



HAL
open science

Étude du rôle des facteurs de transcription inducteurs d'EMT dans la mélanomagenèse

Geoffrey Richard

► **To cite this version:**

Geoffrey Richard. Étude du rôle des facteurs de transcription inducteurs d'EMT dans la mélanomagenèse. Cancer. Université Claude Bernard - Lyon I, 2015. Français. NNT : 2015LYO10141 . tel-01323026

HAL Id: tel-01323026

<https://theses.hal.science/tel-01323026>

Submitted on 30 May 2016

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

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

THESE DE L'UNIVERSITE DE LYON

Délivrée par

L'UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1

ECOLE DOCTORALE
Biologie Moléculaire Intégrative et Cellulaire

DIPLOME DE DOCTORAT
(arrêté du 7 août 2006)

soutenue publiquement le 08-10-2015

par

Geoffrey RICHARD

Etude du rôle des facteurs de transcription inducteurs d'EMT dans la mélanomagenèse

JURY

Pr. Stéphane Dalle	Président
Pr. Gilles Favre	Rapporteur
Dr. Lionel Larue	Rapporteur
Dr. Corine Bertolotto	Examineur
Pr. Alain Puisieux	Directeur de thèse
Dr. Julie Caramel	Encadrante de thèse

THESE DE L'UNIVERSITE DE LYON

Délivrée par

L'UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1

ECOLE DOCTORALE
Biologie Moléculaire Intégrative et Cellulaire

DIPLOME DE DOCTORAT
(arrêté du 7 août 2006)

soutenue publiquement le 08-10-2015

par

Geoffrey RICHARD

Etude du rôle des facteurs de transcription inducteurs d'EMT dans la mélanomagenèse

JURY

Pr. Stéphane Dalle	Président
Pr. Gilles Favre	Rapporteur
Dr. Lionel Larue	Rapporteur
Dr. Corine Bertolotto	Examineur
Pr. Alain Puisieux	Directeur de thèse
Dr. Julie Caramel	Encadrante de thèse

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

Président de l'Université

Vice-président du Conseil d'Administration

Vice-président du Conseil des Etudes et de la Vie Universitaire

Vice-président du Conseil Scientifique

Directeur Général des Services

M. François-Noël GILLY

M. le Professeur Hamda BEN HADID

M. le Professeur Philippe LALLE

M. le Professeur Germain GILLET

M. Alain HELLEU

COMPOSANTES SANTE

Faculté de Médecine Lyon Est – Claude Bernard

Directeur : M. le Professeur J. ETIENNE

Faculté de Médecine et de Maïeutique Lyon Sud – Charles Mérieux

Directeur : Mme la Professeure C. BURILLON

Faculté d'Odontologie

Directeur : M. le Professeur D. BOURGEOIS

Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

Directeur : Mme la Professeure C. VINCIGUERRA

Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation

Directeur : M. le Professeur Y. MATILLON

Département de formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine

Directeur : Mme. la Professeure A-M. SCHOTT

COMPOSANTES ET DEPARTEMENTS DE SCIENCES ET TECHNOLOGIE

Faculté des Sciences et Technologies

Directeur : M. F. DE MARCHI

Département Biologie

Directeur : M. le Professeur F. FLEURY

Département Chimie Biochimie

Directeur : Mme Caroline FELIX

Département GEP

Directeur : M. Hassan HAMMOURI

Département Informatique

Directeur : M. le Professeur S. AKKOUCHE

Département Mathématiques

Directeur : M. le Professeur Georges TOMANOV

Département Mécanique

Directeur : M. le Professeur H. BEN HADID

Département Physique

Directeur : M. Jean-Claude PLENET

UFR Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives

Directeur : M. Y. VANPOULLE

Observatoire des Sciences de l'Univers de Lyon

Directeur : M. B. GUIDERDONI

Polytech Lyon

Directeur : M. P. FOURNIER

Ecole Supérieure de Chimie Physique Electronique

Directeur : M. G. PIGNAULT

Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1

Directeur : M. le Professeur C. VITON

Ecole Supérieure du Professorat et de l'Education

Directeur : M. le Professeur A. MOUGNIOTTE

Institut de Science Financière et d'Assurances

Directeur : M. N. LEBOISNE

Thèse effectuée sous la direction du Pr. Alain PUISIEUX

Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon

INSERM1052 – CNRS 5286

Equipe EMT et plasticité de la cellule cancéreuse

Centre Léon Bérard – 28 rue Laënnec

69008 Lyon

Thèse financée dans le cadre du projet « Laboratoires d'Excellence » DEVweCAN
Développement Cancer et Thérapies Ciblées (3 ans) ainsi que par l'association
La Ligue Contre le Cancer



Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier les membres qui composent mon jury pour avoir accepté d'évaluer mon travail de thèse. Je remercie le Dr. Lionel Larue et le Pr. Gille Favre qui en qualité de rapporteurs ont donné de leur temps pour lire et critiquer mon manuscrit. Je remercie tout particulièrement le Dr. Corine Bertolotto, préalablement membre de mon comité de thèse, qui a pris de son temps pour m'écouter et me guider dès le début de mon projet. Je tenais aussi à remercier le Pr. Stéphane Dalle qui a beaucoup apporté à mon projet et a accepté de présider mon jury.

C'est un immense honneur pour moi que de présenter mes travaux de thèse devant des scientifiques reconnus tels que vous.

En dehors de sa participation à mon jury de thèse, je souhaite aussi remercier le Pr. Puisieux, mon directeur de thèse, pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire et pour avoir su être présent, malgré ses responsabilités, tout au long de mon doctorat. Vos remarques lors de nos réunions ont souvent su me guider dans mes choix. Ce fut pour moi un honneur et un plaisir de travailler dans votre laboratoire.

Je tiens évidemment à remercier tout particulièrement le Dr. Julie Caramel pour m'avoir encadrée tout au long de ma thèse. Je te remercie pour m'avoir aidé et accompagné à chaque étape qu'un doctorant doit traverser entre sa première année et la soutenance. Tu as pris de ton temps pour me transmettre ton savoir et les qualités qui font de toi le chercheur que tu es. Tu n'as jamais compté tes heures et je t'en suis sincèrement reconnaissant. Merci également de m'avoir accordé ta confiance et de m'avoir laissé suffisamment d'indépendance et d'autonomie pour développer mon esprit critique.

Je remercie ma famille pour l'amour et le soutien qu'elle m'apporte.

Une thèse, c'est l'histoire d'une aventure dans laquelle on fait des rencontres qui marquent. Je suis donc très heureux que cette aventure m'est amené à connaître des gens qui sont maintenant plus que des collègues, des amis. Je pense bien sûr aux « Pigeons », Baptiste Gras, Guillaume Collin et Laurent Jacquaroud, mais aussi à Ebticem Nouri et Charlotte Bouard.

Je remercie tous les membres de l'équipe, particulièrement Marie-Ambre Monet son aide à la paillasse m'a été précieuse.

Enfin, je remercie toutes les personnes que j'ai pu côtoyer tout au long de ma thèse et qui ont contribué à faire de ces années une expérience inoubliable.

Résumé de la thèse

Etude du rôle des facteurs de transcription inducteurs d'EMT dans la mélanomagenèse

Les facteurs de transcription inducteurs de la transition épithélio-mésenchymateuse (EMT) sont fréquemment réactivés de manière aberrante dans de nombreux cancers. Dans les carcinomes, ils favorisent dans les étapes précoces le développement tumoral en inhibant les systèmes de sauvegarde tels que la sénescence ou l'apoptose et à terme dans les étapes finales, promeuvent la formation de métastases. Dans le cadre du mélanome nous avons mis en évidence des fonctions antagonistes de ces facteurs : il était connu que ZEB2 et SNAIL2 sont impliqués dans la délamination de la crête neurale et la détermination mélanocytaire mais de manière inattendue ZEB2 et SNAIL2 sont aussi exprimés dans les mélanocytes adultes normaux et leur expression est diminuée au cours de la progression maligne, au profit des facteurs ZEB1 et TWIST1. Ce changement de profil d'expression est un facteur de mauvais pronostic pour les patients.

Mes travaux ont permis de montrer que cet effet antagoniste passe par la régulation de MITF, le facteur clef du développement mélanocytaire. ZEB2 et SNAIL2 exercent une fonction oncosuppressive en activant l'expression de MITF et en promouvant la différenciation mélanocytaire. Au contraire, ZEB1 et TWIST1 jouent un rôle oncogénique en inhibant MITF et favorisent l'acquisition de propriétés de cellules souches. J'ai poursuivi l'étude de la fonction oncogénique de Twist1 *in vivo* dans un modèle murin de mélanome induit par l'oncogène BRAFV600. J'ai ainsi mis en évidence que l'expression conjointe de Twist1 et de BRAFV600 entraîne la formation de mélanomes agressifs, dédifférenciés et invasifs.

Enfin, j'ai analysé et caractérisé l'implication de ces facteurs dans le processus de résistance aux thérapies ciblées anti-BRAF dans les mélanomes BRAFV600E. J'ai démontré que ZEB1 peut contribuer à la résistance aux inhibiteurs de BRAF. En effet, l'expression de ZEB1 est augmentée dans des cellules de mélanomes résistantes (innée ou acquise), par rapport aux cellules sensibles. Tandis que l'expression de ZEB1 favorise l'émergence de cellules résistantes, cibler ZEB1 augmente la sensibilité des cellules à l'inhibiteur de BRAF et resensibilise les cellules résistantes, mettant en évidence l'intérêt de cette combinaison d'un point de vue thérapeutique.

Mots clés : EMT; mélanome ; ZEB1; oncogène ; plasticité; différenciation; thérapie ciblée; résistance.

Abstract

EMT-transcription factors involvement during melanomagenesis

Embryonic transcription factors inducers of Epithelial to Mesenchymal Transition (EMT-TFs) are frequently and aberrantly reactivated in many cancers. In carcinomas they promote, in early stage, tumor development by inhibiting the failsafe programs of the cell like senescence and apoptosis, and in final stages, they promote metastases formation. In melanoma we highlighted antagonist's functions of these factors: it was known that ZEB2 and SNAIL2 were involved in delamination of neural crest cells and melanocytes determination but unexpectedly, ZEB2 and SNAIL2 are also expressed in normal adult melanocytes and their expression is decreased during malignant progression, for the benefit of ZEB1 and TWIST1 factors. This change in expression profiling is a factor of poor prognosis for patients.

The results I provide show that this antagonistic effect might go through the regulation of MITF, the key factor in the development of melanocytic. ZEB2 and SNAIL2 exert an oncosuppressive function by activating the expression of MITF and promoting melanocytic differentiation. On the contrary, ZEB1 TWIST1 plays an oncogenic role in inhibiting MITF and promotes the acquisition of stem cells properties. In order to go deeper in the study of TWIST1 oncogenic functions, I used an *in vivo* Melanoma murine model induced by the BRAFV600 oncogene. I thus put in evidence that the combined expression of TWIST1 and BRAFV600 leads to the formation of aggressive, dedifferentiated and invasive melanoma.

Finally, I analyzed and characterized the involvement of these factors in the process of resistance to targeted therapies against BRAFV600E melanomas. I demonstrated that ZEB1 may contribute to BRAF inhibitors resistance. Indeed, ZEB1 expression is increased in resistant (innate or acquired) melanomas cells, compared to sensitive cells. While ZEB1 expression promotes the emergence of resistant cells, targeting ZEB1 increases the sensitivity to BRAF inhibitor and sensitizes resistant cells, highlighting the interest of this combination from a therapeutic point of view.

Keywords : EMT ; melanoma ; ZEB1 ; oncogene ; plasticity ; differentiation ; targeted therapy ; resistance.

Sommaire

RESUME DE LA THESE	11
ABSTRACT	13
SOMMAIRE	15
Liste des abréviations	19
Liste des figures	25
Liste des tableaux	25
INTRODUCTION GENERALE	29
I. LA TRANSITION EPITHELIO-MESENCHYMATEUSE.....	31
A. FONCTION PHYSIOLOGIQUE ET REGULATION DE L'EMT	33
1. <i>Rôles physiologiques de l'EMT</i>	33
a) L'EMT au cours du développement embryonnaire	33
EMT primaires.....	33
EMT secondaires.....	35
b) EMT de Type 2.....	37
2. <i>Les voies de signalisation activatrices de l'EMT</i>	39
3. <i>Les facteurs de transcription inducteurs d'EMT</i>	40
a) La famille SNAIL : structure et fonctions	43
b) La famille ZEB : structure et fonctions.....	45
c) La famille TWIST : structure et fonctions	51
B. L'EMT DANS LA PROGRESSION Tumorale.....	55
1. <i>Régulation de la cascade métastatique</i>	55
2. <i>Inhibition des programmes de sauvegarde et initiation tumorale</i>	61
3. <i>Acquisition de propriétés de cellules souches</i>	67
4. <i>L'EMT et ses facteurs dans la résistance aux traitements</i>	71
II. LE MELANOME : DEVELOPPEMENT, TRAITEMENTS ET RESISTANCE	77
A. ORIGINE.....	77
1. <i>La structure de la peau : derme et épiderme</i>	77
2. <i>Les mélanocytes chez l'Homme</i>	81
a) Origine et détermination	81
b) Fonctions, pigmentation et régénération	81
c) Les mélanocytes et les kératinocytes, une interaction forte.....	85
3. <i>MITF : le facteur clef</i>	87
a) Fonctions et réseaux	87
b) Pathologies.....	93
B. LES DIFFERENTS TYPES DE MELANOMES.....	95
1. <i>La classification morphologique et phénotypique</i>	95
2. <i>La classification génétique</i>	99
a) Les mutations de NRAS	101
b) Les mutations de BRAF.....	103
c) Les autres mutations courantes	105
3. <i>Combinaison des classifications</i>	107
C. LA MELANOMAGENÈSE.....	115
1. <i>Les différentes étapes de la mélanomagenèse</i>	115
a) L'activation oncogénique	115
b) Les systèmes de sauvegarde et leur inhibition : formation d'une tumeur maligne	119
c) Les phases de croissance de la tumeur maligne.....	123
d) La dissémination métastatique	125
2. <i>MITF un agent double</i>	127

3.	<i>L'apport des modèles murins de mélanome dans la compréhension de la mélanomagenèse</i>	129
a)	Les principaux modèles.....	131
(1)	Modèle NRASQ61R.....	131
(2)	Modèle BRAFV600E.....	131
(3)	Le modèle NRASQ61R inductible.....	133
b)	Démonstration du rôle de certains oncogènes et oncosuppresseurs.....	133
D.	TRAITEMENTS ET EMERGENCES DE CELLULES RESISTANTES.....	139
1.	<i>Les inhibiteurs de BRAF</i>	139
2.	<i>Mécanismes de résistance aux inhibiteurs de BRAF</i>	143
a)	Mécanismes dépendants de la voie des MAPK.....	145
b)	Mécanismes indépendants de la voie des MAPK.....	147
c)	Les combinaisons anti-BRAF et anti-MEK.....	149
3.	<i>L'immunothérapie dans le mélanome</i>	151
	OBJECTIF GENERAL DE LA THESE.....	157
	RESULTATS	159
III.	RESULTATS	161
	ARTICLE N°1: A SWITCH IN THE EXPRESSION OF EMBRYONIC EMT-INDUCERS DRIVES THE DEVELOPMENT OF MALIGNANT MELANOMA.....	161
A.	INTRODUCTION.....	161
B.	CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....	207
	RESEARCH HIGHLIGHTS: ANTAGONISTIC FUNCTIONS OF EMT-INDUCERS IN MELANOMA DEVELOPMENT: IMPLICATION FOR CANCER CELL PLASTICITY.....	207
C.	ETUDE <i>IN VIVO</i> D'UNE EVENTUELLE COOPERATION ENTRE BRAFV600E ET TWIST1 DANS UN MODELE MURIN DE MELANOME	217
	ARTICLE N°2: ZEB1-MEDIATED MELANOMA CELL PLASTICITY ENHANCES RESISTANCE TO MAPK INHIBITORS.....	225
A.	INTRODUCTION.....	225
	ARTICLE N°2: ZEB1-MEDIATED MELANOMA CELL PLASTICITY ENHANCES RESISTANCE TO MAPK INHIBITORS.....	229
B.	CONCLUSIONS.....	277
	DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES	279
IV.	DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES	281
A.	FONCTIONS SPECIFIQUES DES EMT-TFS DANS LE MELANOME.....	283
1.	<i>Expressions tissus-spécifiques et rôles antagonistes des EMT-TFs</i>	283
2.	<i>Mécanismes soutenant ces fonctions antagonistes : MITF un facteur clef de voute</i>	285
3.	<i>Les réseaux d'inter-régulation des EMT-TFs</i>	287
B.	FONCTION ONCOGENIQUE DES EMT-TFS DANS DES MODELES MURINS.....	289
1.	<i>La caractérisation des souris BRAFV600E ; TWIST1</i>	291
2.	<i>Perspectives dans d'autres modèles murins</i>	293
C.	EMT-TFS ET RESISTANCE AUX THERAPIES CIBLEES DIRIGEES CONTRE LA VOIE DES MAPK.....	295
1.	<i>ZEB1 régulation de la plasticité cellulaire et résistance</i>	297
2.	<i>Stratégies de ciblage de ZEB1 à visée thérapeutique</i>	299
3.	<i>Perspectives : EMT-TFs et immunosuppression</i>	303
	BIBLIOGRAPHIE	307
V.	BIBLIOGRAPHIE	309
	ANNEXE	331
VI.	ANNEXE	333

Liste des abréviations

α -MSH:	alpha-Melanocyte Stimulating Hormone
ABCC1:	ATP-binding cassette sub family C member 1
AMM:	Autorisation de Mise sur le Marché
ADN:	Acide DésoxyriboNucléique
ARF	ADP Ribosylation Factor
ARN:	Acide Ribonucléique
ATM:	Ataxia telangiectasia mutated
ATP:	Adenosine Tri-Phosphate
ATR:	ATM and Rad3 related
AXL:	AXL receptor tyrosine kinase
BCL-2:	B-cell Chronic lymphocytic leukemia/lymphoma-2
bHLH:	basic Helix Loop Helix
BMI1:	B Lymphoma Mo-MLV insertion region 1 homolog
BMP:	Bone Morphogenetic Protein
BRAF:	Rapidly Accelerated Fibrosarcoma homologue B
BRN2	mouse Brain-2-gene
CBP:	CREB-binding protein
CCLE:	Cancer Cell Line Encyclopedia
CCND1:	Cyclin D1
CDH1:	Cadherine 1, type 1, E-cadherin
CDK:	Cyclin Dependant Kinase
CDKN2:	cyclin-dependent kinase inhibitor 2A/B
cGMP:	cyclic Guanosine Monophosphate
CHK1:	Checkpoint Kinase 1
CREB:	cAMP-responsive element binding
CSCs:	Cancer Stem Cells
CtBP:	C-terminal binding protein
CTLA-4:	cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4
DCT:	Dopachrome tautomérase
DMBA-TPA:	7,12-Dimethylbenz[a]anthracene- 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate
EDN:	Endothéline
EGF:	Epidermal Growth Factor
EMT:	Epithelial to Mesenchymal Transition
EMT-TFs:	EMT-Transcription factors
ERBB4	erb-b2 receptor tyrosine kinase 4
ERK:	Extracellular signal regulated kinase
FBX031	F-Box protein 031
FDA:	Food and Drugs Administration
FGF:	Fibroblast Growth Factor
FOXC2:	Forkhead box protein C2

GDP: Guanosine Diphosphate
 GRIN2A: glutamate receptor, ionotropic, N-methyl D-aspartate 2A
 GSK3 β : glycogen synthase kinase 3-beta
 GTP: Guanosine Triphosphate
 GTPas: Guanosinetriphosphatase
 HAND2: Heart And Neural Crest Derivatives Expressed 2
 IGFR: Insulin Growth Factor Receptor
 IKK: inhibitor of kappa kinase
 INK4A: Inhibitor of CDK4
 JARID1B: Jumonji/ARID domain-containing protein 1B
 KLF4: Kruppel-like factor 4
 Lef1: Lymphoid enhancer factor 1
 MAPK: Mitogen Activated Protein Kinase
 MC1R: Melanocortin 1 Receptor
 MDM: Mouse Double Minute
 MDR: Multi drug resistance
 MEK: MAK/ERK kinase
 MET: Mesenchymal to Epithelial Transition
 miRNA: micro-RNA
 MITF: Microphthalmia Transcription Factor
 MMP: Matrix MetalloProtease
 NES: Nuclear Export Signal
 NF- κ B: nuclear factor kappaB
 NOD/SCID: Non-Obese Diabetic / Severe Combined ImmunoDeficiency
 NSCLC: Non-Small Cell lung Cancer
 NuRD: Nucleosome Remodeling and Deacetylase
 OIS: Oncogene Induced Senescence
 p75: low-affinity nerve growth factor receptor
 Pax3: Paired Box 3
 PD-1: Programme Death 1
 PDGFR: Platelet Derived Growth Factor Receptor
 PDK1: Phosphoinositide-dependent kinase 1
 PI3K/AKT: Phosphatidylinositol-3 kinase / PKB, Protein Kinase B
 PKA : Protein Kinase A
 PPCD3 : dystrophie cornéenne postérieure polymorphe 3
 PRRX1: Paired Related Homeobox 1
 PTEN: Phosphatase and tensin homolog
 RAC1: Ras-related botulinum toxin substrate 1
 Ras: Rat sarcoma (H-Ras, Harvey; K-Ras, Kristen; N-Ras, Neuroblastoma)
 Rb: Retinoblastoma protein
 RND3: Rho family GTPase 3
 RTK: Tyrosine Kinase Receptor

SBD: Smad Binding Domain
shRNA: short-hairpin RNA
siRNA: small interfering RNA
SIX1: Six oculis homeobox homolog 1
SMAD: Sma (Small body size) Mothers Against Decapentaplegic homolog
SNAIL: Snai Homolog
SOX: SRY-box
TCF: T-Cell Factor
TCGA: The Cancer Genome Atlas
TFE: Transcription Factor enhance
TGF- β : Transforming Growth Factor-Beta
TWIST: Twist-related protein
TYRP: Tyrosinase-related protein
VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor
WAP: Whet Acidic Protein
WNT: wingless integration site
ZEB: Zinc finger E-box-binding

Liste des figures

Figure 1 : Le processus de transition épithélio-mésenchymateuse.....	32
Figure 2 : EMT primaire, secondaire.....	34
Figure 3 : Devenir des cellules issues des EMT primaires et secondaires	36
Figure 4 : L'EMT de type 2 dans la fibrose, processus pathologique.....	38
Figure 5 : Représentation des différentes voies impliquées dans l'activation de l'EMT et de ses inducteurs	40
Figure 6 : Structure des protéines de la famille SNAIL	44
Figure 7 : Structure des protéines de la famille ZEB	46
Figure 8 : Structure des protéines de la famille TWIST	52
Figure 9 : Cycle d'EMT et de MET dans la progression tumorale	56
Figure 10 : Les EMT-TFs permettent l'inhibition des systèmes de sauvegardes et favorisent la transformation cellulaire.....	64
Figure 11: Les EMT-TFs dans la génération de la plasticité cellulaire.....	70
Figure 12 : Structure de la peau.....	80
Figure 13 : Formation de la crête neurale et devenir des cellules issues de la délamination	82
Figure 14 : Structure de la protéine MITF.....	90
Figure 15 : MITF : activation de gènes cibles	92
Figure 16 : Syndrome de Waardenburg : plusieurs maladies pour un même gène	94
Figure 17 : Présentation de la voie de signalisation MAPK.....	104
Figure 18 : Mélanomes issus de mélanocytes associés à un épithélium	110
Figure 19 : Mélanomes issus de mélanocytes non-associés à un épithélium	112
Figure 20 : La mélanomagenèse et les événements génétiques et moléculaires correspondant.....	116
Figure 21 : La voie des MAPkinase	118
Figure 22 : MITF, le modèle de rhéostat.....	128
Figure 23 : PET scan de patients traités au vémurafenib montrant un effet anti-tumoral efficace	142
Figure 24 : Mécanismes de résistances aux inhibiteurs de BRAFV600E et conséquences sur la voie des MAPK	148
Figure 25 : Comparaison des modèles de mélanome murin BRAFV600E en présence ou non de TWIST1.....	218
Figure 26 : Influence de TWIST1 sur la tumorigénicité	221
Figure 27 : Analyse et caractérisation des mélanomes BRAFV600E; TWIST1	222
Figure 28 : Modèle schématique de plasticité phénotypique dépendante de ZEB1 dans la résistance aux BRAFi.....	300

Liste des tableaux

Tableau 1 : Facteurs de transcription affilié à l'EMT	41
Tableau 2 : Tableau récapitulatif des modèles murins démontrant le rôle des EMT-TFs dans l'initiation tumorale.....	67
Tableau 3 : Classification selon l'indice de Breslow et correspondance avec les critères TNM	114

Préambule

La Transition Epithélio-Mésenchymateuse (EMT) est un processus embryonnaire fréquemment réactivé de manière aberrante dans de nombreux cancers, où il a tout d'abord été impliqué dans les étapes tardives de la progression tumorale, dans la dissémination métastatique. Par la suite, les travaux notamment de l'équipe d'Alain Puisieux ont permis de montrer que l'EMT joue aussi un rôle aux étapes précoces du développement tumoral. Les facteurs inducteurs de l'EMT sont en effet capables de promouvoir l'initiation tumorale en favorisant la transformation cellulaire via notamment l'inhibition des programmes de sauvegarde tels que la senescence et l'apoptose. Ces données ont essentiellement été obtenues dans des modèles de carcinomes, tumeurs d'origine épithéliale.

Sachant que certains EMT-TFs sont impliqués lors de la délamination des cellules de la crête neurale il paraissait alors très intéressant d'étudier le rôle des EMT-TFs dans le mélanome, une tumeur de la peau qui se développe à partir de cellules pigmentées appelées les mélanocytes, trouvant leur origine embryonnaire au niveau de la crête neurale. Détecté précocement, le mélanome nécessite une intervention chirurgicale mineure avec de grandes chances de survie pour le patient, mais au stade métastatique il constitue la forme de cancer cutanée la plus mortelle. Jusqu'à il y a peu, les patients atteints d'un mélanome métastatique, présentaient en effet une médiane de survie située entre six et quinze mois, les cellules de mélanomes résistant aux chimiothérapies classiquement utilisées, laissant les patients dans une impasse thérapeutique. Ce n'est que très récemment, ces dernières années, que la prise en charge du mélanome métastatique a été révolutionnée par l'émergence de nouveaux traitements (thérapies ciblées contre la voie MAPK et immunothérapies), malgré des taux de réponses encore insatisfaisants et des problèmes de résistance. Il reste donc nécessaire de mieux comprendre cette maladie et les facteurs impliqués dans son développement afin de déceler de potentielles nouvelles cibles thérapeutiques.

Après avoir présenté le processus d'EMT, le réseau de facteurs de transcription assurant sa régulation et leurs fonctions connues dans la tumorigenèse des carcinomes essentiellement, nous présenterons les acteurs impliqués dans le développement du mélanome et la résistance aux traitements.

INTRODUCTION GENERALE

I. La Transition Epithélio-Mésenchymateuse

L'EMT est un processus de transdifférenciation cellulaire transitoire et réversible, jouant un rôle physiologique principalement au cours du développement embryonnaire. Il permet la transition progressive d'un état épithélial, où les cellules sont jointives et polarisées, vers un état mésenchymateux, où les cellules sont cette fois-ci dissociées et motiles (Thiery & Sleeman, 2006) (Figure 1). En plus des modifications phénotypiques, cette transition se caractérise par une reprogrammation massive des programmes transcriptionnels, avec l'activation ou l'inhibition de l'expression de marqueurs spécifiques. Ainsi, le statut épithélial se définit par l'expression de marqueurs tels que la E-cadhérine ou l'occludine (protéines de jonctions cellulaires), alors que le statut mésenchymateux se caractérise d'une part, par une perte de ces marqueurs et d'autre part, par un gain d'expression de marqueurs tels que la N-cadhérine ou la fibronectine (M Angela Nieto, 2009). De manière importante, l'EMT est réversible par le processus inverse de transition mésenchymo-épithéliale (MET), des cycles d'EMT-MET étant à l'origine de la plasticité cellulaire. Si l'induction d'une EMT « totale » est nécessaire pour obtenir un pur phénotype mésenchymateux et invasif, une EMT « partielle » est à l'origine de la génération d'un spectre de phénotypes intermédiaires, appelés états métastables, caractérisés par la co-expression de marqueurs épithéliaux et mésenchymateux, pas nécessairement associés à un changement morphologique évident.

Si l'EMT joue un rôle majeur à différents stades du développement embryonnaire, elle est également mise en place à l'âge adulte en tant que réponse physiologique suite à une blessure. D'autre part l'EMT est aussi un acteur important des pathologies dégénératives telles que la fibrose et des pathologies d'origine cancéreuse. Comme nous le verrons, les EMTs pathologiques sont très similaires aux EMTs physiologiques dans le sens où elles mettent en place les mêmes voies de signalisation et les mêmes régulateurs.

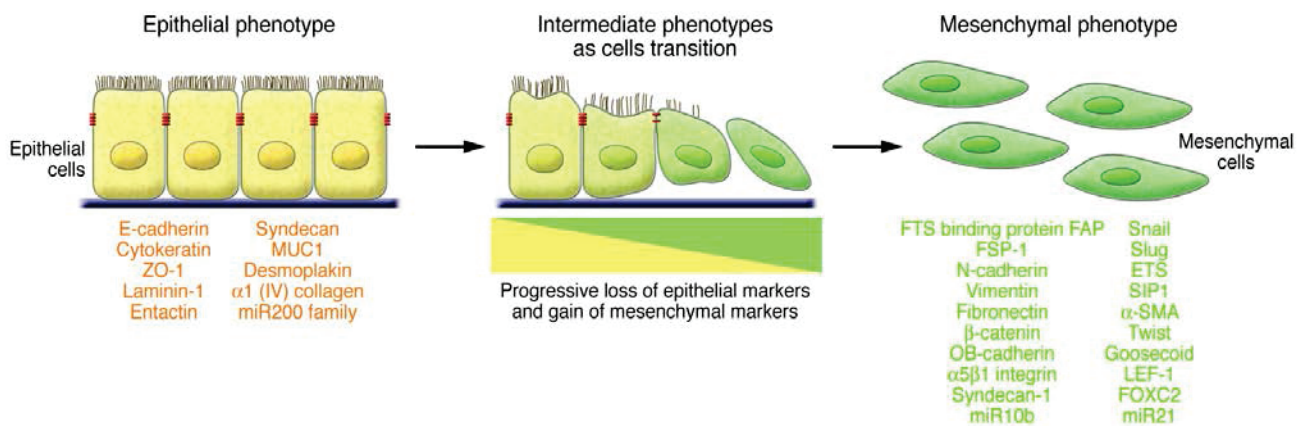


Figure 1 : Le processus de transition épithélio-mésenchymateuse

D'après (Kalluri & Weinberg, 2009).

L'EMT est un processus de transdifférenciation cellulaire permettant la transition d'un phénotype épithélial et polarisé vers un phénotype mésenchymateux et motile. Il est transitoire, progressif et réversible, le processus de réversion étant appelé MET (Transition mésenchymo-épithéliale). Les différents marqueurs spécifiques de chaque état sont listés. Le phénotype intermédiaire est caractérisé par l'expression conjointe de marqueurs propres aux deux états.

A. Fonction physiologique et régulation de l'EMT

1. Rôles physiologiques de l'EMT

a) *L'EMT au cours du développement embryonnaire*

EMT primaires

Les EMT primaires (qui définissent un tissu n'ayant jamais subi d'EMT auparavant) ont lieu chez les vertébrés au stade de la **gastrulation**, une étape importante puisqu'elle permet la création des différents feuilletts embryonnaires. Lors de cette étape, des cellules de l'embryon vont former une structure interne appelée épiblaste, ou ectoderme primitif, constitué d'une couche cellulaire épithéliale. A partir de cette couche va se former un renflement appelé ligne primitive, à partir duquel les cellules vont s'invaginer. Les cellules qui s'invaginent vont à terme finir par délaminer, elles perdent l'expression de la E-cadhérine et s'engagent alors dans une EMT pour devenir mésenchymateuses. Le devenir de ces cellules va varier selon leur engagement dans cette EMT, ainsi des moins vers les plus engagées elles formeront respectivement l'ectoderme, le mésoderme et l'endoderme (Kalluri & Weinberg, 2009; Lim & Thiery, 2012; Thiery, Acloque, Huang, & Nieto, 2009)

Chez les vertébrés, la gastrulation est suivie de la **neurulation**. L'ectoderme va former en réponse à des signaux envoyés par le mésoderme une structure appelée plaque neurale. La plaque neurale va se courber puis fusionner pour former le tube neural, précurseur du système nerveux central. Les cellules situées entre le tube neural et l'ectoderme assurent le lien entre les cellules neurales et non neurales formant ainsi une structure transitoire, les crêtes neurales (Figure 2). Les cellules qui constituent ces dernières vont délaminer à leur tour puis migrer vers les zones internes de l'embryon. Cette délamination requiert une EMT comme le démontre encore une fois la perte de la E-cadhérine, des jonctions cellulaires, un changement de morphologie et le gain d'expression de facteurs inducteurs de l'EMT, les EMT-TFs. Ces cellules alors mésenchymateuses expriment des métalloprotéases, protéines leur permettant d'évoluer dans la matrice extracellulaire et ainsi de rejoindre leurs sites de destinations. Ayant un fort potentiel de différenciation, les cellules qui délaminent de la crête neurale sont à l'origine de nombreuses structures (cœur, structure cranio-faciale...) et types cellulaires (myoblastes, ostéoblastes...) dont les mélanoblastes (Figure 3) (Bronner, 2012; Lim & Thiery, 2012; Sauka-Spengler & Bronner-Fraser, 2008; Simões-Costa & Bronner, 2013; Strobl-Mazzulla & Bronner, 2012).

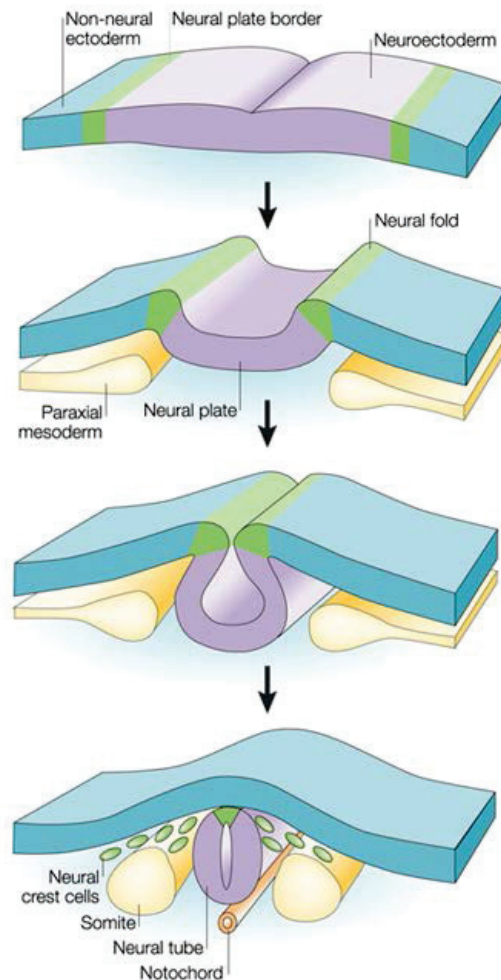


Figure 2 : EMT primaire, secondaire....

D'après (Gammill & Bronner-Fraser, 2003).

La plaque neurale va s'invaginer sous l'induction de signaux envoyés d'un côté par le neuroectoderme et l'ectoderme non neural et d'un autre coté par le mésoderme paraxial. Cette invagination va finir par générer un cylindre appelé tube neural. Les cellules de la crête neurale situées entre le tube neural et l'ectoderme non neural vont par le processus d'EMT délaminer et migrer vers différentes structures de l'embryon générant une multitude de types cellulaires dont les mélanocytes.

Dans ce processus, la transition vers un phénotype mésenchymateux ne représente donc qu'un état transitoire. Les cellules, une fois arrivées sur leurs sites respectifs vont subir une réversion de l'EMT, appelée la Transition Mésenchymo-Epithéliale (MET). Cette réversion leur permet de passer par une nouvelle étape de différenciation qui les rendra sensibles aux signaux extérieurs propres à leur environnement, permettant ainsi une spécialisation des cellules. Comme décrit précédemment, les cellules de la crête neurale génèrent une grande diversité de types cellulaires dont la spécificité se fait par différentes zones de migrations et la régulation spatio-temporelle de l'expression de nombreux gènes. Ainsi les cellules de la crête neurale qui migrent le long de l'axe dorso-latéral se retrouvent dans une zone où sont exprimés entre autres l'endothéline 3 (EDN3/EDNRB), les facteurs WNT et KIT. Ces différents facteurs vont favoriser l'expression dans ces cellules du gène clef de la détermination mélanocytaire, MITF (Microphthalmia Transcription Factor). Le facteur MITF favorise alors à son tour l'expression d'une pléiade de facteurs qui permettront la différenciation des cellules en mélanoblastes puis en mélanocytes et permettra à terme la production de mélanine (Larue, de Vuyst, & Delmas, 2013; Sommer, 2011) (Cf paragraphe II.A.3 page 54).

EMT secondaires

Alors que les EMT primaires sont suivies d'une phase de différenciation donnant naissance à de nombreuses structures et types cellulaires différents, les cellules mésenchymateuses issues des EMT secondaires possèdent un potentiel de différenciation plus restreint. Les structures mésodermes issues des EMT primaires, telles que le somatopleure, le splanchnopleure ou les somites, forment en effet des structures transitoires qui subiront une nouvelle EMT afin de générer de nouveaux types cellulaires. Ainsi les somites sont à l'origine du mésenchyme et des myoblastes alors que le splanchnopleure et le somatopleure formeront respectivement les cellules hématopoïétiques, les angioblastes, les cellules progénitrices de l'endocarde et le tissu connectif musculaire. Enfin il existe une EMT tertiaire qui se caractérise principalement par la formation du cœur. Les progéniteurs de l'endocarde redeviennent épithéliaux pour former un plexus et les tubes cardiaques. Les cellules situées dans la lumière du tube délaminent pour former les 4 différents ventricules, générant ainsi l'ébauche du cœur (Kovacic, Mercader, Torres, Boehm, & Fuster, 2012; Thiery et al., 2009).

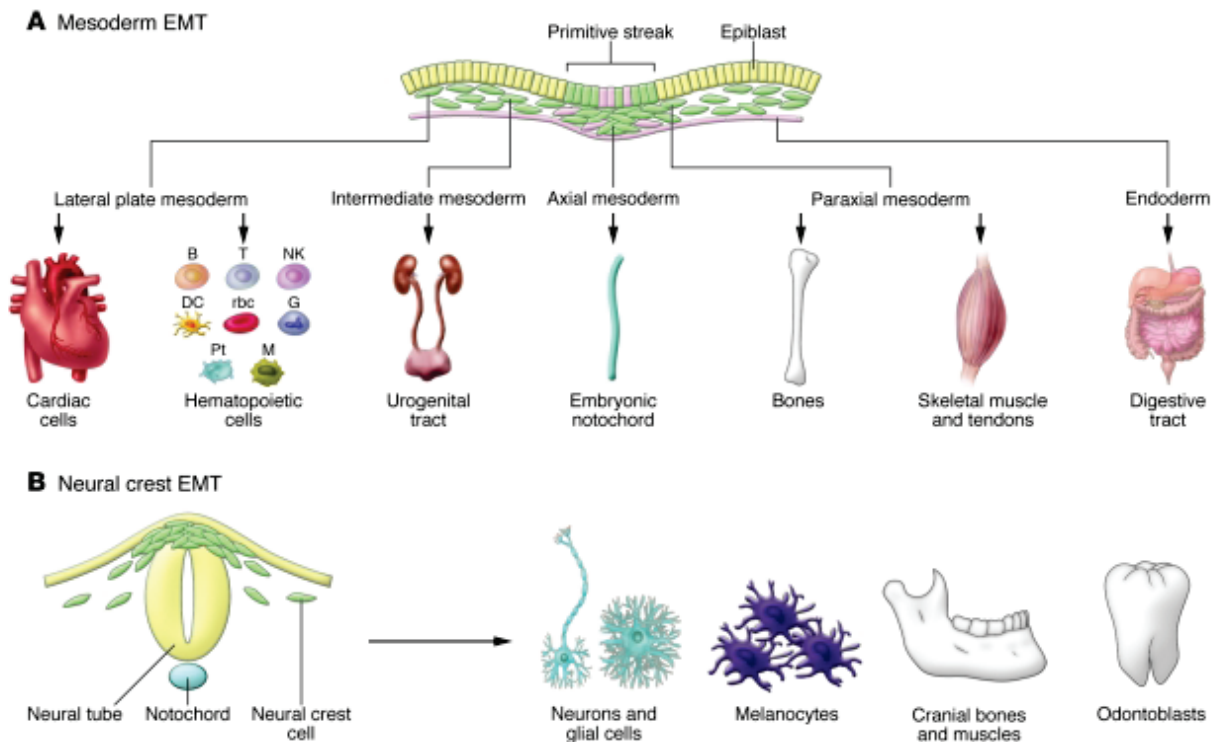


Figure 3 : Devenir des cellules issues des EMT primaires et secondaires
 D'après (Acloque, Adams, Fishwick, Bronner-Fraser, & Nieto, 2009).

Les EMTs primaires permettent la génération d'une multitude de progéniteurs d'organes et de tissus. En A, les cellules de la ligne primitive (primitive streak) vont subir une EMT afin de générer le mésoderme. Les différentes lignées issues de ce mésoderme sont représentées. En B, les différentes lignées cellulaires dérivées de la délamination de la crête neurale après l'invagination de la plaque neurale et formation du tube neural.

Des cycles d'EMT/MET sont donc nécessaires au bon déroulement du développement embryonnaire et permettent aux cellules de passer par un état transitoire, le statut mésenchymateux, afin d'assurer leur migration avant de se différencier en cellules spécialisées.

b) EMT de Type 2

Les EMTs de type 2 représentent toutes les EMTs, physiologiques ou pathologiques, non développementales et non tumorales telles que la régénération de tissus ou la fibrose, et interviennent donc à l'âge adulte.

Lors d'une blessure, les cellules mettent en place un processus similaire à l'EMT, appelé pseudo EMT ou EMT partielle. Ces EMT partielles ont été mises en évidence en étudiant la réponse mise en place après une blessure cutanée effectuée sur la souris. Les kératinocytes situés aux bords de la blessure rentrent en pseudo EMT en réponse à l'EGF et expriment le facteur SNAIL2. On observe alors un réarrangement du cytosquelette d'actine avec une perte des liaisons cellulaires comme les desmosomes. Les kératinocytes ré-épithélialisent alors la zone blessée, en maintenant toutefois une certaine cohésion entre eux, puisqu'on observe des migrations collectives de kératinocytes reliés entre eux (Arnoux, Nassour, L'Helgoualc'h, Hipskind, & Savagner, 2008; Thiery et al., 2009).

La **fibrose** prend place dans de nombreux tissus épithéliaux, elle est médiée par les cellules inflammatoires et par les fibroblastes qui émettent des signaux pro-inflammatoires ainsi que des composants de la matrice extra-cellulaire tels que du collagène. La fibrose représente les tissus connectifs formés afin de réparer une zone blessée, si cette formation de tissu est excessive et incontrôlée, la fibrose devient pathologique. En effet, si le dépôt de fibres devient trop important, les fonctions de l'organe sont compromises et à terme ce dernier devient défaillant (Figure 4). Dans ce contexte, on parle alors de myofibroblastes, cellules qui expriment en excès des composants de la matrice extracellulaire et particulièrement du collagène de type I. La génération de ces myofibroblastes est encore mal définie, toutefois nous savons que leur origine est multiple. Par exemple l'équipe d'Iwano a montré en 2002 au moyen de modèles de souris transgéniques que les fibroblastes activaient des inter-fibroblastes, précurseurs des myofibroblastes.

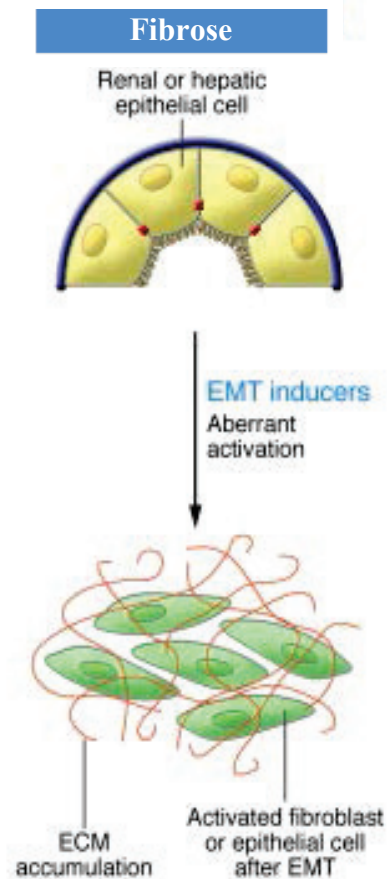


Figure 4 : L'EMT de type 2 dans la fibrose, processus pathologique
 D'après (Acloque et al., 2009; Kalluri & Weinberg, 2009).

Les EMTs de type 2 sont principalement associées à la fibrose. La réponse inflammatoire mise en place en réponse à une blessure induit une EMT. En cas de réponse immunitaire trop intense ou non contrôlée, les fibroblastes issus de cette EMT sont générés en trop grand nombre et finissent par altérer les fonctions de l'organe.

De manière plus intéressante, des études de suivi cellulaire ont permis de mettre en évidence que les myofibroblastes pouvaient émerger de la conversion de cellules épithéliales à travers une transition épithélio-mésenchymateuse (Thiery et al., 2009). Premièrement mis en évidence dans des cellules différenciées du tube rénal, il est maintenant acquis que des cellules de l'épithélium oculaire, les hépatocytes et les cardiomyocytes peuvent contribuer à la fibrose en passant par une EMT (Iwano et al., 2002; Thiery et al., 2009).

2. Les voies de signalisation activatrices de l'EMT

La transition épithélio-mésenchymateuse est un processus finement régulé, qu'il soit mis en place au cours du développement, de la cicatrisation ou dans une pathologie. De manière intéressante, on observe que dans ces différents contextes, les voies de signalisation mises en place sont très similaires.

Il existe plusieurs voies activatrices de l'EMT, certaines assurent l'activation des EMT-TFs et d'autres assurent le remodelage du cytosquelette ou le désassemblage des jonctions cellulaires, des modifications indispensables à la transition épithélio-mésenchymateuse. Ces voies sont activées par les signaux envoyés par le microenvironnement et les structures adjacentes, assurant ainsi une certaine spécificité. Ces signaux activateurs sont divers, cela peut être un signal de contrainte physique, un signal d'hypoxie, de l'inflammation, ou encore un stress oncogénique ou métabolique.

Ainsi, au cours de l'organogénèse, les voies de signalisation seront mises en place suite l'activation de facteurs clés du développement tels que Nodal, Notch, Wnt, mais aussi par des facteurs de croissance tel que le FGF ou le TGF- β , l'un des inducteurs d'EMT les plus puissants. Ces voies pourront soit activer directement les EMT-TFs, soit permettre de lever des signaux inhibiteurs réprimant leur expression. Par exemple, les voies de signalisations activatrices d'EMT au cours de la gastrulation, sont induites par le récepteur WNT, ce dernier activant le facteur Frizzled, ce qui conduit à la répression du facteur GSK3 β , un inhibiteur de SNAIL1. Plus tard pendant la délamination de la crête neurale, on retrouve une fois de plus la voie WNT/BMP mais aussi des facteurs de croissance tels que le FGF (Figure 5).

Les facteurs de croissance représentent une part importante dans l'activation de l'expression des inducteurs d'EMT. Par exemple, les récepteurs à tyrosine kinase activent des voies majeures dans la cellule, comme la voie des MAPK.

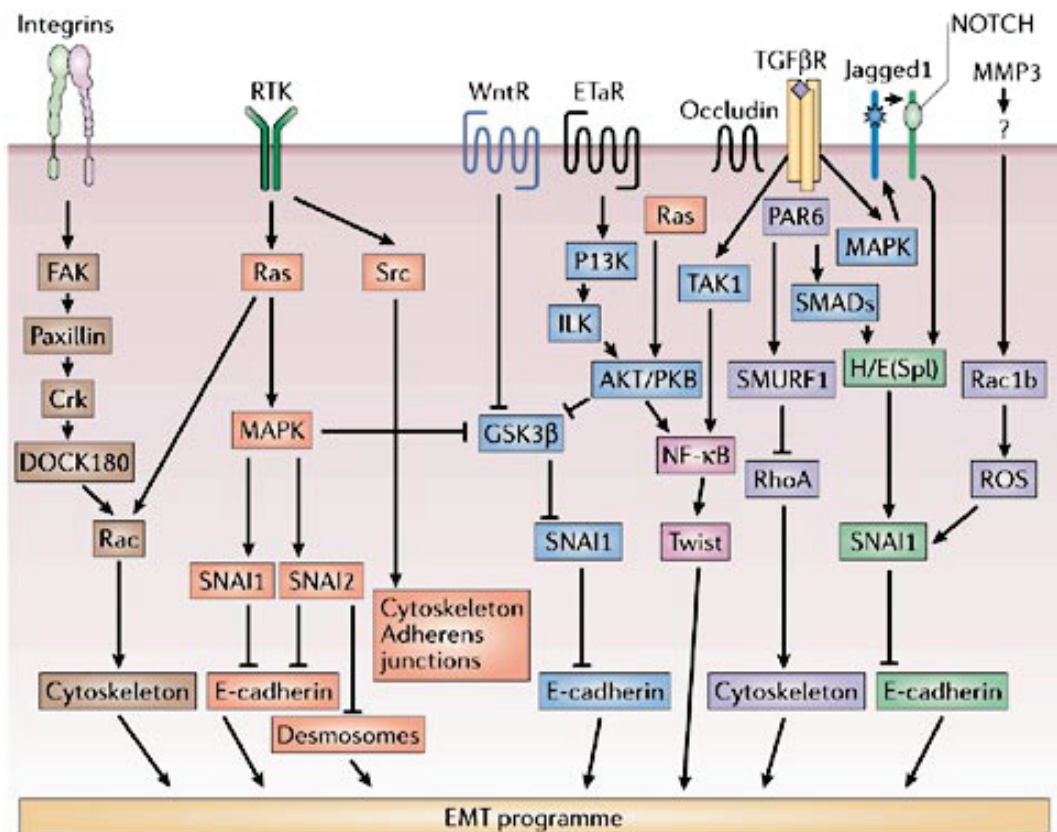


Figure 5 : Représentation des différentes voies impliquées dans l'activation de l'EMT et de ses inducteurs

D'après (Thiery & Sleeman, 2006)

Schéma des différentes voies de signalisations et leurs interactions mises en place dans le processus d'EMT physiologique et pathologique. Les différentes recherches montrent que ce sont en effet ces mêmes voies réactivées de manières aberrantes qui sont responsables de l'entrée en EMT des cellules dans un contexte pathologique. Il est aujourd'hui évident que plusieurs voies sont simultanément activées pour assurer le bon déroulement de l'EMT.

L'activation de cette voie permet d'un côté l'activation de facteurs de transcription, régulant positivement l'expression des EMT-TFs, mais lève aussi des inhibitions réprimant ces derniers. Cette voie va aussi favoriser l'inhibition des jonctions cellulaires tout comme le remodelage du cytosquelette, deux étapes indispensables pendant une EMT. Différents signaux activateurs extracellulaires peuvent activer les mêmes voies de signalisation intracellulaire. Généralement, l'activation d'un processus d'EMT nécessite la combinaison de différents signaux, le premier signal permettant d'initier le processus, puis d'autres signaux assurant son maintien (Gonzalez & Medici, 2014; Thiery & Sleeman, 2006).

Facteurs	Familles
Facteurs de transcriptions fixant directement le promoteur <i>CDH1</i>	
SNAIL/SNAIL2	Protéine à doigts de zinc
ZEB1/ZEB2	Protéine à doigts de zinc et à homéodomaine
E47	Facteur de classe I type basique hélice-boucle-hélice
KLF8	Protéine à doigts de zinc
Brachyury	Activateur transcriptionnel
Facteurs de transcription lié à l'EMT	
TWIST1	Facteur basique hélice-boucle-hélice
FOXC2	Activateur transcriptionnel
Gossecoid	Protéine à homéodomaine
E2-2	Facteur de classe I type basique hélice-boucle-hélice
SIX1	Protéine à homéodomaine
PRRX1	Protéine à homéodomaine

Tableau 1 : Facteurs de transcription affilié à l'EMT

D'après (Bram De Craene & Berx, 2013)

Résumé des facteurs de transcriptions impliqués dans l'EMT. Les premiers furent identifiés par leurs capacités à lier directement le promoteur de la E-cadhérine (*CDH1*). La liste fut ensuite étendue aux facteurs modulant les protéines des jonctions cellulaires et le gain d'expression de marqueurs mésenchymateux.

Les différentes voies de signalisation activatrices de l'EMT, d'une grande diversité, convergent vers un groupe en revanche restreint de facteurs de transcription inducteurs d'EMT appelés les EMT-TFs. Je ne présenterai ici que les facteurs appartenant aux 3 principales familles, SNAIL, ZEB et TWIST, mais il est à noter que d'autres facteurs ont été décrits comme présentant de telles propriétés, tels que Goosecoid, FOXC2, SIX1 ou plus récemment encore PRRX1 (Tableau 1) (Bram De Craene & Berx, 2013).

a) *La famille SNAIL : structure et fonctions*

Les membres de la famille SNAIL sont au nombre de trois, *SNAIL1*, *SNAIL2 (SLUG)* et *SNAIL3 (SMUC)*. Mis en évidence pour la première fois chez la drosophile (Grau, Carteret, & Simpson, 1984), des homologues de SNAIL ont depuis été décrits dans de nombreuses espèces d'invertébrés et de vertébrés dont l'Homme. Ces différents facteurs ont des fonctions communes comme par exemple leur implication dans la formation du mésoderme mais ils possèdent aussi des fonctions spécifiques comme nous le verrons plus tard. Les facteurs de transcription de la famille SNAIL sont de type à doigts de zinc, à raison de quatre à six de ces domaines en région C-terminale (Figure 6). Les doigts de zinc permettent la fixation à l'ADN sur les séquences E-box, entraînant la répression de la transcription de gènes épithéliaux tels que la E-cadhérine. Ces facteurs possèdent aussi un domaine SNAG dans leur région N-terminale, ce domaine leur permet aussi la répression de gènes spécifiques, notamment en recrutant et en interagissant avec d'autres facteurs.

Mes travaux se sont essentiellement focalisés sur le facteur SNAIL2 ou SLUG car il a été impliqué dans la genèse des mélanocytes. Le facteur SNAIL2 est impliqué dans le développement de la crête neurale comme l'attestent les expériences d'inhibition de SLUG (M Angela Nieto, 2002) menant à des défauts dans la génération et dans la migration des cellules de la crête neurale ainsi qu'une absence des générations des cellules qui en dérivent. Les souris *Snail2*^{-/-} sont viables mais sont, entre autres défauts (anémie, problème de fertilité...), caractérisées par une dépigmentation de la peau particulièrement marquée sur le haut du crâne et le ventre (Sánchez-Martín et al., 2003). Il a été montré que SNAIL2 était exprimé par des cellules en EMT durant la délamination de la crête neurale et que ce facteur était nécessaire pour la détermination des mélanocytes, leur migration et leur survie.

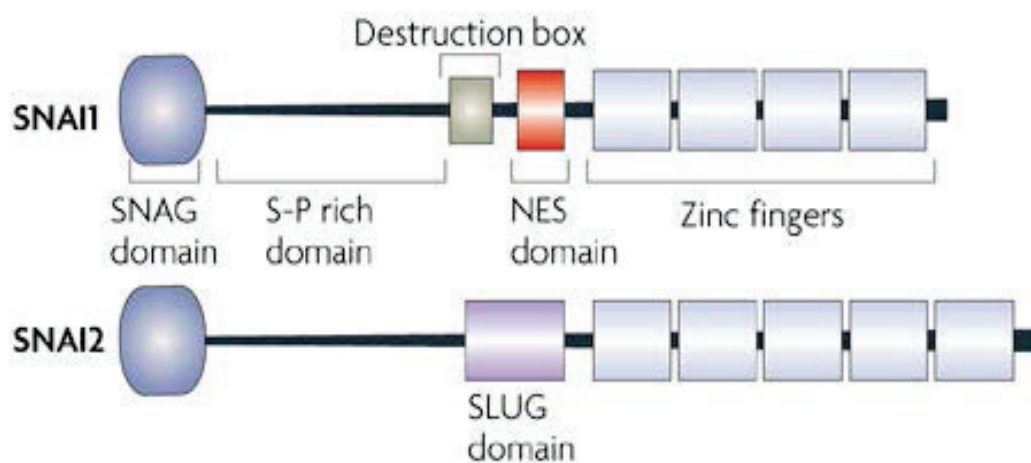


Figure 6 : Structure des protéines de la famille SNAIL

D'après (Peinado, Olmeda, & Cano, 2007)

Cette famille comprend trois gènes, SNAI1, SNAI2, SNAI3 (les protéines SNAI1 et 2 sont les seules représentées ici), ce sont des protéines à doigts de zinc, une structure leur permettant de se fixer sur l'ADN. Le domaine SNAG (Snail/Gfi domain) est un domaine associé à la répression transcriptionnelle. Alors que les domaines en C- et N- terminal sont conservés entre ces facteurs, leurs domaines centraux diffèrent plus, on retrouve pour SNAI1 un domaine de destruction ainsi qu'un domaine de localisation nucléaire (NES). La protéine SNAI2 possède un domaine qui lui est spécifique appelé SLUG dont la fonction n'est pas encore connue.

Etant données les similarités entre ces anomalies chez les souris et les défauts de pigmentation observés chez les patients atteints du syndrome de Waardenburg (ou dans la plupart des cas le gène *c-Kit* est soumis à diverses altérations), le gène *SNAIL2* a été étudié lui aussi pour une éventuelle implication dans cette maladie. Les résultats ont permis de mettre en évidence que les patients ne portant pas de mutation sur le gène *c-Kit* pouvaient avoir des altérations au niveau du gène *SNAIL2* voire une délétion complète de ce dernier.

Ces résultats mettent en évidence l'importance du facteur SNAIL2 dans l'homéostasie des mélanocytes (Cobaleda, Pérez-Caro, Vicente-Dueñas, & Sánchez-García, 2007; M A Nieto, Sargent, Wilkinson, & Cooke, 1994; Pérez-Losada et al., 2002; Sánchez-Martín et al., 2003).

Bien que SNAIL1 et SNAIL2 soient tous les deux des inducteurs d'EMT impliqués dans le développement et qui possèdent donc des fonctions communes, ces facteurs possèdent aussi une certaine spécificité. SNAIL1 est en effet essentiel pour la gastrulation chez la souris comme le démontre le KO léthal à jour E8.5 (Carver, Jiang, Lan, Oram, & Gridley, 2001), alors que les souris SNAIL2 *-/-* sont viables, SNAIL2 étant impliqué plus tardivement dans le devenir de la crête neurale.

b) La famille ZEB : structure et fonctions

Les vertébrés expriment les deux facteurs de transcription de la famille ZEB, à savoir *Zeb1* (δ EF1) et *Zeb2* (SIP1). Tout comme la famille SNAIL, ces facteurs sont des protéines à doigts de zinc qui peuvent spécifiquement se fixer sur les séquences E-box de l'ADN, ils ont de plus été décrits comme pouvant réprimer tous deux l'E-cadhérine. Ces facteurs possèdent deux séquences situées à chaque extrémité de la protéine, en C- et en N-terminale, contenant de multiples structures en doigts de zinc. Les membres de la famille ZEB se caractérisent par deux domaines spécifiques, d'une part le domaine SBD (SMAD Binding Domain) qui leur permet de se lier aux protéines SMAD et ainsi d'interagir avec la voie de signalisation du TGF- β et d'autre part l'homéodomaine POU-like, localisé dans la partie centrale, domaine d'interaction protéine – protéine, qui leur permet de recruter des partenaires de régulation de la transcription. Ainsi le recrutement des co-activateurs comme CBP ou p300 favorise l'expression de gènes cibles, alors que le recrutement de corépresseurs tel que CtBP ou NuRD favorisent une répression transcriptionnelle (Figure 7).

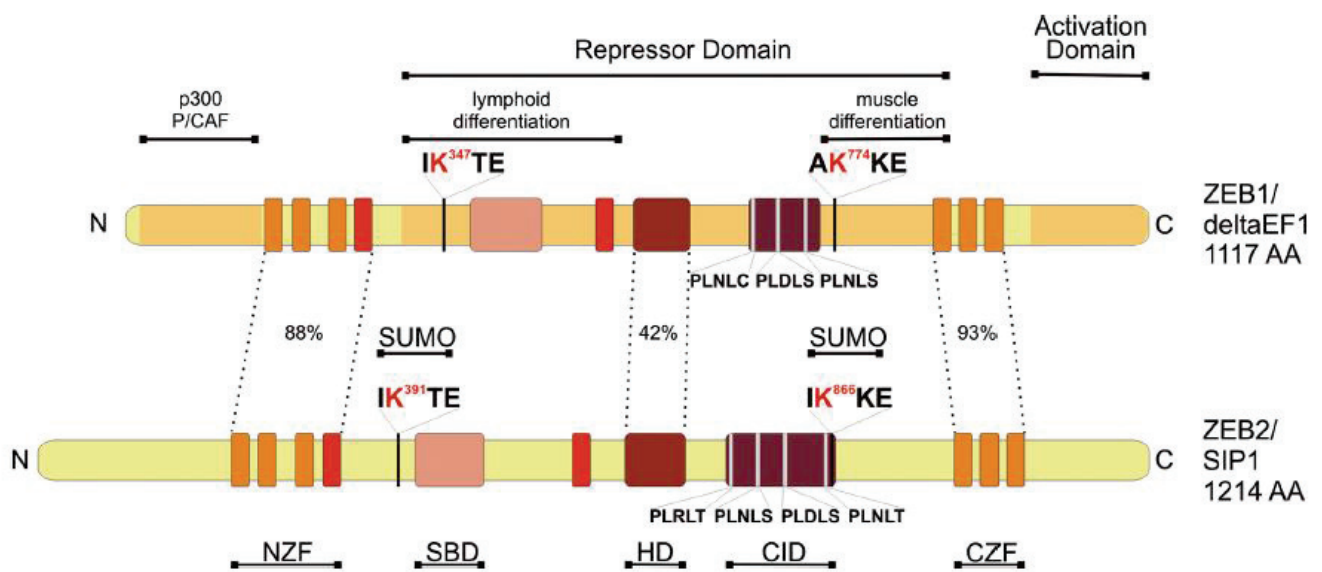


Figure 7 : Structure des protéines de la famille ZEB

D'après (Vandewalle et al., 2009)

La famille ZEB comprend deux membres ZEB1 et ZEB2. Ces protéines se caractérisent par la présence de domaines à doigt de zinc en N- (NZF) et C-terminal (CZF) très conservés, ainsi que d'un homéo-domaine (HD). Le domaine SBD permet l'interaction avec les protéines SMADs. Étant décrit comme des répresseurs transcriptionnels, leur structure comprends un domaine de recrutement du corépresseur CtBP (CID).

L'expression des facteurs ZEB est en grande partie régulée par les miRNA de la famille miR200 qui alors forme alors une boucle de rétrocontrôle négatif avec les protéines ZEB.

Les facteurs ZEB1 et ZEB2 sont très conservés au cours de l'évolution, ce probablement en raison de leur importante implication dans le développement. Ainsi, il existe une grande homologie entre ces deux facteurs, d'une part au sein d'une même espèce mais aussi entre différentes espèces tels que la souris et l'Homme (van Grunsven et al., 2007)(Vandewalle, Van Roy, & Berx, 2009)(A A Postigo & Dean, 1999).

L'étude de l'invalidation de ces gènes dans des modèles murins a permis une meilleure compréhension des différentes fonctions de ces facteurs *in vivo*. Chez la souris, ZEB1 est exprimé au niveau des notochordes, des somites, des membres ainsi que dans les dérivés de la crête neurale. Les souris *Zeb1*^{-/-} meurent juste après la naissance pour cause de déficiences respiratoires. Elles présentent entre autres de multiples malformations de l'ossature, des anomalies crâno-faciales et une déficience dans la génération des lymphocytes T. Ces résultats corroborent l'analyse montrant le rôle de ce facteur dans le mésoderme, précurseur des tissus conjonctifs et des os. Les souris déficientes pour *Zeb2* meurent quant à elles plus tôt, au stade E8.5, elles présentent d'importants retards de croissance, des défauts dans la fermeture du tube neural et une absence quasi complète de l'ectoderme. De manière intéressante, il n'y a aucune déficience notable dans les tissus où les deux protéines sont co-exprimées, ce qui indique une redondance dans leurs fonctions uniquement dans certains tissus : ainsi, il n'y a aucune défaillance dans la formation des tissus neuronaux dans les souris *Zeb1*^{-/-}.

Le phénotype des doubles KO *Zeb1*^{-/-} ; *Zeb2*^{-/-} est comparable à celui observé chez les KO *Zeb2*^{-/-}, même si on notera une amplification des anomalies observées, comme par exemple l'ouverture amplifiée du tube neural. Des expériences de sauvetage visant à analyser les éventuelles redondances entre les protéines de la famille ZEB ont été effectuées par l'équipe de Higashi. Il s'avère que les animaux *Zeb2*^{+/-};*Zeb1*^{-/-} se développent normalement jusqu'au stade E10, mais à partir de ce point, ils présentent des défauts importants du tube neural et meurent finalement au stade E13.5 (Miyoshi et al., 2006)(Antonio A Postigo, 2003).

Bien qu'il existe une importante homologie entre ces deux protéines, il apparaît que chacune d'entre elles possède son propre réseau, dont seulement certains partenaires sont communs. En effet, alors que les séquences dites en doigts de zinc sont extrêmement homologues entre ZEB1 et ZEB2, les autres séquences présentent une homologie beaucoup plus faible (environ

30%), suggérant des interactions spécifiques à chacun de ces facteurs. Ainsi il a déjà été démontré que ces facteurs pouvaient réguler de manière antagoniste la voie TGF β /BMP. Les deux protéines ZEB1 et ZEB2 sont en effet capables d'interagir avec les facteurs Smads mais, bien que très similaires, alors que ZEB1 synergise avec ces Smads pour activer la transcription (en interagissant avec le co-activateur p300), ZEB2 a l'effet opposé (via l'interaction avec le co-répresseur CtBP). ZEB2 en réponse au TGF β est en effet capable de dissocier ZEB1 de ses sites de fixation à l'ADN et ainsi de bloquer la transcription de gènes mise en place en réponse au TGF β (Antonio A Postigo, 2003)

Des mutations des gènes *ZEB2/SIP1* ou *ZEB1/DEF1* ont été identifiées comme responsables de différentes malformations à l'origine de nombreuses pathologies. Parmi ces pathologies, le syndrome de Mowat-Wilson se caractérise par un retard mental, une physionomie marquée, différentes malformations congénitales et la maladie de Hirschsprung (Vandewalle et al., 2009). Ce syndrome est la conséquence d'une défaillance dans le développement des cellules de la crête neurale, elle-même due à une mutation perte de fonction du gène *ZEB2*. Des souris présentant une haplo-insuffisance de *ZEB2* ne développent pas d'anomalies ayant des similarités avec le syndrome de Hirschsprung, toutefois le phénotype de ces souris sera utile pour comprendre certains aspect de la maladie. En effet les souris *Zeb2*^{+/-} sont dépourvues des précurseurs des cellules de la crête neurale soulignant la dépendance de ces cellules au facteur ZEB2. L'invalidation de *Zeb2* spécifiquement dans le lignage de la crête neurale a permis de mettre en évidence des anomalies crâno-faciales, de développement du cœur et enfin des défauts du système nerveux périphérique (Ghoumid et al., 2013). Des KO conditionnels pour *ZEB2* au niveau du télencéphale présentent un défaut du corps calleux et de l'hippocampe, des caractéristiques des patients atteints du syndrome de Hirschsprung.

Le gène *ZEB1* est quant à lui majoritairement lié au syndrome de la dystrophie cornéenne postérieure polymorphe 3 (PPCD3), de nombreuses mutations ZEB1 n'est alors plus capable de réguler correctement ces gène cibles. Ceci a pour conséquence une dégénérescence majoritairement bilatérale de la cornée qui se manifeste lors de la petite enfance, syndrome généralement asymptomatique (Vandewalle et al., 2009).

Ces résultats caractérisant l'expression des facteurs ZEB1 et ZEB2 dans le développement ainsi que les pathologies liées à des mutations de ces gènes, indiquent qu'il existe une importante et fine régulation spatio-temporelle de ces gènes. Cette régulation assure au cours du développement l'alternance d'expressions de gènes communs et

spécifiques à chacun de ces facteurs (Ghoumid et al., 2013; Van de Putte, Francis, Nelles, van Grunsven, & Huylebroeck, 2007; Vandewalle et al., 2009)

c) La famille TWIST : structure et fonctions

La famille TWIST comprend deux membres que sont les protéines TWIST1 et TWIST2. Je ne me focaliserai que sur la protéine TWIST1, beaucoup moins d'informations étant disponibles concernant TWIST2. Ces protéines très conservées au cours de l'évolution se caractérisent par leur domaine bHLH (basic Helix Loop Helix), une structure permettant la dimérisation de ces facteurs avec d'autres protéines possédant elles aussi un domaine hélice-boucle-hélice (Figure 8). Il existe cinq classes différentes de bHLH, les protéines de la famille TWIST appartiennent à la classe II signifiant que leur expression est restreinte à des tissus spécifiques. La famille E2A appartient quant à elle à la classe I, et se caractérise par une expression ubiquitaire et la capacité à former des homo- et hétérodimères (Barnes & Firulli, 2009; Connerney et al., 2006; Massari & Murre, 2000). La formation du dimère est dépendante d'un ensemble de modifications post traductionnelles ainsi que de l'expression de cofacteurs tels que les protéines Id. Le dimère peut être un homodimère (TWIST-TWIST) ou un hétérodimère formé avec les protéines HLH de la famille E2A tels que E12 et E47. Chaque dimère formé générera en aval des fonctions distinctes et spécifiques, voire antagonistes. En effet, les facteurs une fois dimérisés forment un domaine basique opérationnel qui permet une fixation sur des séquences bien spécifiques de l'ADN appelées E-box (CANNTG). Par conséquent, le dimère permettra l'activation ou la répression de la transcription de gènes cibles spécifiques (Barnes & Firulli, 2009; Z. F. Chen & Behringer, 1995). A la différence des facteurs SNAIL et ZEB, il ne semblerait pas que TWIST1 régule l'expression de la E-Cadhérine de manière directe.

Décrit pour la première fois chez la drosophile, l'expression du gène *Tw* a été montrée comme importante pour la gastrulation et différentes étapes du développement embryonnaire, notamment lors de la formation du mésoderme. En effet, des mutants de *Tw* conduisent à une gastrulation incomplète, une absence de formation du mésoderme ainsi qu'à une torsion de l'abdomen (d'où l'origine de la nomenclature *Twist*) et meurent à la fin de l'embryogénèse.

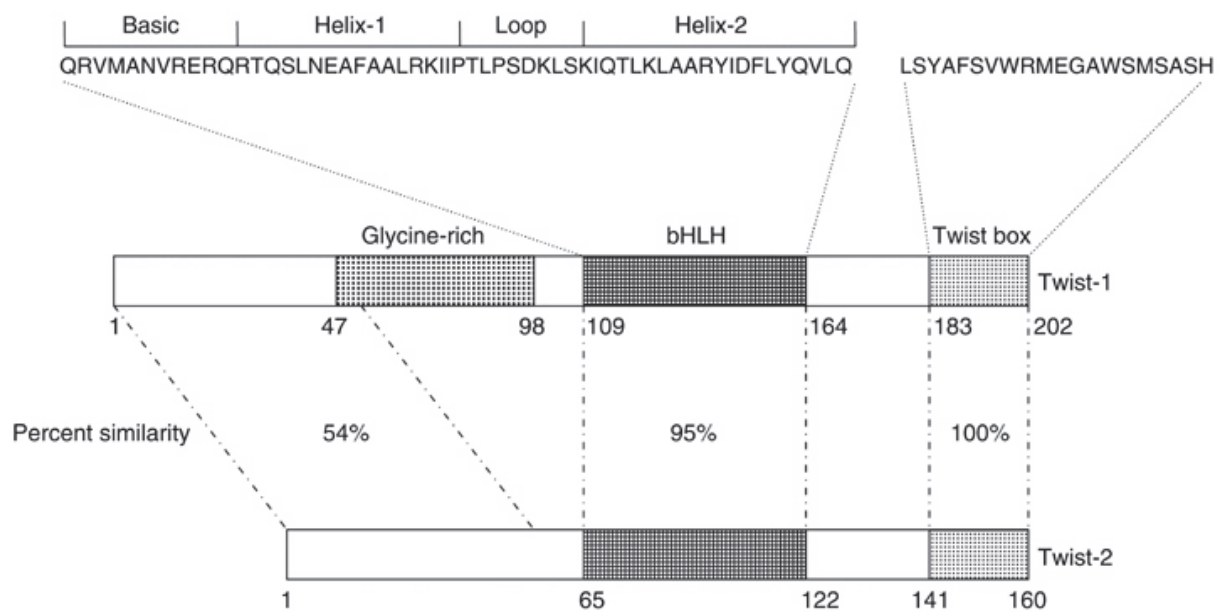


Figure 8 : Structure des protéines de la famille TWIST

(A Puisieux, Valsesia-Wittmann, & Ansieau, 2006)

La famille TWIST comporte deux membres, TWIST1 et TWIST2. Appartenant à la famille bHLH, ces facteurs peuvent se dimériser avec d'autres protéines possédant aussi des domaines HLH, leur domaine basic (b) leur permet de se fixer à l'ADN. Le domaine le plus conservé, la boîte Twist, est un domaine d'interaction protéique.

Bien que la protéine TWIST chez les mammifères soit assez conservée par rapport à son homologue chez la drosophile, ses fonctions diffèrent en partie. L'expression de TWIST1 apparaît chez la souris au stade E7.0-7.5, au niveau du mésoderme. L'expression de TWIST1 est ensuite principalement située au niveau des somites et du mésenchyme crânial et céphalique. Plus tardivement l'expression de TWIST1 est retrouvée dans les ostéoblastes ainsi que dans les précurseurs des ventricules. Les souris *twist1*^{-/-} présentent une gastrulation normale confirmant une expression de TWIST1 qu'après cette étape à E7.0-7.5. Néanmoins les embryons ne sont pas viables et meurent au stade E11.5 en raison de défauts dans la fermeture du tube neural, une exencéphalie et enfin à des anomalies au niveau des somites. (Barnes & Firulli, 2009; Z. F. Chen & Behringer, 1995; Connerney et al., 2006).

Les souris présentant une hétérozygotie de *Twist1* (modèles *Twist1*^{+/-}) sont viables mais se caractérisent par des anomalies crâno-faciales, une polydactylie et des anomalies au niveau des membres. Ce phénotype est très similaire à celui observé chez les patients atteints du syndrome de Saethre-Chotsen où une déficience dans l'expression de *TWIST* a été décrite (Bourgeois et al., 1998; el Ghouzzi et al., 1997).

Au cours du développement, TWIST assure un réseau de régulation en fonction du dimère qu'il forme. Ainsi des expériences utilisant des dimères forcés ont permis de montrer qu'un homodimère unique ne suffisait pas à mener l'embryogénèse à terme soulignant l'importance de la régulation de l'expression de Twist et de ses partenaires dans le développement (Connerney et al., 2006). Les modifications post-traductionnelles jouent aussi un rôle important dans la formation des dimères de TWIST, des mutations empêchant la phosphorylation de TWIST peuvent inhiber sa dimérisation avec ses partenaires tels que HAND2 générant ainsi des anomalies dans les bourgeons des membres chez la souris (Cai & Jabs, 2005).

Au final, ces différents facteurs de transcription partagent certes en commun la capacité à induire une EMT (quoique avec des efficacités variables, TWIST1 étant par exemple un inducteur moins puissant que les membres des familles SNAIL ou ZEB) mais ils appartiennent à des familles de facteurs de transcription très différents de par leur structure et dont les gènes cibles sont seulement en partie communs, d'autres étant spécifiques, y compris au sein d'une même famille. En attestent les différences de fonction au cours du développement embryonnaire. Ces facteurs qui fonctionnent en réseau, pouvant s'inter-réguler les uns les autres (avec un niveau de régulation supplémentaire par les miRNA), ne

sont donc que partiellement redondants, et des fonctions spécifiques, types cellulaires dépendantes, ont été décrites.

B. L'EMT dans la progression tumorale

Nous avons vu que l'acquisition de capacités de motilité et d'invasion joue un rôle majeur au cours du développement embryonnaire, mais c'est également une caractéristique majeure pour une étape cruciale de la progression tumorale, la formation de métastases. En effet, les cellules cancéreuses au niveau de la tumeur primaire doivent adopter ces mêmes capacités afin de coloniser des sites distants, appelés alors sites secondaires, pour former des métastases. Ainsi l'EMT à l'âge adulte serait latent et sa manifestation serait dépendante d'événements oncogéniques déclencheurs. Si l'implication de l'EMT dans la dissémination métastatique a été largement étudiée par de nombreuses équipes, ce n'est que plus récemment qu'un rôle plus précoce dans l'initiation tumorale a été décrit comme nous le verrons.

1. Régulation de la cascade métastatique

L'implication de l'EMT dans le cancer a été mise en évidence en 2000 grâce aux travaux sur le facteur SNAIL1. En partant de l'observation de similitudes entre les cellules qui migrent pendant l'embryogénèse et des points clés de la progression des carcinomes, l'équipe d'Angela Nieto a réalisé des expériences de sur-expression de la protéine SNAIL1 de manière ectopique dans des cellules saines et tumorales. Dans les deux cas, l'expression de SNAIL1 était corrélée à une répression de l'expression de la E-cadhérine ainsi qu'à l'acquisition d'un phénotype mésenchymateux et dans le cas des cellules cancéreuses, à l'accroissement du potentiel invasif (A Cano et al., 2000). En 2001, Thomas Brabletz décrit des cellules avec un phénotype dédifférencié sur les fronts invasifs de carcinomes colorectaux (Brabletz et al., 2001). Les cellules s'isolent en clusters et finissent même par s'individualiser en adoptant une morphologie fibroblastique. De manière intéressante il observe que les cellules au centre de la tumeur primaire ainsi que les cellules présentes dans le centre des métastases ont des caractéristiques communes, comme par exemple l'expression de la E-cadhérine et un phénotype épithélial. De la même façon, une similitude est observée entre les fronts invasifs de ces mêmes tumeurs et les métastases qu'elles génèrent.

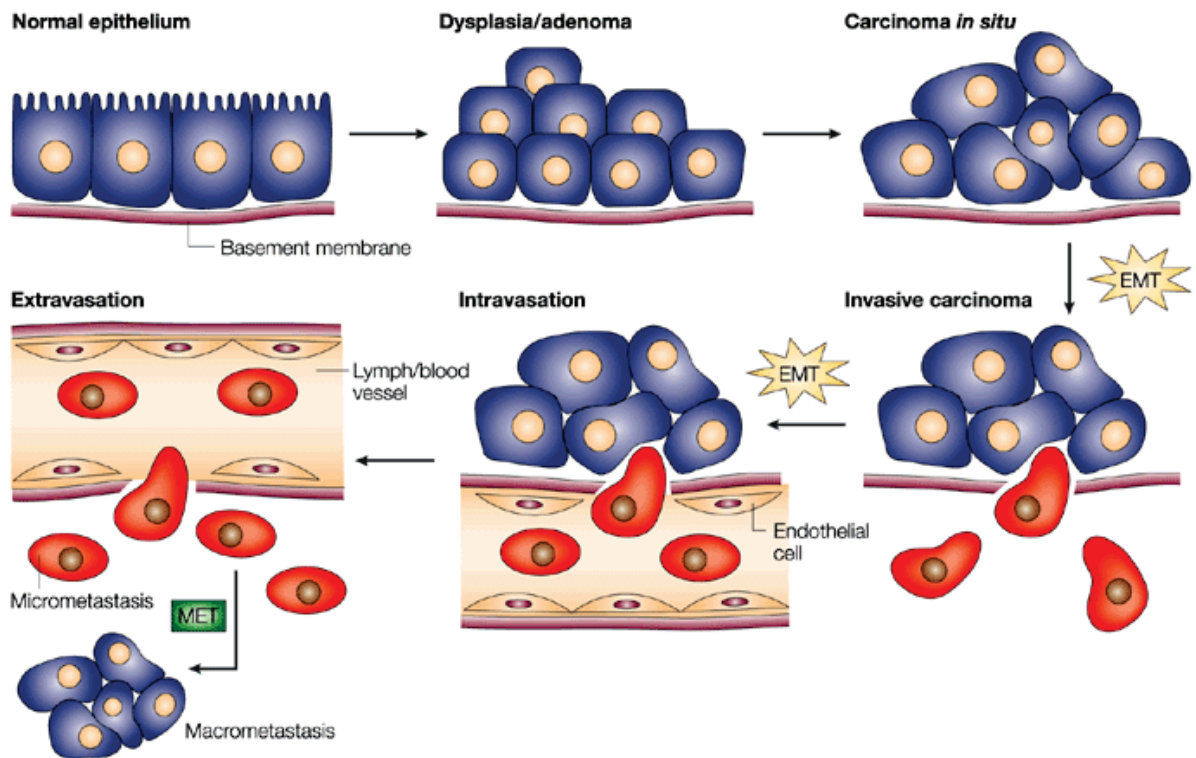


Figure 9 : Cycle d'EMT et de MET dans la progression tumorale
D'après (Thiery, 2002)

L'épithélium normal repose et prolifère sur une membrane basale. Les altérations génétiques et les modifications épigénétiques peuvent générer un adénome (tumeur bénigne), avec le temps et l'accumulation de mutations, cet adénome peut évoluer en tumeur maligne, le carcinome qui était *in situ* devient de type invasif et traverse la membrane basale par le biais d'une EMT. Les cellules tumorales peuvent alors rejoindre des vaisseaux sanguins par le processus d'intravasation et d'extravasation et métastaser à des sites distants.

Ces cellules perdent l'expression de la E-cadhérine, accumulent de la β -caténine au niveau nucléaire et ceci est corrélé à la perte de leur phénotype épithélial, et à l'acquisition d'un phénotype plus fibroblastique. Ainsi on retrouve au niveau des fronts invasifs des tumeurs primaires et des métastases des figures et des caractéristiques de l'EMT.

En 2000 les capacités mésenchymateuses nécessaires à la métastase, telles que la dissociation cellulaire, la migration, la dissémination et l'invasion sont, selon le dogme de la progression tumorale linéaire, le résultat d'une succession d'altérations génétiques secondaires conférant, au cours des étapes tardives de la carcinogénèse, ces capacités aux cellules tumorales (Nowell, 1976).

Or, une observation commune des anatomopathologistes est que les métastases observées dans le cas des carcinomes colorectaux ressemblent à la tumeur primaire et présentent des structures épithéliales organisées (si l'on fait abstraction des fronts invasifs). Ces observations seraient la preuve que la transition vers un phénotype mésenchymateux est réversible et transitoire. Ainsi, ce serait la conséquence d'une importante modification de la régulation d'expressions de différents gènes et non pas d'évènements génétiques aléatoires et définitifs. Depuis, ces différentes observations ont pu être mises en évidence dans de nombreux modèles tumoraux notamment dans le cancer du sein (Figure 9).

En 2004, le laboratoire de Robert Weinberg démontre l'implication d'un autre EMT-TF dans la promotion métastatique, le facteur TWIST1. Cette étude démontre *in vivo* chez la souris que l'inhibition de TWIST1 par ARN interférence dans un modèle de xénogreffes de la lignée 4T1 (cellules de carcinomes mammaires invasives) diminue leur capacité à générer des métastases au niveau des poumons alors qu'à l'inverse, l'expression ectopique de TWIST1 dans des cellules épithéliales mammaires conduit à la perte de la E-cadhérine, à l'expression de marqueurs mésenchymateux et enfin à un gain de motilité. Cette étude comporte par ailleurs une analyse de cohorte de patients montrant que de hauts niveaux d'expression de TWIST1 sont retrouvés dans des carcinomes lobulaires invasifs (Yang et al., 2004).

Cependant l'implication de l'EMT *in vivo* en tant que processus oncogénique a été longtemps débattue car il s'agit d'un processus transitoire et donc difficilement observable. De plus, la zone tumorale est également riche en cellules stromales, qu'il est difficile de distinguer de cellules tumorales de morphologie mésenchymateuse. En 2008, l'utilisation de modèles murins transgéniques a permis de confirmer *in vivo* la relevance de la transition épithélio-mésenchymateuse dans le cancer du sein. Dans cette étude, les souris transgéniques

générées expriment spécifiquement et de manière inductible dans les cellules épithéliales mammaires l'oncogène c-MYC ainsi que l'opéron lacZ (servant de traceur cellulaire). Cet outil a permis de mettre en évidence après activation de l'oncogène l'existence de cellules mésenchymateuses lacZ positives, validant ainsi leur origine épithéliale et le processus d'EMT *in vivo* (Trimboli et al., 2008).

Si des figures d'EMT ont été détectées au stade de carcinome invasif, une dissémination de cellules isolées à des stades plus précoces n'est pas à exclure. En effet, il a été détecté en analysant des carcinomes de patients la présence de cellules cancéreuses disséminées au niveau de la moelle épinière. Ces dernières qui exprimaient le facteur TWIST comportaient très peu d'altérations génétiques indiquant que cette dissémination s'était effectuée à un stade précoce ou peu avancé de la carcinogénèse (Hüsemann & Klein, 2009). Ces résultats ont depuis été observés dans d'autres types tumoraux comme dans le cancer du pancréas, l'utilisation d'un modèle murin ayant permis de montrer qu'une réponse inflammatoire était mise en place directement après l'activation de l'oncogène KRAS dans les cellules épithéliales du pancréas. Cette réponse inflammatoire favorise l'EMT et l'intravasation des cellules tumorales et donc leur dissémination dès les premières étapes du cancer (Rhim et al., 2012).

Enfin il apparaît que la dernière étape dans la génération de métastases soit une réversion de l'EMT, soit une transition mésenchymo-épithéliale ou MET. En effet, l'implication de l'EMT dans les métastases de carcinomes a été fortement controversée, notamment du fait du phénotype épithélial de la majorité des métastases de carcinome. Des données récentes ont démontré *in vivo* que l'activation de TWIST1 dans la couche épidermique de la peau après traitement au DMBA-TPA est nécessaire à la migration, l'intravasation et l'extravasation des cellules cancéreuses (Tsai, Donaher, Murphy, Chau, & Yang, 2012). Le stade final de cette cascade est l'implantation des cellules sur des sites secondaires et donc la formation de métastases. De manière intéressante, les EMT-TFs sont connus pour diminuer la prolifération, or cette dernière est nécessaire à l'implantation de macrométastases. Il a pu être montré dans ce modèle murin que l'inhibition de TWIST1 et une réversion de l'EMT était nécessaire pour que les cellules rentrent dans une nouvelle phase de prolifération et assurent la colonisation et la croissance des métastases (Ocaña et al., 2012; Tsai et al., 2012).

Au total, plutôt qu'une induction d'un pur phénotype mésenchymateux, c'est la succession réversible de cycles d'EMT et de MET qui permet la bonne complétion des

différentes étapes de la cascade métastatique, démontrant ainsi l'importance de la plasticité cellulaire (Figure 9).

2. Inhibition des programmes de sauvegarde et initiation tumorale

Dès 1997 Serrano et al démontrent que l'expression de l'oncogène H-Ras dans des fibroblastes humains conduit à un engagement des cellules dans le processus de sénescence. Ce dernier est associé à une accumulation de p53 et de p16, deux inhibiteurs majeurs du cycle cellulaire (Serrano, Lin, McCurrach, Beach, & Lowe, 1997). Les deux principales voies oncosuppressives mises en jeu suite à une activation oncogénique sont la voie p16-RB (rétinoblastome) et la voie p14^{ARF}-p53, qui vont induire la sénescence induite par les oncogènes (OIS) (Figure 10).

- La voie p16-RB : en réponse aux signaux prolifératifs transmis par la voie des MAPKs, la cycline D1 s'accumule dans le noyau où elle forme un complexe cycline/CDK avec la kinase CDK4. Les complexes cycline/CDK sont des dimères protéiques indispensables pour passer les check point du cycle cellulaire. A chacun de ces check point, un complexe de kinases spécifiques, le couple cycline D1/CDK4 permet la transition du stade G1 à S du cycle, en phosphorylant la protéine du rétinoblastome Rb inhibant ainsi son interaction avec le facteur E2F qui assure la progression dans la phase S. p16 agit comme un inhibiteur du complexe et empêche l'activation par phosphorylation des cibles de ce dernier. p16 bloque alors la cellule dans la phase G1 du cycle.

- La voie p14-p53 : p14 est la deuxième protéine formée à partir du locus *CDKN2A*. Alors que p16 est impliqué dans la voie du rétinoblastome pour contrôler l'entrée dans la sénescence, p14 intervient dans une voie parallèle mettant en jeu le suppresseur de tumeur p53. p53 est régulé par MDM2, un facteur qui favorise sa dégradation par le protéasome après ubiquitinylation. En cas de signal activateur, p14 une fois exprimé va inhiber MDM2 favorisant la stabilisation de p53. p53 est un puissant facteur de transcription impliqué dans l'arrêt de la prolifération et l'apoptose. Son activation conduit à celle de p21 qui inhibe la phosphorylation de Rb, lui permettant d'interagir avec E2F et de bloquer ainsi le cycle.

La mise en évidence de l'expression de certains EMT-TFs dans des carcinomes non invasifs, dès le stade *in situ*, a permis d'émettre l'hypothèse qu'ils pourraient jouer un rôle oncogénique dans l'initiation de la tumeur primaire, bien avant la mise en place de la cascade métastatique. En effet, des résultats de l'équipe ont pu démontrer que la réactivation aberrante des facteurs de transcription de l'EMT permet *in vitro* d'inhiber les systèmes de sauvegarde tels que la sénescence et l'apoptose mis en place par la cellule en réponse à des stress oncogéniques favorisant ainsi la survie cellulaire (Ansieau et al., 2008; Valsesia-Wittmann et al., 2004).

Les EMT-TFs vont outrepasser cet arrêt du cycle cellulaire en inhibant ces différentes voies. Ainsi il a été montré que TWIST1 pouvait inhiber p53 de différentes façons dans des cellules épithéliales mammaires : il peut inhiber son activation en amont en inhibant l'activation de p19^{ARF}, limiter sa réponse en inhibant en aval l'activation de p21 ou encore se fixer directement à p53, l'engageant alors dans une voie menant à sa dégradation. D'autre part, ZEB1 et TWIST1 peuvent tous les deux bloquer l'activation de p16 et p15 mise en place après un stress oncogénique. Ainsi ces protéines ne pourront pas lever l'inhibition effective sur RB. Des fonctions similaires sur l'inhibition de p53 ont été observées avec les protéines SNAIL1 et 2 (Wu et al., 2005)(S.-H. Lee et al., 2009).

Ainsi, en empêchant l'arrêt du cycle et l'entrée en sénescence ou en apoptose, les EMT-TFs favorisent le maintien de la prolifération cellulaire entraînant donc la transformation des cellules (Ansieau et al., 2008; Valsesia-Wittmann et al., 2004). Cette capacité des EMT-TFs à coopérer avec des oncogènes tels que RAS dans la transformation cellulaire *in vitro* a également pu être démontrée *in vivo* via le croisement avec des modèles de souris transgéniques pour TWIST1 dans un premier temps. Si l'activation de RAS seul *in vivo* ne permet pas la formation de tumeurs, l'expression conjointe de TWIST1 promeut l'initiation tumorale et la formation de carcinomes dans des modèles mammaire et pulmonaire (Morel et al., 2012; Tran et al., 2012). D'autres EMT-TFs (SNAIL ou ZEB2) ont par la suite également été montrés comme capables de coopérer avec des altérations oncogéniques pour promouvoir l'initiation tumorale (cf. Tableau 2).

Des expériences utilisant un KO conditionnel de TWIST1, ont permis d'étudier l'implication de ce facteur aux différentes étapes de la carcinogénèse de la peau (Beck et al., 2015).

