



HAL
open science

Implication des enzymes de déubiquitination associés au protéasome dans la pathogénie du mélanome

Robin Didier

► **To cite this version:**

Robin Didier. Implication des enzymes de déubiquitination associés au protéasome dans la pathogénie du mélanome. Biologie cellulaire. COMUE Université Côte d'Azur (2015 - 2019), 2018. Français. NNT : 2018AZUR4219 . tel-02463836

HAL Id: tel-02463836

<https://theses.hal.science/tel-02463836>

Submitted on 2 Feb 2020

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.

THÈSE DE DOCTORAT

Implication des enzymes de
déubiquitination USP14 et PSMD14
dans la pathogénie du mélanome

Robin DIDIER

Centre Méditerranéen de Médecine Moléculaire (C3M), INSERM U1065

**Présentée en vue de l'obtention
du grade de docteur en** Sciences de la Vie
et de la Santé. Spécialité : Interactions
Moléculaires et Cellulaires
de l'Université Côte d'Azur
Dirigée par : Marcel DECKERT
Soutenue le : 7 décembre 2018

Devant le jury, composé de :
Dr Nathalie ANDRIEU-ABADIE, DR, CRCT
Dr Marcel DECKERT, DR, C3M
Dr Serge MANIÉ, DR, CRCL
Dr Stéphane ROCCHI, DR, C3M

Implication des enzymes de déubiquitination USP14 et PSMD14 dans la pathogénie du mélanome

Jury :

Président du jury

Dr Stéphane ROCCHI, DR INSERM, C3M

Rapporteurs

Dr Nathalie ANDRIEU-ABADIE, DR INSERM, CRCT

Dr Serge MANIÉ, DR CNRS, CRCL et UCBL

Directeur de thèse

Dr Marcel DECKERT, DR INSERM, C3M

Implication des enzymes de déubiquitination USP14 et PSMD14 dans la pathogénie du mélanome

Résumé

Le mélanome cutané est un cancer très agressif, responsable de 80% des décès liés aux cancers de la peau. Le mélanome métastatique (MM) est souvent résistant à la radiothérapie et aux chimiothérapies. Sa progression est majoritairement initiée par des mutations oncogéniques des gènes BRAF et NRAS activant la voie de prolifération MEK/ERK. Le MM est difficile à traiter malgré le succès de nouveaux traitements (thérapies ciblant l'oncogène BRAFV600E et immunothérapies), qui sont cependant limités à certains patients. De plus l'émergence de résistances ne permet pas d'obtenir une réponse durable, ce qui incite à rechercher de nouvelles cibles tumorales. Dans les cellules cancéreuses, l'accumulation d'altérations génétiques et le fort index prolifératif accroissent leur addiction aux mécanismes de contrôle de la qualité du protéome, comme le système ubiquitine-protéasome (UPS). L'UPS comprend une machinerie protéolytique (le protéasome 26S) et un réseau d'enzymes régulant l'ubiquitination de protéines cibles. La réaction enzymatique de retrait de l'ubiquitine est la déubiquitination, réalisés par de protéases spécifiques appelées DéUBiquitinases (DUBs). Malgré l'importance des DUBs dans de nombreuses situations pathologiques comme le cancer, leur implication dans la physiopathologie du mélanome est mal connue.

Afin d'identifier des DUBs dont l'activité est modulée dans le mélanome, nous avons utilisé une méthode d'étiquetage biochimique in vitro des DUBs actives ("DUB trap assay") qui nous a permis d'identifier USP14 (Ubiquitin Specific Protease 14) dont l'activité est augmentée dans nos lignées de mélanome par rapport aux mélanocytes. USP14 est associée physiquement au protéasome, avec un rôle important sur la protéostasie cellulaire en général. L'analyse de données bioinformatiques publiques confirme l'importance de USP14 dans le mélanome en associant l'expression du gène USP14 à la progression du mélanome et à un mauvais pronostic. Nous avons ensuite montré que cibler USP14 par des approches génétique (siRNA) ou pharmacologique (inhibiteurs de l'activité) a un effet anti-mélanome in vitro et in vivo, associé à une accumulation de protéines polyubiquitinées, générant un stress du réticulum endoplasmique, la dépoliarisation de la mitochondrie et une production de ROS, aboutissant à une mort indépendante des caspases. Cet effet cytotoxique est obtenu indépendamment du statut mutationnel des protéines oncogéniques (BRAFV600E, NRAS, NF1), des suppresseurs de tumeurs (TP53, PTEN), du niveau de résistance aux thérapies ciblées ou du statut phénotypique des mélanomes. Ces résultats indiquent que USP14 représente une nouvelle cible thérapeutique pertinente dans le mélanome.

Dans la continuité de ces travaux, j'ai cherché à identifier d'autres DUBs pouvant jouer un rôle dans la prolifération et la survie des cellules de mélanome en réalisant le criblage d'une banque de siRNA ciblant 90 DUBs sur une lignée de cellules de mélanome. Outre le fait de confirmer l'implication de USP14 dans la prolifération du mélanome, ce criblage génétique révèle que la déplétion de PSMD14 a un puissant effet antiprolifératif sur les cellules de mélanome. PSMD14/RPN11/POH1 est une métalloisopeptidase dépendant du Zn²⁺ et une des trois DUBs associées au protéasome avec UCHL5 et USP14. Nos travaux préliminaires montrent que le ciblage de PSMD14 se traduit par un arrêt de prolifération suivi d'une mort cellulaire associée à des dommages à l'ADN in vitro et in vivo.

Dans l'ensemble, mes travaux de thèse révèlent un rôle essentiel des DUBs associées au protéasome USP14 et PSMD14 dans la prolifération et la survie du mélanome, et ouvrent la piste à de nouvelles stratégies thérapeutiques ciblant les mécanismes aberrants de la protéostasie tumorale de ce cancer.

Mots-clés : Mélanome ; UPS : Protéostasie ; Déubiquitinase ; USP14 ; PSMD14

Involvement of the Deubiquitination Enzymes USP14 and PSMD14 in Melanoma Pathogenesis

Abstract

Cutaneous melanoma is a very aggressive cancer, causing 80% of deaths related to skin cancer. Metastatic melanoma (MM) is often resistant to radiotherapy and chemotherapy. Its progression is mainly initiated by oncogenic mutations of BRAF and NRAS genes activating the MEK/ERK proliferation pathway. MM is difficult to treat despite the success of new therapies (therapies targeting the oncogene BRAFV600E and immunotherapies), which are however limited to certain patients. Moreover, the emergence of resistances does not allow to obtain a durable response, which encourages the search for new tumor targets. In cancer cells, the accumulation of genetic alterations and the strong proliferative index increase their addiction to proteome quality control mechanisms, such as the ubiquitin-proteasome system (UPS). The UPS includes a proteolytic machinery (the 26S proteasome) and a network of enzymes that regulate the ubiquitination of target proteins. The enzymatic reaction of ubiquitin removal is the deubiquitination, performed by specific proteases called DeUBiquitinases (DUBs). Despite the importance of DUBs in many pathological situations such as cancer, their involvement in the pathophysiology of melanoma is poorly understood.

In order to identify DUBs whose activity is modulated in melanoma, we used an *in vitro* method of biochemical labeling of active DUBs (DUB trap assay) which allowed us to identify USP14 (Ubiquitin Specific Protease 14) whose activity is increased in our melanoma lines compared to normal melanocytes. USP14 is physically bound to the proteasome and play an important role on cellular proteostasis. Public bioinformatic data analysis confirms the importance of USP14 in melanoma by associating USP14 gene expression with melanoma progression and with poor prognosis. We then showed that targeting USP14 by genetic (siRNA) or pharmacological (activity inhibitory) approaches has an anti-melanoma effect *in vitro* and *in vivo*, associated with an accumulation of polyubiquitinated proteins, generating an endoplasmic reticulum stress, the mitochondria depolarization and a ROS production, resulting in caspase-independent cell death. This cytotoxic effect is obtained independently of the mutational status of oncogenic proteins (BRAFV600E, NRAS, NF1), of the tumor suppressors (TP53, PTEN), of the resistance to targeted therapies or of the phenotypic melanomas status. These results indicate that USP14 represents a new relevant therapeutic target in melanoma.

In the continuation of this work, I sought to identify other DUBs that may play a role in the proliferation and survival of melanoma cells by performing a screening of a siRNA library targeting 90 DUBs, on a melanoma cell line. melanoma. We confirmed the involvement of USP14 in melanoma proliferation, and moreover, this genetic screening reveals that depletion of

PSMD14 has a potent antiproliferative effect on melanoma cells. PSMD14 (RPN11/POH1) is a Zn²⁺-dependent metalloisopeptidase and, with UCHL5 and USP14, one of three proteasome-associated DUBs. Our preliminary work shows that targeting PSMD14 results in proliferation arrest followed by cell death associated with some DNA damage in vitro and in vivo. We can say that my thesis reveals an essential role of proteasome-associated DUBs USP14 and PSMD14 in the proliferation and survival of melanoma, and opens the door to new therapeutic strategies targeting the aberrant mechanisms of tumor proteostasis in this cancer.

Keywords: Melanoma; UPS; Proteostasis; Deubiquitinase; USP14; PSMD14

Remerciement

Pour commencer, je souhaite remercier les membres de mon jury, le Dr Nathalie ANDRIEU-ABADIE et le Dr Serge MANIÉ d'avoir accepté de juger mon travail de thèse.

Je souhaite également grandement remercier le Dr. Stephane ROCCHI, pour m'avoir fait l'honneur et le plaisir de présider ma thèse mais aussi pour tous les moments partagés et les échanges que nous avons pu avoir.

Ensuite, je voudrais plus que remercier mon directeur de thèse, le Dr. Marcel DECKERT. Tu m'as tendu la main quand j'étais dans le besoin et je ne l'oublierai pas. Tu m'as apporté beaucoup, tant sur la science que sur le caractère. Tu m'as poussé quand il le fallait et je t'en suis reconnaissant. Tu m'as offert de très belles opportunités de travail et je suis fier de ce que nous avons fait ensemble. Ces deux années ont été pour moi très enrichissante, dans lesquelles tu fus un exemple à suivre.

Je tiens par la même occasion à remercier Sophie TARTARE-DECKERT, qui m'a aussi permis de faire partie de cette belle équipe. Ton calme et ta gentillesse apporte beaucoup à cette bonne ambiance de travail.

Votre enthousiasme et vos connaissances à vous deux sont un souffle stimulant pour cette équipe, et c'est un regret pour moi de n'y avoir passé que deux ans.

Avant de me lancer dans une longue liste de remerciement, je veux vraiment prendre le temps de remercier l'homme sans qui j'aurais certainement arrêté avant, Mickael. Tu m'as tout appris ! Dès que je suis arrivé, tu m'as pris sous ton aile et tu m'as guidé. Tu m'as soutenu, motivé, stimulé, encouragé, aidé, valorisé (et là je manque de verbe)... Tout cela bien sûr, sur fond de ta passion, transmissible, pour la science. Mais outre, le scientifique, ton caractère, ton humour, ta joie de vivre m'ont donné envie de venir travailler. Les discussions musiques, cinéma, bouffe... ça va me manquer tout ça ! La plupart des meilleurs moments que j'ai connu au labo, c'était grâce à toi. Merci énormément ! (PS : je n'ai toujours pas goûté à tes fabuleux cocktails !)

Et vient le tour de l'équipe 11 !

Serena, oh Serena. La bellissima, le soleil milanais au travail, ma work-buddy, ma partenaire café, ma confidente, ma ficanasse, maitresse des qPCRs, fan des chats et ma meilleure élève d'insulte. Que dire sinon des bonnes choses ! Une des meilleures motivations pour aller au travail. Un de mes grands regrets fut de travailler dans l'autre salle de culture. La seule question que je me pose, c'est pourquoi tu n'es pas venu me parler plus tôt ! Vivo per lei da quando sai !

Ilona et Margaux, quand l'Estonie rencontre Breil sur Roya. Vous avez été collègues géniales. Toujours prêtes à rendre service, toujours là pour la déconne ou le travail, vous avez tiré, musicalement parlant, le meilleur de moi ! A quand le prochain Escape Game ?

Christopher, électron libre, tu m'as toujours épaté, dans tous les sens du terme. Ouvre-toi à la vie et n'écoutes pas trop Mickael.

Merci à Virginie, Christophe, Rania et Fred pour l'aide, les discussions, le soutien, et la vie de labo en général. Ce fut enrichissant de travailler en votre compagnie.

Mr Biber, qui aime bien châtie bien. Bon courage pour la reprise du flambeau. Tu m'as été d'un grand secours, parce qu'on sait que rien ne peut nous arriver de pire qu'à toi. Ça remonte le moral. Le bonjour à ta sœur. Et veille bien sur Serena !

Une petite pensée pour les anciens. Aude, l'Occitanie puissance mille. Je te dois tout mon savoir-faire sur les DUBs, et sur les chansons nulles ! Merci beaucoup.

Et tite pensée aux deux terreurs, ouragans de bonne humeur, Marina et Emie !

Je tiens aussi à remercier mes camarades de l'équipe 1. Vous avez été là à mes débuts et vous m'avez soutenu dans les moments difficiles et j'ai tout appris à vos côtés. Vous savez allier déconne et boulot. J'ai découvert dans cette équipe que l'image des uns ne vaut rien face aux supports des autres et que la détermination permet de s'élever face à l'adversité.

Spéciale dédicace à Justine et Jeff. L'union dans l'adversité. Merci pour m'avoir trimballé en ballade et d'avoir fait de ces 2 premières années un plaisir. Nos sessions sports furent plus anecdotiques que nos apéros. On retourne au ski quand vous voulez, hein Justine !

Emilie, partie bien trop vite. Que de belles choses nous avons partagé, moto, piscine, Irlande et j'en passe. Tu fus mon point d'accroche sur Nice, et un magnifique point de départ. On en a bavé mais on s'est toujours soutenu, et pour ça merci.

Karine, le pilier du labo, tu m'as tout enseigné et tu m'as bien aidé. Je te dois une grande partie de mon savoir technique. Maintenant, pour moi, Mandelieu c'est toi. Et je pensais vraiment sauver le peu d'anticorps en remettant le sachet au frais !

Céline, avec toi, c'était que de la bonne humeur contagieuse. Ce fut un vrai plaisir de travailler avec toi, jour après jour, et de lever les yeux aux ciels à cause de Tanesha.

Je voudrais tellement remercier chacun de manière personnalisée, mais faut bien sauver la planète. Merci à Najla, Tanesha, Marina, Nadia, Alexandra, Charlotte, Lara.

Merci à l'équipe 12, Laura, Guillaume, Gian Marco, Patricia, Nedra, Meri, Hélène, Elisa et au Pr Passeron.

Merci à tous mes doctorants, en particulier à Babinou, le BG du centre, ex-président des JEDNs, source d'inspiration pour la dévotion au travail. Manon, à l'accent chantant, tu m'as fait découvrir la passion du rugby (mais moins des rugbymen) et je t'ai fait découvrir le vrai cassoulet William Saurin. Echange de bons procédés. Lisa, perle de douceur à l'esprit aiguisé. Chicorée forever !

Merci à Fabien, mon ptit Corse, frère de bataille, Rana, Wafa, Ruxanda, Joseph, Elodie, Romain, à la bella figa Sofia et à Elsa...

Merci aux membres du TGIF, Nathan, Florian, Aurélie et Maeva en particulier ! Des très bons moments au centre et aussi à l'extérieur !

Merci aussi aux chercheurs qui m'ont accompagné (mon ptit Sto en particulier).

Un grand merci à mes parents pour tout leur soutien, invétéré (et financier !). Je vous dois tout et je ne vous remercierai jamais assez pour tout ce que vous avez fait et continuez à faire. Merci à Adrien et Aurianne pour me faire garder les pieds sur terre et d'avoir fait de moi ce que je suis aujourd'hui.

Merci aux drômois de Coupinade ! Je vous insulte mais je vous aime.

Et pour finir le plus grand des mercis pour ma chérie, Julia, qui a fait de ma vie sur Nice un vrai bonheur, qui me soutient, et qui fait semblant de rire à mes blagues. J'ai découvert un nouveau monde grâce à toi et j'ai hâte d'en découvrir d'autres à tes cotés. Docteur first.

Merci à tous !

Sommaire

Liste des abréviations	4
Liste des figures	7
Introduction.....	8
Partie 1 : La peau : transition du mélanocyte au mélanome	9
I. La peau : un organe stratifié.....	9
I.1. Les différentes couches de la peau	9
I.2. Les types cellulaires présents dans l'épiderme	11
II. La pigmentation induite par les mélanocytes permet la photoprotection UV.	13
II.1. Mélanocyte et mélanogénèse	13
II.2. Rôle des pigments dans la protection face au soleil	13
III. Du mélanocyte au mélanome cutané	16
III.1. Les cancers cutanés	16
III.2. Epidémiologie du mélanome.....	17
III.3. Facteurs de risque	19
III.3.a. Facteurs constitutionnels et génétiques	19
III.3.b. Facteurs acquis	20
III.4. La transformation du mélanocyte étapes par étapes	21
III.4.a. Le naevus bénin, premier pas vers la transformation.....	21
III.4.b. Le naevus atypique ou dysplasique, entre naevus commun et mélanome	22
III.4.c. Le mélanome en phase radiale de croissance : prolifération en surface.....	22
III.4.d. Le mélanome en phase verticale de croissance : l'invasion commence	22
III.4.e. La phase métastatique, victoire du mélanome	23
III.5. Les modifications géniques au cœur du mélanome.....	26
III.5.a. Suractivation de la voie des MAP-Kinases par les oncogènes BRAF et NRAS	26
III.5.b. Autres dérégulations affectant la mélanomagénèse	31
III.6. Le microenvironnement, facteur extrinsèque, favorise lui aussi la mélanomagénèse.	34
III.7. De la classification histologique du mélanome découle le pronostic	36
III.8. Prise en charge thérapeutique du mélanome.....	38
III.8.a. Emergence des thérapies ciblées, une vraie révolution.....	38
III.8.b. Mécanismes de résistance ou comment passer outre les traitements	39
III.8.c. Stimuler le système immunitaire : l'avènement des immunothérapies	41

Partie 2 : Le Système Ubiquitine-Protéasome.....	43
I. Principes généraux de l'ubiquitination.....	45
II. Ecriture du code ubiquitine par les ubiquitine ligases	45
II.1. L'activation par les E1.....	45
II.2. La liaison sur les E2.....	47
II.3. Le transfert final de l'ubiquitine sur le substrat par les E3.....	47
III. Le code ubiquitine	49
III.1. L'Ubiquitine, une molécule socle à de nombreux processus cellulaires.....	49
III.2. Ubiquitin – like proteins, ou comment élargir le domaine de l'ubiquitine	49
III.3. Le type de liaison à l'Ub, centre d'aiguillage pour une réponse cellulaire variée.....	51
III.3.a. La monoubiquitination	51
III.3.a. La multi-monoubiquitination	51
III.3.b. La polyubiquitination, principal signal pour la dégradation des protéines par le protéasome	53
III.3.c. La polyubiquitination et ses activités non-dégradatives.....	54
III.4. Mécanisme de reconnaissance des substrats	56
IV. La dégradation des protéines par le SUP	58
IV.1. Le protéasome, le complexe protéolytique du SUP.....	58
IV.1.a. Le cœur catalytique 20S	58
IV.1.a. La particule régulatrice 19S	60
IV.2. L'immunoprotéasome, un cousin de 26S à visée immunitaire	62
V. Autres mécanismes de régulation de l'homéostasie protéique	62
VI. La suppression du code ubiquitine par les déubiquitinases.....	64
VI.1. La grande famille des DUBs.....	64
VI.2. Spécificité enzymatique.....	66
VI.1. Les DUBs associées au protéasome	68
VI.1.a. USP14.....	68
VI.1.b. PSMD14	71
VI.1.c. UCHL5	71
VI.1.d. PSMD7	72
VII. Le Système Ubiquitine-Protéasome comme nouvelle cible thérapeutique du mélanome	74
VII.1. DUBs et cancer	74
VII.2. DUB et mélanome	74
VII.3. Les DUBs du protéasome et cancer.....	75

VII.3.a. USP14 et cancer.....	75
VII.3.b. PSMD14 et cancer	75
VII.3.c. UCHL5 et cancer	75
VII.4. Les DUBs associées au protéasome comme cibles thérapeutiques.....	77
Contexte	79
Résultats.....	80
Le ciblage de l'enzyme de déubiquitination USP14 associée au protéasome entrave la survie des cellules de mélanome et surmonte la résistance aux thérapies ciblant la voie des MAPK.	81
Implication de l'enzyme de déubiquitinase PSMD14 dans la pathologie du mélanome.....	102
Discussion / Conclusion.....	110
Discussion.....	111
Conclusion	116
Bibliographie.....	117
Annexes	118
Fin	118

Liste des abréviations

8TQ	8-thioquinoline	E3	Ubiquitin ligase E3
AA	Acides aminés	EGF	Epidermal Growth Factor
AC	Adenylate Cyclase	EMDR	Environmental-Mediated Drug Resistance
ADN	Acide DésoxyriboNucléique	ERAD	ER-Associated protein Degradation
AKT	RAC-alpha serine/threonine-protein kinase	ERK	Extracellular signal-Regulated Kinases
ALM	Acral Lentiginous Melanoma	FDA	Food and Drug Administration
AMPc	Adénosine Monophosphate Cyclique	GAP	GTPase-activating protein
miARN	Micro Acide RiboNucléique	GDP	Guanosine DiPhosphate
ARN	Acide RiboNucléique	GPCR	Récepteurs Couplés aux Protéines G
ARNm	Acide RiboNucléique Messenger	GTP	Guanosine TriPhosphate
ATP	Adénosine TriPhosphate	HECT	Homologous to the E6AP Carboxyl Terminus
BAP1	BRCA1 Associated Protein 1	HIF	Hypoxia Induced Factor
BMP	Bone Morphogenetic Protein	IBR	InBetweenRING
BRAFi	Inhibiteur de BRAF	IC50	Concentration Inhibitrice médiane
CAM-DR	Cell Adhesion Mediated Drug Resistance	IFN γ	Interféron γ
CAR-T	Chimeric Antigen Receptor T cell	IKK	inhibitor of κ B kinase
CCN	Cellules de la Crête Neurale	IL6	Interleukine 6
CDK	Kinases Cycle-Dépendantes	IRF-3	Interferon regulatory factor-3
CDK4	Cyclin-Dependent Kinase 4	JDE	Jonction Dermo-Épidermique
CDKN2A	Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor 2A	kDa	kiloDalton
CP	Coeur Protéolytique	LMM	Lentigo Maligna Melanoma
CSF-1	Colony-stimulating factor 1	MAPK	Mitogen Activated Protein Kinase
CSD	Chronically Sun Damaged	MCR1	Melanocortin 1 Receptor
CTLA-4	Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4	MDM2	Mouse Double Minute 2
DCT/TYRP2	DOPAchrome tautomérase/Tyrosinase-related protein 2	MEC	Matrice ExtraCellulaire
DUB	Déubiquitinase	MINDY	Motif interacting with Ub-containing novel DUB family
E1	Ubiquitin activating enzyme E1	MITF	Microphthalmia-Associated Transcription Factor
E2	Ubiquitin-conjugating enzyme E2	MJD	Machado-Joseph Disease protease
		MM	Mélanome Métastatique

MMP	MétalloProtéinase Matricielle	Rb	Retinoblastoma protein
MPT	Modification Post-Traductionnel	RBR	RING-InBetweenRing-RING
α -MSH	α -Melanocyte-Stimulating Hormone	RING	Really Interesting New Gene
MVB	MultiVesicular Bodies	RTK	Receptor Tyrosine Kinase
NF1	Neurofibromine 1	SEER	Surveillance, Epidemiology, and End Results Program
NF- κ B	Nuclear Factor-Kappa B	SFM-DR	Soluble Factors-Mediated Drug Resistance
NFRKB	Nuclear Factor Related to Kappa b Binding protein	SPARC	Secreted Protein Acidic and Rich in Cysteine
NK	Natural Killer	Smurf1	Smad Ubiquitylation Regulatory Factor 1
NM	Nodular Melanoma	SSM	Superficial Spreading Melanoma
OIS	Oncogene-Induced Senescence	SUMO	Small Ubiquitin-Related Modifier
OMS	Organisation Mondiale de la Santé	SUP	Système Ubiquitine Protéasome
OTU	Ovarian Tumour Protease	TAM	Tumor-Associated Macrophages
PCNA	Proliferating Cell Nuclear Antigen	TEM	Transition Épithélio-Mésenchymateuse
PD-1	Programmed cell death receptor 1	TGCA	The <i>Cancer</i> Genome Atlas
PD-L1	Programmed cell death ligand 1	TGF β	Transforming Growth Factor- β
PDGFR β	Platelet-Derived Growth Factor Receptor	TNF α	Tumour Necrosis Factor- α
PGPH	Peptidylglutamyl-Peptide Hydrolysing	mTOR	mammalian Target Of Rapamycin
PH	Plekstrin Homology	TP53	Tumor Protein 53
PI3K	Phosphoinositide-3 Kinase	TYR	Tyrosinase
PIP2	Phosphatidylinositol-4, 5-bisphosphate	TYRP	Tyrosinase-related protein
PIP3	Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate	Ub	Ubiquitine
PKA	Protein kinase A	UBA1	Ubiquitin-like modifier-activating enzyme 1
PolyUb	Polyubiquitine	UBA	Ub-associated domain
PR	Particules Régulatrice	UBD	ubiquitin binding domain
PRC	Phase Radiale de Croissance	UBL	UBiquitin-Like protein
PSMD14	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 14	UCH	ubiquitin Carboxyl-terminal hydrolase
PTEN	Homologue de la Phosphatase et de la TEnsine	UCHL5	Ubiquitin C-terminal hydrolase isozyme L5
PVC	Phase Verticale de Croissance	UIM	Ub-interacting motif
RAF	Rapidly Accelerated Fibrosarcoma		

UPR Unfolded Protein Response

USP Ubiquitin-specific protease

UV Ultraviolet

UVA/B Ultraviolet A/B

VEGF-A Vascular Endothelial Growth
Factor A

ZUFSP Zinc finger with UFM1-specific
peptidase domain protein

Liste des figures

<i>Figure 1 : Structure de la peau et composition de l'épiderme</i>	10
<i>Figure 2 : Voie de signalisation de la synthèse pigmentaire, la mélanomagenèse</i>	12
<i>Figure 3 : Incidence et mortalité du mélanome en France des années 1980 à 2010</i>	18
<i>Figure 4 : Etapes et processus mis en jeu lors du développement du mélanome</i>	25
<i>Figure 5 : Voie de signalisation des MAPK RAS/RAF/MEK/ERK</i>	27
<i>Figure 6 : Voie de signalisation PI3K/AKT</i>	32
<i>Figure 7 : Mécanismes de résistance intrinsèques et extrinsèques dans le mélanome</i>	40
<i>Figure 8 : Mécanisme moléculaire de l'ubiquitination et de la déubiquitination</i>	44
<i>Figure 9 : Représentation schématique de l'organisation hiérarchique du système d'ubiquitine.</i>	46
<i>Figure 10 : Différents mécanismes de transfert de l'ubiquitine aux substrats par les E3 ligases</i>	48
<i>Figure 11 : Représentation de la structure 3D d'une molécule d'ubiquitine ou des ubiquitine-like protein</i>	50
<i>Figure 12 : Principaux types de liaisons de l'ubiquitine</i>	52
<i>Figure 13 : Structure détaillée du protéasome</i>	59
<i>Figure 14 : Structure du cœur protéolytique de l'immunoprotéasome et des diverses particules régulatrices associées à l'immunoprotéasome</i>	61
<i>Figure 15 : Structure 3D des domaines catalytiques de chaque famille de déubiquitinases</i>	63
<i>Figure 16 : Multiplicité de fonction des déubiquitinases</i>	65
<i>Figure 17 : Réactions chimiques détaillées de la déubiquitination</i>	67
<i>Figure 18 : Diagramme représentatif de la grande famille des déubiquitinases et la structures des 3 DUBs actives associées au protéasome</i>	70
<i>Figure 19: Fréquence des altérations génétiques retrouvées chez USP14 dans divers cancers</i>	76
<i>Tableau 1 : Descriptif des différents phototypes cutanés</i>	15
<i>Tableau 2 : Classification des mélanomes selon la norme TNM et correspondance avec les stades du mélanome</i>	37
<i>Tableau 3 : Diversité fonctionnelle et structurelle des domaines de liaison à l'ubiquitine</i>	57
<i>Tableau 4 : Liste des DUBs impliquées dans divers cancers</i>	73

Introduction

Partie 1 : La peau : transition du mélanocyte au mélanome

I. La peau : un organe stratifié

I.1. *Les différentes couches de la peau*

La peau représente chez l'être humain le plus large organe avec une surface d'environ 2m². Etant donné ses origines développementales diverses, la peau est un organe complexe, dont le principal rôle est de délimiter une barrière physique entre l'organisme et l'environnement, le protégeant ainsi des diverses atteintes extérieures, tel que les chocs, les températures, les expositions aux rayonnements nocifs comme les ultraviolets, et les infections par exemple, tout en maintenant une homéostasie hydrique. Elle joue également un rôle sensoriel (le sens du toucher), un rôle de régulateur thermique ainsi qu'un rôle énergétique (organe de réserve).

Ces fonctions sont remplies par les trois couches de la peau, qui sont, de la plus profonde vers la surface, **l'hypoderme, le derme et l'épiderme** (Figure 1).

- **L'hypoderme** est un tissu conjonctif très vascularisé, composé majoritairement d'adipocytes, qui assurent le rôle de réserve énergétique et permettent une isolation thermique. Longtemps cantonnées à ce rôle, il semble désormais que ces adipocytes régulent aussi l'homéostasie de la peau, par leur fonction endocrine (adipokines), et qu'ils participent activement à la cicatrisation (Rivera-Gonzalez, Shook et al. 2014). Ce tissu très souple, d'origine mésoblastique, permet le glissement de la peau sur les tissus sous-jacents. C'est par ailleurs dans cette couche que se situent les glandes sudoripares.
- **Le derme** est un tissu conjonctif dense et vascularisé qui forme la couche la plus épaisse de la peau. Il se compose de deux régions : la région profonde accolée à l'hypoderme est dite derme réticulaire tandis que la région supérieure est appelée derme papillaire. Le derme est composé majoritairement par des fibroblastes, qui synthétisent les fibres d'élastine et de collagène de type I et III, incorporé dans un gel de protéoglycans, formant ainsi la matrice extracellulaire (MEC) (Prost-Squarcioni, Fraïtag et al. 2008). Cette matrice assure à ce tissu à la fois élasticité et solidité. Cette couche comprend également les annexes épidermiques telles que les glandes sébacées, sudoripares et les follicules pileux, mais aussi les terminaisons nerveuses et différents corpuscules, responsables du sens du toucher.
- **La jonction dermo-épidermique (JDE)** est la région acellulaire qui sépare le derme de l'épiderme. Cette région, communément appelée membrane basale, régule l'adhésion dermo-épidermique par le biais d'un réseau de fibres de collagène IV et de laminine, ce qui en fait une interface stabilisante, bien que dynamique, et une barrière de diffusion. Elle permet en effet le contrôle du trafic cellulaire et la diffusion de molécules bioactives. En outre, une variété de cytokines et de facteurs de croissance sont liés à la JDE, servant de réservoir pour leur libération contrôlée. Leur relargage joue un rôle crucial lors des processus de réparation de la peau après une blessure, tandis que dans des conditions pathologiques telles que l'inflammation, la destruction de cette

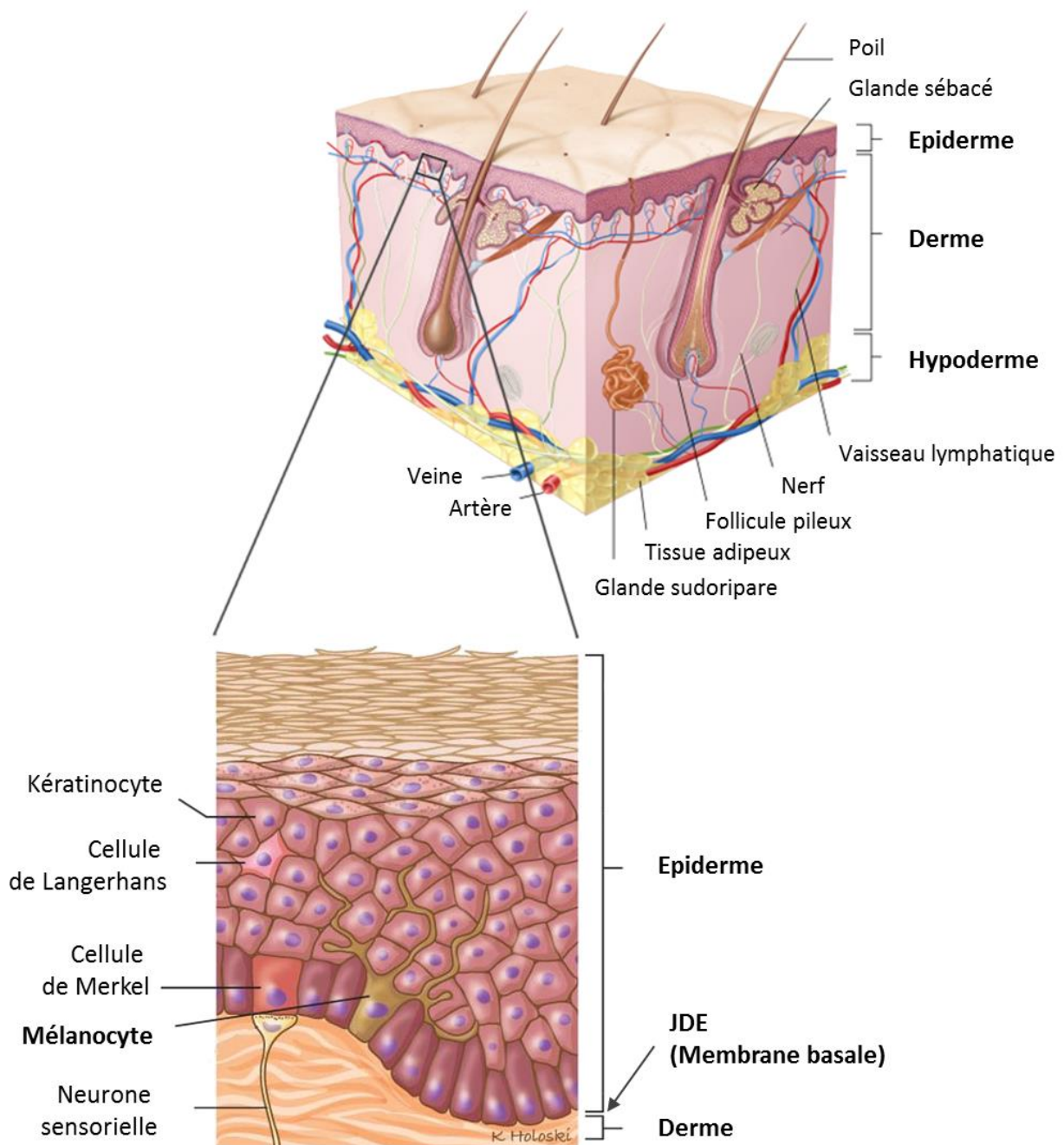


Figure 1 : Structure de la peau et composition de l'épiderme

La peau est composée de 3 couches dont l'épiderme est la plus externe. C'est dans cette couche que se situe les mélanocytes.

JDE : Jonction dermo-épidermique

membrane basal entraîne leur libération faisant également partie de la réaction d'activation des cellules stromales dans le cancer (Breitkreutz, Koxholt et al. 2013).

- **L'épiderme**, la couche la plus superficielle de la peau est un épithélium squameux stratifié kératinisé, en perpétuelle renouvellement. Il protège entre autres de la déshydratation, du stress mécanique, chimique et des pathogènes. En ce qui nous concerne, c'est son rôle photoprotecteur et les cellules associées à ce rôle qui vont nous intéresser. Ces fonctions sont possibles grâce à quatre types cellulaires différents.

1.2. Les types cellulaires présents dans l'épiderme

- **Les kératinocytes** (\approx 85% des cellules de l'épiderme) sont en constante renouvellement et maturation au sein de l'épiderme et forment *in fine* une couche imperméable, via la production de la kératine. Leur processus de maturation, appelé kératinisation, transforme les kératinocytes au cours de leur progression vers la surface, passant de la couche basale (couche germinative), à la couche épineuse, puis à la couche granuleuse et enfin à la couche cornée (desquamante). Au cours de ce processus, les kératinocytes vont perdre leur fonction mitotique et changer de morphologie jusqu'à former l'enveloppe cornée.
- **Les cellules de Langherans** (2 à 5% des cellules de l'épiderme) sont des cellules dendritiques présentatrices d'antigène pouvant orienter la réponse immunitaire ou la tolérance allergène. Ces cellules, se développant à partir des cellules souches hématopoïétiques de la moelle osseuse, constituent la première barrière immunitaire pour les agents pathogènes envahissants. Elles vont phagocyter les pathogènes, capter leurs antigènes et les présenter soit aux lymphocytes T mémoire résidant dans la peau, soit migrer jusqu'aux ganglions lymphatiques régionaux où elles les présenteront aux lymphocytes T naïfs. La réponse qui s'en suit sera une balance entre une réponse de type inflammatoire et une tolérance active. (Katz, Tamaki et al. 1979, Lappin, Kimber et al. 1996, Schmitt 2005, Seneschal, Clark et al. 2012, Hieronymus, Zenke et al. 2015)
- **Les cellules de Merkel** (2 à 5% des cellules de l'épiderme) se situent près des bulges des follicules pileux, et permettent la sensation tactile fine. Ces cellules sont en général en contact avec les terminaisons nerveuse et y joue leur rôle de mécanorécepteur, d'où leur abondance vers les zones sensibles tels que les doigts, les lèvres ou les pieds par exemple. (Boulais and Misery 2007)
- **Les mélanocytes** (2 à 5% des cellules de l'épiderme), situés vers la JDE, sont responsables de la pigmentation. Les mélanocytes dérivent des mélanoblastes, eux-mêmes originaire des cellules embryonnaires pluripotentes transitoires hautement migratrices, les cellules de la crête neurale (CCN). Seuls les CCNs migrant selon l'axe dorso-latéral vont donner des mélanoblastes, qui suite au franchissement de la lame basale, vont se différencier en cellules pigmentaires (Le Douarin and Kalcheim 1999). Elles synthétisent les pigments mélaniques responsables de la couleur de la peau, des yeux et des poils, qui permettent la photoprotection contre les ultraviolets (UV) solaires.

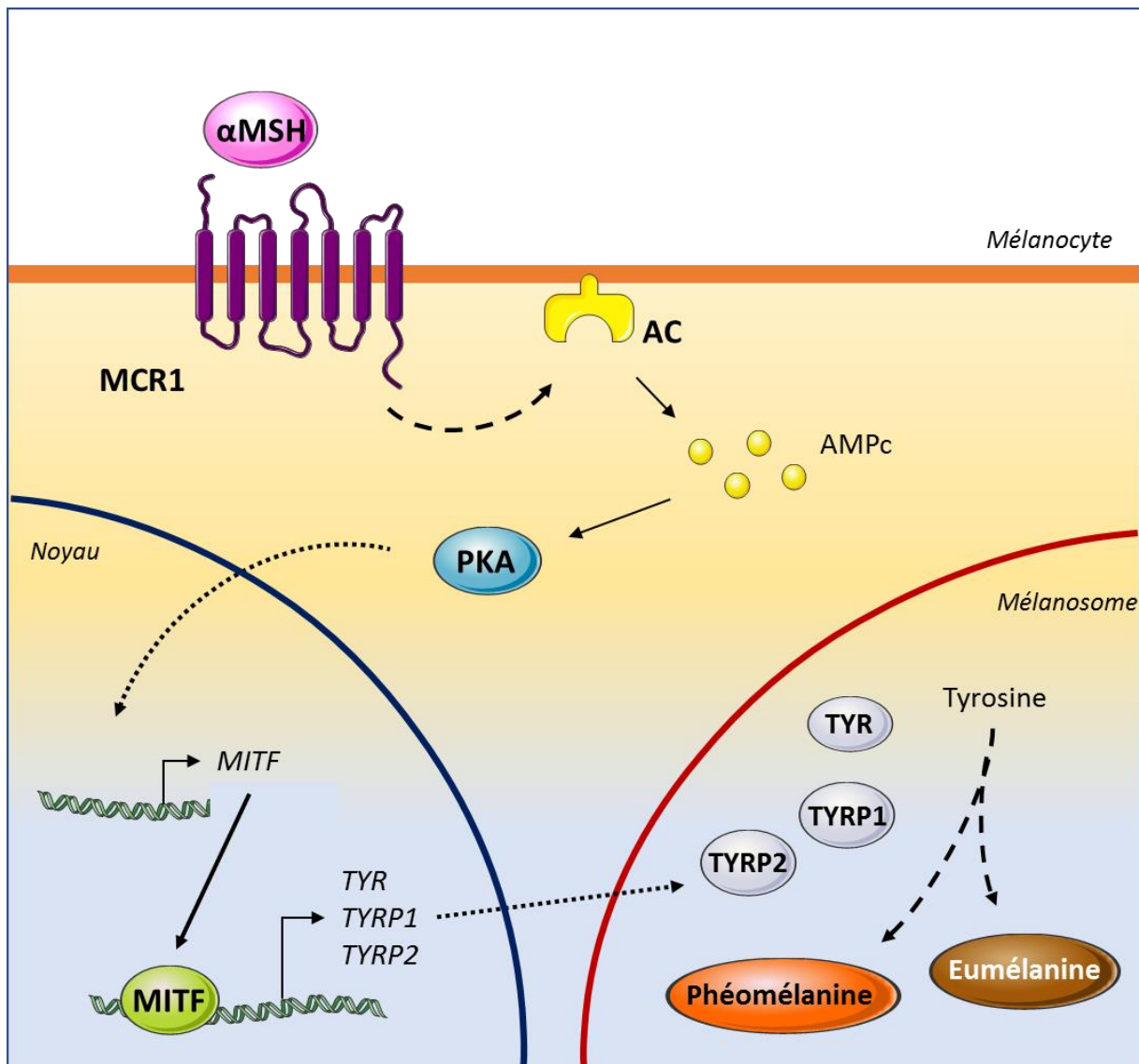


Figure 2 : Voie de signalisation de la synthèse pigmentaire, la mélanomagénèse

À la suite de la fixation de l' α MSH à MCR1, une cascade de signaux va mener à l'activation de MITF, qui va permettre l'expression des gènes de la mélanogénèse. Les enzymes ainsi synthétisées vont transloquer dans les mélanosomes et transformer la tyrosine en pigment : l'eumélanine et la phéomélanine.

α MSH, α -melanocyte-stimulating hormone; MCR1, Melanocortin 1 Receptor; AC, Adenylate cyclase; AMPc, Adénosine monophosphate cyclique; PKA, Protein kinase A; MITF, Microphthalmia-Associated Transcription Factor; TYR, Tyrosinase; TYRP, Tyrosinase-related protein.

II. La pigmentation induite par les mélanocytes permet la photoprotection UV.

II.1. *Mélanocyte et mélanogénèse*

Du fait de leur lignage embryonnaire, les mélanocytes sont retrouvés au niveau l'oreille interne (cochlée, strie vasculaire) où ils joueraient un rôle dans l'audition, au niveau de la pie-mère où ils joueraient un rôle neuroendocrine (Plonka, Passeron et al. 2009). Ce n'est cependant qu'au niveau du poil (follicule et bulge) et de la choroïde de l'œil qu'ils assurent leur rôle pigmentaire, par la production de pigments photoprotecteurs, la mélanine. La pigmentation est un processus qui commence au sein même des mélanocytes, dans des organites intracytoplasmiques appelés mélanosomes où a lieu la synthèse des pigments mélaniques, c'est ce que l'on appelle la mélanogénèse (Figure 2).

A l'intérieur des mélanosomes, trois enzymes-clé sont responsables de la pigmentation : la tyrosinase (TYR), la tyrosinase-related protein 1 (TYRP1), et la DOPAchrome tautomérase/Tyrosinase-related protein 2 (DCT/TYRP2) vont permettre la transformation de la tyrosine en deux pigments mélaniques : l'eumélanine et la phéomélanine. Plus précisément, sous la catalyse de la tyrosinase, la tyrosine est convertie en DOPAquinone. Le processus de pigmentation se scinde ici en deux voies : l'eumélanogénèse et le phéomélanomagénèse. La première implique les enzymes DCT/TYRP2 puis TYRP1 pour donner de l'eumélanine tandis que la deuxième va incorporer des composés soufrés afin de synthétiser la phéomélanine (Kobayashi, Urabe et al. 1994, Hearing 2011). Ces deux pigments différents ainsi par leur couleur, alors que l'eumélanine présente une couleur brune-noire, la phéomélanine elle est rouge-jaune. C'est uniquement le ratio entre ces deux pigments qui va déterminer la couleur de la peau (phototype cutané).

Cette synthèse pigmentaire va être stimulée par l'exposition au soleil, et plus précisément aux UV. Cette réponse est possible grâce à un dialogue entre mélanocytes et kératinocytes. Les dommages à l'ADN induits par le rayonnement UV sur les kératinocytes vont induire, via un mécanisme p53-dépendant, une sécrétion de la « α -melanocyte-stimulating hormone » (α MSH). La fixation de cette hormone au récepteur de la mélanocortine 1 (MC1R), exprimée à la surface des mélanocytes, va permettre l'expression du facteur de transcription Microphthalmia-Associated Transcription Factor (MITF), « master regulator » de la mélanogénèse (Shain and Bastian 2016). De plus, il est clairement établi que les kératinocytes ne sont pas seulement impliqués dans la stimulation de la synthèse de mélanine mais contrôlent aussi la nature du pigment produit (Duval, Smit et al. 2002).

II.2. *Rôle des pigments dans la protection face au soleil*

Les mélanosomes sont ensuite transportés le long des prolongements cytoplasmiques mélanocytaires et transférés aux kératinocytes environnant (avec un ratio de 1 mélanocyte pour environ 30 kératinocytes) qui sont responsables de la coloration de la peau et des poils (Miyamura, Coelho et al. 2007) (Cichorek, Wachulska et al. 2013). Ce mouvement intracellulaire implique principalement les microtubules et les filaments d'actine. Le réseau central de microtubules présents dans les dendrites des mélanocytes sert au transport long distance des mélanosomes tandis que le réseau périphérique d'actine sert au transport de proximité et au transfert des mélanosomes. Ces organites sont ensuite dirigés, à l'intérieur des kératinocytes, vers une position périnucléaire pour assurer un rôle photoprotecteur pour l'ADN nucléaire.

En effet, en plus d'être le déterminant de la couleur de la peau, les mélanines présentes différentes propriétés physico-chimiques impliquées dans la protection de notre organisme contre les dommages induits par les UV solaires. Alors que l'eumélanine est généralement reconnue comme un polymère photostable et photoprotecteur, la phéomélanine est au contraire photolabile et considéré comme un photosensibilisateur. Le ratio entre ces deux pigments va donc impacter la qualité de la photoprotection. Ces ratios vont définir une couleur de peau, appelé **phototype cutané** (allant de 1 à 6) qui caractérise la sensibilité de la peau aux rayonnements UV et donc leur réaction au soleil (Tableau 1) (Fitzpatrick 1988, Astner and Anderson 2004). En effet, une personne de couleur de peau mat/foncé possède le même nombre de mélanocyte qu'une personne à peau claire, mais va produire de l'eumélanine en plus grande quantité et celle-ci va être mieux réparti au sein des kératinocytes (Iozumi, Hoganson et al. 1993, Slominski, Tobin et al. 2004). Plus le rapport eumélanine/phéomélanine est élevé, meilleur est la photoprotection. Les personnes à peau claire qui présentent un ratio faible ont un risque élevé de développer des cancers de la peau photo-induits (Vincensi, d'Ischia et al. 1998). D'autre part, il semblerait que des mutations du gène *Tyr*, pouvant conduire aux albinismes oculo-cutanés, par des défauts ou une absence complète de pigmentation de la peau, des poils, des cheveux et des yeux, puissent augmenter les risques de développer un cancer cutané (Saran, Spinola et al. 2004, Passeron, Mantoux et al. 2005).







Phototype	Peau	Cheveux	Taches de rousseur	Réaction au soleil	Bronzage	
I		Laitéuse	Roux	Nombreuses	Coups de soleil systématiques	Pas de bronzage
II		Très claire	Blonds	Fréquentes	Coups de soleil très fréquents	Hâle léger
III		Claire	Châtains	Rares	Coups de soleil fréquents	Hâle moyen
IV		Mate	Bruns	Aucune	Coups de soleil peu fréquents	Bronzage foncé
V		Très foncée	Foncés	Aucune	Coups de soleil rares	Bronzage très foncé
VI		Noire	Noirs	Aucune	Coups de soleil très rares	Bronzage noir

Tableau 1 : Descriptif des différents phototypes cutanés

III. Du mélanocyte au mélanome cutané

En temps normal, les effets des UV sont bien régulés et l'homéostasie de la peau et des mélanocytes est sous contrôle. Il arrive cependant que, suite à une exposition prolongée au soleil ou d'autres facteurs de risques, cette homéostasie soit dérégulée et que les cellules de la peau mutent et dégénèrent, formant ainsi divers cancers cutanés dont le mélanome.

III.1. Les cancers cutanés

La peau est un organe hétérogène, composés de différents types cellulaires pouvant tous subir une transformation cancéreuse. Ces cancers peuvent être classés en 2 catégories : non mélanocytaire et mélanocytaire. Les cancers cutanés les plus fréquents sont les cancers non mélanocytaires ou carcinomes.

- **Les carcinomes basocellulaires**, comme l'indique leur nom, proviennent des cellules de la lame basale de l'épiderme (couche profonde germinative). C'est le moins grave des cancers de la peau, mais nonobstant son potentiel métastatique quasi-nul, une exérèse chirurgicale est nécessaire. Il représente environ 75% des cancers cutanés et environ 15% des cancers en France (tout type confondus).
- **Les carcinomes épidermoïdes ou spino-cellulaires** à pour origines les kératinocytes présents dans la couche épineuse de l'épiderme. Bien que moins fréquent (20% des cancers de la peau) et à croissance lente, il nécessite une attention particulière car il peut développer un potentiel métastatique.
- Il existe enfin quelques cancers non mélanocytaires très rares, représentant moins d'1% des cancers cutanés, tel que **le carcinome de merkel, les carcinomes annexiels** (dérivant des annexes de la peau, c'est-à-dire les glandes sébacées, sudoripares et les follicules pileux).

Le seul cancer de la peau de type mélanocytaire est le mélanome.

Le mélanome est le cancer de la peau le plus agressif, il est responsable de 5% des cancers de la peau mais entraîne 80% des décès des cancers cutanés. Dans seulement 20% des cas, le mélanome apparaît à partir d'un naevus mais le plus souvent, il apparaît *de novo*. Le mélanome évolue ensuite rapidement et se propage dans l'organisme via le système lymphatique et/ou sanguin, colonise d'abord les ganglions lymphatiques et métastases ensuite essentiellement dans les poumons, dans le foie et le système nerveux centrale.

On distingue plusieurs types de mélanomes, avec du plus fréquent au moins fréquent, **le mélanome à extension superficielle, le mélanome nodulaire, le mélanome de Dubreuilh ou lentigo maligna et le mélanome acro-lentigineux**.

Le système de classification traditionnelle pour le mélanome a été basée sur les caractéristiques cliniques et pathologiques (Elder, Jucovy et al. 1980, Scolyer, Long et al. 2011). Le type d'exposition au UV entre aussi en compte, qu'il soit dû à une forte exposition chronique au soleil (« chronically sun damaged » (CSD)) ou non (non-CSD).

- **Le mélanome extensif superficiel (SSM**, « Superficial Spreading Melanoma ») est le plus fréquent (~70%). Comme son nom l'indique, ce mélanome se développe le long de la couche supérieure de la peau, le derme, mais peut potentiellement pénétrer plus profondément. Le SSM se présente habituellement comme une lésion irrégulière plane à croissance lente. Il appartient à la famille des mélanomes « non-CSD », car il survient suites à des expositions intermittentes et intenses ainsi que suites à des coups de soleil survenus dans le passé, en particulier au cours de l'enfance. Ce mélanome peut être trouvé presque n'importe où sur le corps, mais il est plus susceptible de se produire sur le tronc, les jambes chez les femmes, et le haut du dos chez les hommes.
- **Le mélanome nodulaire (NM** pour « nodular melanoma », ~15%) est celui qui croît le plus rapidement. Il a un phénotype invasif marqué ce qui en fait le mélanome le plus agressif. Il touche plus les hommes que les femmes, et se développe sur tout le corps, y compris les régions non exposées (Ibrahim and Haluska 2009).
- **Le mélanome de Dubreuilh ou lentigo maligna (LMM** pour « lentigo maligna melanoma », ~10%) est similaire au SSM, car il reste en superficie de la peau et se développe lentement, ce qui en fait le moins agressif. Ce type de mélanome *in situ* (de type CSD) se rencontre le plus souvent chez les personnes âgées, survenant sur la peau du visage, des oreilles, des bras et du tronc supérieur chroniquement exposée au soleil.
- **Le mélanome acro-lentigineux (ALM** pour « acral lentiginous melanoma », ~5%) est un mélanome de type « non-CSD » car il est localisé aux extrémités non exposées au soleil telles que la paume des mains ou des pieds et sous les ongles. Il touche de manière prépondérante les personnes à phototype élevé (peaux brunes à noires).
- Là encore, il existe enfin quelques cancers mélanocytaires très rares, représentant moins d'1% des cancers cutanées, tel que le **mélanome uvéal** et le **mélanome des muqueuses**.

III.2. *Epidémiologie du mélanome*

L'incidence mondiale du mélanome cutané a augmenté chaque année plus rapidement que tout autre type de cancer, avec un quasiment un doublement observé tous les 10 ans (Ali, Yousaf et al. 2013). Le programme de surveillance, d'épidémiologie et des résultats finaux (ou SEER) nous révèle que l'incidence du mélanome aux Etats Unis en 1975 était de 8 cas pour 100 000 contre 26 cas sur 100 000 en 2015.

En 2012, le programme Globocan de l'Organisation Mondiale de la Santé, a recensé 232 000 nouveaux cas de mélanome et 55 000 décès dans le monde, plaçant le mélanome au 22e rang des cancers les plus répandus dans le monde.

En France, l'Institut National pour le Cancer a estimé le nombre de mélanomes pour 2017 à 15 404 nouveaux cas, avec là encore, **une incidence en augmentation** (Figure 3). Ce cancer représente donc 3,7 % de l'ensemble des cancers incidents. Il est intéressant de noter que l'incidence est plus marquée chez la population masculine (32 cas contre 23 pour la gente féminine) ainsi que dans la population caucasienne (32 cas / 100 000). Le mélanome, comme la plupart des cancers, a son incidence qui augmente avec l'âge, passant d'environ 10 cas pour 100 000 pour les moins de 30 ans à environ 380 cas pour les plus de 60 ans. L'âge médian au diagnostic est de 64 ans chez l'homme et 61 ans chez la femme.

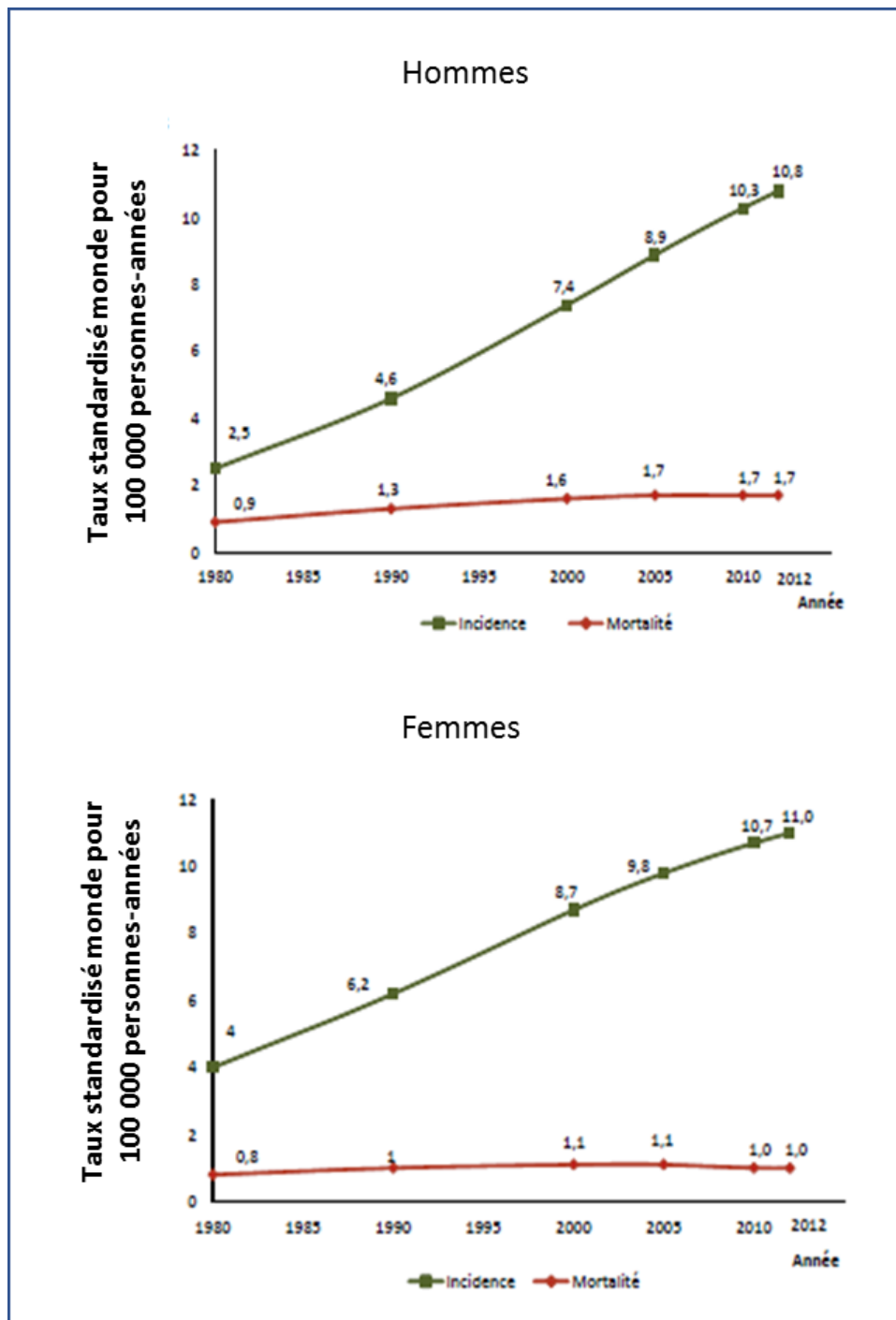


Figure 3 : Incidence et mortalité du mélanome en France des années 1980 à 2010

D'après : Incidence et mortalité en 2012 par classe d'âge et sexe pour les tumeurs solides- HCL/Francim/Invs/INCa/lesdonnees.e-cancer.fr/2016

L'évolution de la mortalité suivait celle de l'incidence, mais l'on observe depuis 2005 **une stabilisation du taux de mortalité** chez l'homme (+ 0,1 %) et **une légère diminution** chez la femme (- 1,8 % par an en moyenne). La couleur de peau détermine aussi la mortalité des suites d'un mélanome. En effet, même si la population caucasienne est plus sujette au mélanome, leur survie à 5 ans avoisine les 91% contre 60% pour les personnes à peau foncée.

Du fait de l'estimation de 1783 décès pour l'année 2017, le mélanome représente donc 1,2 % des décès par cancer, tous sexes confondus.

III.3. Facteurs de risque

Le mélanome est une maladie multifactorielle. Il résulte de différents facteurs de risques, qui associés entre eux, peuvent augmenter les chances de développer un mélanome. On distingue les facteurs de risque externes, liés à l'environnement et aux modes et conditions de vie, et les facteurs de risque internes, c'est-à-dire constitutifs des individus.

III.3.a. Facteurs constitutionnels et génétiques

Le mélanome étant une transformation anormale des mélanocytes, il est normal de penser que le naevus peut être un facteur de risque. **Le nombre de naevi ou grains de beauté** (cf.III.4.a) constitue en effet un facteur de risque. Ainsi, on estime que la présence d'une cinquantaine de naevi ou plus, ou la présence d'au moins cinq naevi atypiques de grande taille (supérieur à 5mm de diamètre, à bord irréguliers et de multiples couleurs) multiplient le risque d'un facteur 5. (Holly, Kelly et al. 1987, Gandini, Sera et al. 2005). La présence de **naevi congénitaux** de grande taille semble être également un facteur de risque du mélanome (Krengel, Hauschild et al. 2006).

Le phototype cutané prédit la réaction au soleil (Fitzpatrick 1988, Astner and Anderson 2004). Ainsi, les personnes à phototypes faibles sont plus sujettes aux érythèmes actiniques (coups de soleil). Ces personnes sont plus sensibles aux effets délétères des rayonnements UV, et ont un risque beaucoup plus important de développer un mélanome. Néanmoins, les personnes de phototypes élevés peuvent aussi développer d'autres types de mélanome, non directement liés aux UV, tels que le mélanome acro-lentigineux qui siège sur la paume des mains, la plante des pieds ou sous les ongles.

Enfin, **les prédispositions génétiques** sont également un facteur de risque. Environ 10% des mélanomes surviennent dans un contexte familial, défini comme au moins 2 mélanomes chez deux ou plusieurs membres d'une même famille. Certains gènes transmis de manière héréditaire, qui confère un risque élevé, dit de prédisposition à forte pénétrance, ont été identifiés à ce jour : **CDKN2A** (Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor 2A), **CDK4** (Cyclin-Dependent Kinase 4), **BAP1** (BRCA1 Associated Protein 1) sont les plus cités (Read, Wadt et al. 2016). D'autres gènes présentent un risque à pénétrance moyenne tel que le gène **MC1R** (Melanocortin 1 Receptor), **MITF** (Microphthalmia-Associated Transcription Factor) (Garraway, Widlund et al. 2005) ou **TP53** (Tumor protein 53) (Box, Duffy et al. 2001, Marzuka-Alcala, Gabree et al. 2014, Benfodda, Gazal et al. 2018). Les gènes MITF, amplifié dans environ 15% des mélanomes, et MC1R, quant à eux, comme dit dans la section [II.1](#), sont des gènes liés à la mélanogénèse.

Il existe cependant des facteurs génétiques hérités qui réduisent le risque de développer un mélanome. Ces prédispositions génétiques ont toutes un phénotype direct sur la peau. **Le vitiligo** par exemple, aussi appelé leucodermie, caractérisée par la destruction des mélanocytes et donc l'apparition de zones dépigmentées blanches sur la peau et en particulier les pieds, les mains, le

visage, les lèvres. Diverses études ont montré que les personnes atteintes de vitiligo présentaient 3 fois moins de risque de développer un mélanome (Ban, Labbouz et al. 2018).

III.3.b. Facteurs acquis

L'exposition aux rayonnements ultraviolets est un facteur environnemental majeur dans le développement des cancers de la peau. On estime que deux tiers des mélanomes sont dus à une exposition excessive au soleil, cette proportion étant plus élevée encore chez les personnes à la peau claire (Gandini, Sera et al. 2005, Leiter and Garbe 2008).

Des études épidémiologiques ont lié **l'apparition du mélanome aux érythèmes actiniques** (coups de soleil), durant la petite enfance mais aussi au cours de l'âge adulte (Dennis, Vanbeek et al. 2008).

La pénétration des UV dans la peau est liée à leur longueur d'onde, les UVA pénétrant donc plus profondément dans la peau, jusqu'à atteindre le derme (OMS, série régionale européenne n°25) tandis que les UVB s'arrêtent au niveau de l'épiderme. Ces absorptions s'accompagnent des lésions cellulaires importantes. L'énergie transmise par les UVB va majoritairement entraîner la formation d'une liaison covalente entre cytosine et thymine, entraînant un blocage de la progression des ADN polymérase δ/ϵ et de l'ARN polymérase II. Les UVA, moins énergétiques que les UVB, vont plutôt exciter des molécules photosensibles et être à l'origine de la formation d'espèces réactives de l'oxygène (Ridley, Whiteside et al. 2009). Malgré cela, les données suggèrent que les rayons UVA comme les UVB sont impliqués dans la progression de la maladie (De Fabo, Noonan et al. 2004, Mitchell and Fernandez 2012, Noonan, Zaidi et al. 2012). Kamenisch et al. ont par exemple rapporté un nouveau mécanisme pour la progression du mélanome induite par les UV. Les auteurs ont démontré que les UVA induisent l'effet Warburg et des changements dans le métabolisme des cellules de mélanome. Ils ont montré que les irradiation aux UVA augmentait l'absorption du glucose et la production de lactate, qui favorise l'invasion des cellules de mélanome à travers la régulation positive de métalloprotéinases matricielles (Kamenisch, Baban et al. 2016).

Le rôle prépondérant du rayonnement UV dans l'augmentation du risque de mélanome est aussi confirmé par la localisation des mélanomes, qui se retrouvent sur les zones principalement photo-exposées comme le tronc et les membres (Whiteman, Stickley et al. 2006).

Enfin, le spectre de mutation retrouvé au sein du mélanome rappelle celui précédemment associé à l'exposition aux UV (Pleasant, Cheetham et al. 2010).

Les antécédents personnels du mélanome sont des critères majeurs du risque de développer un mélanome. Le développement antérieur d'un mélanome est un prédicteur d'un risque important de récurrence (risque accru d'environ 10 fois) et, dans une moindre mesure, de carcinomes basocellulaires ou de carcinomes épidermoïdes (van der Leest, Flohil et al. 2015). Cela pourrait s'expliquer par le fait qu'une tumeur primaire de mélanome peut induire la formation à distance de niche pré-métastatique favorable au développement tumoral. **Des facteurs solubles ou insolubles sécrétés par la tumeur** dans la circulation induisent à distance un remodelage cellulaire du microenvironnement de la niche. Les facteurs solubles notables sont le « vascular endothelial growth factor A » (**VEGF-A**), le « transforming growth factor- β » (**TGF β**) et le « tumor necrosis factor- α » (**TNF α**) qui vont induire l'expression des protéines inflammatoires, comme S100A8 et S100A9 de manière organes-dépendantes et ainsi influencer le recrutement de différents types de cellules (Hiratsuka, Watanabe et al. 2006).

Les facteurs insolubles tels que les exosomes ou vésicules extracellulaires au sens large ont été décrits pour transporter des protéines pro-tumoral, des protéines du cytosquelette ainsi que des

ARNm, de l'ADN et des miARN qui contribuent probablement à la formation de niche pré-métastatique via le remodelage de la matrice ou l'éducation des cellules cibles (Peinado, Lavotshkin et al. 2011, Peinado, Aleckovic et al. 2012).

Ainsi, le cumul de plusieurs facteurs à risque, qu'ils soient constitutifs ou acquis, va augmenter les chances de voir apparaître un mélanome.

III.4. *La transformation du mélanocyte étapes par étapes*

Comme dit précédemment, le mélanome est un cancer qui provient de la transformation maligne d'un mélanocyte. Au cours de cette transformation, appelé mélanomagénèse, le mélanocyte malin va accumuler une série de mutations génétiques, nécessaire à l'acquisition des facultés tumorigéniques, tels que la prolifération ou l'évasion face au système immunitaire (Hanahan and Weinberg 2011).

Qu'il provienne de la dégénérescence de **nævi préexistants** ou qu'ils apparaissent **de novo**, l'évolution du mélanome peut être segmenté en plusieurs étapes, comme décrit dans **le modèle de Clark** (Clark, Elder et al. 1984, Gandini, Sera et al. 2005).

Selon ce modèle, le mélanocyte peut passer par cinq phases (Figure 4). Elles ne sont pas toutes nécessaires à la transformation d'un mélanocyte en mélanome, et leur profil « CSD » ou « non-CDS » va déterminer la voie qu'empruntera le mélanome (Shain and Bastian 2016).

III.4.a. *Le naevus bénin, premier pas vers la transformation*

Les mélanocytes, comme précédemment mentionnées, sont dispersés au niveau de la JDE. Ils prolifèrent peu et ils utilisent principalement leur machinerie cellulaire pour la synthèse pigmentaire. Cependant, certains mélanocytes peuvent échapper à ce contrôle via l'acquisition de mutations qui vont entraîner leur prolifération locale et donner naissance à un regroupement pigmentaire bénins appelé naevus (ou grain de beauté dans le langage courant). La mutation qui va être retrouvé au sein de ces nævi affecte la protéine BRAF, mutant la valine 600 en en acide glutamique : **BRAF^{V600E}** (Shain and Bastian 2016). Cette mutation va avoir pour conséquence l'activation d'une des voies des MAP-Kinases (« Mitogen Activated Protein Kinase »), impliquée dans la survie et la prolifération cellulaire. Une protéine en amont de BRAF, NRAS, est aussi retrouvée mutée dans les naevi, mais ce de manière moins fréquente (15% sont muté **NRAS^{Q61K}** contre 52 pour **BRAF^{V600E}**) (Tschandl, Berghoff et al. 2013). Je revendrai sur les mécanismes et facteurs moléculaires impliqués dans le mélanome dans la [Partie 1-III-5](#). Ces nævi, reconnaissables par leur aspect de petites taches brunes, sont retrouvés sur tout le corps, et principalement sur les zones exposées au soleil (Zalaudek, Schmid et al. 2011).

Fort heureusement, les nævi sont bénins car les néomélanocytes regroupés subissent une sortie permanente du cycle cellulaire, qui les empêche de progresser en cancer, et entrent dans un programme de **sénescence**, programme d'arrêt de la prolifération cellulaire (Clark, Elder et al. 1984). Cette sénescence, activé par un oncogène, déclenche l'induction de suppresseurs de tumeurs, et en particulier le gène **CDKN2A** (Michaloglou, Vredeveld et al. 2005, Gray-Schopfer, Cheong et al. 2006). Cet arrêt de prolifération est très efficace, et permet ainsi un contrôle durable des mélanocytes. C'est la perte de cette sénescence, induite par l'apparition de mutations secondaires, qui va initier la transformation des mélanocytes. Je vous rappelle cependant que seulement 25% des mélanomes

sont issus de naevus, même s'il a été montré que près de 90% des mélanomes extensifs superficiels avaient pour origine les naevi (Shitara, Nascimento et al. 2014).

III.4.b. Le naevus atypique ou dysplasique, entre naevus commun et mélanome

Les grains de beauté atypiques (aussi appelés naevi dysplasiques) présentent certaines caractéristiques qui diffèrent d'un naevus commun. Ce naevus précancéreux est en général plus grand que la forme commune (avec un diamètre entre 5 et 1 mm). Il se rapproche de l'aspect des mélanomes primaires avec une forme le plus souvent asymétrique, des bords irréguliers et une couleur non homogène.

Des analyses génétiques récentes ont montré que les naevi catégorisés sans équivoque comme bénins n'étaient généralement porteurs que d'une seule mutation, BRAF^{V600E}, alors que les lésions intermédiaires, comme les naevi dysplasiques, ont plusieurs mutations différentes, incluant celles activant la voie MAPK (BRAF^{nonV600E} et NRAS, décrites dans la [partie III.5.a](#)) et, en outre, des mutations du promoteur TERT ou des altérations hémizygotiques de CDKN2A. Ces néoplasies intermédiaires ont également des charges de mutation globale plus élevées que ceux de lésions bénignes et inférieures à celles des lésions malignes (Tschandl, Berghoff et al. 2013, Shain, Yeh et al. 2015).

III.4.c. Le mélanome en phase radiale de croissance : prolifération en surface

Lorsque les mélanocytes se transforment, suites à plusieurs altérations géniques, ils développent le moyen de contourner la sénescence, ils rentrent alors en **phase radiale de croissance (PRC)**. Les mélanocytes transformés acquièrent la capacité à proliférer et se développent dans l'épiderme parallèlement à la membrane basale, sans jamais envahir la lame basale. Les quelques lignées en PRC étudiées sont décrites comme non tumorigéniques, c'est-à-dire qu'elles ne permettent pas l'établissement de tumeurs chez la souris (Elder 2006).

Les mélanomes en PRC n'ont en effet pas acquis la capacité à traverser la JDE et envahir le derme. Cela peut s'expliquer par le fait qu'ils soient encore dépendants des facteurs de croissance environnant sécrétés par les kératinocytes et sont confinés dans leur proximité (Shih and Herlyn 1993, Rüter, Bogenrieder et al. 2002, Wang, Fukunaga-Kalabis et al. 2016).

On retrouve principalement cette PRC, purement proliférative, associée à des mélanomes de type « CSD », comme le mélanome de Dubreuilh (Shitara, Nascimento et al. 2014).

A cette phase, le mélanome est encore de bon pronostic, car une exérèse chirurgicale élargie suffit généralement à éliminer les cellules tumorales.

III.4.d. Le mélanome en phase verticale de croissance : l'invasion commence

Le passage des cellules de mélanome à cette phase est critique, rendant le pronostic peu propice. Les cellules, en plus de présenter un phénotype prolifératif vont aussi acquérir un phénotype migratoire et invasif. Elles rentrent en **phase verticale de croissance (PVC)**. Affranchis des signaux du microenvironnement et grâce à l'acquisition de la faculté de digérer la lame basale, ces mélanocytes transformés envahissent du derme jusqu'à l'hypoderme (Clark, Ainsworth et al. 1975). Lors de ce passage en PVC, une **transition de type épithélio-mésenchymateuse (TEM)** a lieu, permettant aux

cellules d'échapper au contrôle des kératinocytes (Caramel, Papadogeorgakis et al. 2013). De nouvelles interactions vont alors être possibles avec de nouveaux types cellulaires tels que les fibroblastes ou les cellules endothéliales vasculaires, ou bien avec la matrice extracellulaire du derme, pour aider à l'invasion et la dissémination des cellules.

Ces mélanomes en PVC s'affranchissent du contrôle des kératinocytes par cinq mécanismes principaux:

(1) la régulation négative des récepteurs importants pour la communication avec les kératinocytes tels que **l'E-cadhérine** (Hsu, Wheelock et al. 1996)

(2) la régulation à la hausse des récepteurs et des molécules de signalisation importantes pour les interactions cellules-cellules entre mélanomes et entre mélanome et fibroblaste telles que **la N-cadhérine** (Yan, Holderness et al. 2016)

(3) la dérégulation de morphogènes tels que les récepteurs **Notch**, la famille **SNAI**, **ZEB** ou **TWIST** (Liu, Xiao et al. 2006, Caramel, Papadogeorgakis et al. 2013, Yan, Holderness et al. 2016)

(4) la perte d'ancrage à la membrane basale à cause d'une altération de l'expression des molécules d'adhésion cellule-matrice tel que **l'intégrine $\alpha\beta3$**

(5) l'augmentation de la sécrétion des métalloprotéinases tels que **MMP-2** ou les **MMP-9**.

Ainsi, les cellules de mélanome échappent au **microenvironnement** créé par les kératinocytes épidermiques et se développent via l'interaction avec de nouveaux partenaires cellulaires comme les fibroblastes et les cellules endothéliales, qui soutiennent leur croissance et leur invasion, que ce soit en direction des vaisseaux lymphatiques ou sanguins. L'implication du microenvironnement dans la mélanonagénèse est décrites plus amplement [section III.6](#)

Les données suggèrent qu'environ 45% des cas de mélanome sont entièrement dans une PRC, 10% ont une PVC seul (donc classés comme types nodulaires) (Heenan and Holman 1982), le reste présentant un nodule tumoral en PVC entouré d'une PRC, dans lequel ils sont probablement apparus (Laga and Murphy 2010).

III.4.e. La phase métastatique, victoire du mélanome

Dans ce dernier stade de la maladie, la tumeur primaire a atteint un niveau de développement tel que l'oxygène et les nutriments nécessaires à sa croissance ne sont plus accessibles en quantités suffisantes. Elles vont alors induire le processus de **d'angiogenèse tumorale** pour subvenir à ses besoins. Le mélanome va entraîner la production d'IL6 (Interleukine 6) et de VEGF pour promouvoir cet angiogenèse (Tang, Bhandaru et al. 2015). Lorsque le mélanome atteint les vaisseaux, par angiogenèse ou migration, les cellules tumorales vont pouvoir alors se dissocier de la tumeur primaire et coloniser d'autres organes ou tissus. Elles peuvent circuler dans l'organisme via le système sanguin et/ou lymphatique. **Le mélanome métastatique (MM)** va coloniser préférentiellement les ganglions lymphatiques, les poumons, le foie et le cerveau (Leiter, Meier et al. 2004). Cette organotropisme des cellules tumorales peut s'expliquer par le chemotaxisme induits par des facteurs solubles sécrétés par les organes cibles pouvant être présent dans la matrice extracellulaire lors de la dégradation de celle-ci par les cellules tumorales (Auerbach, Lu et al. 1987) (Cerra and Nathanson 1991). Les exosomes peuvent aussi jouer un rôle dans cette organotropisme (Hoshino, Costa-Silva et al. 2015). D'autres facteurs produits par la cellule tumorale peuvent avoir des effets paracrines pour modifier les vasculatures lymphatiques et sanguines et favoriser la phase d'extravasation et d'invasion à distance. Ainsi, la protéine matricellulaire **SPARC** produite par le mélanome a été décrite pour modifier la perméabilité de l'endothélium vasculaire lors de la

dissémination métastatique via son interaction avec le récepteur endothelial VCAM-1 (Tichet, Prod'Homme et al. 2015).

A ce niveau-là, la survie à 5 ans d'un mélanome ne dépasse pas le 20%. Le MM est en effet très agressif et résistant aux thérapies (cf. III.8.b)

Cependant, tous les mélanomes ne s'accordent avec le modèle de Clark. Depuis l'acceptation de ce modèle en 1984, des travaux ont pu mettre en évidence des alternatives à la progression classique du mélanome. Des mélanocytes isolés peuvent directement passer en PRC ou PVC sans passer par l'étape de naevus (Miller and Mihm 2006, Gray-Schopfer, Wellbrock et al. 2007).

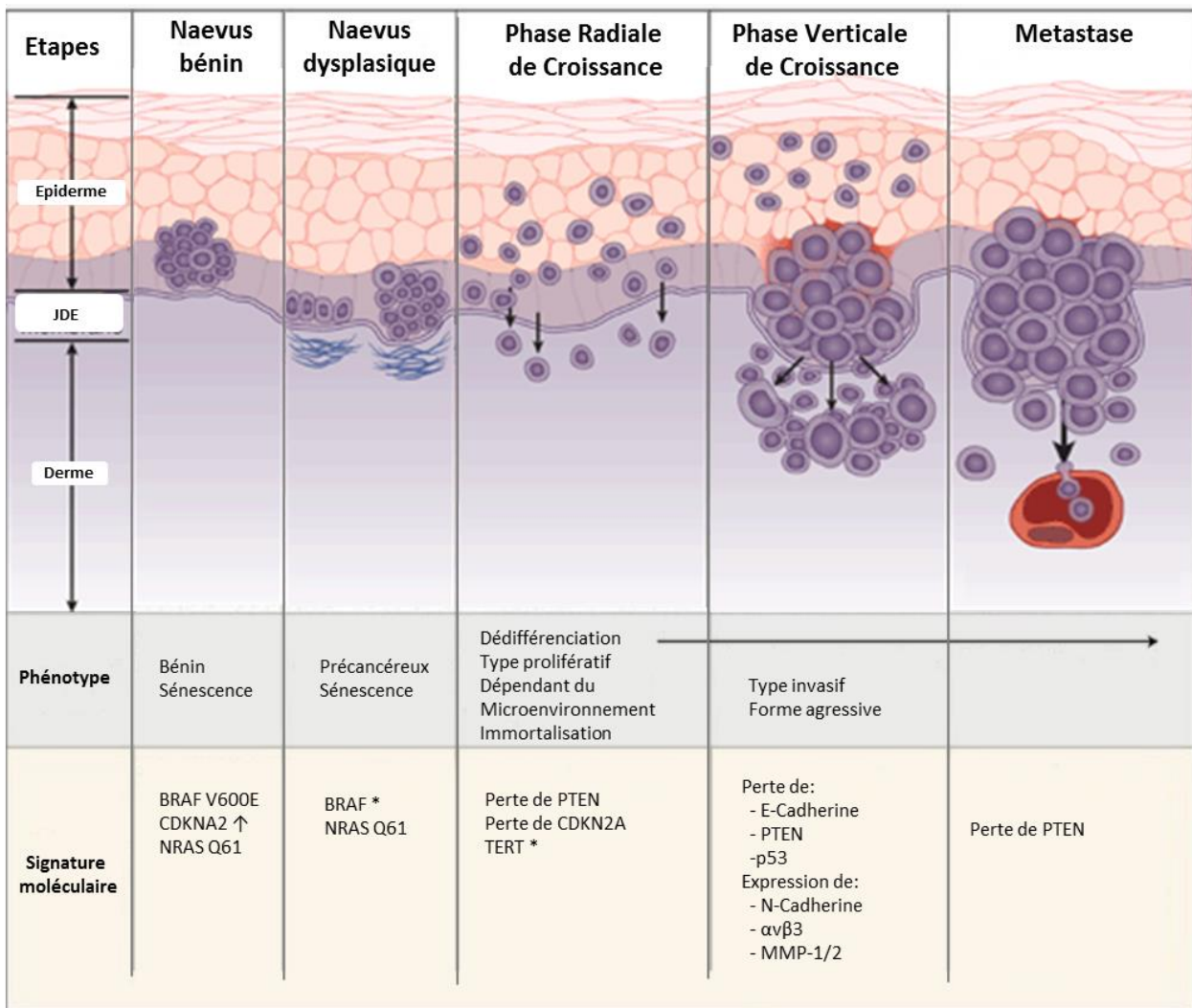


Figure 4 : *Etapes et processus mis en jeu lors du développement du mélanome*

Adapté d'après Miller and Mihm (2006) et Shain and Bastian (2016)

III.5. Les modifications géniques au cœur du mélanome

Dû à sa signature UV, le mélanome est le cancer présentant le plus haut taux de mutations somatiques (Lawrence, Stojanov et al. 2013). On retrouve au sein de chaque mélanome des modifications génétiques, dont certaines comme je vous l'ai déjà dit, ont un rôle clé dans l'initiation et le développement du mélanome. Ces altérations vont induire des voies de signalisation cellulaires, permettant au mélanome d'acquérir ces différentes caractéristiques, tel que la prolifération, la migration, l'invasion...

Les principaux gènes touchés par ces mutations sont des oncogènes ou des gènes suppresseurs de tumeurs.

III.5.a. Suractivation de la voie des MAP-Kinases par les oncogènes BRAF et NRAS

Comme dit précédemment, la première altération que nous retrouvons dans l'évolution du mélanocyte est une augmentation de la prolifération, menant le plus souvent à la formation d'un naevus. Cette altération est celle de la voie des **MAPK pour Mitogen Activated Protein Kinase**.

Les protéines kinases activées par des mitogènes sont une famille hautement conservée de sérine/thréonine kinases impliquées dans divers processus cellulaires fondamentaux tels que la prolifération, la différenciation, la motilité, la réponse au stress, l'apoptose et la survie.

Une large gamme de stimuli extracellulaires comprenant des mitogènes (facteurs favorisant la mitose et la division cellulaire), des cytokines, des facteurs de croissance et des facteurs de stress environnementaux activent cette voie, par l'induction d'une cascade de phosphorylation jusqu'à l'activation de facteurs de transcription spécifiques.

La famille des MAPKs se compose de 4 cascades distinctes, activant les kinases suivantes :

- Les **protéines ERK-1 et ERK-2** signifiant *Extracellular signal-regulated kinases*
- Les protéines N-terminales c-Jun 1-3 (**JNK1-3**)
- Les isoformes de **p38** (p38a, β, γ et δ)
- Et **Erk5**.

Quel que soit la cascade, le mécanisme d'activation de la famille des MAPK est identique. Les stimuli se fixent sur des récepteurs membranaires, récepteurs à activité tyrosine kinases (« RTK ou receptor tyrosine kinases »), et activent une ou de plusieurs MAP3Kinases (MAPKKK). Ces MAP3Kinases activent une cascade de phosphorylation, activant une MAP2Kinase (MAPKK) puis à son tour une MAPKinase. De multiples effecteurs en aval sont alors activés et permettent la réponse cellulaire.

Dans le cadre du mélanome, la voie régulant la prolifération, la survie et la différenciation est la voie impliquant ERK-1/2 (Figure 5). Brièvement, une petite protéine G de la famille RAS va activer une kinase de la famille RAF (MPA3K), puis MEK1/2 (MAP2K) et enfin ERK 1/2. Environ 160 substrats ont déjà été découverts pour les ERK régulant entres autres les processus cellulaires tels que la prolifération, la différenciation et la progression du cycle cellulaire (Yoon and Seger 2006).

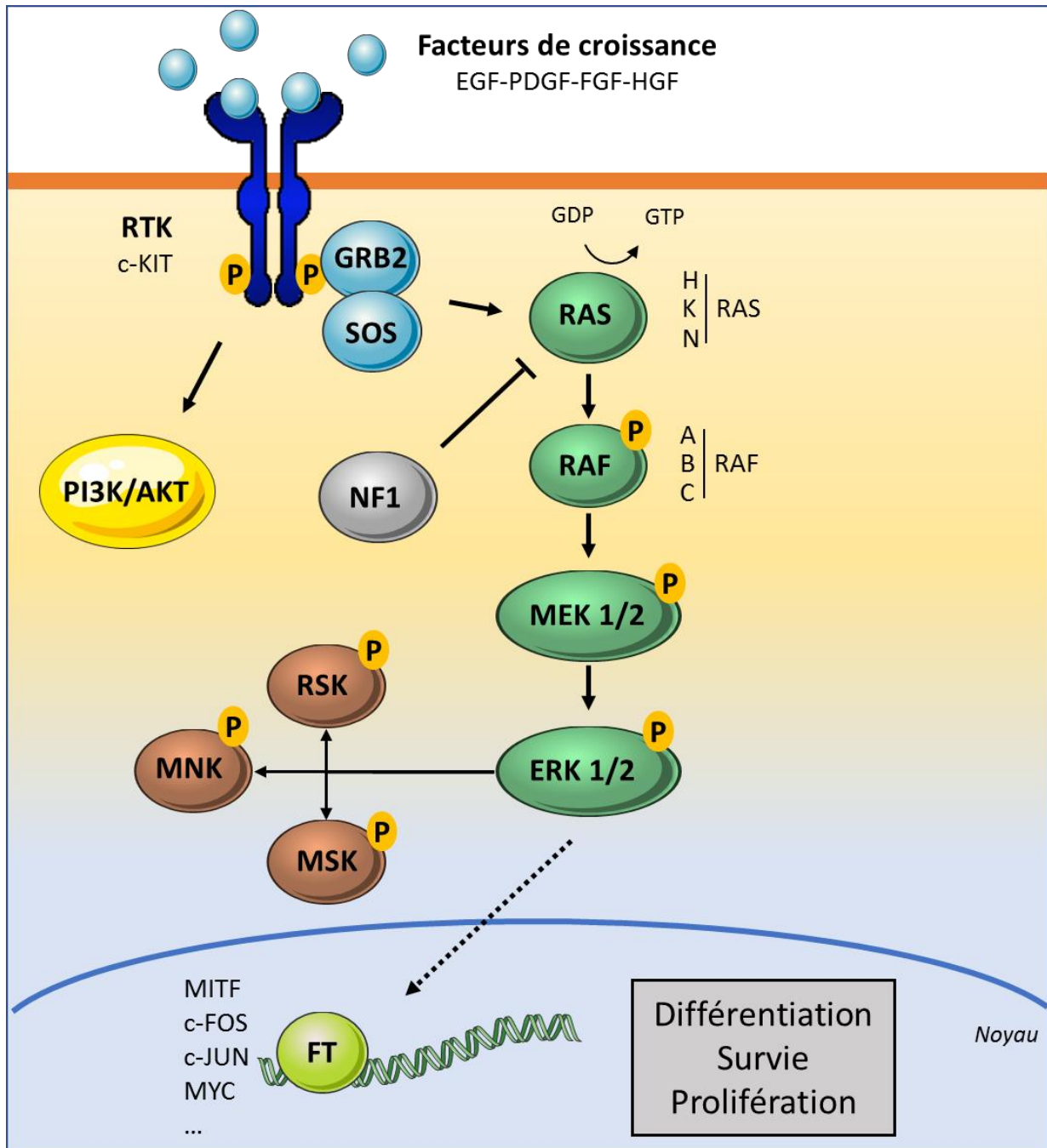


Figure 5 : Voie de signalisation des MAPK RAS/RAF/MEK/ERK

Une cascade de phosphorylation va activer la voie des MAPK. Les kinases Erk1/2 vont alors activer des kinases effectrices (RSK, MSK, MNK) ou des facteurs de transcription promouvant la prolifération cellulaire. EGF, epidermal growth factor; PDGF, platelet-derived growth factor ; FGF, fibroblast growth factor ; HGF, hepatocyte growth factor, RTK Receptor tyrosine kinase; FT, Facteur de transcription

Au sein du mélanome, des mutations affectant les gènes **BRAF** ou **NRAS** vont induire de manière constitutive l'activation de cette voie des MAPK. En effet, ces 2 mutations sont **mutuellement exclusives** dans les cellules individuelles en raison de l'apoptose auto-induite par une hyper-activation prolongée de la voie MAPK (Petti, Molla et al. 2006, Sensi, Nicolini et al. 2006).

