University, London, UK). They were grown in F12 medium supplemented with 10% FBS, antibiotics and 100 nM TPA (tetradecanoyl phorbol acetate). All cells were grown at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% carbon dioxide.

Plasmids, cDNA constructs and mutagenesis

The human ICAT cDNA (243bp) cloned in the pFLAG-CMV2 vector was kindly provided by Dr. C. Gottardi (University of Chicago IL, USA). This vector is referred to as CMV::ICAT WT in the manuscript. A triple mutant form of ICAT in helix 1 (ICAT-DQE mutant) derived from the ICAT-Flag vector was created with primers shown in Table S1. The forward primer LL1806 containing three nucleotide changes (shown in red) when compared to the wild-type sequence was coupled with the reverse primer LL1521. A 186 bp PCR fragment was generated and then restriction digested with BspEI and BlnI. This 128 bp sub-fragment was exchanged with the equivalent wild-type fragment isolated from the CMV::ICAT WT vector. Single (D66G, F71A, E75V), double (D66G, E75V = GV; F71A, E75V = AV and D66G, F71A = GA) and triple (D66G, F71A, E75V = GAV) mutants of ICAT C-terminal domain were created using the Quick-Change Site Directed Mutagenesis kit (Stratagene) and primers listed in Table S1. The HA tagged CMV::β-catenin-NLS expression vector was used for overexpression of β-catenin in the nucleus (Gallagher et al., 2012). Mutants of the HA tagged CMV::β-catenin-NLS vector (K312E, K435E, R386G, F660S) were also created by site directed mutagenesis using primers listed in Table S1. All constructs were sequenced to validate presence of the different mutations. The M-MITF::Luc promoter (#727) was a gift from Dr C. Goding (Ludwig Institute, Oxford UK). The NEDD9::Luc promoter (#1034) was a gift from Dr W. Liu (Fox Chase Cancer Center, Philadelphia PA, USA).

Production of recombinant wild-type and mutant GST-ICAT proteins in E. coli

The human ICAT cDNA in the bacterial expression vector pGEX-4T3 was kindly provided by C. Gottardi (USA). The mutant ICAT-DQE, ICAT-GV, ICAT-AV, ICAT-GA and ICAT- GAV

cDNAs were subcloned in the pGEX-4T3 vector then used to transform *E.coli* BL21 competent cells (Stratagene). Transformants were grown at 37°C for 2-3 hr to an OD₆₀₀ of 0.6-0.8 and induced with 0.5 mM IPTG at 37°C for 3-4 hr. The bacterial cultures were centrifuged and the cell pellets sonicated. Bacterial lysates were incubated with glutathione Sepharose 4B beads (GE Healthcare) overnight at 4°C. The beads were washed twice with 1X PBS, 0.3M NaCl, Triton 0.1%, protease inhibitors, twice with the same buffer containing 0.15M NaCl, and once with 1X PBS, Triton 0.1%. After re-suspension in one volume of 1X PBS, aliquots were analyzed on polyacrylamide gels and stained with Coomassie blue.

Western blotting and affinity precipitation

For total cell lysates preparation confluent cells were scraped in the presence of RIPA supplemented with protease inhibitors (Complete, Roche) and phosphatase inhibitor tablets (Phostop, Roche). Lysates were centrifuged at 15,000g for 30 min at 4°C. Total protein concentrations in cell lysates were determined. Aliquots of 50 μ g of total proteins were resolved by SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose membranes (Protran, Whatman, Germany) and probed with indicated antibodies. For affinity precipitation, total cell lysates in RIPA (500 μ g of total proteins) were incubated for 3 hr at 4°C with 20-30 μ L of a 50% suspension of WT GST-ICAT or mutants GST-ICAT coupled to glutathione-Sepharose 4B beads. Affinity precipitated proteins were washed five times and subjected to SDS-PAGE and immuno-blotting analysis.

Antibodies

Rabbit polyclonal antibody raised against a synthetic ICAT peptide was used for WB as described (Domingues et al., 2014). Mouse monoclonal antibodies against human ICAT (clone 5C6), anti Flag M2 and anti β -actin (clone AC-15) were obtained from Sigma-Aldrich. Rabbit polyclonal antibody raised against β -catenin was from Abcam. The anti-LEF1 monoclonal antibody (clone 2D12) was obtained from Upstate Cell Signaling.

Transfections and Dual luciferase assays

Lipofectamine 2000 was used to transfect Melan-a, Lu1205 and Mel501 cells with the *M-MITF* or *NEDD9* promoters cloned in the pGL3 Basic Firefly Luciferase reporter vector (Promega, Madison WI). Expression vectors for LEF1, β -catenin (WT and mutants) and ICAT (WT and mutants) were also transfected together with the *M-MITF* or the *NEDD9* promoters. The pRL-TK *Renilla* luciferase reporter construct was used as an internal control for transfection efficiency. Forty-

eight hr post-transfection, cells were lysed with passive lysis buffer and luciferase activities (*Firefly* and *Renilla*) were measured using the Dual Luciferase reporter Assay (Promega) in a TriStar luminometer (Berthold, Germany). *Firefly* luciferase activity was normalized to *Renilla* luciferase activity.

Statistical analysis

Prism6 software (GraphPad, La Jolla, CA) was used for statistical analyses. Luciferase activity differences were assessed using two-way analysis of variance (ANOVA) test followed by Tukey's post-test.

Results

ICAT negatively regulates the M-MITF promoter in melanoma cells in a dose-dependent manner by competing with LEF1 to bind nuclear β -catenin

Among the many targets of β -catenin in melanoma cells, the transcriptional factor M-MITF known to play a key role in melanocyte differentiation and in melanoma formation (Levy et al., 2006; Selzer et al., 2002) was chosen to evaluate the effect of ICAT on the co-transcriptional activity of β -catenin. The effect of ICAT was evaluated in an immortalized mouse melanocyte cell line (Melan-a) and in two melanoma cell lines (Mel501 and Lu1205). These three cell lines express β -catenin at variable levels. In Melan-a cells, β -catenin is localized in the cytoplasm and at the cell membrane. In Mel501 cells, β -catenin is abundant and visible both in the cytoplasm and in the nucleus, whereas in Lu1205 β -catenin is less abundant and localized mostly at the cell membrane (Domingues et al., 2014). Melan-a and Mel501 highly express M-MITF while in Lu1205 cells, barely detectable levels of M-MITF are found.

Co-transfection of Mel501 cells with the M-MITF::luc promoter and increasing amounts of the CMV::ICAT vector, showed a dose-dependent negative effect of ICAT on the luciferase activity (Figure S1A). Based on this result, a dose of 250 ng of CMV::ICAT plasmid was used in further experiments. In colon cancer cells, ICAT has been originally reported to compete with TCF7L2 for binding to β -catenin (Tago et al., 2000). Through RT-qPCR evaluation of TCF7L2 and LEF1 expression in Mel501 and Lu1205 cells, TCF7L2 was found to be almost undetectable while LEF1 was much more abundant (Figure S1B). Competition between ICAT and LEF1 for binding to β -catenin was then tested by co-transfecting Mel501 cells with CMV::ICAT and CMV::LEF1 vectors. LEF1 overexpression greatly increased luciferase activity of the M-MITF promoter. This stimulating

effect was almost abrogated in the presence of exogenous ICAT (Figure 1A). To validate the co-transcriptional role of β-catenin in activating the M-MITF promoter, we used Melan-a cells. The basic luciferase activity of the M-MITF promoter in these cells was increased in the presence of a β-catenin-NLS vector targeting ectopic β-catenin to the nucleus. As expected, ICAT overexpression abrogated this effect in presence or in absence of exogenous LEF1 (Figure 1B).

Creation of ICAT and β-catenin mutants

So far, β-catenin is the only reported protein known to interact directly with ICAT (Tago et al., 2000). However, ICAT may also bind with high affinity to other proteins. To identify putative additional partners, a yeast two-hybrid screen using human ICAT as bait was performed with a human melanocyte cDNA library. Although various putative partners were detected at a low frequency by sequencing of prey clones, most of the positive clones (80%) corresponded to CTNNB1/β-catenin cDNAs (Table S2), clearly identifying β-catenin as the main ICAT-interacting protein in melanocytes.

Based on the crystal structure of the ICAT/β-catenin complex (Daniels and Weis, 2002; Graham et al., 2002), we identified six ICAT residues that may be critical for the formation and/or stabilization of this complex. Three of them, Tyrosine 15 (Y15), Lysine 19 (K19) and Valine 22 (V22) are located in helix H1 of the N-terminal domain and predicted to establish hydrophobic interactions with Phenylalanine 660 (F660) of β-catenin (Figure 2A). In order to assess the importance of these residues, we performed site directed mutagenesis, converting Tyrosine 15 into Aspartic acid (Y15D), Lysine 19 into Glutamine (K19Q) and Valine 22 into Glutamic acid (V22E). We also converted β-catenin residue Phenylalanine 660 into Serine (F660S) (Figure 2B).

The three other ICAT residues, Aspartic acid 66 (D66), Phenylalanine 71 (F71) and Glutamic acid 75 (E75), are located in the C-terminal domain of ICAT and belong to the consensus sequence identified in different β-catenin ligands. They are predicted to interact, respectively, with Lysine 435 (K435), Arginine 386 (R386) and Lysine 312 (K312) of β-catenin (Figure 2A). To determine if ICAT C-terminal domain competes with TCF/LEF transcription factors by blocking their interaction with β-catenin, we generated different ICAT mutants harboring single, double or triple amino-acid substitutions (Figure 2B). The Aspartic acid 66 was changed into Glycine (D66G), the Phenylalanine 71 into Alanine (F71A) and the Glutamic acid 75 into valine (E75V). β-catenin residues were also mutated, changing Lysine 435 into Glutamic acid (K435E), Arginine 386 into Glycine (R386G) and Lysine 312 into Glutamic acid (K312E).

The triple ICAT DQE mutant fails to bind β -catenin and to inhibit reporter activity

To assess whether the three ICAT residues located in the N-terminal domain were required for ICAT binding to β -catenin we transfected Mel501 cells with WT and mutant (DQE) ICAT vectors and performed an immunoprecipitation assay using an anti Flag antibody. As expected, exogenous ICAT-WT protein bound efficiently to endogenous β -catenin present in Mel501 cell lysates while ICAT-DQE mutant failed to interact with β -catenin, thus behaving as a loss of function mutant (Figure 3A). Similar results were obtained with WT and mutant ICAT-GST beads (Figure S2A). In a reporter luciferase assay using the M-MITF promoter, ectopic expression of ICAT-DQE failed to reduce M-MITF luciferase activity both in Mel501 and Melan-a cells (Figure 3B). To verify that these results were not M-MITF-specific, we performed the same experiment using a NEDD9 promoter. Luciferase activity of the NEDD9 promoter harboring four LEF/TCF binding sites was markedly reduced ($\approx 60\%$) in the presence of ICAT-WT whereas the ICAT-DQE mutant had no such effect. These results confirm the absence of competition between LEF1 and ICAT-DQE for the binding to β -catenin (Figure S2B).

In order to validate these results, we performed the similar experiments using β -catenin F660S mutant predicted to interact hydrophobically with the three ICAT residues mentioned above. In an immunoprecipitation assay, we observed that the ability of β -catenin F660S mutant to bind to ICAT was also completely abolished (Figure 3C). However, in contrast to what we observed with ICAT-DQE mutant, β -catenin F660S mutant had no effect on M-MITF promoter activity in Melan-a cells or on NEDD9 promoter activity in Lu1205 cells (Figure 3D) even when ectopic LEF1 was present (Figure S2C). We conclude that residue F660 is critical for ICAT anchoring to β -catenin but not involved in LEF1/ β -catenin interaction.

Effects of ICAT C-terminal domain mutants on the binding to β -catenin and on NEDD9 promoter activity

To test whether the three ICAT residues located in the C-terminal domain were required for binding to β -catenin and/or inhibition of β -catenin co-transcriptional activity, immunoprecipitation, GST pull down and luciferase assays were performed using single, double or triple ICAT mutants. ICAT-Flag immunoprecipitation indicated that the ability of ICAT-AV, ICAT-GA and ICAT-GAV mutants to bind endogenous β -catenin in Mel501 cell lysates was decreased when compared to WT (Figure 4A). This was confirmed by affinity precipitation of WT ICAT-GST and mutant ICAT-GST beads incubated with cell lysates isolated from Mel501 and Lu1205 cells. By contrast, double mutant ICAT-GV bound β -catenin as efficiently as ICAT-WT (Figure S3A). The luciferase reporter assay was used to assess the effect of these ICAT mutants on NEDD9 promoter activity. Surprisingly, we

only observed an absence of effect on the luciferase activity with the ICAT-GV and ICAT-AV mutants. The other mutants behave similarly to the ICAT-WT constructs, significantly decreasing the NEDD9 promoter activity (Figure 4B). In presence of exogenous LEF1, only ICAT-AV mutant had no effect on the luciferase activity (Figure S3B).

β -catenin point mutations affecting conserved residues predicted to interact with residues from the consensus sequence present in LEF1 and ICAT were generated, and their effect on NEDD9 promoter activity were studied by luciferase assay. As expected, β -catenin-WT construct significantly increased NEDD9 promoter activity whereas mutant β -catenin-K312E had no significant effect. By contrast, mutant β -catenin-K435E and R386G were as efficient as WT (Figure 5A). In presence of exogenous LEF1, both β -catenin-K312E and K435E mutants had no effect on NEDD9 promoter luciferase activity (Figure 5B). This suggests that the charged residues K312 and K435 are essential for the co-transcriptional activity of β -catenin through electrostatic binding to LEF/TCF transcription factors.

Discussion

Owing to the critical role of nuclear β -catenin in the canonical Wnt signaling pathway through co-transcriptional regulation of numerous target genes, it is not surprising that a growing list of positive and negative regulators has been identified, since appropriate Wnt/ β -catenin signaling may rely on a subtle balance between these factors (Jung et al., 2013; Mosimann et al., 2009; Yang et al., 2012). ICAT is one of the β -catenin negative regulators. It can compete with TCF/LEF factors through its C-terminal end (Daniels and Weis, 2002).

In this study we observed that ICAT overexpression in melanocyte and melanoma cell lines decreases M-MITF and NEDD9 promoter-associated luciferase activity both in the absence and presence of ectopic LEF1, showing that in these cells ICAT competes with LEF1 for binding to β -catenin. Our results support data from two previous crystallographic studies predicting that ICAT binds to the same β -catenin Arm repeats (5-7) as LEF/TCF transcription factors (Daniels and Weis, 2002; Graham et al., 2002). Mutation of three ICAT residues in helix 1 of the N-terminal domain (ICAT-DQE mutant) predicted to form a hydrophobic patch with β -catenin F600 disrupted ICAT- β -catenin interaction in an affinity precipitation assay. Likewise, ectopic expression of the ICAT-DQE mutant failed to reduce the M-MITF and NEDD9 promoter luciferase activities, indicating that this mutant is unable to compete with LEF/TCF transcription factors. Importantly, β -catenin mutant

F600S failed to interact with ICAT but had no effect on M-MITF and NEDD9 promoter activities, confirming that F600 is only involved in the interaction with ICAT but not with LEF/TCF factors.

Based on the crystal structure, three conserved ICAT residues (D66, F71, E75) in the C-terminal domain were also predicted to be involved in the interaction with β-catenin. Single (D66G, F71A, E75V), double (GV, AV, GA) or triple (GAV) mutations of these residues had variable effects on the binding to β-catenin and on the reporter genes luciferase activities. Only AV, GA and GAV-ICAT mutants bound to β-catenin with a lower affinity than WT in an immunoprecipitation assay. Unexpectedly, only the GV and AV mutants failed to reduce the luciferase activity of the NEDD9 promoter. Further experiments are required to clarify this issue.

All together, our results in melanocyte and melanoma cells support the “anchor and kick off” model proposed by W. Xu team in 2002 (Graham et al., 2002). As predicted, ICAT when overexpressed would first anchor to β-catenin Arm repeats 10-12, through an hydrophobic interaction involving β-catenin residue F660 and ICAT residues Y15, K19 and V22. In a second step, the C-terminal domain of ICAT would expulse LEF1 from the groove formed by Arm repeats 5-7 and interact through negatively charged residues D66 and E75 with β-catenin positively charged residues K312 and K435. This electrostatic interaction would be strengthened through the hydrophobic bond between ICAT F71 and β-catenin R386.

Interestingly, the triplet of three glutamic residues E37-E39 present in ICAT helix 2 also actively participates in ICAT/β-catenin interaction as their conversion into alanine abolished ICAT negative regulatory function in colon cancer cells (Tago et al., 2000). Such mutation would impair formation of two hydrogen bonds with β-catenin residue R661 (Graham et al., 2002). It would be of interest to investigate if the same effect is observed in melanoma cells.

Aside from its competition with LEF/TCF transcription factors, ICAT is also predicted to prevent binding of the prominent histone acetyl transferases (HAT) CBP and p300 to β-catenin through its helical amino terminal domain (Daniels and Weis, 2002). Whether ICAT is also able to compete efficiently with other HAT known to bind β-catenin ARM repeats 11-12 and interfere with the cascade of events leading to chromatin remodeling required for turning on Wnt/β-catenin target genes, deserves further investigations.

References

- Anastas, J.N., and Moon, R.T. (2013). WNT signalling pathways as therapeutic targets in cancer. *Nat Rev Cancer* *13*, 11-26.
- Choi, H.J., Huber, A.H., and Weis, W.I. (2006). Thermodynamics of beta-catenin-ligand interactions: the roles of the N- and C-terminal tails in modulating binding affinity. *J Biol Chem* *281*, 1027-1038.
- Clevers, H., and Nusse, R. (2012). Wnt/beta-catenin signaling and disease. *Cell* *149*, 1192-1205.
- Daniels, D.L., and Weis, W.I. (2002). ICAT inhibits beta-catenin binding to Tcf/Lef-family transcription factors and the general coactivator p300 using independent structural modules. *Mol Cell* *10*, 573-584.
- Domingues, M.J., Rambow, F., Job, B., Papon, L., Liu, W., Larue, L., and Bonaventure, J. (2014). ICAT, Inhibitor of beta-catenin and TCF4, a new modulator of melanoma cells motility and invasiveness. *Cancer Res*.
- Fasolini, M., Wu, X., Flocco, M., Trosset, J.Y., Oppermann, U., and Knapp, S. (2003). Hot spots in Tcf4 for the interaction with beta-catenin. *J Biol Chem* *278*, 21092-21098.
- Gail, R., Frank, R., and Wittinghofer, A. (2005). Systematic peptide array-based delineation of the differential beta-catenin interaction with Tcf4, E-cadherin, and adenomatous polyposis coli. *J Biol Chem* *280*, 7107-7117.
- Gallagher, S.J., Rambow, F., Kumasaka, M., Champeval, D., Bellacosa, A., Delmas, V., and Larue, L. (2012). Beta-catenin inhibits melanocyte migration but induces melanoma metastasis. *Oncogene*.
- Gottardi, C.J., and Gumbiner, B.M. (2004). Role for ICAT in beta-catenin-dependent nuclear signaling and cadherin functions. *Am J Physiol Cell Physiol* *286*, C747-756.
- Graham, T.A., Clements, W.K., Kimelman, D., and Xu, W. (2002). The crystal structure of the beta-catenin/ICAT complex reveals the inhibitory mechanism of ICAT. *Mol Cell* *10*, 563-571.
- Huber, A.H., Nelson, W.J., and Weis, W.I. (1997). Three-dimensional structure of the armadillo repeat region of beta-catenin. *Cell* *90*, 871-882.
- Jung, H.Y., Jun, S., Lee, M., Kim, H.C., Wang, X., Ji, H., McCrea, P.D., and Park, J.I. (2013). PAF and EZH2 induce Wnt/beta-catenin signaling hyperactivation. *Mol Cell* *52*, 193-205.
- Levy, C., Khaled, M., and Fisher, D.E. (2006). MITF: master regulator of melanocyte development and melanoma oncogene. *Trends Mol Med* *12*, 406-414.
- Li, Y., Bavarva, J.H., Wang, Z., Guo, J., Qian, C., Thibodeau, S.N., Golemis, E.A., and Liu, W. (2011). HEF1, a novel target of Wnt signaling, promotes colonic cell migration and cancer progression. *Oncogene* *30*, 2633-2643.
- Mosimann, C., Hausmann, G., and Basler, K. (2009). Beta-catenin hits chromatin: regulation of Wnt target gene activation. *Nat Rev Mol Cell Biol* *10*, 276-286.
- Poy, F., Lepourcelet, M., Shivdasani, R.A., and Eck, M.J. (2001). Structure of a human Tcf4-beta-catenin complex. *Nat Struct Biol* *8*, 1053-1057.
- Satoh, K., Kasai, M., Ishida, T., Tago, K., Ohwada, S., Hasegawa, Y., Senda, T., Takada, S., Nada, S., Nakamura, T., *et al.* (2004). Anteriorization of neural fate by inhibitor of beta-catenin and T cell factor (ICAT), a negative regulator of Wnt signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* *101*, 8017-8021.
- Selzer, E., Wacheck, V., Lucas, T., Heere-Ress, E., Wu, M., Weilbaecher, K.N., Schlegel, W., Valent, P., Wrba, F., Pehamberger, H., *et al.* (2002). The melanocyte-specific isoform of the microphthalmia transcription factor affects the phenotype of human melanoma. *Cancer Res* *62*, 2098-2103.

Tago, K., Nakamura, T., Nishita, M., Hyodo, J., Nagai, S., Murata, Y., Adachi, S., Ohwada, S., Morishita, Y., Shibuya, H., *et al.* (2000). Inhibition of Wnt signaling by ICAT, a novel beta-catenin-interacting protein. *Genes Dev* *14*, 1741-1749.

Takemaru, K., Yamaguchi, S., Lee, Y.S., Zhang, Y., Carthew, R.W., and Moon, R.T. (2003). Chibby, a nuclear beta-catenin-associated antagonist of the Wnt/Wingless pathway. *Nature* *422*, 905-909.

Takemaru, K.I., Ohmitsu, M., and Li, F.Q. (2008). An oncogenic hub: beta-catenin as a molecular target for cancer therapeutics. *Handb Exp Pharmacol*, 261-284.

Tutter, A.V., Fryer, C.J., and Jones, K.A. (2001). Chromatin-specific regulation of LEF-1-beta-catenin transcription activation and inhibition in vitro. *Genes Dev* *15*, 3342-3354.

Xing, Y., Takemaru, K., Liu, J., Berndt, J.D., Zheng, J.J., Moon, R.T., and Xu, W. (2008). Crystal structure of a full-length beta-catenin. *Structure* *16*, 478-487.

Yang, P.T., Anastas, J.N., Toroni, R.A., Shinohara, M.M., Goodson, J.M., Bosserhoff, A.K., Chien, A.J., and Moon, R.T. (2012). WLS inhibits melanoma cell proliferation through the beta-catenin signalling pathway and induces spontaneous metastasis. *EMBO Mol Med* *4*, 1294-1307.

Figure Legends

Figure 1. ICAT negatively regulates the M-MITF promoter activity by competing with LEF1. (A) Mel501 cells were transiently transfected with a M-MITF::luciferase reporter. Mel501 cells were also transfected with LEF1 and ICAT-WT expression vectors. (B) Melan-a cells were transiently transfected with a M-MITF::luciferase reporter. Melan-a cells were also transfected with β -catenin, LEF1 and ICAT-WT expression vectors. Data are presented as means \pm SEM of three independent experiments. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, **** $p < 0.0001$, ns = not significant.

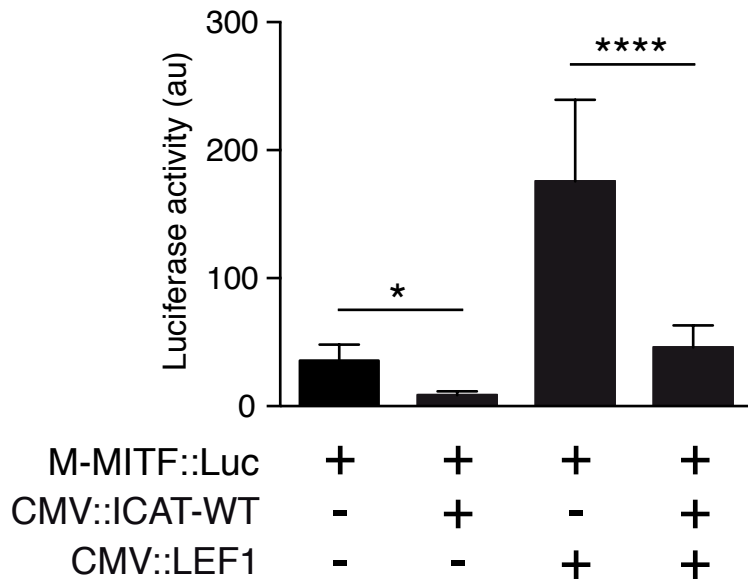
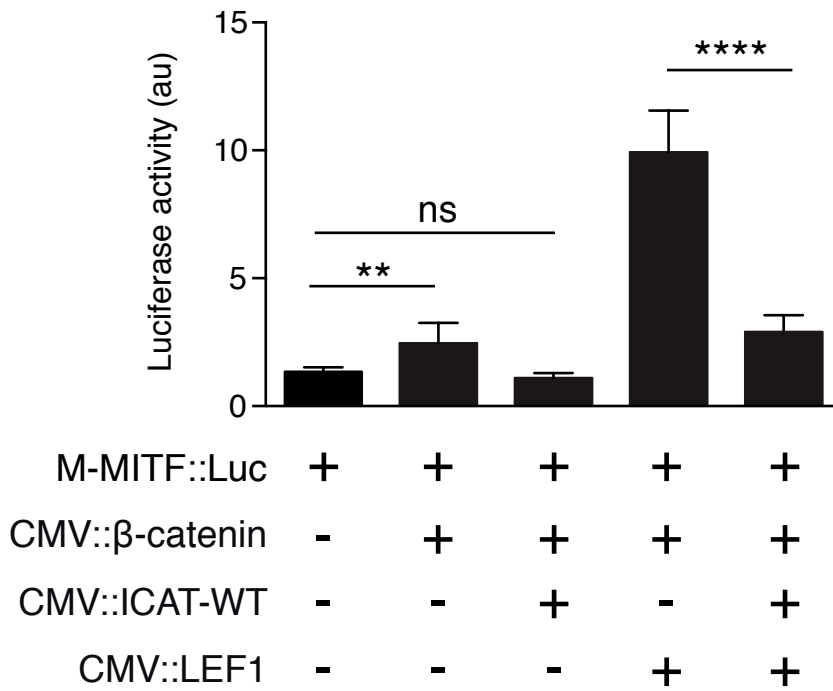
Figure 2. Schematic representation of ICAT and LEF1 bound to the core of β -catenin in an anti-parallel orientation. (A) Model for the interaction between ICAT and β -catenin or LEF1 and β -catenin based on structural data (Daniels and Weis, 2002; Graham et al., 2002; Poy et al., 2001). The 781 aa β -catenin protein comprises a central region made of 12 armadillo (ARM) repeats (in blue) and an additional helical domain (in red) termed helix C that docks to the 12th arm repeat (Xing et al., 2008). The N-terminal domain (NTD) and the C-terminal domain (CTD) are unstructured. Members of the TCF/LEF family and ICAT bind to β -catenin in an anti-parallel orientation. The amino terminal domain of ICAT comprises 3 helices (residues 5-58) denoted H1, H2 and H3 that bind to ARM repeats 10-12. β -catenin lysine residues K312 and K435 predicted to form electrostatic interactions with LEF1 acidic residues D21 and E29 are shown as blue arrow heads. Arginine 386 of β -catenin putatively involved in a hydrophobic interaction with residue F26 of LEF1 is shown as blue arrow head. ICAT and LEF1 residues putatively involved in electrostatic interactions (dotted black lines) or hydrophobic interactions (dotted green lines) with β -catenin residues K312, K435, R386 and F660 are shown respectively as purple and orange arrow heads. (B) List of ICAT and β -catenin mutants created by site directed-mutagenesis.

Figure 3. Effect of ICAT N-terminal domain mutant on the binding to β -catenin and on M-MITF and NEDD9 promoter activity. (A) Representative Total Cell Lysate extract (TCL) and immunoprecipitation analysis of endogenous β -catenin by overexpressed ICAT-WT or ICAT-DQE in Mel501 cells using an anti Flag antibody. (B) Melan-a and Mel501 cells were transiently transfected with a M-MITF::luciferase reporter. These cells were also transfected with β -catenin (only Melan-a), ICAT-WT or ICAT-DQE expression vectors. (C) Representative Total Cell Lysate extract (TCL) and pull-down analysis of β -catenin and β -catenin-F660S by ICAT-GST protein in Lu1205 cells. HA-epitope tag was used to reveal exogenous β -catenin. In the β -catenin panel, the upper band corresponds to the exogenous β -catenin and the lower band to the endogenous β -catenin.

(D) Melan-a cells were transiently transfected with a M-MITF::Luciferase reporter and Lu1205 cells with a NEDD9::luciferase reporter. These cells were also transfected with β -catenin or β -catenin-F660S expression vectors. Data are presented as means \pm SEM of three independent experiments. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, ns = not significant.