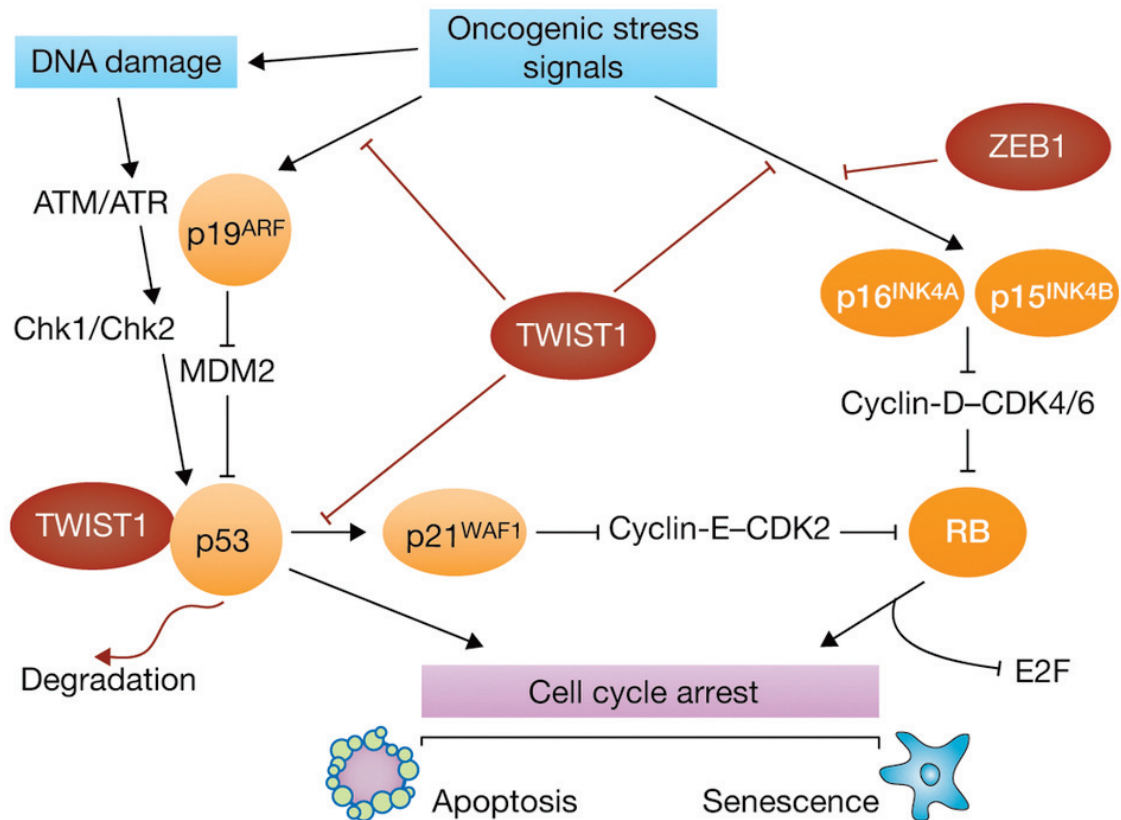


Figure 10 : Les EMT-TFs permettent l'inhibition des systèmes de sauvegardes et favorisent la transformation cellulaire
(Alain Puisieux et al., 2014)

La senescence et l'apoptose représentent les premières barrières anti-tumorales mises en place par la cellule en réponse à un stress oncogénique ou à des dommages à l'ADN. L'activation des voies p53 et RB via p19 et p16 permettent ainsi l'arrêt du cycle cellulaire. Les inducteurs d'EMT, particulièrement TWIST1 et ZEB1 vont empêcher la mise en place des programmes oncosuppresseurs dépendants de p53 ou RB en inhibant l'activation des protéines p19 et p16 ou en favorisant la dégradation de p53. Ce schéma représente les mécanismes décrits à ce jour, l'implication d'autres EMT-TFs restant à démontrer.

L'application de DMBA/TPA (de puissants carcinogènes) induit l'expression de TWIST1 dans les cellules épithéliales, suggérant son implication précoce dans le développement tumoral.

En effet, l'inactivation de TWIST1 dans ces cellules épidermiques (K14Cre:Twist1^{fl/fl}) diminue drastiquement la formation de papillomes suite au traitement par DMBA/TPA (14% au lieu de 100% pour les souris contrôles).

Par ailleurs, dans un contexte muté pour p53, l'invalidation des deux allèles de TWIST1 est capable d'inhiber la formation de carcinomes, tandis que l'élimination d'un seul des deux allèles permet la formation de papillomes mais pas la transition vers une tumeur maligne. Ces résultats indiquent donc qu'un faible niveau de TWIST1 permet la formation de tumeurs bénignes mais qu'un niveau plus élevé est nécessaire pour une progression maligne complète (Beck et al., 2015).

Une étude similaire a permis de démontrer l'implication de ZEB1 dans l'initiation tumorale, et de mettre en évidence un effet dose similaire dans la progression tumorale dans un modèle de cancer du poumon induit par KRAS (Liu et al., 2014). La délétion hétérozygote de *ZEB1* ne compromet pas la survie des animaux et aucun défaut de développement majeur n'est observé. Si les souris *ZEB1* +/- développent toujours des adénomes suite à l'activation de KRAS, ceux-ci n'évolueront pas au stade malin d'adénocarcinomes montrant donc qu'une haplo-insuffisance dans l'expression de *ZEB1* est suffisante pour inhiber l'initiation tumorale. De plus, *ZEB1* est nécessaire pour la survie de ces cellules de carcinomes, et un niveau encore plus fort de *ZEB1* est nécessaire pour stimuler la métastase. Au niveau mécanistique, l'activation de KRAS conduit à l'activation du facteur de transcription *ZEB1*, qui dans ce contexte peut directement réprimer l'expression de *PTEN*, le suppresseur de tumeur le plus exprimé dans ces adénocarcinomes du poumon.

Ces données démontrent donc une synergie entre l'expression des EMT-TFs et l'expression d'oncogène de type RAS dans la carcinogénèse. L'activation oncogénique de RAS est dans certaines situations à l'origine de l'activation de ces facteurs d'EMT, qui sont nécessaires de manière dose-dépendante aux étapes précoces et tardives de la tumorigénèse. Par ailleurs, la seule sur-expression d'un EMT-TF serait également capable d'induire un développement tumoral, démontrant l'activité oncogénique intrinsèque. L'équipe de Geert Berx a en effet montré que la seule expression du facteur *SNAIL* dans les kératinocytes de

souris pouvait conduire au développement spontané de carcinomes (B De Craene et al., 2014). Dans ce modèle l'activation de SNAIL, conduit à la prolifération des cellules souches de kératinocytes et permet leur résistance au stress génotoxique ainsi qu'à l'accumulation de dommage à l'ADN, favorisant à terme le développement de ces carcinomes (Tableau 2).

EMT-TFs	Tissus	Effet	Oncogènes / Oncosuppresseur	Tumeurs	Référence
TWIST1	épithélium mammaire (WAP-Cre)	Expression	KRAS	carcinome mammaire « claudin low »	(Morel et al., 2012)
TWIST1	épithélium pulmonaire (tetO7)	Expression	KRAS	adénocarcinome pulmonaire	(Tran et al., 2012)
SNAIL	Kératinocytes (K5-Cre)	Expression	KO p53	carcinome de la peau	(B De Craene et al., 2014)
ZEB2	Précurseurs des cellules T (Ti2Cre)	Expression	-	leucémie	(Goossens et al., 2015)

Tableau 2 : Tableau récapitulatif des modèles murins démontrant le rôle des EMT-TFs dans l'initiation tumorale

3. Acquisition de propriétés de cellules souches

Les tumeurs sont constituées de populations de cellules cancéreuses différentes de par leur phénotype mais aussi de par leur profil mutationnel. Cette hétérogénéité intra-tumorale peut être expliquée soit par l'acquisition successive de mutations différentes à l'origine des différents sous-clones, soit par l'hypothèse de l'existence d'une population de cellules souches cancéreuses. Les CSCs présenteraient les mêmes caractéristiques que les cellules souches normales, c'est-à-dire une capacité d'autorenouveaulement par division asymétrique, générant ainsi des progéniteurs qui finiront par se différencier, assurant ainsi la spécificité de la structure et de la fonction du tissu. Les CSCs représentent donc un faible pourcentage de la tumeur, elles sont à l'origine de la progression et de l'entretien de la tumeur, soutenant la croissance tumorale en maintenant d'une part le pool de CSCs et en générant une population

non-tumorigène différenciée. Ces cellules isolées à partir de différents modèles tumoraux ont été montrées comme présentant un potentiel tumorigénique élevé, une capacité importante à générer des tumeurs en xénogreffes chez la souris immuno-déficiente de type NOD/SCID, possèdent des capacités d'autorenouvellement et réalisent des divisions asymétriques. Les populations de cellules souches cancéreuses peuvent être caractérisées et isolées sur la base de l'expression d'une série de marqueurs membranaires spécifiques de chaque organe. Par exemple, dans les carcinomes mammaires, les CSCs peuvent être isolées des autres types cellulaires présents dans la tumeur sur la base d'une perte du marqueur de surface CD24 et d'un gain de CD44 (Al-Hajj & Clarke, 2004; Al-Hajj, Wicha, Benito-Hernandez, Morrison, & Clarke, 2003).

Des équipes, dont la nôtre, ont démontré que l'EMT pouvait conférer des propriétés de CSCs. Il a en effet été mis en évidence que des cellules mammaires transformées ayant subi une EMT sont très similaires aux cellules souches mammaires. L'activation d'un oncogène, combinée avec l'expression ectopique d'un EMT-TF dans des cellules épithéliales mammaires immortalisées entraîne une expression élevée de CD44 et une perte de CD24 similaire au profil observé dans des cellules souches (Mani et al., 2008; Morel et al., 2008; M Angela Nieto & Cano, 2012). Tout comme les cellules souches normales, les cellules cancéreuses CD44+/CD24- peuvent générer des mammosphères en milieu non adhérent, et leur implantation chez la souris immunodéprimée permet la génération de tumeurs. De plus, des cellules souches isolées de glandes mammaires murines ou humaines sont enrichies en marqueurs de l'EMT. Notre équipe a par ailleurs aussi démontré *in vivo* que l'expression conjointe de l'oncogène RAS et du facteur de transcription TWIST1 dans l'épithélium mammaire murin conduisait à la génération de tumeurs de type « Claudin Low », un type tumoral mammaire enrichi en cellules souches CD44+/CD24- (Morel et al., 2012; Youssef et al., 2010).

L'activité transcriptionnelle des EMT-TFs est impliquée dans cette acquisition de propriétés souches à différents niveaux (Figure 11). Le facteur TWIST1 est par exemple capable d'activer l'expression de BMI1, une protéine appartenant au groupe Polycomb. Ce dernier permet d'assurer une répression du locus *INK4A* maintenant ainsi les capacités d'autorenouvellement de la cellule. ZEB1 quant à lui réprime les membres de la famille miR-200 qui contrôlent l'expression de gènes associés aux cellules souches tel que BMI1, KLF4 ou SOX2 (Alain Puisieux, Brabletz, & Caramel, 2014; Wellner et al., 2009).

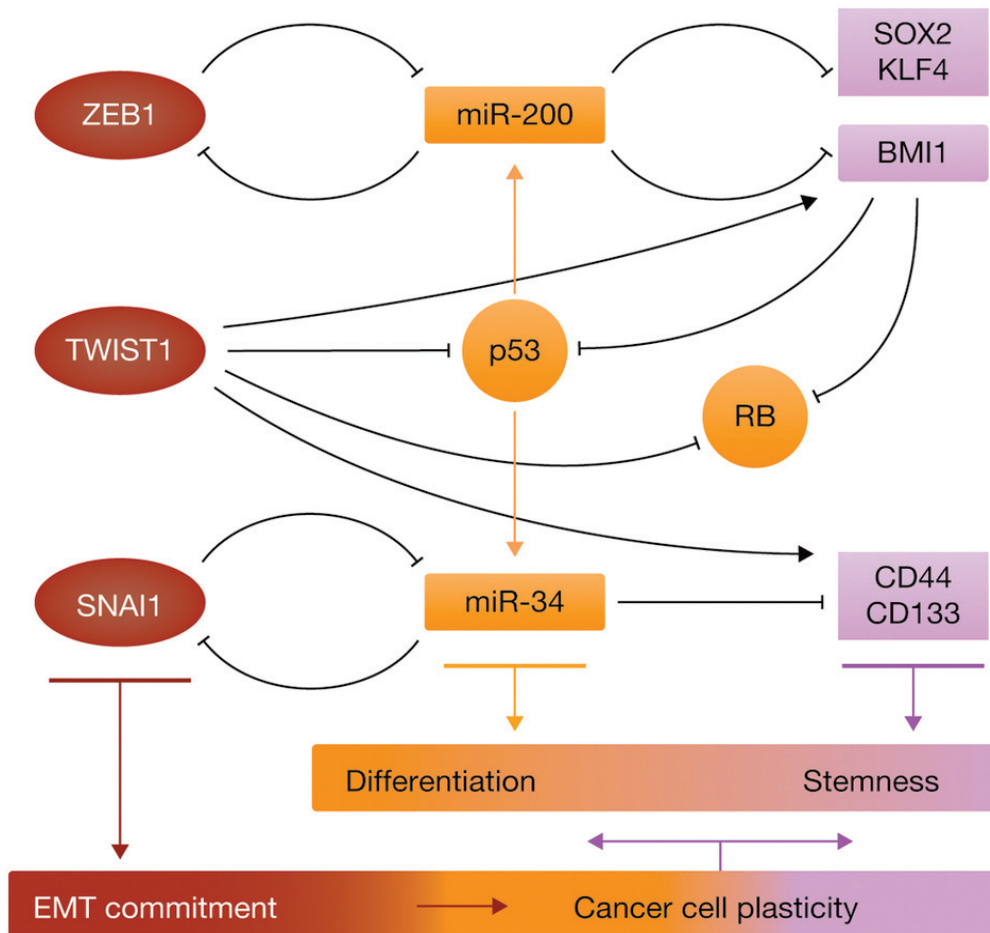


Figure 11: Les EMT-TFs dans la génération de la plasticité cellulaire
(Alain Puisieux et al., 2014)

p53 est responsable de l'expression des miR-200 et miR-34, ces derniers répriment l'expression de facteurs cruciaux pour le phénotype souche des cellules tels que KLF4, BMI1 ou CD44. Les EMT-TFs par leur implication dans une boucle de rétrocontrôle négatif avec ces miRNA et leur capacité à inhiber p53 ou la protéine du rétinoblastome vont moduler la plasticité cellulaire en régulant la balance entre différenciation et propriétés de cellules souches.

SNAIL2 peut également coopérer avec SOX9, un facteur important pour la conservation du statut de cellules souches chez l'adulte, pour induire une dédifférenciation de cellules épithéliales mammaires et leur conférer des capacités de cellules souches telles que la capacité à générer des mammosphères (Guo et al., 2012).

Au total, l'ensemble de ces données obtenues essentiellement dans les cancers d'origine épithéliale, indiquent donc que la réexpression aberrante des facteurs inducteurs d'EMT, avant même de permettre l'engagement des cellules dans un processus d'EMT, va assurer l'initiation tumorale en empêchant la mise en place des systèmes de sauvegarde cellulaires et en induisant la génération de cellules souches cancéreuses.

4. L'EMT et ses facteurs dans la résistance aux traitements

Comme nous l'avons vu, l'induction du processus d'EMT dans des cellules cancéreuses est associée à l'acquisition de propriétés de cellules souches et à une inhibition des programmes de mort, ainsi l'étude de son rôle dans la résistance aux traitements anti-tumorale a été soulevé et étudié.

Lors d'une thérapie anti-tumorale, les médecins sont confrontés à deux types de résistance, une résistance dite « de novo » que l'on peut qualifier de innée, le patient ne répondra jamais à la thérapie. A l'inverse les patients qui vont répondre aux traitements puis récidiver représentent le deuxième type de résistance, la résistance acquise. Contrairement à la résistance innée qui normalement est très spécifique à la drogue utilisée, la résistance de type acquise est une résistance plus généralisée, en effet les cellules ne répondent plus à tout un ensemble de classes de drogues, on parle alors de résistance multi-drogue (MDR multi drug resistance). Ce processus est aussi à l'origine de la récurrence des cancers, générant de nouvelles tumeurs plus agressives que celles d'origine. De nombreux mécanismes peuvent être à l'origine de la résistance à une drogue, par exemple l'activation des voies de signalisation menant à la réparation de l'ADN ou l'altération des cible des drogues, mais parmi ces mécanismes il en existe un majeur, c'est l'activation accrue des pompe à efflux qui permettent d'éliminer la drogue ingérée par la cellule. Ces pompes appelées transporteurs ABC sont exprimées de manière ubiquitaire et ont pour rôle physiologique d'éliminer de la cellule les différentes toxines ingérées. Malheureusement, leur activité est aussi utile dans un contexte pathologique ou ils sont connus pour excréter un nombre important de

chimiothérapies. Cette augmentation d'expression des transporteurs ABC est associée avec à la chimiorésistance des cancers.

Afin d'étudier l'implication de l'EMT et de ses facteurs dans ce processus de chimiorésistance, une approche intéressante a été d'analyser le profil d'expression génique de différentes lignées tumorales et de le comparer à leur sensibilité aux drogues anti-tumorales normalement utilisées en thérapie. De manière intéressante il s'est avéré que les lignées les plus résistantes étaient souvent corrélées à un profil d'expression génique associé à l'EMT (Haslehurst et al., 2012; Işeri et al., 2011). Pour valider cette hypothèse, des cellules cancéreuses mammaires (MCF-7) initialement sensibles ont été rendues résistantes aux drogues utilisées pour les traiter (doxorubicin, paclitaxel, docetaxel) et une analyse de transcriptome a été réalisée à la fois sur les lignées sensibles et sur les lignées résistantes en dérivant. Ceci a permis de montrer que les cellules résistantes présentaient des marqueurs de l'EMT, tels que la perte de la E-cadhérine et le gain d'expression de la vimentine. De plus ces résultats montraient que les cellules ayant acquis cette résistance exprimaient des inducteurs de l'EMT tel le facteur SNAI2 (Işeri et al., 2011).

Une étude similaire a révélé que des cellules de cancer du poumon de type NSCLC possédant une signature de l'EMT avaient un phénotype mésenchymateux marqué et étaient plus résistantes aux traitements ciblant la voie PI3K/AKT ou l'EGFR, que les cellules tumorales toujours de phénotype épithélial (Byers et al., 2013). La résistance à l'Erlotinib (inhibiteur de l'EGFR) dans les cancers du poumon de type NSCLC présentant une mutation activatrice d'EGFR a été associée à une induction d'EMT, associée à l'activation du récepteur tyrosine kinase AXL, dont l'inhibition permet de restaurer la sensibilité à cette drogue (Z. Zhang et al., 2012).

Afin de mieux caractériser les mécanismes mis en jeu, différents inducteurs d'EMT ont été exprimés de manière ectopique dans des lignées épithéliales mammaires puis soumis aux chimiothérapies conventionnelles. Ainsi dans la lignée MCF7, l'expression de SNAI1 et 2 conduit à l'entrée des cellules en EMT et à une protection de ces dernières contre l'apoptose induite par le traitement avec différentes drogues (Kajita, McClinic, & Wade, 2004). Dans ces mêmes cellules, l'activation au TGF- β , un inducteur de l'EMT est associé à la résistance, en effet il a été montré que l'activation de l'EMT va d'une part donner des capacités invasives aux cellules mais aussi que l'expression des inducteurs d'EMT, comme TWIST et SNAI1 va permettre une régulation positive de l'expression des transporteurs ABC, conférant alors en plus aux cellules une résistance (Saxena, Stephens, Pathak, & Rangarajan, 2011). Depuis ces résultats ont été confirmés dans différentes lignées tumorales sur différents facteurs inducteurs

de l'EMT. Une étude a mis en évidence que le facteur TWIST1 surexprimé dans certaines lignées de cancer du sein, est capable, indépendamment de tout processus d'EMT, par sa simple expression de conférer à la cellule une résistance aux drogues. Pour cela, TWIST1 va agir à différents niveaux, il va d'une part permettre la génération de cellules CD44+/CD24- grâce à sa répression directe sur CD24, d'autre part il va augmenter l'expression de ABCC1 (un transporteur membre de la famille des transporteurs ABC). Ainsi, TWIST1 favorise l'émergence de cellules résistantes en permettant non seulement l'acquisition d'un phénotype et de propriétés souches mais aussi l'expression du transporteur ABC, (Vesuna, Lisok, Kimble, & Raman, 2009).

Enfin, il est à noter qu'en plus de la chimiorésistance, certains EMT-TFs ont également été montrés comme jouant un rôle dans la radiorésistance, tel ZEB1 via l'activation de CHK1, a priori de manière indépendante du phénotype EMT (P. Zhang et al., 2014).

Pris dans leur ensemble, ces données montrent que l'entrée en EMT d'une cellule ou que l'expression de facteurs inducteurs de l'EMT est étroitement corrélée à l'apparition de résistance. Les différentes voies alors mises en place sont multiples et encore aujourd'hui il est difficile de comprendre si la résistance est due aux propriétés intrinsèques de ces facteurs ou plus à l'état de dédifférenciation qu'ils induisent. Enfin, il est à noter que si c'est généralement le phénotype mésenchymateux qui est plus résistant aux traitements, c'est parfois le phénotype épithélial qui est au contraire plus résistant, comme c'est le cas pour le cisplatine dans les cancers de l'ovaire (Miow et al., 2015), démontrant donc l'importance du type tumoral dans la réponse.

II. Le mélanome : développement, traitements et résistance

Les cancers de la peau se subdivisent en deux types, les carcinomes et les mélanomes. Les carcinomes sont les cancers les plus fréquents, généralement peu dangereux, ils sont détectés assez rapidement par le porteur ou au cours d'un examen médical. Ces carcinomes peuvent se développer à partir des cellules présentes au niveau de la couche basale de l'épiderme générant ainsi des carcinomes basocellulaires, ne métastasent pas, une intervention chirurgicale permet d'assurer la guérison. Ils peuvent aussi se développer à partir de cellules appartenant à la couche épineuse de la peau, ce sont les carcinomes épidermoïdes. Ces derniers sont plus rares et peuvent métastaser. Toutefois, décelés précocement, ils ne nécessitent eux aussi qu'une simple exérèse chirurgicale.

Le mélanome est un cancer qui a pour origine un mélanocyte de la peau, c'est la forme de cancer cutanée la plus agressive. Bien qu'ils ne représentent que 4% des cancers de la peau, les mélanomes sont responsables de la mort d'environ 80% des patients atteints d'un cancer cutané. Les données montrent une incidence croissante de 3 à 7% par an. L'indice de survie à 5 ans des patients traités aux premiers stades de la maladie est assez élevé, autour de 90% mais tombe rapidement à 40% au bout de 15 ans. Si la maladie est prise en charge à des stades plus tardifs, l'indice de survie à 5 ans est alors inférieur à 20%. Décelés rapidement, ils restent curables par une intervention chirurgicale. Si le cancer est métastatique, il est alors quasiment incurable, du fait de sa résistance aux thérapies conventionnelles. Il est donc important de mieux comprendre les mécanismes moteurs du développement et de la progression de cette maladie afin de trouver de nouvelles cibles thérapeutiques.

A. Origine

1. La structure de la peau : derme et épiderme

La peau est l'un des organes les plus importants chez l'Homme puisqu'elle assure différentes fonctions dont la protection de l'organisme contre différents types d'attaques extérieures telles que les UVs. Elle est principalement constituée de deux couches que sont l'épiderme et le derme. L'épiderme représente un épithélium stratifié en cinq couches, qui sont de l'extérieur vers l'intérieur : la couche cornée, la couche claire, la couche granuleuse, la couche épineuse et enfin la couche basale. L'épiderme est majoritairement constitué de cellules épithéliales, les kératinocytes (Figure 12).

Les **kératinocytes** assurent le maintien et la structure de l'épiderme, ils forment une barrière hydrophobe avec l'environnement extérieur. Les seuls kératinocytes prolifératifs se trouvent au plus profond de l'épiderme, dans la couche basale. A la suite de divisions asymétriques, les kératinocytes prolifératifs génèrent des cellules qui ne se diviseront pas et qui rentreront dans un stade de différenciation terminale (Eckhart, Lippens, Tschachler, & Declercq, 2013). Ces cellules vont migrer vers les couches supérieures, elles se différencient au fur et à mesure de leur progression (Henry et al., 2012). Au stade terminal, les kératinocytes forment la couche cornée, ils ont perdu leur noyau et leurs organelles, ne conservant majoritairement que de la kératine, contribuant ainsi à la résistance mécanique de cette couche (Norlén & Al-Amoudi, 2004). Enfin ils finiront par perdre leurs cohésions et se détacher de l'épiderme par un processus de desquamation.

Les **mélanocytes** sont des cellules issues de la crête neurale situés au niveau de la couche basale de l'épiderme. Ils se divisent peu et ne représentent qu'une faible proportion des cellules de l'épiderme, on estime approximativement une proportion d'un mélanocyte pour dix kératinocytes. Leur fonction première comme nous le verrons dans le point suivant consiste en la production de mélanine, protéine protectrice de l'organisme contre les rayonnements UVs.

On retrouve également dans l'épiderme, les cellules de Langerhans et les cellules de Merkel.

Le derme représente un tissu conjonctif nécessaire au maintien de l'épiderme, ces structures se retrouvent étroitement liées au niveau de la membrane basale. Le derme est constitué d'une matrice extracellulaire et principalement de fibroblastes qui secrètent du collagène et de l'élastine conférant à l'épiderme sa résistance et son élasticité. Il contient les terminaisons nerveuses, les glandes sébacées, les follicules pileux et enfin les vaisseaux sanguins permettant ainsi à la peau d'assurer une multitude de fonctions. Les vaisseaux sanguins assurent l'apport de nutriments à l'épiderme, les terminaisons nerveuses permettent de conférer la sensibilité au toucher. La région du « bulge » des follicules pileux contient des cellules souches assurant la reconstruction de l'épiderme après une blessure ou plus simplement la régénération de la peau.

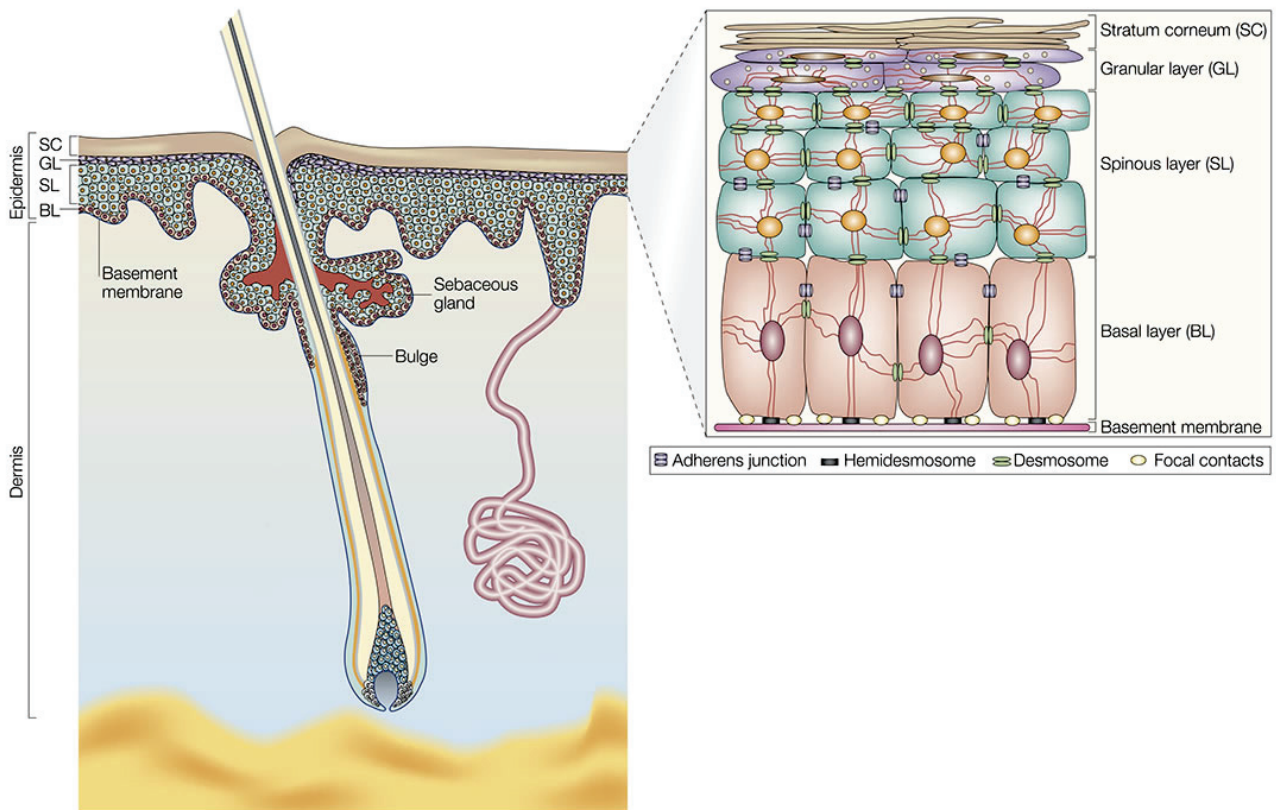


Figure 12 : Structure de la peau

Adapté de (Fuchs & Raghavan, 2002)

La peau des mammifères est constituée du derme et de l'épiderme séparés par une membrane basale. L'épiderme est un épithélium stratifié en cinq couches, la membrane basale, la couche basale (BL), la couche épineuse (SL), la couche granuleuse (GL) et la couche cornée (SC). Le derme est principalement constitué de tissu conjonctif comme le collagène, l'élastine ou des fibroblastes. Les glandes sébacées et les follicules pileux sont ancrés profondément dans le derme.

2. Les mélanocytes chez l'Homme

a) Origine et détermination

Nous avons déjà vu le rôle majeur joué par la transition épithélio-mésenchymateuse au cours de la neurulation, dans la délamination de la crête neurale (Cf paragraphe I.A.a. page 15). Les cellules de la crête neurale vont alors migrer dans différentes zones de l'embryon. Initialement multipotentes, leur potentiel de différenciation va progressivement se restreindre à un seul lignage cellulaire. Les cellules de la crête neurale situées au niveau du tronc vont donner naissance aux mélanocytes de la peau, aux neurones et aux cellules gliales (Figure 13). Il est à noter que l'on retrouve aussi des mélanocytes au niveau de la choroïde de l'œil, dans l'oreille interne et enfin dans les valves cardiaques, toutefois les seuls mélanocytes dont je parlerai dans mon manuscrit correspondront à ceux retrouvés au niveau cutané. Ces futurs mélanocytes alors en migration vont envahir l'épiderme pendant le processus embryonnaire d'innervation cutanée, entre la sixième et huitième semaine de développement chez l'Homme (Mort, Jackson, & Patton, 2015). Les mélanocytes se retrouvent alors localisés au niveau de la jonction dermo-épidermique chez l'Homme.

L'engagement dans le lignage mélanocytaire au détriment d'une autre voie est le résultat d'expressions et d'inhibitions de gènes, le tout mis en place et régulé par le facteur de transcription associé à la microphthalmie MITF. Comme nous le verrons, c'est un facteur important pour les mélanocytes aussi bien dans le contexte physiologique que pathologique, il mettra en place un réseau de gènes déterminant pour la survie et la différenciation des mélanocytes en premier lieu, puis il favorisera l'expression de gènes permettant aux mélanocytes de produire de la mélanine, leur fonction première (Bondurand et al., 2000; Mort et al., 2015).

b) Fonctions, pigmentation et régénération

Le mélanocyte de la peau a pour fonction de produire et de disséminer de la mélanine dans l'épiderme. La mélanine est un pigment qui assure une protection contre les rayonnements UVs mutagènes du soleil.

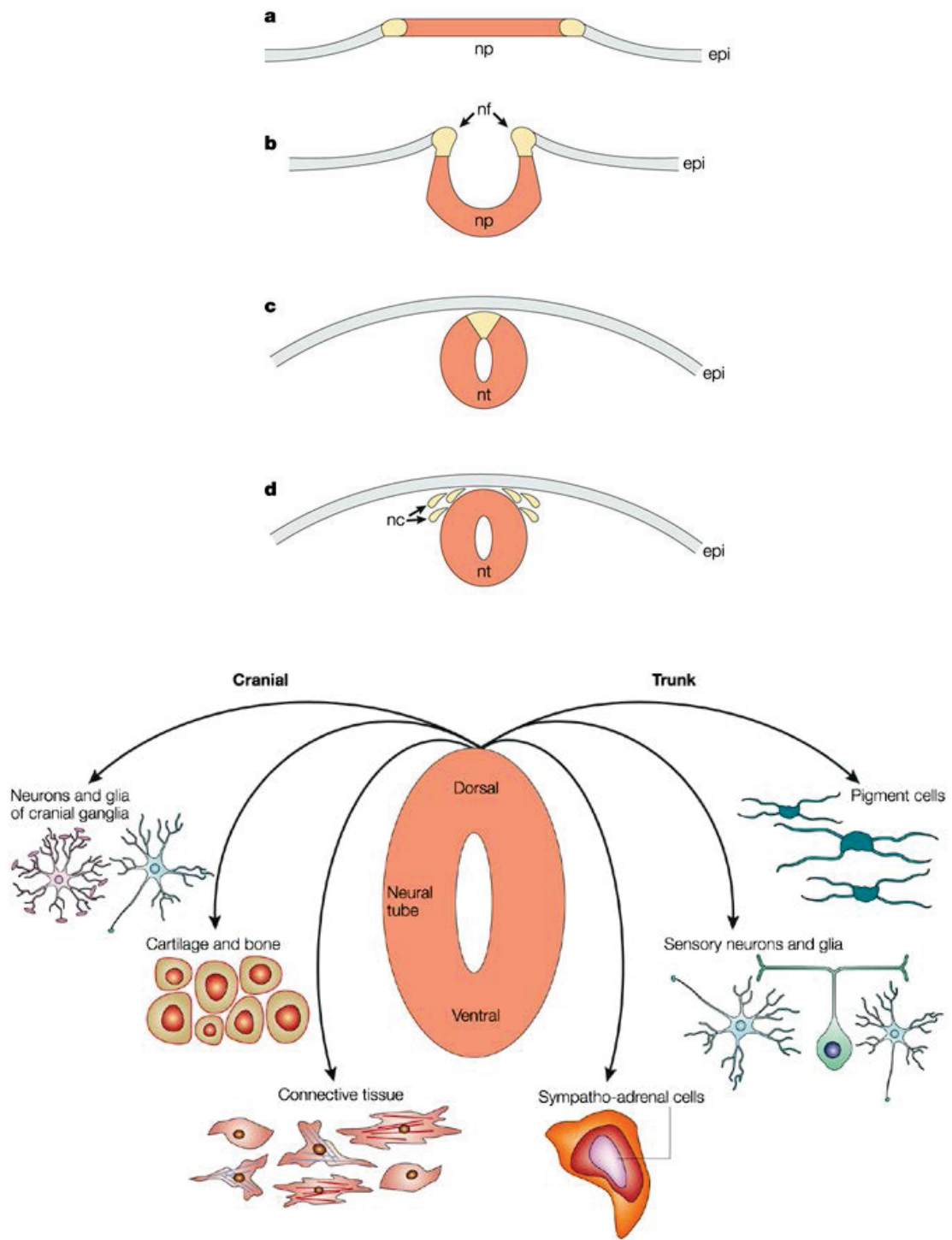


Figure 13 : Formation de la crête neurale et devenir des cellules issues de la délamination
(Knecht & Bronner-Fraser, 2002)

A. Formation de la crête neurale : a. ouverture de la plaque neurale (np), b. invagination de la plaque neurale, génération de la gouttière neurale et formation des futures cellules de la crête neurale (nf), c. fermeture et formation du tube neural (nt), d. Délamination des cellules de la crête neurale (nc). B. Différenciation des cellules de la crête neurale : les cellules de la crête neurale migrent à travers tout l'organisme se différenciant en une multitude de types cellulaire. Les cellules qui migrent vers le tronc généreront les mélanocytes, mais aussi les neurones sensitifs et les cellules des glandes surrénales. Les cellules qui migreront vers le crâne formeront les neurones, ainsi que les os et les tissus conjonctifs.

De par sa structure chimique, la mélanine agit comme un capteur des rayons UVs. Ce pigment est produit dans un organite spécifique aux mélanocytes, le mélanosome, à l'issue d'une cascade de réactions enzymatiques seront produits deux types de pigments, l'eumélanine et la pheomélanine, dont le mélange dans des proportions inégales correspond au polymère de mélanine. Le potentiel de photo-protection diffère entre ces deux pigments, alors que l'eumélanine est de couleur noire ou brune et possède un potentiel de protection élevé en absorbant toute la lumière, la phéomélanine est de couleur jaune orangé et son potentiel d'absorption est moindre. Ces deux types de pigments sont produits à partir d'un précurseur commun, la Tyrosine qui va être transformée en L-Dopamine puis en DOPAquinone par la tyrosinase. Après ce tronc commun de réactions enzymatiques, la voie va se séparer, les enzymes DOPAchrome tautomerase (DCT) puis TRP1 formeront l'eumélanine et parallèlement, la présence de cystéine favorisera la synthèse de phéomélanine, aucune enzyme n'a encore été décrite comme nécessaire à la synthèse de cette dernière (Cichorek, Wachulska, Stasiewicz, & Tymińska, 2013; Hearing, 2011; White & Zon, 2008).

Avec le système hématopoïétique, la peau est un des organes les plus régénératifs. Par jour, nous générons des milliers de cellules cutanées ou de poils et cheveux, et chacun d'entre eux est re-pigmenté de manière identique à ses prédécesseurs. Cette constante pigmentation soulève la question de l'existence de cellules souches mélanocytaires. Bien que peu de données soient disponibles quant à cette population chez l'Homme, nous savons que cette population existe, elle se caractérise par l'expression de marqueurs précurseurs de la lignée mélanocytaire, tels que PAX3 et SOX10. Ces cellules sont quiescentes, elles sont localisées dans le renflement de la partie constante du follicule pileux appelée le bulge. Sous la dépendance de signaux spécifiques, cette cellule va entrer dans une phase de prolifération et former un progéniteur par division asymétrique. Ce progéniteur possède un potentiel prolifératif plus élevé, il va se différencier pour devenir un mélanocyte mature tout en migrant progressivement vers la base du follicule pileux. Les mélanosomes sont alors fonctionnels et les pigments de mélanines sont transmis aux kératinocytes adjacents, ces derniers contenant maintenant de la mélanine, se chargeront en kératine afin d'assurer un nouveau cycle folliculaire.

De récents travaux ont mis en évidence la présence de cellules souches au niveau de l'épiderme. Ces cellules qui possèdent des caractéristiques communes avec les dérivés de la crête neurale seraient capables de maturer en cellules mélanocytaires complètes et fonctionnelles (Li et al., 2010). De plus, dès 1991, une étude sur le vitiligo montrait que sous

l'action d'un traitement stimulant, les mélanocytes inactifs et immatures dans le bulge migraient dans les zones dépigmentées de l'épiderme. Cette migration s'accompagnait d'une maturation des mélanocytes les faisait entrer dans un statut actif favorisant ainsi la repigmentation (Cui, Shen, & Wang, 1991).

c) Les mélanocytes et les kératinocytes, une interaction forte

La mélanine est conservée dans les mélanosomes. Afin d'assurer une protection dans tout l'épiderme et sachant que le nombre de mélanocytes dans la peau est limité, les mélanocytes vont transférer leurs mélanosomes aux kératinocytes adjacents assurant ainsi une diffusion uniforme et globale dans tout l'épiderme. Les mélanosomes contenant la mélanine sont transportés du centre de la cellule vers la périphérie en suivant les microtubules via des protéines moteurs appelées kinésine et dynéine. Arrivés à destination, les mélanosomes vont cette fois utiliser l'actine, via une GTPase nommée Rab27, afin de se positionner dans les dendrites de la cellule. Les mélanosomes sont ensuite transmis aux kératinocytes selon des mécanismes de transfert qui font toujours l'objet d'investigations. Parmi les différentes hypothèses, on trouve comme moyen de transfert de la mélanine, l'exocytose, la cytophagocytose, la phagocytose et la fusion de membrane. Toutefois, nous savons que leurs interactions sont fortes et que ces deux types cellulaires génèrent un microenvironnement permettant des communications nécessaires à l'homéostasie et à la réponse mise en place face aux dommages induits par les UVs.

Des expériences de co-cultures ont montré que des facteurs sécrétés par les kératinocytes, comme le α -MSH, activent des voies de signalisations dans les mélanocytes impliquées dans la prolifération de ces dernières mais aussi dans l'expression du facteur MITF, favorisant ainsi la différenciation et la production de mélanine. L' α -MSH est induit en réponse aux rayonnements UVs, une fois fixé sur le récepteur MC1R exprimé par les mélanocytes, il y aura activation d'une protéine G puis en aval l'activation de la Protéine Kinase A (PKA), puis de CREB, un transactivateur de MITF. Les facteurs émis par les kératinocytes sont retrouvés dans l'hématopoïèse et les vaisseaux sanguins en formation. C'est le flux sanguin qui permettrait à ces facteurs d'être distribués dans les organes cibles, ainsi une hypothèse serait que les mélanoblastes et les mélanocytes recevraient ces signaux grâce au système sanguin pendant leur migration et que les kératinocytes prendraient le relais

dans les stades finaux de leur différenciation après colonisation de l'épiderme (Ando et al., 2012; Hirobe, 2005; Joshi et al., 2007; Van Den Bossche, Naeyaert, & Lambert, 2006).

3. MITF : le facteur clef

Les différentes recherches s'accordent sur le fait que MITF est le chef d'orchestre du développement mélanocytaire. Il va mettre en place un réseaux de gènes essentiels à la formation, à la différenciation et à la survie des mélanocytes.

a) Fonctions et réseaux

Il existe quatre isoformes de *Mitf* chez l'Homme et vingt-cinq chez la Souris. Ayant de grandes similarités, ces isoformes ne diffèrent que par les aminos-acides contenus dans l'exon 1. Chez l'Homme nous retrouvons donc les isoformes *Mitf-M*, *Mitf-A*, *Mitf-C*, *Mitf-H*, sachant que la seule isoforme exprimée dans les mélanocytes est *Mitf-M*, la forme A est plus spécifique de la rétine, la C dans le cœur et les données pour la forme H font toujours l'objet de recherches (Yann Cheli, Ohanna, Ballotti, & Bertolotto, 2010; Hou & Pavan, 2008; Vance & Goding, 2004; White & Zon, 2008).

MITF appartient à la famille myc et possède donc un domaine de type bHLH, lui permettant d'une part de se dimériser et d'autre part de se lier à l'ADN. Ses partenaires potentiels pour la dimérisation sont TFE3 et TFEB. Toutefois, ces facteurs ne se retrouvent pas exprimés dans la crête neurale suggérant que MITF fonctionne en homodimère dans ces cellules. Etant donnée son importance, MITF est finement régulé au cours des différentes étapes de la détermination mélanocytaire.

La régulation directe du promoteur de MITF fait intervenir les facteurs de transcription PAX3, CREB, SOX10 ou Lef1. Ces différents facteurs sont activés par différentes voies de signalisation et assurent ainsi l'expression de MITF, des précurseurs mélanoblastiques aux mélanocytes fonctionnels (Figure 14). L'utilisation de modèles murins a permis de mettre en évidence les acteurs clés de du développement mélanocytaire. Ainsi, à partir de l'observation de souris KO pour les gènes *Wnt1* et *Wnt3a* qui présentent une absence de mélanoblastes (pas de marquage positif pour DCT), il a été montré que l'expression de WNT induite par les tissus adjacents à la crête neurale, va déclencher l'activation d'une voie canonique conduisant à la

translocation de la β -caténine. Cette dernière se dimérisera avec TCF pour activer des gènes précoces de la détermination mélanocytaire tels que PAX3 et SOX10. Ces premiers facteurs de transcription exprimés dès le début de la migration des cellules de la crête neurale, favoriseront plus tard positivement l'expression de MITF (Bondurand et al., 2000; Mort et al., 2015). D'autres facteurs, tels que FOXD3, pourront au contraire inhiber l'expression de MITF favorisant dans ces précurseurs une autre détermination cellulaire (neuronale ou cellules gliales) (Mort et al., 2015). De la même façon que pour la voie WNT, des expériences d'inhibition *in vivo* ont mis en évidence le rôle de la voie KIT dans le développement des mélanocytes. La voie de signalisation de KIT est mise en place dès la délamination de la crête neurale, elle régule la survie et la migration des mélanoblastes. Différentes hypothèses co-existent aujourd'hui, quant à savoir qui de MITF ou de KIT est le premier facteur exprimé. Une de ces hypothèses suggère que KIT est exprimé par le biais de MITF, des expériences de KO de MITF chez le zebrafish ont en effet montré que ces poissons étaient incapables d'exprimer KIT. Une autre hypothèse est que KIT est exprimé en amont de MITF, ainsi il favorise la phosphorylation de ce facteur, favorisant alors son interaction avec des co-activateurs transcriptionnel comme p300. Enfin il apparaît dans certaines études que leur expression initiale est indépendante, toutefois, il semble que ces deux protéines interagissent indirectement coopérant au final dans le développement des mélanocytes. Enfin la voie EDNRB a été montrée chez la souris comme nécessaire dans un premier temps, non pas à la formation des mélanocytes mais en amont de la différenciation à la migration des mélanoblastes puis plus tard au stade final dans le développement des mélanocytes.

La régulation peut aussi être effectuée au niveau protéique, en effet MiTF est régulé post-traductionnellement. Sa phosphorylation sur différents résidus par des facteurs comme GSK3 β ou c-KIT stimule son activité transcriptionnelle en régulant sa fixation à l'ADN, à l'inverse une phosphorylation en C-terminal par le facteur RSK régule son ubiquitinylation et sa dégradation par le protéasome. Son domaine de transactivation AD-1 lui permet d'interagir avec p300 et CBP deux co-activateurs transcriptionnels, à l'inverse une interaction avec la protéine STAT3 inhibe ses activités transcriptionnelles. L'activité transcriptionnelle de MiTF est également régulée par sumoylation sur la lysine 318 (Bertolotto et al., 2011).

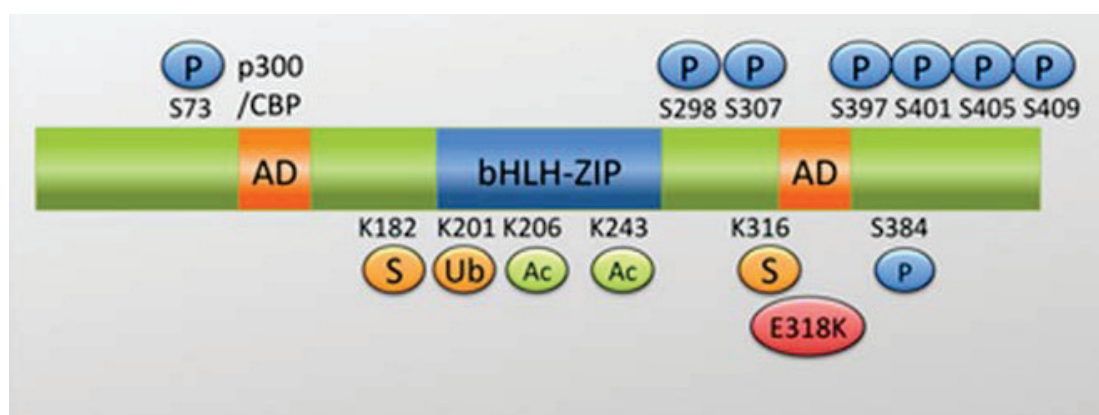


Figure 14 : Structure de la protéine MITF

D'après (Wellbrock & Arozarena, 2015)

Le facteur MITF est constitué d'un domaine basique de type hélice-boucle-hélice leucine zipper (bHLH-LZ) lui permettant de se fixer à l'ADN sur des séquences spécifiques, d'un domaine de transactivation (AD) permettant de recruter des coactivateurs transcriptionnels. MITF est connu pour être la cible de différentes kinases comme ERK (phosphorylation S73), GSK-3 β (phosphorylation S298, S397-S405) ou encore la kinase ribosomale RSK (phosphorylation S409). Ces modifications post traductionnelles activent et régulent l'activité de MITF.

Dès 1942, le phénotype MITF est décrit sur une souris mutante dont on remarque que les défauts de pigmentation sont dus à un manque de mélanocyte plutôt qu'à un défaut dans la production de mélanine (Uong & Zon, 2010). Cette observation fut la première montrant l'importance de MITF pour la survie des mélanocytes. On sait depuis que ce facteur est relié à la survie mélanocytaire en favorisant l'expression de BCL2 et MET, soulignant une nouvelle fois que les mutants de MITF présentent un défaut du nombre de mélanocytes et non pas un défaut de la synthèse de mélanine. De plus, il est impliqué dans leur prolifération et la progression dans le cycle cellulaire en régulant INK4A/p16, p21 ou encore CDK2 (Figure 15). Enfin, il contrôle aussi leur différenciation en se fixant sur des séquences e-box spécifiques sur les gènes *Dct*, Tyrosinase et *Tyrp1*. *In vitro* des expériences ont permis de montrer que MITF était capable quand il était exprimé de manière ectopique dans un type cellulaire dérivé de la crête neurale, d'induire de la transdifférenciation mélanocytaire ce qui indique que dans certains types cellulaires, MITF seul suffit à établir un programme de gènes spécifiques des mélanocytes. Cependant, l'utilisation de modèles murins a permis de montrer que certains gènes nécessaires pour le lignage mélanocytaire nécessitaient l'expression de MITF mais aussi de gènes mélanoblastiques tels que SOX10. En effet l'expression d'un seul de ces deux gènes ne suffit pas pour permettre l'expression de la Tyrosinase pourtant essentielle dans les étapes finales de la différenciation des mélanocytes.

En conclusion, il apparaît que MITF est bien le gène clé de la biologie des mélanocytes, exprimé précocement il participe à toutes les étapes de la détermination mélanocytaire, depuis la migration de ces cellules à partir de la crête neurale jusqu'aux étapes finales en permettant la production de mélanine. Toutefois, MITF seul ne serait pas suffisant pour assurer toutes les étapes de détermination, et c'est donc en réseau avec d'autres voies de signalisation majeures qu'il assure le développement normal des mélanocytes.

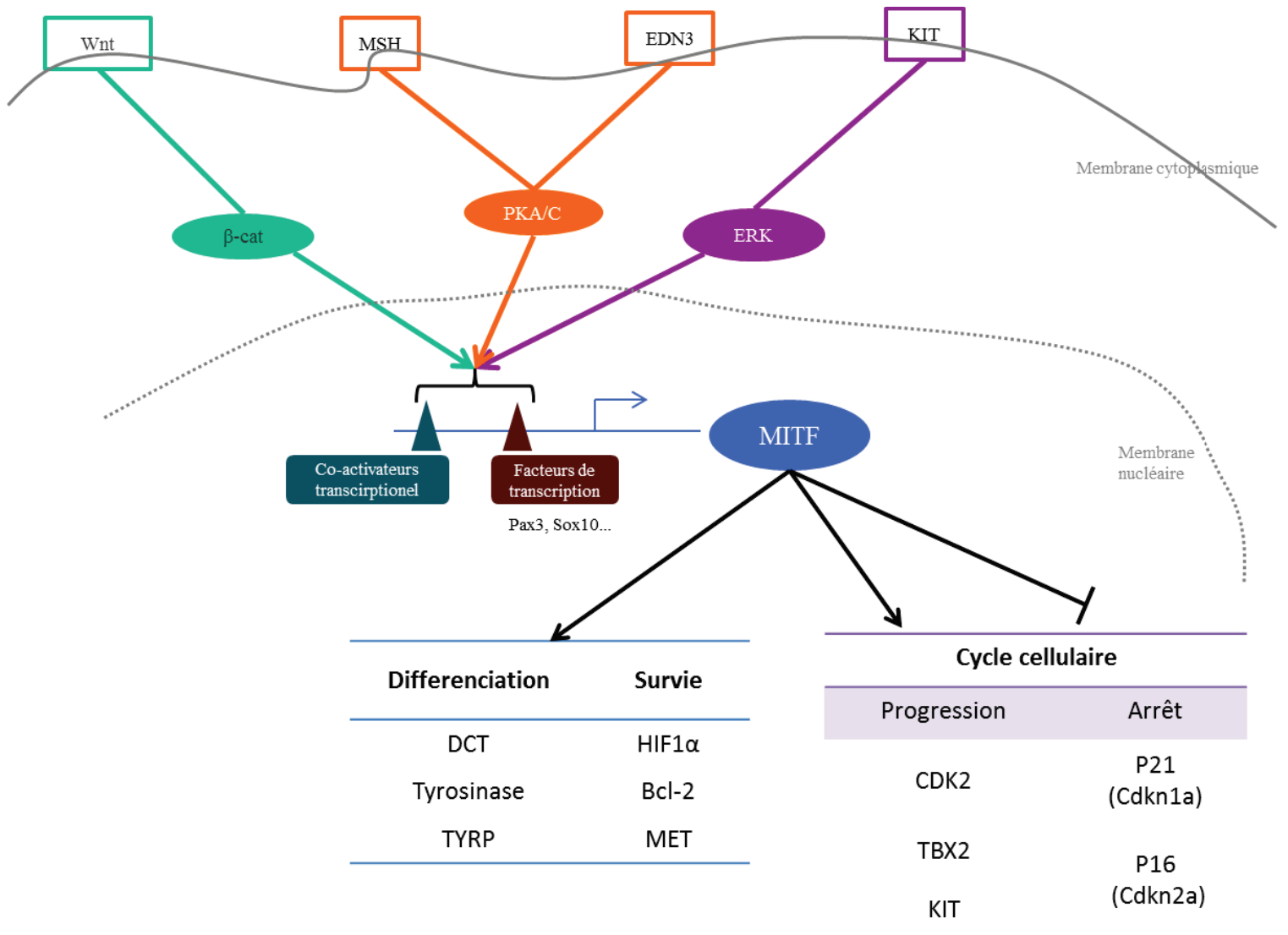


Figure 15 : MITF : activation de gènes cibles

(Yann Cheli et al., 2010; Hocker, Singh, & Tsao, 2008; Hou & Pavan, 2008)

MITF est le gène clef de la différenciation mélanocytaire, une fois activé, il met en place un programme génique visant à assurer le développement, la différenciation, la survie et la prolifération des mélanocytes.

b) Pathologies

Il existe de nombreuses pathologies liées à des défauts de la pigmentation. Bien que toutes ne soient pas directement liées à MITF, on retrouve par exemple des mutations dans les gènes *Pax3* et *Sox10* responsables de certaines versions du syndrome de Waardenburg, le facteur de la microphthalmie est le seul impliqué dans la version de cette maladie touchant les mélanocytes épidermiques. Le type 2A du syndrome de Waardenburg et le syndrome de Tietz sont directement reliés à une mutation de MITF. Les patients atteints de ces syndromes sont caractérisés par une hypopigmentation et des problèmes de surdité plus ou moins importants (Figure 16).

Les différentes mutations observées dans le syndrome de Waardenburg et le syndrome de Tietz sont souvent la conséquence de la génération d'une protéine MITF tronquée. Ces mutations touchent les différents domaines structuraux et des expériences *in vitro* ont validé l'incapacité de MITF portant ces mutations à assurer sa fonction dans le développement des mélanocytes. Certaines mutations touchent le domaine basique de MITF inhibant ainsi la fixation du facteur de transcription à l'ADN, l'activation de gènes comme TYR indispensable à la pigmentation est alors impossible. Elles peuvent aussi toucher sa séquence de localisation nucléaire, maintenant MITF dans le cytoplasme (H. Zhang et al., 2012). Ainsi, quelle que soit la mutation, MITF sera dans l'incapacité de mettre en place le réseau de gènes nécessaires à la survie et au bon développement des mélanocytes.

De manière intéressante, nous avons pu voir que les souris déficientes pour le gène *Slug* présentaient des défauts de pigmentation (Cf paragraphe I.A.3.a page 24). Or ce même gène est retrouvé muté chez certains patients atteints du syndrome de WS de type 2.

Ainsi des études *in vivo* ont mis en évidence que *Slug* étant nécessaire pour la pigmentation du pelage, les souris déficientes présentant une dépigmentation du front, des pattes et du ventre. Aucune analyse sur une éventuelle surdité n'a été effectuée mais des problèmes de comportements suggèrent une déficience dans l'oreille interne, une zone dans laquelle nous retrouvons des mélanocytes (Grill et al., 2013; Pingault et al., 2010; Tachibana, Kobayashi, & Matsushima, 2003).

Waardenburg syndrome

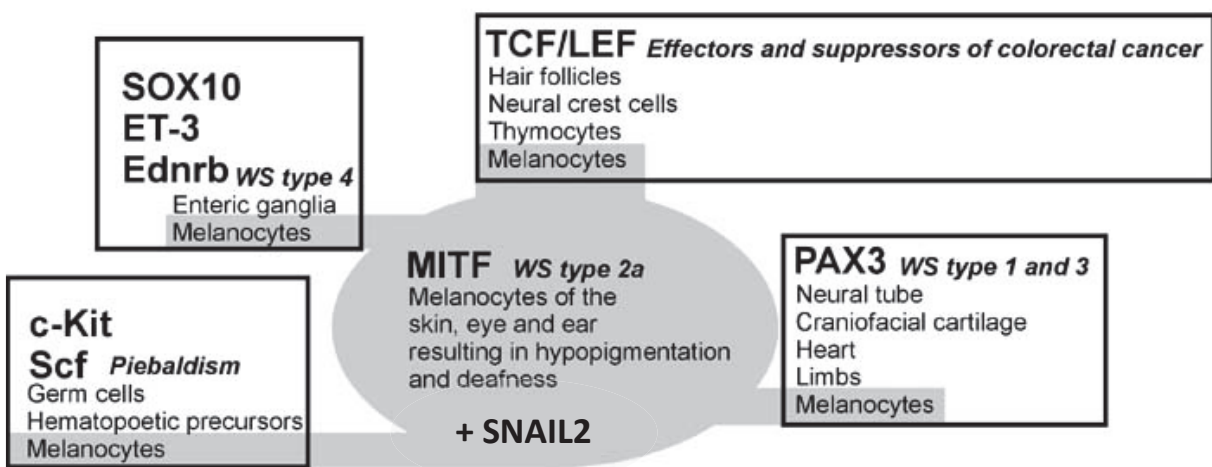


Figure 16 : Syndrome de Waardenburg : plusieurs maladies pour un même gène

D'après (Widlund & Fisher, 2003)

Le syndrome de Waardenburg (WS) est principalement associé à des problèmes de surdité et de dépigmentation de la peau. Plusieurs gènes (*Pax3*, *Sox10*) ont été identifiés comme responsables de cette pathologie, qui se subdivise en quatre différents types selon la cause génétique. Toutes ces causes génétiques étant impliquées dans la régulation de MITF, les différents types de WS présentent une perte de fonction des mélanocytes. MITF est donc le facteur commun à toutes ces pathologies.

B. Les différents types de mélanomes

Les mélanomes constituent un ensemble hétérogène de tumeurs, et différentes classifications ont été proposées prenant tout d'abord en compte des critères cliniques puis génétiques.

Différentes tentatives de classifications des mélanomes cutanés ont été mises en place, aucune ne représente en soi un facteur pronostic local supérieur à la mesure de l'épaisseur selon Breslow, aucun de ces facteurs n'a de pertinence pronostic au stade métastatique. Jusqu'en 2011, il n'existait pas de traitement ciblé, les chimiothérapies classiques (alkylants en particulier) permettaient d'obtenir des résultats très inconstants. Aucune des drogues utilisées ne prenaient en compte les spécificités biologiques de la tumeur d'origine. Enfin, les critères de classification histopathologique pris en compte n'étaient pas assez catégoriques, ils se superposaient, il était alors difficile et peu reproductible de classer les tumeurs pour pouvoir les traiter spécifiquement au sein de groupes homogènes.

Depuis, les analyses moléculaires se sont ajoutées à l'analyse histopathologique standard, permettant de mettre en évidence l'existence de plusieurs sous-types biologiques de mélanome et de progresser dans les techniques d'approches et de traitements. Nous savons aussi qu'à l'intérieur même d'un type de mélanome, la population cellulaire est hétérogène et que chacune de ces sous-populations peut potentiellement avoir différentes susceptibilités. Aujourd'hui, il existe donc de nouveaux critères permettant de classer les mélanomes, ils prennent en compte les altérations génétiques, particulièrement les gènes clefs des voies aberrantes mises en place dans la pathologie, créant ainsi des groupes qui permettent de mettre en place des stratégies thérapeutiques spécifiques (Bishop et al., 2009; Whiteman, Pavan, & Bastian, 2011).

1. La classification morphologique et phénotypique

En clinique, le diagnostic phénotypique permettant d'évaluer une lésion pigmentée suspecte et son évolution se fait selon cinq critères dont chacun commence par une des cinq premières lettres de l'alphabet, c'est la technique dite de « l'abécédaire ». Un mélanome présente généralement une asymétrie « A » à bords irréguliers « B ». La couleur « C » peut

varier entre le noir, le brun et même le bleu. La lésion peut comporter des zones dépigmentées entourées d'une zone inflammatoire, la taille peut donc varier rapidement, on parle du diamètre « D » de la lésion. Ces critères peuvent évoluer au cours du temps, ils définissent alors l'évolution « E » de la lésion. Ces critères initialement destinés aux patients ne sont ni assez sensibles ni assez spécifiques et des techniques telles que la dermoscopie, dermoscopie digitale et microscopie confocale permettent de renforcer les performances cliniques (Bafounta, Beauchet, Aegerter, & Saiag, 2001; Menzies, 2013). Toutefois, ces simples critères phénotypiques ne suffisent pas pour asseoir le diagnostic et doivent toujours être complétés par une analyse histopathologique. Les analyses génétiques peuvent aider au diagnostic des tumeurs d'interprétation difficile dites « border-line » pour lesquelles l'anatomopathologie ne permet pas d'établir un diagnostic de certitude et sont désormais utiles à la prise en charge thérapeutique dans les formes localement avancées ou métastatiques.

La première classification mise en place en 1973 prenait en compte deux types de critères, des critères cliniques et histopathologiques. Ainsi Mcgovern et al établissaient une classification contenant quatre types de mélanomes. En se basant sur la distribution des mélanocytes en phase précoce du mélanome, où la tumeur prolifère à la surface de la peau (et non pas en profondeur) en intraépidermique, ils ont distingué trois types de mélanome. Le SSM (Superficial Spreading Melanoma), en français « mélanome superficiel extensif » se caractérise par une croissance en superficie formant des taches pigmentées à l'intérieur desquelles des nodules se développent et pénètrent alors dans le derme dans une phase de croissance qui passe de radiale à verticale. Dans ce modèle, les mélanocytes sont élargis et regroupés en agrégats. Les mélanomes de types LMM (Lentigo Malignant Melanoma) pour « mélanome lentigo malin » ou ALM (Acral Lentiginous Melanoma) pour « mélanome acrolentigineux » sont à l'inverse constitués de mélanocytes isolés dans la couche basale de l'épiderme. Le LMM qui a pour origine un lentigo (tâche pigmentée non cancéreuse), s'étend en macule dans la couche basale, il devient invasif en plongeant dans l'épiderme au niveau des follicules pileux. Cette progression est assez lente et peut prendre plusieurs années. Ils sont difficiles à diagnostiquer car peut différenciable des lentigos et leur prolifération en périphérie est discrète, souvent achromique, donc difficile à délimiter. L'ALM est principalement palmoplantaire, il n'est pas lié à une surexposition aux UVs, il prolifère comme les autres membres de son groupe d'abord de manière superficielle et plus tard dans la pathologie il pourra envahir le derme dans la phase de prolifération verticale. Enfin Mcgovern

définit un dernier sous type de mélanome, qu'il classe à part, le mélanome nodulaire (NM). Ce dernier type ne présente pas de prolifération radiale suggérant une transition vers une phase verticale envahissante plus rapide. Cette étude a permis de baser les fondations de la classification des mélanomes, depuis d'autres types de mélanomes, moins communs, qui diffèrent aussi bien sur un plan clinique que histopathologique tel que le mélanome desmoplastique, les mélanomes issu d'un nævus bleu ou d'un nævus congénital tout comme les mélanomes non cutanés (mélanomes des muqueuses, mélanomes uvéaux) ont été identifiés et caractérisés (McGovern et al., 1973).

De nombreuses études épidémiologiques ont permis de mieux comprendre les caractéristiques de la maladie. La corrélation entre l'exposition au soleil et l'incidence du mélanome a été établie par de nombreuses études sur des populations à travers le monde. Toutefois, il s'est avéré que certains types de mélanomes apparaissaient avec une fréquence élevée dans des zones normalement peu exposées au soleil ou protégées, c'est le cas notamment des mélanomes acraux ou muqueux. Ces études ont évolué et ont pris en compte de plus en plus de critères pour dans les années 2000 commencer à déceler des génotypes ayant un risque accru de développer des mélanomes cutanés (Bishop et al., 2009; Whiteman et al., 2011). Des études comparatives réalisées entre des jumeaux ou des frères ont montré qu'une partie des nævus que nous portions était imputable dès notre naissance à l'hérédité puis ensuite à notre exposition au soleil. La corrélation entre le nombre de nævus et l'apparition de mélanomes cutanés est élevée, de plus des recherches faites sur le génome ont montré que certains gènes étaient retrouvés altérés à la fois dans des nævus et dans les mélanomes, soulignant ainsi la contribution de ces derniers dans le développement de la pathologie.

Au final, le type de mélanome qui touche la personne est dépendante de l'âge, de l'exposition au soleil et du phénotype de l'hôte.

2. La classification génétique

Les études de biologie moléculaire des dernières années ont mis en évidence des altérations spécifiques dans les mélanomes, des altérations que l'on peut associer avec des caractéristiques cliniques et histopathologiques spécifiques, affinant ainsi la caractérisation des différents types de mélanomes. L'analyse des mélanomes a montré que les mutations dans

la voie RAS/RAF/MAPK sont les plus fréquentes. Les mutations de RAS et de BRAF sont retrouvées dans 70 à 80% des mélanomes, particulièrement dans les mélanomes indépendants des dommages dus à l'exposition chronique au soleil (non-CSD).

a) Les mutations de NRAS

La famille RAS se caractérise par des protéines G, fixées sur la face interne de la membrane plasmique, qui permettent l'échange de GTP en GDP. Elles assurent ainsi par la phosphorylation d'une protéine, la transmission d'un signal intracellulaire par la voie de signalisation RAS/RAF/MAPK. La mutation NRAS fut identifiée dans les années 1980 par Albino (Albino, Strange, Oliff, Furth, & Old, 1984). Elle correspond à l'inhibition de l'hydrolyse du GTP en GDP par les protéines GAP, ainsi RAS active de manière constitutive les voies qui sont en aval, favorisant des processus pro-tumoraux comme la survie et la prolifération. De manière intéressante, il a été montré que dans ce contexte NRAS était aussi capable d'activer en parallèle de la voie des MAPK, la voie PI3K/AKT favorisant elle aussi la prolifération et la survie cellulaire (Figure 17). L'activation de NRAS est un événement précoce, il est présent dès l'initiation tumorale et le maintien de son expression est préservé pendant toute la progression du mélanome (Omholt et al., 2002).

RAS est muté dans environ 15% des mélanomes sous les trois isoformes, NRAS, HRAS et KRAS. Toutefois, le ratio d'expression de ces mutations varie en fonction du sous type étudié.

Les mutations les plus communes sont les mutations NRAS particulièrement celles sur le codon 61 appelées mutations NRAS Q61R ou NRAS Q61K (substitution d'une glutamine par une arginine ou une leucine). Ainsi, on retrouve NRAS muté principalement dans les mélanomes cutanés indépendants des dommages dus à l'exposition chronique au soleil, 31% dans les mélanomes nodulaires, 21% dans les SSM, 19% dans les LMM et enfin 8% dans les ALM. NRAS est retrouvé ensuite dans 21% des mélanomes exposés de manière intermédiaire au soleil et seulement 6% dans les zones non exposées au soleil (Platz, Egyhazi, Ringborg, & Hansson, 2008).

b) Les mutations de BRAF

Le deuxième oncogène, BRAF, fut trouvé en analysant *in vitro* des lignées cellulaires de mélanome (Davies et al., 2002). La famille RAF comprend trois protéines, ARAF, BRAF et CRAF. Parmi ces trois kinases, BRAF est celle qui a l'activité la plus élevée dans un contexte physiologique et c'est aussi BRAF qui se retrouve être le plus souvent muté dans les mélanomes. La mutation BRAFV600E est la plus commune dans le mélanome, on considère que 50 à 60% des mélanomes portent cette mutation. Retrouvée principalement chez des patients jeunes, elle est exprimée dans 60% des SSMs, majoritairement sur des zones moyennement exposées au soleil comme le torse. Le mélanome BRAFV600E se démarque des autres mélanomes non mutés pour BRAF, par une forte pigmentation et un fort potentiel métastatique. Un individu possédant un nombre élevé de naevi a une plus forte probabilité de développer un mélanome BRAF muté. De manière intéressante, on sait qu'un grand pourcentage de naevi présents chez un individu sain (qui ne développera peut être jamais de mélanome) porte la mutation BRAF. Ces résultats suggèrent aussi que BRAF seul n'est pas suffisant pour induire le développement d'un mélanome mais que des altérations génétiques supplémentaires sont nécessaires. Ainsi, ces événements oncogéniques expliqueraient la latence observée entre l'apparition de naevus sur l'individu dans les deux premières décennies et l'apparition de mélanomes dans les décennies suivantes. BRAF est donc très majoritairement retrouvé dans les mélanomes issus d'un épithélium et soumis à un ensoleillement intermédiaire, comme cité précédemment on retrouve l'oncogène BRAF muté dans 60% des SSM, mais aussi dans 41% des mélanomes nodulaires, dans environ 20% des LMM et ALM et enfin dans 5% des mélanomes muqueux. Cette mutation est de mauvais pronostic car elle est fortement corrélée à un potentiel métastatique élevé (Houben et al., 2004; Long et al., 2011).

La mutation V600E consiste en la substitution d'une valine par un acide glutamique, la position sur l'acide aminé 600 est très importante car elle touche le domaine kinase de BRAF. Normalement phosphorylé pour être actif, la mutation mime cette modification post traductionnelle, entraînant ainsi une activation intense et constitutive de la voie de signalisation en aval de BRAF. Comme NRAS, BRAF appartient à la voie de signalisation des MAPK et son activation favorise la prolifération et la survie cellulaire (Cf paragraphe II.C.1.a page 73) (Figure 17). Des mutations moins communes sont retrouvées telles que V600D ou V600K.

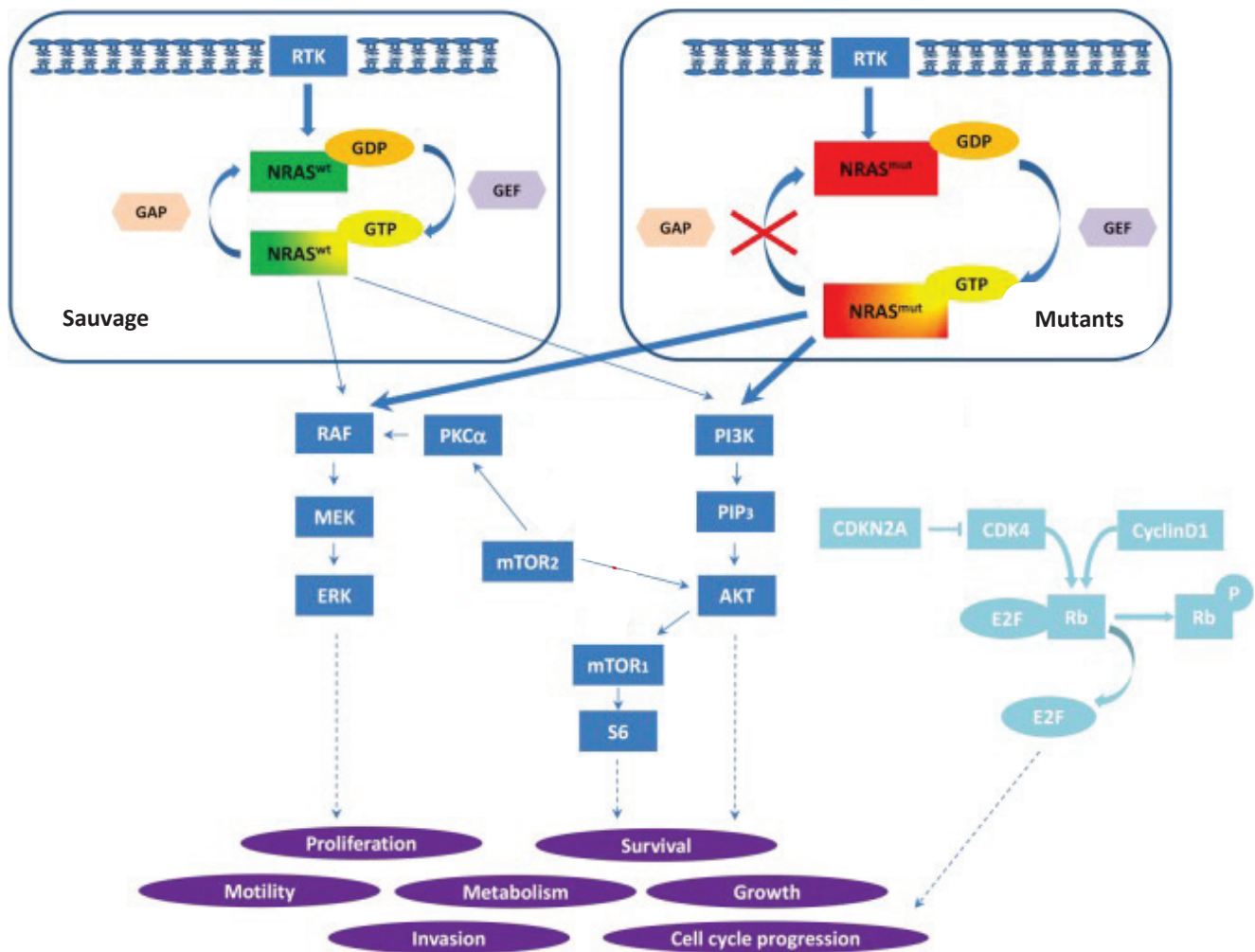


Figure 17 : Présentation de la voie de signalisation MAPK

D'après (Posch & Ortiz-Urda, 2013)

La protéine RAS permet la transduction d'un signal. Elle oscille entre un état actif où elle est liée à un GTP (Guanosine TriPhosphate) et un état inactif lorsqu'elle est liée à un GDP (Guanosine DiPhosphate). Les mutations NRAS^{Q61} ou NRAS^{G12} empêchent l'hydrolyse du GTP en GDP laissant NRAS dans un état constitutivement actif indépendamment d'un signal d'activation en amont. NRAS suractive alors les voies PI3K et MAPK favorisant ainsi de nombreux processus nécessaires à la progression tumorale. RTK : Récepteur Tyrosine Kinase, GEF : Guanine Exchange Factor, GAP : GTPase activating protein.

Elles représentent 5-6% des mutations de BRAF et ont la même conséquence, la substitution ayant lieu à la même position (Strickland, Pal, Elmets, & Afaq, 2015).

c) Les autres mutations courantes

D'autres oncogènes et voies de signalisation ont été mis en évidence comme importants dans le mélanome. C-KIT par exemple est retrouvé muté dans les mélanomes issus des muqueuses ou sur les mélanomes de la peau qui ont été très exposés. Les mélanomes mutés pour KIT sont généralement retrouvés chez des patients plus âgés. Contrairement aux mélanomes BRAF pigmentés, les mélanomes KIT sont plus difficiles à délimiter et posent des problèmes de marges en cas d'excision. Leurs migrations sont plus latérales et restent donc très localisées. La mutation c-KIT correspond aussi à une activation aberrante de la protéine, indépendamment de son ligand. c-KIT est situé en amont de la voie des MAPK et de PI3K/AKT et favorise la survie et la prolifération cellulaire.

Plus récemment, les protéines G ont été mises en évidence dans des tumeurs mélanocytaires, principalement dans des mélanomes uvéaux. La mutation la plus fréquemment retrouvée est GNAQ, elle conduit à une activation constitutive de la protéine. Les mutations C-KIT et GNAQ sont les deux autres mutations les plus communes mais restent faibles en comparaison à RAS et BRAF. Alors que GNAQ est retrouvé exclusivement dans les mélanomes non exposés au soleil et non associés à un épithélium, c-KIT est principalement exprimé dans les mélanomes acro-lentigineux (21%) et muqueux (18%) associé à un épithélium et, dans une moindre mesure, dans les mêmes mélanomes que GNAQ. Les recherches ont montré que ces différentes mutations prises dans leur ensemble sont toutes mutuellement exclusives. De plus, il semble que chacune d'entre elles soit spécifique d'un type de mélanome, ainsi il a été établi un lien entre la classification histologique et moléculaire.

De nouveaux candidats ont été mis en évidence dans de récentes recherches, ERBB4, GRIN2A ou encore RAC1. Leurs rôles font toujours l'objet d'investigations bien que pour certains, des données *in vivo* et *in vitro* ont pu valider leur implication dans la pathologie (Kunz, 2014; Tsao, Chin, Garraway, & Fisher, 2012).

3. Combinaison des classifications

Le fait de pouvoir associer un type de mélanome à une mutation directrice peut trouver son explication dans les cellules d'origine de ces mélanomes. Bien que tous les mélanocytes viennent de la délamination des cellules de la crête neurale, les précurseurs des mélanocytes ont un potentiel de différenciation élevé et ce n'est que la combinaison de signaux spécifiques qui fera d'eux des mélanocytes. Ainsi, les cellules de la crête neurale qui migreront vers la région céphalique pourront donner des neurones, des cellules gliales. Les cellules qui migreront vers la région caudale quant à elles ne pourront pas se différencier en neurones, et enfin les cellules qui migrent vers le tronc ne pourront pas générer des dérivés mésodermiques. Lors de ces migrations tout comme dans le microenvironnement de leurs sites de destination finaux, ces précurseurs vont donc être soumis à une multitude de signaux. Ils vont potentiellement subir des modifications épigénétiques et enfin les interactions que ces cellules auront avec les cellules adjacentes, comme par exemple les interactions entre mélanocytes et kératinocytes sont autant de potentielles explications quant à la diversité de types de mélanomes observés.

Vers la fin des années 1990, la complexité des données accumulées rend la classification difficile or celle-ci est nécessaire. En effet, elle permet de définir les maladies en groupes biologiques distincts selon des critères de diagnostic. Le but étant de classer les pathologies selon une étiologie commune, une évolution clinique similaire et donc de les traiter en conséquence. Il émerge alors un modèle plus simple qui prend en compte le temps d'exposition, le nombre de naevi, la pigmentation et le potentiel prolifératif des mélanocytes. Ainsi, deux groupes sont formés, le premier est constitué d'individus ayant une forte propension à générer des naevi, ces derniers nécessitent ou pas une faible exposition solaire pour initier un mélanome qui aura pour origine un grain de beauté préexistant pouvant émerger sur une zone non exposée. Le deuxième groupe est formé d'individus ayant une faible propension à générer des naevi et l'initiation d'un mélanome nécessitera une exposition au soleil chronique, le mélanome émergera de novo sur une zone exposée. Ces nouveaux critères ont permis de faire émerger une nouvelle classification plus hiérarchisée. Tout d'abord, les mélanomes se distinguent en deux catégories selon leur origine épithéliale ou non épithéliale, on prend donc en compte la notion de mélanocytes distincts en fonction de leur développement et zone anatomique. Ensuite, le critère distinctif est l'exposition au soleil, en effet les mélanomes apparaissant sur le visage ou le cou sont situés sur une zone plus exposée

que les mélanomes situés dans la muqueuse buccale par exemple. Enfin, on peut corrélérer ces données aux données génétiques et associer des mutations type BRAF ou GNAQ aux mélanomes correspondants.

Ainsi, les mélanomes émergeant d'un épithélium peuvent eux même être sous divisés en quatre catégories (Bastian, 2014; Whiteman et al., 2011) (Figure 18) :

- **Les mélanomes dépendants d'une exposition chronique aux UVs dit CSD** (Dommage dus à l'exposition au Soleil Chronique). Ces mélanomes apparaissent tard, après la cinquième décennie. Ils affectent les zones exposées au soleil comme la tête, le visage et le cou. Ils n'émergent pas d'un nævus ou d'une lésion préexistante mais de novo. On retrouve principalement les mutations KIT ou NRAS (toutes les mutations pour ce sous type n'ont pas encore été découvertes).

- **Les mélanomes indépendants de l'exposition au soleil (non-CSD)**, les plus communs en Europe, avec une incidence maximale autour de 50 ans. Ils se forment sur des zones modérément exposées comme le torse ou les extrémités sur des individus ayant un nombre élevé de nævus. Les lésions sont pigmentées, forment des nids et restent en surface au niveau de l'épiderme dans les premiers temps. Ils émergent à partir d'un nævus préexistant, formé au cours des premières décennies de l'individu. La mutation la plus retrouvée est BRAF (70%).

- **Les mélanomes de type acral**, se forment majoritairement sur la paume, la plante des pieds ou encore les ongles. Cette localisation anatomique suggère que les UVs ne sont pas en cause dans leur apparition. Principalement mutés pour KIT (20%), on ne retrouve que rarement la mutation BRAF (20%). Ils présentent une grande instabilité génétique, conséquence de multiples amplifications de gènes.

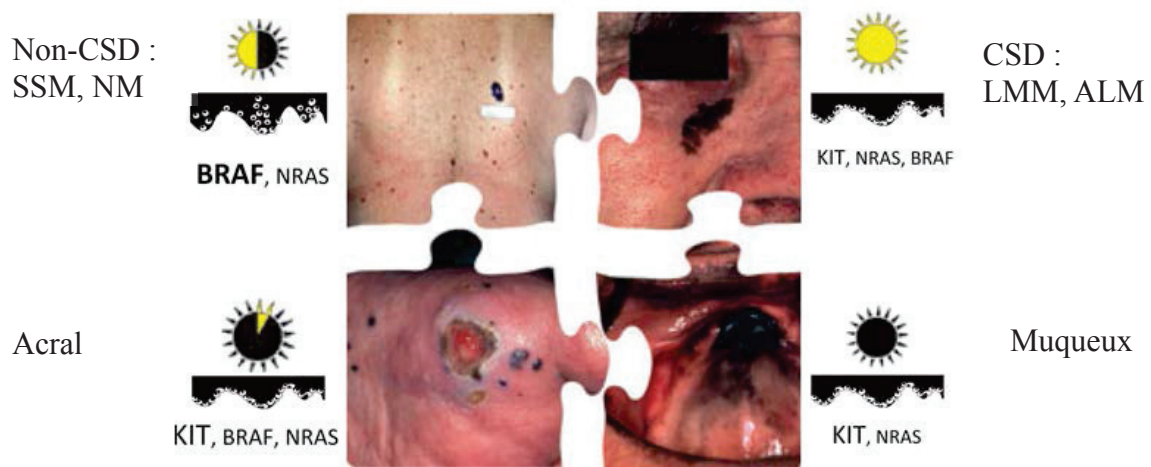


Figure 18 : Mélanomes issus de mélanocytes associés à un épithélium

Adapté de (Whiteman et al., 2011)

Ces mélanomes proviennent des mélanocytes cutanés situés dans l'épithélium. Leur développement est le résultat d'une exposition au soleil plus ou moins importante selon la propension de l'individu à former des nævi et de l'instabilité génétique. Le type de mélanome qui a fait l'objet de ma thèse, le mélanome superficiel extensif (SSM) correspond au type non-CSD (Dommages dus à l'exposition chronique au soleil). Le schéma présente les mutations les plus communes retrouvées dans chaque type de mélanomes. Ainsi, les types Non-CSD regroupent les mélanomes SSM et NM, les CSD regroupent principalement les LMM et le mélanome acral les ALM.

- **Les mélanomes muqueux**, ont pour origine un épithélium non stratifié comme le pharynx, les sinus ou la zone anogénitale. Ils présentent eux aussi une forte instabilité génétique.

Le groupe des mélanomes n'émergeant pas d'un épithélium, se caractérise par des mutations des protéines G telles que GNAQ ou GNA11. Ces mutations étant absentes des mélanomes issus d'un épithélium, cela suggère que les mélanocytes d'origine entre ces deux groupes puissent être différents. Ces mélanocytes se localisent plus dans le derme, ils sont plus dépendants de la voie WNT qui transmet son signal via les protéines G (Bastian, 2014; Whiteman et al., 2011). Dans cette catégorie on trouve donc (Figure 19) :

- **Les mélanomes de Ota**, localisés en périorbitaire, ils sont à la base des zones hyperpigmentées bénignes qui ne dérivent que rarement en mélanome.

- **Les mélanomes uvéaux** : ils ont pour origine un mélanocyte de la choroïde ou de l'iris. Ils sont très pigmentés et prédisposés à métastaser dans les ganglions lymphatiques puis le foie. Mutés pour GNAQ et GNA11, la transition vers un phénotype métastatique nécessite la mutation d'un gène suppresseur de tumeur comme BRCA1.

En conclusion, les mélanomes représentent un ensemble de maladies qui diffèrent en fonction de l'âge, de l'exposition au soleil, des prédispositions de l'individu et de la zone anatomique. Historiquement, ces pathologies ont été traitées comme si les mélanomes n'étaient qu'une seule et simple maladie, toutefois les différences notables entre ces différents sous types suggèrent qu'ils doivent être caractérisés et traités séparément. Les thérapies ciblées utilisées de nos jours s'appliquent donc à un sous-type particulier et ne seront pas pertinentes dans un autre sous-type.

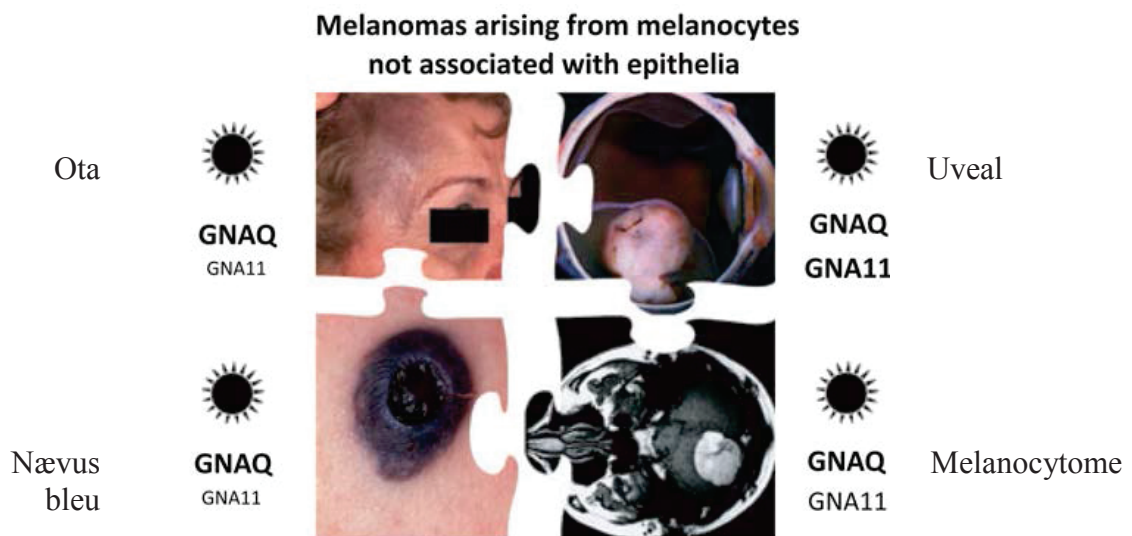


Figure 19 : Mélanomes issus de mélanocytes non-associés à un épithélium
 Adapté de (Whiteman et al., 2011)

Ces mélanomes proviennent des mélanocytes non cutanés comme les mélanocytes de la choroïde (mélanome uvéal) ou les mélanocytes qui ont migré dans le système nerveux central (mélanocytome). Ils proviennent aussi de mélanocytes localisés profondément dans le derme, c'est le cas des nævi bleu et des nævi de Ota. Tous ces mélanomes non cutanés portent des mutations de GNAQ (Guanine Nucleotide binding protein). Cette classification montre que différents mélanocytes donneront différentes pathologies.

Une fois le type de mélanome identifié, une autre unité de mesure permet de caractériser son avancée dans la tumorigénicité, c'est la classification TNM pour Tumeur, Nodule (ganglions lymphatiques), Métastase. Elle représente trois étapes cruciales de l'évolution tumorale selon leur invasion anatomique. La valeur T est suivie d'un nombre allant de 0 à 4 qui définit la taille de la tumeur et l'invasion des tissus adjacents. N est suivi d'un nombre entre 0 et 3 et indique le degré de propagation dans les ganglions lymphatiques. Enfin M est simplement suivi de 0 ou 1 indiquant la présence ou l'absence de métastases. Il existe une version de cette mesure spécifique au mélanome, c'est l'index micrométrique de Breslow. Cette échelle de mesure donne une valeur permettant de niveler le mélanome dans son évolution et ainsi d'évaluer le pronostic comme indice de survie à cinq ans. Il mesure l'épaisseur de la tumeur depuis la couche granuleuse jusqu'au point le plus enfoncé dans l'épiderme, le derme ou les tissus sous-cutanés. Cette mesure se fait sur une coupe histologique à l'aide d'un microscope. Ainsi la valeur est associée à un stade d'avancement de la maladie, plus ce stade est bas, plus le pronostic est bon et les chances de survie élevées (Tableau 3).

Stades	Critères histologiques
Stade 0	- Tumeur <i>in situ</i>
Stade IA	- Correspond au stade T1a - Tumeur inférieure ou égale à 1mm ² d'épaisseur, sans ulcération
Stade IB	- Correspond aux stades T1b/T2a - Tumeur inférieure ou égal à 1mm ² d'épaisseur, avec ulcérations - Tumeur supérieure à 1mm ² mais inférieure à 2mm ² d'épaisseur, sans ulcération
Stade IIA	- Correspond aux stades T2b/T3a - Tumeur supérieure à 1mm ² mais inférieure à 2mm ² d'épaisseur, avec ulcérations - Tumeur supérieure à 2mm ² mais inférieure à 4mm ² d'épaisseur, sans ulcération
Stade IIB	- Correspond aux stades T3b/T4a - Tumeur supérieure à 2mm ² mais inférieure à 4mm ² d'épaisseur, avec ulcérations - Tumeur supérieure à 4mm ² d'épaisseur, sans ulcération
Stade IIC	- Correspond aux stades T4b - Tumeur supérieure à 4mm ² d'épaisseur, avec ulcérations
Stade IIIA	- Correspond aux stades T1a-4a, N1a/2a - Tumeur sans ulcération et présence de métastases microscopiques dans les ganglions lymphatiques
Stade IIIB	- Correspond aux stades T1a-4a, N1b/2b - Tumeur sans ulcération et présence de métastases macroscopiques dans les ganglions lymphatiques - Tumeur avec ulcérations et présence de métastases microscopiques dans les ganglions lymphatiques
Stade IIIC	- Correspond au stade T1b-4b, N1b/2b/3b - Tumeur avec ulcération et métastases macroscopiques dans les ganglions lymphatiques régionaux - Tumeur avec ou sans ulcération et métastases généralisées dans les ganglions lymphatiques régionaux
Stade IV	- Correspond aux stades T + N + M1 - Métastases à distances

Tableau 3 : Classification selon l'indice de Breslow et correspondance avec les critères TNM

Adapté de (Balch et al., 2009; Trotter, Sroa, Winkelmann, Olencki, & Bechtel, 2013)

L'indice de Breslow permet de calculer la survie du patient à cinq ans. Il prend en compte l'épaisseur du mélanome et son invasion dans les couches internes de l'épithélium cutané. Les a et b permettent de distinguer des tumeurs du même stade mais se différenciant par leur taille (mm²) et leur agressivité (ulcération).

C. La mélanomagenèse

La mélanomagenèse est un processus long qui peut se segmenter en différentes étapes. Le modèle de progression est basé sur le mélanome de type SSM pour mélanome malin superficiel extensif. C'est le type de mélanome le plus commun et le plus étudié, c'est aussi sur ce type de mélanome que mes travaux de thèse ont été réalisés. Mon manuscrit se concentrera donc exclusivement sur ce sous type.

La première étape correspond à l'activation aberrante d'un oncogène dans un mélanocyte. Cette activation va entraîner l'hyperprolifération de la cellule qui déclenchera alors les systèmes de sauvegarde tels que la sénescence, formant ainsi une tumeur bénigne appelée nævus ou plus communément grain de beauté. Bien que cela soit toujours controversé, il est généralement admis que cette tumeur bénigne est sénescence.

Bien que la majorité des mélanomes se développent sur peau saine, dans le cas d'un développement sur nævus, le passage de la tumeur bénigne vers une tumeur maligne nécessite d'autres événements oncogéniques comme la perte d'un suppresseur de tumeur, permettant d'inhiber cette sénescence. La tumeur va entrer dans des nouvelles phases d'hyperprolifération. Les cellules tumorales finiront par traverser la membrane basale pour envahir le derme, elles auront adopté des capacités de motilité leur permettant de se propager dans l'organisme générant ainsi des métastases (Figure 20).

Ces différentes étapes et les aspects moléculaires qui leur sont associés vont être abordés en détails dans les points suivants (Clark et al., 1984; Miller & Mihm, 2006).

1. Les différentes étapes de la mélanomagenèse

a) L'activation oncogénique

BRAFV600E est la mutation la plus fréquente dans le mélanome, on la retrouve notamment dans 60% des SSM. En 2004, Richard Marais démontre *in vitro* que BRAF est un oncogène et que son expression permet la transformation des mélanocytes (Garnett & Marais, 2004; Wellbrock et al., 2004).