Des cultures de mélanomes à double mutation **NRAS/BRAF** ont déjà été rapportées, elles représentent très certainement des mélanges hétérogènes de cellules de mélanome à mutation unique, des sous-clones mutuellement exclusifs avec les mutations **BRAF** ou **NRAS** (Nazarian, Shi et al. 2010).

D'autre part, un régulateur de la famille RAS, **NF1**, a été décrit comme muté dans 10% des mélanomes, affectant la voie des MAPK de manière significative. Son inactivation, par délétion ou mutation non-sens par exemple, augmente le risque de développer un mélanome de 3,6% (Cirenajwis, Lauss et al. 2017).

Cela a donc mené à une **classification génomique du mélanome**, proposée par le réseau Cancer Genome Atlas (TCGA). Les quatre sous-types ont été définis sur la base du modèle de mutation dans **BRAF**, **NRAS**, **NF1** ou n'arborant aucune de ces mutations, le groupe dit **triple-sauvage**. (Cancer Genome Atlas Network 2015)

Je vais maintenant vous décrire un peu plus précisément ces 3 protéines, leur mutation et leur rôle au sein du mélanome (Figure 5).

1) NRAS

Les protéines RAS appartiennent à la super famille **des petites GTPases** comprenant les sous-familles Ras, Rho, Rac, Ral et Cdc42. Celles-ci font partie d'un réseau complexe de voies de signalisation aboutissant finalement à la libération d'une diversité de facteurs de transcription, conduisant ainsi à l'expression de gènes impliqués **dans la mitogenèse, l'organisation du cytosquelette, la régulation métabolique et l'apoptose**.

Les protéines Ras, localisées à la membrane, ont une activité GTPase intrinsèque et passent d'une forme inactive liée au GDP à une forme active liée au GTP, fonctionnant ainsi comme un commutateur moléculaire pour la transmission des signaux de régulation (Barbacid 1987). Trois proto-oncogènes étroitement apparentés codent pour 4 isoformes : H-Ras, K-Ras4A, K-Ras4B and N-Ras (Olson and Marais 2000). Ces GTPases sont fréquemment trouvées dans leurs formes oncogéniques mutées dans les tumeurs humaines (Barbacid 1987, Bos 1989). Les formes oncogéniques mutées des protéines RAS sont constitutivement actives, car elles ont une activité GTPase intrinsèque réduite (Trahey, Milley et al. 1987). Les premières observations sur la présence de gènes *RAS* activés dans le mélanome humain ont été publiées en 1984. La séquence nucléotidique du gène c-Ha-RAS-1, a été établie dans une tumeur de mélanome d'un patient japonais (Sekiya, Fushimi et al. 1984).

Environ **20% des tumeurs humaines** ont des mutations ponctuelles *RAS* activatrices, soit un cancer sur cinq. Au total, les mutations dans *KRAS* représentent environ 85% de toutes les mutations *RAS* dans les tumeurs humaines, *NRAS* environ 15% et *HRAS* moins de 1% (Downward 2003). Les mutations des gènes *RAS* semblent être spécifique du type de tumeur puisque les carcinomes du pancréas, du côlon et du poumon présentent tous des fréquences élevées de mutations *KRAS* alors que les mutations *NRAS* sont fréquentes dans les leucémies myéloïdes et parmi les mélanomes cutanés (Bos 1989).

Dans l'ensemble, l'altération du codon **61 de NRAS** est de loin la plus fréquente dans les mélanomes, retrouvés dans environ 20% des cas (Platz, Egyhazi et al. 2008). Les mutations du codon NRAS 61 les plus fréquemment observées sont les changements Q61R (CAA/CGA) et Q61K (CAA/AAA) conduisant respectivement à des substitutions de la glutamine à l'arginine ou à la lysine, conduisant à l'activation constitutive de la voie RAF/MEK/ERK mais aussi de la voie des PI3K (Phosphoinositide-3 Kinase) (Castellano and Downward 2010). Il est intéressant de noter que ce taux de mutation au sein des mélanomes avoisine 95% chez des patients porteurs de mutations germinales de CDKN2A (Eskandarpour, Hashemi et al. 2003). De plus, des souris transgéniques exprimant l'oncogène NRASQ61K dans le lignage mélanocytaire peuvent développer des mélanomes, mais uniquement sous un fond *CDKN2A* muté (Ackermann, Fruttschi et al. 2005).

Ces données confirment que la mutation de *NRAS* seul n'est pas suffisante pour induire un mélanome. L'activation de RAS déclenche **un mécanisme de senescence**, appelé Senescence induite par les oncogènes (OIS pour « Oncogene-Induced Senescence »). Elle induit entre autres l'accumulation de TP53, p16 et ARF et provoque l'arrêt cellulaire (Serrano, Lin et al. 1997).

2) BRAF

La famille **des RAF kinases** (pour « Rapidly Accelerated Fibrosarcoma ») est composée de trois membre : A-RAF, B-RAF and C-RAF (ou RAF-1). Ces sérine/thréonine kinases présentent des structures similaires, cependant, certains sites de phosphorylation ne sont pas conservés entre ces trois formes, ce qui montre que ces protéines peuvent être régulées indépendamment. L'invalidation génétique (ou Knock-out en anglais) des différentes formes de RAF révèle eux aussi des rôles différents pour ces isoformes. Les souris qui sont *ARAF* *-/-* survivent à la naissance, mais meurent après 7 à 21 jours en raison de défauts neurologiques et gastro-intestinaux. Les embryons de souris qui sont *BRAF* *-/-* ou *CRAF* *-/-* meurent in utero entre 10,5 et 12,5 jours post-coït. Les embryons *BRAF* *-/-* montrent un retard de croissance, et des défauts vasculaires et neuronaux, et les embryons *CRAF* *-/-* meurent apparemment d'une apoptose massive du foie (Wellbrock, Karasarides et al. 2004).

Parmi ces isoformes, on retrouve une forte présence de mutations de *BRAF* dans les cancers humains, en particulier **le mélanome (20 à 80%)** (Platz, Egyhazi et al. 2008), le cancer de la thyroïde (30-50%), le cancer colorectal (5-20%) et le cancer de l'ovaire (\approx 30%), mais aussi plus faible taux (1-3%) dans plusieurs autres types de cancers.

Plus de 45 mutations de *BRAF* ont maintenant été décrites, mais l'altération la plus fréquemment observée est la substitution d'un résidu de valine à la position 600 pour l'acide glutamique, **BRAFV600E** (GTG/GAG). Elle représente plus de 90% des mutations *BRAF* qui sont observées dans le mélanome. Cette mutation est retrouvée dans les mélanomes « non-CSD » car elle ne correspond pas à la signature UV. Cette signature est caractérisée par des mutations CC/TT ou C/T associées à la formation de dimères de pyrimidine survenant suite à exposition aux UV, comme fréquemment observé, par exemple, dans le gène *TP53* dans les cancers de la peau autres que les mélanomes (Wellbrock, Karasarides et al. 2004). L'altération V600E se situe dans le segment d'activation du domaine kinase. Elle imite la phosphorylation de T599/S602 puisqu'il a été montré que le mutant BRAFV600E a une activité kinase plus élevée que BRAF de type sauvage. Deux autres substitutions à la valine 600 sont répertoriées, V600K et V600D, ainsi que quelques rares mutations touchant d'autres codons (Davies, Bignell et al. 2002, Pavey, Johansson et al. 2004). Cette mutation apparaît précocement dans le mélanocyte, étant retrouvée dans 82 % des nævi (Pollock, Harper et al. 2003). Comme pour la mutation de *NRAS*, *BRAFV600E* n'est pas suffisante à elle seule pour induire la

transformation tumorale, car cette oncogène est lui aussi **inducteur de senescence (OIS)** (Michaloglou, Vredeveld et al. 2005). La senescence est un mécanisme naturel qui se met en place lorsque par exemple, les télomères ont atteint une taille critique. Les nævi ne semblent pas souffrir de la réduction des télomères, arguant d'un processus de sénescence activé par un oncogène actif, plutôt qu'une perte de potentiel réplicatif. Ce n'est que l'acquisition de mutations supplémentaires qui vont permettre de surmonter cette senescence et d'enclencher le processus de transformation tumoral. On retrouve par exemple la surexpression de c-Myc, des cyclines de type D, et de Cdc25A et -B, et la perte de TP53, p16 ou IRF-1 (Serrano, Lin et al. 1997).

3) NF1

La protéine NF1 pour **neurofibromine** est une protéine activatrice de la GTPase Ras. Cette famille de protéines régulatrices, les GAP (« GTPase-activating proteins »), a la capacité de se lier aux protéines G et stimuler leur activité GTPase, mettant ainsi fin à l'activité de la petite protéine G.

Les mutations de perte de fonction de NF1 mènent à la neurofibromatose familiale de type I, caractérisée par le développement d'une variété de symptômes tumorigènes et non tumorigènes (Courtois-Cox, Gether Williams et al. 2006).

NF1 est donc un régulateur négatif des protéines RAS et ainsi contrôle les voies de signalisation MAPK et PI3K/AKT (Nissan, Pratilas et al. 2014), mais aussi la voie de signalisation de l'adénosine monophosphate cyclique (AMPC) (Kiuru and Busam 2017).

Plusieurs équipes ont déjà montré que Ras est hyperactivé dans des cellules de souris déficientes en NF1 et des lignées cellulaires tumorales humaines (Basu, Gutmann et al. 1992, Cichowski, Santiago et al. 2003). De plus, comme pour la mutation de *NRAS*, l'inhibition de NF1 induit de la senescence. Cette inhibition et donc la suractivation de la voie RAS/PI3K va entraîner une boucle de régulation négative via l'activation de Rb et p53 (Courtois-Cox, Gether Williams et al. 2006).

Toutes ces données ont permis de faire le rapprochement entre NF1 et son rôle dans le mélanome. Des altérations de NF1 entraînant l'activation de RAS ont été identifiées dans un sous-ensemble de lignées cellulaires de mélanome *BRAF* sauvage / *NRAS* sauvage. Cependant, les altérations *NF1* ne sont pas mutuellement exclusives avec les aberrations *RAS* et *BRAF*. La perte de *NF1* dans les cellules co-mutées pour *BRAF* est suffisante pour surmonter la boucle de rétrocontrôle négatif en amont qui entraîne la suppression de l'activation de RAS dans les cellules portant la mutation *BRAFV600E*. D'autre part, des altérations concomitantes des gènes *NF1* et *RAS* ont également été observés dans deux études récentes de séquençage d'exome complet de tumeurs de mélanome (Hodis, Watson et al. 2012, Cancer Genome Atlas Network 2015, Cirenajwis, Lauss et al. 2017). *CDKN2A* et/ou *TP53* étaient parmi les gènes les plus communément co-altérés dans les lignées et tumeurs de mélanome délétées pour *NF1*, suggérant que ces gènes peuvent coopérer avec la perte de *NF1* dans la promotion de la mélanomagenèse (Andersen, Fountain et al. 1993, Nissan, Pratilas et al. 2014).

III.5.b. Autres dérégulations affectant la mélanomagénèse

Le réseau TCGA, via la caractérisation systématique effectuée sur 333 mélanomes cutanés à l'échelle génomique, transcriptomique et protéique a pu définir un catalogue d'altérations somatiques et décrire leur signification biologique et clinique potentielle. Outre les trois protéines décrites précédemment, de nombreuses autres altérations ont été identifiées ou ré-identifiées et leurs cooccurrences avec les différents sous-types (**BRAF**, **RAS**, **NF1** et **triple-sauvage**) ont pu être quantifiés. Je vais vous présenter de manière non-exhaustive quelques voies de signalisation affectées avec les altérations en causes.

1) La voie PI3K/AKT

La voie de signalisation **PI3K/AKT/mTOR** (« mammalian target of rapamycin ») joue un rôle central dans la physiologie cellulaire, coordonnant la signalisation de l'insuline pendant la croissance des organismes et favorisant les processus cellulaires critiques tels que l'homéostasie du glucose, la synthèse protéique, la prolifération cellulaire et la survie (Lien, Dibble et al. 2017) (Figure 6).

Cette voie de croissance commence avec les récepteurs à tyrosine kinases de facteurs de croissance (RTK) ou avec les récepteurs couplés aux protéines G (GPCR) qui activent PI3K par phosphorylation. Cela conduit à son hétérodimérisation, lui permettant de phosphoryler le phosphatidylinositol-4, 5-bisphosphate (PIP2) pour générer le phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate (PIP3). PIP3 recrute à la membrane cellulaire AKT. AKT est phosphorylée par PDK1 et mTORC2 et va ensuite activer directement et indirectement de nombreuses protéines en aval, entraînant l'expression de gènes impliqués entre autres dans la survie, la prolifération cellulaire ou le métabolisme.

La dérégulation de cette voie est donc souvent observée dans les cancers (Zhang, Kwok-Shing Ng et al. 2017)

PTEN

Le principal régulateur négatif de l'activation de PI3K est la phosphatase PTEN, qui déphosphoryle PIP3 en position 3' (Keniry and Parsons 2008). L'homologue de la phosphatase et de la tensine (PTEN) est un suppresseur de tumeur connu qui est fréquemment inactivé dans divers cancers humains, y compris le mélanome où on le retrouve altéré dans 10% des mélanomes (Vultur and Herlyn 2013, Cancer Genome Atlas Network 2015). La perte de *PTEN* active constitutivement la voie PI3K et a été montré pour avoir un rôle important dans le mélanome (Wu, Goel et al. 2003, Dong, Richards et al. 2014).

Les altérations menant à la perte de fonction de PTEN sont retrouvées de manière majoritaire dans les mélanomes mutés pour *BRAF* (~20%) contre moins de 10% pour les autres sous-types. La sous-expression de *PTEN* ou sa perte de fonction sont associées avec des tumeurs profondes et une invasion marquée (Goel, Lazar et al. 2006).

AKT3

La famille AKT (ou RAC-alpha serine/threonine-protein kinase et anciennement PKB) est composée de 3 isoformes : AKT1, AKT2 et AKT3. Malgré la forte homologie, il semble que ces différentes isoformes ont des profils d'expression cellulaire différents ainsi que des substrats spécifiques. Il a été montré

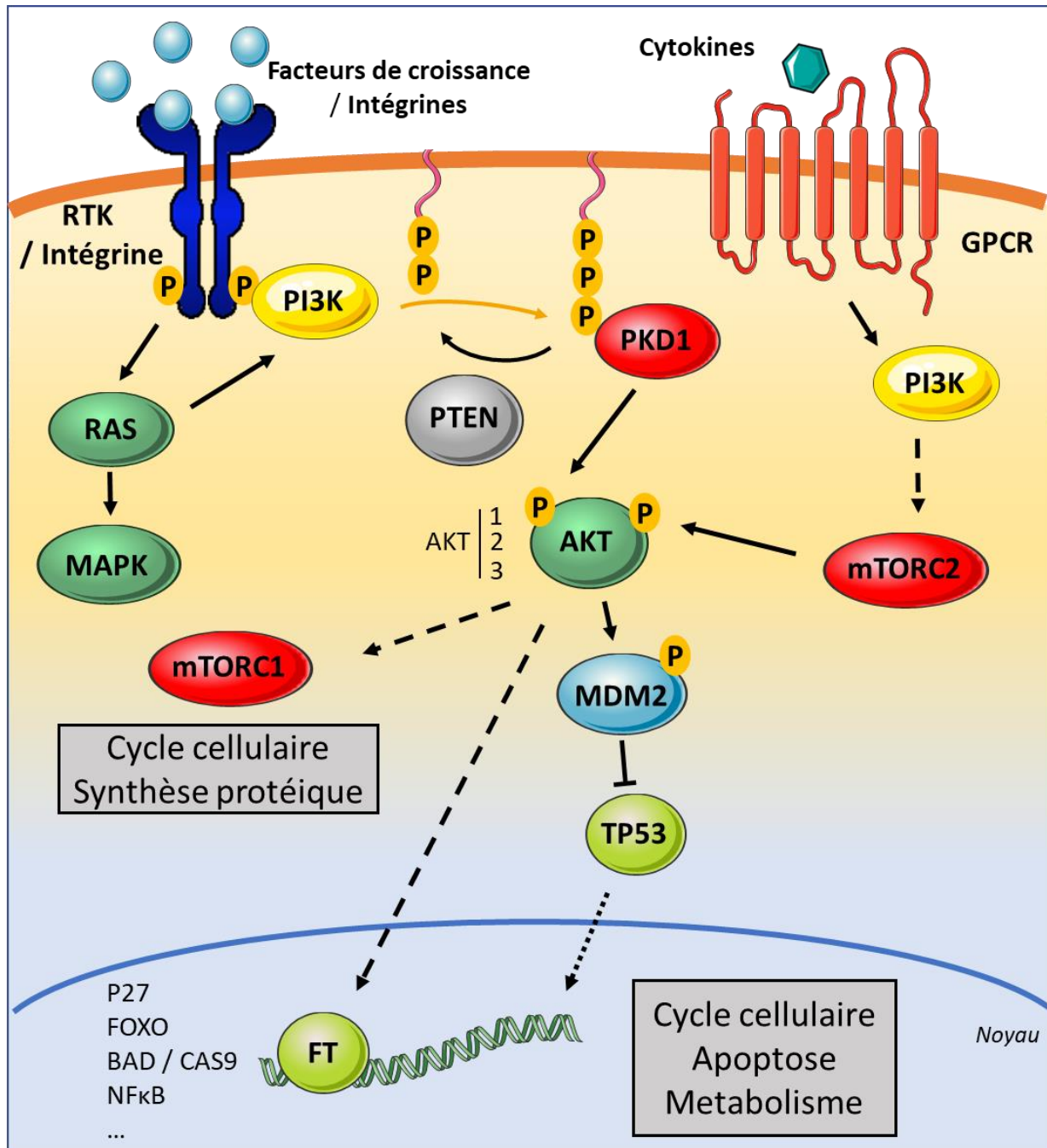


Figure 6 : Voie de signalisation PI3K/AKT

Des signaux extracellulaires, qu'ils soient des facteurs de croissance, intégrines ou cytokines vont activer la voie PI3k/AKT, voie qui régule le cycle cellulaire, le métabolisme et l'apoptose entre autres. GPCR, G protein-coupled receptor ; FT, facteur de transcription

qu'une expression spécifique de AKT3 était observé dans environ 50% des mélanomes (Stahl, Sharma et al. 2004).

L'activation de cette voie est corrélée avec le stade d'avancement tumoral. Une forte expression de phospho-AKT a été observée dans 17%, 43%, 49% et 77% des biopsies dans les naevi normaux, les naevi dysplasiques, les mélanomes primaires et les métastases de mélanome, respectivement. De plus, la forte activité de AKT est corrélée avec un mauvais pronostic pour le mélanome (Dai, Martinka et al. 2005).

Une surexpression de AKT3, dû soit à une amplification génique ou à une surexpression de l'ARN messenger va induire la suractivation de la voie PI3K/AKT/mTOR. Ces surexpressions ont été détectées dans le sous-type de mélanome *RAS*, *NF1* et triple-sauvage, à de taux de 40%, 30% et 20% respectivement.

2) La voie du cycle cellulaire

Le gène **CDKN2A**, a forte pénétrance dans le mélanome, est un gène suppresseur de tumeur régulant principalement le cycle cellulaire, mais aussi la sénescence, comme dit partie III.3.a. Ce locus code pour deux protéines distinctes, **p16^{INK4a}** et **p14^{ARF}**. Bien que ces deux protéines soit des inhibiteurs du cycle cellulaire et en particulier des Kinases cycle-dépendantes (CDK), elles activent différentes voies de signalisation. Alors que p16^{INK4a} participe à la voie Rb pour « retinoblastoma protein », p14^{ARF} est impliqué dans la voie p53.

Concernant, p16^{INK4a} se lie à CDK4/6, inhibant la formation de complexes entre cycline D et CDK4/6 et donc la phosphorylation des membres de la famille Rb. L'expression de p16^{INK4a} maintient les membres de la famille Rb dans un état hypophosphorylé, ce qui favorise leur liaison à E2F1 et conduit à l'arrêt du cycle cellulaire en G1 (Serrano 1997). p16^{INK4a} est un régulateur négatif de la prolifération cellulaire, et donc joue un rôle de suppresseur de tumeurs. Près de **50% de tous les cancers humains** montrent une inactivation de p16^{INK4a} ; qu'ils soient solides comme le cancer de la tête et du cou ou des poumons par exemple ou liquides avec les leucémie ou les lymphomes (Romagosa, Simonetti et al. 2011).

Pour ce qui est de la protéine p14^{ARF}, elle se lie au complexe MDM2-TP53, empêchant l'ubiquitination et la dégradation de p53. La stabilisation de p53 va entrainer l'expression de *p21*, qui va arrêter le cycle cellulaire en inhibant les complexes CDK4/6-cycline D et CDK2-cycline E (Bates, Phillips et al. 1998, Karimian, Ahmadi et al. 2016)

Plusieurs mécanismes sont décrits pour être responsable de l'inactivation du gène *CDKN2A*, comprenant des délétions homozygotes, une perte d'hétérozygotie, des mutations ponctuelles et une hyperméthylation du promoteur (Romagosa, Simonetti et al. 2011). Cette perte d'activité est très présente au sein du mélanome ; sa co-occurrence avec les mutations *BRAF*, *NRAS* et *NF1* dépassant les 60%, mais seulement 40% pour les triples-sauvages (Cancer Genome Atlas Network 2015)

3) La voie de réponse aux dommages à l'ADN et processus de mort

p53 codant pour la protéine tumoral 53 (TP53) est l'un des gènes suppresseur de tumeur le plus étudié. Il est connu que TP53 est impliqué dans l'arrêt du cycle cellulaire, l'apoptose ou la sénescence et participe à la réparation de l'ADN. TP53, dont les cibles sont estimées à plus de 400, est retrouvé inactivé dans 50% des tumeurs invasives (Nikulenkov, Spinnler et al. 2012, Duffy, Synnott et al. 2017).

Bien sûr, la prévalence varie entre les types de tumeurs. En effet, *p53* s'avère être le gène le plus fréquemment muté dans certains des cancers les plus difficiles à traiter tels que le cancer du poumon, le cancer du sein triple négatif, le cancer de l'ovaire de haut grade et le cancer de l'œsophage. Dans ces cancers, *p53* est muté dans au moins 80% des cas. (Duffy, Synnott et al. 2017). Dans le cas du mélanome, *p53* n'est que peu altéré dans les lésions primaires mais il est inactivé dans environ 20% des mélanomes à mutations contre 7% pour les triples-sauvages (Cancer Genome Atlas Network 2015).

La plupart des cas de mélanome avec une mutation sur *p53* ne présentent pas de mutation simultanée sur *p14^{ARF}* ou *p16^{INK4a}*. Cela peut suggérer que la pression génétique pour muter *p53* dans le mélanome est réduite en raison de la suppression fréquente du locus *CDKN2A* (Hodis, Watson et al. 2012).

Une régulation indirecte de *p53* peut aussi être observé dans le mélanome. Mouse Double Minute 2 (**MDM2**) est l'ubiquitine ligase E3 de TP53 (cf. Partie 2.II.3). MDM2 est surexprimé dans environ 20% des mélanomes triple-sauvages et va donc augmenter la dégradation de TP53 (Cancer Genome Atlas Network 2015).

La protéine **SPARC** (« Secreted protein acidic and rich in cysteine », également appelé ostéonectine et BM-40) peut aussi impacter TP53. Cette glycoprotéine multifonctionnelle appartient au groupe des protéines matricellulaires. Elle module l'interaction cellulaire avec la matrice extracellulaire (MEC) par sa liaison aux protéines de la matrice, telles que le collagène et la vitronectine, et par son abrogation des adhérences focales, empêche l'adhésion cellulaire (Brekken and Sage 2000). SPARC active aussi AKT, activant à son tour MDM2 et limite les niveaux de TP53. Sachant que SPARC est abondamment produite par les cellules de mélanome mais n'est pas exprimé par les mélanocytes, son expression au cours du développement du mélanome conférerait un avantage de survie grâce à la suppression des voies apoptotiques TP53-dépendante (Fenouille, Puissant et al. 2011).

III.6. *Le microenvironnement, facteur extrinsèque, favorise lui aussi la mélanomagénèse*

Dans tous tissus sains, les cellules sont maintenues dans un environnement favorable à leur fonction, c'est ce qu'on appelle le **microenvironnement**. Ce microenvironnement est composé de différents types cellulaires (fibroblastes, cellules endothéliales et cellules immunitaires), de vaisseaux sanguins et lymphatiques et surtout, de la MEC. Principalement sécrétée par les fibroblastes, cette MEC sert de fondation sur laquelle les cellules se développent. C'est un réseau complexe de macromolécules qui s'assemblent en structures en trois dimensions avec des propriétés biochimiques et biomécaniques distinctes qui régulent la croissance, la survie, la motilité et la différenciation cellulaires via sa liaison à des récepteurs spécifiques tels que les intégrines, syndécans et récepteurs à domaine discoïdine. Les cellules vont interagir au sein de cet environnement, par des contacts **cellule-cellule**, des interactions **cellule-matrice**, par des **facteurs solubles** (cytokines, facteurs de croissance) ou **insolubles** (vésicules extracellulaires). Tous ces signaux vont contrôler le devenir et la fonction de chaque cellule et de manière réciproque, chaque cellule va pouvoir modifier ce microenvironnement.

Le rôle du microenvironnement est depuis longtemps étudié, que ce soit dans l'homéostasie cellulaire mais aussi dans son implication dans les cancers. Les premières données sur le rôle du microenvironnement tumoral remontent à 1889 quand Stephen PAGET a proposé la théorie du « Seed and Soil » (Paget 1989). Il a noté que la distribution des métastases chez 735 femmes

atteintes d'un cancer du sein était non aléatoire. Il en a déduit que les cellules tumorales (les graines ou « seed ») se développaient préférentiellement dans le microenvironnement de certains organes (le sol ou « soil »).

Le mélanome est bien connu pour sa capacité à métastaser pratiquement tous les organes ou tissus, y compris certains sites rarement observés avec d'autres tumeurs solides. Néanmoins, certains sites sont plus susceptibles de contenir des métastases. Ils se disséminent le plus souvent vers la peau, les tissus sous-cutanés et les ganglions lymphatiques (50% à 75% des patients selon les études). Les sites de métastases viscérales les plus courants sont les poumons ($\approx 80\%$), le foie ($\approx 60\%$), le cerveau ($\approx 45\%$), et les os ($\approx 30\%$) (Patel, Didolkar et al. 1978). Il semblerait que ces sites présentent un microenvironnement favorable au développement tumoral.

Ces niches métastatiques du mélanome ont un microenvironnement spécifique, que ce soit par une synthèse par les fibroblastes activés d'une MEC protumorale, ou suite à sa modification par des facteurs remodelant sécrété par les cellules de mélanome. La protéine matricielle **SPARC** est par exemple abondamment produite par les cellules de mélanome mais n'est pas exprimée par les mélanocytes normaux (Robert, Gaggioli et al. 2006). Cette protéine, capable de remodeler la MEC ou de moduler les adhérences cellulaires voit son expression corrélée avec l'agressivité des mélanomes (Massi, Franchi et al. 1999). L'activité de SPARC, autocrine, paracrine ou interne, modifie différentes voies cellulaires, la différenciation, l'apoptose, la migration des cellules cancéreuses et la régulation de la réponse cellulaire immunitaire (Arnold and Brekken 2009). Notre équipe a montré la forte implication de SPARC au sein du mélanome :

- SPARC favorise la survie cellulaire en promouvant la dégradation de TP53 par MDM2 (Fenouille, Puissant et al. 2011, Fenouille, Robert et al. 2011).
- SPARC entraîne l'expression du facteur de transcription Slug et la répression de l'E-cadherine, nécessaire à la TEM des mélanomes, améliorant leurs propriétés invasives (Robert, Gaggioli et al. 2006, Fenouille, Tichet et al. 2012).
- SPARC stimule la perméabilité vasculaire et l'extravasation par la voie de signalisation endothéliale VCAM1 pour promouvoir l'évolution métastatique (Tichet, Prod'Homme et al. 2015).

Ce n'est qu'un exemple parmi tant d'autres de l'importance et du rôle du microenvironnement sur le développement tumoral. La MEC régule beaucoup de processus cellulaires décrits comme « hallmarks of cancer » par Hanahan and Weinberg (Hanahan and Weinberg 2011, Pickup, Mouw et al. 2014), et l'évasion tumorale peut être obtenue par l'augmentation de la rigidité de la MEC tumorale, typiquement observé dans les cancers. Grâce à une accumulation de protéines matricielles comme la fibronectine et le collagène, l'expression de protéines inhibitrices de la progression du cycle cellulaire se trouve réduite (Tilghman, Cowan et al. 2010).

D'autres mécanismes au sein de la niche tumorale du mélanome peuvent participer à la promotion des métastases. Ainsi, des travaux récents ont montré que la production de sphingosine 1-phosphate (S1P) par les mélanomes exprimant fortement la sphingosine kinase 1 (SPHK1) favorise la différenciation des fibroblastes en myofibroblastes qui en retour induisent la dissémination métastatique S1P-dépendante des cellules de mélanome via le récepteur S1P3 (Albinet, Bats et al. 2014).

D'autre part, l'activation de l'invasion et des métastases peut être obtenue grâce à des cellules régulatrices de la tumorigenèse, les macrophages associés aux tumeurs (« Tumor-associated macrophages » ou TAMs). Les TAMs participent à la TEM des cellules tumorales et augmentent leur phénotype invasif par une boucle de signalisation paracrine faisant intervenir le facteur tumoral

« colony-stimulating factor 1 » (CSF-1) et le facteur de croissance épidermique (« epidermal growth factor » ou EGF) produit par les macrophages (Quail and Joyce 2013).

III.7. *De la classification histologique du mélanome découle le pronostic*

Dans n'importe quel type de mélanome, le pronostic va dépendre de la précocité du diagnostic et du stade de la maladie. L'avantage du mélanome, si l'on peut dire, est qu'il est visible sur la peau. La première ligne de défense est donc l'auto-surveillance vient ensuite l'examen pratiqué par un dermatologue pour un suivi de l'évolution des lésions mélanocytaires. Afin de faciliter la détection des mélanomes, la règle ABCDE a été mise en place (Abbasi, Shaw et al. 2004). A chaque lettre correspond un signe caractéristique d'une lésion à risque :

- **A** pour **A**symétrie
- **B** pour **B**ords irréguliers
- **C** pour **C**ouleurs (apparition de différentes couleurs)
- **D** pour **D**iamètre (supérieur à 6mm)
- **E** pour **E**volution (de la taille, de la forme, des symptômes (démangeaisons, sensibilité) et des nuances de couleur)

Lorsque ces critères mettent en évidence une lésion pigmentaire susceptible d'évoluer vers un mélanome, des critères immunohistochimiques et histopathologiques/ anatomopathologiques permettent de valider ou non l'hypothèse d'un mélanome.

Parmi les marqueurs **immunohistochimiques**, S-100 reste le marqueur le plus sensible pour les lésions mélanocytaires, avec une sensibilité de 97–100%. D'autres marqueurs légèrement moins sensibles étayent ensuite le diagnostic, tels que HMB-45, MART-1/ Melan-A, Tyrosinase et MITF. Ki67 permet de compléter le diagnostic et permet le distinguo entre des tumeurs mélanocytaires bénignes et des tumeurs mélanocytaires malignes (Ohsie, Sarantopoulos et al. 2008).

Les critères anatomopathologiques vont permettre quant à eux à classier les mélanomes selon un grade de développement. Le principale facteur pronostic est l'indice de Breslow, qui correspond à l'épaisseur maximale de la tumeur (exprimé en mm). La survie à 5 ans va être dépendante de la profondeur de la lésion, avec un faible risque (≈95%) à moins d'1mm et un risque élevé (≈50%) au-delà de 4mm (Balch, Gershenwald et al. 2009). Couplé avec l'ulcération des lésions et la présence de **micro ou macrométastases** (détectées avec ou sans biopsie des ganglions lymphatiques respectivement), l'American Joint Committee on Cancer a proposé une classification TNM (Tumeurs / « Node » ou ganglions / Métastase) reprenant ces différents paramètres, résumé dans le Tableau 2. De cette classification TNM va découler une gradation de la pathologie allant des grades I à IV, qui vont correspondre à la gravité de la maladie. Plus le grade est élevé, plus le pourcentage de survie à 5 ans est faible.

Cependant, cette classification reste généraliste car elle est uniquement basée sur des observations histologiques et ne prend pas en compte le profil génétique de chaque mélanome, qui va fortement influencer son traitement.

Classification	Epaisseur (mm)	Ulcération/Indexe mitotique	Stage (Survie à 5 ans)	T	N	M
T1	≤ 1.00	a: Sans ulcération et mitose < 1/mm ² b: Avec ulcération ou mitose ≥ 1/mm ²	0	T0	N0	M0
T2	1.01-2.00	a: Sans ulcération b: Avec ulcération	IA (97%)	T1a	N0	M0
T3	2.01-4.00	a: Sans ulcération b: Avec ulcération	IB (92%)	T1b	N0	M0
T4	> 4.00	a: Sans ulcération b: Avec ulcération		T2a	N0	M0
			IIA (81%)	T2b	N0	M0
				T3a	N0	M0
			IIB (70%)	T3b	N0	M0
				T4a	N0	M0
			IIC (53%)	T4b	N0	M0
			IIIA (78%)	T1-4a	N1a	M0
				T1-4a	N2a	M0
			IIIB (59%)	T1-4b	N1a	M0
				T1-4b	N2a	M0
				T1-4a	N1b	M0
				T1-4a	N2b	M0
				T1-4a	N2c	M0
			IIIC (40%)	T1-4b	N1b	M0
				T1-4b	N2b	M0
				T1-4b	N2c	M0
				T (x)	N3	M0
			IV (≈15%)	T (x)	N (x)	M1

Classification	Nbr de ganglions envahis	Type de métastases
N0	0	NA
N1	1	a: Micrométastase
		b: Macrométastase
N2	2/3	a: Micrométastase
		b: Macrométastase
		c: En transit/ ganglions sains
N3	4 ou + ou en transit	

Classification	Site
M0	Pas de métastase
M1a	Métastases cutanées, sous-cutanées ou ganglionnaires
M1b	Métastases pulmonaires
M1c	Toutes les autres métastases viscérales
	Toute métastase à distance

Tableau 2 : Classification des mélanomes selon la norme TNM et correspondance avec les stades du mélanome

III.8. *Prise en charge thérapeutique du mélanome*

Le traitement du mélanome va tout d'abord dépendre du stage de la pathologie. A des faibles grades (I et II), **une exérèse chirurgicale** est effectuée le plus souvent par les dermatologues avec des marges appropriées selon le type de mélanome, avec de très bons résultats.

Le pronostic devient sérieux lorsque le mélanome envahit le derme et plus encore s'il métastase. Si le mélanome est potentiellement de grade III, une biopsie du premier ganglion lymphatique relais ou "ganglion sentinelle", va permettre affiner le diagnostic et va entraîner **un curage ganglionnaire complet**. Il semble cependant qu'il n'y ai pas d'avantage supplémentaire à faire un curage contre une simple observation chez les patients présentant une métastase ganglionnaire régionale (Delgado 2017). Enfin, si le mélanome est métastatique, le pronostic vital est engagé.

Jusqu'en 2010, les seuls traitements disponibles pour le mélanome métastatique (MM) étaient les chimiothérapies classiques, avec les agents alkylants de l'ADN (Fotémustine, Dacarbazine Témazolomide entre autres) ou l'utilisation d'interleukine-2 à haute dose. Le taux de réponse était malheureusement très faible ($\approx 15\%$) et n'entraînait que peu d'augmentation de la survie globale (Yang and Chapman 2009).

III.8.a. *Emergence des thérapies ciblées, une vraie révolution*

Le génotypage systématique des mélanomes a permis de mettre en exergue des profils génétiques spécifiques du mélanome et donc des cibles potentielles, à l'origine de l'émergence récente de traitements personnalisés. Historiquement, les premières thérapies ciblées sont apparues dans les années 2000. Utilisées dans les cancers du sang ou les cancers du sein de mauvais pronostic, elles ont montré une efficacité sans égale et ont permis d'améliorer la survie des patients. L'imatinib, autorisé en 2002, et le trastuzumab, apparu en 2006, ont révolutionné la prise en charge des patients atteints de leucémie myéloïde chronique et de cancer du sein « HER2 », respectivement.

Ces thérapies se présentent généralement sous la forme d'anticorps monoclonaux, d'inhibiteurs de kinases ou d'inhibiteurs de l'angiogenèse. De nos jours, en France, plus de vingt thérapies ciblées ont une autorisation de mise sur le marché, ciblant les différents cancers suivants : la leucémie myéloïde chronique, la leucémie aiguë lymphoblastique, les tumeurs stromales digestives, les cancers du sein, gastrique, colorectal, du poumon et le mélanome. Pour la petite information, 71 % des dépenses d'anticancéreux dans le secteur public sont pour les thérapies ciblées (Institut national du cancer 2015).

Le mélanome a vu une révolution de son traitement en 2012, avec l'apparition de petites molécules, comme le **PLX4032 (Vémurafénib)** et le **GSK2118436 (Dabrafénib)**, ciblant sélectivement la forme mutée de BRAF, la protéine BRAFV600E. Ce sont des inhibiteurs sélectifs de type I, **antagonistes compétitifs de la liaison de l'ATP**. Les premières études en 2010 sur le PLX4032 ont montré des résultats très prometteurs sur les mélanomes mutés BRAF, que ce soit *in vitro* ou *in vivo* (Flaherty, Puzanov et al. 2010, Yang, Higgins et al. 2010). La rapidité de la mise sur le marché de cette molécule a mis en évidence le fort besoin de nouveau traitement anti-mélanome ainsi que l'efficacité du PLX4032. En effet, le vémurafénib permet une **augmentation significative de la survie** des patients avec **un taux de réponse d'environ 70%** (Chapman, Hauschild et al. 2011). Bien que les réponses à ces inhibiteurs de BRAF soient impressionnantes, la **durée de la réponse est limitée** en raison d'apparition de résistance, et des signes de progression de la maladie peuvent être observés 6 à 8 mois après le début du traitement. (Wagle, Emery et al. 2011, Finn, Markovic et al. 2012).

III.8.b. Mécanismes de résistance ou comment passer outre les traitements

Les cellules de mélanome sont hautement hétérogènes, indépendamment de leur profil mutationnel et épigénomique. Elles expriment une grande plasticité, avec plusieurs sous-clones de tumeurs soutenus par le microenvironnement. Ce microenvironnement soutient la croissance tumorale et le maintien de deux populations, les cellules tumorales à cycle lent, type cellules souches, et les cellules ayant réalisé leur TEM. Les cellules de mélanome acquièrent leur résistance soit par des mécanismes dit primaires, la pression sélective des thérapies favorisant des clones résistants préexistants, soit secondaires en tant que processus évolutif acquis au cours du traitement (Figure 7).

Pour 25% des patients, la présence des résistances intrinsèques (ou primaires) va faire qu'ils ne seront pas répondeurs aux traitements. Les autres patients vont développer des résistances dites extrinsèques (ou secondaires), induisant des rechutes agressives (Manzano, Layos et al. 2016). La frontière entre les deux n'étant pas toujours claire, je parlerai essentiellement des mécanismes acquis, sachant que les innées ont, pour certaines, été décrites dans les paragraphes précédents.

Dans la majeure partie des cas, ces résistances vont permettre aux cellules de mélanomes de maintenir une activation de la voie des MAPK (Arozarena and Wellbrock 2017).

Ainsi, une amplification de BRAF^{V600E} a été observée chez les patients traités par les inhibiteurs de BRAF (BRAFi) (Shi, Moriceau et al. 2012). Cela est dû à un gain de copie de l'allèle mutant de BRAF, entraînant sa surexpression et conduisant à la réactivation de ERK indépendamment de RAS. Cette augmentation du nombre de copies a été observée dans 20% des patients traités par BRAFi. Cette amplification peut aussi être induite par les inhibiteurs de MEK (Villanueva, Infante et al. 2013).

Une autre altération de BRAF^{V600E}, son épissage alternatif, permet à la cellule de résister aux traitements (Poulikakos, Persaud et al. 2011). Les cellules résistantes au vémurafénib expriment un variant de 61 kDa du BRAF^{V600E}, dépourvu des exons 4 à 8, une région englobant le domaine de liaison à RAS. p61 BRAF^{V600E} présente une dimérisation améliorée dans les cellules avec de faibles niveaux d'activation de RAS, par rapport au BRAF^{V600E} entier. Dans les cellules dans lesquelles p61 BRAF^{V600E} est exprimé, la signalisation ERK est résistante aux BRAFi.

La résistance acquise aux BRAFi se développe aussi par la régulation à la hausse de récepteurs tyrosine kinases (RTKs) comme PDGFR β (« Platelet-derived growth factor receptor ») ou par des mutations et amplification de NRAS (Nazarian, Shi et al. 2010). Les cellules tumorales avec de haut niveau de PDGFR β ont de faibles taux de RAS activé et, lorsqu'elles sont traitées, ne réactivent pas de manière significative la voie MAPK. Dans d'autres cas, des taux élevés de NRAS activé résultant de mutations entraînent une réactivation significative de la voie MAPK lors du traitement par PLX4032.

Enfin, la kinase COT (MAP3K8), en tant qu'agoniste de la voie MAPK, peut être à l'origine de résistance à l'inhibition de RAF (Johannessen, Boehm et al. 2010). COT active ERK par le biais de mécanismes dépendant de MEK, indépendamment de RAF. De plus, l'expression de la COT est associée à une résistance *de novo* dans les lignées cellulaires BRAF^{V600E} et à une résistance acquise dans des cellules de mélanome de patients en rechute après un traitement par inhibition de MEK ou de RAF.

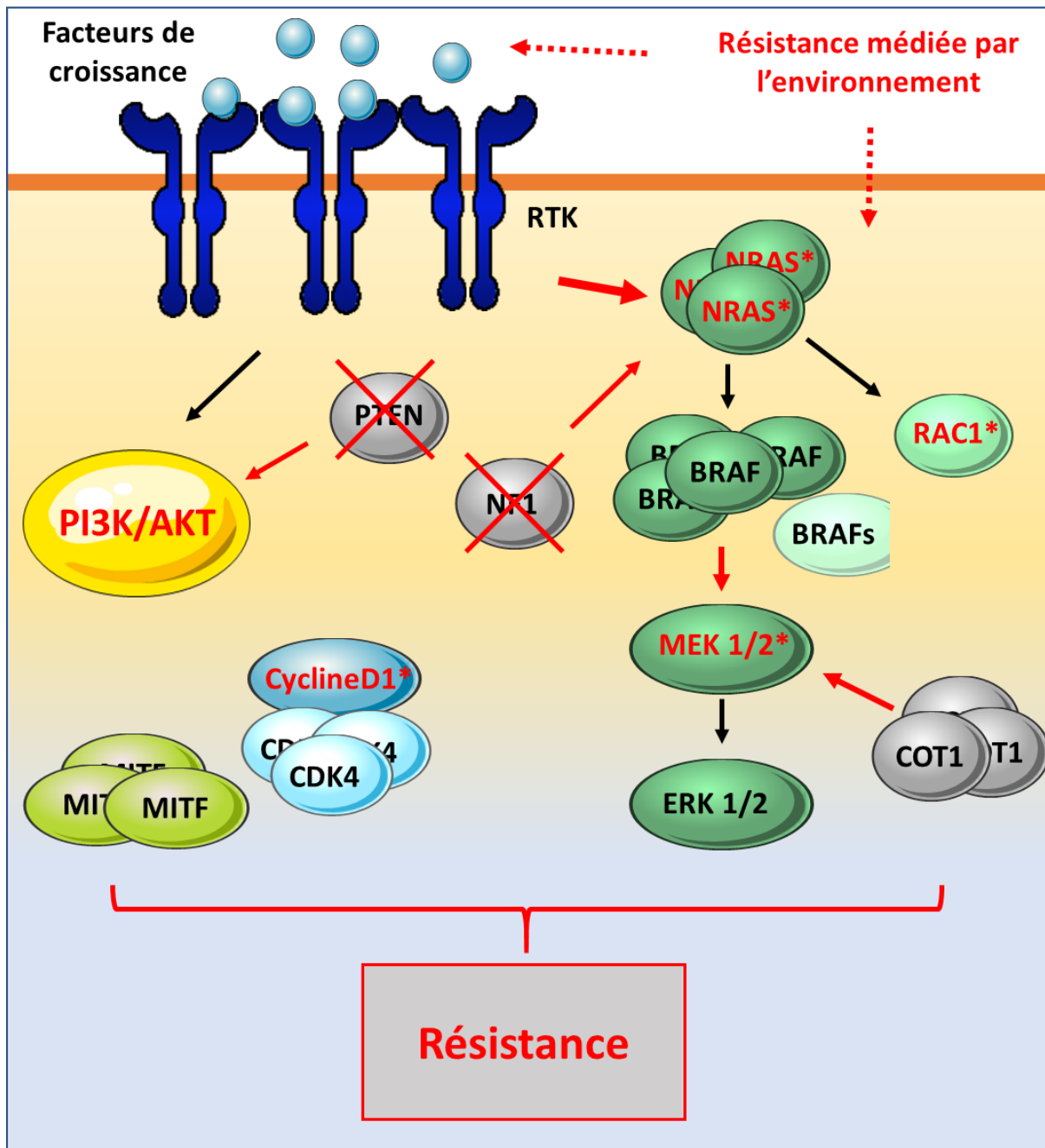


Figure 7 : Mécanismes de résistance intrinsèques et extrinsèques dans le mélanome

La résistance du mélanome peut en partie s'expliquer par les modifications représentées ci-dessus : surexpression des RTK, mutation et amplification de NRAS, mutation de RAC1, de MEK, de la cyclineD1 ou de AKT, délétion de PTEN ou NF1, amplification de CDK4, MITF, COT1 ou BRAF et épissage alternatif de BRAF.

BRAFs, spliced BRAF ; RTK, Receptor tyrosine kinase

Ces résistances, outre réactiver la voie des MAPK, peuvent aussi activer la voie PI3K/AKT. On observe ainsi des mutations d'AKT, couplés ou non avec des délétions de *PTEN*, qui mènent à l'activation de cette voie et participe à cette résistance au BRAFi (Arozarena and Wellbrock 2017).

Enfin, un dernier type de résistance a été observé, qui n'implique pas directement la cellule de mélanome mais son microenvironnement. La pharmacorésistance médiée par l'environnement (ou EMDR pour « environmental-mediated drug resistance ») est une forme de résistance de novo qui protège les cellules tumorales des premiers effets de diverses thérapies. Cette résistance est rapidement induite, initiée par des facteurs présents dans le microenvironnement tumoral. Elle peut être subdivisée en deux catégories non exclusives. D'une part, la pharmacorésistance induite par les facteurs soluble (SFM-DR pour l'acronyme anglais), comme les cytokines, les chimiokines et les facteurs de croissance sécrétés par les cellules du stroma tumoral. On citera l'exemple de l'action du facteur de croissance hépatocytaire (HGF) produit par les cellules stromales qui entraîne via son récepteur MET la réactivation des voies MAPK et PI3K-AKT, et la résistance à l'inhibition de BRAF muté (Straussman, Morikawa et al. 2012). D'autre part, la pharmacorésistance médiée par l'adhésion cellulaire (CAM-DR pour l'acronyme anglais), qui est induite par l'adhésion des cellules tumorales à des fibroblastes stromaux ou à des composants de la MEC, tels que la fibronectine, la laminine et le collagène (Meads, Gatenby et al. 2009). Ainsi, des travaux récents ont montré que le PLX4720, en activant la production de fibronectine par les fibroblastes associés aux mélanomes, génère un microenvironnement permettant la réactivation de la voie ERK dans les cellules de mélanome via la signalisation Intégrine β 1-FAK-Src (Hirata, Girotti et al. 2015).

Afin de contrecarrer la réactivation de la voie BRAF/MEK/ERK, de nouveaux composés ont vu le jour et se sont ajoutés à l'arsenal des thérapies ciblées contre le mélanome. **Des inhibiteurs de MEK** ont eux aussi démontré leur efficacité dans le traitement des mélanomes, **améliorant la survie sans progression et la survie globale** dans le mélanome muté sur BRAFV600 (Falchook, Lewis et al. 2012, Flaherty, Robert et al. 2012). À la suite de cela, et toujours dans le but d'améliorer l'efficacité de ces thérapies, des tests de combinaison ont été effectués et ont démontré une meilleure survie globale comparé aux monothérapies avec les inhibiteurs de BRAF seuls ou les inhibiteurs de MEK seuls (Paraiso, Fedorenko et al. 2010, Long, Stroyakovskiy et al. 2014, Robert, Karaszewska et al. 2015). La **bi-thérapie** est maintenant le traitement utilisé en première intention en clinique.

Très récemment, **des inhibiteurs de ERK1/2** ont été testés dans des phases cliniques I, montrant une activité antitumorale chez des patients atteints de mélanome muté BRAFV600 (Moschos, Sullivan et al. 2018, Sullivan, Infante et al. 2018).

III.8.c. Stimuler le système immunitaire : l'avènement des immunothérapies

Une des caractéristiques spécifiques des cancers est **d'échapper au système immunitaire** (Hanahan and Weinberg 2011). Cela a pu être confirmé chez des sujets immunodéprimés, qui suite à une transplantation d'organe, étaient plus sujets à développer des cancers (Vajdic and van Leeuwen 2009). Le système immunitaire est donc essentiel à la surveillance tumorale. Les cancers vont alors mettre en place des mécanismes d'échappement pour éviter la reconnaissance du système immunitaire et la mort qui leur est associée. Les tumeurs peuvent cibler les lymphocytes T régulateurs et ainsi diminuer leur infiltration au sein de la tumeur, modifier la présentation des antigènes, modifier la production de médiateurs immunosuppresseurs etc. (Vinay, Ryan et al. 2015). C'est ainsi qu'a vu le jour **l'immunothérapie**. Elle vise à stimuler le système immunitaire d'une personne pour lui permettre de mieux reconnaître les cellules cancéreuses et de les détruire plus

efficacement. Plusieurs types d'immunothérapies ont été conçus, comme l'utilisation de lymphocyte T modifié, les cellules « Chimeric Antigen Receptor (CAR)-T » ou l'utilisation d'anticorps monoclonaux. Pour le mélanome, des inhibiteurs des points de contrôles immunitaires ou « immune checkpoint inhibitors » ont démontrés de fortes propriétés anti-tumorales.

En 2011, l'**ipilimumab**, un anticorps dirigé contre **CTLA-4** (Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4) a été approuvé par la « Food and Drug Administration » (FDA) pour traiter le mélanome non résecable ou métastatique. CTLA-4 est un récepteur membranaire exclusive des lymphocytes T cytotoxique, intervenant dans la phase dite d'activation des lymphocytes, mais ayant un rôle inhibiteur de l'activité cytotoxique. L'approbation est venue suite à un essai clinique de phase III montrant une **amélioration de la survie globale de 10,1 mois**, contre 6,4 mois dans le groupe de contrôle, avec un taux de réponse faible ($\approx 10\%$). Le suivi à long terme des patients ayant reçu l'ipilimumab a montré qu'un fort pourcentage était encore en vie à deux et cinq ans (Hodi, O'Day et al. 2010).

Deux nouveaux inhibiteurs ont reçu leur approbation de la FDA en 2014, le **pembrolizumab** et le **nivolumab**. Ces deux anticorps monoclonaux sont dirigés contre le récepteur de mort cellulaire programmé 1 (**PD-1** ou « **programmed cell death receptor 1** ») et inhibent ainsi l'interaction avec ses ligands PD-L1 (CD274) et PD-L2 (CD273). PD-1 est exprimée sur les cellules T activées, les cellules B, les monocytes et les cellules « natural killer » (NK). PD-L1 et PD-L2, les ligands de PD-1, sont principalement exprimées sur des cellules présentatrices d'antigène telles que les macrophages et les cellules dendritiques, mais peuvent également être exprimées par les cellules tumorales. La formation du **complexe PD-L1/2 - PD-1 va inhiber l'activité du lymphocytes T** (Franklin, Livingstone et al. 2017). Le pembrolizumab a montré des taux de réponse global d'environ 40% (Robert, Schachter et al. 2015), contre 32% chez les patients traités par nivolumab (Weber, D'Angelo et al. 2015). Depuis 2016, la FDA a élargi l'utilisation du pembrolizumab et du nivolumab en tant que traitement de première intention du mélanome non résecable ou métastatique, quel que soit le statut mutationnel. L'ipilimumab est quant à lui relégué comme traitement de deuxième intention, ainsi qu'en traitement adjuvant chez les patients atteints d'un mélanome complètement résecqué.

La combinaison des deux anticorps est en phase clinique, et laisse à penser que la combinaison serait plus efficace, au détriment d'une augmentation des effets secondaires graves (grade 3-4) (Redman, Gibney et al. 2016).

Ces résultats sont très prometteurs et donnent de l'espoir quant à la survie des patients. Cependant, il ne faut pas oublier de prendre en compte les effets secondaires, qui pour certains sont sérieux, comme des réactions auto-immunes sous immunothérapie.

Afin de réduire au maximum ses effets secondaires tout en améliorant la réponse thérapeutique, des études cliniques ont vu le jour pour évaluer les effets combinatoires entre thérapies ciblées et immunothérapies. Des études de phase I ont montré la non toxicité de la combinaison, et des études de phase II sont en cours de recrutement (Karachaliou, Gonzalez-Cao et al. 2017).

Bien que les avancés dans le traitement du mélanome soient prodigieuses, son hétérogénéité et son adaptabilité aux thérapies en font un cancer très résistant, entraînant de nombreuses impasses thérapeutiques. Une compréhension plus approfondie du mélanome permettra le développement de thérapies innovantes, pour le traiter ou empêcher l'apparition de résistances aux thérapies ciblées.

Notre équipe s'intéresse à la protéostasie cellulaire au sein du mélanome comme nouvelle cible thérapeutique.

Partie 2 : Le Système Ubiquitine-Protéasome

Au sein de chaque organisme, les cellules vont développer des programmes biologiques complexes en fonction de leur matériel génétique et en réponse à leur environnement. Pour développer ces programmes, les cellules vont synthétiser, réguler et dégrader une multitude de protéines effectrices. Cet ensemble de protéines est nommé **le protéome**.

La synthèse protéique étant un processus très énergétique (la transcription, la maturation, l'export et traduction étant nécessaires à la synthèse), des mécanismes de régulation de l'activité, de la stabilité, ou de la localisation par exemple sont mis en place afin de réguler le protéome, sans avoir à synthétiser de nouvelles protéines. Cette régulation peut se faire par le clivage ou la formation de liaisons covalentes entre des groupements moléculaires et des protéines déjà existantes. On parle alors de **Modifications Post-Traductionnelles** (MPT). Ces modifications covalentes, souvent réalisées par des enzymes, peuvent être classées en trois catégories basées sur les processus suivants : **le clivage** (élimination de la méthionine initiateur par exemple), **la liaison** (tel que la fixation de groupes chimiques comme le groupe phosphate) et **la réticulation** (comme les liaisons disulfure) (Farriol-Mathis, Garavelli et al. 2004). L'ajout d'un groupement phosphate est l'exemple le plus commun. Cette phosphorylation, qui active généralement une protéine, est essentielle à une grande partie des processus biologiques, du cycle cellulaire et la transduction de signaux, tel que la voie des MAPK (cf. [Partie 1 III.5.a](#)).

La dégradation des protéines est nécessaire à l'homéostasie protéique, en permettant l'élimination des protéines endommagées, inutiles ou à courte durée de vie. Au cours de la protéolyse, les liaisons peptidiques qui lient les acides aminés sont hydrolysés et les acides aminés sont libérés et redirigés vers la synthèse protéique. Les cellules eucaryotes présentent plusieurs systèmes protéolytiques : **les lysosomes, l'autophagie et le système ubiquitine-protéasome (SUP)** principalement.

Historiquement, la dégradation des protéines était considérée comme lysosomal-dépendante et ATP-indépendante. Ce n'est que dans la fin des années 70 que la protéolyse cellulaire fut révolutionnée. La découverte d'un processus de conjugaison de polypeptide, ATP-dépendant, entraînant la dégradation des protéines (Hershko, Ciechanover et al. 1980). Le système Ubiquitine-Protéasome voit le jour, et ces travaux ont même débouché sur le prix Nobel de Chimie de 2004.

Le SUP est désormais reconnu comme le système majeur de la dégradation des protéines cellulaires, responsable de la dégradation d'environ 80% des protéines (Rock, Gramm et al. 1994). Ce processus hautement complexe et spécifique, avec une régulation temporelle très fine, joue donc un rôle majeur dans de très nombreuses fonctions cellulaires (cycle cellulaire, mort cellulaire, parmi tant d'autres) ainsi que dans de nombreuses pathologies (Glickman and Ciechanover 2002).

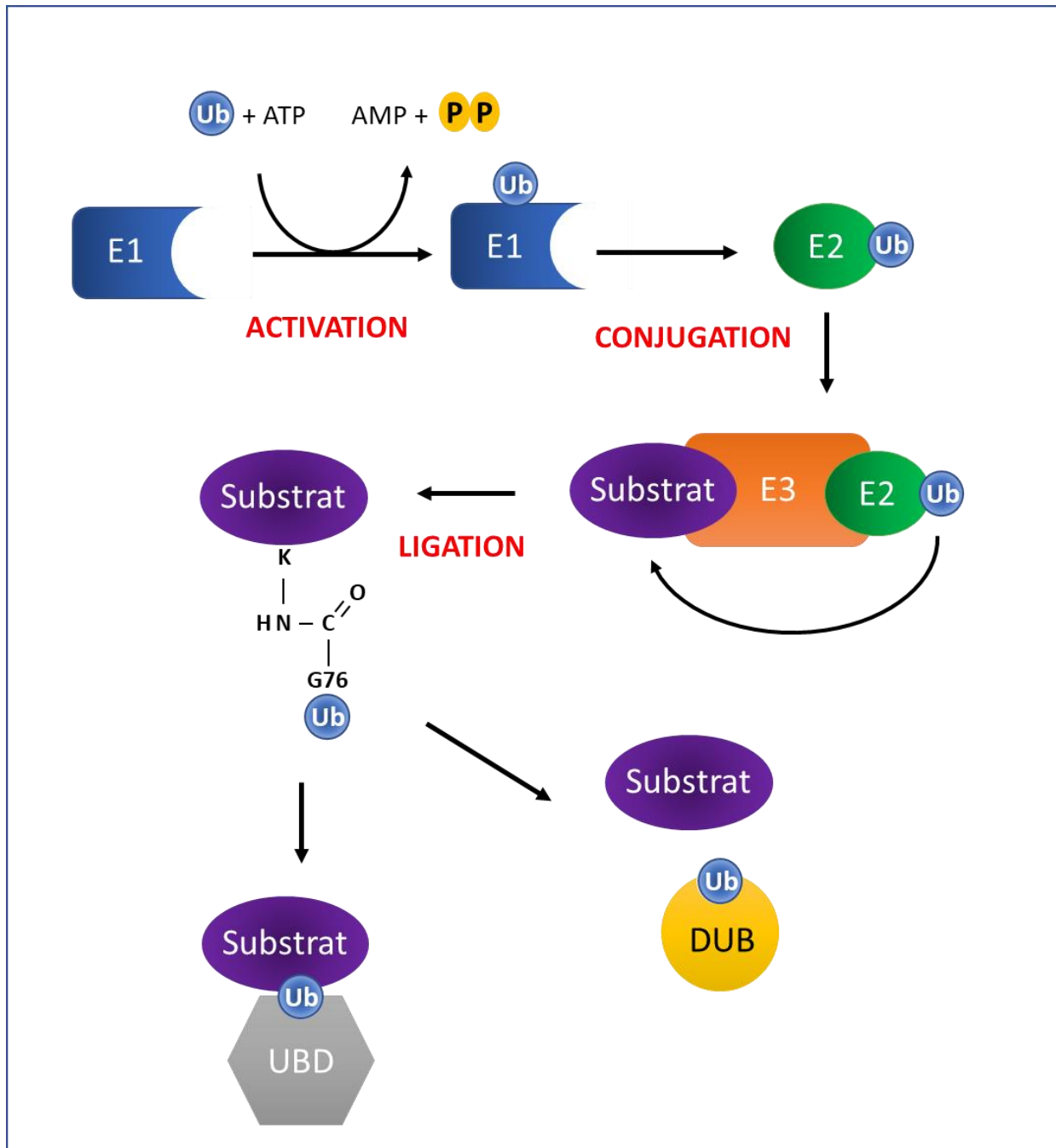


Figure 8 : Mécanisme moléculaire de l'ubiquitination et de la déubiquitination

L'ubiquitination passe par 3 étapes : activation, conjugation et ligation. L'ubiquitine ainsi ajoutée peut être soit reconnue par des UBD et induire un effet cellulaire ou soit par des DUB qui vont l'enlever du substrat.

Ub, ubiquitin ; E1, ubiquitin activating enzyme ; E2, ubiquitin-conjugating enzyme ; E3, ubiquitin ligase ; UBD, protéine à ubiquitin binding domain ; DUB, déubiquitinase

I. Principes généraux de l'ubiquitination

Le SUP repose sur une succession d'étapes qui vont mener à la lyse protéique. La liaison de manière covalente d'une ou plusieurs molécules **d'ubiquitine** sur le substrat cible la dirige vers le **protéasome 26S qui la dégrade**, permettant le recyclage **des acides aminés et de l'ubiquitine (Ub)**. La fixation covalente de l'Ub aux protéines implique une cascade de trois classes d'enzymes (Figure 8 et Figure 9) :

- En premier lieu, l'extrémité C-terminale de Ub forme une liaison thioester avec la cystéine catalytique d'une enzyme d'activation E1 (ubiquitin activating enzyme). Cette activation est une réaction ATP-dépendante.
- L'Ub activée est ensuite transférée de l'E1 à la cystéine catalytique de l'enzyme de conjugaison E2 (ubiquitin-conjugating enzyme), formant une nouvelle liaison thioester.
- L'enzyme E2 coopère alors avec un enzyme de liaison E3 (ubiquitin ligase) pour transférer l'Ub sur le substrat. Deux mécanismes sont possibles pour le transfert de l'Ub (Figure 10).

Une fois l'ubiquitination accomplie, le code ubiquitine est lu et reconnu par des protéines comportant des « ubiquitin binding domain » (UBDs) qui vont transmettre des signaux, ou reconnu par des déubiquitinases (DUB) qui vont catalyser la réaction inverse et retirer l'Ub des protéines ubiquitinées (Figure 8).

II. Ecriture du code ubiquitine par les ubiquitine ligases

Tout code fonctionnel nécessite son assemblage spécifique, par analogie, une maison ne peut se construire qu'à la suite de travaux spécifiques réalisés dans un ordre précis. De la même manière, l'ubiquitination spécifique de substrats ne sera possible qu'à la suite de réactions séquentielles par des enzymes spécifiques à chaque fonction (Figure 9).

II.1. L'activation par les E1

L'étape d'activation étant extrêmement spécifique à l'Ub, seulement deux enzymes E1, UBA1 ou UBA6 (« Ubiquitin-like modifier-activating enzyme ») sont nécessaires (Pelzer, Kassner et al. 2007, Schulman and Harper 2009). Il existe cependant des protéines similaires à l'ubiquitine, appelé « ubiquitin-like proteins » ou Ubls, qui vont suivre le même type de cascade d'activation, élargissant ainsi le code de l'ubiquitination. Sept autres enzymes E1 sont nécessaires pour l'activation de ces Ubls (Schulman and Harper 2009). Une spécificité de fonction peut apparaître dès l'activation, par exemple, l'E1 ATG7 fonctionne au sommet d'un système de signalisation nécessaire à l'autophagie. ATG7 reconnaît des Ubls spécifiques (ATG8 et ATG12), essentielle à la régulation de l'autophagie.

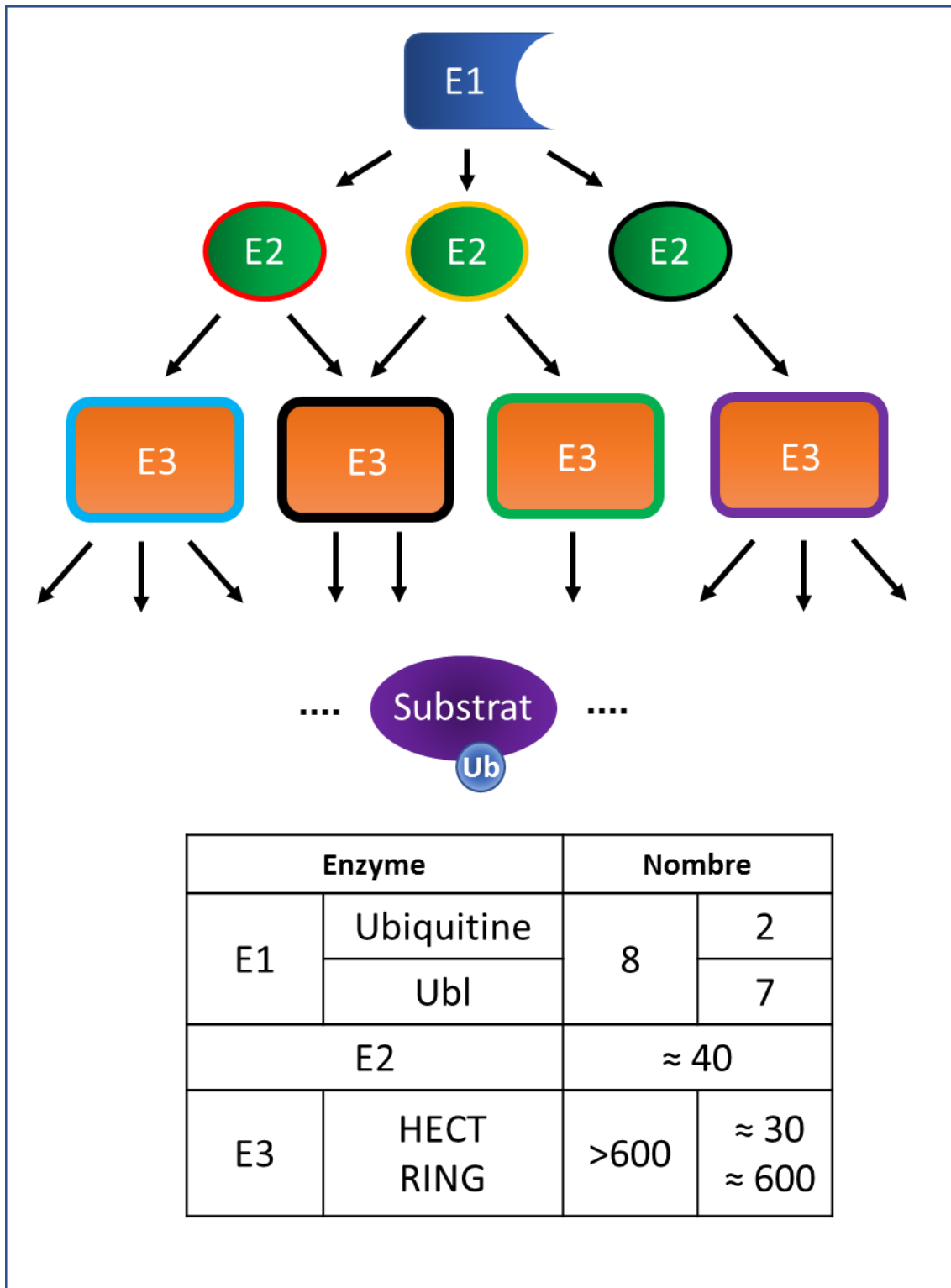


Figure 9 : Représentation schématique de l'organisation hiérarchique du système d'ubiquitine.

Une de deux enzymes d'activation E1 est capable de d'activer l'ubiquitine et de la transférer à l'une des quelconques 40 enzymes de conjugaison E2. Ces enzymes E2 ont une spécificité pour certaines enzymes E3, elles-même ubiquitinant un ou plusieurs substrats selon leur propre spécificité.

II.2. *La liaison sur les E2*

Bien plus qu'un simple transporteur d'Ub, l'enzyme E2 joue un rôle prépondérant dans la sélection de l'E3 et donc du résultat de l'ubiquitination. Elles constituent le centre de tri qui va mener à un substrat spécifique ou à un type d'ubiquitination particulier. Toutes les E2 interagissent avec une enzyme E1 et une ou plusieurs E3 (Figure 9).

On dénombre 38 gènes codant pour environ 40 enzymes E2. Toutes ces enzymes partagent un domaine central catalytique conservé d'environ 150 acides aminés, suffisant pour l'activité enzymatique. Ce domaine est connu sous le nom de « Ubiquitin Conjugation domain » et contient la cystéine catalytique, qui forme une liaison thioester avec l'Ub (Ye and Rape 2009). On estime que la sélection des E3 par les E2 pourrait se faire par la partie N ou C-terminal.

Outre la sélection des E3, certaines E2 peuvent de régulation d'activité d'autres enzymes. C'est le cas pour l'enzyme E2 UBCH5B qui régule l'activité de la DUB OTUB1. La formation du complexe DUB-E2 stabilise le repliement de l'hélice de liaison à l'Ub d'OTUB1 et stimule sa fonction de déubiquitination (Wiener, DiBello et al. 2013).

II.3. *Le transfert final de l'ubiquitine sur le substrat par les E3*

Dernière étape de l'ubiquitination, **les E3 ligases** vont conférer la spécificité à l'ubiquitination en reconnaissant les substrats cibles et en médiant le transfert de l'Ub de l'enzyme E2 au substrat. Cette grande famille d'enzymes, qui compte plus de 600 membres, se scindent en 3 groupes : les **HECT** (homologous to the E6AP carboxyl terminus) E3, les **RING** (really interesting new gene) E3 et les **RBR** (RING-InBetweenRing-RING) E3 ligases.

Deux mécanismes distincts ont été identifiés au sein des E3 pour le transfert de l'Ub. Les HECT et les RBR, de manière similaire, vont capter l'Ub de l'enzyme E2 et former un intermédiaire catalytique avec l'Ub, avant de la transférer sur le substrat. Les RING E3 quant à elles servent uniquement d'entremetteur entre de l'E2 et le substrat (Figure 10).

1) Les HECT E3 ligases

Les HECT E3 tirent leur nom de leur domaine HECT. Ce domaine d'environ 350 acides aminés, très conservé, dont la partie N-terminal permet l'interaction avec l'E2 et une partie C-terminal qui contient la cystéine du site actif qui forme le thioester avec l'ubiquitine. Parmi leurs nombreuses fonctions, les HECT E3 sont reconnus pour leur rôle majeur dans le trafic intracellulaire des protéines, la réponse immunitaire ainsi que dans plusieurs voies de signalisation régulant la prolifération cellulaire (Metzger, Hristova et al. 2012).

2) Les RING E3 ligases

Les RING E3 possèdent un « RING zinc finger », domaine qui ne forme pas de liaison avec l'Ub mais dont le rôle est de rapprocher l'E2 et son substrat, facilitant le transfert direct de l'Ub. MDM2, l'E3 responsable de l'ubiquitination de TP53, fait partie de cette famille, qui regroupe à elle seule plus de 600 enzymes potentielles (Metzger, Hristova et al. 2012).

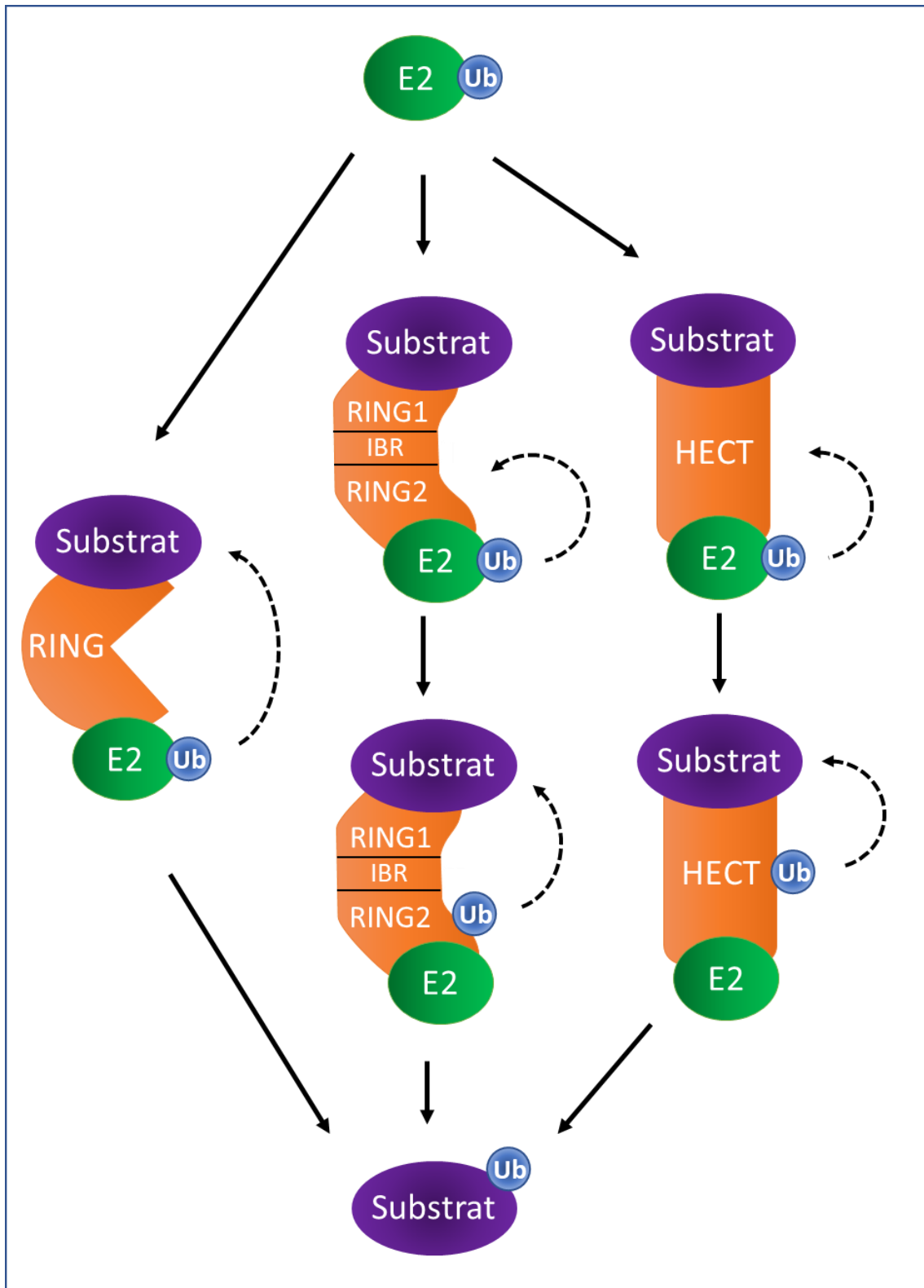


Figure 10 : Différents mécanismes de transfert de l'ubiquitine aux substrats par les E3 ligases

3) Les RBR E3 ligases

Contrairement aux ligases E3 classiques de type RING ou HECT, toutes les ligases RBR E3 identifiées à ce jour sont des protéines à multidomains complexes (Spratt, Walden et al. 2014). Elles contiennent deux domaines grossièrement conformes à la séquence consensus des RING E3 ligase, RING1 et RING2. RING1, domaine canonique, permet la reconnaissance de l'enzyme E2 tandis que le domaine RING2, comprenant un domaine catalytique à cystéine, va permettre la formation d'un complexe E3-Ub, similaire aux HECT E3. Un troisième domaine central, situé entre les séquences de RING proposées, est nommé à juste titre IBR (« InBetweenRING »). Ainsi, la nomenclature RBR est née. Le domaine IBR adopte la même conformation que le domaine catalytique de RING2, sans avoir le résidu catalytique de cystéine et l'activité d'ubiquitination. Sa fonction n'est pas clair pour le moment, il pourrait s'agir d'un rôle structural (Wenzel and Klevit 2012).

III. Le code ubiquitine

III.1. *L'Ubiquitine, une molécule socle à de nombreux processus cellulaires*

L'ubiquitine est une petite protéine de 76 acides aminés et 8,5 kDa, hautement stable et conservée dans l'évolution, d'où son nom de protéine ubiquitaire (Figure 11). La structure de l'ubiquitine est ponctuée de plusieurs régions hydrophobes qui sont reconnues par des domaines de liaison à l'ubiquitine, les UBDs (cf. III.4). Cependant, les résidus les plus importants de l'Ub sont la méthionine 1 (**M1**), la glycine 76 (**G76**), ainsi que les 7 lysines qui la compose : **K6, K11, K27, K29, K33, K48 et K63**. C'est par ces différents résidus que l'Ub va former des liaisons isopeptidiques avec les protéines cibles ou avec d'autres molécules d'Ub. C'est en effet une des caractéristiques marquantes de l'**ubiquitination**, qui peut voir l'ajout d'une molécule ou la formation de chaîne d'Ub. J'y reviendrai dans la section III.3.

III.2. *Ubiquitin - like proteins, ou comment élargir le domaine de l'ubiquitine*

Tout comme l'Ub, les « **UBiquitin-Like proteins** » (**UBL**) sont des protéines composées d'un « β -grasp fold », structure tertiaire dans laquelle une hélice alpha est maintenue entre 5 feuillets bêta (Figure 11). Une dizaine d'UBLs différentes ont à ce jour été identifiées, et régulent un ensemble étonnamment divers de processus cellulaires, y compris le transport nucléaire, la protéolyse, la traduction, l'autophagie et les voies antivirales (van der Veen and Ploegh 2012). Ces UBLs vont elles aussi se lier de manière covalente à leurs substrats via une cascade enzymatique analogue à l'ubiquitination des protéines.

Ces UBLs, bien que structurellement apparentées, ne présentent que peu d'homologie de séquence avec l'Ub, avec un maximum de 55% d'homologie pour la protéine **NEDD8** (Hochstrasser 2009). La voie NEDD8 par exemple joue un rôle essentiel dans l'activation de l'activité ubiquitine ligase E3 des cullin-RING ligases, elles-mêmes responsables de l'ubiquitination de plusieurs substrats impliquées dans la régulation de fonctions cellulaires normales mais aussi pathologiques, tels que c-Myc ou p27 qui sont importantes dans le mélanome (Soucy, Dick et al. 2010).

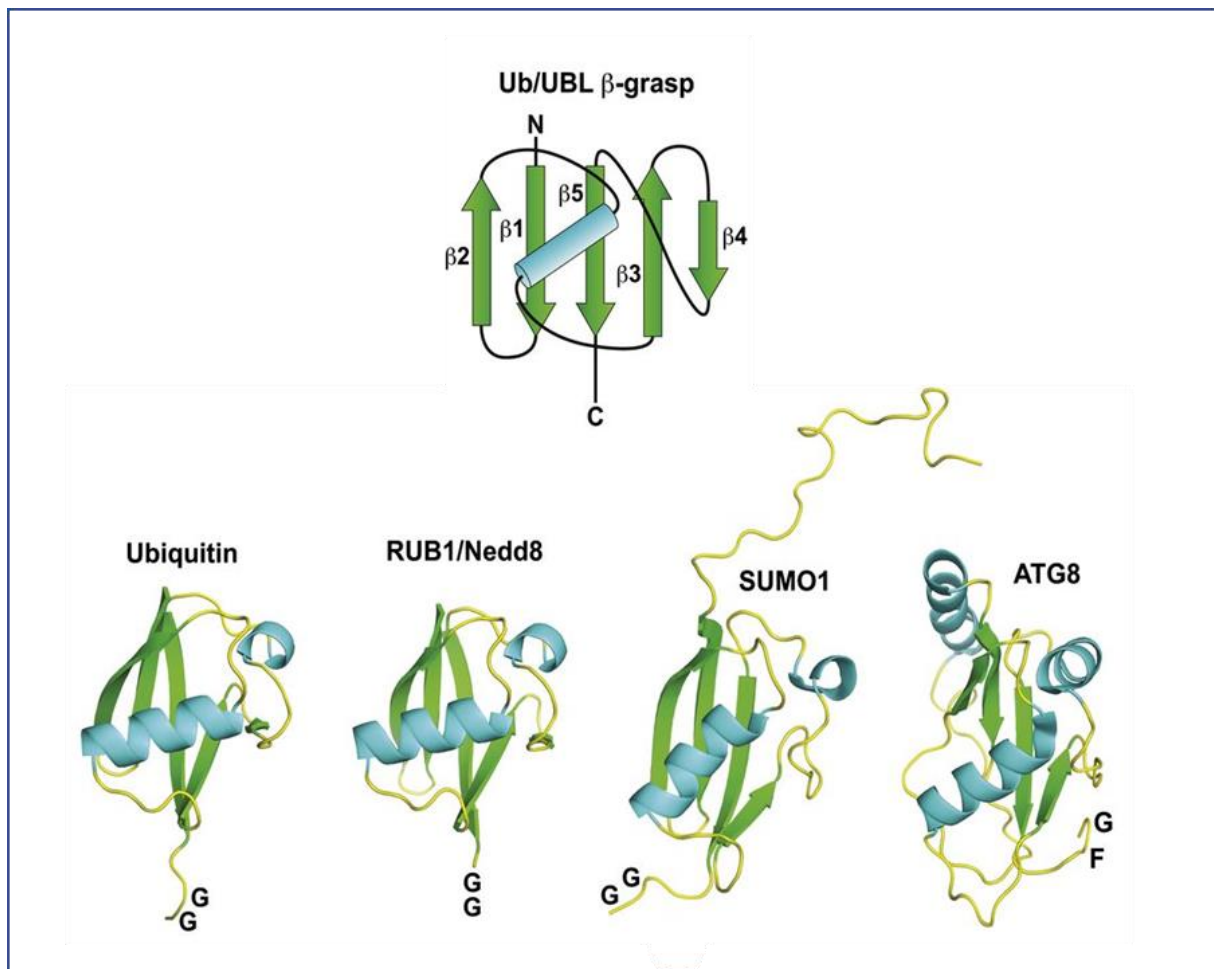


Figure 11 : Représentation de la structure 3D d'une molécule d'ubiquitine ou des ubiquitine-like protein

Schéma de la structure générale d'une Ub/UBL (haut). Structure tertiaire d'une molécule d'ubiquitine et des ubiquitine-like protein (bas).

Tiré de Richard D. Vierstra (2012)

Les protéines **SUMO** (« small ubiquitin-related modifier ») sont des protéines analogues à l'ubiquitine de ≈ 10 kDa. Comme l'ubiquitylation, la SUMOylation est une modification protéique dynamique et réversible. Au niveau moléculaire, la modification SUMO crée ou perturbe fréquemment une interface dans les interactions intermoléculaires, ou induit un changement conformationnel impactant la protéine cible (van der Veen and Ploegh 2012). Dans le contexte du mélanome, la protéine MITF a été montrée comme cible de la SUMOylation, qui module l'activité transcriptionnelle de MITF sur certains de ces promoteurs (Murakami and Arnheiter 2005).

III.3. Le type de liaison à l'Ub, centre d'aiguillage pour une réponse cellulaire variée

L'ubiquitination des protéines est un processus complexe en raison de la diversité de liaison possible. L'Ub va pouvoir se lier à une ou plusieurs lysines de son substrat cible, ou bien sur elle-même à travers ses propres lysines ou via son résidu méthionine N-terminal, créant ainsi des chaînes d'Ub. La génération d'un large éventail d'ubiquitination, par le nombre de molécules ajoutées ou par le type de liaison formée, offre une diversité structurelle permettant une reconnaissance spécifique par un vaste nombre de protéines possédant des domaines de liaison à l'Ub, permettant des réponses cellulaires nombreuses et variées (Komander and Rape 2012) (Figure 11 et Figure 12).

III.3.a. La monoubiquitination

La monoubiquitination est la modification la plus simple possible, consistant en l'ajout d'une seule molécule d'Ub sur une lysine du substrat cible. De nombreux rôles ont été décrits pour la monoubiquitination (Hicke 2001). Les histones H2A et H2B peuvent se voir ajouter une molécule d'Ub. Cette modification permet le recrutement d'histone méthyltransférase et qui vont impacter les premières étapes de l'initiation de la **transcription** et de l'élongation (Weake and Workman 2008).

Chez les levures ou les mammifères, la monoubiquitination est suffisante pour déclencher **l'endocytose** de récepteurs membranaires dans les vésicules endocytiques primaires (Nakatsu, Sakuma et al. 2000). La monoubiquitination pourrait aussi moduler le trafic de molécules "cargos" au sein des endosomes. Il semble que la monoubiquitination de protéines contenant des domaines d'interaction à l'Ub (« ubiquitin-interacting motifs », UIM) soit activée à la suite de la liaison à des molécules cargos mono-ubiquitinées, modifiant leur affinité et entraînant le relargage et donc le trafic de ces cargos (Haglund, Di Fiore et al. 2003).

Les dommages à l'ADN sont aussi pris en charge via la monoubiquitination. Le recrutement de TP53BP1 sur le site du dommage se fait via l'histone H2A ubiquitinée sur la lysine 15 (Fradet-Turcotte, Canny et al. 2013, Uckelmann and Sixma 2017).

III.3.a. La multi-monoubiquitination

Lorsqu'un même substrat est monoubiquitiné sur plusieurs lysines différentes, on parle alors de multi-monoubiquitination. Pour le moment, la multi-monoubiquitination a seulement été décrite pour réguler l'endocytose des RTK. **EGFR** et **PDGFR** sont monoubiquitinés sur plusieurs sites après leur activation induite par le ligand, suffisant à la fois pour l'internalisation et le mouvement de ces RTK vers le lysosome (Haglund, Sigismund et al. 2003).