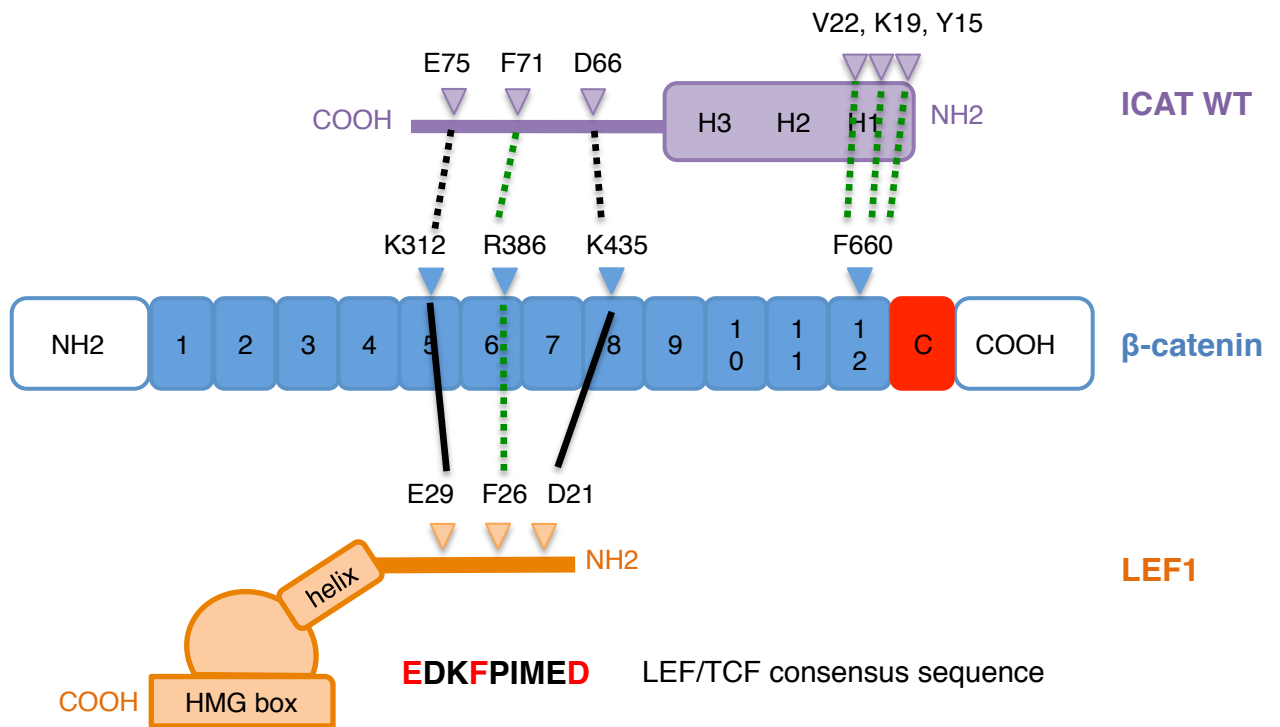
Figure 4. Effect of ICAT mutations affecting the C-terminal domain on the binding to β -catenin and NEDD9 promoter activity. . (A) Representative Total Cell Lysate (TCL) and immunoprecipitation of β -catenin by overexpressed ICAT-WT or ICAT mutants in Mel501 cells using an anti Flag antibody. (B) Mel501 cells were transiently co-transfected with a NEDD9::luciferase reporter construct and ICAT-WT, ICAT-D66G, ICAT-E75V, ICAT-GV, ICAT-F71A, ICAT-AV, ICAT-GA or ICAT-GAV expression vectors. Data are presented as means \pm SEM of three independent experiments. Presented p-values are compared to NEDD9::Luc. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, ns = not significant.

Figure 5. Effect of β -catenin mutants on NEDD9 promoter activity. (A) Lu1205 cells were transiently transfected with a NEDD9::luciferase reporter. Lu1205 cells were also transfected with β -catenin, β -catenin-K321E, β -catenin-K435E or β -catenin-R386G expression vectors. (B) Lu1205 cells were transiently transfected with a NEDD9::luciferase reporter in presence of LEF1. Lu1205 cells were also transfected with β -catenin, β -catenin-K321E, β -catenin-K435E or β -catenin-R386G expression vectors. Data are presented as means \pm SEM of three independent experiments. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, ns = not significant.

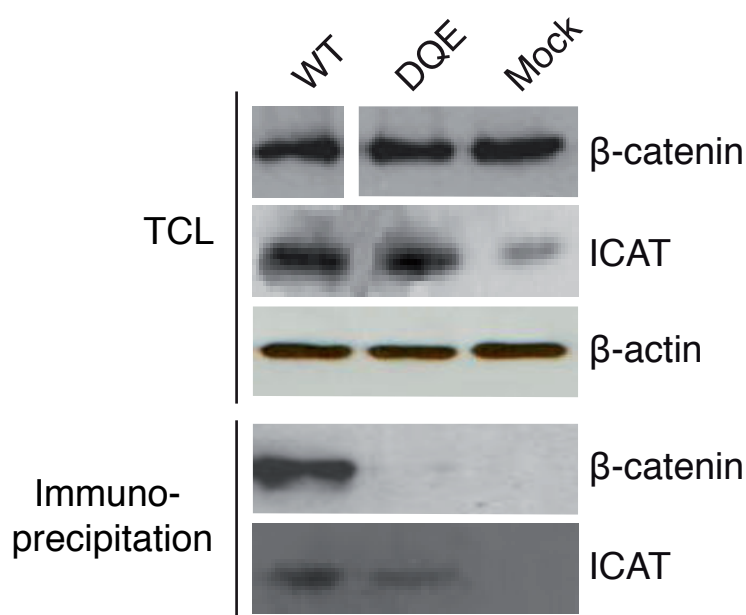
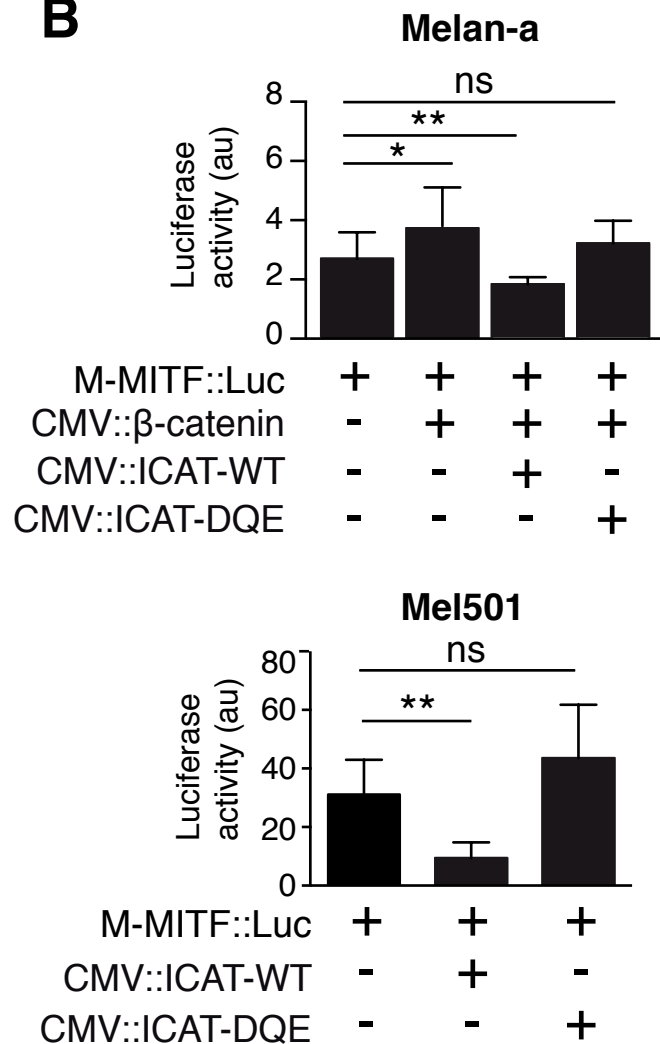
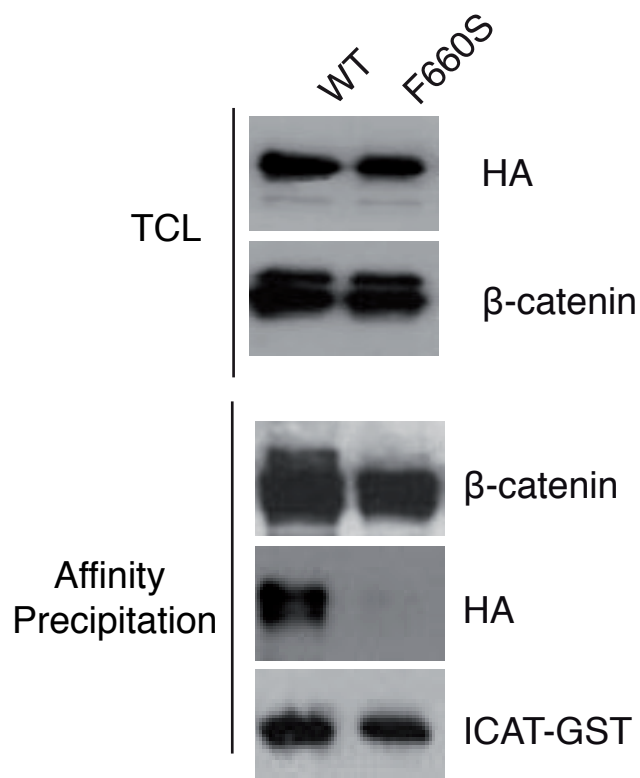
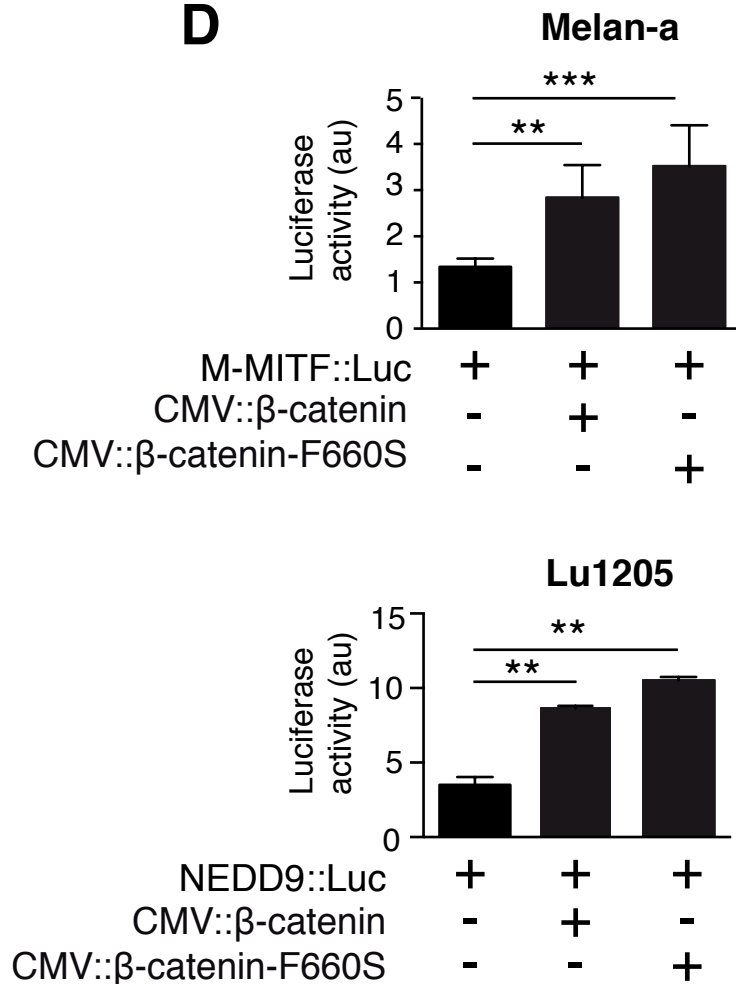
A**Mel501****B****Melan-a**

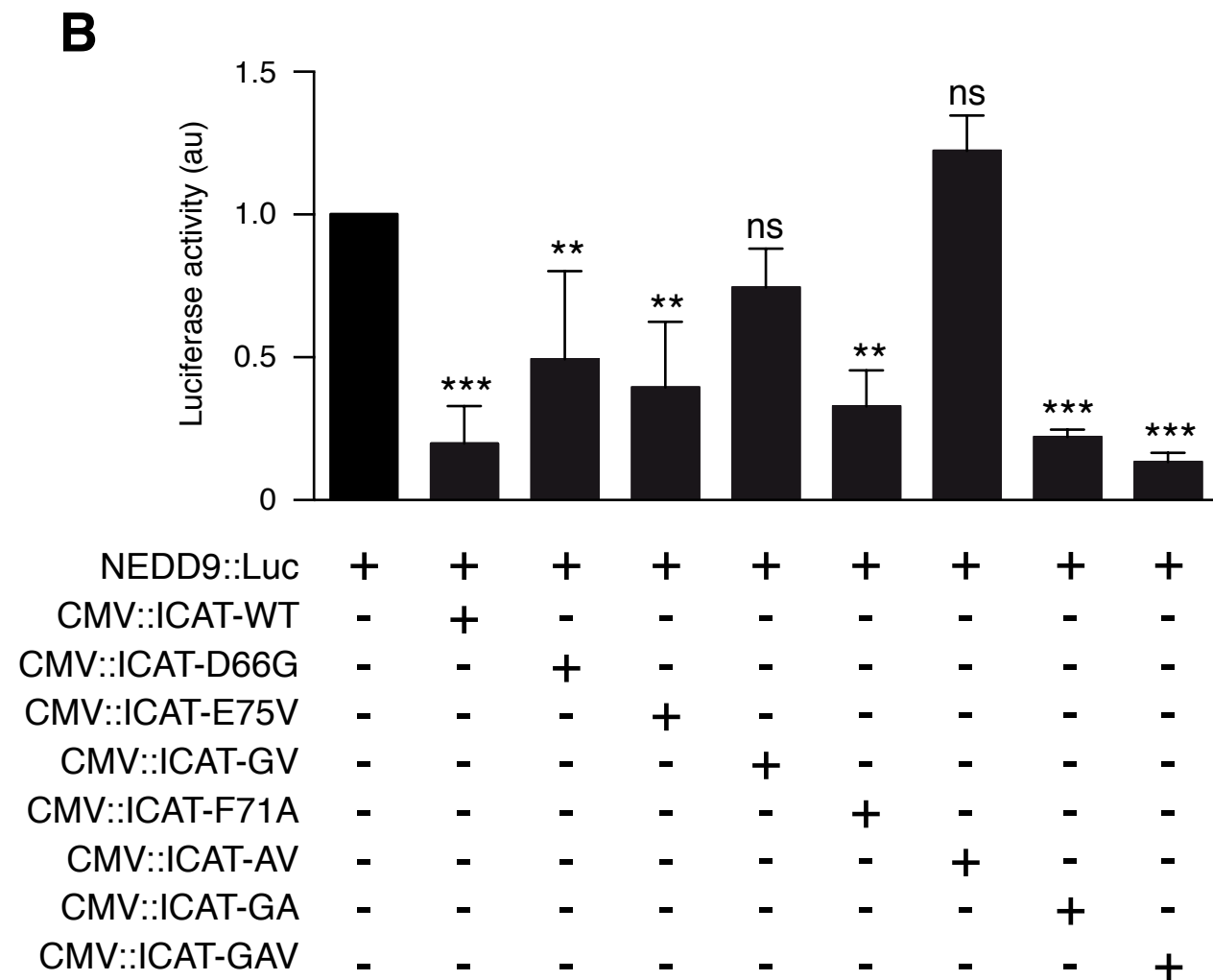
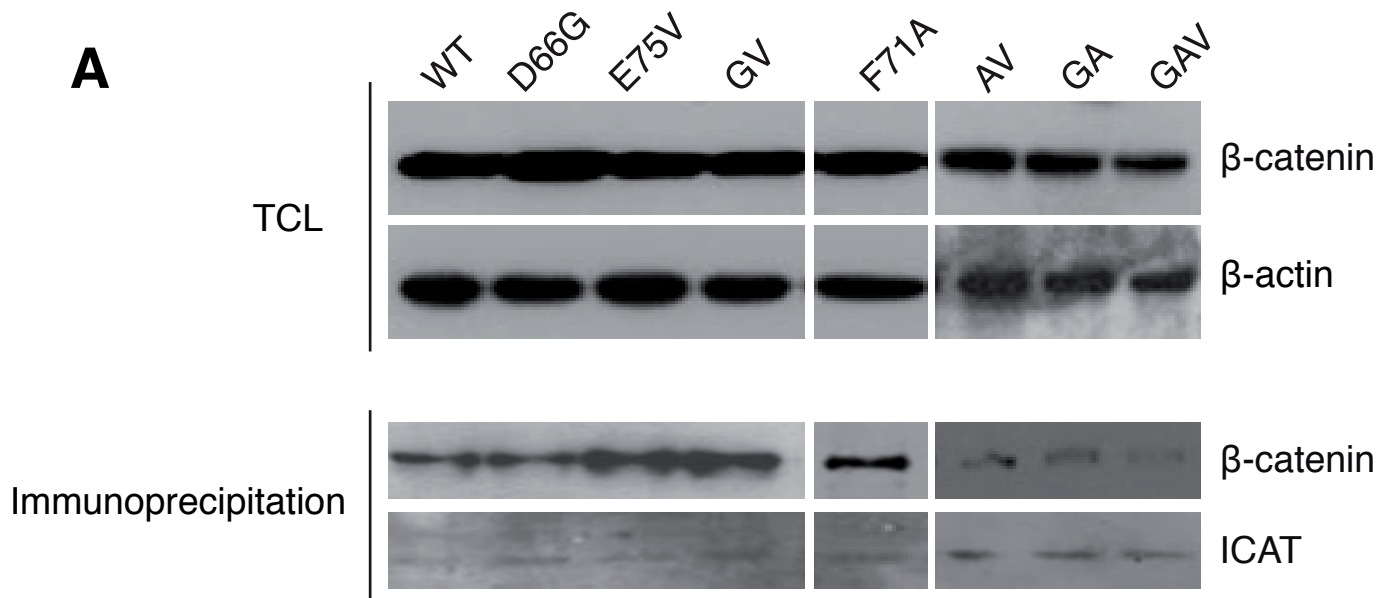
A

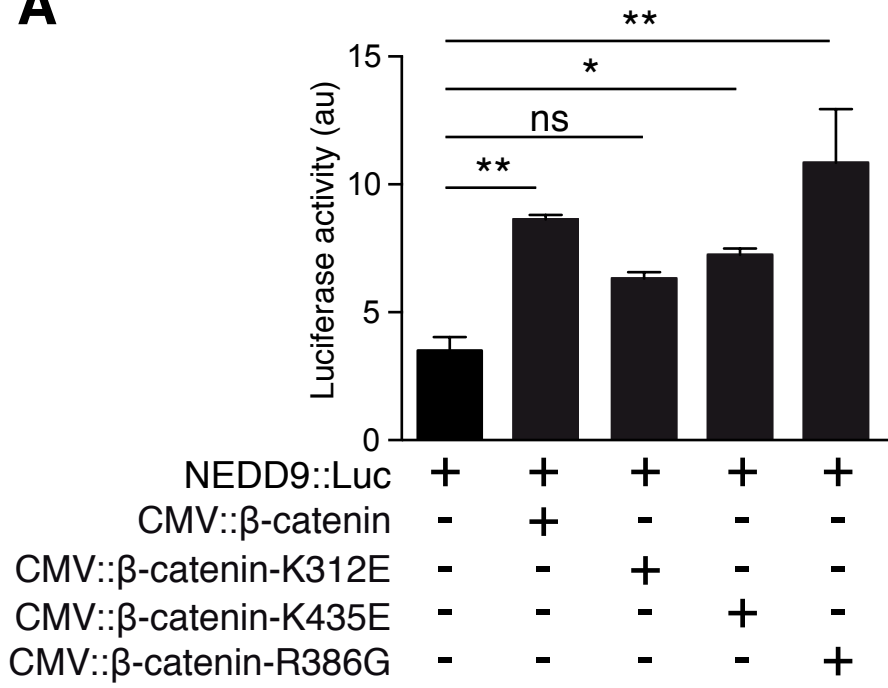
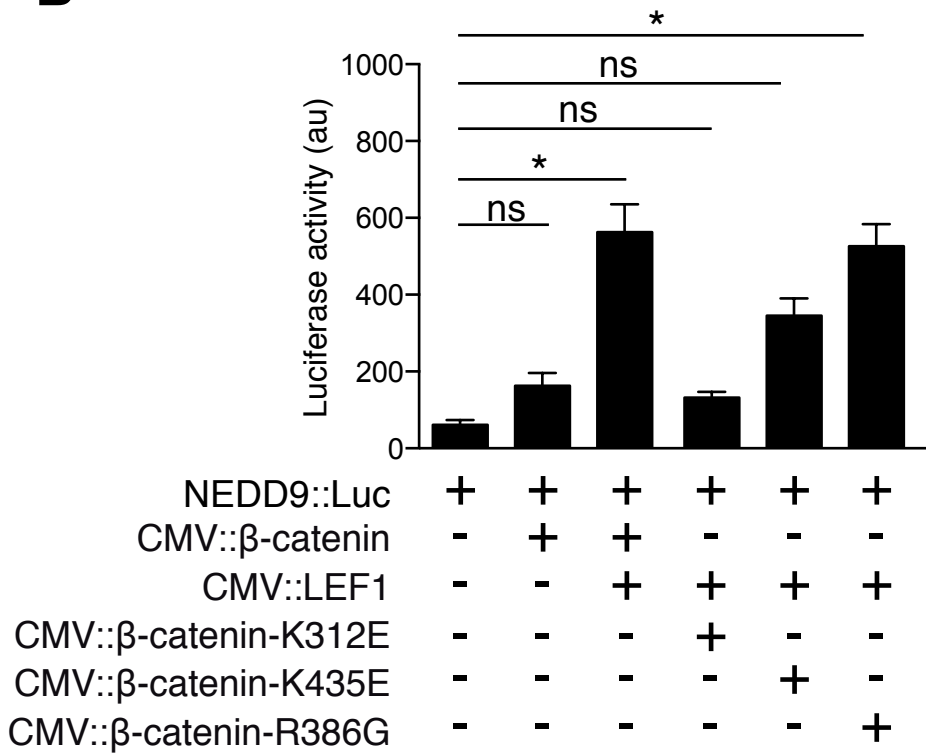
ICAT consensus sequence

ESRSFAMVVD**B**

Gene/Protein	Mutation
CTNNBIP1/ICAT	Y15E+K19Q+V22D (DQE)
CTNNBIP1/ICAT	D66G
CTNNBIP1/ICAT	F71A
CTNNBIP1/ICAT	E75V
CTNNBIP1/ICAT	D66G+F71A (GA)
CTNNBIP1/ICAT	D66G+E75V (GV)
CTNNBIP1/ICAT	F71A+E75V (AV)
CTNNBIP1/ICAT	D66G+F71A+E75V (GAV)
CTNNB1/ β -catenin	F660S
CTNNB1/ β -catenin	K312E
CTNNB1/ β -catenin	K435E
CTNNB1/ β -catenin	R386G

A**B****C****D**



A**B**

ICAT N-Terminal domain is essential for the inhibitory mechanism of ICAT - Supplementary Information

Mélanie J. Domingues, Laura Papon, Lionel Larue, Jacky Bonaventure

Supplementary Table S1: Primers used to create the different mutants.

Gene	Primer name	Mutation name	Sequence 5'-3'
ICAT	LL1806	DQE	AAG AGT CCG GAG GAG ATG GAC ATT CAG CAG CAG GTC CGA GAG
	LL1521		CGC CAT CAC CAC GCC CTC TGC ACC CTG G
ICAT	LL1520	D66G	C CAG GGT GCA GAG GGC GTG GTG ATG GCG
	LL1521		CGC CAT CAC CAC GCC CTC TGC ACC CTG G
ICAT	LL1924	F71A	GAC GTG GTG ATG GCG GCT TCC AGG TCG GAG ACG
	LL1925		CGT CTC CGA CCT GGA AGC CGC CAT CAC CAC GTC
ICAT	LL1522	E75V	G TTT TCC AGG TCG GTG ACG GAA GAC CGG AG
	LL1523		CTC CGG TCT TCC GTC ACC GAC CTG GAA AAC
ICAT	LL1520	GV	CCA GGG TGCA GAG GGC GTG GTG ATG GCG
	LL1521		CGC CAT CAC CAC GCC CTC TGC ACC CTG G
ICAT	LL1520	GA	CCA GGG TGCA GAG GGC GTG GTG ATG GCG
	LL1521		CGC CAT CAC CAC GCC CTC TGC ACC CTG G
ICAT	LL2214	AV	G GTG ATG GCG GCT TCC AGG TCG GTG ACG GAA GAC CGG
	LL2215		CCG GTC TTC CGT CAC CGA CCT GGA AGC CGC CAT CAC C
ICAT	LL1522	GAV (with plasmid ICAT- GA)	G TTT TCC AGG TCG GTG ACG GAA GAC CGG AG
	LL1523		CTC CGG TCT TCC GTC ACC GAC CTG GAA AAC
β -catenin	LL1913	K312E	GC AAC CAA GAA AGC GAG CTC ATC ATA CTG G
	LL1914		CCA GTA TGA TGA GCT CGC TTT CTT GGT TGC
β -catenin	LL1915	K435E	GC AAT AAT TAT AAG AAC GAG ATG ATG GTC TGC C
	LL1916		GGC AGA CCA TCA TCT CGT TCT TAT AAT TAT TGC
β -catenin	LL2262	R386G	GT CTT TGG ACT CTC GGG AAT CTT TCA GAT GCT GC
	LL2263		GCA GCA TCT GAA AGA TTC CCG AGA GTC CAA AGA C
β -catenin	LL1899	F660S	GCA GCT GCT GTT TTG TCC CGA ATG TCT GAG GAC
	LL1900		GTC CTC AGA CAT TCG GGA CAA AAC AGC AGC TGC

Supporting Table S2: Results of the yeast two-hybrid screening using CTNNBIP1/ICAT as bait.

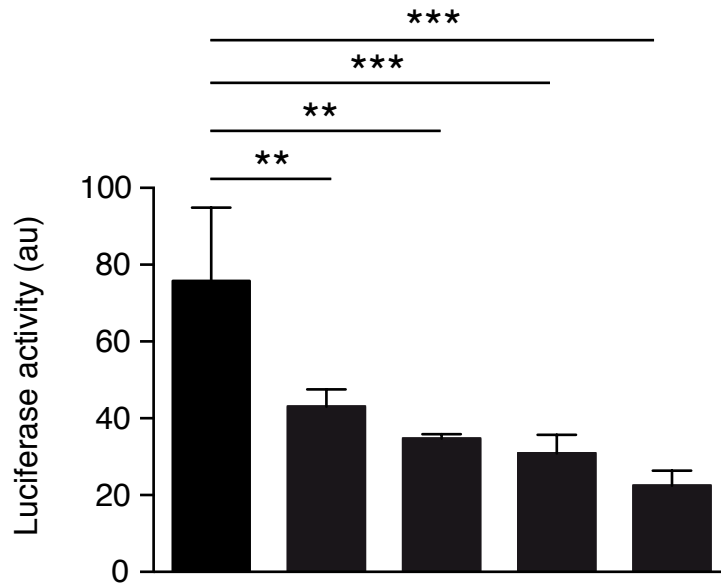
Gene name	Accession number (NCBI)	Protein	Number of clones (% of total)
AFF4	NM_014423	AFF4 (RNA binding protein)	4 (1.6 %)
AP1G1	NM_001030007	Gamma-Adaptin	6 (2.4 %)
CTNNB1	NM_020248.2	β -catenin	198 (80 %)
PPP2R5D	NM_006245	Protein phosphatase 2	4 (1.6 %)
IFIT3	NM_001549	Interferon-induced protein RIG-G	4 (1.6 %)
STK24	NM_003576	Mst3	11 (4.4 %)
TIMM8A	NG_011734	Translocase	10 (4 %)
IFIT5	NM_012420	Interferon-induced protein RI58	10 (4%)

Supplementary Figure Legends

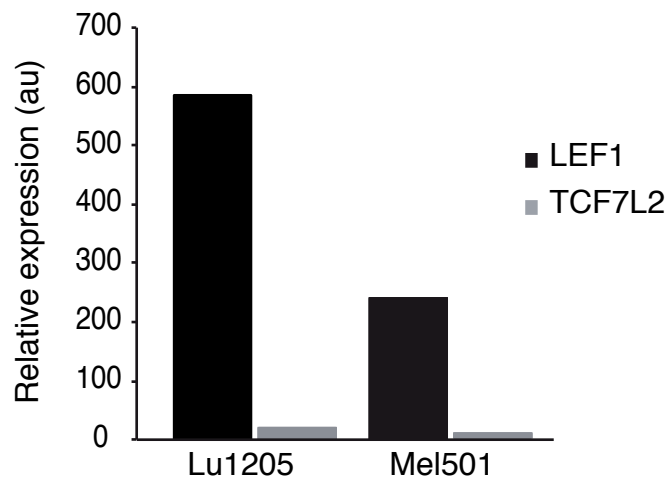
Supplementary Figure S1. ICAT negatively regulates the M-MITF promoter in a dose dependent manner. (A) Mel501 cells were transiently transfected with a M-MITF::luciferase reporter in presence of increasing amounts of ICAT-WT expression vector. Data are presented as means \pm SEM of three independent experiments. (B) RT-qPCR analysis of LEF1 and TCF7L2 in Lu1205 and Mel501 cells. **p<0.01, ***p<0.001

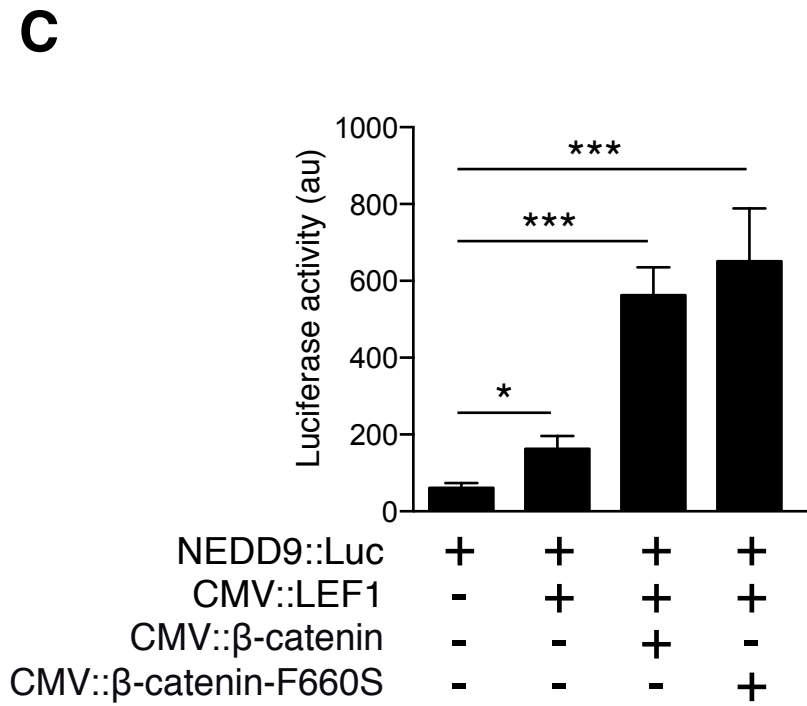
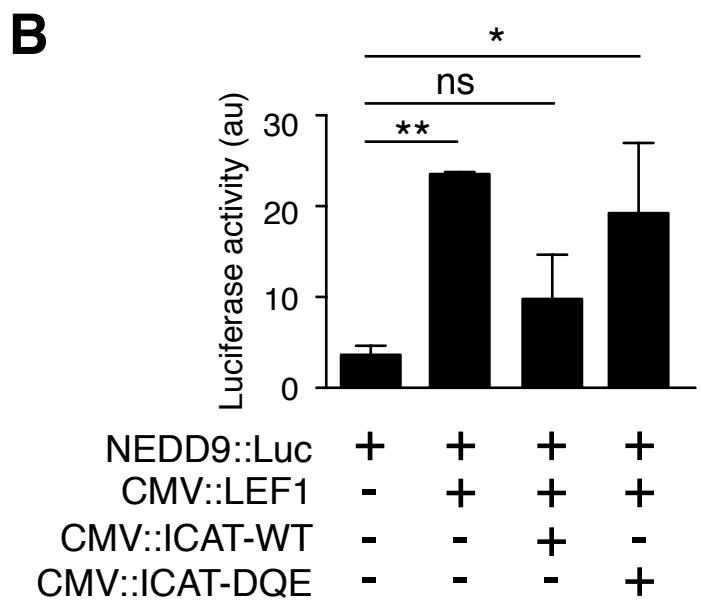
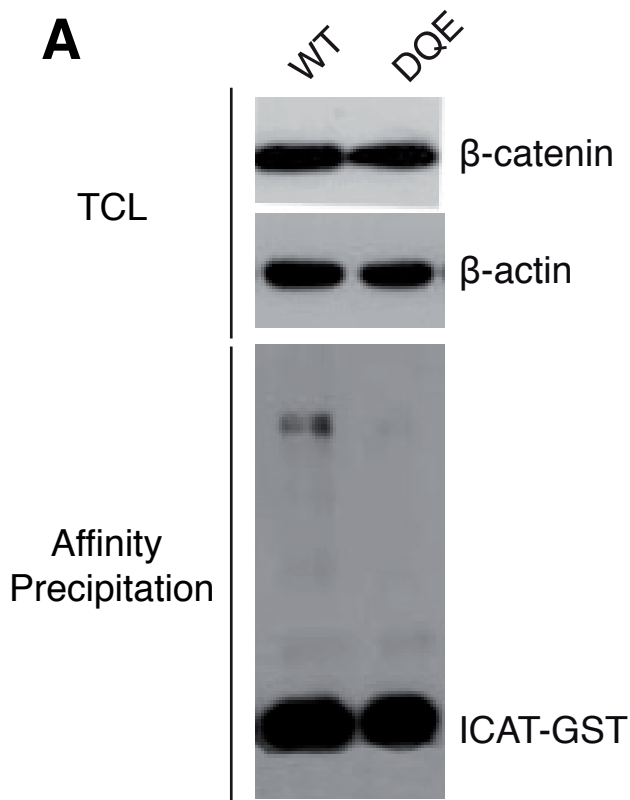
Supplementary Figure S2. Effect of ICAT N-terminal mutant on the NEDD9 promoter activity. (A) Representative Total Cell Lysate extract (TCL) and pull-down analysis of endogenous β -catenin by ICAT-WT and ICAT-DQE GST proteins in Mel501 cells. (B) Mel501 cells were transiently transfected with a NEDD9::luciferase reporter in presence of LEF1. Mel501 cells were also transfected with ICAT-WT or ICAT-DQE expression vectors. (C) Lu1205 cells were transiently transfected with a NEDD9::luciferase reporter in presence of LEF1. Lu1205 cells were also transfected with β -catenin or β -catenin-F660S expression vectors. Data are presented as means \pm SEM of three independent experiments. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, ns = not significant.