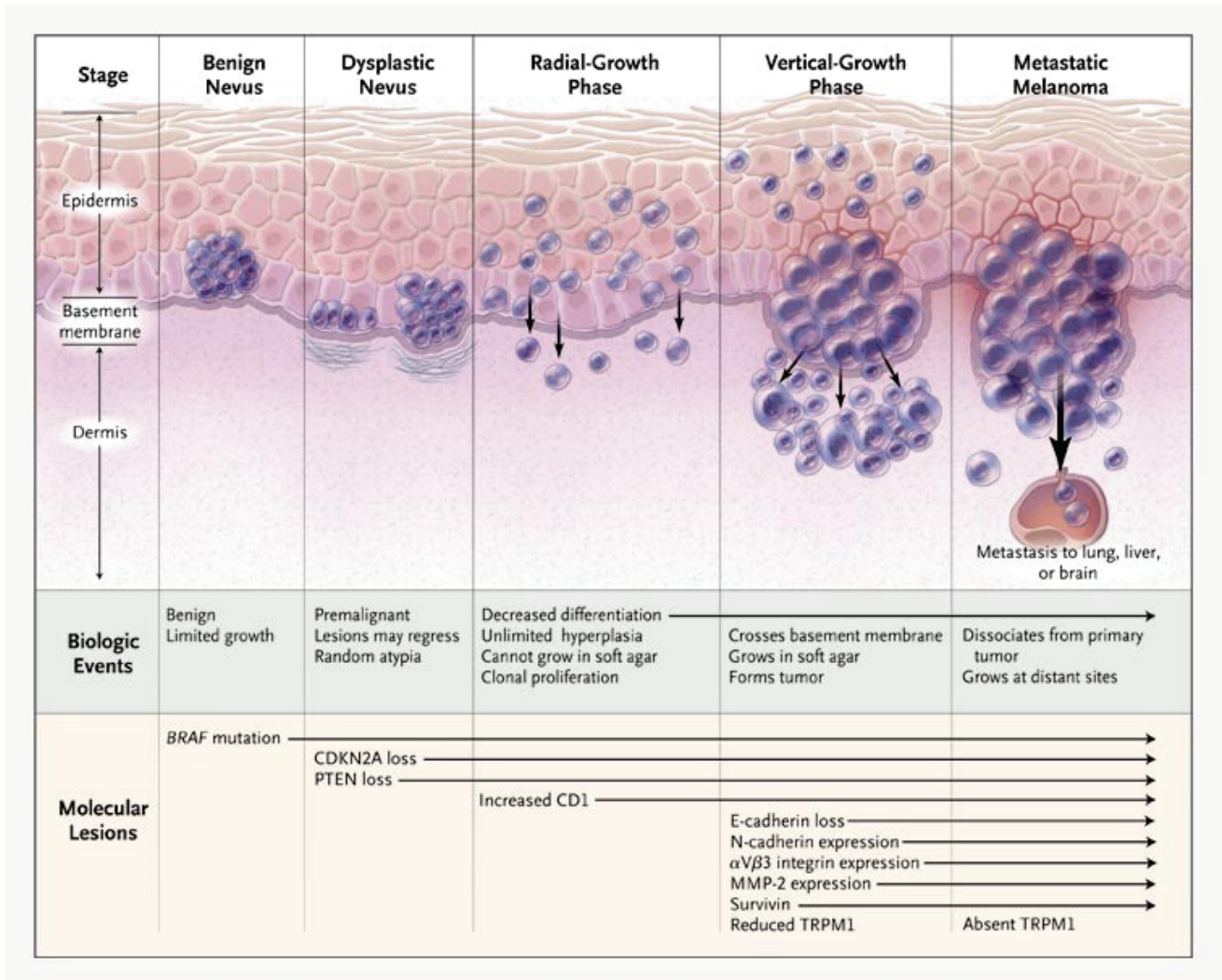


Figure 20 : La mélanomagenèse et les événements génétiques et moléculaires correspondant
D'après (Miller & Mihm, 2006)

Le premier événement est l'activation constitutive d'un oncogène majeur et en aval de la voie des MAPK. La conséquence est l'activation des programmes de sauvegarde cellulaire, générant une tumeur bénigne, le nævus. La perte de gènes suppresseurs de tumeur induit une nouvelle entrée en prolifération des cellules (phase de croissance radiale et verticale, respectivement RGP et VGP), c'est la transition vers la malignité. Les étapes finales (VGP et métastases) présentent d'importantes modifications, comme la perte d'adhésion, une dédifférenciation et l'expression de marqueurs mésenchymateux et invasifs, le mélanome est devenu invasif et métastatique.

La mutation V600E qui conduit à l'activation constitutive de BRAF va amplifier la voie de signalisation normalement induite par BRAF, une voie fréquemment mutée dans les cancers, la voie des MAPK. La voie RAS/RAF/MEK/ERK est mutée dans environ 30% de tous les cancers.

La voie des MAPK permet la transmission d'un signal depuis l'extérieur de la cellule, jusqu'au noyau (Figure 21). A l'extérieur de la cellule, des cytokines, des hormones ou encore des facteurs de croissance vont interagir avec leurs récepteurs respectifs pour transmettre des signaux. Ces signaux sont transmis en intracellulaire par le biais des protéines GTPases de la famille RAS. En fonction du stimulus qui est induit, la réponse biologique sera différente. En effet, le stimulus détermine les kinases qui seront activées par phosphorylation, ce qui permettra de différencier en aval la réponse mise en place. Par exemple, les cytokines émises en cas de stress réplicatif se lient à des protéines G couplées à des récepteurs particuliers et dans la voie des MAPK, ce sont spécifiquement les kinases MEK4/7 qui recruteront les facteurs de la famille des Jun kinase (JNK), des facteurs connus dans la régulation de l'apoptose. Les chocs osmotiques ou la chaleur vont eux activer les kinases de la famille p38 qui via les MAPK MEK3/6 mettent en place une réponse qui favorisera soit l'inflammation et la production de cytokines soit la prolifération des cellules touchées (Brown & Sacks, 2009). Enfin, les protéines RAS et RAF, vont activer par phosphorylation spécifiquement MEK1/2 puis ERK1/2 et ces derniers activeront dans le noyau des facteurs de transcription impliqués dans la survie, la prolifération et la différenciation cellulaire.

La mutation V600E mimant la phosphorylation de BRAF rend la kinase constitutivement active, ainsi BRAF et la voie des MAPK kinase seront constamment phosphorylées indépendamment des stimuli extracellulaires rendant alors la cellule autonome dans sa croissance et sa survie (Cantwell-Dorris, O'Leary, & Sheils, 2011; Smalley, 2010). BRAFV600E a été montré comme pouvant favoriser la survie en inhibant des gènes comme BAD et BIM, ou encore comme pouvant moduler la prolifération et la différenciation des mélanocytes en régulant indirectement l'expression de MITF (Cartlidge et al., 2008; Wellbrock et al., 2008).

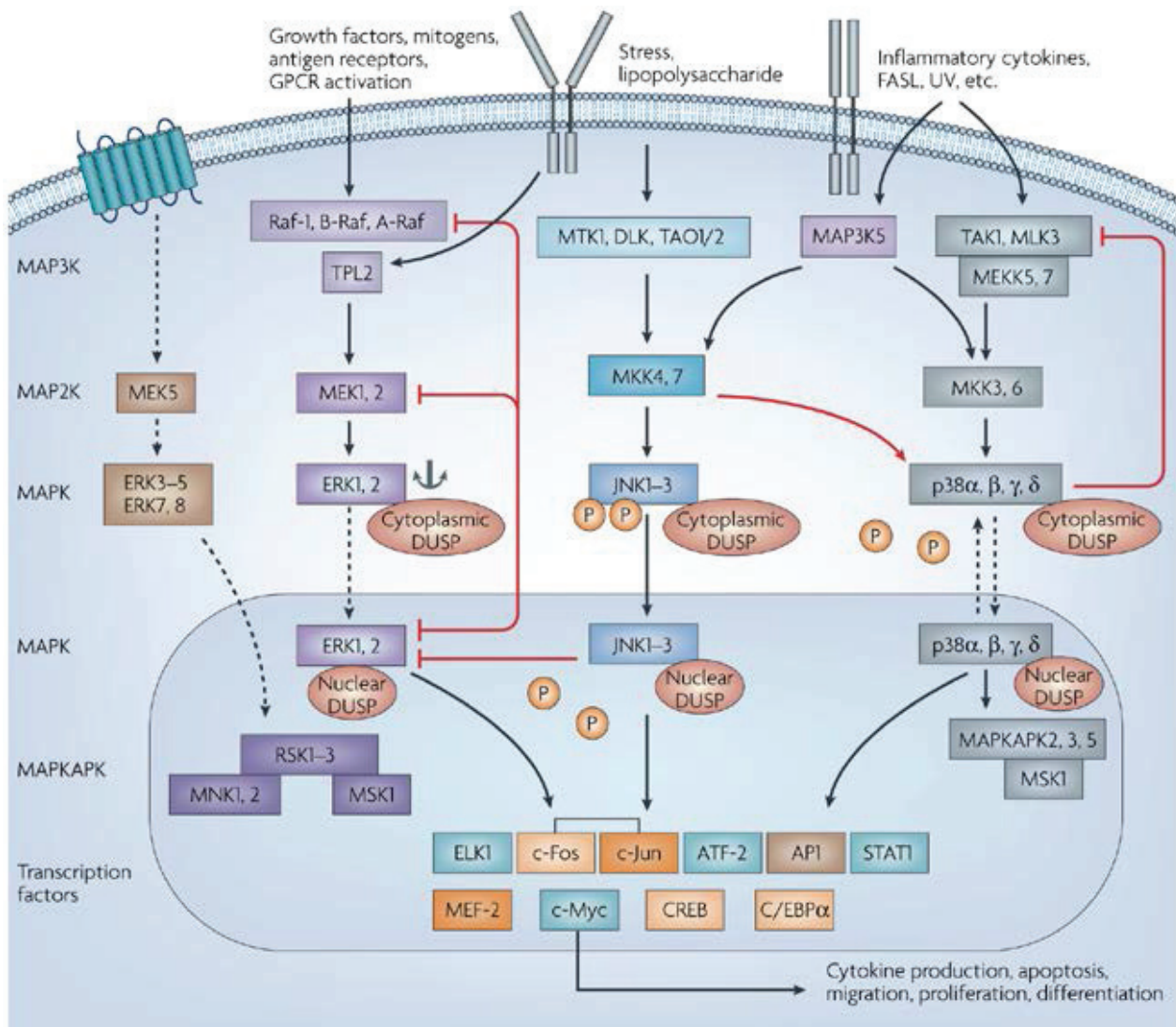


Figure 21 : La voie des MAPkinase

D'après (Jeffrey, Camps, Rommel, & Mackay, 2007)

Représentations des trois principales voies d'activation des MAPK. Chacune de ces voies activera des MAPK spécifiques, toutefois les signaux convergent tous vers des processus similaires comme la prolifération, ou la migration assurant ainsi à la fois une amplification et un contrôle fin des signaux.

b) Les systèmes de sauvegarde et leur inhibition : formation d'une tumeur maligne

Des études comparatives réalisées entre des mélanomes primaires et des tumeurs bénignes ont mis en évidence que BRAF était muté dans 80% des nævi (congénitaux ou de novo) et 60% des SSM (Poynter et al., 2006). Les auteurs de ces recherches suggèrent alors que BRAF est d'une part un évènement précoce de la mélanomagenèse et qu'il joue ainsi un rôle initiateur de tumeur. Ils concluent aussi que la cellule met en place des systèmes de sécurité dont la sénescence. BRAF peut donc initier la tumeur mais il est seul insuffisant pour la faire croître, il y a besoin d'évènements génétiques secondaires (Poynter et al., 2006). De manière intéressante, cette observation corrobore les analyses montrant que les nævi se caractérisent aussi par une forte expression de p16, un puissant inhibiteur du cycle cellulaire et une activité de la β -galactosidase, un marqueur de la sénescence. Ces nævi sont portés toute la vie par l'individu et éventuellement, seulement un faible taux d'entre eux dérivera en mélanome (Papp et al., 1999; Pollock et al., 2003). Cette observation est validée en 2005, où l'activation de la sénescence par un oncogène dans les mélanocytes humains est mise en évidence après l'expression de BRAFV600E *in vitro* et *in vivo*, cette sénescence est associée à une augmentation de p16 et l'activité de la β -galactosidase (Michaloglou et al., 2005). D'autres marqueurs tels que la méthylation de la lysine 9 sur l'histone 3 et l'expression de DEC1 ont par la suite confirmé le statut sénéscent des cellules (G. Zhang & Herlyn, 2012).

Dans la mélanomagenèse, la transition entre la lésion bénigne appelée nævus et la tumeur maligne, nécessite l'inhibition de la sénescence. Comme je l'ai décrit dans le paragraphe I.B.2 (p.27) sur l'échappement à la sénescence, les deux voies oncosuppressives majeures sont les voies impliquant p16/RB et p53. Elles sont altérées dans de nombreux cancers et des variations d'expressions ou des mutations de plusieurs de ces facteurs ont été retrouvées dans le mélanome.

- **La voie p16/RB** : L'expression du locus CDKN2A codant notamment pour la protéine p16 est fréquemment réprimée dans le mélanome. La répression peut être le résultat de mutations, de délétion ou de l'hyperméthylation du promoteur (Bennett, 2008; Dahl & Guldborg, 2007). Une étude a suggéré que la perte de p16 permettait l'échappement à la sénescence et l'immortalisation des cellules, assurant ainsi la progression du mélanome (Gray-Schopfer et al., 2006). Cependant p16 n'est pas toujours activé dans les nævus et la

sénescence peut se mettre en place en l'absence de p16. Bien que moins fréquentes, des mutations dans les codons 22 et 24 du gène *CDK4* ont été décrites. Ces mutations empêchent l'interaction entre CDK4 et p16, ainsi le complexe cyclin-CDK ne se forme pas, ne phosphoryle pas RB, libérant en conséquence E2F (Meyle & Guldberg, 2009).

- **La voie p53** : Seulement 5% des mélanomes présentent une mutation du gène p53, suggérant que son rôle dans ce modèle tumoral est minime. En revanche, les mutations du locus *CDKN2A* entraînent la perte d'expression de la protéine p14/ARF, qui ne peut plus lever la répression sur p53. La protéine p21 peut également être réprimée par les facteurs TBX2 et TBX3 fréquemment surexprimés dans les mélanomes (Lu, Li, Dong, Kung, & He, 2010).

Le rôle de ces deux voies oncosuppressives dans la mise en place de la sénescence en réponse à l'activation d'un oncogène fait toujours débat. Alors que certaines études semblent montrer que l'inhibition conjointe de p53 et de pRB est nécessaire au contournement de la sénescence dans les mélanomes mutés pour NRASQ61R, d'autres études menées dans des mélanocytes humains ont démontré que l'OIS induite par BRAFV600E ou NRASQ61R peut se mettre en place en absence de p14 et p16 (Bansal & Nikiforov, 2010; Haferkamp et al., 2009). Des études récentes mettent en avant de nouvelles voies comme la voie FBXO31 ou IGHBP7 dont l'activation serait importante dans la mise en place de l'OIS. Toutefois des études plus poussées sont nécessaires pour valider leur implication dans ce processus (Ross, Sanchez, & Grichnik, 2011).

Par ailleurs, un certain nombre d'études suggèrent l'implication de la voie PI3K/AKT dans le mélanome :

- **La voie PI3K-PTEN-AKT** : Suite à l'activation d'un récepteur tyrosine kinase, la phosphatidylinositol 3-kinase est recrutée pour phosphoryler le lipide PiP2 en PiP3. PiP3 recrute alors différents facteurs dont AKT et PDK1. Alors que AKT interagit avec PiP3 permettant un changement de conformation libérant des sites de phosphorylations sur AKT, la proximité de PDK1 qui possède une activité kinase constitutivement active va phosphoryler AKT sur la thréonine 308. Cette phosphorylation stabilise et active AKT, dont la fonction est de moduler la survie et la progression dans le cycle. AKT va inactiver par phosphorylation de nombreux facteurs pro-apoptotiques comme Bad, la procaspases-9..., activer CREB et IKK des régulateurs positifs de NF- κ B, un facteur activant un réseau de gènes anti-apoptotique. De

plus AKT a pour cible des régulateurs du cycle cellulaire, il peut par exemple inhiber GSK3 un inhibiteur de la cycline D1, cette dernière assure la phosphorylation de Rb, permettant la progression dans le cycle. AKT peut aussi phosphoryler le facteur MDM2, permettant à ce facteur de se localiser dans le noyau et d'ubiquitinyler p53, le conduisant à une dégradation par le protéasome (Fresno Vara et al., 2004; Hemmings & Restuccia, 2012).

L'activation aberrante de cette voie peut être due à deux mécanismes différents, soit l'altération de PTEN, ce qui l'empêche d'avoir son rôle de modulateur négatif sur la voie, soit l'activation aberrante de AKT.

Le gène *PTEN* peut en effet être hyperméthylé et donc réprimé, on retrouve aussi de nombreuses mutations de délétion conduisant à son inactivation dans 10 à 40% des mélanomes. On notera que seulement 10% des mélanomes primaires présentent une délétion de PTEN alors que ce chiffre monte jusqu'à 40% pour les métastases, suggérant un rôle tardif dans la progression du mélanome (Aguissa-Touré & Li, 2012; Conde-Perez & Larue, 2012). La famille AKT comprend trois isoformes, AKT1, AKT2 et AKT3. Il a été montré que leurs fonctions peuvent être redondantes ou pas en fonction du tissu. Toutefois, seule l'isoforme AKT3, la moins connue à ce jour, est retrouvée mutée dans 40 à 60% des mélanomes. Il s'agit d'une amplification du gène menant à une surexpression et donc une suractivation de la voie PI3K-AKT (Stahl et al., 2004).

En conclusion, on ne sait toujours pas aujourd'hui exactement quels facteurs sont importants pour l'OIS dans le mélanome ni le réseau mis en place pour maintenir cette sénescence. Il semblerait que les facteurs qui contrôlent cette OIS et dont l'inhibition dépend pour passer à une tumeur maligne varient en fonction du type de mélanome étudié.

c) Les phases de croissance de la tumeur maligne

Une fois le processus de sénescence inhibé, la tumeur est devenue maligne. Les cellules vont entrer dans une nouvelle phase de prolifération appelée la phase de croissance radiale. Pendant cette phase, l'évolution en terme de tumorigénicité est faible mais les cellules ne sont plus sous la dépendance des régulateurs du cycle cellulaire, elles prolifèrent donc énormément. Toutefois, cette croissance reste en surface, les cellules n'ont toujours pas acquis un potentiel d'invasion et elles ne peuvent donc pas traverser la membrane basale. Les cellules vont donc s'étendre dans la zone intra-épidermique sous la forme de petites vésicules

et de micro-invasions, la taille du mélanome augmente mais sans pénétrer en profondeur. Bien que définis comme malins, à ce stade ces mélanomes se traitent facilement par une simple exérèse chirurgicale (Crowson, Magro, & Mihm, 2006).

Le passage de la phase de croissance radiale vers la phase de croissance verticale est une étape majeure dans la progression du mélanome. En effet, la tumeur adopte des capacités d'invasion et de migration par le biais d'une transition épithélio-mésenchymateuse. Les mélanocytes n'étant pas des cellules épithéliales on parlera d'« EMT-like ». Toutefois, on retrouve un changement d'expression de marqueurs spécifiques de l'EMT. Les cellules qui sont en VGP perdent l'expression de la E-cadhérine, au profit de l'expression de la N-cadhérine et de certaines métalloprotéases, une marque de l'EMT. Les cellules mettent en place des programmes anti-apoptotiques et de motilité. En conséquence, elles ne prolifèrent que très peu et ne se différencient pas. Les cellules dégradent alors la membrane basale et envahissent le derme. Cette étape est associée à un mauvais pronostic pour le patient, la probabilité de survie diminue drastiquement. En effet, les cellules alors immortelles et motiles vont, en s'enfonçant dans le derme pouvoir envahir les vaisseaux sanguins et métastaser (Haqq et al., 2005; Mobley, Braeuer, Kamiya, Shoshan, & Bar-Eli, 2012; Scatolini et al., 2010).

d) La dissémination métastatique

L'étape finale de la mélanomagénèse est la génération de métastases. La tumeur primaire a envahi le derme, les cellules ayant subi une EMT quittent la tumeur et rejoignent les systèmes circulatoire lymphatique et sanguin. Les cellules métastasent dans l'organisme à différents niveaux. Les métastases dites locales de type satellite ou en transit restent proches de la tumeur primaire. Les métastases dite régionales, s'éloignent plus de la tumeur primaire et colonisent le ganglion lymphatique drainant. Enfin les métastases distantes, colonisent les différents organes (principalement le poumon et le cerveau). A ce moment plus aucune opération chirurgicale n'est envisageable, le pronostic est mauvais avec une probabilité de survie à cinq ans inférieure à 10%, quant aux traitements par chimiothérapies, encore aujourd'hui aucune drogue n'a montré à long terme une réelle efficacité.

Au niveau mécanistique, il a été observé que les cellules de mélanome produisaient une importante quantité de VEGF et de chimiokines connues pour être impliquées dans la

mobilité cellulaire (Braeuer, Zigler, Villares, Dobroff, & Bar-Eli, 2011; Leiter, Meier, Schitteck, & Garbe, 2004). Il a été montré que BRAF pouvait via la voie des MAPK induire une réorganisation du cytosquelette d'actine et ainsi participer à la motilité cellulaire. En effet des études ont mis en évidence que l'expression du facteur RND3 était corrélée à l'expression de BRAF et que l'inhibition de ce dernier conduisait à la diminution de l'expression de RND3 ce qui avait pour conséquence une augmentation des fibres d'actine sur les points d'adhésions focaux. De plus, BRAFV600E induit la diminution d'expression de la kinase PDE5A, dont un des rôles est de dégrader la cGMP, ainsi l'augmentation de ce nucléotide induit un relâchement de Ca^{+} dans le cytoplasme entraînant une contraction cellulaire favorisant l'invasion. Des expériences de sauvetage *in vivo* ont montré que la réexpression ectopique de PDE5A inhibait l'invasion cellulaire dans le modèle nude (Arozarena et al., 2011; Klein & Aplin, 2009).

2. MITF un agent double

Comme nous avons pu le voir le facteur MITF est impliqué dans la détermination des mélanocytes et il est au centre de voies régulant la survie, la prolifération et la détermination mélanocytaire. C. Goding a proposé un modèle de rhéostat où l'expression de MITF contrôle le phénotype des cellules de mélanome (Hoek & Goding, 2010) (Figure 22). Etant un gène nécessaire à la survie mélanocytaire, son expression, même faible doit être maintenue. Un faible taux de MITF induit de l'invasion et des caractéristiques souches. Un taux intermédiaire favorise la prolifération et enfin une forte expression de MITF induit de la différenciation. Ce modèle a été validé dans de nombreuses études dont une, sur des cultures *in vitro* de mélanome, a montré que MITF était retrouvé dans les mélanomes à fort potentiel prolifératif mais faiblement métastatique. A l'inverse, les mélanomes peu prolifératifs et fortement métastatiques présentaient une faible expression de MITF (Aladowicz et al., 2013; Fernández-Barral et al., 2014). Dans une autre étude des chercheurs ont montré que l'expression de MITF et par conséquent de ses gènes cibles peut inhiber la métastase et favoriser la prolifération (Carreira et al., 2006).

Dans 10 à 20% des mélanomes, on retrouve des amplifications de copies du gène MITF et ces amplifications sont corrélées à un mauvais pronostic de survie à 5 ans. Dans ce cas, MITF est considéré comme un oncogène qui favorise la transformation et la progression du mélanome (Levy, Khaled, & Fisher, 2006).

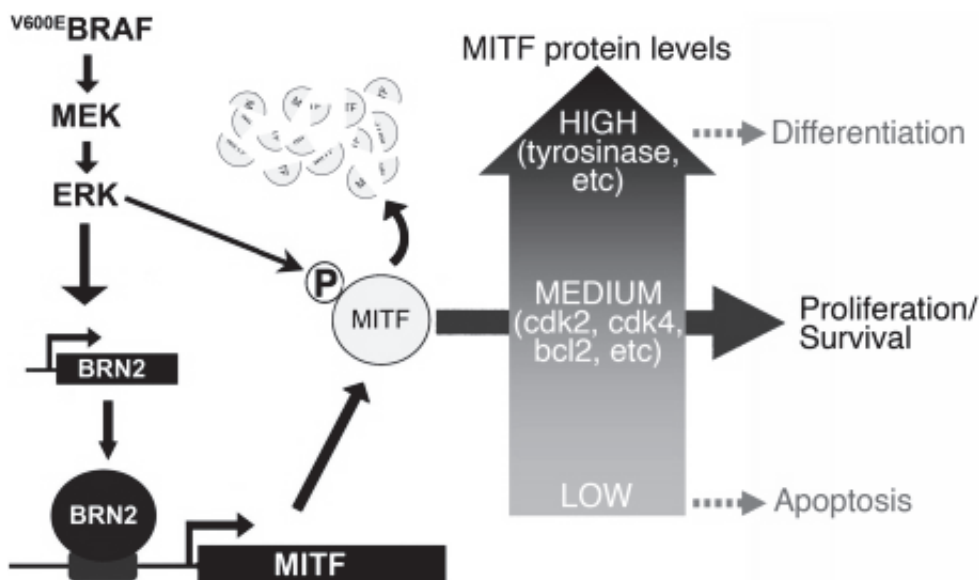
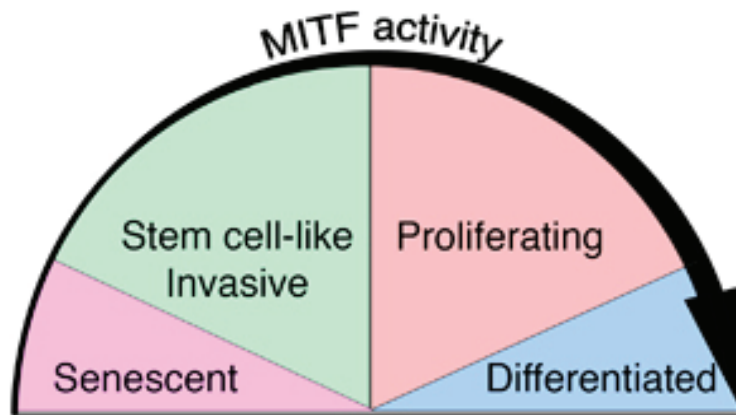


Figure 22 : MITF, le modèle de rhéostat
 D'après (Goding, 2011; Wellbrock et al., 2008)

Le modèle de Daniel Peepers décrit que le niveau d'expression de MITF dans les cellules de mélanomes va impacter sur leur devenir. Sachant que l'expression de MITF est nécessaire à la survie des mélanocytes, de sa plus faible à sa plus forte expression, MITF va induire de la senescence, un phénotype souche invasif, de la prolifération et de la différenciation. L'expression de BRAFV600E permet l'activation de MITF via la phosphorylation par ERK, cette activation conduit à sa dégradation. Afin de maintenir son expression un minimum, BRAF va stabiliser MITF via le facteur BRN2. MITF peut alors assurer la progression dans le cycle et la survie des cellules mélanocytaires.

Corine Bertolotto a d'ailleurs démontré que l'inhibition de MITF dans des lignées de mélanome pouvait ré-induire un programme de sénescence dépendant de la voie des dommages à l'ADN (Giuliano, Ohanna, Ballotti, & Bertolotto, 2011). MITF peut agir comme un oncogène en favorisant la progression dans le cycle cellulaire en induisant CDK2 et en favorisant la survie des mélanocytes via Bcl2 (Carreira et al., 2005; McGill et al., 2002; Wellbrock et al., 2008).

Pour autant, l'expression de MITF est fréquemment réprimée dans les mélanomes, suggérant que MITF ne se comporterait comme un oncogène que dans certains sous-types de mélanomes. R. Marais a ainsi montré que l'activation de BRAFV600 induit la dégradation de MITF et la ré-expression ectopique de ce dernier inhibe la prolifération de cellules de mélanome (Giuliano et al., 2010; Wellbrock & Marais, 2005; Wellbrock et al., 2008). Ainsi, la perte d'expression de MITF tout comme sa surexpression a un rôle délétère sur des cellules de mélanome. Ainsi il est nécessaire que la cellule maintienne un niveau de MITF suffisant pour la survie mais insuffisant pour favoriser la différenciation. Une régulation fine de l'expression de MITF doit donc être opérée aux différents stades de la mélanomagenèse, des changements réversibles de phénotype pouvant contribuer aux étapes d'invasion ou de prolifération (Y Cheli et al., 2011; McGill et al., 2002; Zhuang et al., 2007).

3. L'apport des modèles murins de mélanome dans la compréhension de la mélanomagenèse

Suite à l'identification des principales mutations oncogéniques dans le mélanome, la génération de modèles murins a permis d'étudier le rôle des oncogènes initiateurs du mélanome et de mieux appréhender les étapes et les acteurs clés de la mélanomagenèse. Ces modèles basés sur l'expression des mutations initiatrices observées chez l'homme, comme BRAFV600E, NRASQ61R, ont démontré la nécessité d'autres altérations génétiques pour la formation des mélanomes (Ackermann et al., 2005; Garnett & Marais, 2004; Pollock et al., 2003).

a) *Les principaux modèles*

(1) Modèle NRASQ61R

Le premier modèle de mélanome, le modèle NRAS muté, a été développé par le laboratoire de F. Beermann en 2005 (Ackermann et al., 2005). Le transgène Tyr : NRASQ61R permet l'expression de cet oncogène spécifiquement dans les mélanocytes grâce à l'utilisation du promoteur de la tyrosinase, une enzyme spécifique des mélanocytes. Ainsi l'expression de l'oncogène NRASQ61R dans les mélanocytes induit une hyperprolifération de ces derniers dès le développement embryonnaire (jour E10), il en résulte une hyperpigmentation des zones glabres de la peau, comme les oreilles, les pattes et la queue des souris dès la naissance. Cette prolifération anormale des mélanocytes entraîne le développement de lésions cutanées, ressemblant fortement aux nævi congénitaux chez l'Homme. Ces nævi pouvant constituer un facteur de risque dans la pathologie, les souris NRASQ61K sont alors potentiellement un modèle d'étude intéressant pour les mélanomes NRAS mutés se développant sur nævi congénitaux.

Toutefois ce phénotype n'évolue pas tant que les souris ne sont pas croisées sur un fond génétique déficient pour p16. En effet après les avoir croisées avec des souris déficientes pour le gène *INK4a* sur le locus CDKN2A, ces souris ont commencé à développer des mélanomes dans une latence de six mois. De plus, ces mélanomes ont la capacité de se disséminer dans un premier temps localement au niveau des ganglions lymphatiques puis ensuite dans les différents organes.

(2) Modèle BRAFV600E

Deux modèles de mélanome BRAF mutés ont été générés indépendamment par 2 équipes en 2009 (Dankort et al., 2009; Dhomen et al., 2009). Il s'agit cette fois d'un knock-in, l'expression de BRAFV600E étant sous la dépendance d'une séquence LoxP-stop-LoxP, qui doit être supprimée pour assurer l'expression de l'allèle BRAFV600E sous le contrôle de son propre promoteur, assurant un niveau d'expression physiologique. Afin de mimer l'apparition d'une mutation somatique dans un mélanocyte adulte, un modèle de souris Tyr: CreERT2 généré par Lionel Larue a été utilisé : celui-ci permet l'expression inductible de la cre-recombinase spécifiquement dans les mélanocytes, suite à l'induction au tamoxifène. Le modèle LSL-BRAFV600E ; Tyr: CreERT2 permet donc une expression de l'oncogène BRAFV600 dans les mélanocytes suite à l'application de tamoxifène. L'intérêt de ce modèle

est sa forte ressemblance avec la progression de la pathologie chez l'Homme puisque après une phase d'hyperprolifération, des nævi se forment en quelques mois. Ces structures sénescents restent stables jusqu'à ce qu'un nouvel événement oncogénique apparaisse. En 12 à 14 mois, environ 60% des souris développent un mélanome. Ce mélanome est unique, non pigmenté et non métastatique (Dhomen et al., 2009).

(3) Le modèle NRASQ61R inductible

Le modèle NRASQ61R constitutif ne permettant l'étude que d'un sous-type de mélanomes, la génération d'un modèle inductible pour NRASQ61R était nécessaire afin d'analyser le rôle de cette mutation après activation à l'âge adulte.

Comme pour le modèle BRAFV600E, un knock-in de NRASQ61R a donc été généré et croisé avec les souris TyrCreERT2 sur un fond génétique déficient pour p16 (Burd et al., 2013). Dans ces conditions et après activation de NRAS, les souris présentent rapidement une hyperpigmentation de la peau suivie d'une formation de nævi, indiquant par ailleurs que p16 n'est donc pas toujours nécessaire à la génération de ces derniers. Etant donnée la déficience pour p16, la formation de mélanomes est très rapide, en effet la médiane d'apparition des tumeurs est de 26 semaines avec un pénétrance de 70%. Ces modèles ne développent toutefois pas de métastase sans l'addition d'une autre mutation (Burd et al., 2014).

b) Démonstration du rôle de certains oncogènes et oncosuppresseurs

Les analyses effectuées chez l'Homme ayant permis de détecter des facteurs tels que p16 ou PTEN mis en place par l'organisme pour contrer la progression tumorale, des croisements entre les modèles murins de mélanome et des souris déficientes pour ces gènes ont été réalisés. Ces combinaisons de mutations ont permis de mieux comprendre les mécanismes nécessaires aux différentes étapes de la mélanomagenèse.

Comme je viens de le décrire, les modèles murins NRASQ61R nécessitent d'être croisés avec des souris déficientes pour p16 pour pouvoir générer un mélanome. C'est aussi le cas des animaux portant la mutation HRASG12V qui génèrent des nævi mais ne forment pas de mélanomes sans un deuxième événement oncogénique comme l'inhibition d'un

suppresseur de tumeur tel que p16 (Ackermann et al., 2005; Chin, 1999). Cependant, dans le modèle BRAFV600E décrit par Richard Marais, si le croisement avec des souris déficientes pour p16 permet de diminuer la latence de 5 mois, d'augmenter la pénétrance à un an de 60% à 80%, et de permettre le développement de plusieurs tumeurs sur ces animaux quand le modèle BRAFV600E seul ne générerait qu'un mélanome unique (Dhomen et al., 2009), les mélanomes ne sont toujours pas métastatiques. Ces travaux montrent donc que p16 n'est pas nécessaire à la sénescence induite par BRAFV600E et que la perte de p16 n'est pas nécessaire à la progression tumorale dans ce modèle.

Alors qu'on observe que rarement des mutations de p53 dans le mélanome chez l'Homme, il apparaît à l'inverse que dans les modèles murins, p53 soit un régulateur plus important. Il a d'une part été montré qu'il était impliqué dans la sénescence, de plus les souris portant la double déficience p53 et p19 (l'homologue murin de p14) présentent une pénétrance plus importante (Bardeesy et al., 2001; Bennett & Medrano, 2002; Ross et al., 2011; Terzian et al., 2010). Et une mutation de p53 accélère la tumorigenèse induite par BRAFV600E chez la souris en réponse aux dommages induits par les UV (Viros et al., 2014).

Par ailleurs Mdm4, un répresseur de p53 est surexprimé dans 65% des mélanomes humains. Les auteurs ont étudié le rôle de la sur-expression de Mdm4 dans un modèle Tyr :NRASQ61;Tyr :Cre; Trp53+/- . Alors que l'expression de NRAS seul permet la génération de mélanome après une latence importante et avec une pénétrance faible, les souris activées pour Mdm4 développent au minimum un mélanome avec une latence beaucoup plus courte. De plus, l'inhibition de l'interaction Mdm4-p53 est capable de restaurer l'action pro-apoptotique de ce dernier et sensibilise les cellules à la chimiothérapie et aux thérapies ciblées comme les inhibiteurs de BRAF. Il semblerait donc que dans le mélanome, cibler l'interaction Mdm4-p53 est un intérêt thérapeutique en combinaison avec des traitements déjà utilisés (Gembarska et al., 2012).

En 2012, l'équipe de Daniel Peeper montre *in vivo* que la délétion de PTEN corrélée à l'activation de la voie PI3K/AKT conduit à l'abrogation de la sénescence induite par BRAFV600E et permet ainsi la progression du mélanome (Vredeveld et al., 2012). Une autre étude montre que l'expression de BRAFV600E combinée avec l'inhibition de PTEN diminue la latence d'apparition des mélanomes et en augmente la pénétrance (Marsh Durban, Deuker, Bosenberg, Phillips, & McMahon, 2013). De manière intéressante, cette étude montre aussi que dans les mélanomes mutés pour BRAF, la perte de PTEN agit sur la voie PI3K

indépendamment d'AKT. Toutefois, AKT a été montré par une étude comme favorisant la transition radiale à verticale de la croissance mélanocytaire, or c'est pendant cette phase de prolifération que le mélanome adopte des capacités de motilité (Govindarajan et al., 2007). Il semblerait alors que son expression soit importante non pas pour l'inhibition de la sénescence mais pour une étape plus tardive de la progression tumorale. Enfin, dans le modèle BRAFV600E décrit par Dankort et al., les souris ne développent pas de mélanome par la seule expression de l'oncogène. Cependant, le croisement avec des souris déficientes pour PTEN permet la génération de mélanomes avec une forte pénétrance, une latence très courte, et de plus ces mélanomes sont métastatiques dans 100% des cas (Dankort et al., 2009), indiquant donc le rôle de la voie PI3K dans la métastase.

En conclusion, les modèles murins ont permis de mettre en évidence le rôle de certains facteurs dans la progression tumorale, de mimer le développement de la maladie observé chez l'Homme et enfin d'évaluer le potentiel de nouvelles drogues. Toutefois, si ces modèles murins reproduisent en grande partie la pathologie humaine, il est à noter certaines différences. Le modèle de mélanome BRAFV600E est en effet apigmenté et non métastatique. De plus, la différence majeure entre l'Homme et la souris est la localisation des mélanocytes. Alors que chez l'homme les mélanocytes se situent d'une part dans la couche basale de l'épiderme, distribué parmi les kératinocytes et d'autre part dans le follicule pileux, chez la souris, cette zone épidermique est dépourvue de mélanocytes dans les parties poilues de l'animal. Les mélanocytes se localisent plus profondément dans le derme, et dans les follicules pileux. En conséquence les mélanomes formés chez la souris sont localisés au niveau du derme et non pas de l'épiderme. Toutefois la génération de certains modèles a permis de palier à ce problème en forçant la relocalisation des mélanocytes dans l'épiderme, c'est le cas des souris portant des copies additionnelles des gènes des facteurs de croissance de l'hépatocyte (HGF). Localisés en surface, moins protégés, ces mélanocytes sont sensibles aux radiations UVs. Ainsi chez le nouveau-né, une dose UVB permet, avec beaucoup de pénétrance, la génération un an plus tard de mélanomes ressemblant fortement à ceux observé chez l'Homme (Wolnicka-Glubisz & Noonan, 2006; Wolnicka-Glubisz, Pecio, Podkowa, Plonka, & Grabacka, 2013). Enfin, certains essais cliniques ont montré des résultats très décevants en comparaison des effets massifs parfois observés chez les animaux. L'hétérogénéité du mélanome qui est responsable de cette complexité rend impératif le choix d'un modèle murin présentant de fortes similitudes avec le type de mélanome étudié.

Les tumeurs les plus rares devront faire l'objet de xénogreffes si aucun modèle assez relevant n'est disponible (Becker et al., 2010; Conde-Perez & Larue, 2014).

D. Traitements et émergences de cellules résistantes

Depuis les premières chimiothérapies approuvées par la FDA (BCNU ou dacarbazine) dans les années 70, le traitement du mélanome métastatique n'a que peu progressé pendant des décennies, avec des résultats peu satisfaisants. La dacarbazine par exemple n'a d'effet positif que sur 10 à 15% des sujets, le pourcentage de réponse complète est encore plus faible et la survie globale n'est que peu modifiée. Les essais cliniques avec l'interféron IFN α 2b et l'interleukine 2 ont montré une faible efficacité de ces immunothérapies. La FDA approuve alors l'utilisation de forte dose d'IL-2 en bolus. Depuis les années 2000 peu de nouveaux agents ont eu un réel effet sur les patients en comparaison aux traitements standards réalisés avec l'IL-2 ou la dacarbazine.

Le mélanome métastatique étant résistant aux chimiothérapies conventionnelles, le pronostic est donc longtemps resté très mauvais, jusqu'à l'essor il y a quelques années de nouveaux traitements qui ont révolutionné la prise en charge thérapeutique : les thérapies ciblées contre la voie MAPK et les immunothérapies. En effet, la mise en évidence des mutations de BRAF a permis l'élaboration de drogues ciblant spécifiquement les versions mutées de cette kinase, qui ont été mises sur le marché à partir de 2011. C'est donc la découverte des mutations initiatrices de mélanomes qui a permis le développement des thérapies ciblées permettant ainsi une meilleure prise en charge de chaque patient (Garbe, Eigentler, Keilholz, Hauschild, & Kirkwood, 2011; C. Lee, Collichio, Ollila, & Moschos, 2013).

1. Les inhibiteurs de BRAF

Des inhibiteurs spécifiques de la forme mutée BRAFV600 ont été acceptés par la FDA pour le traitement des mélanomes métastatiques en 2011 pour le vémurafenib (ou son analogue le PLX4032), puis en 2013 pour le Dabrafenib.

Le **vémurafenib** a été généré dans le but de se localiser de manière sélective sur le site de fixation de l'ATP de la protéine BRAF mutée et ainsi bloquer son activité. Les tests *in vitro* ont montré que l'IC₅₀ pour BRAFV600E (31nM) était trois fois plus faible que celui

trouvé pour BRAF non muté (100nM) (Poulikakos, Zhang, Bollag, Shokat, & Rosen, 2010). *In vivo*, dans des tumeurs de patients xenogreffées sur la souris immunodéficiente, l'inactivation de BRAFV600E conduit en aval à l'inhibition de la phosphorylation de ERK et au final à l'inhibition de la prolifération dans les cellules dépendantes de l'oncogène, la tumeur va alors régresser. Aucun de ces effets n'est observé dans du tissu sain ou dans des mélanomes ne présentant pas de mutation de BRAF. Des analyses conduites *in vitro* ont permis de mettre en évidence que le PLX4032 avait pour effet d'induire de la sénescence et de la mort dans les cellules cibles (Foletto & Haas, 2014; Haferkamp et al., 2013; Søndergaard et al., 2010).

Chez les patients, les premiers essais cliniques ont mis en évidence que la drogue devait être administrée plus fréquemment et à une dose plus forte que celle initialement prévue. Au départ de 200mg par mois, les patients de la phase I ont finalement reçu une dose de 160mg deux fois par jour (Bollag et al., 2012). Cette dose a été constamment augmentée jusqu'à ce que les effets secondaires ne soient plus acceptables ou que la tumeur progresse malgré le traitement. Les réponses complètes correspondent à une diminution de toutes les lésions BRAFV600E et une réponse partielle à une diminution d'au moins 30% du diamètre de ces lésions. Au final, l'étude clinique a montré que la posologie de la drogue devait être de deux prises quotidiennes de 960 mg par voie orale, avec un réajustement en fonction de la sévérité des effets secondaires. Les études chez les patients ont montré qu'une inhibition de 90% de la phosphorylation de ERK est nécessaire pour observer un bénéfice au niveau clinique (Bollag et al., 2010). De plus, ils ont mis en évidence que le taux de réponse chez les patients avoisinait 50% soit deux à trois fois plus que pour la dacarbazine (Flaherty et al., 2010). En utilisation seule, une augmentation de la survie sans tumeur de 7 mois a été observée et la survie globale atteignait environ 13.6 mois (Figure 23).

Malgré ces taux de réponses importants, il est à noter que l'utilisation du vémurafenib induit des effets secondaires non négligeables, comme le développement chez 25% des patients de carcinomes squameux cutanés autour de huit semaines, qui doivent être rapidement enlevés par chirurgie. De manière plus grave, il a été mis en évidence que l'utilisation du vémurafenib induisait un développement de mélanomes secondaires primitifs, à partir de cellules sauvages pour BRAF. Ces mélanomes représentent un véritable problème dans l'approche du traitement du patient (Dalle, Poulalhon, & Thomas, 2011; Zimmer et al., 2012).

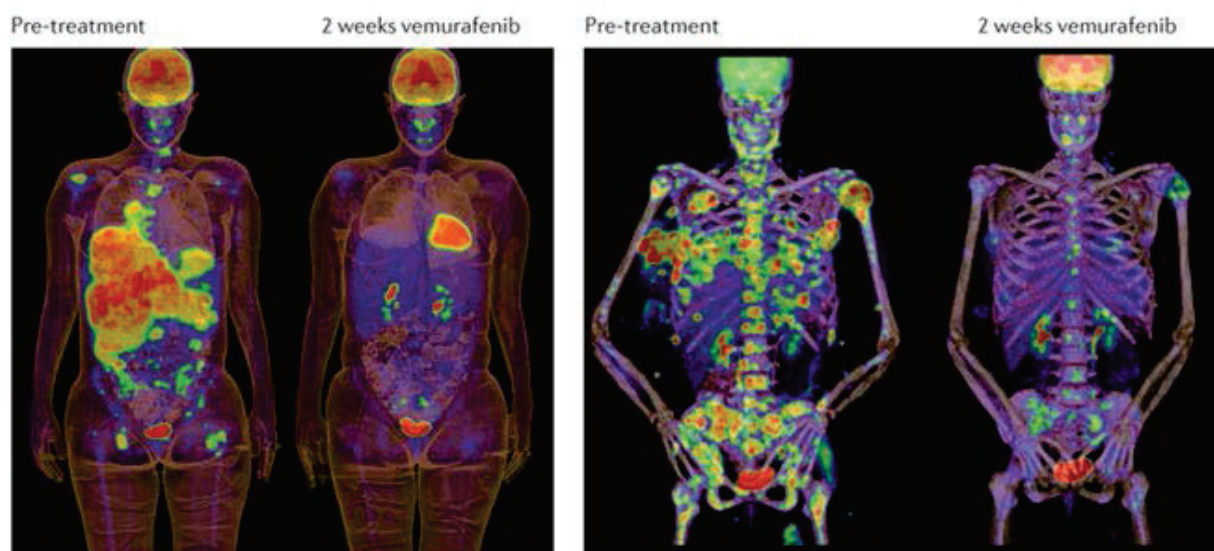


Figure 23 : PET scan de patients traités au vémurafenib montrant un effet anti-tumoral efficace
 D'après (Bollag et al., 2012)

Représentations de PETscan montrant la prise de glucose marquée chez 2 patients, avant puis après deux semaines de traitement au vemurafenib. On observe un remarquable blocage du métabolisme tumoral associé à une importante réduction des métastases.

Parmi les autres effets secondaires communs on note la survenue d'éruptions cutanées, des arthralgies, une fatigue prononcée et enfin une photosensibilité (Bollag et al., 2010; Chapman et al., 2011; Flaherty et al., 2010; McArthur et al., 2014).

Plus récemment, en 2013, le **dabrafenib**, un autre inhibiteur de BRAFV600E a été accepté par les autorités sanitaires comme traitement pour le mélanome métastatique. Comme le vémurafenib, c'est un compétiteur du site de fixation à l'ATP spécifique des versions mutées de BRAF. Son utilisation bloque la transmission du signal émis par BRAF, la voie des MAPK s'en retrouve alors inactivée. Environ 65% des patients répondent à cette drogue, une légère amélioration en comparaison au vemurafenib. La médiane de survie sans tumeur est de 6 mois et la survie globale avoisine les 13 mois, deux indices bien supérieurs à ceux obtenus avec la dacarbazine utilisée en comparaison dans ces essais cliniques. En monothérapie, le dabrafenib est administré à une dose de 150mg deux fois par jour, les effets secondaires sont similaires à ceux observés chez les patients utilisant le vémurafenib mais semblent moins prononcés. On notera cependant parmi ces effets secondaires, l'absence de mélanome secondaire primitif.

2. Mécanismes de résistance aux inhibiteurs de BRAF

Si les inhibiteurs de BRAF entraînent une régression de la tumeur mutée BRAFV600E seulement deux semaines après le début du traitement chez les patients répondeurs (environ 50%), cet effet n'est malheureusement que de courte durée, l'ensemble des patients rechutant dans les 6 mois (Fedorenko, Paraiso, & Smalley, 2011; Sullivan & Flaherty, 2013), avec l'apparition de récurrences reflétant l'acquisition d'une résistance. La résistance aux inhibiteurs de BRAF est de 2 types : la résistance intrinsèque, ou innée, c'est-à-dire que la tumeur est d'emblée résistante et n'y répondra jamais ; la résistance acquise se développe quant à elle en cours de traitement, la tumeur initialement sensible met en place des mécanismes pour échapper à la pression du traitement, et devient insensible à celui-ci.

La résistance intrinsèque pourrait être due à des mutations retrouvées sur les gènes *CDK2*, *CDK4*, *MITF* ou encore *AKT3*, qui pourraient permettre la progression dans le cycle malgré l'inhibition de l'oncogène BRAF. L'absence de régulation de la voie PI3K-AKT suite à la perte de PTEN a aussi été montrée comme conférant de la résistance aux cellules

BRAFV600E (Fedorenko et al., 2011; Paraiso et al., 2011). Enfin des mutations du gène *CCND1* entraînent une surexpression de la cycline D1 facilitant encore une fois l'entrée dans le cycle cellulaire. De manière intéressante il semblerait que certains des mécanismes de résistance innée aux inhibiteurs de BRAFV600E soient aussi mis en place dans la résistance acquise. Comme nous allons le voir la cellule peut mettre en place différents mécanismes que nous pouvons classer en deux groupes distincts, les mécanismes qui réactivent la voie des MAPK et ceux qui passent par d'autres voies (Lito, Rosen, & Solit, 2013) (Figure 24 A).

a) Mécanismes dépendants de la voie des MAPK

Dans la grande majorité des tumeurs résistantes (79%) on observe une réactivation de la voie des MAPK. Différentes études ont été menées sur des cohortes de patients portant la mutation BRAFV600, traités avec un inhibiteur de BRAF, et dont la tumeur après avoir répondu est devenue résistante et a progressé. Ces études ont permis de mettre en évidence différents mécanismes de résistance (Poulikakos et al., 2011; Shi et al., 2012; Van Allen et al., 2014).

Parmi ces mécanismes on trouve des variants d'épissage de BRAFV600E, dont le variant p61 qui génère une forme tronquée de BRAFV600E. La protéine p61 ne contient pas le domaine lui permettant d'interagir avec RAS normalement nécessaire à la dimérisation de BRAF pour la transduction du signal (dans un contexte physiologique). Dans le mélanome, le mutant BRAFV600 est actif en monomère et c'est dans cette configuration que le vémurafenib est efficace. Le mutant p61 va, indépendamment de l'interaction de RAS et de l'action du vémurafenib, former un homodimère qui réactivera la voie des MAPK (Lito et al., 2013; Rizos et al., 2014). Un autre mécanisme de résistance toujours BRAFV600E dépendant a été observé, c'est la surexpression de cet oncogène. En effet, des analyses génomiques sur des patients résistants ont mis en évidence un nombre de copies anormalement élevé du gène muté codant pour la protéine BRAFV600E réactivant en aval la voie des MAPK (Shi et al., 2012).

D'autres mécanismes assurent la réactivation de la voie MAPK, de manière indépendante de BRAFV600E, en agissant soit en son amont soit en son aval (Figure 24 B). Une équipe a d'ailleurs récemment réalisé un immense travail d'identification et de validation

des différentes mutations responsables de la résistance des mélanomes métastatiques mutés pour BRAFV600E. Ils ont séquencé et comparé l'exome de 45 patients portant cette mutation (14 d'entre eux ayant une résistance intrinsèque et 34 ayant acquis cette résistance), avant et après un traitement au vémurafenib ou au dabrafenib en monothérapie (Van Allen et al., 2014). La comparaison entre les deux exomes de chaque patient a permis d'identifier un certain nombre de mutations dans des gènes préalablement décrits comme pouvant conférer de la résistance. Ainsi on retrouve des mutations de NRAS notamment les mutations G13R ou Q61R. Ces mutations vont contourner BRAF et activer CRAF ou ARAF afin de transmettre leur signal (Nazarian et al., 2010). Des mutations sur les protéines MEK1 et MEK2 ont également pu être observées chez des patients devenus résistants aux traitements. Elles confèrent une activation constitutive de ERK et de la voie des MAPK en aval, indépendamment des signaux activateurs en amont, à savoir dans notre cas BRAF (Hodis et al., 2012; Nikolaev et al., 2012). Les cellules portant les mutations de MEK1 et MEK2 sont donc résistantes au vémurafenib, au dabrafenib et au tramétinib mais elles restent sensibles aux inhibiteurs de ERK (Van Allen et al., 2014).

Une analyse a mis en évidence une série de kinases pouvant être impliquées dans la résistance, parmi ces kinases se trouvait COT, une protéine agoniste aux MAPK pouvant activer ERK indépendamment de RAS et de RAF. Cette kinase est de grand intérêt, elle pourrait expliquer la résistance intrinsèque aux inhibiteurs de BRAF et de MEK observée chez certains patients (Johannessen et al., 2010).

Enfin, alors que le vémurafenib est censé être spécifique de la forme mutée BRAFV600E, des résultats ont mis en évidence que la drogue activait de manière paradoxale la voie MEK/ERK dans des cellules sauvages pour BRAF. Il s'avère que la drogue favorise l'activation par phosphorylation et la dimérisation de BRAF sauvage et ainsi la transmission d'un signal d'activation à la voie des MAPK. Ces cellules tumorales résistantes à la thérapie ciblée car non mutées vont alors proliférer, au détriment de la pression de sélection subie par les cellules BRAFV600E (Dalle et al., 2011; Poulidakos et al., 2010).

b) Mécanismes indépendants de la voie des MAPK

Des mécanismes de résistance indépendants à la fois de BRAF et de la voie de MAPK ont par ailleurs été décrits.

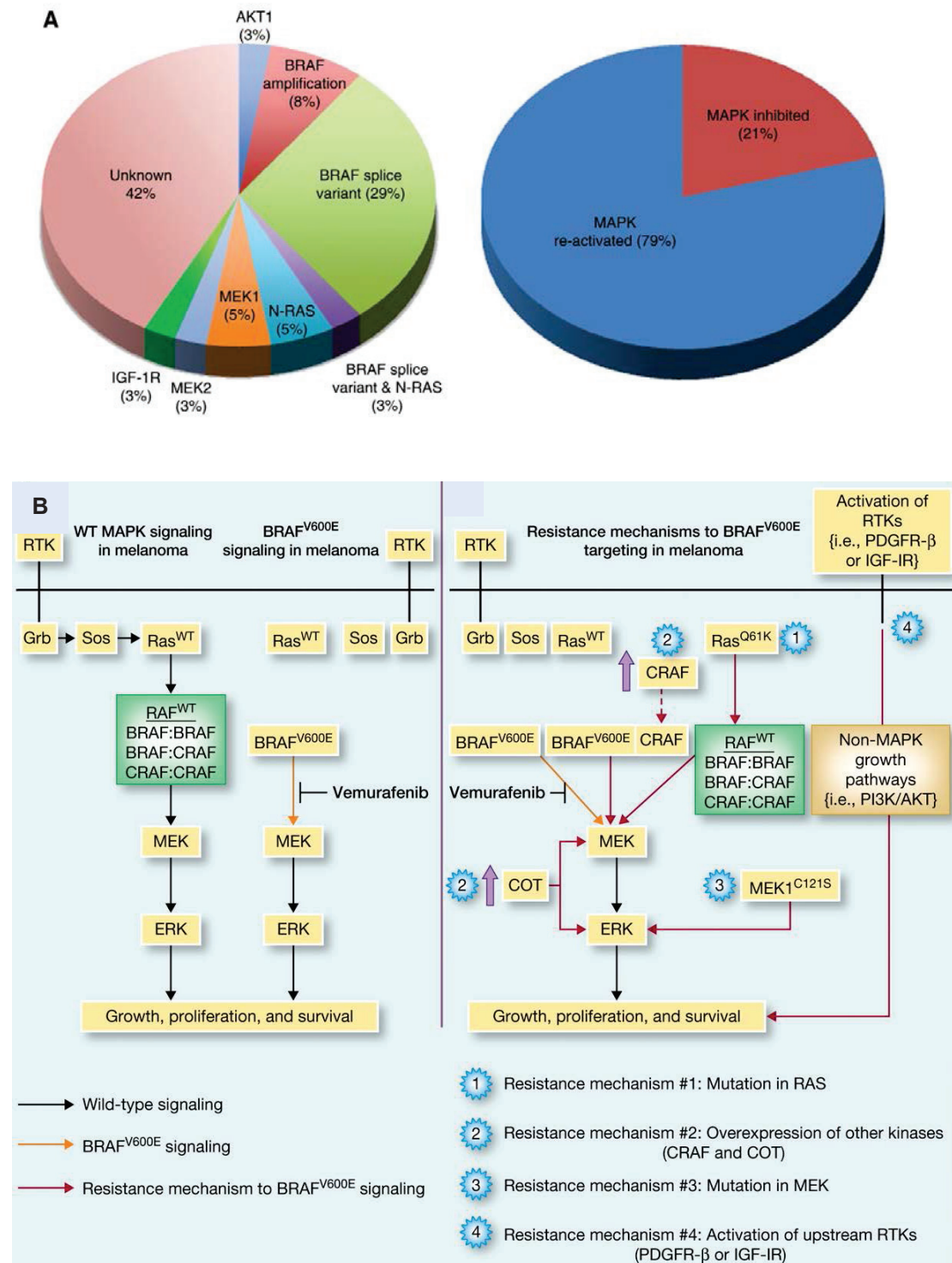


Figure 24 : Mécanismes de résistances aux inhibiteurs de BRAFV600E et conséquences sur la voie des MAPK

D'après (Luke & Hodi, 2012; Rizos et al., 2014)

Présentation des différents mécanismes mis en place par la tumeur pour répondre à l'inhibition de BRAFV600E. De manière intéressante on peut voir dans 80% des cas, ces mécanismes visent à rétablir l'activité de la voie des MAPK.

Représentation en A de la voie physiologique de transduction du signal impliquant NRAS, BRAF et la voie des MAPK favorisant la croissance, la survie et la prolifération. Dans le mélanome naïf, la mutation BRAFV600E rend le facteur constitutivement actif, il n'est plus tributaire de NRAS en amont. Le vemurafenib inhibe ce signal et induit de la mort cellulaire.

B représente dans les mélanomes différents mécanismes de résistance existants mis en place par la cellule pour réactiver la voie des MAPK. 1, une mutation activatrice sur NRAS. 2, surexpression d'autres kinases comme CRAF ou COT. 3, une activation en aval de BRAF directement au niveau de MEK. 4, une surexpression des récepteurs à activité tyrosine kinase.

Ces mécanismes utilisent donc une voie complètement différente mettant en jeu les récepteurs tyrosine kinase (RTK). Ainsi en 2010, deux études indépendantes ont montré qu'il existe une résistance aux inhibiteurs de BRAF sans activation de ERK (Nazarian et al., 2010; Villanueva et al., 2010). Ils ont mis en évidence la surexpression dans certains mélanomes des récepteurs à activité tyrosine kinase tels que IGFR ou PDGFR β . Ces récepteurs vont activer la voie alternative aux MAPK, la voie PI3K-AKT. Bien que complètement indépendante des MAPK, les cibles de ces deux voies se retrouvent communes puisque toutes deux vont favoriser la survie et la prolifération. Ces sur-expressions de RTKs sont les résultats de mutations activatrices ou d'amplifications de gènes. De manière intéressante leur implication a été montrée dans la résistance par l'utilisation d'inhibiteurs de ces récepteurs, qui permettent de restaurer la sensibilité au vémurafenib (Luke & Hodi, 2012; Sun et al., 2014; Villanueva et al., 2010) (Figure 24 B).

Au total, une grande diversité de mécanismes de résistance aux inhibiteurs de BRAF a été décrite et les approches de séquençage permettent d'en découvrir encore de nouveaux, une diversité qui complique encore davantage la prise en charge thérapeutique.

En effet, la stratégie de venir en 2^{ème} ligne cibler le mécanisme de résistance mis en place quand des inhibiteurs existent (comme ceux ciblant les RTK ou la voie PI3K-AKT) paraît difficile à réaliser, sachant que de nouveaux mécanismes de résistance peuvent à nouveau émerger, du fait de la grande plasticité du mélanome.

c) *Les combinaisons anti-BRAF et anti-MEK*

Le mécanisme de résistance aux inhibiteurs de BRAF le plus fréquemment observé (dans environ 80% des cas) passant par la réactivation de la voie MAPK, des inhibiteurs de MEK, comme le trametinib ou le selumetinib, ont été testés en combinaison, dans l'idée de bloquer la réactivation de la voie des MAPK en aval. De nombreux essais cliniques ont testé l'efficacité d'un traitement combinant directement deux drogues, le vémurafenib et une deuxième ciblant MEK. Cette combinaison a pour but de ralentir la latence d'émergence de la résistance, voir même d'empêcher totalement son apparition contrairement aux progressions observées chez les patients traités avec un anti BRAF seulement.

Les thérapies combinées touchent plus de patients, le vémurafenib ou le dabrafenib seuls ne touchent que 50% des patients, les combinaisons de drogues sont plus proches des 65%. Elles améliorent à la fois la survie sans tumeur et la survie globale des patients de 6 à 9 mois. De plus, la combinaison des deux drogues diminue les effets secondaires observés chez les patients (Flaherty et al., 2012; Johnson et al., 2014; Lito et al., 2013; Long et al., 2014) (Amaria & Kim, 2014; Marzuka, Huang, Theodosakis, & Bosenberg, 2015; Rutkowski & Blank, 2014). Cependant, des mécanismes de résistance se mettent également en place contre ces combinaisons, qui pourraient être en grande partie similaires à ceux décrits contre les inhibiteurs de BRAF seuls.

3. L'immunothérapie dans le mélanome

Bien que ce sujet ne soit pas abordé dans mes travaux de thèse, on ne peut pas ne pas mentionner les résultats impressionnants obtenus avec les immunothérapies.

Dès les années 1950, naît l'idée du rôle du système immunitaire dans le mélanome. Les patients présentant un mélanome métastatique ne sont pas tous immunocompétents, de plus des transfusions de sang à partir de patients présentant une régression spontanée ont eu un effet. L'utilisation d'immunostimulant comme le Bacillus Calmette-Guérin sur des patients montrant une immunocompétence, fut le premier succès du traitement du mélanome métastatique avec une immunothérapie.

Notre système immunitaire a la possibilité d'identifier et d'éliminer les cellules tumorales, toutefois les cellules cancéreuses ont développé la capacité d'échapper à la vigilance de ce système ou encore de limiter voire d'inhiber la réponse immune mise en place. En effet, les patients atteints de mélanome présentent une variété d'anomalies immunitaires comme des défauts dans la présentation des antigènes aux cellules de l'immunité ou bien encore des défauts dans la production de cytokines indispensables au développement et au recrutement de cellules immunitaires. Les mélanomes recrutent notamment des lymphocytes T régulateurs ayant des propriétés immunosuppressives.

Alors que les premières immunothérapies étaient peu efficaces et n'allongeaient pas la survie globale des patients (interleukine de type 2 ou interféron- α), un pas en avant a été effectué en 2011 avec l'utilisation d'un anticorps anti-CTLA-4, l'ipilimumab. La mise en place d'une réaction immunitaire se fait en différentes étapes appelées «checkpoints», ces

checkpoints assurent l'activation et la prolifération des lymphocytes T ayant rencontrés un antigène et devant mettre en place une réponse immune. C'est la cellule présentatrice d'antigène (ou cellule dendritique) qui permet de mettre en contact l'antigène issu de la cellule tumorale avec la cellule immunitaire. L'activation de la cellule T va dépendre des signaux issus de cette interaction, ainsi le lymphocyte exprime à sa surface deux ligands, CD28 et CTLA-4 qui sont en compétition pour le récepteur B7 situé sur la cellule dendritique, une interaction avec CD28 va activer le lymphocyte, alors que l'interaction avec CTLA-4 va inhiber l'activation et empêcher la prolifération de la cellule. L'utilisation d'anticorps anti-CTLA-4 va permettre de piéger ce ligand, favorisant alors l'interaction activatrice entre le récepteur B7 et CD28. Ceci conduira à l'activation du lymphocyte, sa prolifération et la reconnaissance des cellules tumorales comme corps étrangers à l'organisme.

L'action de l'ipilimumab consiste à lever l'inhibition du système immunitaire, et peut donc avoir des effets secondaires majeurs. L'ipilimumab n'est effectif que sur environ 20% des patients, toutefois sa réponse est durable, la survie globale est de 10 mois mais certains patients, ceux qui répondent le mieux, ont une survie globale de plusieurs années (Hodi et al., 2010; Jilaveanu, Aziz, & Kluger; Lebbé et al., 2014).

Plus récemment, le développement d'anticorps anti-PD1 comme le nivolumab ou le pembrolizumab, a montré un réel potentiel pour le traitement du mélanome. Quand il est activé un lymphocyte T va rentrer en contact avec la cellule tumorale, le lymphocyte exprime à sa surface le récepteur PD-1, si le ligand se lie à ce récepteur, il induit un signal de répression qui inhibe la cellule T. Or en réponse à l'inflammation, les cellules tumorales vont exprimer à leur surface le ligand PDL-1, permettant ainsi même après l'activation des lymphocytes T de réprimer la réponse immune. Le nivolumab va venir sur les récepteurs et sur les ligands, créant ainsi un piège qui empêche l'interaction entre PD-1 et PDL-1. Encore une fois ce traitement lève une inhibition imposée sur le système immunitaire.

Ce traitement est efficace pour 30 à 40% des patients atteints de mélanomes, mais comme cela est le cas pour l'ipilimumab, c'est dans sa durabilité et dans son indépendance vis à vis du type de mélanome que ce traitement est innovant. Les essais cliniques ont montré une importante augmentation des différents indices de survie, l'indice de survie globale (proche de un an) et progression sans tumeurs (5 mois contre seulement 2 avec le dacarbazine). On notera même que dans certaines cohortes, la survie globale des patients est de 41% à deux an. C'est une nouvelle opportunité pour le traitement des mélanomes ne présentant pas de mutation de BRAF et un traitement salvateur pour certain patient en impasse thérapeutique. Certains de ces résultats ont été obtenus sur des cohortes de patients atteints de mélanomes

métastatiques non muté pour BRAFV600E et donc non traité (Gunturi & McDermott, 2015; Hodi et al., 2010; Jilaveanu et al.; Robert et al., 2014).

Ces traitements ont reçu en juin 2015 l'AMM pour leur utilisation en monothérapie et en première ligne et font l'objet d'essais cliniques d'association avec les thérapeutiques ciblées ou dans le cadre de combinaisons. Ces immunothérapies présentent d'excellents résultats, augmentant significativement la durée de vie des patients sans pour autant induire des effets secondaires trop importants (Hu-Lieskovan, Robert, Homet Moreno, & Ribas, 2014; Postow et al., 2015; Ribas, Hodi, Callahan, Konto, & Wolchok, 2013).

Objectif général de la thèse

Les facteurs de transcription inducteurs d'EMT des familles SNAIL, ZEB et TWIST jouent un rôle oncogénique dans les carcinomes, où ils ont été impliqués à différents stades de la tumorigénèse. Aux étapes précoces, ils promeuvent l'initiation tumorale en favorisant la transformation néoplasique en inhibant les programmes de sauvegarde cellulaire, et induisent une reprogrammation génique favorisant la plasticité cellulaire et l'acquisition de propriétés souches. Aux étapes tardives, ces facteurs en induisant la transition épithélio-mésenchymateuse, assurent un gain de motilité aux cellules cancéreuses et permettent la génération de métastases.

Si le rôle oncogénique des EMT-TFs est bien décrit dans les carcinomes, tumeurs d'origine épithéliale, leur éventuelle implication dans le mélanome, une tumeur trouvant son origine au niveau de la crête neurale, était peu documentée. Certains de ces facteurs, comme SNAIL2 et ZEB2, étaient connus pour jouer un rôle dans la délamination de la crête neurale et la détermination mélanocytaire. Le mélanome étant un cancer fortement métastatique, une hypothèse était qu'une éventuelle réactivation de ce programme embryonnaire puisse jouer un rôle dans la formation de métastases. D'autre part, le concept de sénescence oncogénique comme barrière anti-tumorale a été mis évidence au niveau des tumeurs bénignes, les nevi. Les EMT-TFs sont capables d'inhiber la sénescence oncogénique dans des cellules épithéliales, et présentent une activité oncogénique intrinsèque, indépendante du programme de transdifférenciation cellulaire proprement dit et de tout changement morphologique. Il était donc intéressant d'étudier leur potentiel rôle oncogénique dans des cellules non-épithéliales. L'objectif général de mes travaux de thèse était donc d'étudier l'expression des EMT-TFs et de caractériser leur rôle éventuel dans la mélanomagénèse.

RESULTATS

III. Résultats

Article n°1: A switch in the expression of embryonic EMT-inducers drives the development of malignant melanoma

Caramel J, Papadogeorgakis E, Hill L, Browne GJ, **Richard G**, Wierinckx A, Saldanha G, Osborne J, Hutchinson P, Tse G, Lachuer J, Puisieux A, Pringle JH, Ansieau S, Tulchinsky E.

Publié en octobre 2013 dans le journal *Cancer Cell*

A. Introduction

L'expression et le rôle des EMT-TFs dans des cellules non épithéliales comme les mélanocytes étaient jusqu'alors peu étudié. Des études préliminaires effectuées au laboratoire avaient montré que les facteurs SNAIL2 et ZEB2 sont d'ores et déjà exprimés dans les mélanocytes normaux adultes. Une analyse par immunohistochimie de l'expression des différents inducteurs d'EMT réalisée en collaboration avec l'équipe d'Eugene Tulchinsky (Université de Leicester, UK) sur un large panel d'échantillons humains de naevi et de mélanomes primaires et métastatiques avait permis de mettre en évidence un changement du profil d'expression des EMT-TFs au cours de la progression maligne. Si les facteurs SNAIL2 et ZEB2 sont toujours exprimés dans les naevi, leur expression est progressivement perdue dans les mélanomes, tandis que l'on observe une réexpression aberrante des facteurs TWIST1 et ZEB1. De plus, ce nouveau profil d'expression des EMT-TFs est statistiquement associé à un mauvais pronostic pour les patients atteints de mélanome.

Nous avons tout d'abord pu reproduire ce changement d'expression des EMT-TFs *in vitro* dans des mélanocytes normaux humains ou murins : l'expression ectopique de l'oncogène BRAFV600E est capable d'induire une diminution de l'expression de ZEB2 et SNAIL2 et un gain de ZEB1 et TWIST1. De manière intéressante, cette reprogrammation est réversible, puisque l'inhibition de BRAF ou ERK à l'aide d'inhibiteurs spécifiques dans des lignées de mélanomes conduit à une redistribution inverse des inducteurs d'EMT (diminution de TWIST1 et ZEB1 et augmentation de SNAIL2 et ZEB2).

Nous avons tout d'abord cherché à déterminer si ce changement du profil d'expression des EMT-TFs était nécessaire à la transformation par BRAF. Pour cela j'ai utilisé une lignée de mélanocytes murins immortalisés (du fait de la perte du locus INK4a/ARF) mais non transformés, appelée melan-a, dans laquelle l'expression d'une version constitutivement

active de BRAF suffit à transformer les cellules : celles-ci deviennent alors capables de former des colonies en agar mou et acquièrent un pouvoir tumorigène une fois xéno greffées chez des souris immunodéprimées. Ces cellules melan-a exprimant une version activée de BRAF ont alors été modifiées pour soit maintenir de manière forcée l'expression de SNAIL2 ou ZEB2 (par expression ectopique), soit empêcher l'activation de TWIST1 ou ZEB1 en déplétant ces cellules à l'aide de shRNA spécifiques. J'ai ainsi pu mettre en évidence dans chacune de ces conditions une diminution très significative du potentiel transformant de la protéine BRAF activée.

Ces mêmes lignées melan-a ont ensuite été xéno greffées en sous-cutané chez des souris immunodéprimées de type Nude. Les souris xéno greffées avec les cellules exprimant la forme activée de BRAF uniquement ont développé comme attendu des tumeurs dans les temps les plus courts. A l'inverse la co-expression avec BRAF de SNAIL2, ZEB2 ou des shRNA dirigés contre TWIST1 ou ZEB1, a non seulement retardé la prise tumorale des cellules xéno greffées, mais aussi diminué le nombre de tumeurs formées. La sur-expression de ZEB2 et SNAIL2 dans des lignées de mélanome (A375 ou SKMEL5) inhibe également la croissance tumorale chez la souris nude. Ces résultats démontrent que SNAIL2 et ZEB2, à l'inverse de TWIST1 et ZEB1, se comportent comme des suppresseurs de tumeur dans le lignage mélanocytaire.

Afin de déterminer les mécanismes permettant d'expliquer ces rôles antagonistes, une étude de transcriptome a été réalisée. La transformation des melan-a par BRAF est normalement associée à une inhibition de l'expression du facteur de transcription clef du développement mélanocytaire MITF. Une analyse des profils d'expression géniques a permis de montrer que l'induction de SNAIL2 ou ZEB2 induisait dans les cellules BRAF activée la réexpression de MITF ainsi que de nombreux de ses gènes cibles impliqués dans la différenciation mélanocytaire (telle l'enzyme tyrosinase) alors que TWIST1 et ZEB1 coopèrent avec BRAF pour inhiber ces mêmes gènes et par ailleurs stimuler l'expression de gènes impliqués dans l'invasion cellulaire.

Article n°1: A switch in the expression of embryonic EMT-inducers drives the development of malignant melanoma

A Switch in the Expression of Embryonic EMT-Inducers Drives the Development of Malignant Melanoma

Julie Caramel,^{1,2,3,4,5,6,11} Eftychios Papadogeorgakis,^{7,11} Louise Hill,^{1,2,3,4,5,6,7,11} Gareth J. Browne,⁷ Geoffrey Richard,^{1,2,3,4,5,6} Anne Wierinckx,^{1,2,3,4,5,6,8} Gerald Saldanha,⁷ Joy Osborne,⁹ Peter Hutchinson,⁷ Gina Tse,⁷ Joël Lachuer,^{1,2,3,4,5,6,8} Alain Puisieux,^{1,2,3,4,5,6,10} J. Howard Pringle,⁷ Stéphane Ansieau,^{1,2,3,4,5,6,*} and Eugene Tulchinsky^{7,*}

¹Inserm UMR-S1052

²CNRS UMR5286

Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon, 69008 Lyon, France

³LabEX DEVweCAN, 69008 Lyon, France

⁴University Lyon I, 69008 Lyon, France

⁵Université de Lyon, 69000 Lyon, France

⁶Centre Léon Bérard, 69008 Lyon, France

⁷Department of Cancer Studies and Molecular Medicine, University of Leicester, Leicester LE1 5WW, UK

⁸ProfileXpert, 69500 Bron, France

⁹Department of Dermatology, University Hospitals of Leicester NHS Trust, Leicester LE1 5WW, UK

¹⁰Institut Universitaire de France, 75006 Paris, France

¹¹These authors contributed equally to this work

*Correspondence: stephane.ansieau@lyon.unicancer.fr (S.A.), et32@le.ac.uk (E.T.)

<http://dx.doi.org/10.1016/j.ccr.2013.08.018>

SUMMARY

Aberrant expression of embryonic epithelial-mesenchymal transition-inducing transcription factors (EMT-TFs) in epithelial cells triggers EMT, neoplastic transformation, stemness, and metastatic dissemination. We found that regulation and functions of EMT-TFs are different in malignant melanoma. SNAIL2 and ZEB2 transcription factors are expressed in normal melanocytes and behave as tumor-suppressor proteins by activating an MITF-dependent melanocyte differentiation program. In response to NRAS/BRAF activation, EMT-TF network undergoes a profound reorganization in favor of TWIST1 and ZEB1. This reversible switch cooperates with BRAF in promoting dedifferentiation and neoplastic transformation of melanocytes. We detected EMT-TF reprogramming in late-stage melanoma in association with enhanced phospho-ERK levels. This switch results in E-cadherin loss, enhanced invasion, and constitutes an independent factor of poor prognosis in melanoma patients.

INTRODUCTION

Epithelial-mesenchymal transition (EMT) is a reversible embryonic genetic program, which produces motile cells from polarized epithelia. EMT is driven by a network of embryonic

EMT-inducing transcription factors (EMT-TFs) represented by several protein families, such as SNAIL, TWIST, or ZEB. The aberrant expression of EMT-TFs is frequently observed in various cancer types, particularly in carcinomas, and is often associated with poor prognosis and high risk of metastasis

Significance

In epithelial cells, the aberrant reactivation of transcription factors inducing epithelial-mesenchymal transition (EMT-TFs) is known to facilitate both neoplastic transformation and tumor cell dissemination. We have now shown that during melanomagenesis SNAIL2 and ZEB2 transcription factors drive a melanocytic differentiation program and behave as oncosuppressive proteins, whereas ZEB1 and TWIST1 repress differentiation and possess oncogenic properties. The reversible switch from tumor-suppressive to oncogenic EMT-TF expression pattern is driven by mitogen-activated protein kinase (MAPK)-activating molecular pathways that are critical to melanoma initiation and progression. Our data demonstrate that regulation and function of embryonic EMT-TFs in malignant melanoma and epithelial tumors are dissimilar. Overall, these data provide insight into cooperation between classical oncogenes and embryonic genetic programs during tumor initiation and progression.

(Thiery et al., 2009; Peinado et al., 2007). Their oncogenic potential relies on their ability to promote escape from oncogene-induced fail-safe programs by interfering with critical tumor suppressor pathways including p53, RB, and PP2A (Maestro et al., 1999; Valsesia-Wittmann et al., 2004; Ansieau et al., 2008; Morel et al., 2012). At later stages of carcinoma development, the EMT-resembling processes initiated by EMT-TFs contribute to accelerated tumor progression and metastases (Peinado et al., 2007). Importantly, EMT results in the acquisition of stem cell-like properties including slow proliferation and self-renewal potential (Vega et al., 2004; Mejlvang et al., 2007; Mani et al., 2008; Morel et al., 2008). The flexible and transient nature of EMT pathways determines reversible switches between proliferative and invasive phenotypes and manifests plasticity of tumor cells in aggressive carcinomas (Tsai et al., 2012; Ocaña et al., 2012; Brabletz, 2012a, 2012b). Tumor cell plasticity depends on microenvironmental cues and is responsible for drug resistance and for driving epithelial tumorigenesis through balancing tumor growth and spread (Iliopoulos et al., 2011; Nieto and Cano, 2012).

A high degree of phenotypic plasticity is a hallmark of malignant melanoma (MM), a most aggressive skin cancer originating from neural crest-derived melanocytes. In MM, phenotypic plasticity is controlled by a master regulator of melanocyte development, the microphthalmia-associated transcription factor (MITF) (Cheli et al., 2010; Bell and Levy, 2011). In contrast to the majority of epithelial tissues, normal melanocytes express some EMT-TFs, and this was considered as an intrinsic factor predisposing MM to high metastatic propensity (Gupta et al., 2005). As melanocytes do not belong to epithelial lineage, the term “EMT” cannot be formally attributed to the progression of MM. However, differentiated melanocytes do express E-cadherin, which is required for their contacts with keratinocytes in the basal layer of the epidermis. These communications maintain differentiation state of melanocytes and suppress their proliferation. Loss of E-cadherin that represents a hallmark of EMT in epithelial tumors is also evident in late-stage MM, especially in nodal metastases (Miller and Mihm, 2006; Alexaki et al., 2010).

It is well established that MM is driven by the activation of MEK-ERK signaling, most frequently through the mutations in *BRAF* or *NRAS* oncogenes. However, a molecular link between this pathway, cell plasticity, and EMT-TF network in MM cells remains not studied. Here, we analyze regulation and function of EMT-TFs in MM with the aim to assess a role for EMT-resembling processes in melanomagenesis.

RESULTS

EMT-TF Switching in Human Melanoma Samples

Expression of some EMT-inducers in melanomas has been reported previously (Hoek et al., 2004; Ansieau et al., 2008; Shirley et al., 2012; Mikesh et al., 2010). However, no comprehensive study on the EMT-TF network in MM has yet been performed. We therefore analyzed the expression of SNAIL1, SNAIL2, TWIST1, ZEB1, and ZEB2 proteins in a series of human tissues representing melanoma progression, including normal epidermis, common acquired nevi, primary MM, and metastases. In addition, we evaluated the IHC staining of a selected cohort of primary MM to investigate the clinical significance of the EMT-TF network. In a recent report, SNAIL1 has been shown

to be absent in 96% of MM samples (Mikesh et al., 2010). In agreement with these data, 24 MM samples including 12 primary tumors and matched metastases were SNAIL1-negative; therefore we excluded SNAIL1 from further analyses.

Remarkably, ZEB2 and SNAIL2 showed strong nuclear expression in normal epidermal melanocytes, in which ZEB1 and TWIST1 were absent (Figure S1A available online). The analyses of the melanoma progression series showed two opposing trends within and between lesions. Within lesions, a distinct gradient was observed, where ZEB2 and SNAIL2 were strongly expressed in superficial sites with weaker or absent nuclear staining in the deep sites of nevi ($n = 26$) and primary MMs ($n = 151$) (Wilcoxon matched pairs test, $p < 0.0001$). ZEB1 and TWIST1 showed the opposite gradient with stronger focal staining at the deep sites of primary MMs compared to superficial sites in these lesions ($p < 0.0001$) (Figures 1A and S1). In cortical and medullar parts of metastases, we detected similar gradients of immunopositivity for EMT-TFs ($n = 51$, $p < 0.0001$) (Figures S1B and S1C).

Likewise, a reciprocal pattern of IHC staining was observed between lesions with melanoma progression. We observed a progressive loss of ZEB2 immunopositivity in superficial and deep sites of primary MM and medullar sites of independent metastases ($n = 101$, $p < 0.001$ and $n = 51$, $p < 0.001$ respectively, Jonckheere-Terpstra trend test; Figures 1A and S1B–S1D) and loss of ZEB2 and SNAIL2 staining in matched metastatic lesions ($n = 31$, $p < 0.01$ and $n = 28$, $p < 0.01$ respectively, Page’s L trend) (Figure S1E). ZEB1 showed increased immunopositivity with tumor progression. H-score values showed a significant increasing trend from primary MM to medullar sites of independent ($n = 101$, $p < 0.0001$ superficial, $n = 101$, $p < 0.0001$ deep Jonckheere-Terpstra trend test) or matched metastatic lesions ($n = 31$, $p < 0.01$, Page’s L trend) (Figures S1D and S1E; Table S1). For TWIST1, the superficial staining showed a significant increasing trend with progression ($n = 101$, $p < 0.014$, Jonckheere-Terpstra trend test) (Table S1).

Overall, we characterized a trend of transition from ZEB2^{high}/SNAIL2^{high}/ZEB1^{low}/TWIST1^{low} toward a ZEB2^{low}/SNAIL2^{low}/ZEB1^{high}/TWIST1^{high} expression pattern. This transition was evident at deeper sites of the lesions and correlated with the level of malignancy.

These findings prompted us to perform survival analyses for all primary melanomas with follow-up data (the Kaplan-Meier method; $n = 98$) for superficial and deep staining of ZEB1, ZEB2, and TWIST1. Significant shorter metastasis-free survival was observed for Breslow depth, high ZEB1, and low ZEB2 levels at deep sites and high TWIST1 at superficial sites (Figure 1B; Table S1). Two-step cluster analysis using IHC H-scores of these EMT-TFs identified three distinct natural groups of expression representing a switch in EMT-TFs from ZEB2/SNAIL2 to ZEB1/TWIST1 with significant differences in clinical outcome (Figure 1B; Table S1). In a multivariate analysis, both superficial and deep staining of ZEB1 and TWIST1 combined with Breslow thickness were all significant independent predictors of time to metastasis. Loss of deep ZEB2 staining showed decreased metastasis-free survival but not independent of tumor depth (Table S1). Together, these data demonstrate that a switch from ZEB2/SNAIL2 to ZEB1/TWIST1 expression constitutes a major risk factor for poor outcome in MM when controlling for other clinico-pathological variables.

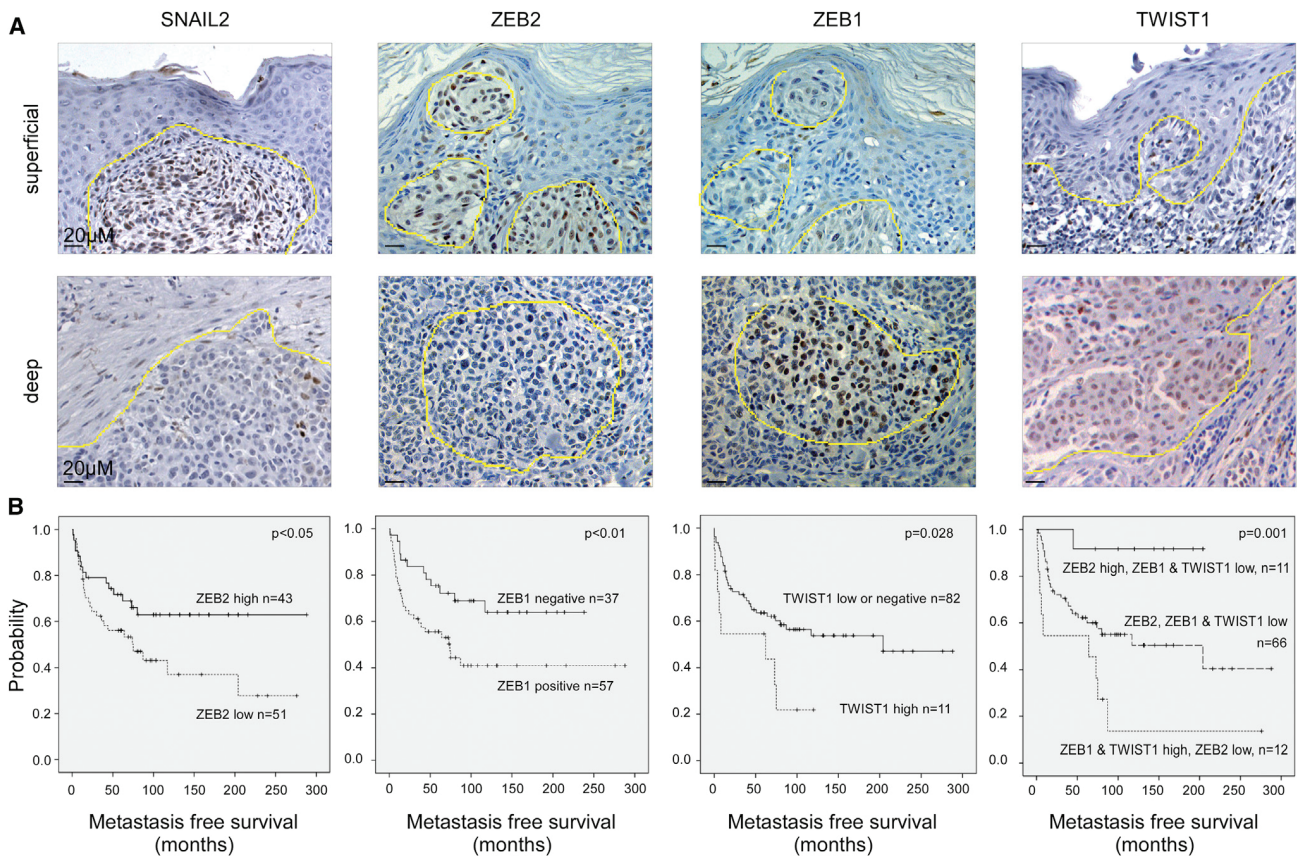


Figure 1. Oposing Trends of EMT-TF Expression in Melanocytic Lesions

(A) Examples of representative IHC analyses of EMT-TF expression at superficial and deep sites of primary melanoma samples. The images exemplify opposing gradients of ZEB2 and SNAIL2 versus ZEB1 and TWIST1 expression within the lesions. Tumor borders are indicated with dashed yellow lines.

(B) Metastasis-free survival of patients with MM according to EMT-TF expression. Note significantly shorter metastasis-free survival of patients with ZEB2-negative tumors expressing ZEB1 and TWIST1.

See also [Figure S1](#) and [Table S1](#).

Activation of the NRAS/BRAF Signaling Pathway Perturbs the Expression of EMT-TFs

Perturbed expression of EMT-TFs in MM samples prompted us to explore a potential interrelationship between this reprogramming and the NRAS or BRAF melanoma-driving pathways. To activate this pathway in melanocytes, we transduced immortalized, but nontransformed murine C57 BL/6J-derived melan-a cells with the tamoxifen-inducible version of a dominant-active truncated variant of BRAF (Δ BRAF-ER). In parallel, human primary melanocytes (NHEM) were infected with a vector expressing a constitutively active mutant BRAF^{V600E}. Consistent with the results of the IHC analyses of normal skin ([Figure S1A](#)), nontransformed melanocytes in culture were positive for SNAIL2 and ZEB2, but negative for ZEB1 and TWIST1 ([Figure 2A](#)). Activation of the BRAF pathway converted the expression of EMT-TFs to a ZEB2^{low}/SNAIL2^{low}/ZEB1^{high}/TWIST1^{high} pattern consistent with the EMT-TF reprogramming observed by the analyses of deeper lesions of more malignant melanoma samples ([Figure 2A](#)).

Next, we addressed whether the constitutive BRAF or NRAS signaling is required to maintain EMT-TF expression pattern in melanoma cell lines. In line with the data obtained in NHEM

and melan-a cells, MEK inhibition upregulated ZEB2 and SNAIL2 and downregulated ZEB1 and TWIST1 in melanoma cell lines with mutations in *BRAF* or *NRAS* ([Figure 2B](#)). The effect of a specific BRAF inhibitor was identical with that of MEK inhibitors in *BRAF* mutant cells, such as A375P, but not in an *NRAS* mutant IPC-298 cell line, likely due to the activation of the NRAS-CRAF pathway ([Heidorn et al., 2010](#)). Collectively, these data demonstrated that in both murine and human species, BRAF activation drives a rapid and reversible switch in EMT-TF expression, and the activity of this pathway is necessary and sufficient to maintain MM-specific pattern of EMT-TF expression.

Although the absolute majority of melanocytic lesions including nonmalignant nevi contain MAPK-activating mutations, the strength of the signaling is different and modulated by various negative feedback and bypass mechanisms ([Wajapeyee et al., 2008](#); [Nikolaev et al., 2012](#); [Li et al., 2012](#); [Martin et al., 2012](#)). Consequently, variable levels of phospho-ERK immunopositivity were reported in the lesions, with higher expression in late-stage melanoma and low or lack of expression in nevi ([Saldanha et al., 2004](#); [Uribe et al., 2006](#); [Venesio et al., 2008](#); [Yazdi et al., 2010](#)). To validate the results obtained in vitro, we analyzed phospho-ERK expression in a subset of

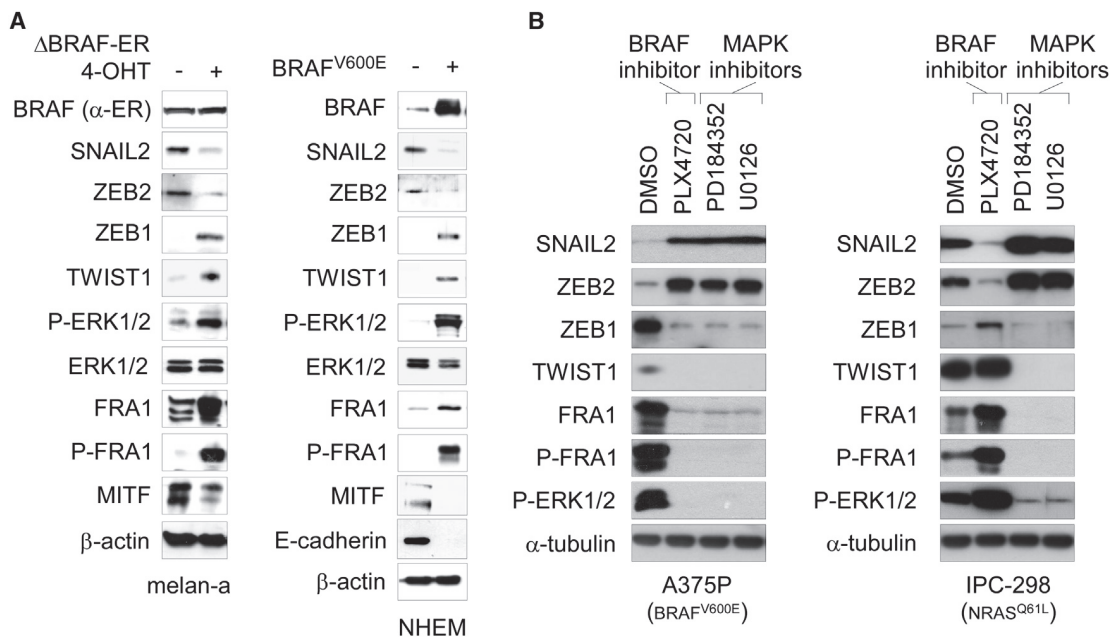


Figure 2. RAS-BRAF Pathway Induces a Reversible Switch in EMT-TF Expression

(A) Activation of BRAF pathway in nontransformed melanocytes upregulates ZEB1, TWIST1, and FRA1, but downregulates ZEB2 and SNAIL2. Expression of an activated form of BRAF in melan-a cells was induced by tamoxifen (4-OHT) treatment of melan-a/ΔBRAF-ER cells for 72 hr. NHEM cells were infected with a lentiviral vector harboring BRAF^{V600E} point mutation. Protein expression was analyzed by immunoblotting.

(B) Chemical inhibitors of BRAF and MEK downregulate ZEB1, TWIST1, and FRA1, but upregulate ZEB2 and SNAIL2. Parental A375 (A375P) and IPC-298 MM cells were treated with indicated inhibitors for 24 hr. Protein expression was analyzed by immunoblotting.

melanocytic lesions with previously characterized expression of EMT-TFs (n = 89). The results showed low phospho-ERK levels in nevi (Figure S2) and elevated expression in cancerous tissues, primary MM (Figure 3A) and metastases (Figures S2B and S2C). Importantly, phospho-ERK immunopositivity in MM samples significantly correlated with elevated ZEB1 and low ZEB2 (Figures 3A and 3B) and represented a prognostic factor for poor survival in MM patients (Figure 3C; Table S1). Therefore, IHC analyses supported the *in vitro* data and indicated that MEK-ERK pathway regulates EMT-TF reprogramming.

FRA1 Links BRAF Pathway with the Regulatory EMT-TF Network

Zeb2^{-/-} mouse embryos express considerably more ZEB1 in paraxial mesoderm and in neural folds than their wild-type counterparts suggesting that *Zeb1* is ZEB2-regulated (Miyoshi et al., 2006). Likewise, in carcinoma cells, hierarchical reciprocal regulation of EMT-TFs has been reported (Taube et al., 2010; Hugo et al., 2011). These data indicate that regulatory interplay between EMT-TFs may exist also in MM. To address this, we assessed the kinetics of EMT-TF expression in response to MEK inhibition in MM cells. Regulation of all four EMT-TFs was transcriptional, and, importantly, upregulation of *SNAIL2* and *ZEB2* was rapid and apparently preceded repression of *ZEB1* and *TWIST1* (Figure 4A). These data suggested a hierarchy between different EMT-TFs may exist. Indeed, we noted that in some backgrounds depletion of certain individual EMT-TFs affected the expression of the others; i.e., knock-down of *ZEB1* resulted in enhanced expression of *ZEB2* in RPMI-7951

cells (Figure 4B), and depletion of *SNAIL2* upregulated *ZEB1* in A375P and A375M cells (see Figure S6A). Knock-down of *ZEB2* activated *ZEB1* in several MM cell lines including WM-266-4, RPMI-7951, A375P, and A375M (Figures 4B, 4C, and S6A). Moreover, *ZEB2* depletion attenuated downregulation of *ZEB1* by U0126 (Figure 4C). Taken together with our observations that ZEB2 is replaced with ZEB1 in melanoma samples (Figures 1 and S1), these data suggest that ZEB2 acts upstream of ZEB1 in MEK-EMT-TF pathway.