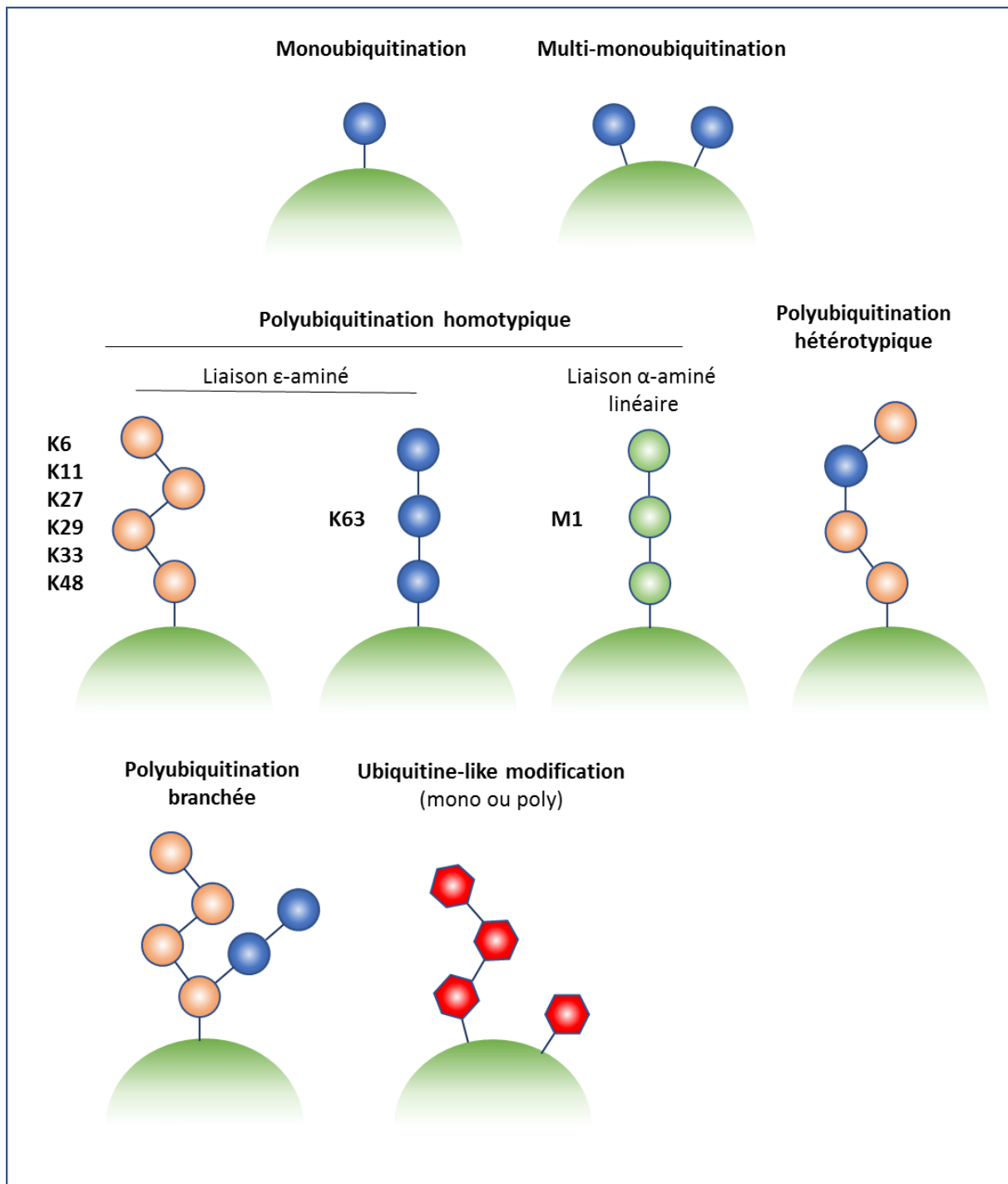


Figure 12 : Principaux types de liaisons de l'ubiquitine

De nombreuses architectures de l'ubiquitine sur les substrats (en vert) sont connues, chacune jouant un rôle spécifique.

III.3.b. La polyubiquitination, principal signal pour la dégradation des protéines par le protéasome

Le code ubiquitine, lorsque nécessaire, peut transmettre un signal via **l'ajout d'une chaîne d'Ub**. On parle alors de **polyubiquitination**. En effet, la molécule d'Ub possède elle-même des sites de liaison à l'Ub : 7 sites de liaisons ϵ -aminé via 7 lysines (**K6, K11, K27, K29, K33, K48 et K63**) et 1 site liaison α -aminé (**M1**) sont capable de former une liaison isopeptidique avec la G76 d'une autre molécule d'Ub (Figure 12). Si l'on prend en compte le nombre de molécules ajoutées, ainsi que les divers choix de liaison, qu'elle soit homotypique ou hétérotypique, le nombre de possibilité qu'ouvre la polyubiquitination est considérable (Akutsu, Dikic et al. 2016). Cela s'explique par le fait que chaque type de liaison possède une géométrie spécifique, exposant différentes régions de l'Ub, permettant sa reconnaissance et sa différenciation vis-à-vis des autres chaînes (Komander and Rape 2012).

Ce sont les enzymes E3 et/ou les E2 qui vont être responsables de la formation de ces chaînes d'Ub. En effet, les différentes enzymes ou complexes E2/E3 vont adopter une conformation particulière limitant l'addition des chaînes d'Ub à un certain type de liaison. Par exemple, chez la levure, bien que l'enzyme E2 Rad6 soit capable de promouvoir l'ajout d'une chaîne de polyubiquitine (polyUb), lorsqu'elle est associée à l'E3 Rad18, le substrat cible n'est que mono-ubiquitiné, Rad18 occupant le site d'élongation (Komander and Rape 2012).

Il est bien établi que les chaînes d'ubiquitine servent de signal de dégradation. Ces chaînes ciblent les protéines au protéasome 26S, un complexe protéolytique nécessaire à la division cellulaire chez tous les eucaryotes (Chau, Tobias et al. 1989). Grâce à une étude utilisant différentes Ub mutées, il a été montré que **le ciblage au protéasome par l'Ub se fait à la suite d'une liaison à la lysine 48 (K48)** (Chau, Tobias et al. 1989). Des chaînes contenant au moins quatre molécules d'ubiquitine liées en K48 sont nécessaires pour une interaction de haute affinité avec le protéasome (Thrower, Hoffman et al. 2000). Une analyse quantitative du protéome faisant suite à l'inhibition du protéasome a confirmé que les chaînes K48 étaient les plus abondantes (Xu, Duong et al. 2009).

Cependant, cette même étude a aussi mis en évidence l'accumulation d'autres types de liaison. Alors que les liaisons K48 augmentent d'environ 8 fois sous inhibition du protéasome, les liaisons en K11 augmentent elles-aussi d'environ 4 fois (Xu, Duong et al. 2009). Les chaînes K11 présentent une affinité à la sous-unité 5 du protéasome humain, comparable à celle des chaînes K48 (Baboshina and Haas 1996). Ces résultats nous montrent le lien entre des liaisons en K11 et une dégradation via le protéasome. Ce signal de dégradation par les **chaînes K11 va aussi activer la dégradation dépendante du réticulum endoplasmique (RE)** (« Endoplasmic Reticulum-Associated Protein Degradation » ou ERAD), qui permet la régulation du cycle cellulaire (Matsumoto, Wickliffe et al. 2010, Komander and Rape 2012).

Différents motifs de dégradation (ou dégrons), vont être reconnus par les complexes E2/E3 et induire leur polyubiquitination et leur adressage au protéasome (pour review : Glickman and Ciechanover 2002). Pour n'en citer qu'un, la phosphorylation de p27 permet sa reconnaissance et ubiquitination par SCF(Skp2), et donc sa dégradation (Tsvetkov, Yeh et al. 1999).

III.3.c. La polyubiquitination et ses activités non-dégradatives

Je vais me concentrer sur la description des chaînes "canoniques", homotypiques de préférence, dont je vais essayer de vous lister de manière non exhaustive les fonctions cellulaires non-dégradatives connues à ce jour :

1) Les chaînes K6

Les fonctions cellulaires des chaînes d'ubiquitine liées en K6 ne sont actuellement peu claires. Cependant, les liaisons K6 ont été indirectement associées **aux mécanismes de réparation de l'ADN** par l'E3 ligase BRCA1-BARD1 (Morris and Solomon 2004).

Les chaînes K6 assemblées par Parkin, une RBR E3 ligase se sont également avérées importantes pour **la mitophagie**, recyclage sélective de mitochondries endommagées ou en excès, par macroautophagie (Michel, Swatek et al. 2017).

2) Les chaînes K11

Les chaînes Ub présentant des liaisons de type K11 sont peu nombreuses, représentent que ~2% des chaînes polyubiquitinées (Wickliffe, Williamson et al. 2011). Ce niveau est variable, car les liaisons K11 peuvent s'accumuler lors de divers processus cellulaires. Les chaînes K11 sont fortement régulées à la hausse dans les cellules humaines mitotiques (Matsumoto, Wickliffe et al. 2010).

En plus de leur rôle dans **le contrôle du cycle cellulaire humain**, des chaînes d'ubiquitine liées en K11 ont été impliquées dans **l'adaptation cellulaire à l'hypoxie**. Il a été montré qu'elles régulent la stabilité du facteur de transcription HIF-1 α et le niveau d'expression de HIF-2 α (Akutsu, Dikic et al. 2016).

3) Les chaînes K27

Concernant les chaînes de polyubiquitynation en K27, elles sont associées **aux dommages à l'ADN et à la réponse immunitaire**. Cette liaison représente le type de chaîne principale retrouvée sur la chromatine lors de dommages à l'ADN. Les médiateurs cruciaux de cette réponse (53BP1 par exemple) reconnaissent ces chaînes K27 sur les histones H2A et H2A.X et l'incapacité d'une cellule à former des liaisons K27 empêche l'activation de la réponse aux dommages à l'ADN (Gatti, Pinato et al. 2015). Suite à la détection d'ADN microbien, les voies de signalisation IRF-3 (« interferon regulatory factor-3 ») et/ou NF- κ B (« nuclear factor-kappa B ») sont activées et mènent à la formation de chaînes K27 afin de transmettre le signal de danger (Akutsu, Dikic et al. 2016).

4) Les chaînes K29

Récemment, il a été démontré que l'E3 ligase Smurf1 (« Smad ubiquitylation regulatory factor 1 »), régulant normalement la voie BMP (« bone morphogenetic protein »), pouvait catalyser l'ajout de chaînes d'Ub en K29, conduisant à la **répression de la signalisation Wnt / β -caténine**, voie de signalisation elle aussi essentiel à l'embryogenèse (Fei, Li et al. 2013, Akutsu, Dikic et al. 2016).

5) Les chaînes K33

Certaines E3 ligases fixent des chaînes d'Ub liées à K33 afin de réguler **le trafic intracellulaire**. Cette modification sur la coronine 7 par exemple crée une surface de liaison pour la liaison d'Eps15, un adaptateur de la clathrine requis pour le trafic post-Golgi. Le complexe se lie à l'actine fibrillaire et empêche sa dépolymérisation. Cette action contribue à la modification du réseau d'actine et donc du trafic du Golgi (Yuan, Lee et al. 2014).

6) Les chaînes K48

Bien que normalement associée à la **dégradation**, une chaîne de polyUb K48 peut aussi avoir des propriétés non-catalytiques. Met4 est un facteur de transcription retrouvé dans la levure, régulant l'expression du métabolisme de la méthionine. Lorsque le milieu extérieur est riche en méthionine, Met4 subit rapidement une polyubiquitination en K48, et perd son activité transcriptionnelle sans pour autant être dégradée. Il s'avère que le facteur de transcription lui-même contient un domaine de liaison à l'ubiquitine qui interagit avec ses propres chaînes d'ubiquitine pour limiter la longueur de la chaîne au-dessous du seuil requis pour la reconnaissance par le protéasome. Bien que l'on ne sache toujours pas comment la polyubiquitination régit l'activité transcriptionnelle de Met4, ces résultats démontrent clairement que la polyubiquitination liée à Lys48 peut inactiver une protéine modifiée sans la cibler sur le protéasome pour le dégrader sous certaines conditions.

7) Les chaînes en K63

Les chaînes liées à K63 sont maintenant connues pour signaler trois voies: **la voie de réparation des dommages à l'ADN, la réponse inflammatoire** et la plus connue, celle du **trafic intracellulaire des protéines** (Pickart and Fushman 2004).

Dans le premier cas, la polyubiquitination en K63 de PCNA (« proliferating cell nuclear antigen ») l'engagerait vers un mode de réparation de l'ADN (Hoegel, Pfander et al. 2002).

Le rôle de la polyubiquitination en K63 dans l'inflammation est de stimuler l'activité de la voie NF-κB. L'ubiquitine ligase TRAF6 (« TNF-receptor associated factor 6»), suite à son auto-polyubiquitination, active la kinase IKK (« inhibitor of κB kinase »), conduisant à l'activation de NF-κB dans les lymphocytes T par un mécanisme mal connu (Pickart and Fushman 2004, Sun and Chen 2004, Komander and Rape 2012).

Mais le rôle le plus notoire de la polyub K63 est celui du trafic intracellulaire des protéines. Les chaînes UbK63 de différentes longueurs et/ou conjuguées par de différents complexes E2/E3 sont retrouvées sur les cargos d'endocytose venant de la membrane plasmique, les cargaisons des corps multivésiculaires (MVB ou « multivesicular bodies), les protéines virales en cours de bourgeonnement. Lorsque ces chaînes agissent comme signal de tri spécifique vers les MVB, elles dirigent les protéines vers une dégradation lysosomale (Erpapazoglou, Walker et al. 2014).

8) Les chaînes linéaires en M1

Les chaînes linéaires d'Ub en M1 jouent un rôle essentiel **dans les réponses inflammatoires et immunitaires** en régulant l'activation du facteur de transcription NF-κB. NEMO, une sous-unité du

complexe IKK, est modifiée avec des chaînes liées à M1 et participe à la prévention de l'inflammation et la régulation de la signalisation immunitaire (Tokunaga, Sakata et al. 2009)

III.4. Mécanisme de reconnaissance des substrats

La diversité du code Ubiquitine indique l'existence de protéines capables de lire ce code et de l'interpréter. En effet, le génome eucaryote code pour un grand nombre de protéines comportant des UBD de différents types (Tableau 3) (Hicke, Schubert et al. 2005, Dikic, Wakatsuki et al. 2009). Ces domaines peuvent être répartis selon leur spécificité structurale en cinq grandes familles :

- les UBD à hélice α (comprenant entres autres les UBA (Ub-associated domain) ou les UIM (Ub-interacting motif))
- les UBD à doigts de zinc (« Zinc finger ») avec par exemple NZF (Npl4 zinc finger)
- les UBD à domaine Plekstrin homology (PH)
- les UBD à domaine Ubiquitin-conjugating (Ubc)-like
- et les UBD à domaine particulier

Les UDB peuvent interagir directement avec la monoubiquitine et/ou des chaînes polyubiquitines, par des liaisons non-covalentes faibles, rendant ces interactions hautement réversibles et transitoires. Les UBD sont structurellement diversifiées et se retrouvent dans les protéines qui contiennent différentes caractéristiques structurales et qui ont des fonctions biologiques différentes, que ce soit des enzymes qui catalysent l'ubiquitylation ou la déubiquitination, ou dans les récepteurs de l'Ub.

La reconnaissance de l'Ub se fait en partie grâce à deux régions hydrophobiques (Ile44 et Ile36) mais cela ne suffit pas à différencier les nombreuses conformations possibles (Komander and Rape 2012). Pour cela, certaines protéines vont se servir de la distance spécifique entre 2 molécules d'Ub, qui varie selon le type de liaison. Ainsi, Rap80, qui sépare deux de ces UBD par une hélice de sept résidus, va être capable de reconnaître la distance entre deux lysines liées en K63 (Sims and Cohen 2009). Certaines vont aussi mettre à profit la conformation (plus ou moins compacte ou même linéaire des chaînes) pour reconnaître spécifiquement le type de modification.

Plus particulièrement, les domaines UBA et UIM jouent un rôle important dans le ciblage au protéasome. RAD26 est une protéine dont le rôle est de délivrer des protéines ubiquitinées au protéasome. Elle présente un domaine UBL capable de se lier au protéasome 26S et de manière simultanée se lie aux substrats polyubiquitinés grâce à deux domaines UBA (Mueller and Feigon 2003).

Ubiquitin Binding Domains	Protéine représentative	Fonction
Hélice α		
UIM	S5a (humain) et Rpn10 (levure), Vps27, STAM, epsins et RAP80 (UIMC1)	Dégradation par le protéasome, Endocytose, Biogenèse des MVB et Réparation de l'ADN
IUIM (ou MIU)	RABEX5	Endocytose
DUIM	HRS	Biogenèse des MVB
UBM	Polymerase iota et reversionless 1	Tolérance aux dommages à l'ADN
UBAN	NEMO, ABIN1–ABIN3 et optineurin	Voie de signalisation NF- κ B
UBA	Rad23 (levure) et R23A (humain), Dsk2 et NBR1	Ciblage au protéasome, Régulation des kinases et Autophagie
GAT	GGA3 et TOM1	Biogenèse des MVB
CUE	Vps9, TAB2 et TAB3	Endocytose et Régulation des kinases
VHS	STAM et GGA3	Biogenèse des MVB
Doigt de Zinc (ZnF)		
UBZ	Polymerase-h; polymerase-k et Tax1BP1	Tolérance aux dommages à l'ADN et Voie de signalisation NF- κ B
NZF	NPL4, Vps36, TAB2 (MAP3K7IP2) et TAB3 (MAP3K7IP3)	ERAD, Biogenèse des MVB et Régulation des kinases
ZnF A20	RABEX5 (RABGEF1) et A20 (TNFAIP3)	Endocytose et Régulation des kinases
Znf UBP (ou PAZ)	Isopeptidase T (USP5) et HDAC6	Fonction du protéasome, Formation des aggresome et Autophagie
Domaine Plekstrin homology (PH)		
PRU	RPN13	Fonction du protéasome
GLUE	EAP45 (VPS36)	Biogenèse des MVB
Domaine Ubiquitin-conjugating (Ubc)-like		
UEV	UEV1 (UBE2V1) et MMS2	Réparation de l'ADN, Biogenèse des MVB et Régulation des kinases
UBC	UBCH5C (UBE2D3)	Transfert d'Ubiquitin
Autres		
SH3	Sla1 et CIN85 (SH3KBP1)	Endocytose
PFU	Ufd3 (Doa1)	ERAD
Jab1/MPN	Prp8	Epissage de l'ARN
<p>* Les noms alternatives des protéines sont entre parenthèses. <u>ABIN</u>, A20 binding inhibitor of nuclear factor-κB protein; <u>CUE</u>, coupling of ubiquitin conjugation to endoplasmic reticulum degradation; <u>DUIM</u>, double-sided UIM; <u>Dsk2</u>, dominant suppressor of KAR1; <u>EAP45</u>, ELL-associated protein of 45 kDa; <u>ERAD</u>, endoplasmic reticulum-associated degradation; <u>GAT</u>, GGA et TOM; <u>GGA</u>, Golgi-localized, γ-ear-containing, ARF-binding; <u>GLUE</u>, GRAM-like ubiquitin-binding in EAP45; <u>HDAC6</u>, histone deacetylase 6; <u>HRS</u>, hepatocyte growth factor-regulated tyrosine kinase substrate; <u>IUIM</u>, inverted UIM; <u>MVB</u>, multivesicular body; <u>NBR1</u>, next to BRCA1 gene 1; <u>NEMO</u>, nuclear factor-κB essential modulator; <u>NPL4</u>, nuclear protein localization 4; <u>NZF</u>, nuclear protein localization 4 ZnF; <u>PFU</u>, PLAA family ubiquitin binding; <u>PRU</u>, plekstrin homology receptor for ubiquitin; <u>RABEX5</u>, RAB5 guanine nucleotide exchange factors; <u>RAP80</u>, receptor associated protein 80; <u>RPN13</u>, regulatory particle, non-ATPase-like 13; <u>SH3</u>, Src homology 3; <u>STAM</u>, signal-transducing adapter molecule; <u>TAB</u>, TAK1 binding protein; <u>TOM</u>, target of Myb; <u>UBA</u>, ubiquitin-associated; <u>UBAN</u>, ubiquitin binding in ABIN et NEMO; <u>UBC</u>, ubiquitin-conjugating; <u>UBM</u>, ubiquitin-binding motif; <u>UBP</u>, ubiquitin-binding protein; <u>UBZ</u>, ubiquitin-binding ZnF; <u>UEV</u>, ubiquitin-conjugating enzyme E2 variant; <u>UIM</u>, ubiquitin-interacting motif; <u>VHS</u>, VPS27, HRS et STAM; <u>VPS</u>, vacuolar protein sorting-associated protein.</p>		

Tableau 3 : Diversité fonctionnelle et structurelle des domaines de liaison à l'ubiquitine

Adapté d'après (Dikic, Wakatsuki et al. 2009)

IV. La dégradation des protéines par le SUP

Les raisons qui conduisent à la dégradation des protéines sont nombreuses et touchent toutes les protéines, ce qui en fait un processus majeur dans la régulation cellulaire. La voie de dégradation impliquant l'ubiquitine cible les substrats vers le protéasome.

IV.1. *Le protéasome, le complexe protéolytique du SUP*

Ce complexe enzymatique de 2,5 MDa également connu sous le nom de protéasome 26S présente une structure globale qui peut être divisée en deux sous-complexes majeurs : le cœur catalytique 20S qui contient les sous-unités à activité protéolytique et une particule régulatrice 19S qui régule la fonction du premier (Glickman and Ciechanover 2002, Tanaka 2009).

Il existe également un protéasome 30S, qui diffère du 26S par la présence de 2 particules 19S. Cependant, la littérature regroupe souvent ces deux entités sous le terme protéasome 26S, ce qui fait que les différences fonctionnelles entre ces 2 entités ne sont pas encore connues.

Après reconnaissance des substrats engagés dans la voie de dégradation, le protéasome va prendre en charge les protéines via sa partie 19S, les déplier et les déubiquitiner pour enfin les dégrader en son cœur 20S.

IV.1.a. *Le cœur catalytique 20S*

La protéasome 20S, en forme de tonneau, est composée de quatre anneaux hétéroheptamériques identiques deux à deux. Les deux anneaux internes β , composés de sept sous-unités ($\beta 1$ à 7), concentrent les activités protéolytiques catalytiques avec $\beta 1$, 2 et 5 tandis que les deux anneaux α externes ($\alpha 1$ à 7) agissent comme régulateur dans l'entrée des protéines dans le cœur (Figure 13).

La structure cristalline du protéasome 20S révèle que l'ouverture des anneaux α est presque complètement fermée, empêchant les protéines de pénétrer dans la chambre catalytique des anneaux β . De plus, les extrémités N-terminales des sous-unités α constituent une barrière physique supplémentaire pour l'accès aux sites actifs (Tanaka 2009). Les anneaux α externes servent aussi d'interface pour la liaison de particules régulatrices (PR), qui permettront l'ouverture des anneaux α et l'accès des protéines au cœur protéolytique (CP). Parmi les 7 sous-unités du cœur, seules $\beta 1$, $\beta 2$ et $\beta 5$ sont associées à des activités de type caspase (ou PGPH pour « peptidylglutamyl-peptide hydrolysing »), de type trypsine et de chymotrypsine, respectivement. Ainsi, $\beta 1$, $\beta 2$ et $\beta 5$ ont la capacité de cliver les liaisons peptidiques du côté C-terminal d'un résidu acide, basique et hydrophobe, respectivement. Le protéasome 20S dégrade de manière processive les protéines, générant des oligopeptides dont la longueur varie de 3 à 15 résidus d'acides aminés (Tanaka 2009).

Le CP mesure, à son maximum, 53 Å de largeur, bien que l'entrée soit étroite de 13 Å, suggérant que les protéines du substrat doivent être au moins partiellement dépliés pour entrer (Nandi, Tahiliani et al. 2006).

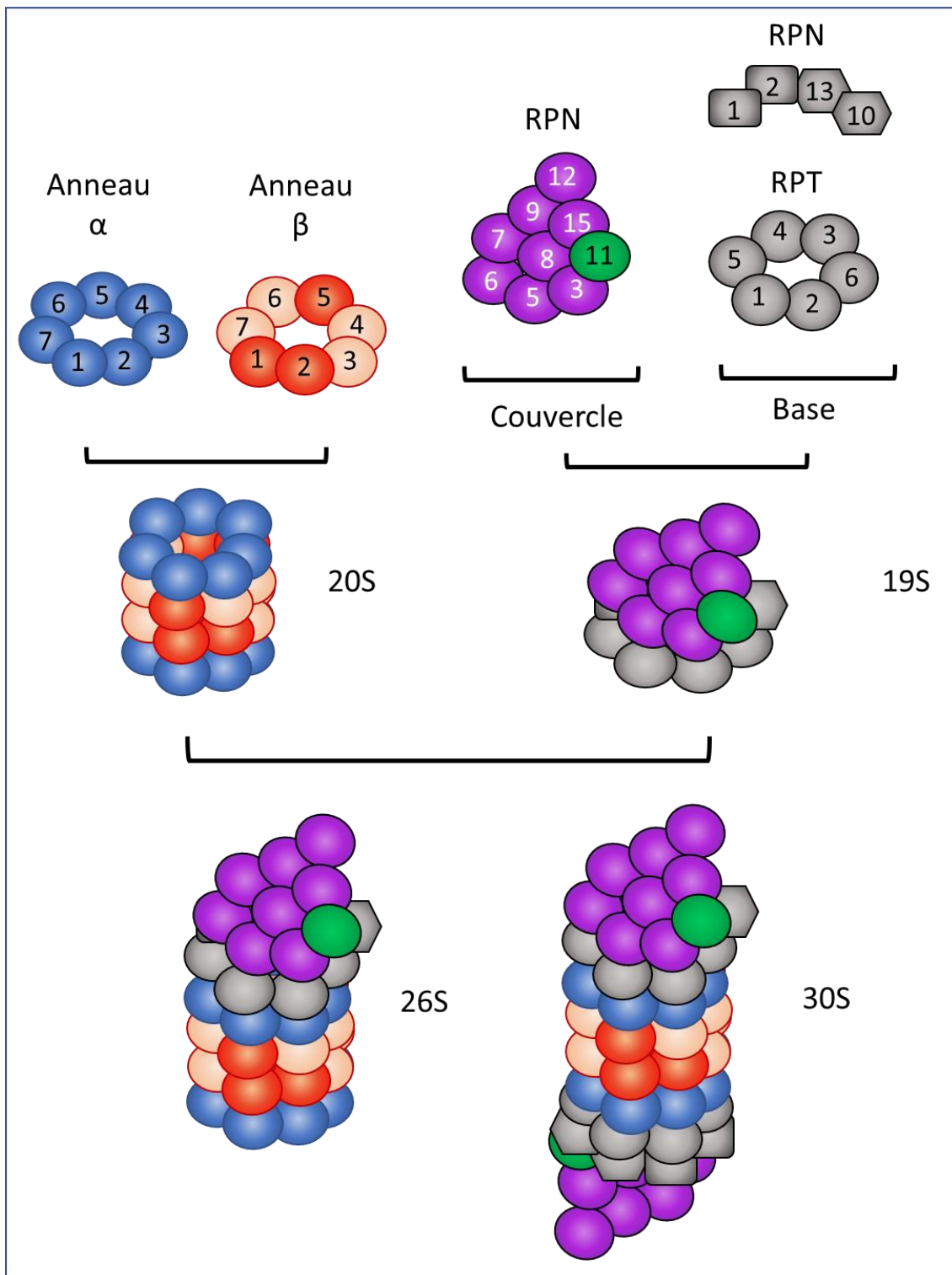


Figure 13 : Structure détaillée du protéasome

IV.1.a. La particule régulatrice 19S

La particule régulatrice 19S, aussi appelé PA700, est un complexe multifonctionnel de 19 sous-unités qui régulent la fonction du protéasome (Figure 13). La PR 19S est en effet divisée en deux parties à sous-unités multiples, la base et le couvercle, qui vont permettre l'identification, la liaison, la déubiquitination, le dépliage et la translocation des substrats vers le CP 20S (Arrigo, Tanaka et al. 1988, Knecht, Aguado et al. 2009).

La base comprend six ATPases (RPT 1-6), deux grandes sous-unités non-ATPase, RPN1 et RPN2, et deux sous-unités avec des récepteurs pour l'ubiquitine, RPN10 et RPN13. **La base du 19S a trois rôles fonctionnels : capturer les protéines** à dégrader via la reconnaissance de l'ubiquitine, **favoriser le dépliement** du substrat et **ouvrir le canal** dans l'anneau α .

Les six sous-unités RPT 1 à 6, de la famille des AAA+ ATPase, forment un anneau hétérohexamérique en contact direct avec l'anneau α du CP 20S et qui est responsable du déploiement et de la translocation du substrat dans la chambre de manière ATP-dépendante (Vigneron and Van den Eynde 2014).

Il semblerait que RPN2 soit nécessaire pour la liaison avec le 20S, alors que RPN1 sert de site d'accueil pour les facteurs de recrutement de substrats ubiquitinés (Rad23, Ddi1 et Dsk2) (Leggett, Hanna et al. 2002, Lander, Estrin et al. 2012). RPN1 est la sous-unité de fixation de la DUB USP14 tandis que la DUB UCHL5 se fixe sur RPN13 (Tanaka 2009). RPN10 et RPN13 fonctionnent comme des récepteurs d'ubiquitine capturent efficacement les substrats polyubiquitinés, en K48 notamment (D'Arcy and Linder 2012).

Le couvercle est composé d'au moins neuf sous-unités non-ATPases : RPN3, RPN5, RPN6, RPN7, RPN8, RPN9, RPN11, RPN12 et RPN15. La fonction principale du couvercle est de **déubiquitiner** les substrats capturés, un processus réalisé par la métalloisopeptidase RPN11 (ou PSMD14) afin de recycler les ubiquitines.

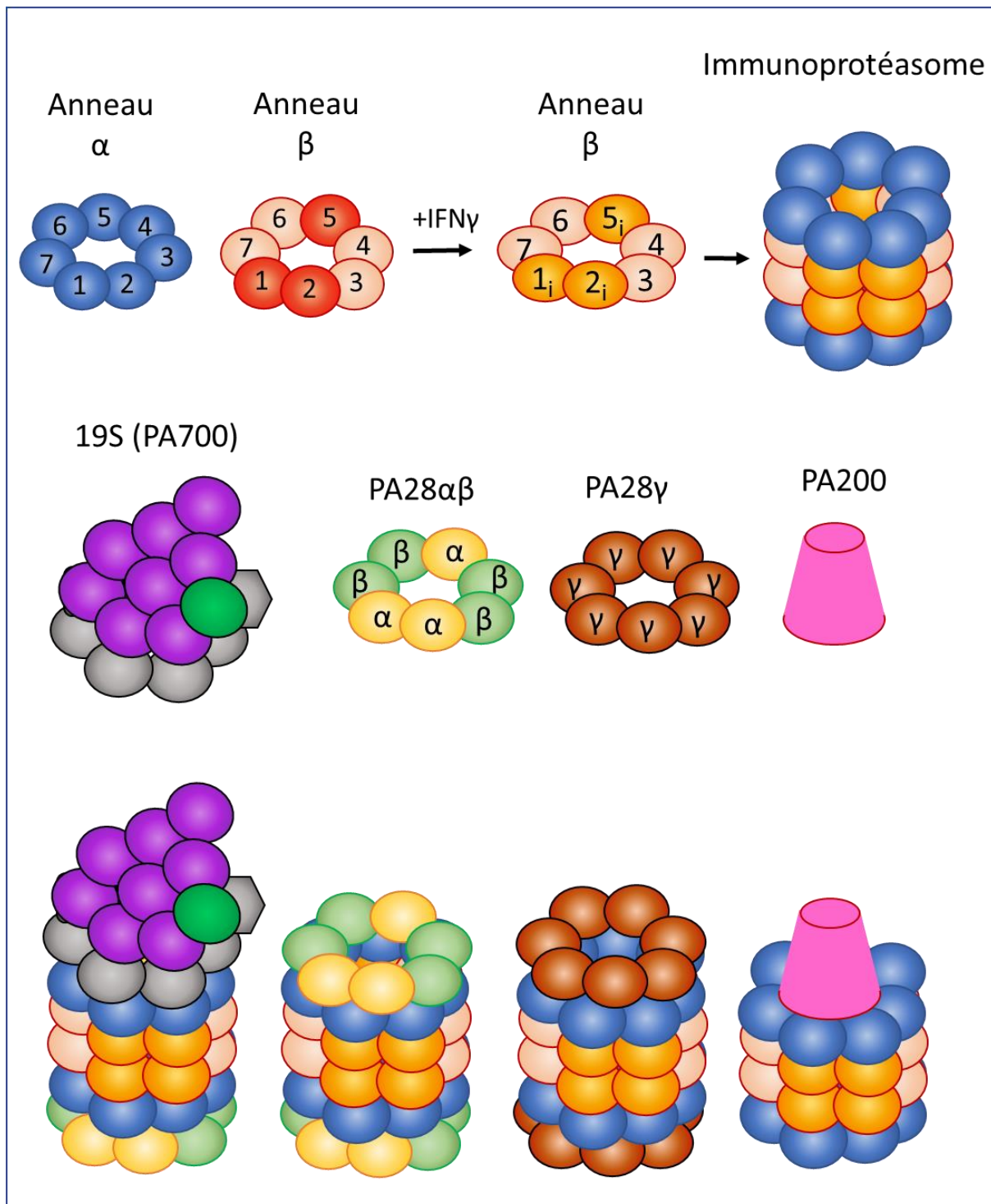


Figure 14 : Structure du cœur protéolytique de l'immunoprotéasome et des diverses particules régulatrices associées à l'immunoprotéasome

Une stimulation par l'IFN γ va induire le remplacement de β_1 , β_2 et β_5 par β_{1i} , β_{2i} et β_{5i} , pour former l'immunoprotéasome.

IFN γ , interféron γ

IV.2. *L'immunoprotéasome, un cousin de 26S à visée immunitaire*

Au cours d'une infection virale, les protéasomes jouent un rôle crucial dans la génération de peptides antigéniques et leur présentation par les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de type 1 (CMH-I), et la réponse immune. Un type spécialisé de protéasome appelé immunoprotéasome est exprimé de manière constitutive dans les cellules hématopoïétiques et induit lors d'une infection virale dans les cellules non immunes par l'interféron γ (IFN γ), et potentiellement le TNF α (Figure 14) (McCarthy and Weinberg 2015).

L'immunoprotéasome diffère du protéasome classique par ses sous-unités catalytiques du CP ainsi que par différents PR. Il a pour rôle de dégrader les protéines étrangères de manière spécifique afin **d'obtenir des antigènes à présenter aux cellules immunitaires**. Ainsi, un stimulus inflammatoire va entraîner l'expression de sous-unités protéolytiques spécifiques, nommées **$\beta 1i$, $\beta 2i$ et $\beta 5i$** , qui vont alors remplacer leurs homologues classiques. Je ne rentrerai pas dans les détails mais des combinaisons entre sous-unités β classiques et immuns peuvent exister, et il existe aussi un protéasome retrouvé spécifiquement dans le thymus composé des sous-unités $\beta 1i$, $\beta 2i$ et d'une sous-unité spéciale $\beta 5t$ (pour review : Vigneron and Van den Eynde 2014).

Ces protéases vont générer des peptides de 8 à 11 acides aminés, qui sont ensuite transloqués dans le RE, couplées aux protéines CMH-I et exporter à la membrane. Pour réguler cet immunoprotéasome 20S, la cellule va synthétiser des PR alternatifs : le régulateur PA28 $\alpha\beta$ (ou régulateur 11S), le régulateur PA28 γ et la PR PA200.

PA28 $\alpha\beta$, connu pour sa participation à la voie de dégradation et présentation des antigènes, est composé de deux sous-unités, α et β , formant un complexe hétéroheptamérique en forme d'anneau avec une conformation 3 α 4 β . Lui aussi induit après une exposition à l'IFN γ , il va pouvoir, comme son homologue la PR 19S, interagir avec l'anneau α du CP 20S.

Son homologue, PA28 γ , est lui associé aux protéasomes 20S, mais principalement dans le noyau et, contrairement au PA28 $\alpha\beta$, il n'est pas induit par l'IFN γ . Son rôle serait spécialisé dans le contrôle des niveaux de peptides biologiquement actifs dans le noyau (Wilk, Chen et al. 2000).

Enfin, PA200 est un PR n'utilisant pas l'ATP et fonctionnant de manière ubiquitine-indépendante. On pense généralement qu'il stimule l'hydrolyse des peptides mais pas des protéines car sa structure cristalline reflète une architecture fermée, peu propice à la dégradation (Stadtmueller and Hill 2011).

V. **Autres mécanismes de régulation de l'homéostasie protéique**

Le protéasome est donc une entité enzymatique complexe dont le rôle dans la régulation de l'homéostasie protéique n'est plus à démontrer. Ce n'est cependant pas le seul processus régulant cette homéostasie protéique. La cellule a mis en place divers moyens, autres que le protéasome, pour réguler son protéome, que ce soit des mécanismes d'aide au repliement des protéines ou de dégradation, lorsque nécessaire.

Dans des conditions physiologiques, les **chaperonnes** contrôlent le repliement des polypeptides sortant du ribosome, ou des protéines cytoplasmiques ainsi que celles présentes au sein du RE ou la matrice mitochondriale. Elles détectent tout repliement non conventionnel et se lient sur ces protéines mal repliées pour empêcher la formation d'agrégats protéiques.

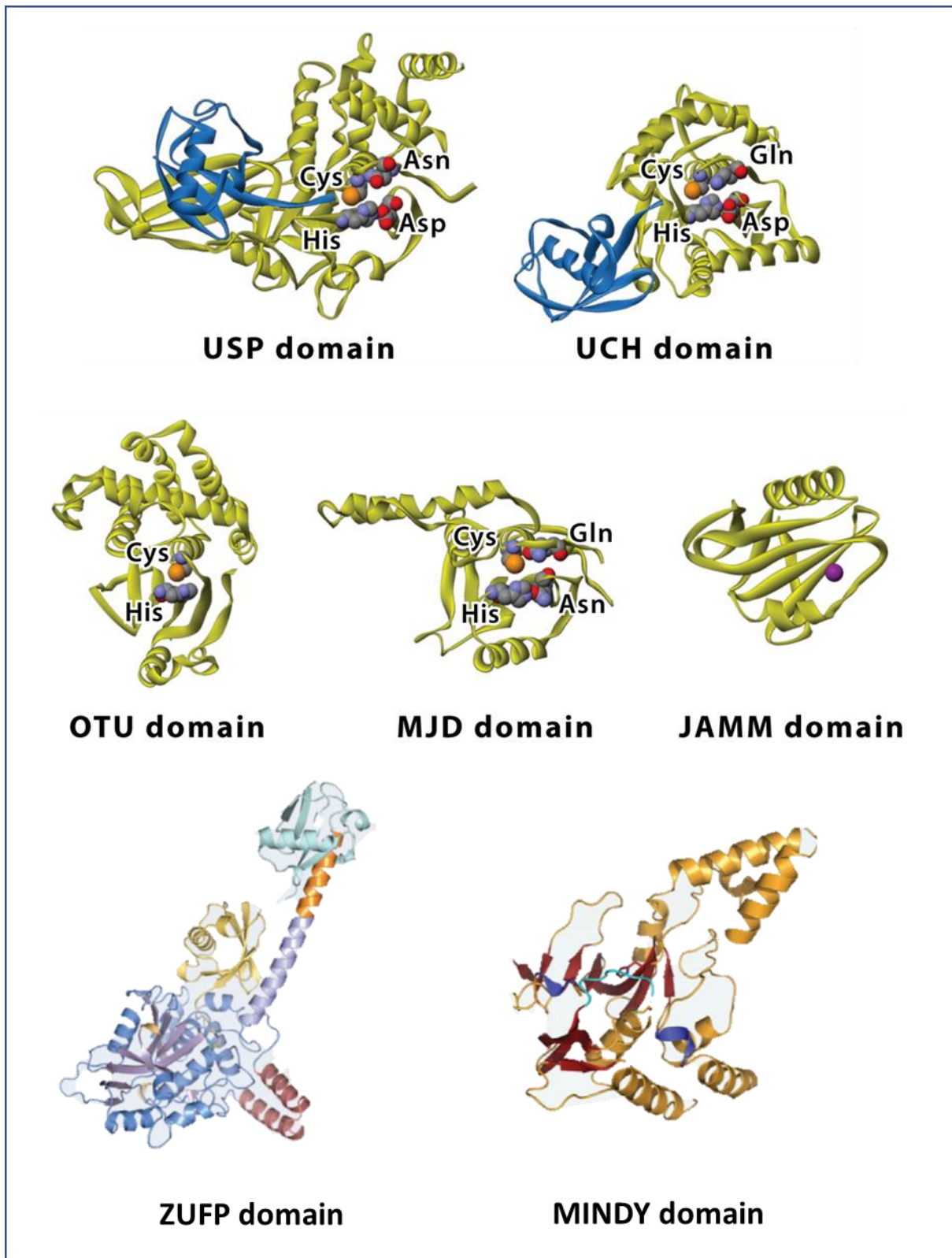


Figure 15 : Structure 3D des domaines catalytiques de chaque famille de déubiquitinases

Pas de structure disponible pour MCP1P

Tiré de Wang et al. (2018) et Abdul Rehman et al. (2016 et 2018)

Elles ont aussi un rôle enzymatique, leur permettant de déplier les protéines mal repliées afin qu'elles reprennent spontanément un repliement correct (Mattoo and Goloubinoff 2014). Les chaperonnes jouent aussi un rôle dans un processus de contrôle qualité des protéines au sein du RE. Jusqu'à 30% de toutes les protéines produites sont dirigées vers la voie de sécrétion, dont le site d'entrée est le RE. Afin de réguler le repliement des protéines, des processus regroupés sous le nom de UPR pour « Unfolded Protein Response » vont surveiller les conditions du RE, et son niveau de stress induit par les agrégats de protéines mal repliées.

Si stress il y a, les senseurs du stress du RE vont s'activer. ATF6, IRE1 et PERK représentent trois branches distinctes de l'UPR. L'activation de ATF6, IRE1 et PERK produit un facteur de transcription (ATF6(N), XBP1 et ATF4, respectivement) qui active des gènes pour contrecarrer ces stresses. La synthèse de chaperonnes ou l'augmentation de la taille du RE sont permettre l'amélioration de la capacité de repliement des protéines dans le RE. IRE1 (via RIDD) et PERK (via la phosphorylation de eIF2a) diminuent également la charge de protéines entrant dans le RE (Walter and Ron 2011, Cao and Kaufman 2012, Manie, Lebeau et al. 2014).

Lors d'erreurs de repliement non réversibles, les protéines mal repliées sont dégradées par une voie appelée dégradation des protéines associée au RE (ou ERAD pour « ER-associated protein degradation ») (Hiller, Finger et al. 1996, Lemus and Goder 2014). Brièvement, les chaperonnes vont reconnaître les substrats pour la dégradation, qui vont être retro-transloqués du RE vers le cytosol, polyubiquitinés et dégradés par le protéasome. Mais lorsque le stress du RE est trop important, l'UPR va alors activer des gènes de mort apoptotique, tels que CHOP.

Enfin, pour en citer un dernier, l'autophagie est un processus qui peut entre autres participer à la régulation de l'homéostasie protéique. L'autophagie est un processus d'autodégradation qui est important pour équilibrer les sources d'énergie aux moments critiques du développement mais joue également un rôle dans l'élimination des protéines mal repliées ou agrégées ainsi que l'élimination des organelles endommagés. L'autophagie est un processus sélectif en ce qui concerne l'élimination des organites, des ribosomes et des agrégats de protéines spécifiques (Glick, Barth et al. 2010).

VI. La suppression du code ubiquitine par les déubiquitinases

Comme dans tout processus cellulaire labile et réversible, et en particulier pour les MPT, il existe un groupe d'enzyme capable de catalyser le retrait du groupe chimique apposé. Les enzymes qui enlèvent l'Ub sont appelés des déubiquitinases ou DUBs.

VI.1. La grande famille des DUBs

Les déubiquitinases font partie du large groupe des protéases, enzymes coupant les liaisons peptidiques des protéines. Il en existe plus de 500, subdivisés en plusieurs classes selon leur mécanisme d'action : aspartique, serine, thréonine, cystéine et métalloprotéases (Puente and Lopez-Otin 2004). A l'heure actuelle, les DUBs connues sont des protéases à cystéine ou des métalloprotéases. Cette grande famille des DUBs comptait jusqu'en 2016 une centaine de membres subdivisés en six familles, selon leur type de domaine catalytique : ubiquitin C-terminal hydrolases (**UCHs**), ubiquitin-specific proteases (**USPs**), ovarian tumour proteases (**OTUs**), Machado-Joseph disease protease (**MJD**), monocyte chemotactic protein-induced protein 1 (**MCPIP1**) et les métalloprotéases JAB1/MPN/MOV34 (**JAMM/MPN+**) (Fraile, Quesada et al. 2012).

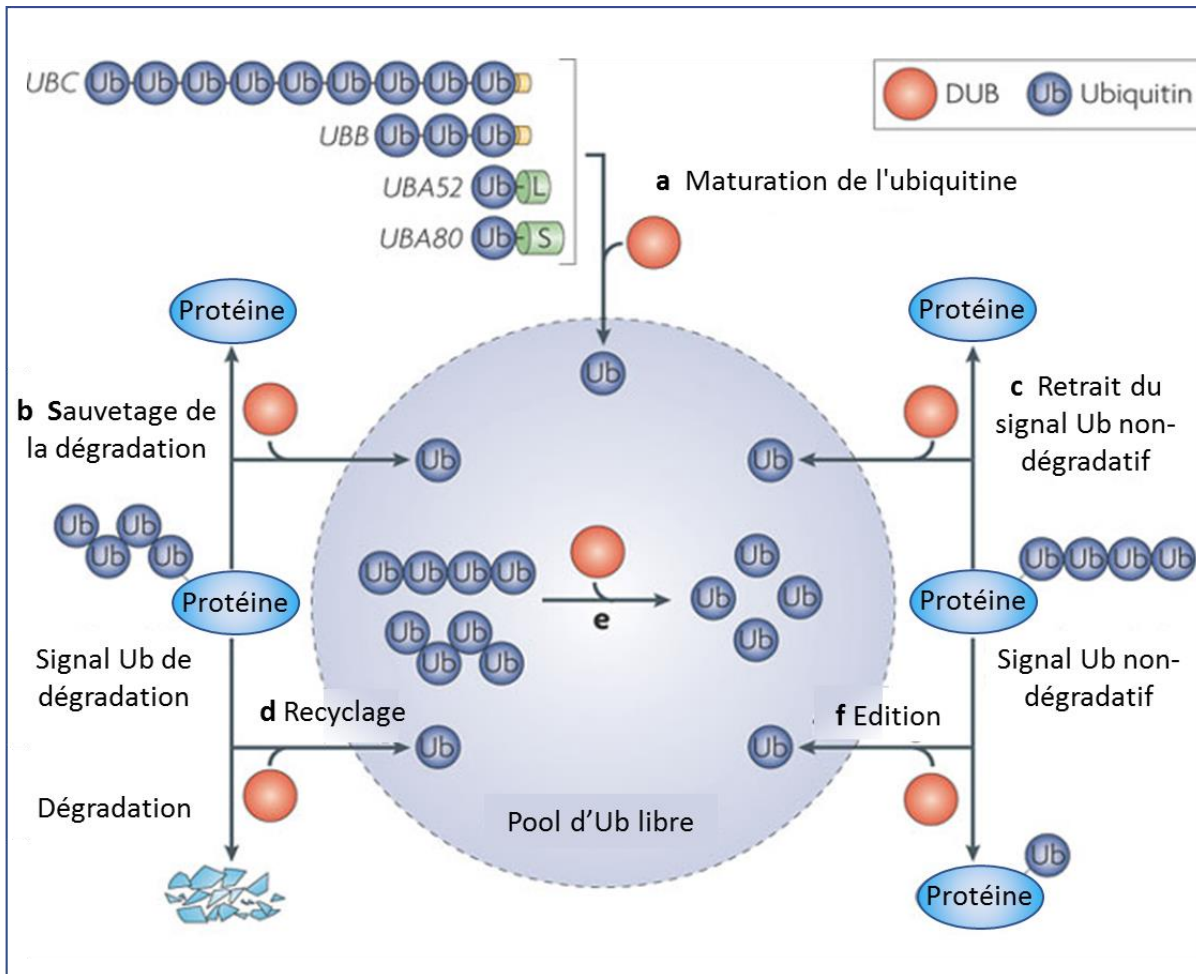


Figure 16 : Multiplicité de fonction des déubiquitinases

Adapté de Komander et al. (2006)

Cependant deux équipes ont récemment mis en évidence deux nouvelles classes de DUB, la famille **MINDY** (« motif interacting with Ub-containing novel DUB family ») et la famille **ZUFSP** (« Zinc finger with UFM1-specific peptidase domain protein ») (Abdul Rehman, Kristariyanto et al. 2016, Haahr, Borgermann et al. 2018, Kwasna, Abdul Rehman et al. 2018)

Alors que les familles UCH, USP, OTU, MJD, MCPIP, MINDY et ZUFSP sont des protéases à cystéine, les membres de la famille JAMM/MPN sont des métalloprotéases à zinc.

Ces enzymes présentent souvent des UBDs, tels que les UBA (Ub-associated domain), les UIM (Ub-interacting motif) ou les UBD à doigts de zinc afin de lier et reconnaître la topologie des chaînes d'Ub. L'activité enzymatique des **DUBs** qui s'en suit va répondre à **3 grands processus** (Figure 16):

- Prendre en charge les précurseurs de l'Ub, néosynthétisés sous forme de chaînes de polyubiquitine et **créer ainsi le pool d'Ub libre cellulaire**
- **Modifier des chaînes de polyUb** ajoutées sur des protéines, afin de réguler avec plus finesse ces MPT, en rognant les chaînes d'Ub.
- **Enlever entièrement les mono et polyUb** des protéines pour inverser les signaux, qu'ils soient dégradatifs ou non, ou bien pour recycler l'Ub avant la dégradation et préserver le pool d'Ub.

VI.2. Spécificité enzymatique

D'un point de vue mécanistique, sans trop rentrer dans le détail de la réaction chimique, le clivage de l'Ub se déroule en plusieurs étapes, pour les DUB à cystéine en tout cas. Un intermédiaire acyl, dans lequel le groupe carboxyle est lié de manière covalente à la cystéine catalytique après clivage du groupe amine. Par la suite, une molécule d'eau hydrolyse l'acyl-cystéine pour compléter le cycle catalytique. Cela est possible grâce à la présence d'une triade catalytique formée par l'histidine, l'asparagine et la cystéine, pour les DUBs à cystéine tout du moins. Le mécanisme des DUB de type JAMM est différent et va lui utiliser l'acide glutamique et le zinc pour cliver l'Ub (Figure 17).

Le clivage de l'Ub, bien qu'avec une mécanistique similaire, peut prendre différents visages. En effet, comme dit dans la partie 2.III.3, le code ubiquitine est très hétérogène et la reconnaissance de ce code par les DUBs va dicter leur fonction.

Le premier niveau de spécificité des DUBs va toucher la reconnaissance des chaînes d'Ub. On retrouve alors des DUBs qui désassemblent les chaînes polyUb indépendamment du type de liaison, bien qu'elles puissent avoir une spécificité de substrats. Ces DUBs incluent la plupart des membres de la famille USP, régulant de nombreuses réactions cellulaires, allant de l'épissage, au trafic de protéines ou au remodelage de la chromatine. La plupart des USP sont actives contre toutes les liaisons (USP21 par exemple) (Ye, Akutsu et al. 2011, Komander and Rape 2012). En opposition, on retrouve des DUBs avec une spécificité de clivage se limitant bien souvent à un type de chaînes polyUb. AMSH, une DUB à domaine JAMM est connue pour son rôle dans l'endocytose. Sa structure lui permet de lier et de cliver spécifiquement les chaînes liées en K63 (Sato, Yoshikawa et al. 2008).. Des membres de la famille OTU et MINDY (OTUB1 et MINDY-1) ont quant à eux une spécificité envers les liaisons K48. Cependant, à la différence de OTUB1 qui peut hydrolyser une chaîne de 2 Ub, MINDY-1 n'est capable d'effectuer un clivage que lorsque son substrat porte une chaîne d'Ub d'au moins 4 molécules (Abdul Rehman, Kristariyanto et al. 2016). Cette spécificité lui vient de ses domaines de liaisons à l'Ub se trouvant en aval du site catalytique, à une distance équivalente à 2 Ub. Le deuxième niveau de spécificité des DUBs porte sur le type de clivage que va effectuer l'enzyme.

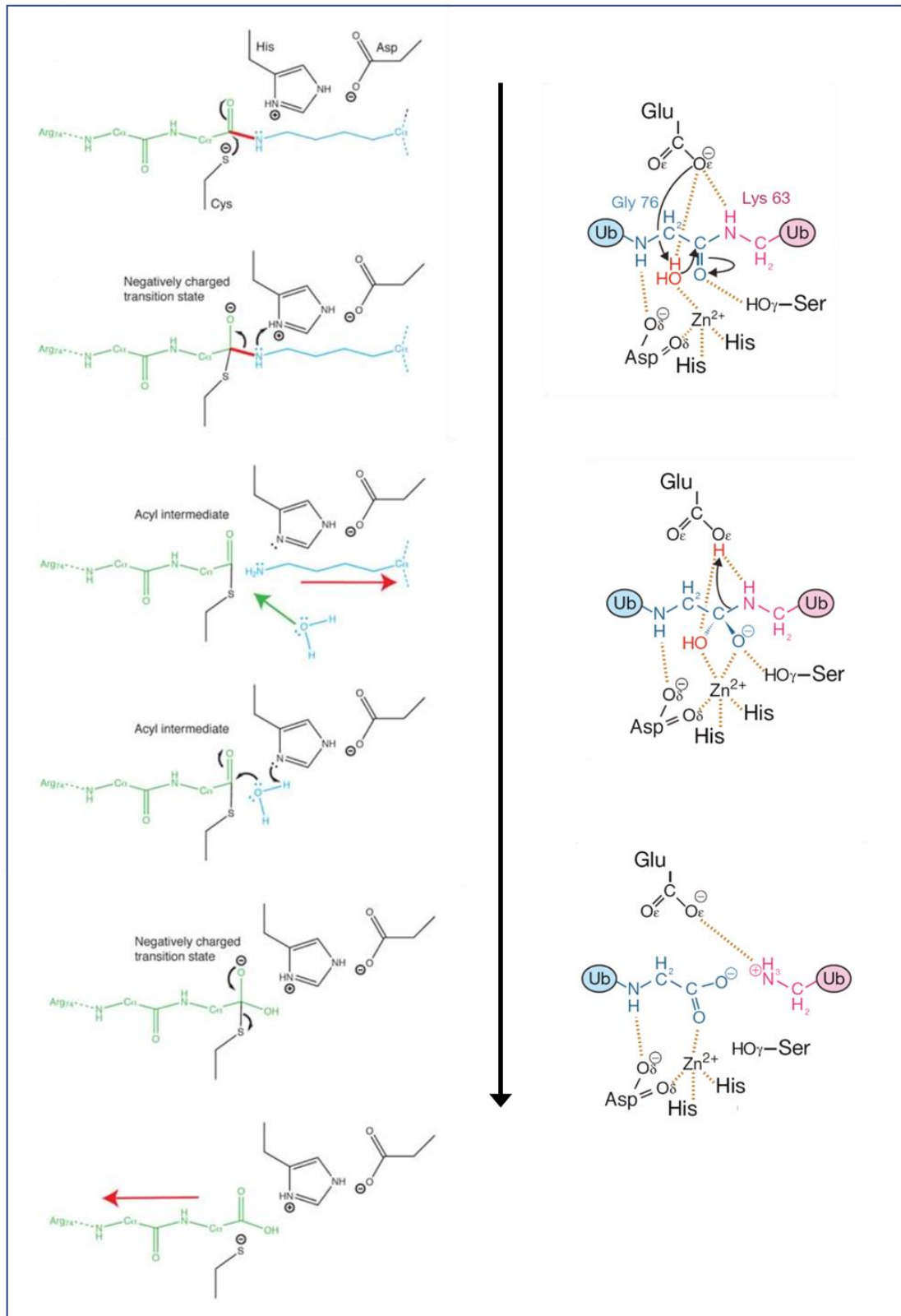


Figure 17 : Réactions chimiques détaillées de la déubiquitination

Réaction de déubiquitination des cystéines protéases (à gauche) et des métalloprotéases (à droite)

Il peut être de type endo-déubiquitinase, clivant au sein d'une chaîne ou de type exo-déubiquitinase, raccourcissant par l'extrémité la chaîne polyUb. Pour rester avec les mêmes exemples, alors que OTUB1 a une activité endo, pouvant cliver entre n'importe quel doublet d'Ub, MINDY-1 a une activité exo, ne lui permettant que de raccourcir une chaîne d'Ub, jusqu'à laisser 2 molécules fixées au substrat. Son rôle serait donc de modifier la chaîne d'Ub pour affiner le signal (Abdul Rehman, Kristariyanto et al. 2016).

Enfin, certaines DUBs ne seraient actives que suite à un changement conformationnel, induit par la fixation d'un substrat particulier. Des études structurales de la DUB USP7 ont révélé que sa triade catalytique peut exister dans une configuration inactive. La liaison à l'ubiquitine induit un changement conformationnel de la triade catalytique vers une configuration active et modifie également la conformation de la « switching loop », une boucle de surface proche du site actif importante pour l'activité catalytique (Hu, Li et al. 2002, Sahtoe and Sixma 2015).

Des MPTs sur les DUBs elles-mêmes peuvent aussi être critiques pour leur activité. Cette régulation de l'activité des DUBs par des MPTs touche tout type de DUBs, via de nombreuses modifications activatrices ou inhibitrices, que ce soit phosphorylation, sumoylation ou ubiquitination (Kobayashi, Masoumi et al. 2015, Sahtoe and Sixma 2015). C'est le cas par exemple d'OTUD5 (ou DUBA), une enzyme de classe OTU qui joue un rôle important dans le système immunitaire, régulant négativement la production d'interféron de type 1. DUBA n'est actif que lorsqu'il est phosphorylé à Ser177 et les structures cristallines ont démontré que la phosphorylation réarrange une partie de la protéine contenant un domaine de liaison de l'ubiquitine (Kayagaki, Phung et al. 2007, Huang, Ma et al. 2012).

VI.1. Les DUBs associées au protéasome

Aux vues du nombre de DUBs et de la multitude de rôles qu'elles occupent au sein de la cellule, un recensement serait fastidieux et peu informatif (pour revues voir (Nijman, Luna-Vargas et al. 2005, Komander, Clague et al. 2009)). Pour ne pas s'éloigner du sujet, nous allons nous concentrer sur les DUBs associées au protéasome, et leur rôle dans l'homéostasie protéique. On dénombre 4 DUBs associées au protéasome : USP14, UCHL5 (UCH37), PSMD14 (RPN11/POH1) et PSMD7 (RPN8). Il est intéressant de noter que seulement USP14, UCH-L5 et PSMD14 ont été décrites avec une activité de déubiquitinase (Figure 18).

VI.1.a. USP14

USP14 pour « Ubiquitin specific protease 14 » est une protéine de 494 acides aminés (aa) codée sur le chromosome 18p11.32. USP14 est une DUB qui lie la sous-unité Rpn1 du protéasome à travers son domaine UBL en N-terminal (9kDa) alors que sa partie C-ter contient son domaine USP, domaine catalytique (Borodovsky, Kessler et al. 2001, Ventii and Wilkinson 2008).

Son activité enzymatique est variable et va dépendre de sa fixation au protéasome. La triade catalytique présente dans USP14 libre existe dans une conformation active, bien que l'activité déubiquitinase soit quasi nulle. Lors de sa fixation via son domaine Ubl au protéasome, on observe une augmentation de l'activité d'USP14 d'environ 500 fois. Une étude structurale d'USP14 révèle que l'accès aux résidus catalytiques par l'ubiquitine est restreint. Deux boucles de surface sont positionnées près du site de liaison prévu pour l'extrémité C-terminale de l'ubiquitine. Ces boucles bloqueraient probablement l'accès de l'extrémité C-terminale de l'ubiquitine au site actif de USP14.

La fixation au protéasome déplacerait ces boucles et améliorerait l'activité déubiquitinase (Hu, Li et al. 2005, Nijman, Luna-Vargas et al. 2005). En plus d'augmenter l'activité DUB d'USP14, la fixation au protéasome va aussi stimuler l'activité protéolytique du protéasome lui-même. L'ouverture du cœur 20S est stimulée par la fixation de conjugués ubiquitinés sur USP14. Cette activation améliore la sélectivité du protéasome 26S pour les protéines ubiquitinées et lie leur déubiquitination à leur dégradation (Peth, Besche et al. 2009). De manière surprenante, il existe une fraction significative d'USP14 libre dans le cytoplasme, dont le rôle n'est à ce jour pas connu.

Concernant son activité, USP14 a d'abord été montré pour désassembler l'Ub une par une et ainsi permettre le recyclage de l'Ub monomérique (Hu, Li et al. 2005). Cependant, des dernières recherches indiquent qu'USP14 hydrolyse la liaison isopeptidique entre le substrat et la première ubiquitine, réalisant **une déubiquitination dites en bloc** (Lee, Lu et al. 2016). Ainsi, USP14, par son lien avec l'activité protéolytique du protéasome, est en mesure de déubiquitiner les protéines adressées au protéasome, qu'elles aient des chaînes polyUb K11, K48 ou K63 (Xu, Shan et al. 2015).

L'homologue d'USP14, Ubp6 chez la levure, lorsqu'il est lié à l'ubiquitine, inhibe la déubiquitination du substrat par Rpn11, stabilise la conformation du protéasome avec son substrat et interfère de manière allostérique avec l'engagement d'un nouveau substrat. Ubp6 peut donc agir comme un « minuteur » dépendant de l'ubiquitine pour réguler dans le temps les étapes de traitement des substrats au protéasome et moduler leur dégradation (Bashore, Dambacher et al. 2015, Kim and Goldberg 2017). De plus, l'inhibition d'USP14 va dans certains cas augmenter la dégradation de certains substrats, démontrant un rôle dans le **sauvetage** de la dégradation de certaines protéines par la suppression de l'étiquette de dégradation polyUb (Kirkpatrick, Hathaway et al. 2006, Boselli, Lee et al. 2017).

Ces données nous indiquent qu'**USP14** joue un rôle majeur en tant que **régulateur de l'activité du protéasome** et donc de **la dégradation des protéines**.

Ce rôle d'USP14 est primordial dans le système nerveux central. Une mutation récessive spontanée, la mutation de l'ataxie (axJ) entraîne une réduction de l'expression d'USP14. Les souris homozygotes pour la mutation axJ ont un retard de croissance et présentent plusieurs troubles du comportement, y compris un tremblement de repos et une paralysie des membres postérieurs. Les protéasomes isolés des cerveaux axJ sont fonctionnels et possèdent encore une activité de déubiquitination, probablement via une augmentation de l'activité et/ou l'expression d'UCHL5. Cependant, les taux d'ubiquitine monomère sont réduits d'environ 35% dans la plupart des tissus examinés (Anderson, Crimmins et al. 2005).

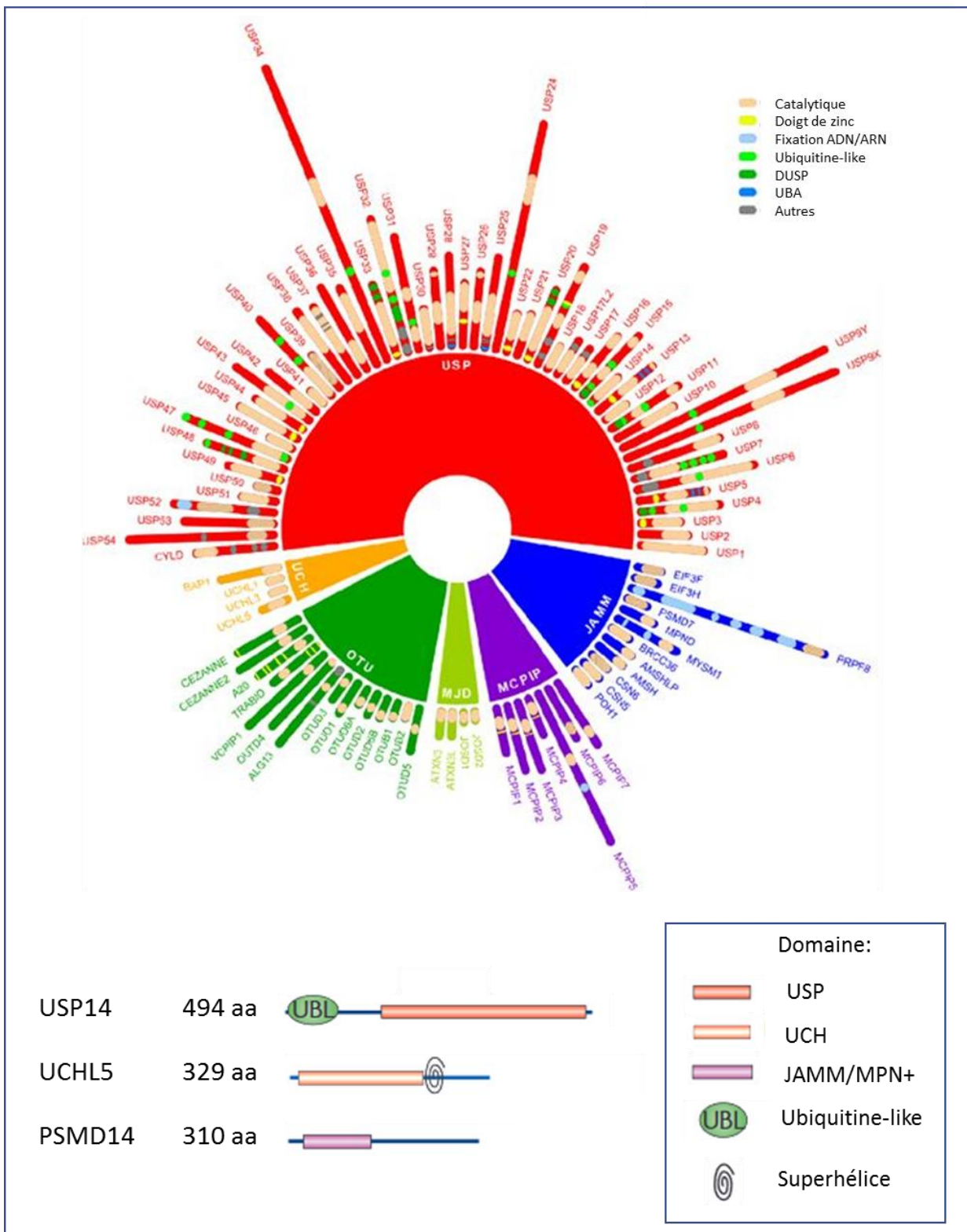


Figure 18 : Diagramme représentatif de la grande famille des déubiquitinasés et la structures des 3 DUBs actives associées au protéasome

VI.1.b. PSMD14

PSMD14 pour « 26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 14 » est une déubiquitinase de 310 aa codée par le chromosome 2q24.2. D'abord connu pour son activité enzymatique sous le nom de **POH1**, ou pour son appartenance au protéasome sous le nom de **RPN11 (voir chapitre IV.1.a)**, cette **métalloprotéase à zinc** possède un domaine JAMM/MPN en N-terminal. Situé sur le couvercle du protéasome, dans la PR 19S, PSMD14 forme un dimère avec PSMD7/RPN8 (Beck, Unverdorben et al. 2012, Pathare, Nagy et al. 2014). Tout comme USP14, l'activité de PSMD14 est en étroite relation avec l'activité du protéasome. L'activité DUB de PSMD14 s'avère **dépendre de l'hydrolyse de l'ATP** par le protéasome. Durant la dégradation du substrat ATP-dépendante, la PR 19S se réarrange en une conformation compétente pour la translocation, modifiant la position de PSMD14. Celle-ci se déplace au-dessus du pore central, facilitant ainsi la déubiquitination du substrat précédant sa translocation (Matyskiela, Lander et al. 2013).

La particularité de la déubiquitination par PSMD14 est le retrait de la chaîne polyUb **en bloc**. En effet, elle clive la liaison isopeptidique entre l'Ub proximal (la plus proche du substrat) et son substrat. Les chaînes de prédilection de PSMD14 sont les chaînes en K63 (Fletcher, Mallery et al. 2015).

Une inactivation de PSMD14 induit une incapacité à éliminer l'ubiquitine, avec pour répercussion de limiter la vitesse de dégradation protéique *in vitro*, processus létal chez la levure (Verma, Aravind et al. 2002, Yao and Cohen 2002).

Son activité est donc essentielle à la **déubiquitination du substrat lors de la dégradation du protéasome** et pourrait également jouer un rôle dans **l'édition des substrats polyubiquitinés**, permettant un contrôle plus fin de la dégradation, et ce éventuellement de manière indépendante du protéasome (Luise, Capra et al. 2011).

Jusqu'à présent, c-JUN, MITF, ErbB2, E2F1 et SNAIL ont été identifiés comme les potentiels substrats de PSMD14 (Schwarz, Sohn et al. 2010, Zhu, Liu et al. 2018). Cela permet à **PSMD14 de réguler de multiples processus biologiques**, tels que la viabilité cellulaire, la sénescence, la pluripotence, la différenciation, l'autophagie et la réponse aux dommages de l'ADN (Suresh, Lee et al. 2016).

VI.1.c. UCHL5

UCHL5 (Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase isozyme L5 ou **UCH37**, car son poids est de 37 kDa) est la deuxième DUB s'associant à la PR 19S du protéasome. Cette DUB de 329 aa, appartenant à la famille UCH, est codée sur le chromosome 1q31.2. UCHL5 **se lie au protéasome** par une association réversible avec la sous-unité de la PR 19S ADRM1/Rpn13, mais **également à la sous-unité NFRKB** (« nuclear factor related to kappaB binding protein ») du complexe INO80, un remodeleur de la chromatine. Tandis que son association avec ADRM1 active son activité de déubiquitination, NFRKB bloque le site de liaison à l'ubiquitine et perturbe le site actif de l'enzyme (Sahtoe and Sixma 2015, Vander Linden, Hemmis et al. 2015). Concernant sa liaison au protéasome, RPN13 possède une extension C-terminale contenant un faisceau de neuf hélices qui permet la liaison à UCHL5 (Hamazaki, Iemura et al. 2006, Huang, Luan et al. 2016). UCHL5 a une **activité de rognage de l'Ub**. Elle désassemble la chaîne polyUb par son Ub distale, suggérant un rôle d'édition des chaînes d'Ub, modifiant et affinant le signal associé à l'ubiquitination (Lam, Xu et al. 1997).

Son activité DUB semble être essentielle au protéasome. Son inactivation affecte plus profondément l'activité DUB du protéasome que la perte d'USP14, ce qui indique qu'UCHL5 est la DUB dominante

du protéasome par rapport à USP14, bien qu'elles semblent avoir toutes deux une activité redondante, centrée sur les chaînes K48 et K63 (Hamazaki, Iemura et al. 2006).

UCHL5 aurait un double rôle, dépendant des substrats. Elle préviendrait la dégradation des protéines en raccourcissant les chaînes de substrats à sauver (Lam, Xu et al. 1997, Koulich, Li et al. 2008) mais elle **favorise la dégradation de substrats spécifiques du protéasome**, tels que l'oxyde nitrique synthase et I κ B- α (Mazumdar, Gorgun et al. 2010, D'Arcy, Wang et al. 2015)

VI.1.d. PSMD7

PSMD7, ou RPN8, est une DUB de la famille des JAMM/MNP mais elle est surtout une sous-unité du protéasome. Présente dans le couvercle de la PR 19S, elle s'associe à PSMD14 comme dit précédemment. Cependant à l'heure actuelle, l'activité DUB de PSMD7 n'a jamais été démontrée (Sowa, Bennett et al. 2009). On pense qu'elle aurait un rôle sur l'activité du protéasome mais ces résultats restent à confirmer (Shi, Zhang et al. 2018).

Comme vous avez pu le voir, les DUBs associées au protéasome ont toutes un rôle majeur dans la régulation de la dégradation des protéines et donc dans l'homéostasie protéique. Leur dérégulation entraîne de lourdes conséquences sur la cellule.

Anémie de Fanconi	USP1, UAF1
Cerveau	USP1, USP2, USP3, USP4, USP5, USP6, USP7, USP8, USP18, USP22, USP33, USP39, USP44, CYLD, AMSH-LP, MYSM, PSMD14 , UCHL1, UCHL5, OUTB1, TRABID, A20
Colon	USP2, USP5, USP7, USP9X, USP14 , USP21, USP22, AMSH, BRCC36, PSMD14 , UCHL1
Estomac	USP1, USP44, UCHL1, UCHL5
Foie	USP1, USP4, USP5, USP15, USP21, AMSH, AMSH-LP, CEZANNE, TRABD, PSMD14
Sang	USP1, USP3, USP5, USP8, USP9X, USP20, USP21, USP33, USP42, USP44, USP50, CYLD, AMSH, PSMD14
Ovaire	USP1, USP5, USP18, USP39, CYLD, BAP1, UCHL1, UCHL5, A20
Pancréas	USP11, USP39
Poumons	USP2, USP4, USP5, USP8, USP9X, USP14 , USP18, USP22, Ataxin-3, A20, USP33, CYLD, OTUB1
Prostate	USP1, USP2a, USP7, USP9X, USP14 , USP19, USP33, BRCC36
Rein	BAP1, CYLD, USP10
Sein	USP7, USP15, USP19, USP25, USP32, USP33, PSMD14 , UCHL1, UCHL5, BRCC36

Tableau 4 : Liste des DUBs impliquées dans divers cancers

Adapté de Vultur, A. and M. Herlyn (2013) et Wei, R et al. (2015)

VII. Le Système Ubiquitine-Protéasome comme nouvelle cible thérapeutique du mélanome

VII.1. DUBs et cancer

Qu'elles soient liées ou non au protéasome, les DUBs, en régulant les signaux majeurs relayés par l'Ub, sont des acteurs essentiels au bon fonctionnement cellulaire. En particulier, elles régulent certaines **modifications épigénétiques**. Les changements épigénétiques comprennent la méthylation de l'ADN, les modifications des histones et les modifications de l'activité des répresseurs et des facteurs de transcription. Certaines DUBs contrôlent par exemple la liaison des histones à leurs partenaires. Tous ces processus entraînent une altération du transcriptome et affectent la croissance, la survie et l'homéostasie cellulaires (McClurg and Robson 2015). Les DUBs participent aussi aux mécanismes de régulation du cycle cellulaire ou de la réponse aux dommages à l'ADN, souvent via la régulation de voies oncogéniques comme le voie p53, NF- κ B, c-Myc etc (Pinto-Fernandez and Kessler 2016).

L'éventail des DUBs et de leurs actions joue donc un rôle crucial dans le développement et la progression du cancer (Fraile, Quesada et al. 2012, D'Arcy, Wang et al. 2015, Wei, Liu et al. 2015).

VII.2. DUB et mélanome

Le lien entre DUB et cancer n'est maintenant plus à faire. Aucun organe n'est épargné, car comme son nom l'indique l'Ub est ubiquitaire et on la retrouve avec ses DUB dans tout l'organisme.

Les données concernant plus précisément le lien entre DUB et mélanome sont cependant plus disparates. Ce n'est qu'en 2011 qu'une équipe parvient à faire ce lien, en trouvant USP13 comme la DUB de MITF. Comme dit dans la partie 1, MITF est essentielle au développement mélanocytaire mais est aussi un gène de prédisposition au mélanome. USP13 via son activité de déubiquitination, stabilise et régule à la hausse le taux de protéines MITF, et module ainsi l'expression des gènes cibles en aval de MITF. USP13 est de ce fait essentiel pour le développement du mélanome (Zhao, Fiske et al. 2011).

USP5 a quant à elle été montrée pour être activé par BRAF afin de supprimer les points de contrôle du cycle cellulaire et l'apoptose en bloquant l'induction de p53 et de FAS, récepteur de mort (Potu, Peterson et al. 2014).

Par la suite, USP4, USP9X, CYLD ont été elles aussi décrites en lien avec la pathogénie du mélanome (Massoumi, Kuphal et al. 2009, Potu, Peterson et al. 2017, Guo, Ma et al. 2018)

Enfin, on sait que BAP1, une DUB de la famille UCH est un gène de prédisposition à forte pénétrance pour le mélanome, son inactivation étant retrouvé dans la majeure partie des mélanomes de l'uvée et sa mutation contribue aussi bien au développement du mélanome qu'à son invasivité (Harbour, Onken et al. 2010, Wiesner, Obenauf et al. 2011, Ma, Guo et al. 2017)

A cette liste exhaustive de DUBs étant impliqué dans la pathogénie du mélanome peuvent venir se rajouter des DUBs en lien avec des acteurs essentielles au développement du mélanome : USP18 (PTEN), OTUB1 (RAS/MAPK), OTUD1 et USP15 et USP42 (MDM2- p53) etc. (Hock, Vigneron et al. 2011, Zou, Jin et al. 2014, Baietti, Simicek et al. 2016, Mustachio, Kawakami et al. 2017, Piao, Pei et al. 2017)

VII.3. Les DUBs du protéasome et cancer

VII.3.a. USP14 et cancer

Les DUBs associées au protéasome n'échappent pas à la règle. Chez USP14, la plus étudiée des trois, on retrouve de nombreuses mutations et/ou amplifications décrites, dans diverses bases de données (Figure 19) (Zhu, Zhang et al. 2016). Il a été montré qu'USP14 est une enzyme pro-tumorigène, quel que soit le cancer étudié. En stabilisant ses substrats, USP14 va promouvoir la prolifération des cellules tumorales dans des cancers du poumons, des ovaires, colorectaux, de la prostate, du sein, et dans les carcinomes œsophagiens (Shinji, Naito et al. 2006, Wu, Liu et al. 2013, Wang, Wang et al. 2015, Zhu, Yang et al. 2016, Liao, Liu et al. 2017, Zhang, Zhang et al. 2017).

Les mécanismes cellulaires qui vont conduire à l'aspect protumorigénique d'USP14 sont à l'heure actuelle mal connus. Elle pourrait par exemple inhiber la dégradation de la cycline B1 ou de la β -caténine et améliorer l'entrée des cellules dans le cycle cellulaire et ainsi promouvoir leur prolifération (Hanna, Hathaway et al. 2006, Wu, Liu et al. 2013). Elle pourrait aussi permettre l'inhibition de l'autophagie ou de l'apoptose selon le contexte (Zhu, Yang et al. 2016, Min, Lee et al. 2017).

VII.3.b. PSMD14 et cancer

PSMD14 a souvent été étudiée pour son rôle structural et fonctionnel au sein du protéasome mais peu de choses sont connues concernant son implication dans les cancers. Il a cependant été montré que PSMD14 pouvait stabiliser E2F1, facteur de transcription majeur du cycle cellulaire. Sa stabilisation active aussi des signaux pro-survie en aval, y compris la régulation à la hausse des taux de protéines Survivine et FOXM1, et facilitent efficacement la croissance tumorale des cellules cancéreuses du foie chez la souris nude (Wang, Ma et al. 2015).

La déubiquitination et la stabilisation de SNAIL par l'intermédiaire de PSMD14 contribuent à la métastase du carcinome épidermoïde oesophagien à la fois in vitro et in vivo (Zhu, Liu et al. 2018). On sait aussi que MITF peut être un substrat de PSMD14 dans le tissu osseux non pathologique. Sachant le lien entre MITF et le développement du mélanome, on peut alors se poser la question du lien possible entre PSMD14 et ce cancer (Schwarz, Sohn et al. 2010).

VII.3.c. UCHL5 et cancer

Mis à part un groupe ayant montré un effet direct d'UCHL5 comme agent anti-apoptotique dans l'adénocarcinome du poumon, seul des liens entre son niveau d'expression et le pronostic associé ont été publiés, qu'il soit positif dans le cancer colorectal ou négatif dans le cancer de l'ovaire (Chen, Niu et al. 2011, Wang, Chen et al. 2014, Arpalhti, Hagstrom et al. 2017).

VII.4. Les DUBs associées au protéasome comme cibles thérapeutiques

L'idée de cibler le SUP n'est pas nouvelle. L'instabilité génomique est l'une des caractéristiques du cancer (Hanahan and Weinberg 2011). La plupart des cellules cancéreuses sont aneuploïdes et les variations du nombre de copies de gènes sont marquées, en raison d'amplifications et/ou de délétions. La régulation de la protéostasie cellulaire dans les cancers est alors essentielle, on dit que les cellules cancéreuses présentent une addiction aux processus de régulation protéique, dont le SUP est l'un des acteurs majeurs.

Des inhibiteurs de l'activité du protéasome ont donc vu le jour afin de cibler l'activité du protéasome et entraîner une dérégulation massive et fatale de l'homéostasie protéique. Des inhibiteurs tels que le bortézomib (BTZ ou Velcade), le carfilzomib (CFZ) et l'ixazomib sont approuvés cliniquement contre certaines tumeurs hématologiques (2004 pour le myélome multiple, 2015 pour le lymphome du manteau). Cependant, ces thérapies, bien qu'efficaces, présentent de nombreux inconvénients. Leurs actions sont limitées étant donné leur toxicité et l'acquisition de résistances. D'autre part, leur efficacité est modérée sur les tumeurs solides telles que le mélanome et ce, malgré une activité cytotoxique *in vitro* (Caravita, de Fabritiis et al. 2006, Goldberg 2012).

Afin de contourner cela, les recherches se sont tournées vers l'inhibition des activités DUBs associées au protéasome, dans le but de déstabiliser l'homéostasie protéique.

Un des premiers composés ciblant cette régulation protéique est le WP1130. Cet inhibiteur n'est cependant pas spécifique des DUBs associées au protéasome car il touche également USP5, UCHL1, USP9X, USP14 et UCHL5. Cependant, et ce très certainement via l'inhibition d'USP14 et d'UCHL5, il induit une accumulation rapide et marquée de conjugués ubiquitinés, entraînant la formation d'agrégomes et l'apoptose des cellules tumorales (myélome multiple et lymphome du manteau). Ces activités sont décrites comme distinctes par rapport aux autres composés qui affectent l'ubiquitination des protéines, comme le bortézomib (Kapuria, Peterson et al. 2010).

Un autre composé plus spécifique d'USP14 et d'UCHL5 a vu le jour. Le b-AP15 entraîne une accumulation de protéines polyubiquitinés et l'apoptose des cellules tumorales, indépendamment du statut de TP53. C'est la première fois qu'une molécule ciblant les DUBs associées au protéasome a été décrite pour inhiber le SUP dans des tumeurs solides (carcinome cutané, du colon ou du poumon) (D'Arcy, Brnjic et al. 2011). L'activité cytotoxique du b-AP15 est fortement associée à l'inhibition fonctionnelle du protéasome (Brnjic, Mazurkiewicz et al. 2014). Ces résultats ont été confirmés ensuite par d'autres équipes, y compris dans le myélome multiple (Tian, D'Arcy et al. 2014, Wang, Stafford et al. 2014). Afin d'améliorer les propriétés physico-chimiques du b-AP15, celui-ci a été dérivé et le VLX1570 a vu le jour. Ce composé montre une sélectivité accrue envers USP14 et UCHL5 (Wang, D'Arcy et al. 2015). Par ailleurs, il présente la même activité cytotoxique envers les tumeurs, liquides ou solides (Paulus, Akhtar et al. 2016, Wang, Mazurkiewicz et al. 2016, Mazurkiewicz, Hillert et al. 2017). Une étude clinique utilisant le VLX1570 a été commencée en 2015 mais arrêtée en 2017 pour cause de toxicité du composé (**A Study of VLX1570 and Dexamethasone in Myeloma Patients**, NCT02372240)

Le ciblage de PSMD14 a été proposé pour lutter contre les résistances au BTZ dans les myélomes multiples. L'utilisation de l'inhibiteur de PSMD14, l'O-phenanthroline (OPA), est cytotoxique pour les cellules tumorales, résistantes ou non au BTZ (Yan Song 2015). Les auteurs exposent que l'OPA induit une apoptose dépendante des caspases et indépendante du statut p53. Ils ont ensuite affiné ces résultats par une approche génétique qui montre que la déplétion de PSMD14 par siARN inhibition induit un stress du RE et une induction de l'autophagie, *in vitro* et *in vivo* (Song, Li et al. 2017).

Un composé sélectif pour PSMD14, le 8TQ (8-thioquinoline) a été identifié lors d'un criblage d'une bibliothèque de pharmacophores liant les métaux (Perez, Li et al. 2017). Ce composé, avec une IC50 de 2,5 μ M, a été dérivé par la même équipe pour conduire à la capzimin, composé 5 fois plus affiné pour PSMD14 (Li, Yakushi et al. 2017). La capzimin stabilise des substrats du protéasome, induit une réponse UPR et bloque la prolifération des cellules cancéreuses, y compris celles résistantes au bortézomib.

Ainsi, le ciblage des DUBs du protéasome apparaît comme une alternative de choix pour cibler le SUP (Lauinger, Li et al. 2017, Li, Zhang et al. 2018).

Contexte

Mes recherches s'inscrivent dans un contexte où le mélanome métastatique est un cancer encore trop peu maîtrisé, en raison d'une importante résistance des mélanomes métastatiques aux thérapies ciblées et de rechutes fréquentes. Mes travaux ont donc consisté à identifier de nouvelles cibles thérapeutiques afin d'élargir les possibilités de traitement.

Etant donné la fréquence importante de mutations somatiques dans le mélanome et son aspect prolifératif très marqué, le mélanome est certainement une forme de cancer qui présente une très forte addiction aux mécanismes de maintien de la protéostasie cellulaire, parmi lesquels le SUP joue un rôle essentiel. Dans ce contexte, nous avons étudié le rôle des DUBs associées au protéasome dans la pathogénie du mélanome afin d'évaluer le potentiel thérapeutique de leur ciblage.

Par le biais de nos travaux, nous avons été amenés à étudier deux de ces DUBs, USP14 et PSMD14. Les résultats sur USP14 sont présentés à travers un article publié en 2018. Les travaux préliminaires concernant PSMD14 sont présentés à la suite dans un paragraphe de résultats complémentaires.

Résultats

Le ciblage de l'enzyme de déubiquitination USP14 associée au protéasome entrave la survie des cellules de mélanome et surmonte la résistance aux thérapies ciblant la voie des MAPK.

Le mélanome est le cancer de la peau le plus meurtrier dont l'incidence augmente dans le monde entier. Les thérapies ciblées contre le mélanome muté BRAF et les immunothérapies ont montré une efficacité clinique remarquable. Cependant, ces traitements sont limités à des sous-groupes de patients et les rechutes sont fréquentes. Globalement, plus de 50% des patients ont besoin de traitements supplémentaires, justifiant le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques. Dans le mélanome, la charge mutationnelle due à l'exposition UV et un indice de prolifération élevé augmente l'addiction aux mécanismes de contrôle du protéome, parmi lesquels le système ubiquitine-protéasome (SUP) joue un rôle essentiel. Cibler le SUP représente donc une stratégie prometteuse contre les mélanomes réfractaires.