Supplementary Figure S3. Effect of ICAT C-terminal mutants on the NEDD9 promoter activity. (A) Representative Total Cell Lysate extract (TCL) and pull-down analysis of endogenous β -catenin by ICAT-WT, ICAT-GV, ICAT-AV, ICAT-GA and ICAT-GAV GST proteins in Lu1205 and Mel501 cells. (B) Mel501 cells were transiently transfected with a NEDD9::luciferase reporter in presence of LEF1. Mel501 cells were also transfected with ICAT-WT, ICAT-D66G, ICAT-E75V, ICAT-GV, ICAT-F71A, ICAT-AV, ICAT-GA or ICAT-GAV expression vectors. Data are presented as means \pm SEM of three independent experiments. Presented p-values are compared to NEDD9::Luc + CMV::LEF1. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001, ns = not significant.

A

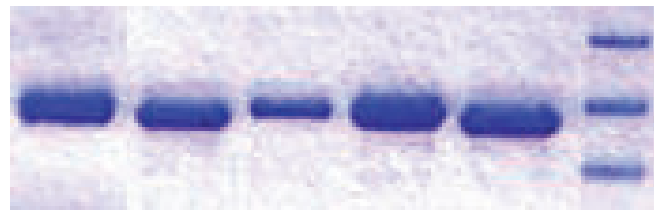
M-MITF::Luc	+	+	+	+	+
CMV::ICAT-WT 10ng	-	+	-	-	-
CMV::ICAT-WT 50ng	-	-	+	-	-
CMV::ICAT-WT 100ng	-	-	-	+	-
CMV::ICAT-WT 250ng	-	-	-	-	+

B

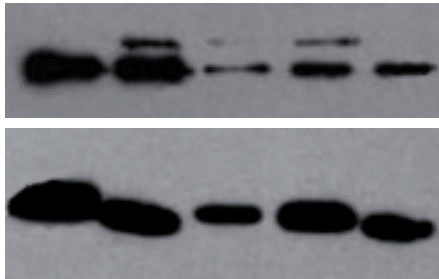
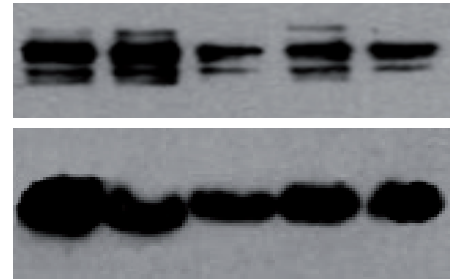


A

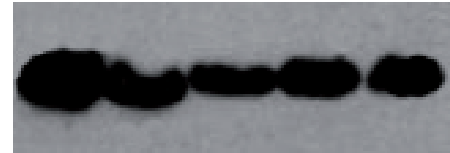
Coomassie blue



ICAT-GST WT GV AV GA GAV

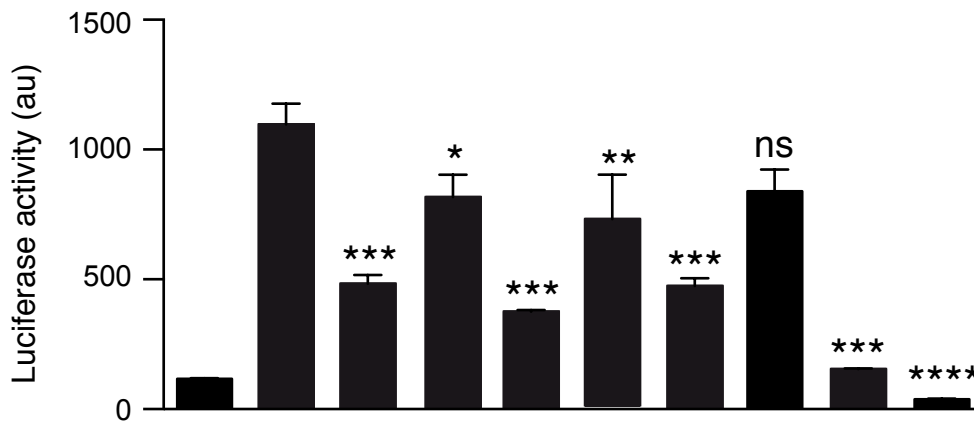
Lu1205**Mel501** β -catenin

ICAT



ICAT-GST WT GV AV GA GAV

ICAT-GST WT GV AV GA GAV

B

NEDD9::Luc	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CMV::LEF1	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CMV::ICAT-WT	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
CMV::ICAT-D66G	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
CMV::ICAT-E75V	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
CMV::ICAT-GV	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
CMV::ICAT-F71A	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
CMV::ICAT-AV	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
CMV::ICAT-GA	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
CMV::ICAT-GAV	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+

DISCUSSION

Les principaux objectifs de mon travail de thèse étaient d'étudier le rôle de la protéine ICAT dans le développement normal et pathologique du lignage mélanocytaire mais également d'élucider les caractéristiques tridimensionnelles de son interaction avec β -caténine.

Comme je l'ai mentionné dans l'introduction, la protéine ICAT est un inhibiteur physiologique de la voie de signalisation Wnt/ β -caténine. En effet, ICAT est capable d'entrer en compétition avec les facteurs de transcription TCF/LEF pour se lier à β -caténine et donc d'inhiber la transcription des différents gènes cibles de β -caténine. La voie de signalisation Wnt joue un rôle extrêmement important au niveau du développement embryonnaire mais elle est également dérégulée dans de nombreux cancers dont le mélanome. Etant donné sa fonction d'inhibiteur physiologique de l'interaction β -caténine-TCF/LEF au niveau nucléaire, ICAT pourrait se révéler être un agent thérapeutique intéressant car *in vivo* il n'affecte pas l'interaction de β -caténine avec E-cadhérine (Gottardi and Gumbiner, 2004). On peut même imaginer que des drogues imitant les effets de ICAT pourraient être utilisées en tant qu'agents anti tumoraux dans certains cas. Dans ce contexte, l'étude de la structure tridimensionnelle du complexe ICAT/ β -caténine me semble être essentielle pour le développement de tels agents. Car malgré le succès de certaines nouvelles thérapies, le mélanome reste responsable de 80% des décès suite à un cancer cutané et il n'est guérissable que s'il est traité de façon précoce. De nouvelles thérapies sont donc nécessaires afin de pouvoir, à long terme, améliorer le taux de survie des patients atteints d'un mélanome.

Rôle de ICAT durant le développement embryonnaire murin

L'approche *in vivo* avait pour but d'analyser la possible implication de ICAT dans le développement embryonnaire des mélanoblastes puisque nous avons pu montrer par RT-qPCR que ICAT est exprimé dans ces cellules, des stades E13,5 à E18,5.

Le développement de différents lignages cellulaires à partir des CCN résulte d'une interaction complexe et dynamique entre des facteurs externes et des régulateurs transcriptionnels internes. Le destin des CCN est également corrélé avec le moment où les cellules vont émerger du tube neural. Les cellules les plus précoces vont se différencier en cellules gliales, cellules du système nerveux sympathique et sensoriel, alors que les cellules plus tardives adoptent un destin mélanocytaire (Adameyko et al., 2012). Les mélanoblastes sont des cellules uniques qui se distinguent des autres dérivés des CCN par leur mode de migration et leur profil d'expression génétique et ces différences apparaissent immédiatement après leur sortie du tube neural. La spécification des mélanoblastes à partir des CCN est un processus progressif durant lequel des cellules initialement pluripotentes deviennent restreintes au lignage mélanocytaire et adoptent le profil d'expression génétique et la morphologie des mélanocytes. Le processus de spécification est principalement régulé par les voies Wnt et BMP bien que les voies de signalisation activées par Kit et l'Endothéline 3 puissent également stimuler la mélanogenèse (Thomas and Erickson, 2008).

Afin d'analyser le rôle de ICAT dans le développement embryonnaire du lignage mélanocytaire nous avons généré et analysé des souris totalement invalidées pour ICAT portant le transgène *Dct::LacZ*. Les loci *CTNNB1P1* et *Dct::LacZ* étant localisés sur le chromosome 4, nous avons d'abord vérifié si la ségrégation des deux loci se faisait de façon indépendante. En effet, pour obtenir des embryons totalement invalidés pour ICAT portant le transgène *Dct::LacZ*, il était impératif que les deux loci ne soient pas liés. La comparaison du pourcentage théorique de chaque génotype attendu avec le pourcentage de chaque génotype observé suggère que la ségrégation se fait de façon indépendante et que la distance génétique séparant les deux loci est équivalente à la distance physique (60 Mb).

En ce qui concerne le rôle de ICAT dans le développement embryonnaire des mélanoblastes la coloration *in toto* des embryons au X-gal ou les marquages par immunofluorescence n'ont pas révélé de différences objectives entre les embryons ICAT^{+/+}, ICAT^{+/-} et ICAT^{-/-} au niveau de la localisation des mélanoblastes. Le comptage des cellules LacZ-positives a donné des chiffres comparables pour les 3 génotypes aux stades E13.5, E15.5 et E18.5. Nous en concluons que l'inactivation totale du gène ICAT n'affecte ni le nombre ni la localisation des mélanoblastes, suggérant que la prolifération et la migration de ces cellules aux stades E13.5, E15.5 et E18.5 est normale en absence de ICAT.

Les mélanoblastes étant des dérivés des CCN, la raison pour laquelle l'inactivation de ICAT n'affecte pas leur développement, alors que la voie canonique Wnt est essentielle pour le développement des dérivés des CCN, n'est pas évidente. Cependant, même si l'on sait que la voie Wnt est essentielle pour le développement des CCN, son rôle exact dans le développement du lignage mélanocytaire est extrêmement complexe. En effet, il a été montré au laboratoire que le développement des mélanoblastes est fortement dépendant du degré d'activation de la voie Wnt. Dans une première expérience une forme de β -caténine portant 4 Sérines/Thréonines mutées en Alanines a été utilisée. Ces mutations empêchent la dégradation de la protéine et permettent une activation constitutive de la voie 1,5 fois supérieure à l'activité basale. Grâce à la recombinase Cre placée sous le contrôle du promoteur tyrosinase, cette activation constitutive de β -caténine se fait spécifiquement dans le lignage mélanocytaire et induit un défaut de migration des mélanoblastes reflété par la présence d'une tache blanche au niveau ventral chez les souris mutantes (Gallagher et al., 2012). Cependant, l'activation constitutive de β -caténine *via* l'utilisation d'une forme dans laquelle l'exon 3 est entièrement délété spécifiquement dans le lignage mélanocytaire, permet une activation 3 fois supérieure à l'activité basale et induit une hyperpigmentation des pattes (résultats non publiés du laboratoire). Ces résultats suggèrent qu'un développement normal du lignage mélanocytaire requiert une fine régulation de la voie Wnt/ β -caténine tant au niveau spatio-temporel qu'au niveau moléculaire. Dans notre cas on peut tout d'abord penser que l'inactivation de ICAT n'active pas suffisamment la voie Wnt pour que l'on puisse constater un effet sur le développement des mélanoblastes. Il est important de noter que l'inactivation de ICAT induit uniquement une absence de compétition avec les facteurs TCF/LEF dans le noyau. L'inactivation de ICAT n'affecte ni la dégradation ni la translocation de β -caténine au noyau. Le niveau d'activation de la voie Wnt est donc dépendant de la quantité de facteurs TCF/LEF présents à ce moment dans les cellules. Il serait intéressant de quantifier les facteurs TCF/LEF dans les CCN mais également dans les mélanoblastes en développement, ce qui nous donnerait un indice sur le niveau d'activation de la

voie Wnt. De plus, il est tout à fait possible que d'autres inhibiteurs de la voie Wnt, tels que Chibby ou Gsk3 β , prennent le relais.

Les effets de l'activation de la voie Wnt pourraient se refléter sur l'expression du facteur de transcription M-Mitf qui, comme je l'ai mentionné lors de l'introduction, est largement impliqué dans le développement des mélanoblastes. M-Mitf est exprimé dans les mélanoblastes peu après leur sortie du tube neural et avant qu'ils n'entrent dans la voie de migration dorsolatérale. M-Mitf est donc essentiel à des stades précoces du développement des mélanoblastes et il a été suggéré qu'il soit le premier gène à être surexprimé lors de la spécification des mélanoblastes. Selon ce modèle, M-Mitf serait exprimé au moment de la spécification des mélanoblastes ce qui permettrait en retour l'expression d'autres gènes qui confèrent leurs caractéristiques aux mélanoblastes. Dans notre cas, on peut penser que l'absence de ICAT pourrait induire une augmentation de la transcription de M-Mitf puisqu'il existe des sites TCF/LEF dans le promoteur de *M-Mitf*. Cependant, la transcription de M-Mitf est régulée par de nombreux autres facteurs que β -caténine, tels que Pax3, CREB et Sox10 (Denat and Larue, 2007; Goding, 2000). Il faudrait donc vérifier si les niveaux d'expression de M-Mitf sont réellement augmentés chez les souris ICAT $^{-/-}$. Si nous n'observons pas d'augmentation de l'expression de M-Mitf, il est possible que d'autres facteurs régulant négativement la transcription de M-Mitf tels que NDRG2 (Kim et al., 2008) annulent l'effet de l'activation de la voie Wnt en absence de ICAT. Cependant, même si M-Mitf est essentiel pour la spécification des mélanoblastes, il ne semble pas réguler directement la capacité des mélanoblastes à trouver leur chemin lors du développement. En effet, la transfection d'un shARN dirigé contre Mitf dans des CCN de poulet, n'empêche pas les cellules de migrer dorsolatéralement (Thomas and Erickson, 2008), suggérant qu'un autre gène, cible de M-Mitf ou non, soit impliqué dans la régulation de la migration des mélanoblastes. Il serait intéressant de vérifier si un phénomène similaire se produit chez la souris. La régulation des niveaux de M-Mitf nécessaires aux différents stades de développement des mélanoblastes semble être, tout comme celle de β -caténine, très fine. En effet, un modèle de rhéostat a été proposé par C. Goding en 2006 selon lequel des niveaux faibles de M-Mitf induisent un arrêt en phase G1 ainsi que l'apoptose des cellules souches mélanocytaires, alors que de hauts niveaux de M-Mitf induisent également un arrêt en phase G1 mais induisent la différenciation. La prolifération n'est induite que par des niveaux intermédiaires de M-Mitf (Carreira et al., 2006). Pour voir un effet sur le développement des mélanoblastes, je pense qu'il faudrait altérer significativement la voie de signalisation Wnt et l'expression de M-Mitf. L'inactivation de ICAT ne semble pas être un événement suffisant pour cela.

L'utilisation de souris porteuses d'un allèle floxé permettant l'inactivation spécifique de ICAT dans le lignage mélanocytaire permettrait certainement d'obtenir des résultats plus informatifs. En effet, les souris ne mourraient pas à la naissance et il serait donc possible d'observer directement l'effet de l'inactivation de ICAT sur la couleur du pelage des souris. Cette technique nous permettrait également de vérifier l'importance de ICAT au niveau de l'homéostasie et du renouvellement des mélanocytes. β -caténine jouant un rôle dans le renouvellement de la réserve de mélanocytes des follicules pileux chez la souris, on peut croire que ICAT pourrait également jouer un rôle.

Malgré l'absence d'effet sur le développement du lignage mélanocytaire, nous avons observé que les embryons ICAT^{-/-} présentent de nombreuses malformations développementales: anomalies cranio-faciales avec absence complète ou partielle des yeux (71%) raccourcissement du museau avec absence ou développement incomplet de la mandibule inférieure (76%) et exencéphalie (14%). Bien que ce type d'anomalies ait été préalablement rapporté par l'équipe ayant invalidé le gène *ICAT* (Satoh et al., 2004), le pourcentage d'embryons montrant ces anomalies est nettement plus élevé que dans l'article princeps. En effet, seul 35/69 (51%) de leurs embryons au stade E18.5 présentaient des anomalies cranio-faciales. Ce résultat pourrait être associé au fond génétique, puisque les souris qui nous ont été fournies étaient sur un fond C57BL/6 alors que les souris d'origine avaient un fond mixte CBA-C57BL/6.

Il est maintenant largement accepté que le développement de la partie antérieure du cerveau (télencéphale) et de la face nécessite l'inhibition des voies de signalisation BMP, TGF- β et Wnt/ β -caténine (Andoniadou and Martinez-Barbera, 2013). De nombreuses études basées sur des expériences de perte ou de gain de fonction et des analyses embryologiques sur le xénope, le poisson zèbre, le poulet et la souris ont prouvé l'importance de ces voies de signalisation durant le développement embryonnaire du cerveau et plus particulièrement l'importance de la voie Wnt/ β -caténine. En effet, cette voie régule une multitude de processus durant le développement de la partie antérieure du cerveau (Harrison-Uy and Pleasure, 2012). Il a été montré que c'est la présence ou l'absence de certains ligands Wnt à des stades et dans des zones précises durant le développement embryonnaire qui permet de réguler l'activation de la voie de signalisation Wnt. Cette voie est active précocement durant le développement embryonnaire et son activité décroît au fur et à mesure que le développement progresse. De plus, l'ensemble des défauts développementaux que nous avons observé sont similaires à ceux des embryons invalidés pour les gènes *Dkk1* ou *Six3* (Lagutin et al., 2003; Mukhopadhyay et al., 2001) qui sont également des régulateurs négatifs de la voie Wnt,

montrant que l'inhibition de la voie Wnt est essentielle à un développement correct de la partie antérieure du cerveau. Nos résultats et ceux de l'équipe de T. Akiyama (Sato et al., 2004) suggèrent que chez les embryons ICAT^{-/-} la voie de signalisation Wnt est activée de façon aberrante ce qui conduit à l'apparition de diverses anomalies développementales.

Dans nos embryons, l'absence de régulation négative de la voie Wnt par ICAT semble être suffisante pour empêcher le développement correct de la partie antérieure du cerveau et de la face mais n'affecte en rien le développement du lignage mélanocytaire. Nos résultats montrent l'importance de la voie Wnt/ β -caténine pour le développement de la partie antérieure du cerveau et soulignent la complexité de la régulation de la voie Wnt dans le développement du lignage mélanocytaire.

Rôle de ICAT dans la motilité des cellules de mélanome

La protéine β -caténine est le pivot de la voie de signalisation Wnt et sert d'ancrage pour le recrutement au niveau du noyau de nombreux régulateurs positifs ou négatifs, de la transcription (Mosimann et al., 2009; Willert and Jones, 2006). Une étude récente montre que 7% des patients atteints de mélanome présentent une mutation activatrice de β -caténine (Hodis et al., 2012). Cependant, les résultats de plusieurs études menées *in vivo* ou *in vitro* sont souvent contradictoires ce qui ne permet pas de définir clairement le rôle de β -caténine dans la formation/progression du mélanome (Arozarena et al., 2011; Chien et al., 2009; Delmas et al., 2007; Gallagher et al., 2012; Luciani et al., 2011; Sinnberg et al., 2011; Yang et al., 2012). Il a récemment été suggéré qu'une régulation fine des niveaux et de l'activité de β -caténine serait en fait nécessaire dans les mélanocytes normaux afin de prévenir la formation d'un mélanome (Damsky et al., 2011). ICAT, étant capable de rivaliser avec les facteurs TCF/LEF pour la liaison à β -caténine (Graham et al., 2002; Tago et al., 2000), pourrait être l'un de ces régulateurs.

Dans cette étude nous avons pu observer dans des lignées cellulaires de mélanome humain capables de former des métastases chez des souris immunodéficientes que le niveau d'expression de ICAT était plus élevé que dans des lignées ne formant pas de métastases. De plus, l'analyse des données transcriptomiques de l'étude de P.E. Lonning (Jonsson et al., 2010) nous a permis d'observer qu'un fort niveau d'expression de ICAT, dans des échantillons humains de mélanome métastatique, était associé à une diminution du temps de survie des patients, suggérant fortement que ICAT pourrait accroître le caractère invasif de certains mélanomes. L'utilisation de trois lignées cellulaires de mélanome humain (Lu1205, Mel501 et Skmel3) exprimant des niveaux variables de ICAT nous a permis de montrer pour la première fois que la formation du complexe ICAT/ β -caténine induit une augmentation de la vitesse cellulaire en 2D et une augmentation des capacités invasives des cellules en 3D. Ces résultats sont en accord avec d'autres résultats *in vitro* obtenus récemment au laboratoire montrant que la présence de β -caténine dans le noyau réduit la motilité cellulaire (Gallagher et al., 2012). Plusieurs observations *in vitro* réalisées sur les cellules Lu1205

permettent d'expliquer cette augmentation de vitesse cellulaire et des capacités invasives. En effet, nous avons pu observer une augmentation de la phosphorylation de MLC (Myosin Light Chain) et la présence de blebs à la surface des cellules, suggérant que la présence de ICAT induirait la contraction des fibres d'actine et de myosine et générerait une pression hydrostatique intracellulaire accrue qui conduirait à la formation de blebs et donc à une migration amiboïde, normalement associée à une vitesse de migration plus rapide. L'implication des GTPases Rac et Rho dans la motilité cellulaire a été largement documentée (Parri and Chiarugi, 2010; Raftopoulou and Hall, 2004; Ridley, 2011; Sanz-Moreno et al., 2008; Sanz-Moreno and Marshall, 2009; Yamazaki et al., 2009). Afin de vérifier leur possible implication dans les différences de motilité cellulaire observées en présence de ICAT, nous avons utilisé des inhibiteurs de Rac et de Rho/ROCK. Le traitement avec l'inhibiteur de Rac induit, tout comme la surexpression de ICAT, une augmentation du nombre de cellules arrondies, alors que le traitement avec l'inhibiteur de Rho/ROCK a l'effet opposé, en effet, la quasi-totalité des cellules adoptent une morphologie allongée. La surexpression de ICAT est même capable de rivaliser avec les effets de l'inhibiteur de Rho/ROCK en permettant le maintien d'environ 25% de cellules rondes, suggérant un rôle important de ICAT dans le changement de morphologie de ces cellules. Nous avons observé que l'augmentation des capacités invasives des cellules n'était pas associée à une augmentation de la sécrétion ou de l'activité de métalloprotéases. On peut donc penser que les cellules de mélanome adoptent une forme arrondie afin de pouvoir se faufiler entre les fibres de collagène et pouvoir ainsi envahir le matrigel sans avoir à le dégrader (Pinner and Sahai, 2008; Wolf et al., 2003; Wolf et al., 2007). Cette forme d'invasion, indépendante des métalloprotéases, est maintenant largement acceptée *in vitro* (Friedl and Wolf, 2010) mais reste controversée *in vivo* (Sabeh et al., 2009; Sahai, 2007). Cependant, l'inefficacité des traitements anti-métalloprotéases sur l'invasion tumorale suggère que des mécanismes d'invasion indépendants des métalloprotéases pourraient exister *in vivo* (Friedl and Wolf, 2003; Sahai, 2007; Wolf et al., 2007). De plus, l'équipe de E. Sahai a récemment développé un modèle informatique permettant de prédire le mode de migration des cellules en fonction du microenvironnement (Tozluoglu et al., 2013). Selon ce modèle, les cellules adopteraient préférentiellement un mode de migration amiboïde dans des environnements riches en collagène, semblables à l'environnement qui entoure une tumeur. Ces prédictions ont été testées par imagerie intravitale de tumeurs formées par des cellules de mélanome (A375M) après injection sous cutanée dans des souris immunodéficientes. Les résultats obtenus ont permis de confirmer les prédictions informatiques, montrant que la migration cellulaire peut se faire de façon totalement indépendante de l'adhésion dans certaines matrices extracellulaires.

In vivo, l'extravasation cellulaire et la colonisation des tissus sont deux caractéristiques du processus métastatique (Sahai, 2007). L'injection de cellules de mélanome humain au niveau de la veine caudale de souris immunodéficientes conduit à l'extravasation de ces cellules et à la colonisation des tissus pulmonaires, reproduisant ainsi partiellement le processus métastatique. Nous avons pu observer que l'injection de cellules Lu1205 surexprimant ICAT conduit à une augmentation de la colonisation des tissus pulmonaires et à une diminution du temps de survie des souris. La capacité des cellules de mélanome à former des métastases peut dépendre de leur habilité à changer de morphologie et à s'adapter aux changements d'environnement (Joyce and Pollard, 2009; Sanz-Moreno et al., 2008; Straussman et al., 2012). L'absence de changement de morphologie des cellules Mel501 et Skmel3 surexprimant ICAT et leurs faibles capacités invasives peuvent expliquer le fait que ces cellules ne forment pas de métastases chez la souris. En accord avec nos résultats, d'autres équipes ont également montré que la voie Rac associée à une migration mésenchymateuse inhibe la colonisation des tissus pulmonaires (Sanz-Moreno et al., 2008) alors qu'une migration amiboïde favorise la formation de tumeurs pulmonaires chez des souris immunodéficientes (Pinner and Sahai, 2008).

Le mécanisme moléculaire par lequel ICAT induit une augmentation de la motilité cellulaire et la formation de tumeurs pulmonaires n'est cependant pas totalement élucidé. Nous avons décidé de rechercher si une des cibles du complexe ICAT/ β -caténine pouvait être impliquée dans la régulation de la migration cellulaire *via* la voie Rac. Le rôle de la protéine NEDD9 en tant que régulateur de la migration cellulaire est largement documenté (Kim et al., 2010; Li et al., 2011b; Natarajan et al., 2006; O'Neill and Golemis, 2001; O'Neill et al., 2007; Singh et al., 2010). De plus, l'équipe de W. Liu a récemment montré que *NEDD9* était une cible de la voie de signalisation Wnt/ β -caténine (Li et al., 2011b). Une expression accrue de cette protéine a été observée dans 30 à 50% des mélanomes (Kim et al., 2006). De façon surprenante nous avons observé que NEDD9 était fortement exprimée dans les cellules non métastatiques Mel501 et Skmel3 et faiblement exprimée dans les cellules métastatiques Lu1205 et WM852. La surexpression de NEDD9 induit un changement de morphologie des cellules Lu1205 qui passent d'une morphologie arrondie à une morphologie allongée alors qu'elle n'a aucun effet sur la morphologie, déjà allongée, des cellules Mel501 et Skmel3. Des résultats similaires ont également été observés par une autre équipe (Sanz-Moreno et al., 2008). Nous avons donc suggéré que la surexpression de ICAT induit une réduction de l'expression de NEDD9 *via* l'inactivation de la voie Wnt/ β -caténine. La réduction d'expression de NEDD9 est associée à une diminution de l'activation de Rac1, ce qui favorise l'activation de la voie Rho/ROCK et donc la migration amiboïde. Comme je l'ai mentionné dans l'introduction, NEDD9

est une protéine essentielle à la régulation de la migration et de l'invasion cellulaire. Cependant, son rôle exact dans les tumeurs reste quelque peu controversé. En effet, il semblerait que sa fonction dans la motilité cellulaire soit tissu-spécifique et que la réponse cellulaire associée à différents niveaux d'expression de NEDD9 soit dynamique et dépende du stade de développement tumoral (Kim et al., 2010; Natarajan et al., 2006; Zhong et al., 2012). De plus, une étude menée sur des fibroblastes embryonnaires murins a également montré que la protéine NEDD9 affecte différemment la migration 2D et 3D (Zhong et al., 2012).