We next aimed at identifying a molecular link between MEK pathway and EMT-TF network. A double-negative feedback loop involving miR-200 family members and ZEB transcription factors regulates carcinoma cell plasticity. Enhanced expression of the miR-200 family prevails in epithelial cells where it targets *ZEB1* and *ZEB2*, allowing expression of epithelial markers. In mesenchymal cells, an autocrine TGF-β signaling prevents expression of miR-200 and epithelial markers through upregulation of ZEB factors (Brabletz and Brabletz, 2010). Our data indicate that *ZEB1* and *ZEB2* genes are not coregulated in MM, suggesting that the involvement of miR-200 is unlikely. Indeed, miR-200 expression level in melanoma cells was much lower than that in epithelial carcinoma cell lines (Figure 5A). In line with these data, adjunction of miR-200-targeted 3'UTR sequences of *ZEB1* or *ZEB2* to a luciferase reporter impacted on its activity in epithelial, but not in mesenchymal carcinoma or MM cells (Figure S3A).

Given that EMT-TF regulation is transcriptional (Figure 4A), we next evaluated the putative role of FRA1, an AP-1 family member that was required for *ZEB1/2* induction in response

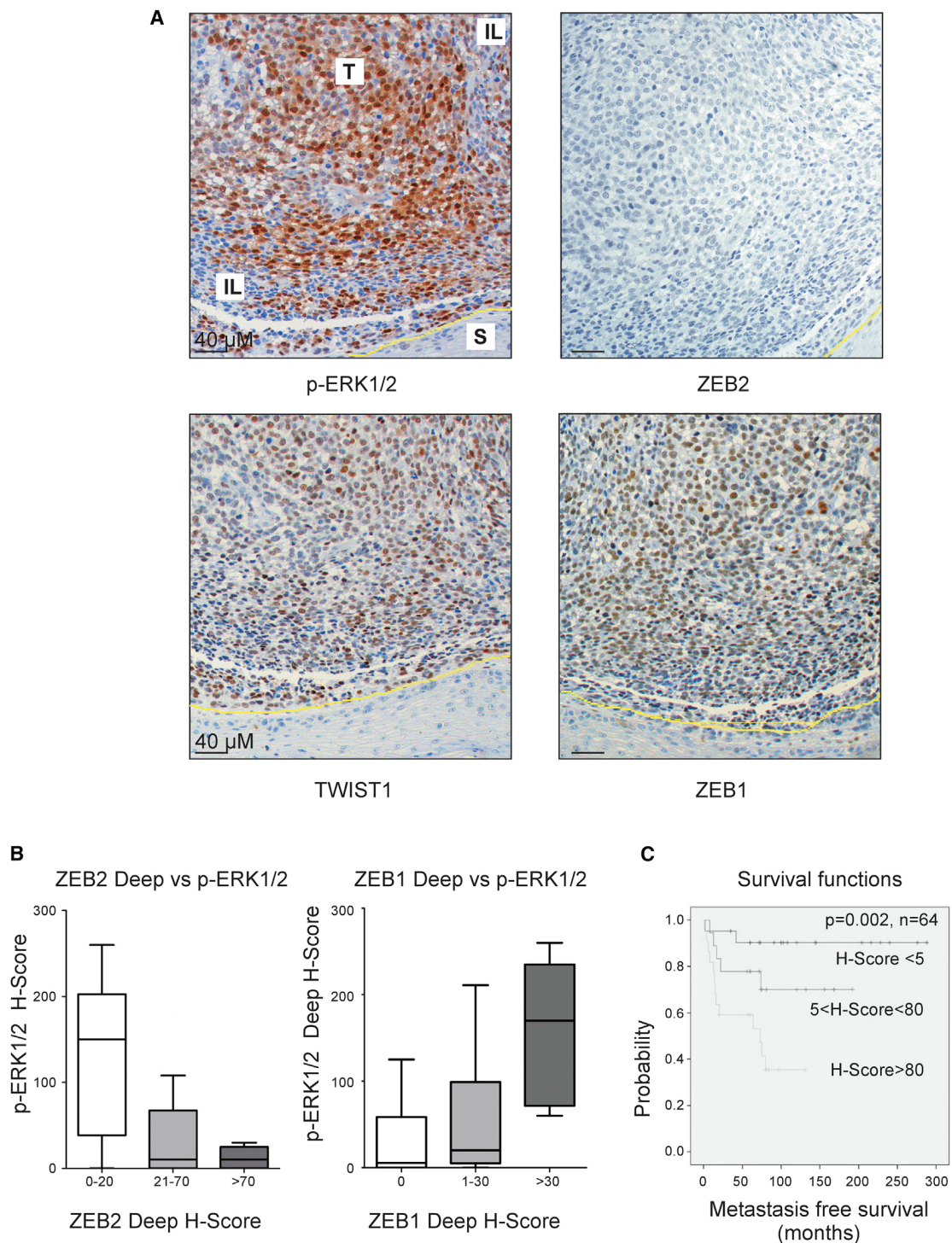


Figure 3. EMT-TF Reprogramming Correlates with ERK Activation

(A) An example illustrating coexpression of phospho-ERK (p-ERK1/2) with ZEB1 and TWIST1 in primary melanoma. T, tumor; IL, infiltrating lymphocytes; S, stroma.

(B) Expression of ZEB2 and ZEB1 correlates with phospho-ERK (p-ERK1/2) in malignant melanomas. Samples (n = 89) were separated in three groups according to the IHC staining for ZEB proteins (H-score) as indicated, and compared with the levels of phospho-ERK. Statistical significance of correlations was determined using Kruskal-Wallis test.

(C) Kaplan-Meier survival analysis of patients with malignant melanoma (n = 64) according to the presence of phospho-ERK in deep areas. Phospho-ERK expression is a highly significant prognostic factor for poor survival.

See also [Figure S2](#).

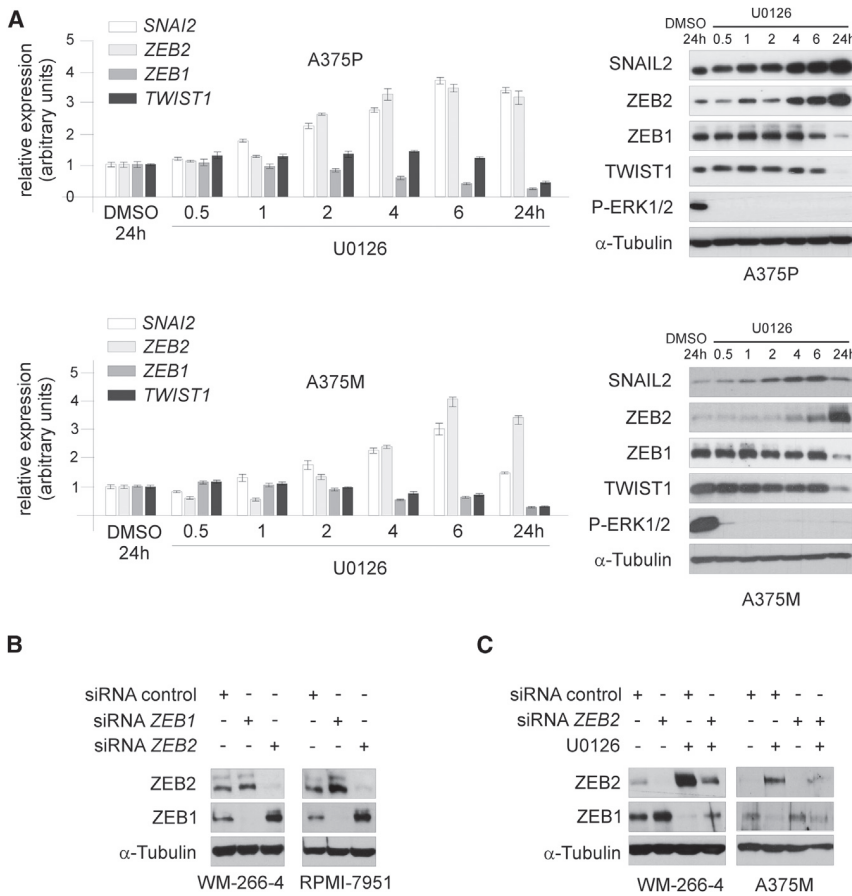


Figure 4. Hierarchical Regulation of EMT-TF Network: ZEB2 Represses ZEB1 in Melanoma Cell Lines

(A) Kinetics of EMT-TF expression was analyzed in A375P and A375M cells treated with 10 μ M U0126 and incubated for different time periods as indicated. EMT-TF expression was analyzed by quantitative PCR (qPCR) (left panels) or immunoblotting (right panels). The results of qPCR analyses are shown as mean \pm SD of triplicate experiments.

(B and C) Melanoma cells were treated with siRNA targeting ZEB1 or ZEB2, left untreated (B), or treated with 10 μ M U0126 or DMSO for 24 hr, as indicated (C) and analyzed by immunoblotting.

2011). Moreover, we characterize a pathway, which operates in melanoma cells and couples BRAF and NRAS mutations to the EMT-TF network. This pathway is independent of the members of miR-200 family and involves FRA1.

EMT-TF Switch Is a Determinant of BRAF-Induced Transformation

Activation of BRAF or NRAS pathway is a melanoma-initiating event. Therefore, after establishing a link between this pathway and EMT-TF expression, we focused on the role of EMT-TF reprogramming in BRAF-induced transformation. We uncoupled EMT-TF regulation from BRAF mutant in melan-a cells either

to RAS and ERK2 activation in epithelial cells (Shin et al., 2010). In melanocytes and MM cells, FRA1 expression is BRAF-inducible and MEK-dependent (Figure 2), as in other cell types (Casalino et al., 2003). We depleted FRA1 in BRAF-transformed melan-a and in A375P MM cells and found that in both cases FRA1 knockdown largely mimicked the effect of MEK inhibition in MM cell lines by upregulating SNAIL2/ZEB2, but downregulating TWIST1 and ZEB1 protein levels (Figure 5B). Next, we aimed to address whether FRA1 has a direct role in transcriptional regulation of EMT-TFs in A375P MM cells. As ZEB1 and ZEB2 genes produce several different transcript variants and utilize alternative promoters (Figure S3B), we employed 5'RACE to identify their transcriptional promoters that are active in MM cells (Figure S3C). Using chromatin immunoprecipitation assay, we detected FRA1 in association with DNA fragments containing a canonical AP-1 binding site localized to the middle part of the ZEB2 transcriptional silencer (Chng et al., 2010) (Figure S3D). Likewise, we identified in vivo FRA1 binding to AP-1 response elements located upstream of transcription start sites of ZEB1, SNAIL2, and TWIST1 genes (Figure S3D). This indicates that FRA1 can directly modulate transcription of EMT-TF-encoding genes downstream of MEK-ERK pathway.

Overall, these data demonstrate mutual regulation of EMT-TFs in MM cells, which resembles complex interactomes reported in EMT models in carcinoma cells (Taube et al., 2010; Hugo et al.,

by ectopic expression of each of four EMT-TFs, or by shRNA-mediated depletion of Zeb1 or Twist1 and examined the transforming activity of BRAF mutant in these conditions. All conditions impacted neither ERK activation nor cell proliferation (data not shown). However, ectopic expression of SNAIL2 or ZEB2, as well as depletion of ZEB1 or TWIST1 reproducibly reduced the oncogenic potential of BRAF as evidenced by the decreased number of colonies formed on soft agar (Figure 6A). In contrast, exogenous ZEB1 or TWIST1 facilitated BRAF-driven transformation of melan-a cells (Figure 6B). In line with these data, in vivo experiments demonstrated that uncoupling BRAF activation from EMT-TF reprogramming either inhibited or delayed tumor development when cells were xenografted in immunocompromised mice (Figure 6C). Data indicate that although SNAIL2 and ZEB2 display tumor suppressor properties, TWIST1 and ZEB1 cooperate with BRAF in melanocyte transformation.

Consistent with the role of FRA1 in orchestrating the EMT-TF switch, its depletion in melan-a/ Δ BRAF-ER cells reduced colony formation, an effect that could be partially rescued by ectopic expression of ZEB1 or TWIST1 (Figure 6D). To corroborate these results we assessed the effect of ZEB2 and SNAIL2 on tumorigenicity of established MM cell lines. In agreement with the data obtained in melan-a cells, simultaneous ectopic expression of ZEB2 and SNAIL2 reduced colony formation potential and in vivo tumorigenicity of both A375P and A375M cell lines (Figure S4).

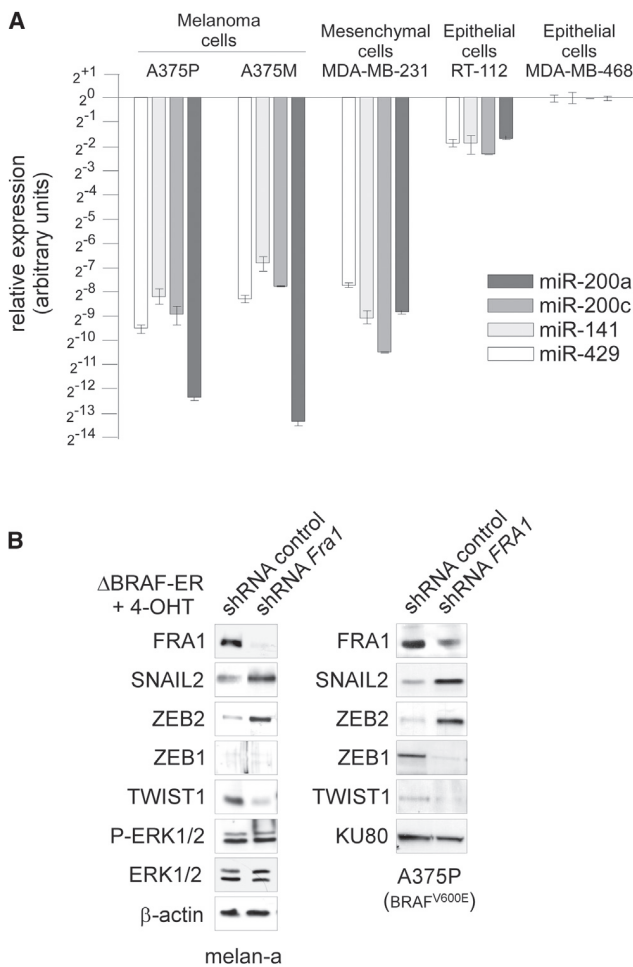


Figure 5. The Switch in EMT-TFs Is miR-200-Independent, but FRA1-Dependent in Melanoma Cells

(A) qPCR analyses of the expression of miR-200 family members in melanoma (A375P and A375M), mesenchymal carcinoma (MDA-MB-231) or epithelial carcinoma (RT112 and MDA-MB-468) cell lines. Data show mean ± SD of a triplicate experiment.

(B) EMT-TF reprogramming is FRA1-dependent in BRAF-transformed melanocytes and MM cell lines. Tamoxifen (4-OHT)-treated melan-a/ Δ BRAF-ER cells or A375P cells were either infected with a virus expressing shRNA targeting FRA1, or mock infected. Protein expression was analyzed by immunoblotting.

See also Figure S3.

Therefore, SNAIL2 and ZEB2 not only impair BRAF-induced melanocyte transformation, but also have a tumor-suppressive role in established melanoma cell lines.

EMT-TF Switch Affects Melanocyte Differentiation Program

To explore a mechanism by which EMT-TF reprogramming contributes to BRAF-induced transformation we performed gene expression profiling of melan-a-derived cell lines expressing active Δ BRAF-ER alone or in combination with ectopic SNAIL2, ZEB2, TWIST1, or ZEB1. Clustering of the individual EMT-TF gene expression profiles based on their similarity to each other has revealed that ZEB1/TWIST1 and ZEB2/SNAIL2 generated

two pairs of dissimilar gene expression signatures (Figure 7A). Melan-a transformation is associated with the downregulation of *Mitf* and the subsequent inhibition of its target genes, including tyrosinase, an enzyme-controlling melanin production (Wellbrock and Marais, 2005). Beyond its role in cell transformation, subtle regulation of MITF expression is believed to determine the differentiated/proliferative/invasive phenotypic switches occurring in melanomagenesis (Hoek and Goding, 2010). As expected, BRAF activation was associated with the downregulation of *Mitf* expression (Figure 2A) and the repression of genes regulating melanocyte differentiation downstream of MITF (e.g., *Tyr*, *Si*, *Mreg*, *Typr1*, *Trpm1*, *Slc45a2*, *Dct*, *Gpr143*). Enforced expression of SNAIL2 or ZEB2 restored *Mitf* and MITF-target gene expression supporting the assumption that these two EMT-TFs play a role in MITF-driven melanocyte differentiation program. Conversely, ZEB1 and TWIST1 cooperated with the BRAF oncoprotein in downregulating *Mitf* and other differentiation markers (Figures 7A, S5A, and S5B). Consistent with these data, rare soft agar colonies and xenografted tumors generated from melan-a/ Δ BRAF-ER cells ectopically expressing SNAIL2/ZEB2 or depleted of *Zeb1*/*Twist1* were more pigmented than those obtained with the parental cell line (see Figures 6A and 6C). In agreement with the data generated in melan-a cells, siRNA-mediated knockdown of *SNAI2* or *ZEB2* reduced MITF protein levels in A375 and WM-266-4 melanoma cell lines (Figure 7B). Furthermore, ectopic expression of ZEB1 in ZEB1-negative melanoma cells (SK-MEL-5 and UACC-257) produced a similar effect (Figure 7B). Thus, the repertoire of EMT-TFs in melanoma cells regulates the level of MITF, and EMT-TF reprogramming couples the activation of BRAF-FRA1 and NRAS-FRA1 oncogenic pathways to dedifferentiation and malignant transformation.

The Switch in EMT-TFs Is Associated with the Gain in Invasive Properties and Loss of E-Cadherin

Gene expression analysis of melan-a-derived cells additionally demonstrated that TGF- β -regulated genes (*Bgn*, *Col5A1*, *Fbn1*, *IL6*, *Lox*, *Tagln*, *Thbs1*) (Hoek et al., 2006) and invasion-associated genes (*Mmp1a*, *Mmp3*, *Mmp13*, *Sparc*) were repressed in ZEB2/SNAIL2 group, but activated by TWIST1 and ZEB1 in combination with the BRAF mutant (Figures 7A, S5C, and S5D). Consistent with these data, ectopic expression of TWIST1 or ZEB1 activated, whereas ZEB2 or SNAIL2 repressed, matrigel invasion of melan-a/ Δ BRAF-ER (Figure 8A). Furthermore, although combined knockdown of ZEB1 and TWIST1 in A375P and A375M MM cells decreased their invasiveness, depletion of *SNAI2* and *ZEB2* had no effect (Figure 8B). Overall, these data point to a role of EMT-TF reprogramming in control of MM cell invasion.

E-cadherin, a prototypical target of SNAIL, TWIST, and ZEB family members, is often downregulated at the invasive front in carcinomas as a result of EMT (Thiery et al., 2009; Brabletz and Brabletz, 2010). Loss of membranous E-cadherin has been documented also in vertical growth-phase melanomas at deep sites in the dermis and in metastatic nodules predominantly in medullar parts (Sanders et al., 1999; Andersen et al., 2004; Alexaki et al., 2010), i.e., in the areas where we identified the EMT-TF switch. To establish a link between EMT-TF reprogramming and loss of E-cadherin in melanoma, we assessed the

effect of transient depletion of individual EMT-TFs on E-cadherin in A375P and A375M melanoma cell lines. We found that, among the EMT-inducers, ZEB1 was the only protein required for the repression of the *CDH1* gene in this cellular context (Figure S6A). Consistent with these data, ZEB1, but not ZEB2 depletion-activated wild-type *CDH1* gene promoter, whereas a reporter driven by the promoter with mutagenized E-boxes was insensitive to *ZEB1* knockdown (Figure S6B). To substantiate these findings, we transiently expressed ZEB1 in UACC-257 cells expressing E-cadherin, *SNAIL2*, and ZEB2 (Figure S6C) and observed inhibition of E-cadherin expression in cells positive for ZEB1 (Figure S6D). In agreement with the results of these experiments, no coexpression of E-cadherin and ZEB1 was observed in a panel of melanoma cell lines (Figure S6E).

Next, we assessed whether the expression of E-cadherin and ZEB1 correlated in tumor samples. Given that loss of E-cadherin has been reported in nodal metastases, we analyzed a cohort of ten matched pairs of primary tumors and corresponding metastases by IHC. E-cadherin immunoreactivity revealed a homogeneous staining in superficial areas of metastatic primary melanomas and reduced level in deeper parts in some specimens. Likewise, we observed a gradient of stronger cortical staining for E-cadherin compared to the medullary sites in nodal metastases, where in some areas E-cadherin was entirely lost. Out of ten primary tumors with strong membrane-bound E-cadherin immunoreactivity, eight showed reduced expression in the corresponding metastases. ZEB1 was detected in 20% of primary melanomas (deep areas) and in 40% of paired metastases (medullary metastatic deposits). Strikingly, ZEB1-positive tumor areas showed lack of E-cadherin expression in all cases (Figure 8C). This mutually exclusive pattern of ZEB1 and E-cadherin expression strongly indicates a critical role of ZEB1 in EMT in melanocytic lesions. Expression of ZEB2 was detected in superficial areas of all primary melanomas and in 60% of corresponding metastases. ZEB1-positive tumor cells with absent E-cadherin showed negative ZEB2 protein expression, but in ZEB1-negative melanomas E-cadherin and ZEB2 were coexpressed (Figure 8C). In agreement with these data, downregulation of E-cadherin was concomitant with EMT-TF reprogramming in *BRAF*^{V600E}-transduced primary human melanocytes (see Figure 2A). Taken together, our data show that in addition to its role in cell transformation, EMT-TF reprogramming contributes to loss of E-cadherin and activation of cell invasion in advanced melanoma.

DISCUSSION

In epithelial backgrounds, EMT-TFs cooperate with mitogenic oncoproteins in malignant transformation, tumor progression, and metastatic dissemination (Ansieau et al., 2008; Thiery et al., 2009; Rhim et al., 2012). Here, we demonstrate that in a neural crest-derived malignancy, MM, the cross-talk between EMT-TFs and oncogenic pathways has different configuration. We show that normal melanocytes express two EMT-TFs, *SNAIL2* and ZEB2, but MM-driving ERK-activating oncogenic pathways induce EMT-TF reprogramming, which involves downregulation of *SNAIL2* and ZEB2 and upregulation of *TWIST1* and ZEB1.

In vitro, we detected EMT-TF reprogramming in untransformed melanocytes in response to the *BRAF* activation. In melanoma cell lines, MEK inhibition downregulated ZEB1 and *TWIST1*, but upregulated ZEB2 and *SNAIL2* indicating that continual MEK-ERK signaling is required to maintain the reconfigured pattern of EMT-TF expression. By the analyses of EMT-TF expression in melanoma samples, we detected EMT-TF switch at late stages of MM progression in deep sites of primary tumors and in medullary metastatic deposits in lymph nodes. High expression of ZEB1 and decreased levels of ZEB2 significantly correlated with high phospho-ERK expression. Remarkably, EMT-TF reprogramming and phospho-ERK immunopositivity represented poor prognostic factors in melanoma patients.

MEK-ERK pathway activation is the central event driving the development of MM. Given high frequencies of mutually exclusive MEK-ERK-activating mutations in *BRAF* (61%), *NRAS* (20%) (Hodis et al., 2012), and a G protein-coupled receptor gene *GRM3* (16.3%) (Prickett et al., 2011), this pathway seems to be activated in most melanocytic lesions including benign nevi. However, there is a documented discrepancy between mutational status of the pathway and phospho-ERK immunopositivity, with MAPK activity being much higher in MM than in common acquired nevi (Saldanha et al., 2004; Uribe et al., 2006; Venesio et al., 2008; Yazdi et al., 2010). This is likely to be caused by the activation of different *BRAF*- or *NRAS*-dependent negative feedback loops, such as IGF1R or an MEK-inducible dual specificity phosphatases (DUSPs), which repress the MEK-ERK pathway (Wajapeyee et al., 2008; Li et al., 2012; Martin et al., 2012). Diverse mechanisms such as amplification of mutant *BRAF* or *NRAS* alleles, acquired mutations in genes encoding MEK1/2 or activation of EGFR signaling may bypass suppression of MEK-ERK activity at later stages of MM (Udart et al., 2001; Nikolaev et al., 2012). Our data indicate that EMT-TF composition is dependent on activating mutations in *BRAF* or *NRAS* oncogenes, but dynamically regulated thereafter during MM progression mirroring the phospho-ERK expression pattern (Figure 8D).

We also addressed molecular mechanisms linking MEK-ERK pathway with EMT-TF reprogramming. In epithelial cells undergoing EMT, EMT-TFs are upregulated in hierarchical manner. In some EMT models, *SNAIL1*, *SNAIL2*, and *TWIST1* upregulate ZEB1 and ZEB2 (Taube et al., 2010; Hugo et al., 2011; Dave et al., 2011). In other systems, *TWIST1* is upstream of *SNAIL* family members activating *SNAIL2* and *SNAIL1* (Casas et al., 2011). The interaction between EMT-TFs is complex also in MM, where we demonstrate their mutual repression. We propose that reciprocal regulation of ZEB proteins in MM mediates dynamic EMT-TF switches in course of melanoma progression (Figure 8D). A regulatory feedback loop involving miR-200 family members and TGF- β is a key mechanism that controls ZEB1 and ZEB2 mRNA levels in carcinoma cells (Brabletz and Brabletz, 2010; Hill et al., 2013). However, in MM cells, miR-200 are present at very low levels and not functional. We believe that lack of miR-200 expression (possibly as a result of epigenetic silencing) is in large responsible for the differences in the configurations of EMT-TF networks in MM and epithelial cells. We show that the reorganization of the EMT-TF network in MM is dependent at least in part on FRA1, one of the key effectors of

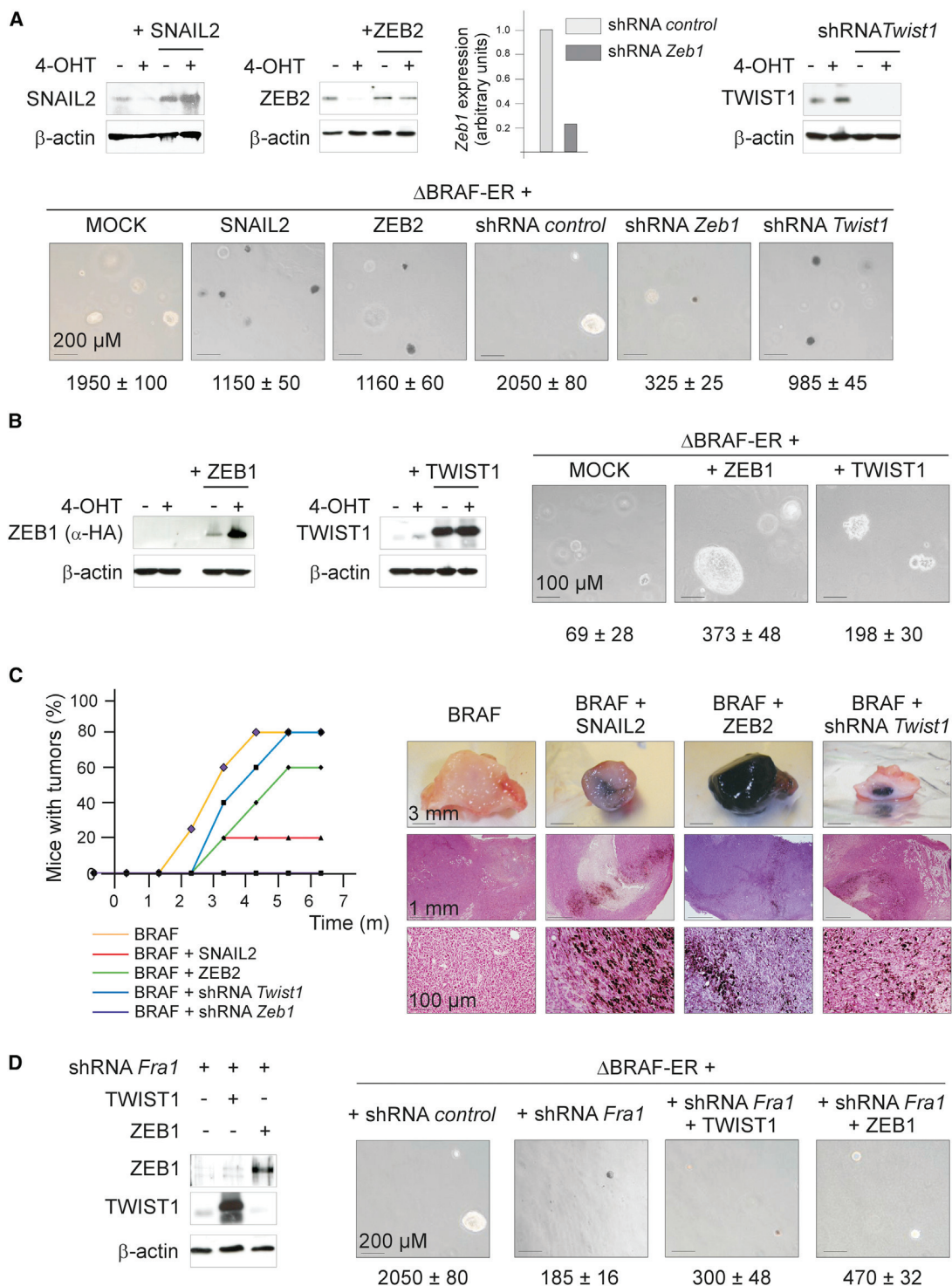


Figure 6. EMT-TF Switch Cooperates with BRAF in Malignant Transformation

(A) EMT-TF expression was modulated by infecting melan-a/ Δ BRAF-ER cells with viral vectors expressing either SNAIL2 or ZEB2. In parallel experiments, *Zeb1* or *Twist1* expression was reduced by shRNA. The BRAF kinase has been activated with 4-OHT 2 weeks before plating. EMT-TF expression was assessed by immunoblotting or qPCR as indicated (upper panels). Colony formation of 4-OHT-treated cells was analyzed, and the results of triplicate experiments (\pm SD) are shown (lower panels).

(B) Melan-a/ Δ BRAF-ER cells were infected with vectors harboring ZEB1 or TWIST1. The BRAF kinase has been activated with 4-OHT immediately before plating. Expression of ZEB1 and TWIST1 was analyzed by immunoblotting (left panels). Colony formation of 4-OHT-treated cells was analyzed, and the results of triplicate experiments (\pm SD) are shown (right panels).

(legend continued on next page)

the RAS-MEK pathway (Vial et al., 2003). The crosstalk between FRA1 and EMT-TFs appears to be complex and implies both transcriptional and posttranslational mechanisms (data not shown). However, FRA1 is associated with regulatory elements within EMT-TFs genes-containing chromatin, and, therefore, it has a potential to directly regulate EMT-TF expression.

We elucidated the functional outcome of EMT-TF reprogramming in MM cells. EMT-TF network plays a more complex role in MM than in epithelial backgrounds, with different EMT-TFs having antagonistic functions. Specifically, although ZEB1 and TWIST1 contribute to the malignant transformation, SNAIL2 and ZEB2 act as oncosuppressive proteins. Recently, ZEB2 mRNA was shown to suppress MM growth by enhancing *PTEN* expression in microRNA-dependent manner (Karreth et al., 2011). However, we did not observe any changes in *PTEN* expression levels upon ZEB2 downregulation in either melan-a or A375M cells (data not shown). This implies that different mechanisms may underlie oncosuppressive properties of ZEB2, and our data indicate that antagonistic functions of EMT-TFs in MM correlate with their opposing effects on MITF expression and function.

There are several lines of genetic evidence supporting the link between SNAIL2 and ZEB2 to MITF and melanocyte differentiation (Sánchez-Martín et al., 2002; Van de Putte et al., 2007; Liu et al., 2009). In agreement with our findings, a recent study demonstrated coexpression of MITF and SNAIL2 in MM samples (Shirley et al., 2012). A mechanism by which EMT-TFs regulate *MITF* transcription remains undefined. We failed to detect any effects of EMT-TFs on *MITF* promoter activity in reporter assays (data not shown), suggesting an indirect effect similar to that described for ATF2 (Shah et al., 2010). The role of MITF is not limited to melanoma initiation, and currently its function is being intensively discussed in the context of the mechanisms underlying cell plasticity in MM (Cheli et al., 2010, 2011; Bell and Levy, 2011; Bertolotto et al., 2011). According to the phenotypic plasticity model, the highest *MITF* expression maintains differentiated status of cell-cycle arrested melanocytes. Reduced *MITF* expression results in the transition to proliferative stage, whereas further decrease in the MITF level generates invasive and slow-proliferating cells with tumor-initiating properties (Hoek and Goding, 2010). Our data suggest that EMT-TF network operates upstream of MITF to control cell plasticity during melanomagenesis. Indeed, ZEB1 and TWIST1 induce TGF- β - and invasion-associated gene signatures in concert with downregulating *MITF*. In line with these findings, ZEB1 and TWIST1 stimulate cell invasion; and E-cadherin loss, an attribute of aggressive melanoma, is associated with elevated ZEB1.

Of note, nodal metastatic deposits recapitulated the same EMT-TF and phospho-ERK expression gradients that we observed in primary tumors. This may indicate that late-stage MM cells retain the capability to reconstitute “differentiation

pattern” of EMT-TF expression (ZEB2^{high}/SNAIL2^{high}/ZEB1^{low}/TWIST1^{low}), and MEK-ERK-dependent EMT-TF switches determine tumor cell plasticity during metastatic process via the regulation of MITF expression. Alternatively, similar EMT-TF expression patterns in primary and secondary tumors imply that cancer cells may populate lymph nodes prior the feedback mechanisms suppressing MEK-ERK signaling are activated. Then, primary melanomas and lymph node metastases evolve separately, but pass through similar cycles of EMT-TF reprogramming. This explanation is within the framework of a theory suggesting parallel progression of epithelial tumors and metastases (Hüsemann et al., 2008; Ansieau et al., 2008; Stoecklein et al., 2008; Rhim et al., 2012). ZEB1^{high}/TWIST1^{high} MM cells residing in medullary parts of lymph nodes may represent the source for secondary wave of metastatic dissemination. In line with this suggestion, medullary invasion is predictive of distant metastases and poor survival in patients with MM (Scolyer et al., 2008). On the other hand, our finding that SNAIL2 and ZEB2 are highly expressed in cortical areas of lymph node metastases is in agreement with a previous study linking SNAIL2 with high metastatic propensity of MM (Gupta et al., 2005).

EMT in epithelial tumors is a reversible process, and metastatic carcinoma cells undergo MET in order to colonize distant organs (Korpál et al., 2011; Tsai et al., 2012; Ocaña et al., 2012). It is plausible to speculate that the scenario is similar in MM: melanoma cells cycle between differentiated (ZEB2^{high}/SNAIL2^{high}/MITF^{high}/E-cadherin^{high}) and oncogenic (ZEB1^{high}/TWIST1^{high}/MITF^{low}/E-cadherin^{low}) states to accomplish metastatic process.

Recent clinical trials in patients with BRAF mutant melanoma have shown that the acquired resistance to BRAF-selective inhibitors is an important clinical challenge. In many cases, the mechanism of the resistance was based on the restoration of MEK activity (Emery et al., 2009; Villanueva et al., 2010). Therefore, targeting EMT-TF network downstream of MEK represents an attractive strategy for treatment of MM. Given that FRA1 plays an important role in EMT-TF reprogramming and is required for melanocyte transformation by BRAF, molecular pathways regulating FRA1 activity in MM appear as appealing targets for future therapies.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

All detailed information on experimental procedures and reagents is provided in the [Supplemental Experimental Procedures](#).

Human Samples and IHC

Melanocytic tissues were obtained from the consenting patients through the Histopathology and Dermatology Departments, University Hospitals of Leicester. Leicestershire Ethics Committee approval was obtained for the tissue analysis (“Molecular pathology of malignant melanoma” REC

(C) Melan-a/ Δ BRAF-ER cells with the reduced or increased expression of individual EMT-TFs were grafted in immunocompromised mice ($n = 7$). The graph shows the appearance of tumors in each group of mice (left panels). Photographs illustrate high pigmentation of tumors with reduced TWIST1 or increased SNAIL2 and, especially, ZEB2 (right panels).

(D) FRA1 contributes to the oncogenic potential of BRAF. BRAF signaling was induced by 4OH-T treatment in melan-a/ Δ BRAF-ER cells depleted of FRA1 and expressing or not exogenous ZEB1 or TWIST1. As positive control, we used 4-OHT-treated melan-a/ Δ BRAF-ER cells infected with the control vector. Ectopic expression of ZEB1 and TWIST1 was confirmed by immunoblotting (left panels). Oncogenicity was assessed in soft agar colony assay. The data are means \pm SD of triplicate experiments (right panels).

See also [Figure S4](#).

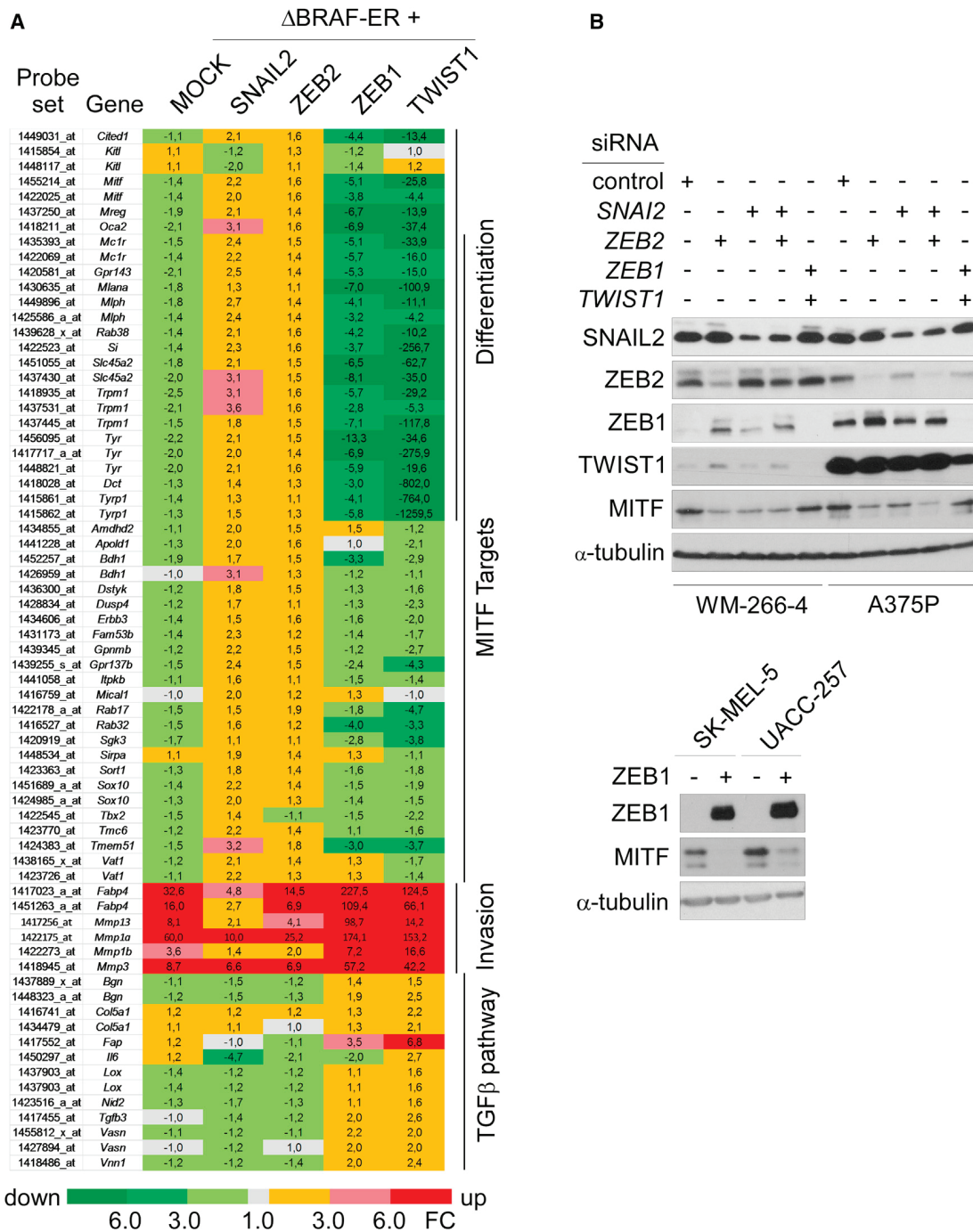


Figure 7. EMT-TF Switch Affects Gene Expression Programs

(A) Genes differentially regulated by ZEB1/TWIST1 and ZEB2/SNAIL2 in melan-a/ Δ BRAF-ER cells. Melan-a/ Δ BRAF-ER cells were infected with either SNAIL2, ZEB2, ZEB1, or TWIST1 retroviral expression vectors, treated with 4-OHT for 1 week, and processed for gene expression profiling. Fold changes are relative to control melan-a/ Δ BRAF-ER cells maintained in the absence of 4-OHT.

(B) The effects of EMT-TFs on MITF expression in MM cell lines. Melanoma cell lines were depleted of EMT-TFs by siRNAs (top panel), or ZEB1 was ectopically expressed in ZEB1-negative cell lines SK-MEL-5 and UACC-257 (bottom panel). EMT-TF expression and the expression of MITF was analyzed by immunoblotting.

See also Figure S5.

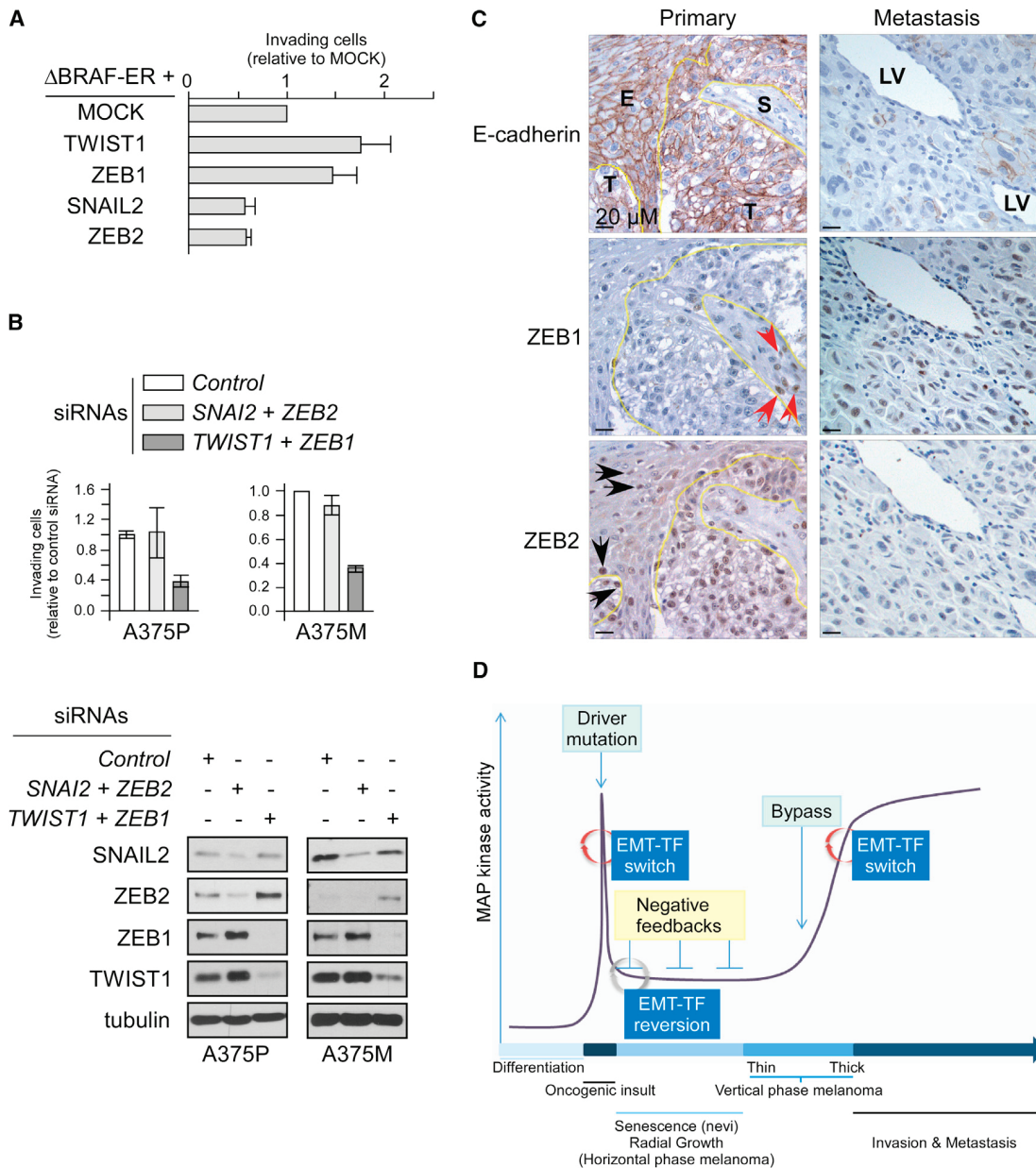


Figure 8. The EMT-TF Switch Is Associated with Increased Invasion and Loss of E-Cadherin

(A) Assessment of invasive potential of melan-a/ Δ BRAF-ER-derived cells in matrigel-coated BD transwells. Melan-a/ Δ BRAF-ER cells were infected with either SNAIL2, ZEB2, ZEB1, or TWIST1 retroviral expression vectors and treated with 4-OHT for 1 week. Fold changes in invasion relative to MOCK-infected melan-a/ Δ BRAF-ER cells in the presence of 4-OHT are shown. Results are shown as the mean \pm SD of triplicate experiments.

(B) Simultaneous knockdown of TWIST1 and ZEB1, but not of SNAI2 and ZEB2, reduces invasion of A375P or A375M cells into matrigel. The invasion was normalized to that of the cells transfected with control siRNA. Bars represent the mean \pm SD of three independent experiments.

(C) Examples of IHC analyses demonstrating an in vivo correlation between ZEB1, ZEB2, and E-cadherin expression in primary melanoma (left panels) and matched metastases (right panels). T, tumor; S, stroma; E, epidermis; LV, lymphatic vessel. ZEB1-positive cells observed in stromal areas are either invading tumor cells, which underwent EMT-like reprogramming, or stromal components. These cells are marked with red arrows. Black arrows designate melanocytes located in the epidermis.

(D) A hypothetical scheme illustrating modulation of MAPK activity and EMT-TF reprogramming in the time course of tumor progression. Initial activation of MAPK is caused by gain of function MM-driving mutations (BRAFV600E, NRASQ61L, etc.). MAPK activity is suppressed in nevi and in radial growth-phase melanoma through negative feedback loops. The pathway is reactivated in advanced cancer via bypass mechanisms. An early EMT-TF switch is immediately induced by oncogenic mutation, contributes to the neoplastic transformation, and is possibly involved in early dissemination. A late EMT-TF reprogramming is dependent on continual MAPK signaling and leads to loss of E-cadherin and enhanced cell invasion. We hypothesize that the suppression of MAPK activity in nevi or horizontal-phase melanoma causes EMT-TF reversion (suppression of ZEB1 and TWIST1 and reactivation of ZEB2 and SNAI2).

See also Figure S6.

Ref6791). Histological sections and formalin-fixed paraffin embedded tissue blocks were retrieved from the archive. The primary tumors (n = 142) were from the lower extremities (21.4%), the trunk (39.8%), the upper extremities (17.3%), the head and neck (16.3%), and acral (4.1%). Of the 51 metastases, 76% were in lymph nodes, and the remaining metastases were in skin or subcutaneous tissue. In addition, 26 common acquired nevi were analyzed. Demographic information on the MM cases included age at primary excision, gender, time to last follow-up visit/clinical metastasis. Stage was determined from the Breslow thickness and ulceration of the primary tumor.

Mouse Injection

Single cell suspensions of melan-a derivatives or A375 MM cell lines ($1-2 \times 10^6$ cells) in PBS/Matrigel (BD Biosciences) (1/1) were injected subcutaneously in the flank of 8-week-old female athymic Swiss nude mice (Charles River Laboratories). Tumor incidence and growth was monitored during different time periods postinjection. Tumors grew up to 1.5 cm in diameter, at which point animals were euthanized. Each tumor was dissected, fixed in formalin, and processed for histopathology examination.

Mice were housed and bred in a specific pathogen-free animal facility "AniCan" at the CRCL, Lyon, France. The experiments were performed in accordance with the animal care guidelines of the European Union and French laws and were validated by the local Animal Ethic Evaluation Committee (CECCAPP).

Statistics

Expression gradients within and between the lesions were analyzed by Wilcoxon matched pairs test and Jonckheere-Terpstra trend test, respectively. Unpaired data were compared by the Mann-Whitney U test or Kruskal-Wallis one-way ANOVA. Paired data were analyzed by the Page L test (Unistat Statistical Package, version 5.0, Unistat) and interrelationships were investigated by linear regression analysis (Stata software package, version 7.0, Stata). Metastasis was investigated by Kaplan-Meier analysis (Unistat) of H-score, which were compared by the log rank Mantel-Haenszel (Peto) test, and by univariate and multivariate Cox regression (Stata).

ACCESSION NUMBERS

The GEO database accession number for the results of microarray experiments reported in this paper is 39030.

SUPPLEMENTAL INFORMATION

Supplemental Information includes Supplemental Experimental Procedures, six figures, and one table and can be found with this article online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.ccr.2013.08.018>.

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to M. McMahon for providing the Δ BRAF-ER construct and D. Bennett for melan-a cells. We thank A. Garcia de Herreros for an anti-SNAI1 antibody. We are grateful to Severine Croze, Mojgan Devouassoux-Shisheboran, and Audrey Pierrot for technical help with ProfileXpert platform and IHC analyses of mouse tumor tissues. We thank Linda Potter for help with IHC. The A. Puisieux and S. Ansieau team is labeled by the Ligue Nationale contre le Cancer. The work was supported by Cancer Research UK grant C8851/A10844 (to E.T.) and an INCa grant (PLB1009) and was performed within the framework of the LABEX DEVweCAN (ANR-10-LABX-0061) of Lyon University, within the program "Investissements d'Avenir" (ANR-11-IDEX-0007) operated by the French National Research Agency (ANR).

Received: November 1, 2012

Revised: April 30, 2013

Accepted: August 22, 2013

Published: September 26, 2013

REFERENCES

- Alexaki, V.I., Javelaud, D., Van Kempen, L.C., Mohammad, K.S., Dennler, S., Luciani, F., Hoek, K.S., Juárez, P., Goydos, J.S., Fournier, P.J., et al. (2010). GLI2-mediated melanoma invasion and metastasis. *J. Natl. Cancer Inst.* **102**, 1148–1159.
- Andersen, K., Nesland, J.M., Holm, R., Flørenes, V.A., Fodstad, O., and Maelandsmo, G.M. (2004). Expression of S100A4 combined with reduced E-cadherin expression predicts patient outcome in malignant melanoma. *Mod. Pathol.* **17**, 990–997.
- Ansieau, S., Bastid, J., Doreau, A., Morel, A.P., Bouchet, B.P., Thomas, C., Fauvet, F., Puisieux, I., Doglioni, C., Piccinin, S., et al. (2008). Induction of EMT by twist proteins as a collateral effect of tumor-promoting inactivation of premature senescence. *Cancer Cell* **14**, 79–89.
- Bell, R.E., and Levy, C. (2011). The three M's: melanoma, microphthalmia-associated transcription factor and microRNA. *Pigment Cell Melanoma Res.* **24**, 1088–1106.
- Bertolotto, C., Lesueur, F., Giuliano, S., Strub, T., de Lichy, M., Bille, K., Dessen, P., d'Hayer, B., Mohamdi, H., Remenieras, A., et al.; French Familial Melanoma Study Group. (2011). A SUMOylation-defective MITF germline mutation predisposes to melanoma and renal carcinoma. *Nature* **480**, 94–98.
- Brabletz, T. (2012a). EMT and MET in metastasis: where are the cancer stem cells? *Cancer Cell* **22**, 699–701.
- Brabletz, T. (2012b). To differentiate or not—routes towards metastasis. *Nat. Rev. Cancer* **12**, 425–436.
- Brabletz, S., and Brabletz, T. (2010). The ZEB/miR-200 feedback loop—a motor of cellular plasticity in development and cancer? *EMBO Rep.* **11**, 670–677.
- Casalino, L., De Cesare, D., and Verde, P. (2003). Accumulation of Fra-1 in ras-transformed cells depends on both transcriptional autoregulation and MEK-dependent posttranslational stabilization. *Mol. Cell. Biol.* **23**, 4401–4415.
- Casas, E., Kim, J., Bendesky, A., Ohno-Machado, L., Wolfe, C.J., and Yang, J. (2011). Snail2 is an essential mediator of Twist1-induced epithelial mesenchymal transition and metastasis. *Cancer Res.* **71**, 245–254.
- Cheli, Y., Ohanna, M., Ballotti, R., and Bertolotto, C. (2010). Fifteen-year quest for microphthalmia-associated transcription factor target genes. *Pigment Cell Melanoma Res.* **23**, 27–40.
- Cheli, Y., Giuliano, S., Botton, T., Rocchi, S., Hofman, V., Hofman, P., Bahadoran, P., Bertolotto, C., and Ballotti, R. (2011). Mitf is the key molecular switch between mouse or human melanoma initiating cells and their differentiated progeny. *Oncogene* **30**, 2307–2318.
- Chng, Z., Teo, A., Pedersen, R.A., and Vallier, L. (2010). SIP1 mediates cell-fate decisions between neuroectoderm and mesendoderm in human pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* **6**, 59–70.
- Dave, N., Guaita-Esteruelas, S., Gutarra, S., Frias, A., Beltran, M., Peiró, S., and de Herreros, A.G. (2011). Functional cooperation between Snail1 and twist in the regulation of ZEB1 expression during epithelial to mesenchymal transition. *J. Biol. Chem.* **286**, 12024–12032.
- Emery, C.M., Vijayendran, K.G., Zipser, M.C., Sawyer, A.M., Niu, L., Kim, J.J., Hatton, C., Chopra, R., Oberholzer, P.A., Karpova, M.B., et al. (2009). MEK1 mutations confer resistance to MEK and B-RAF inhibition. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **106**, 20411–20416.
- Gupta, P.B., Kuperwasser, C., Brunet, J.P., Ramaswamy, S., Kuo, W.L., Gray, J.W., Naber, S.P., and Weinberg, R.A. (2005). The melanocyte differentiation program predisposes to metastasis after neoplastic transformation. *Nat. Genet.* **37**, 1047–1054.
- Heidorn, S.J., Milagre, C., Whittaker, S., Noury, A., Niculescu-Duvas, I., Dhomen, N., Hussain, J., Reis-Filho, J.S., Springer, C.J., Pritchard, C., and Marais, R. (2010). Kinase-dead BRAF and oncogenic RAS cooperate to drive tumor progression through CRAF. *Cell* **140**, 209–221.
- Hill, L., Browne, G., and Tulchinsky, E. (2013). ZEB/miR-200 feedback loop: at the crossroads of signal transduction in cancer. *Int. J. Cancer* **132**, 745–754.

- 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.
- Hoek, K.S., and Goding, C.R. (2010). Cancer stem cells versus phenotype-switching in melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res.* **23**, 746–759.
- Hoek, K., Rimm, D.L., Williams, K.R., Zhao, H., Ariyan, S., Lin, A., Kluger, H.M., Berger, A.J., Cheng, E., Trombetta, E.S., et al. (2004). Expression profiling reveals novel pathways in the transformation of melanocytes to melanomas. *Cancer Res.* **64**, 5270–5282.
- Hoek, K.S., Schlegel, N.C., Brafford, P., Sucker, A., Ugurel, S., Kumar, R., Weber, B.L., Nathanson, K.L., Phillips, D.J., Herlyn, M., et al. (2006). Metastatic potential of melanomas defined by specific gene expression profiles with no BRAF signature. *Pigment Cell Res.* **19**, 290–302.
- Hugo, H.J., Kokkinos, M.I., Blick, T., Ackland, M.L., Thompson, E.W., and Newgreen, D.F. (2011). Defining the E-cadherin repressor interactome in epithelial-mesenchymal transition: the PMC42 model as a case study. *Cells Tissues Organs (Print)* **193**, 23–40.
- Hüsemann, Y., Geigl, J.B., Schubert, F., Musiani, P., Meyer, M., Burghart, E., Forni, G., Eils, R., Fehm, T., Riethmüller, G., and Klein, C.A. (2008). Systemic spread is an early step in breast cancer. *Cancer Cell* **13**, 58–68.
- Iliopoulos, D., Hirsch, H.A., Wang, G., and Struhl, K. (2011). Inducible formation of breast cancer stem cells and their dynamic equilibrium with non-stem cancer cells via IL6 secretion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **108**, 1397–1402.
- Karreth, F.A., Tay, Y., Perna, D., Ala, U., Tan, S.M., Rust, A.G., DeNicola, G., Webster, K.A., Weiss, D., Perez-Mancera, P.A., et al. (2011). In vivo identification of tumor-suppressive PTEN ceRNAs in an oncogenic BRAF-induced mouse model of melanoma. *Cell* **147**, 382–395.
- Korpala, M., Ell, B.J., Buffa, F.M., Ibrahim, T., Blanco, M.A., Celià-Terrassa, T., Mercatali, L., Khan, Z., Goodarzi, H., Hua, Y., et al. (2011). Direct targeting of Sec23a by miR-200s influences cancer cell secretome and promotes metastatic colonization. *Nat. Med.* **17**, 1101–1108.
- Li, W., Song, L., Ritchie, A.M., and Melton, D.W. (2012). Increased levels of DUSP6 phosphatase stimulate tumorigenesis in a molecularly distinct melanoma subtype. *Pigment Cell Melanoma Res.* **25**, 188–199.
- Liu, Y., Ye, F., Li, Q., Tamiya, S., Darling, D.S., Kaplan, H.J., and Dean, D.C. (2009). Zeb1 represses *Mitf* and regulates pigment synthesis, cell proliferation, and epithelial morphology. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **50**, 5080–5088.
- Maestro, R., Dei Tos, A.P., Hamamori, Y., Krasnokutsky, S., Sartorelli, V., Kedes, L., Doglioni, C., Beach, D.H., and Hannon, G.J. (1999). Twist is a potential oncogene that inhibits apoptosis. *Genes Dev.* **13**, 2207–2217.
- Mani, S.A., Guo, W., Liao, M.J., Eaton, E.N., Ayyanan, A., Zhou, A.Y., Brooks, M., Reinhard, F., Zhang, C.C., Shipitsin, M., et al. (2008). The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell* **133**, 704–715.
- Martin, M.J., Hayward, R., Viros, A., and Marais, R. (2012). Metformin accelerates the growth of BRAF V600E-driven melanoma by upregulating VEGF-A. *Cancer Discov.* **2**, 344–355.
- Mejlvang, J., Krijavetska, M., Vandewalle, C., Chernova, T., Sayan, A.E., Bex, G., Mellon, J.K., and Tulchinsky, E. (2007). Direct repression of cyclin D1 by SIP1 attenuates cell cycle progression in cells undergoing an epithelial mesenchymal transition. *Mol. Biol. Cell* **18**, 4615–4624.
- Mikesh, L.M., Kumar, M., Erdag, G., Hogan, K.T., Molhoek, K.R., Mayo, M.W., and Slingluff, C.L., Jr. (2010). Evaluation of molecular markers of mesenchymal phenotype in melanoma. *Melanoma Res.* **20**, 485–495.
- Miller, A.J., and Mihm, M.C., Jr. (2006). Melanoma. *N. Engl. J. Med.* **355**, 51–65.
- Miyoshi, T., Maruhashi, M., Van De Putte, T., Kondoh, H., Huylebroeck, D., and Higashi, Y. (2006). Complementary expression pattern of *Zfx1* genes *Sip1* and *deltaEF1* in the mouse embryo and their genetic interaction revealed by compound mutants. *Dev. Dyn.* **235**, 1941–1952.
- Morel, A.P., Lièvre, M., Thomas, C., Hinkal, G., Ansieau, S., and Puisieux, A. (2008). Generation of breast cancer stem cells through epithelial-mesenchymal transition. *PLoS ONE* **3**, e2888.
- Morel, A.P., Hinkal, G.W., Thomas, C., Fauvet, F., Courtois-Cox, S., Wierinckx, A., Devouassoux-Shisheboran, M., Treilleux, I., Tissier, A., Gras, B., et al. (2012). EMT inducers catalyze malignant transformation of mammary epithelial cells and drive tumorigenesis towards claudin-low tumors in transgenic mice. *PLoS Genet.* **8**, e1002723.
- Nieto, M.A., and Cano, A. (2012). The epithelial-mesenchymal transition under control: global programs to regulate epithelial plasticity. *Semin. Cancer Biol.* **22**, 361–368.
- Nikolaev, S.I., Rimoldi, D., Iseli, C., Valsesia, A., Robyr, D., Gehrig, C., Harshman, K., Guipponi, M., Bukach, O., Zoete, V., et al. (2012). Exome sequencing identifies recurrent somatic MAP2K1 and MAP2K2 mutations in melanoma. *Nat. Genet.* **44**, 133–139.
- Ocaña, O.H., Córcoles, R., Fabra, A., Moreno-Bueno, G., Acloque, H., Vega, S., Barrallo-Gimeno, A., Cano, A., and Nieto, M.A. (2012). Metastatic colonization requires the repression of the epithelial-mesenchymal transition inducer *Prrx1*. *Cancer Cell* **22**, 709–724.
- Peinado, H., Olmeda, D., and Cano, A. (2007). Snail, Zeb and bHLH factors in tumour progression: an alliance against the epithelial phenotype? *Nat. Rev. Cancer* **7**, 415–428.
- Prickett, T.D., Wei, X., Cardenas-Navia, I., Teer, J.K., Lin, J.C., Walia, V., Gartner, J., Jiang, J., Cherukuri, P.F., Molinolo, A., et al. (2011). Exon capture analysis of G protein-coupled receptors identifies activating mutations in *GRM3* in melanoma. *Nat. Genet.* **43**, 1119–1126.
- Rhim, A.D., Mirek, E.T., Aiello, N.M., Maitra, A., Bailey, J.M., McAllister, F., Reichert, M., Beatty, G.L., Rustgi, A.K., Vonderheide, R.H., et al. (2012). EMT and dissemination precede pancreatic tumor formation. *Cell* **148**, 349–361.
- Saldanha, G., Purnell, D., Fletcher, A., Potter, L., Gillies, A., and Pringle, J.H. (2004). High BRAF mutation frequency does not characterize all melanocytic tumor types. *Int. J. Cancer* **111**, 705–710.
- Sánchez-Martín, M., Rodríguez-García, A., Pérez-Losada, J., Sagrera, A., Read, A.P., and Sánchez-García, I. (2002). *SLUG* (*SNAI2*) deletions in patients with Waardenburg disease. *Hum. Mol. Genet.* **11**, 3231–3236.
- Sanders, D.S., Blessing, K., Hassan, G.A., Bruton, R., Marsden, J.R., and Jankowski, J. (1999). Alterations in cadherin and catenin expression during the biological progression of melanocytic tumours. *MP, Mol. Pathol.* **52**, 151–157.
- Scolyer, R.A., Murali, R., Satzger, I., and Thompson, J.F. (2008). The detection and significance of melanoma micrometastases in sentinel nodes. *Surg. Oncol.* **17**, 165–174.
- Shah, M., Bhoumik, A., Goel, V., Dewing, A., Breitwieser, W., Kluger, H., Krajewski, S., Krajewska, M., Dehart, J., Lau, E., et al. (2010). A role for ATF2 in regulating *MITF* and melanoma development. *PLoS Genet.* **6**, e1001258.
- Shin, S., Dimitri, C.A., Yoon, S.O., Dowdle, W., and Blenis, J. (2010). ERK2 but not ERK1 induces epithelial-to-mesenchymal transformation via DEF motif-dependent signaling events. *Mol. Cell* **38**, 114–127.
- Shirley, S.H., Greene, V.R., Duncan, L.M., Torres Cabala, C.A., Grimm, E.A., and Kusewitt, D.F. (2012). *Slug* expression during melanoma progression. *Am. J. Pathol.* **180**, 2479–2489.
- Stoecklein, N.H., Hosch, S.B., Bezler, M., Stern, F., Hartmann, C.H., Vay, C., Siegmund, A., Scheunemann, P., Schurr, P., Knoefel, W.T., et al. (2008). Direct genetic analysis of single disseminated cancer cells for prediction of outcome and therapy selection in esophageal cancer. *Cancer Cell* **13**, 441–453.
- Taube, J.H., Herschkowitz, J.I., Komurov, K., Zhou, A.Y., Gupta, S., Yang, J., Hartwell, K., Onder, T.T., Gupta, P.B., Evans, K.W., et al. (2010). Core epithelial-to-mesenchymal transition interactome gene-expression signature is associated with claudin-low and metaplastic breast cancer subtypes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **107**, 15449–15454.
- Thiery, J.P., Acloque, H., Huang, R.Y., and Nieto, M.A. (2009). Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell* **139**, 871–890.

- Tsai, J.H., Donaher, J.L., Murphy, D.A., Chau, S., and Yang, J. (2012). Spatiotemporal regulation of epithelial-mesenchymal transition is essential for squamous cell carcinoma metastasis. *Cancer Cell* 22, 725–736.
- Udart, M., Utikal, J., Krähn, G.M., and Peter, R.U. (2001). Chromosome 7 aneusomy. A marker for metastatic melanoma? Expression of the epidermal growth factor receptor gene and chromosome 7 aneusomy in nevi, primary malignant melanomas and metastases. *Neoplasia* 3, 245–254.
- Uribe, P., Andrade, L., and Gonzalez, S. (2006). Lack of association between BRAF mutation and MAPK ERK activation in melanocytic nevi. *J. Invest. Dermatol.* 126, 161–166.
- Valsesia-Wittmann, S., Magdeleine, M., Dupasquier, S., Garin, E., Jallas, A.C., Combaret, V., Krause, A., Leissner, P., and Puisieux, A. (2004). Oncogenic cooperation between H-Twist and N-Myc overrides failsafe programs in cancer cells. *Cancer Cell* 6, 625–630.
- Van de Putte, T., Francis, A., Nelles, L., van Grunsven, L.A., and Huylebroeck, D. (2007). Neural crest-specific removal of Zfhx1b in mouse leads to a wide range of neurocristopathies reminiscent of Mowat-Wilson syndrome. *Hum. Mol. Genet.* 16, 1423–1436.
- Vega, S., Morales, A.V., Ocaña, O.H., Valdés, F., Fabregat, I., and Nieto, M.A. (2004). Snail blocks the cell cycle and confers resistance to cell death. *Genes Dev.* 18, 1131–1143.
- Venesio, T., Chiorino, G., Balsamo, A., Zaccagna, A., Petti, C., Scatolini, M., Pisacane, A., Sarotto, I., Picciotto, F., and Risio, M. (2008). In melanocytic lesions the fraction of BRAF V600E alleles is associated with sun exposure but unrelated to ERK phosphorylation. *Mod. Pathol.* 21, 716–726.
- Vial, E., Sahai, E., and Marshall, C.J. (2003). ERK-MAPK signaling coordinately regulates activity of Rac1 and RhoA for tumor cell motility. *Cancer Cell* 4, 67–79.
- Villanueva, J., Vultur, A., Lee, J.T., Somasundaram, R., Fukunaga-Kalabis, M., Cipolla, A.K., Wubbenhorst, B., Xu, X., Gimotty, P.A., Kee, D., et al. (2010). Acquired resistance to BRAF inhibitors mediated by a RAF kinase switch in melanoma can be overcome by cotargeting MEK and IGF-1R/PI3K. *Cancer Cell* 18, 683–695.
- Wajapeyee, N., Serra, R.W., Zhu, X., Mahalingam, M., and Green, M.R. (2008). Oncogenic BRAF induces senescence and apoptosis through pathways mediated by the secreted protein IGFBP7. *Cell* 132, 363–374.
- Wellbrock, C., and Marais, R. (2005). Elevated expression of MITF counteracts B-RAF-stimulated melanocyte and melanoma cell proliferation. *J. Cell Biol.* 170, 703–708.
- Yazdi, A.S., Ghoreschi, K., Sander, C.A., and Röcken, M. (2010). Activation of the mitogen-activated protein kinase pathway in malignant melanoma can occur independently of the BRAF T1799A mutation. *Eur. J. Dermatol.* 20, 575–579.

Supplemental Information

A Switch in the Expression of Embryonic EMT-Inducers Drives the Development of Malignant Melanoma

Julie Caramel, Eftychios Papadogeorgakis, Louise Hill, Gareth J. Browne, Geoffrey Richard, Anne Wierinckx, Gerald Saldanha, Joy Osborne, Peter Hutchinson, Gina Tse, Joël Lachuer, Alain Puisieux, J. Howard Pringle, Stéphane Ansieau, and Eugene Tulchinsky

Inventory of Supplemental Information

Supplemental data

Figure S1, related to Figure 1

Table S1, related to Figure 1

Figure S2, related to Figure 3

Figure S3, related to Figure 5

Figure S4, related to Figure 6

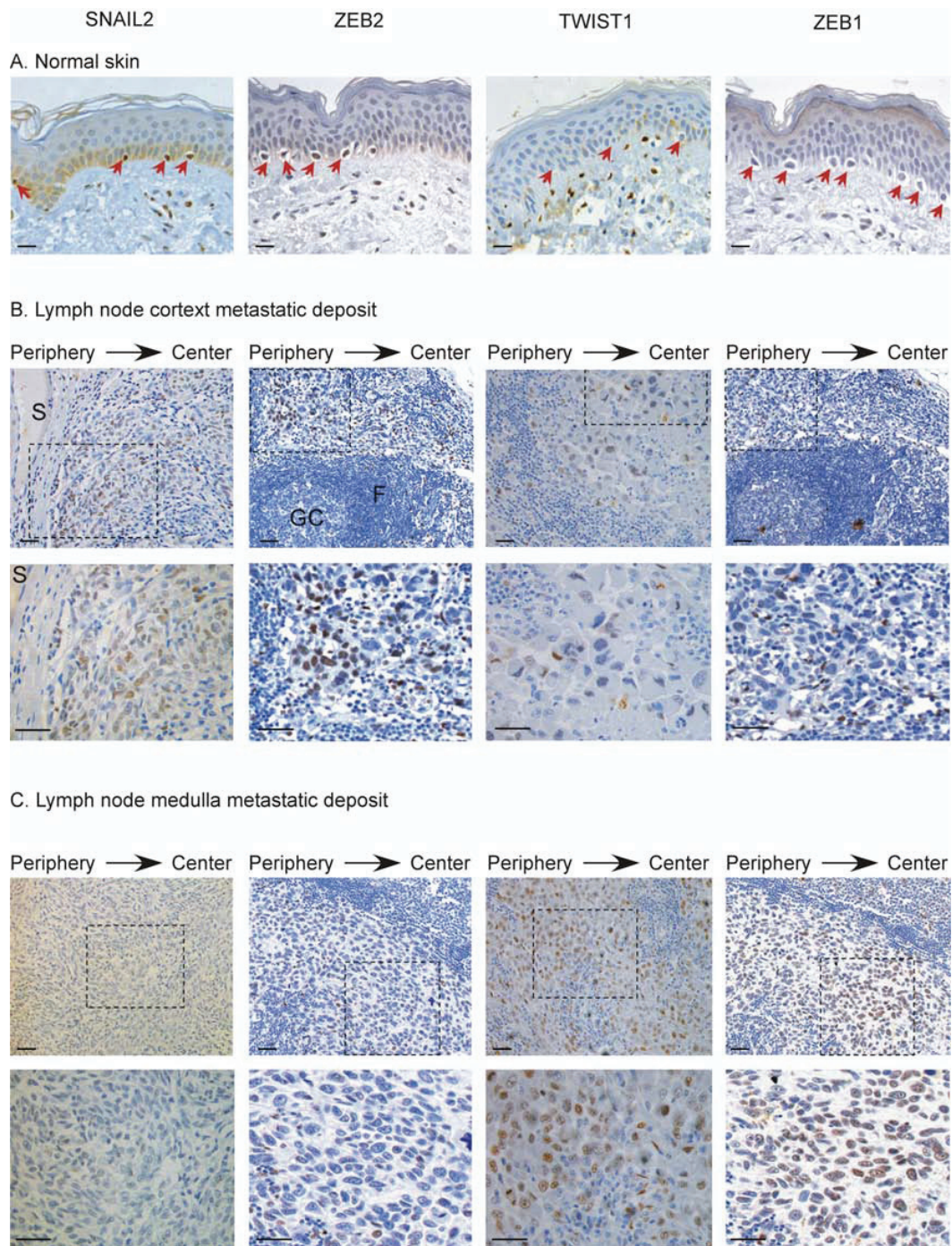
Figure S5, related to Figure 7

Figure S6, related to Figure 8

Supplemental experimental procedures

Supplemental references

SUPPLEMENTAL DATA



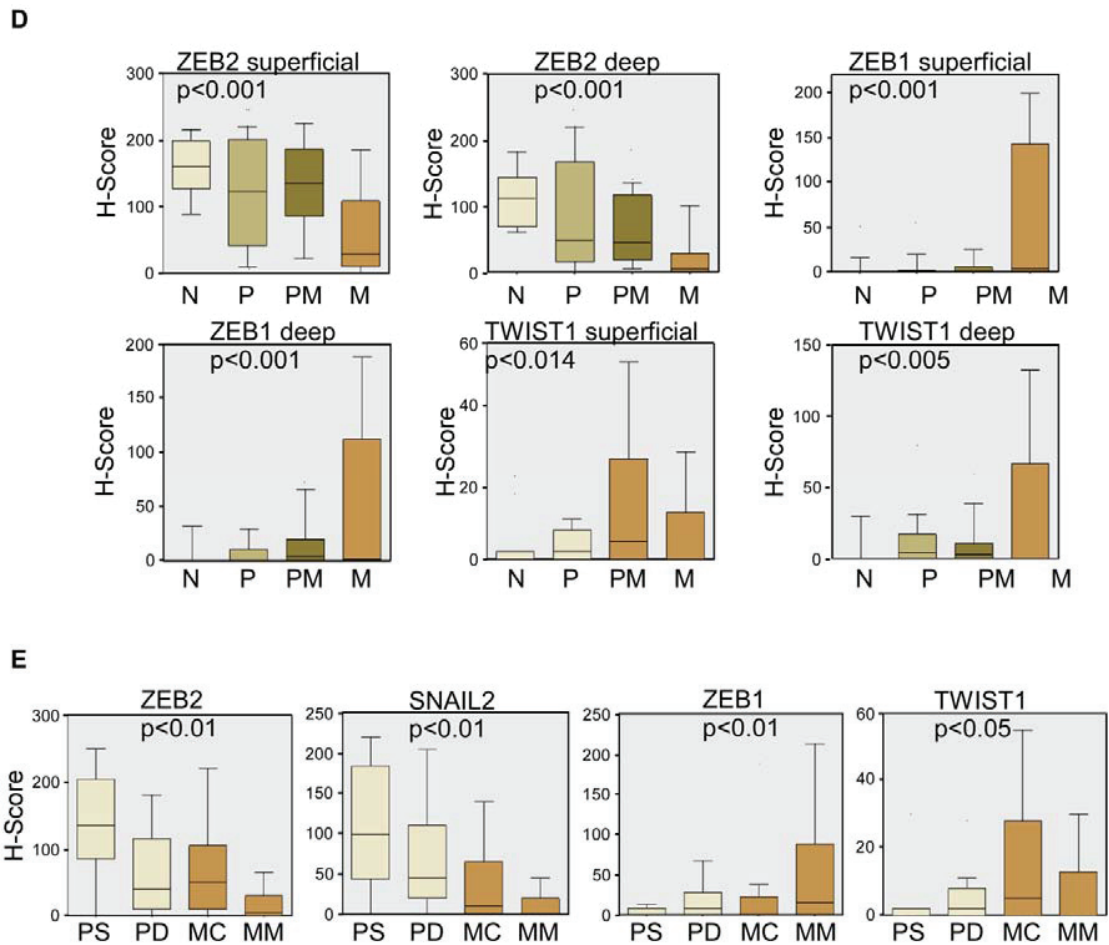


Figure S1, related to Figure 1.

Opposing trends of EMT-TF expression in melanocytic lesions.

(A) IHC analysis of EMT-TF expression in the skin.

Melanocytes embedded in the basal layer of the epidermis are indicated by red arrows. Note that melanocytes are positive for ZEB2 and SNAIL2, but negative for ZEB1 and TWIST1. Keratinocytes do not express EMT-TFs. Scale bar = 40 μ m.

(B, C) Examples of IHC analyses of EMT-TF expression in lymph nodal metastases in patients with advanced MM. Cortical (B) and medullar (C) regions of affected lymph nodes are shown. Images within boxed areas represent predominantly tumor cells and are shown at 40x magnification in adjacent photomicrographs. F, follicles; GC, germinal center; S, subcapsular sinus. Scale bar = 40 μ m.

(D, E) Box and whisker plots of EMT-TF IHC staining (H-Score) for MM independent progression series (D) or matched primary tumor/metastatic lesions series (E). Staining was measured at superficial and deep sites for each melanocytic lesion. Error bars represent the 10th and 90th percentiles. p values represent the significance of a trend test using Jonckheere-Terpstra trend test for the independent series (D) and the Page L trend test for the matched series (E). N, nevi; P, primary melanoma; PM, metastatic primary melanoma; M, metastases. PS, superficial areas in primary melanomas; PD, deep areas in primary melanomas; MC, cortical metastatic deposits in lymph nodes; MM, metastatic deposits in medullary areas. Note opposing gradients of ZEB2 and SNAIL2 versus ZEB1 and TWIST1 expression within the lesions.

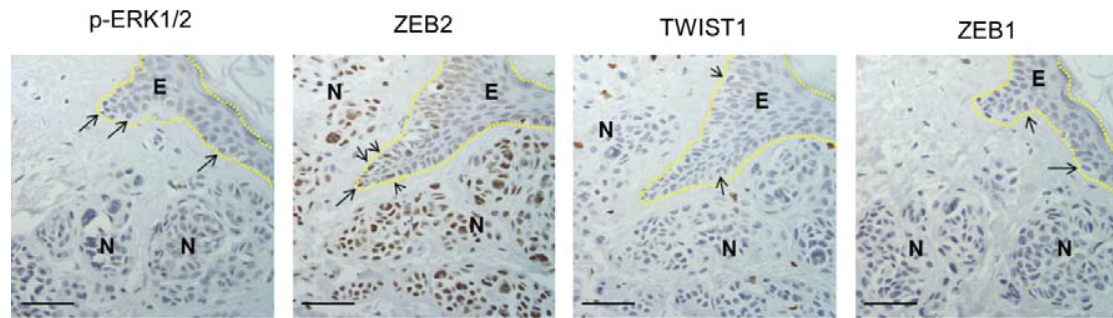
Table S1, related to Figure 1.

Univariate and multivariate Cox proportional hazard analysis for clinical prognostic factors, age, gender, tumor Breslow depth and ulceration with EMT-TF and phospho-ERK immunostaining.

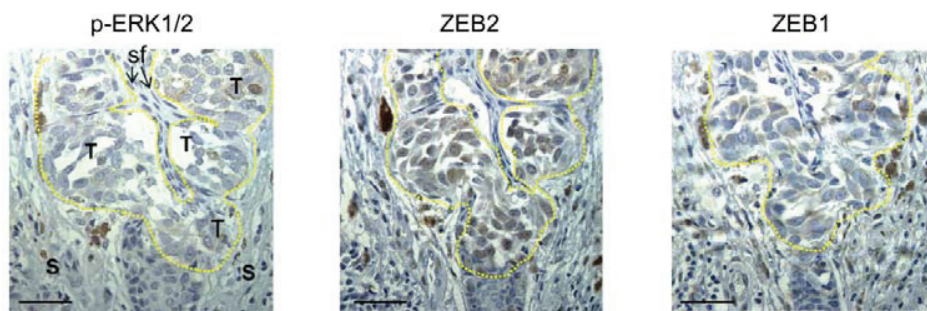
Variable	Evaluation	N#	Univariate Cox Proportional hazard analysis of EMT-TF and p-ERK IHC with metastasis free survival			Multivariate Cox Proportional hazard analysis of EMT-TF or p-ERK IHC and clinical prognostic factors with metastasis free survival		
			HR (95% confidence interval)		P value	HR (95% confidence interval)		P value
Age	< 60	46	1			1		
	>60	52	1.64	0.91-2.97	0.01*	0.781	0.40-1.51	0.46
Gender	Female	57	1			1		
	Male	41	1.99	1.12-3.55	0.02*	1.98	1.09-3.62	0.081
Breslow	< 1.5 mm	29	1			1		
	> 1.5 mm < 4.0mm	43	2.67	1.16-6.17	0.02*	3.09	1.18-8.08	0.022*
	> 4.0mm	26	5.10	2.14-12.17	< 0.001***	5.35	1.89-15.12	0.002**
Ulceration	No ulceration	56	1			1		
	ulceration	39	1.81	1.01-3.24	0.049*	1.178	0.58-2.374	0.65
ZEB1 Superficial	H Score (100)	98	6.22	2.19-17.71	<0.001***	5.413	1.74-16.86	0.004**
ZEB2 Superficial	H Score (100)	98	0.89	0.61-1.30	0.557	1.061	0.69-1.63	0.79
TWIST1 Superficial	H Score (100)	92	4.04	1.23-13.29	0.022*	6.452	1.94-21.45	0.002**
p-ERK1/2 Superficial	H Score (100)	63	1.83	1.052-3.19	0.032*	1.40	0.74-2.657	0.302
ZEB1 Deep	H Score (100)	98	4.16	2.02-8.54	<0.001***	3.42	1.53-7.59	0.003**
ZEB2 Deep	H Score (100)	98	0.931	0.35-0.93	0.025*	0.75	0.45-1.25	0.27
TWIST1 Deep	H Score (100)	92	1.73	0.497-6.04	0.389	6.022	1.58-22.94	0.008**
p-ERK1/2 Deep	H Score(100)	63	1.98	1.28-3.07	0.002**	1.72	1.04-2.83	0.034*

Cases were excluded where time-to-event was zero (i.e. 4 cases with pre-existing metastases) P * <0.05 **<0.01 *** < 0.001

A. Expression in nevi



B. Expression in cortical area



C. Expression in medullary area

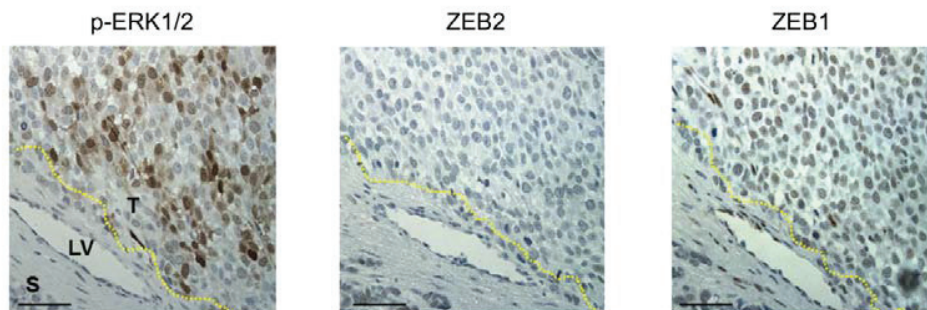


Figure S2, related to Figure 3.

EMT-TF switch correlates with ERK activity. Examples of IHC analyses of phospho-ERK (p-ERK1/2) and EMT-TF expression in a nevus (A) and lymph nodal metastasis (B, C). E, epidermis; N, nevus, melanocytes are indicated by arrows. T, tumor; S, stroma; sf, stromal fibroblasts; LV, lymphatic vessel. The micrographs demonstrate a correlation between EMT-TF reprogramming and phospho-ERK immunopositivity. Scale bar = 40 μ m.

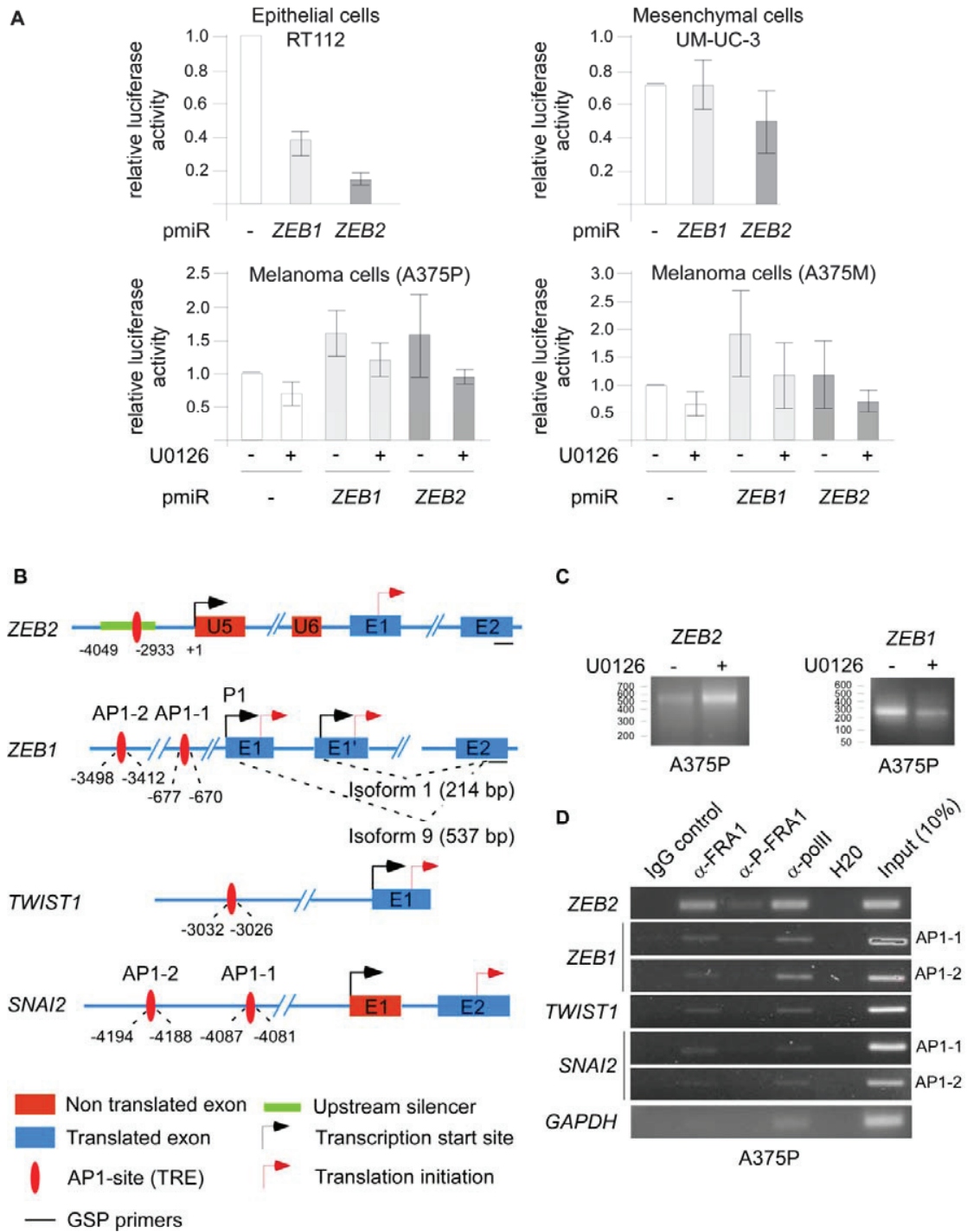


Figure S3, related to Figure 5.

Regulation of *ZEB1* and *ZEB2* expression is independent of miR-200 family members, but dependent on FRA1 in melanoma cells.

(A) Activity of the firefly luciferase reporters linked to the 3'UTRs of *ZEB1* or *ZEB2* was measured after transient transfection in epithelial (RT112), mesenchymal carcinoma (UM-UC-3) or MM (A375P and A375M) cell lines. U0126 was added to the transfected cells as indicated. The reporter activity was normalized to that of the pMIR-REPORT vector containing no UTRs (-). Data represent mean \pm SD of three independent experiments.

(B) A scheme depicts localization of AP-1 binding sites relative to the *ZEB2*, *ZEB1*, *TWIST1* and *SNAI2* gene structures.

(C) Results of 5'RACE experiments mapping *ZEB2* and *ZEB1* transcription start sites. Note the transcriptional activation of *ZEB2* and repression of *ZEB1* by U0126 in A375P cells.

(D) ChIP using anti-FRA1 and anti-phospho-FRA1 (P-FRA1) antibodies revealed FRA1 interactions with DNA fragments containing AP-1 binding sites upstream of transcription start sites within *ZEB2*, *ZEB1*, *TWIST1* and *SNAI2* genes. ChIP with an anti-PolIII antibody and negative IgG was used as positive and negative controls. Input shows amplification of DNA that was sheared but not subjected to immunoprecipitation.

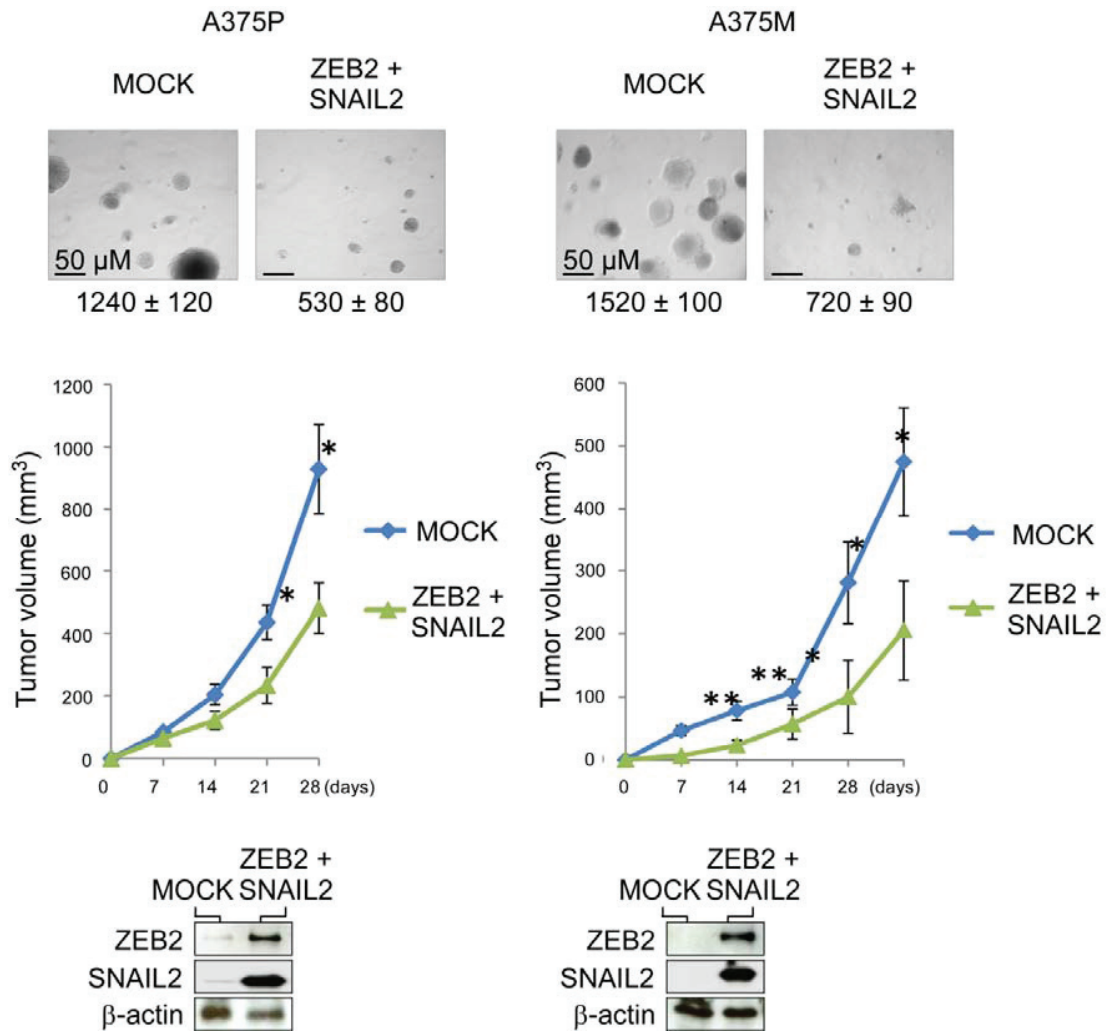
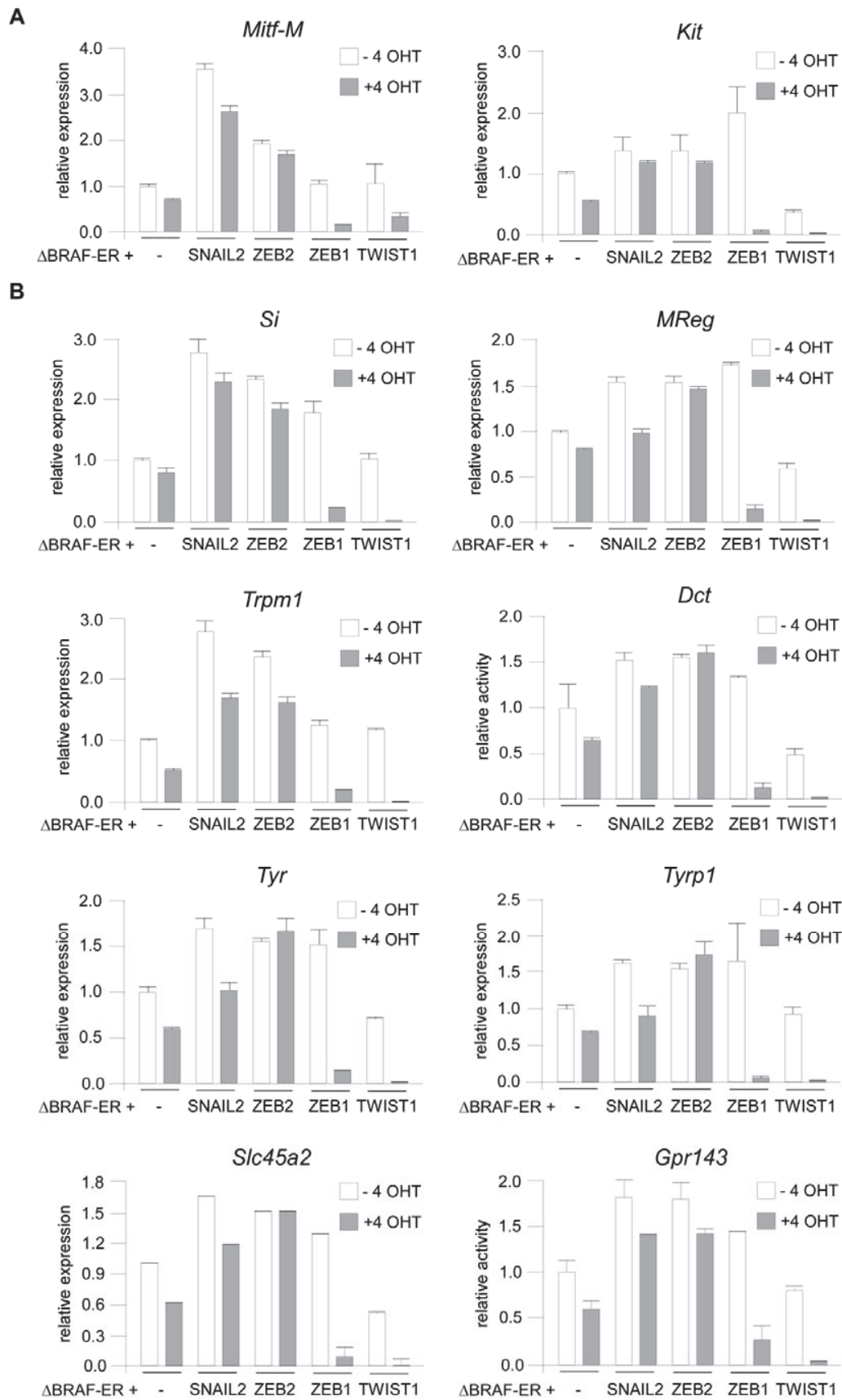


Figure S4, related to Figure 6.