Les enzymes de déubiquitination ou déubiquitinases (DUBs), jouent un rôle majeur dans le contrôle de l'ubiquitination et donc du SUP, et plusieurs d'entre elles ont été associées à des situations pathologiques, notamment le cancer. Dans le mélanome, certaines DUBs ont été reliées à la progression de la maladie, comme USP13 (Zhao, Fiske et al. 2011) ou USP9X (Potu, Peterson et al. 2017). Cependant, l'implication exacte des DUBs associées au protéasome dans le développement du mélanome et la résistance thérapeutique reste mal connue.

Nous avons identifié USP14 comme acteur essentiel à la protéostasie cellulaire du mélanome, présentant un fort impact sur la prolifération et la viabilité du mélanome.

En utilisant un test de piège des DUBs pour marquer les DUBs cellulaires actives, nous avons observé une activité accrue de la DUB associée au protéasome, USP14 dans les cellules de mélanome par rapport aux mélanocytes. Notre étude des bases de données publiques sur l'expression des gènes nous indique qu'une expression élevée de USP14 est corrélée à la progression du mélanome et à un taux de survie plus faible chez les patients atteints d'un mélanome métastatique.

Le "knockdown" par siRNA ou l'inhibition pharmacologique d'USP14 altère considérablement la viabilité des cellules de mélanome, quel que soit le statut mutationnel de *BRAF*, *NRAS* ou *TP53* et de leur état de transcription cellulaire, et surmonte la résistance aux thérapies ciblant MAPK *in vitro* et chez les souris xénotreffées de mélanome humain.

Au niveau moléculaire, nous avons observé que l'inhibition de USP14 déclenche rapidement une accumulation de protéines poly-ubiquitinées et de chaperones, un dysfonctionnement mitochondrial, une réponse de stress du RE et une production de ROS conduisant à une mort cellulaire indépendante des caspases.

Nos résultats démontrent l'intérêt de cibler la DUB USP14 associée au protéasome pour traiter et combattre les mélanomes métastatiques.

Targeting the Proteasome-Associated Deubiquitinating Enzyme USP14 Impairs Melanoma Cell Survival and Overcomes Resistance to MAPK-Targeting Therapies

Robin Didier^{1,2}, Aude Mallavialle^{1,2}, Rania Ben Jouira^{1,2}, Marie Angela Domdom^{1,2}, Mélanie Tichet^{1,2}, Patrick Auberger⁴, Frédéric Luciano⁴, Mickael Ohanna³, Sophie Tartare-Deckert^{1,2}, and Marcel Deckert^{1,2}



Abstract

Advanced cutaneous melanoma is one of the most challenging cancers to treat because of its high plasticity, metastatic potential, and resistance to treatment. New targeted therapies and immunotherapies have shown remarkable clinical efficacy. However, such treatments are limited to a subset of patients and relapses often occur, warranting validation of novel targeted therapies. Posttranslational modification of proteins by ubiquitin coordinates essential cellular functions, including ubiquitin-proteasome system (UPS) function and protein homeostasis. Deubiquitinating enzymes (DUB) have been associated to multiple diseases, including cancer. However, their exact involvement in melanoma development and therapeutic resistance remains poorly understood. Using a DUB trap assay to label cellular active DUBs, we have observed an increased activity of the proteasome-associated DUB, USP14 (Ubiquitin-specific peptidase 14) in

melanoma cells compared with melanocytes. Our survey of public gene expression databases indicates that high expression of *USP14* correlates with melanoma progression and with a poorer survival rate in metastatic melanoma patients. Knockdown or pharmacologic inhibition of USP14 dramatically impairs viability of melanoma cells irrespective of the mutational status of *BRAF*, *NRAS*, or *TP53* and their transcriptional cell state, and overcomes resistance to MAPK-targeting therapies both *in vitro* and in human melanoma xenografted mice. At the molecular level, we find that inhibition of USP14 rapidly triggers accumulation of poly-ubiquitinated proteins and chaperones, mitochondrial dysfunction, ER stress, and a ROS production leading to a caspase-independent cell death. Our results provide a rationale for targeting the proteasome-associated DUB USP14 to treat and combat melanomas. *Mol Cancer Ther*; 17(7): 1416–29. ©2018 AACR.

Introduction

Cutaneous melanoma is an aggressive type of skin cancer whose incidence increases worldwide. It is recognized for its propensity for early and extensive metastatic spread and seen as one of the most virulent and refractory form of human

advanced cancers. Melanoma develops from the pigment-producing melanocytes in the epidermis (1). Tumor progression is accompanied by driver mutations affecting the *BRAF* and *NRAS* genes (in 50% and 20% of melanoma, respectively) leading to constitutive activation of the MEK/ERK MAPK pathway. Other genetic and epigenetic changes, as well as the tumor microenvironment, affect the survival and proliferation of melanoma cells by altering several signaling pathways. The majority of melanomas undergo an epithelial-to-mesenchymal (EMT)-like transition to acquire a mesenchymal motile phenotype associated with a drug-tolerant state and metastatic abilities (1–3). Melanomas also exhibit a high level of differentiation state plasticity and intratumor heterogeneity, which is an obstacle to therapeutic success and a source of relapse (4–6). Immunotherapies and therapies targeting mutant *BRAF* and *MEK* have led to improved survival in patients with metastatic disease (2, 7). Nevertheless, drug resistance to *BRAF*/*MEK* inhibition invariably develops within 6 to 12 months of treatment. Relapses are generally associated with acquired resistance linked to *NRAS* mutations that reactivate the MAPK pathway and activation of parallel signaling pathways such as the PI3K/*AKT* pathway (2, 5). The long-term prognosis of metastatic melanoma is still very poor for most patients, underscoring the need for novel therapeutic options (2, 8). Beside, no targeted treatments currently exist for patients whose tumors are wild-type for *BRAF*, including *NRAS*-mutant melanomas.

¹Inserm, U1065, Team Microenvironment, Signaling and Cancer, Centre Méditerranéen de Médecine Moléculaire (C3M) and Université Côte d'Azur, Nice, France. ²Equipe labellisée Ligue Contre le Cancer 2016, Nice, France. ³Inserm, U1065, Team 1, C3M, Nice, France. ⁴Inserm, U1065, Team 2, C3M, Nice, France.

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

R. Didier and A. Mallavialle contributed equally to this article as co-first authors. S. Tartare-Deckert and M. Deckert contributed equally to this article as co-last authors.

Current address for M. Tichet: Laboratory of Translational Oncology, ISREC (Swiss Institute for Experimental Cancer Research), Swiss Federal Institute of Technology Lausanne (EPFL), Lausanne, Switzerland.

Corresponding Author: Marcel Deckert, Inserm UMR1065/C3M, 151 Route de Ginestière BP 23194, F-06204 Nice cedex 3, France. Phone: 3304-8906-4310; Fax: 3304-8906-4221; E-mail: deckert@unice.fr

doi: 10.1158/1535-7163.MCT-17-0919

©2018 American Association for Cancer Research.

In cancer cells, accumulation of genetic mutations, aneuploidy, and chromosomal alterations, together with a high proliferative index, increases protein synthesis and cell addiction to mechanisms controlling protein homeostasis, including the heat shock and unfolded protein responses, autophagy, and endo-lysosomal degradative pathways, and the ubiquitin-proteasome system (UPS; refs. 9, 10). Posttranslational modification of proteins by ubiquitin represents a complex signaling system that coordinates essential cellular functions and protein homeostasis (11). While mono-ubiquitination is rather involved in the modification of protein activity and intracellular transport, poly-ubiquitination, with a K48 linkage, is the main mechanism responsible for the degradation of cellular proteins by the UPS system. This system encompasses a proteolytic machinery (the 26S proteasome) and a cascade of enzymes (E1, E2, and E3) capable of activating ubiquitin residues and adding them to the target proteins (12). Illustrating the importance of the UPS in melanoma, high levels of Skp2, an F-box protein of the ubiquitin ligase complex SCF, have been associated with p53-dependent proliferation (13), and inactivation of the E3 ligase FBXW7 leads to sustained accumulation of NOTCH1, thereby accelerating tumor development (14). We have also shown that the matricellular protein SPARC controls a signaling circuit from the tumor microenvironment leading to proteasome-mediated degradation of p53 via the E3 ligase MDM2, which confers survival advantage to melanoma cells (15). The enzymatic reaction, which opposes the conjugation of ubiquitin by E3 ligases, consists of the deubiquitination by deubiquitinating enzymes (DeUBiquitinases or DUBs). DUBs represent ubiquitin-specific cysteine proteases that can cleave one or more ubiquitin molecules on target proteins, or even the entire poly-ubiquitin chain (16, 17). The expression or abnormal activity of DUBs has been demonstrated in pathologic situations, including cancer and their druggable activity, is now considered for development of novel molecular therapies (18, 19). Several DUBs have been linked to melanoma progression and response to therapy, including USP13 (20), USP5 (21), and recently, USP9X as an important regulator of NRAS expression (22). Some DUBs, such as UCHL5 and USP14 (Ubiquitin-specific peptidase 14) are direct components of the proteasome, and their pharmacologic targeting by compounds such as b-AP15 and VLX1570 has a major impact on cancer proteostasis and immunoreactivity (23–25). USP14 is an essential regulator of the proteasome (26, 27) that control the deubiquitination of poly-ubiquitinated substrates addressed to the proteasome (28). The function of USP14 in promoting cell growth and viability in diverse type of cancers, such as acute myeloid leukemia (23), multiple myeloma (29), squamous and colon carcinoma (23), and breast cancer (30), has been recognized. In this context, the recent observation that Akt activates USP14 to control the ubiquitin-proteasome system (31) further underlies the involvement of USP14 in tumorigenesis. However, its role in the malignancy of melanoma remains poorly understood.

In this study, using a combination of biochemical, genetic, and pharmacologic approaches, we found that targeting USP14 impairs melanoma cell viability irrespective of the mutational status, and overcomes resistance to targeted therapies *in vitro* and *in vivo*. Mechanistically, inhibition of USP14 resulted in a caspase-independent cell death associated with accumulation of poly-ubiquitinated proteins and chaperones, ROS production, mitochondrial dysfunction, and ER stress. Our results show that the proteasome-associated DUB USP14 represents a promising therapeutic target in melanoma.

Materials and Methods

Cell and reagents

The human melanoma cell lines A375, 1205lu, and MeWo were from ATCC. HMVII cells were from European Collection of Authenticated Cell Cultures (ECACC). WM164 and WM266-4 cells were purchased from Rockland. SBCL2, WM793, 451lu, Mel1617 cells and their BRAF inhibitor-resistant derivatives (451luR and Mel1617R) were provided by Drs. M. Herlyn and J. Villanueva (The Wistar Institute, Philadelphia, USA) and have been described previously (33). M229, M238, and M249 cells and their BRAF inhibitor-resistant sublines were from Dr. R. Lo (UCLA Dermatology, Los Angeles, USA) and have been characterized previously (34). 501Mel cells were a gift from Dr. R. Halaban (Yale University School of Medicine, New Haven, USA) and were described elsewhere (3). All melanoma cell lines were used within 6 months between resuscitation and experimentation. To guarantee cell line authenticity, cell lines were expanded and frozen at low passage after their receipt from original stocks, used for a limited number of passages after thawing, and routinely tested for the expression of melanocyte-lineage proteins such as Microphthalmia-Associated Transcription Factor (MITF). All cell lines were routinely tested for the absence of mycoplasma by PCR. A375DR double resistant cell line variants were generated from A375 cells by repeated exposure to BRAF inhibitor PLX4032 (Selleckchem) and ERK inhibitor SCH772984 (Selleckchem) until the onset of resistance. Patient melanoma cells (Pt#1 and Pt#2) were a kind gift from Dr. R. Ballotti (INSERM U1065, Nice, France) and have been described previously (3). Melanoma cells were cultured in DMEM supplemented with 7% FBS (HyClone). Human primary epidermal melanocytes were isolated from foreskin and maintained as described previously (32). For *in vivo* bioluminescence imaging, 451luR-Luc+ cells were obtained by lentiviral transduction (pLenti6/V5-luciferase; Thermo Fischer Scientific) and blasticidin selection (2 µg/mL). All cell cultures were grown at 37°C under 5% CO₂.

Primers and culture reagents were purchased from Thermo Fischer Scientific. b-AP15 and VLX1570 were from Merck Millipore and MedChem Express, respectively. Bortezomib was from Selleckchem. QVD-OPH was from ApexBio Technology. Staurosporin, MG-132, N-Acetyl-L-cysteine (NAC), H₂O₂, and all other reagents were purchased from Sigma-Aldrich unless otherwise stated.

Antibodies used were USP14, HSP60, HSP70, p53, p21, ERK2 (Santa Cruz Biotechnology), K48-linkage-specific polyubiquitin (D9D5), JNK, phospho-JNK (Thr183/Tyr185), p38, phospho-p38 (Thr180/Tyr182), phospho-Rb (Ser807/Ser811), Caspase 8, CHOP, Tubulin α (Cell Signaling Technology), UCHL5, USP5, USP7 (Bethyl Laboratories), K63-linkage specific Polyubiquitin (Abcam), and Bip/GRP78 (BD Biosciences). Peroxidase-conjugated anti-rabbit antibodies were from Cell Signaling Technology. Peroxidase-conjugated anti-mouse and anti-goat antibodies were from Dako.

RNAi studies, transfection, and infection studies

siRNAs were purchased from Dharmacon (Thermo Fisher Scientific). Transfection of siRNA was carried out using Lipofectamine RNAiMAX (Thermo Fisher Scientific) at a final concentration of 25 or 50 nmol/L. Cells were assayed 3 or 6 days posttransfection. USP14-Flag adenovirus was purchased from

Vigene Biosciences. Cells were infected for 2 days in DMEM supplemented with 7% FBS prior treatment.

Cell lysis and immunoblot analysis

Melanoma cells were harvested as described before (35). Cells were lysed at 4°C in RIPA buffer (Millipore) supplemented with Pierce Protease and Phosphatase Inhibitor Mini Tablets, and briefly sonicated. Cell lysates were cleared at $16,000 \times g$ for 15 minutes at 4°C. Whole-cell lysates were subjected to SDS-PAGE and immunoblot analysis as described previously (35).

DUB trap assay

Cells were lysed in ice-cold buffer containing 50 mmol/L Tris (pH 7.4), 5 mmol/L $MgCl_2$, 250 mmol/L sucrose, 1 mmol/L DTT, 2 mmol/L ATP, and 1 mmol/L PMSF and mild sonication. Lysates were cleared by centrifugation and 30 μg of protein extracts were incubated for 15 minutes at 37°C with 0.5 $\mu mol/L$ HA-Ub-V5 (Boston Biochem). After boiling in reducing sample buffer, labeled cell lysates were subjected to immunoblot analysis.

Proteasome activity assay

Proteasome activity was determined as described previously (36). Cells were lysed for 30 minutes at 4°C in ATP-containing lysis buffer (50 mmol/L HEPES pH 7.8, 5 mmol/L ATP, 0.5 mmol/L DTT, 5 mmol/L $MgCl_2$, 0.2% Triton X-100). Cell lysates were cleared at $16,000 \times g$ for 15 minutes at 4°C. Ten micrograms of proteins from each sample were incubated in 96-well plates with 0.1 mmol/L of Z-Leu-Leu-Glu-AMC, Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC, and Ac-Arg-Leu-Arg-AMC fluorogenic substrates (Enzo Life Sciences) to measure caspase-like, chymotrypsin-like, and trypsin activities, respectively. Fluorescence intensity was measured during 2 hours by following emission at 460 nm (excitation at 390 nm).

Aggresome staining

Aggresome staining was performed using the Proteostat Aggresome detection kit (Enzo Life Sciences) according to the manufacturer's instructions. Analysis was performed by flow cytometry.

Proliferation assays

Cell proliferation was measured by a MTS conversion assay using the CellTiter 96 Aqueous Non-Radioactive Cell Proliferation kit (Promega) according to the manufacturer's instructions (5×10^3 cells/well). Alternatively, cell growth was assessed by crystal violet staining on cells seeded in 24-well plates for the indicated time. After treatment, cells were fixed in PFA 3% during 20 minutes, washed with PBS three times, and stained with crystal violet 0.4% in ethanol 20% for 30 minutes. For real-time analysis of cell growth using an automated InCuCyte Zoom imaging system (Essen Bioscience), cells were plated in triplicate in complete medium on 96-well plates (5×10^3 cells/well). Phase contrast images were taken every hour over a 3-day period. Growth curves were generated using the InCuCyte cell proliferation assay software based on cell confluence.

Analysis of apoptosis and cell cycle by flow cytometry

Cell-cycle analysis was performed by flow cytometry analysis of propidium iodide (PI)-stained cells. Following permeabilization in ice-cold ethanol 70%, cells were stained with 40 $\mu g/mL$ PI in PBS supplemented with 100 $\mu g/mL$ RNase A before analysis using

a BD FACSCanto cytometer. Cell death was evaluated by flow cytometry following staining with Annexin-V-FITC and PI (eBioscience) as described previously (37). Alternatively, cells were seeded in 96-well plates (5×10^3 cells/well) overnight at 37°C. A mixture of compounds and Cytotox Green Reagent (Essen Bioscience) in complete culture medium was then added to the cells. Cell death was monitored in real time for 72 hours with an InCuCyte imaging system. Experiments were carried out in triplicate.

Measurement of ROS production

To measure ROS levels, cells were stained with 10 $\mu mol/L$ of the redox-sensitive dye CM-H₂DCFDA (Thermo Fischer Scientific) in PBS for 30 minutes at 37°C. Cells were washed with PBS and resuspended in PBS 5 mmol/L EDTA/1% BSA. ROS production was analyzed using a MACSQuant Analyzer 10 cytometer (Miltenyi Biotec).

Measurement of mitochondrial membrane potential

Following treatment, cells were stained with 1 $\mu mol/L$ tetramethylrhodamine (TMRE) in media for 15 minutes at 37°C. Cells were washed with PBS and resuspended in PBS, 5 mmol/L EDTA/1% BSA. MMP levels were analyzed using a MACSQuant Analyzer 10 cytometer (Miltenyi Biotec).

Immunofluorescence analysis

Tumors frozen-section in optimal cutting temperature were sliced using a Cryostat CM350 (8 μm) and stained using the Apoptag Red *In Situ* kit (Millipore) according to the manufacturer's instructions. Images were captured on a Leica widefield microscope (Leica Microsystems).

Real-time quantitative PCR

Total RNA was extracted from cell samples using Nucleospin RNAII kit (Macherey-Nagel). Reverse transcription was performed on 1 μg of total RNA in a volume of 20 μL using High capacity cDNA Reverse Transcription kit (Applied Biosystems). Quantitative PCR was performed on 20 ng cDNA samples, in sealed 96-well microtiter plates using the Platinum SYBR Green qPCR Supermix-UDG w/ROX (Life Technologies) with the StepOnePlus System (Applied Biosystems). Relative mRNA levels were determined using the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method and *ACTB* and *PPIA* as housekeeping genes. Values are the mean of duplicates and are representative of two independent experiments.

Gene expression analysis from human databases

Publicly available gene expression data sets from Gene Expression Omnibus (GEO) database were used to analyze *USP14* levels in melanoma progression (GSE3189) and patient outcome (GSE19234). Normalized data were analyzed using GraphPad Prism V5.0b software (GraphPad).

In vivo experiments

All mouse experiments were carried out in accordance with the Institutional Animal Care and the local ethics committee. For human melanoma xenografts, 5-week-old female athymic (nu/nu) mice (Harlan) were subcutaneously injected with 1×10^6 BRAF inhibitor-resistant 451luR melanoma cells engineered to express a luciferase reporter (451luR-Luc+ cells) in 100 μL of PBS. After 3 days, mice were injected every 3 days intraperitoneally with vehicle or 10 mg/kg b-AP15 in 90/1/9

mix of Labrafil/Tween 80/DMA. At the indicated times, mice were anesthetized and injected intraperitoneally with 50 mg/kg D-Luciferin (Perkin Elmer) in PBS. Images were acquired using a Photon Imager (Biospace Lab) system and data analyzed with the M3Vision software (Biospace Lab). Tumor growth was monitored and quantified using bioluminescence imaging (BLI). The total numbers of photons per second per steradian per square centimeter were recorded. For BLI plots, photon flux was calculated for each mouse by using a rectangular region of interest encompassing the thorax of the mouse in a prone position. This value was normalized to the value obtained immediately after injection (15 minutes), so that all mice had an arbitrary starting BLI signal of 100.

Statistical analysis

Unless otherwise stated, all experiments were repeated at least three times and representative data/images are shown. Statistical analysis was performed using the GraphPad Prism software. All data are presented as mean \pm SEM. For comparisons between two groups, *P* values were calculated using unpaired one-sided *t* test or Mann–Whitney test. Statistical significance of the *in vivo* experiment was calculated with the two-way ANOVA test. *P* values of 0.05 (*), 0.01 (**), and 0.001 (***) were considered statistically significant.

Results

Expression and activity of USP14 in melanoma cells

To identify DUBs that may be involved in melanoma biology, we used a DUB trap assay with the probe HA-Ub-V5, which covalently labels with a HA-tagged ubiquitin molecule active DUBs in cell lysates (ref. 38; Fig. 1A). The DUB trap assays performed on melanocyte and melanoma cell lysates revealed an increased activity of several DUBs in melanoma cells compared with melanocytes. Anti-USP14 immunoblot analysis of the above DUB trap assays showed that compared with normal melanocytes, USP14 activity is significantly increased in melanoma cell lines 501Mel, 451lu, MeWo, and A375 (Fig. 1B). To further examine the role of USP14 in melanoma, we used the previously described USP14 inhibitor b-AP15 (23). b-AP15 efficiently blocked the activity of USP14 in a dose-dependent manner in A375 cells (Fig. 1C; Supplementary Fig. S1A), and in 1205lu, 501Mel, SKMel28, and 451lu cells (Fig. 1D). Notably, the DUB activity of UCHL5, another target of b-AP15 (29), was not affected in melanoma cells. Note that the activity of other DUBs, such as USP5 and USP7, were also not significantly affected by b-AP15 treatment (Supplementary Fig. S1A). Consistent with the effect of b-AP15, VLX1570, a selective inhibitor of USP14 (39, 40) also blocked USP14, but not UCHL5, activity in melanoma (Supplementary Fig. S1B and S1C).

To confirm USP14 as a potential target in melanoma, we assessed *USP14* gene expression in annotated NCBI Gene Expression Omnibus (GEO) datasets comparing patients' tumors with their normal tissue counterparts and benign tumors. While *USP14* levels were not significantly increased between normal skin samples and nevi, its expression was statistically increased in melanomas when compared with both normal skin and nevi (Fig. 1E). Interestingly, further analysis of public databases associates high *USP14* expression with a lower probability of survival in patients with metastatic melanoma (Fig. 1F).

USP14 inhibition has a potent and broad anti-melanoma effect

We next examined the impact of USP14 inhibition on a collection of melanoma cell lines with diverse mutational status and metastatic potential (3, 4). These cell lines are also representative of the three major subtypes of melanoma based on the frequency of *BRAF* and *NRAS* mutations: mutant *BRAF*, mutant *RAS*, and wild-type. The exposure of 1205lu, 501Mel, and A375 cells to b-AP15 during 48-hour affected cell morphology (Supplementary Fig. S2A) and impaired cell proliferation in a dose-dependent manner (Fig. 2A). Using the same approach, we calculated the IC_{50} of b-AP15 for 22 melanoma cell lines and short-term cultures to be in a micromolar range (0.3–3.4 μ mol/L; Table 1). Our data show that pharmacologic inhibition of USP14 by b-AP15 similarly reduced proliferation of mutant *BRAF*, mutant *RAS*, and wild-type melanoma cells. Treatment with b-AP15 also blocks the proliferation of melanoma cells irrespective of the mutational status of *TP53*, *PTEN*, or *CDKN2A* and of their invasive or proliferative transcriptional cell state. Real-time imaging further shows that the effect of b-AP15 on cell proliferation was rapid and compared with what was observed with the proteasome inhibitor bortezomib or with VLX1570 (Fig. 2B; Supplementary Fig. S2B). We next evaluated how b-AP15 affects melanoma clonogenic growth. As shown in Fig. 2C, 501Mel and A375 cells treated with b-AP15 were no longer capable of forming colonies when isolated, compared with untreated cells. Cell-cycle analysis performed on melanoma cells treated or not with b-AP15 for 24 hours revealed that USP14 inhibition altered cell-cycle progression and increased cell death as indicated by the appearance of a sub- G_1 cell population with reduced DNA content (9% and 5% for 1205lu and A375 cells, respectively; Fig. 2D). For comparison, *BRAF* inhibitor vemurafenib (PLX4032) caused cell-cycle arrest in the G_0 – G_1 phase.

The impact of b-AP15 on melanoma cell death was confirmed through real-time imaging of cell toxicity (Fig. 2E) and with a flow cytometric analysis of Annexin-V-FITC/PI labeling of A375 cells treated or not with b-AP15 (Fig. 2F). Data showed a significant reduction of the viability of A375 cells exposed to b-AP15 (45%) compared with solvent effect (93%), with increase in both early and late apoptotic populations. As a control, treatment with the cell death inducer staurosporine led to a similar decrease in cell viability (37%). Importantly, melanoma cell death was induced to similar levels following incubation with VLX1570 (Supplementary Fig. S2C and S2D). At the molecular level, immunoblot analysis showed that USP14 targeting in 1205lu cells altered the expression or phosphorylation of proteins related to cell proliferation and apoptosis. Treatment with b-AP15 increased levels of the cell-cycle inhibitor p21CIP1, while reducing the levels of phosphorylated Rb proteins. After 24 hours of treatment, the drug caused the appearance of active fragments of caspase 3 and the cleavage of its nuclear substrate PARP (Fig. 2G). Interestingly, washout experiments performed on A375 and 501Mel cells further showed that a short exposure to b-AP15 (1 hour) followed by 23-hour incubation in drug-free medium had an anti-melanoma action similar to a full exposure to b-AP15 for 24 hours (Supplementary Fig. S2E and S2F), indicating that the cytotoxic action of b-AP15 in melanoma is rapid and irreversible, consistent with a previous study (41). Finally, we found that adenoviral-mediated overexpression of USP14 significantly antagonized the cleavage of PARP induced by an optimal

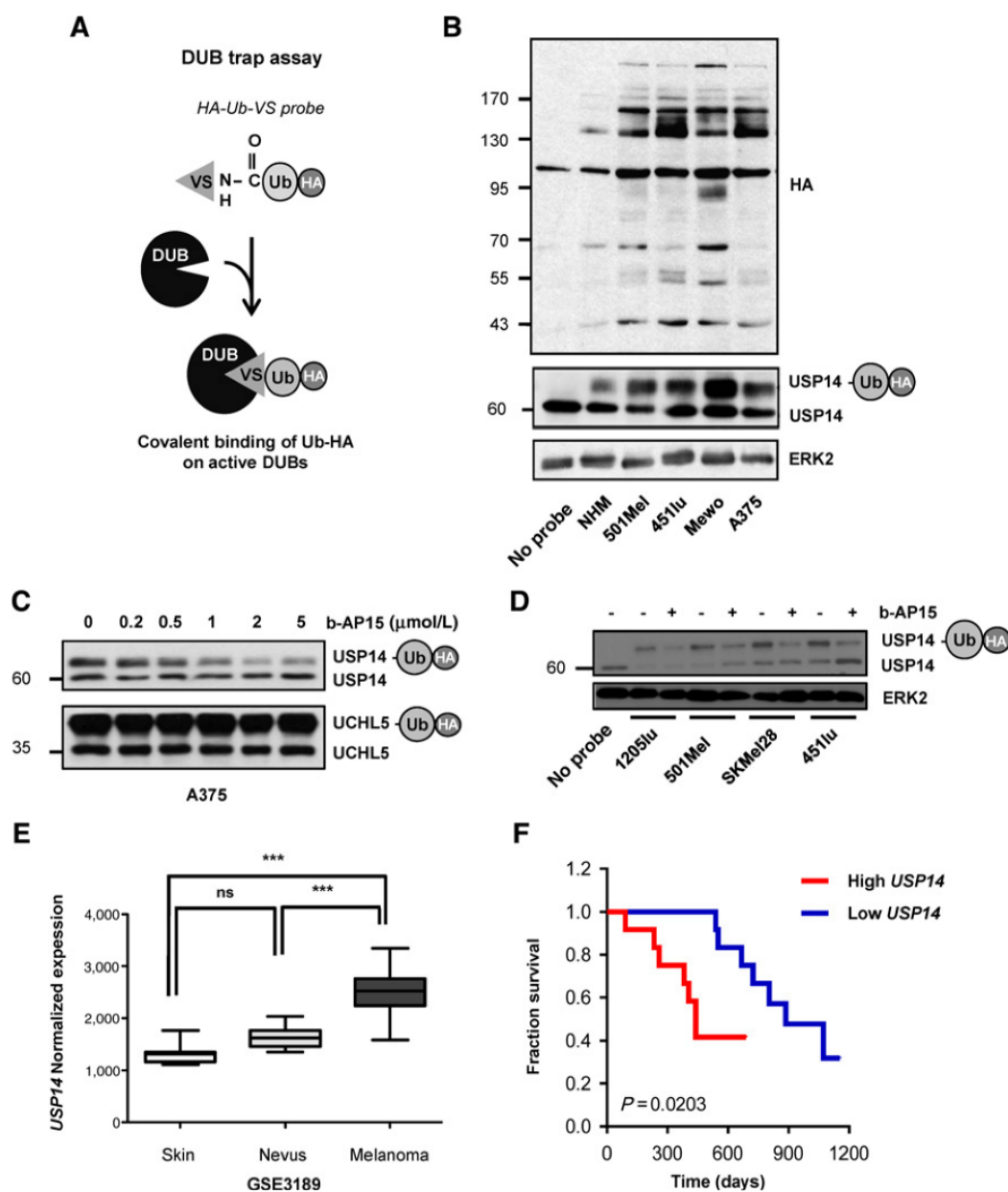


Figure 1. Expression and activity of USP14 in melanoma cells. **A**, Principle of the *in vitro* labeling method of activated DUBs by the suicide substrate HA-Ub-VS (DUB trap assay). **B**, Comparison of DUB activity between normal human melanocytes (NHM) and melanoma cells using DUB trap assay. Lysates of the indicated cells were incubated at 37°C with the HA-Ub-VS probe and analyzed by anti-HA, anti-USP14, and anti-ERK2 immunoblots. The active form of USP14 is indicated (USP14-Ub-HA). **C**, Inhibition of USP14 activity in A375 cells by increasing doses of b-AP15 measured by DUB trap assay and anti-USP14 and anti-UCHL5 immunoblot. **D**, Inhibition of USP14 activity in 1205lu, 501Mel, SKMel28, and 451lu cells by b-AP15 (2 μmol/L) measured by DUB trap assay and anti-USP14 immunoblot. Anti-ERK2 was used as a loading control. **E**, Analysis of public bioinformatic dataset (GSE3189) associates *USP14* gene expression with melanoma progression. **F**, Survival curves of metastatic melanoma patients with high versus low levels of *USP14* gene expression ($P = 0.0203$). Data were collected from publicly available dataset (GSE19234).

dose of b-AP15 (2 μmol/L), suggesting that the cytotoxicity of b-AP15 on melanoma cells was largely not due to an off-target effect (Supplementary Fig. S3). Together, these observations

demonstrate that the pharmacologic inhibition of USP14 has a potent anti-melanoma effect irrespective of mutational status of oncogenes and gene expression signatures.

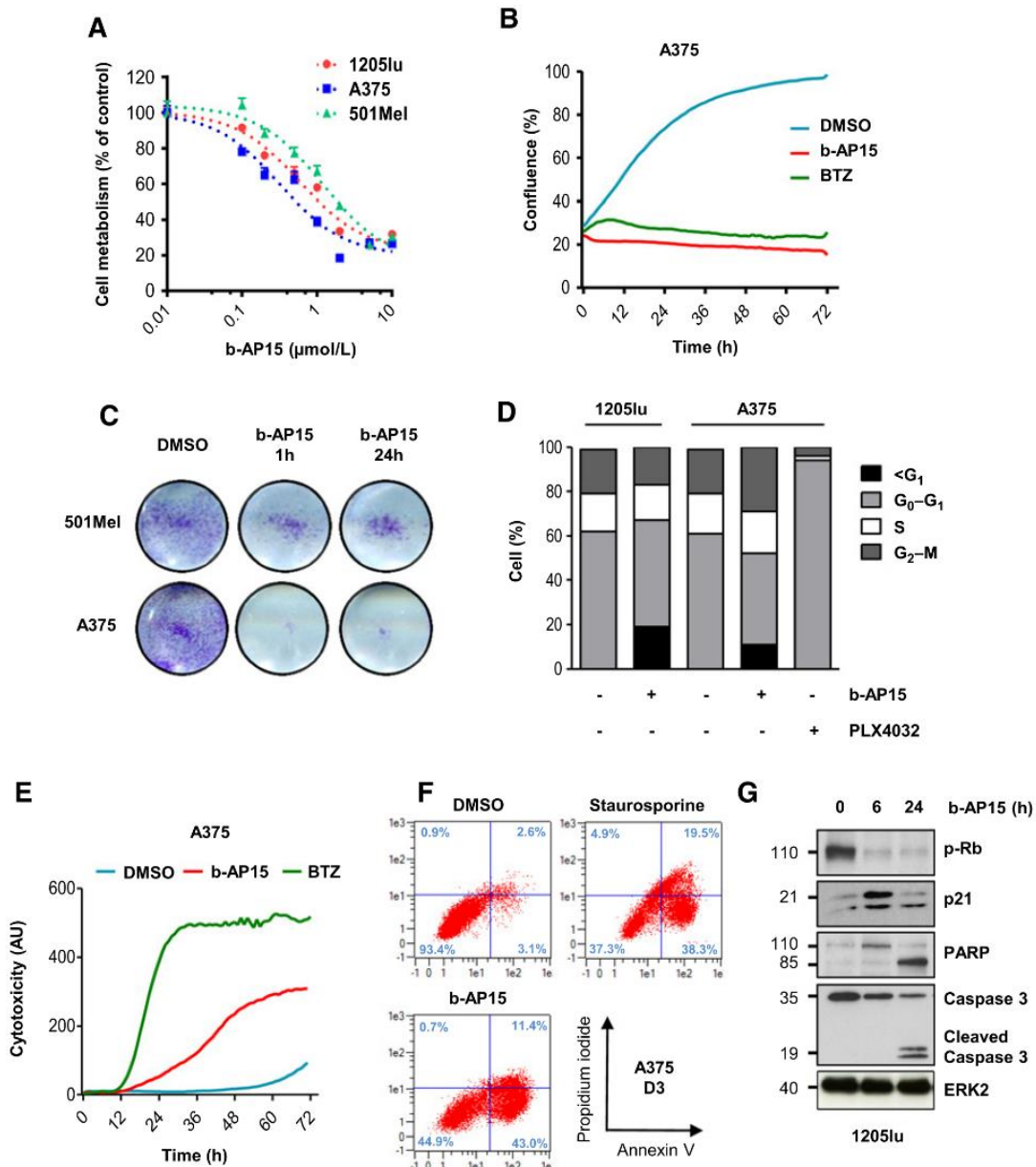


Figure 2. USP14 inhibition has a potent and broad anti-melanoma effect. **A**, Inhibition of USP14 reduces the proliferation of 1205lu, A375, and 501Mel cells. MTS assay on cells treated for 48 hours with increasing doses of b-AP15 (0.01–10 $\mu\text{mol/L}$). **B**, Growth curve of A375 treated with b-AP15 (2 $\mu\text{mol/L}$) or bortezomib (BTZ, 1 $\mu\text{mol/L}$). Data were acquired during 3 days with an IncuCyte zoom imaging system. **C**, Clonogenicity assay on A375 and 501Mel cells treated with DMSO or with b-AP15 (2 $\mu\text{mol/L}$, 1 or 24 hours) and seeded at 20,000 cells/well. Colonies were then fixed and stained with crystal violet. **D**, Effects of b-AP15 on melanoma cell-cycle progression. A375 and 1205lu cells were treated with b-AP15 (2 $\mu\text{mol/L}$) for 24 hours, fixed in 70% ethanol, and labeled with propidium iodide (PI). Cell DNA content was analyzed by flow cytometry. The different phases of the cell cycle are indicated. A treatment with vemurafenib (PLX, 1 $\mu\text{mol/L}$) is shown as control. Results are representative of three independent experiments. **E**, Cytotoxic effect of b-AP15 on melanoma cell. A375 cells were treated with b-AP15 (2 $\mu\text{mol/L}$) or bortezomib (BTZ, 1 $\mu\text{mol/L}$), and stained with cytotox green reagent (100 nmol/L). Data were acquired in triplicate during 3 days with an IncuCyte zoom imaging system. **F**, Effect of b-AP15 on melanoma cell survival. A375 cells treated or not with b-AP15 (2 $\mu\text{mol/L}$, 24 hours) were labeled with Annexin V-FITC and PI and analyzed by flow cytometry. The percentages indicate the different forms of cell death. A treatment with Staurosporine (1 $\mu\text{mol/L}$) is shown as control. Data are representative of three independent experiments. **G**, Western blot analysis of proteins involved in cell-cycle regulation and apoptosis on lysates from 1205lu cells treated with b-AP15 (2 $\mu\text{mol/L}$) for the indicated times. Membranes were probed with antibodies against phosphorylated Rb, p21CIP1, caspase 3, and cleaved PARP. Anti-ERK2 was used as a loading control.

Table 1. b-AP15 has a potent anti-melanoma effect irrespective of mutational status, gene expression signatures, and acquired drug resistance

Cell line	Type	Mutation(s)	Resistance	b-AP15 IC ₅₀ (μmol/L)
SBCL2	RGP	BRAF ^a	None	0.4
WM793	VGP	BRAFV600E/PTEN ^a	None	0.3
WM164	MET	BRAFV600E/CDKN2A ^a	None	0.9
WM266-4	MET	BRAFV600D/PTEN ^a	None	0.5
MeWo	MET	TP53 ^a /CDKN2A ^a /NF1 ^a	None	0.7
HMVII	MET	NRAS ^a	None	1.8
501Mel	MET	BRAFV600E	None	0.5
1205lu	MET	BRAFV600E/PTEN ^a	None	0.3
451lu	MET	BRAFV600E/TP53 ^a	None	0.9
451luR	MET	BRAFV600E/TP53 ^a /?	Dabrafenib	1.3
M229	MET	BRAFV600E/PTEN ^a	None	0.9
M229R	MET	BRAFV600E/PTEN ^a /RTK ^a	Vemurafenib	0.9
M238	MET	BRAFV600E/PTEN ^a	None	1.6
M238R	MET	BRAFV600E/PTEN ^a /RTK ^a	Vemurafenib	0.4
M249	MET	BRAFV600E/PTEN ^a	None	2.0
M249R	MET	BRAFV600E/PTEN ^a /NRAS ^a	Vemurafenib	3.0
Mel1617	MET	BRAF ^a /TP53 ^a	None	1.4
Mel1617R	MET	BRAF ^a /TP53 ^a /?	Vemurafenib	0.9
A375	MET	BRAFV600E/CDKN2A ^a	None	0.6
A375DR	MET	BRAFV600E/CDKN2A ^a /?	Vemurafenib/ERKi	1.3
Short-term cultures				
Pt#1	MET	?	None	3.4
Pt#2	MET	?	None	1.7

NOTE: IC₅₀ (μmol/L) of b-AP15 treatment on melanoma cell proliferation was determined after 48 hours by a MTS conversion assay.

Abbreviations: MET, metastasis; RGP, radial growth phase; RTK, receptor tyrosine kinase; VGP, vertical growth phase.

^aGene mutation or alteration.

Depletion of USP14 in melanoma reduces cell survival

We next used a genetic approach based on siRNAs targeting USP14 to study the effects of USP14 depletion on melanoma cell survival. Compared with nontargeting siRNA, two siRNA sequences (siUSP14 #1 and #2) targeting USP14 efficiently decreased USP14 expression and similarly decreased the phosphorylation of Rb following 3 days of transfection in 1205lu cells (Fig. 3A). Real-time imaging shows that USP14 knockdown impaired the proliferation of melanoma cell lines A375 and 501Mel (Fig. 3B; Supplementary Fig. S4A). We then studied the impact of USP14 depletion on melanoma focus formation. Compared with cells transfected with control siRNA, A375 and 501Mel cells transfected with USP14 siRNA were no longer capable of forming colonies after 7 days (Fig. 3C; Supplementary Fig. S4B and S4C). Consistent with this, cell-cycle analysis performed on USP14-depleted 1205lu cells showed that suppression of USP14 for 6 days altered cell-cycle progression and massively increased cell death as indicated by the appearance of a sub-G₁ cell population with reduced DNA content (Fig. 3D). Induction of cell death caused by USP14 knockdown in melanoma cells was further confirmed on USP14-depleted cells stained by Annexin-V-FITC/PI (Fig. 3E) and by immunoblot analysis revealing that USP14 depletion, which reduced Rb phosphorylation, also led to the cleavage of caspase 3 and its substrate PARP, two markers of apoptosis (Fig. 3F). These data confirm that USP14 is an important regulator of melanoma cell survival.

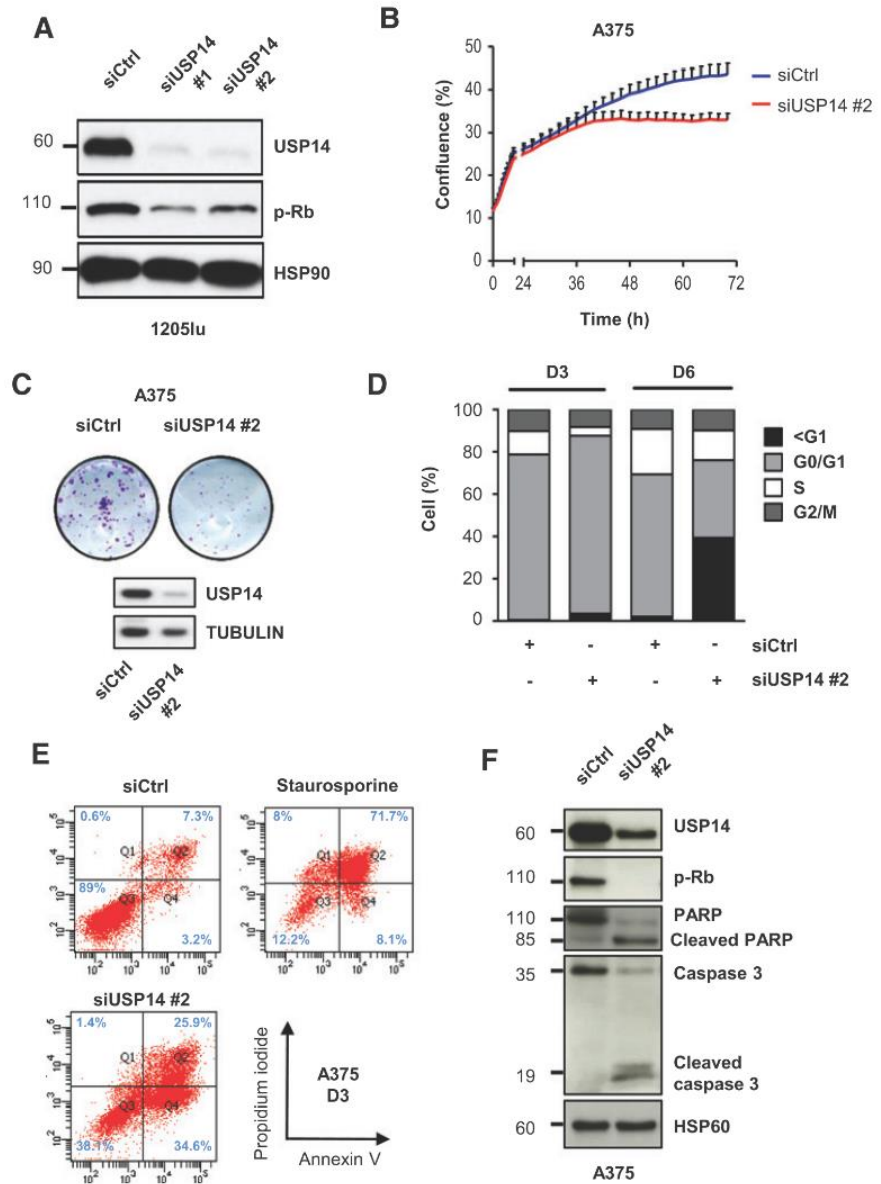
Molecular mechanisms underlying USP14 inhibition

To clarify how USP14 regulates melanoma cell survival, we first assessed the importance of the caspase-mediated apoptotic process in the cytotoxicity of b-AP15. Flow cytometry analysis of Annexin-V and PI staining performed on cells treated with b-AP15 in the presence or not of the pan-caspase inhibitor QVD-OPH

showed that melanoma cell death induced by b-AP15 took place independently of caspase activity (Fig. 4A and B; Supplementary Fig. S5A). USP14 is a DUB predominantly associated with the proteasome, where it cleaves the poly-ubiquitin chains of proteins that are addressed to the proteasome (23, 28). In myeloma cells, USP14 inhibition has been shown to trigger the accumulation of poly-ubiquitinated proteins and an ER stress response (29). We therefore examined how USP14 inhibition affects these events in melanoma cells. Treatment of melanoma cells with b-AP15 induced a rapid accumulation of K48-linked poly-ubiquitinated proteins (Fig. 4C; Supplementary Fig. S6A and S6B), and to a less extent accumulation of K63-linked poly-ubiquitinated proteins (Supplementary Fig. S6C). Targeting USP14 also resulted in the phosphorylation of the stress-related kinases p38 and JNK, and in the upregulation of ER stress-induced proteins Bip/GRP78 and CHOP, as well as in the increased expression of the chaperone HSP70 (Fig. 4C; Supplementary Fig. S6D). Using qRT-PCR analysis, we confirmed that USP14 inhibition in melanoma cells triggered a potent ER stress response as shown by the upregulation of *DDIT3/CHOP*, *HSPA5/GRP78*, *GADD34*, *ATF4*, and the appearance of the spliced form of *XBP1* mRNA (Fig. 4D). Flow cytometry analysis revealed that treatment of melanoma cells with b-AP15 triggered a rapid burst of ROS (Fig. 4E), associated with mitochondrial membrane depolarization (Fig. 4F). Importantly, the ROS scavenger NAC counteracted the anti-melanoma effect of b-AP15 (Supplementary Fig. S5B). Interestingly, compared with bortezomib, b-AP15 did not significantly affect proteasome-associated proteolytic activities (Fig. 4G), nor induce the formation of protein aggregates (Fig. 4H). Our data indicate that targeting USP14 leads to a caspase-independent cell death associated with accumulation of poly-ubiquitinated proteins and chaperones, ER stress, ROS production, and mitochondrial dysfunction.

Figure 3.

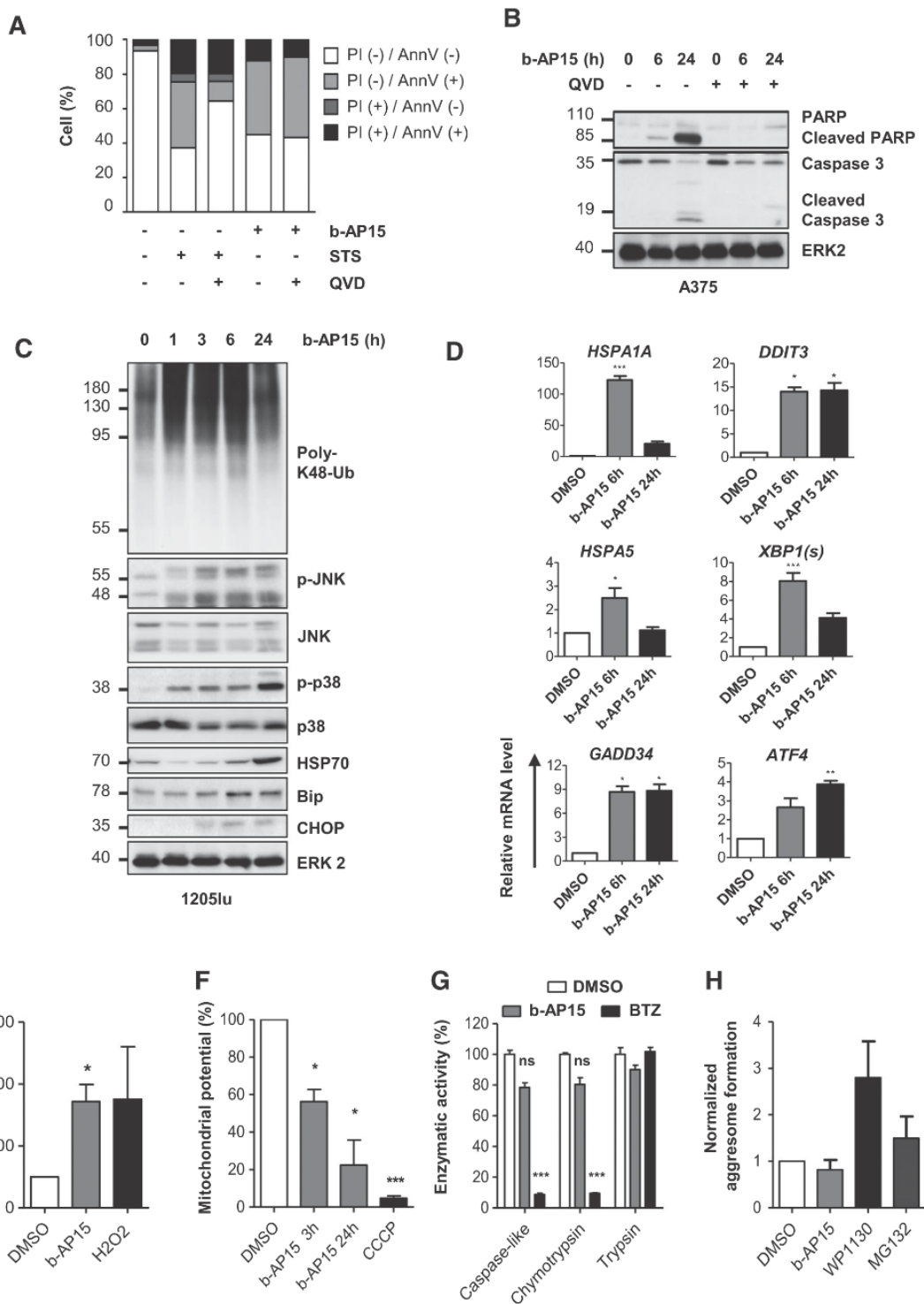
siRNA-mediated depletion of USP14 reduces melanoma cell survival. **A**, 1205lu cells were transfected with 50 nmol/L of siRNAs targeting USP14 (siUSP14 # 1 and # 2) or 50 nmol/L of control siRNA for 3 days. The expression of USP14 and the phosphorylation of Rb were analyzed by Western blot analysis after 5 days of transfection. Anti-HSP90 was used as a loading control. **B**, Growth curve of A375 transfected with siRNA control or targeting USP14 (siUSP14 #2; 50 nmol/L each). Data were collected in triplicate for the indicated times using an InCuCyte Zoom imaging system. **C**, Clonogenicity assays performed on A375 cells transfected with control siRNA or USP14 targeting USP14 (siUSP14 #2; 50 nmol/L each), reseeded at 2,000 cells/well and grown for 7 days. Colonies were labeled with crystal violet. An immunoblot against USP14 is shown as transfection control. **D**, Effects of USP14 knockdown on melanoma cell-cycle progression. 1205lu cells were transfected with control siRNA or siUSP14 #2 for 3 or 6 days, fixed in 70% ethanol, and labeled with PI. Cell DNA content was analyzed by flow cytometry. The different phases of the cell cycle are indicated. Results are representative of two independent experiments. **E**, USP14 knockdown reduces melanoma cell survival. A375 cells were transfected with control siRNA or siUSP14 #2 for 3 days, labeled with Annexin V-FITC and PI, and analyzed by flow cytometry. The percentages indicate the different forms of cell death. A treatment with staurosporine (1 μmol/L, 24 hours) is shown as control. **F**, Western blot analysis of lysates from A375 cells transfected with control or USP14 siRNA for 3 days. Membranes were probed with antibodies against USP14, phosphorylated Rb, caspase 3, and cleaved PARP. Anti-HSP60 was used as a loading control.



Targeting USP14 overcomes resistance to BRAFV600E inhibitors

Acquired resistance to MAPK signaling–targeted drugs remains a clinical challenge in the treatment of advanced metastatic BRAF-mutated melanomas. Therefore, we examined the impact of USP14 inhibition in melanoma cells resistant to BRAFV600E inhibitors (BRAFi). We first used two resistant cell lines that were isolated from parental BRAFV600E melanoma cells following chronic treatment with vemurafenib (isogenic pair M229 and M229R) or dabrafenib (isogenic pair 451lu and 451luR; Fig. 5A; refs. 33, 34). Inhibition of USP14 with b-AP15 potently decreased cell proliferation of BRAFi-resistant cells M229R and 451luR, in a

range of concentration that was comparable with their parental counterparts (Fig. 5B). Consistent with this, a DUB trap assay performed on lysates from the two pairs of cells showed that USP14 activity was slightly increased between BRAFi-sensitive and BRAFi-resistant cells (Fig. 5C). We extended these observations to additional isogenic pairs of cells sensitive and resistant to BRAFi through distinct mechanisms (Table 1). Using cell proliferation assays, we calculated the IC₅₀ of b-AP15 on sensitive and BRAFi-resistant cells and we found that b-AP15 blocked proliferation of vemurafenib- or dabrafenib-resistant cells with an efficacy not significantly different to what is observed on the respective parental BRAFi-sensitive cells. Notably, BRAFi-resistant



cells were efficiently targeted by b-AP15 regardless of the molecular mechanisms of acquired resistance. Importantly, USP14 inhibition efficiently decreased the viability of A375 melanoma cells with acquired resistance to dual BRAF and ERK inhibition (A375DR cells; Table 1). A colony formation assay carried out on 451lu and 451luR cells further confirmed that b-AP15 could suppress melanoma focus formation independently of acquired resistance to BRAFi (Fig. 5D). Mechanistically, inhibition of USP14 in melanoma cells induced molecular events, including accumulation of K48-linked poly-ubiquitination, decreased Rb phosphorylation, increased p38 phosphorylation, and ER stress response that were indistinguishable between BRAFi-sensitive and BRAFi-resistant cells (Fig. 5E). Our data show that melanoma cell treatment with b-AP15 can overcome resistance to drugs targeting oncogenic BRAF signaling pathway.

Antitumor activity of b-AP15 in a preclinical mouse model of melanoma

To further validate the anti-melanoma activity of b-AP15 observed *in vitro*, we used a xenograft mouse model of melanoma development in which the BRAFi-resistant cell line 451luR stably expressing the luciferase gene (451luR-luc+ cells) were injected subcutaneously into nude mice (Fig. 6A). After 3 days, mice were divided into two groups: one group was injected intraperitoneally with b-AP15, while the other group was injected with vehicle alone. Bioluminescence analysis of tumor growth showed a marked decrease in melanoma burden in b-AP15- versus vehicle-treated mice (Fig. 6B). The effect of b-AP15 treatment was already observable after 10 days and maintained up to day 35 of the experiment, as evidenced by BLI and the measurement of the tumor size at endpoint (Fig. 6C). Immunostaining of tumor sections also confirmed the effect of b-AP15 *in vivo*, with increased apoptosis-related DNA fragmentation in treated mice (Fig. 6D). Importantly, the doses of b-AP15 received by the animals were well tolerated, as no weight loss was observed during the course of the study (Fig. 6E). Our data thus reveal a potent *in vivo* anti-melanoma activity of b-AP15 and further suggest that targeting USP14 could represent a novel tool to treat melanoma that have acquired resistance to targeted therapy.

Discussion

Despite the recent introduction of immunotherapies and drugs targeting the MAPK pathway, advanced melanomas remain asso-

ciated with poor prognosis and as such a clinical challenge. Efforts to identify novel arms to combat metastatic resistant disease are thus warranted. Here we show that the DUB activity of USP14 is specifically elevated during the neoplastic progression of melanocytes to malignant cells. Besides, analysis of public databases first establishes a correlation between *USP14* expression and poor outcome in human melanoma. Together, our findings support the notion that USP14 may be pathologically relevant in melanoma.

USP14 is one of the two DUBs that reversibly associate with the 19S regulatory particle of the proteasome (42), to promote the deubiquitination of poly-ubiquitinated substrates addressed to the proteasome (28). The important role of USP14 in regulating proteostasis has been implicated in several types of cancer, including hematologic and solid tumors (23, 24, 29, 30). Our study now identifies USP14 as a key regulator of melanoma cell survival and targeting USP14 with the selective inhibitor b-AP15 and its derivative VLX1570 drastically reduces tumor cell proliferation. Importantly, USP14 inhibition efficiently impairs melanoma cell viability regardless of the mutational status of the oncogenic proteins BRAF and NRAS and of the tumor suppressor genes *TP53* and *PTEN*. These findings could have important clinical consequences for melanoma patients with tumors lacking *BRAF* mutations. Our data also suggest that elevated and targetable activity of USP14 in melanoma could not be attributed to a particular oncogenic driving event such as mutations affecting *BRAF* or *NRAS*. Whether USP14 activity in melanoma could be attributed to the Akt signaling pathway (31) remains to be determined. The collection of cancer cells tested in our study reflects the highly heterogeneous transcriptional and genomic landscape of cutaneous melanoma (2, 6). Notably, b-AP15 and VLX1570 target show similar efficacy on melanoma cells with distinct phenotypes and metastatic potential (3, 4). Given that b-AP15 targets melanoma cells with invasive traits associated with melanoma-initiating activity, and thereby intrinsically resistant to targeted therapy, our results suggest that USP14 inhibition could also be effective in targeting this highly aggressive melanoma cell population.

Another challenge clinicians have to face during the treatment of advanced melanoma is the rapid emergence of drug-resistant melanoma lesions (2, 8). To this regard, we show that selective targeting of USP14 overcomes acquired resistance to BRAFi both *in vitro* and *in vivo*. b-AP15 drastically impairs the viability of therapy-resistant cells, in a range of concentration similar to what is required to induce cell death in drug-sensitive cell lines and

Figure 4.

Characterization of the molecular mechanisms underlying USP14 inhibition. **A**, Effect of caspase inhibition on b-AP15-induced cell death. A375 cell cultures were treated with 1 $\mu\text{mol/L}$ b-AP15 or 1 $\mu\text{mol/L}$ staurosporine in the presence or not of 20 $\mu\text{mol/L}$ QVD-Oph for 24 hours, labeled with Annexin V-FITC and PI and analyzed by flow cytometry. Data are representative of two independent experiments and show the percentage of different forms of cell death based on Annexin-FITC and PI positivity. **B**, Western blot analysis of caspase 3 and PARP cleavage induced by b-AP15 on A375 cells treated or not with QVD-Oph. Anti-ERK2 was used as a loading control. **C**, Western blot analysis of lysates from 1205lu cells treated with 2 $\mu\text{mol/L}$ b-AP15 for the indicated times. Membranes were probed with antibodies against K48-linked poly-ubiquitinated proteins, phosphorylated JNK and p38, HSP70, Bip/GRP78, and CHOP. Anti-ERK2 was used as a loading control. **D**, qRT-PCR analysis of mRNA levels of *HSPA1A* and ER stress response genes following incubation of 1205lu cells with b-AP15 (2 $\mu\text{mol/L}$) for 6 and 24 hours. Data are the mean \pm SD of two independent experiments performed in duplicate. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$ and ***, $P < 0.001$. **E**, USP14 inhibition triggers ROS production. 501Mel cells were treated with 2 $\mu\text{mol/L}$ b-AP15 for 30 minutes and stained with 10 $\mu\text{mol/L}$ CM-H₂DCFDA for 30 minutes at 37°C. ROS levels were determined by flow cytometry. A treatment with H2O2 (10 $\mu\text{mol/L}$) is shown as control. *, $P < 0.05$. **F**, USP14 inhibition triggers mitochondrial membrane depolarization. A375 cells were treated with 2 $\mu\text{mol/L}$ b-AP15 for 3 or 24 hours, stained with 1 $\mu\text{mol/L}$ TMRE, and analyzed by flow cytometry. A treatment with the mitochondrial uncoupler CCCP (15 $\mu\text{mol/L}$) is shown as control. *, $P < 0.05$. **G**, USP14 inhibition does not affect proteasome activity. A375 cells were treated with 2 $\mu\text{mol/L}$ b-AP15 or bortezomib (BTZ, 1 $\mu\text{mol/L}$) for 6 hours. Proteasome caspase-like, chymotrypsin-like, and trypsin activities were measured as described in Materials and Methods. Bar graphs show mean \pm SD ($n = 3$). Results are representative of two independent experiments. ***, $P < 0.001$; ns, not significant. **H**, USP14 inhibition does not induce protein aggresome formation. A375 cells treated with 2 $\mu\text{mol/L}$ b-AP15, 10 $\mu\text{mol/L}$ MG132, or 2 $\mu\text{mol/L}$ of the pan-DUB inhibitor WP1130 for 6 hours. Aggresomes were stained as indicated in Materials and Methods. Bar graphs show mean \pm SD ($n = 3$).

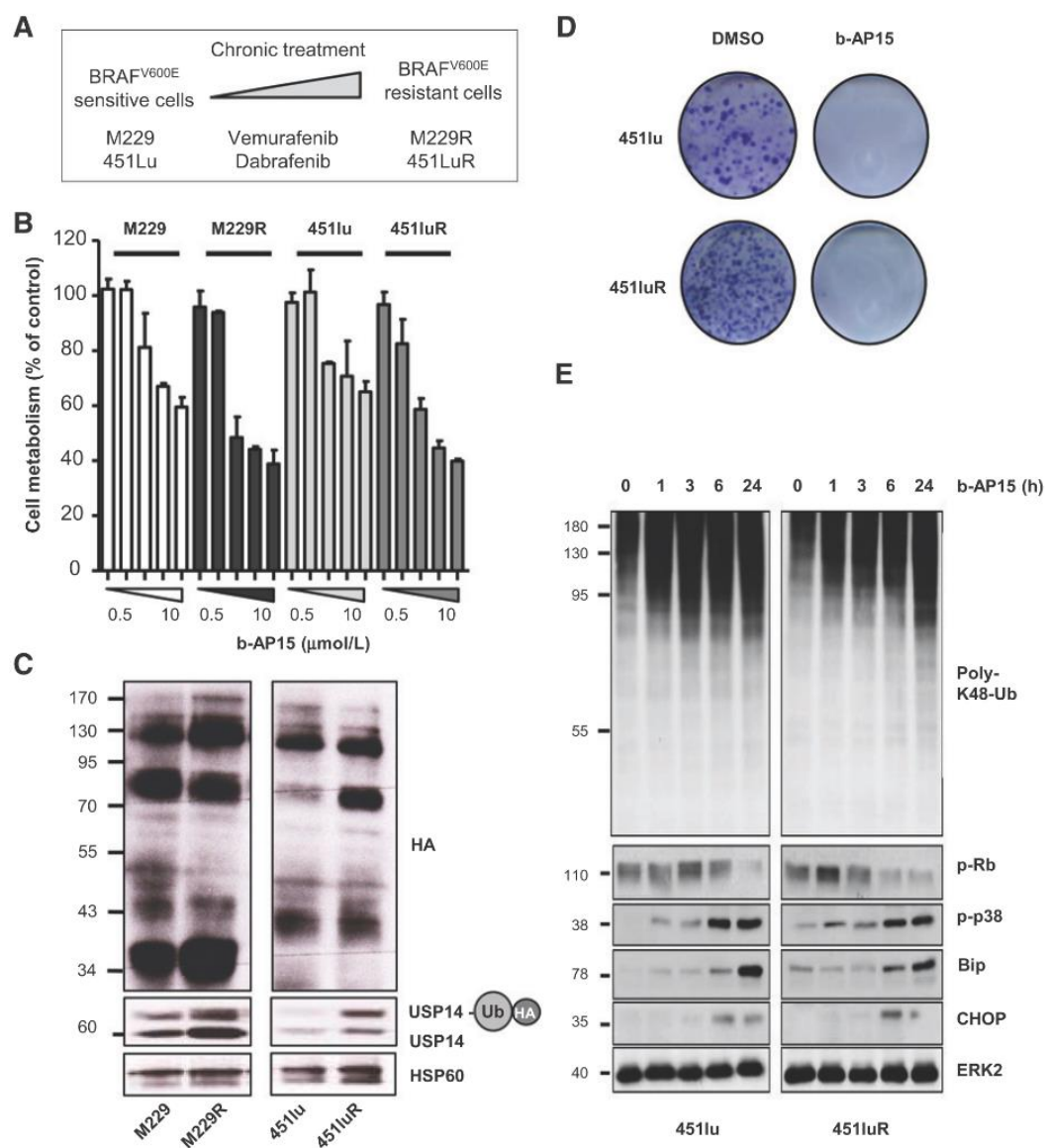
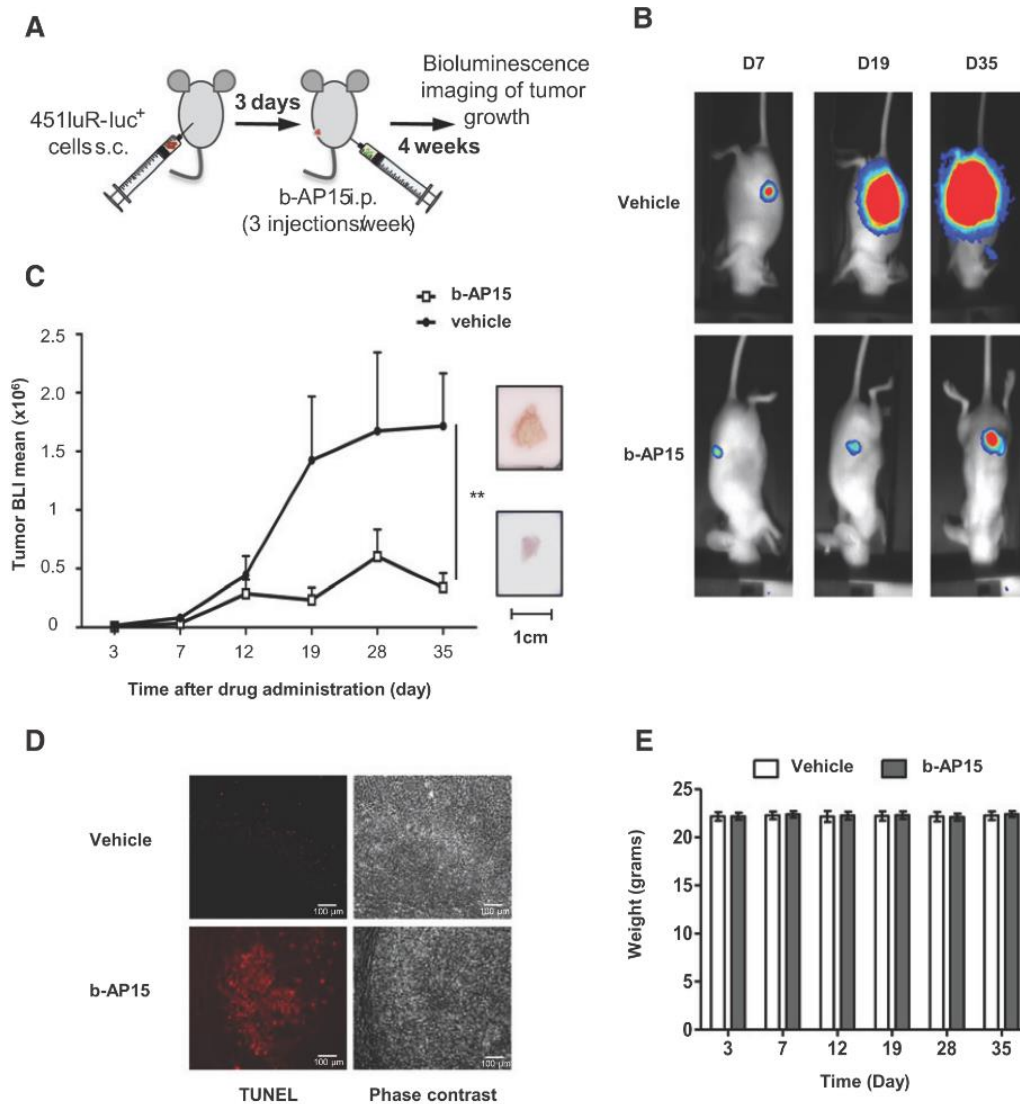


Figure 5. Treatment with b-AP15 overcomes resistance to BRAFV600E inhibitors. **A**, Schematic description of the isogenic pairs of naïve and BRAFV600E-resistant melanoma cells used in this study. **B**, USP14 inhibition reduces the proliferation of M229 and 451lu BRAFV600E-sensitive cells and of their BRAFV600E-resistant derivatives M229R and 451luR, respectively. MTS assays on cells treated for 24 hours with increasing doses of b-AP15 (0.1–10 μmol/L). Bar graphs show mean ± SD (*n* = 3). Results are representative of two independent experiments. **C**, Analysis of USP14 activity in M229/M229R and 451lu/451luR pairs of melanoma cells using DUB trap assay. Lysates of the indicated cells were incubated at 37°C with the HA-Ub-V5 probe and analyzed by anti-HA and anti-USP14 immunoblots. Anti-HSP60 was used as a loading control. The active form of USP14 is indicated (USP14-Ub-HA). **D**, Clonogenic assay on 451lu and 451luR cells seeded at 20,000 cells/well and treated with or without b-AP15 (2 μmol/L). Colonies were fixed and stained with crystal violet. **E**, Western blot analysis of lysates from 451lu and 451luR cells treated with 2 μmol/L b-AP15 for the indicated times. Membranes were probed with antibodies against K48-linked poly-ubiquitinated proteins, phosphorylated Rb and p38, BIP/GRP78, and CHOP. Anti-ERK2 was used as a loading control.

irrespective of the mechanism of secondary resistance (i.e., NRAS mutation or upregulation of receptor tyrosine kinases). We also demonstrate the anti-melanoma activity of b-AP15 in a preclinical mouse model of BRAFV600E-resistant tumor growth. This is consistent

with previous studies describing antitumor activity of USP14 inhibitors in cancer models (23, 29, 39, 40). Interestingly, inhibition of proteasome-bound DUBs with b-AP15 has been shown to sensitize tumor cells to TRAIL-mediated apoptosis by NK cells

**Figure 6.**

b-AP15 inhibits tumor growth in melanoma xenografted mouse. **A**, Schematic representation of the experimental procedure used in this study. **B**, 451LuR-luc⁺ cells (1×10^6) were injected subcutaneously into nude mice. After 3 days, mice were injected intraperitoneally 3 times per week either with b-AP15 (10 mg/kg) or vehicle. Bioluminescence images were acquired at the indicated times using a Photon Imager system (Biospace Lab). Representative images of tumor bioluminescence at day 7, 19, and 35 of treatment are shown. **C**, Quantification of tumor growth inhibition by b-AP15. Tumor BLIs of b-AP15- or vehicle-treated mice were recorded as described above and data analyzed with the M3Vision software (Biospace Lab). Data shown are mean \pm SD of tumor BLI ($n = 12$; **, $P = 0.009$, two-way ANOVA). Representative micrographs of endpoint analysis of b-AP15- or vehicle-treated tumor volume are shown (right). **D**, Apoptotic cells were detected *in situ* on b-AP15- or vehicle-treated tumors by an indirect TUNEL method. Scale bar, 100 μ m. **E**, Mouse body weight was measured at the indicated days. Data shown are mean \pm SD ($n = 12$).

and T cells (24). These observations raise the interesting possibility that USP14 inhibition could improve current anti-melanoma immunotherapies that show significant toxicities and patient-selective responses (8).

Previous studies have indicated that DUBs are functionally involved in multiple signaling pathways controlling cell proliferation and migration, as well as cell survival (18, 42). In multiple

myeloma, b-AP15 induces a G₂-M phase cell-cycle arrest followed by caspase-dependent cell death (29). Consistently, we show that USP14 targeting alters cell-cycle progression and triggers caspase-3 activity and melanoma cell death. However, caspase blockade does not prevent cell death induced by USP14 inhibition, suggesting that USP14 controls melanoma cell viability independently of caspase activities. USP14 is predominantly associated with the

proteasome, where it deubiquitinates poly-ubiquitinated substrates (28). Consistently, USP14 inhibition triggers in melanoma cells a rapid accumulation of K48-linked poly-ubiquitinated proteins, without significantly affecting the core proteolytic activities of the proteasome, nor the accumulation of toxic protein aggregates, underlining the selective action of b-AP15. USP14 inhibition also induces a rapid activation of stress-inducible kinases p38 and JNK, accumulation of the chaperone protein HSP70, and a potent ER stress response. Consistent with a previous study (41), the treatment of melanoma cells with b-AP15 also promotes a rapid burst of ROS, followed by mitochondrial dysfunction and an irreversible commitment to cell death. The origin of ROS is currently unknown but our data point toward mitochondria as the actual source of ROS generated downstream of USP14 inhibition. The inhibition of the selenoprotein thioredoxin reductase (TrxR) by b-AP15 (41) represents another possible mechanism that is under investigation. Together, our data indicate that targeting USP14 in melanoma increases oxidative and proteotoxic stress, and ultimately triggers a ROS-dependent and caspase-independent cell death through an unresolved ER stress that overcomes resistance to MAPK-targeting therapies.

Genome sequencing has demonstrated that, compared with other solid tumors, cutaneous melanomas exhibit one of the highest rate of somatic mutations due to carcinogenic ultraviolet light exposure (43). In addition, recent studies have underscored the addition of melanoma cells to proteostatic processes (44–46). In this context, our findings identifying a role for the proteasome-associated DUB USP14 in melanoma cell survival further document the targetability of aberrant proteostasis in melanoma. A clinical trial investigating VLX1570 for relapsed or refractory multiple myeloma has been suspended due to dose toxicity, indicating that additional drug development is necessary before USP14 inhibitors could enter the clinic. Nevertheless, our study provides a rationale for the evaluation of USP14-targeting drugs as potential therapies to tackle melanoma.

References

- Miller AJ, Mihm MC Jr. Melanoma. *N Engl J Med* 2006;355:51–65.
- Flaherty KT, Hodi FS, Fisher DE. From genes to drugs: targeted strategies for melanoma. *Nat Rev Cancer* 2012;12:349–61.
- Tichet M, Prod'Homme V, Fenouille N, Ambrosetti D, Mallavialle A, Cerezo M, et al. Tumour-derived SPARC drives vascular permeability and extravasation through endothelial VCAM1 signalling to promote metastasis. *Nat Commun* 2015;6:6993.
- Widmer DS, Cheng PF, Eichhoff OM, Belloni BC, Zipser MC, Schlegel NC, et al. Systematic classification of melanoma cells by phenotype-specific gene expression mapping. *Pigment Cell Melanoma Res* 2012;25:343–53.
- Kemper K, de Goeje PL, Peeper DS, van Amerongen R. Phenotype switching: tumor cell plasticity as a resistance mechanism and target for therapy. *Cancer Res* 2014;74:5937–41.
- Tirosh I, Izar B, Prakadan SM, Wadsworth MHII, Treacy D, Trombetta JJ, et al. Dissecting the multicellular ecosystem of metastatic melanoma by single-cell RNA-seq. *Science* 2016;352:189–96.
- Girotti MR, Satumo G, Lorigan P, Marais R. No longer an untreatable disease: how targeted and immunotherapies have changed the management of melanoma patients. *Mol Oncol* 2014;8:1140–58.
- Eggermont AM, Spatz A, Robert C. Cutaneous melanoma. *Lancet* 2014;383:816–27.
- Balch WE, Morimoto RI, Dillin A, Kelly JW. Adapting proteostasis for disease intervention. *Science* 2008;319:916–9.
- Deshais RJ. Proteotoxic crisis, the ubiquitin-proteasome system, and cancer therapy. *BMC Biol* 2014;12:94.
- Hershko A, Ciechanover A. The ubiquitin system. *Annu Rev Biochem* 1998;67:425–79.
- Finley D. Recognition and processing of ubiquitin-protein conjugates by the proteasome. *Annu Rev Biochem* 2009;78:477–513.
- Hu R, Aplin AE. Skp2 regulates G₂-M progression in a p53-dependent manner. *Mol Cell Biol* 2008;19:4602–10.
- Aydin IT, Melamed RD, Adams SJ, Castillo-Martin M, Demir A, Bryk D, et al. FBXW7 mutations in melanoma and a new therapeutic paradigm. *J Natl Cancer Inst* 2014;106:dju107.
- Fenouille N, Puissant A, Tichet M, Zimniak G, Abbe P, Mallavialle A, et al. SPARC functions as an anti-stress factor by inactivating p53 through Akt-mediated MDM2 phosphorylation to promote melanoma cell survival. *Oncogene* 2011;30:4887–900.
- Nijman SM, Luna-Vargas MP, Velds A, Brummelkamp TR, Dirac AM, Sixma TK, et al. A genomic and functional inventory of deubiquitinating enzymes. *Cell* 2005;123:773–86.
- Reyes-Turcu FE, Ventii KH, Wilkinson KD. Regulation and cellular roles of ubiquitin-specific deubiquitinating enzymes. *Ann Rev Biochem* 2009;78:363–97.
- Fraille JM, Quesada V, Rodriguez D, Freije JM, Lopez-Otin C. Deubiquitinases in cancer: new functions and therapeutic options. *Oncogene* 2012;31:2373–88.
- D'Arcy P, Wang X, Linder S. Deubiquitinase inhibition as a cancer therapeutic strategy. *Pharm Ther* 2015;147:32–54.
- Zhao X, Fiske B, Kawakami A, Li J, Fisher DE. Regulation of MIF stability by the USP13 deubiquitinase. *Nat Commun* 2011;2:2414.

Disclosure of Potential Conflicts of Interest

No potential conflicts of interest were disclosed.

Authors' Contributions

Conception and design: S. Tartare-Deckert, M. Deckert

Development of methodology: R. Didier, A. Mallavialle, M. Tichet, M. Deckert

Acquisition of data (provided animals, acquired and managed patients, provided facilities, etc.): R. Didier, A. Mallavialle, R. Ben Jouira, M.A. Domdom, F. Luciano, M. Ohanna, M. Deckert

Analysis and interpretation of data (e.g., statistical analysis, biostatistics, computational analysis): R. Didier, A. Mallavialle, M. Ohanna, S. Tartare-Deckert, M. Deckert

Writing, review, and/or revision of the manuscript: R. Didier, S. Tartare-Deckert, M. Deckert

Administrative, technical, or material support (i.e., reporting or organizing data, constructing databases): P. Auberger, S. Tartare-Deckert, M. Deckert

Study supervision: S. Tartare-Deckert, M. Deckert

Acknowledgments

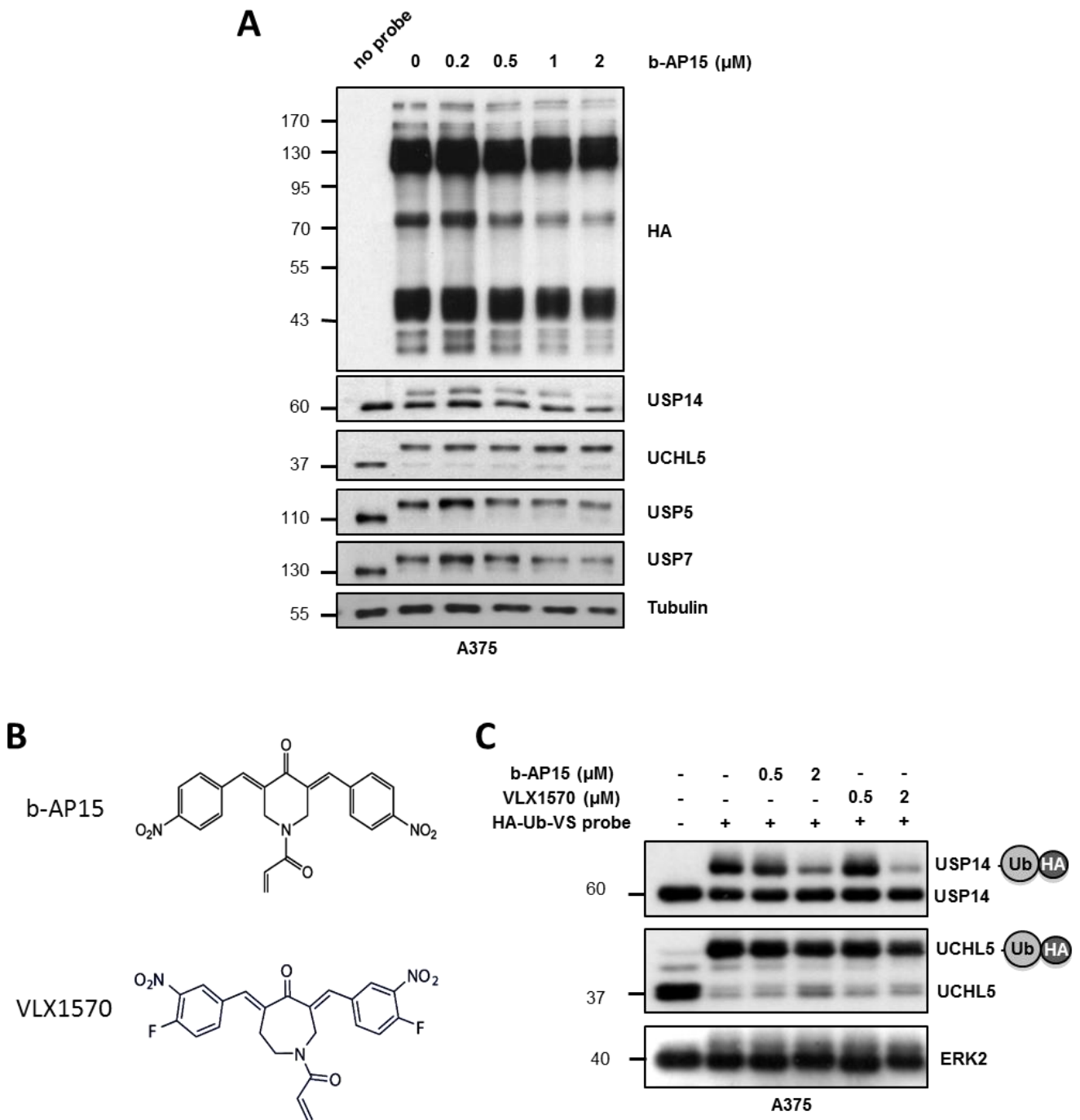
We thank R.S. Lo, M. Herlyn, J. Villanueva, R. Ballotti, and C. Marine for melanoma cells. We also acknowledge the C3M animal room facility and the C3M imaging facility (Microscopy and Imaging platform Côte d'Azur, MICA). This work was supported by Fondation ARC (grant PJA 20131200347, to M. Deckert), Canceropôle PACA (Emergence 2015, to M. Deckert), Ligue contre le cancer (Equipe labellisée 2016, to S. Tartare-Deckert), the French Government (National Research Agency, ANR) through the "Investments for the Future," LABEX SIGNALIFE program reference # ANR-11-LABX-0028-01 (to R. Ben Jouira) and with financial support from IEMO Cancer Aviesan (Alliance Nationale pour les Sciences de la Vie et de la Santé, National Alliance for Life Science and Health) within the framework of the Cancer Plan 2016 (to S. Tartare-Deckert). We also thank financial support by Conseil général des Alpes-Maritimes and Région PACA. R. Didier and R. Ben Jouira were recipients of a doctoral fellowship from Fondation ARC.

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

Received September 18, 2017; revised January 26, 2018; accepted April 16, 2018; published first April 27, 2018.