Nous avons également observé une augmentation modérée de la vitesse de migration cellulaire et des capacités invasives des cellules Mel501 et Skmel3, cependant ces augmentations n'étaient pas accompagnées d'un changement de morphologie. Le processus que nous avons observé chez les cellules Lu1205 ne semble donc pas opérer dans les cellules Mel501 et Skmel3 qui n'adoptent pas une morphologie arrondie même en présence d'un inhibiteur de Rac. Cependant, nous avons également observé que l'activité des métalloprotéases n'était pas affectée dans ces cellules, suggérant que l'augmentation de la vitesse de migration cellulaire et des capacités invasives observées en présence de ICAT soit associées à une autre forme d'invasion. Une étude récente a montré que les mélanoblastes murins sont capables de migrer en absence de Rac1 durant le développement embryonnaire (Li et al., 2011a; Li and Machesky, 2012). Les mélanoblastes forment des petites protrusions d'actine (short stubby protrusions) qui se distinguent des blebs car elles sont généralement courtes, trapues et riches en filaments d'actine. Cette forme de migration se caractérise par une vitesse de migration lente, comparable à la migration mésenchymateuse. On peut donc évoquer l'existence d'un processus similaire dans les cellules de mélanome, expliquant peut être les faibles capacités invasives des cellules Mel501 et Skmel3 dans lesquelles le taux de Rac1-GTP (forme active de Rac1) est très faible.

Selon notre modèle, l'inactivation de la voie Wnt, *via* la surexpression de ICAT, serait de mauvais pronostic étant donné l'augmentation du nombre de métastases formées et la diminution du temps de survie des souris immunodéficientes. Il est intéressant de rappeler que le rôle de β -caténine dans la formation et la progression des mélanomes reste controversé. En effet, selon certaines études, β -caténine est présente dans approximativement 30% des noyaux des cellules de mélanome en culture, reflétant l'activation constitutive de la voie Wnt, (Orgaz and Sanz-Moreno, 2013). Une étude récente d'un modèle murin a même montré que β -caténine, en coopération avec la perte de PTEN et la mutation BRAF^{V600E}, est impliquée dans la formation de métastases au niveau des poumons et des ganglions lymphatiques (Orgaz and Sanz-Moreno, 2013). À l'inverse, d'autres études ont montré que l'activation de la voie Wnt, *via* la surexpression de β -caténine, peut s'avérer être de bon pronostic

pour les patients. En effet, une étude *in vitro* a montré que dans les mélanomes, à l'inverse de ce qui se passe dans d'autres cancers, β -caténine est capable de bloquer l'invasion cellulaire (Arozarena et al., 2011). Selon cette étude, le blocage de l'invasion par β -caténine se fait *via* M-MITF. L'équipe de C. Wellbrock a montré que M-MITF induit à la fois une réduction de l'activation de la voie Rho/ROCK, impliquée dans la régulation de la migration/invasion amiboïde, et une réduction de l'expression de la métalloprotéase MT1-MMP, impliquée dans la régulation de l'invasion métalloprotéases-dépendante. M-MITF semble donc capable d'affecter les différents aspects caractérisant une cellule invasive.

Récemment, une attention particulière a été accordée au possible rôle des micro-ARNs (miARN) dans le développement ou la progression des cancers, en particulier du mélanome. Les miARN influencent le développement de certains cancers car ils peuvent agir en tant que suppresseurs de tumeurs ou en tant qu'oncogènes, selon qu'ils régulent négativement des oncogènes ou des suppresseurs de tumeurs respectivement. De nombreuses analyses du génome par la technique de CGH (Comparative Genomic Hybridization) ont permis l'identification des gènes codant pour des miRNA impliqués dans les mélanomes (Kunz, 2013). Cependant, leur implication dans la formation et la progression des mélanomes reste peu connue. Une étude menée par l'équipe de R.J. Perera en 2010 a identifié le miR-211 comme un marqueur du caractère non-invasif des cellules de mélanome (Mazar et al., 2010). Dans cette étude le miR-211 a été retrouvé sous-exprimé dans des lignées cellulaires de mélanome mais également dans des échantillons de mélanome humain. L'effet principal de la réduction du miR-211 est l'augmentation de l'expression de *KCNMA1* (potassium channel calcium-activated, subfamily M, alpha-1 subunit) qui serait impliqué dans la vitesse de prolifération et les capacités invasives des mélanomes (Xu et al., 2012). Le miR-211 est un membre de la famille miR-204 et il se localise dans l'intron 6 du gène de la mélastatine (*TRPM1*). M-MITF est capable de se fixer directement sur le promoteur du gène *TRPM1* régulant ainsi son expression ainsi que celle du miR-211 (Miller et al., 2004). L'expression du miR-211, étant dépendante de M-MITF, est limitée aux tissus contenant des cellules pigmentaires (Boyle et al., 2011) et pourrait donc jouer un rôle extrêmement important dans la formation et la progression des mélanomes. De façon intéressante, une analyse *in silico* nous a permis d'identifier un site de fixation du miR-211 dans la partie 3'UTR de ICAT et d'observer que le niveau d'expression de miR-211 dans les cellules exprimant fortement ICAT était très faible. Nous avons également pu observer une réduction significative de l'expression de ICAT, au niveau de l'ARNm, en présence d'un mime de miR-211. De plus, la présence de ce mime induit une légère diminution de la vitesse de migration et des capacités invasives des cellules Lu1205. Ces résultats restent préliminaires, mais suggèrent qu'une

boucle de rétrocontrôle, régulant la motilité cellulaire, pourrait exister entre M-MITF, le miR-211 et ICAT.

Les mélanomes sont des maladies complexes influencés tant par des facteurs génétiques qu'environnementaux. Pour former des métastases les cellules de mélanome doivent altérer l'organisation de leur cytosquelette ainsi que leurs interactions avec la matrice extracellulaire. Elles sont capables d'adopter différentes stratégies de migration en fonction du microenvironnement pour s'échapper de la tumeur primaire et ainsi coloniser les tissus adjacents ou plus distants. Ce domaine de recherche a fait l'objet de nombreuses études ces six dernières années permettant diverses découvertes. De nombreuses voies ont été identifiées comme régulant la migration des cellules de mélanome. Notre étude vient s'ajouter à l'ensemble de ces découvertes en montrant pour la première fois que ICAT joue un rôle dans la régulation de la migration des cellules de mélanome. À long terme, on peut imaginer que le développement d'un anticorps bloquant dirigé contre ICAT, qui empêcherait la fixation de ICAT à β -caténine sans affecter la liaison des autres partenaires de β -caténine, pourrait être utilisé dans certains cas.

Analyse de la structure 3D du complexe ICAT/ β -caténine

L'étude de la structure tridimensionnelle du complexe ICAT/ β -caténine avait pour but de rechercher si ICAT est capable de moduler l'expression de gènes cibles de β -caténine et quels sont les acides aminés de ICAT essentiels à cette modulation.

Dans cette étude nous avons pu vérifier que la surexpression de ICAT induit une diminution de l'activité luciférase associée aux promoteurs *M-MITF* et *NEDD9* (cibles de β -caténine), montrant l'existence d'une compétition entre TCF/LEF et ICAT pour la liaison à β -caténine. Ces résultats sont cohérents avec les données de la littérature, puisque deux études (Daniels and Weis, 2002; Graham et al., 2002) prédisent que ICAT et TCF/LEF utilisent des répétitions ARM communes (5-7) pour se fixer à β -caténine. Nous nous sommes plus particulièrement intéressés à LEF1 car les niveaux de TCF7L2 dans les cellules de mélanome en culture sont quasiment indétectables. La diminution de l'activité luciférase est observée avec ou sans surexpression de la protéine LEF1 et ce dans une lignée cellulaire de mélanocytes murins, les Melan-a, et dans deux lignées cellulaires de mélanome humain, les Lu1205 et les Mel501. Afin de comprendre le mécanisme d'interaction entre ICAT et β -caténine, nous avons décidé de déterminer quels sont les acides aminés essentiels à l'interaction entre les deux protéines. Au niveau de la partie N-terminale de ICAT trois résidus (Y15, K19, V22), prédits comme interagissant avec la Phe660 de β -caténine (répétition ARM 12), nous ont paru intéressants. Afin d'obtenir une réponse claire nous avons décidé de créer une protéine ICAT mutante pour ces trois acides aminés. Les résultats obtenus avec ce mutant (ICAT-DQE) montrent que ces résidus sont essentiels à la formation d'un complexe stable ICAT/ β -caténine. De plus, l'absence d'effet sur l'activité luciférase associée aux promoteurs *M-MITF* et *NEDD9* en présence de ce mutant montre son incapacité à interférer avec LEF1 pour la liaison à β -caténine. Dans le but de confirmer ces résultats, nous avons muté la Phe660 de β -caténine en Sérine (F660S) et nous avons réalisé des expériences similaires. Nous avons observé que l'interaction entre ICAT et le mutant F660S de β -caténine est également abolie, témoignant de l'importance de ces résidus pour l'interaction des deux protéines. Cependant, la mutation F660S de β -caténine n'affecte pas l'activité

luciférase associée aux promoteurs *M-MITF* et *NEDD9* confirmant que le facteur de transcription LEF1 ne se fixe pas au niveau de la répétition ARM 12 de β -caténine.

L'analyse de l'effet des mutations au niveau de la partie C-terminale de ICAT ne nous a pas permis pour l'instant, d'obtenir une réponse aussi claire. Nous avons muté les trois résidus (D66, F71, E75) prédits comme étant impliqués dans la liaison à β -caténine *via* leurs interactions avec les résidus K435, R386 et K312 respectivement. Nous avons généré trois simples mutants, portant soit une mutation D66G, F71A ou E75V, trois doubles mutants portant différentes combinaisons de deux mutations (GV, AV ou GA) et un triple mutant portant les trois mutations (GAV). L'analyse protéique nous a permis d'observer que les mutants AV, GA et GAV voient leurs capacités à interagir avec β -caténine fortement affectées, suggérant que ces résidus sont impliqués dans la compétition avec LEF1 pour la liaison aux répétitions ARM de β -caténine. L'ensemble des simples mutants se comporte comme la protéine ICAT-WT diminuant de façon significative l'activité luciférase associée au promoteur *NEDD9*. De façon comparable à ce que l'on observe en absence de ICAT, la surexpression des doubles mutants GV et AV n'affecte pas l'activité luciférase. Il semblerait que ces deux mutants ne soient pas capables d'interférer efficacement avec LEF1 permettant ainsi la transcription de *NEDD9*. Il y a cependant une discordance entre l'analyse protéique et l'analyse de l'activité luciférase. Selon l'analyse protéique les mutants AV, GA et GAV perdent en partie leur capacité à se fixer sur β -caténine, l'activité luciférase associée au promoteur *NEDD9* ne devrait donc pas être affectée en présence de ces trois mutants et ce n'est le cas que pour le mutant AV. De façon similaire, le mutant GV n'affecte pas l'activité luciférase alors que sa capacité à interagir avec β -caténine n'est que faiblement affectée au niveau de l'analyse protéique. Nous ne savons pas encore pourquoi nous observons de telles différences. L'ensemble de nos résultats est malgré tout en accord avec les données thermodynamiques (Choi et al., 2006) qui ont montré l'existence dans ICAT d'un domaine de haute affinité pour β -caténine (partie N-terminale) et d'un domaine de faible affinité (partie C-terminale). Les mutations du domaine C-terminal affectent la compétition avec les facteurs TCF/LEF mais ont peu d'incidence sur l'interaction de haute affinité entre la partie hélicale de ICAT et les domaines ARM 10 à 12 de β -caténine. Par contre les mutations du domaine hélicale H1 suppriment à la fois l'interaction avec les domaines ARM 10 à 12 et la compétition avec LEF1. Nous en concluons que la perte du site de haute affinité est suffisante pour empêcher le positionnement correct du domaine C-terminal sur β -caténine, confirmant ainsi la faible affinité de ce domaine pour β -caténine.

Nous avons déjà montré que la surexpression de ICAT induit une augmentation de la vitesse de migration cellulaire *via* l'inhibition de la voie Wnt, suggérant que l'altération de certains résidus

essentiels à son rôle d'inhibiteur de la voie Wnt pourrait également influencer sa capacité à réguler la migration cellulaire. Des expériences permettant de déterminer la vitesse de migration des cellules de mélanome en présence des différents mutants sont actuellement en cours.

Les expériences d'immunoprécipitation nous ont permis de vérifier l'existence ou l'absence d'interaction entre β -caténine et la forme sauvage ou les formes mutantes de ICAT. Cependant cette technique n'est que semi quantitative, elle ne permet pas de déterminer avec précision la force de l'interaction entre les deux protéines. Afin de compléter notre étude, nous avons décidé de réaliser une expérience de Titration Calorimétrique Isotherme (ITC-Isothermal Titration Calorimetry). Cette technique permet de déterminer de nombreux paramètres thermodynamiques tels que les constantes d'affinité entre deux protéines en solution. Avec cette technique nous espérons pouvoir déterminer précisément les constantes d'affinité entre la forme sauvage ou les formes mutantes de ICAT et β -caténine. La production de ces protéines purifiées ainsi que la mise au point de la technique d'ITC sont actuellement en cours.

Comme je l'ai mentionné dans l'introduction d'autres résidus ont été prédits comme étant importants pour la liaison de ICAT à β -caténine. En particulier, l'acide Glutamique 37 de ICAT, situé sur l'hélice H2, qui formerait deux liaisons hydrogène avec l'Arginine 661 de β -caténine. La méthionine 29 de ICAT stabiliserait la partie C-terminale de l'hélice H1 en interagissant avec la Tyrosine 654 de β -caténine *via* une liaison hydrophobe. Il a été montré que leur conversion en Alanine abolit la fonction de régulateur négatif de ICAT dans des cellules de cancer colorectal (Tago et al., 2000; Takemaru et al., 2003). Il serait intéressant de muter ces résidus et de réaliser le même type d'expériences afin de déterminer si ces résidus, seuls ou en combinaison avec d'autres, sont essentiels à la fonction de ICAT dans les cellules de mélanome.

De façon intéressante, l'étude menée par l'équipe de W. Xu prédit que ICAT pourrait également entrer en compétition avec les histones acétyl transférase CBP et p300 pour la liaison à β -caténine *via* son domaine N-terminal (Daniels and Weis, 2002; Graham et al., 2002). L'utilisation du mutant ICAT-DQE permettrait de confirmer cette hypothèse et permettrait également d'éclaircir d'avantage le mécanisme d'inhibition de l'activité transcriptionnelle de β -caténine par ICAT.

Afin de poursuivre cette étude des expériences supplémentaires d'immunoprécipitation et de mesure d'activité luciférase avec d'autres lignées cellulaires sont en cours. L'ensemble des expériences manquantes ainsi que les valeurs obtenues avec l'ITC nous permettrons peut-être de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans l'interaction entre ICAT et β -caténine.

*RÉFÉRENCES
BIBLIOGRAPHIQUES*

Abbasi, N.R., Shaw, H.M., Rigel, D.S., Friedman, R.J., McCarthy, W.H., Osman, I., Kopf, A.W., and Polsky, D. (2004). Early diagnosis of cutaneous melanoma: revisiting the ABCD criteria. *JAMA* 292, 2771-2776.

Aberle, H., Bauer, A., Stappert, J., Kispert, A., and Kemler, R. (1997). beta-catenin is a target for the ubiquitin-proteasome pathway. *EMBO J* 16, 3797-3804.

Adameyko, I., Lallemand, F., Aquino, J.B., Pereira, J.A., Topilko, P., Muller, T., Fritz, N., Beljajeva, A., Mochii, M., Liste, I., *et al.* (2009). Schwann cell precursors from nerve innervation are a cellular origin of melanocytes in skin. *Cell* 139, 366-379.

Adameyko, I., Lallemand, F., Furlan, A., Zinin, N., Aranda, S., Kitambi, S.S., Blanchart, A., Favaro, R., Nicolis, S., Lubke, M., *et al.* (2012). Sox2 and Mitf cross-regulatory interactions consolidate progenitor and melanocyte lineages in the cranial neural crest. *Development* 139, 397-410.

Anastas, J.N., and Moon, R.T. (2013). WNT signalling pathways as therapeutic targets in cancer. *Nat Rev Cancer* 13, 11-26.

Andoniadou, C.L., and Martinez-Barbera, J.P. (2013). Developmental mechanisms directing early anterior forebrain specification in vertebrates. *Cell Mol Life Sci* 70, 3739-3752.

Arozarena, I., Bischof, H., Gilby, D., Belloni, B., Dummer, R., and Wellbrock, C. (2011). In melanoma, beta-catenin is a suppressor of invasion. *Oncogene* 30, 4531-4543.

Bachmann, I.M., Straume, O., Puntervoll, H.E., Kalvenes, M.B., and Akslen, L.A. (2005). Importance of P-cadherin, beta-catenin, and Wnt5a/frizzled for progression of melanocytic tumors and prognosis in cutaneous melanoma. *Clin Cancer Res* 11, 8606-8614.

Behrens, J., von Kries, J.P., Kuhl, M., Bruhn, L., Wedlich, D., Grosschedl, R., and Birchmeier, W. (1996). Functional interaction of beta-catenin with the transcription factor LEF-1. *Nature* 382, 638-642.

Bennett, D.C. (2008). How to make a melanoma: what do we know of the primary clonal events? *Pigment Cell Melanoma Res* 21, 27-38.

Bentley, N.J., Eisen, T., and Goding, C.R. (1994). Melanocyte-specific expression of the human tyrosinase promoter: activation by the microphthalmia gene product and role of the initiator. *Mol Cell Biol* 14, 7996-8006.

Bertolotto, C., Abbe, P., Hemesath, T.J., Bille, K., Fisher, D.E., Ortonne, J.P., and Ballotti, R. (1998). Microphthalmia gene product as a signal transducer in cAMP-induced differentiation of melanocytes. *J Cell Biol* 142, 827-835.

Bertolotto, C., Bille, K., Ortonne, J.P., and Ballotti, R. (1996). Regulation of tyrosinase gene expression by cAMP in B16 melanoma cells involves two CATGTG motifs surrounding the TATA box: implication of the microphthalmia gene product. *J Cell Biol* 134, 747-755.

Bevona, C., Goggins, W., Quinn, T., Fullerton, J., and Tsao, H. (2003). Cutaneous melanomas associated with nevi. *Arch Dermatol* 139, 1620-1624; discussion 1624.

Biechele, T.L., Kulikaukas, R.M., Toroni, R.A., Lucero, O.M., Swift, R.D., James, R.G., Robin, N.C., Dawson, D.W., Moon, R.T., and Chien, A.J. (2012). Wnt/beta-catenin signaling and AXIN1 regulate apoptosis triggered by inhibition of the mutant kinase BRAFV600E in human melanoma. *Sci Signal* 5, ra3.

Bliss, J.M., Ford, D., Swerdlow, A.J., Armstrong, B.K., Cristofolini, M., Elwood, J.M., Green, A., Holly, E.A., Mack, T., MacKie, R.M., *et al.* (1995). Risk of cutaneous melanoma associated with pigmentation characteristics and freckling: systematic overview of 10 case-control studies. The International Melanoma Analysis Group (IMAGE). *Int J Cancer* 62, 367-376.

Bolos, V., Gasent, J.M., Lopez-Tarruella, S., and Grande, E. (2010). The dual kinase complex FAK-Src as a promising therapeutic target in cancer. *Onco Targets Ther* 3, 83-97.

Bonaventure, J., Domingues, M.J., and Larue, L. (2013). Cellular and molecular mechanisms controlling the migration of melanocytes and melanoma cells. *Pigment Cell Melanoma Res* 26, 316-325.

Boyle, G.M., Woods, S.L., Bonazzi, V.F., Stark, M.S., Hacker, E., Aoude, L.G., Dutton-Regester, K., Cook, A.L., Sturm, R.A., and Hayward, N.K. (2011). Melanoma cell invasiveness is regulated by miR-211 suppression of the BRN2 transcription factor. *Pigment Cell Melanoma Res* 24, 525-537.

Butz, S., and Larue, L. (1995). Expression of catenins during mouse embryonic development and in adult tissues. *Cell Adhes Commun* 3, 337-352.

Carreira, S., Goodall, J., Denat, L., Rodriguez, M., Nuciforo, P., Hoek, K.S., Testori, A., Larue, L., and Goding, C.R. (2006). Mitf regulation of Dia1 controls melanoma proliferation and invasiveness. *Genes Dev* 20, 3426-3439.

Charras, G., and Paluch, E. (2008). Blebs lead the way: how to migrate without lamellipodia. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9, 730-736.

Chesarone, M.A., and Goode, B.L. (2009). Actin nucleation and elongation factors: mechanisms and interplay. *Curr Opin Cell Biol* 21, 28-37.

Chien, A.J., Moore, E.C., Lonsdorf, A.S., Kulikaukas, R.M., Rothberg, B.G., Berger, A.J., Major, M.B., Hwang, S.T., Rimm, D.L., and Moon, R.T. (2009). Activated Wnt/beta-catenin signaling in melanoma is associated with decreased proliferation in patient tumors and a murine melanoma model. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 1193-1198.

Chin, L., Pomerantz, J., Polsky, D., Jacobson, M., Cohen, C., Cordon-Cardo, C., Horner, J.W., 2nd, and DePinho, R.A. (1997). Cooperative effects of INK4a and ras in melanoma susceptibility in vivo. *Genes Dev* 11, 2822-2834.

- Chinnadurai, G. (2002). CtBP, an unconventional transcriptional corepressor in development and oncogenesis. *Mol Cell* 9, 213-224.
- Choi, H.J., Huber, A.H., and Weis, W.I. (2006). Thermodynamics of beta-catenin-ligand interactions: the roles of the N- and C-terminal tails in modulating binding affinity. *J Biol Chem* 281, 1027-1038.
- Clark, E.S., Whigham, A.S., Yarbrough, W.G., and Weaver, A.M. (2007). Cortactin is an essential regulator of matrix metalloproteinase secretion and extracellular matrix degradation in invadopodia. *Cancer Res* 67, 4227-4235.
- Clark, W.H., Jr., Elder, D.E., Guerry, D.t., Epstein, M.N., Greene, M.H., and Van Horn, M. (1984). A study of tumor progression: the precursor lesions of superficial spreading and nodular melanoma. *Hum Pathol* 15, 1147-1165.
- Clevers, H. (2006). Wnt/beta-catenin signaling in development and disease. *Cell* 127, 469-480.
- Clevers, H., and Nusse, R. (2012). Wnt/beta-catenin signaling and disease. *Cell* 149, 1192-1205.
- Coit, D.G., and Olszanski, A.J. (2013). Progress in the management of melanoma in 2013. *J Natl Compr Canc Netw* 11, 645-648.
- Conde-Perez, A., and Larue, L. (2012). PTEN and melanomagenesis. *Future Oncol* 8, 1109-1120.
- Cong, F., and Varmus, H. (2004). Nuclear-cytoplasmic shuttling of Axin regulates subcellular localization of beta-catenin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 2882-2887.
- Curtin, J.A., Fridlyand, J., Kageshita, T., Patel, H.N., Busam, K.J., Kutzner, H., Cho, K.H., Aiba, S., Brocker, E.B., LeBoit, P.E., *et al.* (2005). Distinct sets of genetic alterations in melanoma. *N Engl J Med* 353, 2135-2147.
- D**amsky, W.E., Curley, D.P., Santhanakrishnan, M., Rosenbaum, L.E., Platt, J.T., Gould Rothberg, B.E., Taketo, M.M., Dankort, D., Rimm, D.L., McMahon, M., *et al.* (2011). beta-catenin signaling controls metastasis in Braf-activated Pten-deficient melanomas. *Cancer Cell* 20, 741-754.
- Daniels, D.L., and Weis, W.I. (2002). ICAT inhibits beta-catenin binding to Tcf/Lef-family transcription factors and the general coactivator p300 using independent structural modules. *Mol Cell* 10, 573-584.
- Davies, H., Bignell, G.R., Cox, C., Stephens, P., Edkins, S., Clegg, S., Teague, J., Woffendin, H., Garnett, M.J., Bottomley, W., *et al.* (2002). Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature* 417, 949-954.
- Delmas, V., Beermann, F., Martinozzi, S., Carreira, S., Ackermann, J., Kumasaka, M., Denat, L., Goodall, J., Luciani, F., Viros, A., *et al.* (2007). Beta-catenin induces immortalization of melanocytes by suppressing p16INK4a expression and cooperates with N-Ras in melanoma development. *Genes Dev* 21, 2923-2935.

Denat, L., and Larue, L. (2007). [Malignant melanoma and the role of the paradoxal protein Microphthalmia transcription factor]. *Bull Cancer* 94, 81-92.

Domingues, M.J., Rambow, F., Job, B., Papon, L., Liu, W., Larue, L., and Bonaventure, J. (2014). ICAT, Inhibitor of beta-catenin and TCF4, a new modulator of melanoma cells motility and invasiveness. *Cancer Res.*

Dorsky, R.I., Moon, R.T., and Raible, D.W. (1998). Control of neural crest cell fate by the Wnt signalling pathway. *Nature* 396, 370-373.

Dupin, E., and Le Douarin, N.M. (2003). Development of melanocyte precursors from the vertebrate neural crest. *Oncogene* 22, 3016-3023.

Ernfors, P. (2010). Cellular origin and developmental mechanisms during the formation of skin melanocytes. *Exp Cell Res* 316, 1397-1407.

Fasolini, M., Wu, X., Flocco, M., Trosset, J.Y., Oppermann, U., and Knapp, S. (2003). Hot spots in Tcf4 for the interaction with beta-catenin. *J Biol Chem* 278, 21092-21098.

Fitzpatrick, T.B., and Breathnach, A.S. (1963). [the Epidermal Melanin Unit System]. *Dermatol Wochenschr* 147, 481-489.

Friedl, P., and Wolf, K. (2003). Tumour-cell invasion and migration: diversity and escape mechanisms. *Nat Rev Cancer* 3, 362-374.

Friedl, P., and Wolf, K. (2010). Plasticity of cell migration: a multiscale tuning model. *J Cell Biol* 188, 11-19.

Gaggioli, C., and Sahai, E. (2007). Melanoma invasion - current knowledge and future directions. *Pigment Cell Res* 20, 161-172.

Gail, R., Frank, R., and Wittinghofer, A. (2005). Systematic peptide array-based delineation of the differential beta-catenin interaction with Tcf4, E-cadherin, and adenomatous polyposis coli. *J Biol Chem* 280, 7107-7117.

Gallagher, S.J., Rambow, F., Kumasaka, M., Champeval, D., Bellacosa, A., Delmas, V., and Larue, L. (2012). Beta-catenin inhibits melanocyte migration but induces melanoma metastasis. *Oncogene.*

Gammill, L.S., and Bronner-Fraser, M. (2003). Neural crest specification: migrating into genomics. *Nat Rev Neurosci* 4, 795-805.

Garbe, C., Peris, K., Hauschild, A., Saiag, P., Middleton, M., Spatz, A., Grob, J.J., Malvehy, J., Newton-Bishop, J., Stratigos, A., *et al.* (2010). Diagnosis and treatment of melanoma: European consensus-based interdisciplinary guideline. *Eur J Cancer* 46, 270-283.

Gauthier, Y., Cario Andre, M., and Taieb, A. (2003). A critical appraisal of vitiligo etiologic theories. Is melanocyte loss a melanocytorrhagy? *Pigment Cell Res* 16, 322-332.

Gavard, J., and Mege, R.M. (2005). Once upon a time there was beta-catenin in cadherin-mediated signalling. *Biol Cell* 97, 921-926.

Goding, C.R. (2000). Mitf from neural crest to melanoma: signal transduction and transcription in the melanocyte lineage. *Genes Dev* 14, 1712-1728.

Goodall, J., Martinozzi, S., Dexter, T.J., Champeval, D., Carreira, S., Larue, L., and Goding, C.R. (2004). Brn-2 expression controls melanoma proliferation and is directly regulated by beta-catenin. *Mol Cell Biol* 24, 2915-2922.

Gottardi, C.J., and Gumbiner, B.M. (2004). Role for ICAT in beta-catenin-dependent nuclear signaling and cadherin functions. *Am J Physiol Cell Physiol* 286, C747-756.

Graham, T.A., Clements, W.K., Kimelman, D., and Xu, W. (2002). The crystal structure of the beta-catenin/ICAT complex reveals the inhibitory mechanism of ICAT. *Mol Cell* 10, 563-571.

Graham, T.A., Weaver, C., Mao, F., Kimelman, D., and Xu, W. (2000). Crystal structure of a beta-catenin/Tcf complex. *Cell* 103, 885-896.

Gray-Schopfer, V.C., Cheong, S.C., Chong, H., Chow, J., Moss, T., Abdel-Malek, Z.A., Marais, R., Wynford-Thomas, D., and Bennett, D.C. (2006). Cellular senescence in naevi and immortalisation in melanoma: a role for p16? *Br J Cancer* 95, 496-505.

Grossmann, A.H., Yoo, J.H., Clancy, J., Sorensen, L.K., Sedgwick, A., Tong, Z., Ostanin, K., Rogers, A., Grossmann, K.F., Tripp, S.R., *et al.* (2013). The small GTPase ARF6 stimulates beta-catenin transcriptional activity during WNT5A-mediated melanoma invasion and metastasis. *Sci Signal* 6, ra14.

Grulich, A.E., Bataille, V., Swerdlow, A.J., Newton-Bishop, J.A., Cuzick, J., Hersey, P., and McCarthy, W.H. (1996). Naevi and pigmentary characteristics as risk factors for melanoma in a high-risk population: a case-control study in New South Wales, Australia. *Int J Cancer* 67, 485-491.

Guerrero, M.S., Parsons, J.T., and Bouton, A.H. (2012). Cas and NEDD9 Contribute to Tumor Progression through Dynamic Regulation of the Cytoskeleton. *Genes Cancer* 3, 371-381.

Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* 100, 57-70.

Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144, 646-674.

Hari, L., Brault, V., Kleber, M., Lee, H.Y., Ille, F., Leimeroth, R., Paratore, C., Suter, U., Kemler, R., and Sommer, L. (2002). Lineage-specific requirements of beta-catenin in neural crest development. *J Cell Biol* 159, 867-880.