EMT-TF reprogramming impacts on tumorigenicity of melanoma cells.

ZEB2 and SNAIL2 were ectopically expressed in A375P and A375M melanoma cell lines. Tumorigenicity was examined using a soft agar colony assay (top panels) or by xenografting cells in immunocompromised mice. The graphs illustrate the mean tumor size in each group of mice (n=5). Error bars represent standard error of the mean. Significance was analyzed using one tail t test. * p<0.05; ** p<0.01. Note that simultaneous expression of exogenous ZEB2 and SNAIL2 reduces colony formation in soft agar and alleviates tumor growth in xenografted mice.



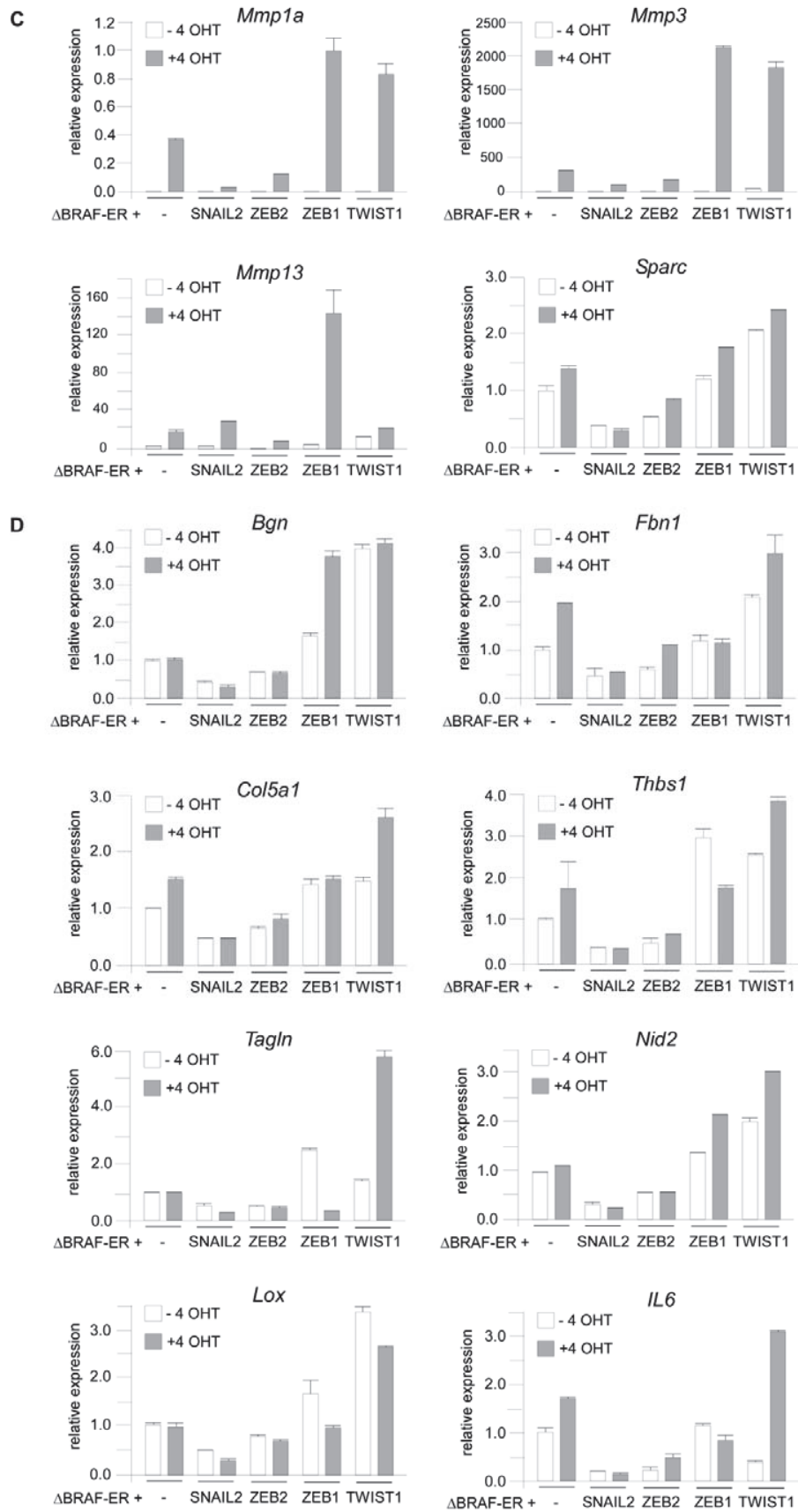


Figure S5, related to Figure 7.

Validation of the array data.

Expression of indicated genes from the following clusters was validated by qPCR.

(A), differentiation; (B), target genes of MITF; (C), invasion; (D), TGF- β pathway.

Data show mean \pm SD of triplicate experiments.

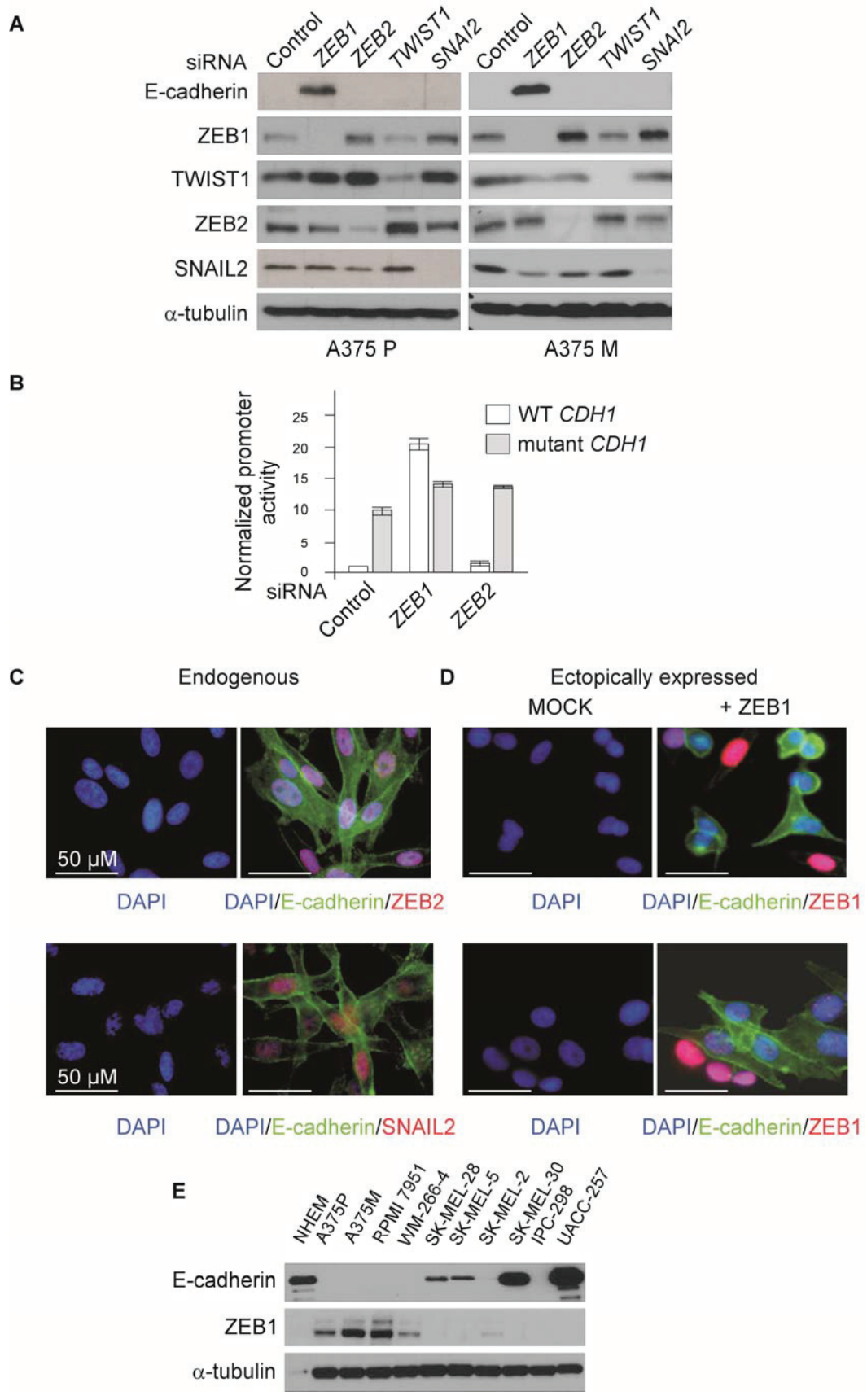


Figure S6, related to Figure 8.

ZEB1 represses *CDH1* expression in melanoma cells.

(A) Analysis of the effect of EMT-TF depletion on the expression of E-cadherin and other EMT-TFs in A375P or A375M cells as assessed by immunoblotting.

(B) Impact of ZEB1 or ZEB2 depletion on *CDH1* promoter activity. Luciferase reporters containing either wild type or mutant E boxes (Bolos et al., 2003) were transiently expressed in A375M cells. Luciferase activity was determined in three independent experiments performed in duplicate with similar results. Results are mean \pm SD of a representative experiment.

(C) E-cadherin is co-expressed with ZEB2 and SNAIL2 in UACC-257 cells as demonstrated by immunofluorescent microscopy.

(D) Ectopic expression of ZEB1 down-regulates E-cadherin in UACC-257 melanoma cells.

(E) Expression levels of E-cadherin and ZEB1 are inversely correlated in a panel of melanoma cell lines.

SUPPLEMENTAL EXPERIMENTAL PROCEDURES

Constructs and cell lines

Lentiviral vector encoding BRAF^{V600E} (Denoyelle et al., 2006) and retroviral vector encoding a fusion protein consisting of Δ BRAF linked to the T1 form of the human estrogen receptor hormone-binding domain (Pritchard et al., 1995) was generously provided by Dr. Martin McMahon.

Murine HA-ZEB2, murine HA-ZEB1, human SNAIL2, human FLAG-TWIST1, and trans-species shRNA *TWIST1* in pBABE-Puro have been previously described (Ansieau et al., 2008; Morel et al., 2012). The HA-ZEB1 pCMV3.1TOPO expression vector was derived from the HA-ZEB1 pBABE-Puro retroviral construct. To analyze whether miR-200 regulates *ZEB1* and *ZEB2* in MM cells, we generated reporter constructs by cloning 3671-5125 bp and 3618-4935 bp 3'-untranslated sequences respectively of *ZEB1* and *ZEB2* genes (relative to ATG codons) into pMIR-REPORT vector (Invitrogen Carlsbad, CA, USA) vector. To determine *CDH1* promoter activity, we used luciferase reporter vectors containing either a wild-type E-cadherin promoter fragment (-178 - +92 bp) (WT-E-cad), or the same fragment with mutated E-boxes (mutant-E-cad) (Bolos et al., 2003).

Murine shRNA *Zeb1* in pLKO-1 (TRCN0000070819 = NM_011546.1-2785s1c1 and TRCN0000070821 = NM_011546.1-770s1c1) and shRNA *Fra1* (TRCN0000042687 = NM_010235.1-851s1c1 and TRCN0000042683 = NM_010235.1-664s1c1) were purchased from Sigma-Aldrich (St-Louis, MO, USA).

Melan-a cell line (kindly provided by Dorothy Bennett, St. George's Hospital Medical School, London, UK) and melan-a-derivatives were cultured in RPMI medium (Invitrogen) supplemented with 10% FBS (Cambrex), 100 U/ml penicillin-streptomycin (Invitrogen), 2 mM L glutamine (Invitrogen) and 100 nM PMA (Sigma-Aldrich). Δ BRAF-ER was activated by treatment with 50 nM 4-OH-Tamoxifen (Sigma-Aldrich). Primary adult normal human epidermal melanocyte cells (NHEMs) were purchased from Lonza GmbH (Cologne, Germany) and cultured in MBM4 medium supplemented with FBS, CaCl₂, rhFGF-B, PMA, rh-insulin, hydrocortisone, BPE, and endothelin3 (MGM4 bullet kit). WM-266-4, RPMI-7951, SK-MEL-5, and SK-MEL-28 melanoma cell lines were obtained from ATCC. IPC-298 and A375-derived cell lines were obtained from the German Collection of Microorganisms and Cell Cultures

(Leibniz Institut DSMZ, Braunschweig, Germany) and Wellcome Trust Functional Genomics Cell Bank (St. George's, University of London, UK) respectively. Cells were cultured according to the ATCC recommendation and treated with 10 μ M U0126, PD184352 (both purchased from Merck, Darmstadt, Germany), or 10 μ M PLX4720 (SeleckChem, Houston, TX, USA) or with DMSO for the indicated times. UM-UC-3 and RT112 carcinoma cells were cultured in DMEM medium supplemented with 10% FBS (GE Healthcare, Amersham, UK) and non-essential amino acids (Invitrogen).

Retroviral and lentiviral infection

4.10⁶ human embryonic kidney 293T cells were transfected with retroviral or lentiviral expression constructs (10 μ g) in combination with GAG-POL (5 μ g) and ENV expression vectors (10 μ g) using calcium phosphate. Viral stocks were collected 48 h post-transfection, filtered (0.45 μ m) and placed in contact of 2 x 10⁶ melanocytes or melanoma cells for 8 h in the presence of 8 μ g/ml polybrene. 48 h post-infection, cells were selected in presence of puromycin (1.5 μ g/ml), neomycin (100 μ g/ml) or hygromycin (25 μ g/ml) (all from Invitrogen).

siRNA

Transfections of siRNA were performed by electroporation with a single pulse of 250 V and 250 μ Fd by using the Gene Pulser Xcell electroporation system (Bio-Rad, Hercules, CA, USA).

List of siRNAs used for transient transfections:

Target name	siRNA sequence (sense strand)
<i>SNAI2</i>	GGACCACAGUGGCUCAGAA(UU)
<i>ZEB1</i>	GGACUCAAGACAUCUCAGUdTdG
<i>ZEB2</i>	GAACAGACAGGCUUACUUAAdTdT
<i>TWIST1</i>	ON-TARGET plus SMARTpool

siRNA were purchased from Ambion (Austin, TX, USA) or Dharmacon (Lafayette, CO, USA).

Soft-agar colony formation assay

Melan-a cells expressing Δ BRAF-ER or A375 MM cell lines were transduced with cDNA or shRNA retroviral or lentiviral expression vectors and selected with puromycin. Plates were prepared by coating with 0.75% low-melting agarose (Lonza) in growth medium and then overlaid with cell suspension in 0.45% low-melting agarose (2×10^4 cells/well for melan-a or 5×10^3 cells/wells for A375 cells). Melan-a cells were applied in a medium supplemented with 4-OHT (50 nM), PMA (100 nM) and puromycin (1.5 μ g/ml). Plates were incubated for 2-3 weeks at 37°C. Colonies were stained with crystal violet (1 mg/ml Sigma-Aldrich) and counted under microscope.

Transwell invasion assays

Melan-a/ Δ BRAF-ER cells infected with retroviral vectors expressing EMT-TFs, or MM cells with transiently depleted EMT-TFs with siRNAs (48 hours post-transfection) were seeded on matrigel-coated porous membranes (pore size, 8 μ m; BD Biosciences) in transwells. Cells were allowed to invade matrigel towards FBS gradients for 24 hours. Cells that did not migrate were removed using a cotton swab. The membranes were then fixed with methanol and stained with Gurr rapid staining kit (BDH). The number of invaded cells was determined by counting ten random fields using an inverted Nikon TE2000-U microscope.

Immunoblot analysis

Cells were washed twice with phosphate buffered saline (PBS) containing CaCl_2 and then lysed in a 100 mM NaCl, 1% NP40, 0.1% SDS, 50 mM Tris pH 8 RIPA buffer supplemented with a complete protease inhibitor cocktail (Roche, Mannheim, Germany) and phosphatase inhibitors (Sigma-Aldrich). Protein expression was examined by western blot using the anti-HA clone 11 (BabCO), anti-TWIST Twist2C1a (Abcam, Cambridge, MA, USA), anti-P-ERK1/2 (#9106, Cell Signaling

Technology, Danvers, MA, USA), anti-BRAF clone F-7 (sc-5284, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), anti-MITF clone C5 (Thermo Scientific, Huntville, AL, USA), anti-E-cadherin clone 36 (BD Biosciences), anti-ZEB1 H102 (Santa Cruz), anti-ZEB2 (Sayan et al., 2009), anti-ERK1/2 #9102 (Cell Signaling), anti-FRA1 sc-605 (Santa Cruz), anti Phospho-FRA1 #3880 (Cell Signaling), anti-ER HC20 (Santa Cruz) rabbit polyclonal antibodies, and the anti-SNAIL2 G-18 (Santa Cruz) goat polyclonal antibody for primary detection. The anti-SNAIL1 antibody was a gift from Dr Antonio Garcia de Herreros. Loading was controlled using the anti- β -actin clone AC-15 (Sigma-Aldrich), anti-Ku80 clone 7/Ku80) (BD Biosciences) or anti- α -Tubulin (T5168, Sigma-Aldrich) antibodies. Horseradish peroxidase-conjugated rabbit anti-mouse, goat anti-rabbit and donkey anti-goat polyclonal antibodies (Dako, Glostrup, Denmark) were used as secondary antibodies. Western blots were revealed using an ECL detection kit (Amersham) or a western-blotting Luminol reagent (Santa Cruz).

Immunofluorescence analysis

For immunofluorescent staining, cells were transfected with a ZEB1-expressing vector HA-ZEB1 pCMV3.1TOPO or mock-transfected, cultured for 3 days on coverslips and stained according to standard protocols. Briefly, cells were fixed with 4% PFA for 10 min at room temperature, permeabilized with 0.1% Triton X-100 and blocked with 10% FCS in DMEM. Slides were consecutively incubated with the indicated primary and then secondary antibodies. After counter staining with DAPI (Molecular Probes), cells were examined and photographed using a fluorescent Nikon TE2000-U microscope.

Immunohistochemistry

Sections (4 μ m) of formalin-fixed paraffin embedded (FFPE) nevi, melanoma and metastatic melanoma were rehydrated, heated in TE (10 mM Tris, 1 mM EDTA buffer, pH 9.0, or citrate buffer) in a 750W microwave oven at full power for 20 min and allowed to cool down for 20-30 min at room temperature. Sections were incubated in protein blocking solution (Novocastra, Newcastle, UK) and incubated at 4°C overnight in the presence of a primary antibody. Primary antibodies were: rabbit

monoclonal antibodies to human SNAIL2 (clone C19G7 Cell Signaling); rabbit polyclonal antibodies to human ZEB1 sc-H-102 (Santa Cruz Biotech), ZEB2 (Sayan et al., 2009), and TWIST1 sc-R20 (Santa Cruz Biotech); murine monoclonal antibody to human SNAIL1 (Franci et al., 2006), phospho-ERK1/2 #9102 (Cell Signaling) and E-cadherin #610181, (BD Biosciences). Detection was performed using the Novolink™ Polymer System, purchased from Novocastra. Staining was visualized in 3, 3'-diaminobenzidine (DAB) chromogen in Novolink DAB substrate buffer, for 5 min, counterstained in Mayer's Haematoxylin and mounted. Agarose-embedded cell pellets known to be positive or negative for EMT-TFs were used as controls.

Quantitative analysis of immunostaining

Positive staining was scored via the H-score (Kinsel et al., 1989), and three observers agreed the criteria for levels of positive staining. Four representative dermal fields were assessed; two from the superficial tumor close to the epidermal basal lamina in the papillary dermis and two from the deepest tumor sites within the reticular dermis, and a mean H-Score was calculated for both the superficial and deep sites. Superficial and deep sites of the metastatic lesions were also scored using the same criteria. Inter-observer agreement was measured using 12 randomly selected cases and an intra-class correlation coefficient (ICC) indicated high agreement (ICC = 0.92).

5'-RACE (Rapid amplification of cDNA ends)

ZEB2 and *ZEB1* transcription start sites were identified using RACE kit (Roche) according to the manufacturer's protocol. Total RNA was isolated from A375P cells treated or mock treated with 10 μ M U0126 for 24 h and used for the synthesis of the first strand cDNA using the SP2 primer complementary to the exon E2 of *ZEB2* or *ZEB1*. After purification, terminal deoxynucleotidyl transferase was used to add dA tail to 3'-end of cDNA. cDNA was amplified using the oligo-dT anchor primer and *ZEB2*- or *ZEB1*-specific primer pairs (*ZEB2*, TGTTGTGCCAGGGGTGTTCCAC and ACAATTCAGGAAAGATTTTTGTCATGG; *ZEB1*, GTCTGGTCTGTTGGCAGGTCATCC and TCCTCTGGTACACCTTCACAGTCAGC). Amplified DNA was analyzed in agarose gels. For *ZEB2*, DNA was gel-purified, cloned, and the sequence of 20 recombinant plasmid DNAs was determined.

Chromatin immunoprecipitation

Chromatin purification and precipitation was performed following manufacturer's protocols (Active Motif, Rixensart, Belgium). For each chromatin preparation, cells grown in a 70% confluent 15 cm plate were fixed with 1% formalin for 5 min at room temperature. Fixation was stopped by an excess of glycine; nuclei from collected cells were extracted using a Dounce homogenizer and precipitated by brief centrifugation. Chromatin was sheared using sonication with one quarter setting (25 seconds for 4 times on ice). Sheared chromatin was used for each precipitation or input control. Chromatin immunoprecipitation was performed using R-20 anti-FRA1 N-terminal antibody (sc-605, Santa-Cruz Biotech), anti-phospho-FRA1 peptide antibody (New England Biolabs) or negative or positive control antibodies included in the kit. After extensive washing of chromatin-protein G complex, the samples were eluted, reverse cross-linked and treated with Proteinase-K. Following inactivation of Proteinase-K, the sample was used for PCR amplifications using EMT-TF gene-specific or control primer pairs encompassing the AP-1 binding sequence elements. *GAPDH* control primers were from Active Motif).

List of primer pairs used for ChIP

<i>ZEB2</i> , AP-1	F, TGCACGTGAGAAAACCGTTTGGC R, GTGTTGTGACTCAGGAGGTGGGC
<i>ZEB1</i> , AP-1-1	F, ACTCATTCCGCTCTACTAAGGAGGC R, TGACCCGCGCAGCCCGGACTC
<i>ZEB1</i> , AP-1-2	F, CTCCTGGGAGGCTGTATTCTGAAG R, CAGTTCACCGTGGAACAAAGGAG
<i>SNAI2</i> , AP-1-1	F, TCCATCTGAAATTGTGGCAATTG R, GACATCTATTGGTCAGCTTCAGAAGAC
<i>SNAI2</i> , AP-1-2	F, GACGTCATAACATTCCCTTTCTCGC R, GCAATTGCCACAATTTTCAGATGGAC
<i>TWIST1</i> , AP-1	F, TGCAAACATGCCAAGTTTGCAG R, GGGACTACCTTCTTTGGGAATGC

Luciferase reporter assays

Cells were transiently transfected with luciferase reporter vectors along with the β -galactosidase expression vector, pCMV β -gal (Invitrogen). Forty-eight hours post-

transfection, cells were harvested, lysed; and the luciferase activity was measured with a Lumat LB9501 tube luminometer (Berthold). β -galactosidase activity was determined and used for the normalization of luciferase data.

Microarray processing and analysis

Δ BRAF-ER-melan-a cells expressing TWIST1, ZEB1, SNAIL2, or ZEB2 were treated with 4-OHT for 1 week before isolation of total RNA. Microarray processing and data analysis were performed on the ProfileXpert core facility (Bron, France). Total RNA (100 ng) was amplified and biotin-labeled using Kit GeneChip 3' IVT Express and procedures from Affymetrix (Santa Clara, CA, USA, <http://www.affymetrix.com>). Microarrays analyses were performed using high-density oligonucleotide arrays (Mouse Genome 430 2.0 Array, Affymetrix). Fifteen μ g of biotinylated cRNA were fragmented, and hybridization on chip was performed following Affymetrix protocol. Arrays were washed and stained with streptavidin-phycoerythrin using GeneChip Hybridization and Wash stain kit from Affymetrix in a Fluidics Station 450 according to the manufacturer's instructions. The arrays were scanned with a confocal laser (Genechip scanner 3000, Affymetrix).

CEL files were generated using the Affymetrix GeneChip Command Console (AGCC) software 3.0. The complete set of CEL files is available at the GEO database under accession number Geo39030. The obtained data were normalized with Affymetrix Expression Console software using Robust Multiarray Average (RMA) statistical algorithm. Data were analyzed using tools in Partek Genomic Suite 6.4 software (Partek Inc., St. Louis, MO, USA). The retained genes of interest were listed and classified according to their functions using Ingenuity Pathway Analysis and Ingenuity® iReport™ (Mountain View, CA, USA). Probeset intensities were summarized and normalized using RMA, and significant differential expression was determined by a moderated t-test (Limma) using a fold change cutoff of 2.

Transcriptional expression analysis

Total RNA was isolated using Trizol reagent (Sigma-Aldrich) and reverse transcribed using a high cDNA capacity reverse transcription kit (Invitrogen) following the manufacturer's instructions. Real-time PCR intron-spanning assays were designed using the ProbeFinder software (Roche). All reactions, including no-template controls

and RT controls were performed in triplicate on the 96-well StepOnePlus™ Fast Real Time PCR system (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Human *HPRT1* or mouse *Rplp0* was used for normalization. List of primer pairs and probes used:

Gene	Species	Probe	Primers
<i>ZEB1</i>	human	57	Applied Biosystems (Hs00232783_m1)
<i>ZEB2</i>	human	68	Applied Biosystems (Hs00207691_m1)
<i>TWIST1</i>	human	88	Applied Biosystems (Hs01675818_s1)
<i>SNAI2</i>	human	86	Applied Biosystems (Hs00950344_m1)
<i>HPRT1</i>	human	73	F, TGACCTTGATTTATTTTGCATACC
			R, CGAGCAAGACGTTTCAGTCCT
<i>Zeb1</i>	mouse	57	F, GCCAGCGTCATGATGAAAA
			R, TATCACAATACGGGCAGGTG
<i>Bgn</i>	mouse	40	F, CACTTGGACAACAACAAGCTG
			R, TGATGTTGTTGGAGTGCAGATA
<i>Col5a1</i>	mouse	79	F,GGGCAGAAGGGAAGCAAG
			R, GGCCTTGAGGACCGGTAG
<i>Dct</i>	mouse	6	F, GGCTACAATTACGCCGTTG
			R, CACTGAGAGAGTTGTGGACCAA
<i>Fbn1</i>	mouse	40	F, CAGTGGACCGGGAATGAC
			R, TGGGCAAATATCAGGATCTAATG
<i>Grp143</i>	mouse	18	F, GTATACTTGGTGATCAGGAGATCG
			R, CCTCCACACAGAGCAGCAC
<i>Ii6</i>	mouse	55	F, ACGGCCTTCCCTACTTCAC
			R, ACAGGTCTGTTGGGAGTGGT
<i>Kit</i>	mouse	15	F, GATCGCTCTGCGTCCTGTT
			R, CTTGCAGATGGCTGAGACG
<i>Lox</i>	mouse	48	F, CAGGCTGCACAATTTACC
			R, CAAACACCAGGTACGGCTTT

<i>Mitf-M</i>	mouse	27	F, CTAAGTGGTCTGCGGTGTCTC
			R, GGTTTTCCAGGTGGGTCTG
<i>Mmp13</i>	mouse	89	F, GCCAGAACTTCCCAACCAT
			R, TCAGAGCCCAGAATTTTCTCC
<i>Mmp1A</i>	mouse	94	F, TGTGTTTCACAACGGAGACC
			R, GCCCAAGTTGTAGTAGTTTTCCA
<i>Mmp3</i>	mouse	7	F, TTGTTCTTTGATGCAGTCAGC
			R, GATTTGCGCCAAAAGTGC
<i>Mreg</i>	mouse	6	F, TTCGTAATCAGCAGACCAAAGA
			R, CTGCCGCAGGGTGTAGATA
<i>Nid2</i>	mouse	10	F, ATGACCAGCACACTTGTATCTTG
			R, AGGTGTGACTGCCATCGAG
<i>Silver</i>	mouse	76	F, AGCTTCCTTCCCGTGCTT
			R, CACCAAGCCAGTCCTGATTC
<i>Slc45a2</i>	mouse	29	F, GAGATGCGGTCGTATCAGC
			R, TGATGCTTATGGCCCAGAT
<i>Sparc</i>	mouse	73	F, GCCCCTCAGCAGACTGAA
			R, GTCTCCTCCACCACGGTTT
<i>Tagln</i>	mouse	13	F, CCTTCCAGTCCACAAACGAC
			R, GTAGGATGGACCCTTGTTGG
<i>Thbs1</i>	mouse	22	F, CACCTCTCCGGGTTACTGAG
			R, GCAACAGGAACAGGACACCTA
<i>Trp1</i>	mouse	67	F, GGTGCGGGATGTAAAGAAGA
			R, TGTAGTTGCAGCGGTAGGC
<i>Tyr</i>	mouse	26	F, TCGTCACCCTGAAAATCCTAA
			R, CTGATCTGCTACAAATGATCTGC
<i>Tyrp1</i>	mouse	104	F, ATGGATATGGGTGCACGAG
			R, CCTTGTAAGTGAAGCCCTCCT
<i>Rplpo</i>	mouse	9	F, ACTGGTCTAGGACCCGAGAAG

			R, TCCCACCTTGTCTCCAGTCT
--	--	--	-------------------------

To analyze the expression of miRs, quantitative real-time PCR Taqman® MicroRNA assay (Applied Biosystems) was used. MiR-132, miR-345 and miR-191 were identified as the most appropriate endogenous control genes for miR expression. Selection of stable endogenous control genes was carried out using geNorm algorithm-based software.

SUPPLEMENTAL REFERENCES

Bolos, V., Peinado, H., Pérez-Moreno, MA., Fraga, MF., Esteller, M., Cano, A. (2003). The transcription factor Slug represses E-cadherin expression and induces epithelial to mesenchymal transitions: a comparison with Snail and E47 repressors. *J. Cell Sci.* 116: 499-511.

Denoyelle, C., Abou-Rjaily, G., Bezrookove, V., Verhaegen, M., Johnson, T.M., Fullen, D.R., et al. (2006). Anti-oncogenic role of the endoplasmic reticulum differentially activated by mutations in the MAPK pathway. *Nat. Cell. Biol.* 10, 1053-1063.

Francí, C., Takkunen, M., Dave, N., Alameda, F., Gómez, S., Rodríguez, R., Escrivà, M., Montserrat-Sentís, B., Baró, T., Garrido, M., et al. (2006). Expression of Snail protein in tumor-stroma interface. *Oncogene* 24, 5134-5144.

Kinsel, L.B., Szabo, E., Greene, G.L., Konrath, J., Leight, G.S., McCarty, K.S., Jr. (1989). Immunocytochemical analysis of estrogen receptors as a predictor of prognosis in breast cancer patients: comparison with quantitative biochemical methods. *Cancer Res.* 49, 1052-1056.

Pritchard, C.A., Samuels, M.L., Bosch, E., McMahon, M. (1995). Conditionally oncogenic forms of the A-Raf and B-Raf protein kinases display different biological and biochemical properties in NIH 3T3 cells. *Mol. Cell. Biol.* 15, 6430-6442.

Sayan, A.E., Griffiths, T.R., Pal, R., Browne, G.J., Ruddick, A., Yagci, T., Edwards, R., Mayer, N.J., Qazi, H., Goyal, S., et al. (2009). SIP1 protein protects cells from DNA

damage-induced apoptosis and has independent prognostic value in bladder cancer.
Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. *106*, 14884-14889.

B. Conclusion et perspectives

Ces résultats montrent que l'expression et la fonction des EMT-TFs diffèrent dans le mélanome comparé aux carcinomes et soulèvent des différences tissus-spécifiques. Au lieu d'une réactivation aberrante de l'ensemble des EMT-TFs, on observe au contraire un changement réversible dans le profil d'expression des EMT-TFs au cours de la mélanomagenèse. Ces résultats mettent ainsi en évidence deux classes d'EMT-TFs dans ce modèle :

- les premiers (SNAIL2 et ZEB2), exprimés dans les mélanocytes normaux, nécessaires à la différenciation cellulaire, jouent un rôle oncosuppresseur ;
- les seconds (TWIST1 et ZEB1), réactivés dans les cellules cancéreuses, pourraient coopérer avec l'oncogène BRAF dans la transformation cellulaire et l'initiation tumorale.

La transition d'un phénotype de différenciation vers un phénotype de prolifération cellulaire, en partie au moins dépendent de MITF, contribuerait ainsi à la transformation cellulaire.

A la suite de cet article, nous avons été contacté pour rédiger un commentaire sur les résultats que nous avons obtenus.

Research highlights: Antagonistic functions of EMT-inducers in melanoma development: implication for cancer cell plasticity

Geoffrey RICHARD, Alain PUISIEUX, Julie CARMEL

**Antagonistic functions of EMT-inducers in melanoma development:
implication for cancer cell plasticity**

RESEARCH HIGHLIGHT

Antagonistic functions of EMT-inducers in melanoma development: implications for cancer cell plasticity

Geoffrey Richard^{1,2,3,4,5,6}, Alain Puisieux^{1,2,3,4,5,6,7}, Julie Caramel^{1,2,3,4,5,6}

¹Inserm UMR-S1052, Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon, F-69008 Lyon, France

²CNRS UMR5286, Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon, F-69008 Lyon, France

³LabEX DEVweCAN, F-69000 Lyon, France

⁴Université de Lyon, F-69000 Lyon, France

⁵Université Lyon 1, ISPB, F-69000 Lyon, France

⁶Centre Léon Bérard, F-69008 Lyon, France

⁷Institut Universitaire de France, F-75000 Paris, France

Correspondence: Julie Caramel

E-mail: julie.caramel@lyon.unicancer.fr

Received: January 17, 2014

Published online: February 15, 2014

EMT-inducing transcription factors (EMT-TFs) of the SNAIL, TWIST and ZEB families are frequently reactivated during tumorigenesis. In carcinoma, in addition to promoting metastasis, they favor neoplastic transformation of epithelial cells by enabling escape from failsafe programs and providing cells with stem-like properties. We recently unveiled different functions and regulatory mechanisms of EMT-TFs in melanoma, a highly metastatic neural crest-derived cancer. A switch in expression is observed from SNAIL2 and ZEB2, which are expressed in melanocytes and behave as oncosuppressive proteins to TWIST1 and ZEB1, which are aberrantly reactivated in melanoma and foster neoplastic transformation of melanocytes. This reversible switch in EMT-TF expression driven by a MEK-ERK-FRA1 pathway represents a novel independent factor of poor prognosis in patients with malignant melanoma. We herein discuss cell type specific biological functions of EMT-TFs in terms of cancer cell plasticity.

Keywords: EMT; melanoma; MITF; tumor suppression; melanocyte differentiation; cancer cell plasticity

Cancer cell & Microenvironment 2014; 1: e61. doi: 10.14800/ccm.61; © 2014 by Geoffrey Richard, et al.

Epithelial-mesenchymal transition (EMT) is an essential program during embryonic development. EMT drives the reversible reprogramming of polarized epithelia into mesenchymal cells by providing motility properties. This cellular plasticity process, tightly regulated in response to microenvironmental signals, is driven by a network of embryonic EMT-inducing transcription factors (EMT-TFs) mainly represented by the SNAIL, TWIST and ZEB protein families. Aberrant reactivation of this embryonic process is frequently observed during tumorigenesis and it has been particularly studied in tumors of epithelial origin,

carcinomas^[1,2]. Primarily implicated in the invasion-dissemination-metastasis cascade^[3,4,5], aberrant expression of EMT-TFs was also shown to foster malignant transformation. EMT-TF's oncogenic potential mainly relies on their ability to promote escape from oncogene-induced senescence and apoptosis by interfering with p53 and RB tumor suppressor pathways^[6,7,8,9]. These factors additionally provide cells with stem-like properties^[10,11]. While aberrant reactivation of EMT in epithelial cells is clearly oncogenic, functions of EMT-TFs in non-epithelial cells are largely unknown.

Based on the crucial role of EMT in the embryonic

neural crest ^[2], we recently analyzed expression and function of EMT-TFs in melanocytes and melanoma, a highly aggressive skin cancer originating from the neural crest. Malignant melanoma represents one of the deadliest cancer types at the metastatic stage. Mutually exclusive gain-of-function mutations are observed in melanoma in oncogenes such as NRAS (15-25%) or, most frequently, in BRAF (~50%). These mutations lead to the constitutive activation of the downstream MEK-ERK signaling pathway, providing tumor cells with proliferation and survival advantages. A substitution of glutamic acid for valine at position 600 (V600E) in the serine/threonine protein kinase BRAF is the most common mutation in BRAF in melanoma. BRAFV600E mutations are also found in up to 80% of human nevi, benign melanocytic lesions that can remain unchanged for decades. Melanoma progression involves transition from a radial to a vertical growth phase, characterized by invasion into the dermis and subcutaneous tissue. Although the term “EMT” cannot be formally defined, differentiated melanocytes express E-cadherin and loss of this epithelial marker, a hallmark of EMT in carcinoma, is observed in late-stage melanoma that will invariably metastasize ^[12].

We have unraveled different roles for EMT-TFs in melanoma compared to carcinoma ^[13]. We showed that during melanomagenesis, a reversible switch from a tumor-suppressive to an oncogenic EMT-TF expression pattern occurs. SNAIL2 and ZEB2 transcription factors drive a melanocytic differentiation program and behave as oncosuppressive proteins, whilst TWIST1 and ZEB1 possess oncogenic properties. We herein discuss the biological implications of these cell type specific functions for EMT-TFs in the context of cancer cell plasticity.

Expression of EMT inducers is considered to be transient during embryogenesis, EMT becoming latent in most adult tissues. Detection of EMT-TFs in the adult epithelial lineage mainly results from their aberrant reactivation in pathological conditions, such as organ fibrosis ^[14] and tumorigenesis ^[1]. EMT-TF expression analyses in normal human skin samples unexpectedly showed that SNAIL2 and ZEB2 are expressed in differentiated melanocytes, while TWIST1 and ZEB1 are not detected. As expected, adjacent epidermal cells were negative for these factors. Accordingly, endogenous expression of EMT-TFs has been described in other normal adult differentiated cell types (neurons, lymphocytes or endothelial cells), suggesting that their major roles in cell differentiation and normal tissue homeostasis may not be exclusively restricted to embryonic development.

More importantly, during the transition from nevi to malignant melanoma, a progressive loss of ZEB2/SNAIL2 expression and a gain in TWIST1/ZEB1 was observed in a melanoma progression series (Figure 1). Metastasis-free survival data analyses of melanoma patients further indicated that this switch from ZEB2/SNAIL2 to TWIST1/ZEB1 constitutes a major factor of poor prognosis. This first comprehensive study of the whole EMT-TF network in melanomas provides evidence consistent with other independent melanoma series showing either activation of TWIST1 ^[15], loss of ZEB2 ^[16] or SNAIL2 ^[17]. Moreover, within primary melanoma lesions, opposite gradients in the expression of ZEB2/SNAIL2 and TWIST1/ZEB1 from superficial to deep sites correlated with two major attributes of melanoma progression and aggressivity: namely MAPK pathway activation (as evidenced by the level of phosphorylation of the ERK kinase, resulting from BRAF or NRAS mutations and from additional mechanisms enabling escape of ERK from negative feedback loops); and E-cadherin loss, a hallmark of vertical growth and invasion into the dermis in aggressive stages. While SNAIL2/ZEB2 were paradoxically co-expressed with E-cadherin in normal melanocytes and senescent melanocytes from nevi, loss of E-cadherin expression in deep site of primary tumors correlated with strong ZEB1/TWIST1 activation (Figure 1). Therefore, in contrast to carcinoma where aberrant reactivation of EMT-TFs fosters neoplastic cell transformation and invasion, malignant melanoma progression is instead associated with a switch in the composition of EMT-TF expression from ZEB2^{High}/SNAIL2^{High}/ZEB1^{Low}/TWIST1^{Low} to ZEB2^{Low}/SNAIL2^{Low}/ZEB1^{High}/TWIST1^{High}.

Further *in vitro* analyses showed that EMT-TF reprogramming is directly regulated by the MEK-ERK signaling pathway. While activation of BRAF is sufficient to induce the switch in EMT-TF expression profile in normal melanocytes, inhibition of the MAPK pathway with BRAF/MEK inhibitors induces the opposite reprogramming in human melanoma cells. This reversible switch in EMT-TF expression is controlled downstream of ERK by a member of the AP-1 complex, the FRA1 (FOS related 1) transcription factor. Inter-regulations between FRA1 and EMT-TFs were recently shown to play a critical role in breast carcinoma cell plasticity ^[18,19]. More importantly, alteration of the switch (through inhibition of ZEB1/TWIST1/FRA1 or ectopic expression of ZEB2/SNAIL2) is sufficient to impair BRAF-dependent melanocyte transformation both *in vitro* and *in vivo* in xenograft experiments. Therefore, while ZEB1 and TWIST1 harbor oncogenic activities in melanoma, ZEB2 and SNAIL2 act as oncosuppressive

EMT-inducers in melanoma development

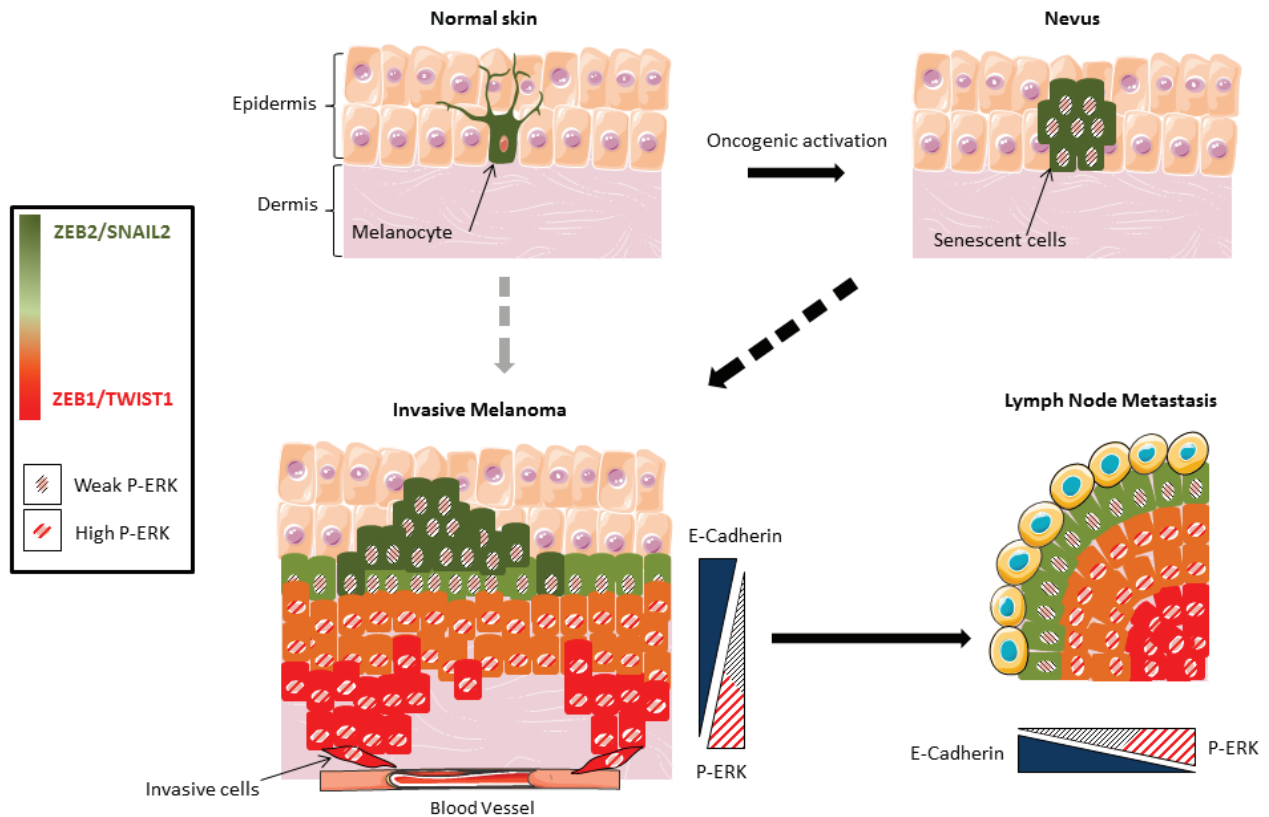


Figure 1. Schematic of EMT-TF expression at different stages of melanoma progression. Development of malignant melanoma is a multistep process relying on a series of genetic alterations. A first oncogenic event (such as BRAF/NRAS mutation) triggers melanocytes proliferation, which generally induces senescence and formation of nevi (benign lesions). ZEB2 and SNAIL2 are still detected in nevi, presumably because of various negative feedback mechanisms suppressing MEK-ERK signaling. While acquisition of secondary genetic events is required for transition to malignant cells, progression to primary melanoma does not always involve a nevus stage. Elevation of the MEK-ERK signaling pathway (as evidenced by the level of phosphorylated ERK, P-ERK) in primary melanomas results in a tendency towards loss of ZEB2 and SNAIL2 and gain of ZEB1 and TWIST1 expression. Melanoma cells can then invade the dermis, enter the blood vessels and metastasize. Only a few millimetres of dermal invasion are needed for the tumor to spread. Of note, the gradients in ZEB2/SNAIL2 and ZEB1/TWIST1 expression are correlated with E-cadherin and P-ERK gradients in both primary tumors and lymph node metastases.

proteins in this specific neural-crest derived lineage, in contrast to carcinoma.

Interestingly the ZEB2/SNAIL2 “differentiation pattern” of EMT-TF expression is reconstituted in cortical areas of lymph node metastases, and correlates with E-cadherin and phospho-ERK gradients, in a similar way as described in primary tumors (Figure 1). This may reflect early metastatic dissemination to lymph nodes, followed by similar EMT-TF reprogramming as seen in primary tumors, as suggested in epithelial tumors^[20]. ZEB1^{high}/TWIST1^{high} melanoma cells from medullar regions of lymph nodes may then fuel additional metastatic dissemination waves. Alternatively, highly plastic melanoma cells may re-differentiate at the metastatic site, as suggested in the model of carcinoma metastasis, where re-differentiation is crucial for metastatic colonization^[21]. Reversible EMT-MET cycles would thus be required for the completion of the

metastatic process and ZEB2/SNAIL2 might, in this model, equally contribute to the high metastatic propensity of melanomas as previously suggested^[22]. These data highlight the major role of tumor cell plasticity in both melanomas and carcinomas.

A tumor-suppressive role for SNAIL2 and ZEB2 in melanoma was unexpected, although such an activity was suggested for *Zeb2* mRNA through the activation of PTEN expression^[16]. The fact that both factors are normally expressed in human melanocytes fits with the idea that their oncosuppressive function may rely on their specific role in melanocyte differentiation. Melanoma phenotypic plasticity is dynamically regulated by the microphthalmia-associated transcription factor MITF, the master regulator of melanocyte development^[23]. According to the rheostat model proposed by Colin Goding, high MITF expression maintains differentiated status of melanocytes, intermediate MITF expression

sustains proliferation, while low MITF levels generate invasive and slow-proliferating cells with tumor-initiating properties [24]. Our data suggest that antagonistic functions of EMT-TFs in melanoma rely on their opposing effects on MITF expression and melanocyte differentiation. Gene expression profiles of BRAF-activated melanocytes indeed revealed that ZEB2/SNAI2 activate MITF and cause a melanocyte differentiation gene signature, while ZEB1/TWIST1 repress MITF and generate an invasion-associated gene signature [13]. Such a crosstalk between MITF and EMT-TFs is supported by studies in mutant mice and humans. *MITF* mutation results in various degrees of pigmentation defects in mice and is associated with Waardenburg syndrome type 2 in humans, a disorder with pigmentary abnormalities and sensorineural deafness. *Snai2* depletion in mice alters commitment of neural crest cells into melanoblasts, leading to skin depigmentation on the ventral body and a white forehead [25], and *SNAI2* homozygous deletions are found in some patients with Piebaldism and Waardenburg syndrome type 2D [26]. Moreover, *SNAI2* was shown to correlate with MITF expression during melanoma progression [17]. In a similar way, *Zeb2* depletion in mice results in neural crest cell defects [27] and *ZEB2* heterozygous mutations are observed in Mowat-Wilson syndrome, a mental retardation syndrome characterized by multiple congenital malformations, including Hirschsprung disease [28]. In contrast with ZEB2/SNAI2, but consistently with our model, ZEB1 was shown to repress *MITF* and alter pigmentation in mice retina [29].

This implies that, depending on their respective role on cell differentiation in a given cell type, EMT-TFs may act either as oncoproteins or tumor suppressors. Additional work will be required to precisely unravel the molecular mechanisms mediating antagonistic functions for ZEB2 and ZEB1 in specific cell types, and therefore decipher the basis for the specificity of the tumor suppressor role of EMT-TF. Of note, targeted disruption of the *Zeb2* or *Zeb1* genes in mice revealed differences in expression during embryonic development, with specific spatio-temporal regulation and non-redundant functions in certain tissues (such as the lymphoid system) [30]. Moreover, *Zeb2* knock-out in the mouse embryo results in increased ZEB1 expression in paraxial mesoderm and in neural folds, supporting our results that ZEB2 can inhibit *ZEB1* expression in the melanocyte lineage. How can ZEB2 repress *ZEB1* in this specific cell type but not in a mesenchymal context? One hypothesis to explain the antagonistic functions between ZEB1 and ZEB2 could rely on differential recruitment of co-factors, as previously suggested for the regulation of the TGF β /BMP pathway [31,32]: both ZEB1 and ZEB2/SIP1

(SMAD interacting protein) bind SMADs, but while ZEB1 acts synergistically to activate transcription through binding to p300 co-activator, ZEB2 has the opposite role through binding the CtBP co-repressor.

In conclusion, these data highlight crucial roles for TWIST1 and ZEB1 in promoting cell dedifferentiation and plasticity of non-epithelial cells. By regulating MITF-dependent phenotype switching, deregulation of the EMT-TF network contributes to malignant progression of melanoma. Therefore, targeting the EMT-TF network represents an attractive treatment strategy for metastatic melanomas that invariably develop resistance to BRAFV600 targeted therapy.

Acknowledgements

We are grateful to Stephane Ansieau and to members of the Eugene Tulchinsky laboratory who contributed to this work. We thank Sarah Kabani for critical reading of the manuscript. AP is supported by grants from the Institut National du Cancer (PLBI009), the Association pour la Recherche contre le Cancer (ARC), the Ligue Nationale contre le Cancer, the Comités de l'Ain et du Rhône, the LABEX DEVweCAN (ANR-10-LABX-0061) of Lyon university, within the program "Investissements d'Avenir" (ANR-11-IDEX-0007) operated by the French National Research Agency (ANR).

References

1. Peinado H, Cano A. New potential therapeutic targets to combat epithelial tumor invasion. *Clin Transl Oncol* 2006; 8:851-857. <http://dx.doi.org/10.1007/s12094-006-0148-z>
2. Thiery JP, Acloque H, Huang RY, Nieto MA. Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell* 2009; 139:871-890. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2009.11.007> PMID:19945376
3. Brabletz T. To differentiate or not--routes towards metastasis. *Nat Rev Cancer* 2012; 12:425-436. <http://dx.doi.org/10.1038/nrc3265> PMID:22576165
4. Spaderna S, Schmalhofer O, Wahlbuhl M, Dimmler A, Bauer K, Sultan A et al. The transcriptional repressor ZEB1 promotes metastasis and loss of cell polarity in cancer. *Cancer Res* 2008; 68:537-544. <http://dx.doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-5682> PMID:18199550
5. Yang J, Mani SA, Donaher JL, Ramaswamy S, Itzykson RA, Come C et al. Twist, a master regulator of morphogenesis, plays an

- essential role in tumor metastasis. *Cell* 2004; 117:927-939.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2004.06.006>
 PMid:15210113
6. Ansieau S, Bastid J, Doreau A, Morel AP, Bouchet BP, Thomas C et al. Induction of EMT by twist proteins as a collateral effect of tumor-promoting inactivation of premature senescence. *Cancer Cell* 2008; 14:79-89.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.ccr.2008.06.005>
 PMid:18598946
7. Maestro R, Dei Tos AP, Hamamori Y, Krasnokutsky S, Sartorelli V, Kedes L et al. Twist is a potential oncogene that inhibits apoptosis. *Genes Dev* 1999; 13:2207-2217.
<http://dx.doi.org/10.1101/gad.13.17.2207>
 PMid:10485844 PMCID:PMC317004
8. Morel AP, Hinkal GW, Thomas C, Fauvet F, Courtois-Cox S, Wierinckx A et al. EMT inducers catalyze malignant transformation of mammary epithelial cells and drive tumorigenesis towards claudin-low tumors in transgenic mice. *PLoS Genet* 2012; 8:e1002723.
<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pgen.1002723>
 PMid:22654675 PMCID:PMC3359981
9. Valsesia-Wittmann S, Magdeleine M, Dupasquier S, Garin E, Jallas AC, Combaret V et al. Oncogenic cooperation between H-Twist and N-Myc overrides failsafe programs in cancer cells. *Cancer Cell* 2004; 6:625-630.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.ccr.2004.09.033>
 PMid:15607966
10. Mani SA, Guo W, Liao MJ, Eaton EN, Ayyanan A, Zhou AY et al. The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell* 2008; 133:704-715.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2008.03.027>
 PMid:18485877 PMCID:PMC2728032
11. Morel AP, Lievre M, Thomas C, Hinkal G, Ansieau S, Puisieux A. Generation of breast cancer stem cells through epithelial-mesenchymal transition. *PLoS One* 2008; 3:e2888.
<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0002888>
 PMid:18682804 PMCID:PMC2492808
12. Alexaki VI, Javelaud D, Van Kempen LC, Mohammad KS, Dennler S, Luciani F et al. GLI2-mediated melanoma invasion and metastasis. *J Natl Cancer Inst* 2010; 102:1148-1159.
<http://dx.doi.org/10.1093/jnci/djq257>
 PMid:20660365 PMCID:PMC2914763
13. Caramel J, Papadogeorgakis E, Hill L, Browne GJ, Richard G, Wierinckx A et al. A Switch in the Expression of Embryonic EMT-Inducers Drives the Development of Malignant Melanoma. *Cancer Cell* 2013; 24:466-480.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.ccr.2013.08.018>
 PMid:24075834
14. Iwano M, Plieth D, Danoff TM, Xue C, Okada H, Neilson EG. Evidence that fibroblasts derive from epithelium during tissue fibrosis. *J Clin Invest* 2002; 110:341-350.
<http://dx.doi.org/10.1172/JCI0215518>
<http://dx.doi.org/10.1172/JCI200215518>
<http://dx.doi.org/10.1172/JCI15518>
 PMid:12163453 PMCID:PMC151091
15. Hoek K, Rimm DL, Williams KR, Zhao H, Ariyan S, Lin A et al. Expression profiling reveals novel pathways in the transformation of melanocytes to melanomas. *Cancer Res* 2004; 64:5270-5282.
<http://dx.doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-0731>
 PMid:15289333
16. Karreth FA, Tay Y, Perna D, Ala U, Tan SM, Rust AG et al. In vivo identification of tumor-suppressive PTEN ceRNAs in an oncogenic BRAF-induced mouse model of melanoma. *Cell* 2011; 147:382-395.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2011.10.032>
<http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2011.09.032>
 PMid:22000016 PMCID:PMC3236086
17. Shirley SH, Greene VR, Duncan LM, Torres Cabala CA, Grimm EA, Kusewitt DF. Slug expression during melanoma progression. *Am J Pathol* 2012; 180:2479-2489.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.ajpath.2012.02.014>
 PMid:22503751 PMCID:PMC3378849
18. Shin S, Dimitri CA, Yoon SO, Dowdle W, Blenis J. ERK2 but not ERK1 induces epithelial-to-mesenchymal transformation via DEF motif-dependent signaling events. *Mol Cell* 2010; 38:114-127.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.molcel.2010.02.020>
 PMid:20385094 PMCID:PMC2854677
19. Tam WL, Lu H, Buikhuisen J, Soh BS, Lim E, Reinhardt F et al. Protein kinase C alpha is a central signaling node and therapeutic target for breast cancer stem cells. *Cancer Cell* 2013; 24:347-364.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.ccr.2013.08.005>
 PMid:24029232
20. Husemann Y, Geigl JB, Schubert F, Musiani P, Meyer M, Burghart E et al. Systemic spread is an early step in breast cancer. *Cancer Cell* 2008; 13:58-68.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.ccr.2007.12.003>
 PMid:18167340
21. Ocana OH, Corcoles R, Fabra A, Moreno-Bueno G, Acloque H, Vega S et al. Metastatic colonization requires the repression of the epithelial-mesenchymal transition inducer Prrx1. *Cancer Cell* 2012; 22:709-724.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.ccr.2012.10.012>
 PMid:23201163
22. Gupta PB, Kuperwasser C, Brunet JP, Ramaswamy S, Kuo WL, Gray JW et al. The melanocyte differentiation program predisposes to metastasis after neoplastic transformation. *Nat Genet* 2005; 37:1047-1054.
<http://dx.doi.org/10.1038/ng1634>
 PMid:16142232 PMCID:PMC1694635
23. Widlund HR, Fisher DE. Microphthalmia-associated

transcription factor: a critical regulator of pigment cell development and survival. *Oncogene* 2003; 22:3035-3041.
<http://dx.doi.org/10.1038/sj.onc.1206443>
 PMid:12789278

24. Hoek KS, Goding CR. Cancer stem cells versus phenotype-switching in melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res* 2010; 23:746-759.
<http://dx.doi.org/10.1111/j.1755-148X.2010.00757.x>
 PMid:20726948

25. Sanchez-Martin M, Rodriguez-Garcia A, Perez-Losada J, Sagrera A, Read AP, Sanchez-Garcia I. SLUG (SNAI2) deletions in patients with Waardenburg disease. *Hum Mol Genet* 2002; 11:3231-3236.
<http://dx.doi.org/10.1093/hmg/11.25.3231>
 PMid:12444107

26. Sanchez-Martin M, Perez-Losada J, Rodriguez-Garcia A, Gonzalez-Sanchez B, Korf BR, Kuster W et al. Deletion of the SLUG (SNAI2) gene results in human piebaldism. *Am J Med Genet A* 2003; 122A:125-132.
<http://dx.doi.org/10.1002/ajmg.a.20345>
 PMid:12955764

27. Van de Putte T, Maruhashi M, Francis A, Nelles L, Kondoh H, Huylebroeck D et al. Mice lacking ZFH1B, the gene that codes for Smad-interacting protein-1, reveal a role for multiple neural crest cell defects in the etiology of Hirschsprung disease-mental retardation syndrome. *Am J Hum Genet* 2003; 72:465-470.
<http://dx.doi.org/10.1086/346092>
 PMid:12522767 PMCID:PMC379238

28. Dastot-Le MF, Wilson M, Mowat D, Collot N, Niel F, Goossens M. ZFH1B mutations in patients with Mowat-Wilson syndrome. *Hum Mutat* 2007; 28:313-321.
<http://dx.doi.org/10.1002/humu.20452>
 PMid:17203459

29. Liu Y, Ye F, Li Q, Tamiya S, Darling DS, Kaplan HJ et al. Zeb1 represses Mitf and regulates pigment synthesis, cell proliferation, and epithelial morphology. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2009; 50:5080-5088.
<http://dx.doi.org/10.1167/iovs.08-2911>
 PMid:19515996 PMCID:PMC3648851

30. Miyoshi T, Maruhashi M, Van de Putte T, Kondoh H, Huylebroeck D, Higashi Y. Complementary expression pattern of Zfh1 genes Sip1 and deltaEF1 in the mouse embryo and their genetic interaction revealed by compound mutants. *Dev Dyn* 2006; 235:1941-1952.
<http://dx.doi.org/10.1002/dvdy.20799>
 PMid:16598713

31. Postigo AA, Dean DC. Differential expression and function of members of the zfh-1 family of zinc finger/homeodomain repressors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97:6391-6396.
<http://dx.doi.org/10.1073/pnas.97.12.6391>

32. Postigo AA. Opposing functions of ZEB proteins in the regulation of the TGFbeta/BMP signaling pathway. *EMBO J* 2003; 22:2443-2452.
<http://dx.doi.org/10.1093/emboj/cdg225>
 PMid:12743038 PMCID:PMC155983

To cite this article: Richard G, et al. Antagonistic functions of EMT-inducers in melanoma development: implications for cancer cell plasticity. *Cancer Cell Microenviron* 2014; 1: e61. doi: 10.14800/ccm.61.

A la suite de ces résultats, les objectifs suivants étaient :

(i) d'une part de mieux caractériser le rôle oncogénique de TWIST1 et ZEB1 ; nous avons pour cela tout d'abord analysé *in vivo* dans un modèle de souris transgénique l'éventuelle coopération entre BRAFV600E et TWIST1 ;

(ii) d'autre part de déterminer les mécanismes soutenant le rôle oncosuppresseur de ZEB2/SNAIL2 et oncogénique de TWIST1/ZEB1 ;

(iii) enfin, d'étudier si les EMT-TFs pouvaient être impliqués dans l'émergence de résistance aux traitements.

C. Etude *in vivo* d'une éventuelle coopération entre BRAFV600E et TWIST1 dans un modèle murin de mélanome

Nos résultats *in vitro* ayant souligné que l'expression de TWIST1 ou de ZEB1 avec BRAFV600E augmentait le pouvoir transformant des cellules melan-a, j'ai cherché à évaluer cette coopération oncogénique *in vivo* dans un modèle de mélanome murin exprimant de manière conditionnelle la mutation BRAFV600E. Comme décrit précédemment, dans ce modèle élaboré dans l'équipe de Richard Marais, l'expression spécifique de BRAFV600E dans les mélanocytes adultes est assurée par le croisement avec les souris TyrCre-ERT2 qui expriment une version inductible de la Cre sous le contrôle du promoteur de la tyrosinase. L'induction se fait par le tamoxifène, un analogue des œstrogènes pouvant venir se fixer sur leur récepteur.

Le modèle de progression tumorale est le suivant : après activation de l'oncogène BRAFV600E spécifiquement dans les mélanocytes, la souris va présenter dans les 3 à 4 mois une hyperpigmentation de la peau, au niveau du dos, des oreilles, de la queue ou encore des pattes (Figure 25).

En 6 mois, on observe la formation de névi démontrés comme sénescents. En approximativement un an, les souris développent un mélanome unique non pigmenté et non métastatique.

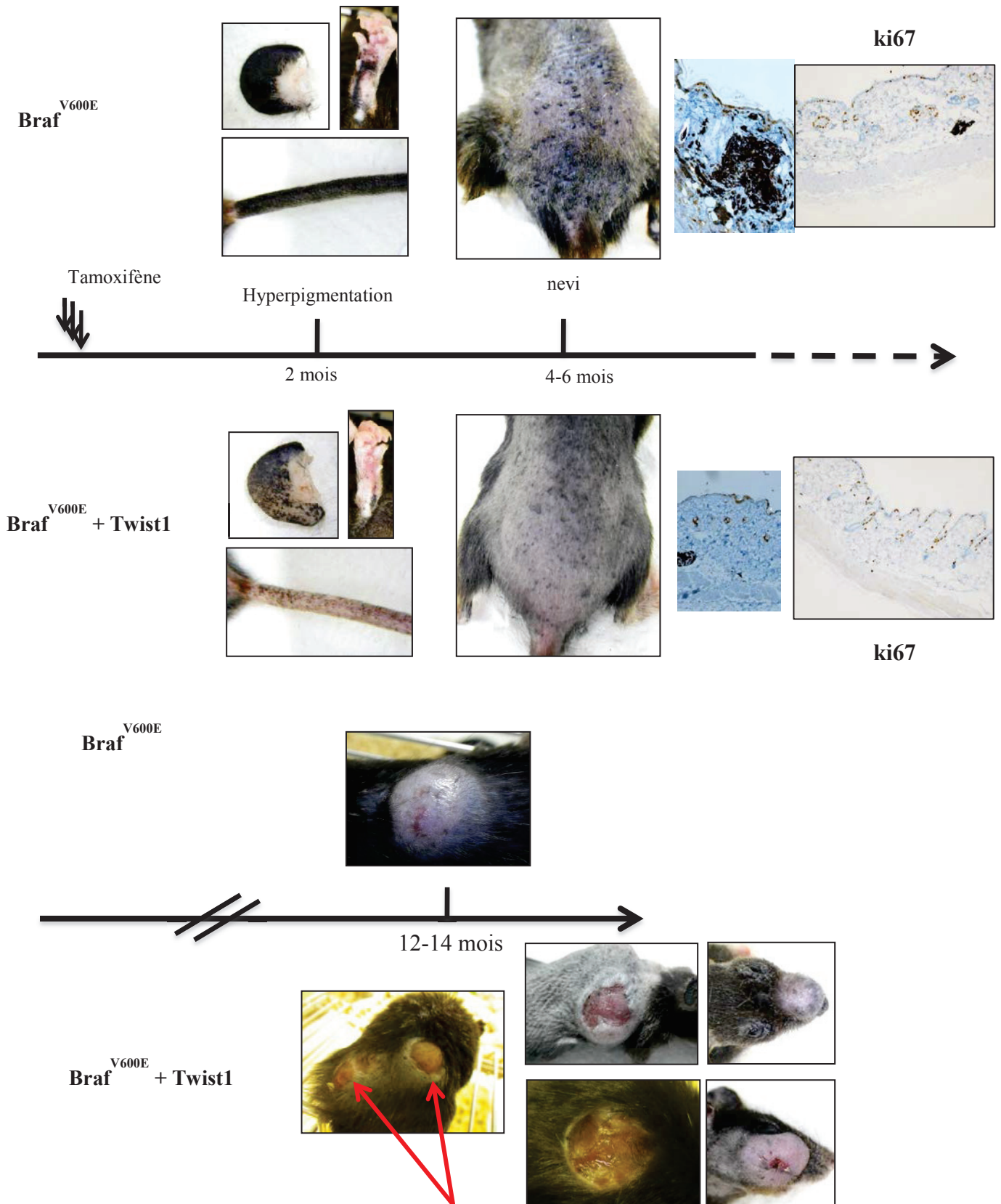


Figure 25 : Comparaison des modèles de mélanome murin BRAFV600E en présence ou non de TWIST1

L'activation de BRAFV600E et de TWIST1 se fait spécifiquement dans les mélanocytes grâce au système TyrCre-ERT2. A deux mois on observe une pigmentation moins prononcée en présence de TWIST1 (conséquence d'une dédifférenciation) et à 6 mois une réduction dans le nombre de névi qui n'est pas dû à un défaut de prolifération (ki67). En un an, les souris exprimant BRAFV600E et TWIST1 développent des mélanomes plus agressifs et parfois en plus grand nombre.

Ce modèle a été croisé avec le modèle de souris transgéniques TWIST1 inductible (Lox-Stop-Lox) généré par Douglas Spicer. J'ai ainsi généré trois groupes expérimentaux comportant 15 à 20 individus :

- le groupe BRAFV600E;TyrCre-ERT2,
- le groupe TWIST1;TyrCre-ERT2
- et le groupe BRAFV600E; TWIST1;TyrCre-ERT2.

J'ai tout d'abord mis en culture des mélanocytes primaires à partir des modèles murins BRAFV600E +/- TWIST1 et, tandis que l'activation de BRAFV600E au tamoxifène induit la sénescence oncogénique en une semaine, j'ai pu montrer que l'expression concomitante de TWIST1 permet aux cellules de continuer à proliférer et donc d'échapper à la sénescence induite par BRAFV600E.

J'ai alors émis l'hypothèse que l'expression conjointe de BRAFV600E et de TWIST1 pourrait outrepasser la sénescence induite par l'activation de l'oncogène, et ainsi diminuer la latence d'apparition des mélanomes.

Cette coopération pourrait aussi jouer sur le nombre de mélanomes, normalement unique, la synergie observée *in vitro* pourrait *in vivo* avoir pour conséquence l'émergence de multiples mélanomes chez un même animal. Enfin, le potentiel inducteur d'EMT de TWIST1 pourrait influencer sur la génération de métastases, absentes du modèle BRAFV600E.

Les souris TWIST1 n'ont jamais développé de phénotype particulier, ni aucune pathologie. Toutefois, une caractérisation immunohistochimique de marqueurs de différenciation mélanocytaire devrait nous aider à savoir si TWIST1 peut influencer leur développement.

Les souris BRAFV600E ; TWIST1 ont présenté aux temps précoces une hyperpigmentation moins marquée que celle de leurs congénères exprimant seulement BRAFV600E (Figure 25). Pour autant la prolifération n'était pas diminuée comme l'atteste les marquages KI67, suggérant que les mélanocytes puissent proliférer dans un phénotype dédifférencié. Puis ces souris ont présenté un nombre réduit de tumeurs bénignes que sont les nevi. La pénétrance (60-70%) et la latence au développement de mélanome était similaire dans les 2 cohortes BRAFV600E et BRAFV600E ; TWIST1 (environ 1 an). Cependant, de manière intéressante, près de 40% des souris BRAFV600E ; TWIST1 ayant développé un

mélanome sur le dos, en présentant un deuxième sur la joue, la nuque ou la queue (5 animaux sur 13). De plus, une fois apparus chez les souris BRAFV600E ; TWIST1, les mélanomes se développent plus rapidement que les mélanomes BRAFV600E suggérant une plus grande agressivité.

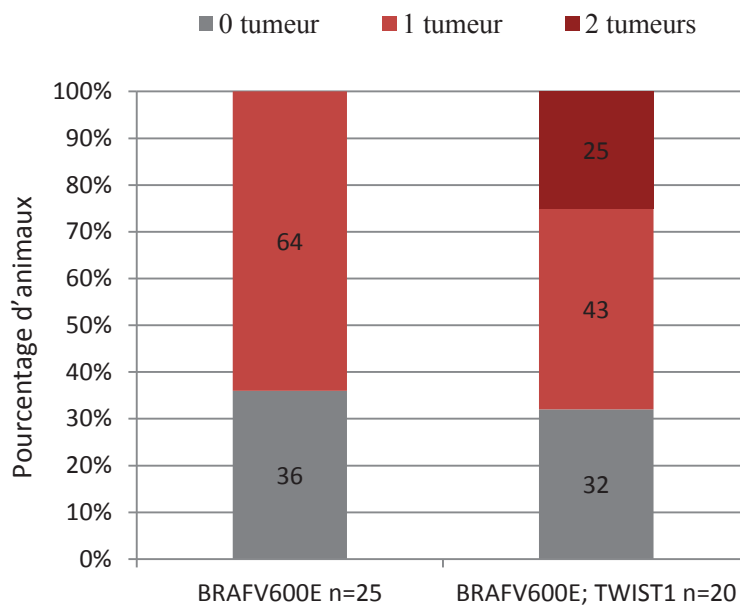


Figure 26 : Influence de TWIST1 sur le nombre de tumeur dans le modèle murin BRAFV600E

Un an après activation au tamoxifène 64% (16 sur 25) des animaux BRAFV600E ont développées un mélanome unique. Dans le groupe BRAFV600E ; TWIST1 68% (13 sur 20) des individus présentaient une tumeur et 40% d’entre eux en ont développé deux. TWIST1 ne modifie ni la latence, ni la pénétrance mais semble influencer le nombre de mélanome par souris.

Les mélanomes BRAFV600E ; TWIST1 ont montré une prolifération très active et à l’inverse une diminution importante des marqueurs de différenciation cellulaire (S100).

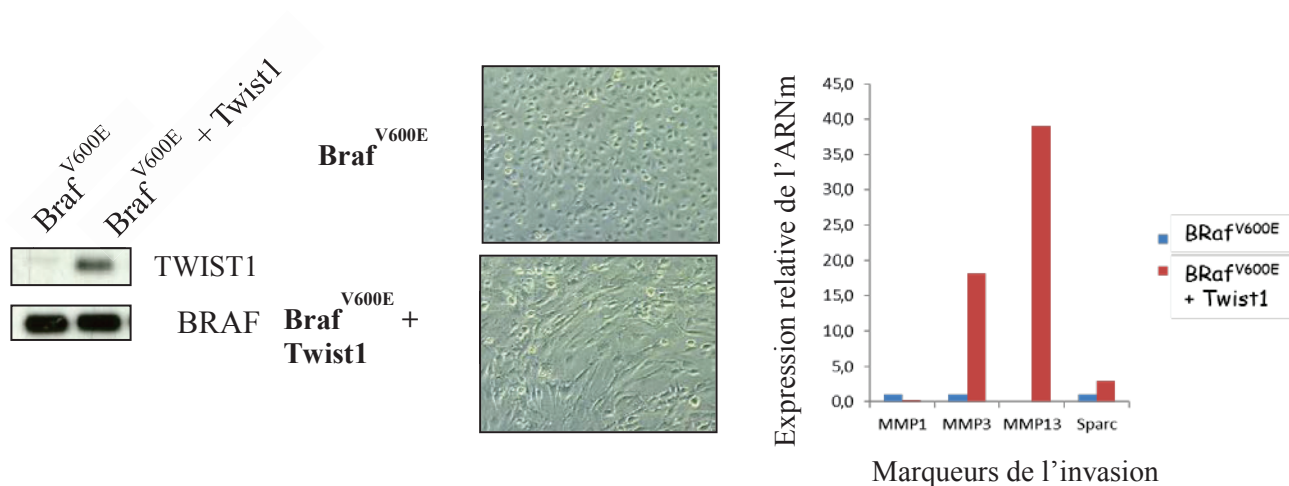
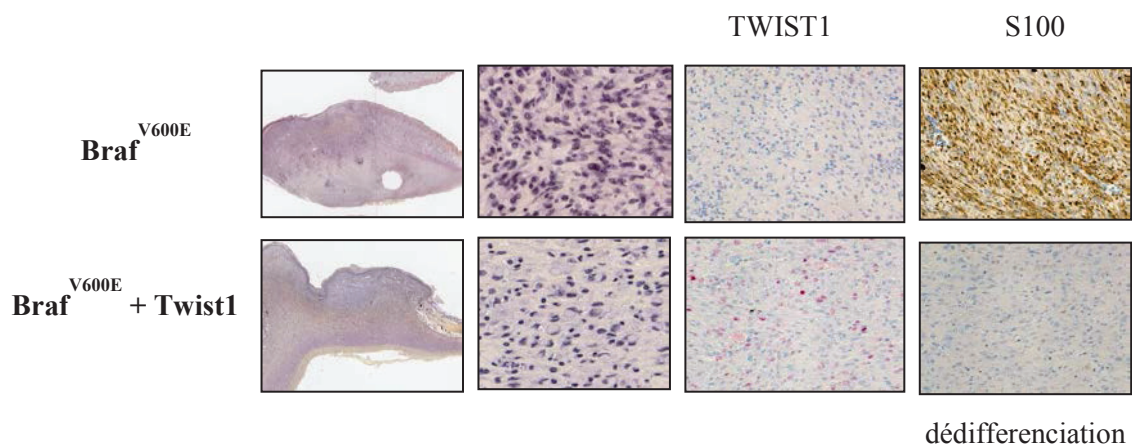


Figure 27 : Analyse et caractérisation des mélanomes BRAFV600E; TWIST1

Caractérisation immunohistochimique des mélanomes BRAFV600E et BRAFV600E ; TWIST1 entraîne une perte du marqueur de différenciation (S100).

In vitro les cellules de mélanomes BRAFV600E ; TWIST1 présentent un phénotype invasif comme le montre leur forme fusiforme. Ceci est corrélé à une surexpression de marqueur de l'invasion comme les métalloprotéases de la matrice extracellulaire (MMP).

Des lignées cellulaires établies suite à la mise en culture de ces mélanomes murins ont montré une différence de morphologie *in vitro* : les cellules BRAFV600E ; TWIST1 présentent un phénotype fusiforme et invasif comparé aux cellules BRAFV600E. Une analyse par QPCR sur ces différentes lignées de mélanomes indique que les cellules exprimant TWIST1 en plus de BRAFV600E sur-expriment des marqueurs spécifiques de l'invasion comme certaines Matrice Metalloprotéases (Figure 27).

Au total, ces résultats indiquent que TWIST1 ne permet pas de diminuer la latence au développement de mélanomes BRAFV600E *in vivo*, mais permet la formation de plusieurs mélanomes par souris, des mélanomes qui s'avèrent plus agressifs et invasifs. Ces travaux devront être poursuivis afin d'identifier les mécanismes différentiels mis en jeu dans les mélanomes BRAFV600 ; TWIST1 permettant d'expliquer comment TWIST1 contribue à l'agressivité du mélanome.

Article n°2: ZEB1-mediated melanoma cell plasticity enhances resistance to MAPK inhibitors

Geoffrey Richard, Stéphane Dalle, Marie-Ambre Monet, Amélie Boespflug, Roxane M. Pommier, Arnaud de la Fouchardière, Lauriane Depaepe, Romain Barnault, Garance Tondeur⁸, Stéphane Ansieau, Samia Mourah, Maxime Battistella, Céleste Lebbé, Luc Thomas, Alain Puisieux and Julie Caramel

Soumis en 2015 dans *Journal of Clinical Investigation*

A. Introduction

Les patients porteurs d'un mélanome métastatique muté BRAFV600 peuvent être traités par thérapie ciblée avec les inhibiteurs de BRAF mais 50% d'entre eux ne répondent pas au traitement (résistance innée) et les patients initialement répondeurs sont confrontés à des problèmes de résistance acquise. L'expression des EMT-TFs a été associée à de la résistance aux traitements dans les carcinomes. Ayant démontré que ZEB1 et TWIST1 sont réactivés dans le mélanome, et jouent un rôle oncogénique à la différence d'autres EMT-TFs, j'ai donc étudié l'éventuelle implication de ces facteurs dans la résistance aux traitements dans ce type tumoral.

J'ai tout d'abord pu observer une corrélation entre le niveau d'expression de ZEB1 et la sensibilité au vémurafenib : les lignées de mélanome intrinsèquement résistantes présentent un niveau de ZEB1 plus élevé que les lignées sensibles. Nous avons ensuite analysé sur une cohorte de patients si le niveau d'expression de ZEB1 était associé à la réponse au traitement. Ainsi, des analyses en immunohistochimie sur des coupes de tumeurs de patients BRAFV600 (CRB, CHLS) dont la réponse au vémurafenib était connue, ont mis en évidence qu'un fort taux de ZEB1 corrélait avec une résistance innée au vémurafenib.

J'ai ensuite généré des lignées résistantes en soumettant des lignées sensibles à des doses croissantes de PLX4032. Il s'est avéré que ces cellules, une fois devenues résistantes, présentaient une augmentation de l'expression de ZEB1. Un fort niveau d'expression de ZEB1 a également pu être observé dans des cellules de mélanomes de patients résistants au traitement, mises en culture au laboratoire après prélèvement d'ascites.

Une activation de l'expression de ZEB1 a enfin pu être mise en évidence par IHC sur des prélèvements après traitement au vemurafenib.

MITF ayant récemment été impliqué dans la résistance aux MAPKi, j'ai tout d'abord étudié le lien entre ZEB1 et MITF. Une corrélation inverse entre l'expression de ZEB1 et l'expression de MITF a pu être mise en évidence dans des bases de données de lignées et de tumeurs de mélanomes (CCLE et TCGA). Des analyses immunohistochimiques sur des mélanomes de patients ont montré une hétérogénéité intra-tumorale importante : les zones présentant un faible niveau d'expression de MITF montrent un niveau élevé de ZEB1 et inversement.

Afin d'étudier le rôle de ZEB1 sur l'état de différenciation, le potentiel de transformation et la résistance aux MAPKi, j'ai ensuite sélectionné différentes lignées de mélanomes : des lignées dans lesquelles ZEB1 est fortement exprimé et à l'inverse MITF faiblement (A375P et SKMEL5) et des lignées qui expriment peu de ZEB1 et beaucoup de MITF (501MEL).

L'expression ectopique de ZEB1 est suffisante pour réprimer MITF et induire une dédifférenciation des cellules, caractérisée par l'augmentation de marqueurs de cellules souches de mélanome tels que ABCB5, JARID1B ou CD271/p75. Ce phénotype corrèle avec un gain de pouvoir transformant comme démontré par des tests de croissance en agar mou. Les cellules sur-exprimant ZEB1 deviennent alors plus résistantes au vemurafenib mais aussi à la combinaison avec un inhibiteur de MEK. L'augmentation de l'expression de CD271 est potentialisée par le traitement au vemurafenib, suggérant que ZEB1 exacerbe un phénotype « souche » pour résister au traitement.

J'ai ensuite utilisé l'approche inverse de déplétion de ZEB1 par l'utilisation de shARN et montré une augmentation de l'expression de MITF et une diminution de l'expression des marqueurs souches. Cet engagement dans un programme de différenciation diminue drastiquement le pouvoir transformant de ces cellules de mélanome *in vitro* et *in vivo* en xénogreffe chez la souris nude, indiquant le rôle majeur de ZEB1 pour le maintien du caractère tumorigène de ces lignées de mélanome. De plus, l'inhibition de ZEB1 sensibilise les cellules au vemurafenib. En effet, dans des lignées qui répondent à la drogue, leur sensibilité est accrue : l'inhibition combinée de BRAF et de ZEB1 par shRNA a un effet synergique. Dans les lignées résistantes, la perte de ZEB1 induit de la mort cellulaire.

**Article n°2: ZEB1-mediated melanoma cell plasticity enhances resistance to
MAPK inhibitors**

ZEB1-mediated melanoma cell plasticity enhances innate and acquired resistance to MAPK inhibitors

Geoffrey Richard^{1,2,3,4,5}, Stéphane Dalle^{1,2,3,4,5,6}, Marie-Ambre Monet^{1,2,3,4,5}, Amélie Boespflug⁶, Roxane M. Pommier^{1,2,3,4,5}, Arnaud de la Fouchardière^{1,2,3,4,5,7}, Lauriane Depaepe⁸, Romain Barnault^{1,2,3,4,5}, Garance Tondeur⁸, Stéphane Ansieau^{1,2,3,4,5}, Samia Mourah⁹, Maxime Battistella¹⁰, Céleste Lebbé^{11, 12}, Luc Thomas^{1,2,3,4,5,6}, Alain Puisieux^{1,2,3,4,5,13} and Julie Caramel^{1,2,3,4,5}

¹ INSERM U1052, Cancer Research Center of Lyon, Lyon, F-69008, France.

² CNRS UMR 5286, Cancer Research Center of Lyon, Lyon, F-69008, France.

³ Université de Lyon, Lyon, F-69622, France.

⁴ Université Lyon1, ISPB, Lyon, F-69008, France.

⁵ Centre Léon Bérard, Lyon, F-69008, France.

⁶ Dermatology Unit, Hospices Civils de Lyon, CH Lyon Sud, 165 chemin du Grand Revoyet, 69495 Pierre Bénite Cedex, France.

⁷ Department of biopathology, Centre Léon Bérard, Lyon, France.

⁸ Department of biopathology, Hospices Civils de Lyon, CH Lyon Sud, 165 chemin du Grand Revoyet, 69495 Pierre-Bénite cedex, France.

⁹ APHP, Saint Louis Hospital Pharmacology-Genetic Laboratory Paris, INSERM U976, 75010, France.

¹⁰ APHP, Department of Pathology, Saint Louis Hospital, INSERM U 1165, 75010, Paris, France.

¹¹ APHP, Department of Dermatology, Saint Louis Hospital, 75010, Paris, France.

¹² University Paris 7 Diderot, INSERM U976, 75010, Paris, France.

¹³ Institut Universitaire de France, Paris, F-75005, France

*Correspondence: alain.puisieux@lyon.unicancer.fr ; julie.caramel@lyon.unicancer.fr

Abstract (200 words)

Targeted therapies like BRAF and MEK inhibitors are facing severe problems of innate and acquired resistance in BRAF-mutant melanoma. Identification of resistance mechanisms is required to identify novel therapeutic targets. ZEB1 transcription factor, a known inducer of EMT and invasive capacity, is now considered as a genuine oncogenic factor required for tumor initiation, cancer cell plasticity and drug resistance in carcinomas. Here we show that increased ZEB1 expression is observed in BRAF^{V600}-mutated melanoma cell lines and tumors samples from patients exhibiting primary or acquired resistance to BRAF inhibitors. ZEB1 overexpression is sufficient to drive the emergence of resistance to MAPK inhibitors *in vitro* by promoting a reversible transition towards a stem-like and tumorigenic phenotype characterized by low MITF and high p75 neural-crest cell marker expression. As a direct consequence, ZEB1 inhibition sensitizes naive melanoma cells to BRAF inhibitor, prevents the emergence of resistance upon chronic exposure *in vitro* and induces cell death in resistant melanoma cells. As a whole, our results show that ZEB1 is a major driver of phenotype switching mediated resistance to MAPK inhibitors and that combination strategies targeting EMT-like plasticity could represent an interesting strategy to reduce resistance to targeted therapy.

Highlights

- High ZEB1 expression is observed in BRAF^{V600}-mutated human melanoma cell lines and tumors exhibiting primary or acquired resistance to vemurafenib
- ZEB1 overexpression is sufficient to drive the emergence of resistance to MAPK inhibitors by promoting reversible conversions between a MITF^{high} / p75^{low} differentiated state and a MITF^{low} / p75^{high} stem-like and tumorigenic state
- ZEB1 inhibition sensitizes naive melanoma cells to BRAF inhibitors and induces cell death in resistant melanoma cells

Introduction

The recent emergence of targeted therapies directed against components of the mitogen-activated protein kinase MAPK pathway has led to unprecedented clinical benefits in metastatic melanoma. About 50% of melanomas exhibit a BRAF^{V600E} mutation that can be targeted with specific inhibitors, vemurafenib (or PLX4032) or dabrafenib (1). Unfortunately, resistance to these BRAF-inhibitors invariably develops in patients after only a few months through various mechanisms that generally lead to the reactivation of the BRAF-MEK-ERK pathway, or activation of the PI3K-AKT survival pathway (2). Fifty % of BRAF mutant melanoma patients also demonstrate intrinsic/innate resistance early on treatment. Combined treatment of BRAF and MEK inhibitors (such as trametinib or cobimetinib) have been shown to extend the median progression-free survival from 7.3 months in the vemurafenib group to 11.4 months in the combination-therapy group (3), it does not avoid the appearance of acquired resistance (4). Novel therapeutic targets therefore need to be identified in order to design more efficient combination therapies to prevent the emergence of resistance to these MAPK inhibitors (MAPKi).

We and others have recently demonstrated the role of epithelial-mesenchymal transition-inducing transcription factors, EMT-TFs, in the development of melanoma. EMT is a reversible embryonic process that is often reactivated during carcinoma progression (5;6), where it promotes invasion and metastatic dissemination. More recently, we and others have shown that EMT-TFs of the ZEB, SNAIL and TWIST families act as genuine oncogenic factors in epithelial cells, promoting cell transformation, stemness (7;8) and carcinoma initiation *in vivo* (9-11). ZEB1 is the main regulator of breast cancer cell plasticity allowing reversible conversions between non-CSCs (cancer stem cells) and CSCs (12). EMT

commitment has been shown to promote resistance to treatment, establishing a link with the resistant phenotype of CSCs (13-15).

In contrast to carcinoma, not all EMT-TFs exhibit oncogenic functions in melanoma. ZEB2 and SNAIL2 are expressed in normal adult melanocytes, and a switch in EMT-TFs expression occurs during melanoma progression: ZEB2 and SNAIL2 expression is lost while ZEB1 and TWIST1 are upregulated (16-19). This reversible switch in EMT-TFs expression is regulated by the MAPK pathway, at least in part through the AP1-FRA1 transcriptional complex, and represents a major risk factor for poor outcome in melanoma patients.

We herein wondered whether increased TWIST1/ZEB1 expression may enhance the resistance to MAPKi in melanoma, with the final aim of testing whether targeting these factors in combination with MAPKi could prevent the emergence of resistance. Higher ZEB1 expression was found in BRAF^{V600}-mutated cell lines and tumors exhibiting primary resistance to BRAF inhibitor (BRAFi) and ZEB1 expression was activated in BRAFi-acquired resistant melanoma cell lines and biopsies from patients relapsing while under treatment. ZEB1 overexpression in melanoma cell lines was sufficient to promote a reversible transition towards a MITF^{low}/p75^{high} stem-like and tumorigenic phenotype and to drive the emergence of resistance to MAPK inhibitors (MAPKi). As a direct consequence, ZEB1 inhibition sensitized naive melanoma cells to BRAF inhibitor, prevented the emergence of resistance upon chronic exposure *in vitro* and induced cell death in resistant melanoma cells. Collectively these data highlight ZEB1 as a major driver of phenotype switching mediated resistance to MAPKi.

Results

ZEB1 expression level is high in BRAF mutant melanoma cell lines and patients with primary resistance to vemurafenib

We first analyzed EMT-TFs expression in 28 BRAF^{V600}-mutated melanoma cell lines from the Cancer Cell Line Encyclopedia (CCLE), for which sensitivity to BRAF and MEK inhibitors are known. We observed a significant inverse correlation between ZEB1 mRNA expression level and sensitivity to the BRAFi PLX4720 (n=28, p=4.92.E-3) (Fig. 1A, Suppl. Table 1). Melanoma cell lines insensitive to BRAFi showed the highest ZEB1 expression level. A similar correlation was observed for ZEB1 and resistance to the MEKi AZD6244 (p=1.37.E-2) (Fig. 1A). In contrast, high ZEB2 expression correlated with low ZEB1 expression and higher sensitivity to BRAFi (Suppl. Table 1). No correlation with TWIST1 or SNAIL2 was found, indicating that not all EMT-TFs regulate melanoma sensitivity to MAPKi (Suppl. Table 1).

In order to investigate whether EMT-TF expression level is predictive of patient response to vemurafenib, we then performed immunohistochemical staining for ZEB1 and TWIST1 on 30 human BRAF^{V600}-melanoma samples from patients whose response to treatment was known. Half of them presented primary resistance (initially non-responders), and half were initially responders but relapsed after treatment with vemurafenib (developing acquired resistance). ZEB1 expression was activated in 80 % of the samples. It could be observed as a gradient from superficial to deep sites, as previously described (16), but interestingly ZEB1 was not only detected in the invasive front, but also in the bulk of the tumor (Suppl. Fig.1), suggesting that in addition to its role in the promotion of invasive capacities it might also have a role in tumor initiation. TWIST1 expression was also activated in about 75% of the cases, and most samples were ZEB1 and TWIST1 positive, although the

intensity and percentage of positive cells were lower for TWIST1 compared to ZEB1 (Suppl. Fig.1). A few samples showed high TWIST1 positivity despite ZEB1 negativity. A ZEB1 staining score was defined based on the intensity and the percentage of positive cells. Samples were divided into three groups (Fig. 1B): ZEB1 high corresponds to 100% positive cells with a strong intensity, ZEB1 intermediate (int) includes samples with 40-80% positivity with an intensity ranging from low to intermediate, ZEB1 low corresponds to samples with fewer than 10% positive cells with a low to moderate intensity. Interestingly, all ZEB1-high melanoma samples were in the primary resistance group (Fig. 1B). Moreover, some ZEB1-negative melanoma samples from patients with primary resistance showed strong TWIST1 staining, suggesting that TWIST1 may compensate for ZEB1. As a whole, 35% of primary resistant melanomas exhibited a high staining for ZEB1 or TWIST1. Initial high endogenous ZEB1/TWIST1 expression is thus associated to primary resistance to treatment.