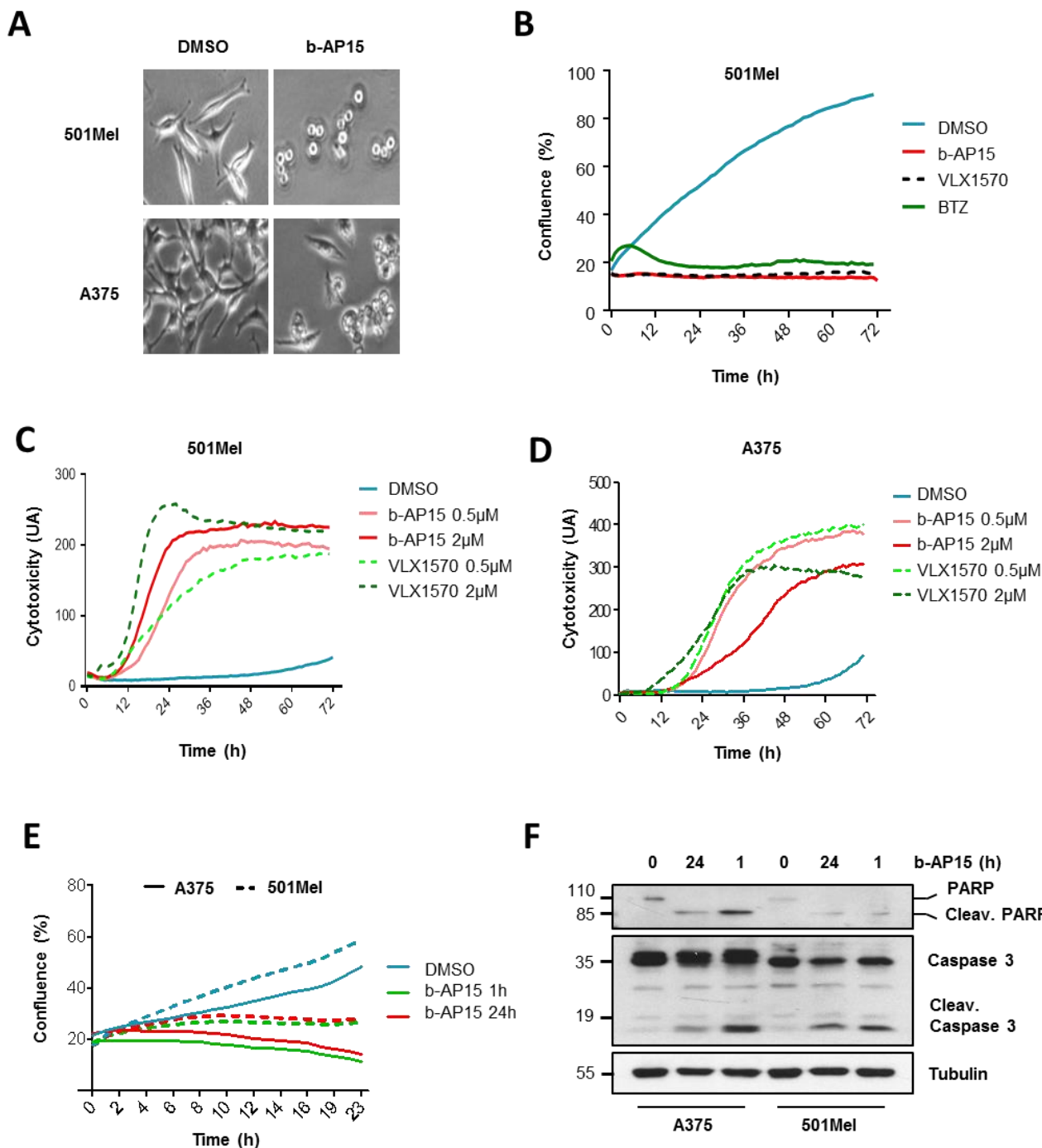
21. Potu H, Peterson LF, Pal A, Verhaegen M, Cao J, Talpaz M, et al. Usp5 links suppression of p53 and FAS levels in melanoma to the BRAF pathway. *Oncotarget* 2014;5:5559–69.
22. Potu H, Peterson LF, Kandarpa M, Pal A, Sun H, Durham A, et al. Usp9x regulates Ets-1 ubiquitination and stability to control NRAS expression and tumorigenicity in melanoma. *Nat Commun* 2017;8:14449.
23. D'Arcy P, Brnjic S, Olofsson MH, Fryknas M, Lindsten K, De Cesare M, et al. Inhibition of proteasome deubiquitinating activity as a new cancer therapy. *Nat Med* 2011;17:1636–40.
24. Sarhan D, Wennerberg E, D'Arcy P, Gurajada D, Linder S, Lundqvist A. A novel inhibitor of proteasome deubiquitinating activity renders tumor cells sensitive to TRAIL-mediated apoptosis by natural killer cells and T cells. *Cancer Immunol Immunother* 2013;62:1359–68.
25. Oh YT, Deng L, Deng J, Sun SY. The proteasome deubiquitinase inhibitor b-AP15 enhances DR5 activation-induced apoptosis through stabilizing DR5. *Sci Rep* 2017;7:8027.
26. Hu M, Li P, Song L, Jeffrey PD, Chenova TA, Wilkinson KD, et al. Structure and mechanisms of the proteasome-associated deubiquitinating enzyme USP14. *EMBO J* 2005;24:3747–56.
27. Lee BH, Lee MJ, Park S, Oh DC, Elsasser S, Chen PC, et al. Enhancement of proteasome activity by a small-molecule inhibitor of USP14. *Nature* 2010;467:179–84.
28. Lee BH, Lu Y, Prado MA, Shi Y, Tian G, Sun S, et al. USP14 deubiquitinates proteasome-bound substrates that are ubiquitinated at multiple sites. *Nature* 2016;532:398–401.
29. Tian Z, D'Arcy P, Wang X, Ray A, Tai YT, Hu Y, et al. A novel small molecule inhibitor of deubiquitylating enzyme USP14 and UCHL5 induces apoptosis in multiple myeloma and overcomes bortezomib resistance. *Blood* 2014;123:706–16.
30. Vogel RI, Coughlin K, Scotti A, Iizuka Y, Anchoori R, Roden RB, et al. Simultaneous inhibition of deubiquitinating enzymes (DUBs) and autophagy synergistically kills breast cancer cells. *Oncotarget* 2015;6:4159–70.
31. Xu D, Shan B, Lee BH, Zhu K, Zhang T, Sun H, et al. Phosphorylation and activation of ubiquitin-specific protease-14 by Akt regulates the ubiquitin-proteasome system. *eLife* 2015;4:e10510.
32. Robert G, Gaggioli C, Bailet O, Chavey C, Abbe P, Aberdam E, et al. SPARC represses E-cadherin and induces mesenchymal transition during melanoma development. *Cancer Res* 2006;66:7516–23.
33. Villanueva J, Vultur A, Lee JT, Somasundaram R, Fukunaga-Kalabis M, Cipolla AK, et al. Acquired resistance to BRAF inhibitors mediated by a RAF kinase switch in melanoma can be overcome by cotargeting MEK and IGF-1R/PI3K. *Cancer Cell* 2010;18:683–95.
34. Nazarian R, Shi H, Wang Q, Kong X, Koya RC, Lee H, et al. Melanomas acquire resistance to B-RAF(V600E) inhibition by RTK or N-RAS upregulation. *Nature* 2010;468:973–7.
35. Fenouille N, Tichet M, Dufies M, Pottier A, Mogha A, Soo JK, et al. The epithelial-mesenchymal transition (EMT) regulatory factor SLUG (SNAI2) is a downstream target of SPARC and AKT in promoting melanoma cell invasion. *PLoS One* 2012;7:e40378.
36. Hamouda MA, Belhacene N, Puissant A, Colosetti P, Robert G, Jacquel A, et al. The small heat shock protein B8 (HSPB8) confers resistance to bortezomib by promoting autophagic removal of misfolded proteins in multiple myeloma cells. *Oncotarget* 2014;5:6252–66.
37. Baudot AD, Jeandel PY, Mouska X, Maurer U, Tartare-Deckert S, Raynaud SD, et al. The tyrosine kinase Syk regulates the survival of chronic lymphocytic leukemia B cells through PKCdelta and proteasome-dependent regulation of Mcl-1 expression. *Oncogene* 2009;28:3261–73.
38. Ovaas H, Galardy PJ, Ploegh HL. Mechanism-based proteomics tools based on ubiquitin and ubiquitin-like proteins: synthesis of active site-directed probes. *Methods Enzymol* 2005;399:468–78.
39. Wang X, Mazurkiewicz M, Hillert EK, Olofsson MH, Pierrou S, Hillert P, et al. The proteasome deubiquitinase inhibitor VLX1570 shows selectivity for ubiquitin-specific protease-14 and induces apoptosis of multiple myeloma cells. *Sci Rep* 2016;6:26979.
40. Paulus A, Akhtar S, Caulfield TR, Samuel K, Yousaf H, Bashir Y, et al. Coinhibition of the deubiquitinating enzymes, USP14 and UCHL5, with VLX1570 is lethal to ibrutinib- or bortezomib-resistant Waldenstrom macroglobulinemia tumor cells. *Blood Cancer J* 2016;6:e492.
41. Wang X, Stafford W, Mazurkiewicz M, Fryknas M, Brnjic S, Zhang X, et al. The 19S Deubiquitinase inhibitor b-AP15 is enriched in cells and elicits rapid commitment to cell death. *Mol Pharmacol* 2014;85:932–45.
42. D'Arcy P, Linder S. Proteasome deubiquitinases as novel targets for cancer therapy. *Int J Biochem Cell Biol* 2012;44:1729–38.
43. Lawrence MS, Stojanov P, Polak P, Kryukov GV, Cibulskis K, Sivachenko A, et al. Mutational heterogeneity in cancer and the search for new cancer-associated genes. *Nature* 2013;499:214–8.
44. Beck D, Niessner H, Smalley KS, Flaherty K, Paraiso KH, Busch C, et al. Vemurafenib potently induces endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis in BRAFV600E melanoma cells. *Sci Signal* 2013;6:ra7.
45. Ma XH, Piao SF, Dey S, McAfee Q, Karakousis G, Villanueva J, et al. Targeting ER stress-induced autophagy overcomes BRAF inhibitor resistance in melanoma. *J Clin Invest* 2014;124:1406–17.
46. Cerezo M, Lehraiki A, Millet A, Rouaud F, Plaisant M, Jaune E, et al. Compounds triggering ER stress exert anti-melanoma effects and overcome BRAF inhibitor resistance. *Cancer Cell* 2016;29:805–19.

Supplementary Figure 1



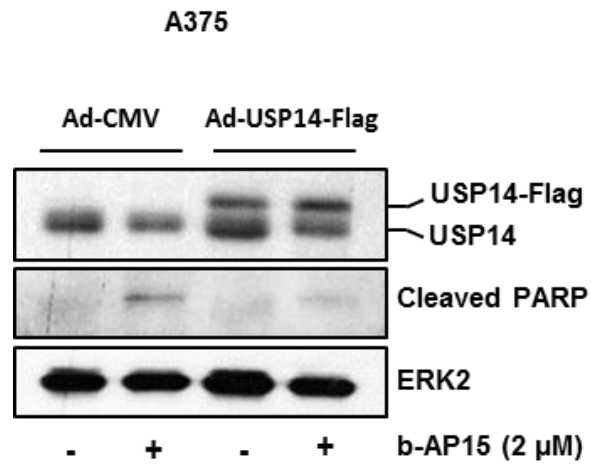
Supplementary Figure 1. b-AP15 and its derivative VLX1570 inhibit USP14 activity in melanoma cells. (A) Inhibition of DUB activities in A375 cells by increasing doses of b-AP15 measured by DUB trap assay and anti-HA, anti-USP14, anti-UCHL5, anti-USP5 and anti-USP7 immunoblots. Anti-tubulin α was used as a loading control. (B) Chemical structures of b-AP15 and VLX1570. (C) Analysis of USP14 activity in A375 cells treated with b-AP15 or VLX1570 using the DUB trap assay. Lysates were blotted with antibodies against USP14 and UCHL5. The active forms of USP14 and UCHL5 are indicated (USP14-Ub-HA and UCHL5-Ub-HA).

Supplementary Figure 2



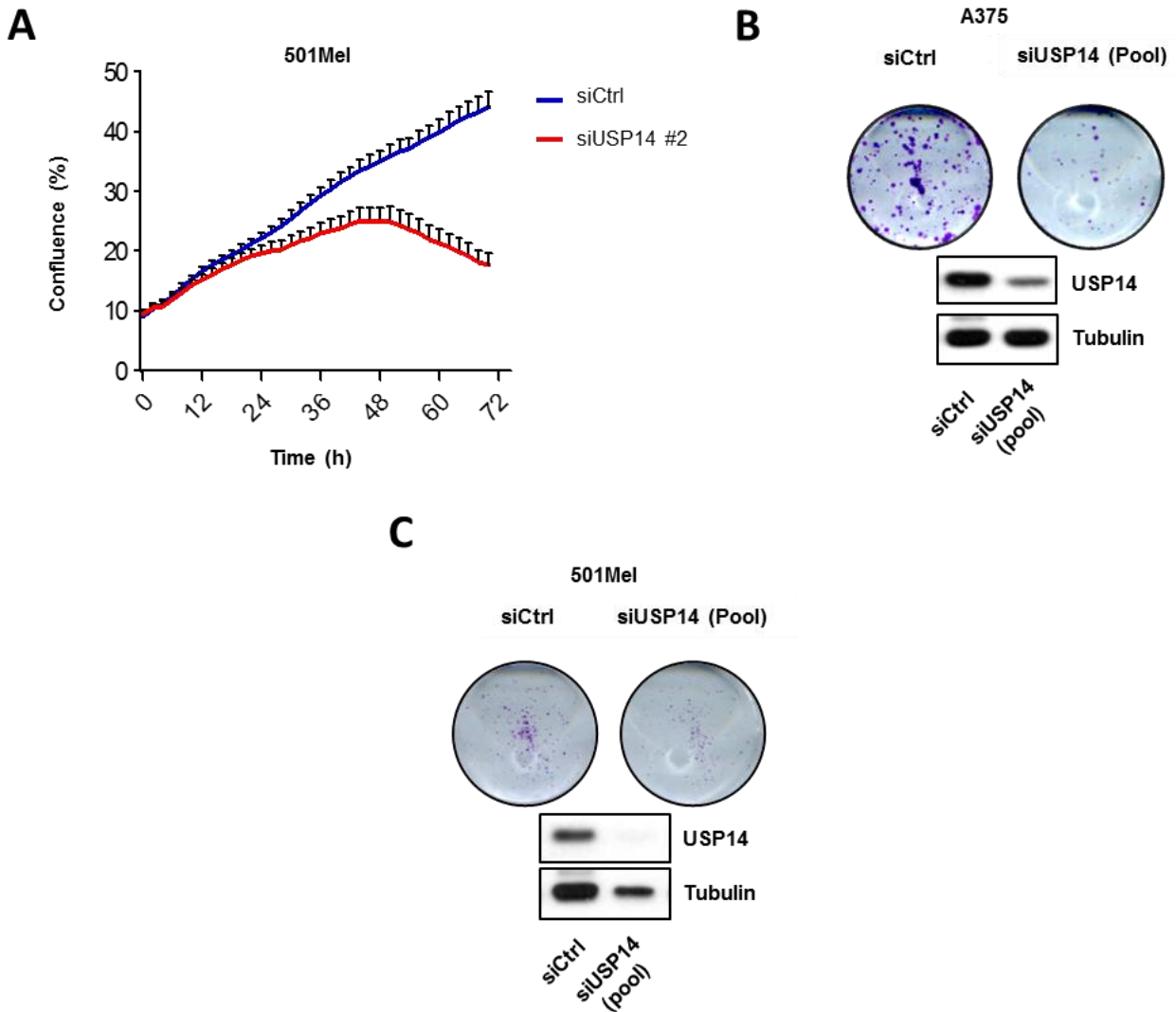
Supplementary Figure 2. USP14 inhibition irreversibly induces growth inhibition and cytotoxicity in melanoma cells. (A) Microphotographs showing the change in the morphology of A375 and 501Mel cells treated or not with b-AP15 (2 μ M, 12h) (EVOS[®] FL microscope, magnification x20). (B) Growth curve of 501Mel cells treated with 2 μ M b-AP15, 2 μ M VLX1570 or 1 μ M bortezomib (BTZ). Data were acquired in triplicate during 3 days using an IncuCyte Zoom imaging system. 501Mel (C) and A375 (D) cells were treated with the indicated doses of b-AP15 or VLX1570, and stained with cytotox green reagent (100nM). Cytotoxicity was monitored in triplicate for 72 h with an IncuCyte Zoom imaging system. (E) Washout experiments with b-AP15. Growth curve of A375 and 501Mel cells treated with b-AP15 (2 μ M) for 1h or during the whole experiment (24h). Data were acquired during 1 day with an IncuCyte zoom imaging system. (D) Western blot analysis of proteins involved in apoptosis on lysates from A375 and 501Mel cells treated with b-AP15 as indicated above. Membranes were probed with antibodies against caspase 3 and PARP. Anti-tubulin was used as a loading control.

Supplementary Figure 3



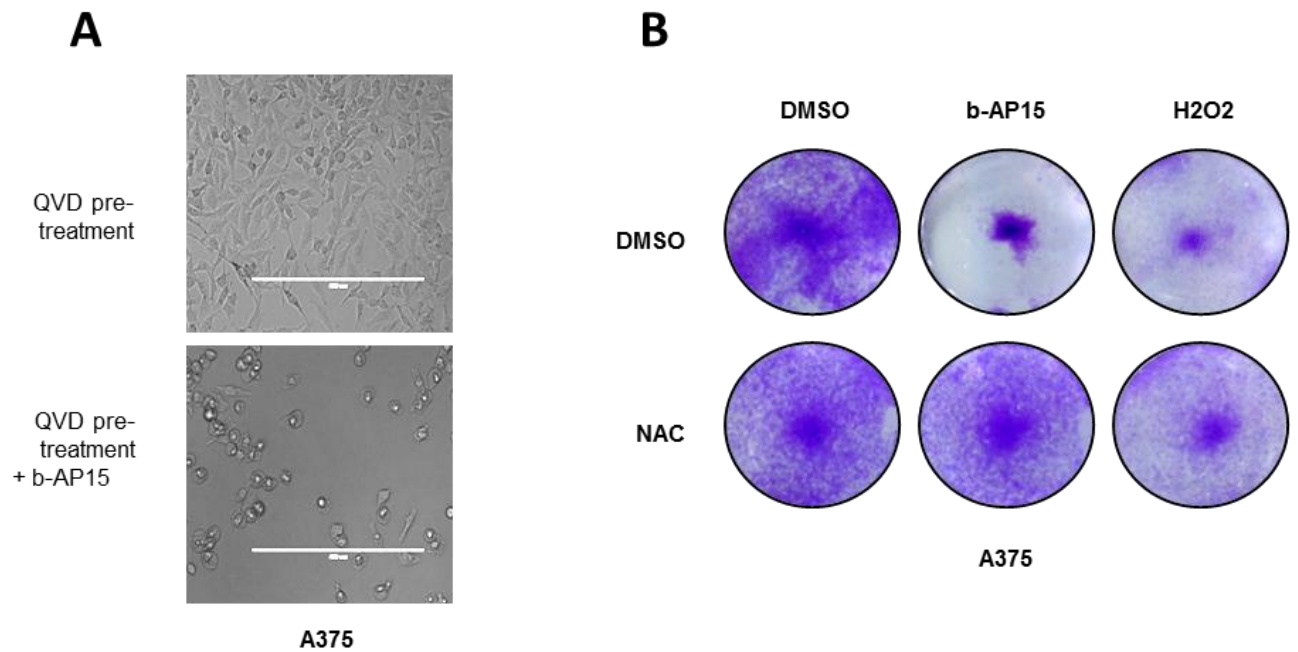
Supplementary Figure 3. USP14 overexpression reduces the cytotoxic effect of b-AP15 on melanoma cell. A375 cells were infected with an USP14-Flag adenovirus or control adenovirus (Ad-CMV) for 24h, then treated with or without b-AP15 (2 μ M, 24h). Lysates were analyzed by anti-cleaved PARP, anti-USP14 and anti-ERK2 immunoblots.

Supplementary Figure 4



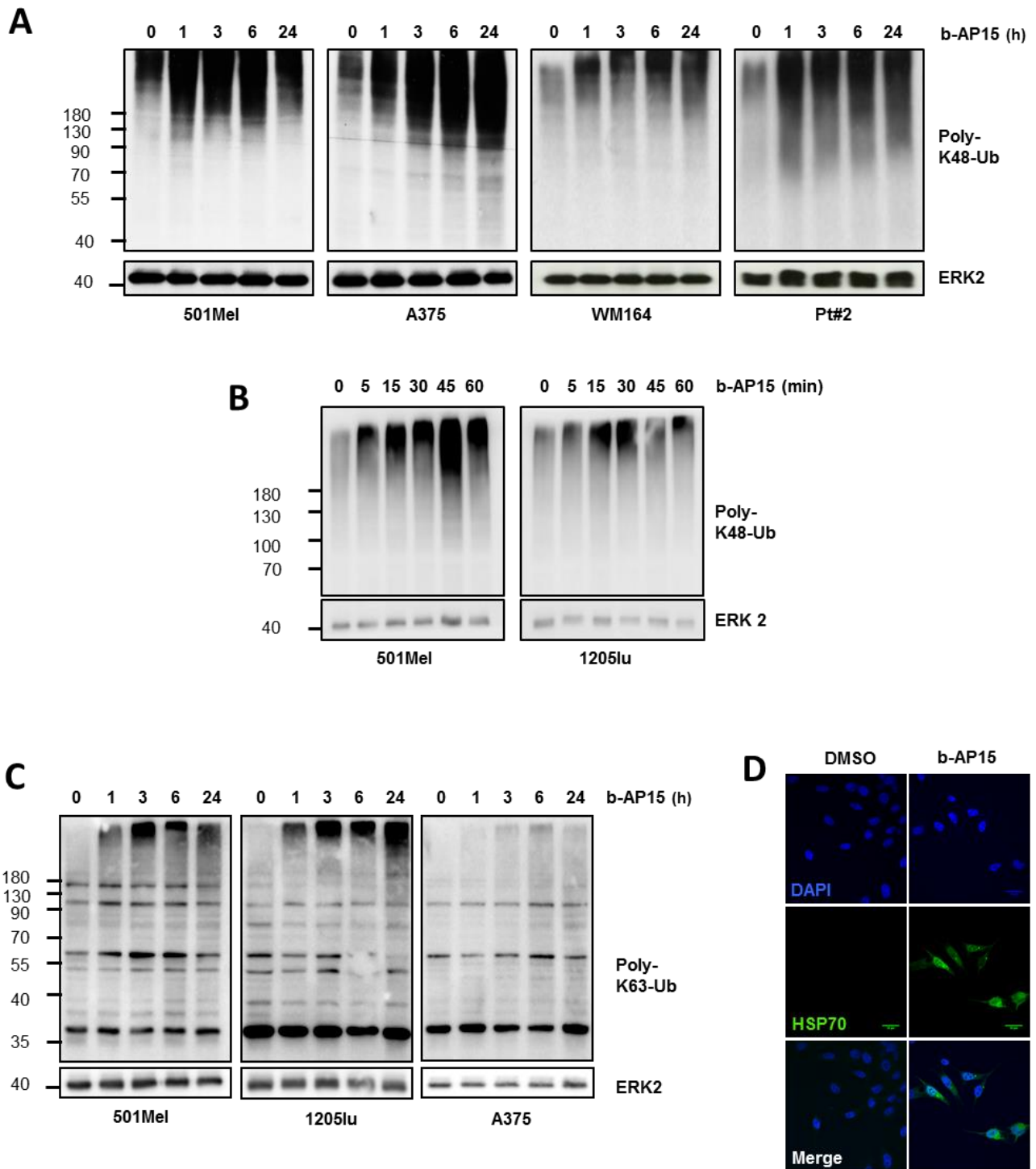
Supplementary Figure 4. siRNA-mediated depletion of USP14 reduces melanoma cell growth and focus formation. (A) Growth curve of 501Mel transfected with 50 nM of control (siCtrl) or USP14 (siUSP14 #2) siRNAs. The growth rate of the cells determined in triplicate for 3 days using the IncuCyte instrument. (B) and (C) Clonogenic assays performed on A375 and 501Mel cells transfected with control siRNA or a pool of four USP14-targeting siRNAs (50 nM), re-seeded at 2,000 and 4,000 cells/well respectively and grown for 7 days. Colonies were labeled with crystal violet. Immunoblots against USP14 and tubulin are shown as controls.

Supplementary Figure 5



Supplementary Figure 5. USP14 targeting induces caspase-independent and ROS-dependent cell death. (A) Microphotographs showing the change in the morphology of A375 cells treated with b-AP15 (1 μ M, 24h) in the presence or not of 20 μ M QVD-Oph (Microscope EVOS[®] FL microscope, magnification x10). Scale bar = 400 μ m. (B) A375 cells were treated or not with b-AP15 (2 μ M) in the presence or not of NAC (5 μ M) for 24 h. Cell viability were then assessed with crystal violet staining.

Supplementary Figure 6



Supplementary Figure 6. USP14 inhibition induces a rapid accumulation of polyubiquitinated proteins and HSP70 in melanoma cells. (A) and (B) Western blot analysis of lysates from 501Mel, A375, 1205lu, WM164 melanoma cell lines or cells obtained from a melanoma patient (Pt#2), treated with 2 μ M b-AP15 for the indicated times. Membranes were probed with antibodies against K48-linked poly-ubiquitinated proteins. Anti-ERK2 was used as a loading control. (C) Lysates from the above experiments were immunoblotted with antibodies against K63-linked poly-ubiquitinated proteins. Anti-ERK2 was used as a loading control. (D) Immunofluorescence analysis of A375 cells treated with 0.5 μ M b-AP15 for 6h. Nuclei were labeled with DAPI and HSP70 expression was visualized following FITC-conjugated anti-HSP70 staining. Scale bar, 25 μ M.

Résultats complémentaires :

Implication de l'enzyme de déubiquitine PSMD14 dans la pathologie du mélanome.

À la suite de nos premiers travaux sur l'implication de USP14 dans le mélanome, nous avons cherché à identifier d'autres DUBs pouvant jouer un rôle dans la prolifération et la survie des cellules de mélanome.

Un criblage génétique identifie la DUB PSMD14/RPN11 comme un important régulateur de la prolifération des cellules de mélanome *in vitro*

Nous avons utilisé un criblage génétique basé sur une bibliothèque de siRNA dirigés contre 90 DUBs que nous avons transfectés dans la lignée de mélanome 501Mel. La prolifération cellulaire des cellules transfectées par chaque siRNA contre une DUB a été quantifiée par rapport à une moyenne de siRNA contrôle à l'aide du système d'imagerie en temps réel Incucyte ZOOM (**Fig. 1 A**). Après 72h, les résultats révèlent que la déplétion de plusieurs DUBs a un effet antiprolifératif important sur les cellules de mélanome. On retrouve dans ce criblage USP14 que nous avons caractérisée précédemment, validant ainsi notre expérience. Parmi les DUBs dont l'effet antiprolifératif suite à leur déplétion est plus important que celui observé par le "knockdown" de USP14, nous avons identifié PSMD14 (RPN11/POH1), une autre DUBs associée au protéasome.

Dans notre rationnel de ciblage du SUP afin d'entraver la croissance cancéreuse, nous avons cherché à déterminer l'implication de PSMD14 dans la pathogénie du mélanome. Une analyse *in silico* des bases de données publiques bioinformatique (GEO/GSE8401) de l'expression du gène PSMD14 nous montre que PSMD14 est statistiquement augmentée sur une cohorte de mélanomes pris au stade métastatique (MM, n=31), comparée à stade primaire (MP, n=52) (**Fig. 1 B**).

La déplétion de PSMD14/RPN11 réduit la viabilité des cellules de mélanome et induit un stress protéotoxique

Nous avons voulu ensuite déterminer le rôle de PSMD14 dans la survie des cellules de mélanome. Pour cela, nous avons poursuivi notre étude par la déplétion génique de PSMD14 au sein de deux lignées de mélanome métastatique. Une analyse par imagerie en temps réel confirme que la déplétion de PSMD14 par deux siRNA différents réduit rapidement la prolifération de cellules 501mel et A375, dès 36h après la transfection **des siRNA (Fig. 2 A)**. Une analyse biochimique confirme que la déplétion de PSMD14 par les deux siRNA est efficace (**Fig. 2 B**). Les effets antiprolifératifs sont aussi visibles au niveau protéique, avec une modulation de marqueurs du cycle cellulaire associée à un arrêt de prolifération comme la baisse du niveau de cycline D1, de la phosphorylation de Rb et l'augmentation de p21^{CIP1} (**Fig. 2 C**). Il apparaît par ailleurs que la déplétion de PSMD14 induit un stress protéotoxique associé à l'accumulation de protéines polyubiquitinées, à la surexpression de protéines chaperonnes comme BIP/GRP78 et HSP7, ainsi que l'activation de la voie p38. Ces résultats indiquent un rôle de PSMD14 essentiel dans les processus liés à la survie des cellules de mélanome.

L'inhibition pharmacologique de PSMD14 induit une réponse de stress protéotoxique et la mort des cellules de mélanome *in vitro* capable de prévenir l'apparition de cellules résistantes « persister »

Nous avons ensuite cherché à confirmer ces résultats en utilisant des petites molécules inhibitrices de l'activité enzymatique de PSMD14. Nous disposons pour cela d'un inhibiteur de métalloprotéase sélectif pour PSMD14, le quinoline-8-thiol (8TQ) (Perez, Li et al. 2017). Nous avons déterminé la cytotoxicité de ce composé sur des lignées de mélanomes humains et murin (Yumm 1.7). Le 8TQ présente un IC50 (concentration inhibitrice médiane) inférieur à 1 μ M, quel que soit la lignée (**Fig. 3 A**). Il est par ailleurs autant efficace sur la lignée A375R de mélanome résistant à la thérapie ciblant BRAF^{V600E} utilisé en clinique (PLX4032). La caractérisation des effets biochimiques du 8TQ montre des effets similaires à ceux observés par la déplétion de PSMD14 par siRNA. On note la génération d'un stress protéotoxique avec une accumulation de protéines polyubiquitinées et de protéines chaperonnes ainsi qu'une légère activation de la voie p38 (**Fig. 3 B**). Ce stress protéique est concomitant avec un stress oxydatif. En effet, des cellules A375 soumises à des doses croissantes de 8TQ vont produire des espèces réactives de l'oxygène (ROS), et cela de manière dose dépendante (**Fig. 3 C**). Cette cytotoxicité avérée, nous avons voulu voir si le 8TQ pouvait apporter un bénéfice en combinaison avec la bithérapie proposée en clinique, ciblant BRAF et MEK. Il est connu que cette bithérapie peut induire l'apparition de clones résistants, dès les premières semaines de traitement (pour revue (Arozarena and Wellbrock 2017)). Ces clones, appelées cellules persistantes (ou « persister » en anglais) sont très certainement à l'origine des rechutes cliniques. Afin de déterminer si le ciblage pharmacologique de PSMD14 peut prévenir l'apparition de cellules de mélanome « persister », nous avons traitées pendant 3 semaines des cellules A375 avec des doses croissantes d'une combinaison d'inhibiteurs de BRAF (PLX4032) et de MEK (Trametinib). Comme le montre cette expérience, en présence de doses intermédiaires de la combinaison BRAFi/MEKi, de nombreux clones résistants à la bithérapie apparaissent en comparaison avec les cellules non traitées (**Fig. 3 D, panneau du haut**). De façon remarquable, l'ajout de 8TQ à la combinaison BRAFi/MEKi prévient totalement l'apparition de ces clones « persister » (**Fig. 3 D, panneau du bas**), suggérant que l'inhibition pharmacologique de PSMD14 pourrait être prévenir la résistance innée des cellules de mélanome aux thérapies ciblées. .

PSMD14/RPN11 contrôle la réponse de dommage à l'ADN des cellules de mélanome

Nous avons ensuite cherché à préciser les mécanismes contrôlés par PSMD14 qui pourraient expliquer la cytotoxicité induite par sa déplétion et son inhibition. Nous avons évalué si l'expression de PSMD14 peut être liée à une signature transcriptionnelle particulière dans le mélanome. Une analyse TCGA (cancergenome.nih.gov) sur la cohorte de patients atteints de mélanome combinée à une étude d'enrichissement (GSEA, software.broadinstitute) révèle que l'expression de *PSMD14* est corrélée de manière significative à l'expression de gènes contrôlés par la voie E2F et des gènes liés au "checkpoint" G2/M du cycle cellulaire (**Fig. 4 A**). Ces données *in silico* ont été confirmées par une analyse biochimique par westernblot qui montre que la déplétion de PSMD14 par deux siRNA différents induit une diminution de la protéine E2F1 (**Fig. 4 B**). Cette voie étant connue pour être un modulateur de la réponse aux dommages à l'ADN, nous y avons porté notre attention. Ainsi, la déplétion de PSMD14 se traduit par une augmentation de p53 et de la phosphorylation de l'histone H2AX (γ H2Ax), qui sont induits par les dommages à l'ADN (**Fig. 4 B**). De manière importante, l'inhibition de PSMD14 par des doses croissantes de 8TQ induit également l'expression de p53 et de γ H2Ax (**Fig. 4 C**). La protéine CHK2, impliquée dans le contrôle du cycle cellulaire et la réparation de

l'ADN, est aussi activée lors de l'inhibition de PSMD14. Enfin, le clivage de la protéine PARP semble confirmer une réponse apoptotique en cours (**Fig. 4 C**). La présence de dommage à l'ADN est validée par l'observation de foci nucléaires enrichis en histone γ H2Ax apparaissant après 24h de traitement par le 8TQ ou par un siRNA PSMD14 (**Fig. 4 D et E**). Il semble donc que le ciblage de PSMD14 induit des dommages à l'ADN irréversibles, entraînant la cellule vers un processus de mort.

L'inhibition de PSMD14 a un effet anti-mélanome dans un modèle tumoral syngénique chez la souris

Finalement, nous avons évalué l'efficacité anti-mélanome du ciblage de PSMD14 par le 8TQ *in vivo*. Pour étudier le rôle des DUBs dans le développement et la réponse thérapeutique des mélanomes, nous avons mis en place dans le laboratoire des modèles de mélanome se développant dans des souris immunocompétentes C57BL/6. Un de ces modèles est basé sur la greffe orthotopique de cellules de mélanome murin syngénique YUMM1.7 (génotype *Braf^{V600E}x Pten null x cdkn2a null*) (Homet Moreno, Zaretsky et al. 2016).

Après injection des cellules Yumm 1.7 et le développement des tumeurs pendant 7 jours, les animaux ont été traités par du 8TQ (5mg/kg) ou le véhicule tous les 2 jours pendant 3 semaines. De façon intéressante, la croissance des tumeurs est fortement ralentie par le traitement au 8TQ en comparaison avec le groupe contrôle (véhicule), avec un volume tumoral moyen environ 3 fois plus faible et une masse tumorale réduite après 17 jours de traitement (**Fig. 5 A**). Confirmant nos observations *in vitro*, l'analyse immunohistochimique de coupes de tumeurs prélevées à la fin du traitement révèle que, par rapport au traitement contrôle, le traitement par le 8TQ réduit l'expression du marqueur nucléaire de cycle cellulaire Ki67, augmente l'expression du marqueur de dommage à l'ADN γ H2Ax et induit la forme clivée de la caspase 3, un marqueur de l'apoptose (**Fig. 5 B**).

Dans l'ensemble, ces résultats préliminaires indiquent que le ciblage de la DUB associée au protéasome PSMD14 a un puissant effet anti-mélanome *in vitro* et *in vivo* qui résulte d'une réponse de stress protéotoxique et de dommage à l'ADN conduisant à la mort des cellules de mélanome.

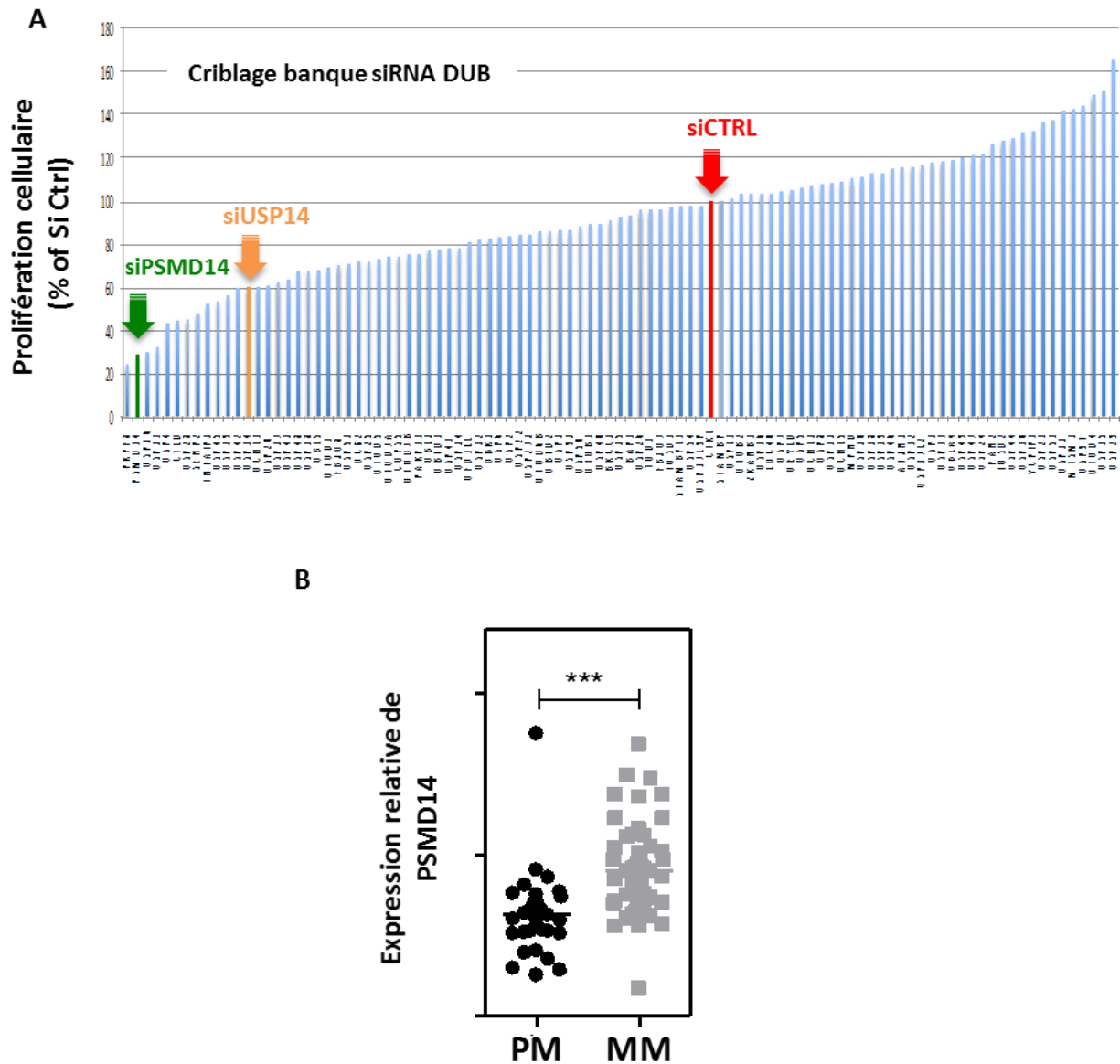


Figure 1: Identification de la déubiquitinase PSMD14/RPN11 comme régulateur de la prolifération des cellules de mélanome *in vitro*. (A) Criblage d'une banque de siRNA dirigée contre les déubiquitinase (DUBs) sur la prolifération cellulaire (4 jours après transfection) dans les cellules 501Mel. Le siCTRL, le siPSMD14 et le siUSP14 sont représentés en rouge, en vert et en orange respectivement. (B) Augmentation de l'expression du gène *PSMD14* dans les mélanomes métastatiques (MM) par rapport aux mélanomes primaires (PM) (données GSE8401).

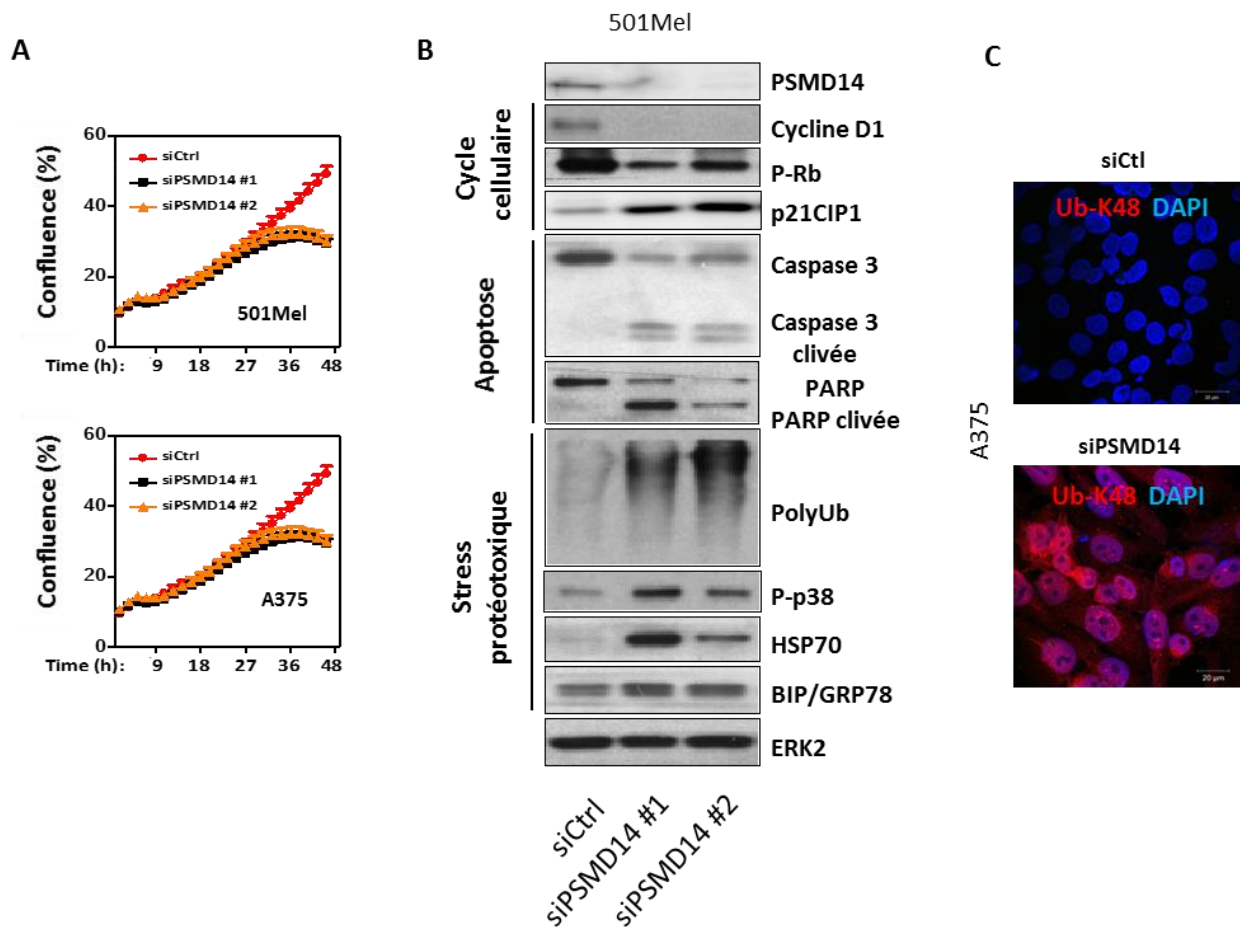


Figure 2: La déplétion de PSMD14/RPN11 réduit la prolifération et la viabilité des cellules de mélanome *in vitro*. (A) Analyse de la prolifération cellulaire en temps réel (Incucyte imaging system) de cellules 501Mel et A375 transfectées par deux siRNA contre PSMD14 (siRNA#1 et #2) pendant 48h. (B) Analyse par western blot de l'effet de deux siRNA contre PSMD14 sur l'expression ou l'activité de protéines du cycle cellulaire, du stress protéotoxique et de l'apoptose dans les cellules 501Mel (C) Analyse par immunofluorescence du stress proteotoxique (PolyUb K48) sur des cellules de mélanomes A375 transfectées par un siPSMD14 vs un siContrôle (siCtl) (48h)

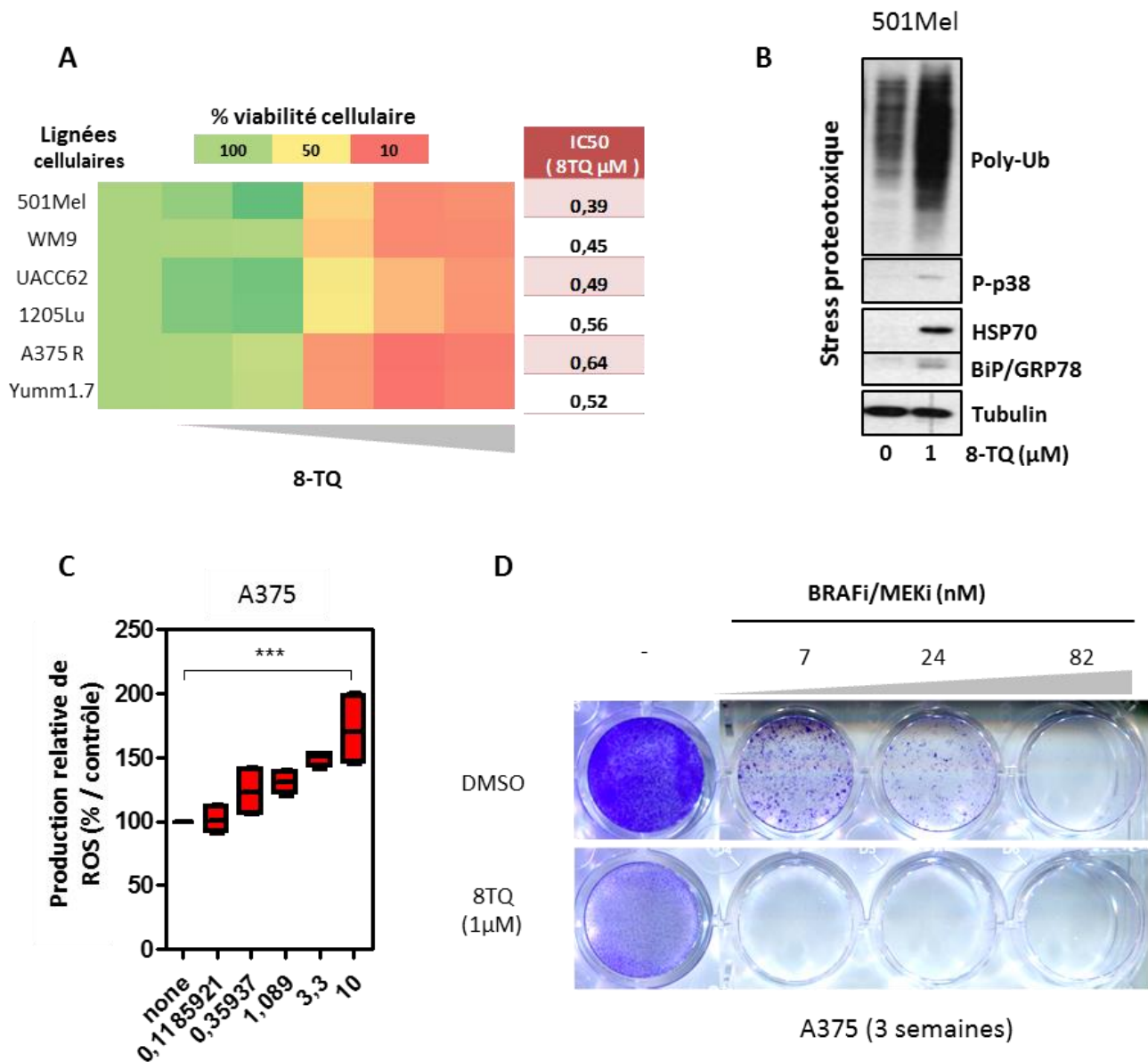


Figure 3: L'inhibition pharmacologique de PSMD14 induit un stress protéotoxique, une production de ROS et la mort des cellules de mélanome *in vitro*, capable de prévenir l'apparition de cellules résistantes « persisters ». (A) Analyse de la viabilité cellulaire et détermination de l'IC50 (50% de cytotoxicité cellulaire) suite à un effet dose de l'inhibiteur de PSMD14, le 8TQ (log base2 descendant en partant de 10 μM / 3 jours) sur diverses lignées de mélanome (A375 R: A375 résistante à l'inhibiteur de BRAF; Yumm 1.7: lignée murine de mélanome). Quantification de la cytotoxicité par dosage colorimétrique du crystal violet dans des cellules fixées et marquées. (B) Accumulation de protéines poly-ubiquitinées et de protéines liées du stress protéotoxique sur des cellules 501Mel traitées par l'inhibiteur de PSMD14, le 8TQ (1 μM / 24h). (C) Augmentation de la quantité de ROS intracellulaire, de manière dose dépendante, dans des cellules A375 suite au traitement par le 8TQ (4h). Analyse effectuée en cytométrie en flux, via la sonde H2DCFDA. (D) Le traitement de cellules A375 pendant 3 semaines avec différentes doses de la combinaison du BRAF inhibiteur et du MEK inhibiteur (PLX4032/Trametinib respectivement, ratio 1/1) permet l'apparition de cellules persistantes et résistantes, dont le traitement par le 8TQ prévient l'apparition (Cellules fixées et marquées au crystal violet).

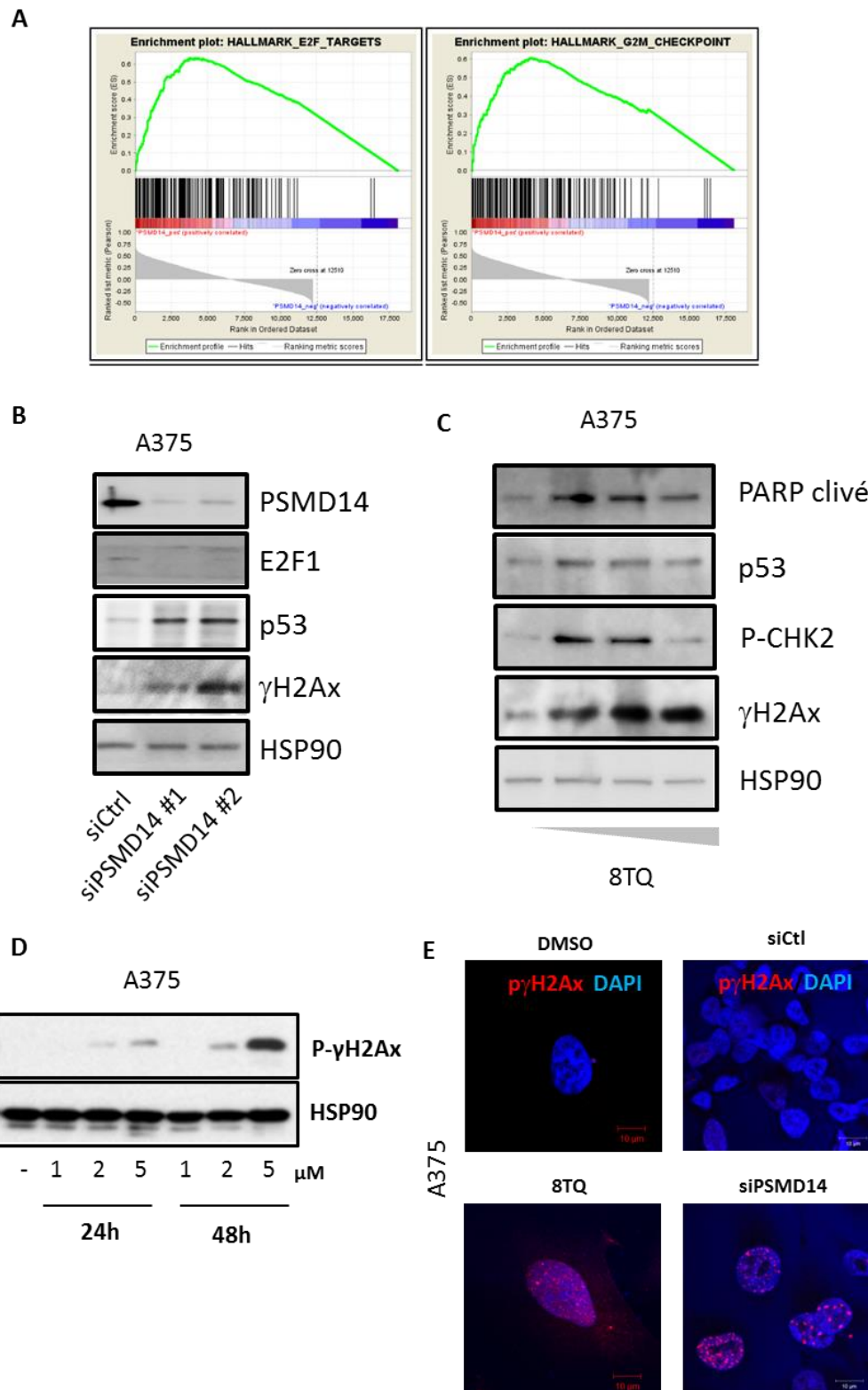


Figure 4: Le ciblage de PSMD14/RPN11 dans les cellules de mélanome induit une réponse de dommage à l'ADN *in vitro*. (A) L'expression de PSMD14 est corrélée de manière significative à l'expression de gènes contrôlés par la voie E2F (cycle cellulaire, réparation de l'ADN...) et des gènes du checkpoint G2/M du cycle cellulaire. Analyse du TCGA (cancergenome) sur la cohorte de patients atteints de mélanome combinée à une étude d'enrichissement (GSEA.) (B) Augmentation des protéines liées au cycle et à l'ADN, p53 et γ H2Ax suite à la déplétion de PSMD14 par siRNA dans des A375 (48h après transfection). (C) Augmentation des protéines liées au cycle et à l'ADN, p53, P-CHK2 et γ H2Ax concomitant avec le clivage de PARP, marqueur apoptotique, suite à l'inhibition de PSMD14 par dose croissante de 8TQ dans des A375 (48h, 0,1 à 10 μ M). (D) Phosphorylation de γ H2Ax temps et dose dépendante sous 8TQ. (E) Analyse par immunofluorescence du marqueur du dommage à l'ADN (γ H2Ax) sur des cellules de mélanomes A375 après déplétion de PSMD14 (siPSMD14, 48h) ou inhibition de PSMD14 (8TQ, 5 μ M, 24h)

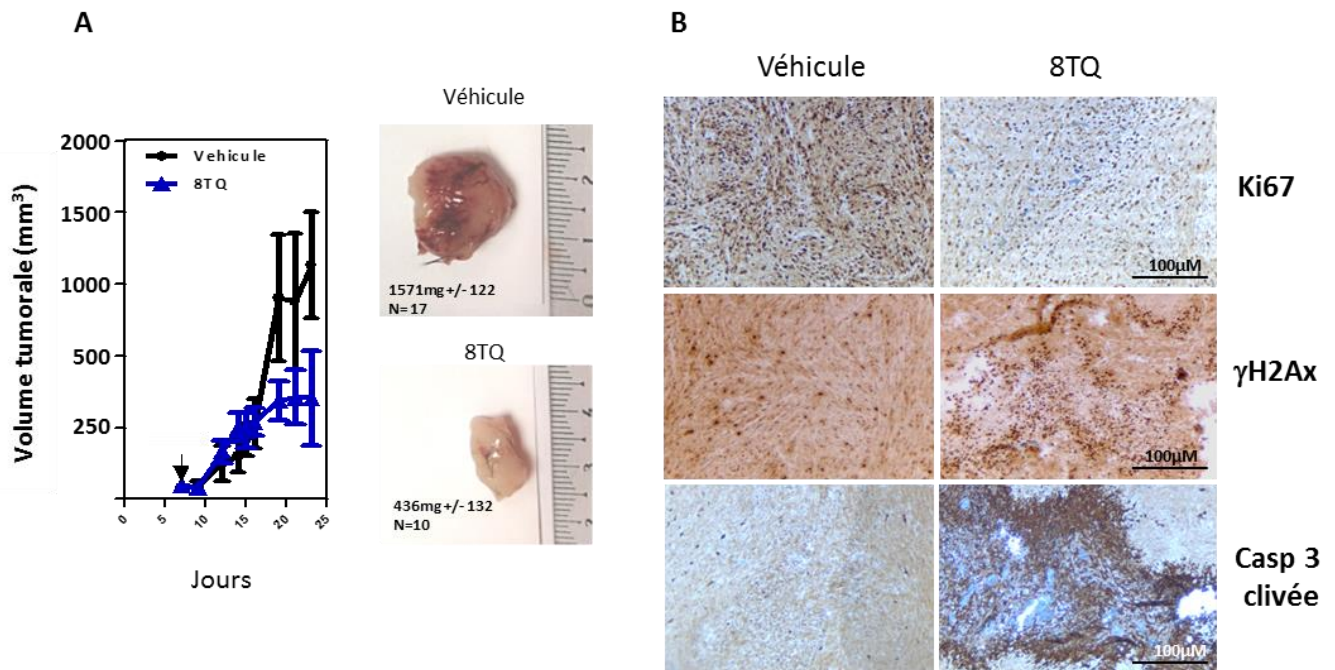


Figure 5: Le ciblage de PSMD14/RPN11 a un effet anti-mélanome dans un modèle tumoral syngénique chez la souris. (A) Analyse du volume et de la masse tumorale en fonction des jours après injection de cellules de mélanome syngénique Yumm1.7 dans des souris C57BL/6 en présence ou en absence de traitement au 8TQ (5mg/kg). Les valeurs de masse tumorale sont indiquées (mean +/- SEM, N=nombre de tumeurs). Photos représentatives de chaque groupe à la fin de l'expérience. **(B)** Analyse immuno-histochimique de marqueurs de la prolifération cellulaire (Ki67), du dommage à l'ADN (γH2Ax) et de la mort cellulaire (caspase 3 clivée) sur des coupes de tumeurs traitées ou non par 8TQ pendant 17 jours.

Discussion / Conclusion

Discussion

Le mélanome cutané est un cancer de la peau agressif dont l'incidence a augmenté de façon spectaculaire depuis les trente dernières années. Le mélanome se développe à partir des mélanocytes, cellules originaires de la crête neurale localisées au niveau de la membrane basale de l'épiderme (Miller and Mihm 2006). Lors d'un diagnostic précoce, le seul traitement efficace est l'exérèse de la tumeur primaire. Cependant, dans les phases métastatiques, le mélanome reste à l'heure actuelle un cancer très agressif, dont les chances d'en réchapper sont faibles. Malgré de récentes avancées dans le domaine, du fait de son hétérogénéité et de sa très forte adaptabilité, ce cancer surmonte très souvent toutes les tentatives de traitement. En effet, entre différents individus, les profils tumoraux sont variables, avec des statuts mutationnels distincts, induisant un phénotype cellulaire particulier et des réponses aux thérapies spécifiques. On retrouve également cette hétérogénéité au sein d'un même patient dans lequel différents foyers tumoraux se développent dans différents microenvironnements tissulaires. A cette hétérogénéité inter-tumorale s'ajoute également une hétérogénéité intra-tumorale qui va influencer notablement les réponses thérapeutiques. C'est pour cela que les premiers traitements, les alkylants de l'ADN, bien trop généralistes, ont échoué. Leur spécificité étant trop faible, les dommages collatéraux étaient importants et donc la réponse générale était très limitée.

Le développement du mélanome est accompagné par des mutations "driver" touchant les gènes *BRAF* et *NRAS*, et conduisant à l'activation constitutive de la voie MEK/ERK (Flaherty, Hodi et al. 2012, Cancer Genome Atlas Network 2015). L'identification de la mutation *BRAF*^{V600E} a permis le développement de thérapies ciblant la voie BRAF/MEK avec une augmentation significative de la survie initiale des patients. Cependant, seuls les patients arborant les mutations sur BRAF sont éligibles à ces thérapies ciblées et l'émergence rapide de résistances secondaires, associées à des mutations secondaires de *NRAS* ou de *MEK1*, à l'activation de récepteurs tyrosine kinase et des voies de survie PI3K/AKT et STAT3, ne permet pas de réponse durable (Flaherty, Hodi et al. 2012, Arozarena and Wellbrock 2017).

Pour les formes non mutées *BRAF* (*NRAS* mutée, *NF1* muté et triple non mutée) (Cancer Genome Atlas Network 2015), des immunothérapies basées sur le blocage des points de contrôle immunologique CTLA4 et PD1 ont été développées avec une très bonne efficacité à long terme, mais avec des taux de réponses hétérogènes et des effets secondaires importants (Eggermont, Maio et al. 2015).

Plusieurs pistes de recherche sont à l'essai afin de contourner ces différents problèmes. Certaines approches tentent d'empêcher l'apparition de résistance en combinant plusieurs thérapies. C'est le cas de Roche, Novartis et Merck qui ont lancé des études (NCT02908672-Phase 3, NCT02967692-Phase 3 et NCT02130466-Phase 1/2 respectivement) pour déterminer l'efficacité d'une double inhibition de la voie des MAPK combiné à une immunothérapie. Cependant, devant le constat que plus de 50% des patients ont besoin de traitement additionnel, **il reste urgent de mieux comprendre les mécanismes biologiques impliqués dans la pathogénie du mélanome afin de développer de nouvelles options thérapeutiques.**

Notre étude s'est concentrée sur les mécanismes de la protéostasie cellulaire et l'impact du ciblage du Système Ubiquitine-Protéasome (SUP) et des déubiquitinasés (DUBs) sur la prolifération et la

survie des cellules de mélanome. Dans les cellules cancéreuses, l'accumulation d'altérations génétiques et le fort index prolifératif accroissent de façon considérable la synthèse protéique et l'addiction aux mécanismes de contrôle de la qualité du protéome, incluant l'autophagie, le système endo-lysosomal, les protéines chaperonnes et le système ubiquitine-protéasome (SUP) (Balch, Morimoto et al. 2008, Deshaies 2014). Comprendre les mécanismes de l'addiction cellulaire au stress protéotoxique est particulièrement pertinent dans le cas du mélanome, car il s'agit d'une forme de cancer qui présente l'une des plus hautes fréquences de mutations somatiques dues à l'exposition aux UV (Lawrence, Stojanov et al. 2013).

Le SUP constitue le mécanisme principal de dégradation des protéines cellulaires. Il comprend une machinerie protéolytique (le protéasome 20S), associée à deux complexes régulateurs 19S et une cascade d'enzymes (E1, E2 et E3) ajoutant des résidus d'ubiquitine à des protéines vouées à la destruction par le protéasome (Finley 2009). Malgré l'intérêt clinique du ciblage de l'UPS, illustré en oncologie dans le traitement du myélome multiple, son implication dans la pathophysiologie du mélanome reste mal connue. La réaction enzymatique qui s'oppose à l'ubiquitination est la déubiquitination par des protéases spécifiques de l'ubiquitine : les DéUBiquitinases (DUBs) (Nijman, Luna-Vargas et al. 2005, D'Arcy, Wang et al. 2015). Dans le mélanome, plusieurs DUBs ont été reliées à la progression de la maladie, comme USP13 qui module la stabilité de MITF (Zhao, Fiske et al. 2011) ou encore USP9X, récemment identifiée comme un régulateur de l'expression de Ets-1 et de NRAS (Potu, Peterson et al. 2017).

Afin d'identifier de nouvelles DUBs potentiellement impliquées dans la pathogénie du mélanome cutané, nous avons utilisé une combinaison d'approches *in silico*, biochimiques, génétiques et fonctionnelles qui nous a permis de montrer le rôle majeur joué par les DUBs associées au protéasome USP14 et PSMD14/RPN11 dans le maintien de la protéostasie tumorale et les voies contrôlant la prolifération et la survie des cellules de mélanome et leur réponse aux thérapies ciblées. Dans un premier temps, pour identifier des DUBs dont l'activité est modulée dans les cellules de mélanome, nous avons utilisé une méthode d'étiquetage biochimique *in vitro* des DUBs actives ("DUB trap assay") qui nous a permis d'identifier USP14 (Ubiquitin Specific Protease 14) dont l'activité est augmentée dans plusieurs lignées de mélanome par rapport aux mélanocytes, cellules normales de la peau. USP14 clive les chaînes de poly-ubiquitine des protéines arrivant au protéasome pour être dégradées (Lee, Lu et al. 2016). De façon intéressante, il a été montré que l'activité de USP14 peut être contrôlée par la PTEN/AKT (Xu, Shan et al. 2015). Considérant les mutations fréquentes de PTEN dans les cellules de mélanome, il serait intéressant de déterminer si USP14 peut être activée par une phosphorylation directe par AKT sur le résidu sérine 432 comme il a été décrit (Xu, Shan et al. 2015). On peut également se poser la question de la nature des liens moléculaires entre l'activité de USP14 et les voies oncogéniques du mélanome (NRAS/BRAF/MEK/ERK). Dans ce contexte, nous avons observé que les cellules de mélanome mutées BRAF ayant acquis une résistance au Vémurafenib (PLX4032) présentent une activité DUB de USP14 accrue. Il serait donc intéressant de déterminer comment les inhibiteurs de BRAF et de MEK affectent l'activité et/ou l'expression de USP14. De même, on peut se demander comment les voies de signalisation du microenvironnement tumoral (RTK/SPARC/PI3K/AKT) influencent l'activité de USP14. De façon générale, l'activité accrue de USP14 ou l'augmentation de son expression semble reposer sur le fait que les cellules cancéreuses, au profil chaotique et à la prolifération incontrôlée, présentent une addiction aux mécanismes de dégradation des protéines. C'est probablement pour cela que USP14 est un facteur de mauvais pronostic dans de nombreuses formes de cancer (Shinji, Naito et al. 2006, Wu, Liu et al. 2013, Wang, Wang et al. 2015,

Zhu, Yang et al. 2016, Liao, Liu et al. 2017, Zhang, Zhang et al. 2017). Dans ce contexte, des études précédentes ont montré que l'inhibition de USP14 par le composé b-AP15 a des effets anti-tumoraux importants dans de nombreux types de cancer, solides (D'Arcy, Brnjic et al. 2011) et hématologiques (D'Arcy, Brnjic et al. 2011, Tian, D'Arcy et al. 2014, Wang, Stafford et al. 2014, Wang, Mazurkiewicz et al. 2016). En particulier, le myélome multiple, un cancer hématologique dans lequel le ciblage du protéasome par le Bortezomib (Velcade) est un traitement de référence, est particulièrement sensible au ciblage de USP14 par le b-AP15 qui induit une mort cellulaire de type apoptose *in vitro* et *in vivo* (Tian, D'Arcy et al. 2014, Wang, Stafford et al. 2014, Wang, Mazurkiewicz et al. 2016). Cependant, contrairement aux cellules de myélome multiple dans lesquelles le b-AP15 affecte l'activité de USP14 et d'une autre DUB associée au protéasome UCHL5 (Tian, D'Arcy et al. 2014, Wang, Stafford et al. 2014), le traitement des cellules de mélanome par le b-AP15, ou par son dérivé VLX1570, affecte uniquement l'activité de USP14 et non celle de UCHL5. La raison pour cette différence tient probablement au fait que le test d'activité « DUB trap assay » que nous utilisons est plus sensible que celui utilisé par l'équipe de Linder qui consistait en une simple mesure de l'activité DUB sous inhibiteur de protéase à cystéine. A noter que des travaux plus récents de ce laboratoire ont montré que le b-AP15 affectait peu l'activité d'UCHL5 (Wang, Stafford et al. 2014, Wang, Mazurkiewicz et al. 2016), en accord avec nos observations dans le mélanome. A noter que notre test d'activité « DUB trap assay » suggère une activité accrue de plusieurs autres DUBs dans les cellules de mélanome mutées BRAF comparées aux mélanocytes. Il serait donc intéressant de déterminer la nature exacte de ces DUBs, par exemple en utilisant une approche de protéomique de masse.

Dans un deuxième temps, le criblage d'une banque de siRNA ciblant les principales DUBs du génome sur la prolifération de la lignée de cellules de mélanome 501Mel m'a permis d'identifier la DUB PSMD14 (RPN11/POH1), une métalloisopeptidase dépendante du Zn^{2+} et une des trois DUBs associées au protéasome avec UCHL5 et USP14. Nos travaux préliminaires montrent que le ciblage de PSMD14 se traduit par un arrêt de prolifération suivi d'une mort cellulaire associée à des dommages à l'ADN *in vitro* et *in vivo*. L'effet anti-prolifératif et cytotoxique de la déplétion de PSMD14 a été confirmé pharmacologiquement. La drogue utilisée, le 8TQ, est un inhibiteur non compétitif se fixant sur le site actif à zinc de PSMD14 (Li, Yakushi et al. 2017). Cet inhibiteur n'est pas entièrement sélectif pour PSMD14. Il inhibe aussi une deuxième DUB à domaine JAMM, CSN5, avec cependant 3 fois plus d'affinité pour PSMD14 (IC50 de 3 μ M contre 10 μ M pour CSN5) (Perez, Li et al. 2017). Nous devons être prudent sur nos résultats avec l'inhibition pharmacologique de PSMD14 induite par le 8TQ. CSN5 est une sous-unité du signalosome COP9 (CSN), complexe protéique à activité de déubiquitineuse, de de-neddylation (le retrait de l'Ubl NEDD8) et à une activité de protéine kinase capable de phosphoryler des régulateurs de signalisation importants comme p53, c-jun ou I κ B α . Cependant, les doses auxquelles nous utilisons le 8TQ ne dépassant pas les 2 μ M et les IC50 déterminées sur la viabilité des cellules de mélanome étant inférieure à 1 μ M, nous pouvons estimer que l'effet cytotoxique du 8TQ est le résultat d'une inhibition sélective de PSMD14. Un dérivé du 8TQ, la capzimine, montre une sélectivité 5 fois supérieure pour PSMD14/RPN11 par rapport aux autres protéases JAMM et 2 logs en moins d'activité vis-à-vis des métalloenzymes (Li, Yakushi et al. 2017). Il serait donc intéressant de tester dans nos modèles l'effet de la capzimine en comparaison avec le 8TQ.

Mes travaux montrent que le ciblage de deux DUB associées au protéasome, USP14 et PSMD14, affecte la prolifération et la survie des cellules de mélanomes. Dans le cas de USP14, le composé b-

AP15 inhibe la croissance des cellules de mélanomes, quel que soit leur statut mutationnel. L'IC50 de ce composé est en effet similaire sur des lignées présentant des altérations des protéines oncogéniques BRAF et NRAS ou des suppresseurs de tumeur TP53, PTEN et NF1. L'inhibition de PSMD14 par le 8TQ semble suivre cette tendance. Ces profils mutationnels distincts entraînent des phénotypes et comportement cellulaires spécifiques, allant de profils prolifératifs à invasifs. Les effets observés sont particulièrement intéressants dans le contexte d'hétérogénéité tumorale qui caractérise le mélanome et au vu de la restriction des thérapies ciblant la voie MAPK aux mélanomes mutés BRAF. Les drogues ciblant USP14 et PSMD14 pourraient donc potentiellement cibler tous les types de mélanome. Un autre problème majeur dans la prise en charge thérapeutique du mélanome est l'apparition de cellules résistantes aux thérapies (ciblées ou immunothérapies) (Manzano, Layos et al. 2016, Gide, Wilmott et al. 2018). J'ai pu montrer que les inhibiteurs USP14 et PSMD14 induisent une cytotoxicité *in vitro* sur des cellules de mélanomes résistantes aux thérapies ciblées, de manière comparable aux lignées sensibles. Dans le cas de PSMD14, nous avons de plus montré *in vitro* que son inhibition est en mesure de prévenir l'apparition de clones résistants à une combinaison BRAFi/MEKi. La capacité à surmonter les résistances est aussi visible *in vivo*, l'inhibition de USP14 étant capable de ralentir la croissance tumorale de cellules de mélanome humaines résistantes au Vémurafenib chez des souris immunodéprimées. De façon intéressante, des résultats comparables ont été obtenus sur la macroglobulinemia de Waldenstrom (WM) dont les formes résistantes à l'ibrutinib ou au bortezomib sont sensibles au traitement par le VLX1570 (Paulus, Akhtar et al. 2016). Il serait donc intéressant de déterminer si les drogues ciblant PSMD14 sont elles-aussi capable de prévenir la croissance tumorale de cellules résistantes aux thérapies ciblées *in vivo*. Une meilleure compréhension des mécanismes d'action de USP14 et PSMD14, et des études pré-cliniques complémentaires pourraient permettre de valider la combinaison du ciblage de ces DUBs avec les thérapies conventionnelles. De manière intéressante, il a été montré que le b-AP15 permet de sensibiliser des cellules tumorales à l'apoptose médiée par TRAIL par les cellules NK et les cellules T (Sarhan, Wennerberg et al. 2013).

Nos observations sur l'induction de HSP70 et d'un stress réticulaire induits par le blocage de USP14 et de PSMD14 sont quant à elles compatibles avec l'induction d'un processus de mort immunogénique capable de stimuler la réponse immune antitumorale de l'hôte. Une autre métalloprotéase à domaine JAMM, CSN5, stabilise PD-L1, un des points de contrôle immunologique ciblé par certaines immunothérapies utilisées en clinique (Lim, Li et al. 2016). Plus intéressant encore, le bortezomib a été décrit pour induire une mort de type immunogénique, et il est actuellement testé en combinaison avec certaines immunothérapies (Spisek, Charalambous et al. 2007, Pol, Vacchelli et al. 2015). Dans l'ensemble, ces observations suggèrent que le ciblage de USP14 et de PSMD14 puisse améliorer les immunothérapies anti-mélanome.

Les mécanismes contrôlés par USP14 et PSMD14 dans les cellules cancéreuses restent encore à l'heure actuelle mal compris. L'inhibition d'USP14, comme de PSMD14, induit une accumulation de protéines polyubiquitinées en K48 mais aussi en K63. Ces deux types de liaison dirigent les protéines ubiquitinées vers le protéasome au sein duquel les activités DUB de USP14 et PSMD14 permettent de modifier les chaînes de polyubiquitine, voire de les retirer "en bloc", afin de trier les protéines vouées à la destruction et de recycler les résidus d'ubiquitine. De plus, certaines études ont montré qu'en plus de ce rôle de tri moléculaire, les DUBs du protéasome sont capables de moduler l'activité même de la partie catalytique du protéasome 20S. Dans ce contexte, il n'est pas surprenant d'observer une accumulation de protéines poly-ubiquitinées dans les cellules dont l'activité et/ou

l'expression de USP14 et de PSMD14 ont été inhibées. De façon intéressante, j'ai pu observer que l'inhibition de USP14 dans les cellules de mélanome n'affecte pas l'activité protéolytique du protéasome 20S, excluant un simple effet "bortezomib-like". L'implication de PSMD14 sur l'activité du protéasome dans les cellules de mélanome est quant à elle inconnue mais une étude récente dans le myélome multiple a montré que son inhibition était sans effet (Song, Li et al. 2017).

Nous avons montré que les drogues ciblant USP14 ou PSMD14 induisent un stress oxydatif de manière similaire aux drogues ciblant l'activité catalytique du protéasome comme le bortezomib (Brnjic, Mazurkiewicz et al. 2014). Ainsi, une accumulation d'espèces réactives de l'oxygène est observée après inhibition de USP14 ou de PSMD14. Dans le premier cas, nous avons montré que ce stress oxydatif était suivi d'un dysfonctionnement mitochondrial. La pré-incubation des cellules de mélanome avec du N-acétyl-L-cystéine (NAC), un antioxydant, est en mesure d'empêcher la mort induite par le b-AP15. L'origine exacte de ce stress oxydatif est encore inconnue, mais il est possible que le mécanisme fasse intervenir une inhibition de la thioredoxine réductase comme décrit précédemment (Brnjic, Mazurkiewicz et al. 2014).

Dans des cellules de mélanome, l'accumulation de protéines polyubiquitinées induite par le blocage des fonctions de USP14 et de PSMD14 est également suivi par l'activation de kinases de stress comme p38 et JNK, l'accumulation de protéines de choc comme HSP70 et l'apparition de marques de stress du RE parmi lesquelles la surexpression de BIP/GRP78 et de CHOP. Dans tous les cas, l'amplitude du stress protéotoxique produit par le ciblage de USP14 et PSMD14 est trop importante pour les mécanismes adaptatifs de la cellule qui n'y résiste pas. *In fine*, ce stress entraîne la mort des cellules de mélanome par un mécanisme indépendant des caspases effectrices, du moins dans le cas de USP14. Le lien exact entre les réponses de stress oxydatif et de stress protéotoxique générées par l'inhibition de USP14 et de PSMD14 reste toutefois à définir.

De manière intéressante, nos résultats suggèrent des rôles différents, bien que partiellement redondants, pour USP14 et PSMD14 dans le contrôle de l'homéostasie protéique des cellules de mélanome. En effet, en plus de la régulation du stress oxydatif et réticulaire, mes observations préliminaires indiquent que PSMD14 joue un rôle essentiel dans la réponse de dommage à l'ADN dans les cellules de mélanome. PSMD14 a été décrite pour être présente au niveau des cassures de l'ADN afin de limiter l'accumulation d'Ub sur les sites de dommages à l'ADN. Elle régule aussi 53BP1, facteur de réponse aux dommages de l'ADN bien connu et promeut la réparation de l'ADN par jonction homologue (Butler, Densham et al. 2012). Nos résultats montrent que l'inhibition ou la déplétion de PSMD14 entraîne l'activation de p53 et l'accumulation de l'histone H2AX phosphorylée (γ H2AX) sur des foci nucléaires. Suite à des cassures de l'ADN, cette histone est phosphorylée au niveau des dommages à l'ADN (Kuo and Yang 2008). Si la machinerie de réponse aux dommages à l'ADN est clairement activée par l'inhibition de PSMD14, l'origine de ce phénomène est inconnue. On peut se demander si l'augmentation de ROS à la suite de l'inhibition de PSMD14 pourrait suffire à induire ces dommages. Une autre hypothèse serait que la diminution de la protéine E2F1 observée dans les cellules déplétées de PSMD14 soit responsable de cette réponse de dommage à l'ADN.

Dans l'ensemble, nos résultats soulignent le rôle important de USP14 et de PSMD14 dans la régulation de la prolifération et de la survie des cellules de mélanome. L'identification des interactomes et des substrats spécifiques de USP14 et de PSMD14 devrait permettre d'élucider les fonctions respectives de ces deux DUBs dans l'homéostasie protéique du mélanome.

Conclusion

Le mélanome métastatique reste encore à l'heure actuelle le cancer de la peau le plus agressif et le plus mortel, étant responsable de 80% des décès liés à un cancer de la peau. Les nouvelles thérapies (ciblées et immunothérapies), bien que prometteuses, sont limitées à des groupes de patients et sont globalement suivies de rechutes conduisant à l'un échec thérapeutique. Afin d'identifier de nouveaux mécanismes dont le ciblage pourrait améliorer la prise en charge thérapeutique des mélanomes réfractaires, je me suis intéressé à la régulation de l'homéostasie protéique des cellules de mélanome et plus particulièrement à la famille des enzymes de déubiquitination, également appelées déubiquitinases (ou DUBs).

Dans ce contexte, mes travaux ont permis d'identifier les DUBs associées au protéasome USP14 et PSMD14 comme des acteurs importants et non redondants dans le maintien de l'homéostasie protéique des cellules de mélanome. J'ai pu montrer que leur inhibition conduit à une profonde dérégulation de processus cellulaires comme la prolifération et la survie cellulaire, associée à des réponses majeures de stress oxydatif, protéotoxique et génomique. Les différents mécanismes en causes ne sont pas encore clairement élucidés. Cependant, j'ai pu apporter la preuve de concept que le ciblage des DUBs associées au protéasome USP14 et PSMD14 représente une nouvelle approche prometteuse dans la lutte contre le mélanome métastatique et réfractaire.

Bibliographie

- Abbasi, N. R., H. M. Shaw, D. S. Rigel, R. J. Friedman, W. H. McCarthy, I. Osman, et al. D. Polsky (2004). "Early diagnosis of cutaneous melanoma: revisiting the ABCD criteria." *JAMA* **292**(22): 2771-2776.
- Abdul Rehman, S. A., Y. A. Kristariyanto, S. Y. Choi, P. J. Nkosi, S. Weidlich, K. Labib, et al. Y. Kulathu (2016). "MINDY-1 Is a Member of an Evolutionarily Conserved and Structurally Distinct New Family of Deubiquitinating Enzymes." *Molecular cell* **63**(1): 146-155.
- Ackermann, J., M. Fruttschi, K. Kaloulis, T. McKee, A. Trumpp and F. Beermann (2005). "Metastasizing melanoma formation caused by expression of activated N-RasQ61K on an INK4a-deficient background." *Cancer Research* **65**(10): 4005-4011.
- Akutsu, M., I. Dikic and A. Bremm (2016). "Ubiquitin chain diversity at a glance." *Journal of cell science* **129**(5): 875-880.
- Albinet, V., M. L. Bats, A. Huwiler, P. Rochaix, C. Chevreau, B. Segui, et al. N. Andrieu-Abadie (2014). "Dual role of sphingosine kinase-1 in promoting the differentiation of dermal fibroblasts and the dissemination of melanoma cells." *Oncogene* **33**(26): 3364-3373.
- Ali, Z., N. Yousaf and J. Larkin (2013). "Melanoma epidemiology, biology and prognosis." *EJC Suppl* **11**(2): 81-91.
- Andersen, L. B., J. W. Fountain, D. H. Gutmann, S. A. Tarle, T. W. Glover, N. C. Dracopoli, et al. F. S. Collins (1993). "Mutations in the neurofibromatosis 1 gene in sporadic malignant melanoma cell lines." *Nature genetics* **3**(2): 118-121.
- Anderson, C., S. Crimmins, J. A. Wilson, G. A. Korbil, H. L. Ploegh and S. M. Wilson (2005). "Loss of Usp14 results in reduced levels of ubiquitin in ataxia mice." *J Neurochem* **95**(3): 724-731.
- Arnold, S. A. and R. A. Brekken (2009). "SPARC: a matricellular regulator of tumorigenesis." *Journal of cell communication and signaling* **3**(3-4): 255-273.
- Arozarena, I. and C. Wellbrock (2017). "Overcoming resistance to BRAF inhibitors." *Annals of translational medicine* **5**(19): 387.
- Arpalhti, L., J. Hagstrom, H. Mustonen, M. Lundin, C. Haglund and C. I. Holmberg (2017). "UCHL5 expression associates with improved survival in lymph-node-positive rectal cancer." *Tumour Biol* **39**(7): 1010428317716078.
- Arrigo, A. P., K. Tanaka, A. L. Goldberg and W. J. Welch (1988). "Identity of the 19S 'prosome' particle with the large multifunctional protease complex of mammalian cells (the proteasome)." *Nature* **331**(6152): 192-194.
- Astner, S. and R. R. Anderson (2004). "Skin phototypes 2003." *J Invest Dermatol* **122**(2): xxx-xxxi.
- Auerbach, R., W. C. Lu, E. Pardon, F. Gumkowski, G. Kaminska and M. Kaminski (1987). "Specificity of adhesion between murine tumor cells and capillary endothelium: an in vitro correlate of preferential metastasis in vivo." *Cancer Res* **47**(6): 1492-1496.

- Baboshina, O. V. and A. L. Haas (1996). "Novel multiubiquitin chain linkages catalyzed by the conjugating enzymes E2EPF and RAD6 are recognized by 26 S proteasome subunit 5." The Journal of biological chemistry **271**(5): 2823-2831.
- Baietti, M. F., M. Simicek, L. Abbasi Asbagh, E. Radaelli, S. Lievens, J. Crowther, et al. A. A. Sablina (2016). "OTUB1 triggers lung cancer development by inhibiting RAS monoubiquitination." EMBO Mol Med **8**(3): 288-303.
- Balch, C. M., J. E. Gershenwald, S. J. Soong, J. F. Thompson, M. B. Atkins, D. R. Byrd, et al. V. K. Sondak (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): 6199-6206.
- Balch, W. E., R. I. Morimoto, A. Dillin and J. W. Kelly (2008). "Adapting proteostasis for disease intervention." Science **319**(5865): 916-919.
- Ban, L., S. Labbouz, D. Grindlay, J. Batchelor and S. Ratib (2018). "Risk of skin cancer in people with vitiligo: a systematic review and meta-analysis." The British journal of dermatology.
- Barbacid, M. (1987). "ras genes." Annual review of biochemistry **56**: 779-827.
- Bashore, C., C. M. Dambacher, E. A. Goodall, M. E. Matyskiela, G. C. Lander and A. Martin (2015). "Ubp6 deubiquitinase controls conformational dynamics and substrate degradation of the 26S proteasome." Nature structural & molecular biology **22**(9): 712-719.
- Basu, T. N., D. H. Gutmann, J. A. Fletcher, T. W. Glover, F. S. Collins and J. Downward (1992). "Aberrant regulation of ras proteins in malignant tumour cells from type 1 neurofibromatosis patients." Nature **356**(6371): 713-715.
- Bates, S., A. C. Phillips, P. A. Clark, F. Stott, G. Peters, R. L. Ludwig and K. H. Vousden (1998). "p14ARF links the tumour suppressors RB and p53." Nature **395**(6698): 124-125.
- Beck, F., P. Unverdorben, S. Bohn, A. Schweitzer, G. Pfeifer, E. Sakata, et al. F. Forster (2012). "Near-atomic resolution structural model of the yeast 26S proteasome." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **109**(37): 14870-14875.
- Benfodda, M., S. Gazal, V. Descamps, N. Basset-Seguin, L. Deschamps, L. Thomas, et al. N. Soufir (2018). "Truncating mutations of TP53AIP1 gene predispose to cutaneous melanoma." Genes, chromosomes & cancer **57**(6): 294-303.
- Borodovsky, A., B. M. Kessler, R. Casagrande, H. S. Overkleeft, K. D. Wilkinson and H. L. Ploegh (2001). "A novel active site-directed probe specific for deubiquitylating enzymes reveals proteasome association of USP14." The EMBO journal **20**(18): 5187-5196.
- Bos, J. L. (1989). "ras oncogenes in human cancer: a review." Cancer Research **49**(17): 4682-4689.
- Boselli, M., B. H. Lee, J. Robert, M. A. Prado, S. W. Min, C. Cheng, et al. D. Finley (2017). "An inhibitor of the proteasomal deubiquitinating enzyme USP14 induces tau elimination in cultured neurons." The Journal of biological chemistry **292**(47): 19209-19225.
- Boulais, N. and L. Misery (2007). Les cellules de Merkel. Keratin, Editions PRIVAT. **12**: 4.

Box, N. F., D. L. Duffy, W. Chen, M. Stark, N. G. Martin, R. A. Sturm and N. K. Hayward (2001). "MC1R genotype modifies risk of melanoma in families segregating CDKN2A mutations." Am J Hum Genet **69**(4): 765-773.

Breitkreutz, D., I. Koxholt, K. Thiemann and R. Nischt (2013). "Skin basement membrane: the foundation of epidermal integrity--BM functions and diverse roles of bridging molecules nidogen and perlecan." Biomed Res Int **2013**: 179784.

Brekken, R. A. and E. H. Sage (2000). "SPARC, a matricellular protein: at the crossroads of cell-matrix." Matrix Biology **19**(7): 569-580.

Brnjic, S., M. Mazurkiewicz, M. Fryknas, C. Sun, X. Zhang, R. Larsson, et al.S. Linder (2014). "Induction of tumor cell apoptosis by a proteasome deubiquitinase inhibitor is associated with oxidative stress." Antioxid Redox Signal **21**(17): 2271-2285.

Butler, L. R., R. M. Densham, J. Jia, A. J. Garvin, H. R. Stone, V. Shah, et al.J. R. Morris (2012). "The proteasomal de-ubiquitinating enzyme POH1 promotes the double-strand DNA break response." The EMBO journal **31**(19): 3918-3934.

Cancer Genome Atlas Network (2015). "Genomic Classification of Cutaneous Melanoma." Cell **161**(7): 1681-1696.

Cao, S. S. and R. J. Kaufman (2012). "Unfolded protein response." Current biology : CB **22**(16): R622-626.

Caramel, J., E. Papadogeorgakis, L. Hill, G. J. Browne, G. Richard, A. Wierinckx, et al.E. Tulchinsky (2013). "A switch in the expression of embryonic EMT-inducers drives the development of malignant melanoma." Cancer Cell **24**(4): 466-480.

Caravita, T., P. de Fabritiis, A. Palumbo, S. Amadori and M. Boccadoro (2006). "Bortezomib: efficacy comparisons in solid tumors and hematologic malignancies." Nat Clin Pract Oncol **3**(7): 374-387.

Castellano, E. and J. Downward (2010). "Role of RAS in the regulation of PI 3-kinase." Current topics in microbiology and immunology **346**: 143-169.

Cerra, R. F. and S. D. Nathanson (1991). "Chemotactic activity present in liver extracellular matrix." Clin Exp Metastasis **9**(1): 39-49.

Chapman, P. B., A. Hauschild, C. Robert, J. B. Haanen, P. Ascierto, J. Larkin, et al.G. A. McArthur (2011). "Improved survival with vemurafenib in melanoma with BRAF V600E mutation." The New England journal of medicine **364**(26): 2507-2516.

Chau, V., J. W. Tobias, A. Bachmair, D. Marriott, D. J. Ecker, D. K. Gonda and A. Varshavsky (1989). "A multiubiquitin chain is confined to specific lysine in a targeted short-lived protein." Science **243**(4898): 1576-1583.

Chen, Z., X. Niu, Z. Li, Y. Yu, X. Ye, S. Lu and Z. Chen (2011). "Effect of ubiquitin carboxy-terminal hydrolase 37 on apoptotic in A549 cells." Cell Biochem Funct **29**(2): 142-148.

Cichorek, M., M. Wachulska, A. Stasiewicz and A. Tyminska (2013). "Skin melanocytes: biology and development." Postepy Dermatol Alergol **30**(1): 30-41.