Hari, L., Miescher, I., Shakhova, O., Suter, U., Chin, L., Taketo, M., Richardson, W.D., Kassaris, N., and Sommer, L. (2012). Temporal control of neural crest lineage generation by Wnt/beta-catenin signaling. *Development* 139, 2107-2117.

Harrison-Uy, S.J., and Pleasure, S.J. (2012). Wnt signaling and forebrain development. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 4, a008094.

Hodis, E., Watson, I.R., Kryukov, G.V., Arold, S.T., Imielinski, M., Theurillat, J.P., Nickerson, E., Auclair, D., Li, L., Place, C., *et al.* (2012). A landscape of driver mutations in melanoma. *Cell* 150, 251-263.

Hsu, M.Y., Wheelock, M.J., Johnson, K.R., and Herlyn, M. (1996). Shifts in cadherin profiles between human normal melanocytes and melanomas. *J Investig Dermatol Symp Proc* 1, 188-194.

Huber, A.H., Nelson, W.J., and Weis, W.I. (1997). Three-dimensional structure of the armadillo repeat region of beta-catenin. *Cell* 90, 871-882.

Hulsken, J., Birchmeier, W., and Behrens, J. (1994). E-cadherin and APC compete for the interaction with beta-catenin and the cytoskeleton. *J Cell Biol* 127, 2061-2069.

Hurlstone, A., and Clevers, H. (2002). T-cell factors: turn-ons and turn-offs. *EMBO J* 21, 2303-2311.

Ito, S., and Wakamatsu, K. (2011). Diversity of human hair pigmentation as studied by chemical analysis of eumelanin and pheomelanin. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 25, 1369-1380.

Jonsson, G., Busch, C., Knappskog, S., Geisler, J., Miletic, H., Ringner, M., Lillehaug, J.R., Borg, A., and Lonning, P.E. (2010). Gene expression profiling-based identification of molecular subtypes in stage IV melanomas with different clinical outcome. *Clin Cancer Res* 16, 3356-3367.

Joyce, J.A., and Pollard, J.W. (2009). Microenvironmental regulation of metastasis. *Nat Rev Cancer* 9, 239-252.

Jung, H.Y., Jun, S., Lee, M., Kim, H.C., Wang, X., Ji, H., McCrea, P.D., and Park, J.I. (2013). PAF and EZH2 induce Wnt/beta-catenin signaling hyperactivation. *Mol Cell* 52, 193-205.

Kim, A., Yang, Y., Lee, M.S., Yoo, Y.D., Lee, H.G., and Lim, J.S. (2008). NDRG2 gene expression in B16F10 melanoma cells restrains melanogenesis via inhibition of Mitf expression. *Pigment Cell Melanoma Res* 21, 653-664.

Kim, M., Gans, J.D., Nogueira, C., Wang, A., Paik, J.H., Feng, B., Brennan, C., Hahn, W.C., Cordon-Cardo, C., Wagner, S.N., *et al.* (2006). Comparative oncogenomics identifies NEDD9 as a melanoma metastasis gene. *Cell* 125, 1269-1281.

Kim, S.H., Xia, D., Kim, S.W., Holla, V., Menter, D.G., and Dubois, R.N. (2010). Human enhancer of filamentation 1 Is a mediator of hypoxia-inducible factor-1alpha-mediated migration in colorectal carcinoma cells. *Cancer Res* 70, 4054-4063.

Kunz, M. (2013). MicroRNAs in melanoma biology. *Adv Exp Med Biol* 774, 103-120.

Kunz, M., Dannemann, M., and Kelso, J. (2013). High-throughput sequencing of the melanoma genome. *Exp Dermatol* 22, 10-17.

Kuphal, S., and Bosserhoff, A. (2009). Recent progress in understanding the pathology of malignant melanoma. *J Pathol* 219, 400-409.

Kwong, L.N., and Davies, M.A. (2013). Navigating the therapeutic complexity of PI3K pathway inhibition in melanoma. *Clin Cancer Res* 19, 5310-5319.

Lagutin, O.V., Zhu, C.C., Kobayashi, D., Topczewski, J., Shimamura, K., Puelles, L., Russell, H.R., McKinnon, P.J., Solnica-Krezel, L., and Oliver, G. (2003). Six3 repression of Wnt signaling in the anterior neuroectoderm is essential for vertebrate forebrain development. *Genes Dev* 17, 368-379.

Lammermann, T., and Sixt, M. (2009). Mechanical modes of 'amoeboid' cell migration. *Curr Opin Cell Biol* 21, 636-644.

Larue, L., and Beermann, F. (2007). Cutaneous melanoma in genetically modified animals. *Pigment Cell Res* 20, 485-497.

Larue, L., and Delmas, V. (2006). The WNT/Beta-catenin pathway in melanoma. *Front Biosci* 11, 733-742.

Larue, L., Kumasaka, M., and Goding, C.R. (2003). Beta-catenin in the melanocyte lineage. *Pigment Cell Res* 16, 312-317.

Le Douarin, N.M., and Kalcheim, C. (1999). *The Neural Crest*, 2nd edition. Cambridge University Press.

Levy, C., Khaled, M., and Fisher, D.E. (2006). MITF: master regulator of melanocyte development and melanoma oncogene. *Trends Mol Med* 12, 406-414.

Li, A., Dawson, J.C., Forero-Vargas, M., Spence, H.J., Yu, X., Konig, I., Anderson, K., and Machesky, L.M. (2010). The actin-bundling protein fascin stabilizes actin in invadopodia and potentiates protrusive invasion. *Curr Biol* 20, 339-345.

Li, A., Ma, Y., Yu, X., Mort, R.L., Lindsay, C.R., Stevenson, D., Strathdee, D., Insall, R.H., Chernoff, J., Snapper, S.B., *et al.* (2011a). Rac1 drives melanoblast organization during mouse development by orchestrating pseudopod-driven motility and cell-cycle progression. *Dev Cell* 21, 722-734.

Li, A., and Machesky, L.M. (2012). Melanoblasts on the move: Rac1 sets the pace. *Small GTPases* 3, 115-119.

Li, F.Q., Mofunanya, A., Harris, K., and Takemaru, K. (2008). Chibby cooperates with 14-3-3 to regulate beta-catenin subcellular distribution and signaling activity. *J Cell Biol* 181, 1141-1154.

Li, Y., Bavarva, J.H., Wang, Z., Guo, J., Qian, C., Thibodeau, S.N., Golemis, E.A., and Liu, W. (2011b). HEF1, a novel target of Wnt signaling, promotes colonic cell migration and cancer progression. *Oncogene* 30, 2633-2643.

Loo, J.C., Liu, L., Hao, A., Gao, L., Agatep, R., Shennan, M., Summers, A., Goldstein, A.M., Tucker, M.A., Deters, C., *et al.* (2003). Germline splicing mutations of CDKN2A predispose to melanoma. *Oncogene* 22, 6387-6394.

Luciani, F., Champeval, D., Herbette, A., Denat, L., Aylaj, B., Martinozzi, S., Ballotti, R., Kemler, R., Goding, C.R., De Vuyst, F., *et al.* (2011). Biological and mathematical modeling of melanocyte development. *Development* 138, 3943-3954.

Mazar, J., DeYoung, K., Khaitan, D., Meister, E., Almodovar, A., Goydos, J., Ray, A., and Perera, R.J. (2010). The regulation of miRNA-211 expression and its role in melanoma cell invasiveness. *PLoS One* 5, e13779.

Meredith, P., and Riesz, J. (2004). Radiative relaxation quantum yields for synthetic eumelanin. *Photochem Photobiol* 79, 211-216.

Miller, A.J., Du, J., Rowan, S., Hershey, C.L., Widlund, H.R., and Fisher, D.E. (2004). Transcriptional regulation of the melanoma prognostic marker melastatin (TRPM1) by MITF in melanocytes and melanoma. *Cancer Res* 64, 509-516.

Miyamura, Y., Coelho, S.G., Wolber, R., Miller, S.A., Wakamatsu, K., Zmudzka, B.Z., Ito, S., Smuda, C., Passeron, T., Choi, W., *et al.* (2007). Regulation of human skin pigmentation and responses to ultraviolet radiation. *Pigment Cell Res* 20, 2-13.

Moore, K.A., and Lemischka, I.R. (2006). Stem cells and their niches. *Science* 311, 1880-1885.

Mosimann, C., Hausmann, G., and Basler, K. (2009). Beta-catenin hits chromatin: regulation of Wnt target gene activation. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10, 276-286.

Mouawad, R., Sebert, M., Michels, J., Bloch, J., Spano, J.P., and Khayat, D. (2010). Treatment for metastatic malignant melanoma: old drugs and new strategies. *Crit Rev Oncol Hematol* 74, 27-39.

Mouawad, R., Spano, J.P., Comperat, E., Capron, F., and Khayat, D. (2009). Tumoural expression and circulating level of VEGFR-3 (Flt-4) in metastatic melanoma patients: correlation with clinical parameters and outcome. *Eur J Cancer* 45, 1407-1414.

Mukhopadhyay, M., Shtrom, S., Rodriguez-Esteban, C., Chen, L., Tsukui, T., Gomer, L., Dorward, D.W., Glinka, A., Grinberg, A., Huang, S.P., *et al.* (2001). Dickkopf1 is required for embryonic head induction and limb morphogenesis in the mouse. *Dev Cell* 1, 423-434.

- N**atarajan, M., Stewart, J.E., Golemis, E.A., Pugacheva, E.N., Alexandropoulos, K., Cox, B.D., Wang, W., Grammer, J.R., and Gladson, C.L. (2006). HEF1 is a necessary and specific downstream effector of FAK that promotes the migration of glioblastoma cells. *Oncogene* *25*, 1721-1732.
- O**'Neill, G.M., and Golemis, E.A. (2001). Proteolysis of the docking protein HEF1 and implications for focal adhesion dynamics. *Mol Cell Biol* *21*, 5094-5108.
- O'Neill, G.M., Seo, S., Serebriiskii, I.G., Lessin, S.R., and Golemis, E.A. (2007). A new central scaffold for metastasis: parsing HEF1/Cas-L/NEDD9. *Cancer Res* *67*, 8975-8979.
- Oiso, N., Fukai, K., Kawada, A., and Suzuki, T. (2013). Piebaldism. *J Dermatol* *40*, 330-335.
- Ongenaes, K., Van Geel, N., and Naeyaert, J.M. (2003). Evidence for an autoimmune pathogenesis of vitiligo. *Pigment Cell Res* *16*, 90-100.
- Orgaz, J.L., and Sanz-Moreno, V. (2013). Emerging molecular targets in melanoma invasion and metastasis. *Pigment Cell Melanoma Res* *26*, 39-57.
- Orlow, S.J. (1995). Melanosomes are specialized members of the lysosomal lineage of organelles. *Journal of Investigative Dermatology* *105*, 3-7.
- Orsulic, S., and Peifer, M. (1996). An in vivo structure-function study of armadillo, the beta-catenin homologue, reveals both separate and overlapping regions of the protein required for cell adhesion and for wingless signaling. *J Cell Biol* *134*, 1283-1300.
- Osterlind, A., Tucker, M.A., Stone, B.J., and Jensen, O.M. (1988). The Danish case-control study of cutaneous malignant melanoma. II. Importance of UV-light exposure. *Int J Cancer* *42*, 319-324.
- P**ai, L.M., Kirkpatrick, C., Blanton, J., Oda, H., Takeichi, M., and Peifer, M. (1996). Drosophila alpha-catenin and E-cadherin bind to distinct regions of Drosophila Armadillo. *J Biol Chem* *271*, 32411-32420.
- Parri, M., and Chiarugi, P. (2010). Rac and Rho GTPases in cancer cell motility control. *Cell Commun Signal* *8*, 23.
- Petrie, R.J., Gavara, N., Chadwick, R.S., and Yamada, K.M. (2012). Nonpolarized signaling reveals two distinct modes of 3D cell migration. *J Cell Biol* *197*, 439-455.
- Pichot, C.S., Arvanitis, C., Hartig, S.M., Jensen, S.A., Bechill, J., Marzouk, S., Yu, J., Frost, J.A., and Corey, S.J. (2010). Cdc42-interacting protein 4 promotes breast cancer cell invasion and formation of invadopodia through activation of N-WASp. *Cancer Res* *70*, 8347-8356.
- Pinner, S., and Sahai, E. (2008). PDK1 regulates cancer cell motility by antagonising inhibition of ROCK1 by RhoE. *Nat Cell Biol* *10*, 127-137.

Pinon, P., and Wehrle-Haller, B. (2011). Integrins: versatile receptors controlling melanocyte adhesion, migration and proliferation. *Pigment Cell Melanoma Res* 24, 282-294.

Poincloux, R., Lizarraga, F., and Chavrier, P. (2009). Matrix invasion by tumour cells: a focus on MT1-MMP trafficking to invadopodia. *J Cell Sci* 122, 3015-3024.

Poy, F., Lepourcelet, M., Shivdasani, R.A., and Eck, M.J. (2001). Structure of a human Tcf4-beta-catenin complex. *Nat Struct Biol* 8, 1053-1057.

Prasad, M.S., Sauka-Spengler, T., and LaBonne, C. (2012). Induction of the neural crest state: control of stem cell attributes by gene regulatory, post-transcriptional and epigenetic interactions. *Dev Biol* 366, 10-21.

Raftopoulou, M., and Hall, A. (2004). Cell migration: Rho GTPases lead the way. *Dev Biol* 265, 23-32.

Reifenberger, J., Knobbe, C.B., Wolter, M., Blaschke, B., Schulte, K.W., Pietsch, T., Ruzicka, T., and Reifenberger, G. (2002). Molecular genetic analysis of malignant melanomas for aberrations of the WNT signaling pathway genes CTNNB1, APC, ICAT and BTRC. *Int J Cancer* 100, 549-556.

Ridley, A.J. (2011). Life at the leading edge. *Cell* 145, 1012-1022.

Rosin-Arbesfeld, R., Townsley, F., and Bienz, M. (2000). The APC tumour suppressor has a nuclear export function. *Nature* 406, 1009-1012.

Sabeh, F., Shimizu-Hirota, R., and Weiss, S.J. (2009). Protease-dependent versus -independent cancer cell invasion programs: three-dimensional amoeboid movement revisited. *J Cell Biol* 185, 11-19.

Sahai, E. (2007). Illuminating the metastatic process. *Nat Rev Cancer* 7, 737-749.

Sahai, E., and Marshall, C.J. (2003). Differing modes of tumour cell invasion have distinct requirements for Rho/ROCK signalling and extracellular proteolysis. *Nat Cell Biol* 5, 711-719.

Sanz-Moreno, V., Gadea, G., Ahn, J., Paterson, H., Marra, P., Pinner, S., Sahai, E., and Marshall, C.J. (2008). Rac activation and inactivation control plasticity of tumor cell movement. *Cell* 135, 510-523.

Sanz-Moreno, V., and Marshall, C.J. (2009). Rho-GTPase signaling drives melanoma cell plasticity. *Cell Cycle* 8, 1484-1487.

Sanz-Moreno, V., and Marshall, C.J. (2010). The plasticity of cytoskeletal dynamics underlying neoplastic cell migration. *Curr Opin Cell Biol* 22, 690-696.

Satoh, K., Kasai, M., Ishida, T., Tago, K., Ohwada, S., Hasegawa, Y., Senda, T., Takada, S., Nada, S., Nakamura, T., *et al.* (2004). Anteriorization of neural fate by inhibitor of beta-catenin and T cell factor (ICAT), a negative regulator of Wnt signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 8017-8021.

- Schaller, M.D. (2010). Cellular functions of FAK kinases: insight into molecular mechanisms and novel functions. *J Cell Sci* 123, 1007-1013.
- Schallreuter, K.U., Moore, J., Wood, J.M., Beazley, W.D., Gaze, D.C., Tobin, D.J., Marshall, H.S., Panske, A., Panzig, E., and Hibberts, N.A. (1999). In vivo and in vitro evidence for hydrogen peroxide (H₂O₂) accumulation in the epidermis of patients with vitiligo and its successful removal by a UVB-activated pseudocatalase. *J Investig Dermatol Symp Proc* 4, 91-96.
- Schoumacher, M., Goldman, R.D., Louvard, D., and Vignjevic, D.M. (2010). Actin, microtubules, and vimentin intermediate filaments cooperate for elongation of invadopodia. *J Cell Biol* 189, 541-556.
- Selzer, E., Wacheck, V., Lucas, T., Heere-Ress, E., Wu, M., Weilbaecher, K.N., Schlegel, W., Valent, P., Wrba, F., Pehamberger, H., *et al.* (2002). The melanocyte-specific isoform of the microphthalmia transcription factor affects the phenotype of human melanoma. *Cancer Res* 62, 2098-2103.
- Sheppard, K.E., and McArthur, G.A. (2013). The cell-cycle regulator CDK4: an emerging therapeutic target in melanoma. *Clin Cancer Res* 19, 5320-5328.
- Siegel, R., Ma, J., Zou, Z., and Jemal, A. (2014). Cancer statistics, 2014. *CA Cancer J Clin* 64, 9-29.
- Silye, R., Karayiannakis, A.J., Syrigos, K.N., Poole, S., van Noorden, S., Batchelor, W., Regele, H., Sega, W., Boesmueller, H., Krausz, T., *et al.* (1998). E-cadherin/catenin complex in benign and malignant melanocytic lesions. *J Pathol* 186, 350-355.
- Singh, M.K., Izumchenko, E., Klein-Szanto, A.J., Egleston, B.L., Wolfson, M., and Golemis, E.A. (2010). Enhanced genetic instability and dasatinib sensitivity in mammary tumor cells lacking NEDD9. *Cancer Res* 70, 8907-8916.
- Sinnberg, T., Menzel, M., Ewerth, D., Sauer, B., Schwarz, M., Schaller, M., Garbe, C., and Schitteck, B. (2011). beta-Catenin signaling increases during melanoma progression and promotes tumor cell survival and chemoresistance. *PLoS One* 6, e23429.
- Sommer, L. (2011). Generation of melanocytes from neural crest cells. *Pigment Cell Melanoma Res* 24, 411-421.
- Spiering, D., and Hodgson, L. (2011). Dynamics of the Rho-family small GTPases in actin regulation and motility. *Cell Adh Migr* 5, 170-180.
- Stadeli, R., Hoffmans, R., and Basler, K. (2006). Transcription under the control of nuclear Arm/beta-catenin. *Curr Biol* 16, R378-385.
- Straume, O., Smeds, J., Kumar, R., Hemminki, K., and Akslen, L.A. (2002). Significant impact of promoter hypermethylation and the 540 C>T polymorphism of CDKN2A in cutaneous melanoma of the vertical growth phase. *Am J Pathol* 161, 229-237.

Straussman, R., Morikawa, T., Shee, K., Barzily-Rokni, M., Qian, Z.R., Du, J., Davis, A., Mongare, M.M., Gould, J., Frederick, D.T., *et al.* (2012). Tumour micro-environment elicits innate resistance to RAF inhibitors through HGF secretion. *Nature* 487, 500-504.

Tago, K., Nakamura, T., Nishita, M., Hyodo, J., Nagai, S., Murata, Y., Adachi, S., Ohwada, S., Morishita, Y., Shibuya, H., *et al.* (2000). Inhibition of Wnt signaling by ICAT, a novel beta-catenin-interacting protein. *Genes Dev* 14, 1741-1749.

Takemaru, K., Fischer, V., and Li, F.Q. (2009). Fine-tuning of nuclear-catenin by Chibby and 14-3-3. *Cell Cycle* 8, 210-213.

Takemaru, K., Yamaguchi, S., Lee, Y.S., Zhang, Y., Carthew, R.W., and Moon, R.T. (2003). Chibby, a nuclear beta-catenin-associated antagonist of the Wnt/Wingless pathway. *Nature* 422, 905-909.

Takemaru, K.I., Ohmitsu, M., and Li, F.Q. (2008). An oncogenic hub: beta-catenin as a molecular target for cancer therapeutics. *Handb Exp Pharmacol*, 261-284.

Taylor, K.M., and LaBonne, C. (2007). Modulating the activity of neural crest regulatory factors. *Curr Opin Genet Dev* 17, 326-331.

Thomas, A.J., and Erickson, C.A. (2008). The making of a melanocyte: the specification of melanoblasts from the neural crest. *Pigment Cell Melanoma Res* 21, 598-610.

Tortora, G., Derrickson B. and Forest M. (2007). Principe d'anatomie et de physiologie, 4e édition edn (De Boek).

Tozluoglu, M., Tournier, A.L., Jenkins, R.P., Hooper, S., Bates, P.A., and Sahai, E. (2013). Matrix geometry determines optimal cancer cell migration strategy and modulates response to interventions. *Nat Cell Biol* 15, 751-762.

Trunzer, K., Pavlick, A.C., Schuchter, L., Gonzalez, R., McArthur, G.A., Hutson, T.E., Moschos, S.J., Flaherty, K.T., Kim, K.B., Weber, J.S., *et al.* (2013). Pharmacodynamic effects and mechanisms of resistance to vemurafenib in patients with metastatic melanoma. *J Clin Oncol* 31, 1767-1774.

Tu, C., Zhao, D., and Lin, X. (2001). Levels of neuropeptide-Y in the plasma and skin tissue fluids of patients with vitiligo. *J Dermatol Sci* 27, 178-182.

Tucker, M.A., and Goldstein, A.M. (2003). Melanoma etiology: where are we? *Oncogene* 22, 3042-3052.

Tutter, A.V., Fryer, C.J., and Jones, K.A. (2001). Chromatin-specific regulation of LEF-1-beta-catenin transcription activation and inhibition in vitro. *Genes Dev* 15, 3342-3354.

Van de Wetering, M., Cavallo, R., Dooijes, D., van Beest, M., van Es, J., Loureiro, J., Ypma, A., Hursh, D., Jones, T., Bejsovec, A., *et al.* (1997). Armadillo coactivates transcription driven by the product of the *Drosophila* segment polarity gene dTCF. *Cell* 88, 789-799.

- Waardenburg, P.J. (1951). A new syndrome combining developmental anomalies of the eyelids, eyebrows and nose root with pigmentary defects of the iris and head hair and with congenital deafness. *Am J Hum Genet* 3, 195-253.
- Wang, H.H., Chen, H.S., Li, H.B., Zhang, H., Mei, L.Y., He, C.F., Wang, X.W., Men, M.C., Jiang, L., Liao, X.B., *et al.* (2014). Identification and functional analysis of a novel mutation in the SOX10 gene associated with Waardenburg syndrome type IV. *Gene* 538, 36-41.
- Webster, M.R., and Weeraratna, A.T. (2013). A Wnt-er migration: the confusing role of beta-catenin in melanoma metastasis. *Sci Signal* 6, pe11.
- Wehrle-Haller, B., and Weston, J.A. (1995). Soluble and cell-bound forms of steel factor activity play distinct roles in melanocyte precursor dispersal and survival on the lateral neural crest migration pathway. *Development* 121, 731-742.
- Wildhardt, G., Zirn, B., Graul-Neumann, L.M., Wechtenbruch, J., Suckfull, M., Buske, A., Bohring, A., Kubisch, C., Vogt, S., Strobl-Wildemann, G., *et al.* (2013). Spectrum of novel mutations found in Waardenburg syndrome types 1 and 2: implications for molecular genetic diagnostics. *BMJ Open* 3.
- Willert, K., and Jones, K.A. (2006). Wnt signaling: is the party in the nucleus? *Genes Dev* 20, 1394-1404.
- Wilson, Y.M., Richards, K.L., Ford-Perriss, M.L., Panthier, J.J., and Murphy, M. (2004). Neural crest cell lineage segregation in the mouse neural tube. *Development* 131, 6153-6162.
- Winnepenninckx, V., Lazar, V., Michiels, S., Dessen, P., Stas, M., Alonso, S.R., Avril, M.F., Ortiz Romero, P.L., Robert, T., Balacescu, O., *et al.* (2006). Gene expression profiling of primary cutaneous melanoma and clinical outcome. *J Natl Cancer Inst* 98, 472-482.
- Winston, J.T., Strack, P., Beer-Romero, P., Chu, C.Y., Elledge, S.J., and Harper, J.W. (1999). The SCFbeta-TRCP-ubiquitin ligase complex associates specifically with phosphorylated destruction motifs in IkappaBalpha and beta-catenin and stimulates IkappaBalpha ubiquitination in vitro. *Genes Dev* 13, 270-283.
- Wolf, K., Mazo, I., Leung, H., Engelke, K., von Andrian, U.H., Deryugina, E.I., Strongin, A.Y., Brocker, E.B., and Friedl, P. (2003). Compensation mechanism in tumor cell migration: mesenchymal-amoeboid transition after blocking of pericellular proteolysis. *J Cell Biol* 160, 267-277.
- Wolf, K., Wu, Y.I., Liu, Y., Geiger, J., Tam, E., Overall, C., Stack, M.S., and Friedl, P. (2007). Multi-step pericellular proteolysis controls the transition from individual to collective cancer cell invasion. *Nat Cell Biol* 9, 893-904.
- Woodman, S.E., Lazar, A.J., Aldape, K.D., and Davies, M.A. (2012). New strategies in melanoma: molecular testing in advanced disease. *Clin Cancer Res* 18, 1195-1200.

Wu, Z., Zheng, S., Li, Z., Tan, J., and Yu, Q. (2011). E2F1 suppresses Wnt/beta-catenin activity through transactivation of beta-catenin interacting protein ICAT. *Oncogene* 30, 3979-3984.

Xing, Y., Takemaru, K., Liu, J., Berndt, J.D., Zheng, J.J., Moon, R.T., and Xu, W. (2008). Crystal structure of a full-length beta-catenin. *Structure* 16, 478-487.

Xu, Y., Brenn, T., Brown, E.R., Doherty, V., and Melton, D.W. (2012). Differential expression of microRNAs during melanoma progression: miR-200c, miR-205 and miR-211 are downregulated in melanoma and act as tumour suppressors. *Br J Cancer* 106, 553-561.

Yaar, M., and Gilchrist, B.A. (2004). Melanocyte biology: Before, during, and after the Fitzpatrick era. *Journal of Investigative Dermatology* 122, Xxvii-Xxix.

Yamazaki, D., Kurisu, S., and Takenawa, T. (2009). Involvement of Rac and Rho signaling in cancer cell motility in 3D substrates. *Oncogene* 28, 1570-1583.

Yang, P.T., Anastas, J.N., Toroni, R.A., Shinohara, M.M., Goodson, J.M., Bosserhoff, A.K., Chien, A.J., and Moon, R.T. (2012). WLS inhibits melanoma cell proliferation through the beta-catenin signalling pathway and induces spontaneous metastasis. *EMBO Mol Med* 4, 1294-1307.

Yasumoto, K., Yokoyama, K., Shibata, K., Tomita, Y., and Shibahara, S. (1994). Microphthalmia-associated transcription factor as a regulator for melanocyte-specific transcription of the human tyrosinase gene. *Mol Cell Biol* 14, 8058-8070.

Yasumoto, K., Yokoyama, K., Takahashi, K., Tomita, Y., and Shibahara, S. (1997). Functional analysis of microphthalmia-associated transcription factor in pigment cell-specific transcription of the human tyrosinase family genes. *J Biol Chem* 272, 503-509.

Zhao, X., and Guan, J.L. (2011). Focal adhesion kinase and its signaling pathways in cell migration and angiogenesis. *Adv Drug Deliv Rev* 63, 610-615.

Zhong, J., Baquiran, J.B., Bonakdar, N., Lees, J., Ching, Y.W., Pugacheva, E., Fabry, B., and O'Neill, G.M. (2012). NEDD9 stabilizes focal adhesions, increases binding to the extra-cellular matrix and differentially effects 2D versus 3D cell migration. *PLoS One* 7, e35058.

ANNEXES

Au cours de ma thèse, j'ai pu participer à l'écriture de deux revues publiées en 2013 dans les journaux « Médecine Sciences » et « Pigment Cell and Melanoma Research » respectivement.

J'ai également établi une collaboration avec le laboratoire de Judith Favier à l'Hôpital Georges Pompidou à Paris. Un article, sur lequel je suis deuxième auteur, est actuellement en cours de préparation.

➤ Revue 1 :

Migration des cellules du lignage mélanocytaire. Mélanie J. Domingues, Lionel Larue, Jacky Bonaventure. Med Sci (Paris). 2013 Mar;29(3):287-92.

➤ Revue 2 :

Cellular and molecular mechanisms controlling the migration of melanocytes and melanoma cell. Jacky Bonaventure, Mélanie J. Domingues and Lionel Larue. Pigment Cell Melanoma Res. 2013 May;26(3):316-25

➤ Article 3:

Sdhb deficient chromaffin cells display EMT-like phenotype characterized by invasive and migratory properties, in which cytoskeleton protein KRT19 is an important player. Manuscript in preparation. Lorient C, Domingues MJ, Berger A, Menara M, Castro-Vega LJ, Bemelmans A, Larue L, Gimenez-Roqueplo AP, Favier J.

Revue 1
Migration des cellules du lignage
mélanocytaire

► Au cours du développement embryonnaire chez les vertébrés, la migration des mélanocytes et de leurs précurseurs, les mélanoblastes, le long de l'axe dorso-latéral et le franchissement de la membrane basale séparant le derme de l'épiderme permettent leur localisation au niveau des zones interfolliculaires et folliculaires des poils. La transformation néoplasique convertit les mélanocytes en cellules de mélanome fortement invasives pouvant adopter deux modes de migration interconvertibles. Cette revue décrit comment les mutants naturels de souris, les modèles générés par ciblage génique et les systèmes de culture *in vitro*, ont permis l'identification des gènes, des voies de signalisation et des mécanismes qui régulent la migration des cellules normales et pathologiques du lignage mélanocytaire. ◀

La migration cellulaire est un processus complexe et hétérogène qui concerne l'ensemble des cellules nucléées au cours du développement embryonnaire. Elle est limitée une fois la différenciation terminale des cellules accomplie, mais peut être réactivée lors du processus d'invasion tumorale. Dans cette revue, nous nous intéresserons plus particulièrement à la migration des mélanocytes et de leurs précurseurs, les mélanoblastes, au cours du développement embryonnaire normal. Nous insisterons également sur les mécanismes cellulaires et moléculaires régissant la migration *in vitro* en système bi (2D) et tridimensionnel (3D). Enfin, nous aborderons l'aspect pathologique de la migration associée à l'invasion tumorale et à la formation de métastases par les cellules de mélanome.