ZEB1 expression is increased after development of acquired resistance upon chronic exposure to BRAFi in melanoma cells *in vitro* and in patients

In order to investigate the putative role of ZEB1 in the development of acquired resistance to BRAFi, we then established two BRAFi-resistant melanoma cell lines in culture. A375 and SKMEL5 human BRAF^{V600}-melanoma cells were treated with increasing doses of PLX4032 for 8 weeks to generate resistant cell lines, subsequently referred to as A375-R and SKMEL5-R. We validated that these cells exhibited a 10 times increase in their IC50 value for PLX4032 compared to the sensitive parental cells (Fig. 1C). These cells had thus become insensitive to BRAFi treatment. ZEB1 protein and mRNA expression levels showed a dramatic increase in the resistant cells compared to the parental ones (Fig. 1D). Expression of the FRA1 transcription factor, a known inducer of ZEB1 in melanoma, was also increased, while TWIST1 expression was not affected.

We also established two BRAFi resistant cell lines from ascites of patients with acquired resistance to vemurafenib (GOKA and ESP). These patients initially responded to BRAFi but developed acquired resistance within a few months after the treatment onset. Immunohistochemical analyzes of the tumor before treatment showed low ZEB1 and TWIST1 expression. These BRAFi resistant cells showed a high expression level of ZEB1 equivalent to that of resistant A375-R and SKMEL5-R cells (Fig. 1D).

To assess the relevance of our findings in a physiologically more relevant setting, we investigated ZEB1 and TWIST1 expression in a small cohort of patient tumors before and after vemurafenib treatment. In 4 out of 8 matched pre-treatment and post-relapse samples pairs, ZEB1 expression was either gained or further elevated. In a primary resistant case, ZEB1 was strongly expressed before treatment and the levels of expression were maintained upon vemurafenib treatment (Patient 1, Fig. 1E). In a sample from an initially-responding patient, both ZEB1 and TWIST1 were expressed at low level and then significantly activated in the relapsed tumor after treatment, both in intensity and percentage of positive cells: from 10 to 80% (Patient 2, Fig. 1E). Overall, ZEB1 increased expression is a common event in acquired resistance to vemurafenib. This prompted us to investigate how ZEB1 may promote intrinsic or acquired resistance to BRAFi in BRAF^{V600}-mutant melanoma.

High ZEB1 expression correlates with low MITF level

Previous expression microarray profiling in murine immortalized melan-a cells have revealed that ZEB1 or TWIST1 ectopic expression induced the down-regulation of the master regulator of melanocyte development, the microphthalmia-associated transcription factor MITF (16). MITF expression level is tightly regulated and controls melanoma cells phenotype. According to the MITF rheostat model, MITF regulates the transitions from a differentiated, cell cycle-arrested phenotype (MITF^{high}), to a proliferative phenotype (intermediate MITF)

and then to a quiescent stem-like phenotype (MITF^{low}) (20). While increased MITF expression can contribute to melanoma progression and resistance to BRAFi in a subset of melanomas (21), low MITF expression was conversely recently shown to predict intrinsic resistance to MAPKi (22;23), highlighting the dual function of this factor. We thus analyzed the crosstalk between EMT-TFs and MITF. We found a strong inverse correlation between ZEB1 and MITF expression in melanoma cell lines from the Cancer Cell Line Encyclopedia CCLE regardless of their BRAF/NRAS mutational status (n=61, p=4,08E-11) (Fig. 2A), while TWIST1 expression was not significantly correlated (Suppl. Table 1). This correlation between high ZEB1 and low MITF expression was confirmed in a collection of 467 primary and metastatic melanomas from The Cancer Genome Atlas TCGA (45-47) (p<2.2E-16) (Fig. 2A). Interestingly in this cohort ZEB1 expression was higher in BRAF^{V600} or NRAS^{Q61R}-mutated melanomas compared to BRAF/NRAS WT tumors, consistent with the role of the MAPK pathway in the regulation of ZEB1 (Suppl. Fig. 2). Importantly, MAPKi intrinsically resistant cell lines exhibited a ZEB1^{high}/MITF^{low} profile (Suppl. Table 1). Western-blot analyzes of a panel of BRAF^{V600}-mutated human melanoma cell lines confirmed this inverse correlation between ZEB1 and MITF, while TWIST1 protein level was similar in all these cell lines (Fig. 2B). We then determined the IC50 of PLX4032 by ATP assay by treating melanoma cell lines for 48 hours with this drug at a dose ranging from 10 nM to 1 μM. PLX4032 IC50 was higher in ZEB1^{high}/MITF^{low} cell lines (A375: 150nM; and SKMEL5: 300nM) compared to ZEB1^{low}/MITF^{high} cell line (501MEL: 80nM).

In order to investigate the relevance of this observation at the protein level in human samples, we analyzed MITF by immunohistochemical staining on the previously described cohort of human BRAF^{V600}-mutated melanomas for which ZEB1 and TWIST1 expression was known. While about half of the samples presented a strong and homogeneous expression of MITF (17/30), a heterogeneous staining was observed in the second half (13/30), with

clones exhibiting MITF loss or low expression. In most cases, lower MITF expression was found in a gradient from superficial to deep sites, and correlated with high ZEB1 expression (Fig. 2C). Moreover, the cases of intrinsic resistance to vemurafenib with the highest ZEB1 expression, exhibited low level of MITF. No significant correlation of TWIST1 with MITF was detected. As a whole, inverse correlation between ZEB1 and MITF expression is observed in BRAF^{V600}-mutated melanoma at the intra-tumoral level, and this ZEB1^{high}/MITF^{low} profile correlates with intrinsic resistance to MAPKi. However, it is noteworthy that in some acquired resistant melanoma cells, ZEB1 increased expression was not necessarily associated with MITF loss, both *in vitro* and in patients. Indeed, MITF was lost in A375-R but increased in SKMEL5R; MITF was low in GOKA but increased in ESP primary resistant cells (Fig. 1D, lower panel). If decreased MITF expression was found after treatment in patient 1, MITF expression was maintained or activated in most melanoma relapse samples after vemurafenib treatment. These observations suggest that ZEB1 function in MAPKi resistance may be mediated by MITF-dependent and MITF-independent mechanisms.

ZEB1 overexpression promotes stemness properties, cell transformation, and resistance to BRAF inhibitor

In order to further investigate the function of ZEB1 in melanoma cell plasticity and resistance to MAPKi, we selected two ZEB1^{high}/MITF^{low} human melanoma cell lines (A375 and SKMEL5) and one ZEB1^{low}/MITF^{high} cell line (501MEL), that maintains a differentiated phenotype with E-Cadherin expression (data not shown) (Fig. 2B). ZEB1 was ectopically expressed in these three cell lines through infection with ZEB1-expressing lentiviruses (Fig. 3A, suppl. Fig.3). As previously described, ZEB1 ectopic expression induced a down-regulation of MITF (Fig. 3B, suppl. Fig. 3). In addition to low levels of MITF, different

markers have been associated with the generation of melanoma initiating cells. We therefore analyzed the expression of ABCB5 and JARID1B (24;25) by Q-PCR, and found an activation upon ZEB1 ectopic expression. Analyses of the expression of the neural crest cell marker p75/CD271 (26;27) by western-blot similarly showed an up-regulation in ZEB1-over-expressing SKMEL5 cells (Fig. 3A). We further analyzed p75 cell surface repartition in the different cell populations by flow cytometry. ZEB1^{high}/MITF^{low} cell lines exhibited increased cell surface expression of p75 compared to 501MEL. ZEB1 ectopic expression led to an enrichment in the p75^{high} population in SKMEL5 cells (30 to 50%) (Fig. 3C). Moreover ZEB1 transient expression was able to activate a luciferase reporter regulated by the p75-promoter in A375 and SKMEL5 cells (Data not shown). Finally, p75 expression showed a positive correlation with ZEB1 in the tumors from the TCGA (R=0,29; p=1.16E-10) (Suppl. Fig. 4).

We then sought to analyze the oncogenic function of ZEB1 in melanoma cells. ZEB1 overexpression promoted the growth of A375 and SKMEL5 cells in semi-solid medium (Fig. 3C). A 50% increase in the number of colonies growing from ZEB1-over-expressing cells was observed compared to control cells, associated with a concomitant increase in the size of the colonies. ZEB1 ectopic expression also increased the clonogenic growth of ZEB1^{low} 501MEL cells (Suppl. Fig. 3). Of note, ectopic expression of TWIST1 did not significantly stimulate colony formation capacity in either of the three cell lines (Suppl. Fig.5), thus suggesting that ZEB1 is a stronger oncogenic factor than TWIST1 in melanoma.

We then addressed whether ZEB1 ectopic expression might enhance resistance to BRAFi. We treated A375 cells with PLX4032 at the IC50 dose of control cells (150nM), which lead to MAPK pathway inhibition, as assessed by a diminished level of ERK phosphorylation (Fig. 3D). Consistent with a role of the MAPK pathway in the control of ZEB1 and TWIST1 expression, levels of the two EMT-TFs were decreased upon PLX4032 treatment in the control cells, while MITF level was increased. Upon treatment with

PLX4032, ZEB1 expression still remained higher in ZEB1-over-expressing cells compared to control cells (Fig. 3D). ZEB1-mediated conversion towards a p75^{high} phenotype was significantly potentiated in A375 and SKMEL5 upon treatment with PLX4032 for 10 days (Fig. 3E). These results suggest that ZEB1 induces a reprogramming of the cells upon BRAF inhibition and that ZEB1^{high} cells are prone to induce a p75^{high} stem-like phenotype in response to treatment with PLX4032.

As a consequence, the ability of ZEB1-over-expressing A375 and SKMEL5 cells to grow in a clonogenic assay was only moderately affected in the continuous presence of 150 nM PLX4032 for 10 days, while the number of colonies was drastically decreased for control cells (Fig. 3F). Interestingly, in the ZEB1^{low} 501MEL cell line, while PLX4032 treatment drastically inhibited the growth of colonies in soft agar, ZEB1-overexpressing cells were less sensitive to the BRAFi (Suppl. Fig. 3). Of note, if TWIST1 ectopic expression was unable to confer resistance to PLX4032 in ZEB1^{high} cell lines (A375/SKMEL5) it could do so in 501MEL cells (Suppl. Fig. 3), suggesting that ZEB1 is the main driver of BRAFi resistance but that TWIST1 may complement for ZEB1 when this factor is not activated.

In line with this observation, chronic treatment of A375 and SKMEL5 cells with PLX4032 demonstrated that ZEB1 overexpression favored emergence of resistance *in vitro*. Indeed, in presence of ZEB1, PLX4032 dose had to be increased more rapidly and led to the emergence of resistant clones after 3 weeks only while 8 weeks were needed with control cells. Finally, since MEK inhibitors are now used in the clinic in combination with BRAFi, we addressed whether ZEB1 could also promote resistance to combined PLX4032 and GDC-0973 (cobimetinib) treatment and showed that ZEB1-expressing A375 and SKMEL5 cells were also more resistant to this combined treatment (Fig. 3F). Collectively, these data indicated that ZEB1 ectopic expression drives the emergence of resistance upon chronic

exposure to MAPKi by exacerbating a MITF^{low}/p75^{high} stem-like phenotype insensitive to MAPKi.

ZEB1 knock-down promotes cell differentiation and sensitizes naive melanoma cells to a BRAF^{V600} inhibitor

In order to assess the interest of targeting ZEB1 as a therapeutic strategy, ZEB1 was knocked-down in the ZEB1^{high} A375 and SKMEL5 cell lines through infection with a ZEB1-shRNA encoding lentivirus. Proliferation of the cells was not affected and neither senescence nor apoptosis was observed (data not shown). Increased MITF expression, as well as down-regulation of ABCB5, JARID1B and p75/CD271 was observed upon ZEB1-knock-down in A375 and SKMEL5 cells (Fig. 4A and B). ZEB1 knock-down promoted a conversion to a p75^{low} profile as assessed by flow cytometry (Fig. 4C).

Moreover, a 5-time decrease in the number of colonies growing in soft agar assay was observed upon ZEB1 knock-down in A375 and SKMEL5 cell lines (Fig. 4E and data not shown), clearly demonstrating that ZEB1 is required for melanoma cell transformation capacity. We then analyzed ZEB1 requirement for melanoma cells tumor growth *in vivo*. Since ZEB1-knock-down was shown to prevent tumor initiation from melan-a and B16F10 murine cells (16;28), we used IPTG-inducible ZEB1-shRNA to study the impact on tumor shrinkage on established tumors. Two ZEB1-shRNA that consistently reduced the levels of endogenous ZEB1 protein upon IPTG treatment *in vitro* were used (Fig. 4F and data not shown). A375 cells infected with shRNA-control or shRNA-ZEB1 IPTG-inducible were injected subcutaneously in nude mice. When tumors reached a 5mm-diameter, mice were treated with IPTG in the drinking water. ZEB1 knock-down led to a drastic decrease in A375 xenografted tumor growth, highlighting the potent anti-tumor effect of ZEB1 inhibition (Fig. 4F). Combined with the results obtained upon ZEB1 overexpression, our data indicate that

ZEB1 drives reversible conversion between MITF^{high}/p75^{low} differentiated and MITF^{low}/p75^{high} stem-like/initiating phenotypes and regulates subsequent tumorigenic capacities.

We next investigated whether knocking-down ZEB1 in initially PLX4032-naive melanoma cell lines could increase their sensitivity to this drug. ZEB1 knock-down in sensitive A375 and SKMEL5 melanoma cells inhibited the growth in a soft agar colony formation assay to a similar extent to BRAF inhibition (60%). Importantly, colony number was reduced by 90% in ZEB1 knock-down upon PLX4032 treatment, indicating a synergistic effect upon combined inhibition of BRAF and ZEB1 (Fig. 4D and E and suppl. Fig.6).

We then attempted to analyze the efficacy of such a combination *in vivo* in A375 xenografts. Mice were treated with vemurafenib through daily IP injection. Interestingly, ZEB1 knock-down alone was as efficient as vemurafenib treatment in decreasing A375 xenografted tumors growth, but the combined inhibition of BRAF and ZEB1 did not lead to a further decrease in tumor growth (Fig. 4F). This does not exclude that ZEB1 inhibition could prevent the emergence of resistance cells *in vivo*. We could indeed show *in vitro* that ZEB1 inhibition prevented the emergence of resistance upon chronic exposure to PLX4032 in A375 and SKMEL5 cells, with a significant delay in weeks till emergence of resistant cells (Data not shown).

ZEB1 knock-down decreases the viability of BRAFi-resistant melanoma cells

We finally investigated whether ZEB1 was required for the survival of resistant-melanoma cells. The consequences of ZEB1 knock-down were first analyzed in a vemurafenib intrinsically resistant cell line, the RPMI7951 (IC₅₀ = 8μM), with one of the highest ZEB1 expression level (Suppl. Table 1). ZEB1 knock-down in these cells increased their sensitivity to PLX4032, resulting in decreased clonogenic capacity (Fig. 5A and B). We

then knocked-down ZEB1 in the vemurafenib-acquired resistant cell lines A375-R and SKMEL5-R. While ZEB1 expression is rapidly down-regulated upon PLX4032 treatment in the parental naive cells (Fig. 3D), a high level of ZEB1 expression is maintained in these resistant cells in the presence of 6 μ M PLX4032 (Fig. 5A). shRNA knock-down of ZEB1 led to a dramatic decrease in their clonogenic growth, that was associated with an apoptotic response upon co-treatment with BRAFi, as shown by an increase in the abundance of cleaved PARP (Fig. 5A and B). ZEB1 inhibition also decreased the clonogenic growth of patient-derived BRAFi resistant ESP cells (Fig. 5B). Overall, these data show that ZEB1 knock-down decreases the viability of resistant melanoma cells in both MITF^{low} (RPMI7951, A375-R) and MITF^{high} (SKMEL5-R, ESP) cellular context.

Discussion

Aberrant activation of an epithelial–mesenchymal transition and subsequent generation of a cancer stem cell phenotype are considered a major cause of therapy resistance in carcinoma (15). Such a relationship was not previously investigated in melanoma, where characterization of resistance mechanisms to BRAF and/or MEK inhibitors remains a major issue. Melanomas harbour a high level of intra-tumoral heterogeneity that relies on an exacerbated cell plasticity allowing highly efficient reversible conversions between non-tumorigenic and tumorigenic states (29-31). According to this concept of phenotype switching, tumor progression does not necessarily rely on clonal evolution but rather on reversible reprogramming of signaling networks in large populations of cells. In parallel to “genetic” resistance to MAPKi, due to the acquisition of genetic mutations, affecting NRAS or MEK (32;33), the present study emphasizes melanoma cell plasticity as a potent driver of “phenotypic” resistance (34). Our findings demonstrate that the transcription factor ZEB1 is a crucial determinant of melanoma phenotypic plasticity, tumorigenicity and resistance to MAPKi. Data from cell lines and patients indicate that at least a subset of BRAF-mutant melanoma with high ZEB1 expression may be intrinsically indifferent to BRAFi and MEKi and that ZEB1 activation is frequently observed after acquisition of resistance upon chronic treatment with BRAFi. Functional studies revealed that ZEB1 overexpression is sufficient to drive the emergence of resistance to BRAFi alone or in combination with MEKi, while ZEB1 inhibition sensitizes naive melanoma cells to BRAFi, prevents the emergence of resistance upon chronic exposure *in vitro*, and decreases the viability of resistant cells.

Investigation of the underlying mechanisms *in vitro* uncovered that ZEB1 regulates reversible transitions from a drug-sensitive differentiated state to a drug-resistant stem-like phenotype (Figure 5C), associated with a down-regulation of MITF and direct or indirect

activation of several melanoma initiating cell markers, including the neural crest cell marker p75/CD271, a crucial determinant of melanoma cells colony-formation and tumorigenicity (26;27;35). Expression of two other markers that do not necessarily overlap with CD271 (36), the ABCB5 transporter and the histone demethylase JARID1B (24;25), were also regulated upon ZEB1 modulation.

We found a potent correlation between high ZEB1 and low MITF expression in various settings both in cell lines and in patient samples. Both ZEB1 and MITF are at least in part regulated by the MAPK pathway. While ZEB1 is down-regulated by PLX4032 at early time point, it is strongly up-regulated in resistant cells. MITF is upregulated after short treatment with PLX4032, but is generally lost in resistant cells, which is in favor of a role for lower MITF expression in the resistance to MAPKi. In support of our model, invasive MITF^{low} cells with high expression of WNT5A or of the Receptor Tyrosine Kinase AXL were recently shown to be more resistant to MAPKi (22;23;37). AXL, a known target of FRA1 that promotes EMT in epithelial cells is also strongly activated in resistant melanoma cells (38). However, the role of MITF in resistance to MAPKi is complex since both MITF high and low levels can result in BRAF inhibitor resistance (39). In line with this observation, cell lines and patient samples with intrinsic or acquired resistance to MAPKi could display a ZEB1^{high}/MITF^{high} profile. Furthermore, ZEB1 knock-down decreases the viability of resistant melanoma cells in both MITF^{low} and MITF^{high} context, suggesting that ZEB1 may act partly through MITF-independent mechanisms.

While high ZEB1 expression undoubtedly promotes an invasive phenotype in melanoma, including decreased E-Cadherin and increased expression of various MMP (16;40), our results reinforce the notion that ZEB1 additionally display intrinsic oncogenic functions. ZEB1 is expressed in the bulk of primary melanoma, its ectopic expression promotes stemness and tumorigenic features in melanoma cell lines and its knock-down

drastically decreases the tumorigenic growth of melanoma cells *in vivo*. Our results demonstrate that ZEB1 is a major driver of phenotype switching mediated resistance to MAPKi and highlight that it is not the EMT phenotype or invasive status itself but rather the specific functions of EMT-TFs that promotes resistance in melanoma. ZEB2 is in contrast associated with low ZEB1 expression and a differentiated, MAPKi-sensitive phenotype. As previously highlighted in terms of tumorigenic capacity, ZEB2 could therefore play antagonist function to ZEB1 in terms of resistance to treatment in melanoma. In line with our model, EMT-TF specific functions in resistance to treatment were previously reported in carcinoma: ZEB1 was previously shown to induce radioresistance through EMT-independent, Chk1-dependent mechanisms (41;42). Moreover, invasive phenotype and stemness properties may be uncoupled in carcinomas, since ZEB1 and TWIST1 exhibit a dose-dependent role in malignant progression. A lower threshold of ZEB1 or TWIST1 is sufficient for stemness and tumor initiation, whereas further induction is necessary for EMT induction, invasion and tumour metastasis (9;10).

While our study was mainly focused on ZEB1, TWIST1 is also frequently activated in melanoma. If TWIST1 is unable to confer resistance to BRAFi when ZEB1 expression is already high, our results indicate that TWIST1 can drive resistance in a ZEB1-low context (501MEL). Combined with the observation that some primary resistant melanoma negative for ZEB1 exhibit high TWIST1 expression, these results suggest that TWIST1 can confer resistance to vemurafenib in BRAF^{V600E} melanoma cells when ZEB1 is not already activated and might constitute a potential therapeutic target in a subset of melanoma.

As a whole, a better understanding of EMT-TFs functions in melanoma cell plasticity should lead to the design of novel combination therapies, combining targeting of specific EMT-TFs and BRAF inhibitors. Even if ZEB1 aberrant expression is more frequently found in BRAF^{V600}-mutated tumors (54%), it might still remain interesting to target ZEB1 as a

mediator of cell plasticity in a subset of NRAS^{Q61R}-mutated (29%) or BRAF and NRAS WT tumors (16%) with high ZEB1 expression (Suppl. Fig. 2). ZEB1 inhibition was shown to increase sensitivity to MAPKi, to prevent the emergence of resistance and to induce cell death in various melanoma cells with intrinsic or acquired resistance to BRAFi. The targeting of transcription factors being challenging, a strategy may thus consist in identifying ZEB1-target genes or epigenetic mechanisms regulating ZEB1-driven plasticity in order to overcome ZEB1-associated drug resistance. In this regard, the class I HDAC inhibitor mocetinostat was recently shown to interfere with ZEB1 expression and function through its target miR-203 and to restore sensitivity to chemotherapy in pancreatic cancer cells (43). A screening of molecules able to interfere with ZEB1 function may thus enable to restore MAPKi sensitivity.

References

1. Chapman,P.B., Hauschild,A., Robert,C., Haanen,J.B., Ascierto,P., Larkin,J., Dummer,R., Garbe,C., Testori,A., Maio,M. et al 2011. Improved survival with vemurafenib in melanoma with BRAF V600E mutation. *N. Engl. J. Med.* **364**:2507-2516.
2. Lito,P., Rosen,N., and Solit,D.B. 2013. Tumor adaptation and resistance to RAF inhibitors. *Nat. Med.* **19**:1401-1409.
3. Robert,C., Karaszewska,B., Schachter,J., Rutkowski,P., Mackiewicz,A., Stroiakovski,D., Lichinitser,M., Dummer,R., Grange,F., Mortier,L. et al 2015. Improved overall survival in melanoma with combined dabrafenib and trametinib. *N. Engl. J. Med.* **372**:30-39.
4. Flaherty,K.T., Infante,J.R., Daud,A., Gonzalez,R., Kefford,R.F., Sosman,J., Hamid,O., Schuchter,L., Cebon,J., Ibrahim,N. et al 2012. Combined BRAF and MEK inhibition in melanoma with BRAF V600 mutations. *N. Engl. J. Med.* **367**:1694-1703.
5. Morel,A.P., Hinkal,G.W., Thomas,C., Fauvet,F., Courtois-Cox,S., Wierinckx,A., Devouassoux-Shisheboran,M., Treilleux,I., Tissier,A., Gras,B. et al 2012. EMT inducers catalyze malignant transformation of mammary epithelial cells and drive tumorigenesis towards claudin-low tumors in transgenic mice. *PLoS. Genet.* **8**:e1002723.
6. Trimboli,A.J., Fukino,K., de,B.A., Wei,G., Shen,L., Tanner,S.M., Creasap,N., Rosol,T.J., Robinson,M.L., Eng,C. et al 2008. Direct evidence for epithelial-mesenchymal transitions in breast cancer. *Cancer Res.* **68**:937-945.
7. Mani,S.A., Guo,W., Liao,M.J., Eaton,E.N., Ayyanan,A., Zhou,A.Y., Brooks,M., Reinhard,F., Zhang,C.C., Shipitsin,M. et al 2008. The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell* **133**:704-715.
8. Morel,A.P., Lievre,M., Thomas,C., Hinkal,G., Ansieau,S., and Puisieux,A. 2008. Generation of breast cancer stem cells through epithelial-mesenchymal transition. *PLoS. One.* **3**:e2888.
9. Beck,B., Lapouge,G., Rorive,S., Drogat,B., Desaedelaere,K., Delafaille,S., Dubois,C., Salmon,I., Willekens,K., Marine,J.C. et al 2015. Different levels of Twist1 regulate skin tumor initiation, stemness, and progression. *Cell Stem Cell* **16**:67-79.
10. Liu,Y., Lu,X., Huang,L., Wang,W., Jiang,G., Dean,K.C., Clem,B., Telang,S., Jenson,A.B., Cuatrecasas,M. et al 2014. Different thresholds of ZEB1 are required for Ras-mediated tumour initiation and metastasis. *Nat. Commun.* **5**:5660.
11. Puisieux,A., Brabletz,T., and Caramel,J. 2014. Oncogenic roles of EMT-inducing transcription factors. *Nat. Cell Biol.* **16**:488-494.
12. Chaffer,C.L., Marjanovic,N.D., Lee,T., Bell,G., Kleer,C.G., Reinhardt,F., D'Alessio,A.C., Young,R.A., and Weinberg,R.A. 2013. Poised Chromatin at the ZEB1

- Promoter Enables Breast Cancer Cell Plasticity and Enhances Tumorigenicity. *Cell* **154**:61-74.
13. Mallini,P., Lennard,T., Kirby,J., and Meeson,A. 2014. Epithelial-to-mesenchymal transition: what is the impact on breast cancer stem cells and drug resistance. *Cancer Treat. Rev.* **40**:341-348.
 14. Polyak,K., and Weinberg,R.A. 2009. Transitions between epithelial and mesenchymal states: acquisition of malignant and stem cell traits. *Nat. Rev. Cancer* **9**:265-273.
 15. Singh,A., and Settleman,J. 2010. EMT, cancer stem cells and drug resistance: an emerging axis of evil in the war on cancer. *Oncogene* **29**:4741-4751.
 16. Caramel,J., Papadogeorgakis,E., Hill,L., Browne,G.J., Richard,G., Wierinckx,A., Saldanha,G., Osborne,J., Hutchinson,P., Tse,G. et al 2013. A Switch in the Expression of Embryonic EMT-Inducers Drives the Development of Malignant Melanoma. *Cancer Cell* **24**:466-480.
 17. Denecker,G., Vandamme,N., Akay,O., Koludrovic,D., Taminau,J., Lemeire,K., Gheldof,A., De,C.B., Van,G.M., Brochez,L. et al 2014. Identification of a ZEB2-MITF-ZEB1 transcriptional network that controls melanogenesis and melanoma progression. *Cell Death. Differ.* **21**:1250-1261.
 18. Shirley,S.H., Greene,V.R., Duncan,L.M., Torres Cabala,C.A., Grimm,E.A., and Kusewitt,D.F. 2012. Slug expression during melanoma progression. *Am. J. Pathol.* **180**:2479-2489.
 19. Tulchinsky,E., Pringle,J.H., Caramel,J., and Ansieau,S. 2014. Plasticity of melanoma and EMT-TF reprogramming. *Oncotarget.* **5**:1-2.
 20. Hoek,K.S., and Goding,C.R. 2010. Cancer stem cells versus phenotype-switching in melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res.* **23**:746-759.
 21. Johannessen,C.M., Johnson,L.A., Piccioni,F., Townes,A., Frederick,D.T., Donahue,M.K., Narayan,R., Flaherty,K.T., Wargo,J.A., Root,D.E. et al 2013. A melanocyte lineage program confers resistance to MAP kinase pathway inhibition. *Nature* **504**:138-142.
 22. Konieczkowski,D.J., Johannessen,C.M., Abudayyeh,O., Kim,J.W., Cooper,Z.A., Piris,A., Frederick,D.T., Barzily-Rokni,M., Straussman,R., Haq,R. et al 2014. A melanoma cell state distinction influences sensitivity to MAPK pathway inhibitors. *Cancer Discov.* **4**:816-827.
 23. Muller,J., Krijgsman,O., Tsoi,J., Robert,L., Hugo,W., Song,C., Kong,X., Possik,P.A., Cornelissen-Steijger,P.D., Foppen,M.H. et al 2014. Low MITF/AXL ratio predicts early resistance to multiple targeted drugs in melanoma. *Nat. Commun.* **5**:5712.
 24. Roesch,A., Fukunaga-Kalabis,M., Schmidt,E.C., Zabierowski,S.E., Brafford,P.A., Vultur,A., Basu,D., Gimotty,P., Vogt,T., and Herlyn,M. 2010. A temporarily distinct subpopulation of slow-cycling melanoma cells is required for continuous tumor growth. *Cell* **141**:583-594.

25. Schatton,T., Murphy,G.F., Frank,N.Y., Yamaura,K., Waaga-Gasser,A.M., Gasser,M., Zhan,Q., Jordan,S., Duncan,L.M., Weishaupt,C. et al 2008. Identification of cells initiating human melanomas. *Nature* **451**:345-349.
26. Civenni,G., Walter,A., Kobert,N., Mihic-Probst,D., Zipser,M., Belloni,B., Seifert,B., Moch,H., Dummer,R., van den Broek,M. et al 2011. Human CD271-positive melanoma stem cells associated with metastasis establish tumor heterogeneity and long-term growth. *Cancer Res.* **71**:3098-3109.
27. Boiko,A.D., Razorenova,O.V., van de Rijn,M., Swetter,S.M., Johnson,D.L., Ly,D.P., Butler,P.D., Yang,G.P., Joshua,B., Kaplan,M.J. et al 2010. Human melanoma-initiating cells express neural crest nerve growth factor receptor CD271. *Nature* **466**:133-137.
28. Dou,J., He,X., Liu,Y., Wang,Y., Zhao,F., Wang,X., Chen,D., Shi,F., and Wang,J. 2014. Effect of downregulation of ZEB1 on vimentin expression, tumour migration and tumourigenicity of melanoma B16F10 cells and CSCs. *Cell Biol. Int.* **38**:452-461.
29. Meacham,C.E., and Morrison,S.J. 2013. Tumour heterogeneity and cancer cell plasticity. *Nature* **501**:328-337.
30. Quintana,E., Shackleton,M., Sabel,M.S., Fullen,D.R., Johnson,T.M., and Morrison,S.J. 2008. Efficient tumour formation by single human melanoma cells. *Nature* **456**:593-598.
31. Quintana,E., Shackleton,M., Foster,H.R., Fullen,D.R., Sabel,M.S., Johnson,T.M., and Morrison,S.J. 2010. Phenotypic heterogeneity among tumorigenic melanoma cells from patients that is reversible and not hierarchically organized. *Cancer Cell* **18**:510-523.
32. Nazarian,R., Shi,H., Wang,Q., Kong,X., Koya,R.C., Lee,H., Chen,Z., Lee,M.K., Attar,N., Sazegar,H. et al 2010. Melanomas acquire resistance to B-RAF(V600E) inhibition by RTK or N-RAS upregulation. *Nature* **468**:973-977.
33. Van Allen,E.M., Wagle,N., Sucker,A., Treacy,D.J., Johannessen,C.M., Goetz,E.M., Place,C.S., Taylor-Weiner,A., Whittaker,S., Kryukov,G.V. et al 2014. The genetic landscape of clinical resistance to RAF inhibition in metastatic melanoma. *Cancer Discov.* **4**:94-109.
34. Roesch,A. 2015. Tumor heterogeneity and plasticity as elusive drivers for resistance to MAPK pathway inhibition in melanoma. *Oncogene* **34**:2951-2957.
35. Redmer,T., Welte,Y., Behrens,D., Fichtner,I., Przybilla,D., Wruck,W., Yaspo,M.L., Lehrach,H., Schafer,R., and Regenbrecht,C.R. 2014. The nerve growth factor receptor CD271 is crucial to maintain tumorigenicity and stem-like properties of melanoma cells. *PLoS. One.* **9**:e92596.
36. Cheli,Y., Bonnazi,V.F., Jacquelin,A., Allegra,M., De Donatis,G.M., Bahadoran,P., Bertolotto,C., and Ballotti,R. 2014. CD271 is an imperfect marker for melanoma initiating cells. *Oncotarget.* **5**:5272-5283.
37. Anastas,J.N., Kulikauskas,R.M., Tamir,T., Rizos,H., Long,G.V., von Euw,E.M., Yang,P.T., Chen,H.W., Haydu,L., Toroni,R.A. et al 2014. WNT5A enhances resistance of melanoma cells to targeted BRAF inhibitors. *J. Clin. Invest* **124**:2877-2890.

38. Sayan,A.E., Stanford,R., Vickery,R., Grigorenko,E., Diesch,J., Kulbicki,K., Edwards,R., Pal,R., Greaves,P., Jariel-Encontre,I. et al 2012. Fra-1 controls motility of bladder cancer cells via transcriptional upregulation of the receptor tyrosine kinase AXL. *Oncogene* **31**:1493-1503.
39. Wellbrock,C., and Arozarena,I. 2015. Microphthalmia-associated transcription factor in melanoma development and MAP-kinase pathway targeted therapy. *Pigment Cell Melanoma Res.* **28**:390-406.
40. Verfaillie,A., Imrichova,H., Atak,Z.K., Dewaele,M., Rambow,F., Hulselmans,G., Christiaens,V., Svetlichnyy,D., Luciani,F., Van den Mooter,L. et al 2015. Decoding the regulatory landscape of melanoma reveals TEADS as regulators of the invasive cell state. *Nat. Commun.* **6**:6683.
41. Zhang,P., Wei,Y., Wang,L., Debeb,B.G., Yuan,Y., Zhang,J., Yuan,J., Wang,M., Chen,D., Sun,Y. et al 2014. ATM-mediated stabilization of ZEB1 promotes DNA damage response and radioresistance through CHK1. *Nat. Cell Biol.* **16**:864-875.
42. Zhang,P., Sun,Y., and Ma,L. 2015. ZEB1: at the crossroads of epithelial-mesenchymal transition, metastasis and therapy resistance. *Cell Cycle* **14**:481-487.
43. Meidhof,S., Brabletz,S., Lehmann,W., Preca,B.T., Mock,K., Ruh,M., Schuler,J., Berthold,M., Weber,A., Burk,U. et al 2015. ZEB1-associated drug resistance in cancer cells is reversed by the class I HDAC inhibitor mocetinostat. *EMBO Mol. Med.* **7**:831-847.
44. Barretina,J., Caponigro,G., Stransky,N., Venkatesan,K., Margolin,A.A., Kim,S., Wilson,C.J., Lehar,J., Kryukov,G.V., Sonkin,D. et al 2012. The Cancer Cell Line Encyclopedia enables predictive modelling of anticancer drug sensitivity. *Nature* **483**:603-607.
45. 2015. Genomic Classification of Cutaneous Melanoma. *Cell* **161**:1681-1696.
46. Cerami,E., Gao,J., Dogrusoz,U., Gross,B.E., Sumer,S.O., Aksoy,B.A., Jacobsen,A., Byrne,C.J., Heuer,M.L., Larsson,E. et al 2012. The cBio cancer genomics portal: an open platform for exploring multidimensional cancer genomics data. *Cancer Discov.* **2**:401-404.
47. Gao,J., Aksoy,B.A., Dogrusoz,U., Dresdner,G., Gross,B., Sumer,S.O., Sun,Y., Jacobsen,A., Sinha,R., Larsson,E. et al 2013. Integrative analysis of complex cancer genomics and clinical profiles using the cBioPortal. *Sci. Signal.* **6**:11.
48. Anders,S., and Huber,W. 2010. Differential expression analysis for sequence count data. *Genome Biol.* **11**:R106.
49. the R core Team 2008. R : a language and environment for statistical computing.

Figure Legends

Figure 1: High ZEB1 expression is observed in BRAF^{V600}-mutated human melanoma cell lines and tumors exhibiting primary or acquired resistance to vemurafenib

A. ZEB1 expression correlates with BRAFi (vemurafenib) and MEKi (selumetinib) sensitivity in melanoma cell lines from the CCLE.

B. ZEB1 immunostaining in BRAF^{V600} tumors from patients initially responding or non-responding to vemurafenib treatment (n=28). ZEB1 expression is higher in BRAFi primary resistant melanomas.

C. PLX4032 IC50 of A375 and SKMEL5 sensitive and resistant cell lines.

D. Upper panel: Western-blot analyzes of ZEB1, TWIST1 and FRA1 in A375-R and SKMEL5-R versus the parental naive cells, and in 2 BRAFi-resistant patient-derived primary cell lines. GAPDH was used as a loading control. ZEB1 expression is increased in BRAFi-resistant melanoma cells upon chronic exposure to BRAFi *in vitro*. Lower panel: quantitative PCR analyzes of ZEB1 and MITF in the same cell lines.

E. Representative pictures of ZEB1 and TWIST1 immunostainings in 2 patient tumors, before and after treatment with vemurafenib.

Figure 2: High ZEB1 expression correlates with low MITF level in melanoma cell lines and tumors

A. Inverse correlation of ZEB1 and MITF mRNA expression in cell lines from the CCLE and tumors from the TCGA.

B. ZEB1, TWIST1 and MITF expression in a panel of melanoma cell lines assessed by western-blot analyzes. Tubulin was used as a loading control.

C. Representative pictures of ZEB1 and MITF immuno-staining in primary melanoma. ZEB1 aberrant activation in melanoma correlates with a MITF^{low} phenotype.

Figure 3: ZEB1 overexpression in melanoma cell lines induces switching towards a MITF^{low}/p75^{high} stem-like tumor initiating phenotype and promotes resistance to MAPK inhibitors

A. A375 and SKMEL5 cells were infected with retroviruses expressing ZEB1. Western-blot analyzes of ZEB1 and p75. GAPDH was used as a loading control.

B. Quantitative PCR analyzes of MITF, ABCB5 and JARID1B upon ZEB1 expression in A375 cells.

C. Soft agar colony formation assay in A375 and SKMEL5 cells upon ZEB1 expression. Scale bar = 50µM. Histograms represent quantitative analyzes (mean ± SD, n=3).

D. Western-blot analyzes of ZEB1, MITF, P-ERK, and TWIST1 expression in control or ZEB1-expressing cells +/- 150nM PLX4032 treatment for 24 hours. GAPDH was used as a loading control.

E. FACS analyzes of p75/CD271 expression in A375 and SKMEL5 cells upon ZEB1 expression, after 10 days treatment with 150nM (A375) or 300nM (SKMEL5) PLX4032.

F. Clonogenic assay +/- PLX4032 (150nM for A375 and 300nM for SKMEL5), +/- GDC-0973 (5nM) treatment for 10 days. The graph represents the mean number of colonies in 3 independent experiments.

Figure 4: ZEB1 knock-down in melanoma cells promotes the conversion towards a MITF^{high}/p75^{low} differentiated phenotype, inhibits tumor growth and sensitizes cells to BRAF inhibitor

A. Western-blot analyzes of ZEB1 and p75 upon infection with a ZEB1-shRNA. GAPDH was used as a loading control.

B. Quantitative PCR analyzes of MITF, ABCB5 and JARID1B upon ZEB1 knock-down in A375 cells.

C. FACS analyzes of p75/CD271 expression in A375 and SKMEL5 cells upon ZEB1 knock-down.

D. Western-blot analyzes of ZEB1 and P-ERK in shRNA-control or shRNA-ZEB1-expressing cells +/- 150nM PLX4032 treatment for 24 hours. GAPDH was used as a loading control.

E. Soft agar colony formation assay in A375 cells in the presence or absence of PLX4032 (300 nM). Histograms represent quantitative analyzes (mean \pm SD, n=3).

F. A375 cells were infected with an IPTG-inducible ZEB1-shRNA. Left panel: Western-blot analyzes of ZEB1 expression \pm IPTG. Right panel: 4.10^6 shRNA-Control or shRNA-ZEB1 A375 cells were injected subcutaneously in nude mice. When the tumor reached 5 mm in diameter, ZEB1 expression was silenced by providing IPTG (10mM) in the drinking water and vemurafenib (10mg/kg) was injected daily IP for 15 days. The mean tumor volume for 5 mice is represented (\pm SEM). Significance between shRNA-ZEB1 and control was analyzed using one tail t test. * p<0.05; ** p<0.01.

Figure 5: ZEB1 knock-down induces cell death in BRAFi-resistant melanoma cells

A. Western-blot analyzes showing ZEB1 knock-down in RPMI7951, A375-R, SKMEL5-R, GOKA and ESP cells. Cell death induction was assessed by PARP cleavage. GAPDH or actin were used as loading control.

B. Clonogenic assays with or without 6 μ M PLX4032, and with or without IPTG (200 μ M).

C. Schematic representation of the proposed model of ZEB1-mediated phenotype switching in MAPKi resistance.

Supplementary figures

Supplementary Figure 1: Representative pictures of ZEB1 and TWIST1 immuno-staining in the bulk of primary melanoma.

Supplementary Figure 2: Analyzes in the TCGA data set. Left panel: Whisker plot of ZEB1 mRNA expression in BRAF^{V600}, NRAS^{Q61R} or BRAF/NRAS WT melanoma from the TCGA. Right panel: Histogram showing that 80% of ZEB1^{high} melanomas exhibit a BRAF or NRAS mutation, while 50% of ZEB1^{low} melanomas are BRAF/NRAS WT.

Supplementary Figure 3: TWIST1 or ZEB1 ectopic expression in the 501MEL cell line. Western-blot analyzes and soft agar colony formation assay in the presence or absence of PLX4032.

Supplementary Figure 4: Correlation between ZEB1 and NGFR (p75) mRNA expression in the TCGA data set.

Supplementary Figure 5: TWIST1 ectopic expression in A375, SKMEL5 and 501MEL melanoma cells. Soft agar colony formation assays showing no significant difference compared to control cells.

Supplementary Figure 6: ZEB1 knock-down in SKMEL5 cells. Soft agar colony formation assay in the presence or absence of PLX4032

Supplementary Table 1: MITF, ZEB1, TWIST1 and ZEB2 mRNA expression and IC50 for BRAFi PLX4720 and MEKi AZD6244 in BRAF^{V600}-mutated melanoma cell lines from the CCLE.

Materials and methods

Human tumor samples and immunohistochemical analyzes

Melanoma tumor samples were obtained through the Biological Resource Center of the Hôpital Lyon Sud, Hospices Civils de Lyon, and of the Hôpital Saint Louis. Samples were used with the patient's written informed consent. This study was approved by the reviewal boards of Hospices Civils de Lyon. Immunohistochemical studies were conducted on a cohort of 30 melanomas with a BRAF^{V600} mutation, for which clinical data were known. For each case, a representative paraffin block was chosen. IHC was performed using 3- μ m-thick formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections, steam heat-induced epitope retrieval, the Ventana Benchmark XT platform (Ventana-Roche Tissue Diagnostics, Meylan France), Ultraview red detection and commercially available antibodies against ZEB1 (H102, rabbit polyclonal, Santa Cruz), MITF (C5/D5) mouse monoclonal (Roche) and TWIST1 Twist2C1a (Abcam, Cambridge, MA, USA). For all three antibodies, the staining was nuclear. The IHC staining was scored evaluating the intensity (1, 2, 3) and the percentage of positive cells.

CCLC and TCGA Data set statistical analyzes

Data set

For CCLC analyzes, 61 melanoma cancer cell lines were analyzed for mRNA expression obtained from the file “*CCLC_Expression_Entrez_2012-10-18.res*” provided by CCLC, and 28 BRAF^{V600}-mutated melanoma cancer cell lines were analyzed for drug response profile obtained from the file “*CCLC_NP24.2009_Drug_data_2015.02.24.csv*” provided by CCLC (44).

For TCGA analyzes, 467 human melanomas were analyzed for mRNA expression obtained from the level 3 data “*UNC_IlluminaHiSeq_RNASeqV2*” of the Skin Cutaneous Melanoma

study provided by TCGA, and 341 human melanomas were analyzed for mutational status of *BRAF* and *NRAS* genes obtained from cBioPortal (<http://www.cbioportal.org/>) (45-47). TCGA level 3 RNA-Sequencing data were normalized using DESeq method with R software (version 3.1.2) (48) (49) (<http://www.R-project.org>).

TCGA mRNA expression data processing

For the TCGA samples, *ZEB1* mRNA expression levels superior to the 80th percentile were referred to as “High” and *ZEB1* expression levels inferior to the 20th percentile were referred to as “Low”. The remaining samples are classified as “Intermediate”.

Statistical Analyzes

To assess significant correlation between *ZEB1*, *MITF* or *NGFR* expression in CCLE and TCGA dataset, a Pearson's correlation coefficient was performed. To assess significant associations between *ZEB1* expression level and *BRAF* or *NRAS* mutated status in TCGA dataset, a Wilcoxon signed-rank test was performed. To assess significant associations between *ZEB1* or *MITF* expression level and BRAF or MEK inhibitor IC50 on melanoma cancer cell lines from CCLE, a Student's t-test was performed. The provided p-values were considered significant <0.05. Statistical analyzes were carried out using R software (version 3.1.2) (49) (<http://www.R-project.org>).

Mouse injection

Single cell suspensions of A375 cell lines (4×10^6 cells) in PBS/Matrigel (BD Biosciences, Oxford, UK) (1/1) were injected subcutaneously in the flank of eight-week old female athymic Swiss nude mice (Charles River laboratories). When the tumor reached 5 mm in diameter, *ZEB1* expression was silenced by providing IPTG (10mM) (Sigma) in the drinking water and vemurafenib (10mg/kg) was injected daily IP for 15 days. Tumor growth was monitored during 3 weeks post-injection. Tumors grew up to 1.5 cm in diameter, at which

point animals were euthanized. Mice were housed and bred in a specific pathogen free animal facility “AniCan” at the CRCL, Lyon, France. The experiments were performed in accordance with the animal care guidelines of the European Union and French laws and were validated by the local Animal Ethic Evaluation Committee (CECCAPP).

Cell culture and reagents

A375, SKMEL5, WM9, MALM3M and 501MEL human melanoma cell lines were cultured in DMEM complemented with 10% FBS (Cambrex) and 100 U/ml penicillin-streptomycin (Invitrogen). ESP and GOKA vemurafenib-resistant patient’s derived cell line were cultured in RPMI complemented with 10% FBS and 100 U/ml penicillin-streptomycin. PLX4032/vemurafenib and GDC0973/cobimetinib were purchased from Selleck Chemicals (Houston, TX, USA) and reconstituted in DMSO. All BRAFi-resistant cell lines were permanently cultured under 3 μ M PLX4032.

Retroviral and lentiviral infection

4.10⁶ human embryonic kidney 293T cells were transfected with retroviral or lentiviral expression constructs (10 μ g) in combination with GAG-POL (5 μ g) and ENV expression vectors (10 μ g) using calcium phosphate. Viral stocks were collected 48 h post-transfection, filtered (0.45 μ m) and placed in contact of 2 x 10⁶ melanoma cells 8 h in the presence of 8 μ g/ml polybrene. 48 h post-infection, cells were selected in presence of puromycin (1 μ g/ml) (Invitrogen). HA-ZEB1, Flag-TWIST1, shRNA-control and shRNA-ZEB1 in pBABE-Puro were described previously (16). IPTG-inducible shRNA-Control and shRNA-ZEB1 (TRCN0000369266 and TRCN0000369267) in pLKO_IPTG_3xLacO were purchased from Sigma-Aldrich (St-Louis, MO, USA).

Immunoblot analysis

Cells were washed twice with phosphate buffered saline (PBS) containing CaCl_2 and then lysed in a 100 mM NaCl, 1% NP40, 0.1% SDS, 50 mM Tris pH 8 RIPA buffer supplemented with a complete protease inhibitor cocktail (Roche, Mannheim, Germany) and phosphatase inhibitors (Sigma-Aldrich). Protein expression was examined by western blot using the anti-ZEB1 H102 (Santa Cruz), anti-TWIST Twist2C1a (Abcam, Cambridge, MA, USA), anti-P-ERK1/2 (#9106, Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA), anti-MITF clone C5 (Thermo Scientific, Huntville, AL, USA), anti-FRA1 sc-605 (Santa Cruz), anti-PARP (ab6079, Abcam) antibodies for primary detection. Loading was controlled using the anti- β -actin clone AC-15 (Sigma-Aldrich), anti-GAPDH (Millipore) or anti- α -Tubulin (T5168, Sigma-Aldrich) antibodies. Horseradish peroxidase-conjugated rabbit anti-mouse, goat anti-rabbit and donkey anti-goat polyclonal antibodies (Dako, Glostrup, Denmark) were used as secondary antibodies. Western blots were revealed using a western-blotting Luminol reagent (Santa Cruz).

Q-PCR

Total RNA was isolated using RNeasy Kit (QIAGEN) and reverse transcribed using a high cDNA capacity reverse transcription kit following the manufacturer's instructions (Fisher Scientific). Real-time PCR intron-spanning assays were designed using the ProbeFinder software (Roche). All reactions, including no-template controls and RT controls were performed in triplicate on a CFX96 (Bio-Rad) and were analyzed with the Bio-Rad CFX manager software. Human *HPRT1* was used for normalization. List of primer pairs for: ZEB1, TWIST1, MITF, ABCB5, JARID1B and p75/CD271.

Flow-cytometry analysis

To analyze p75/CD271 cell surface marker expression, cells were incubated with an AlexaFluor647-conjugated anti-CD271 antibody (BD Pharmingen) for 1 hour before analyzes on a FACSCalibur. Data were analyzed with the FlowJo 7.5.5 software.

Soft-agar colony formation assay

Melanoma cell lines were transduced with cDNA or shRNA retroviral or lentiviral expression vectors and selected with puromycin. Plates were prepared by coating with 0.75% low-melting agarose (Lonza) in growth medium and then overlaid with cell suspension in 0.45% low-melting agarose (5×10^3 cells/ well). Plates were incubated for 2-3 weeks at 37°C. Colonies were stained with crystal violet (1 mg/ml Sigma-Aldrich) and counted under microscope.

Viability assays

For short term viability assay, 1000 cells in 96-well plate were treated with the indicated drugs for 72h in a final volume of 100 μ L. 3 by 3-fold PLX4032 dilutions lead to concentrations ranging from 10nM to 10 μ M. After 72 hours, CellTiter-glo reaction solution (Promega) was added and luminescence was read (Tekan). Control wells with DMSO were used for normalization. IC50 values were determined with Compusyn software (ref). For long-term viability assays, 800 cells in 6-well plates were treated with the indicated drugs at the IC50 concentration. Medium was changed every 2 to 3 days, and colonies were fixed and stained with crystal violet after 10 days.

Acknowledgements:

The authors would like to thank Michelle Houang and Sophie Leon for their help with immunohistochemical stainings. Our team is funded by the Ligue Nationale contre le Cancer. The work was additionally supported by the Institut National contre le Cancer (project PAIR

melanoma D22044), the Fondation de France (project n° 2012 00029143), and the Société Française de dermatologie. GR was supported by the LABEX DEVweCAN (ANR-10-LABX-0061) of Lyon university, and by a fellowship from the Ligue Nationale contre le Cancer.

Figure 1

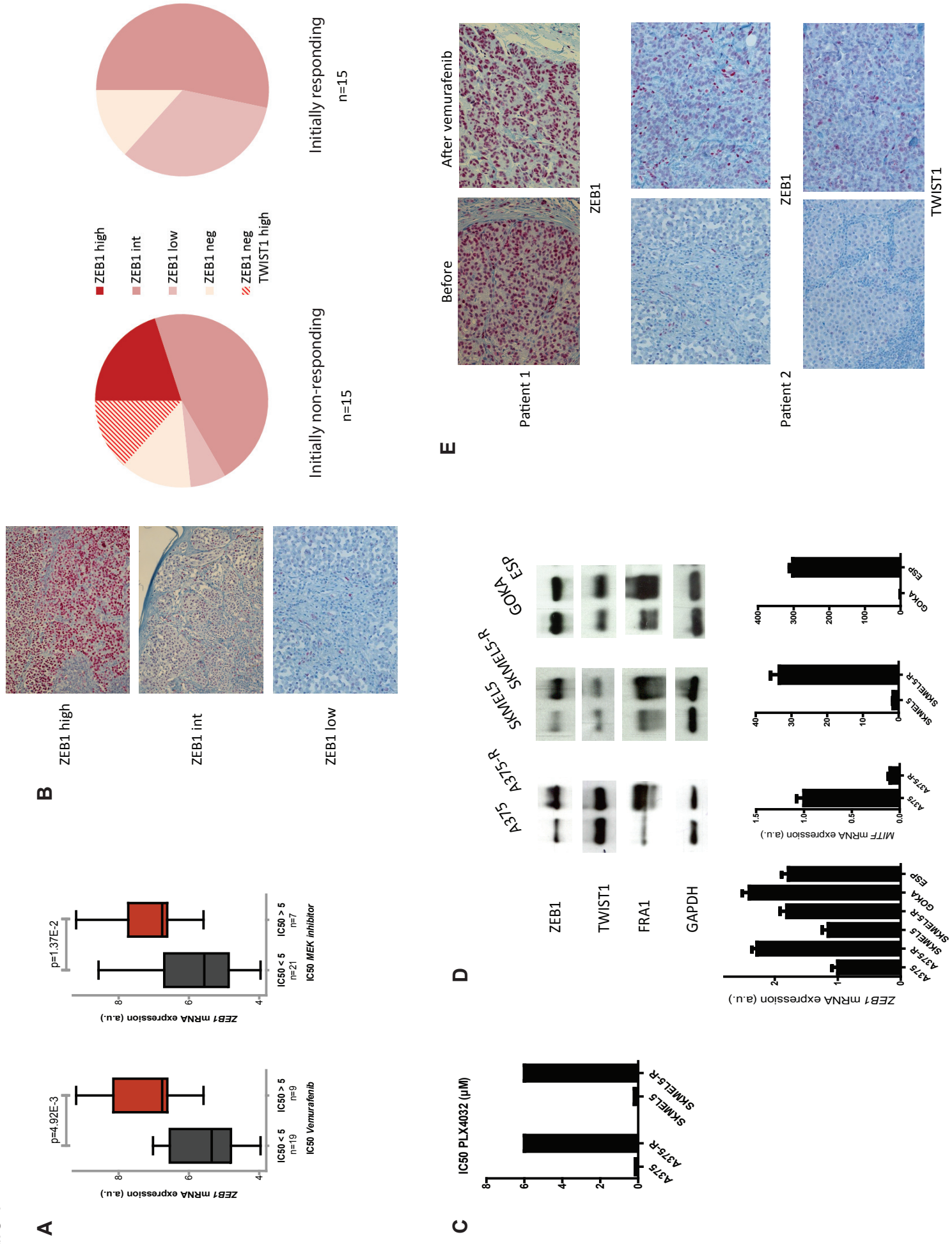


Figure 2

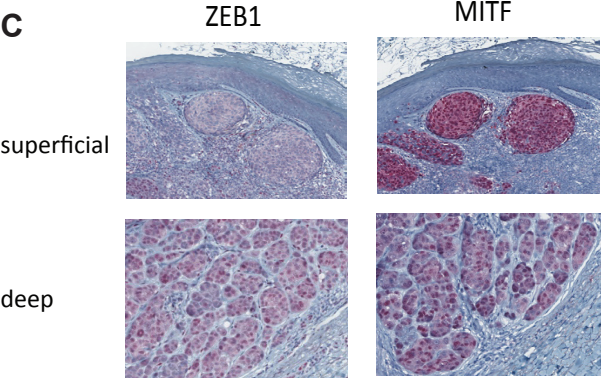
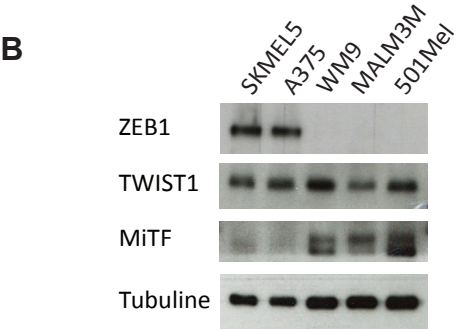
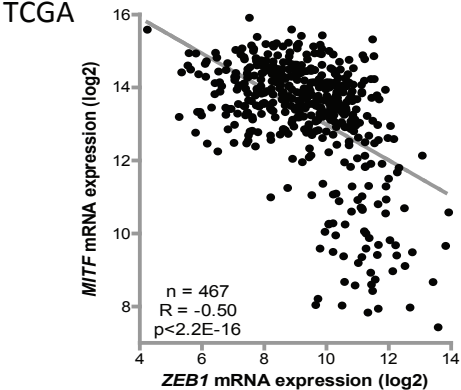
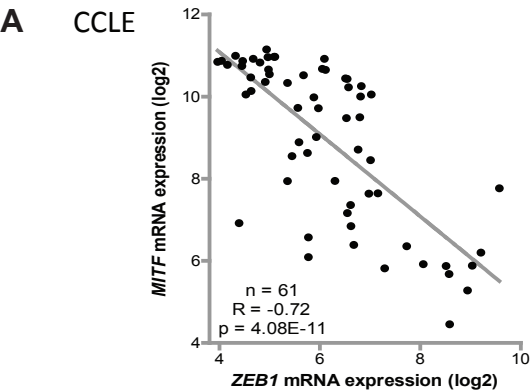


Figure 3

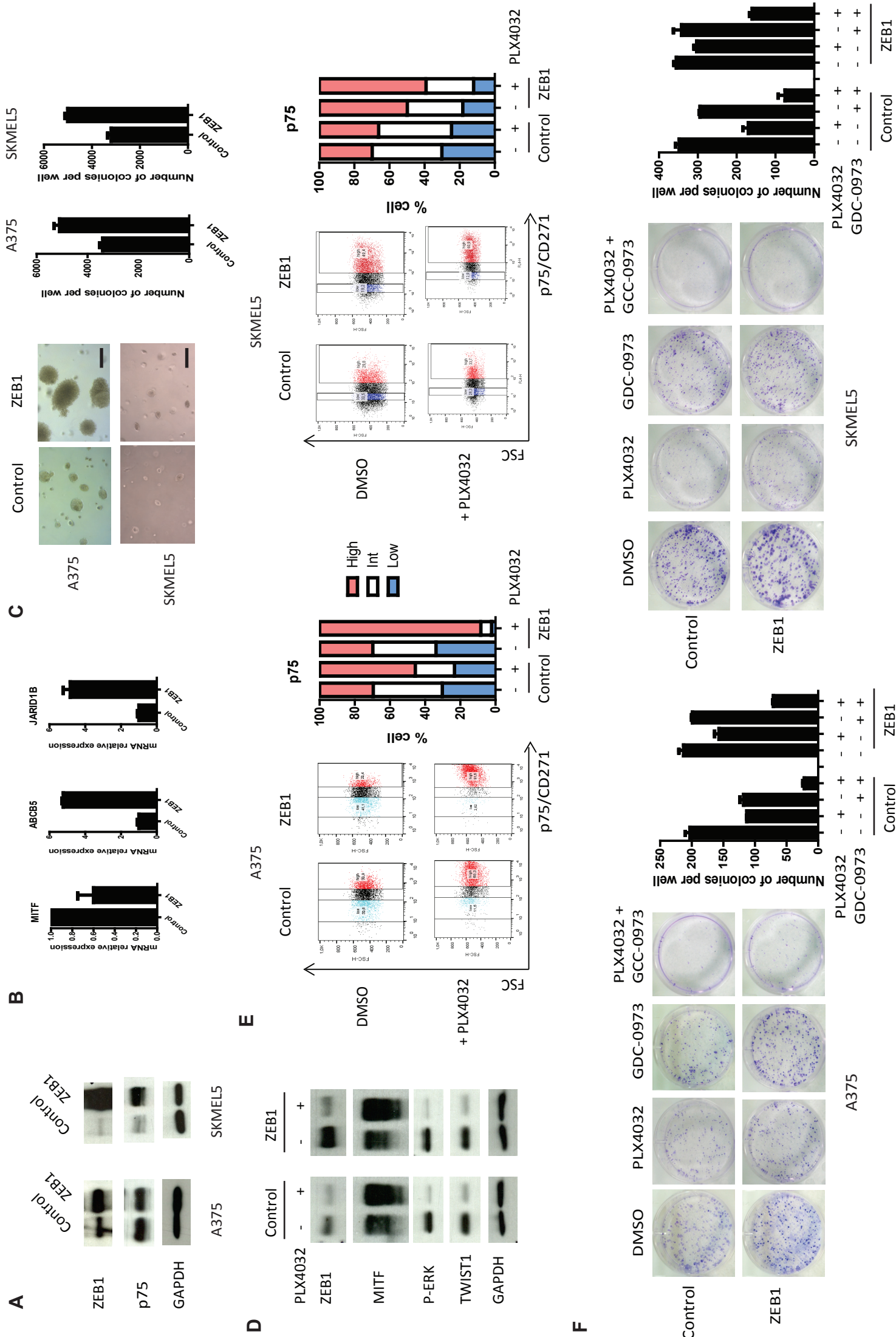
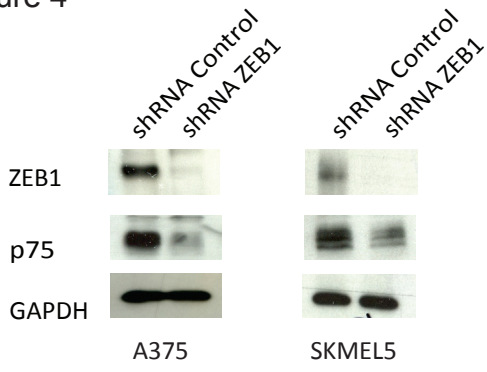
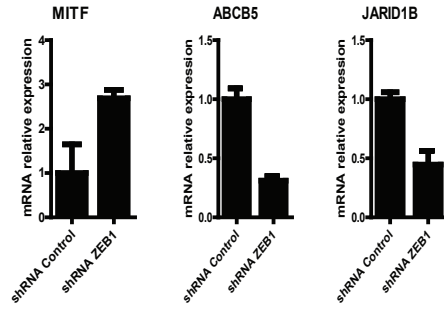


Figure 4

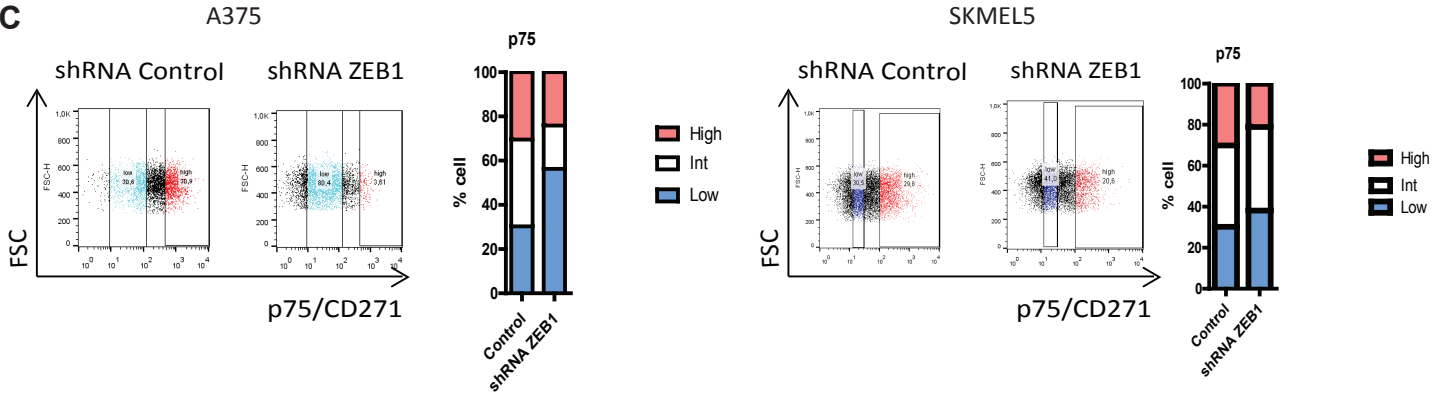
A



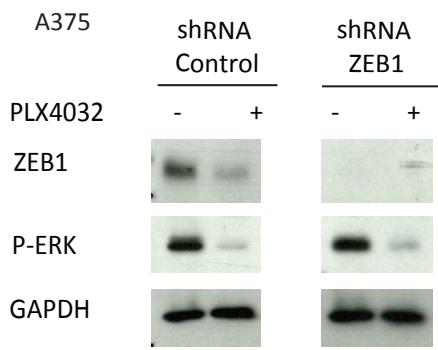
B



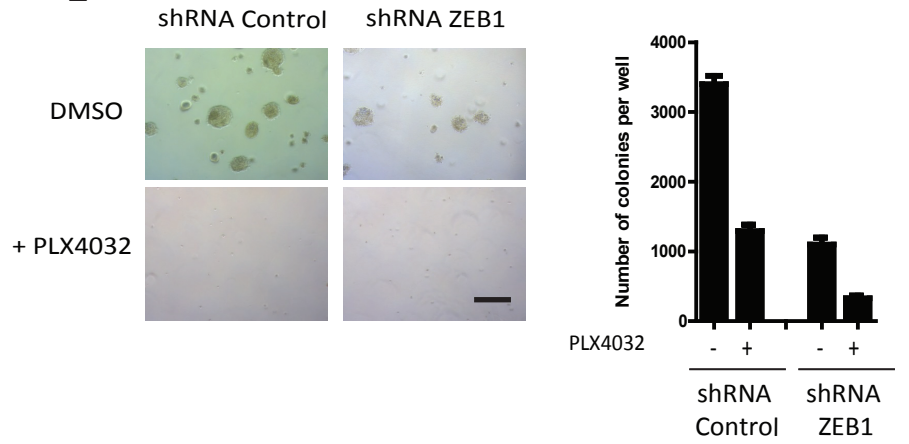
C



D



E



F

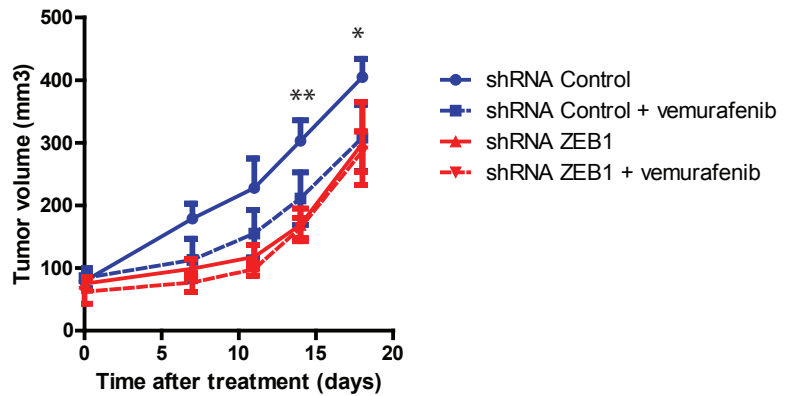
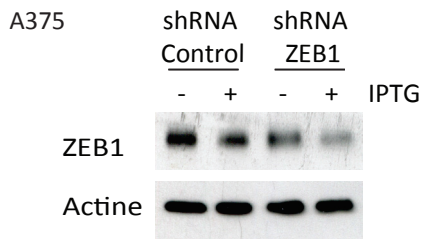
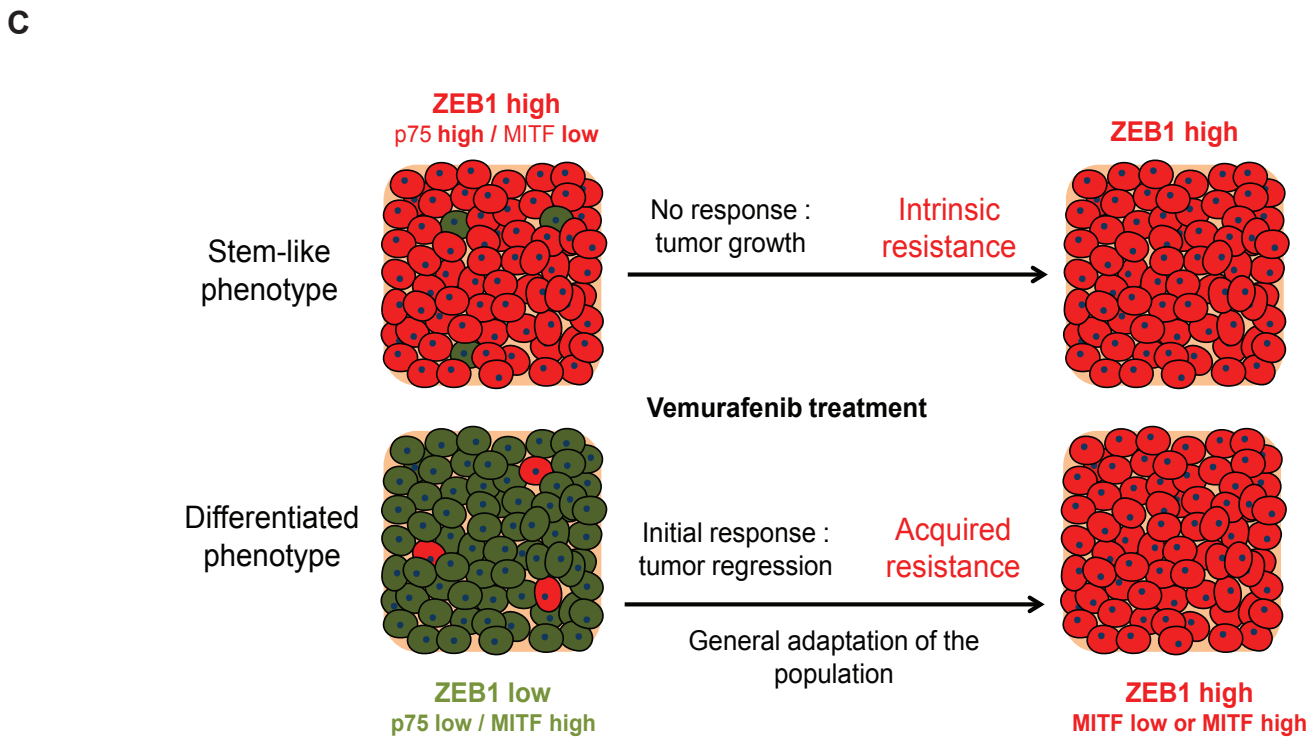
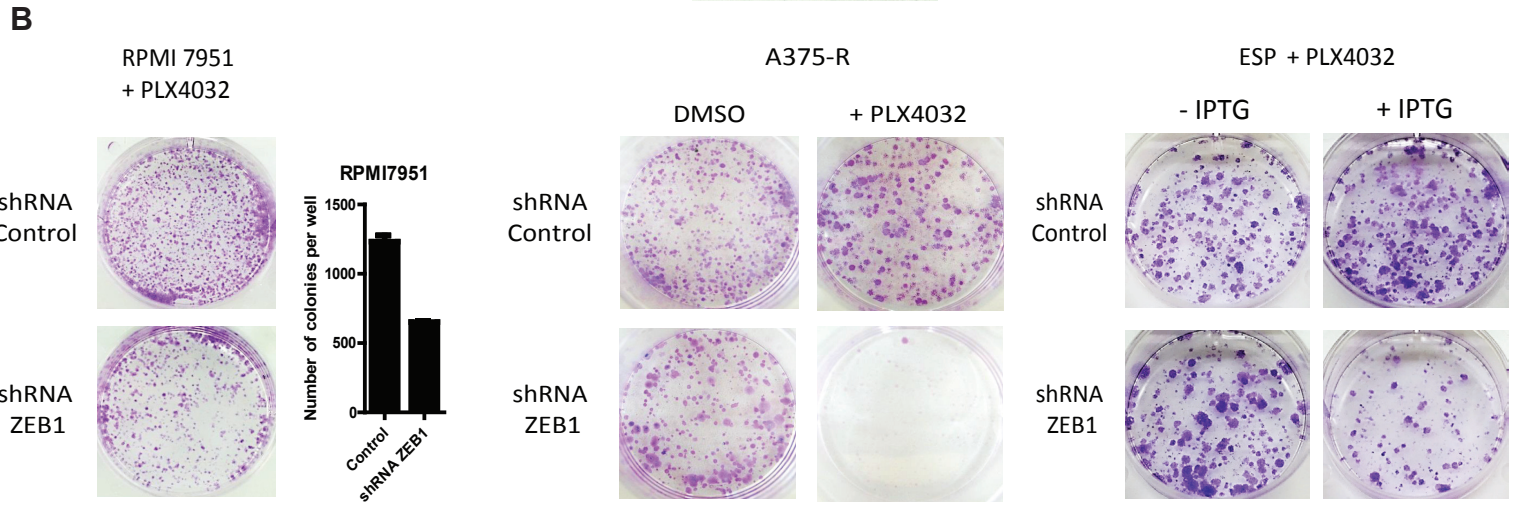
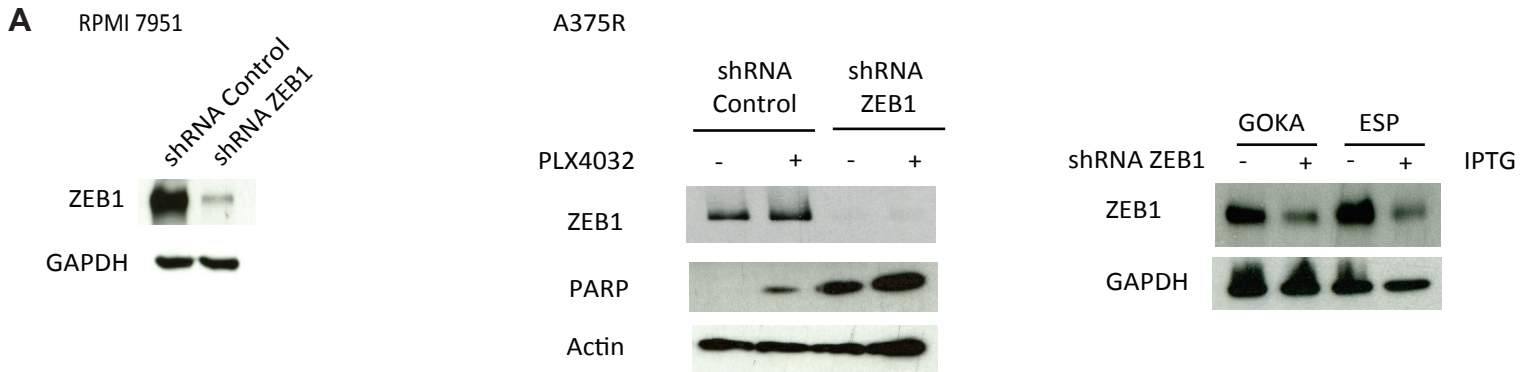
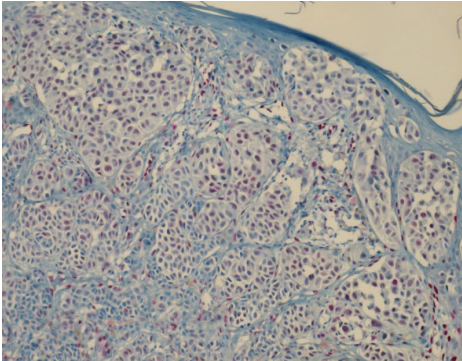


Figure 5

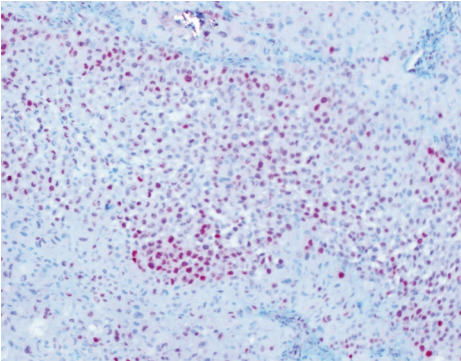


Supplemental figure 1

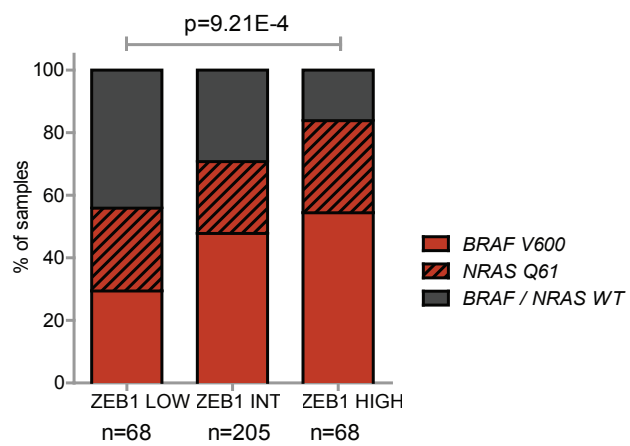
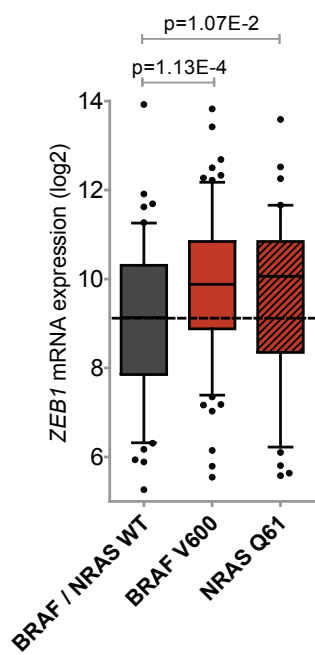
ZEB1



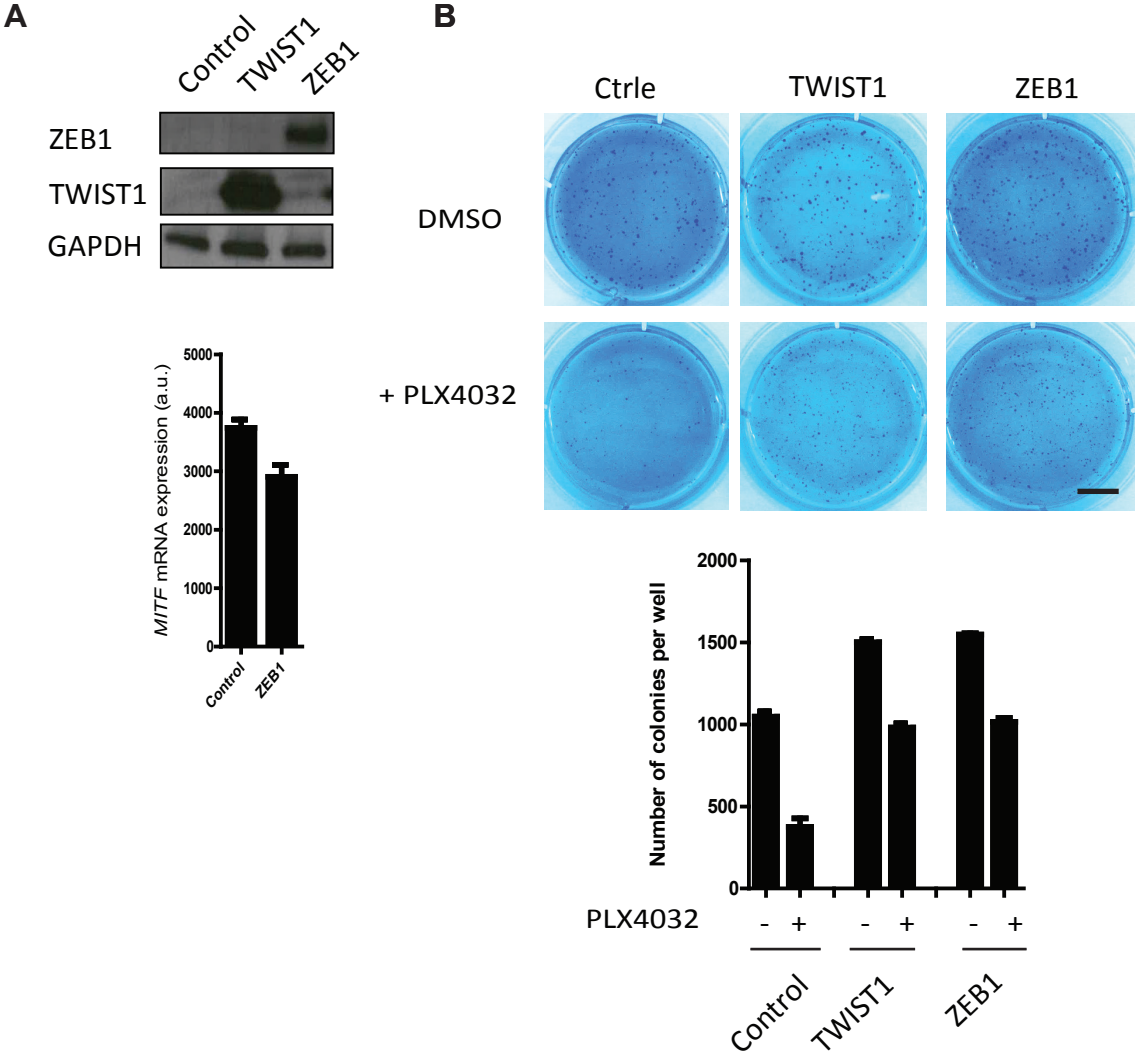
TWIST1



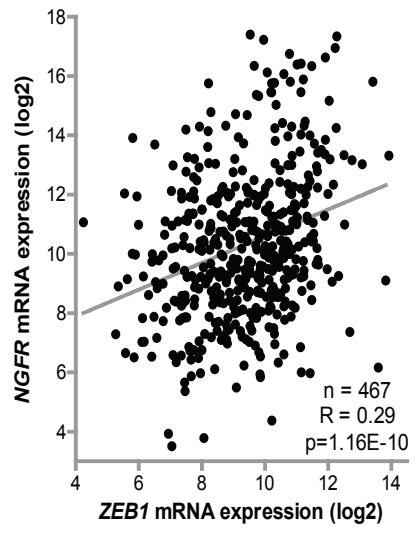
Supplemental figure 2



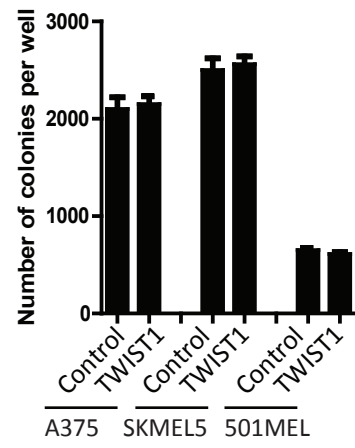
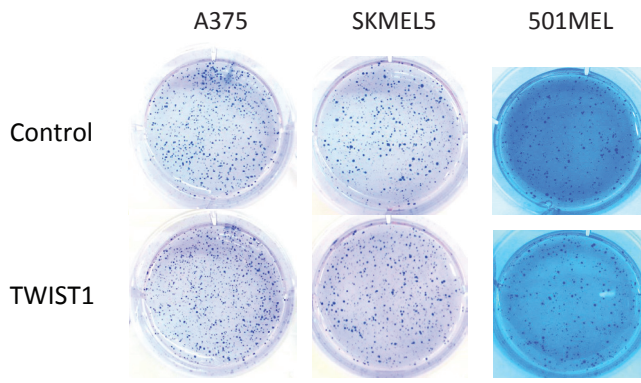
Supplemental figure 3



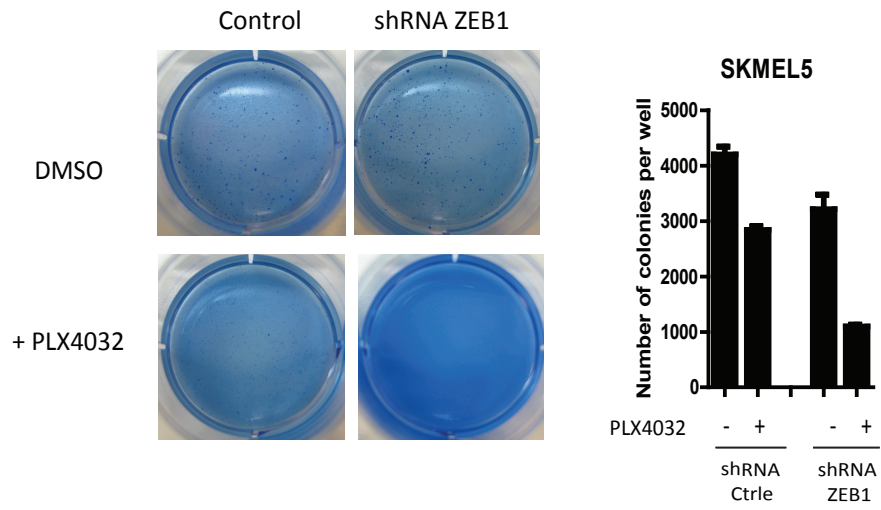
Supplemental figure 4



Supplemental figure 5



Supplemental figure 6



Supplemental table 1

Cell line	BRAF status	IC50 PLX4720	IC50 AZD6244	MITF	ZEB1	TWIST1	ZEB2
WM88	BRafV600	0,204	0,051	10,050	7,023	10,055	5,678
UACC62	BRafV600	0,250	0,035	9,496	6,795	9,947	7,957
A375	BRafV600	0,258	0,107	7,636	6,976	9,361	4,433
MALME3M	BRafV600	0,286	0,046	10,960	4,964	8,285	6,698
MELHO	BRafV600	0,313	0,108	11,149	4,937	7,993	5,733
SKMEL5	BRafV600	0,369	0,169	10,970	5,103	9,517	5,990
WM983B	BRafV600	0,511	0,088	10,053	4,524	10,098	7,070
COLO679	BRafV600	0,554	0,123	10,335	5,353	10,953	5,354
RVH421	BRafV600	0,771	0,257	10,445	6,511	8,977	5,936
IGR37	BRafV600	0,904	0,213	10,847	3,964	10,445	6,644
UACC257	BRafV600	1,064	0,234	10,996	4,321	7,833	7,957
WM1799	BRafV600	1,226	0,351	10,004	6,812	10,222	6,825
G361	BRafV600	1,287	0,419	10,831	4,805	10,403	7,216
HT144	BRafV600	1,336	0,374	9,477	6,528	9,514	7,239
WM2664	BRafV600	1,579	0,165	10,433	6,545	6,007	7,321
HS939T	BRafV600	2,103	0,494	9,724	5,563	10,040	6,841
K029AX	BRafV600	2,111	0,459	10,466	4,624	7,392	7,191
C32	BRafV600	2,207	1,360	9,984	5,881	9,861	6,251
MDAMB435S	BRafV600	2,313	0,422	7,947	6,302	9,300	6,642
COLO741	BRafV600	4,040	2,675	10,969	5,088	7,969	7,491
SKMEL24	BRafV600	5,155	2,313	7,357	6,612	8,475	7,358
HS695T	BRafV600	7,265	8	6,354	7,728	8,538	4,466
LOXIMM	BRafV600	8	0,590	5,681	8,573	8,585	6,217
RPMI7951	BRafV600	8	8	6,201	9,207	10,103	5,820
WM793	BRafV600	8	8	6,389	6,674	9,797	5,408
WM115	BRafV600	8	8	6,847	6,618	10,725	6,859
IGR39	BRafV600	8	8	7,645	7,155	9,094	5,073
A2058	BRafV600	8	5,036	8,709	6,761	9,225	5,369

B. Conclusions

En conclusion ces travaux montrent que ZEB1 peut réguler la plasticité des cellules de mélanome en régulant des transitions phénotypiques réversibles entre un état différencié et sensible aux inhibiteurs de BRAF, vers un état dédifférencié plus résistant, où MITF est perdu et p75/CD271 fort. ZEB1 est suffisant pour permettre l'émergence de résistance aux inhibiteurs des MAPK et son expression est plus élevée dans les mélanomes BRAFV600E qui présentent une résistance, qu'elle soit innée ou acquise. Son inhibition permet d'augmenter la sensibilité des cellules naïves et d'induire de la mort dans les lignées résistantes mettant en évidence l'intérêt de développer des stratégies inhibant la plasticité dépendante de ZEB1.

**DISCUSSION GENERALE ET
PERSPECTIVES**

IV. Discussion générale et perspectives

Mes travaux de thèse avaient pour objectif de déterminer l'implication des EMT-TFs des familles SNAIL, ZEB et TWIST dans le développement et la résistance aux traitements du mélanome cutané. Facteurs inducteurs de l'EMT, leurs rôles avaient principalement été caractérisés dans des cellules épithéliales et dans les tumeurs qui en dérivent, les carcinomes. Les fonctions que les EMT-TFs pouvaient jouer dans des cellules non-épithéliales restaient peu étudiées. Des travaux antérieurs de l'équipe dans des cellules épithéliales mammaires avaient montré que les EMT-TFs pouvaient favoriser la transformation cellulaire indépendamment du processus de transdifférenciation lui-même, suggérant que ces facteurs pouvaient avoir une activité oncogénique intrinsèque, indépendamment du type cellulaire. L'étude dans les mélanocytes nous a permis de démontrer que certains EMT-TFs (ZEB1 et TWIST1 en l'occurrence) jouent bien un rôle oncogénique dans ce contexte cellulaire dérivé de la crête neurale et valide donc l'activité intrinsèque, indépendante de l'EMT, dans un modèle cellulaire non-épithélial. De manière importante, les travaux auxquels j'ai participé ont mis en évidence pour la première fois que d'autres EMT-TFs (SNAIL2 et ZEB2), exprimés de manière normale dans les mélanocytes normaux adultes, jouent au contraire un rôle oncosuppresseur dans ce contexte cellulaire.

A. Fonctions spécifiques des EMT-TFs dans le mélanome

1. Expressions tissus-spécifiques et rôles antagonistes des EMT-TFs

Nous avons mis en évidence que ZEB2 et SNAIL2 sont exprimés dans les mélanocytes adultes normaux. Bien que ces deux facteurs étaient connus pour jouer un rôle majeur dans la délamination de la crête neurale, cette observation était inattendue, l'expression des EMT-TFs étant jusque-là considérée comme restreinte au stade embryonnaire, et devenant latente à l'âge adulte dans la plupart des cellules différenciées, à l'exception des cellules mésenchymateuses. SNAIL2 et ZEB2 sont donc des acteurs clés de l'homéostasie et de la différenciation du lignage mélanocytaire. Le phénotype des souris KO pour SNAIL2 avait déjà montré des défauts majeurs de pigmentation (Cf paragraphe I.A.3.a page 26). Plus récemment, des souris n'exprimant pas ZEB2 dans le lignage mélanocytaire ont été montrées comme présentant des défauts dans la migration des mélanoblastes et dans la différenciation des mélanocytes (Denecker et al., 2014).

Nos travaux ont par ailleurs démontré que SNAIL2 et ZEB2, décrits pour leur implication dans l'initiation tumorale et la génération de métastases dans des modèles de carcinomes, présentent des fonctions antagonistes dans le modèle du mélanome. En effet leur expression est perdue au cours de la progression tumorale, un profil d'expression inattendu qui a été confirmé par la suite dans d'autres études (Denecker et al., 2014; Shirley et al., 2012). SNAIL2 et ZEB2 jouent ainsi au contraire un rôle oncosuppresseur dans des mélanocytes en s'opposant à la transformation induite par l'oncogène BRAF, en favorisant au contraire la différenciation cellulaire. Leur expression ectopique est par ailleurs capable d'inhiber le pouvoir tumorigène de cellules de mélanome.

Ces travaux indiquent donc qu'il faut étudier de plus près l'expression tissu-spécifique des EMT-TFs à l'âge adulte afin de mieux appréhender leurs fonctions. De plus en plus d'études décrivent en effet l'expression de certains EMT-TFs dans des tissus sains adultes. L'équipe de Bob Weinberg et la nôtre ont tout d'abord mis en évidence que les cellules souches mammaires humaines ou murines expriment certains EMT-TFs. SNAIL2 coopère notamment avec SOX9 pour mettre en place un programme génique assurant l'autorenouveau et le maintien de ces cellules à l'état souche (Guo et al., 2012). Une autre étude a montré que ZEB2 est exprimé dans les cellules souches et les précurseurs hématopoïétiques chez la souris. ZEB2 est nécessaire pour l'homéostasie et la différenciation

de ces cellules et son inhibition dans ce lignage induit une létalité embryonnaire chez la souris (Goossens et al., 2011).

En plus de certaines populations de cellules souches, l'expression de certains EMT-TFs a également été décrite dans d'autres types de cellules différenciées, autres que les mélanocytes. L'expression de ZEB2 a ainsi été suivie au niveau du cerveau de souris, et retrouvée dans de nombreuses régions cérébrales comme le cortex, l'hippocampe ou les oligodendrocytes par exemple (Nishizaki, Takagi, Matsui, & Higashi, 2014). ZEB2 est ainsi exprimé dans différentes populations de cellules neuronales adultes différenciées et nécessaire à leur différenciation (McKinsey GL, Neuron. 2013 ; Van den Berghe V, Neuron. 2013). En parallèle, les recherches sur le syndrome de Mowat-Wilson, une maladie qui se caractérise par des défauts du développement des tissus neuraux, ont montré la responsabilité de la perte d'expression de ZEB2 dans cette maladie.

Au total, alors que le dogme voulait que l'expression de ces facteurs soit restreinte au cours du développement embryonnaire ou réactivée de manière aberrante dans les cancers, les résultats s'accumulent pour montrer que certains EMT-TFs peuvent avoir un rôle physiologique dans des tissus adultes sains spécifiques, favorisant des programmes de différenciation et l'homéostasie tissulaire. En fonction de leur expression normale dans un tissu donné et de leur fonction pro-différenciante, certains EMT-TFs pourraient donc jouer un rôle oncosuppresseur et non pas oncogénique. Il serait ainsi intéressant d'analyser si ZEB2 et SNAIL2 exercent également une fonction oncosuppressive dans d'autres types cellulaires que les mélanocytes, comme dans certaines populations neuronales ou hématopoïétiques.