- Cichowski, K., S. Santiago, M. Jardim, B. W. Johnson and T. Jacks (2003). "Dynamic regulation of the Ras pathway via proteolysis of the NF1 tumor suppressor." Genes & development **17**(4): 449-454.
- Cirenajwis, H., M. Lauss, H. Ekedahl, T. Tornngren, A. Kvist, L. H. Saal, et al. G. Jonsson (2017). "NF1-mutated melanoma tumors harbor distinct clinical and biological characteristics." Molecular oncology **11**(4): 438-451.
- Clark, W. H., Jr., A. M. Ainsworth, E. A. Bernardino, C. H. Yang, C. M. Mihm, Jr. and R. J. Reed (1975). "The developmental biology of primary human malignant melanomas." Semin Oncol **2**(2): 83-103.
- Clark, W. H., Jr., D. E. Elder, D. t. Guerry, M. N. Epstein, M. H. Greene and M. Van Horn (1984). "A study of tumor progression: the precursor lesions of superficial spreading and nodular melanoma." Hum Pathol **15**(12): 1147-1165.
- Courtois-Cox, S., S. M. Genter Williams, E. E. Reczek, B. W. Johnson, L. T. McGillicuddy, C. M. Johannessen, et al. K. Cichowski (2006). "A negative feedback signaling network underlies oncogene-induced senescence." Cancer Cell **10**(6): 459-472.
- D'Arcy, P., S. Brnjic, M. H. Olofsson, M. Fryknas, K. Lindsten, M. De Cesare, et al. S. Linder (2011). "Inhibition of proteasome deubiquitinating activity as a new cancer therapy." Nat Med **17**(12): 1636-1640.
- D'Arcy, P. and S. Linder (2012). "Proteasome deubiquitinases as novel targets for cancer therapy." The international journal of biochemistry & cell biology **44**(11): 1729-1738.
- D'Arcy, P., X. Wang and S. Linder (2015). "Deubiquitinase inhibition as a cancer therapeutic strategy." Pharmacol Ther **147**: 32-54.
- Dai, D. L., M. Martinka and G. Li (2005). "Prognostic significance of activated Akt expression in melanoma: a clinicopathologic study of 292 cases." Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology **23**(7): 1473-1482.
- Davies, H., G. R. Bignell, C. Cox, P. Stephens, S. Edkins, S. Clegg, et al. P. A. Futreal (2002). "Mutations of the BRAF gene in human cancer." Nature **417**(6892): 949-954.
- De Fabo, E. C., F. P. Noonan, T. Fears and G. Merlino (2004). "Ultraviolet B but not ultraviolet A radiation initiates melanoma." Cancer Res **64**(18): 6372-6376.
- Delgado, A. F. (2017). "Complete Lymph Node Dissection in Melanoma: A Systematic Review and Meta-Analysis." Anticancer research **37**(12): 6825-6829.
- Dennis, L. K., M. J. Vanbeek, L. E. Beane Freeman, B. J. Smith, D. V. Dawson and J. A. Coughlin (2008). "Sunburns and risk of cutaneous melanoma: does age matter? A comprehensive meta-analysis." Ann Epidemiol **18**(8): 614-627.
- Deshaies, R. J. (2014). "Proteotoxic crisis, the ubiquitin-proteasome system, and cancer therapy." BMC biology **12**: 94.
- Dikic, I., S. Wakatsuki and K. J. Walters (2009). "Ubiquitin-binding domains - from structures to functions." Nature reviews. Molecular cell biology **10**(10): 659-671.

- Dong, Y., J. A. Richards, R. Gupta, P. P. Aung, A. Emley, Y. Kluger, et al. N. Wajapeyee (2014). "PTEN functions as a melanoma tumor suppressor by promoting host immune response." Oncogene **33**(38): 4632-4642.
- Downward, J. (2003). "Targeting RAS signalling pathways in cancer therapy." Nature reviews. Cancer **3**(1): 11-22.
- Duffy, M. J., N. C. Synnott and J. Crown (2017). "Mutant p53 as a target for cancer treatment." European Journal of Cancer **83**: 258-265.
- Duval, C., N. P. Smit, A. M. Kolb, M. Regnier, S. Pavel and R. Schmidt (2002). "Keratinocytes control the pheo/eumelanin ratio in cultured normal human melanocytes." Pigment Cell Res **15**(6): 440-446.
- Eggermont, A. M., M. Maio and C. Robert (2015). "Immune checkpoint inhibitors in melanoma provide the cornerstones for curative therapies." Semin Oncol **42**(3): 429-435.
- Elder, D. E. (2006). "Pathology of melanoma." Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research **12**(7 Pt 2): 2308s-2311s.
- Elder, D. E., P. M. Jucovy, R. J. Tuthill and W. H. Clark, Jr. (1980). "The classification of malignant melanoma." Am J Dermatopathol **2**(4): 315-320.
- Erapapazoglou, Z., O. Walker and R. Haguenaer-Tsapis (2014). "Versatile roles of k63-linked ubiquitin chains in trafficking." Cells **3**(4): 1027-1088.
- Eskandarpour, M., J. Hashemi, L. Kanter, U. Ringborg, A. Platz and J. Hansson (2003). "Frequency of UV-inducible NRAS mutations in melanomas of patients with germline CDKN2A mutations." Journal of the National Cancer Institute **95**(11): 790-798.
- Falchook, G. S., K. D. Lewis, J. R. Infante, M. S. Gordon, N. J. Vogelzang, D. J. DeMarini, et al. L. A. Fecher (2012). "Activity of the oral MEK inhibitor trametinib in patients with advanced melanoma: a phase 1 dose-escalation trial." The Lancet. Oncology **13**(8): 782-789.
- Farriol-Mathis, N., J. S. Garavelli, B. Boeckmann, S. Duvaud, E. Gasteiger, A. Gateau, et al. A. Bairoch (2004). "Annotation of post-translational modifications in the Swiss-Prot knowledge base." Proteomics **4**(6): 1537-1550.
- Fei, C., Z. Li, C. Li, Y. Chen, Z. Chen, X. He, et al. L. Li (2013). "Smurf1-mediated Lys29-linked nonproteolytic polyubiquitination of axin negatively regulates Wnt/beta-catenin signaling." Molecular and cellular biology **33**(20): 4095-4105.
- Fenouille, N., A. Puissant, M. Tichet, G. Zimniak, P. Abbe, A. Mallavialle, et al. S. Tartare-Deckert (2011). "SPARC functions as an anti-stress factor by inactivating p53 through Akt-mediated MDM2 phosphorylation to promote melanoma cell survival." Oncogene **30**(49): 4887-4900.
- Fenouille, N., G. Robert, M. Tichet, A. Puissant, M. Dufies, S. Rocchi, et al. S. Tartare-Deckert (2011). "The p53/p21Cip1/ Waf1 pathway mediates the effects of SPARC on melanoma cell cycle progression." Pigment cell & melanoma research **24**(1): 219-232.
- Fenouille, N., M. Tichet, M. Dufies, A. Pottier, A. Mogha, J. K. Soo, et al. S. Tartare-Deckert (2012). "The epithelial-mesenchymal transition (EMT) regulatory factor SLUG (SNAI2) is a downstream target of SPARC and AKT in promoting melanoma cell invasion." PloS one **7**(7): e40378.

Finley, D. (2009). "Recognition and processing of ubiquitin-protein conjugates by the proteasome." Annual review of biochemistry **78**: 477-513.

Finn, L., S. N. Markovic and R. W. Joseph (2012). "Therapy for metastatic melanoma: the past, present, and future." BMC medicine **10**: 23.

Fitzpatrick, T. B. (1988). "The validity and practicality of sun-reactive skin types I through VI." Arch Dermatol **124**(6): 869-871.

Flaherty, K. T., F. S. Hodi and D. E. Fisher (2012). "From genes to drugs: targeted strategies for melanoma." Nature reviews. Cancer **12**(5): 349-361.

Flaherty, K. T., I. Puzanov, K. B. Kim, A. Ribas, G. A. McArthur, J. A. Sosman, et al. P. B. Chapman (2010). "Inhibition of mutated, activated BRAF in metastatic melanoma." The New England journal of medicine **363**(9): 809-819.

Flaherty, K. T., C. Robert, P. Hersey, P. Nathan, C. Garbe, M. Milhem, et al. D. Schadendorf (2012). "Improved survival with MEK inhibition in BRAF-mutated melanoma." The New England journal of medicine **367**(2): 107-114.

Fletcher, A. J., D. L. Mallery, R. E. Watkinson, C. F. Dickson and L. C. James (2015). "Sequential ubiquitination and deubiquitination enzymes synchronize the dual sensor and effector functions of TRIM21." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **112**(32): 10014-10019.

Fradet-Turcotte, A., M. D. Canny, C. Escibano-Diaz, A. Orthwein, C. C. Leung, H. Huang, et al. D. Durocher (2013). "53BP1 is a reader of the DNA-damage-induced H2A Lys 15 ubiquitin mark." Nature **499**(7456): 50-54.

Fraile, J. M., V. Quesada, D. Rodriguez, J. M. Freije and C. Lopez-Otin (2012). "Deubiquitinases in cancer: new functions and therapeutic options." Oncogene **31**(19): 2373-2388.

Franklin, C., E. Livingstone, A. Roesch, B. Schilling and D. Schadendorf (2017). "Immunotherapy in melanoma: Recent advances and future directions." European journal of surgical oncology : the journal of the European Society of Surgical Oncology and the British Association of Surgical Oncology **43**(3): 604-611.

Gandini, S., F. Sera, M. S. Cattaruzza, P. Pasquini, D. Abeni, P. Boyle and C. F. Melchi (2005). "Meta-analysis of risk factors for cutaneous melanoma: I. Common and atypical naevi." Eur J Cancer **41**(1): 28-44.

Gandini, S., F. Sera, M. S. Cattaruzza, P. Pasquini, O. Picconi, P. Boyle and C. F. Melchi (2005). "Meta-analysis of risk factors for cutaneous melanoma: II. Sun exposure." Eur J Cancer **41**(1): 45-60.

Garraway, L. A., H. R. Widlund, M. A. Rubin, G. Getz, A. J. Berger, S. Ramaswamy, et al. W. R. Sellers (2005). "Integrative genomic analyses identify MITF as a lineage survival oncogene amplified in malignant melanoma." Nature **436**(7047): 117-122.

Gatti, M., S. Pinato, A. Maiolica, F. Rocchio, M. G. Prato, R. Aebbersold and L. Penengo (2015). "RNF168 promotes noncanonical K27 ubiquitination to signal DNA damage." Cell reports **10**(2): 226-238.

Gide, T. N., J. S. Wilmott, R. A. Scolyer and G. V. Long (2018). "Primary and Acquired Resistance to Immune Checkpoint Inhibitors in Metastatic Melanoma." Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research **24**(6): 1260-1270.

Glick, D., S. Barth and K. F. Macleod (2010). "Autophagy: cellular and molecular mechanisms." The Journal of pathology **221**(1): 3-12.

Glickman, M. H. and A. Ciechanover (2002). "The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction." Physiological reviews **82**(2): 373-428.

Goel, V. K., A. J. Lazar, C. L. Warneke, M. S. Redston and F. G. Haluska (2006). "Examination of mutations in BRAF, NRAS, and PTEN in primary cutaneous melanoma." The Journal of investigative dermatology **126**(1): 154-160.

Goldberg, A. L. (2012). "Development of proteasome inhibitors as research tools and cancer drugs." J Cell Biol **199**(4): 583-588.

Gray-Schopfer, V., C. Wellbrock and R. Marais (2007). "Melanoma biology and new targeted therapy." Nature **445**(7130): 851-857.

Gray-Schopfer, V. C., S. C. Cheong, H. Chong, J. Chow, T. Moss, Z. A. Abdel-Malek, et al. D. C. Bennett (2006). "Cellular senescence in naevi and immortalisation in melanoma: a role for p16?" Br J Cancer **95**(4): 496-505.

Guo, W., J. Ma, T. Pei, T. Zhao, S. Guo, X. Yi, et al. Q. Shi (2018). "Up-regulated deubiquitinase USP4 plays an oncogenic role in melanoma." J Cell Mol Med **22**(5): 2944-2954.

Haahr, P., N. Borgermann, X. Guo, D. Typas, D. Achuthankutty, S. Hoffmann, et al. N. Mailand (2018). "ZUFSP Deubiquitylates K63-Linked Polyubiquitin Chains to Promote Genome Stability." Molecular cell **70**(1): 165-174 e166.

Haglund, K., P. P. Di Fiore and I. Dikic (2003). "Distinct monoubiquitin signals in receptor endocytosis." Trends in biochemical sciences **28**(11): 598-603.

Haglund, K., S. Sigismund, S. Polo, I. Szymkiewicz, P. P. Di Fiore and I. Dikic (2003). "Multiple monoubiquitination of RTKs is sufficient for their endocytosis and degradation." Nature cell biology **5**(5): 461-466.

Hamazaki, J., S. Iemura, T. Natsume, H. Yashiroda, K. Tanaka and S. Murata (2006). "A novel proteasome interacting protein recruits the deubiquitinating enzyme UCH37 to 26S proteasomes." The EMBO journal **25**(19): 4524-4536.

Hanahan, D. and R. A. Weinberg (2011). "Hallmarks of cancer: the next generation." Cell **144**(5): 646-674.

Hanna, J., N. A. Hathaway, Y. Tone, B. Crosas, S. Elsasser, D. S. Kirkpatrick, et al. D. Finley (2006). "Deubiquitinating enzyme Ubp6 functions noncatalytically to delay proteasomal degradation." Cell **127**(1): 99-111.

- Harbour, J. W., M. D. Onken, E. D. Roberson, S. Duan, L. Cao, L. A. Worley, et al. A. M. Bowcock (2010). "Frequent mutation of BAP1 in metastasizing uveal melanomas." Science **330**(6009): 1410-1413.
- Hearing, V. J. (2011). "Determination of melanin synthetic pathways." J Invest Dermatol **131**(E1): E8-E11.
- Heenan, P. J. and C. D. Holman (1982). "Nodular malignant melanoma: a distinct entity or a common end stage?" The American Journal of dermatopathology **4**(5): 477-478.
- Hershko, A., A. Ciechanover, H. Heller, A. L. Haas and I. A. Rose (1980). "Proposed role of ATP in protein breakdown: conjugation of protein with multiple chains of the polypeptide of ATP-dependent proteolysis." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **77**(4): 1783-1786.
- Hicke, L. (2001). "Protein regulation by monoubiquitin." Nature reviews. Molecular cell biology **2**(3): 195-201.
- Hicke, L., H. L. Schubert and C. P. Hill (2005). "Ubiquitin-binding domains." Nature reviews. Molecular cell biology **6**(8): 610-621.
- Hieronymus, T., M. Zenke, J. H. Baek and K. Sere (2015). "The clash of Langerhans cell homeostasis in skin: Should I stay or should I go?" Seminars in cell & developmental biology **41**: 30-38.
- Hiller, M. M., A. Finger, M. Schweiger and D. H. Wolf (1996). "ER degradation of a misfolded luminal protein by the cytosolic ubiquitin-proteasome pathway." Science **273**(5282): 1725-1728.
- Hirata, E., M. R. Girotti, A. Viros, S. Hooper, B. Spencer-Dene, M. Matsuda, et al. E. Sahai (2015). "Intravital imaging reveals how BRAF inhibition generates drug-tolerant microenvironments with high integrin beta1/FAK signaling." Cancer Cell **27**(4): 574-588.
- Hiratsuka, S., A. Watanabe, H. Aburatani and Y. Maru (2006). "Tumour-mediated upregulation of chemoattractants and recruitment of myeloid cells predetermines lung metastasis." Nature cell biology **8**(12): 1369-1375.
- Hochstrasser, M. (2009). "Origin and function of ubiquitin-like proteins." Nature **458**(7237): 422-429.
- Hock, A. K., A. M. Vigneron, S. Carter, R. L. Ludwig and K. H. Vousden (2011). "Regulation of p53 stability and function by the deubiquitinating enzyme USP42." The EMBO journal **30**(24): 4921-4930.
- Hodi, F. S., S. J. O'Day, D. F. McDermott, R. W. Weber, J. A. Sosman, J. B. Haanen, et al. W. J. Urba (2010). "Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma." The New England journal of medicine **363**(8): 711-723.
- Hodis, E., I. R. Watson, G. V. Kryukov, S. T. Arold, M. Imielinski, J. P. Theurillat, et al. L. Chin (2012). "A landscape of driver mutations in melanoma." Cell **150**(2): 251-263.
- Hoegge, C., B. Pfander, G. L. Moldovan, G. Pyrowolakis and S. Jentsch (2002). "RAD6-dependent DNA repair is linked to modification of PCNA by ubiquitin and SUMO." Nature **419**(6903): 135-141.
- Holly, E. A., J. W. Kelly, S. N. Shpall and S. H. Chiu (1987). "Number of melanocytic nevi as a major risk factor for malignant melanoma." J Am Acad Dermatol **17**(3): 459-468.

- Homet Moreno, B., J. M. Zaretsky, A. Garcia-Diaz, J. Tsoi, G. Parisi, L. Robert, et al. A. Ribas (2016). "Response to Programmed Cell Death-1 Blockade in a Murine Melanoma Syngeneic Model Requires Costimulation, CD4, and CD8 T Cells." Cancer Immunol Res **4**(10): 845-857.
- Hoshino, A., B. Costa-Silva, T. L. Shen, G. Rodrigues, A. Hashimoto, M. Tesic Mark, et al. D. Lyden (2015). "Tumour exosome integrins determine organotropic metastasis." Nature **527**(7578): 329-335.
- Hsu, M. Y., M. J. Wheelock, K. R. Johnson and M. Herlyn (1996). "Shifts in cadherin profiles between human normal melanocytes and melanomas." The journal of investigative dermatology. Symposium proceedings **1**(2): 188-194.
- Hu, M., P. Li, M. Li, W. Li, T. Yao, J. W. Wu, et al. Y. Shi (2002). "Crystal structure of a UBP-family deubiquitinating enzyme in isolation and in complex with ubiquitin aldehyde." Cell **111**(7): 1041-1054.
- Hu, M., P. Li, L. Song, P. D. Jeffrey, T. A. Chenova, K. D. Wilkinson, et al. Y. Shi (2005). "Structure and mechanisms of the proteasome-associated deubiquitinating enzyme USP14." The EMBO journal **24**(21): 3747-3756.
- Huang, O. W., X. Ma, J. Yin, J. Flinders, T. Maurer, N. Kayagaki, et al. A. G. Cochran (2012). "Phosphorylation-dependent activity of the deubiquitinase DUBA." Nature structural & molecular biology **19**(2): 171-175.
- Huang, X., B. Luan, J. Wu and Y. Shi (2016). "An atomic structure of the human 26S proteasome." Nature structural & molecular biology **23**(9): 778-785.
- Ibrahim, N. and F. G. Haluska (2009). "Molecular pathogenesis of cutaneous melanocytic neoplasms." Annual review of pathology **4**: 551-579.
- Institut national du cancer (2015). Les Données. Boulogne-Billancourt, Institut national du cancer.
- Iozumi, K., G. E. Hoganson, R. Pennella, M. A. Everett and B. B. Fuller (1993). "Role of tyrosinase as the determinant of pigmentation in cultured human melanocytes." J Invest Dermatol **100**(6): 806-811.
- Johannessen, C. M., J. S. Boehm, S. Y. Kim, S. R. Thomas, L. Wardwell, L. A. Johnson, et al. L. A. Garraway (2010). "COT drives resistance to RAF inhibition through MAP kinase pathway reactivation." Nature **468**(7326): 968-972.
- Kamenisch, Y., T. S. Baban, W. Schuller, A. K. von Thaler, T. Sinnberg, G. Metzler, et al. M. Berneburg (2016). "UVA-Irradiation Induces Melanoma Invasion via the Enhanced Warburg Effect." The Journal of investigative dermatology **136**(9): 1866-1875.
- Kapuria, V., L. F. Peterson, D. Fang, W. G. Bornmann, M. Talpaz and N. J. Donato (2010). "Deubiquitinase inhibition by small-molecule WP1130 triggers aggresome formation and tumor cell apoptosis." Cancer Res **70**(22): 9265-9276.
- Karachaliou, N., M. Gonzalez-Cao, A. Sosa, J. Berenguer, J. W. P. Bracht, M. Ito and R. Rosell (2017). "The combination of checkpoint immunotherapy and targeted therapy in cancer." Annals of translational medicine **5**(19): 388.

- Karimian, A., Y. Ahmadi and B. Yousefi (2016). "Multiple functions of p21 in cell cycle, apoptosis and transcriptional regulation after DNA damage." DNA repair **42**: 63-71.
- Katz, S. I., K. Tamaki and D. H. Sachs (1979). "Epidermal Langerhans cells are derived from cells originating in bone marrow." Nature **282**(5736): 324-326.
- Kayagaki, N., Q. Phung, S. Chan, R. Chaudhari, C. Quan, K. M. O'Rourke, et al. V. M. Dixit (2007). "DUBA: a deubiquitinase that regulates type I interferon production." Science **318**(5856): 1628-1632.
- Keniry, M. and R. Parsons (2008). "The role of PTEN signaling perturbations in cancer and in targeted therapy." Oncogene **27**(41): 5477-5485.
- Kim, H. T. and A. L. Goldberg (2017). "The deubiquitinating enzyme Usp14 allosterically inhibits multiple proteasomal activities and ubiquitin-independent proteolysis." The Journal of biological chemistry **292**(23): 9830-9839.
- Kirkpatrick, D. S., N. A. Hathaway, J. Hanna, S. Elsassner, J. Rush, D. Finley, et al. S. P. Gygi (2006). "Quantitative analysis of in vitro ubiquitinated cyclin B1 reveals complex chain topology." Nature cell biology **8**(7): 700-710.
- Kiuru, M. and K. J. Busam (2017). "The NF1 gene in tumor syndromes and melanoma." Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology **97**(2): 146-157.
- Knecht, E., C. Aguado, J. Carcel, I. Esteban, J. M. Esteve, G. Ghislat, et al. R. Saez (2009). "Intracellular protein degradation in mammalian cells: recent developments." Cellular and molecular life sciences : CMLS **66**(15): 2427-2443.
- Kobayashi, T., K. C. Masoumi and R. Massoumi (2015). "Deubiquitinating activity of CYLD is impaired by SUMOylation in neuroblastoma cells." Oncogene **34**(17): 2251-2260.
- Kobayashi, T., K. Urabe, A. Winder, K. Tsukamoto, T. Brewington, G. Imokawa, et al. V. J. Hearing (1994). "DHICA oxidase activity of TRP1 and interactions with other melanogenic enzymes." Pigment Cell Res **7**(4): 227-234.
- Komander, D., M. J. Clague and S. Urbe (2009). "Breaking the chains: structure and function of the deubiquitinases." Nature reviews. Molecular cell biology **10**(8): 550-563.
- Komander, D. and M. Rape (2012). "The ubiquitin code." Annual review of biochemistry **81**: 203-229.
- Koulich, E., X. Li and G. N. DeMartino (2008). "Relative structural and functional roles of multiple deubiquitylating proteins associated with mammalian 26S proteasome." Mol Biol Cell **19**(3): 1072-1082.
- Krengel, S., A. Hauschild and T. Schafer (2006). "Melanoma risk in congenital melanocytic naevi: a systematic review." Br J Dermatol **155**(1): 1-8.
- Kuo, L. J. and L. X. Yang (2008). "Gamma-H2AX - a novel biomarker for DNA double-strand breaks." In Vivo **22**(3): 305-309.
- Kwasna, D., S. A. Abdul Rehman, J. Natarajan, S. Matthews, R. Madden, V. De Cesare, et al. Y. Kulathu (2018). "Discovery and Characterization of ZUFSP/ZUP1, a Distinct Deubiquitinase Class Important for Genome Stability." Molecular cell **70**(1): 150-164 e156.

Laga, A. C. and G. F. Murphy (2010). "Cellular heterogeneity in vertical growth phase melanoma." Archives of pathology & laboratory medicine **134**(12): 1750-1757.

Lam, Y. A., W. Xu, G. N. DeMartino and R. E. Cohen (1997). "Editing of ubiquitin conjugates by an isopeptidase in the 26S proteasome." Nature **385**(6618): 737-740.

Lander, G. C., E. Estrin, M. E. Matyskiela, C. Bashore, E. Nogales and A. Martin (2012). "Complete subunit architecture of the proteasome regulatory particle." Nature **482**(7384): 186-191.

Lappin, M. B., I. Kimber and M. Norval (1996). "The role of dendritic cells in cutaneous immunity." Arch Dermatol Res **288**(3): 109-121.

Lauinger, L., J. Li, A. Shostak, I. A. Cemel, N. Ha, Y. Zhang, et al. A. Diernfellner (2017). "Thiolutin is a zinc chelator that inhibits the Rpn11 and other JAMM metalloproteases." Nat Chem Biol **13**(7): 709-714.

Lawrence, M. S., P. Stojanov, P. Polak, G. V. Kryukov, K. Cibulskis, A. Sivachenko, et al. G. Getz (2013). "Mutational heterogeneity in cancer and the search for new cancer-associated genes." Nature **499**(7457): 214-218.

Le Douarin, N. and C. Kalcheim (1999). The neural crest. Cambridge, UK ; New York, NY, USA, Cambridge University Press.

Lee, B. H., Y. Lu, M. A. Prado, Y. Shi, G. Tian, S. Sun, et al. D. Finley (2016). "USP14 deubiquitinates proteasome-bound substrates that are ubiquitinated at multiple sites." Nature **532**(7599): 398-401.

Leggett, D. S., J. Hanna, A. Borodovsky, B. Crosas, M. Schmidt, R. T. Baker, et al. D. Finley (2002). "Multiple associated proteins regulate proteasome structure and function." Molecular cell **10**(3): 495-507.

Leiter, U. and C. Garbe (2008). "Epidemiology of melanoma and nonmelanoma skin cancer--the role of sunlight." Advances in experimental medicine and biology **624**: 89-103.

Leiter, U., F. Meier, B. Schitteck and C. Garbe (2004). "The natural course of cutaneous melanoma." J Surg Oncol **86**(4): 172-178.

Lemus, L. and V. Goder (2014). "Regulation of Endoplasmic Reticulum-Associated Protein Degradation (ERAD) by Ubiquitin." Cells **3**(3): 824-847.

Li, J., T. Yakushi, F. Parlati, A. L. Mackinnon, C. Perez, Y. Ma, et al. R. J. Deshaies (2017). "Capzimin is a potent and specific inhibitor of proteasome isopeptidase Rpn11." Nat Chem Biol **13**(5): 486-493.

Li, J., Y. Zhang, B. Da Silva Sil Dos Santos, F. Wang, Y. Ma, C. Perez, et al. R. J. Deshaies (2018). "Epidithiodiketopiperazines Inhibit Protein Degradation by Targeting Proteasome Deubiquitinase Rpn11." Cell Chem Biol.

Liao, Y., N. Liu, X. Hua, J. Cai, X. Xia, X. Wang, et al. J. Liu (2017). "Proteasome-associated deubiquitinase ubiquitin-specific protease 14 regulates prostate cancer proliferation by deubiquitinating and stabilizing androgen receptor." Cell Death Dis **8**(2): e2585.

- Lien, E. C., C. C. Dibble and A. Toker (2017). "PI3K signaling in cancer: beyond AKT." Current opinion in cell biology **45**: 62-71.
- Lim, S. O., C. W. Li, W. Xia, J. H. Cha, L. C. Chan, Y. Wu, et al.M. C. Hung (2016). "Deubiquitination and Stabilization of PD-L1 by CSN5." Cancer Cell **30**(6): 925-939.
- Liu, Z. J., M. Xiao, K. Balint, K. S. Smalley, P. Brafford, R. Qiu, et al.M. Herlyn (2006). "Notch1 signaling promotes primary melanoma progression by activating mitogen-activated protein kinase/phosphatidylinositol 3-kinase-Akt pathways and up-regulating N-cadherin expression." Cancer Research **66**(8): 4182-4190.
- Long, G. V., D. Stroyakovskiy, H. Gogas, E. Levchenko, F. de Braud, J. Larkin, et al.K. Flaherty (2014). "Combined BRAF and MEK inhibition versus BRAF inhibition alone in melanoma." The New England journal of medicine **371**(20): 1877-1888.
- Luise, C., M. Capra, M. Donzelli, G. Mazzarol, M. G. Jodice, P. Nuciforo, et al.S. Confalonieri (2011). "An atlas of altered expression of deubiquitinating enzymes in human cancer." PloS one **6**(1): e15891.
- Ma, J., W. Guo and C. Li (2017). "Ubiquitination in melanoma pathogenesis and treatment." Cancer Med **6**(6): 1362-1377.
- Manie, S. N., J. Lebeau and E. Chevet (2014). "Cellular mechanisms of endoplasmic reticulum stress signaling in health and disease. 3. Orchestrating the unfolded protein response in oncogenesis: an update." Am J Physiol Cell Physiol **307**(10): C901-907.
- Manzano, J. L., L. Layos, C. Buges, M. de Los Llanos Gil, L. Vila, E. Martinez-Balibrea and A. Martinez-Cardus (2016). "Resistant mechanisms to BRAF inhibitors in melanoma." Annals of translational medicine **4**(12): 237.
- Manzano, J. L., L. Layos, C. Buges, M. de Los Llanos Gil, L. Vila, E. Martinez-Balibrea and A. Martinez-Cardus (2016). "Resistant mechanisms to BRAF inhibitors in melanoma." Annals of translational medicine **4**(12): 237.
- Marzuka-Alcala, A., M. J. Gabree and H. Tsao (2014). "Melanoma susceptibility genes and risk assessment." Methods in molecular biology **1102**: 381-393.
- Massi, D., A. Franchi, L. Borgognoni, U. M. Reali and M. Santucci (1999). "Osteonectin expression correlates with clinical outcome in thin cutaneous malignant melanomas." Hum Pathol **30**(3): 339-344.
- Massoumi, R., S. Kuphal, C. Hellerbrand, B. Haas, P. Wild, T. Spruss, et al.A. K. Bosserhoff (2009). "Down-regulation of CYLD expression by Snail promotes tumor progression in malignant melanoma." J Exp Med **206**(1): 221-232.
- Matsumoto, M. L., K. E. Wickliffe, K. C. Dong, C. Yu, I. Bosanac, D. Bustos, et al.V. M. Dixit (2010). "K11-linked polyubiquitination in cell cycle control revealed by a K11 linkage-specific antibody." Molecular cell **39**(3): 477-484.
- Mattoo, R. U. and P. Goloubinoff (2014). "Molecular chaperones are nanomachines that catalytically unfold misfolded and alternatively folded proteins." Cellular and molecular life sciences : CMLS **71**(17): 3311-3325.

- Matyskiela, M. E., G. C. Lander and A. Martin (2013). "Conformational switching of the 26S proteasome enables substrate degradation." Nature structural & molecular biology **20**(7): 781-788.
- Mazumdar, T., F. M. Gorgun, Y. Sha, A. Tyryshkin, S. Zeng, R. Hartmann-Petersen, et al. N. T. Eissa (2010). "Regulation of NF-kappaB activity and inducible nitric oxide synthase by regulatory particle non-ATPase subunit 13 (Rpn13)." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **107**(31): 13854-13859.
- Mazurkiewicz, M., E. K. Hillert, X. Wang, P. Pellegrini, M. H. Olofsson, K. Selvaraju, et al. S. Linder (2017). "Acute lymphoblastic leukemia cells are sensitive to disturbances in protein homeostasis induced by proteasome deubiquitinase inhibition." Oncotarget **8**(13): 21115-21127.
- McCarthy, M. K. and J. B. Weinberg (2015). "The immunoproteasome and viral infection: a complex regulator of inflammation." Frontiers in microbiology **6**: 21.
- McClurg, U. L. and C. N. Robson (2015). "Deubiquitinating enzymes as oncotargets." Oncotarget **6**(12): 9657-9668.
- Meads, M. B., R. A. Gatenby and W. S. Dalton (2009). "Environment-mediated drug resistance: a major contributor to minimal residual disease." Nature reviews. Cancer **9**(9): 665-674.
- Metzger, M. B., V. A. Hristova and A. M. Weissman (2012). "HECT and RING finger families of E3 ubiquitin ligases at a glance." Journal of cell science **125**(Pt 3): 531-537.
- Michaloglou, C., L. C. Vredeveld, M. S. Soengas, C. Denoyelle, T. Kuilman, C. M. van der Horst, et al. D. S. Peeper (2005). "BRAF^{E600}-associated senescence-like cell cycle arrest of human naevi." Nature **436**(7051): 720-724.
- Michel, M. A., K. N. Swatek, M. K. Hospenthal and D. Komander (2017). "Ubiquitin Linkage-Specific Affimers Reveal Insights into K6-Linked Ubiquitin Signaling." Molecular cell **68**(1): 233-246 e235.
- Miller, A. J. and M. C. Mihm, Jr. (2006). "Melanoma." The New England journal of medicine **355**(1): 51-65.
- Min, Y., S. Lee, M. J. Kim, E. Chun and K. Y. Lee (2017). "Ubiquitin-Specific Protease 14 Negatively Regulates Toll-Like Receptor 4-Mediated Signaling and Autophagy Induction by Inhibiting Ubiquitination of TAK1-Binding Protein 2 and Beclin 1." Front Immunol **8**: 1827.
- Mitchell, D. and A. Fernandez (2012). "The photobiology of melanocytes modulates the impact of UVA on sunlight-induced melanoma." Photochem Photobiol Sci **11**(1): 69-73.
- Miyamura, Y., S. G. Coelho, R. Wolber, S. A. Miller, K. Wakamatsu, B. Z. Zmudzka, et al. V. J. Hearing (2007). "Regulation of human skin pigmentation and responses to ultraviolet radiation." Pigment Cell Res **20**(1): 2-13.
- Morris, J. R. and E. Solomon (2004). "BRCA1 : BARD1 induces the formation of conjugated ubiquitin structures, dependent on K6 of ubiquitin, in cells during DNA replication and repair." Human molecular genetics **13**(8): 807-817.
- Moschos, S. J., R. J. Sullivan, W. J. Hwu, R. K. Ramanathan, A. A. Adjei, P. C. Fong, et al. K. T. Flaherty (2018). "Development of MK-8353, an orally administered ERK1/2 inhibitor, in patients with advanced solid tumors." JCI insight **3**(4).

- Mueller, T. D. and J. Feigon (2003). "Structural determinants for the binding of ubiquitin-like domains to the proteasome." The EMBO journal **22**(18): 4634-4645.
- Murakami, H. and H. Arnheiter (2005). "Sumoylation modulates transcriptional activity of MITF in a promoter-specific manner." Pigment cell research **18**(4): 265-277.
- Mustachio, L. M., M. Kawakami, Y. Lu, J. Rodriguez-Canales, B. Mino, C. Behrens, et al. E. Dmitrovsky (2017). "The ISG15-specific protease USP18 regulates stability of PTEN." Oncotarget **8**(1): 3-14.
- Nakatsu, F., M. Sakuma, Y. Matsuo, H. Arase, S. Yamasaki, N. Nakamura, et al. H. Ohno (2000). "A Di-leucine signal in the ubiquitin moiety. Possible involvement in ubiquitination-mediated endocytosis." The Journal of biological chemistry **275**(34): 26213-26219.
- Nandi, D., P. Tahiliani, A. Kumar and D. Chandu (2006). "The ubiquitin-proteasome system." Journal of biosciences **31**(1): 137-155.
- Nazarian, R., H. Shi, Q. Wang, X. Kong, R. C. Koya, H. Lee, et al. R. S. Lo (2010). "Melanomas acquire resistance to B-RAF(V600E) inhibition by RTK or N-RAS upregulation." Nature **468**(7326): 973-977.
- Nijman, S. M., M. P. Luna-Vargas, A. Velds, T. R. Brummelkamp, A. M. Dirac, T. K. Sixma and R. Bernards (2005). "A genomic and functional inventory of deubiquitinating enzymes." Cell **123**(5): 773-786.
- Nikulenkov, F., C. Spinnler, H. Li, C. Tonelli, Y. Shi, M. Turunen, et al. G. Selivanova (2012). "Insights into p53 transcriptional function via genome-wide chromatin occupancy and gene expression analysis." Cell death and differentiation **19**(12): 1992-2002.
- Nissan, M. H., C. A. Pratilas, A. M. Jones, R. Ramirez, H. Won, C. Liu, et al. D. B. Solit (2014). "Loss of NF1 in Cutaneous Melanoma Is Associated with RAS Activation and MEK Dependence." Cancer Research **74**(8): 2340-2350.
- Noonan, F. P., M. R. Zaidi, A. Wolnicka-Glubisz, M. R. Anver, J. Bahn, A. Wielgus, et al. E. C. De Fabo (2012). "Melanoma induction by ultraviolet A but not ultraviolet B radiation requires melanin pigment." Nat Commun **3**: 884.
- Ohsie, S. J., G. P. Sarantopoulos, A. J. Cochran and S. W. Binder (2008). "Immunohistochemical characteristics of melanoma." Journal of cutaneous pathology **35**(5): 433-444.
- Olson, M. F. and R. Marais (2000). "Ras protein signalling." Seminars in immunology **12**(1): 63-73.
- Paget, S. (1889). "The distribution of secondary growths in cancer of the breast. 1889." Cancer metastasis reviews **8**(2): 98-101.
- Paraiso, K. H., I. V. Fedorenko, L. P. Cantini, A. C. Munko, M. Hall, V. K. Sondak, et al. K. S. Smalley (2010). "Recovery of phospho-ERK activity allows melanoma cells to escape from BRAF inhibitor therapy." British journal of cancer **102**(12): 1724-1730.
- Passeron, T., F. Mantoux and J. P. Ortonne (2005). "Genetic disorders of pigmentation." Clin Dermatol **23**(1): 56-67.

- Patel, J. K., M. S. Didolkar, J. W. Pickren and R. H. Moore (1978). "Metastatic pattern of malignant melanoma. A study of 216 autopsy cases." American journal of surgery **135**(6): 807-810.
- Pathare, G. R., I. Nagy, P. Sledz, D. J. Anderson, H. J. Zhou, E. Pardon, et al. W. Baumeister (2014). "Crystal structure of the proteasomal deubiquitylation module Rpn8-Rpn11." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **111**(8): 2984-2989.
- Paulus, A., S. Akhtar, T. R. Caulfield, K. Samuel, H. Yousaf, Y. Bashir, et al. A. Chanan-Khan (2016). "Coinhibition of the deubiquitinating enzymes, USP14 and UCHL5, with VLX1570 is lethal to ibrutinib- or bortezomib-resistant Waldenstrom macroglobulinemia tumor cells." Blood Cancer J **6**(11): e492.
- Pavey, S., P. Johansson, L. Packer, J. Taylor, M. Stark, P. M. Pollock, et al. N. K. Hayward (2004). "Microarray expression profiling in melanoma reveals a BRAF mutation signature." Oncogene **23**(23): 4060-4067.
- Peinado, H., M. Aleckovic, S. Lavotshkin, I. Matei, B. Costa-Silva, G. Moreno-Bueno, et al. D. Lyden (2012). "Melanoma exosomes educate bone marrow progenitor cells toward a pro-metastatic phenotype through MET." Nat Med **18**(6): 883-891.
- Peinado, H., S. Lavotshkin and D. Lyden (2011). "The secreted factors responsible for pre-metastatic niche formation: old sayings and new thoughts." Seminars in cancer biology **21**(2): 139-146.
- Pelzer, C., I. Kassner, K. Matentzoglou, R. K. Singh, H. P. Wollscheid, M. Scheffner, et al. M. Groettrup (2007). "UBE1L2, a novel E1 enzyme specific for ubiquitin." The Journal of biological chemistry **282**(32): 23010-23014.
- Perez, C., J. Li, F. Parlati, M. Rouffet, Y. Ma, A. L. Mackinnon, et al. S. M. Cohen (2017). "Discovery of an Inhibitor of the Proteasome Subunit Rpn11." J Med Chem **60**(4): 1343-1361.
- Peth, A., H. C. Besche and A. L. Goldberg (2009). "Ubiquitinated proteins activate the proteasome by binding to Usp14/Ubp6, which causes 20S gate opening." Molecular cell **36**(5): 794-804.
- Petti, C., A. Molla, C. Vegetti, S. Ferrone, A. Anichini and M. Sensi (2006). "Coexpression of NRASQ61R and BRAFV600E in human melanoma cells activates senescence and increases susceptibility to cell-mediated cytotoxicity." Cancer Research **66**(13): 6503-6511.
- Piao, S., H. Z. Pei, B. Huang and S. H. Baek (2017). "Ovarian tumor domain-containing protein 1 deubiquitinates and stabilizes p53." Cell Signal **33**: 22-29.
- Pickart, C. M. and D. Fushman (2004). "Polyubiquitin chains: polymeric protein signals." Current opinion in chemical biology **8**(6): 610-616.
- Pickup, M. W., J. K. Mouw and V. M. Weaver (2014). "The extracellular matrix modulates the hallmarks of cancer." EMBO reports **15**(12): 1243-1253.
- Pinto-Fernandez, A. and B. M. Kessler (2016). "DUBbing Cancer: Deubiquitylating Enzymes Involved in Epigenetics, DNA Damage and the Cell Cycle As Therapeutic Targets." Front Genet **7**: 133.
- Platz, A., S. Egyhazi, U. Ringborg and J. Hansson (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.

- Pleasance, E. D., R. K. Cheetham, P. J. Stephens, D. J. McBride, S. J. Humphray, C. D. Greenman, et al. M. R. Stratton (2010). "A comprehensive catalogue of somatic mutations from a human cancer genome." Nature **463**(7278): 191-196.
- Plonka, P. M., T. Passeron, M. Brenner, D. J. Tobin, S. Shibahara, A. Thomas, et al. K. U. Schallreuter (2009). "What are melanocytes really doing all day long...?" Experimental dermatology **18**(9): 799-819.
- Pol, J., E. Vacchelli, F. Aranda, F. Castoldi, A. Eggermont, I. Cremer, et al. L. Galluzzi (2015). "Trial Watch: Immunogenic cell death inducers for anticancer chemotherapy." Oncoimmunology **4**(4): e1008866.
- Pollock, P. M., U. L. Harper, K. S. Hansen, L. M. Yudt, M. Stark, C. M. Robbins, et al. P. S. Meltzer (2003). "High frequency of BRAF mutations in nevi." Nature genetics **33**(1): 19-20.
- Potu, H., L. F. Peterson, M. Kandarpa, A. Pal, H. Sun, A. Durham, et al. N. J. Donato (2017). "Usp9x regulates Ets-1 ubiquitination and stability to control NRAS expression and tumorigenicity in melanoma." Nat Commun **8**: 14449.
- Potu, H., L. F. Peterson, A. Pal, M. Verhaegen, J. Cao, M. Talpaz and N. J. Donato (2014). "Usp5 links suppression of p53 and FAS levels in melanoma to the BRAF pathway." Oncotarget **5**(14): 5559-5569.
- Poulikakos, P. I., Y. Persaud, M. Janakiraman, X. Kong, C. Ng, G. Moriceau, et al. D. B. Solit (2011). "RAF inhibitor resistance is mediated by dimerization of aberrantly spliced BRAF(V600E)." Nature **480**(7377): 387-390.
- Prost-Squarcioni, C., S. Freitag, M. Heller and N. Boehm (2008). "[Functional histology of dermis]." Ann Dermatol Venereol **135**(1 Pt 2): 1S5-20.
- Puente, X. S. and C. Lopez-Otin (2004). "A genomic analysis of rat proteases and protease inhibitors." Genome Res **14**(4): 609-622.
- Quail, D. F. and J. A. Joyce (2013). "Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis." Nature medicine **19**(11): 1423-1437.
- Read, J., K. A. Wadt and N. K. Hayward (2016). "Melanoma genetics." Journal of medical genetics **53**(1): 1-14.
- Redman, J. M., G. T. Gibney and M. B. Atkins (2016). "Advances in immunotherapy for melanoma." BMC medicine **14**: 20.
- Ridley, A. J., J. R. Whiteside, T. J. McMillan and S. L. Allinson (2009). "Cellular and sub-cellular responses to UVA in relation to carcinogenesis." Int J Radiat Biol **85**(3): 177-195.
- Rivera-Gonzalez, G., B. Shook and V. Horsley (2014). "Adipocytes in skin health and disease." Cold Spring Harbor perspectives in medicine **4**(3).
- Robert, C., B. Karaszewska, J. Schachter, P. Rutkowski, A. Mackiewicz, D. Stroiakovski, et al. D. Schadendorf (2015). "Improved overall survival in melanoma with combined dabrafenib and trametinib." The New England journal of medicine **372**(1): 30-39.

- Robert, C., J. Schachter, G. V. Long, A. Arance, J. J. Grob, L. Mortier, et al. A. Ribas (2015). "Pembrolizumab versus Ipilimumab in Advanced Melanoma." The New England journal of medicine **372**(26): 2521-2532.
- Robert, G., C. Gaggioli, O. Bailet, C. Chavey, P. Abbe, E. Aberdam, et al. S. Tartare-Deckert (2006). "SPARC represses E-cadherin and induces mesenchymal transition during melanoma development." Cancer Research **66**(15): 7516-7523.
- Rock, K. L., C. Gramm, L. Rothstein, K. Clark, R. Stein, L. Dick, et al. A. L. Goldberg (1994). "Inhibitors of the proteasome block the degradation of most cell proteins and the generation of peptides presented on MHC class I molecules." Cell **78**(5): 761-771.
- Romagosa, C., S. Simonetti, L. Lopez-Vicente, A. Mazo, M. E. Leonart, J. Castellvi and S. Ramon y Cajal (2011). "p16(Ink4a) overexpression in cancer: a tumor suppressor gene associated with senescence and high-grade tumors." Oncogene **30**(18): 2087-2097.
- Ruiter, D., T. Bogenrieder, D. Elder and M. Herlyn (2002). "Melanoma-stroma interactions: structural and functional aspects." The Lancet. Oncology **3**(1): 35-43.
- Sahtoe, D. D. and T. K. Sixma (2015). "Layers of DUB regulation." Trends in biochemical sciences **40**(8): 456-467.
- Saran, A., M. Spinola, S. Pazzaglia, B. Peissel, C. Tiveron, L. Tatangelo, et al. T. A. Dragani (2004). "Loss of tyrosinase activity confers increased skin tumor susceptibility in mice." Oncogene **23**(23): 4130-4135.
- Sarhan, D., E. Wennerberg, P. D'Arcy, D. Gurajada, S. Linder and A. Lundqvist (2013). "A novel inhibitor of proteasome deubiquitinating activity renders tumor cells sensitive to TRAIL-mediated apoptosis by natural killer cells and T cells." Cancer Immunol Immunother **62**(8): 1359-1368.
- Sato, Y., A. Yoshikawa, A. Yamagata, H. Mimura, M. Yamashita, K. Ookata, et al. S. Fukai (2008). "Structural basis for specific cleavage of Lys 63-linked polyubiquitin chains." Nature **455**(7211): 358-362.
- Schmitt, D. (2005). La cellule de Langerhans en 2004. Keratin, Editions PRIVAT. **9** : **4-12** / : 9.
- Schulman, B. A. and J. W. Harper (2009). "Ubiquitin-like protein activation by E1 enzymes: the apex for downstream signalling pathways." Nature reviews. Molecular cell biology **10**(5): 319-331.
- Schwarz, T., C. Sohn, B. Kaiser, E. D. Jensen and K. C. Mansky (2010). "The 19S proteasomal lid subunit POH1 enhances the transcriptional activation by Mitf in osteoclasts." J Cell Biochem **109**(5): 967-974.
- Scolyer, R. A., G. V. Long and J. F. Thompson (2011). "Evolving concepts in melanoma classification and their relevance to multidisciplinary melanoma patient care." Mol Oncol **5**(2): 124-136.
- Sekiya, T., M. Fushimi, H. Hori, S. Hirohashi, S. Nishimura and T. Sugimura (1984). "Molecular cloning and the total nucleotide sequence of the human c-Ha-ras-1 gene activated in a melanoma from a Japanese patient." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **81**(15): 4771-4775.

- Seneschal, J., R. A. Clark, A. Gehad, C. M. Baecher-Allan and T. S. Kupper (2012). "Human epidermal Langerhans cells maintain immune homeostasis in skin by activating skin resident regulatory T cells." Immunity **36**(5): 873-884.
- Sensi, M., G. Nicolini, C. Petti, I. Bersani, F. Lozupone, A. Molla, et al. A. Anichini (2006). "Mutually exclusive NRASQ61R and BRAFV600E mutations at the single-cell level in the same human melanoma." Oncogene **25**(24): 3357-3364.
- Serrano, M. (1997). "The tumor suppressor protein p16INK4a." Experimental cell research **237**(1): 7-13.
- Serrano, M., A. W. Lin, M. E. McCurrach, D. Beach and S. W. Lowe (1997). "Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a." Cell **88**(5): 593-602.
- Shain, A. H. and B. C. Bastian (2016). "From melanocytes to melanomas." nature reviews Cancer **16**(6): 345.
- Shain, A. H. and B. C. Bastian (2016). "From melanocytes to melanomas." Nature reviews. Cancer **16**(6): 345-358.
- Shain, A. H., I. Yeh, I. Kovalyshyn, A. Sriharan, E. Talevich, A. Gagnon, et al. B. C. Bastian (2015). "The Genetic Evolution of Melanoma from Precursor Lesions." The New England journal of medicine **373**(20): 1926-1936.
- Shi, H., G. Moriceau, X. Kong, M. K. Lee, H. Lee, R. C. Koya, et al. R. S. Lo (2012). "Melanoma whole-exome sequencing identifies (V600E)B-RAF amplification-mediated acquired B-RAF inhibitor resistance." Nat Commun **3**: 724.
- Shi, K., J. Z. Zhang, R. L. Zhao, L. Yang and D. Guo (2018). "PSMD7 downregulation induces apoptosis and suppresses tumorigenesis of esophageal squamous cell carcinoma via the mTOR/p70S6K pathway." FEBS Open Bio **8**(4): 533-543.
- Shih, I. M. and M. Herlyn (1993). "Role of growth factors and their receptors in the development and progression of melanoma." The Journal of investigative dermatology **100**(2 Suppl): 196S-203S.
- Shinji, S., Z. Naito, S. Ishiwata, T. Ishiwata, N. Tanaka, K. Furukawa, et al. T. Tajiri (2006). "Ubiquitin-specific protease 14 expression in colorectal cancer is associated with liver and lymph node metastases." Oncol Rep **15**(3): 539-543.
- Shitara, D., M. M. Nascimento, S. Puig, S. Yamada, M. M. Enokihara, N. Michalany and E. Bagatin (2014). "Nevus-associated melanomas: clinicopathologic features." American journal of clinical pathology **142**(4): 485-491.
- Sims, J. J. and R. E. Cohen (2009). "Linkage-specific avidity defines the lysine 63-linked polyubiquitin-binding preference of rap80." Molecular cell **33**(6): 775-783.
- Slominski, A., D. J. Tobin, S. Shibahara and J. Wortsman (2004). "Melanin pigmentation in mammalian skin and its hormonal regulation." Physiol Rev **84**(4): 1155-1228.
- Song, Y., S. Li, A. Ray, D. S. Das, J. Qi, M. K. Samur, et al. K. C. Anderson (2017). "Blockade of deubiquitylating enzyme Rpn11 triggers apoptosis in multiple myeloma cells and overcomes bortezomib resistance." Oncogene **36**(40): 5631-5638.

- Soucy, T. A., L. R. Dick, P. G. Smith, M. A. Milhollen and J. E. Brownell (2010). "The NEDD8 Conjugation Pathway and Its Relevance in Cancer Biology and Therapy." Genes & cancer **1**(7): 708-716.
- Sowa, M. E., E. J. Bennett, S. P. Gygi and J. W. Harper (2009). "Defining the human deubiquitinating enzyme interaction landscape." Cell **138**(2): 389-403.
- Spisek, R., A. Charalambous, A. Mazumder, D. H. Vesole, S. Jagannath and M. V. Dhodapkar (2007). "Bortezomib enhances dendritic cell (DC)-mediated induction of immunity to human myeloma via exposure of cell surface heat shock protein 90 on dying tumor cells: therapeutic implications." Blood **109**(11): 4839-4845.
- Spratt, D. E., H. Walden and G. S. Shaw (2014). "RBR E3 ubiquitin ligases: new structures, new insights, new questions." The Biochemical journal **458**(3): 421-437.
- Stadtmueller, B. M. and C. P. Hill (2011). "Proteasome activators." Molecular cell **41**(1): 8-19.
- Stahl, J. M., A. Sharma, M. Cheung, M. Zimmerman, J. Q. Cheng, M. W. Bosenberg, et al. G. P. Robertson (2004). "Deregulated Akt3 activity promotes development of malignant melanoma." Cancer Research **64**(19): 7002-7010.
- Straussman, R., T. Morikawa, K. Shee, M. Barzily-Rokni, Z. R. Qian, J. Du, et al. T. R. Golub (2012). "Tumour micro-environment elicits innate resistance to RAF inhibitors through HGF secretion." Nature **487**(7408): 500-504.
- Sullivan, R. J., J. R. Infante, F. Janku, D. J. L. Wong, J. A. Sosman, V. Keedy, et al. B. T. Li (2018). "First-in-Class ERK1/2 Inhibitor Ulixertinib (BVD-523) in Patients with MAPK Mutant Advanced Solid Tumors: Results of a Phase I Dose-Escalation and Expansion Study." Cancer discovery **8**(2): 184-195.
- Sun, L. and Z. J. Chen (2004). "The novel functions of ubiquitination in signaling." Current opinion in cell biology **16**(2): 119-126.
- Suresh, B., J. Lee, H. Kim and S. Ramakrishna (2016). "Regulation of pluripotency and differentiation by deubiquitinating enzymes." Cell death and differentiation **23**(8): 1257-1264.
- Tanaka, K. (2009). "The proteasome: overview of structure and functions." Proceedings of the Japan Academy. Series B, Physical and biological sciences **85**(1): 12-36.
- Tang, Y., M. Bhandaru, Y. Cheng, J. Lu, G. Li and C. J. Ong (2015). "The role of the metastasis suppressor gene KAI1 in melanoma angiogenesis." Pigment Cell Melanoma Res **28**(6): 696-706.
- Thrower, J. S., L. Hoffman, M. Rechsteiner and C. M. Pickart (2000). "Recognition of the polyubiquitin proteolytic signal." The EMBO journal **19**(1): 94-102.
- Tian, Z., P. D'Arcy, X. Wang, A. Ray, Y. T. Tai, Y. Hu, et al. K. C. Anderson (2014). "A novel small molecule inhibitor of deubiquitylating enzyme USP14 and UCHL5 induces apoptosis in multiple myeloma and overcomes bortezomib resistance." Blood **123**(5): 706-716.
- Tichet, M., V. Prod'Homme, N. Fenouille, D. Ambrosetti, A. Mallavialle, M. Cerezo, et al. S. Tartare-Deckert (2015). "Tumour-derived SPARC drives vascular permeability and extravasation through endothelial VCAM1 signalling to promote metastasis." Nature Communications **6**: 6993.

- Tilghman, R. W., C. R. Cowan, J. D. Mih, Y. Koryakina, D. Gioeli, J. K. Slack-Davis, et al. J. T. Parsons (2010). "Matrix rigidity regulates cancer cell growth and cellular phenotype." *PloS one* **5**(9): e12905.
- Tokunaga, F., S. Sakata, Y. Saeki, Y. Satomi, T. Kirisako, K. Kamei, et al. K. Iwai (2009). "Involvement of linear polyubiquitylation of NEMO in NF-kappaB activation." *Nature cell biology* **11**(2): 123-132.
- Trahey, M., R. J. Milley, G. E. Cole, M. Innis, H. Paterson, C. J. Marshall, et al. F. McCormick (1987). "Biochemical and biological properties of the human N-ras p21 protein." *Molecular and cellular biology* **7**(1): 541-544.
- Tschandl, P., A. S. Berghoff, M. Preusser, S. Burgstaller-Muehlbacher, H. Pehamberger, I. Okamoto and H. Kittler (2013). "NRAS and BRAF mutations in melanoma-associated nevi and uninvolved nevi." *PloS one* **8**(7): e69639.
- Tsvetkov, L. M., K. H. Yeh, S. J. Lee, H. Sun and H. Zhang (1999). "p27(Kip1) ubiquitination and degradation is regulated by the SCF(Skp2) complex through phosphorylated Thr187 in p27." *Current biology* : **CB** **9**(12): 661-664.
- Uckelmann, M. and T. K. Sixma (2017). "Histone ubiquitination in the DNA damage response." *DNA repair* **56**: 92-101.
- Vajdic, C. M. and M. T. van Leeuwen (2009). "Cancer incidence and risk factors after solid organ transplantation." *International journal of cancer* **125**(8): 1747-1754.
- van der Leest, R. J., S. C. Flohil, L. R. Arends, E. de Vries and T. Nijsten (2015). "Risk of subsequent cutaneous malignancy in patients with prior melanoma: a systematic review and meta-analysis." *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology* : **JEADV** **29**(6): 1053-1062.
- van der Veen, A. G. and H. L. Ploegh (2012). "Ubiquitin-like proteins." *Annual review of biochemistry* **81**: 323-357.
- Vander Linden, R. T., C. W. Hemmis, B. Schmitt, A. Ndoja, F. G. Whitby, H. Robinson, et al. C. P. Hill (2015). "Structural basis for the activation and inhibition of the UCH37 deubiquitylase." *Molecular cell* **57**(5): 901-911.
- Ventii, K. H. and K. D. Wilkinson (2008). "Protein partners of deubiquitinating enzymes." *The Biochemical journal* **414**(2): 161-175.
- Verma, R., L. Aravind, R. Oania, W. H. McDonald, J. R. Yates, 3rd, E. V. Koonin and R. J. Deshaies (2002). "Role of Rpn11 metalloprotease in deubiquitination and degradation by the 26S proteasome." *Science* **298**(5593): 611-615.
- Vigneron, N. and B. J. Van den Eynde (2014). "Proteasome subtypes and regulators in the processing of antigenic peptides presented by class I molecules of the major histocompatibility complex." *Biomolecules* **4**(4): 994-1025.
- Villanueva, J., J. R. Infante, C. Krepler, P. Reyes-Uribe, M. Samanta, H. Y. Chen, et al. K. L. Nathanson (2013). "Concurrent MEK2 mutation and BRAF amplification confer resistance to BRAF and MEK inhibitors in melanoma." *Cell reports* **4**(6): 1090-1099.

- Vinay, D. S., E. P. Ryan, G. Pawelec, W. H. Talib, J. Stagg, E. Elkord, et al. B. S. Kwon (2015). "Immune evasion in cancer: Mechanistic basis and therapeutic strategies." Seminars in cancer biology **35** **Suppl**: S185-S198.
- Vincensi, M. R., M. d'Ischia, A. Napolitano, E. M. Procaccini, G. Riccio, G. Monfrecola, et al. G. Prota (1998). "Phaeomelanin versus eumelanin as a chemical indicator of ultraviolet sensitivity in fair-skinned subjects at high risk for melanoma: a pilot study." Melanoma Res **8**(1): 53-58.
- Vultur, A. and M. Herlyn (2013). "SnapShot: melanoma." Cancer Cell **23**(5): 706-706 e701.
- Wagle, N., C. Emery, M. F. Berger, M. J. Davis, A. Sawyer, P. Pochanard, et al. L. A. Garraway (2011). "Dissecting therapeutic resistance to RAF inhibition in melanoma by tumor genomic profiling." Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology **29**(22): 3085-3096.
- Walter, P. and D. Ron (2011). "The unfolded protein response: from stress pathway to homeostatic regulation." Science **334**(6059): 1081-1086.
- Wang, B., A. Ma, L. Zhang, W. L. Jin, Y. Qian, G. Xu, et al. Y. Liu (2015). "POH1 deubiquitylates and stabilizes E2F1 to promote tumour formation." Nat Commun **6**: 8704.
- Wang, J. X., M. Fukunaga-Kalabis and M. Herlyn (2016). "Crosstalk in skin: melanocytes, keratinocytes, stem cells, and melanoma." Journal of cell communication and signaling **10**(3): 191-196.
- Wang, L., Y. J. Chen, K. Xu, Y. Y. Wang, X. Z. Shen and R. Q. Tu (2014). "High expression of UCH37 is significantly associated with poor prognosis in human epithelial ovarian cancer." Tumour Biol **35**(11): 11427-11433.
- Wang, X., P. D'Arcy, T. R. Caulfield, A. Paulus, K. Chitta, C. Mohanty, et al. S. Linder (2015). "Synthesis and evaluation of derivatives of the proteasome deubiquitinase inhibitor b-AP15." Chem Biol Drug Des **86**(5): 1036-1048.
- Wang, X., M. Mazurkiewicz, E. K. Hillert, M. H. Olofsson, S. Pierrou, P. Hillertz, et al. P. D'Arcy (2016). "The proteasome deubiquitinase inhibitor VLX1570 shows selectivity for ubiquitin-specific protease-14 and induces apoptosis of multiple myeloma cells." Sci Rep **6**: 26979.
- Wang, X., W. Stafford, M. Mazurkiewicz, M. Fryknas, S. Brnjic, X. Zhang, et al. S. Linder (2014). "The 19S Deubiquitinase inhibitor b-AP15 is enriched in cells and elicits rapid commitment to cell death." Mol Pharmacol **85**(6): 932-945.
- Wang, Y., J. Wang, J. Zhong, Y. Deng, Q. Xi, S. He, et al. R. Liu (2015). "Ubiquitin-specific protease 14 (USP14) regulates cellular proliferation and apoptosis in epithelial ovarian cancer." Med Oncol **32**(1): 379.
- Weake, V. M. and J. L. Workman (2008). "Histone ubiquitination: triggering gene activity." Molecular cell **29**(6): 653-663.
- Weber, J. S., S. P. D'Angelo, D. Minor, F. S. Hodi, R. Gutzmer, B. Neyns, et al. J. Larkin (2015). "Nivolumab versus chemotherapy in patients with advanced melanoma who progressed after anti-CTLA-4 treatment (CheckMate 037): a randomised, controlled, open-label, phase 3 trial." The Lancet. Oncology **16**(4): 375-384.

- Wei, R., X. Liu, W. Yu, T. Yang, W. Cai, J. Liu, et al.S. Liu (2015). "Deubiquitinases in cancer." Oncotarget **6**(15): 12872-12889.
- Wellbrock, C., M. Karasarides and R. Marais (2004). "The RAF proteins take centre stage." Nature reviews. Molecular cell biology **5**(11): 875-885.
- Wenzel, D. M. and R. E. Klevit (2012). "Following Ariadne's thread: a new perspective on RBR ubiquitin ligases." BMC biology **10**: 24.
- Whiteman, D. C., M. Stickley, P. Watt, M. C. Hughes, M. B. Davis and A. C. Green (2006). "Anatomic site, sun exposure, and risk of cutaneous melanoma." Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology **24**(19): 3172-3177.
- Wickliffe, K. E., A. Williamson, H. J. Meyer, A. Kelly and M. Rape (2011). "K11-linked ubiquitin chains as novel regulators of cell division." Trends in cell biology **21**(11): 656-663.
- Wiener, R., A. T. DiBello, P. M. Lombardi, C. M. Guzzo, X. Zhang, M. J. Matunis and C. Wolberger (2013). "E2 ubiquitin-conjugating enzymes regulate the deubiquitinating activity of OTUB1." Nature structural & molecular biology **20**(9): 1033-1039.
- Wiesner, T., A. C. Obenauf, R. Murali, I. Fried, K. G. Griewank, P. Ulz, et al.M. R. Speicher (2011). "Germline mutations in BAP1 predispose to melanocytic tumors." Nature genetics **43**(10): 1018-1021.
- Wilk, S., W. E. Chen and R. P. Magnusson (2000). "Properties of the nuclear proteasome activator PA28gamma (REGgamma)." Archives of biochemistry and biophysics **383**(2): 265-271.
- Wu, H., V. Goel and F. G. Haluska (2003). "PTEN signaling pathways in melanoma." Oncogene **22**(20): 3113-3122.
- Wu, N., C. Liu, C. Bai, Y. P. Han, W. C. Cho and Q. Li (2013). "Over-expression of deubiquitinating enzyme USP14 in lung adenocarcinoma promotes proliferation through the accumulation of beta-catenin." Int J Mol Sci **14**(6): 10749-10760.
- Xu, D., B. Shan, B. H. Lee, K. Zhu, T. Zhang, H. Sun, et al.J. Yuan (2015). "Phosphorylation and activation of ubiquitin-specific protease-14 by Akt regulates the ubiquitin-proteasome system." Elife **4**: e10510.
- Xu, P., D. M. Duong, N. T. Seyfried, D. Cheng, Y. Xie, J. Robert, et al.J. Peng (2009). "Quantitative proteomics reveals the function of unconventional ubiquitin chains in proteasomal degradation." Cell **137**(1): 133-145.
- Yan, S., B. M. Holderness, Z. Li, G. D. Seidel, J. Gui, J. L. Fisher and M. S. Ernstoff (2016). "Epithelial-Mesenchymal Expression Phenotype of Primary Melanoma and Matched Metastases and Relationship with Overall Survival." Anticancer research **36**(12): 6449-6456.
- Yan Song, A. R., Deepika Sharma DAS, Dharminder Chauhan and Kenneth C Anderson (2015). Targeting 19S-Proteasome Deubiquitinase Rpn11/POH1/PSMD14 in Multiple Myeloma. Blood. **126**: 1811.
- Yang, A. S. and P. B. Chapman (2009). "The history and future of chemotherapy for melanoma." Hematology/oncology clinics of North America **23**(3): 583-597, x.

- Yang, H., B. Higgins, K. Kolinsky, K. Packman, Z. Go, R. Iyer, et al. F. Su (2010). "RG7204 (PLX4032), a selective BRAFV600E inhibitor, displays potent antitumor activity in preclinical melanoma models." Cancer Research **70**(13): 5518-5527.
- Yao, T. and R. E. Cohen (2002). "A cryptic protease couples deubiquitination and degradation by the proteasome." Nature **419**(6905): 403-407.
- Ye, Y., M. Akutsu, F. Reyes-Turcu, R. I. Enchev, K. D. Wilkinson and D. Komander (2011). "Polyubiquitin binding and cross-reactivity in the USP domain deubiquitinase USP21." EMBO reports **12**(4): 350-357.
- Ye, Y. and M. Rape (2009). "Building ubiquitin chains: E2 enzymes at work." Nature reviews. Molecular cell biology **10**(11): 755-764.
- Yoon, S. and R. Seger (2006). "The extracellular signal-regulated kinase: multiple substrates regulate diverse cellular functions." Growth factors **24**(1): 21-44.
- Yuan, W. C., Y. R. Lee, S. Y. Lin, L. Y. Chang, Y. P. Tan, C. C. Hung, et al. R. H. Chen (2014). "K33-Linked Polyubiquitination of Coronin 7 by Cul3-KLHL20 Ubiquitin E3 Ligase Regulates Protein Trafficking." Molecular cell **54**(4): 586-600.
- Zalaudek, I., K. Schmid, A. A. Marghoob, A. Scope, M. Manzo, E. Moscarella, et al. G. Argenziano (2011). "Frequency of dermoscopic nevus subtypes by age and body site: a cross-sectional study." Archives of dermatology **147**(6): 663-670.
- Zhang, J., D. Zhang and L. Sun (2017). "Knockdown of Ubiquitin-Specific Protease 14 (USP14) Inhibits the Proliferation and Tumorigenesis in Esophageal Squamous Cell Carcinoma Cells." Oncol Res **25**(2): 249-257.
- Zhang, Y., P. Kwok-Shing Ng, M. Kucherlapati, F. Chen, Y. Liu, Y. H. Tsang, et al. C. J. Creighton (2017). "A Pan-Cancer Proteogenomic Atlas of PI3K/AKT/mTOR Pathway Alterations." Cancer Cell **31**(6): 820-832 e823.
- Zhao, X., B. Fiske, A. Kawakami, J. Li and D. E. Fisher (2011). "Regulation of MITF stability by the USP13 deubiquitinase." Nat Commun **2**: 414.
- Zhu, L., S. Yang, S. He, F. Qiang, J. Cai, R. Liu, et al. Y. Wang (2016). "Downregulation of ubiquitin-specific protease 14 (USP14) inhibits breast cancer cell proliferation and metastasis, but promotes apoptosis." J Mol Histo **47**(1): 69-80.
- Zhu, R., Y. Liu, H. Zhou, L. Li, Y. Li, F. Ding, et al. Z. Liu (2018). "Deubiquitinating enzyme PSMD14 promotes tumor metastasis through stabilizing SNAIL in human esophageal squamous cell carcinoma." Cancer Lett **418**: 125-134.
- Zhu, Y., C. Zhang, C. Gu, Q. Li and N. Wu (2016). "Function of Deubiquitinating Enzyme USP14 as Oncogene in Different Types of Cancer." Cell Physiol Biochem **38**(3): 993-1002.
- Zou, Q., J. Jin, H. Hu, H. S. Li, S. Romano, Y. Xiao, et al. S. C. Sun (2014). "USP15 stabilizes MDM2 to mediate cancer-cell survival and inhibit antitumor T cell responses." Nat Immunol **15**(6): 562-570.

Annexes

Annexe 1

Zangari J, Ilie M, Rouaud F, Signetti L, Ohanna M, Didier R, Roméo B, Goldoni D, Nottet N, Staedel C, Gal J, Mari B, Mograbi B, Hofman P, and Brest P. **Rapid decay of engulfed extracellular miRNA by XRN1 exonuclease promotes transient epithelial-mesenchymal transition.** Nucleic Acids Res. 2016 Dec 19. PMID: 27994032.

Rapid decay of engulfed extracellular miRNA by XRN1 exonuclease promotes transient epithelial-mesenchymal transition

Joséphine Zangari¹, Marius Ilie^{1,2}, Florian Rouaud³, Laurie Signetti¹, Mickaël Ohanna³, Robin Didier³, Barnabé Roméo¹, Dana Goldoni¹, Nicolas Nottet⁴, Cathy Staedel⁵, Jocelyn Gal⁶, Bernard Mari⁴, Baharia Mograbi^{1,*}, Paul Hofman^{1,2,*} and Patrick Brest^{1,*}

¹Université Côte d'Azur, CNRS, INSERM, IRCAN, FHU-OncoAge, 06107 Nice France, ²Université Côte d'Azur, CHU-Nice, Hospital-related Biobank (BB-0033-00025), FHU-OncoAge, 06000 Nice, France, ³Université Côte d'Azur, INSERM, C3M, 06200 Nice, France, ⁴Université Côte d'Azur, CNRS, INSERM, IPMC, FHU-OncoAge, 06560 Valbonne, France, ⁵Université de Bordeaux, INSERM, ARNA, 33076 Bordeaux, France and ⁶Antoine Lacassagne Cancer Center, Epidemiology and Biostatistics Unit, 06189 Nice, France

Received September 05, 2016; Revised November 28, 2016; Editorial Decision December 08, 2016; Accepted December 13, 2016

ABSTRACT

Extracellular vesicles (EVs) have been shown to play an important role in intercellular communication as carriers of DNA, RNA and proteins. While the intercellular transfer of miRNA through EVs has been extensively studied, the stability of extracellular miRNA (ex-miRNA) once engulfed by a recipient cell remains to be determined. Here, we identify the ex-miRNA-directed phenotype to be transient due to the rapid decay of ex-miRNA. We demonstrate that the ex-miR-223-3p transferred from polymorphonuclear leukocytes to cancer cells were functional, as demonstrated by the decreased expression of its target FOXO1 and the occurrence of epithelial-mesenchymal transition reprogramming. We showed that the engulfed ex-miRNA, unlike endogenous miRNA, was unstable, enabling dynamic regulation and a return to a non-invasive phenotype within 8 h. This transient phenotype could be modulated by targeting XRN1/PACMAN exonuclease. Indeed, its silencing was associated with slower decay of ex-miR-223-3p and subsequently prolonged the invasive properties. In conclusion, we showed that the 'steady step' level of engulfed miRNA and its subsequent activity was dependent on the presence of a donor cell in the surroundings to constantly fuel the recipient cell with ex-miRNAs and of XRN1 exonuclease, which is involved in the decay of these imported miRNA.

INTRODUCTION

Extracellular vesicles (EVs), including exosomes, microvesicles, ectosomes, microparticles, are small, lipid bilayer membrane vesicles that are secreted by all cell types and are found in all biological fluids (1). Initially discovered as garbage bags for removal of unneeded material from cells, EVs are now recognized as major players in intercellular communication. EVs contain and shuttle bioactive molecules including DNA, mRNA as well as non-coding microRNAs (miRNAs) from one cell to another, leading to the reprogramming of the recipient cells (2,3). This genetic transfer is particularly important in cancer where the level of circulating miRNAs is dramatically increased in the blood of patients and correlated with tumor progression (4). It is now well appreciated that tumor-derived exosomes can hijack surrounding endothelial cells to support tumor angiogenesis, create an immunosuppressive microenvironment and mobilize polymorphonuclear leukocyte neutrophils (PMN) and stromal cells to promote a tumor niche. Although critical for therapeutic intervention, the exact mechanisms mediating the roles of EVs in cancer have not yet been fully elucidated. Because of their involvement in promoting disease progression, it is currently proposed that the uptake of EVs may induce persistent modulation of recipient cells (5).

Among the EV bioactive cargoes, miRNAs are an important component of gene regulation, eliciting either decay or translational repression of target mRNAs (6). With the potential to regulate more than 30% of human genes, miRNAs are critical in biology and particularly in every step of tumor development from initiation, progression, to

* To whom correspondence should be addressed. Tel: +33 4 92 03 12 45; Fax: +33 4 93 37 76 76; Email: brest@unice.fr
Correspondence may also be addressed to Prof. Paul Hofman. Tel: +33 4 92 03 87 49; Fax: +33 4 93 37 76 76; Email: hofman.p@chu-nice.fr
Correspondence may also be addressed to Dr. Baharia Mograbi. Tel: +33 4 92 03 12 43; Fax: +33 4 93 37 76 76; Email: mograbi@unice.fr

metastasis, behaving either as tumor suppressors or oncogenic miRNAs (7). Control of these master regulators thus represents a fundamental aspect of gene regulation. While mechanisms of miRNA upregulation and processing have been well documented, little is known about how miRNAs are downregulated, a necessary facet of dynamic expression. Compelling studies have shown that miRNAs are highly stable in most cell types, with a half-life ranging from 28 to 220 h (8,9). Similarly to endogenous miRNA, ex-miRNA trapped within circulating EVs show remarkable stability (10). Based on these features, it has been postulated but not yet proven that ex-miRNA once engulfed into surrounding cells, are able to promote persistent pro-tumoral activities.

Nevertheless, this concept, i.e. stability of ex-miRNA, does not explain the dynamic cell plasticity observed during development and in human malignancies. To better define the function of ex-miRNA we decided to focus our attention on metastasis, a spatio-temporal process in which cancer cells undergo epithelial-mesenchymal transition (EMT) and its reversal, mesenchymal-epithelial transition (MET), as these cells escape from the primary tumor and take seed in a secondary organ (11,12). Recapitulating the driving role of inflammation in metastasis (13), we provide here the first evidence that the invasive properties of tumor cells are dependent on the secretion of EVs by PMN. MiRNA-223-3p enriched in PMN-derived exosomes activated in tumor cancer cells an EMT program that was reversed upon removal of inflammatory cells. One of molecular mechanisms underlying this transient tumor cell re-programming stems from the previously unrecognized instability of EV-derived miRNA mediated by the exonuclease XRN1. These results clearly provide new insight into the intricate cell communication occurring in the tumor micro-environment and into the emerging role of ex-miRNA in disease progression.

MATERIALS AND METHODS

Cell culture

The A549, NCI-H1975, NCI-H1299, SK-LU-1 and HeLa cells were cultured according to the recommendations of the ATCC. A549 (human lung adenocarcinoma epithelial cell line, ATCC, number CCL-185), NCI-H441 (human lung adenocarcinoma epithelial cell line, ATCC, HTB-174) and HeLa (human cervical adenocarcinoma epithelial cell line, ATCC, number CCL-2) cells were grown in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), 50 U/ml penicillin and 50 µg/ml streptomycin (Life Technologies). PLB-985 (human myeloid cell line HL-60 subclone prone to PMN differentiation, gift from Pr Sylvie Chollet-Martin, Paris, France), NCI-H1975 (human lung adenocarcinoma epithelial cell line, ATCC, number CRL-5908) and NCI-H1299 (human lung carcinoma epithelial cell line, ATCC, number CRL-5803) cells were grown in RPMI-1640 supplemented with 10% FBS, 1 mM sodium pyruvate, 50 U/ml penicillin and 50 µg/ml streptomycin (Thermo Fisher Scientific). SK-LU-1 (human lung adenocarcinoma epithelial cell line, ATCC, number HTB-57) cells were grown in Minimum Essential Media supplemented with 10% FBS, 1 mM sodium pyruvate, 100 µM MEM Non-Essential Amino Acids, 50 U/ml penicillin and 50 µg/ml streptomycin (Life

Technologies). All the cells were maintained for <25 passages at 37°C in a 5% CO₂ and humidified atmosphere. All cell lines were authenticated after the first amplification or subcloning (here, stable miR-223-3p clone selection) by determining the genetic characteristics using polymerase chain reaction (PCR)-single-locus-technology (Promega, PowerPlex 21 PCR Kit) and certified (Eurofins, Eurofins Genomics, Ebersberg, Germany). Testing for mycoplasma contamination was performed monthly using Plasmotest™-Mycoplasma Detection Kit (Invivogen).

Patient recruitment and PMN isolation

After approval by the local Ethics Committees (Nice University Hospital Center), written informed consent was obtained from all participants (healthy volunteers), after explaining the nature of the study. The study was performed according to the guidelines of the Declaration of Helsinki.

Human PMN were extracted from whole blood of healthy donors by Ficoll gradient centrifugation to remove peripheral blood mononuclear cells followed by gelatin sedimentation to remove red blood cells. Residual red blood cells were then lysed with isotonic ammonium chloride solution. After washing in Hanks' balanced saline solution without Ca²⁺ or Mg²⁺, the cells were counted and resuspended at 5.10⁷ PMN/ml. PMN (95% pure) with 98% viability (assessed by trypan blue exclusion) were used within 1 h after isolation.

Reagents actinomycin D treatment. Cells were treated with actinomycin D (Act. D), to block RNA transcription, at 10 µg/ml. At indicated times, cells were lysed for miRNA analysis as described below. The activity of actinomycin D was confirmed by a decrease in *MYC* and the stability of *GADPH* mRNA as previously described (10). For miRNA analysis, we added spike-in cel-miR-39, -54 and -238 (miScript miRNA mimic, MSY000010, MSY000054, MSY000293) before RNA extraction for unbiased normalization.

Supernatant production (SPN) and extracellular vesicle (EVs) purification

PMN and PLB-985 cells were incubated either in DMEM or RPMI-1640, both supplemented with 10% EV-free FBS for supernatant production (SPN). SPN was isolated from PMN conditioned media after 300 g centrifugation to remove cells and 2000 g to remove cell debris. SPN were then ultra-centrifugated at 100 000 g for 70 min at 4°C. After centrifugation, EV-free SPN was collected and stored for cell culture experiments. The pellet containing EVs was either resuspended in phosphate-buffered saline (PBS) for culture cell experiments or in lysis buffer for protein analysis (1).

Immunoblotting

Immunoblotting was performed as described previously (14). Whole cell lysates were extracted from cells using Laemmli lysis buffer (12.5 mM Na₂HPO₄, 15% glycerol, 3% sodium dodecyl sulphate). The protein concentration was measured with the DC Protein Assay (BIO-RAD)

and 30 μg of total protein was loaded onto 7.5 or 11% sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis and transferred onto polyvinylidene difluoride membranes (Millipore). After 1 h of blocking with 5% bovine serum albumin or non-fat milk prepared in TBS-Tween buffer, the blots were incubated overnight at 4°C with antibodies against FOXO1 (clone C29H4, 1:1000, Cell Signaling Technologies, ref #2880), XRN1 (1:1000, Bethyl Laboratories, ref A-300-443A), E-CADHERIN (clone 4A2C7, 1:500, Invitrogen, ref 33-4000), SNAIL (clone C15D3, 1:1000, Cell Signaling Technologies, ref #3879), SLUG (clone A-7, 1:400, Santa Cruz Biotechnology, ref sc-166476), VIMENTIN (clone SP20, prediluted, 1:100, Abcam, ab27608) and b-ACTIN (clone AC-40, 1:10 000, Sigma-Aldrich, ref A3853) used as loading control. After 1 h of incubation with a horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody (1:6000, Santa Cruz Biotechnologies), protein bands were visualized using an enhanced chemiluminescence detection kit (Millipore) with the imaging system, Syngene Pxi4 (Syngene).

RNA isolation and Reverse Transcription qPCR (RT-qPCR) analysis

Total RNA extraction was performed using TRI-Reagent (Sigma-Aldrich) and QIAGEN RNeasy kit. Isolation of RNA from cultured cells or human samples was performed as described previously (15,16). The RNA concentration was measured by NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific), the purity (A260/A280) of RNA was around 2.0 and the yield was in a range of 200–500 ng/ μl . Then, mRNA were analyzed on a Bioanalyzer (Agilent) and only samples with RIN > 9 were used for further experiments.

For miRNA. Taqman miRNA assays (Applied Biosystems) were used to quantify the expression levels of mature hsa-miR-223-3p, hsa-miR-143-3p, U6 snRNA, cel-miR-39, cel-miR-54 and cel-miR-238. Specific miRNA-primed reverse transcription was carried out on 10 ng of total RNA using MultiScribe™ Reverse Transcriptase at 50 U/ μl (Applied Biosystems) in a final volume of 15 μl . No DNase treatment was performed for miRNA analysis. RNA were treated with Rnase Inhibitor using a TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription Kit (ref 4366597, Applied Biosystems): 30 min at 16°C, 30 min at 42°C, 5 min at 85°C and a pause at 4°C. The cDNA strand was synthesized using specific reverse transcription primers for U6 snRNA, miR-223-3p, miR-143-3p U6 snRNA, cel-miR-39, cel-miR-54 or cel-miR-238 (Thermo Fisher Scientific). The expression levels were analysed by RT-qPCR. RT-qPCR was performed in triplicate 10 μl per reaction on diluted cDNA (1 μl) with TaqMan® Fast Advanced Master Mix (2 \times), that contain AmpliTaq® Fast DNA Polymerase, using a StepOne™ Plus Real-Time PCR system (Applied Biosystems): 20 s at 95°C, [1 s at 95°C, 20 s at 60°C] for 40 cycles. The relative miR-223-3p and miR-143-3p expression levels were calculated for each sample after normalization against the endogenous expression level of the reference miRNA, U6 snRNA, using the $\Delta\Delta\text{Ct}$ method for comparison of relative fold-expression differences with Applied Biosystems

StepOne™ Software v2.3. For actinomycin D treatment, the cel-miRNA were used as normers instead of U6 snRNA.

For mRNA. multiplex oligo(dT)-primed reverse transcription was carried out on 500 ng DNase-treated total RNA using MultiScribe™ Reverse Transcriptase at 50 U/ μl (Applied Biosystems) in a final volume of 20 μl . RNA were treated with DNase I (1 U) 15 min at room temperature, then DNase I was inactivated with ethylenediaminetetraacetic acid (2.5 mM) and 10 min at 65°C. RNA were also treated with RnaseOUT—Ribonuclease Inhibitor (ref 10777-019, Applied Biosystems) in high capacity cDNA Reverse Transcription Kit (ref 4368813, Applied Biosystems): 10 min at 25°C, 120 min at 37°C, 5 min at 85°C and a pause at 4°C. RT-qPCR was performed in triplicate with 10 μl per reaction on diluted cDNA (1 μl , 1/5) with Fast SYBR® Green Master Mix (2 \times), that contained AmpliTaq® Fast DNA Polymerase, using a StepOne™ Plus Real-Time PCR system (Applied Biosystems): 20 s at 95°C, [3 s at 95°C, 30 s at 60°C] for 40 cycles, 15 s at 95°C, 1 s at 60°C, 15 s at 95°C with temperature increment +0.3°C (for Melt Curve). PCR Primers (Sigma-Aldrich) used for quantification of FOXO1, MYC, GAPDH and RPLP0 genes were: FOXO1 forward (ACGAGTGGATGGTCAAGAGC) and reverse (CTGCACACGAATGAACTTGC); MYC forward (ATGAAAAGGCCCAAGGTA) and reverse (CGTTTCGCAACAAGTCCTCT); GAPDH forward (ACCATG GAGAAGGCTGGGGC) and reverse (TGGACTGTGGTCATGAGTCC); RPLP0 forward (GCATCAGTACCC CATTCTATCAT) and reverse (AGGTGTAATCCGTC TCCACAGA), at a concentration of 250 nM. All targets were analyzed for efficiency and used in the range of linearity. The relative FOXO1, MYC, GAPDH expression levels were calculated for each sample after normalization against the endogenous expression level of the reference gene, RPLP0, using the $\Delta\Delta\text{Ct}$ method for comparison of relative fold-expression differences with Applied Biosystems StepOne™ Software v2.3. cDNA were stored in DNase/RNase-free water at –20°C.

miRNA and siRNA transient transfection

Cells were plated at 200 000 cells/well in 6-well plates. After 24 h, cells were transfected with the mirVana miRNA mimic Control or miR-223-3p at 17 nM or with the mirVana miRNA antagomiR Control or miR-223-3p at 68 nM or with siRNA negative Control or Silencer Pre-designed siRNA XRN1 at 50 nM using Lipofectamine RNAiMAX (Life Technologies) according to the manufacturer's instructions. Forty-eight hours after transfection, cells were lysed for RNA or protein analysis as described below.

miRNA stable transfection

Lentiviral particles for hsa-miR-223 (Cat. #: PMIRH223PA-1) were purchased from System Biosciences. Lentivirus transduction was performed according to the manufacturer's instructions. Briefly, A549 cells were seeded onto a 24-well plate and cultured for 24 h to achieve 50% confluence. A549 cells were then transfected with lentivirus and washed the next day. The efficiency of

infection was measured under a fluorescent microscope one week after the transfection and the cells were sorted using a flow cytometry. The sorted cells were used in the following experiments.

Dual luciferase reporter assay

HeLa cells were seeded at 10 000 cells/well in 96-well plates. After 24 h incubation, cells were transfected with the mir-Vana miRNA mimic Control or miR-223-3p. Twenty-four hours after transfection, cells were transfected with different constructs of psiCHECK™-2-FOXO1 3'UTR (1.1; 1.2; 1.3 and 1.4). Forty-eight hours after transfection, cells were assayed by both firefly and renilla luciferase using the dual luciferase assay system (Promega) according to manufacturer's instructions. All transfection experiments were conducted in triplicate and repeated three times independently.

Cell invasion assays

In vitro cell invasion assays were performed using transwell chambers coated with matrigel (pore size of 8 μ m; Corning). Cells were resuspended in serum-free medium, and 500 μ l of the cell suspension (100 000 cells/transwell) was added to the upper chamber. A total of 750 μ l of 5% FBS medium was added to the bottom wells of the chambers. After 16 h, cells were removed from the upper face of the filters using cotton swabs. After fixation in 4% paraformaldehyde and staining in a dye solution containing 0.4% crystal violet and 20% ethanol, cells that adhered to the lower membrane of the inserts were counted. Images of five different fields (200 \times magnification) were taken for each membrane, and the number of invaded cells was counted. All counts of the same experiments were divided by the mean of the control condition in order to calculate the migration index and the relative increase/decrease induced by treatments.

Statistical analysis

Quantitative data were described and presented graphically as medians and interquartiles or means and standard deviations. The distribution normality was tested with the Shapiro's test and homoscedasticity with a Bartlett's test. For two categories, statistical comparisons were performed using the Student's *t*-test or the Mann–Whitney's test. For three and more categories, analysis of variance (ANOVA) or non-parametric data with Kruskal–Wallis (KW) was performed to test variables expressed as categories versus continuous variables. If this test was significant, we used the Tukey's test or the Nemenyi's test to compare these categories.

Disease-free-survival was defined as the interval between the date of diagnosis and the date of discovery of the first evidence after treatment of any tumor (local, regional, metastatic or second primary) or death from any cause. Patients were recorded at the time of death or at the last follow-up. These data were estimated and presented graphically using the Kaplan–Meier method. The survival curves were compared using the log-rank test.

All statistical analyses were performed by the biostatistician using R.3.2.2 software and Prism6 program from

GraphPad software. Tests of significance was two-tailed and considered significant with an alpha level of $P < 0.05$. (graphically: * for $P < 0.05$, ** for $P < 0.01$, *** for $P < 0.001$).

RESULTS

Ex-miR-223-3p contained in EVs and engulfed into tumor cells is active in recipient cancer cells

Here, we developed a model that mimics tumor–stroma interactions in which miRNA, specifically expressed in PMN (17,18), but not in epithelial cancer cells (Figure 1A), were transferred into lung cancer cells via either cell–cell contact or EV transfer.