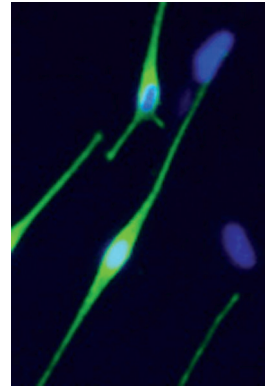
Migration des mélanocytes au cours du développement normal

Les mélanocytes sont des cellules dendritiques mélanisées impliquées dans la pigmentation de nombreuses espèces animales [1] et, aussi, dans la couleur de la peau, des yeux, des poils et des cheveux chez l'homme.

Vignette (Photo © Inserm - Christine Baldeschi).

Migration des cellules du lignage mélanocytaire

Mélanie J. Domingues, Lionel Larue, Jacky Bonaventure



Institut Curie,
CNRS UMR3347, Inserm U1021,
Génétique du développement
des mélanocytes, Centre
de recherche, bâtiment 110,
91405 Orsay, France.
lionel.larue@curie.fr

Ces cellules productrices de mélanine dérivent des cellules de la crête neurale (CCN). Il existe deux sous-populations de CCN qui, après prolifération, peuvent emprunter deux voies majeures de migration lors de leur développement (Figure 1). La voie dorso-ventrale sera à l'origine des cellules du système nerveux périphérique, et la voie dorso-latérale sera à l'origine des mélanocytes [2]. La compréhension des processus de migration des cellules pigmentaires a largement bénéficié des modèles animaux et, tout particulièrement, du modèle murin. Chez la souris, la spécification des CCN en mélanoblastes fondateurs intervient aux jours embryonnaires 8,5-9,5 (E8,5-E9,5) dans la région troncale de l'embryon. Les mélanoblastes fondateurs prolifèrent activement dans une région acellulaire, MSA (*migrating staging area* : aire de pause de migration), localisée entre l'épiderme, le tube neural et le somite. Au stade E10,5, tout en continuant à proliférer, les mélanoblastes précurseurs commencent leur migration à partir de la MSA entre les somites et l'ectoderme selon un gradient temporel rostro-caudal. Une partie des mélanoblastes migrants commence à franchir la lame basale séparant le derme de l'épiderme dès E11,5, et l'autre partie continue à migrer dorso-latéralement dans le derme jusqu'au stade E15,5, tout en continuant à franchir la basale [3]. En dépit d'une prolifération active dans le derme, le nombre de mélanoblastes reste constant. Ceci pourrait s'expliquer par une division cellulaire asymétrique donnant naissance à une cellule fille qui migrerait dans l'épiderme alors que l'autre resterait dans le derme [3]. La colonisation des follicules pileux débute à partir de E15,5. À la naissance des souris, les mélanocytes sont principalement présents dans l'épiderme des zones folliculaire et interfolliculaire. Ils disparaissent rapidement pour ne laisser place qu'aux mélanocytes folliculaires. Alors que les CCN migrant selon la voie dorso-ventrale ont longtemps été

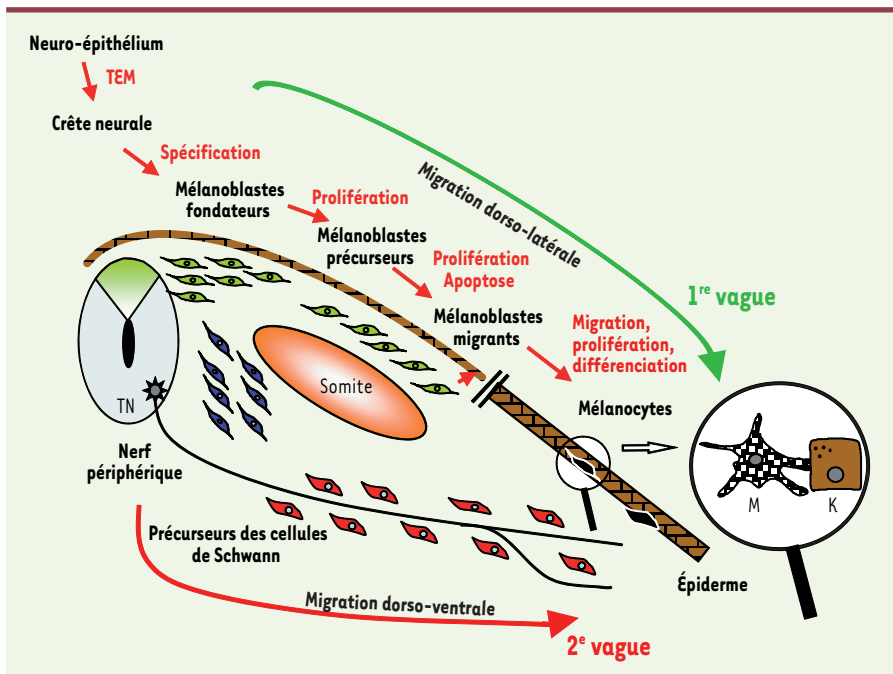


Figure 1. Spécification des mélanocytes à partir des cellules de crête neurale (CCN). Au stade E9, les CCN migrant le long de la voie dorso-latérale sont spécifiés et se différencient en mélanoblastes, puis en mélanocytes de la 1^{re} vague. Les CCN migrant selon la voie dorso-ventrale peuvent générer plusieurs types cellulaires, dont les précurseurs des cellules de Schwann qui migrent le long des nerfs périphériques innervant la peau. Certaines de ces cellules peuvent se détacher des nerfs pour générer les mélanocytes de la 2^e vague. Cette spécification a lieu au stade E12,5. Nous ne savons pas encore si ces mélanocytes résultent d'une dédifférenciation des précurseurs des cellules de Schwann ou dérivent de cellules souches bipotentes associées aux nerfs. TN : tube neural ; TEM : transition épithélio-mésenchymateuse ; M : mélanocyte ; K : kératinocyte.

considérées comme source d'un grand nombre de précurseurs, dont les cellules de Schwann et les neurones, une étude récente a montré que, chez le poulet et la souris, les cellules de Schwann seraient capables de se différencier en mélanocytes [4]. Ces cellules, dont l'apparition serait postérieure aux mélanocytes de la première vague (voie dorso-latérale), migreraient préférentiellement dans les membres en suivant les nerfs, et correspondraient aux mélanocytes de la deuxième vague (Figure 1). L'importance relative de cette deuxième vague est controversée en termes numérique et spatial.

Aspects génétiques et moléculaires de la migration au cours du développement

La compréhension des mécanismes moléculaires impliqués dans la migration des mélanoblastes au cours du développement chez les vertébrés s'appuie sur l'étude de différents modèles animaux : souris, poulet, poisson zèbre et xénope. Le modèle aviaire a largement contribué à l'étude des CCN et a permis de montrer l'importance de deux familles de protéines extrêmement versatiles, les intégrines et les cadhérines, non seulement dans le processus d'adhésion à la matrice extracellulaire, mais également au cours de la migration qui s'accompagne de

modifications de leur profil d'expression [5, 6]. Certains des gènes identifiés comme responsables de la migration chez la souris, tel le gène *Kit*, sont également impliqués dans ce phénomène chez le poisson-zèbre. Cependant, leur fonction diffère à cause de la complexité de la mélanogenèse chez les poissons ou les amphibiens qui repose sur l'existence d'au moins quatre types cellulaires (mélanoblastes, leucoblastes, xanthoblastes et iridoblastes) migrant selon des voies différentes et encore mal explorées [7]. Chez le poulet, le facteur de transcription FoxD3 régule la formation des mélanoblastes en réprimant la migration dorso-latérale des CCN. De même, le complexe éphrine-B/ephrin B-récepteur réprime initialement la migration des CCN selon la voie dorso-latérale (après 12 jours de développement) mais, à partir du stade 18 jours, il stimule la migration des mélanoblastes [8]. Néanmoins, aucun mécanisme équivalent n'a été retrouvé ni chez le poisson-zèbre, ni chez la souris. Les travaux chez la souris ont largement bénéficié de l'existence de mutants

présentant un phénotype de taches blanches au niveau du pelage. Les mutants *Microphthalmia* (*Mitf*), *dominant white spotting* (*Kit*), *Steel* (*Kitl*), *Piebald* (*EdnrB*) et *lethal spotting* (*Edn3*) ont permis d'identifier les gènes et les protéines essentiels à la première étape de migration des mélanoblastes, qui suit leur délamination à partir du tube neural [1]. Ainsi, le ligand *Edn3* (endothéline 3) produit par l'ectoderme se lie au récepteur *EdnrB* exprimé par les mélanoblastes. Le ligand *Kitl* produit dans le dermomyotome, le derme et le follicule pileux, se lie au récepteur à activité tyrosine kinase *c-Kit* exprimé par les mélanoblastes. Seuls les mélanoblastes exprimant le récepteur *c-Kit* et le facteur transcriptionnel *Mitf* (*microphthalmia-associated transcription factor*) peuvent répondre aux signaux attractifs et répulsifs contrôlant la migration. Le produit du gène *Mitf*, et plus particulièrement l'isoforme M-*Mitf*, spécifique du lignage mélanocytaire, joue un rôle central dans les mélanoblastes/mélanocytes, non seulement en assurant leur spécification et leur survie, mais également en participant aux stades primaire (dorso-latéral) et secondaire (ventral) de la migration.

Il n'est donc pas surprenant que des mutations spontanées de certains gènes régulateurs de l'expression de *M-Mitf*, incluant *Sox10* (mutant *dominant megacolon*) et *Pax3* (mutant *Spotch*), puissent produire un phénotype de taches blanches. Chez l'humain, des mutations de ces gènes sont à l'origine d'une série de maladies pigmentaires monogéniques. Ainsi, des mutations hétérozygotes de *SOX10* sont responsables du syndrome de Waardenburg-Shah (WS4C), alors que celles de *PAX 3* sont à l'origine du syndrome de Waardenburg de type 1 (WS1 ou WS3) qui se distingue du précédent par l'absence d'anomalies du côlon. Les mutations de *c-KIT* sont associées au piebaldisme et celles de *MITF* au syndrome de Waardenburg de type 2 (WS2A) ou au syndrome de Tietz. La similitude des anomalies pigmentaires, notamment la présence de taches blanches sur la peau des patients, font des mutants *dominant megacolon* et *Spotch* d'excellents modèles pour l'étude de ces maladies. Outre ces mutants naturels, les techniques de transgénèse chez la souris ont permis d'identifier d'autres gènes régulateurs de la migration, notamment le gène *Ctnnb1* codant pour la protéine β -caténine. Celle-ci contrôle l'expression de *M-Mitf* en agissant comme co-activateur des facteurs de la famille LEF (*lymphoid enhancer factor*)/TCF (*T cell factor*) qui se fixent sur le promoteur de *M-Mitf*. La surexpression d'une forme activée de β -caténine (β -cat*), localisée spécifiquement au niveau nucléaire, est associée à la présence d'un ventre blanc, résultat d'un défaut de migration des mélanoblastes au cours du développement [9]. Grâce à ce modèle, une implication des gènes *M-Mitf* et *Csk* (régulateur de Src) dans le défaut de migration des mélanocytes chez les souris β -cat* a pu être démontrée. Un autre gène clé de la migration *in vivo* des mélanocytes est le gène codant pour la GTPase Rac1. Chez le poisson-zèbre, Rac1 régule la migration des cellules de la crête neurale [10]. Son invalidation spécifique dans les mélanoblastes de souris génère un ventre blanc. L'absence de Rac1 provoque une réduction de la vitesse de migration des mélanoblastes, mais n'abolit pas le passage des mélanocytes du derme vers l'épiderme, ni la colonisation des follicules pileux [11]. L'importance de Rac1 lors de la migration a été confortée par la démonstration que l'invalidation chez la souris de P-Rex1, un membre de la famille GEF (Rho GTPase *guanine nucleotide exchange factors*) activant la formation de Rac-GTP, se traduit également par l'apparition d'un ventre blanc [12].

Modes de migration et mécanismes moléculaires associés

Nous disposons de peu d'informations concernant le mode de migration des mélanocytes *in vivo* car, compte tenu de leur nombre limité, la plupart des études ont été réalisées *in vitro* en système 2D avec des lignées de cellules de mélanome. L'utilisation récente de systèmes de culture 3D, qui recréent un environnement moins éloigné de la situation *in vivo*, a mis en évidence des différences marquées entre les deux systèmes que nous présentons dans cette section.

La migration 2D

Pour se déplacer en système 2D, les cellules doivent former des extensions de leur membrane plasmique (protrusions) au niveau du front de migration, de façon coordonnée avec le reste du corps cellulaire.

Pour les cellules adhésives, deux types de protrusions coexistent, les lamellipodes et les filopodes, dont la structure et la composition moléculaire diffèrent [13]. Ces structures apparaissent de manière spontanée ou sont induites par des signaux externes émanant du microenvironnement. La migration est donc basée sur des cycles successifs d'extensions membranaires, d'adhésion, de traction du corps cellulaire et de rétraction, impliquant une dissymétrie entre l'avant et l'arrière de la cellule [14].

Mécanismes moléculaires associés à la migration 2D

Le cytosquelette d'actine et les molécules régulatrices de sa polymérisation sont impliqués dans tous les types de protrusions. En conséquence, l'assemblage et le désassemblage de l'actine sont des éléments clés de la migration cellulaire. La transmission des signaux des récepteurs membranaires au cytosquelette d'actine est assurée par les petites GTPases de la famille Rho qui oscillent entre une forme active liée au GTP et une forme inactive liée au GDP [15]. Elles sont régulées par deux familles de protéines : les GEF (*guanine nucleotide exchange factor*), qui favorisent la formation de la forme active, et les GAP (*GTPase activating proteins*) qui assurent l'inactivation par hydrolyse du GTP [16]. Les GTPases Rac et Cdc42 régulent respectivement la formation des lamellipodes et des filopodes, en induisant la polymérisation des filaments d'actine. Ceci permet l'extension du front de migration *via* l'activation successive des protéines de la famille WASP (*Wiskott-Aldrich syndrome protein*) et du complexe Arp2/3, régulateur de la polymérisation de l'actine [17]. Les protéines Dia1 et Dia2, membres de la famille des formines, participent également à l'extension du front de migration au niveau des lamellipodes et des filopodes, respectivement. En effet, ces protéines protègent les extrémités des filaments d'actine, empêchant ainsi l'arrêt de leur croissance [13]. Néanmoins, dans certaines lignées de mélanome, une réduction d'expression de *M-Mitf* induirait une diminution du taux de Dia1 et augmenterait la migration de ces cellules [18].

La migration 3D

Lorsqu'elles migrent individuellement en système 3D, certaines cellules de mélanome peuvent adopter deux morphologies et types de migration interconvertibles : le mode de migration mésenchymateux et le mode amiboïde, qui leur permettent de s'adapter à des variations du microenvironnement [19, 20] (Figure 2). Récemment, nous avons observé que certaines cellules de mélanome peuvent également adopter le mode de migration amiboïde en système 2D. Le mode de

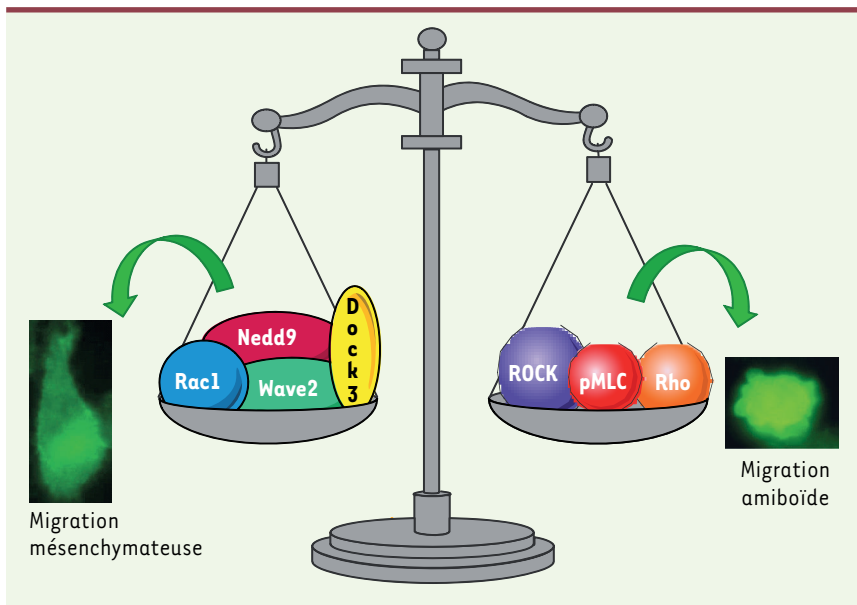


Figure 2. Représentation schématique des molécules régulant l'équilibre et l'inter-convertibilité entre les modes de migration mésenchymateux et amoiboïde. En système 3D, les cellules tumorales peuvent adopter deux types de migration interconvertibles : le mode mésenchymateux (morphologie allongée) et le mode amoiboïde (morphologie arrondie et présence de *bleb*). Les cellules de mélanome sont capables de changer spontanément de type de migration de façon à s'adapter à leur microenvironnement. Le mode de migration mésenchymateux dépend de l'activation de Rac et Wave2 par le complexe Nedd9-Dock3. Le mode de migration amoiboïde est largement associé au niveau de phosphorylation de la myosine II (pMLC) ainsi qu'à la contractilité des filaments d'actine-myosine sous le contrôle de Rho/ROCK. Rac et Rho ont des effets opposés sur la migration des cellules de mélanome.

migration mésenchymateux est caractéristique des cellules adhérentes qui présentent une morphologie allongée et bipolaire, et qui interagissent avec les composants de la matrice extracellulaire (MEC) au niveau des points d'adhésion focaux. Bien qu'il existe des ressemblances avec la migration 2D, les contraintes spatiales liées aux fibres de la MEC imposent des modifications de la morphologie cellulaire. Les lamellipodes sont remplacés par des pseudopodes orientés dans les trois dimensions, et des protéases nécessaires au remodelage de la MEC sont sécrétées [20, 21]. La vitesse de migration de ces cellules est relativement lente (0,1 $\mu\text{m}/\text{min}$) [22].

Le mode de migration amoiboïde est associé à une morphologie arrondie et repose sur le principe que la motilité en système 3D ne requiert pas nécessairement l'attachement de la cellule à son substrat [23]. Le mouvement s'effectue *via* la création de *bleb*, extensions courtes et sphériques de la membrane plasmique dépourvues d'actine et de très courte durée de vie. La formation initiale du *bleb* résulte d'un détachement local de l'actine corticale ou de sa rupture. L'augmentation de la pression intracellulaire génère alors un afflux de cytosol au niveau de la membrane qui permet l'extension du *bleb*. Pour que les *bleb* induisent une migration, ils doivent se former principalement au niveau du front de migration [24]. Dans ce contexte, la cellule est capable de s'insérer dans les cavités naturelles de la matrice sans qu'une protéolyse soit nécessaire. La vitesse de migration des cellules

utilisant ce mécanisme varie entre 1 et 10 $\mu\text{m}/\text{min}$ [22].

Mécanismes moléculaires associés à la migration 3D

La migration 3D selon le mode mésenchymateux fait intervenir un complexe entre Nedd9 (*neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated 9*) (membre de la famille CAS) et Dock3 (membre de la famille GEF) qui permet l'activation de la protéine Rac1. Cette GTPase active la protéine Wave2 (membre de la famille WASP) qui régule le complexe Arp2/3 impliqué dans la polymérisation de l'actine [19]. Le mode de migration amoiboïde est contrôlé par le complexe Rho/Rock qui assure la phosphorylation de la myosine II (MLC2). La transition d'un mode mésenchymateux de migration vers le mode amoiboïde associe une diminution de Rac-GTP et une augmentation de la phosphorylation de MLC2, montrant ainsi que Rac1 et Rho ont des effets opposés sur la migration des cellules de mélanome [19] (Figure 2).

Migration et invasion des mélanomes

Les mélanomes, tumeurs cutanées hautement métastatiques, résultent de la transformation maligne des mélanocytes. L'invasion des mélanomes résulte de la combinaison de différents mécanismes : la transition pseudo épithélio-mésenchymateuse, la perte de l'adhésion cellule-cellule, la perte de l'adhésion cellule-matrice, la dégradation de la matrice, la chimioattraction/répulsion et la migration. Au cours de la phase de croissance radiale, les mélanocytes prolifèrent de façon aberrante et réduisent leur interaction avec les kératinocytes, *via* une perte d'expression des cadhérines E et P et de la desmoglérine. Cette phase est suivie d'une phase de croissance verticale marquant le début du phénomène de migration, puisque les cellules de mélanome migrent de l'épiderme vers le derme en franchissant la lame basale. Cette *transmigration*, inverse de la migration normale des mélanoblastes, est une étape clé de la formation des métastases et s'accompagne d'une expression *de novo* de l'intégrine $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ [5]. Selon les études effectuées en système 3D, la présence d'invadopodes, protrusions de la membrane plasmique

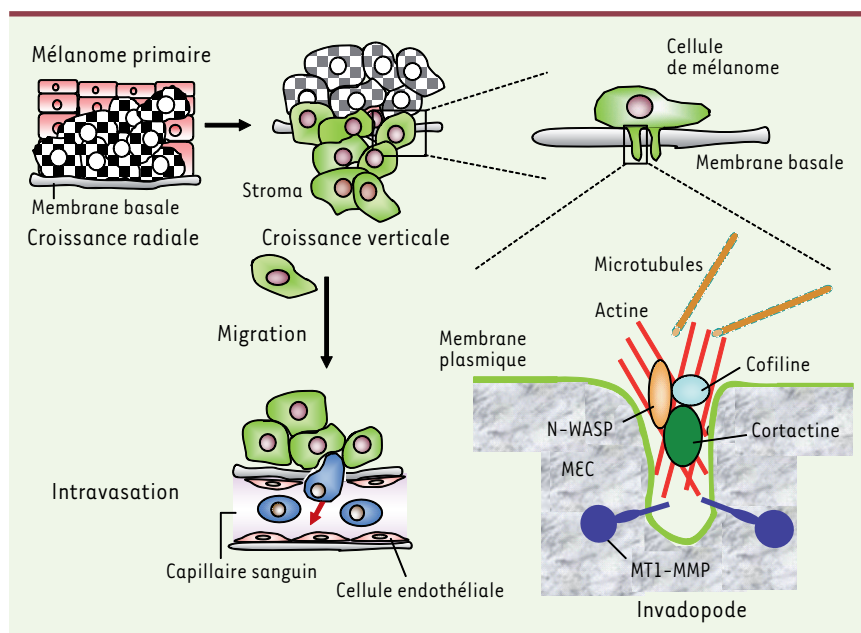


Figure 3. Représentation schématique des étapes initiales conduisant à la formation de métastases à partir d'un mélanome primaire. Au cours de la phase de croissance radiale, les cellules tumorales non invasives (grises) prolifèrent de façon horizontale dans l'épiderme pour former un mélanome primaire. Au cours de la phase de croissance verticale, les cellules deviennent capables de passer dans le derme en dégradant la membrane basale (cellules vertes). Ce processus requiert la formation d'invadopodes permettant la production de métalloprotéases qui assurent la protéolyse de la matrice extracellulaire (MEC). Quelques-unes des protéines (N-WASP, cofiline, cortactine) essentielles à l'assemblage et à la maturation des fibres d'actine dans les invadopodes sont représentées. La protéase MT1-MMP est transportée à l'extrémité des invadopodes grâce aux microtubules. Certaines cellules s'extirpent de la masse tumorale et migrent dans le stroma pour atteindre les vaisseaux, dont elles peuvent dégrader la paroi (c'est le phénomène d'intravasation) (cellules bleues).

riches en actine, serait essentielle au franchissement de la membrane basale (Figure 3). La formation des invadopodes dans des cellules de morphologie mésenchymateuse requiert la présence de cortactine (protéine absente des lamellipodes et des filopodes) qui se lie à l'actine et à la cofiline [25]. L'élongation des filaments d'actine, via une déphosphorylation de la cofiline, et leur stabilisation par la fascine (normalement exprimée par les mélanocytes) participerait au processus d'invasion grâce aux métalloprotéases, notamment MT1-MMP (*matrix metalloproteinase*). Ces enzymes, libérées à l'extrémité de l'invadopode [13, 26], sont capables de dégrader la MEC permettant la progression des cellules de mélanome [27]. Cependant, l'absence d'invadopodes dans les mélanocytes normaux indique que les cellules de mélanome et les mélanocytes utilisent des protrusions membranaires et des protéines distinctes pour migrer [25, 28]. Les cellules de mélanome ne dégradent pas entièrement la membrane basale, mais créent, grâce à l'action des invadopodes, des petites perforations. Celles-ci vont ouvrir la voie à la dissémination des cellules dans le derme et à leur interaction avec les cellules endothéliales, préambule à l'intravasation des capillaires sanguins (Figure 3). Les études transcriptomiques ont identifié de nombreux gènes dont l'expression est altérée dans les cellules de mélanome devenues invasives. Parmi

ceux-ci, on trouve ceux qui codent pour de nombreux facteurs de croissance, dont le TGF β (*transforming growth factor β*). Celui-ci jouerait un rôle important dans l'invasion en conférant aux cellules peu pigmentées et exprimant fortement Brn2/N-oct3, un phénotype mésenchymateux favorisant le passage au travers de la MEC [29]. Parmi les nombreuses molécules participant activement au processus d'invasion des cellules de mélanome, nous citerons la protéine adaptatrice Nedd9, dont l'expression est souvent amplifiée dans les mélanomes ayant métastasé. Nedd9 participerait à la migration 3D en promouvant la transition amoiboïde/mésenchymateux [19, 30] ; cependant, ce mécanisme reste controversé *in vivo* [31].

Conclusion et perspectives

L'élucidation des mécanismes contrôlant la migration des cellules de mélanome a largement bénéficié des études *in vitro* en systèmes 2D et 3D. Cependant, notre compréhension de la colonisation métastatique par quelques cellules tumorales de tissus situés à une grande distance de la tumeur primaire est nettement plus limitée. Les études *in vivo* des cellules du lignage mélanocytaire normal sont encore peu nombreuses, car délicates à mener chez la souris. Nul doute que l'utilisation de modèles, tels que celui du poisson-zèbre, et l'émergence de nouvelles techniques de culture *ex vivo* couplées à l'imagerie en temps réel avec des microscopes à haute résolution, permettront des progrès marquants dans un futur proche. \diamond

SUMMARY

Migration of melanocytic lineage-derived cells

During development, neural crest cells-derived melanoblasts migrate along the dorso-lateral axis into the dermis, then cross the basal layer to reach the epidermis and differentiate into melanocytes. They finally colonize the hair follicles to become resident pigmented cells. Neoplastic transformation converts melanocytes into highly invasive melanoma cells, which can adopt two modes of interconvertible migration (mesenchymal and amoeboid). Through analysis of the coat color phenotype of natural mouse mutants and genetically modified

animals, many of the genes regulating migration were identified. Deciphering of cell membrane protrusions and signaling molecules involved in melanoma cell motility was further achieved through 2D and 3D culture systems. Here, we summarize how these data allow a better understanding of the complex mechanisms controlling migration of normal and pathological cells of the melanocytic lineage. ♦

LIENS D'INTÉRÊT

Les auteurs déclarent n'avoir aucun lien d'intérêt concernant les données publiées dans cet article.

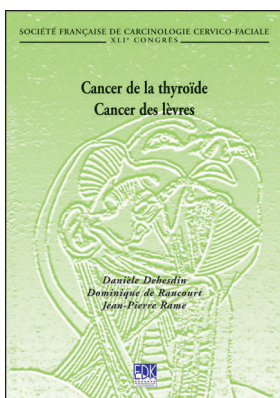
RÉFÉRENCES

- Lamoreux ML, Delmas V, Larue L, Bennett D. *The colors of mice: a model genetic network*. Wiley-Blackwell, 2010.
- Larue L, Kumasaka M, Goding CR. Beta-catenin in the melanocyte lineage. *Pigment Cell Res* 2003; 16 : 312-7.
- Luciani F, Champeval D, Herbet A, et al. Biological and mathematical modeling of melanocyte development. *Development* 2011; 138 : 3943-54.
- Adameyko I, Lallemand F, Aquino JB, et al. Schwann cell precursors from nerve innervation are a cellular origin of melanocytes in skin. *Cell* 2009; 139 : 366-79.
- Pinon P, Wehrle-Haller B. Integrins: versatile receptors controlling melanocyte adhesion, migration and proliferation. *Pigment Cell Melanoma Res* 2011; 24 : 282-94.
- Testaz S, Duband JL. Central role of the alpha4beta1 integrin in the coordination of avian truncal neural crest cell adhesion, migration, and survival. *Dev Dyn* 2001; 222 : 127-40.
- Kelsh RN, Harris ML, Colanesi S, Erickson CA. Stripes and belly-spots – a review of pigment cell morphogenesis in vertebrates. *Semin Cell Dev Biol* 2009; 20 : 90-104.
- Santiago A, Erickson CA. Ephrin-B ligands play a dual role in the control of neural crest cell migration. *Development* 2002; 129 : 3621-32.
- Gallagher SJ, Rambow F, Kumasaka M, et al. Beta-catenin inhibits melanocyte migration but induces melanoma metastasis. *Oncogene* 2012; doi: 10.1038/onc.2012.229.
- Theveneau E, Marchant L, Kuriyama S, et al. Collective chemotaxis requires contact-dependent cell polarity. *Dev Cell* 2010; 19 : 39-53.
- Li A, Ma Y, Yu X, et al. Rac1 drives melanoblast organization during mouse development by orchestrating pseudopod-driven motility and cell-cycle progression. *Dev Cell* 2011; 21 : 722-34.
- Lindsay CR, Lawn S, Campbell AD, et al. P-Rex1 is required for efficient melanoblast migration and melanoma metastasis. *Nat Commun* 2011; 2 : 555.
- Ridley AJ. Life at the leading edge. *Cell* 2011; 145 : 1012-22.
- Spiering D, Hodgson L. Dynamics of the Rho-family small GTPases in actin regulation and motility. *Cell Adh Migr* 2011; 5 : 170-80.
- Primeau M, Lamarche-Vane N. Coup d'œil sur les petites GTPases Rho. *Med Sci (Paris)* 2008; 24 : 157-62.
- Raftopoulos M, Hall A. Cell migration: Rho GTPases lead the way. *Dev Biol* 2004; 265 : 23-32.
- Chesarone MA, Goode BL. Actin nucleation and elongation factors: mechanisms and interplay. *Curr Opin Cell Biol* 2009; 21 : 28-37.
- Carreira S, Goodall J, Denat L, et al. Mitf regulation of Dia1 controls melanoma proliferation and invasiveness. *Genes Dev* 2006; 20 : 3426-39.
- Sanz-Moreno V, Gadea G, Ahn J, et al. Rac activation and inactivation control plasticity of tumor cell movement. *Cell* 2008; 135 : 510-23.
- Friedl P, Wolf K. Plasticity of cell migration: a multiscale tuning model. *J Cell Biol* 2010; 188 : 11-9.
- Sahai E, Marshall CJ. Differing modes of tumour cell invasion have distinct requirements for Rho/ROCK signalling and extracellular proteolysis. *Nat Cell Biol* 2003; 5 : 711-9.
- Sanz-Moreno V, Marshall CJ. The plasticity of cytoskeletal dynamics underlying neoplastic cell migration. *Curr Opin Cell Biol* 2010; 22 : 690-6.
- Lammermann T, Sixt M. Mechanical modes of 'amoeboid' cell migration. *Curr Opin Cell Biol* 2009; 21 : 636-44.
- Charras G, Paluch E. Blebs lead the way: how to migrate without lamellipodia. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008; 9 : 730-6.
- Li A, Dawson JC, Forero-Vargas M, et al. The actin-bundling protein fascin stabilizes actin in invadopodia and potentiates protrusive invasion. *Curr Biol* 2010; 20 : 339-45.
- Schoumacher M, Goldman RD, Louvard D, Vignjevic DM. Actin, microtubules, and vimentin intermediate filaments cooperate for elongation of invadopodia. *J Cell Biol* 2010; 189 : 541-56.
- Gaggioli C, Sahai E. Melanoma invasion – current knowledge and future directions. *Pigment Cell Res* 2007; 20 : 161-72.
- Pichot CS, Arvanitis C, Hartig SM, et al. Cdc42-interacting protein 4 promotes breast cancer cell invasion and formation of invadopodia through activation of N-WASP. *Cancer Res* 2010; 70 : 8347-56.
- Pinner S, Jordan P, Sharrock K, et al. Intravital imaging reveals transient changes in pigment production and Brn2 expression during metastatic melanoma dissemination. *Cancer Res* 2009; 69 : 7969-77.
- Kim M, Gans JD, Nogueira C, et al. Comparative oncogenomics identifies NEDD9 as a melanoma metastasis gene. *Cell* 2006; 125 : 1269-81.
- Sabeh F, Shimizu-Hirota R, Weiss SJ. Protease-dependent versus-independent cancer cell invasion programs: three-dimensional amoeboid movement revisited. *J Cell Biol* 2009; 185 : 11-9.