2. Mécanismes soutenant ces fonctions antagonistes : MITF un facteur clef de voute

Afin de comprendre par quels mécanismes SNAIL2 et ZEB2 jouent un rôle oncosuppresseur dans le lignage mélanocytaire à l'inverse du rôle oncogénique de TWIST1 et ZEB1, nous avons exploité des analyses transcriptomiques dans des mélanocytes murins et montré la régulation antagoniste de MITF et de ses gènes cibles en aval. Tandis que ZEB2 et SNAIL2 activent l'expression de MITF et de ses gènes cibles, engageant les cellules dans une voie de différenciation, à l'inverse, la surexpression de ZEB1 et TWIST1 réprime MITF et favorise l'engagement dans des processus de prolifération et d'invasion. Nos expériences *in*

vitro et *in vivo* indiquent donc que ZEB2 et SNAIL2 exercent une activité oncosuppressive en favorisant un programme de différenciation mélanocytaire dépendant de MITF. Le rôle clé de MITF a pu être confirmé *in vivo* dans un modèle murin, puisque la perte de ZEB2 induit une importante diminution de l'expression de MITF et des marqueurs de différenciation mélanocytaire (Denecker et al., 2014).

En support de cette hypothèse, le modèle de rhéostat de MITF développé par Colin Goding indique que la modulation de l'expression de MITF régule le phénotype des cellules de mélanome. Le gène de *MITF* étant amplifié dans un sous-groupe de mélanome suggère qu'il peut se comporter comme un oncogène. Pourtant un niveau élevé de MITF promeut l'arrêt du cycle et la différenciation cellulaire *in vitro*. De la même façon, un faible taux de MITF induit de l'invasion et des caractéristiques souches, associé à de la quiescence. Seul un niveau intermédiaire de MITF pourrait induire de la prolifération et de la survie, des processus qui assurent la progression tumorale.

Si MITF est un acteur clé, sa régulation n'est pas forcément directe et d'autres mécanismes peuvent être impliqués. Afin de déterminer quels sont les gènes cibles directs différentiellement régulés par ZEB1 et ZEB2 d'autre part, une étude de ChIP-SEQ (séquençage après immunoprécipitation de chromatine) devra être réalisée.

3. Les réseaux d'inter-régulation des EMT-TFs

Principalement caractérisée dans les carcinomes mammaires, la question d'une hiérarchie entre les EMT-TFs apparaît complexe et dépendante du modèle cellulaire utilisé. Dans certains modèles, SNAIL1/2 et TWIST1 vont être capables de réguler positivement ZEB1/2 (Dave et al., 2011; Taube et al., 2010). Dans d'autres modèles, c'est TWIST1 qui sera l'instigateur et qui activera les membres de la famille SNAIL (Casas et al., 2011). Une autre étude a montré que ZEB2 et SNAIL1 possédaient une affinité plus importante que les autres EMT-TFs pour les séquences E-box faisant d'eux les régulateurs des autres EMT-TFs (Amparo Cano & Portillo, 2010; Villarejo, Cortés-Cabrera, Molina-Ortíz, Portillo, & Cano, 2014).

Dans le modèle du mélanome, l'inter-régulation entre les facteurs ZEB2/SNAIL2 et ZEB1/TWIST1 d'autre part doit être mieux caractérisée. Les profils d'expression antagonistes de ZEB1 et ZEB2 peuvent être expliqués par le fait qu'ils ne sont pas soumis à la boucle de

rétrocontrôle négative impliquant les micro-ARN de la famille miR-200, qui sont faiblement exprimés dans les cellules de mélanomes comparé à des cellules épithéliales. Nos résultats ont également montré que FRA1, un membre du complexe AP1, pourrait en partie expliquer la régulation inverse observée entre ZEB1 et ZEB2, puisque des expériences de ChIP ont montré que FRA1 pouvait spécifiquement se fixer sur les promoteurs de ZEB2 et de ZEB1, mais entraînerait dans un cas une répression et dans l'autre une activation transcriptionnelle. Les éventuels co-facteurs différentiellement recrutés restent à déterminer. De plus, nos résultats indiquent que ZEB2 peut réprimer ZEB1 dans le lignage mélanocytaire, alors que ces deux facteurs sont souvent co-exprimés dans des cellules mésenchymateuses, indiquant une régulation type cellulaire spécifique. Cette observation est à rapprocher du phénotype des souris déficientes pour ZEB2 qui présentent au cours du développement embryonnaire dans certains tissus où ZEB2 est normalement exprimé, des niveaux élevés de ZEB1, suggérant à nouveau que l'expression de ZEB1 est réprimée par ZEB2 dans certains types cellulaires (Miyoshi et al., 2006). De la même façon, la perte de ZEB2 dans le lignage mélanocytaire dans les souris TyrCRE Zeb2^{flox/flox} est corrélée à un gain d'expression de ZEB1 (Denecker et al., 2014). Ainsi, il semblerait que l'expression de ZEB1 dans certains types cellulaires soit dépendante d'une levée d'inhibition régulée par ZEB2. Des expériences d'immuno-précipitations de chromatine (ChIP) devraient nous permettre de mettre en évidence l'existence d'une régulation de ZEB1 par ZEB2 et les mécanismes transcriptionnels associés, impliquant des co-facteurs types cellulaires spécifiques. Enfin, la régulation de ZEB1 par ZEB2 pourrait ne pas être directe mais passer en partie par le facteur de transcription MITF, qui serait capable d'inhiber ZEB1 en se fixant sur son promoteur (Denecker et al., 2014). Des boucles de rétrocontrôle impliquant ZEB2, MITF et ZEB1 assureraient ainsi la régulation du phénotype. Enfin, dans nos lignées de mélanomes si ZEB1 serait plutôt en amont de TWIST1, il est à noter que des mécanismes de régulations post-traductionnels jouent un rôle important dans la régulation de la stabilité de TWIST1 et SNAIL2 notamment.

B. Fonction oncogénique des EMT-TFs dans des modèles murins

Ayant démontré les fonctions respectivement oncosuppressives ou oncogéniques de SNAIL2/ZEB2 d'une part et TWIST1/ZEB1 d'autre part dans des modèles cellulaires *in vitro*

et en xéno greffes, nous avons ensuite voulu caractériser leur rôle *in vivo* dans des modèles murins de mélanomes. Nous avons tout d'abord exploité durant ma thèse un modèle transgénique pour TWIST1.

1. La caractérisation des souris BRAFV600E ; TWIST1

Les souris BRAFV600E ; TWIST1 ont présenté aux stades précoces une hyperpigmentation moins prononcée que leurs congénères mutées seulement pour BRAFV600E. Pourtant, les cellules ne présentent aucun défaut de prolifération, suggérant que prolifération et différenciation soient découplées dans ce cas. Cette observation est cohérente avec nos données *in vitro* dans les melan-a, où TWIST1 favorise la prolifération en inhibant la différenciation cellulaire.

D'autre part, nos données *in vitro* ont montré que l'expression de TWIST1 permettait d'inhiber la sénescence oncogénique induite par BRAFV600E dans les mélanocytes murins primaires. L'hypothèse que j'avais émise en croisant les souris transgéniques TWIST1 dans le modèle BRAFV600E était que cet échappement à la sénescence diminuerait ainsi la latence au développement de mélanomes. Toutefois, le suivi des animaux n'a pas montré de modification des délais attendus d'apparition de tumeurs. Pour autant, un nombre réduit de tumeurs bénignes, les nevis, a été observé chez les souris qui expriment TWIST1, suggérant un potentiel échappement à la sénescence. Des marquages de la β -galactosidase ainsi que l'analyse d'expressions de marqueurs de sénescence sur des coupes de peau de ces souris devraient nous permettre de valider si moins de sénescence est observée ou s'il s'agit d'un défaut d'accumulation du pigment dans ces nevis, reflétant le rôle de TWIST1 dans la dédifférenciation cellulaire.

Cependant, ce nombre réduit de nevis ne se traduit pas par une progression plus rapide vers le stade malin, suggérant que d'autres altérations sont nécessaires pour la génération d'une tumeur *in vivo*. La perte d'expression de p16 ou de PTEN est souvent observée au cours de la progression maligne, même si la levée de la sénescence dans les lésions pré-malignes mélanocytaires peut intervenir indépendamment de la perte de ces facteurs (Cf paragraphe I.C.1.b page 81). Il serait donc intéressant d'analyser si l'expression de TWIST1 modifie l'expression de ces 2 facteurs dans notre modèle. De nouveaux facteurs, qui font actuellement l'objet de recherches (comme FBXO31 et IGHBP7 par exemple) pourraient également être

analysés dans les souris BRAFV600 ; TWIST1 afin d'identifier de nouvelles pistes permettant d'expliquer le phénotype de ces souris.

Enfin, si aucune différence dans le temps d'apparition des mélanomes ou dans la pénétrance n'a été observée, certains animaux BRAFV600E ; TWIST1 ont développé 2 tumeurs au lieu d'une, et les mélanomes paraissent plus agressifs et dédifférenciés, avec une perte d'expression de S100. L'expression de marqueurs souches devra être recherchée dans ces tumeurs afin de mieux comprendre par quels mécanismes TWIST1 pourrait dans certains cas favoriser le développement de mélanomes multiples.

Enfin, la mise en culture et la caractérisation de lignées de mélanomes issues des souris BRAFV600E ; TWIST1 ont montré qu'elles présentaient un phénotype invasif mésenchymateux en lien avec la sur-expression de certains marqueurs de l'invasion. Toutefois, aucune métastase n'a été détectée *in vivo* chez ces souris. Il est donc probable que, comme démontré dans un modèle de carcinome cutané chez la souris l'expression de TWIST1 soit nécessaire pour induire la dissémination métastatique mais qu'ensuite la répression de TWIST1 soit nécessaire pour permettre la croissance de ces métastases (Tsai et al., 2012). En effet, la réversion de l'EMT par le processus de transition mésenchymo-épithéliale est nécessaire pour rentrer à nouveau en prolifération, coloniser un site secondaire et générer une métastase. Un processus analogue pourrait expliquer que l'expression de TWIST1 de manière constante dans les souris BRAFV600E ne permette pas la génération de métastases *in vivo*. Pour tester cette hypothèse un modèle inductible pour TWIST1 devrait être utilisé, permettant de réverser l'expression de TWIST1 une fois les mélanomes formés.

2. Perspectives dans d'autres modèles murins

Mes résultats *in vitro* ont indiqué que ZEB1 présentait une plus forte activité oncogénique que TWIST1 dans la majorité des lignées de mélanome étudiées. Il se pourrait donc que TWIST1 ne soit pas un oncogène assez puissant mais que ZEB1 pourrait favoriser l'initiation tumorale dans le modèle murin BRAFV600. Pendant ma thèse nous avons généré des souris Lox-Stop-Lox ZEB1. Ces souris seront croisées avec les souris BRAFV600E afin d'analyser si ZEB1, à la différence de TWIST1 permet de diminuer la latence d'apparition des tumeurs, mais aussi de favoriser la formation de métastases.

Enfin, si TWIST1 avait déjà été décrit au laboratoire comme étant capable de coopérer avec l'oncogène RAS dans la formation de carcinomes mammaires ou cutanées, des résultats obtenus dans une étude annexe (Cf Annexe page 186) à laquelle j'ai participé pendant ma thèse, ont montré que TWIST1 présente une activité oncogénique y compris lorsqu'il est exprimé seul. Dans cette étude, le même modèle de souris transgénique TWIST1 a été croisé avec des souris WAP-Cre. La WAP (pour Whey Acidic Protein) est une des protéines majeures du lait maternel chez les mammifères, produite pendant les cycles de lactation. Les souris femelles WAP-Cre ; TWIST1 ont donc été accouplées afin d'activer l'expression de TWIST1. Cette expérience a permis de montrer que la simple expression de l'EMT-TF TWIST1 est suffisante dans ce modèle pour développer des tumeurs de la glande mammaire, renforçant l'idée que certains EMT-TFs peuvent permettre l'initiation tumorale dans certains contextes cellulaires (Jacqueroud et al, *in press* 2015). La latence est certes longue, de plus d'un an, suggérant la nécessité d'événements secondaires qui restent à caractériser. Il sera donc également intéressant de déterminer si la simple expression de ZEB1 *in vivo* dans les mélanocytes (Tyr-Cre) permet le développement de mélanomes chez la souris, ce qui conforterait encore le rôle oncogénique majeur de ZEB1.

Enfin, le rôle oncosuppresseur de ZEB2 et SNAIL2 dans des modèles murins de mélanome reste encore à démontrer, notamment est-ce que les souris KO pour ces gènes sont davantage sujettes à développer des mélanomes et est-ce que leur sur-expression dans des souris transgéniques peut ralentir la progression tumorale ? Cependant, il semblerait qu'à la différence des mélanomes humains, l'expression de ZEB2 et SNAIL2 soit maintenue dans le modèle de mélanome murin BRAFV600, ce qui pourrait compliquer les interprétations dans ce modèle.

C. EMT-TFs et résistance aux thérapies ciblées dirigées contre la voie des MAPK

Malgré les résultats prometteurs obtenus avec les inhibiteurs de BRAF, ils ne fonctionnent que sur 50% des patients et font systématiquement face à des problèmes de résistance. Il y a donc un besoin essentiel de mieux comprendre les acteurs mis en jeu dans les processus de résistance afin d'identifier de nouvelles voies à fort potentiel thérapeutique. Mes travaux de thèse ont permis d'identifier ZEB1 comme un nouveau facteur clef de la résistance aux inhibiteurs de BRAF dans les mélanomes BRAFV600E.

1. ZEB1 régulation de la plasticité cellulaire et résistance

Si les principaux mécanismes de résistance décrits jusqu'à ce jour sont associés à des mutations génétiques, nos données mettent en lumière un mécanisme de plasticité cellulaire. Ainsi, le modèle que nous proposons suggère que ZEB1 peut favoriser l'émergence de résistance en induisant des changements phénotypiques réversibles. Mes résultats montrent que la résistance induite par ZEB1 passerait par la transition d'un phénotype différencié « MITF high / ABCB5, JARID1B, CD271 low » vers un phénotype dédifférencié « MITF low / ABCB5, JARID1B, CD271 high » (Figure 28). Ce phénotype serait caractéristique des cellules souches initiatrices de mélanome.

MITF joue un rôle central dans la régulation de ces phénotypes et des rôles opposés de MITF dans la résistance aux inhibiteurs de BRAF ont ainsi été décrits (Johannessen et al., 2013; Müller et al., 2014). L'expression de MITF a été analysée en immunohistochimie sur des tumeurs humaines avant et après traitement au vémurafénib. Alors que initialement les tumeurs exprimaient MITF, après traitement on note une importante hétérogénéité dans la tumeur, des clones ayant conservé son expression et d'autres l'ayant perdu. L'alternance entre des programmes géniques induits par un faible taux de MITF pourrait promouvoir de l'invasion et de la résistance par de la dédifférenciation et l'acquisition de propriétés souches. A l'inverse la transition vers un programme génique dépendant d'un taux plus élevé de MITF permettrait la prolifération des cellules, leur survie et leur différenciation. Ces deux types de populations se retrouvent en même temps dans la tumeur, il se peut même que les sous populations passent d'un état à l'autre afin d'alterner entre des cycles de prolifération et d'invasion, favorisant la plasticité tumorale. C'est cette modulation qui va générer l'hétérogénéité intra-tumorale. Les variations d'expression de MITF peuvent donc en partie expliquer la plasticité des mélanomes et ainsi leur résistance au traitement (Hartman & Czyz, 2015; Kim & Ronai, 2015).

Des études ont précédemment montré qu'un fort niveau de MITF était associé à de la résistance aux inhibiteurs de MAPK. Toutefois, en support de nos conclusions, d'autres études soulignent que les cellules présentant un faible taux de MITF, un phénotype invasif et surexprimant des récepteurs tyrosine kinase comme AXL sont considérées comme étant plus résistantes (Müller et al., 2014). AXL est un récepteur d'un intérêt particulier, puisque son expression est associée à un phénotype invasif et que c'est une cible de FRA1 qui a été montré comme pouvant induire de l'EMT dans des cellules épithéliales (Shin & Blenis, 2010). AXL est retrouvé activé dans des lignées résistantes aux inhibiteurs de BRAF et nous

avons pu montrer son activation dans nos lignées résistantes. De plus, il existe un inhibiteur (R428) de ce récepteur et son utilisation dans des cellules résistantes aux inhibiteurs de BRAFV600E a montré qu'il diminuait fortement la viabilité des cellules faisant de AXL une cible thérapeutique intéressante.

Enfin, la surexpression de WNT5A a en 2014 été associée à de la résistance innée et acquise dans le mélanome. La résistance induite par ce récepteur passe par la voie PI3K-AKT, une voie canonique d'activation des EMT-TFs (Anastas et al., 2014) régulée par PTEN, facteur qui peut être inhibé par ZEB1 comme nous avons pu le voir. L'analyse transcriptomique sur ces lignées surexprimant WNT5A a montré que son expression était corrélée à une signature po-métastatique.

Enfin, si MITF est bien régulé en aval de ZEB1, une partie des effets de ZEB1 peuvent être indépendants de MITF, puisque certains cas de résistance présentent un niveau élevé de MITF malgré un niveau élevé de ZEB1. L'inhibition de ZEB1 est d'ailleurs capable de resensibiliser au traitement des cellules résistantes présentant un niveau faible ou au contraire élevé de MITF. L'étude de CHIP-SEQ permettra ainsi de déterminer d'autres gènes cibles directs de ZEB1 pouvant contribuer à la régulation de ces phénotypes.

Au total, ces travaux soulignent que ce n'est pas tant le phénotype « EMT » mais la fonction intrinsèque de certains facteurs de transcription tels que ZEB1 qui joue un rôle dans la résistance. D'autres facteurs d'EMT comme ZEB2 pouvant très bien jouer un rôle opposé du fait de fonctions antagonistes dans la régulation de la différenciation cellulaire.

2. Stratégies de ciblage de ZEB1 à visée thérapeutique

J'ai pu démontrer *in vitro* et *in vivo* que l'inhibition de ZEB1 inhibe la tumorigénicité et augmente la sensibilité aux inhibiteurs de BRAF. Si l'inhibition de ZEB1 présente *in vitro* une efficacité sur des cellules résistantes, en les resensibilisant, voire en induisant de la mort, la validation *in vivo* de ces résultats n'a pas encore été effectuée. Afin de réaliser une expérience comparable à celle effectuée dans les lignées sensibles, il faudrait utiliser les lignées résistantes correspondantes, à savoir les A375-R. Préalablement infectées par le shRNA inductible, le traitement de souris par le PLX4032 ne devrait montrer aucune modification de la croissance tumorale.

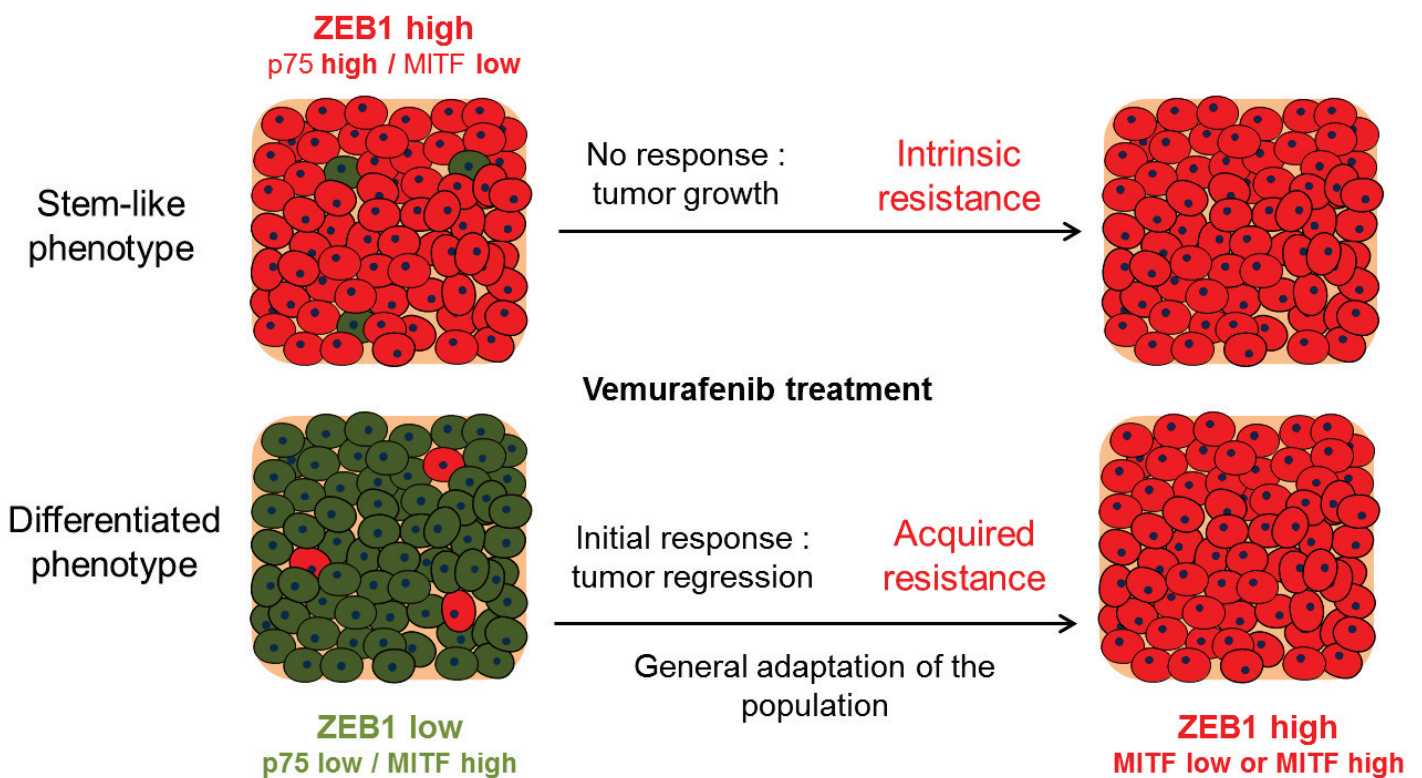


Figure 28 : Modèle schématique de plasticité phénotypique dépendante de ZEB1 dans la résistance aux BRAFi

Les cellules exprimant ZEB1 présentent un phénotype souche MITF low / p75 high, résistant : ces cellules ne répondront pas au traitement.

Les cellules n'exprimant pas ZEB1 possèdent un phénotype différencié MITF high / p75 low, sensible, la tumeur va d'abord régresser sous traitement. Ce dernier induit une adaptation globale de la population et après la rechute, les cellules résistantes ont toutes un profil de cellule initiateur de mélanome. La tumeur est hétérogène et peut être constituée de sous-populations MITF low et MITF high, dans tous les cas, l'inhibition de ZEB1 présente un intérêt thérapeutique.

Alors que dans l'expérience sur les cellules sensibles, aucune synergie n'a été observée par l'inhibition conjointe de BRAF et de ZEB1, nous pouvons supposer au vu de nos résultats *in vitro* qu'il y aura bien une synergie dans ces cellules. Cette expérience devrait démontrer *in vivo* l'intérêt de cibler ZEB1 en combinaison avec les inhibiteurs de BRAFV600E. De plus, afin d'étudier le rôle de ZEB1 dans l'émergence de résistance *in vivo*, des tumeurs xéno greffées pourront être excisées par chirurgie et l'émergence de résistance sous traitement au vemurafenib sera analysée en présence ou en absence de ZEB1.

En termes de stratégie thérapeutique, cibler ZEB1 en tant que facteur de transcription paraît difficile et aucun inhibiteur n'est à ce jour disponible. Il paraît alors plus simple de déterminer les gènes cibles de ZEB1 impliqués dans la résistance et pouvant faire l'objet d'une thérapie. Ces gènes cibles restent à être identifiés dans le mélanome comme cela a été souligné dans un des points précédents. Une autre approche consiste à identifier des régulateurs de l'expression de ZEB1.

En utilisant comme critère de sélection la réexpression d'un facteur cible de ZEB1, miR-203, réprimé dans le cancer du pancréas, des chercheurs ont réalisé un criblage sur des drogues modifiant le contexte épigénétique des cellules. Ils ont ainsi pu isoler le mocetinostat, une histone déacétylase de classe I. Cette drogue va donc induire une répression de ZEB1, lever l'inhibition induite sur le miR-203 et d'autres cibles de ZEB1. Le miRNA pourra alors réprimer les acteurs du phénotype souche mis en place par ZEB1 et favoriser l'apoptose. En conséquence, il sensibilise les cellules à la drogue couramment utilisée dans le cancer du pancréas (Meidhof et al., 2015).

De manière analogue, un criblage sur nos modèles cellulaires de molécules pouvant potentiellement interférer avec l'expression de ZEB1 pourrait réinduire une sensibilité de ces cellules aux inhibiteurs de MAPK. Cela nous permettrait d'une part une approche thérapeutique plus pertinente que l'expression de shRNA dirigé contre ZEB1 et aussi d'identifier des régulateurs en amont de ce facteur de transcription.

Les analyses immunohistochimiques réalisées sur nos échantillons de patients ont montré que TWIST1 était exprimé dans les mélanomes BRAFV600E exprimant ZEB1 et surexprimé dans certains mélanomes négatifs pour ZEB1. En parallèle, les expériences réalisées *in vitro* dans des lignées qui n'expriment que TWIST1 comme EMT-TF ont montré que son ciblage donnait des résultats analogues à ceux obtenus en altérant ZEB1 dans les mélanomes ZEB1 positifs. Pris dans leur ensemble ces résultats suggèrent que TWIST1, dans

un sous-groupe de mélanomes n'exprimant pas ZEB1 serait capable de conférer de la résistance. Une série d'analyses analogues à celles effectuées sur ZEB1 serait envisageable et permettrait d'évaluer le potentiel thérapeutique de TWIST1.

Par ailleurs tous ces résultats ont été obtenus dans le même type de mélanome muté pour BRAFV600E. Il pourrait être intéressant d'analyser le rôle et les fonctions des facteurs TWIST1 et ZEB1 dans les mélanomes mutés pour NRAS ou sauvages pour BRAF et NRAS.

3. Perspectives : EMT-TFs et immunosuppression

Alors que les différentes thérapies ciblées mènent invariablement à l'émergence de résistance entre 6 mois et un an après le début du traitement, les immunothérapies (anti-CTLA4, anti-PD1) donnent des réponses à beaucoup plus long terme. Bien que les résultats soient extrêmement promoteurs, aussi bien en terme d'effets que de durabilité (certains patients répondent encore 2 ans après le début du traitement), ces traitements ne sont efficaces que pour 30 à 40% des patients. Pourtant indépendante du type de mutation, la stratégie de réactivation du système immunitaire devrait fonctionner pour une grande majorité des patients.

Des données récentes pourraient toutefois expliquer pourquoi certains patients ne répondent pas à ces traitements. En effet, dès 2009, une étude montre *in vitro* et *in vivo* avec des cellules murines et humaines que l'expression de SNAIL dans des cellules de mélanomes co-cultivées avec des cellules du système immunitaire favorise l'expression de signaux immunosuppresseurs par ces dernières (Kudo-Saito, Shirako, Takeuchi, & Kawakami, 2009). Les cellules exprimant SNAIL vont favoriser la sécrétion de cytokines comme TSP1. Cette cytokine à un fort potentiel immunosuppresseur et va permettre la génération de lymphocytes T-régulateurs, des inhibiteurs des lymphocytes T effecteurs (les lymphocytes anti-tumoraux). Une autre étude, publiée en 2014 présente ZEB1 comme un immunosuppresseur dans des cellules de cancer du poumon (L. Chen et al., 2014). Dans ce modèle, ZEB1 va réprimer l'expression de miR-200, levant l'inhibition induite par ce dernier sur l'expression de PD-L1. Ce ligand situé à la surface de cellules de l'immunité voire même de cellules tumorales, inhibe la transmission d'un signal activateur lors de la rencontre avec un antigène.

En conclusion, il apparait que les EMT-TFs ont un potentiel tumorigène plus important qu'initialement décrit. Dans un premier temps considérés comme activés dans les étapes tardives du développement tumoral, leur participation se cantonnait à l'EMT et à la génération de métastases. Depuis, leur implication dans les étapes précoces que sont l'initiation et la transformation tumorale a été clairement établie. Cette expression permet l'acquisition de propriétés souches par les cellules de la tumeur conférant une résistance aux chimiothérapies et aux thérapies ciblées. Il apparait maintenant que ces facteurs peuvent par différents moyens moduler et inhiber la réponse immunitaire, une voie qu'il conviendra d'investiguer plus avant dans le mélanome, afin de déterminer si cibler ZEB1 pourrait rétablir la sensibilité aux anti-PD1 par exemple.

BIBLIOGRAPHIE

V. Bibliographie

- Ackermann, J., Fruttschi, M., Kaloulis, K., McKee, T., Trumpp, A., & Beermann, F. (2005). Metastasizing melanoma formation caused by expression of activated N-RasQ61K on an INK4a-deficient background. *Cancer Research*, *65*(10), 4005–11. <http://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-2970>
- Acloque, H., Adams, M. S., Fishwick, K., Bronner-Fraser, M., & Nieto, M. A. (2009). Epithelial-mesenchymal transitions: the importance of changing cell state in development and disease. *Journal of Clinical Investigation*, *119*(6), 1438–1449. <http://doi.org/10.1172/JCI38019>
- Aguissa-Touré, A.-H., & Li, G. (2012). Genetic alterations of PTEN in human melanoma. *Cellular and Molecular Life Sciences : CMLS*, *69*(9), 1475–91. <http://doi.org/10.1007/s00018-011-0878-0>
- Aladowicz, E., Ferro, L., Vitali, G. C., Venditti, E., Fornasari, L., & Lanfranccone, L. (2013). Molecular networks in melanoma invasion and metastasis. *Future Oncology (London, England)*, *9*(5), 713–26. <http://doi.org/10.2217/fon.13.9>
- Albino, A. P., Strange, R. Le, Oliff, A. I., Furth, M. E., & Old, L. J. (1984). Transforming ras genes from human melanoma: a manifestation of tumour heterogeneity? *Nature*, *308*(5954), 69–72. <http://doi.org/10.1038/308069a0>
- Al-Hajj, M., & Clarke, M. F. (2004). Self-renewal and solid tumor stem cells. *Oncogene*, *23*(43), 7274–82. <http://doi.org/10.1038/sj.onc.1207947>
- Al-Hajj, M., Wicha, M. S., Benito-Hernandez, A., Morrison, S. J., & Clarke, M. F. (2003). Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *100*(7), 3983–8. <http://doi.org/10.1073/pnas.0530291100>
- Amaria, R. N., & Kim, K. B. (2014). Dabrafenib for the treatment of melanoma. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, *15*(7), 1043–50. <http://doi.org/10.1517/14656566.2014.909410>
- Anastas, J. N., Kulikauskas, R. M., Tamir, T., Rizos, H., Long, G. V, von Euw, E. M., ... Moon, R. T. (2014). WNT5A enhances resistance of melanoma cells to targeted BRAF inhibitors. *The Journal of Clinical Investigation*, *124*(7), 2877–90. <http://doi.org/10.1172/JCI70156>
- Ando, H., Niki, Y., Ito, M., Akiyama, K., Matsui, M. S., Yarosh, D. B., & Ichihashi, M. (2012). Melanosomes are transferred from melanocytes to keratinocytes through the processes of packaging, release, uptake, and dispersion. *The Journal of Investigative Dermatology*, *132*(4), 1222–9. <http://doi.org/10.1038/jid.2011.413>
- Ansieau, S., Bastid, J., Doreau, A., Morel, A.-P., Bouchet, B. P., Thomas, C., ... Puisieux, A. (2008). Induction of EMT by twist proteins as a collateral effect of tumor-promoting inactivation of premature senescence. *Cancer Cell*, *14*(1), 79–89. <http://doi.org/10.1016/j.ccr.2008.06.005>
- Arnoux, V., Nassour, M., L'Helgoualc'h, A., Hipskind, R. A., & Savagner, P. (2008). Erk5 controls Slug expression and keratinocyte activation during wound healing. *Molecular Biology of the Cell*, *19*(11), 4738–49. <http://doi.org/10.1091/mbc.E07-10-1078>

- Arozarena, I., Sanchez-Laorden, B., Packer, L., Hidalgo-Carcedo, C., Hayward, R., Viros, A., ... Marais, R. (2011). Oncogenic BRAF induces melanoma cell invasion by downregulating the cGMP-specific phosphodiesterase PDE5A. *Cancer Cell*, *19*(1), 45–57. <http://doi.org/10.1016/j.ccr.2010.10.029>
- Bafounta, M. L., Beauchet, A., Aegerter, P., & Saiag, P. (2001). Is dermoscopy (epiluminescence microscopy) useful for the diagnosis of melanoma? Results of a meta-analysis using techniques adapted to the evaluation of diagnostic tests. *Archives of Dermatology*, *137*(10), 1343–50. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11594860>
- Balch, C. M., Gershenwald, J. E., Soong, S.-J., Thompson, J. F., Atkins, M. B., Byrd, D. R., ... Sondak, V. K. (2009). Final version of 2009 AJCC melanoma staging and classification. *Journal of Clinical Oncology : Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, *27*(36), 6199–206. <http://doi.org/10.1200/JCO.2009.23.4799>
- Bansal, R., & Nikiforov, M. A. (2010). Pathways of oncogene-induced senescence in human melanocytic cells. *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)*, *9*(14), 2782–8. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3040961&tool=pmcentrez&render type=abstract>
- Bardeesy, N., Bastian, B. C., Hezel, A., Pinkel, D., DePinho, R. A., & Chin, L. (2001). Dual inactivation of RB and p53 pathways in RAS-induced melanomas. *Molecular and Cellular Biology*, *21*(6), 2144–53. <http://doi.org/10.1128/MCB.21.6.2144-2153.2001>
- Barnes, R. M., & Firulli, A. B. (2009). A twist of insight - the role of Twist-family bHLH factors in development. *The International Journal of Developmental Biology*, *53*(7), 909–24. <http://doi.org/10.1387/ijdb.082747rb>
- Bastian, B. C. (2014). The molecular pathology of melanoma: an integrated taxonomy of melanocytic neoplasia. *Annual Review of Pathology*, *9*, 239–71. <http://doi.org/10.1146/annurev-pathol-012513-104658>
- Beck, B., Lapouge, G., Rorive, S., Drogat, B., Desaedelaere, K., Delafaille, S., ... Blanpain, C. (2015). Different Levels of Twist1 Regulate Skin Tumor Initiation, Stemness, and Progression. *Cell Stem Cell*, *16*(1), 67–79. <http://doi.org/10.1016/j.stem.2014.12.002>
- Becker, J. C., Houben, R., Schrama, D., Voigt, H., Ugurel, S., & Reisfeld, R. A. (2010). Mouse models for melanoma: a personal perspective. *Experimental Dermatology*, *19*(2), 157–64. <http://doi.org/10.1111/j.1600-0625.2009.00986.x>
- Bennett, D. C. (2008). How to make a melanoma: what do we know of the primary clonal events? *Pigment Cell & Melanoma Research*, *21*(1), 27–38. <http://doi.org/10.1111/j.1755-148X.2007.00433.x>
- Bennett, D. C., & Medrano, E. E. (2002). Molecular regulation of melanocyte senescence. *Pigment Cell Research / Sponsored by the European Society for Pigment Cell Research and the International Pigment Cell Society*, *15*(4), 242–50. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12100489>

- Bertolotto, C., Lesueur, F., Giuliano, S., Strub, T., de Lichy, M., Bille, K., ... Bressac-de Paillerets, B. (2011). A SUMOylation-defective MITF germline mutation predisposes to melanoma and renal carcinoma. *Nature*, *480*(7375), 94–8. <http://doi.org/10.1038/nature10539>
- Bishop, D. T., Demenais, F., Iles, M. M., Harland, M., Taylor, J. C., Corda, E., ... Bishop, J. A. N. (2009). Genome-wide association study identifies three loci associated with melanoma risk. *Nature Genetics*, *41*(8), 920–5. <http://doi.org/10.1038/ng.411>
- Bollag, G., Hirth, P., Tsai, J., Zhang, J., Ibrahim, P. N., Cho, H., ... Nolop, K. (2010). Clinical efficacy of a RAF inhibitor needs broad target blockade in BRAF-mutant melanoma. *Nature*, *467*(7315), 596–9. <http://doi.org/10.1038/nature09454>
- Bollag, G., Tsai, J., Zhang, J., Zhang, C., Ibrahim, P., Nolop, K., & Hirth, P. (2012). Vemurafenib: the first drug approved for BRAF-mutant cancer. *Nature Reviews. Drug Discovery*, *11*(11), 873–86. <http://doi.org/10.1038/nrd3847>
- Bondurand, N., Pingault, V., Goerich, D. E., Lemort, N., Sock, E., Le Caignec, C., ... Goossens, M. (2000). Interaction among SOX10, PAX3 and MITF, three genes altered in Waardenburg syndrome. *Human Molecular Genetics*, *9*(13), 1907–17. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10942418>
- Bourgeois, P., Bolcato-Bellemin, A. L., Danse, J. M., Bloch-Zupan, A., Yoshida, K., Stoetzel, C., & Perrin-Schmitt, F. (1998). The variable expressivity and incomplete penetrance of the twist-null heterozygous mouse phenotype resemble those of human Saethre-Chotzen syndrome. *Human Molecular Genetics*, *7*(6), 945–57. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9580658>
- Brabletz, T., Jung, A., Reu, S., Porzner, M., Hlubek, F., Kunz-Schughart, L. A., ... Kirchner, T. (2001). Variable beta-catenin expression in colorectal cancers indicates tumor progression driven by the tumor environment. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *98*(18), 10356–61. <http://doi.org/10.1073/pnas.171610498>
- Brauer, R. R., Zigler, M., Villares, G. J., Dobroff, A. S., & Bar-Eli, M. (2011). Transcriptional control of melanoma metastasis: the importance of the tumor microenvironment. *Seminars in Cancer Biology*, *21*(2), 83–8. <http://doi.org/10.1016/j.semcancer.2010.12.007>
- Bronner, M. E. (2012). Formation and migration of neural crest cells in the vertebrate embryo. *Histochemistry and Cell Biology*, *138*(2), 179–86. <http://doi.org/10.1007/s00418-012-0999-z>
- Brown, M. D., & Sacks, D. B. (2009). Protein scaffolds in MAP kinase signalling. *Cellular Signalling*, *21*(4), 462–9. <http://doi.org/10.1016/j.cellsig.2008.11.013>
- Burd, C. E., Liu, W., Huynh, M. V., Waqas, M. A., Gillahan, J. E., Clark, K. S., ... Sharpless, N. E. (2014). Mutation-specific RAS oncogenicity explains NRAS codon 61 selection in melanoma. *Cancer Discovery*, *4*(12), 1418–29. <http://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-14-0729>
- Burd, C. E., Sorrentino, J. A., Clark, K. S., Darr, D. B., Krishnamurthy, J., Deal, A. M., ... Sharpless, N. E. (2013). Monitoring Tumorigenesis and Senescence In Vivo with a p16INK4a-Luciferase Model. *Cell*, *152*(1-2), 340–351. <http://doi.org/10.1016/j.cell.2012.12.010>

- Byers, L. A., Diao, L., Wang, J., Saintigny, P., Girard, L., Peyton, M., ... Heymach, J. V. (2013). An epithelial-mesenchymal transition gene signature predicts resistance to EGFR and PI3K inhibitors and identifies Axl as a therapeutic target for overcoming EGFR inhibitor resistance. *Clinical Cancer Research : An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 19(1), 279–90. <http://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-12-1558>
- Cai, J., & Jabs, E. W. (2005). A twisted hand: bHLH protein phosphorylation and dimerization regulate limb development. *BioEssays : News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology*, 27(11), 1102–6. <http://doi.org/10.1002/bies.20313>
- Cano, A., Pérez-Moreno, M. A., Rodrigo, I., Locascio, A., Blanco, M. J., del Barrio, M. G., ... Nieto, M. A. (2000). The transcription factor snail controls epithelial-mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression. *Nature Cell Biology*, 2(2), 76–83. <http://doi.org/10.1038/35000025>
- Cano, A., & Portillo, F. (2010). An emerging role for class I bHLH E2-2 proteins in EMT regulation and tumour progression. *Cell Adhesion and Migration*, 4(1), 56–60. <http://doi.org/10.4161/cam.4.1.9995>
- Cantwell-Dorris, E. R., O'Leary, J. J., & Sheils, O. M. (2011). BRAFV600E: implications for carcinogenesis and molecular therapy. *Molecular Cancer Therapeutics*, 10(3), 385–94. <http://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-10-0799>
- Carreira, S., Goodall, J., Aksan, I., La Rocca, S. A., Galibert, M.-D., Denat, L., ... Goding, C. R. (2005). Mitf cooperates with Rb1 and activates p21Cip1 expression to regulate cell cycle progression. *Nature*, 433(7027), 764–9. <http://doi.org/10.1038/nature03269>
- Carreira, S., Goodall, J., Denat, L., Rodriguez, M., Nuciforo, P., Hoek, K. S., ... Goding, C. R. (2006). Mitf regulation of Dia1 controls melanoma proliferation and invasiveness. *Genes & Development*, 20(24), 3426–39. <http://doi.org/10.1101/gad.406406>
- Cartlidge, R. A., Thomas, G. R., Cagnol, S., Jong, K. A., Molton, S. A., Finch, A. J., & McMahon, M. (2008). Oncogenic BRAF(V600E) inhibits BIM expression to promote melanoma cell survival. *Pigment Cell & Melanoma Research*, 21(5), 534–44. <http://doi.org/10.1111/j.1755-148X.2008.00491.x>
- Carver, E. A., Jiang, R., Lan, Y., Oram, K. F., & Gridley, T. (2001). The mouse snail gene encodes a key regulator of the epithelial-mesenchymal transition. *Molecular and Cellular Biology*, 21(23), 8184–8. <http://doi.org/10.1128/MCB.21.23.8184-8188.2001>
- Casas, E., Kim, J., Bendesky, A., Ohno-Machado, L., Wolfe, C. J., & Yang, J. (2011). Snail2 is an essential mediator of Twist1-induced epithelial mesenchymal transition and metastasis. *Cancer Research*, 71(1), 245–54. <http://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-2330>
- Chapman, P. B., Hauschild, A., Robert, C., Haanen, J. B., Ascierto, P., Larkin, J., ... McArthur, G. A. (2011). Improved survival with vemurafenib in melanoma with BRAF V600E mutation. *The New England Journal of Medicine*, 364(26), 2507–16. <http://doi.org/10.1056/NEJMoa1103782>
- Cheli, Y., Giuliano, S., Guiliano, S., Botton, T., Rocchi, S., Hofman, V., ... Ballotti, R. (2011). Mitf is the key molecular switch between mouse or human melanoma initiating cells and their differentiated progeny. *Oncogene*, 30(20), 2307–18. <http://doi.org/10.1038/onc.2010.598>

- Cheli, Y., Ohanna, M., Ballotti, R., & Bertolotto, C. (2010). Fifteen-year quest for microphthalmia-associated transcription factor target genes. *Pigment Cell & Melanoma Research*, 23(1), 27–40. <http://doi.org/10.1111/j.1755-148X.2009.00653.x>
- Chen, L., Gibbons, D. L., Goswami, S., Cortez, M. A., Ahn, Y.-H., Byers, L. A., ... Qin, F. X.-F. (2014). Metastasis is regulated via microRNA-200/ZEB1 axis control of tumour cell PD-L1 expression and intratumoral immunosuppression. *Nature Communications*, 5, 5241. <http://doi.org/10.1038/ncomms6241>
- Chen, Z. F., & Behringer, R. R. (1995). twist is required in head mesenchyme for cranial neural tube morphogenesis. *Genes & Development*, 9(6), 686–99. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7729687>
- Chin, L. (1999). Modeling malignant melanoma in mice: pathogenesis and maintenance. *Oncogene*, 18(38), 5304–10. <http://doi.org/10.1038/sj.onc.1203106>
- Cichorek, M., Wachulska, M., Stasiewicz, A., & Tymińska, A. (2013). Skin melanocytes: biology and development. *Postępy Dermatologii i Alergologii*, 30(1), 30–41. <http://doi.org/10.5114/pdia.2013.33376>
- Clark, W. H., Elder, D. E., Guerry, D., Epstein, M. N., Greene, M. H., & Van Horn, M. (1984). A study of tumor progression: the precursor lesions of superficial spreading and nodular melanoma. *Human Pathology*, 15(12), 1147–65. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6500548>
- Cobaleda, C., Pérez-Caro, M., Vicente-Dueñas, C., & Sánchez-García, I. (2007). Function of the zinc-finger transcription factor SNAI2 in cancer and development. *Annual Review of Genetics*, 41, 41–61. <http://doi.org/10.1146/annurev.genet.41.110306.130146>
- Conde-Perez, A., & Larue, L. (2012). PTEN and melanomagenesis. *Future Oncology (London, England)*, 8(9), 1109–20. <http://doi.org/10.2217/fon.12.106>
- Conde-Perez, A., & Larue, L. (2014). Human relevance of NRAS/BRAF mouse melanoma models. *European Journal of Cell Biology*, 93(1-2), 82–6. <http://doi.org/10.1016/j.ejcb.2013.10.010>
- Connerney, J., Andreeva, V., Leshem, Y., Muentener, C., Mercado, M. A., & Spicer, D. B. (2006). Twist1 dimer selection regulates cranial suture patterning and fusion. *Developmental Dynamics : An Official Publication of the American Association of Anatomists*, 235(5), 1345–57. <http://doi.org/10.1002/dvdy.20717>
- Crowson, A. N., Magro, C. M., & Mihm, M. C. (2006). Prognosticators of melanoma, the melanoma report, and the sentinel lymph node. *Modern Pathology : An Official Journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*, 19 Suppl 2, S71–87. <http://doi.org/10.1038/modpathol.3800517>
- Cui, J., Shen, L. Y., & Wang, G. C. (1991). Role of hair follicles in the repigmentation of vitiligo. *The Journal of Investigative Dermatology*, 97(3), 410–6. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1714927>

- Dahl, C., & Guldborg, P. (2007). The genome and epigenome of malignant melanoma. *APMIS : Acta Pathologica, Microbiologica, et Immunologica Scandinavica*, 115(10), 1161–76. http://doi.org/10.1111/j.1600-0463.2007.apm_855.xml.x
- Dalle, S., Poulalhon, N., & Thomas, L. (2011). Vemurafenib in melanoma with BRAF V600E mutation. *The New England Journal of Medicine*, 365(15), 1448–9; author reply 1450. <http://doi.org/10.1056/NEJMc1108651#SA2>
- Dankort, D., Curley, D. P., Cartlidge, R. A., Nelson, B., Karnezis, A. N., Damsky, W. E., ... Bosenberg, M. (2009). Braf(V600E) cooperates with Pten loss to induce metastatic melanoma. *Nature Genetics*, 41(5), 544–52. <http://doi.org/10.1038/ng.356>
- Dave, N., Guaita-Esteruelas, S., Gutarra, S., Frias, À., Beltran, M., Peiró, S., & de Herreros, A. G. (2011). Functional cooperation between Snail1 and twist in the regulation of ZEB1 expression during epithelial to mesenchymal transition. *The Journal of Biological Chemistry*, 286(14), 12024–32. <http://doi.org/10.1074/jbc.M110.168625>
- Davies, H., Bignell, G. R., Cox, C., Stephens, P., Edkins, S., Clegg, S., ... Futreal, P. A. (2002). Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature*, 417(6892), 949–54. <http://doi.org/10.1038/nature00766>
- De Craene, B., & Berx, G. (2013). Regulatory networks defining EMT during cancer initiation and progression. *Nature Reviews. Cancer*, 13(2), 97–110. <http://doi.org/10.1038/nrc3447>
- De Craene, B., Denecker, G., Vermassen, P., Taminau, J., Mauch, C., Derore, A., ... Berx, G. (2014). Epidermal Snail expression drives skin cancer initiation and progression through enhanced cytoprotection, epidermal stem/progenitor cell expansion and enhanced metastatic potential. *Cell Death and Differentiation*, 21(2), 310–20. <http://doi.org/10.1038/cdd.2013.148>
- Denecker, G., Vandamme, N., Akay, O., Koludrovic, D., Taminau, J., Lemeire, K., ... Berx, G. (2014). Identification of a ZEB2-MITF-ZEB1 transcriptional network that controls melanogenesis and melanoma progression. *Cell Death and Differentiation*, 21(8), 1250–61. <http://doi.org/10.1038/cdd.2014.44>
- Dhomen, N., Reis-Filho, J. S., da Rocha Dias, S., Hayward, R., Savage, K., Delmas, V., ... Marais, R. (2009). Oncogenic Braf induces melanocyte senescence and melanoma in mice. *Cancer Cell*, 15(4), 294–303. <http://doi.org/10.1016/j.ccr.2009.02.022>
- Eckhart, L., Lippens, S., Tschachler, E., & Declercq, W. (2013). Cell death by cornification. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1833(12), 3471–80. <http://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2013.06.010>
- El Ghouzzi, V., Le Merrer, M., Perrin-Schmitt, F., Lajeunie, E., Benit, P., Renier, D., ... Bonaventure, J. (1997). Mutations of the TWIST gene in the Saethre-Chotzen syndrome. *Nature Genetics*, 15(1), 42–6. <http://doi.org/10.1038/ng0197-42>
- Fedorenko, I. V., Paraiso, K. H. T., & Smalley, K. S. M. (2011). Acquired and intrinsic BRAF inhibitor resistance in BRAF V600E mutant melanoma. *Biochemical Pharmacology*, 82(3), 201–9. <http://doi.org/10.1016/j.bcp.2011.05.015>
- Fernández-Barral, A., Orgaz, J. L., Baquero, P., Ali, Z., Moreno, A., Tiana, M., ... Jiménez, B. (2014). Regulatory and functional connection of microphthalmia-associated transcription factor and

- anti-metastatic pigment epithelium derived factor in melanoma. *Neoplasia (New York, N.Y.)*, 16(6), 529–42. <http://doi.org/10.1016/j.neo.2014.06.001>
- Flaherty, K. T., Infante, J. R., Daud, A., Gonzalez, R., Kefford, R. F., Sosman, J., ... Weber, J. (2012). Combined BRAF and MEK inhibition in melanoma with BRAF V600 mutations. *The New England Journal of Medicine*, 367(18), 1694–703. <http://doi.org/10.1056/NEJMoa1210093>
- Flaherty, K. T., Puzanov, I., Kim, K. B., Ribas, A., McArthur, G. A., Sosman, J. A., ... Chapman, P. B. (2010). Inhibition of mutated, activated BRAF in metastatic melanoma. *The New England Journal of Medicine*, 363(9), 809–19. <http://doi.org/10.1056/NEJMoa1002011>
- Foletto, M. C., & Haas, S. E. (2014). Cutaneous melanoma: new advances in treatment. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, 89(2), 301–310. Retrieved from http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4008062&tool=pmcentrez&render_type=abstract
- Fresno Vara, J. A., Casado, E., de Castro, J., Cejas, P., Belda-Iniesta, C., & González-Barón, M. (2004). PI3K/Akt signalling pathway and cancer. *Cancer Treatment Reviews*, 30(2), 193–204. <http://doi.org/10.1016/j.ctrv.2003.07.007>
- Fuchs, E., & Raghavan, S. (2002). Getting under the skin of epidermal morphogenesis. *Nature Reviews. Genetics*, 3(3), 199–209. <http://doi.org/10.1038/nrg758>
- Gammill, L. S., & Bronner-Fraser, M. (2003). Neural crest specification: migrating into genomics. *Nature Reviews. Neuroscience*, 4(10), 795–805. <http://doi.org/10.1038/nrn1219>
- Garbe, C., Eigentler, T. K., Keilholz, U., Hauschild, A., & Kirkwood, J. M. (2011). Systematic review of medical treatment in melanoma: current status and future prospects. *The Oncologist*, 16(1), 5–24. <http://doi.org/10.1634/theoncologist.2010-0190>
- Garnett, M. J., & Marais, R. (2004). Guilty as charged: B-RAF is a human oncogene. *Cancer Cell*, 6(4), 313–9. <http://doi.org/10.1016/j.ccr.2004.09.022>
- Gembarska, A., Luciani, F., Fedele, C., Russell, E. A., Dewaele, M., Villar, S., ... Marine, J.-C. (2012). MDM4 is a key therapeutic target in cutaneous melanoma. *Nature Medicine*, 18(8), 1239–47. <http://doi.org/10.1038/nm.2863>
- Ghoumid, J., Drevillon, L., Alavi-Naini, S. M., Bondurand, N., Rio, M., Briand-Suleau, A., ... Giurgea, I. (2013). ZEB2 zinc-finger missense mutations lead to hypomorphic alleles and a mild Mowat-Wilson syndrome. *Human Molecular Genetics*, 22(13), 2652–61. <http://doi.org/10.1093/hmg/ddt114>
- Giuliano, S., Cheli, Y., Ohanna, M., Bonet, C., Beuret, L., Bille, K., ... Bertolotto, C. (2010). Microphthalmia-associated transcription factor controls the DNA damage response and a lineage-specific senescence program in melanomas. *Cancer Research*, 70(9), 3813–22. <http://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-2913>
- Giuliano, S., Ohanna, M., Ballotti, R., & Bertolotto, C. (2011). Advances in melanoma senescence and potential clinical application. *Pigment Cell & Melanoma Research*, 24(2), 295–308. <http://doi.org/10.1111/j.1755-148X.2010.00820.x>

- Goding, C. R. (2011). Commentary. A picture of Mitf in melanoma immortality. *Oncogene*, *30*(20), 2304–6. <http://doi.org/10.1038/onc.2010.641>
- Gonzalez, D. M., & Medici, D. (2014). Signaling mechanisms of the epithelial-mesenchymal transition. *Science Signaling*, *7*(344), re8–re8. <http://doi.org/10.1126/scisignal.2005189>
- Goossens, S., Janzen, V., Bartunkova, S., Yokomizo, T., Drogat, B., Crisan, M., ... Haigh, J. J. (2011). The EMT regulator Zeb2/Sip1 is essential for murine embryonic hematopoietic stem/progenitor cell differentiation and mobilization. *Blood*, *117*(21), 5620–30. <http://doi.org/10.1182/blood-2010-08-300236>
- Goossens, S., Radaelli, E., Blanchet, O., Durinck, K., Van der Meulen, J., Peirs, S., ... Haigh, J. J. (2015). ZEB2 drives immature T-cell lymphoblastic leukaemia development via enhanced tumour-initiating potential and IL-7 receptor signalling. *Nature Communications*, *6*, 5794. <http://doi.org/10.1038/ncomms6794>
- Govindarajan, B., Sligh, J. E., Vincent, B. J., Li, M., Canter, J. A., Nickoloff, B. J., ... Arbiser, J. L. (2007). Overexpression of Akt converts radial growth melanoma to vertical growth melanoma. *The Journal of Clinical Investigation*, *117*(3), 719–29. <http://doi.org/10.1172/JCI30102>
- Grau, Y., Carteret, C., & Simpson, P. (1984). Mutations and Chromosomal Rearrangements Affecting the Expression of Snail, a Gene Involved in Embryonic Patterning in DROSOPHILA MELANOGASTER. *Genetics*, *108*(2), 347–60. Retrieved from [/pmc/articles/PMC1202410/?report=abstract](http://pmc/articles/PMC1202410/?report=abstract)
- Gray-Schopfer, V. C., Cheong, S. C., Chong, H., Chow, J., Moss, T., Abdel-Malek, Z. A., ... Bennett, D. C. (2006). Cellular senescence in naevi and immortalisation in melanoma: a role for p16? *British Journal of Cancer*, *95*(4), 496–505. <http://doi.org/10.1038/sj.bjc.6603283>
- Grill, C., Bergsteinsdóttir, K., Ogmundsdóttir, M. H., Pogenberg, V., Schepsky, A., Wilmanns, M., ... Steingrímsson, E. (2013). MITF mutations associated with pigment deficiency syndromes and melanoma have different effects on protein function. *Human Molecular Genetics*, *22*(21), 4357–67. <http://doi.org/10.1093/hmg/ddt285>
- Gunturi, A., & McDermott, D. F. (2015). Nivolumab for the treatment of cancer. *Expert Opinion on Investigational Drugs*, *24*(2), 253–60. <http://doi.org/10.1517/13543784.2015.991819>
- Guo, W., Keckesova, Z., Donaher, J. L., Shibue, T., Tischler, V., Reinhardt, F., ... Weinberg, R. A. (2012). Slug and Sox9 cooperatively determine the mammary stem cell state. *Cell*, *148*(5), 1015–28. <http://doi.org/10.1016/j.cell.2012.02.008>
- Haferkamp, S., Borst, A., Adam, C., Becker, T. M., Motschenbacher, S., Windhövel, S., ... Meierjohann, S. (2013). Vemurafenib induces senescence features in melanoma cells. *The Journal of Investigative Dermatology*, *133*(6), 1601–9. <http://doi.org/10.1038/jid.2013.6>
- Haferkamp, S., Tran, S. L., Becker, T. M., Scurr, L. L., Kefford, R. F., & Rizos, H. (2009). The relative contributions of the p53 and pRb pathways in oncogene-induced melanocyte senescence. *Aging*, *1*(6), 542–56. Retrieved from http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2806033&tool=pmcentrez&render_type=abstract

- Haqq, C., Nosrati, M., Sudilovsky, D., Crothers, J., Khodabakhsh, D., Pulliam, B. L., ... Kashani-Sabet, M. (2005). The gene expression signatures of melanoma progression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *102*(17), 6092–7. <http://doi.org/10.1073/pnas.0501564102>
- Hartman, M. L., & Czyz, M. (2015). Pro-survival role of MITF in melanoma. *The Journal of Investigative Dermatology*, *135*(2), 352–8. <http://doi.org/10.1038/jid.2014.319>
- Haslehurst, A. M., Koti, M., Dharsee, M., Nuin, P., Evans, K., Geraci, J., ... Feilotter, H. (2012). EMT transcription factors snail and slug directly contribute to cisplatin resistance in ovarian cancer. *BMC Cancer*, *12*, 91. <http://doi.org/10.1186/1471-2407-12-91>
- Hearing, V. J. (2011). Determination of melanin synthetic pathways. *The Journal of Investigative Dermatology*, *131*(E1), E8–E11. <http://doi.org/10.1038/skinbio.2011.4>
- Hemmings, B. A., & Restuccia, D. F. (2012). PI3K-PKB/Akt pathway. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, *4*(9), a011189. <http://doi.org/10.1101/cshperspect.a011189>
- Henry, J., Toulza, E., Hsu, C.-Y., Pellerin, L., Balica, S., Mazereeuw-Hautier, J., ... Simon, M. (2012). Update on the epidermal differentiation complex. *Frontiers in Bioscience (Landmark Edition)*, *17*, 1517–32. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22201818>
- Hirobe, T. (2005). Role of keratinocyte-derived factors involved in regulating the proliferation and differentiation of mammalian epidermal melanocytes. *Pigment Cell Research / Sponsored by the European Society for Pigment Cell Research and the International Pigment Cell Society*, *18*(1), 2–12. <http://doi.org/10.1111/j.1600-0749.2004.00198.x>
- Hocker, T. L., Singh, M. K., & Tsao, H. (2008). Melanoma genetics and therapeutic approaches in the 21st century: moving from the benchside to the bedside. *The Journal of Investigative Dermatology*, *128*(11), 2575–95. <http://doi.org/10.1038/jid.2008.226>
- Hodi, F. S., O'Day, S. J., McDermott, D. F., Weber, R. W., Sosman, J. A., Haanen, J. B., ... Urba, W. J. (2010). Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. *The New England Journal of Medicine*, *363*(8), 711–23. <http://doi.org/10.1056/NEJMoa1003466>
- Hodis, E., Watson, I. R., Kryukov, G. V., Arold, S. T., Imielinski, M., Theurillat, J.-P., ... Chin, L. (2012). A landscape of driver mutations in melanoma. *Cell*, *150*(2), 251–63. <http://doi.org/10.1016/j.cell.2012.06.024>
- Hoek, K. S., & Goding, C. R. (2010). Cancer stem cells versus phenotype-switching in melanoma. *Pigment Cell & Melanoma Research*, *23*(6), 746–59. <http://doi.org/10.1111/j.1755-148X.2010.00757.x>
- Hou, L., & Pavan, W. J. (2008). Transcriptional and signaling regulation in neural crest stem cell-derived melanocyte development: do all roads lead to Mitf? *Cell Research*, *18*(12), 1163–76. <http://doi.org/10.1038/cr.2008.303>
- Houben, R., Becker, J. C., Kappel, A., Terheyden, P., Bröcker, E.-B., Goetz, R., & Rapp, U. R. (2004). Constitutive activation of the Ras-Raf signaling pathway in metastatic melanoma is associated with poor prognosis. *Journal of Carcinogenesis*, *3*(1), 6. <http://doi.org/10.1186/1477-3163-3-6>

- Hu-Lieskovan, S., Robert, L., Homet Moreno, B., & Ribas, A. (2014). Combining targeted therapy with immunotherapy in BRAF-mutant melanoma: promise and challenges. *Journal of Clinical Oncology : Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 32(21), 2248–54. <http://doi.org/10.1200/JCO.2013.52.1377>
- Hüsemann, Y., & Klein, C. A. (2009). The analysis of metastasis in transgenic mouse models. *Transgenic Research*, 18(1), 1–5. <http://doi.org/10.1007/s11248-008-9225-0>
- Işeri, O. D., Kars, M. D., Arpacı, F., Atalay, C., Pak, I., & Gündüz, U. (2011). Drug resistant MCF-7 cells exhibit epithelial-mesenchymal transition gene expression pattern. *Biomedicine & Pharmacotherapy = Biomédecine & Pharmacothérapie*, 65(1), 40–5. <http://doi.org/10.1016/j.biopha.2010.10.004>
- Iwano, M., Plieth, D., Danoff, T. M., Xue, C., Okada, H., & Neilson, E. G. (2002). Evidence that fibroblasts derive from epithelium during tissue fibrosis. *The Journal of Clinical Investigation*, 110(3), 341–50. <http://doi.org/10.1172/JCI15518>
- Jeffrey, K. L., Camps, M., Rommel, C., & Mackay, C. R. (2007). Targeting dual-specificity phosphatases: manipulating MAP kinase signalling and immune responses. *Nature Reviews. Drug Discovery*, 6(5), 391–403. <http://doi.org/10.1038/nrd2289>
- Jilaveanu, L. B., Aziz, S. A., & Kluger, H. M. Chemotherapy and biologic therapies for melanoma: do they work? *Clinics in Dermatology*, 27(6), 614–25. <http://doi.org/10.1016/j.clindermatol.2008.09.020>
- Johannessen, C. M., Boehm, J. S., Kim, S. Y., Thomas, S. R., Wardwell, L., Johnson, L. A., ... Garraway, L. A. (2010). COT drives resistance to RAF inhibition through MAP kinase pathway reactivation. *Nature*, 468(7326), 968–72. <http://doi.org/10.1038/nature09627>
- Johannessen, C. M., Johnson, L. A., Piccioni, F., Townes, A., Frederick, D. T., Donahue, M. K., ... Garraway, L. A. (2013). A melanocyte lineage program confers resistance to MAP kinase pathway inhibition. *Nature*, 504(7478), 138–142. <http://doi.org/10.1038/nature12688>
- Johnson, D. B., Flaherty, K. T., Weber, J. S., Infante, J. R., Kim, K. B., Kefford, R. F., ... Gonzalez, R. (2014). Combined BRAF (Dabrafenib) and MEK inhibition (Trametinib) in patients with BRAFV600-mutant melanoma experiencing progression with single-agent BRAF inhibitor. *Journal of Clinical Oncology : Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 32(33), 3697–704. <http://doi.org/10.1200/JCO.2014.57.3535>
- Joshi, P. G., Nair, N., Begum, G., Joshi, N. B., Sinkar, V. P., & Vora, S. (2007). Melanocyte-keratinocyte interaction induces calcium signalling and melanin transfer to keratinocytes. *Pigment Cell Research / Sponsored by the European Society for Pigment Cell Research and the International Pigment Cell Society*, 20(5), 380–4. <http://doi.org/10.1111/j.1600-0749.2007.00397.x>
- Kajita, M., McClinic, K. N., & Wade, P. A. (2004). Aberrant expression of the transcription factors snail and slug alters the response to genotoxic stress. *Molecular and Cellular Biology*, 24(17), 7559–66. <http://doi.org/10.1128/MCB.24.17.7559-7566.2004>
- Kalluri, R., & Weinberg, R. A. (2009). The basics of epithelial-mesenchymal transition. *The Journal of Clinical Investigation*, 119(6), 1420–8. <http://doi.org/10.1172/JCI39104>

- Kim, H., & Ronai, Z. A. (2015). The UPs and DOWNs of MITF in melanoma resistance. *Pigment Cell & Melanoma Research*, 28(2), 132–3. <http://doi.org/10.1111/pcmr.12338>
- Klein, R. M., & Aplin, A. E. (2009). Rnd3 regulation of the actin cytoskeleton promotes melanoma migration and invasive outgrowth in three dimensions. *Cancer Research*, 69(6), 2224–33. <http://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-3201>
- Knecht, A. K., & Bronner-Fraser, M. (2002). Induction of the neural crest: a multigene process. *Nature Reviews. Genetics*, 3(6), 453–61. <http://doi.org/10.1038/nrg819>
- Kovacic, J. C., Mercader, N., Torres, M., Boehm, M., & Fuster, V. (2012). Epithelial-to-mesenchymal and endothelial-to-mesenchymal transition: from cardiovascular development to disease. *Circulation*, 125(14), 1795–808. <http://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.111.040352>
- Kudo-Saito, C., Shirako, H., Takeuchi, T., & Kawakami, Y. (2009). Cancer metastasis is accelerated through immunosuppression during Snail-induced EMT of cancer cells. *Cancer Cell*, 15(3), 195–206. <http://doi.org/10.1016/j.ccr.2009.01.023>
- Kunz, M. (2014). Oncogenes in melanoma: an update. *European Journal of Cell Biology*, 93(1-2), 1–10. <http://doi.org/10.1016/j.ejcb.2013.12.002>
- Larue, L., de Vuyst, F., & Delmas, V. (2013). Modeling melanoblast development. *Cellular and Molecular Life Sciences : CMLS*, 70(6), 1067–79. <http://doi.org/10.1007/s00018-012-1112-4>
- Lebbé, C., Weber, J. S., Maio, M., Neyns, B., Harmankaya, K., Hamid, O., ... Wolchok, J. D. (2014). Survival follow-up and ipilimumab retreatment of patients with advanced melanoma who received ipilimumab in prior phase II studies. *Annals of Oncology : Official Journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*, 25(11), 2277–84. <http://doi.org/10.1093/annonc/mdu441>
- Lee, C., Collichio, F., Ollila, D., & Moschos, S. (2013). Historical review of melanoma treatment and outcomes. *Clinics in Dermatology*, 31(2), 141–7. <http://doi.org/10.1016/j.clindermatol.2012.08.015>
- Lee, S.-H., Lee, S.-J., Jung, Y. S., Xu, Y., Kang, H. S., Ha, N.-C., & Park, B.-J. (2009). Blocking of p53-Snail binding, promoted by oncogenic K-Ras, recovers p53 expression and function. *Neoplasia (New York, N.Y.)*, 11(1), 22–31, 6p following 31. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2606115&tool=pmcentrez&render type=abstract>
- Leiter, U., Meier, F., Schitteck, B., & Garbe, C. (2004). The natural course of cutaneous melanoma. *Journal of Surgical Oncology*, 86(4), 172–8. <http://doi.org/10.1002/jso.20079>
- Levy, C., Khaled, M., & Fisher, D. E. (2006). MITF: master regulator of melanocyte development and melanoma oncogene. *Trends in Molecular Medicine*, 12(9), 406–14. <http://doi.org/10.1016/j.molmed.2006.07.008>
- Li, L., Fukunaga-Kalabis, M., Yu, H., Xu, X., Kong, J., Lee, J. T., & Herlyn, M. (2010). Human dermal stem cells differentiate into functional epidermal melanocytes. *Journal of Cell Science*, 123(Pt 6), 853–60. <http://doi.org/10.1242/jcs.061598>

- Lim, J., & Thiery, J. P. (2012). Epithelial-mesenchymal transitions: insights from development. *Development (Cambridge, England)*, *139*(19), 3471–86. <http://doi.org/10.1242/dev.071209>
- Lito, P., Rosen, N., & Solit, D. B. (2013). Tumor adaptation and resistance to RAF inhibitors. *Nature Medicine*, *19*(11), 1401–9. <http://doi.org/10.1038/nm.3392>
- Liu, Y., Lu, X., Huang, L., Wang, W., Jiang, G., Dean, K. C., ... Dean, D. C. (2014). Different thresholds of ZEB1 are required for Ras-mediated tumour initiation and metastasis. *Nature Communications*, *5*, 5660. <http://doi.org/10.1038/ncomms6660>
- Long, G. V., Menzies, A. M., Nagrial, A. M., Haydu, L. E., Hamilton, A. L., Mann, G. J., ... Kefford, R. F. (2011). Prognostic and clinicopathologic associations of oncogenic BRAF in metastatic melanoma. *Journal of Clinical Oncology : Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, *29*(10), 1239–46. <http://doi.org/10.1200/JCO.2010.32.4327>
- Long, G. V., Stroyakovskiy, D., Gogas, H., Levchenko, E., de Braud, F., Larkin, J., ... Flaherty, K. (2014). Combined BRAF and MEK Inhibition versus BRAF Inhibition Alone in Melanoma. *New England Journal of Medicine*, *371*(20), 140929070023009. <http://doi.org/10.1056/NEJMoa1406037>
- Lu, J., Li, X.-P., Dong, Q., Kung, H.-F., & He, M.-L. (2010). TBX2 and TBX3: the special value for anticancer drug targets. *Biochimica et Biophysica Acta*, *1806*(2), 268–74. <http://doi.org/10.1016/j.bbcan.2010.07.001>
- Luke, J. J., & Hodi, F. S. (2012). Vemurafenib and BRAF inhibition: a new class of treatment for metastatic melanoma. *Clinical Cancer Research : An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, *18*(1), 9–14. <http://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-11-2197>
- Mani, S. A., Guo, W., Liao, M.-J., Eaton, E. N., Ayyanan, A., Zhou, A. Y., ... Weinberg, R. A. (2008). The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell*, *133*(4), 704–15. <http://doi.org/10.1016/j.cell.2008.03.027>
- Marsh Durban, V., Deuker, M. M., Bosenberg, M. W., Phillips, W., & McMahon, M. (2013). Differential AKT dependency displayed by mouse models of BRAFV600E-initiated melanoma. *The Journal of Clinical Investigation*, *123*(12), 5104–18. <http://doi.org/10.1172/JCI69619>
- Marzuka, A., Huang, L., Theodosakis, N., & Bosenberg, M. (2015). Melanoma Treatments: Advances and Mechanisms. *Journal of Cellular Physiology*. <http://doi.org/10.1002/jcp.25019>
- Massari, M. E., & Murre, C. (2000). Helix-loop-helix proteins: regulators of transcription in eucaryotic organisms. *Molecular and Cellular Biology*, *20*(2), 429–40. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=85097&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- McArthur, G. A., Chapman, P. B., Robert, C., Larkin, J., Haanen, J. B., Dummer, R., ... Hauschild, A. (2014). Safety and efficacy of vemurafenib in BRAF(V600E) and BRAF(V600K) mutation-positive melanoma (BRIM-3): extended follow-up of a phase 3, randomised, open-label study. *The Lancet. Oncology*, *15*(3), 323–32. [http://doi.org/10.1016/S1470-2045\(14\)70012-9](http://doi.org/10.1016/S1470-2045(14)70012-9)
- McGill, G. G., Horstmann, M., Widlund, H. R., Du, J., Motyckova, G., Nishimura, E. K., ... Fisher, D. E. (2002). Bcl2 regulation by the melanocyte master regulator Mitf modulates lineage survival and

- melanoma cell viability. *Cell*, 109(6), 707–18. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12086670>
- McGovern, V. J., Mihm, M. C., Bailly, C., Booth, J. C., Clark, W. H., Cochran, A. J., ... Milton, G. W. (1973). The classification of malignant melanoma and its histologic reporting. *Cancer*, 32(6), 1446–57. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4757934>
- Meidhof, S., Brabletz, S., Lehmann, W., Preca, B.-T., Mock, K., Ruh, M., ... Brabletz, T. (2015). ZEB1-associated drug resistance in cancer cells is reversed by the class I HDAC inhibitor mocetinostat. *EMBO Molecular Medicine*, 7(6), 831–47. <http://doi.org/10.15252/emmm.201404396>
- Menzies, S. W. (2013). Evidence-based dermoscopy. *Dermatologic Clinics*, 31(4), 521–4, vii. <http://doi.org/10.1016/j.det.2013.06.002>
- Meyle, K. D., & Guldberg, P. (2009). Genetic risk factors for melanoma. *Human Genetics*, 126(4), 499–510. <http://doi.org/10.1007/s00439-009-0715-9>
- Michaloglou, C., Vredeveld, L. C. W., Soengas, M. S., Denoyelle, C., Kuilman, T., van der Horst, C. M. A. M., ... Peeper, D. S. (2005). BRAFE600-associated senescence-like cell cycle arrest of human naevi. *Nature*, 436(7051), 720–4. <http://doi.org/10.1038/nature03890>
- Miller, A. J., & Mihm, M. C. (2006). Melanoma. *The New England Journal of Medicine*, 355(1), 51–65. <http://doi.org/10.1056/NEJMra052166>
- Miow, Q. H., Tan, T. Z., Ye, J., Lau, J. A., Yokomizo, T., Thiery, J.-P., & Mori, S. (2015). Epithelial-mesenchymal status renders differential responses to cisplatin in ovarian cancer. *Oncogene*, 34(15), 1899–907. <http://doi.org/10.1038/onc.2014.136>
- Miyoshi, T., Maruhashi, M., Van De Putte, T., Kondoh, H., Huylebroeck, D., & Higashi, Y. (2006). Complementary expression pattern of Zfhx1 genes Sip1 and deltaEF1 in the mouse embryo and their genetic interaction revealed by compound mutants. *Developmental Dynamics : An Official Publication of the American Association of Anatomists*, 235(7), 1941–52. <http://doi.org/10.1002/dvdy.20799>
- Mobley, A. K., Braeuer, R. R., Kamiya, T., Shoshan, E., & Bar-Eli, M. (2012). Driving transcriptional regulators in melanoma metastasis. *Cancer Metastasis Reviews*, 31(3-4), 621–32. <http://doi.org/10.1007/s10555-012-9358-8>
- Morel, A.-P., Hinkal, G. W., Thomas, C., Fauvet, F., Courtois-Cox, S., Wierinckx, A., ... Puisieux, A. (2012). EMT inducers catalyze malignant transformation of mammary epithelial cells and drive tumorigenesis towards claudin-low tumors in transgenic mice. *PLoS Genetics*, 8(5), e1002723. <http://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002723>
- Morel, A.-P., Lièvre, M., Thomas, C., Hinkal, G., Ansieau, S., & Puisieux, A. (2008). Generation of breast cancer stem cells through epithelial-mesenchymal transition. *PloS One*, 3(8), e2888. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0002888>
- Mort, R. L., Jackson, I. J., & Patton, E. E. (2015). The melanocyte lineage in development and disease. *Development (Cambridge, England)*, 142(7), 1387. <http://doi.org/10.1242/dev.123729>

- Müller, J., Krijgsman, O., Tsoi, J., Robert, L., Hugo, W., Song, C., ... Peeper, D. S. (2014). Low MITF/AXL ratio predicts early resistance to multiple targeted drugs in melanoma. *Nature Communications*, 5, 5712. <http://doi.org/10.1038/ncomms6712>
- Nazarian, R., Shi, H., Wang, Q., Kong, X., Koya, R. C., Lee, H., ... Lo, R. S. (2010). Melanomas acquire resistance to B-RAF(V600E) inhibition by RTK or N-RAS upregulation. *Nature*, 468(7326), 973–7. <http://doi.org/10.1038/nature09626>
- Nieto, M. A. (2002). The snail superfamily of zinc-finger transcription factors. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 3(3), 155–66. <http://doi.org/10.1038/nrm757>
- Nieto, M. A. (2009). Epithelial-Mesenchymal Transitions in development and disease: old views and new perspectives. *The International Journal of Developmental Biology*, 53(8-10), 1541–7. <http://doi.org/10.1387/ijdb.072410mn>
- Nieto, M. A., & Cano, A. (2012). The epithelial-mesenchymal transition under control: global programs to regulate epithelial plasticity. *Seminars in Cancer Biology*, 22(5-6), 361–8. <http://doi.org/10.1016/j.semcancer.2012.05.003>
- Nieto, M. A., Sargent, M. G., Wilkinson, D. G., & Cooke, J. (1994). Control of cell behavior during vertebrate development by Slug, a zinc finger gene. *Science (New York, N.Y.)*, 264(5160), 835–9. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7513443>
- Nikolaev, S. I., Rimoldi, D., Iseli, C., Valsesia, A., Robyr, D., Gehrig, C., ... Antonarakis, S. E. (2012). Exome sequencing identifies recurrent somatic MAP2K1 and MAP2K2 mutations in melanoma. *Nature Genetics*, 44(2), 133–9. <http://doi.org/10.1038/ng.1026>
- Nishizaki, Y., Takagi, T., Matsui, F., & Higashi, Y. (2014). SIP1 expression patterns in brain investigated by generating a SIP1-EGFP reporter knock-in mouse. *Genesis (New York, N.Y. : 2000)*, 52(1), 56–67. <http://doi.org/10.1002/dvg.22726>
- Norlén, L., & Al-Amoudi, A. (2004). Stratum corneum keratin structure, function, and formation: the cubic rod-packing and membrane templating model. *The Journal of Investigative Dermatology*, 123(4), 715–32. <http://doi.org/10.1111/j.0022-202X.2004.23213.x>
- Nowell, P. C. (1976). The clonal evolution of tumor cell populations. *Science (New York, N.Y.)*, 194(4260), 23–8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/959840>
- Ocaña, O. H., Córcoles, R., Fabra, A., Moreno-Bueno, G., Acloque, H., Vega, S., ... Nieto, M. A. (2012). Metastatic colonization requires the repression of the epithelial-mesenchymal transition inducer Prrx1. *Cancer Cell*, 22(6), 709–24. <http://doi.org/10.1016/j.ccr.2012.10.012>
- Omholt, K., Karsberg, S., Platz, A., Kanter, L., Ringborg, U., & Hansson, J. (2002). Screening of N-ras codon 61 mutations in paired primary and metastatic cutaneous melanomas: mutations occur early and persist throughout tumor progression. *Clinical Cancer Research : An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 8(11), 3468–74. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12429636>
- Papp, T., Pemsel, H., Zimmermann, R., Bastrop, R., Weiss, D. G., & Schiffmann, D. (1999). Mutational analysis of the N-ras, p53, p16INK4a, CDK4, and MC1R genes in human congenital melanocytic naevi. *Journal of Medical Genetics*, 36(8), 610–4. Retrieved from

<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1762982&tool=pmcentrez&render type=abstract>

- Paraiso, K. H. T., Xiang, Y., Rebecca, V. W., Abel, E. V, Chen, Y. A., Munko, A. C., ... Smalley, K. S. M. (2011). PTEN loss confers BRAF inhibitor resistance to melanoma cells through the suppression of BIM expression. *Cancer Research*, *71*(7), 2750–60. <http://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-2954>
- Peinado, H., Olmeda, D., & Cano, A. (2007). Snail, Zeb and bHLH factors in tumour progression: an alliance against the epithelial phenotype? *Nature Reviews. Cancer*, *7*(6), 415–28. <http://doi.org/10.1038/nrc2131>
- Pérez-Losada, J., Sánchez-Martín, M., Rodríguez-García, A., Sánchez, M. L., Orfao, A., Flores, T., & Sánchez-García, I. (2002). Zinc-finger transcription factor Slug contributes to the function of the stem cell factor c-kit signaling pathway. *Blood*, *100*(4), 1274–86. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12149208>
- Pingault, V., Ente, D., Dastot-Le Moal, F., Goossens, M., Marlin, S., & Bondurand, N. (2010). Review and update of mutations causing Waardenburg syndrome. *Human Mutation*, *31*(4), 391–406. <http://doi.org/10.1002/humu.21211>
- Platz, A., Egyhazi, S., Ringborg, U., & Hansson, J. (2008). Human cutaneous melanoma; a review of NRAS and BRAF mutation frequencies in relation to histogenetic subclass and body site. *Molecular Oncology*, *1*(4), 395–405. <http://doi.org/10.1016/j.molonc.2007.12.003>
- Pollock, P. M., Harper, U. L., Hansen, K. S., Yudt, L. M., Stark, M., Robbins, C. M., ... Meltzer, P. S. (2003). High frequency of BRAF mutations in nevi. *Nature Genetics*, *33*(1), 19–20. <http://doi.org/10.1038/ng1054>
- Posch, C., & Ortiz-Urda, S. (2013). NRAS mutant melanoma--undrugable? *Oncotarget*, *4*(4), 494–5. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3720596&tool=pmcentrez&render type=abstract>
- Postigo, A. A. (2003). Opposing functions of ZEB proteins in the regulation of the TGFbeta/BMP signaling pathway. *The EMBO Journal*, *22*(10), 2443–52. <http://doi.org/10.1093/emboj/cdg225>
- Postigo, A. A., & Dean, D. C. (1999). ZEB represses transcription through interaction with the corepressor CtBP. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *96*(12), 6683–8. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=21975&tool=pmcentrez&renderty pe=abstract>
- Postow, M. A., Chesney, J., Pavlick, A. C., Robert, C., Grossmann, K., McDermott, D., ... Hodi, F. S. (2015). Nivolumab and Ipilimumab versus Ipilimumab in Untreated Melanoma. *The New England Journal of Medicine*, *372*(21), 2006–17. <http://doi.org/10.1056/NEJMoa1414428>
- Poulikakos, P. I., Persaud, Y., Janakiraman, M., Kong, X., Ng, C., Moriceau, G., ... Solit, D. B. (2011). RAF inhibitor resistance is mediated by dimerization of aberrantly spliced BRAF(V600E). *Nature*, *480*(7377), 387–90. <http://doi.org/10.1038/nature10662>

- Poulikakos, P. I., Zhang, C., Bollag, G., Shokat, K. M., & Rosen, N. (2010). RAF inhibitors transactivate RAF dimers and ERK signalling in cells with wild-type BRAF. *Nature*, *464*(7287), 427–30. <http://doi.org/10.1038/nature08902>
- Poynter, J. N., Elder, J. T., Fullen, D. R., Nair, R. P., Soengas, M. S., Johnson, T. M., ... Gruber, S. B. (2006). BRAF and NRAS mutations in melanoma and melanocytic nevi. *Melanoma Research*, *16*(4), 267–73. <http://doi.org/10.1097/01.cmr.0000222600.73179.f3>
- Puisieux, A., Brabletz, T., & Caramel, J. (2014). Oncogenic roles of EMT-inducing transcription factors. *Nature Cell Biology*, *16*(6), 488–94. <http://doi.org/10.1038/ncb2976>
- Puisieux, A., Valsesia-Wittmann, S., & Ansieau, S. (2006). A twist for survival and cancer progression. *British Journal of Cancer*, *94*(1), 13–7. <http://doi.org/10.1038/sj.bjc.6602876>
- Rhim, A. D., Mirek, E. T., Aiello, N. M., Maitra, A., Bailey, J. M., McAllister, F., ... Stanger, B. Z. (2012). EMT and dissemination precede pancreatic tumor formation. *Cell*, *148*(1-2), 349–61. <http://doi.org/10.1016/j.cell.2011.11.025>
- Ribas, A., Hodi, F. S., Callahan, M., Konto, C., & Wolchok, J. (2013). Hepatotoxicity with combination of vemurafenib and ipilimumab. *The New England Journal of Medicine*, *368*(14), 1365–6. <http://doi.org/10.1056/NEJMc1302338>
- Rizos, H., Menzies, A. M., Pupo, G. M., Carlino, M. S., Fung, C., Hyman, J., ... Long, G. V. (2014). BRAF inhibitor resistance mechanisms in metastatic melanoma: spectrum and clinical impact. *Clinical Cancer Research : An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, *20*(7), 1965–77. <http://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-13-3122>
- Robert, C., Long, G. V., Brady, B., Dutriaux, C., Maio, M., Mortier, L., ... Ascierto, P. A. (2014). Nivolumab in Previously Untreated Melanoma without BRAF Mutation. *New England Journal of Medicine*, *372*(4), 141116004513004. <http://doi.org/10.1056/NEJMoa1412082>
- Ross, A. L., Sanchez, M. I., & Grichnik, J. M. (2011). Nevus senescence. *ISRN Dermatology*, *2011*, 642157. <http://doi.org/10.5402/2011/642157>
- Rutkowski, P., & Blank, C. (2014). Dabrafenib for the treatment of BRAF V600-positive melanoma: a safety evaluation. *Expert Opinion on Drug Safety*, *13*(9), 1249–1258. <http://doi.org/10.1517/14740338.2014.939954>
- Sánchez-Martín, M., Pérez-Losada, J., Rodríguez-García, A., González-Sánchez, B., Korf, B. R., Kuster, W., ... Sánchez-García, I. (2003). Deletion of the SLUG (SNAI2) gene results in human piebaldism. *American Journal of Medical Genetics. Part A*, *122A*(2), 125–32. <http://doi.org/10.1002/ajmg.a.20345>
- Sauka-Spengler, T., & Bronner-Fraser, M. (2008). A gene regulatory network orchestrates neural crest formation. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, *9*(7), 557–68. <http://doi.org/10.1038/nrm2428>
- Saxena, M., Stephens, M. A., Pathak, H., & Rangarajan, A. (2011). Transcription factors that mediate epithelial-mesenchymal transition lead to multidrug resistance by upregulating ABC transporters. *Cell Death & Disease*, *2*, e179. <http://doi.org/10.1038/cddis.2011.61>

- Scatolini, M., Grand, M. M., Grosso, E., Venesio, T., Pisacane, A., Balsamo, A., ... Chiorino, G. (2010). Altered molecular pathways in melanocytic lesions. *International Journal of Cancer. Journal International Du Cancer*, 126(8), 1869–81. <http://doi.org/10.1002/ijc.24899>
- Serrano, M., Lin, A. W., McCurrach, M. E., Beach, D., & Lowe, S. W. (1997). Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a. *Cell*, 88(5), 593–602. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9054499>
- Shi, H., Moriceau, G., Kong, X., Lee, M.-K., Lee, H., Koya, R. C., ... Lo, R. S. (2012). Melanoma whole-exome sequencing identifies (V600E)B-RAF amplification-mediated acquired B-RAF inhibitor resistance. *Nature Communications*, 3, 724. <http://doi.org/10.1038/ncomms1727>
- Shin, S., & Blenis, J. (2010). ERK2/Fra1/ZEB pathway induces epithelial-to-mesenchymal transition. *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)*, 9(13), 2483–4. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20543576>
- Shirley, S. H., Greene, V. R., Duncan, L. M., Torres Cabala, C. A., Grimm, E. A., & Kusewitt, D. F. (2012). Slug expression during melanoma progression. *The American Journal of Pathology*, 180(6), 2479–89. <http://doi.org/10.1016/j.ajpath.2012.02.014>
- Simões-Costa, M., & Bronner, M. E. (2013). Insights into neural crest development and evolution from genomic analysis. *Genome Research*, 23(7), 1069–80. <http://doi.org/10.1101/gr.157586.113>
- Smalley, K. S. M. (2010). Understanding melanoma signaling networks as the basis for molecular targeted therapy. *The Journal of Investigative Dermatology*, 130(1), 28–37. <http://doi.org/10.1038/jid.2009.177>
- Sommer, L. (2011). Generation of melanocytes from neural crest cells. *Pigment Cell & Melanoma Research*, 24(3), 411–21. <http://doi.org/10.1111/j.1755-148X.2011.00834.x>
- Søndergaard, J. N., Nazarian, R., Wang, Q., Guo, D., Hsueh, T., Mok, S., ... Ribas, A. (2010). Differential sensitivity of melanoma cell lines with BRAFV600E mutation to the specific Raf inhibitor PLX4032. *Journal of Translational Medicine*, 8, 39. <http://doi.org/10.1186/1479-5876-8-39>
- Stahl, J. M., Sharma, A., Cheung, M., Zimmerman, M., Cheng, J. Q., Bosenberg, M. W., ... Robertson, G. P. (2004). Deregulated Akt3 activity promotes development of malignant melanoma. *Cancer Research*, 64(19), 7002–10. <http://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-1399>
- Strickland, L. R., Pal, H. C., Elmets, C. A., & Afaq, F. (2015). Targeting drivers of melanoma with synthetic small molecules and phytochemicals. *Cancer Letters*, 359(1), 20–35. <http://doi.org/10.1016/j.canlet.2015.01.016>
- Strobl-Mazzulla, P. H., & Bronner, M. E. (2012). Epithelial to mesenchymal transition: new and old insights from the classical neural crest model. *Seminars in Cancer Biology*, 22(5-6), 411–6. <http://doi.org/10.1016/j.semcan.2012.04.008>
- Sullivan, R. J., & Flaherty, K. T. (2013). Resistance to BRAF-targeted therapy in melanoma. *European Journal of Cancer (Oxford, England : 1990)*, 49(6), 1297–304. <http://doi.org/10.1016/j.ejca.2012.11.019>

- Sun, C., Wang, L., Huang, S., Heynen, G. J. J. E., Prahallad, A., Robert, C., ... Bernards, R. (2014). Reversible and adaptive resistance to BRAF(V600E) inhibition in melanoma. *Nature*, *508*(7494), 118–22. <http://doi.org/10.1038/nature13121>
- Tachibana, M., Kobayashi, Y., & Matsushima, Y. (2003). Mouse models for four types of Waardenburg syndrome. *Pigment Cell Research / Sponsored by the European Society for Pigment Cell Research and the International Pigment Cell Society*, *16*(5), 448–54. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12950719>
- Taube, J. H., Herschkowitz, J. I., Komurov, K., Zhou, A. Y., Gupta, S., Yang, J., ... Mani, S. A. (2010). Core epithelial-to-mesenchymal transition interactome gene-expression signature is associated with claudin-low and metaplastic breast cancer subtypes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *107*(35), 15449–54. <http://doi.org/10.1073/pnas.1004900107>
- Terzian, T., Torchia, E. C., Dai, D., Robinson, S. E., Murao, K., Stieglmann, R. A., ... Box, N. F. (2010). p53 prevents progression of nevi to melanoma predominantly through cell cycle regulation. *Pigment Cell & Melanoma Research*, *23*(6), 781–94. <http://doi.org/10.1111/j.1755-148X.2010.00773.x>
- Thiery, J. P. (2002). Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nature Reviews. Cancer*, *2*(6), 442–54. <http://doi.org/10.1038/nrc822>
- Thiery, J. P., Acloque, H., Huang, R. Y. J., & Nieto, M. A. (2009). Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell*, *139*(5), 871–90. <http://doi.org/10.1016/j.cell.2009.11.007>
- Thiery, J. P., & Sleeman, J. P. (2006). Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, *7*(2), 131–42. <http://doi.org/10.1038/nrm1835>
- Tran, P. T., Shroff, E. H., Burns, T. F., Thiyagarajan, S., Das, S. T., Zabuawala, T., ... Felsher, D. W. (2012). Twist1 Suppresses Senescence Programs and Thereby Accelerates and Maintains Mutant Kras-Induced Lung Tumorigenesis. *PLoS Genetics*, *8*(5), e1002650. <http://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002650>
- Trimboli, A. J., Fukino, K., de Bruin, A., Wei, G., Shen, L., Tanner, S. M., ... Leone, G. (2008). Direct evidence for epithelial-mesenchymal transitions in breast cancer. *Cancer Research*, *68*(3), 937–45. <http://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-2148>
- Trotter, S. C., Sroa, N., Winkelmann, R. R., Olencki, T., & Bechtel, M. (2013). A Global Review of Melanoma Follow-up Guidelines. *The Journal of Clinical and Aesthetic Dermatology*, *6*(9), 18–26. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3780800&tool=pmcentrez&render type=abstract>
- Tsai, J. H., Donaher, J. L., Murphy, D. A., Chau, S., & Yang, J. (2012). Spatiotemporal regulation of epithelial-mesenchymal transition is essential for squamous cell carcinoma metastasis. *Cancer Cell*, *22*(6), 725–36. <http://doi.org/10.1016/j.ccr.2012.09.022>
- Tsao, H., Chin, L., Garraway, L. A., & Fisher, D. E. (2012). Melanoma: from mutations to medicine. *Genes & Development*, *26*(11), 1131–55. <http://doi.org/10.1101/gad.191999.112>

- Uong, A., & Zon, L. I. (2010). Melanocytes in development and cancer. *Journal of Cellular Physiology*, 222(1), 38–41. <http://doi.org/10.1002/jcp.21935>
- Valsesia-Wittmann, S., Magdeleine, M., Dupasquier, S., Garin, E., Jallas, A.-C., Combaret, V., ... Puisieux, A. (2004). Oncogenic cooperation between H-Twist and N-Myc overrides failsafe programs in cancer cells. *Cancer Cell*, 6(6), 625–30. <http://doi.org/10.1016/j.ccr.2004.09.033>
- Van Allen, E. M., Wagle, N., Sucker, A., Treacy, D. J., Johannessen, C. M., Goetz, E. M., ... Schadendorf, D. (2014). The genetic landscape of clinical resistance to RAF inhibition in metastatic melanoma. *Cancer Discovery*, 4(1), 94–109. <http://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-13-0617>
- Van de Putte, T., Francis, A., Nelles, L., van Grunsven, L. A., & Huylebroeck, D. (2007). Neural crest-specific removal of Zfhx1b in mouse leads to a wide range of neurocristopathies reminiscent of Mowat-Wilson syndrome. *Human Molecular Genetics*, 16(12), 1423–36. <http://doi.org/10.1093/hmg/ddm093>
- Van Den Bossche, K., Naeyaert, J.-M., & Lambert, J. (2006). The quest for the mechanism of melanin transfer. *Traffic (Copenhagen, Denmark)*, 7(7), 769–78. <http://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2006.00425.x>
- Van Grunsven, L. A., Taelman, V., Michiels, C., Verstappen, G., Souopgui, J., Nichane, M., ... Bellefroid, E. J. (2007). XSiP1 neuralizing activity involves the co-repressor CtBP and occurs through BMP dependent and independent mechanisms. *Developmental Biology*, 306(1), 34–49. <http://doi.org/10.1016/j.ydbio.2007.02.045>
- Vance, K. W., & Goding, C. R. (2004). The transcription network regulating melanocyte development and melanoma. *Pigment Cell Research / Sponsored by the European Society for Pigment Cell Research and the International Pigment Cell Society*, 17(4), 318–25. <http://doi.org/10.1111/j.1600-0749.2004.00164.x>
- Vandewalle, C., Van Roy, F., & Berx, G. (2009). The role of the ZEB family of transcription factors in development and disease. *Cellular and Molecular Life Sciences : CMLS*, 66(5), 773–87. <http://doi.org/10.1007/s00018-008-8465-8>
- Vesuna, F., Lisok, A., Kimble, B., & Raman, V. (2009). Twist modulates breast cancer stem cells by transcriptional regulation of CD24 expression. *Neoplasia (New York, N.Y.)*, 11(12), 1318–28. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2794513&tool=pmcentrez&render type=abstract>
- Villanueva, J., Vultur, A., Lee, J. T., Somasundaram, R., Fukunaga-Kalabis, M., Cipolla, A. K., ... Herlyn, M. (2010). Acquired resistance to BRAF inhibitors mediated by a RAF kinase switch in melanoma can be overcome by cotargeting MEK and IGF-1R/PI3K. *Cancer Cell*, 18(6), 683–95. <http://doi.org/10.1016/j.ccr.2010.11.023>
- Villarejo, A., Cortés-Cabrera, A., Molina-Ortíz, P., Portillo, F., & Cano, A. (2014). Differential role of Snail1 and Snail2 zinc fingers in E-cadherin repression and epithelial to mesenchymal transition. *The Journal of Biological Chemistry*, 289(2), 930–41. <http://doi.org/10.1074/jbc.M113.528026>

- Viros, A., Sanchez-Laorden, B., Pedersen, M., Furney, S. J., Rae, J., Hogan, K., ... Marais, R. (2014). Ultraviolet radiation accelerates BRAF-driven melanomagenesis by targeting TP53. *Nature*, *511*(7510), 478–82. <http://doi.org/10.1038/nature13298>
- Vredeveld, L. C. W., Possik, P. A., Smit, M. A., Meissl, K., Michaloglou, C., Horlings, H. M., ... Peeper, D. S. (2012). Abrogation of BRAFV600E-induced senescence by PI3K pathway activation contributes to melanomagenesis. *Genes & Development*, *26*(10), 1055–69. <http://doi.org/10.1101/gad.187252.112>
- Wellbrock, C., & Arozarena, I. (2015). Microphthalmia-associated transcription factor in melanoma development and MAP-kinase pathway targeted therapy. *Pigment Cell & Melanoma Research*, *28*(4), 390–406. <http://doi.org/10.1111/pcmr.12370>
- Wellbrock, C., & Marais, R. (2005). Elevated expression of MITF counteracts B-RAF-stimulated melanocyte and melanoma cell proliferation. *The Journal of Cell Biology*, *170*(5), 703–8. <http://doi.org/10.1083/jcb.200505059>
- Wellbrock, C., Ogilvie, L., Hedley, D., Karasarides, M., Martin, J., Niculescu-Duvaz, D., ... Marais, R. (2004). V599EB-RAF is an oncogene in melanocytes. *Cancer Research*, *64*(7), 2338–42. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15059882>
- Wellbrock, C., Rana, S., Paterson, H., Pickersgill, H., Brummelkamp, T., & Marais, R. (2008). Oncogenic BRAF regulates melanoma proliferation through the lineage specific factor MITF. *PloS One*, *3*(7), e2734. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0002734>
- Wellner, U., Schubert, J., Burk, U. C., Schmalhofer, O., Zhu, F., Sonntag, A., ... Brabletz, T. (2009). The EMT-activator ZEB1 promotes tumorigenicity by repressing stemness-inhibiting microRNAs. *Nature Cell Biology*, *11*(12), 1487–95. <http://doi.org/10.1038/ncb1998>
- White, R. M., & Zon, L. I. (2008). Melanocytes in development, regeneration, and cancer. *Cell Stem Cell*, *3*(3), 242–52. <http://doi.org/10.1016/j.stem.2008.08.005>
- Whiteman, D. C., Pavan, W. J., & 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 Research*, *24*(5), 879–97. <http://doi.org/10.1111/j.1755-148X.2011.00880.x>
- Widlund, H. R., & Fisher, D. E. (2003). Microphthalmia-associated transcription factor: a critical regulator of pigment cell development and survival. *Oncogene*, *22*(20), 3035–41. <http://doi.org/10.1038/sj.onc.1206443>
- Wolnicka-Glubisz, A., & Noonan, F. P. (2006). Neonatal susceptibility to UV induced cutaneous malignant melanoma in a mouse model. *Photochemical & Photobiological Sciences : Official Journal of the European Photochemistry Association and the European Society for Photobiology*, *5*(2), 254–60. <http://doi.org/10.1039/b506974b>
- Wolnicka-Glubisz, A., Pecio, A., Podkowa, D., Plonka, P. M., & Grabacka, M. (2013). HGF/SF increases number of skin melanocytes but does not alter quality or quantity of follicular melanogenesis. *PloS One*, *8*(11), e74883. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0074883>

- Wu, W.-S., Heinrichs, S., Xu, D., Garrison, S. P., Zambetti, G. P., Adams, J. M., & Look, A. T. (2005). Slug antagonizes p53-mediated apoptosis of hematopoietic progenitors by repressing puma. *Cell*, *123*(4), 641–53. <http://doi.org/10.1016/j.cell.2005.09.029>
- Yang, J., Mani, S. A., Donaher, J. L., Ramaswamy, S., Itzykson, R. A., Come, C., ... Weinberg, R. A. (2004). Twist, a master regulator of morphogenesis, plays an essential role in tumor metastasis. *Cell*, *117*(7), 927–39. <http://doi.org/10.1016/j.cell.2004.06.006>
- Youssef, K. K., Van Keymeulen, A., Lapouge, G., Beck, B., Michaux, C., Achouri, Y., ... Blanpain, C. (2010). Identification of the cell lineage at the origin of basal cell carcinoma. *Nature Cell Biology*, *12*(3), 299–305. <http://doi.org/10.1038/ncb2031>
- Zhang, G., & Herlyn, M. (2012). Human nevi: no longer precursors of melanomas? *The Journal of Investigative Dermatology*, *132*(9), 2133–4. <http://doi.org/10.1038/jid.2012.183>
- Zhang, H., Luo, H., Chen, H., Mei, L., He, C., Jiang, L., ... Feng, Y. (2012). Functional analysis of MITF gene mutations associated with Waardenburg syndrome type 2. *FEBS Letters*, *586*(23), 4126–31. <http://doi.org/10.1016/j.febslet.2012.10.006>
- Zhang, P., Wei, Y., Wang, L., Debeb, B. G., Yuan, Y., Zhang, J., ... Ma, L. (2014). ATM-mediated stabilization of ZEB1 promotes DNA damage response and radioresistance through CHK1. *Nature Cell Biology*, *16*(9), 864–875. <http://doi.org/10.1038/ncb3013>
- Zhang, Z., Lee, J. C., Lin, L., Olivas, V., Au, V., LaFramboise, T., ... Bivona, T. G. (2012). Activation of the AXL kinase causes resistance to EGFR-targeted therapy in lung cancer. *Nature Genetics*, *44*(8), 852–60. <http://doi.org/10.1038/ng.2330>
- Zhuang, L., Lee, C. S., Scolyer, R. A., McCarthy, S. W., Zhang, X. D., Thompson, J. F., & Hersey, P. (2007). Mcl-1, Bcl-XL and Stat3 expression are associated with progression of melanoma whereas Bcl-2, AP-2 and MITF levels decrease during progression of melanoma. *Modern Pathology : An Official Journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*, *20*(4), 416–26. <http://doi.org/10.1038/modpathol.3800750>
- Zimmer, L., Hillen, U., Livingstone, E., Lacouture, M. E., Busam, K., Carvajal, R. D., ... Schadendorf, D. (2012). Atypical melanocytic proliferations and new primary melanomas in patients with advanced melanoma undergoing selective BRAF inhibition. *Journal of Clinical Oncology : Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, *30*(19), 2375–83. <http://doi.org/10.1200/JCO.2011.41.1660>

ANNEXE

VI. Annexe

Article: The heterodimeric TWIST1-E12 complex drives the oncogenic potential of TWIST1 in human mammary epithelial cells

The heterodimeric TWIST1-E12 complex drives the oncogenic potential of TWIST1 in human mammary epithelial cells.