First, in order to show that PMN could transfer material to lung cancer cells, we stained the PMN with DiIC₁₆, a lipid dye probe. After removal of excess dye, either stained PMN or their conditioned SPN were co-cultured with A549 cells (Supplementary Figure S1A and B). We observed lipid transfer from PMN to cancer cells that was cell-cell contact independent since the transfer could be reproduced with SPN only (Supplementary Figure S1B). Second, together with this lipid transfer, we then confirmed that PMN-specific miRNA miR-223-3p (17,18) were absent in cancer cells (Figure 1A) and transferred following incubation with PMN into lung cancer cells in a dose dependent manner (Figure 1B; Supplementary Figure S2A and B). This transfer was recapitulated in different cancer or immortalized cell types (Supplementary Figure S2D–F). Furthermore, we also observed the transfer of miR-143-3p, a PMN-specific miRNA expressed at lower levels than miR-223-3p (Supplementary Figure S2G), from PMN to cancer cells (Supplementary Figure S2H), underlying that transfer is not restricted to miR-223-3p.

At this stage, it was of interest to show that transfer could also occur in a dose-dependent manner with SPN only (Figure 1C). To determine the component of SPN that was associated with transfer, we tested if it was specifically dependent on EVs. First, we detected little, if any, miRNA transfer when EV-depleted SPN was added to lung cancer cells (Figure 1D). Thus, we isolated EVs from granulocytic PLB-985 cell lines and we showed that their size profile was remarkably similar to the PMN SPN profile (Supplementary Figure S1C and D) and that they displayed classical enrichment for CD63, CD82 and leukocyte-specific CD53 (Supplementary Figure S1E). Then, we showed that the EVs were indeed responsible for lipid (Supplementary Figure S1F) and miRNA (Figure 1E) transfer between PMN to cancer cells.

Moreover, to ascertain that PMN or their supernatant did not transfer a factor responsible for miR-223-3p expression in recipient cells, we analyzed miR-223-3p accumulation during actinomycin D-mediated transcriptional inhibition in cancer cells (Figure 1F). The efficiency of transcription inhibition was confirmed by RT-qPCR of the unstable c-MYC proto-oncogene (Supplementary Figure S2I). As expected, a significant reduction in the c-MYC mRNA levels was detected following 8 h of transcriptional shutoff, while the stable GAPDH mRNA was still present at a high level (Supplementary Figure S2I). Of note, we noticed that U6, which is frequently used as a reference miRNA, was sensitive to actinomycin D in A549 cells (Supplementary

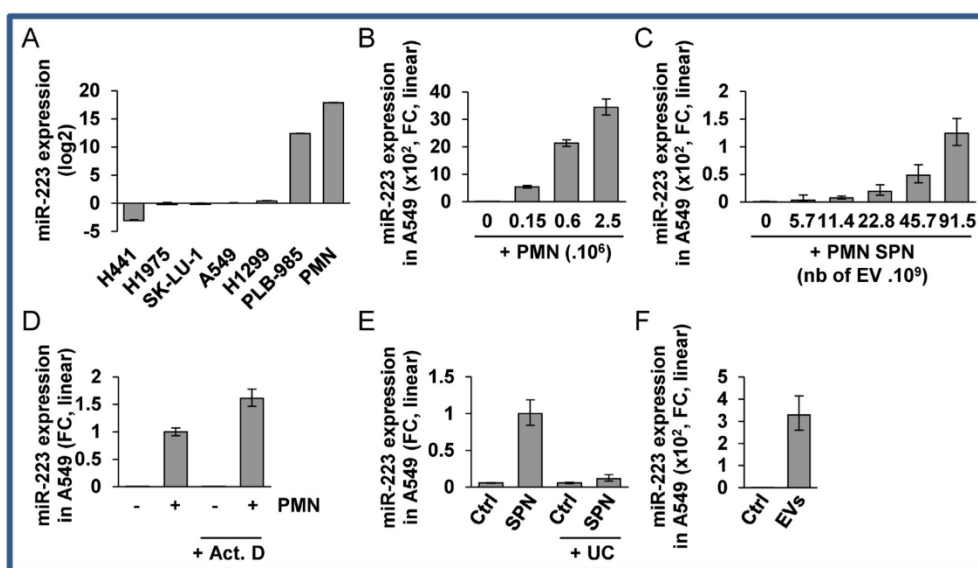


Figure 1. Ex-miR-223-3p is engulfed into recipient cells (A) Relative quantification analysis of ex-miRNA-223-3p expression in H441, H1975, SK-LU-1, A549, H1299, PLB-985 and PMN cells. Cell lines were harvested at 70% confluency. PMN were isolated from blood as described in the ‘Materials and Methods’ section. (B) Relative quantification of the expression of ex-miR-223-3p in A549 cells after overnight co-culture with increasing numbers of PMN and extensive washes. (C) Relative quantification of the expression of ex-miR-223-3p in A549 cells following incubation with increasing amounts of SPN. (D) Relative quantification of the expression of ex-miR-223-3p in A549 cells following incubation with SPN or SPN depleted of EVs by ultra-centrifugation (UC). (E) Relative quantification of the expression of ex-miR-223-3p in A549 cells incubated overnight with EVs isolated from SPN of PLB-985 cells. (F) Relative quantification of the expression of ex-miR-223-3p in A549 cells co-cultured overnight with PMN and treated with actinomycin D (Act. D) at 10 μg/ml. Cells were extensively washed and harvested. (A–E) For all experiments, the levels of miR-223-3p were normalized using U6 snRNA. (F) Spike-in were used for normalization (see the ‘Materials and Methods’ section). (A–F) Results are representative of three biological replicates, ‘centre values’ as mean and error bars as s.d.

Figure S2J), so to analyse miRNA expression, we added spike-in cel-miR-39, -54 and -238 before RNA extraction for unbiased normalization. We showed that miR-223-3p accumulation was not impaired by actinomycin D confirming that miR-223-3p was indeed transferred from PMN (Figure 1F).

We then checked whether the ex-miR-223-3p transferred into recipient cells were functional by analyzing the expression of FOXO1, a *bona fide* miR-223-3p target (19) that contains four potential miR-223-3p binding sites in its 3’UTR (Figure 2A). We cloned the 450 bp region surrounding each potential binding sites and found that two of them were functionally targeted, as assessed by post-transcriptional repression by miR-223-3p in a site-specific luciferase reporter assay (Figure 2B). Finally, the FOXO1 protein was silenced in A549 cells either treated with miR-223-3p (Figure 2C) or co-cultured with PMN (Figure 2D) indicating that miR-223-3p molecules transferred from PMN to lung cancer cells were indeed functional in the recipient cells.

Engulfed ex-miR-223-3p is active in tumor cells and promotes EMT and invasion

Because miRNA target numerous mRNA in cells, following only one target may not resume all the observed phenotypic changes, so we thus focused on a global ‘gain of function phenotype’ that was miR-223-3p dependent. We show here that transfection of miR-223-3p into A549 cells induced impaired cell adhesion and an EMT phenotype, as suggested

by transcriptome analysis with GO.Cellular.Component via numerous potential targets of miR-223-3p (Supplementary Table S1 and Supplementary Figure S3A and B), and as verified by the accumulation of mesenchymal markers like SNAIL, SLUG and VIMENTIN proteins (Supplementary Figure S3C), and E-cadherin relocation and actin remodeling (Supplementary Figure S3D).

Accordingly, PMN or SPN of PMN both enhanced the invasion of A549 or H1975 cells through matrigel chambers (Figure 3A and Supplementary Figure S4A respectively). Of note, this PMN-driven EMT of A549 cells was independent of reactive oxygen species (Supplementary Figure S4B) but dramatically rescued by EV removal from the SPN (Figure 3B), suggesting the relevant paracrine contribution of EVs. Consistently, we confirmed that A549 cells incubated with EVs isolated from granulocytic PLB-985 cells had an increased invasive behavior (Figure 3C). The effect of EVs on A549 cell invasion was recapitulated by the transfection of miR-223-3p (Supplementary Figure S4C) and completely lost after depletion of miR-223-3p by transfection with specific miRNA-antagomir-223-3p in PMN-treated cells (Figure 3D). Furthermore, we tested the effect of FOXO1 silencing on migration and showed that siFOXO1 modestly induced invasion (Figure 3E). This result showed that miR-223-3p-induced invasion is not entirely explained by FOXO1 silencing suggesting a multi-target additive effect that promotes EMT and invasion.

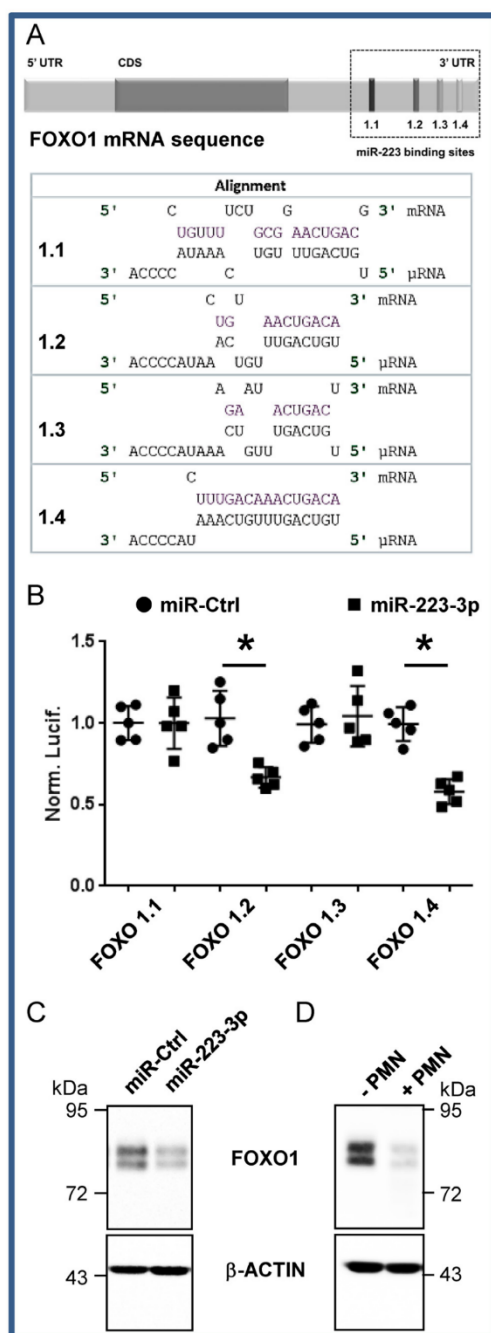


Figure 2 FOXO1 is a *bona fide* target of miR-223-3p (A) *In silico* prediction of miR-223-3p and FOXO1 3'UTR mRNA interaction. (B) Each potential binding site was evaluated independently using the dual luciferase assay as presented in the 'Materials and Methods' section. Each dot corresponds to a biological replicate. The Renilla/Firefly ratios were normalized on paired to miR-Ctrl conditions (Norm. Lucif.). Data represent the quantification of three biological replicates, 'centre values' as mean and error bars as s.d. * for $P < 0.05$. (C) FOXO1 expression in A549 cells after 48 h transfection with miR-223-3p. (D) FOXO1 expression in A549 cells co-cultured overnight with PMN. (C and D) FOXO1 expression was analysed by immunoblotting. β -ACTIN served as reference for loading.

Engulfed ex-miR-223-3p rapid decay after donor cell removal is associated with transient EMT

It has been demonstrated that tumor epithelial cells could be reprogrammed to adopt a transient mesenchymal phenotype by miRNA transfer (20). However, the molecular mechanisms that govern this epithelial plasticity remain poorly understood. Since heterotypic cell interactions are highly dynamic within the tumor micro-environment, we questioned the stability of the ex-miRNA once the donor cell had been removed. Ex-miRNAs are present in blood plasma and serum in a remarkably stable form. However, this resistance, especially for miR-223-3p, was mainly due to membrane protection rather than RISC-associated protection by nucleases (21). Here, we discovered, in the different tested tumor recipient cell lines, that the level of exosomal delivered miR-223-3p rapidly decreased with a half-life of 1.2 h (± 0.4 h) (Figure 4A), in contrast to the 24 h half-life of stably transfected miR-223-3p in actinomycin D-treated A549 cells (Figure 4B). These data reveal different fates for ex-miRNA and cellular miRNA. Along with the decline in ex-miRNA found in different cell lines (Supplementary Figure S5A–C), the miR-223-3p driven responses, i.e. FOXO1 silencing, decreased epithelial markers (E-cadherin) and enhanced mesenchymal markers (SNAIL, SLUG), as well as the invasive behavior, could be gradually rescued overtime up to complete recovery within 8 h after PMN removal (Figure 4C–E). FOXO1 recovery was not related to an increase in transcription suggesting that FOXO1 rescue was dependent on miRNA decay (Supplementary Figure S5D). In addition, we showed that the decrease was not restricted to miR-223-3p since miR-143-3p also decreased in A549 cells after donor cell removal (Supplementary Figure S5E).

Engulfed ex-miR-223-3p stability and EMT longevity depend on XRN1 levels

To uncover the origin of this unexpected instability of ex-miRNA, we focused on the mechanism of decay of miRNA, which remains unclear in mammals. Some studies have highlighted the instability of some specific animal miRNAs (10,22). A potential decay mechanism described in *Arabidopsis* implicated the 3'-to-5' exonucleases SDN (23) and more recently Dis3 in *Drosophila* (24) and the 5'-to-3' exoribonucleases XRN-1 and XRN-2 in *Caenorhabditis elegans* (25–27).

After siRNA screening (Supplementary Figure S6) for these exonuclease isoforms in humans, XRN1 appeared to have a major impact on ex-miR-223-3p decay in our model, increasing its half-life to 2.45 h ± 0.3 (Figure 5A). Consequently, XRN1 knock-out also affected fluctuations in the miR-223-3p targets up to 4 h upon PMN removal. FOXO1 expression levels were lower in siXRN1-transfected cells than in siCtrl-transfected cells after 4 h (Figure 5B). This finding was also corroborated by increased expression of the mesenchymal SNAIL and SLUG markers and decreased expression of E-cadherin in siXRN1-treated cells incubated with SPN (Figure 5B). Along with these observations, we showed that the siXRN1-transfected cells had a higher invasion capacity than siCtrl-treated cells in the presence of supernatant of PMN (Figure 5C). Furthermore, we

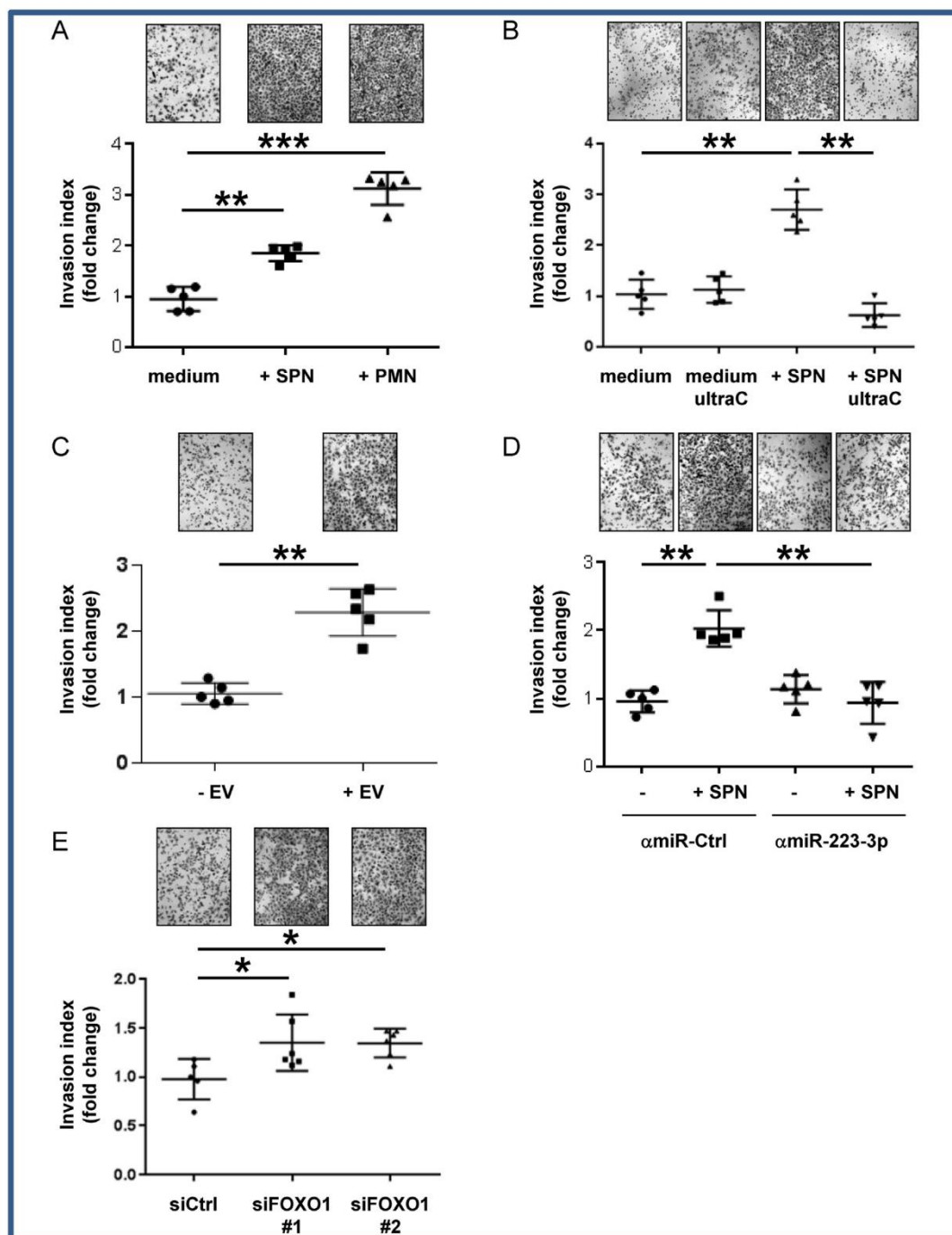


Figure 3. Engulfed miR-223-3p transfer induces enhanced invasive properties (A) *In vitro* invasion assay of A549 cells co-cultured either with PMN or their conditioned supernatant produced in serum-free medium. (B) *In vitro* invasion assay of A549 cells co-cultured with conditioned supernatant depleted of EVs by ultra-centrifugation (UltraC). (C) *In vitro* invasion assay of A549 cells co-cultured with EVs isolated from PLB-985 cells. (D) *In vitro* invasion assay of anti-miR-223-3p (amiR-223-3p) transfected A549 cells co-cultured with SPN of PMN (E) *In vitro* invasion assay of A549 cells transiently transfected either with Ctrl siRNA (siCtrl) or FOXO1 siRNA (siFOXO). (A–E) Each dot corresponds to a biological replicate. * for $P < 0.05$, ** for $P < 0.01$, *** for $P < 0.001$.

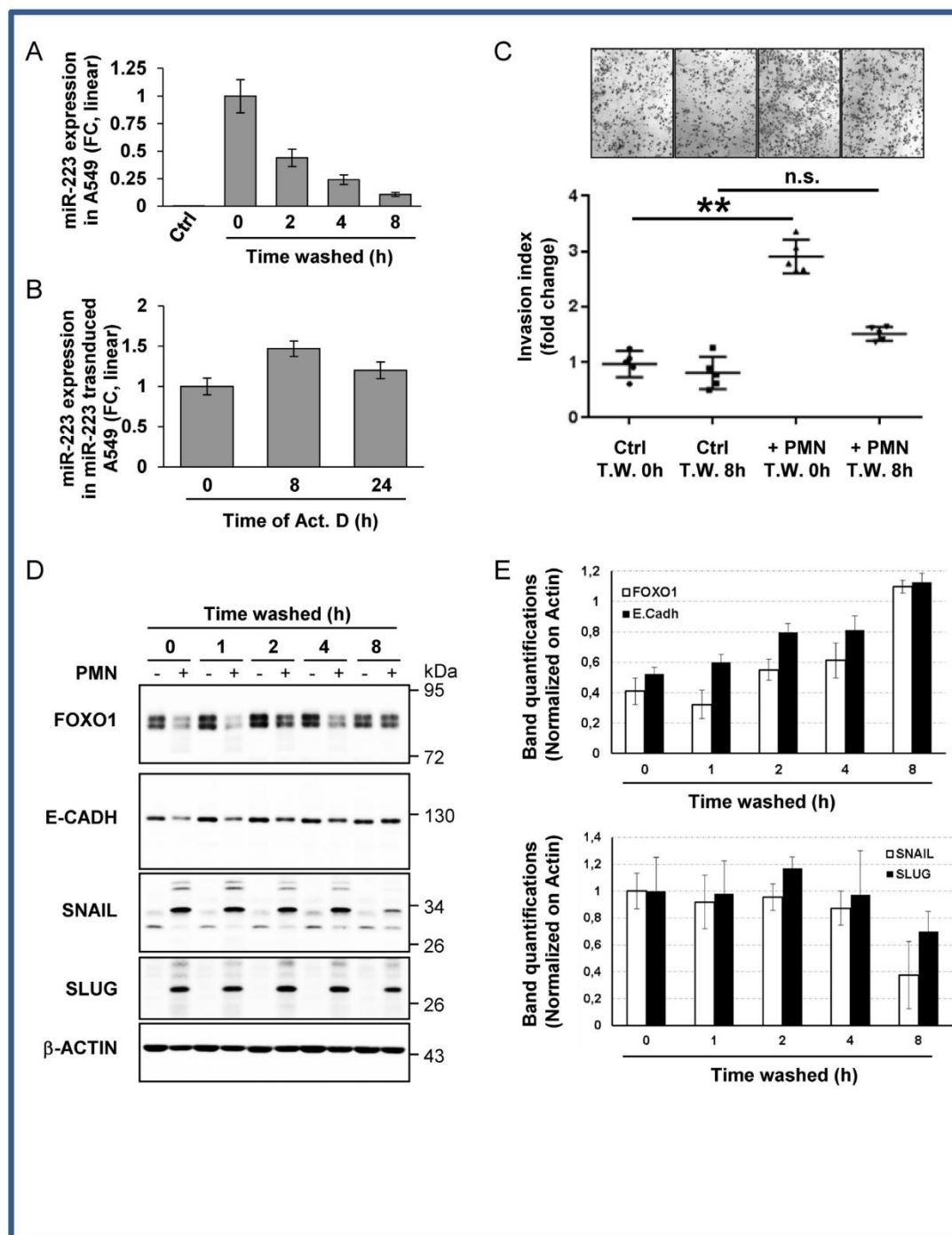


Figure 4. Engulfed miR-223-3p is quickly decayed in recipient cells after donor cell removal. (A) Time-dependent decay of ex-miRNA-223-3p expression in A549 cells. Following overnight co-culture with PMN, A549 cells were harvested at the indicated time periods after PMN removal. The level of miR-223-3p was measured by RT-qPCR and normalized using U6 snRNA. Results are representative of three biological replicates, 'centre values' as mean and error bars as s.d. (B) RT-qPCR analysis of miRNA-223-3p expression in stably miR-223 transduced A549 cells treated with actinomycin D (Act. D) at 10 μ g/ml for the indicated period of time. Spikes-in were used for normalization (see the 'Materials and Methods' section). (C) *In vitro* invasion assay of A549 cells post washes. A549 cells co-cultured with (+PMN) or without PMN (Ctrl) overnight were collected at the indicated time post initial washes (Time Washed, T.W.) and seeded, in the upper part of transwells. The number of cells attached to the bottom of a Matrigel-coated membrane after 16 h was quantified after crystal violet staining. Data represent the quantification of five biological replicates, 'centre values' as mean and error bars as s.d. (D) Immunoblot analysis of FOXO1 and EMT marker expression levels upon PMN removal from A459 cells co-cultured with (+) or without (-) PMN. β -ACTIN served as reference for loading. (E) Quantifications of gels from three independent experiments are presented. * for $P < 0.05$, ** for $P < 0.01$.

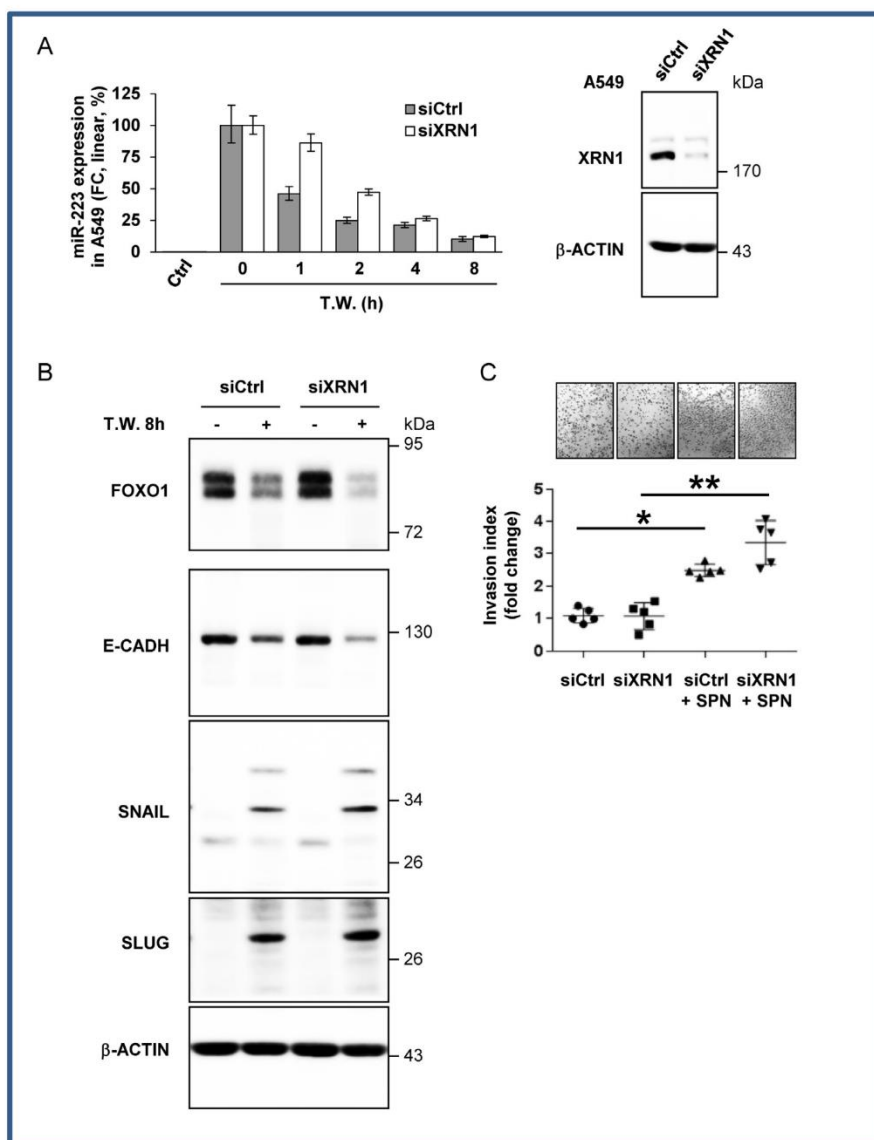


Figure 5. XRN1 regulates ex-miRNA decay in recipient cells (A) Relative quantification analysis of ex-miRNA-223-3p in A549 cells. siXRN1-transfected A549 cells co-cultured with PMN overnight were harvested at the indicated periods of time post PMN removal (Time Washed, T.W.). Results are representative of three biological replicates. In the right panel, immunoblot analysis of XRN1 expression. β-ACTIN served as an equal loading control. (B) Immunoblot analysis of FOXO1 and EMT marker expression levels. β-ACTIN served as an equal loading control. (C) *In vitro* invasion assay of siXRN1-transfected A549 cells. A549 cells co-cultured with SPN of PMN, produced in serum-free medium, were seeded in the upper part of transwells. The number of cells attached to the bottom of a Matrigel-coated membrane after 16 h was quantified after crystal violet staining. Data represent the quantification of five biological replicates, 'centre values' as mean and error bars as s.d. * for $P < 0.05$, ** for $P < 0.01$.

checked if the observed effects were not associated with phenotypic changes due to siXRN1 depletion in cancer cells. We showed that siXRN1 neither perturbed proliferation of A549 cells (Supplementary Figure S7A) nor modified the invasive properties (Supplementary Figure S7B). Moreover, we showed that XRN1 was not sensitive to actinomycin D treatment within 24 h, suggesting that the 'endogenous' miR-223-3p stability in stable-miR-223-3p cell lines could

not be explained by depletion of XRN1 during actinomycin D treatment (Supplementary Figure S7C).

DISCUSSION

Regulation of miRNA levels in normal physiology as in cancer is often exclusively studied at the transcription and processing steps. However, we show here that an additional and essential level of control occurs via ex-miRNA decay. Indeed, we present evidence that PMN release EVs that con-

tain functional miRNAs, which are transferred into cancer cells. Specifically, ex-miR-223-3p induces lung cancer cell reprogramming as demonstrated by induction of the EMT signature and the acquisition of a more invasive phenotype. While the transfer of EV-derived miRNAs from tumor cells to the inflammatory micro-environment has been well-documented (28), our study provides the first evidence of ex-miRNA trafficking from PMN to tumor cells. The role of miRNA in cellular EMT and tumor metastases has been well-established, irrespective of the miRNA nature, i.e. endogenous or derived from EVs (29,30). In agreement with this, we show that the presence of miR-223-3p, following both stable transfection or EVs transfer, activates EMT. Importantly, our results reveal that ex-miR-223-3p triggered an unexpected sequential EMT–MET mechanism. Mechanistically, we demonstrated that the ex-miR-223-3p are extremely labile miRNA, rapidly degraded by XRN1 following removal of EVs producing PMN.

There are several implications in our understanding of the unique properties of ex-miRNA. First, the remarkable instability of ex-miRNAs suggests the ex-miRNAs are the specific target of miRNA-binding proteins or nucleases that control their stability, thus fine-tuning their effectiveness. So far, very little information is currently available regarding the decay of miRNAs and even less for the ex-miRNA once engulfed into recipient cells. By silencing all known exonucleases, we identified XRN1 as the 5′-3′exoribonuclease 1 that specifically targets ex-miR-223-3p in human tumor cells. Knockdown of XRN1 counteracted EV-induced MET, consistent with ex-miR-223-3p stabilization. In mammals, Bail *et al.* showed that endogenous miRNA presented a discrepancy in terms of stability after actinomycin D treatment. Moreover, they showed the involvement of XRN1, and not XRN2, in the decay of endogenous miR-382 (10). Since miR-223-3p has been shown to be protected within the EV and quickly degraded by RNase A after EV permeabilization in a cell-free system (21), our findings together with these results suggest that XRN1 is predominantly targeting unprotected miRNA in cells. This effect may arise from at least two different possibilities: either a given miRNA is lacking some post-transcriptional modification like 5′-phosphate (31) allowing different pools of miRNA within the cell with one more susceptible for degradation or a miRNA is differentially ‘protected’ depending on its different degree of affinity for miRNA-associated proteins like AGO2. Unfortunately, our miRNA sequencing results did not clearly identified the ‘code signal’ for decay at the origin of the differential miRNA susceptibility (data not shown) and further studies that clarify this ‘code signal’ are of great interest.

Second, our study points to the observation that the ex-miRNA and endogenous miRNA do not function in a similar way, as originally expected. In the literature, miRNAs function as key oncogenic and tumor suppressor miRNA. It has been inferred that the stable expression of microRNA mimics the responses triggered by the engulfed ex-miRNA. However, we found that the uptake of ex-miR-223-3p activated rapid EMT followed by a delayed MET in tumor cells, in sharp contrast to the maintenance of EMT of miR-223-transfected cells. We reconciled these apparently contradictory results by showing that ex-miR-223-3p was highly

sensitive to degradation whereas the ectopically expressed miR-223-3p were resistant. These findings point to the important notion that the efficacy of ex-miRNA in recipient cells is the net result of a dynamic balance between uptake and degradation.

Third, the sequential EMT–MET of lung cancer cells shown herein following ex-miRNA decay recapitulates the metastasis process. While there is no doubt that EMT is associated with worse prognosis, the cancer cells concurrently express multiple EMT markers, which render them difficult to transfer for diagnostic or prognostic purposes. A previous study suggests that miR-223-3p promotes invasion of breast cancer cells via regulation of MEF2C. In our experiments, we confirmed that both extracellular transferred and ectopically expressed-miR-223-3p promote cell invasion, however these effects were independent of MEF2C, which was not expressed in our cellular models (data not shown). Our microarray analysis showed rather that miR-223-3p targets a large panel of genes, including FOXO1, which are involved in cell migration. In fact, the worst clinical outcomes of metastatic cancers were recently associated with a dynamic ‘variance gradient’ ranging from EMT phenotypes. In consequence, we propose a model in which the regulation of ex-miRNA decay is particularly important during tumor metastasis, where the plasticity of tumor cells between the epithelial and mesenchymal states requires selective and programmed decay of miRNAs far from their inflammatory site of production. Along this line, the observation that the chromosomal loss of XRN1 was associated with poor disease free survival (logrank, *P*-value = 0.0219, Hazard Ratio: 1.453, 95% CI: 1.065–2.168) in lung adenocarcinoma (The Cancer Genome Atlas TCGA-LUAD data collection) is of great interest (Supplementary Figure S8).

In conclusion, our results suggest that EVs released into the micro-environment contain miRNA that could help cancer cell invade the surrounding tissue. We showed that the ‘steady step’ level of engulfed miRNA and its subsequent activity is dependent of the presence of donor cells in the surrounding to constantly fuel the recipient cell with extracellular miRNAs and that the level of XRN1 exonuclease is involved in the decay of these imported miRNA.

AVAILABILITY/ACCESSION NUMBER

The raw sequence and processed data have been submitted to the NCBI Gene Expression Omnibus (GEO) under accession number GSE81370.

SUPPLEMENTARY DATA

Supplementary Data are available at NAR Online.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to thank Katia Havet-Zahaf, Salomé Lalvée, Eric Selva, Julien Fayada, Pascal Grier, Ludovic Cervera for technical help. The authors acknowledge the technological expertise of the CytoMed, the IRCAN’s Flow Cytometry Facility, the Nice Sophia-Antipolis Functional Genomics Platform and the Nice Hospital Related Biobank (BB 0033-00025).

FUNDING

French Government (Agence Nationale de Recherche, ANR) through the 'Investments for the Future' LABEX SIGNALIFE [ANR-11-LABX-0028-01]; ANR Jeunes Chercheurs Jeunes Chercheuses [ANR-12- JSV1-0009-01]; Infrastructure France-Génomique [ANR-10-INBS-09-03]; Fondation ARC pour la recherche sur le cancer ARC SL220110603478; CANC'AIR Genexposomic project, Canceropole PACA; Région PACA (France); Conseil Général 06; FEDER; Ministère de l'Enseignement Supérieur; Région Provence Alpes-Côte d'Azur; INSERM. *Conflict of interest statement.* None declared.

REFERENCES

- Thery, C., Amigorena, S., Raposo, G. and Clayton, A. (2006) Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids. *Curr. Protoc. Cell Biol.*, doi:10.1002/0471143030.cb0322s30.
- Rahman, M.A., Barger, J.F., Lovat, F., Gao, M., Otterson, G.A. and Nana-Sinkam, P. (2016) Lung cancer exosomes as drivers of epithelial mesenchymal transition. *Oncotarget*, **7**, 54852–54866.
- Vlassov, A.V., Magdaleno, S., Setterquist, R. and Conrad, R. (2012) Exosomes: current knowledge of their composition, biological functions, and diagnostic and therapeutic potentials. *Biochim. Biophys. Acta*, **1820**, 940–948.
- Sanfiorenzo, C., Ilie, M.I., Belaid, A., Barlesi, F., Mouroux, J., Marquette, C.H., Brest, P. and Hofman, P. (2013) Two panels of plasma microRNAs as non-invasive biomarkers for prediction of recurrence in resectable NSCLC. *PLoS One*, **8**, e54596.
- Zhang, X., Yuan, X., Shi, H., Wu, L., Qian, H. and Xu, W. (2015) Exosomes in cancer: small particle, big player. *J. Hematol. Oncol.*, **8**, 83.
- Zamore, P.D., Tuschl, T., Sharp, P.A. and Bartel, D.P. (2000) RNAi: double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. *Cell*, **101**, 25–33.
- Croce, C.M. and Calin, G.A. (2005) miRNAs, cancer, and stem cell division. *Cell*, **122**, 6–7.
- Gantier, M.P., McCoy, C.E., Rusinova, I., Saulep, D., Wang, D., Xu, D., Irving, A.T., Behlke, M.A., Hertzog, P.J., Mackay, F. et al. (2011) Analysis of microRNA turnover in mammalian cells following Dicer1 ablation. *Nucleic Acids Res.*, **39**, 5692–5703.
- Zhang, Z., Qin, Y.W., Brewer, G. and Jing, Q. (2012) MicroRNA degradation and turnover: regulating the regulators. *Wiley Interdiscip. Rev. RNA*, **3**, 593–600.
- Bail, S., Swerdel, M., Liu, H., Jiao, X., Goff, L.A., Hart, R.P. and Kiledjian, M. (2010) Differential regulation of microRNA stability. *RNA*, **16**, 1032–1039.
- Spaderna, S., Schmalhofer, O., Hlubek, F., Berx, G., Eger, A., Merkel, S., Jung, A., Kirchner, T. and Brabletz, T. (2006) A transient, EMT-linked loss of basement membranes indicates metastasis and poor survival in colorectal cancer. *Gastroenterology*, **131**, 830–840.
- Thiery, J.P., Acloque, H., Huang, R.Y. and Nieto, M.A. (2009) Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell*, **139**, 871–890.
- Liu, Y., Gu, Y., Han, Y., Zhang, Q., Jiang, Z., Zhang, X., Huang, B., Xu, X., Zheng, J. and Cao, X. (2016) Tumor exosomal RNAs promote lung pre-metastatic niche formation by activating alveolar epithelial TLR3 to recruit neutrophils. *Cancer Cell*, **30**, 243–256.
- Brest, P., Lapaquette, P., Souidi, M., Lebrigand, K., Cesaro, A., Vouret-Craviari, V., Mari, B., Barbry, P., Mosnier, J.F., Hébuterne, X. et al. (2011) A synonymous variant in IRGM alters a binding site for miR-196 and causes deregulation of IRGM-dependent xenophagy in Crohn's disease. *Nat. Genet.*, **43**, 242–245.
- Pottier, N., Maurin, T., Chevalier, B., Puissegur, M.P., Lebrigand, K., Robbe-Sermesant, K., Bertero, T., Lino Cardenas, C.L., Courcot, E., Rios, G. et al. (2009) Identification of keratinocyte growth factor as a target of microRNA-155 in lung fibroblasts: implication in epithelial-mesenchymal interactions. *PLoS One*, **4**, e6718.
- Triboulet, R., Mari, B., Lin, Y.L., Chable-Bessia, C., Bennasser, Y., Lebrigand, K., Cardinaud, B., Maurin, T., Barbry, P., Baillat, V. et al. (2007) Suppression of microRNA-silencing pathway by HIV-1 during virus replication. *Science*, **315**, 1579–1582.
- Allantaz, F., Cheng, D.T., Bergauer, T., Ravindran, P., Rossier, M.F., Ebeling, M., Badi, L., Reis, B., Bitter, H., D'Asaro, M. et al. (2012) Expression profiling of human immune cell subsets identifies miRNA-mRNA regulatory relationships correlated with cell type specific expression. *PLoS One*, **7**, e29979.
- Haneklaus, M., Gerlic, M., O'Neill, L.A. and Masters, S.L. (2013) miR-223: infection, inflammation and cancer. *J. Intern. Med.*, **274**, 215–226.
- Wu, L., Li, H., Jia, C.Y., Cheng, W., Yu, M., Peng, M., Zhu, Y., Zhao, Q., Dong, Y.W., Shao, K. et al. (2012) MicroRNA-223 regulates FOXO1 expression and cell proliferation. *FEBS Lett.*, **586**, 1038–1043.
- Srivastava, S.P., Koya, D. and Kanasaki, K. (2013) MicroRNAs in kidney fibrosis and diabetic nephropathy: roles on EMT and EndMT. *Biomed. Res. Int.*, **2013**, 125469.
- Li, L., Zhu, D., Huang, L., Zhang, J., Bian, Z., Chen, X., Liu, Y., Zhang, C.Y. and Zen, K. (2012) Argonaute 2 complexes selectively protect the circulating microRNAs in cell-secreted microvesicles. *PLoS One*, **7**, e46957.
- Rissland, O.S., Hong, S.J. and Bartel, D.P. (2011) MicroRNA destabilization enables dynamic regulation of the miR-16 family in response to cell-cycle changes. *Mol. Cell*, **43**, 993–1004.
- Ramachandran, V. and Chen, X. (2008) Degradation of microRNAs by a family of exoribonucleases in Arabidopsis. *Science*, **321**, 1490–1492.
- Towler, B.P., Jones, C.I., Viegas, S.C., Apura, P., Waldron, J.A., Smalley, S.K., Arraiano, C.M. and Newbury, S.F. (2015) The 3'-5' exoribonuclease Dis3 regulates the expression of specific microRNAs in Drosophila wing imaginal discs. *RNA Biol.*, **12**, 728–741.
- Bosse, G.D., Ruegger, S., Ow, M.C., Vasquez-Rifo, A., Rondeau, E.L., Ambros, V.R., Grosshans, H. and Simard, M.J. (2013) The decapping scavenger enzyme DCS-1 controls microRNA levels in *Caenorhabditis elegans*. *Mol. Cell*, **50**, 281–287.
- Chatterjee, S., Fasler, M., Bussing, I. and Grosshans, H. (2011) Target-mediated protection of endogenous microRNAs in *C. elegans*. *Dev. Cell*, **20**, 388–396.
- Chatterjee, S. and Grosshans, H. (2009) Active turnover modulates mature microRNA activity in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, **461**, 546–549.
- Thery, C., Ostrowski, M. and Segura, E. (2009) Membrane vesicles as conveyors of immune responses. *Nat. Rev. Immunol.*, **9**, 581–593.
- Tang, J., Li, Y., Wang, J., Wen, Z., Lai, M. and Zhang, H. (2016) Molecular mechanisms of microRNAs in regulating epithelial-mesenchymal transitions in human cancers. *Cancer Lett.*, **371**, 301–313.
- Kosaka, N. (2016) Decoding the Secret of Cancer by Means of Extracellular Vesicles. *J. Clin. Med.*, **5**, e22.
- Salzman, D.W., Nakamura, K., Nallur, S., Dookwah, M.T., Metherairut, C., Slack, F.J. and Weidhaas, J.B. (2016) miR-34 activity is modulated through 5'-end phosphorylation in response to DNA damage. *Nat. Commun.*, **7**, 10954.

Annexe 2

Ohanna M, Cerezo M, Nottet N, Bille K, Didier R, Beranger G, Mograbi B, Rocchi S, Yvan-Charvet L, Ballotti R, and Bertolotto C. **Pivotal role of NAMPT in the switch of melanoma cells toward an invasive and drug-resistant phenotype.** Genes Dev. 2018, doi:10.1101/gad.305854.117

Pivotal role of NAMPT in the switch of melanoma cells toward an invasive and drug-resistant phenotype

Mickaël Ohanna,¹ Mickaël Cerezo,^{1,5} Nicolas Nottet,² Karine Bille,¹ Robin Didier,¹ Guillaume Beranger,¹ Baharia Mograbi,³ Stéphane Rocchi,¹ Laurent Yvan-Charvet,⁴ Robert Ballotti,^{1,6} and Corine Bertolotto^{1,6}

¹U1065, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), Biology and Pathologies of Melanocytes, Equipe Labellisée L'Association pour la Recherche sur le Cancer (ARC) 2015, Université Nice Côte d'Azur, INSERM, Centre Méditerranéen de Médecine Moléculaire (C3M), 06204 Nice, France; ²Université Nice Côte d'Azur, INSERM, C3M, 06204 Nice, France; ³U1081, INSERM, Institute of Research on Cancer and Ageing of Nice (IRCAN), Equipe Labellisée ARC, Université Nice Côte d'Azur, UMR7284, Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), 06107 Nice, France; ⁴U1065, INSERM, Team ATIP-Avenir, Université Nice Côte d'Azur, INSERM, C3M, 06204 Nice, France

In BRAF^{V600E} melanoma cells, a global metabolomic analysis discloses a decrease in nicotinamide adenine dinucleotide (NAD⁺) levels upon PLX4032 treatment that is conveyed by a STAT5 inhibition and a transcriptional regulation of the nicotinamide phosphoribosyltransferase (NAMPT) gene. NAMPT inhibition decreases melanoma cell proliferation both in vitro and in vivo, while forced NAMPT expression renders melanoma cells resistant to PLX4032. NAMPT expression induces transcriptomic and epigenetic reshufflings that steer melanoma cells toward an invasive phenotype associated with resistance to targeted therapies and immunotherapies. Therefore, NAMPT, the key enzyme in the NAD⁺ salvage pathway, appears as a rational target in targeted therapy-resistant melanoma cells and a key player in phenotypic plasticity of melanoma cells.

[*Keywords:* melanoma; metabolism; NAD; targeted therapy]

Supplemental material is available for this article.

Received August 8, 2017; revised version accepted March 5, 2018.

Reprogramming of cellular energy metabolism has been rediscovered recently as an emerging hallmark of cancer (Ward and Thompson 2012). In 1930, Otto Warburg identified alterations of energy metabolism in cancer cells (Warburg 1956). For ATP production, cancer cells switch from oxidative phosphorylation (OXPHOS) to glycolysis regardless of the oxygen supply, leading to a process called "aerobic glycolysis." This switch is frequently associated with an enhanced glucose uptake that compensates for the poor energetic efficiency of glycolysis compared with OXPHOS.

BRAF oncogenic mutations, which increase glycolytic activity in a variety of cancer cells, particularly in melanoma, play a key role in this metabolic switch (Parmenter et al. 2014). The inhibition of glycolysis upon BRAF inhibitor (BRAFi) treatment participates in the therapeutic response (Baudy et al. 2012; Parmenter et al. 2014). However, as phenotypically and functionally plastic cells,

melanoma cells can rewire their metabolism toward OXPHOS or glutaminolysis upon BRAFi exposure, a process that might dampen the efficacy of the drug and support tumor growth (Haq et al. 2013; Baenke et al. 2016; Falletta et al. 2017).

Therefore, these alternative metabolic pathways for energy supply or the restoration of glycolysis (Parmenter et al. 2014) might also contribute to the acquisition of resistance to BRAFi, leading to treatment failure in patients with BRAF mutated melanoma. Furthermore, glycolysis, OXPHOS, and glutaminolysis are intertwined with other key metabolic pathways, such as protein catabolism, which can fuel the Krebs cycle and fatty acid synthesis/β-oxidation pathways (through citrate and acetyl-CoA) that also represent alternative sources of energy.

In addition to the energy demand, cellular metabolism has been shown to interfere more globally with melanoma

⁵Present address: U981, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Villejuif, France.

⁶These authors contributed equally to this work.

Corresponding author: bertolot@unice.fr

Article published online ahead of print. Article and publication date are online at <http://www.genesdev.org/cgi/doi/10.1101/gad.305854.117>.

© 2018 Ohanna et al. This article is distributed exclusively by Cold Spring Harbor Laboratory Press for the first six months after the full-issue publication date [see <http://genesdev.cshlp.org/site/misc/terms.xhtml>]. After six months, it is available under a Creative Commons License (Attribution-NonCommercial 4.0 International), as described at <http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>.

BRAF/ERK pathway controls NAMPT expression

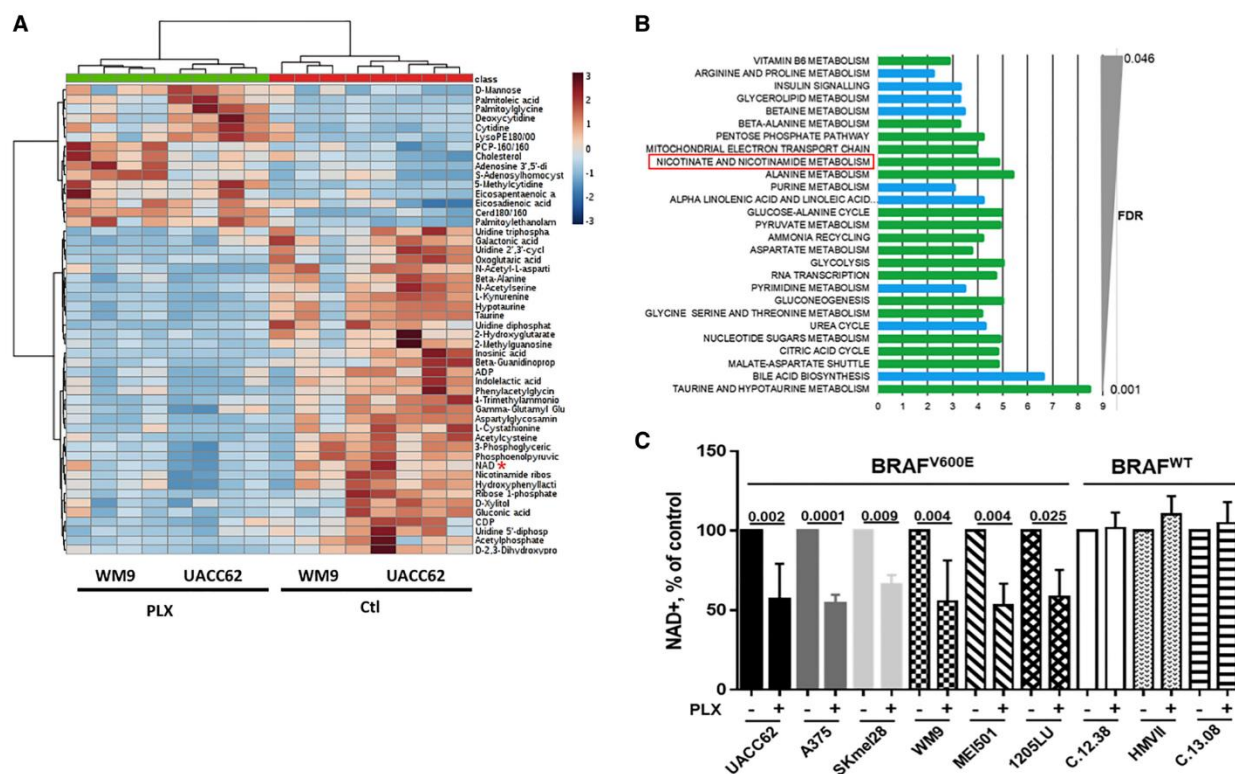


Figure 1. PLX4032 decreases the levels of NAD⁺ in BRAF^{V600E} melanoma cells. (A) Heat map of the top 40 metabolites significantly regulated by 5 μ M PLX4032 for 24 h in WM9 and UACC62 cells. The deregulation of NAD metabolism is highlighted (red asterisk). (B) KEGG pathway analysis of metabolomic data by MetaboAnalyst. (Green) Metabolites in the subpathways are all down-regulated; (blue) metabolites in the subpathways can be up-regulated or down-regulated. (C) Intracellular NAD⁺ levels in a panel of BRAF^{V600E} and wild-type BRAF (BRAF^{WT}) human melanoma cells exposed or not to 5 μ M PLX4032 for 24 h. The values represent the means + SD of five independent experiments.

cell phenotype. Indeed, glutamine limitation causes a translational and transcriptional reprogramming of melanoma cells toward invasive and therapy-resistant phenotypes (Falletta et al. 2017). Therefore, obtaining a complete view of the different metabolic pathways deregulated upon BRAF inhibition in melanoma cells is pivotal to a better understanding of the mechanisms involved in the implementation of resistances and improvements in anti-melanoma therapies.

In the present study, using a global metabolic profiling, we disclose a down-regulation of the nicotinamide adenine dinucleotide (NAD⁺) levels by a BRAFi (PLX4032). We show that the BRAF/ERK pathway, through STAT5 activation, regulates the transcription of nicotinamide phosphoribosyltransferase (*NAMPT*), the key enzyme in the maintenance of cellular NAD⁺ levels. Importantly, forced *NAMPT* expression dampens the anti-proliferative effect of PLX4032 and leads to major transcriptomic and epigenetic upheavals that turn melanoma cells toward invasive and BRAFi-resistant phenotypes. Together, these observations point to *NAMPT* as a key player in BRAFi resistance and melanoma cell plasticity and as a potential target in melanomas.

Results

Alteration of metabolism by PLX4032 in BRAF^{V600E} melanoma cells

To fully elucidate the effect of PLX4032 on the metabolism of melanoma cells, we performed global metabolic profiling using ultrahigh-performance liquid chromatography-tandem mass spectroscopy (UPLC-MS/MS) of two distinct human melanoma cell lines (UACC62 and WM9) that harbor the BRAF^{V600E} mutation. Analysis of >500 metabolites identified 119 metabolites altered by treatment with PLX4032. A total of 60 metabolites was down-regulated, whereas 59 metabolites were up-regulated (Supplemental Table S1). In this list, only 52 metabolites are annotated in the Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) database or Human Metabolome Database (HMDB). Figure 1A shows the heat map of these annotated metabolites. Furthermore, analysis identified enrichment in glycolysis, citric acid, pyruvate metabolism, and mitochondrial electron transport chain function (Fig. 1B; Supplemental Table S2). All of the metabolites in these pathways were inhibited by PLX4032 treatment, indicating a global inhibition of the carbohydrate

Ohanna et al.

metabolism and energy production. Additionally, we observed that the majority of dipeptides, monoacylglycerols, and long-chain fatty acids species detected in our cells (Supplemental Fig. S1A–F) was up-regulated upon PLX4032 treatment, suggesting a global increase in protein catabolism and lipid metabolism. Note that these metabolites are poorly annotated in the KEGG database or HMDB, and therefore MetaboAnalyst (<http://www.metaboanalyst.ca>) or other tools did not identify any enrichment in these metabolite sets. A schematic view of the metabolic consequences of BRAF inhibition is provided (Supplemental Fig. S1G).

Among the other metabolites affected by PLX4032 treatment, our attention was drawn by the inhibition of NAD⁺ levels and the global inhibition of nicotinamide metabolism (Fig. 1A,B). Because of the key role of NAD⁺ in numerous key cellular functions, such as metabolism (carbohydrate metabolism and energy production), post-translation modifications (ADP ribosylation), and epigenetics (deacetylation), we then focused our attention on the NAD⁺ metabolism. Dose response experiments in A375, WM9, and UACC62 (Supplemental Fig. S2A) showed that PLX4032 decreased cell numbers with an IC50 of ~0.1 μM and a maximal effect between 1 and 5 μM (5 μM was used in the following experiments). We then extended the analysis of NAD⁺ levels in a larger panel of melanoma cell lines and short-term melanoma cell cultures. As expected, PLX4032 inhibited cell proliferation in BRAF^{V600E} but not in wild-type BRAF (BRAF^{WT}) human melanoma cells (Supplemental Fig. S2B). Importantly, PLX4032 reduced intracellular NAD⁺ levels in all BRAF^{V600E} mutated melanoma cell lines but not in BRAF^{WT} human melanoma cells (Fig. 1C). Furthermore, additional BRAFis as well as MEK and ERK inhibitors also decreased NAD⁺ levels, indicating that ERK pathway inhibition impacted NAD⁺ metabolism in melanoma cells (Supplemental Fig. S2C). Note that glucose-starved melanoma cells did not display changes in NAD⁺ levels, ruling out the inhibition of glucose metabolism as a confounding factor for lowering NAD⁺ levels (Supplemental Fig. S2D).

BRAF^{V600E} regulates NAD⁺ levels and controls NAMPT expression through STAT5 activation

The NAD⁺ level is primarily maintained in human cells via the “salvage” pathway, in which NAMPT is the rate-limiting enzyme (Canto et al. 2015). Our results indicated that PLX4032 reduced NAMPT expression (Fig. 2A). Both NAMPT mRNA and NAD⁺ levels declined in parallel in response to PLX4032, which was compatible with the notion that the reduction of NAD⁺ in response to PLX4032 was a consequence of the inhibition of NAMPT expression (Supplemental Fig. S3A). No inhibition of NAMPT expression by PLX4032 was observed in BRAF^{WT} human melanoma cells (Supplemental Fig. S3B).

Analysis of publicly available microarray data sets (GSE20051 and GSE42872) confirmed the inhibition of NAMPT mRNA expression in BRAF^{V600E} melanoma cell lines exposed to BRAFi (Fig. 2B,C).

The inhibition of NAMPT expression in A375 melanoma cells was also observed with the MEK inhibitors U0126, PD98059, and GSK1120212 (Trametinib) and the ERK inhibitor SCH77294, the efficiencies of which were shown on the inhibition of ERK phosphorylation levels (Supplemental Fig. S3C). We also observed the inhibition of NAMPT expression in publicly available microarray data (GSE51115) of melanoma cell lines exposed to the MEK inhibitor PD0325901 (Supplemental Fig. S3D).

Additionally, forced expression of BRAF^{V600E} in normal human melanocytes stimulated the ERK signaling pathway and increased levels of NAMPT (Supplemental Fig. S3E), with a concomitant increase in NAD⁺ (Supplemental Fig. S3F). MEK and ERK inhibitors prevented up-regulation of NAMPT in normal melanocytes (Supplemental Fig. S3E).

Altogether, our data demonstrate that the BRAF/MEK/ERK signaling cascade plays a key role in the control of NAMPT expression and the regulation of NAD⁺ metabolism in melanoma cells.

Changes in NAMPT mRNA levels suggested that the BRAF/ERK pathway controlled NAMPT at the transcriptional level. Using a human NAMPT promoter luciferase reporter construct, we showed that PLX4032 induced a dose-dependent decrease in NAMPT promoter activity in both WM9 (Fig. 2D) and A375 cells (Supplemental Fig. S4A). MEK and ERK inhibitors also strongly reduced NAMPT promoter activity (Supplemental Fig. S4B). To identify the regulatory elements, we assessed the effect of PLX4032 on human NAMPT promoter constructs of different lengths. The results revealed that the BRAF/ERK-responsive element was localized between –1182 and –2682 base pairs (bp) upstream of the transcriptional start site (TSS) (Supplemental Fig. S4C). Within this region, Sun et al. (2014) reported STAT5-binding sites promoting NAMPT gene transcription in response to the mechanical stress signal. Therefore, we hypothesized that in melanoma cells, the ERK pathway might control NAMPT expression through STAT5 activation. Analysis of the –1182/–2682 fragment identified two canonical (TTCxxxGAA) STAT5-binding sites at –1260 (S#1) and –1963 (S#2) (Fig. 2E). Next, we performed ChIP-qPCR (chromatin immunoprecipitation [ChIP] combined with quantitative PCR [qPCR]) assays with control or anti-STAT5 antibodies. When using a set of primers spanning the S#1 STAT5-binding site, we observed an enrichment of chromatin immunoprecipitated with STAT5 antibody (compared with control IgG) that was dramatically reduced in cells exposed to PLX4032 (Fig. 2F, middle panel). In contrast, no enrichment was observed when using sets of primers spanning the S#2 STAT5-binding site or located in the 1-kb proximal region (S#3). These data demonstrated that STAT5 bound to the NAMPT promoter.

In agreement with this observation, we showed in A375 cells that STAT5 inhibitor decreased both basal and BRAF^{V600E}-stimulated NAMPT promoter activity, thereby demonstrating the involvement of STAT5 in the BRAF^{V600E}-induced stimulation of NAMPT transcription (Supplemental Fig. S4D). Additionally, a constitutively active form of STAT5 (Onishi et al. 1998) was sufficient to

BRAF/ERK pathway controls NAMPT expression

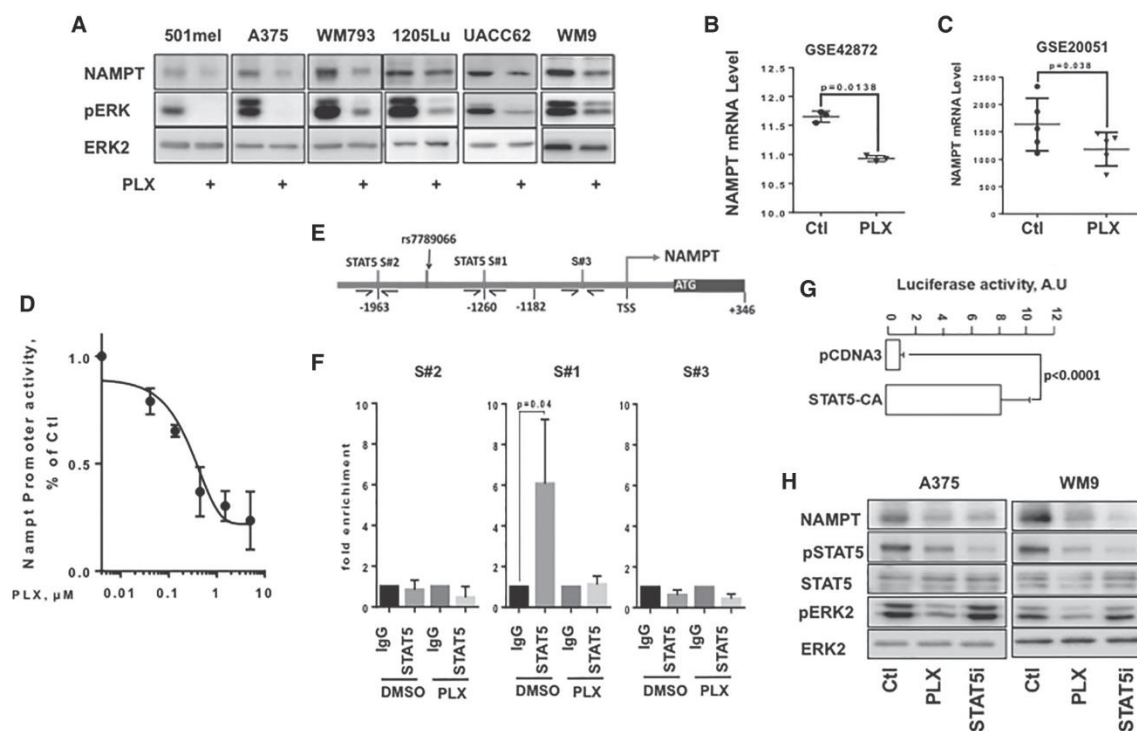


Figure 2. The BRAF/MEK/ERK signaling pathway regulates NAMPT expression at the transcriptional level. (A) Western blot analysis of NAMPT in BRAF^{V600E} melanoma cells exposed or not to 5 μ M PLX4032 for 48 h. Phospho-ERK analysis showed the efficiency of PLX4032, and ERK2 was used as loading control. (B,C) Analysis of publicly available data sets GSE42872 ($n = 3$) and GSE20051 ($n = 5$) of melanoma cells exposed to PLX4032. Scatter plots showing the means \pm SD of the NAMPT mRNA expression are shown. (D) Activity of the NAMPT promoter in WM9 cells exposed to increasing doses of PLX4032 for 48 h. Data are shown as the means \pm SD of three experiments. (E) Schematic representation of the NAMPT promoter showing two canonical (TTCxxxGAA) STAT5-binding sites (S#1 and S#2) and a nonrelevant amplicon (S#3). (F) A375 melanoma cells were left untreated or exposed to PLX4032 for 48 h. Chromatin immunoprecipitation (ChIP) was performed using antibodies directed against STAT5 and/or IgG antibody as a control. The isolated genomic DNA was analyzed by real-time PCR using primers surrounding S#1, S#2, or S#3. Data are shown as the means \pm SD of three experiments. (G) The activity of the NAMPT promoter reporter in A375 melanoma cells transfected with a control vector or a vector encoding a constitutively active form of STAT5. Data are shown as the means \pm SD of three experiments. (H) Western blot analysis of NAMPT, STAT5, and ERK in A375 and WM9 control cells or cells exposed to 5 μ M PLX4032 or 100 μ M STAT5 inhibitor for 48 h.

drive the transactivation of the *NAMPT* promoter (Fig. 2G).

Furthermore, in both A375 and WM9 cells, PLX4032 inhibited both ERK and STAT5 phosphorylation, while the STAT5 inhibitor efficiently reduced STAT5 phosphorylation but did not affect ERK phosphorylation (Fig. 2H). Both BRAF and STAT5 inhibitors decreased NAMPT expression (Fig. 2H) and NAD⁺ levels (Fig. 1D; Supplemental Fig. S4E). In the NRAS^{Q61K} mutated melanoma HMVII cells, PLX4032 had no effect on either ERK or STAT5 phosphorylation, while the STAT5 inhibitor efficiently reduced STAT5 phosphorylation and NAMPT expression (Supplemental Fig. S4F). The STAT5 inhibitor also translated into a parallel decrease in NAD⁺ levels (Supplemental Fig. S4G).

Taken together, these data demonstrate that the BRAF/ERK pathway regulates NAMPT expression and, consequently, NAD⁺ levels at the transcriptional level through STAT5 activation.

NAMPT controls melanoma cell proliferation

To determine the impact of NAD⁺ metabolism on melanoma cell proliferation, we silenced NAMPT using siRNAs and inhibited its function with FK866, a highly specific noncompetitive inhibitor. As expected, two different NAMPT siRNAs efficiently inhibited NAMPT expression in WM9 cells (Fig. 3A) and NAD⁺ levels (Fig. 3B). FK866 did not affect NAMPT expression (Fig. 3A) but decreased NAD⁺ levels (Fig. 3B). Similar results were obtained in A375 and UACC62 cells (Supplemental Fig. S5A,B). FK866 caused a dose-dependent reduction of NAD⁺ level in the three cell lines tested, with a similar IC₅₀ of \sim 0.3 μ M and a maximal effect at 1 μ M (Supplemental Fig. S5C). FK866 also caused a dose-dependent inhibition of cell number, with a IC₅₀ of \sim 3 μ M in A375 and UACC62 and 0.5 μ M in WM9. In the three cell lines, the maximal effect was obtained between 1 and 5 μ M; 5 μ M was used in the following experiments (Supplemental Fig. S5D).

Ohanna et al.

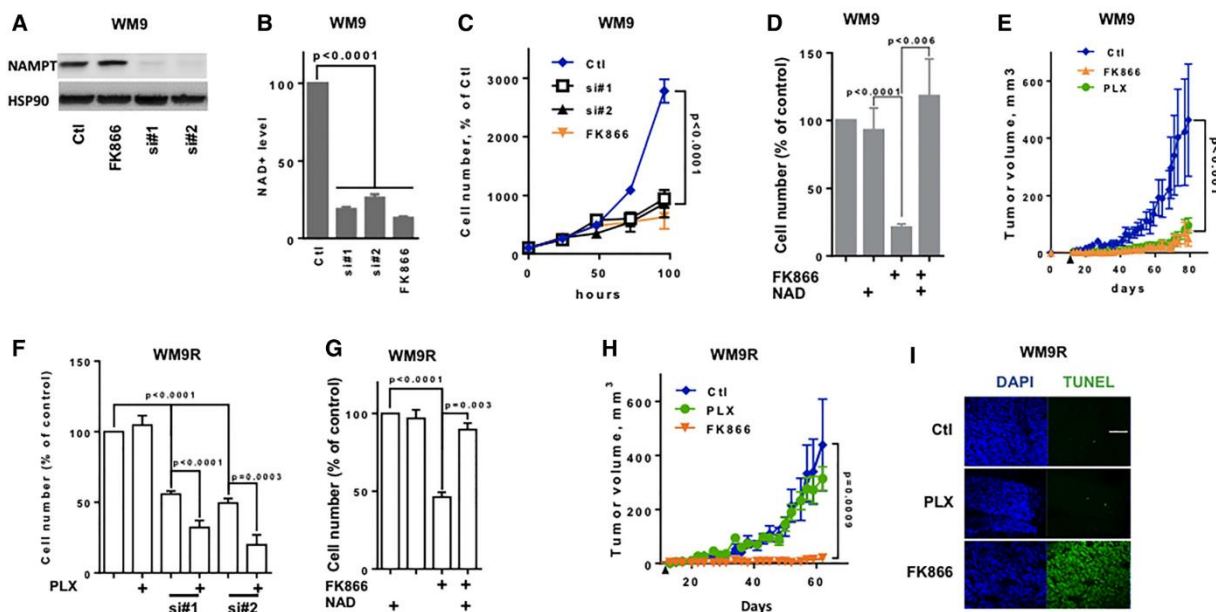


Figure 3. NAMPT inhibition decreases melanoma cell proliferation and xenograft development and restores PLX4032 sensitivity. (A) Western blot analysis of NAMPT expression in WM9 melanoma cells transfected with control (Ctl) siRNA or two different NAMPT siRNAs (si#1 and si#2) or exposed to a NAMPT inhibitor (FK866). HSP90 was used as loading control. (B) Intracellular NAD^+ levels in WM9 melanoma cells treated as in A. Values represent the means \pm SD of three independent experiments. (C) Proliferation of WM9 melanoma cells treated as in A. Cells were trypsinized and counted each day. Values represent the means \pm SD of three independent experiments. (D) Cell number of WM9 melanoma cells exposed to 5 μM FK866 or 500 μM FK866 plus NAD^+ for 72 h. Values represent the means \pm SD of three independent experiments. (E) Growth curve of tumor xenografts after subcutaneous injection of WM9 cells. Mice (six per group) were treated or not with PLX4032 or FK866. Data are shown as the means \pm SD of tumor volume. The black arrow indicates the beginning of the treatment. (F) PLX4032-resistant WM9 melanoma cells were transfected with control or NAMPT siRNA (si#1 and si#2) and subsequently exposed to 5 μM PLX4032. After 72 h, the cells were counted. The histogram represents the means \pm SD of three independent experiments. (G) Cell number of PLX4032-resistant WM9 melanoma cells exposed to 5 μM FK866 or 500 μM FK866 plus NAD^+ for 72 h. Data are presented as the means \pm SD of three independent experiments. (H) Growth curve of tumor xenografts after subcutaneous injection of WM9 cells resistant to PLX4032. Mice (six per group) were treated with vehicle, PLX4032, or FK866. Data are shown as the means \pm SD of tumor volume. The black arrow indicates beginning of the treatment. (I) Frozen sections of xenografts were stained with DAPI and subjected to transferase-mediated UTP nick end labeling (TUNEL). Representative images are shown.

Accordingly, we showed that FK866 or NAMPT knock-down by siRNA elicited a dramatic inhibition of WM9 melanoma cell proliferation (Fig. 3C). Interestingly, the addition of exogenous NAD^+ to the culture medium prevented FK866-mediated inhibition of cell proliferation, thereby demonstrating that the effect of FK866 was causally associated with NAD^+ depletion and not with non-specific effects (Fig. 3D). Similar data were obtained in the A375 and UACC62 cell lines (Supplemental Fig. S5E,F). Flow cytometry analysis of DAPI-permeable cells showed that NAMPT inhibition by siRNA or FK866 increased melanoma cell death (Supplemental Fig. S6A).

We next monitored the effect of PLX4032 and FK866 in vivo. WM9 cells were subcutaneously engrafted into 6-wk-old female athymic nude mice. When the tumors became palpable (0.1–0.2 cm^3), the mice were treated every 2 d with the vehicle (labrafil) or PLX4032 or FK866 alone. Compared with the vehicle, both PLX4032 and FK866 treatments impaired WM9 melanoma cell xenograft growth (Fig. 3E). PLX4032 and FK866 caused no

weight loss in the treated mice (data not shown). qRT-PCR analysis revealed decreased *NAMPT* expression in PLX4032-treated tumors (Supplemental Fig. S6B). A reduced NAD^+ level was also observed (Supplemental Fig. S6C).

Next, we evaluated the effect of NAMPT inhibition on BRAFi-resistant melanoma cells. As expected, BRAFi-resistant WM9 melanoma cells (WM9R) were not sensitive to PLX4032's effects but were sensitive to NAMPT knockdown by two siRNAs (Fig. 3F) and NAMPT inhibition by FK866 (Fig. 3G). Importantly, the effects of FK866 were reversed by addition of NAD^+ . Interestingly, although NAMPT inhibition had a marked effect on BRAFi-resistant cells, we observed a statistically significant restoration of PLX4032 sensitivity in BRAFi-resistant cells upon depletion of NAMPT (Fig. 3F). Similar observations were obtained in BRAFi-resistant A375 melanoma cells (A375R) (Supplemental Fig. S7A,B).

As expected, xenografts derived from WM9R cells were not affected by PLX4032. In contrast, FK866 inhibited

tumor growth (Fig. 3H). The combination of the low-dose FK866 resulted in additive growth inhibition. Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated UTP nick end labeling (TUNEL) staining revealed apoptotic cells in tumor sections from FK866-treated mice compared with control or PLX4032-treated mice (Fig. 3I).

We performed in vivo experiments on A375R cells (Corazao-Rozas et al. 2013) with 25 mg/kg PLX4032 or two doses of FK866 (1.5 mg/kg and 15 mg/kg) alone or with the low FK866 dose in combination with PLX4032 (Supplemental Fig. S7C). In contrast to PLX4032, increasing doses of FK866 dose-dependently reduced melanoma progression. As expected, a reduction in NAD⁺ was observed in the FK866-treated tumors (Supplemental Fig. S7D). The combination of both PLX4032 and FK866 resulted in a synergistic inhibition of melanoma growth. Thus, both in vitro and in vivo, FK866 treatment caused melanoma cell death and restored PLX4032 sensitivity in BRAFi-resistant melanoma cells. Altogether, the striking effect of NAMPT inhibition on BRAFi-resistant melanoma xenografts suggested that targeting NAMPT might be a valid therapeutic option to overcome BRAFi resistance.

NAMPT induces drug resistance and activates an invasive gene program

We next examined whether NAMPT might affect the response to PLX4032. Forced expression of NAMPT (Fig. 4A) enhanced the intracellular NAD⁺ level (Fig. 4B) but did not significantly affect proliferation (data not shown). Furthermore, forced expression of NAMPT or addition of exogenous NAD markedly decreased the efficiency of PLX4032 in inhibiting the proliferation of melanoma cells (Fig. 4C,D). To understand how NAMPT can favor the acquisition of resistance to BRAFi, we performed a transcriptomic analysis of three different melanoma cell lines (WM9, M14, and SKMel28) in control conditions or after forced expression of NAMPT. Differential expression and statistical analysis indicated that 1111 genes were regulated (449 down-regulated and 662 up-regulated). Ingenuity Pathway Analysis identified a striking increase in the functions associated with cell movement and migration (top 10 functions) (Supplemental Table S3). Among the top 10 upstream activators, TNF, TGFB, and SMARCA4 were increased, while MITF was decreased (Table 1). These observations indicated that increased NAMPT

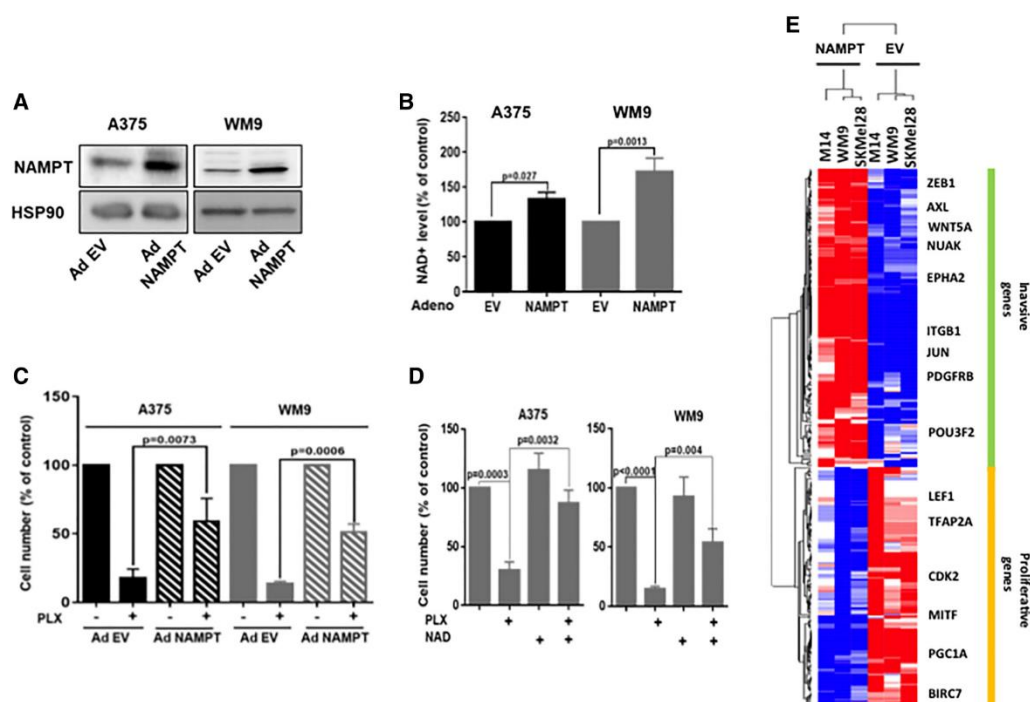


Figure 4. NAMPT affects the sensitivity of melanoma cells to BRAFis. (A) Western blot analysis of NAMPT expression in A375 and WM9 melanoma cells transduced with a control empty adenovirus (EV) or an adenovirus encoding NAMPT (Ad NAMPT). HSP90 was used as a loading control. (B) Intracellular NAD⁺ levels in A375 and WM9 melanoma cells transduced with a control or NAMPT adenovirus. Values represent the means + SD of three independent experiments. (C) A375 and WM9 melanoma cells transduced with a control or NAMPT adenovirus were exposed to 5 μM PLX4032. After 72 h, the cells were counted. The histogram represents the means + SD of three independent experiments. (D) The number of A375 and WM9 melanoma cells exposed to 5 μM FK866 or 500 μM FK866 plus NAD⁺ for 72 h. Values represent the means + SD of three independent experiments. (E) Heat map from transcriptomic analysis showing the gene expression level and clustering according to the invasive and proliferative signature from Verfaillie et al. (2015). (Blue) Down-regulated genes; (red) up-regulated genes.

Ohanna et al.

Table 1. Potential upstream regulators of the NAMPT transcriptional program in melanoma cells

Upstream regulator	Z-score	P-value
TNF	6.317	2.05×10^{-26}
TGFB1	5.092	1.47×10^{-21}
IFNG	6.206	1.54×10^{-20}
IL1B	5.717	5.93×10^{-18}
MITF	-5.063	9.42×10^{-18}
NFkB	5.825	1.69×10^{-16}
TP53	4.242	3.00×10^{-16}
SMARCA4	5.571	3.33×10^{-16}
U0126	-3.151	4.16×10^{-16}
TREM1	-0.062	9.93×10^{-15}

Upstream regulator analysis in Ingenuity Pathway Analysis was used to predict the potential upstream regulators of the genes differentially regulated between control and NAMPT-overexpressing melanoma cells. The top 10 predicted upstream regulators are shown.

expression may activate TNF and TGF β pathways (Supplemental Fig. S8A,B). Interestingly, we also observed that genes down-regulated by NAMPT clustered with the proliferation gene profile described previously (Hoek et al. 2008; Verfaillie et al. 2015), while the up-regulated genes were associated with the invasive genes (Fig. 4E). Therefore, NAMPT induced a phenotypic switch toward the invasive phenotype that has been frequently associated with resistance to targeted therapies.

Of note, SMARCA4 (BRG1), which is activated in our analysis, is a MITF partner and a key player in the regulation of chromatin remodeling, suggesting that increased NAMPT expression might affect the epigenetic landscape.

NAMPT induced a reshuffling of the epigenetic landscape

To identify the effect of NAMPT on the epigenetic landscape, we performed ChIP-seq (ChIP combined with high-throughput sequencing) analyses of key activating (H3K27ac and H3K4me3) or repressive (H3K27me3) histone marks. Comparative analysis of the ChIP-seq data using read density matrix clustering (SeqMiner) identified 41,000 peaks within 12 clusters (Fig. 5A), among which six (1–6) out of 12 showed an alteration of histone marks by NAMPT. Clusters 2, 3, and 5 showed an increase in H3K4me3 marks, and clusters 1, 2, and 6 showed an increase in H3K27me3 marks. H3K27ac marks were decreased in cluster 4 and increased in cluster 3 together with H3K4me3 marks (Supplemental Fig. S9). Further analysis indicated that among the 662 up-regulated genes, 356 displayed enhanced active marks (H3K27ac and H3K4me3) and/or decreased repressive marks (H3K27me3) (Fig. 5B). Only 15 genes overlapped with a decrease in active marks and/or an increase in repressive marks (Supplemental Fig. S10A). Among the 449 down-regulated genes, 68 overlapped with a decrease in active marks and/or an increase in repressive marks (Fig. 5C),

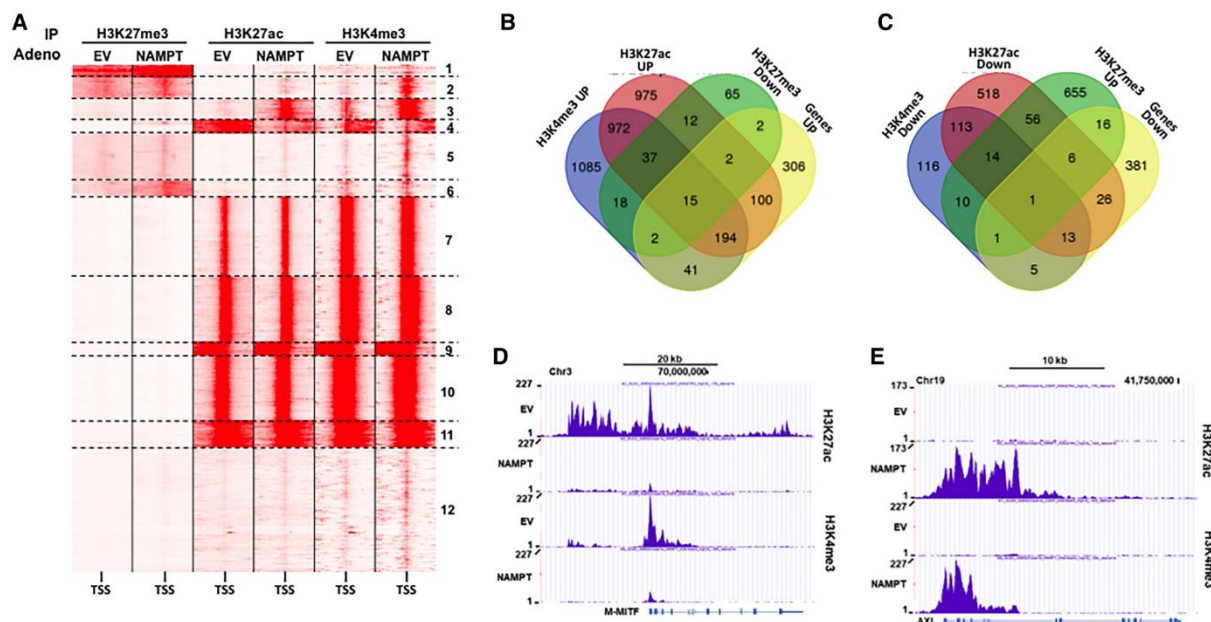


Figure 5. NAMPT changes the histone mark landscape. (A) SeqMiner cluster heat maps showing signal intensities for H3K27me3, H3K27ac, and H3K4me3 in the region ± 5 kb around the TSS in control or NAMPT-overexpressing 501mel melanoma cells. (B) Venn diagram displaying the intersection of genes up-regulated by NAMPT with active histone marks up-regulated and repressive histone marks down-regulated by NAMPT. (C) Venn diagram displaying the intersection of genes down-regulated by NAMPT with active histone marks down-regulated and repressive histone marks up-regulated by NAMPT. (D) UCSC browser view of H3K27ac and H3K4me3 ChIP-seq binding density at the MITF locus. (E) UCSC browser view of H3K27ac and H3K4me3 ChIP-seq binding density at the AXL locus.

BRAF/ERK pathway controls NAMPT expression

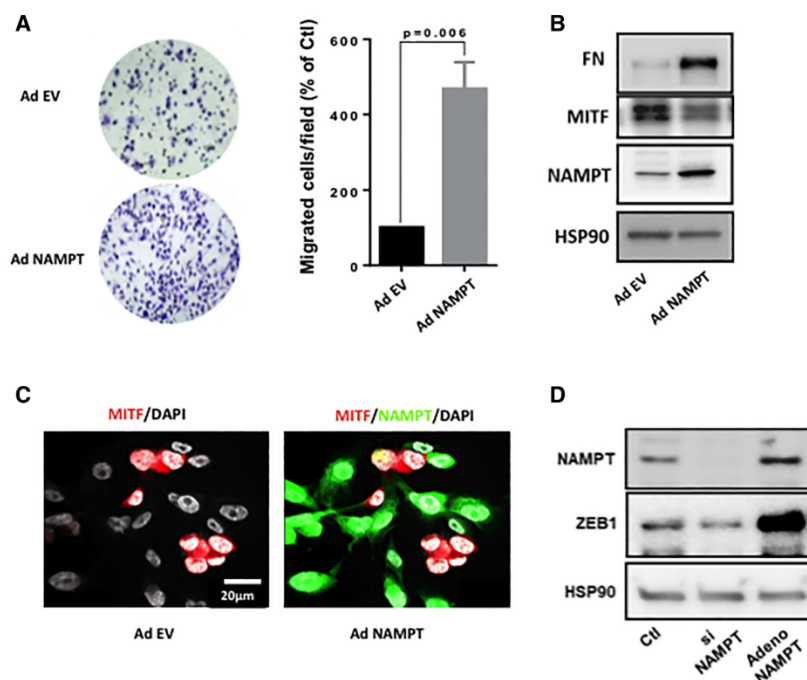


Figure 6. NAMPT enhances the motile capacity of melanoma cells. (A) Boyden chamber experiments of control or NAMPT-overexpressing WM9 melanoma cells. Values represent means + SD of three independent experiments. Representative images are shown. (B) Western blot analysis of MITF, fibronectin (FN), and NAMPT of control or NAMPT-overexpressing WM9 melanoma cells. HSP90 was used as a loading control. (C) Immunofluorescence of NAMPT and MITF in WM9 cells. (D) Western blot analysis of NAMPT and ZEB1 NAMPT in WM9 melanoma cells transfected with siRNA to NAMPT or infected with NAMPT adenovirus. HSP90 was used as a loading control.

and 21 genes had an increase in active marks (H3K27ac and H3K4me3) and/or a decrease in repressive marks (Supplemental Fig. S10B). A track view of our data in the University of California at Santa Cruz (UCSC) browser of genes associated with the proliferative profile such as M-MITF (Fig. 5D), CDK2, and BIRC7 (Supplemental Fig. S11A,B) or with the invasive profile such as AXL (Fig. 5E), ITGB4, and WNT5A (Supplemental Fig. S11C,D) suggested that forced NAMPT expression induced a reshaping of the epigenetic landscape that led to a transcriptomic switch toward the invasive phenotype associated with resistance to targeted and immunotherapies (Muller et al. 2014; Fallotta et al. 2017).

NAMPT induced a switch toward an invasive phenotype

Finally, as predicted by the epigenetic and transcriptomic analysis, Boyden chamber experiments demonstrated that forced NAMPT expression increased the motile capacity of WM9 cells (Fig. 6A). Western blot analysis confirmed the increased expression of NAMPT and demonstrated the up-regulation of fibronectin expression and an inhibition of MITF expression (Fig. 6B), in agreement with a switch toward an invasive phenotype. These results have been obtained also in two additional cell lines: 501Mel and SKMel28 (Supplemental Fig. S12A–D). Furthermore, transduction of WM9 at low multiplicity of infection (MOI) with NAMPT-GFP adenovirus resulted in expression of NAMPT in ~70% of cells, visualized by GFP. Cells exhibited a loss of MITF expression exclusively in GFP-positive cells (Fig. 6C). Finally, we showed that ZEB1 (Caramel et al. 2013), which has been reported as a key player in pseudo-EMT (epithelial–mesenchymal tran-

sition) and phenotypic switch in melanoma cells, was down-regulated by NAMPT silencing and up-regulated by forced NAMPT expression (Fig. 6D). In line with that, ZEB1 was dramatically increased in the transcriptomic analysis and underwent deep epigenetic reshuffling (Supplemental Fig. S12E). In conclusion, these data unveil how NAMPT, through epigenetic remodeling of genes that mediate the phenotypic switch, regulates the motile properties of melanoma cells.