TIRÉS À PART

L. Larue

Bon de commande



ISBN : 978-2-8425-4137-8 264 pages

À retourner à EDK, 25, rue Daviel - 75013 Paris

Tél. : 01 58 10 19 05 - Fax : 01 43 29 32 62 - E-mail : edk@edk.fr

NOM : Prénom :

Adresse :

Code postal : Ville :

Pays :

Fonction :

Je souhaite recevoir l'ouvrage **Cancer de la thyroïde – Cancers des lèvres** : 35 € + 3 € de port = **38 € TTC**

en exemplaire, soit un total de €

Par chèque, à l'ordre de EDK

Par carte bancaire : Visa Eurocard/Mastercard

Carte n° | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

Signature :

Date d'expiration : | | | | | |

N° de contrôle au dos de la carte : | | | |

Revue 2
Cellular and molecular
mechanisms controlling the
migration of melanocytes

The official journal of

INTERNATIONAL FEDERATION OF PIGMENT CELL SOCIETIES · SOCIETY FOR MELANOMA RESEARCH

PIGMENT CELL & MELANOMA Research

Cellular and molecular mechanisms controlling the migration of melanocytes and melanoma cells

Jacky Bonaventure, Melanie J. Domingues and Lionel Larue

DOI: 10.1111/pcmr.12080

If you wish to order reprints of this article, please see the guidelines [here](#)

EMAIL ALERTS

Receive free email alerts and stay up-to-date on what is published in Pigment Cell & Melanoma Research – [click here](#)

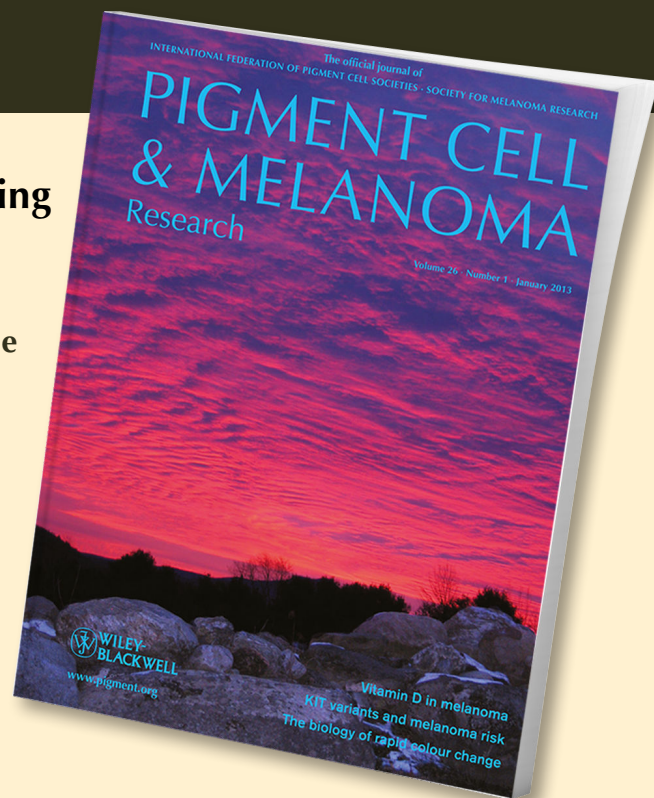
Submit your next paper to PCMR online at <http://mc.manuscriptcentral.com/pcmr>

Subscribe to PCMR and stay up-to-date with the only journal committed to publishing basic research in melanoma and pigment cell biology

As a member of the IFPCS or the SMR you automatically get online access to PCMR. Sign up as a member today at www.ifpcs.org or at www.societymelanomaresearch.org

To take out a personal subscription, please [click here](#)

More information about Pigment Cell & Melanoma Research at www.pigment.org



Cellular and molecular mechanisms controlling the migration of melanocytes and melanoma cells

Jacky Bonaventure^{1,2,3}, Melanie J. Domingues^{1,2,3} and Lionel Larue^{1,2,3}

1 Developmental Genetics of Melanocytes, Institut Curie, Centre de Recherche, Orsay, France **2** CNRS UMR3347, Orsay, France **3** INSERM U1021, Orsay, France

CORRESPONDENCE L. Larue, e-mail: lionel.larue@curie.fr

KEYWORDS melanoblast/melanoma/migration/invadopodia/blebs

PUBLICATION DATA Received 2 November 2012, revised and accepted for publication 7 February 2013, published online 22 February 2013

doi: 10.1111/pcmr.12080

Summary

During embryonic development in vertebrates, the neural crest-derived melanoblasts migrate along the dorsolateral axis and cross the basal membrane separating the dermis from the epidermis to reach their final location in the interfollicular epidermis and epidermal hair follicles. Neoplastic transformation converts melanocytes into highly invasive and metastatic melanoma cells. *In vitro*, these cells extend various types of protrusions and adopt two interconvertible modes of migration, mesenchymal and amoeboid, driven by different signalling molecules. In this review, we describe the major contributions of natural mouse mutants, mouse models generated by genetic engineering and *in vitro* culture systems, to identification of the genes, signalling pathways and mechanisms regulating the migration of normal and pathological cells of the melanocyte lineage, at both the cellular and molecular levels.

Introduction

At a given time during embryonic development, cells migrate, in a complex and heterogeneous process underlying morphogenesis and tissue maintenance. Migration of most cells including stromal, epithelial and neuronal cells normally ceases with their terminal differentiation, but the process can be reactivated during tissue regeneration or tumour invasion. In this review, we focus principally on the migration of melanocytes and their precursors, melanoblasts, during normal embryonic development in vertebrates. We also describe the cellular and molecular mechanisms controlling cell migration *in vitro*, in two-dimensional (2D) and three-dimensional (3D) systems, considering, in particular, the extension of the plasma membrane of the cells at the leading edge for movement. Finally, we discuss the pathological aspects of migration associated with tumour invasion and metastasis, frequent events in patients with melanoma.

Migration of melanocytes during normal development

Melanocytes are melanin-containing dendritic cells involved in pigmentation in many animal species (Lamo-

reux et al., 2010). In humans, they determine skin, hair and eye colour. It has to be noted that in the eye, two types of melanin-producing cells are present, one is derived from the neural tube, the retinal pigment epithelial cells and the other one from the neural crest cells (NCCs), the uveal melanocytes including choroid, iris and ciliary body (Colombo et al., 2011). In the skin and hair, pigment cells are derived from NCCs. The truncal region contains two subpopulations of NCCs, which proliferate and then follow two major migration pathways during their development (Figure 1). NCC derivatives migrating along the dorsoventral pathway give rise to cells of the peripheral nervous system, including neurons, Schwann cells (from spinal sensory, sympathetic and parasympathetic ganglia) and chromaffin cells in the adrenal medulla. The dorsolateral pathway is the main source of melanocytes (Larue et al., 2003). In mouse embryos, NCC are first specified to differentiation into founder melanoblasts on embryonic days 8.5–9.5 (E8.5–E9.5), in the trunk region. These founder melanoblasts proliferate actively in a wedge-shaped area known as the migration staging area (MSA) lying between the ectoderm, the neural tube and the somites, being restricted to the somite-containing region. On E10.5, these melanoblast precursors, which are still proliferating, begin to

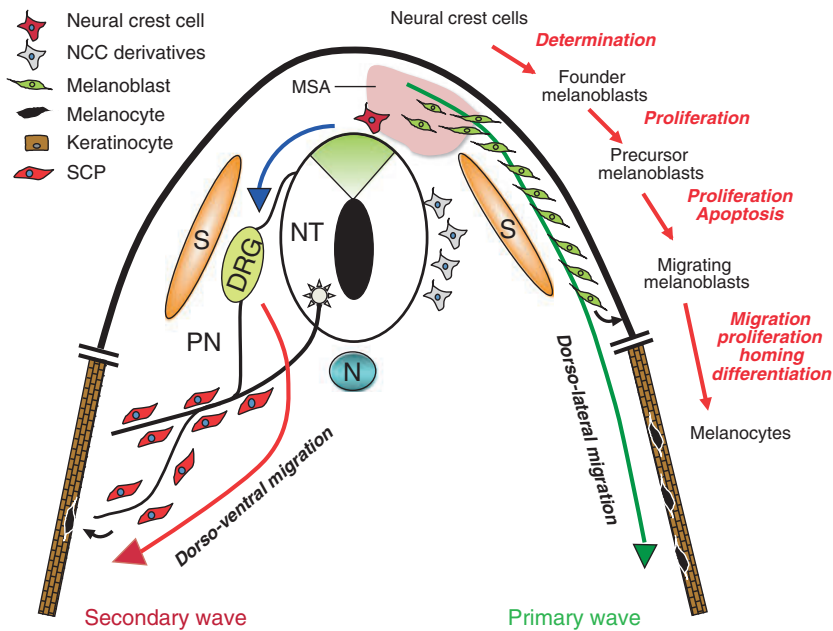


Figure 1. Melanocyte specification from neural crest cells. In the trunk region, early migrating neural crest cells (NCCs) move through the dorso-ventral pathway (blue arrow) in between the somites (S) and the neural tube (NT). These cells will give rise to neurons of the dorsal root ganglia (DRG). Before migrating along the dorso-lateral pathway (green arrow), melanoblast precursors stall in the migration staging area (MSA), then move between the somites (S) and the ectoderm to ultimately give rise to melanocytes of the first wave. A second wave of melanocytes (red arrow) arises from the Schwann cell precursors (SCPs) associated with the peripheral nerves (PN). Melanocytes are found near the nerve endings. N = notochord.

migrate from the MSA, between the somites and the ectoderm, along a rostro-caudal temporal gradient. Some of the migrating melanoblasts begin to cross the basal lamina separating the dermis from the epidermis on E11.5. The remaining cells continue to migrate dorsolaterally in the dermis until stage E15.5 while continuing to cross the basal lamina (Luciani et al., 2011). Despite the occurrence of active melanoblast proliferation in the dermis, the number of melanoblasts in this compartment remains constant. Asymmetric melanoblast division, with one of the daughter cells migrating into the epidermis and the other remaining in the dermis, may account for this observation (Luciani et al., 2011). Alternatively, it may be hypothesized that parallel orientation of the mitotic spindle of the mother dermal melanoblast is predetermined. This would favour preferential localization in the epidermis of the daughter cell closest to the basal membrane (Larue et al., 2012). Because the numbers of melanoblasts in the dermis and epidermis during development are unaffected by the absence of the crucial Notch proteins Notch 1 and Notch 2 (Schouwey et al., 2007), the putative asymmetric cell division would be Notch independent. Colonization of the hair follicles begins on E15.5. At birth, most of the melanocytes are present in the epidermis of the follicular and interfollicular zones in the hairy parts of the mouse body. The interfollicular melanocytes disappear within a few days, resulting in a follicular distribution of melanocytes. More than 10 yr ago, an analysis of melanoblast establishment in patch and rump-white embryos suggested that a putative second source of melanoblasts may exist (Jordan and Jackson, 2000). The origin and characteristics of these cells were unknown at that time, but one may hypothesize that they emerge from the plastic NCC derivatives migrating along the dorsoventral pathway. In a recent study, some of the Schwann cell precursors (SCPs)

migrating ventrally along nerves innervating the skin were reported to differentiate into melanocytes both in chick and mouse embryos (Adameyko et al., 2009). The classical melanoblasts migrating along the dorsolateral pathway may be referred to as the primary wave of melanocyte precursors (Figure 1). Bipotent cells with molecular characteristics of SCPs, acquiring a melanocytic fate, would then represent an alternative source ('secondary wave') of melanocyte precursors. The relative contributions of these two waves of migration to the final pool of melanocytes in adult wild-type skin is still a matter of debate, given the difficulty to estimate precisely the number or relative number, of nerve-derived melanocytes. It remains also unclear whether these cells arise from the differentiation of multipotent neural crest cells, from bipotent cells or from the conversion of SCP to melanoblasts.

Genetic and molecular aspects of cell migration during development

Subtle variations in pigmentation traits are readily observable and recognizable. For centuries, crosses and selections, based on coat colour, have been performed by animal breeders in various species including rodents. In mice, study of pigimentary genetics began more than 100 yr ago (Lamoreux et al., 2010). Since then, many spontaneous coat colour mutants have been isolated and genetically engineered mutants have been produced (see <http://www.espcr.org/micemut/> for a complete list). Most of the genes causing pigimentary phenotypes have now been cloned. A simple examination of coat colour indicates the type of cellular mechanism affected. For instance, the presence of a white belly spot in mice usually points to a potential defect in melanoblast migration, although we cannot exclude that it could be

due to a reduction in melanoblast proliferation. Studies of several vertebrates – mice, chicken, *Xenopus* and zebrafish – have made a major contribution to our understanding of the molecular mechanisms underlying melanoblast migration during development. We will describe here some of the genes and proteins involved in the migration of cells of the melanocyte lineage. We will focus on the relative importance of cell surface receptors (kit, EphB, Ednr) and their ligands in the various species. The critical role of the transcription factors *Mitf*, *Sox10* and *Pax3* in the migration of mouse melanocytes will be highlighted, together with that of β -catenin, *Rac1* and *P-Rex1* proteins.

Several aspects of the migration process are common to all vertebrates, but there are also marked differences between species. This probably reflects the complexity of pigmentation in fish and amphibians, in which at least four types of unpigmented precursors (melanoblasts, leucoblasts, xanthoblasts and iridoblasts) and their respective pigmented derivatives (melanophores, leucophores, xanthophores and iridophores), migrating along different pathways (Kelsh et al., 2009), are required. Unlike the melanoblasts of mice and chickens, those of fish (zebrafish or medaka) reside principally in the dermis and do not invade the epidermis (Hirata et al., 2005). Some of the key genes responsible for migration and survival in mice, such as the *Kit* gene, have also been implicated in the migration and survival of melanoblasts in zebrafish. However, signalling through the *Kit* orthologue (*kita*) appears to be more transient in fish than in rodents (Rawls and Johnson, 2003). Zebrafish *kita* (sparse)-homozygous null mutant embryos are viable. *kita* mutants have fewer (about 50%) and less motile melanoblasts than the wild type. These cells fail to migrate to the periphery of the embryo, instead remaining in the dorsal region, where they eventually undergo apoptosis, after becoming pigmented (Parichy et al., 1999). Interestingly, there seems to be no equivalent role for the *kit* receptor in birds. In chickens, two signalling systems functioning in an additive manner are involved in melanoblast migration: the ephrin B ligand/ephrin B2 (*ephb2*) receptor complex and the endothelin-3 (*EDN-3*) ligand/endothelin receptor B2 (*EDNRB2*) complex (Lecoin et al., 1998; Pla et al., 2005). The ephrin/*ephb2* system initially prevents the migration of NCCs along the dorsolateral pathway [Hamburger–Hamilton (HH) stage 12, with 16 somites, corresponding to 45–49 h after fertilization (Hamburger and Hamilton, 1992)], but it stimulates the dorsolateral migration of melanoblasts after stage HH 18 (with 26–36 somites, 51–68 h after fertilization) (Santiago and Erickson, 2002). The *ephb2* and *EDNRB2* genes are thought to be up-regulated in melanoblasts before migration, allowing them to overcome the effect of inhibitor molecules (Kelsh et al., 2009). No equivalent mechanism has been found in either zebrafish or mouse. The absence of the *EDNRB2* gene from these species may account for these differences [see (Pla and Larue,

2003)]. Natural mouse mutants with a phenotype of white belly spots, caused by the absence of melanoblasts in these areas, have been instrumental to our understanding of melanoblast migration and homing. Studies of the *microphthalmia* (*Mitf*), *dominant white spotting* (*Kit*), *steel* (*Kitl*), *piebald* (*Ednr*) and *lethal spotting* (*Edn-3*) mutants have led to the identification of genes and proteins essential for the first step of melanoblast migration following delamination from the neural tube (Lamoreux et al., 2010). For example, the *Edn-3* ligand, produced by the ectoderm, binds to the *Ednr* receptor expressed on melanoblasts. Signalling through this complex is essential for migrating melanoblasts to reach their destination (Lee et al., 2003). The *kit* ligand produced in the dermomyotome, dermis and hair follicle binds to the *c-kit* receptor tyrosine kinase expressed by melanoblasts. Only melanoblasts expressing the *c-kit* and *Ednr* receptors can respond to the attractive and repulsive signals controlling cell migration (Reid et al., 1996).

The *Mitf* (microphthalmia-associated transcription factor) gene and, in particular, the *M-Mitf* isoform specific to the melanocyte lineage, plays a key role in melanoblasts and melanocytes, not only ensuring their specification and survival, but also contributing to the primary (dorsolateral) and secondary (ventral) stages of migration through regulation of numerous target genes (Tsao et al., 2012). Among them, *Slug* (*Snai2*) was shown to be directly regulated by *M-Mitf*, which has been involved in pseudo-EMT of NCC and melanoblast migration (Sanchez-Martin et al., 2002). Unsurprisingly, spontaneous heterozygous mutations in two of the genes synergistically regulating *M-Mitf* expression, *Sox10* and *Pax3*, give rise to a white-spotted phenotype (*dominant megacolon/Sox10 and Splotch/Pax3*). Another regulator of *M-Mitf*, the *CTNNB1* gene, encoding β -catenin, was identified as a regulator of melanoblast migration through the use of transgenic techniques. When located in the nucleus, β -catenin functions as a co-activator of the LEF/TCF family of proteins, to target, among others, *M-Mitf* promoter. The specific production of an activated form of β -catenin (*bcat**) in the nuclei of mouse melanoblasts is associated with a white belly spot, due to a defect of melanoblast migration during development (Delmas et al., 2007; Gallagher et al., 2012). The *M-Mitf* and *Csk* (*Src* inhibitor) genes have been shown to be involved in the defective melanocyte migration observed in this model (Gallagher et al., 2012). The relative importance of *M-Mitf* in cell migration is certainly due to the fact that it is regulating the expression of other crucial genes involved in this cellular mechanism. Interestingly, *M-Mitf* is regulated by *BRN2*, which is itself regulated by β -catenin (Goodall et al., 2004, 2008; Kobi et al., 2010; Wellbrock et al., 2008). A mutant of *BRN2*, *BRN2AA*, represses melanoblast migration (Berlin et al., 2012). Another key gene controlling the migration of melanocytes *in vivo* is the *Rac1* gene, encoding the *Rac1* small GTPase. In zebrafish, *Rac1* regulates the migration of neural crest cells

towards the chemo-attractant stromal cell-derived factor 1 (Sdf-1)/CXCL4 (Theveneau et al., 2010). Specific inactivation of the *Rac1* gene in mouse melanoblasts results in white belly spots. Absence of the Rac1 protein markedly decreases the speed of melanoblast migration, but does not prevent these cells from crossing the dermal/epidermal junction or colonizing hair follicles (Li et al., 2011). A recurrent activating somatic mutation in the human *RAC1* gene promoting melanoblast migration was recently identified in melanoma samples (Krauthammer et al., 2012). Further evidence for the crucial role of Rac1 in migration was provided by specific inactivation of the *P-Rex1* gene in the mouse melanocyte lineage. *P-Rex1* encodes a member of the GEF (Rho GTPase guanine nucleotide exchange factor) family responsible for activating Rac1-GTP formation. *P-Rex1*-deficient mice have a white belly spot, due to defective melanoblast migration, and high levels of P-Rex1 have been found in several human melanoma cell lines forming metastases (Lindsay et al., 2011).

Modes of migration and associated molecular mechanisms

Little is known about the mode of melanoblast migration *in vivo* due to the small number of these cells and the difficulty to follow their movement in the pregnant mouse. Most studies have therefore been carried out *in vitro*, in 2D systems, with melanoma cell lines. The recent use of 3D culture systems, recreating an environment mimicking the situation *in vivo*, has revealed marked differences between these two systems.

2D migration and molecular mechanisms

Cells migrating in a 2D system must form plasma membrane extensions (protrusions) at the migration front, in a manner coordinated with the rest of the cell body. Adhesive cells migrating on uniform 2D surfaces have two types of protrusion – lamellipodia and filopodia – with different structures and molecular compositions. Lamellipodia were originally described in fibroblasts, as thin sheet-like regions containing microfilaments (Abercrombie et al., 1970), and filopodia are finger-like extensions from the plasma membrane containing parallel bundles of actin filaments (Ridley, 2011). These protrusions may appear spontaneously or may be induced by external signals originating from the microenvironment. Migration is thus dependent on successive cycles of membrane extension, adhesion, retraction of the rear end of the cell and translocation of the cell body. These processes require asymmetry of the front (leading edge) and back (trailing edge) of the cell, resulting in antero-posterior polarity (Spiering and Hodgson, 2011).

The actin cytoskeleton and the molecules regulating its polymerization and dynamics are involved in these protrusions. Actin assembly and disassembly are therefore key elements in cell migration. Signals are transmit-

ted from the membrane receptors to the actin cytoskeleton by small Rho GTPases, oscillating between an active GTP-bound form and an inactive GDP-bound form. These GTPases are regulated by two families of proteins – GEFs and GAPs (GTPase accelerating proteins) – which interact directly with the GTPase protein, at the same binding site. GEFs catalyse the formation of the active form of the GTPase by releasing the bound GDP in exchange for GTP, whereas GAPs mediate inactivation by GTP hydrolysis after the insertion of a water molecule into the catalytic pocket of the GTPase (Raftopoulos and Hall, 2004; Spiering and Hodgson, 2011). The Rac1 and Cdc42 GTPases regulate lamellipodial and filopodial formation, respectively, by inducing the polymerization of actin filaments. This leads to extension of the migration front, through the successive activation of proteins of the WASP (Wiskott–Aldrich syndrome protein) family, acting as nucleation factors binding to the Arp2/3 complex to generate actin filament networks (Chesarone and Goode, 2009). Dia1 and Dia2, which belong to the formin family, also play a role in migration, by promoting actin filament elongation in lamellipodia and filopodia, respectively. These proteins protect the barbed ends of actin filaments, ensuring their continuous growth (Ridley, 2011).

It has been shown that M-Mitf regulates directly the transcription of mDia1 (*Diaph1*) and MET (*Met*), in melanoma cells (Carreira et al., 2006; McGill et al., 2006). In some melanoma cell lines, lower levels of M-Mitf and mDia1 productions were found to induce cell invasion (Carreira et al., 2006).

3D migration and molecular mechanisms

During the migration of individual cells in 3D systems, certain melanoma cells switch between two interconvertible morphologies and types of migration – mesenchymal migration and amoeboid migration – allowing them to adapt to changes in the microenvironment (Friedl and Wolf, 2010; Sanz-Moreno et al., 2008) (Figure 2). Mesenchymal migration is typical of elongated, bipolar adherent cells interacting with the extracellular matrix (ECM) at focal adhesion points. This type of migration roughly resembles 2D migration, but the constraints imposed by the stiffness and elastic behaviour of the ECM necessitate changes in cell morphology. Lamellipodia are replaced with pseudopodia oriented in three dimensions, and the proteases required for ECM remodelling are secreted (Friedl and Wolf, 2010; Sahai and Marshall, 2003). These cells migrate slowly, at an estimated speed of 0.1 $\mu\text{m}/\text{min}$ (Sanz-Moreno and Marshall, 2010).

Amoeboid migration is associated with rounded or ellipsoid cells lacking focal adhesion. This mode of migration is integrin independent, as motility in a 3D system does not necessarily require the cell to be attached to its substrate (Lammermann and Sixt, 2009). Movement is achieved by the creation of 'blebs', short spherical extensions of the plasma membrane devoid of

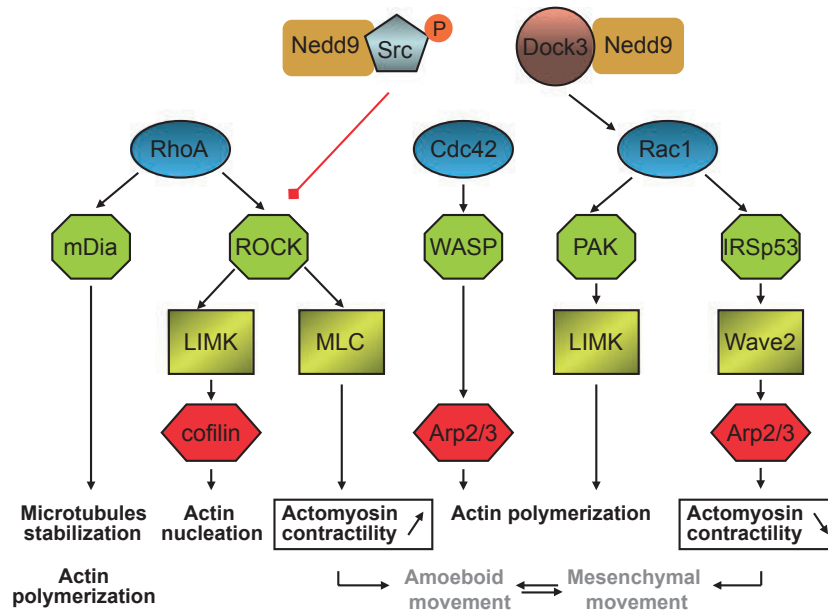


Figure 2. Schematic representation of the opposite patterns of signal transduction from the Rho GTPases on the cell cytoskeleton and the movement of melanoma cells. Rho GTPases (RhoA, Cdc42 and Rac1) are the main proteins of a central signalling hub. Rac1 activation through the Nedd9/Dock3 complex decreases the contractility of actomyosin, promoting mesenchymal movement, whereas the activation of RhoA increases actomyosin contractility, generating amoeboid movement. The scaffold protein Nedd9 also binds to phosphorylated Src Y416. Phosphorylation of the tyrosine 416 residue of Src, through integrin β 3 signalling, down-regulates the kinase activity of ROCK by phosphorylating its tyrosine 722 residue (Ahn et al., 2012; Sanz-Moreno et al., 2008). p21-activated kinase (PAK) binds specifically to the GTP-bound form of Rac 1. It then activates the LIM-motif-containing protein kinase (LIMK) to drive cofilin-mediated actin turnover. IRSp53 (insulin receptor tyrosine kinase substrate p53) is an I-BAR domain-containing adaptor protein that binds to Rac1 and Wave 2, thus contributing to lamellipodial extension (see text for details).

actin with a very short lifetime. ‘Blebbing’ is initiated by the local detachment or rupture of cortical actin. An increase in intracellular pressure leads to an influx of cytosol into the membrane, extending the bleb. A new actin cortex is then formed under the bleb, triggering its retraction. Blebs mostly occur at the migration front (Charras and Paluch, 2008), and they initiate migration by enabling the blebby round cell to insert itself into the natural cavities of the matrix without the need for

proteolysis. This type of propulsive cell migration has a speed of between 1 and 10 μ m/min (Sanz-Moreno and Marshall, 2010).

An unusual mode of 3D cell motility based on the presence of large blunt cylindrical protrusions called lobopodia has been recently described in fibroblasts (Petrie et al., 2012), (see Table 1). Lobopodial migration seems to combine aspects of lamellipodial and blebbing locomotion (Sixt, 2012). However, its role in the motility

Table 1. Type of protrusions involved in single-cell locomotion and associated migration mode

System	Dimension	Type of protrusions	Actin dependency	Migration mode	References
<i>In vitro</i>	2D	Lamellipodia	Yes	Mesenchymal	(Machesky, 2008)
		Filopodia	Yes	Mesenchymal	(Faix and Rottner, 2006)
		Invadopodia	Yes	Mesenchymal	(Chen, 1989)
<i>In vitro</i>	3D	Blebs	No	Amoeboid (pseudopodal)	(Yoshida and Soldati, 2006)
		Lamellipodia	Yes	Mesenchymal	(Friedl and Wolf, 2009)
		Lobopodia	Yes	Lobopodial	(Petrie et al., 2012)
<i>In vivo</i>	3D	Blebs	No	Amoeboid (blebby)	(Charras and Paluch, 2008)
		Short stub protrusions	Yes	NM and NA	(Li et al., 2011)
		Long protrusions	Yes	Mesenchymal	(Li et al., 2011)

NM, non-mesenchymal; NA, non-amoeboid.