Laurent Jacqueroud^{1,2,3,4,5}, Charlotte Bouard^{1,2,3,4,5}, Geoffrey Richard^{1,2,3,4,5}, Mojgan Devouassoux-Shisheboran^{1,2,3,4,5,6,7,8}, Raphael Terreux^{6,9,10}, Audrey Pierrot^{1,2,3,4,5,6}, Douglas B. Spicer¹¹, Julie Caramel^{1,2,3,4,5,6}, Léa Payen^{1,2,3,4,5,6,7}, Alain Puisieux^{1,2,3,4,5,6,12}, Agnès Tissier^{1,2,3,4,5}, Stéphane Ansieau^{1,2,3,4,5,*}.

1. Inserm UMR-S1052, Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon, France ; 2. CNRS UMR5286, Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon, France ; 3. LabEX DEVweCAN, Lyon, France ; 4. UNIV UMR1052, Lyon, France ; 5. Centre Léon Bérard, Lyon, France, 6. Université de Lyon1, ISPB, Lyon, France ; 7. Hospices Civils de Lyon, Lyon, France ; 8. Hôpital de la Croix-Rousse, Lyon, France, 9. Institut de Biochimie des protéines (IBCP, Lyon, France ; 10. CNRS UMR 5086, Lyon, France; 11. Center for Molecular Medicine, Main Medical Center Research Institute, Scarborough, Maine, USA ; 12. Institut Universitaire de France, Paris, France.

* Correspondence: stephane.ansieau@lyon.unicancer.fr

Abstract

While the functions of both TWIST1 homodimeric and heterodimeric complexes during embryonic development have been deciphered, their relative contribution to the oncogenic potential of TWIST1 remained unaddressed. Using tethered dimers, we demonstrate that the heterodimeric TWIST1-E12 complex, unlike its TWIST1-TWIST1 counterpart, complements the endogenous functions of TWIST1 in sustaining breast cancer cell proliferation through inhibition of latent oncogene-induced senescence. Consistent with this observation, the heterodimer is the unique TWIST1 complex successfully overriding HRAS^{G12V}-induced senescence. Furthermore, TWIST1-E12 turns out to be the only TWIST1 complex to trigger a partial epithelial-to-mesenchymal transition in human mammary epithelial cells and to facilitate their neoplastic transformation by mitogenic oncoproteins. Disruption of the interaction between the two partners or destabilization of the DNA/protein complex, achieved through insertion of punctual mutations selected on the basis of an *in silico* structural analysis developed in the laboratory, was confirmed to abolish the oncogenic potential of this heterodimer. Furthermore, in support of our conclusions, the TWIST1-E12 complex was confirmed to be detectable in human breast premalignant lesions and to afford mice an exacerbated susceptibility to spontaneously develop breast carcinoma, when aberrantly produced in mammary luminal cells. The TWIST1-E12 heterodimeric complex thus constitutes the oncogenic form of TWIST1 during breast carcinogenesis.

Running title: TWIST1 dimers and breast carcinogenesis.

Key words: TWIST1 dimers, escape from fail-safe programs, tumor initiation, breast.

Introduction

The epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) is a latent transdifferentiation process transiently converting epithelial cells into mesenchymal cells to promote cell migration. Essential for both morphogenesis and organogenesis during embryonic development, its aberrant activation at the invasive front of tumors constitutes one of the reported mechanisms initiating the metastatic cascade (1, 2). Regulated through a complex interactome of miRNAs and transcription factors (EMT-TFs) of the Snail, Twist and Zeb families (3), EMT actually plays a pivotal role in all metastatic steps, with secondary site colonization being the only exception requiring a return to an epithelial phenotype (MET process) (4, 5). Cell commitment into EMT was additionally suggested to facilitate the neoplastic transformation of human mammary epithelial cells (6). Although still partially defined, the oncogenic potential of EMT-TFs relies on their ability to genetically reprogram cells, with numerous consequences on mitogenic (such as the activation of the RAS pathway (7)) and oncosuppressive (such as the down-modulation of the phosphatase PP2A (6)) pathways and on cell metabolism (8). The genetic reprogramming furthermore associates with cell dedifferentiation and the subsequent reacquisition of some stemness properties (9, 10). The EMT-TF-driven dedifferentiation does not only contribute to carcinoma but also to melanoma and very likely to sarcoma development (11, 12), underlying its pivotal role in their oncogenic functions. TWIST proteins were additionally shown to facilitate the escape from fail-safe programs (senescence and apoptosis) and thereby to cooperate with mitogenic oncoproteins in promoting cell transformation *in vitro* and breast and lung carcinogenesis *in vivo* (6, 13-16). TWIST1 was found to directly bind to p53 and consequently destabilize the oncosuppressive protein (17). It additionally attenuates the transcriptional activation of numerous cyclin-dependent kinase inhibitors (CKI) in response to a mitogenic activation (15, 18). Interestingly, numerous cancer cell types remain dependent of TWIST1 for their proliferation and survival *in vitro* (14, 15, 18-20). In support of this assumption, using a switchable *Twist1* transgenic mouse model, silencing *Twist1* expression was demonstrated to have a pronounced cytostatic effect on RAS + TWIST1-driven lung carcinomas through reactivation of a senescence program (16). Inactivation of the TWIST1 embryonic transcription factor might thus constitute a novel therapeutic route to restore senescence in tumors (21, 22).

The TWIST1 protein either forms homodimeric or heterodimeric complexes mainly in association with their HAND and E2A partners. Homo- and heterodimeric complexes were shown to display distinct and sometimes even antagonistic functions during embryonic development (23-25). Their respective contribution to the oncogenic potential of the

embryonic transcription factor has yet never been addressed. To achieve this end we employed forced dimers, a strategy previously employed with success to decipher TWIST1 dimer function during embryonic development (23, 24). By combining complementary *in vitro* and *in vivo* functional assays, we demonstrated that the heterodimeric TWIST1-E12 complex drives the oncogenic potential of TWIST1 in human mammary epithelial cells, and by performing a structural/functional analysis the need of efficient partner interaction and protein DNA stability for its activity.

Materials and Methods

DNA constructs

The EcoR pBabe Zeo, ER-HRAS^{G12V} pLNCX2-Neo retroviral construct, the *VIMI*-luciferase and the 3.7 Kb *CDH2* reporter have been previously described (26-29).

The tethered dimers were generated by PCR using FLAG-human TWIST1 (15) and E12 expression constructs (30) as templates. A silent mutation was inserted into E12 to disrupt an internal XhoI site using the 5'-ACGTCACAGTGGCCCCGGGCAGGAGCCC-3' and 5'-GGGCTCCTGCCCGGGGCCACTGTGACGT-3' primer pair and the QuickChange site-directed mutagenesis kit (Stratagene). The tethered dimers were generated by sequential sub-clonings of PCR products synthesized with the Q5 high fidelity DNA polymerase (NEB) and primers from Eurogentec.

Briefly, the *FLAG-Twist1* DNA fragment was amplified with the 5'-CGCGGATCCCGCAAATGGGCGACTATAAGGACG-3' and 5'-CCAAGCTTGTGGGACGCGGACATGGACCAGG-3' primer pair, digested with BamH1/HindIII and sub-cloned in the pBluescript II KS vector. The linker was generated by annealing the two oligonucleotides 5'-AGCTTGGCGGAGGATCGAGCGGTGGGAGCGGCGGAGGGTCCGGCGGAGGATCGAGCGGTGGGAGCGGCGGAGGGTCCGGCC-3' and 5'-TCGAGGCCGGACCCTCCGCCGCTCCCACCGCTCGATCCTCCGCCGGACCCTCCGCCGCTCCCACCGCTCGATCCTCCGCCA-3' and by sub-cloning the dsDNA upstream of TWIST1 within the HindIII/XhoI sites. The sequences of the second partner, either TWIST1 or E12, were amplified by PCR using the 5'-CCAAGCTTGTGGGACGCGGACATGGACCAGG-3' and 5'-ACGCGTCGACGTCTAGTGGGACGCGGACATGG-3', and 5'-CCGCTCGAGAACCAGCCGCAGAGGATG-3' and 5'-ACGCGTCGACGTCACATGTGCCCGGGCGGGTTG-3' primer pairs respectively. DNAs

were digested with the enzymes XhoI/SalI and sub-cloned upstream of the TWIST1-linker sequence. The full size FLAG-TT or FLAG-TE BamHI-SalI insert was next inserted into the pBabe retroviral construct (Addgene). Mutant TWIST1 and E12 DNAs were synthesized by Genscript and inserted in TT and TE constructs.

The shRNA *TWIST1* A pLKO.1 (5'-GCTGAGCAAGATTCAGACC-3') lentiviral construct has been previously described (15). The shRNA *TWIST1* B pSIREN (5'-CTCTGGAGCTGGATAACTAAA-3') retroviral construct was kindly provided by Patrice Lassus (IGMM, Montpellier). The shRNA *TCF3* pLKO.1 (5'-ATGAGAGTGCTGGACTCCTAC-3') was supplied by Sigma.

Mouse strains

Animal maintenance and experiments were performed in a specific pathogen free animal facility “Anican” in accordance with the animal care guidelines of the European Union and French laws and were validated by the local Animal Ethic Committee (CECAAP). The CAG-LSL-(*Myc*)-*Twist1*-*Twist1* or CAG-LSL-(*Myc*)-*Twist1*-*E12* (FVB/NJ genetic background) (25) were crossed with the WAP-Cre (Whey Acidic Protein promoter, Wagner et al., 1997) mouse strain (B6.Cg-Tg(Wap-Cre)11738 Mam, obtained from the mouse models of Human Cancers Consortium and back-crossed to the FVB/NJ genetic background). Cohorts of multiparous female WAP-Cre; (*Myc*)-*Twist1*-*Twist1* and WAP-Cre; (*Myc*)-*Twist1*-*E12* mice (with two rounds of lactation) were generated. Genotyping was performed on genomic DNA from tails using the 5'-AATGAAATGGAGAGCTTGGGCGAC-3' and 5'-CATCACTCGTTGCATCGACC-3' for the WAP-Cre transgene and 5'-GCAAGCGCGCAAGAAATCTG-3' and 5'-CCCGTTCAAGTCCTCTTCAGAAATGAC-3' primer pair for the *Twist1* transgene as described in (25, 31). Mice were monitored twice a week for tumor incidence. End points were based on tumor diameter (up to 1.5 cm) unless natural death. Mice were euthanized by CO₂ inhalation. Tumors were fixed in 10% phosphate-buffered formalin during 24 h, and embedded in paraffin. Mammary gland, lung, liver, kidney and spleen were collected to either check for malignant lesions or to assess potential metastatic dissemination.

Cell culture

HMEC-hTERT cells and derivatives were cultured as described (6). The Hs578T, MDA-MB-436, MDA-MB-231 and BT-474 breast cancer cell lines and HEK293T were provided by the ATCC and cultured according to the manufacturer.

***In silico* structural analysis**

To predict the impact of the residue substitutions inserted in the tethered dimers, the *in silico* structural model of the bHLH domains of the TWIST1-E12 dimeric complex bound to its cis-responsive element previously established by homology with the NEUROD1(2ql2B)/E47(2ql2A) template was used (32). Residue substitutions were inserted in these minimized models and submitted to 10 ns molecular dynamics analysis as described (32). Statistical analysis of established H-bonds was performed by assessing the distances between residues and/or bases during the dynamics simulations (100 conformations per ns), considering that H-bonds are established when the two functional groups are spaced less than 2.1Å. The frequency (%) of H-bond implementation was assessed. The impact of a substitution on the total stability of H-bonds between residues and bases, or with the DNA excluded, was assessed to delineate their impact on the stability of the complex with or without DNA, respectively.

Protein analysis

Cells extracts were performed in RIPA buffer (100 mM NaCl, 1% NP40, 0.1% SDS, 50 mM Tris pH8) supplemented with a complete protease inhibitor cocktail (Roche) and phosphatase inhibitor cocktails (Sigma) and clarified by centrifugation. Proteins were analyzed by Western-blot using the monoclonal anti-TWIST1 2C1a (Abcam), anti-p21^{CIP1/WAF1} clone SX118 (Dako), anti-E-cadherin clone 36 (Becton Dickinson), anti-vimentin clone V9 (Dako), anti-fibronectin clone 10 (Becton Dickinson), anti-N-cadherin clone 32 (Becton Dickinson), antibodies, the polyclonal anti-E2A N-649 (Santa-Cruz), anti-H-RAS clone 20 (Santa-Cruz), anti-p15^{INK4B} clone C20 (Santa-Cruz), anti-p16 clone H156 (Santa-Cruz), p-histone H3 (Ser10)-R (Santa-Cruz) and anti-GAPDH clone Abs16 (Millipore) antibodies and horseradish-peroxidase-conjugated secondary antibodies (Dako). Antigen-antibody complexes were revealed with the Western-blotting Luminol reagent (Santa Cruz).

Gene expression analysis

RNA preparation and reverse transcription were performed as described in (33). Real time PCR intron-spanning primers were designed with the primer3 software. The *HPRT1*

housekeeping gene was used for normalization. The following combinations of primers were used:

Gene	NCBI RefSeq	Primers
<i>HPRT1</i>	NM_000194	5'-TGACCTTGATTTATTTGCATACG-3' 5'-CGAGCAAGACGTTTCAGTCCT-3'
<i>TWIST1</i>	NM_000474	5'-GGCTCAGCTACGCCTTCTC-3' 5'-CCTTCTCTGGAAACAATGACATCT-3'
<i>HPGD</i>	NM_000860	5'-TCTTTAGCAGGACTCATGCCCGTTG-3' 5'-TGGCATTTCAGTCTCACACCACTGT-3'
<i>HAS2</i>	NM_005328	5'-GCCTTCAGAGCACTGGGACG-3' 5'-TTAAAATCTGGACATCTCCCCAACACC-3'
<i>HSD11B1</i>	NM_005525	5'-CAATGGAAGCATTGTTGTCG-3' 5'-GGCAGCAACCATTGGATAAG-3'
<i>PIGR</i>	NM_002644	5'-AGGGCGCTACCTGTGTGGAG-3' 5'-GCGGGGAATCGTGGACTCCT-3'
<i>HAND1</i>	NM_004821	5'-CGCAGAAGGGTTAAACAGGT-3' 5'-CAAGGCTGAAAATGAGACGC-3'
<i>HAND2</i>	NM_021973	5'-AAACAGGGCCGCTAACATTT-3' 5'-AAGTGCACAAAACAAGTGGC-3'

Retroviral infections, SA- β -galactosidase, growth curves, and soft-agar colony assays

Enforced expression of RAS and/or TWIST1 proteins was performed through retroviral infections as described (33). Briefly cells were “murinized” by expressing the ecotropic receptor (27, 34) before being infected with retroviral expression constructs. Sequential infections were spaced by a 48 h period of time. Selection was initiated 24 h post-infection or post-second infection with puromycin (0.5 μ g/ml) or neomycin (100 μ g/ml).

shRNA *TWIST1* lentiviral particles were generated through co-transfection of 293T cells with pLKO.1, pCMV Δ R8.91 (gag-pop-Tat-Rev) (35) and pCMVG-VSVG (env) (36) expression constructs and shRNA *TWIST1* retroviral particles through transfection of HEK293GP cells with pSIREN and pCMVG-VSVG (env) expression constructs using the calcium phosphate precipitation technique. *TWIST1* knock-down was achieved through double retroviral (shRNA

TWIST1 B pSIREN) or lentiviral (shRNA *TWIST1* A pLKO.1) infections spaced by a 24 h period of time. More than 90% of cells were confirmed to be infected. Consequences of *TWIST1* depletion on cell survival and proliferation was next assessed in the absence of selection. Growth curves, initiated two days post-activation of ER-RAS^{G12V} with 4-OH-Tamoxifen (4-OHT, 625 nM, Sigma Aldrich), or post-depletion of *TWIST1* through RNA interference was performed by seeding cells at 20-30% confluency. Activation of ER-RAS^{G12V} with 4-OHT was performed in medium supplemented with 1mM D-Glucose. Three days later, cells were washed twice with PBS1X, either fixed in 3% formaldehyde and stained with crystal violet or tested with a SA- β -galactosidase assay as described (37). Transformation assays were performed one week post-infection (*TWIST1* transduction) or post-second infection (*RAS* + *TWIST* transduction) as described (33).

Immunofluorescence

10⁴ cells were seeded on a 12-well IBIDI-chamber slide, fixed in 4% formaldehyde (Sigma) for 15 min, washed with 1% bovine serum albumin (BSA) in PBS buffer and permeabilized in 0.1% Triton 100X (Sigma), 1% BSA in PBS buffer at room temperature for 10 min. The cells were then washed 3 times with 1% BSA in PBS buffer and incubated with the anti-*TWIST1* 2C1a primary antibody (Abcam, diluted 1/100 in 0.5% BSA in PBS buffer) overnight at 4°C. Following extensive washing in 1% BSA in PBS buffer, cells were incubated with FITC-conjugated Alexa goat anti-mouse antibody (Life Technology, 1/600 in 0.5% BSA in PBS buffer) for 30 min at room temperature. Nuclei were stained with Hoechst 5 mg/ml in 0.5% BSA in PBS buffer for 10 min and mounted with Fluoromount-G (SouthernBiotech). Photographs were performed using an immunofluorescence microscope (Leica) and identical exposure times.

Immuno-precipitation

HEK293T cells were transfected with wild type or mutant FLAG-*TWIST1* and/or E12 expression constructs by using the calcium-phosphate technique. 36 h post-transfection, cells were lysed in a 50 mM Tris-HCL pH7.4, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% Triton buffer supplemented with a complete protease inhibitor cocktail (Roche), cleared by centrifugation and incubated with an anti-FLAG M2 resin (Sigma-Aldrich). After intensive washing to eliminate non-specific binding, the resin was resuspended in Laemmli buffer and boiled for 3

min. After elimination of the beads by centrifugation, samples were reduced by adding β -mercaptoethanol and separated on SDS-PAGE. Proteins were analyzed with the murine monoclonal anti-TWIST1 C2a antibody (Abcam) and the rabbit polyclonal V18 E2A antibody (Santa Cruz Biotechnology).

Proximity Ligation Assay

Human ductal carcinoma in situ (DCIS) samples were obtained through the Biological Resource Center of the Centre Léon Bérard with the agreement of the reviewal board of the Centre Léon Bérard. Samples were used with the patient's written informed consent. The present study was approved by the reviewal board of the Centre Léon Bérard. DCIS samples were selected according to the expression of TWIST1 as reported (6).

After deparaffinization and rehydration, tissue sections were boiled in a 10 mM PH6 citrate buffer for 40 min. After saturating unspecific binding sites for 20 min with a 1% BSA PBS buffer, sections were incubated overnight with the mouse monoclonal anti-TWIST1 Twist2C1a (Abcam) and the rabbit polyclonal anti-E2A N-649 (Santa Cruz) antibodies in a 0.5% BSA in PBS buffer. Incubation with PLA probes, ligation and amplification steps were performed according to the manufacturer instructions (Duolink® In Situ kit, Sigma). The specificity of the signal was confirmed by using paraffin-embedded MDA-MB-436, Hs578T (TWIST1-positive, E12-positive) and HMEC-hTERT (TWIST1-negative, E12-positive) mammary cells, wherein *TWIST1* or *TCF3* were specifically knockdown through RNA interference.

Results

The TWIST1-E12 heterodimeric complex, unlike the homodimeric TWIST1 complex, complements the loss of endogenous TWIST1 protein in sustaining mammary epithelial cancer cell proliferation.

We previously reported that TWIST1 was critical to prevent oncogene-induced senescence (OIS) in breast cancer cells (15). We extended this observation to the basal B/ claudin-low MDA-MB-436 and Hs578T breast cancer cell lines and to the luminal BT474 breast cancer cell line by demonstrating that the depletion of TWIST1, achieved through RNA interference, invariably associated with a proliferation arrest and triggered a senescence program, as assessed by crystal violet and SA- β -galactosidase assays. The permanent growth-arrest associated with an accumulation of p21^{CIP1} and p15^{INK4B} cyclin-dependent kinase inhibitors, p16^{INK4A} conversely remaining undetectable (Fig. 1A and Supplementary Fig.1). No trace of

cleaved caspases-3 or PARP fragments were detected, excluding concomitant apoptosis induction (data not shown). As anticipated, survival and proliferation of MDA-MB-231 cells with residual endogenous *TWIST1* expression was confirmed to be TWIST1-independent (Supplementary Fig. 1). To evaluate the contribution of both the homodimeric and heterodimeric TWIST1 complexes in inhibiting latent OIS, complementation assays were performed with either TWIST1 or TWIST1 tethered dimers. This fusion protein strategy was successfully employed to delineate the functions of TWIST1 complexes during mouse embryonic development (23, 25, 38). As both *HAND1* and *HAND2* RNAs were undetectable in all three TWIST1-dependent cell lines (Supplementary Fig. 2A) and as the *TCF3* translation products, E12 and E47, are functionally redundant, fusion proteins were generated with human TWIST1 and/or E12 proteins (Supplementary Fig. 2B). The correct nuclear sub-localization of the two fusion proteins was confirmed (Supplementary Fig. 2C).

Taking advantage of the fact that the shRNA *TWIST1B* targets the *TWIST1* 3'UTR absent in the tethered dimer constructs, MDA-MB-436 cancer cells were sequentially infected with forced dimer expressing retroviral constructs and depleted in endogenous TWIST1 protein. As shown in Fig. 1, the wild-type heterodimer (TE), as well as the ectopically expressed TWIST1 (T) monomer used as internal control, were able to complement the withdrawal of the endogenous TWIST1 protein, maintaining reduced CKI expression and consequently sustaining breast cancer cell proliferation. In comparison, the TWIST1 homodimer (TT) failed to do so, suggesting that in such an assay the heterodimeric complex is the active form of TWIST1. Of note, ectopic expression of the forced dimers gave rise to the detection of lower molecular-weight bands, likely reflecting degradation products (Fig.1E). Similar sub-products were detected with the functional murine (Myc)₆-TWIST1-TWIST1 and (Myc)₆-TWIST1-E12 forced dimers (24) (Supplementary Fig. 2D). In support of our conclusion, the TE heterodimer was similarly shown to specifically complement the endogenous TWIST1 function in sustaining Hs578T and BT-474 cell proliferation (Supplementary Fig. 3). Given that the TT dimer display no apparent activity in the aforementioned assay, its functionality was further controlled by assessing its ability to transactivate a set of TWIST1 target genes identified in established genetic signatures (6, 39). As shown in Supplementary Figure 4, the homodimer was found as active as the TWIST1 monomer and its transcriptional potential to be alleviated when the activity of the forced dimer was impaired through insertion of a single substitution (K145E) reported to fully attenuate its DNA binding potential (40).

Efficient partner dimerization and DNA binding activity are requested for TE functions

To ascertain the need for a functional TWIST1-E12 heterodimeric complex to sustain cell proliferation, we next inserted punctual mutations into the tethered heterodimer, which either disrupted the interaction between the partners or altered the binding capacity of the complex to DNA. The substitution of the TWIST1 residue Arg154 into Pro (mutation R154P) was suggested to disrupt the TWIST1-E2A protein interaction (41). Taking benefit of our recently established *in silico* model of the bHLH domains of the heterodimeric complex bound to its DNA target sequence (32), this substitution was confirmed to induce a significant distortion of the structure, to alter the H-bond integrity within α -helices present in the HLH dimerization domains and to destabilize the protein complex (Fig. 2A-B and Supplementary Fig. 5-7, detailed information regarding the structural functional analysis is provided in the supplementary information section). Consequently, the residue substitution abrogates the ability of TWIST1 to interact with E12, as assessed in a co-immunoprecipitation assay (Fig. 2C). We additionally focused on the TWIST1 Ser123 residue, as its phosphorylation was reported to alter the balance between homo- and heterodimer formation (42) and as its polymorphic substitution into Trp associates with a Saethre-Chotzen phenotype, a human syndrome recurrently associated with a loss of TWIST1 function (43). The Ser123 was found to be located within the vicinity of the His593 residue of E12 and its phosphorylation was shown to reduce the distance between the α -helices and the DNA molecule, likely strengthening the binding affinity of the heterodimeric complex (C. B. and L. P., unpublished data). We thus assessed the consequences of the substitution of these two residues into Ala (mutations S123A in TWIST1 and H593A in E12) and actually demonstrated that the double mutant impacts on structural determinants essential for partner dimerization and protein-DNA complex stability (Fig. 2D-F, Supplementary Fig. 8 and 9). Collectively, this structural and functional analysis allowed us to design mutations impacting on either the stability of the heterodimeric complex or on its DNA binding potential. Mutations were confirmed to impact on neither tethered dimer production (Fig. 1E) nor on its nuclear localization (Fig. 2G). As expected, both R154P (RP) and S123A- H593A (AA) mutations led to the inactivation of the tethered TE dimer, as judged by their inability to activate the two TWIST1-target genes *VIM* and *CDH2*, as assessed in a reporter assay (Fig. 2H). In support of the need for a functional TWIST1 heterodimeric complex to alleviate latent OIS in the breast cancer cell line, both mutants were confirmed not to complement the endogenous TWIST1 function to sustain cell proliferation (Fig. 1C).

The TWIST1 dimers unequally alleviate OIS in human mammary epithelial cells.

In light of the differential activity observed for the two TWIST1 dimers in preventing OIS in breast cancer cells, we presumed that the TE complex should be the only TWIST1 complex capable of overriding RAS-induced senescence. To test this assumption, we sequentially enforced the production of an inducible HRAS^{G12V} (ER-HRAS^{G12V}) protein and TWIST1 (monomer T, tethered TT or TE dimer) protein in immortalized and non-transformed human mammary epithelial cells (HMEC-hTERT) and assessed the capability of each of these TWIST1 proteins to override senescence induction due to activation of the ER-HRAS^{G12V} fusion protein by hydroxyl-tamoxifen (+ 4-OHT) (Fig. 3A). When cells were cultured in a medium supplemented with 1 mM glucose instead of 25 mM glucose as used in all other experiments, the ER-HRAS^{G12V} protein activation was confirmed to trigger a senescence program, as judged by the detection of a SA- β -galactosidase activity (Fig. 3B).

While the *CDKN2A-ARF* locus is methylated in HMEC-hTERT cells (44-46), commitment into senescence was associated with an accumulation of p15^{INK4B} and p21^{CIP1/WAF1} (Fig. 3B). In support of our conclusion, the active heterodimeric TE complex was found to be the unique TWIST1 complex to prevent CKI accumulation and to sustain cell proliferation (Fig. 3C-D).

The TWIST1 heterodimer triggers partial EMT and facilitates the neoplastic transformation of human mammary epithelial cell transformation by mitogenic oncoproteins.

We previously demonstrated that partial commitment of mammary epithelial cells into an EMT program increases their plasticity, facilitating either the acquisition of mesenchymal features when exposed to an EMT-permissive microenvironment or to neoplastic transformation by oncoproteins (6). We then assessed the consequences of the enforced expression of TWIST1 dimers on mammary epithelial cell morphology. As previously observed with the TWIST1 monomer (15), production of the wild-type TE complex in HMEC-hTERT cells, unlike the homodimeric TT complex and inactive TE variants, associated with a slight increase in fibronectin and vimentin proteins while the E-cadherin level remained constant (Fig. 4A). None of the TWIST1 complexes induced drastic changes, with cells maintaining their cobble-stone phenotype (Fig. 4B). Nonetheless, TE-producing cells displayed a significant increased responsiveness to TGF β , an EMT-promoting cytokine. After one week of treatment, cells displayed a spindle morphology, expressed mesenchymal markers and only residual E-cadherin (Fig. 4A-B). The TE complex, unlike its TT counterpart, is thus able to trigger partial commitment of mammary epithelial cells into EMT. This property is expected to facilitate the neoplastic transformation of cells by mitogenic

oncoprotein such as RAS (6). To evaluate this assumption, cells were sequentially infected with *TWIST1* and constitutive *HRASG12V* retroviral expression constructs. While sole expression of the TWIST1 tethered dimer fails to transform cells, concomitant production of HRAS^{G12V} and the active heterodimeric complex successfully afford cells a transformation potential, as assessed in a colony formation assay (Fig. 4C). In line with our expectations, neither the homodimeric TT complex nor the inactive forms of the TE complex were found to be functional in this assay. The observed differential was confirmed not to rely on an unequal *RAS* protein level (Supplementary Fig. 10). Collectively, these observations demonstrated that the heterodimeric TWIST1-E12 complex was also the active form of TWIST1 in regards to EMT induction in mammary epithelial cells.

Forced expression of the TWIST1-E12 heterodimeric complex in mammary epithelial cells specifically confers mice an exacerbated susceptibility to spontaneously develop breast carcinoma.

To validate the differential oncogenic potential between the two TWIST1 complexes *in vivo*, we next assessed whether their aberrant production in mammary epithelial cells also unequally promotes tumor development. To evaluate this assumption, *TT* or *TE* expression was enforced in luminal committed cells through generation of WAP: *Twist1-Twist1* and WAP:*Twist1-E12* mice by crossing CAG-LSL-*Twist* and WAP-*Cre* mouse strains (25, 31). Full activation of the Whey Acidic Protein promoter was assured by two consecutive lactations. After a latency period of more than 18 months, reflecting the need for additional alterations to fully transform cells, TE-expressing mice were found to develop breast carcinomas with a significantly higher frequency (39.2%, n=28) than TT-expressing mice (14.2%, n=14) and control littermates (14.2%, n=14) (Fig. 5 and Supplementary Table 1). Tumor phenotypes were found to be heterogeneous, including glandular and differentiated, malpighian, or metaplastic carcinomas (Supplementary Table 1). No secondary tumor site was detected. This observation highlighted the *in vivo* oncogenic properties of TWIST1-E12 heterodimer and strengthened the differential activity observed between the TT and TE complexes in triggering the neoplastic transformation of mammary epithelial cells.

The heterodimeric TWIST1-E12 complex is detected in human breast premalignant lesions.

If the assumption that the heterodimeric TWIST1 complex plays a role in malignant transformation and breast cancer cell survival and proliferation is correct, we would expect

that this complex would already be detectable in *in situ* ductal carcinoma (DCIS), long before the metastatic cascade initiates. We thus assessed TE complex formation through a proximity ligation assay (PLA), selecting cases previously defined as TWIST1-positive or -negative by immunohistochemistry (6). Experimental conditions were established in mammary carcinoma cell lines and the specificity of the signal was confirmed by turning-down the expression of either the endogenous *TWIST1* or *TCF3* (the E12/E47 proteins-encoding gene) through RNA interference (Supplementary Fig. S11). As shown in Fig. 6, the TE complex was invariably detected in all TWIST1-positive DCIS. As a control, no signal was detected in either TWIST1-negative DCIS or in normal mammary gland. The detection of the TE complex in premalignant lesions is thus compatible with the protein having a role in primary tumor formation.

Discussion

The TWIST1 transcription factor displays oncogenic and pro-metastatic properties mainly due to its ability to alleviate fail-safe programs and to trigger EMT (47, 48). In the present report, we assess the contribution of both TWIST1 complexes in relation to the oncogenic potential of TWIST1. To this end, tethered dimers were generated, a strategy previously employed to delineate the respective functions of the TWIST1 homo- and heterodimers during mouse embryonic development (24, 25, 38). In light of the absence of the *HAND1/2* transcripts in the examined TWIST1-dependent breast cancer cell lines (Supplementary Fig. S2A), the HAND-TWIST1 heterodimer was excluded from our study. As E proteins are functionally redundant, binding of TWIST1 to E proteins was represented by the TWIST1-E12 complex. Strikingly, we demonstrated that the tethered TE dimer, unlike its homodimeric counterpart, is able to complement TWIST1 function in sustaining breast cancer cell proliferation, overriding HRAS^{G12V}-induced senescence in immortalized mammary epithelial cells, triggering partial EMT and cooperating with the mitogenic protein in promoting their neoplastic transformation. As breast cancer cells of the claudin-low subtypes display mutant *TP53* and *RBI* status, oncogene-induced senescence likely results from CKI accumulation and relies on their p53- and RB-independent functions. This observation strengthens the conclusion that TWIST1 facilitates the escape from senescence through multiple mechanisms in different cellular setting (18). In support of a role of TE in the oncogenic potential of TWIST1, the TE heterodimer was found to be expressed in breast premalignant lesions, at a stage preceding the metastatic cascade initiation. Furthermore, aberrant expression of TE in luminal committed mammary epithelial cells significantly increases the risk of mice to develop breast tumors

with time. The long latency and the heterogeneity within the TWIST1-driven breast carcinomas likely reflect the need of variable secondary events to fully transform cells. We are currently addressing the consequences of the activation of these embryonic factors on the course of events leading to neoplastic transformation. Noticeably, we previously demonstrated that TWIST1 and RAS actively cooperate in promoting breast carcinoma in mice, leading to tumor development in less than 3 months (6). We now unambiguously show that the TWIST1 heterodimer displays an intrinsic oncogenic potential *in vivo*.

Interestingly, by performing complementation assays, Philogene and colleagues demonstrated the predominant function of the HLH8-HLH8 (the *C. elegans* TWIST ortholog) homodimeric complex in enteric development (49). Along this line, by using a similar tethered dimer strategy, James Cross's laboratory recently highlighted the dominant role of the HAND1 homodimer during mouse development, likely restricting the heterodimer function to a role in counterbalancing the activity of the HAND1 homodimer *in vivo* (50). The relative contribution of bHLH complexes during embryonic development and tumorigenesis may thus be inverted.

By mutating key residues, based on literature and our recently established *in silico* structural model (32), we confirmed that the functionality of the TWIST heterodimer requires efficient interaction between both partners and correct folding of the complex to stably bind to its target DNA sequence. Interestingly, the Ser123 in TWIST1 was previously shown to be phosphorylated by PKA and to alter the TWIST1 homo- and heterodimer equilibrium (42). Our structural analysis emphasizes the important role of the Ser123 residue. In line with this hypothesis, substitution of the Ser123 to Trp associates with a typical Saethre-Chotzen syndrome (SCS) phenotype (43): a syndrome wherein TWIST1 alterations invariably lead to a loss of function. Furthermore, the R154P mutation impacts on the position of TWIST1 Lys145 and E12 Lys588 (Supplementary Fig. 8C-D), residues essential for DNA binding (32, 40). Strikingly, the substitutions of the Arg154 to Gly and of the Lys145 residue to Asp or Glu were also found in SCS patients (40). In conclusion, this structural analysis led us to provide a rational link between numerous TWIST1 loss-of-function mutations found in SCS patients, strengthening the relevance of our structural model for further investigations.

Acknowledgments

We are grateful to the Biological Resource Center of the Centre Léon Bérard for providing the cohort of human breast samples and to Dr Isabelle Treilleux and Sophie Léon for selecting and sorting the cases. We are thankful to Pr Cornelis Murre (University of California, San-

Diego, USA) and Pr Masataka Nakamura (Tokyo Medical and Dental University, Tokyo, Japan) for providing the human E12 expression construct, Pr William C. Hahn for providing the EcoR retroviral expressing construct (Harvard University, USA), Dr Patrice Lassus (IGMM, Montpellier, France) for the shRNA *TWIST1* directed against its 3'UTR (shRNA *TWIST1* B), Pr Jesus Gil (MRC, London, UK) for the ER-RAS construct, Dr Ivan Mikaelian (CRCL, Lyon, France) for the *VIMI*-luciferase reporter, Dr Pierre J. Marie (INSERM U606, Paris, France) for the *CDH2*-luciferase reporter and Dr Didier Negre (INSERMU111/CIRI, Ecole Normale Supérieure de Lyon, France) for providing the pCMV Δ R8.91 and pHCMVG-VSVG vectors. Authors are thankful to the AniCan and ALECS animal facilities as well as to Nicolas Gadot (Anipath facility) for mouse tissue section embedding and H & E staining. Authors are grateful to Dr Baptiste Gras and Abdel-Adhime Benhassine for their technical help in generating tethered dimers and their contribution in establishing Co-IP experimental conditions respectively, to Dr Ulrich Valcourt (CRCL, Lyon, France) and Dr Patrice Lassus (IGMM, Montpellier, France) for their scientific inputs and to Dr Louise Hill for critical reading of the manuscript.

Funding

Our team is labeled by the Ligue Nationale contre le Cancer. This work was additionally supported by institutional grants from the LabEX DEVweCAN (ANR-10-LABX-61) and from the LyRIC (Lyon Recherche Intégrée en Cancérologie, Institut National contre le Cancer, INCa_4664). LJ, GR and CB were recipients of fellowships from the Ligue Nationale contre le Cancer and the Foundation ARC pour la Recherche sur le Cancer. APi is financed through the LyRIC.

Author contributions

Conception and design: LP, AT, SA.

Development of methodology: LJ, CB, GR, LP, RT, JC.

Acquisition of data (provided animals, acquired and managed patients, provided facilities, etc...): DBS

Analysis and interpretation of data: LJ, CB, LP, AP, AT, SA.

Writing: SA.

Study supervision: LP, AT, SA.

Histopathology and immunohistology: M. D-S., A. Pi.

References

- (1) Yang J, Weinberg RA. Epithelial-mesenchymal transition: at the crossroads of development and tumor metastasis. *Dev Cell* 2008;14:818-29.
- (2) Thiery JP, Acloque H, Huang RY, Nieto MA. Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell* 2009;139:871-90.
- (3) De Craene B, Berx G. Regulatory networks defining EMT during cancer initiation and progression. *Nat Rev Cancer* 2013;13:97-110.
- (4) Tsai JH, Donaher JL, Murphy DA, Chau S, Yang J. Spatiotemporal regulation of epithelial-mesenchymal transition is essential for squamous cell carcinoma metastasis. *Cancer Cell* 2012;22:725-36.
- (5) Ocana OH, Corcoles R, Fabra A, Moreno-Bueno G, Acloque H, Vega S, et al. Metastatic colonization requires the repression of the epithelial-mesenchymal transition inducer Prrx1. *Cancer Cell* 2012;22:709-24.
- (6) Morel AP, Hinkal GW, Thomas C, Fauvet F, Courtois-Cox S, Wierinckx A, et al. EMT inducers catalyze malignant transformation of mammary epithelial cells and drive tumorigenesis towards claudin-low tumors in transgenic mice. *PLoS Genet* 2012;8:e1002723.
- (7) Singh A, Greninger P, Rhodes D, Koopman L, Violette S, Bardeesy N, et al. A gene expression signature associated with "K-Ras addiction" reveals regulators of EMT and tumor cell survival. *Cancer Cell* 2009;15:489-500.
- (8) Dong C, Yuan T, Wu Y, Wang Y, Fan TW, Miriyala S, et al. Loss of FBP1 by Snail-mediated repression provides metabolic advantages in basal-like breast cancer. *Cancer Cell* 2013;23:316-31.

- (9) Mani SA, Guo W, Liao MJ, Eaton EN, Ayyanan A, Zhou AY, et al. The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell* 2008;133:704-15.
- (10) Morel AP, Lievre M, Thomas C, Hinkal G, Ansieau S, Puisieux A. Generation of breast cancer stem cells through epithelial-mesenchymal transition. *PLoS One* 2008;3:e2888.
- (11) Caramel J, Papadogeorgakis E, Hill L, Browne GJ, Richard G, Wierinckx A, et al. A switch in the expression of embryonic EMT-inducers drives the development of malignant melanoma. *Cancer Cell* 2013;24:466-80.
- (12) Alba-Castellon L, Batlle R, Franci C, Fernandez-Acenero MJ, Mazzolini R, Pena R, et al. Snail1 expression is required for sarcomagenesis. *Neoplasia* 2014;16:413-21.
- (13) Maestro R, Dei Tos AP, Hamamori Y, Krasnokutsky S, Sartorelli V, Kedes L, et al. Twist is a potential oncogene that inhibits apoptosis. *Genes Dev* 1999;13:2207-17.
- (14) Valsesia-Wittmann S, Magdeleine M, Dupasquier S, Garin E, Jallas AC, Combaret V, et al. Oncogenic cooperation between H-Twist and N-Myc overrides failsafe programs in cancer cells. *Cancer Cell* 2004;6:625-30.
- (15) Ansieau S, Bastid J, Doreau A, Morel AP, Bouchet BP, Thomas C, et al. Induction of EMT by twist proteins as a collateral effect of tumor-promoting inactivation of premature senescence. *Cancer Cell* 2008;14:79-89.
- (16) Tran PT, Shroff EH, Burns TF, Thiyagarajan S, Das ST, Zabuawala T, et al. Twist1 suppresses senescence programs and thereby accelerates and maintains mutant Kras-induced lung tumorigenesis. *PLoS Genet* 2012;8:e1002650.
- (17) Piccinin S, Tonin E, Sessa S, Demontis S, Rossi S, Pecciarini L, et al. A "twist box" code of p53 inactivation: twist box: p53 interaction promotes p53 degradation. *Cancer Cell* 2012;22:404-15.
- (18) Burns TF, Dobromilskaya I, Murphy SC, Gajula RP, Thiyagarajan S, Chatley SN, et al. Inhibition of TWIST1 leads to activation of oncogene-induced senescence in oncogene-driven non-small cell lung cancer. *Mol Cancer Res* 2013;11:329-38.
- (19) Lee SH, Lee SJ, Jung YS, Xu Y, Kang HS, Ha NC, et al. Blocking of p53-Snail binding, promoted by oncogenic K-Ras, recovers p53 expression and function. *Neoplasia* 2009;11:22-31, 6p.

- (20) Ohashi S, Natsuizaka M, Wong GS, Michaylira CZ, Grugan KD, Stairs DB, et al. Epidermal growth factor receptor and mutant p53 expand an esophageal cellular subpopulation capable of epithelial-to-mesenchymal transition through ZEB transcription factors. *Cancer Res* 2010;70:4174-84.
- (21) Nardella C, Clohessy JG, Alimonti A, Pandolfi PP. Pro-senescence therapy for cancer treatment. *Nat Rev Cancer* 2011;11:503-11.
- (22) Acosta JC, Gil J. Senescence: a new weapon for cancer therapy. *Trends Cell Biol* 2012;22:211-9.
- (23) Firulli BA, Redick BA, Conway SJ, Firulli AB. Mutations within helix I of Twist1 result in distinct limb defects and variation of DNA binding affinities. *J Biol Chem* 2007;282:27536-46.
- (24) Connerney J, Andreeva V, Leshem Y, Muentener C, Mercado MA, Spicer DB. Twist1 dimer selection regulates cranial suture patterning and fusion. *Dev Dyn* 2006;235:1345-57.
- (25) Connerney J, Andreeva V, Leshem Y, Mercado MA, Dowell K, Yang X, et al. Twist1 homodimers enhance FGF responsiveness of the cranial sutures and promote suture closure. *Dev Biol* 2008;318:323-34.
- (26) Le Mée S, Fromiguet O, Marie PJ. Sp1/Sp3 and the myeloid zinc finger gene MZF1 regulate the human N-cadherin promoter in osteoblasts. *Exp Cell Res* 2005;302:129-42.
- (27) Boehm JS, Hession MT, Bulmer SE, Hahn WC. Transformation of human and murine fibroblasts without viral oncoproteins. *Mol Cell Biol* 2005;25:6464-74.
- (28) Barradas M, Anderton E, Acosta JC, Li S, Banito A, Rodriguez-Niedenfuhr M, et al. Histone demethylase JMJD3 contributes to epigenetic control of INK4a/ARF by oncogenic RAS. *Genes Dev* 2009;23:1177-82.
- (29) Mikaelian I, Malek M, Gadet R, Viallet J, Garcia A, Girard-Gagnepain A, et al. Genetic and pharmacologic inhibition of mTORC1 promotes EMT by a TGF-beta-independent mechanism. *Cancer Res* 2013;73:6621-31.
- (30) Murre C, Voronova A, Baltimore D. B-cell- and myocyte-specific E2-box-binding factors contain E12/E47-like subunits. *Mol Cell Biol* 1991;11:1156-60.

- (31) Wagner KU, Wall RJ, St-Onge L, Gruss P, Wynshaw-Boris A, Garrett L, et al. Cre-mediated gene deletion in the mammary gland. *Nucleic Acids Res* 1997;25:4323-30.
- (32) Bouard C, Terreux R, Hope J, Chemelle JA, Puisieux A, Ansieau S, et al. Interhelical loops within the bHLH domain are determinant in maintaining TWIST1-DNA complexes. *J Biomol Struct Dyn* 2014;32:226-41.
- (33) Gras B, Jacquaroud L, Wierinckx A, Lamblot C, Fauvet F, Lachuer J, et al. Snail family members unequally trigger EMT and thereby differ in their ability to promote the neoplastic transformation of mammary epithelial cells. *PLoS One* 2014;9:e92254.
- (34) Baker BW, Boettiger D, Spooncer E, Norton JD. Efficient retroviral-mediated gene transfer into human B lymphoblastoid cells expressing mouse ecotropic viral receptor. *Nucleic Acids Res* 1992;20:5234.
- (35) Zufferey R, Nagy D, Mandel RJ, Naldini L, Trono D. Multiply attenuated lentiviral vector achieves efficient gene delivery in vivo. *Nat Biotechnol* 1997;15:871-5.
- (36) Burns JC, Friedmann T, Driever W, Burrascano M, Yee JK. Vesicular stomatitis virus G glycoprotein pseudotyped retroviral vectors: concentration to very high titer and efficient gene transfer into mammalian and nonmammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993;90:8033-7.
- (37) Dimri GP, Lee X, Basile G, Acosta M, Scott G, Roskelley C, et al. A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92:9363-7.
- (38) Castanon I, Von SS, Kass J, Baylies MK. Dimerization partners determine the activity of the Twist bHLH protein during *Drosophila* mesoderm development. *Development* 2001;128:3145-59.
- (39) Taube JH, Herschkowitz JI, Komurov K, Zhou AY, Gupta S, Yang J, et al. Core epithelial-to-mesenchymal transition interactome gene-expression signature is associated with claudin-low and metaplastic breast cancer subtypes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010;107:15449-54.
- (40) El Ghouzzi, V, Legeai-Mallet L, Benoist-Lasselin C, Lajeunie E, Renier D, Munnich A, et al. Mutations in the basic domain and the loop-helix II junction of TWIST abolish DNA binding in Saethre-Chotzen syndrome. *FEBS Lett* 2001;492:112-8.

- (41) Spicer DB, Rhee J, Cheung WL, Lassar AB. Inhibition of myogenic bHLH and MEF2 transcription factors by the bHLH protein Twist. *Science* 1996;272:1476-80.
- (42) Firulli BA, Krawchuk D, Centonze VE, Vargesson N, Virshup DM, Conway SJ, et al. Altered Twist1 and Hand2 dimerization is associated with Saethre-Chotzen syndrome and limb abnormalities. *Nat Genet* 2005;37:373-81.
- (43) Kress W, Schropp C, Lieb G, Petersen B, Busse-Ratzka M, Kunz J, et al. Saethre-Chotzen syndrome caused by TWIST 1 gene mutations: functional differentiation from Muenke coronal synostosis syndrome. *Eur J Hum Genet* 2006;14:39-48.
- (44) Huschtscha LI, Noble JR, Neumann AA, Moy EL, Barry P, Melki JR, et al. Loss of p16INK4 expression by methylation is associated with lifespan extension of human mammary epithelial cells. *Cancer Res* 1998;58:3508-12.
- (45) Brenner AJ, Stampfer MR, Aldaz CM. Increased p16 expression with first senescence arrest in human mammary epithelial cells and extended growth capacity with p16 inactivation. *Oncogene* 1998;17:199-205.
- (46) Kiyono T, Foster SA, Koop JI, McDougall JK, Galloway DA, Klingelutz AJ. Both Rb/p16INK4a inactivation and telomerase activity are required to immortalize human epithelial cells. *Nature* 1998;396:84-8.
- (47) Yang J, Mani SA, Donaher JL, Ramaswamy S, Itzykson RA, Come C, et al. Twist, a master regulator of morphogenesis, plays an essential role in tumor metastasis. *Cell* 2004;117:927-39.
- (48) Ansieau S, Morel AP, Hinkal G, Bastid J, Puisieux A. TWISTing an embryonic transcription factor into an oncoprotein. *Oncogene* 2010;29:3173-84.
- (49) Philogene MC, Small SG, Wang P, Corsi AK. Distinct *Caenorhabditis elegans* HLH-8/twist-containing dimers function in the mesoderm. *Dev Dyn* 2012;241:481-92.
- (50) Hu D, Scott IC, Snider F, Geary-Joo C, Zhao X, Simmons DG, et al. The basic helix-loop-helix transcription factor Hand1 regulates mouse development as a homodimer. *Dev Biol* 2013;382:470-81.

Figure Legends

Figure 1: Fully active TWIST1-E12 heterodimeric complex is required to complement the endogenous TWIST1 function in sustaining MDA-MB-436 breast cancer cell proliferation.

A, MDA-MB-436 breast cancers were depleted in TWIST1 through RNA interference (shRNA *TWIST1* A or B as indicated on top). Two days post-infection, cells were seeded at low density and stained 3 days later with crystal violet (top panels) or assessed for their SA- β -galactosidase activity. **B**, Analysis of Ser10-histone H3 (H3-S10), p15^{INK4B} (p15), p16^{INK4A} (p16), p21^{CIP1} (p21), and TWIST1 by Western-blotting (relative signal quantification in respect to shRNA *Control* infected cells is indicated). b.d.l. means below detection limit. **C**, MDA-MB436 cells were sequentially infected with T, TT or TE (either wild type (wt) or TWIST1 S121A-E12 H593A (AA) or TWIST1 R154P-E12 (RP) mutant constructs) retroviral expression vectors and depleted in endogenous TWIST1 through RNA interference (shRNA *TWIST1B*). Notice that the shRNA targets 3' untranslated sequence that is absent from the tethered dimers and thus specifically turns-down the endogenous *TWIST1* expression. Cells were seeded at low density 48h post-infection and stained with crystal violet 3 days later. **D**, Expression analysis of the endogenous *TWIST1* by Q-RT-PCR. Levels were expressed relative to the housekeeping *HPRT1* gene transcript, and were normalized with respect to uninfected MDA-MB-436 cells \pm SD of triplicates. **E**, Analysis of p21^{CIP1} (p21), p15^{INK4B} (p15) and TWIST1 proteins by Western-blot (relative signal quantification in respect to MOCK cells is indicated).

Figure 2. Design of mutations disrupting the dimer TWIST1-E12 or its DNA binding potential.

A-C, The R154P mutation impairs the TWIST1-E12 dimerization. **A**, Structure of the heterodimeric TWIST1-E12. Structures are represented as ribbons respectively in grey (for TWIST1) and green (for E12). Position of the R154 residue (in blue) and of the series of residues determinant for the structural conformation of the heterodimer (Boxes A to D) are shown. **B**, Evaluation of the impact of the R154P mutation on the stability of H-bonds established between residues within individual boxes. **C**, The R154P mutation abrogates the ability of TWIST1 to interact with E12, as assessed by a Co-IP assay. Wild type (wt) or mutated version (R154P, RP) of TWIST1 and E12 were transiently produced in HEK293T cells as indicated on top. TWIST protein was immuno-precipitated with a monoclonal α -

FLAG antibody and the presence of E12 protein in the immunoprecipitates (IP) was assessed by Western-blot. In: input 10%. **D-F**, The S123A and H593A substitutions in TWIST1 and E12 respectively disrupt the binding of the heterodimeric complex to its target DNA sequence. **D**, Visualization of the position of structural determinants (Boxes I to IV) in the wild type or double mutant (TWIST1 S123A- E12 H593A) heterodimeric complex structures essential for its DNA binding properties. Notice that Box I of TWIST1 and Box III of E12 are directly in contact with DNA. Positions of Ser123 and His593 residues in the wild type (wt) heterodimer and the Ala123 and Ala593 residues in its mutated variant are shown in CPK representation. **E**, Evaluation of the impact of the double substitution on the stability of H-bonds established between protein-protein residues and between protein residues and DNA, in each individual box. **F**, The S123A and H593A mutations significantly reduce the hydrogen bond stability established between residues within the TWIST1 Box I and E12 Box III with the nucleotides +3, +4, and +5 of the E-box, respectively. **G**, Sub-localization analysis of the mutant heterodimers. 293T cells were transiently transfected with TWIST1 expression constructs as depicted on top and protein analyzed by immunofluorescence 24h post-transfection, using a monoclonal anti-FLAG antibody. **H**, Both single R154P (RP) and double S123A H593A (AA) substitutions alleviate the ability of the heterodimer complex to activate the *Vimentin* (*VIM*) and N-Cadherin (*CDH2*) promoters, as assessed in a luciferase reporter assay.

Figure 3. Homo- and heterodimeric TWIST1 complexes unequally avoid RAS-induced senescence in mammary epithelial cells.

A, HMEC-hTERT cells were sequentially infected with the inducible ER-H-RAS^{G12V} fusion protein and with either monomeric TWIST1, homodimeric TWIST1 tethered dimer, or wild-type (wt) or mutant (AA or RP) TWIST1-E12 heterodimeric tethered dimer as depicted on top. **B**, The activation of the ER-HRAS^{G12V} protein with 4-OHT associated with senescence induction as assessed by a SA- β -galactosidase assay and p15^{INK4B} (p15) and p21^{CIP1} accumulation, as assessed by Western-blot. **C-D**, Five days post-activation of ER-HRAS^{G12V} with 4-OHT, cell proliferation was assessed through a crystal violet staining (**C**) and p21^{CIP1}, p15^{INK4B} and TWIST1 proteins were analyzed by Western-blot (**D**).

Figure 4. Homo- and heterodimeric TWIST1 complexes unequally trigger EMT and cooperate with H-RAS^{G12V} in promoting mammary epithelial cells.

A-B, The heterodimeric complex triggers partial commitment to EMT. Forced expression of the wild type (wt) heterodimeric TWIST1 complex (TE) in human mammary epithelial cells, unlike the homodimeric complex (TT) and the heterodimeric inactive variants (RP and AA), induces partial commitment to EMT as judged by the analysis of epithelial and mesenchymal markers by Western-blot (**A**, left panel) and the maintenance of an epithelial cobble-stone morphology (**B**, upper panels). Forced expression of the wild type heterodimeric complex specifically sensitizes cells to EMT permissive conditions (TGF β), as assessed by the analysis of epithelial and mesenchymal marker by Western-blot (**A**, right panels) and the acquisition of a fibroblastic cellular morphology (**B**, lower panels). **C**, HMEC-hTERT cells were sequentially infected with *TWIST1* (TT, wt or mutant TE as indicated) and *HRASG12V* (RAS) retroviral expression vectors. After one week of selection, the transformation potentials of the established cell lines were assessed in a soft-agar colony formation assay. Numbers of colonies are indicated \pm SD of triplicates.

Figure 5: Forced expression of homodimeric or heterodimeric TWIST1 complexes in luminal committed mammary epithelial cells confer mice with a differential susceptibility to spontaneously develop breast carcinoma.

A, *Twist1* expression in luminal committed mammary epithelial cells was achieved by crossing CAG-LSL-(Myc)₆-*Twist-Twist1* or CAG-(Myc)₆-LSL-*Twist1-E12* and WAP-Cre mice. **B**, Plot boxes indicating the expression of ectopic *TWIST1* transcripts, as assessed by Q-RT-PCR. Levels were expressed relative to the housekeeping *HPRT1* gene transcript, and were normalized with respect to wild-type mice-derived breast carcinoma. **C**, Histogram indicating the number of mice spontaneously developing breast carcinoma during their lifespan. Stars mark mice with two breast tumors. **D**, Representative hematoxylin and eosin (H&E) of the various tumor types observed.

Figure 6: The heterodimeric complex is detectable in breast premalignant lesions, as assessed in a Proximity Ligation Assay.

Assessment of the TWIST1-E12 heterodimeric complex in a proximity ligation assay (PLA) in TWIST1-positive and TWIST1-negative ductal carcinoma *in situ* (DCIS). Healthy mammary gland was used as a control. Each single dot corresponds to the detection of a TE complex.

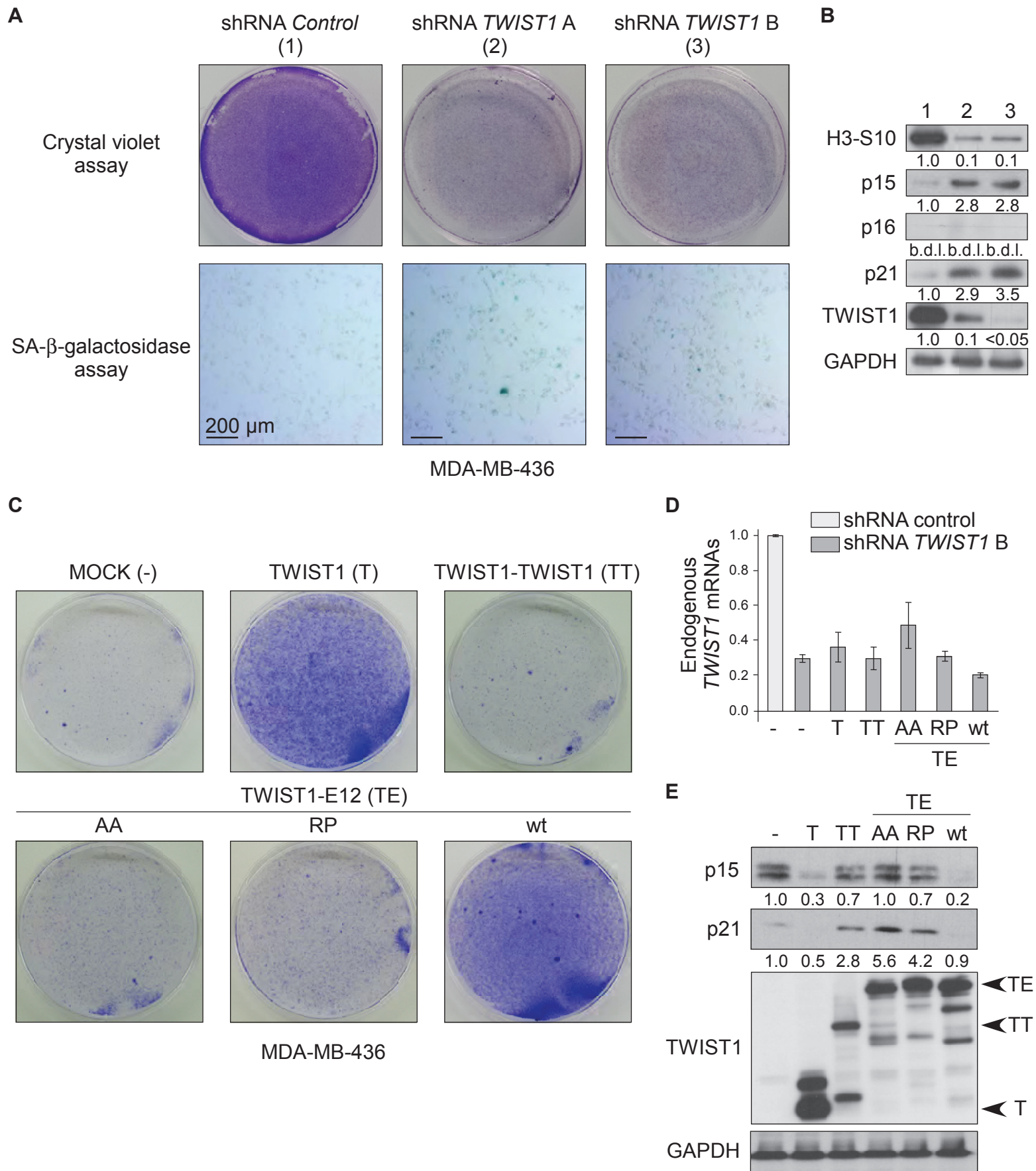


Figure 1

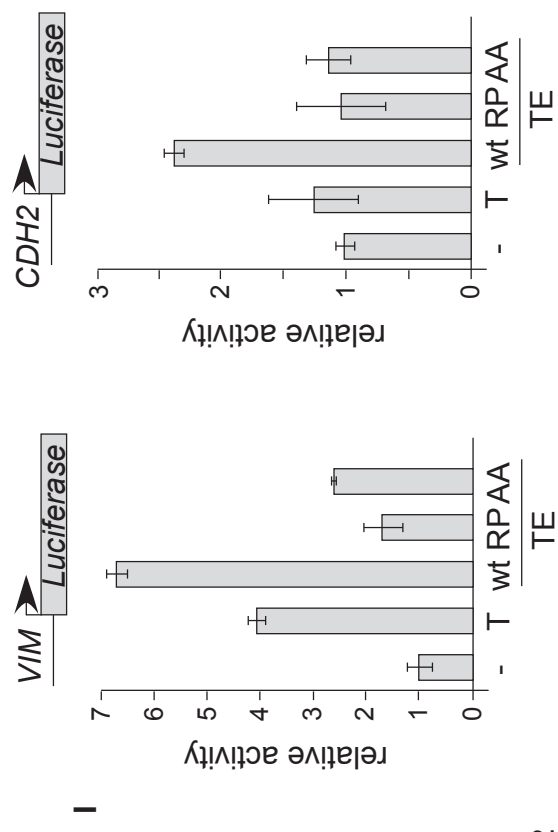
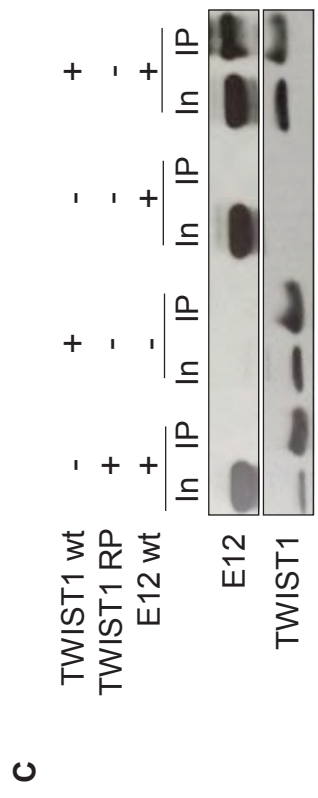
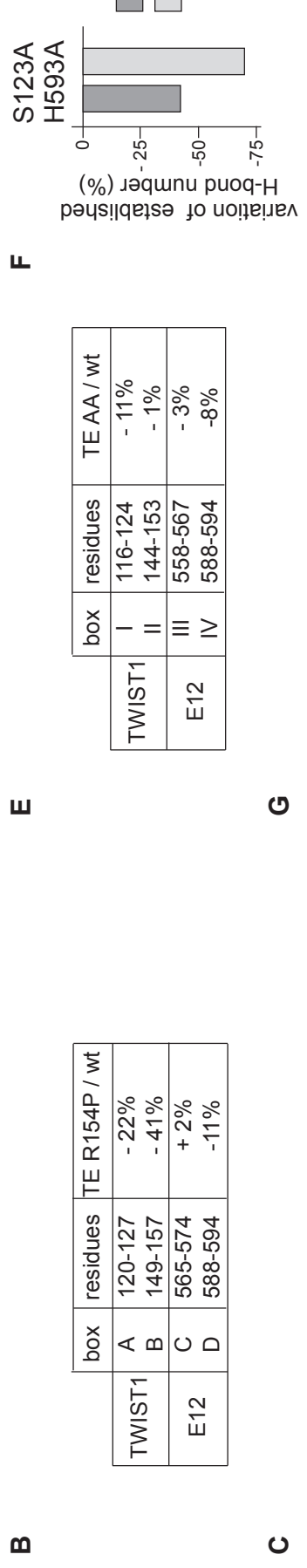
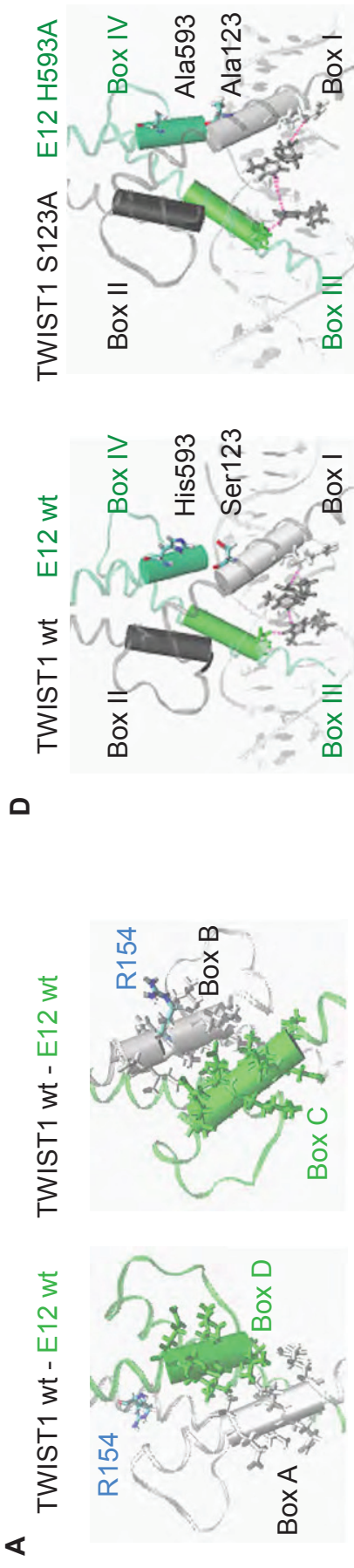


Figure 2

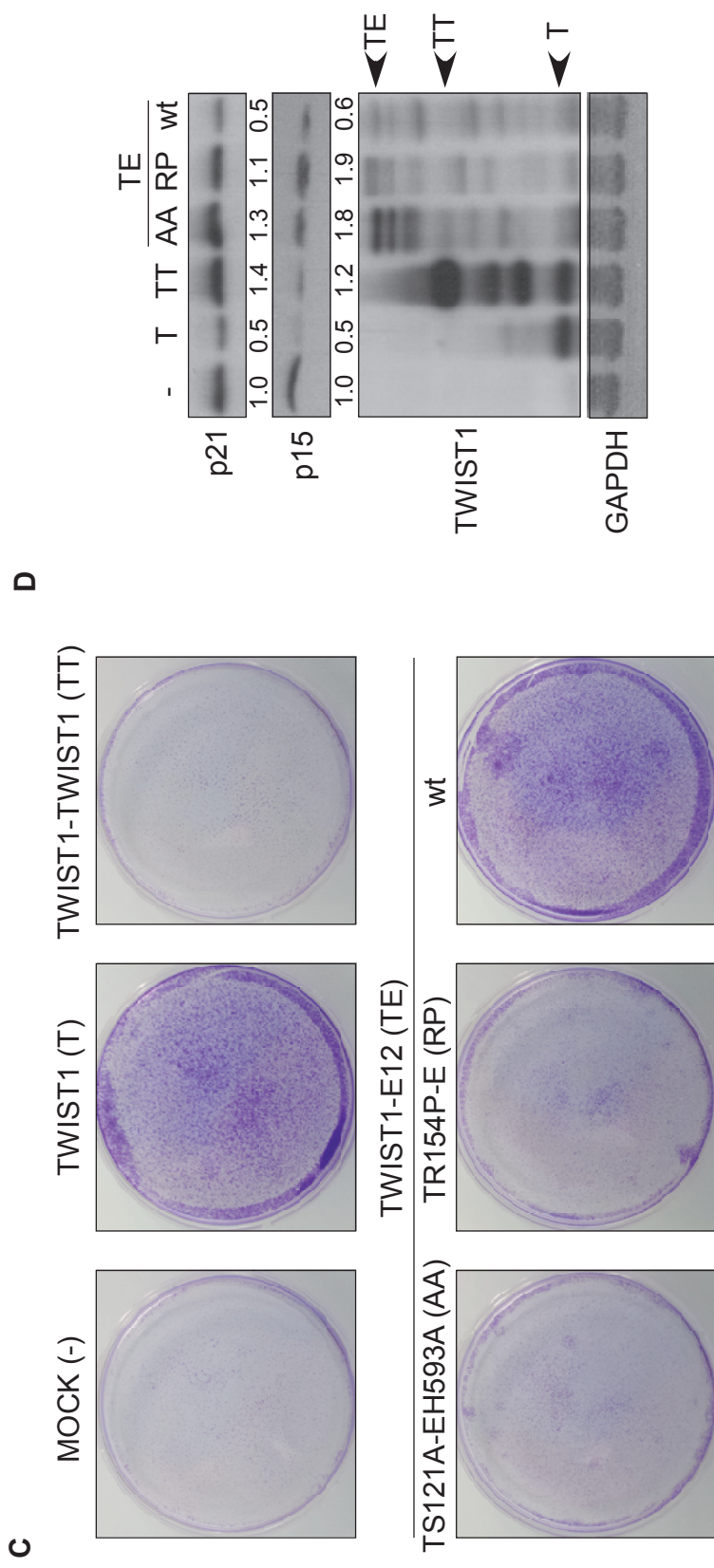
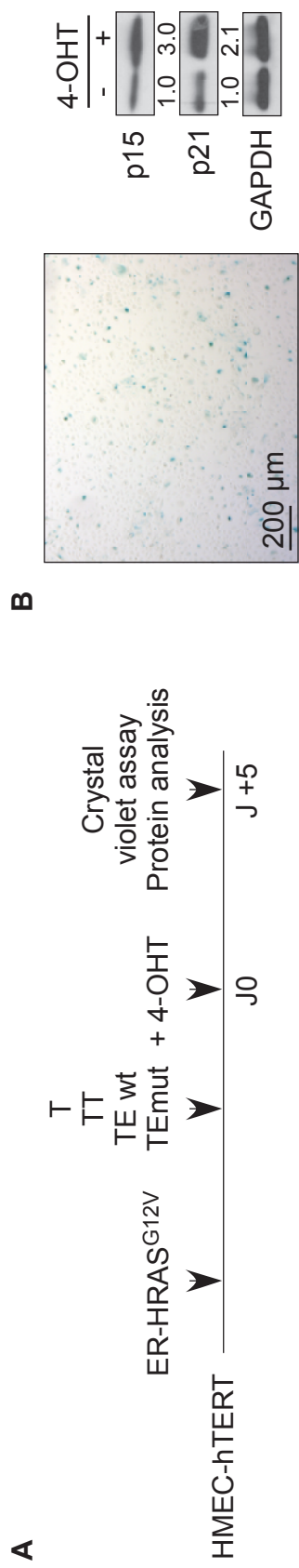


Figure 3

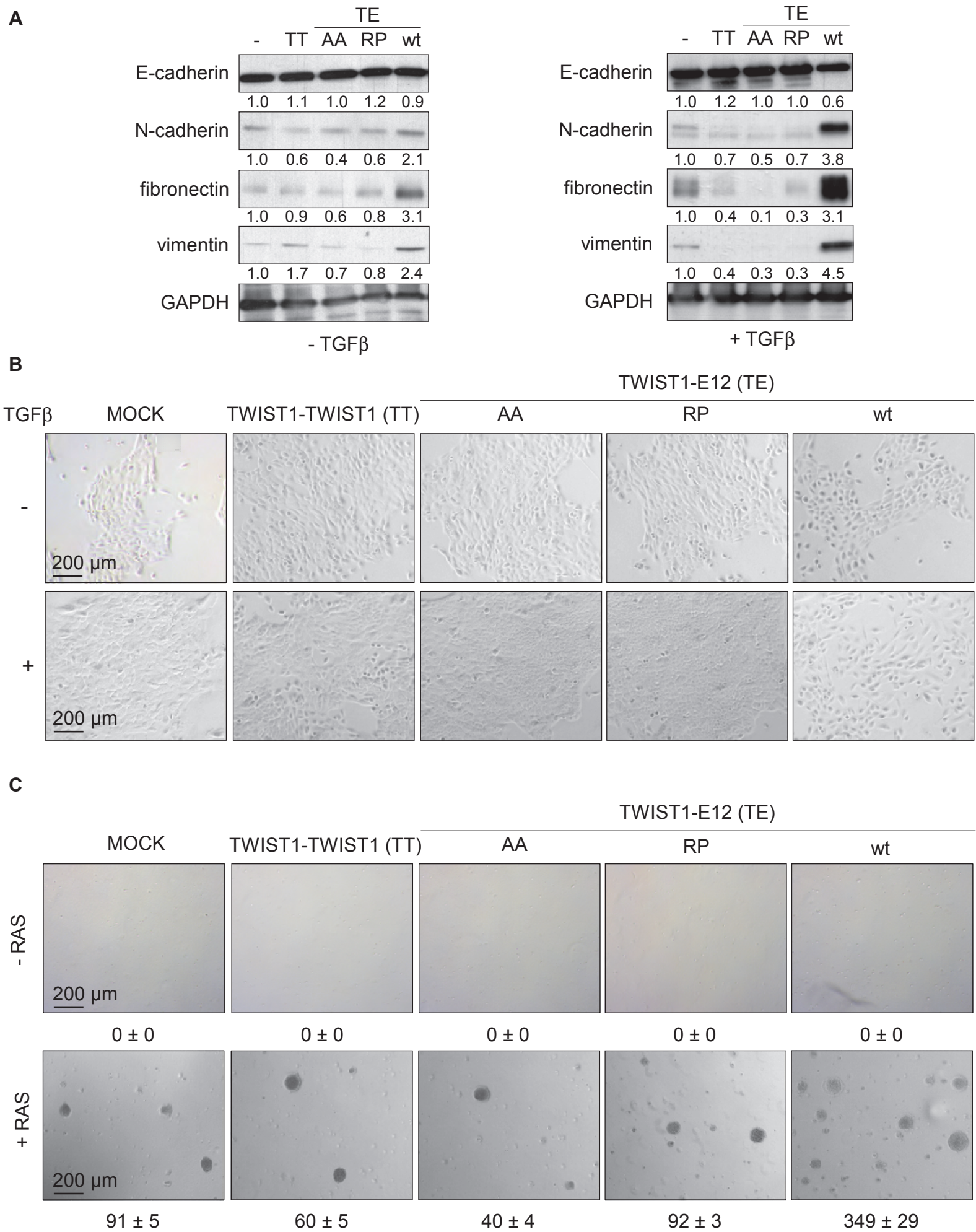


Figure 4

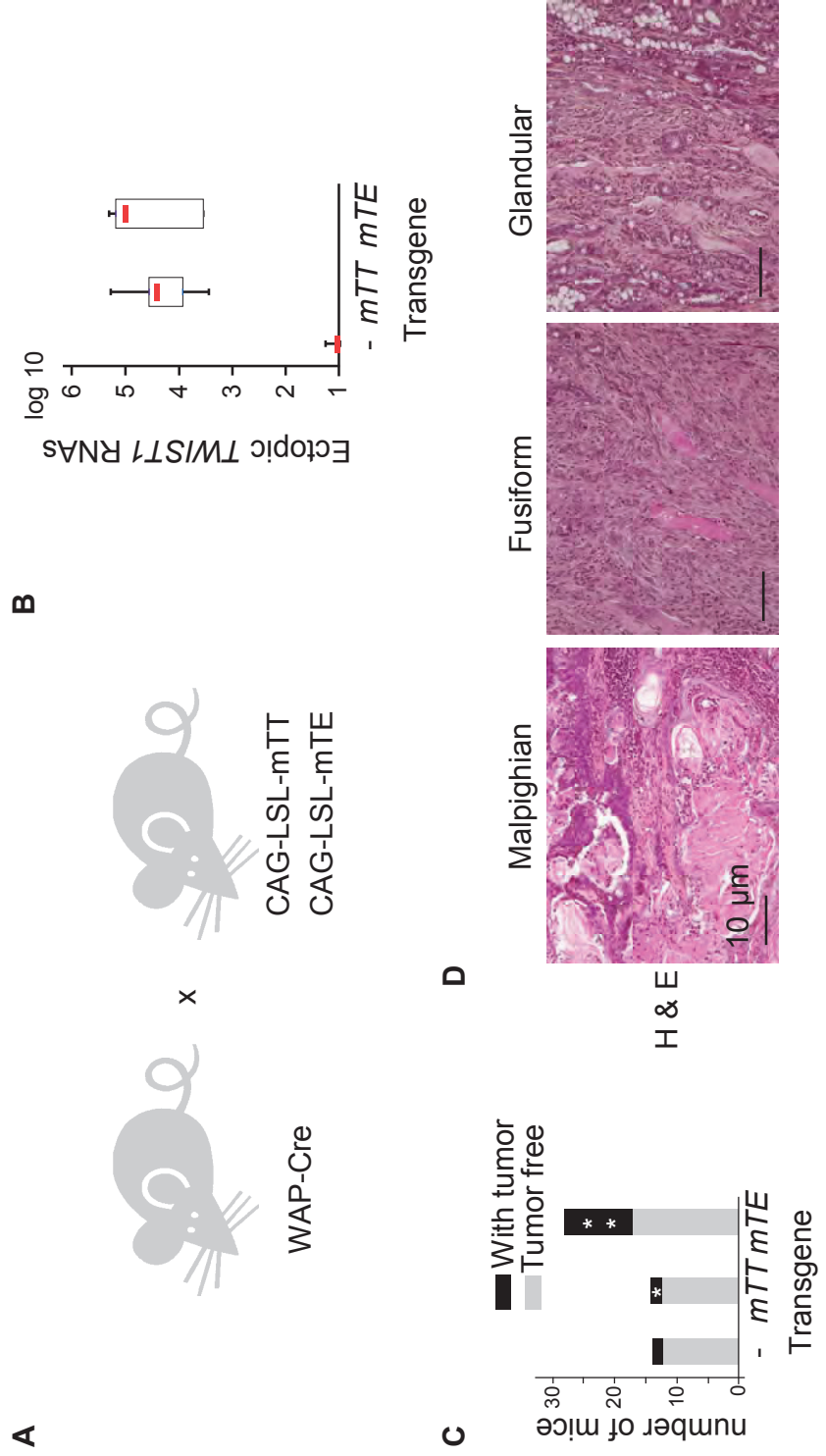
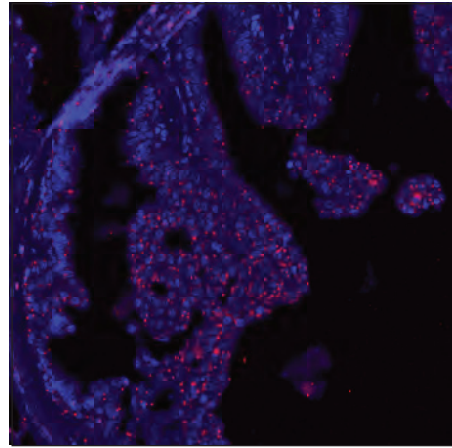
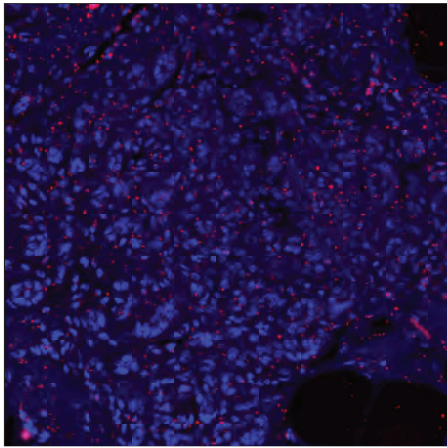
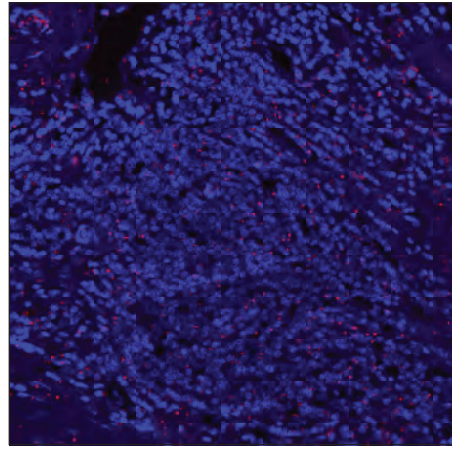
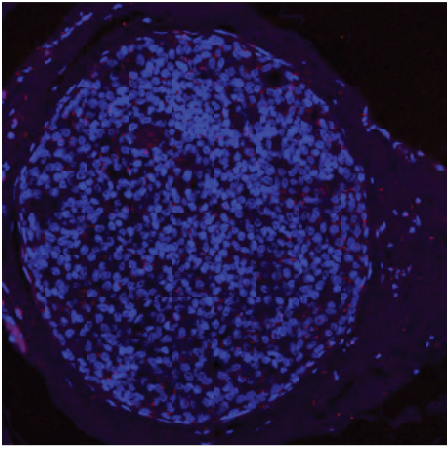
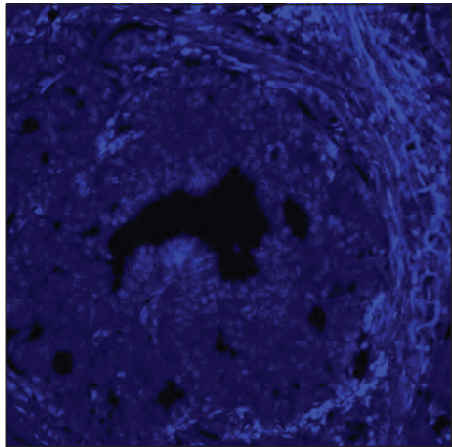
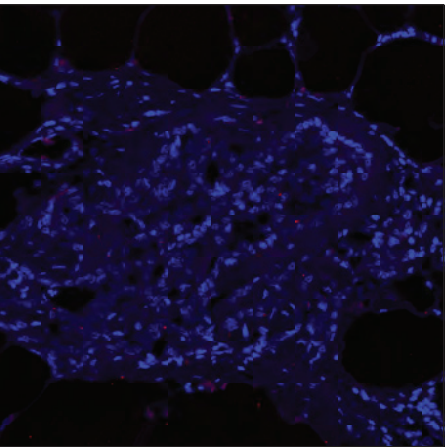


Figure 5

DCIS
TWIST1-
positive



DCIS
TWIST1-
negative



Control
mammary
gland

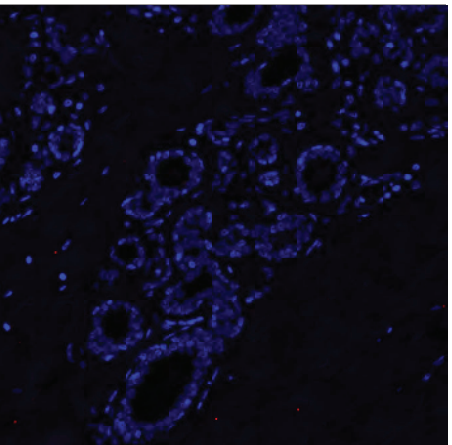
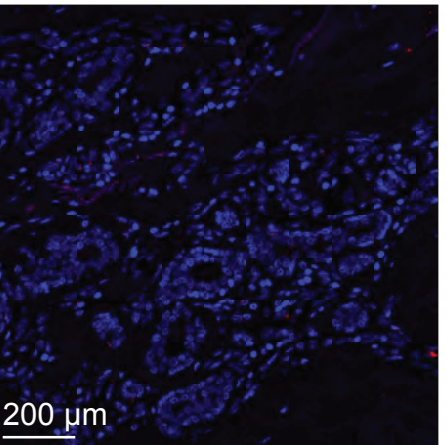


Figure 6

Résumé de la thèse

Etude du rôle des facteurs de transcription inducteurs d'EMT dans la mélanomagenèse

Les facteurs de transcription inducteurs de la transition épithélio-mésenchymateuse (EMT) sont fréquemment réactivés de manière aberrante dans de nombreux cancers. Dans les carcinomes, ils favorisent dans les étapes précoces le développement tumoral en inhibant les systèmes de sauvegarde tels que la sénescence ou l'apoptose et à terme dans les étapes finales, promeuvent la formation de métastases. Dans le cadre du mélanome nous avons mis en évidence des fonctions antagonistes de ces facteurs : il était connu que ZEB2 et SNAIL2 sont impliqués dans la délamination de la crête neurale et la détermination mélanocytaire mais de manière inattendue ZEB2 et SNAIL2 sont aussi exprimés dans les mélanocytes adultes normaux et leur expression est diminuée au cours de la progression maligne, au profit des facteurs ZEB1 et TWIST1. Ce changement de profil d'expression est un facteur de mauvais pronostic pour les patients.

Mes travaux ont permis de montrer que cet effet antagoniste passe par la régulation de MITF, le facteur clef du développement mélanocytaire. ZEB2 et SNAIL2 exercent une fonction oncosuppressive en activant l'expression de MITF et en promouvant la différenciation mélanocytaire. Au contraire, ZEB1 et TWIST1 jouent un rôle oncogénique en inhibant MITF et favorisent l'acquisition de propriétés de cellules souches. J'ai poursuivi l'étude de la fonction oncogénique de Twist1 *in vivo* dans un modèle murin de mélanome induit par l'oncogène BRAFV600. J'ai ainsi mis en évidence que l'expression conjointe de Twist1 et de BRAFV600 entraîne la formation de mélanomes agressifs, dédifférenciés et invasifs.

Enfin, j'ai analysé et caractérisé l'implication de ces facteurs dans le processus de résistance aux thérapies ciblées anti-BRAF dans les mélanomes BRAFV600E. J'ai démontré que ZEB1 peut contribuer à la résistance aux inhibiteurs de BRAF. En effet, l'expression de ZEB1 est augmentée dans des cellules de mélanomes résistantes (innée ou acquise), par rapport aux cellules sensibles. Tandis que l'expression de ZEB1 favorise l'émergence de cellules résistantes, cibler ZEB1 augmente la sensibilité des cellules à l'inhibiteur de BRAF et resensibilise les cellules résistantes, mettant en évidence l'intérêt de cette combinaison d'un point de vue thérapeutique.

Mots clés : EMT; mélanome ; ZEB1; oncogène ; plasticité; différenciation; thérapie ciblée; résistance.