This table refers exclusively to single-cell motility. Collective migration also exists in several types of cells including melanoma [see (Hegerfeldt et al., 2002)]. On the opposite, melanoblasts *in vivo* migrate only individually using Rac1-independent short stubs and Rac1-mediated long protrusions (Li and Machesky, 2012).

of melanoblasts and/or melanoma cells remains unknown.

The signalling pathways used in mesenchymal and amoeboid movements are distinct (Figure 2). The mesenchymal 3D migration of melanoma cell lines involves the formation of a complex between Nedd9 (a member of the CAS family of adaptor proteins) and DOCK3 (a member of the DOCK subfamily of GEFs), resulting in activation of the Rac1 protein. Rac1-GTP activates the Wave 2 protein (a member of the WASP family), which regulates the Arp2/3 complex involved in actin polymerization (Sanz-Moreno et al., 2008). By contrast, amoeboid migration is controlled by the Rho/ROCK complex, which is responsible for the phosphorylation of myosin light chain II (MLC2). The resulting actomyosin complex generates the contractile force required for cell movement. The transition from mesenchymal to amoeboid migration is associated with a decrease in Rac1-GTP levels and an increase in MLC2 phosphorylation (Figure 2), demonstrating the opposite effects of Rac1 and Rho on the migration of melanoma cells (Sanz-Moreno et al., 2008).

Migration and melanoma invasion

Melanomas are highly metastatic skin tumours resulting from the malignant transformation of melanocytes. The presence of lymph node and visceral metastases is directly related to poor outcome, with a mean survival time of 7.5 months from diagnosis (Chudnovsky et al., 2005). Melanomagenesis can be defined at the epidemiological, clinical, histopathological, cellular and molecular levels (Whiteman et al., 2011). At the cellular level, melanoma invasion results from a combination of several mechanisms: a pseudoepithelial–mesenchymal transition, a loss of cell-to-cell adhesion, a loss of cell–matrix adhesion, matrix degradation, chemo-attraction/repulsion and migration. All these cellular events are closely regulated and tightly interconnected using various signalling pathways including MAPK, PI3K and Wnt/ β -catenin (Larue and Beermann, 2007). During the radial growth phase (RGP), melanocytes proliferate in an aberrant manner and their interaction with keratinocytes decreases, partly due to a loss of E-cadherin. This initial stage is followed by a vertical growth phase (VGP) marking the start of the transmigration process characterized by the passage of melanoma cells from the epidermis, across the basal lamina, to the dermis. This transmigration, which runs in the opposite direction to that of normal melanoblast migration during embryonic development, is a key step in metastasis. Migrating melanoma cells make use of cellular and molecular processes commonly associated with melanoblasts during normal development. This observation is entirely consistent with Virchow's assertion that 'Neoplasms arise in accordance with the same law, which regulates embryonic development' (Virchow, 1859). Support for

this assertion was recently provided by a comparison of gene expression between transplanted metastatic melanoma cells and primary melanocytes in a chick embryo model (Bailey et al., 2012). However, *in vivo* analysis of mouse melanoblast migration suggested that the acquisition of basal lamina-degrading activity by melanoma cells does not correspond to a simple reversion to the normal melanoblast genetic programme (Li et al., 2011).

In addition to lamellipodia, filopodia, blebs and lobopodia, a fifth type of membrane protrusion, the invadopodium, has been characterized as an actin-rich matrix-degrading finger-like protrusion (Buccione et al., 2009; Chen, 1989). The presence of invadopodia has been shown to be essential for the crossing of the basal membrane by melanoma cells (Figure 3). The formation of invadopodia in cells with a mesenchymal morphology requires the presence of cortactin, a scaffolding protein that stabilizes branched actin networks and regulates the vesicular trafficking of matrix metalloproteinases to invadopodia (Figure 3) (Clark et al., 2007). Cortactin contributes to these two processes by strongly promoting cell invasiveness (Kirkbride et al., 2011). Cortactin was originally identified as a Src kinase substrate, but its SH3 domain also interacts with many different kinases and it binds to and buffers cofilin (Oser and Condeelis, 2009). The invasion process of elongated mesenchymal melanoma cells also involves the elongation of actin filaments through cofilin dephosphorylation and the stabilization of these filaments by fascin, which is normally produced by melanocytes (Li et al., 2010). The degradation of the ECM by invadopodia clearly distinguishes these structures from lamellipodia and filopodia. Vesicles containing metalloproteinases, including MT1-MMP/MMP14, MMP2 and MMP9, are targeted to the invadopodia by the exocyst complex, mediating the tethering of post-Golgi vesicles to the plasma membrane (Poincloux et al., 2009) (Figure 3). Metalloproteinases are released at the extreme end of the invadopodia (Ridley, 2011; Schoumacher et al., 2010). They degrade the ECM, facilitating the progress of melanoma cells (Gaggioli and Sahai, 2007). However, the absence of invadopodia from normal melanoblasts/melanocytes indicates that these cells use membrane protrusions other than invadopodia for motility *in vivo* (Li et al., 2010, 2011; Pichot et al., 2010). Two types of melanoblast protrusion (short stubs and long pseudopods) have been described *in vivo* (Li et al., 2011) and associated with a mesenchymal mode of migration in wild-type cells. Interestingly, melanoblasts from Rac1-deficient mice formed only actin-rich short stubby protrusions inducing mesenchymal and amoeboid-independent slower migration. Whether this type of motility could correspond to the lobopodial migration (using large blunt cylindrical protrusions called lobopodia) recently observed in a 3D system (Petrie et al., 2012; Table 1) remains to be assessed. Melanoma cells do not destroy the basal membrane completely. Instead, the invadopodia generate small membranous perforations, facilitating the dissem-

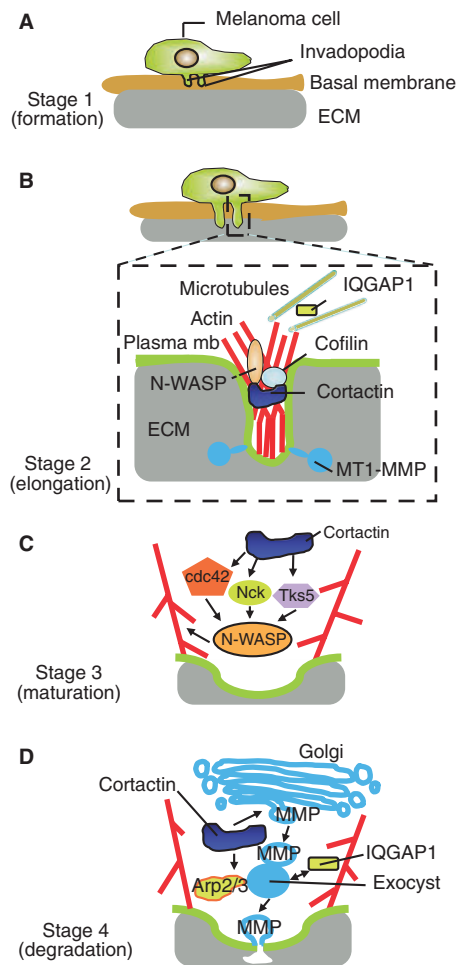


Figure 3. Formation, molecular characteristics and function of invadopodia. (A) Interaction between a tumour cell and the basal membrane (BM) triggers the formation of invadopodia, which start degrading the BM (stage 1). (B) Invadopodia elongate and infiltrate the stromal compartment (stage 2). High magnification of an invadopodium showing a molecular overview of the key proteins involved in actin assembly and ECM degradation. Actin filaments are branched at the cell surface and unbranched at the tip of the protrusion (Schoumacher et al., 2010). (C) Maturation of the invadopodia involves cortactin and actin polymerization via N-Wasp (stage 3). Nck is an upstream regulator of N-Wasp and Tks5 (tyrosine kinase substrate with 5 SH3 domains). This scaffold protein can recruit and phosphorylate cortactin. (D) ECM degradation by invadopodia (stage 4). During this process, cortactin is involved in the vesicular trafficking of matrix metalloproteinases (MMPs) to invadopodia via the regulation of post-Golgi trafficking or vesicle capture at the plasma membrane by means of an exocyst complex. The scaffold protein IQGAP1 coordinates actin assembly and the exocytosis machinery. MMPs are released into the ECM through small perforations in the plasma membrane.

ination of cells in the dermis and interactions with endothelial cells preceding the intravasation of blood vessels (Figure 3). Transcriptomic studies have identified a number of genes displaying abnormal expression in invasive melanoma cells (Hoek et al., 2006). Several of these genes encode growth factors, including TGF β . This

protein is thought to play an important role in invasion by poorly pigmented cells with high levels of the transcription factor Brn2/N-Oct3/Pou3f2. Upon stimulation with TGF β , melanoma cells acquire an elongated mesenchymal phenotype, facilitating their passage across the ECM (Pinner et al., 2009). Brn2 regulates directly M-Mitf and promotes melanoma invasiveness *in vitro* (Goodall et al., 2008), being itself negatively regulated by M-Mitf through miR-211 (Boyle et al., 2011). The many molecules actively contributing to the invasion processes of melanoma cells include the adaptor protein Nedd9. This scaffold protein is often produced in large amounts in metastatic melanomas and has been shown to be involved in 3D migration *in vitro*, promoting the transition between the amoeboid and mesenchymal modes of migration (Kim et al., 2006; Sanz-Moreno et al., 2008). However, it remains unclear whether this transition occurs *in vivo* (Sabeh et al., 2009). This review would not be complete without some mention of the small GTPase ARF6, which is present in invadopodia and involved in the invasion of the lungs by melanoma cells (Ridley, 2011). It activates Rac1 by phosphorylating ERK (Muralidharan-Chari et al., 2009). Finally, reversible epigenetic events linked to the microenvironment are also thought to contribute to the process of metastasis (Shackleton and Quintana, 2010).

Conclusion and perspectives

Molecular genetics, biochemistry, developmental and cell biology have generated a large body of information, highlighting different aspects of melanocytic cell migration. *In vitro* studies in 2D and 3D systems have facilitated elucidation of the biochemical mechanisms controlling the migration of melanoma cells. We now know that melanoma cell movement *in vitro* is based on mesenchymal and amoeboid types of migration. A third type of migration based on lobopodia may also occur in melanocytes and/or melanoma cells. These types of migration are mediated by the plasticity of the cell body and the presence of plasma membrane protrusions (lamellipodia, filopodia, blebs and invadopodia) at the cell front. Migration clearly involves both cell-autonomous and cell-non-autonomous mechanisms. Thus, the microenvironment (including at least cell-matrix and cell-cell interactions) is clearly of importance for both cell migration and protrusions.

Despite considerable advances towards an understanding of the processes underlying protrusion formation and cell motility in a 2D environment, the impact of the physical forces generated by the ECM on melanoma cell movement in 3D or *in vivo* remains unclear. Primary fibroblasts migrating within two different 3D environments were recently shown to adopt two matrix elasticity-dependent modes of migration involving lamellipodia and lobopodia (Petrie et al., 2012). Similarly, melanoma cells may react to the stiffness and elasticity of the tissue in which they migrate, by converting their mechanical

perception of matrix properties into variable intracellular signals, resulting in differences in cell movement.

Another critical question concerns the way by which small numbers of melanoma cells colonize tissues located large distances away from the primary tumour during metastasis? The importance of STAT3 activation in primary tumours and tumour-infiltrating myeloid cells in the colonization process was recently highlighted (Lee et al., 2010). STAT3 signalling by tumour-associated myeloid cells in premetastatic niches before the arrival of metastatic melanoma cells would render distant organs hospitable for future colonization by disseminating tumour cells (Deng et al., 2012). The microenvironment also plays a key role. Stromal cells surrounding tumour cells have been shown to mediate directional cancer cell migration, by producing the Sdf-1 ligand activating the chemokine receptor 4 or CXCR4 (Joyce and Pollard, 2009). A blockade of stromal cell function through the use of ligand inhibitors or receptor antagonists might constitute a promising strategy for preventing metastases.

An understanding of cell movement *in vivo*, during development, homeostasis and transformation, is of crucial importance for deciphering the mechanisms underlying these processes. The transparency of zebrafish embryos is a considerable advantage for developmental studies. Attempts to carry out studies *in vivo* in mammals have been hindered by the difficulty to identify and visualize migrating melanocytes, which are highly dispersed and poorly accessible. The emergence of new *ex vivo* culture techniques, together with real-time imaging techniques with high-resolution microscopes, will undoubtedly lead to substantial progress in the near future (Li et al., 2011; Mort et al., 2010). Likewise, the ability to determine the full molecular content (RNA, protein) of a single melanocyte should also shed new light on the migration of single cells *in vivo*.

Acknowledgements

MD was supported by a fellowship from MENRT. This work was supported by the *Ligue Nationale Contre le Cancer (Equipe labellisée)*, INCa and ARC.

References

- Abercrombie, M., Heaysman, J.E., and Pegrum, S.M. (1970). The locomotion of fibroblasts in culture. I. Movements of the leading edge. *Exp. Cell Res.* *59*, 393–398.
- Adameyko, I., Lallemand, F., Aquino, J.B. et al. (2009). Schwann cell precursors from nerve innervation are a cellular origin of melanocytes in skin. *Cell* *139*, 366–379.
- Ahn, J., Sanz-Moreno, V., and Marshall, C.J. (2012). The metastasis gene NEDD9 product acts through integrin beta3 and Src to promote mesenchymal motility and inhibit amoeboid motility. *J. Cell Sci.* *125*, 1814–1826.
- Bailey, C.M., Morrison, J.A., and Kulesa, P.M. (2012). Melanoma revives an embryonic migration program to promote plasticity and invasion. *Pigment Cell Melanoma Res.* *25*, 573–583.
- Berlin, I., Denat, L., Steunou, A.L. et al. (2012). Phosphorylation of BRN2 modulates its interaction with the Pax3 promoter to control melanocyte migration and proliferation. *Mol. Cell. Biol.* *32*, 1237–1247.
- Boyle, G.M., Woods, S.L., Bonazzi, V.F., Stark, M.S., Hacker, E., Aoude, L.G., Dutton-Regester, K., Cook, A.L., Sturm, R.A., and Hayward, N.K. (2011). Melanoma cell invasiveness is regulated by miR-211 suppression of the BRN2 transcription factor. *Pigment Cell Melanoma Res.* *24*, 525–537.
- Buccione, R., Caldieri, G., and Ayala, I. (2009). Invadopodia: specialized tumor cell structures for the focal degradation of the extracellular matrix. *Can. Metastasis Rev.* *28*, 137–149.
- Carreira, S., Goodall, J., Denat, L., Rodriguez, M., Nuciforo, P., Hoek, K.S., Testori, A., Larue, L., and Goding, C.R. (2006). Mitf regulation of Dia1 controls melanoma proliferation and invasiveness. *Genes Dev.* *20*, 3426–3439.
- Charras, G., and Paluch, E. (2008). Blebs lead the way: how to migrate without lamellipodia. *Nature reviews. Mol. Cell. Biol.* *9*, 730–736.
- Chen, W.T. (1989). Proteolytic activity of specialized surface protrusions formed at rosette contact sites of transformed cells. *J. Exp. Zool.* *251*, 167–185.
- Chesarone, M.A., and Goode, B.L. (2009). Actin nucleation and elongation factors: mechanisms and interplay. *Curr. Opin. Cell Biol.* *21*, 28–37.
- Chudnovsky, Y., Khavari, P.A., and Adams, A.E. (2005). Melanoma genetics and the development of rational therapeutics. *J. Clin. Investig.* *115*, 813–824.
- Clark, E.S., Whigham, A.S., Yarbrough, W.G., and Weaver, A.M. (2007). Cortactin is an essential regulator of matrix metalloproteinase secretion and extracellular matrix degradation in invadopodia. *Cancer Res.* *67*, 4227–4235.
- Colombo, S., Berlin, I., Delmas, V., and Larue, L. (2011). Classical and non-classical melanocytes in vertebrates. In *Melanins and Melanosomes*, P.A. Riley, and J. Borovansky, eds. (Weinheim: Wiley-VCH Verlag & Co), pp. 21–51.
- Delmas, V., Beermann, F., Martinozzi, S. et al. (2007). Beta-catenin induces immortalization of melanocytes by suppressing p16INK4a expression and cooperates with N-Ras in melanoma development. *Genes Dev.* *21*, 2923–2935.
- Deng, J., Liu, Y., Lee, H. et al. (2012). S1PR1-STAT3 signaling is crucial for myeloid cell colonization at future metastatic sites. *Cancer Cell* *21*, 642–654.
- Faix, J., and Rottner, K. (2006). The making of filopodia. *Curr. Opin. Cell Biol.* *18*, 18–25.
- Friedl, P., and Wolf, K. (2009). Proteolytic interstitial cell migration: a five-step process. *Cancer Metastasis Rev.* *28*, 129–135.
- Friedl, P., and Wolf, K. (2010). Plasticity of cell migration: a multiscale tuning model. *J. Cell Biol.* *188*, 11–19.
- Gaggioli, C., and Sahai, E. (2007). Melanoma invasion - current knowledge and future directions. *Pigment Cell Res.* *20*, 161–172.
- Gallagher, S.J., Rambow, F., Kumasaka, M., Champeval, D., Bellacosa, A., Delmas, V., and Larue, L. (2012). Beta-catenin inhibits melanocyte migration but induces melanoma metastasis. *Oncogene*. doi: 10.1038/onc.2012.229.
- Goodall, J., Martinozzi, S., Dexter, T.J., Champeval, D., Carreira, S., Larue, L., and Goding, C.R. (2004). Brn-2 expression controls melanoma proliferation and is directly regulated by beta-catenin. *Mol. Cell. Biol.* *24*, 2915–2922.
- Goodall, J., Carreira, S., Denat, L., Kobi, D., Davidson, I., Nuciforo, P., Sturm, R.A., Larue, L., and Goding, C.R. (2008). Brn-2 represses microphthalmia-associated transcription factor expression and marks a distinct subpopulation of microphthalmia-associated transcription factor-negative melanoma cells. *Cancer Res.* *68*, 7788–7794.

- Hamburger, V., and Hamilton, H.L. (1992). A series of normal stages in the development of the chick embryo. 1951. *Dev. Dyn.* **195**, 231–272.
- Hegerfeldt, Y., Tusch, M., Brocker, E.B., and Friedl, P. (2002). Collective cell movement in primary melanoma explants: plasticity of cell-cell interaction, beta1-integrin function, and migration strategies. *Cancer Res.* **62**, 2125–2130.
- Hirata, M., Nakamura, K., and Kondo, S. (2005). Pigment cell distributions in different tissues of the zebrafish, with special reference to the striped pigment pattern. *Dev. Dyn.* **234**, 293–300.
- Hoek, K.S., Schlegel, N.C., Brafford, P. et al. (2006). Metastatic potential of melanomas defined by specific gene expression profiles with no BRAF signature. *Pigment Cell Res.* **19**, 290–302.
- Jordan, S.A., and Jackson, I.J. (2000). A late wave of melanoblast differentiation and rostrocaudal migration revealed in patch and rump-white embryos. *Mech. Dev.* **92**, 135–143.
- Joyce, J.A., and Pollard, J.W. (2009). Microenvironmental regulation of metastasis. *Nat. Rev. Cancer* **9**, 239–252.
- Kelsh, R.N., Harris, M.L., Colanesi, S., and Erickson, C.A. (2009). Stripes and belly-spots – a review of pigment cell morphogenesis in vertebrates. *Semin. Cell Dev. Biol.* **20**, 90–104.
- Kim, M., Gans, J.D., Nogueira, C. et al. (2006). Comparative oncogenomics identifies NEDD9 as a melanoma metastasis gene. *Cell* **125**, 1269–1281.
- Kirkbride, K.C., Sung, B.H., Sinha, S., and Weaver, A.M. (2011). Cortactin: a multifunctional regulator of cellular invasiveness. *Cell Adh. Migr.* **5**, 187–198.
- Kobi, D., Steunou, A.L., Dembele, D., Legras, S., Larue, L., Nieto, L., and Davidson, I. (2010). Genome-wide analysis of POU3F2/BRN2 promoter occupancy in human melanoma cells reveals Kitl as a novel regulated target gene. *Pigment Cell Melanoma Res.* **23**, 404–418.
- Krauthammer, M., Kong, Y., Ha, B.H. et al. (2012). Exome sequencing identifies recurrent somatic RAC1 mutations in melanoma. *Nat. Genet.* **44**, 1006–1014.
- Lammermann, T., and Sixt, M. (2009). Mechanical modes of 'amoeboid' cell migration. *Curr. Opin. Cell Biol.* **21**, 636–644.
- Lamoreux, M.L., Delmas, V., Larue, L., and Bennett, D. (2010). *The Colors of Mice: A Model Genetic Network*. (Chichester: Wiley-Blackwell).
- Larue, L., and Beermann, F. (2007). Cutaneous melanoma in genetically modified animals. *Pigment Cell Res.* **20**, 485–497.
- Larue, L., Kumasaka, M., and Goding, C.R. (2003). Beta-catenin in the melanocyte lineage. *Pigment Cell Res.* **16**, 312–317.
- Larue, L., De Vuyst, F., and Delmas, V. (2012). Modeling melanoblast development. *Cell. Mol. Life Sci.* **70**, 1067–1079.
- Lecoin, L., Sakurai, T., Ngo, M.T., Abe, Y., Yanagisawa, M., and Le Douarin, N.M. (1998). Cloning and characterization of a novel endothelin receptor subtype in the avian class. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **95**, 3024–3029.
- Lee, H.O., Levorse, J.M., and Shin, M.K. (2003). The endothelin receptor-B is required for the migration of neural crest-derived melanocyte and enteric neuron precursors. *Dev. Biol.* **259**, 162–175.
- Lee, H., Deng, J., Kujawski, M. et al. (2010). STAT3-induced S1PR1 expression is crucial for persistent STAT3 activation in tumors. *Nat. Med.* **16**, 1421–1428.
- Li, A., and Machesky, L.M. (2012). Melanoblasts on the move: Rac1 sets the pace. *Small GTPases* **3**, 115–119.
- Li, A., Dawson, J.C., Forero-Vargas, M., Spence, H.J., Yu, X., Konig, I., Anderson, K., and Machesky, L.M. (2010). The actin-bundling protein fascin stabilizes actin in invadopodia and potentiates protrusive invasion. *Curr. Biol.* **20**, 339–345.
- Li, A., Ma, Y., Yu, X. et al. (2011). Rac1 drives melanoblast organization during mouse development by orchestrating pseudopod-driven motility and cell-cycle progression. *Dev. Cell* **21**, 722–734.
- Lindsay, C.R., Lawn, S., Campbell, A.D. et al. (2011). P-Rex1 is required for efficient melanoblast migration and melanoma metastasis. *Nat. Commun.* **2**, 555.
- Luciani, F., Champeval, D., Herbette, A. et al. (2011). Biological and mathematical modeling of melanocyte development. *Development* **138**, 3943–3954.
- Machesky, L.M. (2008). Lamellipodia and filopodia in metastasis and invasion. *FEBS Lett.* **582**, 2102–2111.
- McGill, G.G., Haq, R., Nishimura, E.K., and Fisher, D.E. (2006). c-Met expression is regulated by Mitf in the melanocyte lineage. *J. Biol. Chem.* **281**, 10365–10373.
- Mort, R.L., Hay, L., and Jackson, I.J. (2010). Ex vivo live imaging of melanoblast migration in embryonic mouse skin. *Pigment Cell Melanoma Res.* **23**, 299–301.
- Muralidharan-Chari, V., Hoover, H., Clancy, J., Schweitzer, J., Suckow, M.A., Schroeder, V., Castellino, F.J., Schorey, J.S., and D'souza-Schorey, C. (2009). ADP-ribosylation factor 6 regulates tumorigenic and invasive properties *in vivo*. *Cancer Res.* **69**, 2201–2209.
- Oser, M., and Condeelis, J. (2009). The cofilin activity cycle in lamellipodia and invadopodia. *J. Cell. Biochem.* **108**, 1252–1262.
- Parichy, D.M., Rawls, J.F., Pratt, S.J., Whitfield, T.T., and Johnson, S.L. (1999). Zebrafish sparse corresponds to an orthologue of c-kit and is required for the morphogenesis of a subpopulation of melanocytes, but is not essential for hematopoiesis or primordial germ cell development. *Development* **126**, 3425–3436.
- Petrie, R.J., Gavara, N., Chadwick, R.S., and Yamada, K.M. (2012). Nonpolarized signaling reveals two distinct modes of 3D cell migration. *J. Cell Biol.* **197**, 439–455.
- Pichot, C.S., Arvanitis, C., Hartig, S.M., Jensen, S.A., Bechill, J., Marzouk, S., Yu, J., Frost, J.A., and Corey, S.J. (2010). Cdc42-interacting protein 4 promotes breast cancer cell invasion and formation of invadopodia through activation of N-WASp. *Cancer Res.* **70**, 8347–8356.
- Pinner, S., Jordan, P., Sharrock, K., Bazley, L., Collinson, L., Marais, R., Bonvin, E., Goding, C., and Sahai, E. (2009). Intravital imaging reveals transient changes in pigment production and Brn2 expression during metastatic melanoma dissemination. *Cancer Res.* **69**, 7969–7977.
- Pla, P., and Larue, L. (2003). Involvement of endothelin receptors in normal and pathological development of neural crest cells. *Int. J. Dev. Biol.* **47**, 315–325.
- Pla, P., Alberti, C., Solov'eva, O., Pasdar, M., Kunisada, T., and Larue, L. (2005). Ednrb2 orients cell migration towards the dorsolateral neural crest pathway and promotes melanocyte differentiation. *Pigment Cell Res.* **18**, 181–187.
- Poincloux, R., Lizarraga, F., and Chavrier, P. (2009). Matrix invasion by tumour cells: a focus on MT1-MMP trafficking to invadopodia. *J. Cell Sci.* **122**, 3015–3024.
- Raftopoulou, M., and Hall, A. (2004). Cell migration: rho GTPases lead the way. *Dev. Biol.* **265**, 23–32.
- Rawls, J.F., and Johnson, S.L. (2003). Temporal and molecular separation of the kit receptor tyrosine kinase's roles in zebrafish melanocyte migration and survival. *Dev. Biol.* **262**, 152–161.
- Reid, K., Turnley, A.M., Maxwell, G.D., Kurihara, Y., Kurihara, H., Bartlett, P.F., and Murphy, M. (1996). Multiple roles for endothelin in melanocyte development: regulation of progenitor number and stimulation of differentiation. *Development* **122**, 3911–3919.
- Ridley, A.J. (2011). Life at the leading edge. *Cell* **145**, 1012–1022.
- Sabeh, F., Shimizu-Hirota, R., and Weiss, S.J. (2009). Protease-dependent versus -independent cancer cell invasion programs: three-dimensional amoeboid movement revisited. *J. Cell Biol.* **185**, 11–19.
- Sahai, E., and Marshall, C.J. (2003). Differing modes of tumour cell invasion have distinct requirements for Rho/ROCK signalling and extracellular proteolysis. *Nat. Cell Biol.* **5**, 711–719.

- Sanchez-Martin, M., Rodriguez-Garcia, A., Perez-Losada, J., Sagrera, A., Read, A.P., and Sanchez-Garcia, I. (2002). SLUG (SNAI2) deletions in patients with Waardenburg disease. *Hum. Mol. Genet.* *11*, 3231–3236.
- Santiago, A., and Erickson, C.A. (2002). Ephrin-B ligands play a dual role in the control of neural crest cell migration. *Development* *129*, 3621–3632.
- Sanz-Moreno, V., and Marshall, C.J. (2010). The plasticity of cytoskeletal dynamics underlying neoplastic cell migration. *Curr. Opin. Cell Biol.* *22*, 690–696.
- Sanz-Moreno, V., Gadea, G., Ahn, J., Paterson, H., Marra, P., Pinner, S., Sahai, E., and Marshall, C.J. (2008). Rac activation and inactivation control plasticity of tumor cell movement. *Cell* *135*, 510–523.
- Schoumacher, M., Goldman, R.D., Louvard, D., and Vignjevic, D.M. (2010). Actin, microtubules, and vimentin intermediate filaments cooperate for elongation of invadopodia. *J. Cell Biol.* *189*, 541–556.
- Schouwey, K., Delmas, V., Larue, L., Zimmer-Strobl, U., Strobl, L.J., Radtke, F., and Beermann, F. (2007). Notch1 and Notch2 receptors influence progressive hair graying in a dose-dependent manner. *Dev. Dyn.* *236*, 282–289.
- Shackleton, M., and Quintana, E. (2010). Progress in understanding melanoma propagation. *Mol. Oncol.* *4*, 451–457.
- Sixt, M. (2012). Cell migration: fibroblasts find a new way to get ahead. *J. Cell Biol.* *197*, 347–349.
- Spiering, D., and Hodgson, L. (2011). Dynamics of the Rho-family small GTPases in actin regulation and motility. *Cell Adh. Migr.* *5*, 170–180.
- Theveneau, E., Marchant, L., Kuriyama, S., Gull, M., Moepps, B., Parsons, M., and Mayor, R. (2010). Collective chemotaxis requires contact-dependent cell polarity. *Dev. Cell* *19*, 39–53.
- Tsao, H., Chin, L., Garraway, L.A., and Fisher, D.E. (2012). Melanoma: from mutations to medicine. *Genes Dev.* *26*, 1131–1155.
- Virchow, R.L.K. (1859). *Cellular Pathology*. (London: John Churchill).
- Wellbrock, C., Rana, S., Paterson, H., Pickersgill, H., Brummelkamp, T., and Marais, R. (2008). Oncogenic BRAF regulates melanoma proliferation through the lineage specific factor MITF. *PLoS ONE* *3*, e2734.
- Whiteman, D.C., Pavan, W.J., and Bastian, B.C. (2011). The melanomas: a synthesis of epidemiological, clinical, histopathological, genetic, and biological aspects, supporting distinct subtypes, causal pathways, and cells of origin. *Pigment Cell Melanoma Res.* *24*, 879–897.
- Yoshida, K., and Soldati, T. (2006). Dissection of amoeboid movement into two mechanically distinct modes. *J. Cell Sci.* *119*, 3833–3844.