Discussion

Here, our findings reveal that the BRAF/MEK/ERK signaling cascade impacts cellular metabolism beyond its well-known effect on glucose metabolism. Indeed, we showed that metabolites from the glycolytic pathway, such as 3-phosphoglycerate, phosphoenolpyruvate, pyruvate, and lactate were down-regulated in PLX4032-treated melanoma cells, while upstream metabolites (fructose 6-P, fructose 1-6-P₂, and glyceraldehyde 3-P) were unaffected. Of note, the glucose 6-P level was decreased (log fold change = -1.9) but did not reach the statistical threshold (false discovery rate = 0.058). This observation can be explained by the inhibition of glucose uptake (Parmenter et al. 2014) and hexokinase 2 expression (Parmenter et al. 2014; Delgado-Goni et al. 2016) caused by BRAF inhibition. In line with that, PLX4032 induced an alteration of the tricarboxylic acid (TCA) cycle, as illustrated by a decrease in α -ketoglutarate, fumarate, and malate levels.

Remarkably, melanoma cells treated with PLX4032 displayed evidence of enhanced lipid metabolism, since a global increase in several types of lipids (monoacyl-glycerol and fatty acids) was observed. These findings suggest

Ohanna et al.

that upon BRAF inhibition, melanoma cells shift from glucose to lipid metabolism and may use fatty acid β -oxidation as a source of energy. Further studies have been undertaken to dissect the molecular mechanisms of this metabolic rewiring and determine the role of lipid metabolism in the effects of PLX4032.

Another key metabolic alteration caused by PLX4032 is the decrease in the cellular content of NAD⁺. Therefore, although melanoma cells exposed to PLX4032 implement alternative energy production pathways, these pathways would be impaired by the decrease in NAD⁺ levels, as NAD⁺ is a key cofactor in glycolysis, citric acid cycle, and β -oxidation.

Our results reveal that NAMPT, the rate-limiting enzyme in the NAD⁺ salvage pathway, is positively controlled by the BRAF/MEK/ERK pathway. Consistent with this observation, NAMPT shows higher expression in melanoma cells that frequently harbor a constitutive activation of the ERK pathway, compared with melanocytes or nevi (Wachsman et al. 2011; Maldini et al. 2013). We provided evidence that BRAF^{V600E} controls NAMPT expression at the transcriptional level and identified the transcription factor STAT5 as the main effector of BRAF^{V600E} effects on NAMPT expression. In line with that, it has been shown previously that STAT5 is activated by the ERK pathway (Maki and Ikuta 2008). Furthermore, we demonstrated that the STAT5 inhibitor decreased NAMPT expression and the NAD⁺ cellular content in both BRAF^{WT} and BRAF mutated melanoma cells. Accordingly, STAT5 was reported to favor melanoma cell proliferation and survival, and the constitutive activation of STAT5 is correlated with the aggressiveness of melanoma (Mirmohammadsadegh et al. 2006; Hassel et al. 2008). Together, these data suggest that STAT5 inhibition alone or in combination with BRAFis might be a valuable strategy for melanoma treatment. Of note, STAT5 is also essential for T-cell survival and immune responses toward melanoma tumors (Tripathi et al. 2010). Therefore, the benefit/risk ratio of using STAT5 inhibitors must be carefully evaluated.

Next, we showed that the inhibition of NAMPT expression by specific siRNA or activity by the pharmacological inhibitor FK866 decreased the NAD⁺ content and proliferation of melanoma cells. A previous study reported that among the six cell lines tested, only one cell line (HMCB) displayed a reduction of proliferation in response to NAMPT inhibition (Maldini et al. 2013). NAMPT inhibition also promoted a marginal effect on mouse B16 melanoma cell proliferation *in vitro* (Grolla et al. 2015).

NAMPT inhibition also affects the proliferation of BRAFi-resistant melanoma cells and at least partially restores the response to PLX4032. *In vivo*, FK866 efficiently inhibited the development of BRAFi-sensitive or BRAFi-resistant melanoma tumor xenografts, and low doses of FK866 (1.5 mg/kg) resensitized BRAFi-resistant tumors to PLX4032. Taken together, these observations suggest that NAMPT inhibition might represent a rational strategy to overcome resistance to targeted therapies.

Interestingly, NAMPT-overexpressing melanoma cells were more resistant to the effects of PLX4032 than the pa-

rental control cells, demonstrating the causal role of NAMPT in the resistance to BRAFis. Furthermore, transcriptomic and ChIP-seq analyses showed that NAMPT overexpression modified active (H3K27ac and H3K4me3) and repressive (H3K27me3) histone marks and gene expression profiles favoring the phenotypic switch of melanoma cells toward the invasive phenotype, characterized by an increased invasiveness and expression of genes associated with pseudo-EMT (ZEB1 and FN1) and resistance to targeted and immunotherapies (Muller et al. 2014; Riesenberg et al. 2015; Falletta et al. 2017).

Beyond its role in metabolism and energy-producing pathways (glycolysis, citric acid cycle, glutaminolysis, and β -oxidation), NAD⁺ serves as a cofactor for numerous other enzymes and pathways. SIRT6 and PARP1 require NAD⁺ for functioning (Bai and Canto 2012; Houtkooper et al. 2012). Both enzymes play a critical role in melanoma biology, as (1) melanoma cells overexpressing SIRT1 were more resistant to BRAFis (Ohanna et al. 2014), and (2) PARP1 inhibition altered the invasive properties of melanoma cells (Rodriguez et al. 2013). Furthermore, SIRT1 (Jing and Lin 2015) and PARP1 (Ciccarone et al. 2017) have a direct involvement in epigenetic regulation that could explain the deep changes in histone marks evoked by NAMPT.

Additionally, NAD⁺ might have a direct impact on transcriptional regulation through its binding to the transcriptional corepressors CtBPs (Balasubramanian et al. 2003) that has been also involved in epigenetic regulation through its interaction with histone demethylase KDM1A (LSD1) (Ray et al. 2014). Notably, CtBP2 was reported to inhibit the expression of MITF, a key driver of melanoma phenotypic switching (Liang et al. 2011).

Now, it remains to be understood why NAMPT affects only a specific subset of genes. Of note, numerous MITF target genes are regulated by NAMPT, and our analyses showed an activation of the BRG1 pathway. BRG1 interacts with MITF in chromatin remodeling complexes that also contain KDM1A (Laurette et al. 2015), indicating a link between the NAD⁺, CtBP, and MITF/BRG1 complexes and specific histone modifications at the regions occupied by these complexes. Of course, NAD⁺ may affect other chromatin remodeling complexes that are not positioned at MITF target loci.

Reflecting their high metabolic demand, malignant cells display higher NAD⁺ levels than their normal counterparts and are particularly sensitive to NAD⁺ depletion (Kennedy et al. 2016). A recent report demonstrated that IDH1 mutant cancer cells showed extreme vulnerability to NAD⁺ depletion (Tateishi et al. 2015). None of the melanoma cells used in the present study showed an IDH1 mutation, but we cannot rule out the likelihood that IDH1 activity is affected by nongenetic alterations. Furthermore, the sensitivity (at least *in vitro*) of NRAS mutated melanoma to FK866 suggests that NAMPT inhibition might be an alternative therapeutic strategy in this subset of melanomas that has a poorer outcome compared with other melanomas (Johnson et al. 2016). Several phase 1 clinical trials using NAMPT inhibitors (CHS828 or FK866) have been conducted in patients with advanced

BRAF/ERK pathway controls NAMPT expression

solid tumor malignancies, including melanomas (Ravaud et al. 2005; Holen et al. 2008; von Heideman et al. 2010). Toxicities are globally manageable, but no overall tumor response was described. However, in a clinical trial that enrolled two patients with melanomas, one patient showed disease stabilization (Holen et al. 2008).

Despite the huge progress in metastatic melanoma treatment using checkpoint immunotherapies or targeted therapies (Luke et al. 2017), most patients are resistant or will develop resistance to these treatments. Resistance can be driven by genetic events, but phenotypic switch, which is generated by epigenetics events and rewiring of transcriptomic and metabolic networks, is the main cause of resistance (Hugo et al. 2015). Our study indicates that NAMPT functions downstream from BRAF/ERK pathways and plays a pivotal role in the switch of melanoma cells toward the invasive and resistant phenotype. Therefore, it might be worthwhile to reassess NAMPT inhibitors in the treatment of melanomas resistant to targeted therapies but also as adjuvant therapy to prevent the acquisition of resistance in the course of the treatment.

Materials and methods

Cell cultures and reagents

Human melanoma cell lines and short-term cultures derived from different patients with metastatic malignant melanoma cells were grown in DMEM supplemented with 7% FBS at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂. PLX4032-sensitive and PLX4032-resistant melanoma cells were described previously (Bonet et al. 2012; Ohanna et al. 2014). Lipofectamine RNAiMAX and Opti-MEM medium were purchased from Invitrogen. FK866 was obtained from Sigma, U0126 and GSK1120212 were purchased from Euromedex, and PD98059 and SCH77294 were obtained from Selleck Chemicals. The STAT5 inhibitor (CAS 285986-31-4) was purchased from Sigma. Intracellular NAD⁺ was measured using the NAD/NADH quantitation kit from Sigma according to the manufacturer's instructions.

Metabolomic profiling

Briefly, samples were prepared using the automated MicroLab STAR system (Hamilton Company). Recovery standards were added prior to the first step in the extraction process for quality control purposes. Cell lysates were precipitated using methanol with vigorous shaking for 2 min followed by centrifugation. The resulting extract was divided into five fractions: two samples for analysis using two separate reverse-phase (RP)/UPLC-MS/MS methods with positive ion mode electrospray ionization (ESI), one sample for analysis through RP/UPLC-MS/MS with negative ion mode ESI, one sample for analysis through hydrophilic interaction chromatography (HILIC)/UPLC-MS/MS with negative ion mode ESI, and one sample reserved for backup. The samples were briefly placed on a TurboVap (Zymark) to remove the organic solvent. The sample extracts were stored overnight under nitrogen prior to preparation for analysis. Chromatography analyses were performed using Waters Acquity UPLC and a Thermo Scientific Q-Exactive high-resolution/accurate mass spectrometer interfaced with a heated ESI (HESI-II) source and an Orbitrap mass analyzer operated at 35,000 mass resolution. The sample extract was dried and subsequently reconstituted in solvents compatible

with each method (Miller et al. 2015). The informatics system comprised four major components: the laboratory information management system (LIMS), the data extraction and peak-identification software, data processing tools for quality control and compound identification, and a collection of information interpretation and visualization tools for subsequent data analysis. The hardware and software foundations for these informatics components were the LAN backbone and a database server running Oracle 10.2.0.1 Enterprise Edition (Evans et al. 2009).

Western blot assays

Western blotting was performed as described previously (Hilmi et al. 2008; Bertolotto et al. 2011). Briefly, 30 µg of cell lysates was separated using SDS-PAGE, transferred onto a PVDF membrane, and subsequently exposed to the appropriate antibodies: anti-ERK2 (clone D-2; Santa Cruz Biotechnology, sc-1647), anti-phospho-ERK1/2 (Thr202/Tyr204) (Cell Signaling Technology, Inc., 2370), anti-BRAF (clone F-7; Santa Cruz Biotechnology, sc-5284), anti-NAMPT (Sigma, B5812), anti-phospho-STAT5 (Tyr694) (Ozyme, 9351), anti-STAT5 (Ozyme, 9363), and anti-HSP90 (Santa Cruz biotechnology, sc-13119). The proteins were visualized using the ECL system (Amersham). The Western blots shown are representative of at least three independent experiments.

Transient transfection of siRNA

Briefly, a single pulse of 50 nM siRNA was administered to the cells at 50% confluency through transfection with 5 µL of Lipofectamine RNAiMAX in Opti-MEM medium (Invitrogen). NAMPT siRNAs (On Target Plus, Dharmacon) were obtained from ThermoFisher Scientific.

Cell proliferation

The cells (10 × 10³ cells) were seeded onto 12-well dishes and, at 48 h after transfection or treatment, trypsinized from days 1 to 4 and counted in triplicate using a hemocytometer. The experiments were performed at least three times.

Luciferase reporter assays

NAMPT promoter luciferase reporters were provided by Dr. J.G.N. Garcia (University of Arizona). We used three constructs containing the following regions of human NAMPT: -2682/+346, -1182/+346, and -582/+346 bp (Sun et al. 2014). A375 melanoma cells were transiently transfected as described previously using Lipofectamine reagent (Invitrogen) (Bertolotto et al. 1998). Briefly, the cells were transiently transfected with 0.3 µg of NAMPT reporter constructs and 0.05 µg of pCMVβGal to control the variability in transfection efficiency. The transfection medium was changed after 6 h, and, where indicated, the cells were transfected with an empty vector or a vector encoding BRAF^{V600E} or treated with PLX4032 or a STAT5 inhibitor. The cells were assayed for luciferase and β-galactosidase activities after 48 h. The experiments were repeated at least three times.

Colony formation assay

Human melanoma cells were seeded onto six-well plates. The cells were subsequently placed in an incubator at 37°C and 5% CO₂. Colonies of cells were grown before being stained with 0.04% crystal violet/2% ethanol in phosphate-buffered saline

Ohanna et al.

(PBS) for 30 min. Photographs of the stained colonies were captured. The colony formation assay was performed in duplicate.

Cell death analysis by flow cytometry

Cells were seeded at a density of 50 000 cells per well in 24-well plates and treated with FK866 for the indicated times. Cells were harvested using accutase enzyme, washed twice with ice-cold PBS, resuspended in medium with 1 µg/mL DAPI, and incubated for 15 min at room temperature (25°C) in the dark. Samples were immediately analyzed by a flow cytometer (MACS Quant) using a laser at 405-nm excitation with a band-pass filter at 425 and 475 nm for DAPI detection.

mRNA preparation and real-time qPCR

The mRNA was isolated using TRIzol (Invitrogen) according to a standard procedure. qRT-PCR was performed using SYBR Green I (Eurogentec) and Multiscribe reverse transcriptase (Applied Biosystems) and subsequently monitored using the ABI Prism 7900 sequence detection system (Applied Biosystems). The detection of the hRSP14 gene was used to normalize the results. Primer sequences for each cDNA were designed using either Primer Express software (Applied Biosystems) or qPrimer Depot (<http://primerdepot.nci.nih.gov>), and these sequences are available on request.

ChIP-qPCR

Cross-linked chromatin was prepared as described previously (Aparicio et al. 2005). STAT5 ChIP was performed on unstimulated and PLX4032-stimulated A375 melanoma cells (5×10^7 cells per condition) using STAT5 antibody (D2O6Y, Ozyme) or an isotype-matched control immunoglobulin (Ozyme) and analyzed by real-time PCR. Data are expressed as a percentage of input DNA.

The genomic sequence of NAMPT (−3000 relative to the TSS up to the polyA) was searched for STAT5-binding sites using Genomatix software (<https://www.genomatix.de>). Forward and reverse real-time PCR primers used for the human genomic DNA analysis were as follows (primers specific for STAT5-binding site-containing regions are underlined, and the others are control primers): F-1946 (5'-TTCCTTCTTTGAATTGCACTCC-3'), R-2052 (5'-GATTACAGACGTGAGCCACC-3'), F-2790 (5'-TTTCTCAGGTCCTCTACATGC-3'), R-2880 (5'-GCCTGTAGTCC CAGCTTCTC-3'), F-1334 (5'-ACTTCCATGATCTTTGCCCT-3'), and R-1523 (5'-GGTAGTGGAACCTTGTGAATTGAG-3').

Boyden chamber experiments

Cell migration was assessed using a modified Boyden chamber assay with 8-µm pore filter inserts for 24-well plates (BD Bioscience). Cells were seeded on the upper chamber of a transwell, and DMEM and 7% FBS were placed into the lower chamber. Cells that adhered to the underside of the filters were fixed with 4% paraformaldehyde (PFA) and stained with 0.4% crystal violet, and five random fields at 20× magnification were counted. Results represent the average of triplicate samples from three independent experiments.

Immunofluorescence studies

Cells were fixed and permeabilized as described previously (Ohanna et al. 2011) before being exposed to anti-MITF or anti-NAMPT antibodies. Cells were washed three times with PBS, incubated for 1 h with 1:1000 dilution anti-mouse Alexa

fluor 594-labeled and anti-rabbit Alexa fluor 488-labeled secondary antibodies (Invitrogen), and mounted using Gel/Mount (Biomedica Corp.). Frozen sections of melanoma xenografts were fixed with 4% PFA (Sigma-Aldrich) for 15 min and subsequently blocked with 10% normal goat serum (Vector Laboratories) with or without 0.1% Triton X-100 (Bio-Rad) in PBS for 30 min at room temperature. The samples were incubated with primary antibodies overnight at +4°C followed by the appropriate secondary fluorescent-labeled antibodies (Invitrogen Molecular Probes) for 1 h at room temperature and mounted using Gel/Mount (Biomedica Corp.). The nuclei were counterstained with DAPI. Apoptosis in melanoma xenografts was detected through a TUNEL assay using an in situ cell apoptosis kit (R&D Systems). Immunofluorescence was examined and photographed using a Zeiss Axiophot microscope equipped with epifluorescence illumination.

Gene expression profiling and bioinformatics

Total RNA of three different cell lines transfected with control scrambled siRNA or siRNA to NAMPT was isolated with Trizol. The RNA integrity (RIN) was assessed by using an Agilent Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies) (RIN >8). RNA samples were then labeled with Cy3 dye using the low RNA input QuickAmp kit (Agilent) as recommended by the supplier. Labeled cRNA probes (825 ng) were hybridized on 8x60K high-density SurePrint G3 gene expression Human Agilent microarrays. Normalization of microarray data was performed using the Limma package available from Bioconductor (<http://www.bioconductor.org>). Inter-slide normalization was performed using the quantile method. Means of ratios from all comparisons were calculated, and *t*-test analysis was performed. Differentially expressed genes were selected based on Abs log fold change > 1 and adjusted *P*-value < 0.05. Data from expression microarrays were analyzed for enrichment in biological themes using Ingenuity Pathway Analysis software (<http://www.ingenuity.com>).

ChIP-seq

501Mel cells infected with empty adenovirus (EV) or NAMPT adenovirus were subjected to ChIP using antibodies for H3K27ac, H3K27me3, and H3K4me3 (Active Motif). Libraries from ChIP and input DNA were then sequenced on a NextSeq500 sequencer (Illumina) with single-end 75-bp read chemistry.

Reads from ChIP-seq were mapped to the human genome release hg19 using the BWA (Li and Durbin 2009) algorithm with default settings. Peaks were called using MACS2 (Zhang et al. 2008), comparing the immunoprecipitation samples against total chromatin input. Peaks were then annotated according to their positions on known exons with HOMER (Heinz et al. 2010). We performed a differential peaks enrichment analysis of the closest TSS-binding sites (<2 kb; NAMPT vs. EV) for each mark. Differentially expressed genes were selected based on Abs log fold change > 1.

The seqMiner (Ye et al. 2011) program was used to calculate the ChIP-seq read densities around the TSS (±2 kb) with the *K*-means clustering method to produce heat maps.

Animal experimentation

Animal experiments were performed in accordance with French law and approved by a local institutional ethical committee. The animals were maintained on a 12-h light/dark cycle in a temperature-controlled facility at 22°C and provided free access to food (standard laboratory chow diet from UAR). Human

WM9 melanoma cells (2×10^6 cells) responsive or resistant to PLX4032 were subcutaneously inoculated into 8-wk-old female immune-deficient athymic nude FOXN1tm mice (Harlan Laboratory). When the tumors became palpable (0.1–0.2 cm³), the mice received an intraperitoneal injection of 25 mg/kg PLX4032, 1.5 or 15 mg/kg FK866, or both drugs dissolved in a 90:9:1 (v/v/v) mixture of labrafil M1944 Cs, dimethylacetamide, and Tween 80 three times per week. Control mice were injected with labrafil alone. The growth tumor curves were determined after measuring the tumor volume using the equation $V = (L \times W^2)/2$. At the end of the experiment, the mice were euthanized by cervical dislocation, and the tumors were harvested for immunofluorescence.

Statistical analysis

The data are presented as the means \pm SD and were analyzed using two-sided Student's *t*-test with Prism or Microsoft Excel software. The difference between both conditions was statistically significant at $P < 0.05$. For the metabolomics analysis, the *P*-values were adjusted using the Benjamini-Hochberg procedure (Anastats).

Acknowledgments

We thank Marina Boncompagni for assistance with mouse tumor staining, and Jérôme Klusa and Philippe Marchetti (UMR-S 1172, Centre Hospitalier Universitaire Lille, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale [INSERM], University of Lille) for providing PLX4032-resistant A375. We thank the Centre Méditerranéen de Médecine Moléculaire imaging and animal facilities. We also thank Dr. T. Kitamura (University of Tokyo, Japan) and Dr. L.J. Martin (University of Moncton, Canada) for providing vectors encoding constitutively active forms of STAT5, and Dr. J.N. Garcia (University of Arizona) for providing NAMPT promoter reporter constructs. This work was funded by grants from the Institut National du Cancer (INCA) to R.B. (2013-1-MELA-04) and C.B. (INCA_10573), and La Ville de Nice and Cancéropôle Provence-Alpes-Côte d'Azur to N.N.

Author contributions: C.B. and R.B. designed, analyzed, and wrote the manuscript. B.M., S.R., and L.Y.-C. participated in the scientific discussions. M.O., M.C., K.B., R.D., and G.B. performed the experiments. N.N. conducted all bioinformatics analyses.

References

Aparicio O, Geisberg JV, Sekinger E, Yang A, Moqtaderi Z, Struhl K. 2005. Chromatin immunoprecipitation for determining the association of proteins with specific genomic sequences in vivo. *Curr Protoc Mol Biol* **69**: 21.3.1–21.3.33.

Baenke F, Chaneton B, Smith M, Van Den Broek N, Hogan K, Tang H, Viros A, Martin M, Galbraith L, Girotti MR, et al. 2016. Resistance to BRAF inhibitors induces glutamine dependency in melanoma cells. *Mol Oncol* **10**: 73–84.

Bai P, Canto C. 2012. The role of PARP-1 and PARP-2 enzymes in metabolic regulation and disease. *Cell Metab* **16**: 290–295.

Balasubramanian P, Zhao LJ, Chinnadurai G. 2003. Nicotinamide adenine dinucleotide stimulates oligomerization, interaction with adenovirus E1A and an intrinsic dehydrogenase activity of CtBP. *FEBS Lett* **537**: 157–160.

Baudy AR, Dogan T, Flores-Mercado JE, Hoeflich KP, Su F, van Bruggen N, Williams SP. 2012. FDG-PET is a good biomarker of both early response and acquired resistance in BRAFV600

mutant melanomas treated with vemurafenib and the MEK inhibitor GDC-0973. *EJNMMI Res* **2**: 22.

Bertolotto C, Abbe P, Hemesath TJ, Bille K, Fisher DE, Ortonne JP, Ballotti R. 1998. Microphthalmia gene product as a signal transducer in cAMP-induced differentiation of melanocytes. *J Cell Biol* **142**: 827–835.

Bertolotto C, Lesueur F, Giuliano S, Strub T, de Lichy M, Bille K, Dessen P, d'Hayer B, Mohamdi H, Remenieras A, et al. 2011. A SUMOylation-defective MITF germline mutation predisposes to melanoma and renal carcinoma. *Nature* **480**: 94–98.

Bonet C, Giuliano S, Ohanna M, Bille K, Allegra M, Lacour JP, Bahadoran P, Rocchi S, Ballotti R, Bertolotto C. 2012. Aurora B is regulated by the mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase (MAPK/ERK) signaling pathway and is a valuable potential target in melanoma cells. *J Biol Chem* **287**: 29887–29898.

Canto C, Menzies KJ, Auwerx J. 2015. NAD⁺ metabolism and the control of energy homeostasis: a balancing act between mitochondria and the nucleus. *Cell Metab* **22**: 31–53.

Caramel J, Papadogeorgakis E, Hill L, Browne GJ, Richard G, Wierincx 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.

Ciccarone F, Zampieri M, Caiafa P. 2017. PARP1 orchestrates epigenetic events setting up chromatin domains. *Semin Cell Dev Biol* **63**: 123–134.

Corazao-Rozas P, Guerreschi P, Jendoubi M, Andre F, Jonneaux A, Scalbert C, Garcon G, Malet-Martino M, Balayssac S, Rocchi S, et al. 2013. Mitochondrial oxidative stress is the Achilles' heel of melanoma cells resistant to Braf-mutant inhibitor. *Oncotarget* **4**: 1986–1998.

Delgado-Goni T, Miniatis MF, Wantuch S, Parkes HG, Marais R, Workman P, Leach MO, Belouche-Babari M. 2016. The BRAF inhibitor vemurafenib activates mitochondrial metabolism and inhibits hyperpolarized pyruvate-lactate exchange in BRAF-mutant human melanoma cells. *Mol Cancer Ther* **15**: 2987–2999.

Evans AM, DeHaven CD, Barrett T, Mitchell M, Milgram E. 2009. Integrated, nontargeted ultrahigh performance liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry platform for the identification and relative quantification of the small-molecule complement of biological systems. *Anal Chem* **81**: 6656–6667.

Falletta P, Sanchez-Del-Campo L, Chauhan J, Efferm M, Kenyon A, Kershaw CJ, Siddaway R, Lisle R, Freter R, Daniels MJ, et al. 2017. Translation reprogramming is an evolutionarily conserved driver of phenotypic plasticity and therapeutic resistance in melanoma. *Genes Dev* **31**: 18–33.

Grolla AA, Torretta S, Gnemmi I, Amoroso A, Orsomando G, Gatti M, Caldarelli A, Lim D, Penengo L, Brunelleschi S, et al. 2015. Nicotinamide phosphoribosyltransferase (NAMPT/PBEF/visfatin) is a tumoural cytokine released from melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res* **28**: 718–729.

Haq R, Shoag J, Andreu-Perez P, Yokoyama S, Edelman H, Rowe GC, Frederick DT, Hurley AD, Nellore A, Kung AL, et al. 2013. Oncogenic BRAF regulates oxidative metabolism via PGC1 α and MITF. *Cancer Cell* **23**: 302–315.

Hassel JC, Winnemoller D, Schartl M, Wellbrock C. 2008. STAT5 contributes to antiapoptosis in melanoma. *Melanoma Res* **18**: 378–385.

Heinz S, Benner C, Spann N, Bertolino E, Lin YC, Laslo P, Cheng JX, Murre C, Singh H, Glass CK. 2010. Simple combinations of lineage-determining transcription factors prime *cis*-

Ohanna et al.

- regulatory elements required for macrophage and B cell identities. *Mol Cell* **38**: 576–589.
- Hilmi C, Larribere L, Giuliano S, Bille K, Ortonne JP, Ballotti R, Bertolotto C. 2008. IGF1 promotes resistance to apoptosis in melanoma cells through an increased expression of BCL2, BCL-X_L, and survivin. *J Invest Dermatol* **128**: 1499–1505.
- Hoek KS, Eichhoff OM, Schlegel NC, Dobbeling U, Kobert N, Schaerer L, Hemmi S, Dummer R. 2008. In vivo switching of human melanoma cells between proliferative and invasive states. *Cancer Res* **68**: 650–656.
- Holen K, Saltz LB, Hollywood E, Burk K, Hanauske AR. 2008. The pharmacokinetics, toxicities, and biologic effects of FK866, a nicotinamide adenine dinucleotide biosynthesis inhibitor. *Invest New Drugs* **26**: 45–51.
- Houtkooper RH, Pirinen E, Auwerx J. 2012. Sirtuins as regulators of metabolism and healthspan. *Nat Rev Mol Cell Biol* **13**: 225–238.
- Hugo W, Shi H, Sun L, Piva M, Song C, Kong X, Moriceau G, Hong A, Dahlman KB, Johnson DB, et al. 2015. Non-genomic and immune evolution of melanoma acquiring MAPKi resistance. *Cell* **162**: 1271–1285.
- Jing H, Lin H. 2015. Sirtuins in epigenetic regulation. *Chem Rev* **115**: 2350–2375.
- Johnson DB, Lovly CM, Sullivan RJ, Carvajal RD, Sosman JA. 2016. Melanoma driver mutations and immune therapy. *Oncoimmunology* **5**: e1051299.
- Kennedy BE, Sharif T, Martell E, Dai C, Kim Y, Lee PW, Gujar SA. 2016. NAD⁺ salvage pathway in cancer metabolism and therapy. *Pharmacol Res* **114**: 274–283.
- Laurette P, Strub T, Koludrovic D, Keime C, Le Gras S, Seberg H, Van Otterloo E, Imrichova H, Siddaway R, Aerts S, et al. 2015. Transcription factor MITF and remodeler BRG1 define chromatin organisation at regulatory elements in melanoma cells. *Life* **4**: e06857.
- Li H, Durbin R. 2009. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics* **25**: 1754–1760.
- Liang H, Fekete DM, Andrisani OM. 2011. CtBP2 downregulation during neural crest specification induces expression of Mitf and REST, resulting in melanocyte differentiation and sympathoadrenal lineage suppression. *Mol Cell Biol* **31**: 955–970.
- Luke JJ, Flaherty KT, Ribas A, Long GV. 2017. Targeted agents and immunotherapies: optimizing outcomes in melanoma. *Nat Rev Clin Oncol* **14**: 463–482.
- Maki K, Ikuta K. 2008. MEK1/2 induces STAT5-mediated germline transcription of the TCR γ locus in response to IL-7R signaling. *J Immunol* **181**: 494–502.
- Maldi E, Travelli C, Caldarelli A, Agazzone N, Cintura S, Galli U, Scatolini M, Ostano P, Miglino B, Chiorino G, et al. 2013. Nicotinamide phosphoribosyltransferase (NAMPT) is over-expressed in melanoma lesions. *Pigment Cell Melanoma Res* **26**: 144–146.
- Miller MJ, Kennedy AD, Eckhart AD, Burrage LC, Wulff JE, Miller LA, Milburn MV, Ryals JA, Beaudet AL, Sun Q, et al. 2015. Untargeted metabolomic analysis for the clinical screening of inborn errors of metabolism. *J Inherit Metab Dis* **38**: 1029–1039.
- Mirmohammadsadeh A, Hassan M, Bardenheuer W, Marini A, Gustrau A, Nambiar S, Tannapfel A, Bojar H, Ruzicka T, Hengge UR. 2006. STAT5 phosphorylation in malignant melanoma is important for survival and is mediated through SRC and JAK1 kinases. *J Invest Dermatol* **126**: 2272–2280.
- Muller J, Krijgsman O, Tsoi J, Robert L, Hugo W, Song C, Kong X, Possik PA, Cornelissen-Steijger PD, Foppen MH, et al. 2014. Low MITF/AXL ratio predicts early resistance to multiple targeted drugs in melanoma. *Nat Commun* **5**: 5712.
- Ohanna M, Giuliano S, Bonet C, Imbert V, Hofman V, Zangari J, Bille K, Robert C, Bressac-de Paillerets B, Hofman P, et al. 2011. Senescent cells develop a PARP-1 and nuclear factor- κ B-associated secretome [PNAS]. *Genes Dev* **25**: 1245–1261.
- Ohanna M, Bonet C, Bille K, Allegra M, Davidson I, Bahadoran P, Lacour JP, Ballotti R, Bertolotto C. 2014. SIRT1 promotes proliferation and inhibits the senescence-like phenotype in human melanoma cells. *Oncotarget* **5**: 2085–2095.
- Onishi M, Nosaka T, Misawa K, Mui AL, Gorman D, McMahon M, Miyajima A, Kitamura T. 1998. Identification and characterization of a constitutively active STAT5 mutant that promotes cell proliferation. *Mol Cell Biol* **18**: 3871–3879.
- Parmenter TJ, Kleinschmidt M, Kinross KM, Bond ST, Li J, Kaadige MR, Rao A, Sheppard KE, Hugo W, Pupo GM, et al. 2014. Response of BRAF-mutant melanoma to BRAF inhibition is mediated by a network of transcriptional regulators of glycolysis. *Cancer Discov* **4**: 423–433.
- Ravaud A, Cerny T, Terret C, Wanders J, Bui BN, Hess D, Droz JP, Fumoleau P, Twelves C. 2005. Phase I study and pharmacokinetic of CHS-828, a guanidino-containing compound, administered orally as a single dose every 3 weeks in solid tumours: an EORTC/ESMO study. *Eur J Cancer* **41**: 702–707.
- Ray SK, Li HJ, Metzger E, Schule R, Leiter AB. 2014. CtBP and associated LSD1 are required for transcriptional activation by NeuroD1 in gastrointestinal endocrine cells. *Mol Cell Biol* **34**: 2308–2317.
- Riesenberg S, Groetchen A, Siddaway R, Bald T, Reinhardt J, Smorra D, Kohlmeyer J, Renn M, Phung B, Aymans P, et al. 2015. MITF and c-Jun antagonism interconnects melanoma dedifferentiation with pro-inflammatory cytokine responsiveness and myeloid cell recruitment. *Nat Commun* **6**: 8755.
- Rodriguez MI, Peralta-Leal A, O'Valle F, Rodriguez-Vargas JM, Gonzalez-Flores A, Majuelos-Melguizo J, Lopez L, Serrano S, de Herreros AG, Rodriguez-Manzanique JC, et al. 2013. PARP-1 regulates metastatic melanoma through modulation of vimentin-induced malignant transformation. *PLoS Genet* **9**: e1003531.
- Sun X, Elangovan VR, Mapes B, Camp SM, Sammani S, Saadat L, Ceco E, Ma SF, Flores C, MacDougall MS, et al. 2014. The NAMPT promoter is regulated by mechanical stress, signal transducer and activator of transcription 5, and acute respiratory distress syndrome-associated genetic variants. *Am J Respir Cell Mol Biol* **51**: 660–667.
- Tateishi K, Wakimoto H, Iafra AJ, Tanaka S, Loebel F, Lelic N, Wiederschain D, Bedel O, Deng G, Zhang B, et al. 2015. Extreme vulnerability of IDH1 mutant cancers to NAD⁺ depletion. *Cancer Cell* **28**: 773–784.
- Tripathi P, Kurtulus S, Wojciechowski S, Sholl A, Hoebe K, Morris SC, Finkelman FD, Grimes HL, Hildeman DA. 2010. STAT5 is critical to maintain effector CD8⁺ T cell responses. *J Immunol* **185**: 2116–2124.
- Verfaillie A, Imrichova H, Atak ZK, 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.

BRAF/ERK pathway controls NAMPT expression

- von Heideman A, Berglund A, Larsson R, Nygren P. 2010. Safety and efficacy of NAD depleting cancer drugs: results of a phase I clinical trial of CHS 828 and overview of published data. *Cancer Chemother Pharmacol* **65**: 1165–1172.
- Wachsmann W, Morhenn V, Palmer T, Walls L, Hata T, Zalla J, Scheinberg R, Sofen H, Mraz S, Gross K, et al. 2011. Noninvasive genomic detection of melanoma. *Br J Dermatol* **164**: 797–806.
- Warburg O. 1956. On the origin of cancer cells. *Science* **123**: 309–314.
- Ward PS, Thompson CB. 2012. Metabolic reprogramming: a cancer hallmark even Warburg did not anticipate. *Cancer Cell* **21**: 297–308.
- Ye T, Krebs AR, Choukrallah MA, Keime C, Plewniak F, Davidson I, Tora L. 2011. seqMINER: an integrated ChIP-seq data interpretation platform. *Nucleic Acids Res* **39**: e35.
- Zhang Y, Liu T, Meyer CA, Eeckhoute J, Johnson DS, Bernstein BE, Nusbaum C, Myers RM, Brown M, Li W, et al. 2008. Model-based analysis of ChIP-seq (MACS). *Genome Biol* **9**: R137.

Annexe 3

Tillet E, Ouarné M, Desroches-Castan A, Mallet C, Subileau M, Didier R, Lioutsko A, Belthier G, Feige J-J, and Bailly S. **A heterodimer formed by bone morphogenetic protein 9 (BMP9) and BMP10 provides most BMP biological activity in plasma.** [J Biol Chem.](#) 2018 Jul 13;293(28):10963-10974

JBC Papers in Press. Published on May 22, 2018 as Manuscript RA118.002968
 The latest version is at <http://www.jbc.org/cgi/doi/10.1074/jbc.RA118.002968>
Bioactive BMP9-10 heterodimers in blood

A heterodimer formed by bone morphogenetic protein 9 (BMP9) and BMP10 provides most BMP biological activity in plasma

Emmanuelle Tillet^{1*}, Marie Ouarné¹, Agnès Desroches-Castan¹, Christine Mallet¹, Mariela Subileau¹, Robin Didier^{1,2}, Anna Lioutsko^{1,3}, Guillaume Belthier^{1,4}, Jean-Jacques Feige¹, Sabine Bailly¹

From the ¹Univ. Grenoble Alpes, Inserm, CEA, BIG-Biologie du Cancer et de l'Infection, 38000 Grenoble, France

Running title: *Bioactive BMP9-10 heterodimers in blood*

²Present address: Univ. Nice, Inserm, C3M, Nice, France

³Present address: Univ. Paris Sud 11, Inserm, CEA, IDMIT, Fontenay-aux-Roses, France

⁴Present address: Univ. Montpellier, Inserm, CNRS, IGF, France

To whom correspondence should be addressed: Emmanuelle Tillet, UMR1036 CEA-G/BIG/BCI, 17 rue des Martyrs 38054 Grenoble Cedex FRANCE; emmanuelle.tillet@cea.fr; tel: (+33) 438784464; fax: (+33) 438785058.

Keywords: Bone Morphogenetic Protein, heterodimer, Activin receptor-Like Kinase 1 ligand, *Bmp10* conditional knock-out mice, blood vessel, liver

ABSTRACT

Bone morphogenetic protein 9 (BMP9) and BMP10 are the two high-affinity ligands for the endothelial receptor activin receptor-like kinase 1 (ALK1) and are key regulators of vascular remodeling. They are both present in the blood, but their respective biological activities are still a matter of debate. The aim of the present work was to characterize their circulating forms to better understand how their activities are regulated *in vivo*. First, by co-transfecting BMP9 and BMP10, we found that both can form a disulfide-bonded heterodimer *in vitro* and that this heterodimer is functional on endothelial cells via ALK1. Next, we developed an ELISA that could specifically recognize the BMP9–BMP10 heterodimer and which indicated its presence in both human and mouse plasma. In addition to using available *Bmp9*-KO mice, we generated a conditional *Bmp10*-KO mouse strain. The plasma from *Bmp10*-KO mice, similarly to that of *Bmp9*-KO mice, completely lacked the ability to activate ALK1-transfected 3T3 cells or phospho-Smad 1–5 on endothelial cells, indicating that the circulating BMP activity is mostly due to the BMP9–BMP10

heterodimeric form. This result was confirmed in human plasma that had undergone affinity chromatography to remove BMP9 homodimer. Finally, we provide evidence that hepatic stellate cells in the liver could be the source of the BMP9–BMP10 heterodimer. Together, our findings demonstrate that BMP9 and BMP10 can heterodimerize and that this heterodimer is responsible of most of the biological BMP activity found in plasma.

Morphogenetic Proteins (BMPs) are members of the Transforming Growth Factor β superfamily that regulate cellular events essential for embryonic development and tissue homeostasis (1).

BMPs are synthesized as pro-proteins, consisting of an N-terminal prodomain, and a receptor-binding C-terminal mature region (2). A single disulfide bond within the terminal mature region allows dimerization of the pro-protein, which is further processed through proteolytic cleavage by furin proconvertases (3, 4). BMP homodimers bind to and activate a receptor complex consisting of two type I and type II transmembrane serine/threonine kinases

(5). Following ligand binding, activated receptors propagate signaling by phosphorylating the receptor-regulated SMAD-1, -5, or -8, which, in association with SMAD4, translocate to the cell nucleus and regulate expression of the SMAD pathway-responsive genes (6).

Among the TGF β growth factor family, BMP9 and BMP10 are two high affinity ligands for the endothelial-specific type I receptor activin receptor-like kinase 1 (ALK1) and its co-receptor endoglin (7, 8). The signaling pathway activated through these receptors is critical for vascular development. Indeed, mutations in *ACVLR1*, encoding ALK1, or *ENG*, encoding *endoglin*, cause an autosomal dominant disease, Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia (HHT), characterized by vascular disorders including abundant epistaxis, dilated blood vessels and arteriovenous malformations (9). Accordingly, in mice, inactivation of *Acv1r1* is lethal at mid-gestation due to severe vascular defects (10, 11).

BMP9 is mainly produced by the liver (12) whereas BMP10 is produced in embryos by the heart and in adults by the right atria (13). *Bmp10* deletion was first shown to lead to embryonic lethality due to cardiac defects (14). However, more recently, it was also shown that loss of *Bmp10* could also lead to vascular defects both in mouse and zebrafish (15, 16). On the other hand, *Bmp9* knockout (KO) mice are viable, but presented lymphatic defects (17). Interestingly, it was found also found that BMP9 and BMP10 could compensate for each other's loss and that BMP9 and BMP10 play a redundant role in post-natal vascular development (15, 18, 19).

ELISAs have shown that human plasma contains both BMP9 (2-6 ng/mL) and BMP10 (0.5-2 ng/mL) (12, 15). It is widely admitted that BMP9 circulates under a biologically active form (7, 12), and functional and structural studies have confirmed that the binding of mature BMP9 to its prodomain does not prevent its binding to signaling receptors (12, 20, 21). However, there is still a debate about the latency of BMP10. First, it has been shown that, when bound to its pro-domain, mature BMP10 is inactive (22), similarly to other members of the TGF β family, including TGF β (23) itself and myostatin (24). A more recent report indicates, however, that recombinant human BMP10 is fully active on endothelial cells, albeit it forms a very sta-

ble complex of the mature form associated with the prodomain (25). Along the same line, Chen et al. (15) have shown that anti-BMP10 antibodies could partially decrease *Smad6* gene induction by mouse serum, indicating that active BMP10 is present in blood. These data thus appear in contradiction with the absence of ALK1-stimulating activity measured in *Bmp9*-KO mouse plasma (19). One hypothesis that could reconcile these results is that plasmatic ALK1 ligand is a BMP9-10 heterodimer rather than a mixture of homodimeric BMP9 and BMP10. Indeed, although most BMPs have been described as homodimeric proteins, they can also, to some extent, heterodimerize (1). Such heterodimers spark increasing interest because they likely provide a distinct signaling pattern (26).

The aim of the present work was to better characterize the circulating forms of BMP9 and BMP10 and to evaluate whether BMP9 and BMP10 can form a heterodimer. We provide evidence that, when co-expressed, BMP9 and BMP10 can associate to form a disulfide-bonded BMP9-10 heterodimer. More importantly, we identified the presence of BMP9-10 heterodimers in human and mouse plasma and show that this heterodimer is active and represents the major circulating form in blood.

RESULTS

BMP9 and BMP10 can form heterodimers in vitro

In order to evaluate whether BMP9-10 heterodimerization can occur, we first transfected HEK 293 cells with both BMP9 and BMP10 cDNAs. First, we engineered recombinant BMP9 and BMP10 and added two different tags placed between the prodomain and the mature BMP peptide, i.e. downstream of the furin cleavage site (Fig.1A). BMP9 was tagged with a 6-histidine motif while BMP10 was tagged with a myc epitope. Tagged BMP9 and BMP10 were transfected into HEK 293 cells, either solely or together and secreted BMPs were evaluated by western blotting of conditioned media (CM) (Fig.1B). Both BMPs were produced as incompletely processed molecules, as 3 bands around 110 kDa (unprocessed dimeric pro-BMP), 50-65 kDa (monomer or partially processed BMP), and 23 kDa (mature dimeric peptide) were revealed by western blotting (Fig.1B). To determine if heterodimeric BMP9-10 could be produced by double-transfected cells, we

Bioactive BMP9-10 heterodimers in blood

affinity-purified the two BMPs using their specific tags. For this, CM from his-BMP9/myc-BMP10 co-transfected cells was applied onto a HisTrapTM column and bound BMPs were then eluted and evaluated by western blotting. As expected, his-BMP9 was fully retained by the HisTrapTM column and only detected in the 200 mmol/L imidazole elution (Fig.1C). Myc-BMP10 was partially detected in the unbound or weakly bound fractions (flow-through (FT), wash) but could also be observed in the elution fraction, demonstrating that BMP9 and BMP10 interacted when they were co-transfected (Fig.1C). We then analyzed whether BMP9 and BMP10 could still interact under denaturing conditions. Under this condition, heterodimeric disulfide-bonded molecules should still co-elute while oligomeric non-covalent BMP9/BMP10 complexes should be disrupted by denaturation. For this, CM was treated with 8 mol/L urea and heated for 20 minutes at 65°C before being applied to the HisTrapTM column. We observed that myc-BMP10 could still interact with his-BMP9 (Fig.1D). On the contrary, further treatment resulting in reduction and alkylation of disulfide-bonds completely disrupted myc-BMP10 binding, as shown by absence of signal in the eluate using anti-myc antibody detection, albeit BMP9 was still detectable (Fig.1E). As a control, loading of the HisTrapTM column with single-transfected myc-BMP10 CM demonstrated the absence of non-specific binding of myc-BMP10 alone (supp. Fig.1). To further support BMP9-10 heterodimerization, we generated unprocessed BMP variants by mutating amino acids in the furin cleavage site, and we co-transfected mutated BMP9 with a wild-type (WT) BMP10 or vice versa. Heterodimerization of BMP9 and BMP10 was estimated by western blot as the association of a precursor and a mature BMP. For this, we removed the tags between the pro- and mature BMP domains. This enabled the full processing of pro-BMP9 and pro-BMP10, as shown by the single 23 kDa band revealed by western blot of CM issued from WT BMP9 or WT BMP10 single transfections (Fig.1F). The BMP9 furin cleavage site RK³¹⁷KR was mutated to RQ³¹⁷KR, RQ³¹⁷A³¹⁸R or RQ³¹⁷A³¹⁸A³¹⁹. The first mutant was generated to mimic a substitution mutation identified in a patient suffering from HHT (27). The two others replaced basic amino acids by alanine residues to avoid furin

cleavage. The single substitution of K³¹⁷ to Q³¹⁷ did not impair BMP9 maturation (supp. Fig.2), thus indicating that HHT disease in this patient is not linked to a BMP9 processing defect as it had been suggested (27). The double mutant RQAR was only partially processed but could be completely cleaved when furin was overexpressed, while the triple mutant RQAA was not cleaved at all even in the presence of overexpressed furin (supp. Fig.2). Similarly, BMP10 RIR³¹⁵R³¹⁶ sequence was mutated to RIAA. Figure 1F shows that, similarly to the BMP9 RQAA mutant, the BMP10 RIAA mutant was exclusively expressed as a 110 kDa precursor. Thus, these mutations inhibit BMP processing and consequently, their capacity to activate ALK1 in a BRE assay using transfected 3T3 cells (7) (Fig.1F, G). Interestingly, co-transfection of BMP10 RIAA mutant with WT BMP9 gave rise to a new 65 kDa BMP9 immune-reactive band (arrowhead), likely corresponding to the association of mature WT BMP9 to BMP10 precursor. Similar results could be obtained with the co-transfection of BMP9 RQAA mutant together with WT BMP10 (Fig.1F). These chimeric proteins (B9WT/B10 RIAA; B10 WT/B9 RQAA) were also unable to activate ALK1 in the BRE assay (Fig.1G). This demonstrated a dominant negative effect of the mutant BMP on the activity of WT BMP9 or 10. Altogether, these results support that BMP9 and BMP10 form a disulfide-bonded heterodimer when coexpressed in the same cells.

BMP9-10 heterodimer is biologically active

BMP9-10 heterodimers were purified in two steps using a HisTrapTM column followed by an affinity column grafted with anti-myc antibodies. The latter allowed separating his-BMP9 homodimers from BMP9-10 heterodimers. Elution was performed by lowering the pH to 3 (fraction containing mainly BMP9) and then to 2 (fraction containing BMP9-10 heterodimer) (supp. Fig.3). The mature BMP9-10 heterodimer was carefully quantified by western blotting using known quantities of commercial BMP9 and BMP10 as standards under reduced (BMP9) or unreduced (BMP10) conditions (see Fig. 2A). The activity of BMP9-10 heterodimer was then determined on human umbilical venous endothelial cells (HUVECs) transfected with the BRE-luc reporter plasmid. The BMP9-10 heterodimer dis-

Bioactive BMP9-10 heterodimers in blood

played a similar stimulation pattern than BMP9 or BMP10 homodimer: induction started with low doses of ligand (25 pg/ml) and a plateau was obtained at doses higher than 250 pg/mL (Fig. 2B). We next addressed whether the activity of the BMP9-10 heterodimer was mediated by ALK1 signaling. To do this, we knocked down ALK1 expression by transfecting HUVECs with two different siRNA specific for ACVLR1. The activity of BMP9, BMP10, and BMP9-10 was then evaluated as above, using the BRE-luc reporter. The activities of BMP9, BMP10 and BMP9-10 were completely (siRNA#1) or severely (siRNA#2) abolished compared to transfection with scramble siRNA (Fig. 2C). The loss of activity was correlated with the level of ACVLR1 gene extinction (supp. Fig. 4A). Moreover, we also found that BMP9, BMP10 and BMP9-10 lost their ability to induce the phosphorylation of Smad1-5, indicating that ALK1 is necessary for activating the Smad pathway in a similar way for the 3 ligands (supp. Fig. 4B).

BMP9-10 heterodimer is present in mouse plasma and is the main active circulating form

In order to quantify BMP9-10 heterodimers, we set-up a cross ELISA, using a capture anti-BMP9 antibody and a detection anti-BMP10 antibody, or the other way round, i.e. a capture anti-BMP10 antibody and a detection anti-BMP9 antibody. We compared their immune reactivities with those of standard BMP9 (12) and BMP10 ELISAs (R&D Systems). BMP9 and BMP10 ELISAs both specifically recognized homodimeric BMP9 or BMP10, respectively but also allowed the detection of purified BMP9-10 heterodimer (supp. Fig.5A, 5B). On the contrary, cross BMP9-10 or cross BMP10-9 ELISAs specifically only detected purified BMP9-10 heterodimers but not BMP9 or BMP10 homodimers (supp. Fig.5C, 5D). Moreover, CM containing a mixture of BMP9 and BMP10 gave no signal, demonstrating that only disulfide-bonded heterodimer is recognized by these cross ELISAs. Standard curves using purified BMP9-10 could be established and showed a sensitivity threshold around 30 pg/mL for both cross ELISAs (supp. Fig. 5E, 5F).

We then sought for the presence of heterodimeric BMP9-10 in mouse plasma. We took advantage

of comparing WT and KO mice in which *Bmp9* (19) or *Bmp10* have been genetically invalidated. As *Bmp10*-KO is embryonic lethal, we generated conditional KO mice by crossing *Bmp10*-floxed mice with Rosa26-CreER^{T2} mice (28). Deletion of *Bmp10* was performed in 3-week-old mice by daily injection of tamoxifen for five days. *Bmp10* knock-down efficiency was evaluated by RT-qPCR on the right atria, 6 weeks after tamoxifen injection. A very strong, although not complete reduction in BMP10 levels was observed (supp. Fig. 6A). *Bmp10* deletion was also checked by measuring the ALK1-BRE activity from protein extracts of the right atria. In accordance with the mRNA levels, only 10% of ALK1-BRE activity remained 3 weeks after tamoxifen injections (supp. Fig. 6B). Following *Bmp10* deletion, mice were viable and did not display any obvious phenotype. We next measured the homo- and heterodimeric BMP9/10 species by ELISA. The results are presented as the immune reactivity as it is difficult to give the accurate concentrations of circulating BMP using ELISA: we are using mature recombinant proteins as standards but BMPs circulate under different forms (uncleaved, processed and complexed) and we know that the antibodies might not recognize the different forms of BMPs with the same affinity (12, 29).

As expected, BMP9 and BMP10 were detected in WT plasma (Fig.3A and B), but very interestingly, using a cross BMP9-10 ELISA, we also found the presence of BMP9-10 heterodimers in WT plasma (Fig.3C). Furthermore, BMP9-10 heterodimer was no more detected in the plasma of *Bmp9*-KO mice, and its level was also strongly reduced in *Bmp10*-cKO versus WT mice (Fig.3C). This slight remaining level of heterodimer in *Bmp10*-cKO plasma is likely due to the incomplete knock-down of *Bmp10* expression (supp. Fig.5A and B) as circulating BMP10, measured by ELISA, was also not completely suppressed (10% residual immune-reactivity) (Fig.3B). Interestingly, we also observed a strong decrease in BMP9 levels in the plasma of *Bmp10*-cKO mice, (Fig.3A), supporting that a large part of BMP9 immune-reactivity can be attributed to BMP9-10 heterodimer. Similarly, we found a significant decrease in BMP10 levels in the plasma of *Bmp9*-KO mice (Fig.3B), likely due to the loss of BMP9-10 heterodimers. It is worth noting that

the BMP10 ELISA detected much lower levels of circulating BMP10 than BMP9-10 heterodimers suggesting an epitope detection problem for BMP10 from blood with the BMP10 ELISA (Fig.3B and C). We next evaluated the ALK1 stimulating activity of these plasma using the ALK1-BRE assay. As previously described (19), no ALK1-BRE activity could be detected in *Bmp9*-KO plasma but interestingly, 90% of ALK1-stimulating activity was also lost in the plasma of *Bmp10*-cKO mice (Fig.3D). To confirm the loss of activity from these plasma, we analyzed their ability to activate Smad1-5 phosphorylation in human endothelial cells. This was done either on human microvascular endothelial cells from the dermis (HMVECds) (Fig.3E) or HUVECs (Fig.3F). WT plasma induced a strong Smad1-5 phosphorylation in both endothelial cell types, while plasma from both KO mice were hardly able to induce Smad1-5 phosphorylation. These results confirm that most of the circulating stimulating activity is lost when either *Bmp9* or *Bmp10* expression is knocked-down. It is worth noting that the right atria of *Bmp9*-KO mice still expressed active BMP10 ligand, as shown by the high specific activity of protein extracts from the right atria similar to that of WT mice and that this activity could be fully inhibited by anti-BMP10 antibodies (supp. Fig 6C). Therefore, cardiac BMP10 is normally synthesized and active, even in the absence of BMP9 expression. Taken together these data show for the first time the presence of a BMP9-10 heterodimer in mouse plasma. The loss of plasmatic activity both in *Bmp9*-KO mice and *Bmp10*-cKO mice strongly supports that this activity is due to the BMP9-10 heterodimeric form as otherwise we would have been able to detect the BMP10 activity in *Bmp9*-KO plasma and vice versa a BMP9 activity in *Bmp10*-cKO plasma.

BMP9-10 heterodimer circulates as an active ligand in human plasma

We then tried to detect BMP9-10 heterodimers in human plasma using the BMP9-10 crossed ELISA that we have set-up (supp. Fig. 5E, 5F). 19 plasmas from healthy individuals were measured. Very interestingly, we found circulating BMP9-10 heterodimers in human plasma (Fig. 4A).

To further support our data, we undertook the char-

acterization of BMP9-10 heterodimers from human plasma by affinity chromatography on anti-BMP10 antibodies. For this, we passed a pool of human plasma (10 mL) through an affinity chromatography column grafted with anti-BMP10 antibodies and eluted bound BMPs by acidic pH. ELISAs and ALK1-BRE assays were then performed on the flow through (FT) and elution fractions. The data are expressed as the quantity of each BMP recovered in each fraction. The FT fraction contained mostly BMP9 homodimers (Fig.4B) and low levels of BMP10 homodimers (Fig.4C) as nearly no BMP9-10 was detected (Fig. 4D). Interestingly, BMP9-10 was highly recovered in the elution fraction, as measured by the BMP9-10 crossed ELISA further supporting the presence of a BMP9-10 heterodimer in human plasma (Fig. 4D). Surprisingly, more BMP10 epitopes could be detected in the FT and elution fractions than in the whole plasma (Fig.4D), suggesting the presence of masking proteins in plasma impeding BMP10 measurement as already suggested in murine plasma (Fig. 3B). As a similar amount of immune reactive BMP10 and BMP9-10 is detected in the eluate, this suggests that BMP10 ELISA can detect BMP9-10 heterodimer in this fraction, whereas it could not in plasma. Interestingly, most of the ALK1-BRE activity was detected in the elution fraction that contained the BMP9-10 heterodimer (Fig.4E). The FT, containing mostly homodimeric BMP9, was not very active. Altogether, these data demonstrate that, similarly to mouse plasma, BMP9-10 heterodimer is the major ALK1 activator circulating in human plasma.

Hepatic stellate cells synthesize BMP9 and BMP10

Heterodimeric BMP9-10 bonding implies that BMP9 and BMP10 are produced by a common cell type. We previously described, using mRNAs from 20 human tissues (Clontech), that BMP9 mRNA is mostly expressed by the liver (12). Using the same samples, we measured BMP10 mRNA expression. We found that BMP10 was, as expected, mostly expressed in the heart but also, though at a lower level, in liver (Fig.5A). We thus hypothesized that liver could be the organ responsible for the expression of circulating BMP9-10 heterodimer. We used the RNAscope technology to identify BMP9- and BMP10-producing cells in mouse liver sec-

tions. The BMP10 probe was first validated on mouse adult heart cross sections. As expected, a strong pink labeling was specifically observed in the right atria, while the ventricle was completely negative (Fig.5B). No BMP9 mRNA expression could be detected in the heart (Fig.5B). On the contrary, liver sections showed BMP9-positive cells throughout the liver lobules (Fig.5C). Higher magnification indicated that positive cells were triangular-stellate-shaped cells, spread between hepatocytes and sinusoids, having a typical morphology of hepatic stellate cells (HSCs). No staining was observed in other hepatic cells i.e. hepatocytes, sinusoidal endothelial cells, or Kupffer cells (Fig.5C). Interestingly, BMP10 staining, albeit weaker than BMP9 staining, was also specifically observed in HSCs (Fig.5C). As expected, BMP9 and BMP10 staining were lost in the respective *Bmp9*-KO, and *Bmp10*-cKO liver sections (supp. Fig.7), demonstrating the specificity of the labeling. BMP10 staining was still observed in liver from *Bmp9*-KO, and vice versa, supporting that BMP9 and BMP10 do not regulate the expression of each other's. From this, we conclude that HSCs can synthesize both BMP9 and BMP10 and could be the physiological source of BMP9-10 heterodimer.

DISCUSSION

Our work demonstrates for the first time that BMP9 and BMP10, two BMPs from the same subfamily, which share 65% protein sequence identity, can heterodimerize by disulfide bonding in the C-terminal mature domain to produce an active BMP9-10 heterodimer. It also shows that this heterodimer is present in both human and mouse plasma, and that this circulating form is the main entity capable of activating the endothelial receptor ALK1 both in 3T3-transfected cells and in primary endothelial cells.

Most TGF β s and BMPs have been described as homodimeric proteins, but several reports demonstrate that they can also, to some extent, heterodimerize (1). The recently established structures of pro-TGF β 1, pro-activin A and pro-BMP9 support that arm domain-growth factor domain swapping could provide a mechanism for preferential formation of heterodimers over homodimers when a cell synthe-

sizes monomers of two different TGF- β family members (30). Heterodimeric BMPs, including BMP2-BMP7, BMP4-BMP7 and BMP2-BMP6, have been shown to play critical roles in embryonic development in various organisms including *Drosophila* (31, 32), zebrafish (33), xenopus (34) and mammals (35). Nodal-GDF1 heterodimers have also been shown to be involved in left-right patterning (36, 37). There is however only little evidence of the expression of these heterodimers in adults. One example is illustrated by the discovery of cumulin, a GDF9-BMP15 heterodimer, which is an oocyte-specific growth factor involved in granulosa cell differentiation and a key regulator of ovarian function (38, 39). In the present work, we identify a new heterodimeric BMP ligand, BMP9-10, which is circulating in adult blood and is likely a key factor for blood vessel homeostasis. To measure its circulating levels, we have set-up a cross ELISA that specifically recognizes heterodimeric BMP9-10 and does not cross-react with the homodimeric forms. To our knowledge, this is the first time that BMP heterodimers can be quantified from in vivo sources. This original approach of cross ELISA could be developed in the future for other BMPs to more generally assess the occurrence of BMP heterodimers in tissues.

Our previous work on *Bmp9*-KO mice showed no ALK1-stimulating activity in the plasma of these mice. We therefore proposed that circulating BMP9 was the main active ALK1 ligand in blood (19). In the present report, we show that *Bmp10*-cKO mice have also lost most of their circulating ALK1-stimulating activity on 3T3-transfected cells. More importantly, plasma devoid of BMP9 or BMP10 failed to activate P-Smad-1-5 on endothelial cells, indicating that BMP9-10 is the only active ligand in blood. It might thus be surprising that *Bmp9*-KO mice are viable and healthy and that they do not present any obvious blood vessel developmental defects as well as *Bmp10*-cKO when deleted in adult mice. One hypothesis that would support our data is that latent homodimeric BMP9 or 10 are still present, albeit not detected in plasma, which can still be locally activated. Along this line, recent structural data of the pro-BMP complex showed that pro-BMP9 can adopt both cross-armed and open-armed conformations, which could correspond to latent and nonlatent

Bioactive BMP9-10 heterodimers in blood

states respectively (21). The transition between the two states could be regulated through the binding to ECM proteins, acting as BMP reservoir (22, 40). Such ECM interactions have been recently demonstrated for BMP7-prodomain complex, which when bound to fibrillin-1 confers a “closed-arm” conformation and denies access of BMP receptors to the growth factor (41). Since BMP10 prodomain has been shown to also bind fibrillin (42), we can envision that such mechanism could also occur for BMP9 and BMP10 homodimers.

Most heterodimeric BMPs, when produced as recombinant proteins, usually show an increased activity, as compared to their homodimeric counterparts (43–46). It is admitted that the high potency of heterodimers is due to their increased versatility regarding receptor binding. Indeed, heterodimers often consist of the association of a member of the BMP2/4 subgroup, having a high affinity to type I receptor, but a low affinity to type II receptors (47) and a member of the BMP5/6/7/8/8b subgroup, having a higher affinity to type II receptors than to type I receptors (48). The combination of both would then enhance the global affinity for the receptor complex. To this respect, BMP2-6 heterodimer displays high affinity for both type I and type II receptors (44). Moreover, heterodimeric association could induce the recruitment of two different type I receptors in the same signaling complex, thus inducing a stronger and/or distinct downstream signaling (44), where the signaling by BMP2-7 induces a synergistic activity of ALK3 and ALK6, which is required for dorsoventral patterning (33).

In contrast to these studies, in our assays, the BMP9-10 heterodimer did not display any higher activity than its homodimeric counterparts. The BMP9-10 heterodimer has however only been challenged on endothelial cell expressing the ALK1 receptor. ALK1 is a type I receptor of very high affinity ($K_d=2$ pM), explained by a unique receptor orientation toward its ligands that is distinct from the other type I receptors (49, 50). ALK1 has a similar affinity for BMP9 and BMP10 and is stimulated with very low concentrations of ligand (as low as 25 pg/mL). To this regard, it might not be surprising that BMP9-10 heterodimer displays the same activation pattern as BMP9 and BMP10 homodimers. It may be possible that this heterodimer differentially activates

cells that do not express ALK1. Indeed, BMP9 and BMP10 present differential affinities toward the three type II receptors (50) and the initial binding of the BMP9-10 heterodimer to a given subset of type II receptors might allow the subsequent recruitment of a lower affinity type I receptor such as ALK2 or ALK3. BMP9 has been shown to signal through ALK2 (51, 52) and BMP10 through ALK3 (53) in non-endothelial cell types. It is tempting to speculate that BMP9-10 heterodimer could drive a specific signal through this receptor set and further work is needed to characterize ALK1-independent cellular responses. However, one has to keep in mind that not all heterodimers produce a synergistic signal due to the recruitment of different receptors. In *Drosophila*, the Dpp/Gbb heterodimer does not lead to a stronger signal but its more effective signaling is attributed to its better transport (54). Hence, specific binding and cleavage play essential roles in spatial regulation of the BMPs activity, as shown in embryonic patterning and vein development with Dpp/Scw heterodimer in *Drosophila* (1, 31, 32). Heterodimerization of BMP9 and BMP10 could lead to a differential localization than homodimers.

Biosynthesis of disulfide-bonded heterodimeric BMPs supposes a common production site for both BMPs. Analysis of BMP10 mRNA expression in twenty different tissues confirmed that BMP10 was mostly expressed by the heart but that some BMP10 expression could also be found in liver (Fig.5A). Using the powerful RNAscope technology, we found that BMP9 and to a lower extent BMP10 mRNAs are present in hepatic stellate cells (HSCs). The source of BMP9 expression has been debated for a long time (12, 55), but HSCs have been recently described as the cellular source for BMP9 protein (56), in agreement with mRNA detection in the present work (Fig.5C). We propose that HSCs could be the cells that produce the BMP9-10 heterodimer but further experiments with isolated primary HSCs are needed to confirm this hypothesis.

The ALK1-stimulating activity in the right atria is significantly decreased in *Bmp10*-cKO mice but not in *Bmp9*-KO mice (supp. Fig.5). This supports the hypothesis that the heart only produces BMP10 homodimer and that this homodimer is not secreted into the circulation, or its activity negatively regulated since no circulating activity is found in *Bmp9*-

KO mice.

Taken together, our results open a new field of investigation for BMP heterodimers, as we show for the first time the presence of a BMP9-10 heterodimer in the plasma of adult humans and mice. Which additional functions are triggered by this circulating heterodimer that its homodimeric counterparts do not fulfill is still an open question and will require further studies in cellular contexts where various combinations of type I and type II receptors are expressed. Which mechanisms control the differential synthesis and bioavailability of BMP9 and BMP10 homo- and heterodimers in liver and heart is also an intriguing question to be addressed in the future.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

BMP9 and BMP10 recombinant expression and purification

Human full-length BMP9 and BMP10 were respectively cloned into pCEP4 vector or pcDNA3.1 zeo vector (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA). An additional sequence was inserted between the prodomain and the mature region for specific tagging of each BMP: a 6-histidine motif for BMP9 or a myc epitope for BMP10. BMP9 and BMP10 were also generated without tags and used as templates to create mutants in the furin cleavage site of each BMP through site-directed mutagenesis using the Stratagene QuickChange kit (BMP9: R³¹⁷Q, K³¹⁸A, K³¹⁹A; BMP10: R³¹⁵A, R³¹⁶A). All vectors and mutants were verified by DNA sequencing.

Constructs were transfected in HEK 293-EBNA cells using lipofectamine 2000. Transfected cells were selected using the appropriate antibiotics (300 µg/mL of hygromycin for pCEP4-BMP9, 200 µg/mL of zeocin for pcDNA3-BMP10) and screened for protein expression by western blotting of serum-free conditioned medium (CM) using anti-BMP9 (kind gift of Dr Yan, Genentech, South San Francisco, CA, USA) or anti-BMP10 (MAB2926, R&D Systems, Abingdon, UK).

For purification of BMP9-10 heterodimer, 200-500 mL of CM were dialyzed against 50 mmol/L sodium phosphate buffer, pH 8.0 and applied onto a HisTrapTM column (GE Healthcare, Little Chalfont, UK). Columns were washed with 10 and 20 mmol/L imidazole and eluted with 200 mmol/L imidazole

in phosphate buffer. In some cases, CM was first denaturated by dialysis against 8 mol/L urea, or alternatively by 1% SDS, followed by 20 minutes heating at 65°C. CM could even undergo a further reduction step with 10 mmol/L DTT followed by alkylation of reduced cysteines by 25 mmol/L iodoacetamide. DTT was then removed by dialysis before loading CM onto the column.

HisTrapTM eluates were further purified by affinity chromatography on anti-c-myc-agarose (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA). Samples were loaded in PBS Tween 20 0.1%, extensively washed with the same buffer and sequentially eluted by glycine 0.1 mol/L pH 3 then pH 2. BMP9 and BMP10 were quantified in all fractions by western blot with anti-mature BMP9 (kind gift of Genentech, san Francisco, USA) and BMP10 (clone 13C11, home-made monoclonal antibody previously used in (18) using commercial recombinant BMP9 or -10 (R&D Systems, Abingdon, UK) as standard (1-10 ng/lane). The quantity of purified BMP9-10 heterodimer was calculated from the 23 kDa (BMP10, unreduced) or 14 kDa (BMP9, reduced) immune-reactive bands. Band intensities were quantified using Image Lab software (Biorad, Hercules, CA, USA).

Anti-BMP10 Ab-affinity purification of human plasma

Anti-BMP10 antibody (clone 13C11, see above) was coupled to NHS-activated Sepharose (2mg/mL of resin) using standard protocols (GE Healthcare). 10-30 mL of human plasma (Biopredic International, pool of donors) was diluted 1:1 in PBS and applied to the column using an Äkta chromatography system. The column was washed with phosphate buffer containing 0.5 mol/L NaCl, and eluted by glycine-HCl pH 2.7.

Bmp9- and Bmp10-KO mice

The generation of *Bmp9*-KO mice was described previously (19). To circumvent the early embryonic lethality of *Bmp10*-KO mice (14), the Institut Clinique de la Souris (Illkirch, France) generated for us a *Bmp10*^{lox/lox} mouse by flanking *loxP* sites around exon 2. These mice were then crossed with the Rosa26-CreER^{T2} mice provided by Pr. P. Chambon (IGBMC, Illkirch, France) (28) to generate

conditional KO of *Bmp10* (*Bmp10*-cKO mice). Intraperitoneal injections of tamoxifen (1 mg) were performed for five days in 3-week-old mice. Blood was collected 6 weeks later on EDTA tubes. Plasma were obtained by centrifugation at 2000 x g for 10 min. All animal studies were approved by the institutional guidelines and those formulated by the European Community for the Use of Experimental Animals. *Bmp9*-KO and *Bmp10*-cKO mice were viable. They were maintained in the C57/BL/6 background.

Right atria extracts

Right atria were retrieved from 1-2-month-old mice. Tissues were homogenized in 50 mmol/L Tris-HCl pH 7.4, 0.5 mol/L NaCl in presence of a cocktail of proteases inhibitors (Sigma) with a MagNA Lysar (Roche Diagnostics, Meylan, France).

Cell culture, transfection and dual luciferase activity assay

NIH-3T3 cells were transfected with a mixture of the reporter plasmid pGL3(BRE)2-luc encoding firefly luciferase downstream of a BMP response element, pRL-TK luc encoding Renilla luciferase and a plasmid encoding human ALK1, as previously described (7). HUVECs were grown in EGM-2 (Lonza, Basel, Switzerland) and transfected by pGL3(BRE)2-luc and pRL-TK luc in the absence of serum with lipofectamine 3000 accordingly to recommended protocols (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA). Cells were stimulated 2 hours after transfection and lysed after 6 hours for luciferase assay measurement.

To analyze Smad 1-5 phosphorylation, HUVEC or HMVEC-d cells (Lonza, Basel) were starved for 90 minutes in EBM-2 without serum and supplements, and stimulated for 20 or 30 minutes with the indicated ligands. Cells were then lysed and phospho-Smads were detected by immunoblotting with rabbit anti- P-Smad1-5 (Cell Signaling, Danvers, MA, USA) (57).

HUVECs were transfected with Silencer® Select siRNA (s986, s987, scramble, ThermoFisher scientific) with RNAi max lipofectamine using recommended protocols. Cells were used 48 hours later and transfected by pGL3(BRE)2-luc and pRL-TK luc as above. The extinction efficiency of ALK1

expression was evaluated by quantitative RT-PCR.

Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

BMP10 ELISA was performed with a commercially available assay (R&D Systems) that recognizes both human and mouse mature BMP10. This ELISA was different from the one previously used (19), and gave more reliable results. BMP9 and heterodimeric BMP9-10 ELISA measurements were performed as follows. 96-well microplate were coated with the capture antibody: MAB3209 (R&D Systems) for BMP9, 13C11 for BMP10 and incubated overnight at room temperature. After blocking with 5% BSA in PBS, all samples except plasmas were diluted in PBS containing 1% BSA, 0.1% Tween-20, added into the wells and incubated for 2 hours at room temperature. Plasma samples were diluted in PBS, 0.05% Tween-20, 0.5% Triton X-100. Biotinylated detection antibodies (anti mature BMP9: BAF3209, R&D Systems or anti mature BMP10: DuoSet R&D Systems, DY2926) were incubated for 2 hours at room temperature. Plates were then revealed and read at 450 nm. Standard curves (15-1000 pg/mL) were obtained with recombinant BMP9 and BMP10 (R&D Systems) or purified BMP9-10 that had been quantified by western blotting.

Quantitative RT-PCR

RNAs were extracted, reverse-transcribed as already described (19). Real-time PCR was performed using Bio-Rad CFX with the specific mouse *Bmp10* primer : forward 5' TCCATGCGTCTGCTAACATCATC 3', reverse ACATCATGCGATCTCTCTGCACCA and RPL13 : forward 5' CCCTCCACCCTATGACAAGA 3', reverse 5' TTCTCCTCC AGAGTGGCTGT 3'.

In situ Hybridization by RNAscope

RNAscope® (Advanced Cell Diagnostics) was carried out on fixed and paraffin-embedded tissues according to the manufacturer instructions. Target retrieval was achieved by heating the slides at 100°C for 18 minutes. RNAscope® probes (Mm-Gdf2, Mm-Bmp10, negative Control Probe, positive Control Probe) were incubated for 2 hours at 40°C on individual slides followed by hybridization amplification and staining. Sections were counter-stained for two minutes with hematoxylin.

Bioactive BMP9-10 heterodimers in blood

Acknowledgments: We thank Dr. D. Constam (Ecole Polytechnique Fédérale de Lausanne, Switzerland) for his gift of PCR3-furin plasmid, Dr S.J. lee (Johns Hopkins University School of Medicine, Baltimore, MD, USA) and Dr. T. Zimmers (Thomas Jefferson University, Philadelphia, PA, USA) for providing *Bmp9*-KO mice, Dr. D Metzger (IGBMC, Illkirch, France) for providing us the Rosa26-CreER^{T2} mouse, and the animal facility staff at Institut de Biosciences et Biotechnologies de Grenoble (BIG, Grenoble, France) for animal husbandry. This work was supported by INSERM (Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, U1036), CEA (Commissariat à l’Energie Atomique et aux Energies Alternatives, DRF/BIG/BCI), UGA (University Grenoble-Alpes), the Liges Départementales contre le Cancer de la Loire et de la Savoie, the association Maladie de Rendu-Osler (AMRO), the Fondation pour la Recherche Médicale (FRM) and the Association Pour la Recherche sur le Cancer. M.O. was supported by the PhD program of CEA/DSV (IRTELIS). We thank the Fondation Maladies Rares (FMR) for its financial support to the generation of *Bmp10*^{lox/lox} mice.

Conflict of interest: The authors declare that they have no conflicts of interest with the contents of this article.

REFERENCES

1. Zinski, J., Tajer, B., and Mullins, M. C. (2017) TGF- β Family Signaling in Early Vertebrate Development. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 10.1101/cshperspect.a033274
2. Hinck, A. P., Mueller, T. D., and Springer, T. A. (2016) Structural Biology and Evolution of the TGF- β Family. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **8**, 10.1101/cshperspect.a022103
3. Constam, D. B. (2014) Regulation of TGF β and related signals by precursor processing. *Semin. Cell Dev. Biol.* **32**, 85–97, 10.1016/j.semcdb.2014.01.008
4. Mueller, T. D. and Nickel, J. (2012) Promiscuity and specificity in BMP receptor activation. *FEBS Lett.* **586**, 1846–1859, 10.1016/j.febslet.2012.02.043
5. Miyazono, K., Kamiya, Y., and Morikawa, M. (2010) Bone morphogenetic protein receptors and signal transduction. *J. Biochem.* **147**, 35–51, 10.1093/jb/mvp148
6. García de Vinuesa, A., Abdelilah-Seyfried, S., Knaus, P., Zwijsen, A., and Bailly, S. (2016) BMP signaling in vascular biology and dysfunction. *Cytokine Growth Factor Rev.* **27**, 65–79, 10.1016/j.cytogfr.2015.12.005
7. David, L., Mallet, C., Mazerbourg, S., Feige, J.-J., and Bailly, S. (2007) Identification of BMP9 and BMP10 as functional activators of the orphan activin receptor-like kinase 1 (ALK1) in endothelial cells. *Blood* **109**, 1953–1961, 10.1182/blood-2006-07-034124
8. Scharpfenecker, M., van Dinther, M., Liu, Z., van Bezooijen, R. L., Zhao, Q., Pukac, L., Löwik, C. W. G. M., and ten Dijke, P. (2007) BMP-9 signals via ALK1 and inhibits bFGF-induced endothelial cell proliferation and VEGF-stimulated angiogenesis. *J. Cell. Sci.* **120**, 964–972, 10.1242/jcs.002949
9. Johnson, D. W., Berg, J. N., Baldwin, M. A., Gallione, C. J., Marondel, I., Yoon, S. J., Stenzel, T. T., Speer, M., Pericak-Vance, M. A., Diamond, A., Guttmacher, A. E., Jackson, C. E., Attisano, L., Kucherlapati, R., Porteous, M. E., et al. (1996) Mutations in the activin receptor-like kinase 1 gene in hereditary haemorrhagic telangiectasia type 2. *Nat. Genet.* **13**, 189–195, 10.1038/ng0696-189
10. Oh, S. P., Seki, T., Goss, K. A., Imamura, T., Yi, Y., Donahoe, P. K., Li, L., Miyazono, K., ten Dijke, P., Kim, S., and Li, E. (2000) Activin receptor-like kinase 1 modulates transforming growth factor-beta 1 signaling in the regulation of angiogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **97**, 2626–2631
11. Urness, L. D., Sorensen, L. K., and Li, D. Y. (2000) Arteriovenous malformations in mice lacking activin receptor-like kinase-1. *Nat. Genet.* **26**, 328–331, 10.1038/81634
12. Bidart, M., Ricard, N., Levet, S., Samson, M., Mallet, C., David, L., Subileau, M., Tillet, E., Feige, J.-J., and Bailly, S. (2012) BMP9 is produced by hepatocytes and circulates mainly in an active mature form complexed to its prodomain. *Cell. Mol. Life Sci.* **69**, 313–324, 10.1007/s00018-011-0751-1
13. Neuhaus, H., Rosen, V., and Thies, R. S. (1999) Heart specific expression of mouse BMP-10 a novel member of the TGF-beta superfamily. *Mech. Dev.* **80**, 181–184
14. Chen, H., Shi, S., Acosta, L., Li, W., Lu, J., Bao, S., Chen, Z., Yang, Z., Schneider, M. D., Chien, K. R., Conway, S. J., Yoder, M. C., Haneline, L. S., Franco, D., and Shou, W. (2004) BMP10 is essential for maintaining cardiac growth during murine cardiogenesis. *Development* **131**, 2219–2231, 10.1242/dev.01094
15. Chen, H., Brady Ridgway, J., Sai, T., Lai, J., Warming, S., Chen, H., Roose-Girma, M., Zhang, G., Shou, W., and Yan, M. (2013) Context-dependent signaling defines roles of BMP9 and BMP10 in embryonic and postnatal development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **110**, 11887–11892, 10.1073/pnas.1306074110
16. Laux, D. W., Young, S., Donovan, J. P., Mansfield, C. J., Upton, P. D., and Roman, B. L. (2013) Circulating Bmp10 acts through endothelial Alk1 to mediate flow-dependent arterial quiescence. *Development* **140**, 3403–3412, 10.1242/dev.095307

Bioactive BMP9-10 heterodimers in blood

17. Levet, S., Ciais, D., Merdzhanova, G., Mallet, C., Zimmers, T. A., Lee, S.-J., Navarro, F. P., Texier, I., Feige, J.-J., Bailly, S., and Vittet, D. (2013) Bone morphogenetic protein 9 (BMP9) controls lymphatic vessel maturation and valve formation. *Blood* **122**, 598–607, 10.1182/blood-2012-12-472142
18. Levet, S., Ouarné, M., Ciais, D., Coutton, C., Subileau, M., Mallet, C., Ricard, N., Bidart, M., Debillon, T., Faravelli, F., Rooryck, C., Feige, J.-J., Tillet, E., and Bailly, S. (2015) BMP9 and BMP10 are necessary for proper closure of the ductus arteriosus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **112**, E3207–3215, 10.1073/pnas.1508386112
19. Ricard, N., Ciais, D., Levet, S., Subileau, M., Mallet, C., Zimmers, T. A., Lee, S.-J., Bidart, M., Feige, J.-J., and Bailly, S. (2012) BMP9 and BMP10 are critical for postnatal retinal vascular remodeling. *Blood* **119**, 6162–6171, 10.1182/blood-2012-01-407593
20. Brown, M. A., Zhao, Q., Baker, K. A., Naik, C., Chen, C., Pukac, L., Singh, M., Tsareva, T., Parice, Y., Mahoney, A., Roschke, V., Sanyal, I., and Choe, S. (2005) Crystal structure of BMP-9 and functional interactions with pro-region and receptors. *J. Biol. Chem.* **280**, 25111–25118, 10.1074/jbc.M503328200
21. Mi, L.-Z., Brown, C. T., Gao, Y., Tian, Y., Le, V. Q., Walz, T., and Springer, T. A. (2015) Structure of bone morphogenetic protein 9 procomplex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **112**, 3710–3715, 10.1073/pnas.1501303112
22. Sengle, G., Ono, R. N., Sasaki, T., and Sakai, L. Y. (2011) Prodomains of transforming growth factor beta (TGFbeta) superfamily members specify different functions: extracellular matrix interactions and growth factor bioavailability. *J. Biol. Chem.* **286**, 5087–5099, 10.1074/jbc.M110.188615
23. Shi, M., Zhu, J., Wang, R., Chen, X., Mi, L., Walz, T., and Springer, T. A. (2011) Latent TGF- β structure and activation. *Nature* **474**, 343–349, 10.1038/nature10152
24. Wolfman, N. M., McPherron, A. C., Pappano, W. N., Davies, M. V., Song, K., Tomkinson, K. N., Wright, J. F., Zhao, L., Sebald, S. M., Greenspan, D. S., and Lee, S.-J. (2003) Activation of latent myostatin by the BMP-1/tolloid family of metalloproteinases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **100**, 15842–15846, 10.1073/pnas.2534946100
25. Jiang, H., Salmon, R. M., Upton, P. D., Wei, Z., Lawera, A., Davenport, A. P., Morrell, N. W., and Li, W. (2016) The Prodomain-bound Form of Bone Morphogenetic Protein 10 Is Biologically Active on Endothelial Cells. *J. Biol. Chem.* **291**, 2954–2966, 10.1074/jbc.M115.683292
26. Guo, J. and Wu, G. (2012) The signaling and functions of heterodimeric bone morphogenetic proteins. *Cytokine Growth Factor Rev.* **23**, 61–67, 10.1016/j.cytogfr.2012.02.001
27. Hernandez, F., Huether, R., Carter, L., Johnston, T., Thompson, J., Gossage, J. R., Chao, E., and Elliott, A. M. (2015) Mutations in RASA1 and GDF2 identified in patients with clinical features of hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Hum Genome Var* **2**, 15040, 10.1038/hgv.2015.40
28. Imayoshi, I., Ohtsuka, T., Metzger, D., Chambon, P., and Kageyama, R. (2006) Temporal regulation of Cre recombinase activity in neural stem cells. *Genesis* **44**, 233–238, 10.1002/dvg.20212
29. Kienast, Y., Jucknischke, U., Scheiblich, S., Thier, M., de Wouters, M., Haas, A., Lehmann, C., Brand, V., Bernicke, D., Honold, K., and Lorenz, S. (2016) Rapid Activation of Bone Morphogenetic Protein 9 by Receptor-mediated Displacement of Pro-domains. *J. Biol. Chem.* **291**, 3395–3410, 10.1074/jbc.M115.680009
30. Zhao, B., Xu, S., Dong, X., Lu, C., and Springer, T. A. (2018) Prodomain-growth factor swapping in the structure of pro-TGF- β 1. *J. Biol. Chem.* **293**, 1579–1589, 10.1074/jbc.M117.809657
31. O'Connor, M. B., Umulis, D., Othmer, H. G., and Blair, S. S. (2006) Shaping BMP morphogen gradients in the Drosophila embryo and pupal wing. *Development* **133**, 183–193, 10.1242/dev.02214
32. Shimmi, O., Umulis, D., Othmer, H., and O'Connor, M. B. (2005) Facilitated transport of a Dpp/Scw heterodimer by Sog/Tsg leads to robust patterning of the Drosophila blastoderm embryo. *Cell* **120**, 873–886, 10.1016/j.cell.2005.02.009

33. Little, S. C. and Mullins, M. C. (2009) Bone morphogenetic protein heterodimers assemble heteromeric type I receptor complexes to pattern the dorsoventral axis. *Nat. Cell Biol.* **11**, 637–643, 10.1038/ncb1870
34. Suzuki, A., Kaneko, E., Maeda, J., and Ueno, N. (1997) Mesoderm induction by BMP-4 and -7 heterodimers. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **232**, 153–156, 10.1006/bbrc.1997.6219
35. Butler, S. J. and Dodd, J. (2003) A role for BMP heterodimers in roof plate-mediated repulsion of commissural axons. *Neuron* **38**, 389–401
36. Fuerer, C., Nostro, M. C., and Constam, D. B. (2014) Nodal-Gdf1 heterodimers with bound prodomains enable serum-independent nodal signaling and endoderm differentiation. *J. Biol. Chem.* **289**, 17854–17871, 10.1074/jbc.M114.550301
37. Tanaka, C., Sakuma, R., Nakamura, T., Hamada, H., and Saijoh, Y. (2007) Long-range action of Nodal requires interaction with GDF1. *Genes Dev.* **21**, 3272–3282, 10.1101/gad.1623907
38. Mottershead, D. G., Sugimura, S., Al-Musawi, S. L., Li, J.-J., Richani, D., White, M. A., Martin, G. A., Trotta, A. P., Ritter, L. J., Shi, J., Mueller, T. D., Harrison, C. A., and Gilchrist, R. B. (2015) Cumulin, an Oocyte-secreted Heterodimer of the Transforming Growth Factor- β Family, Is a Potent Activator of Granulosa Cells and Improves Oocyte Quality. *J. Biol. Chem.* **290**, 24007–24020, 10.1074/jbc.M115.671487
39. Peng, J., Li, Q., Wigglesworth, K., Rangarajan, A., Kattamuri, C., Peterson, R. T., Eppig, J. J., Thompson, T. B., and Matzuk, M. M. (2013) Growth differentiation factor 9:bone morphogenetic protein 15 heterodimers are potent regulators of ovarian functions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **110**, E776–785, 10.1073/pnas.1218020110
40. Ramirez, F. and Rifkin, D. B. (2009) Extracellular microfibrils: contextual platforms for TGF β and BMP signaling. *Curr. Opin. Cell Biol.* **21**, 616–622, 10.1016/j.ceb.2009.05.005
41. Wohl, A. P., Troilo, H., Collins, R. F., Baldock, C., and Sengle, G. (2016) Extracellular Regulation of Bone Morphogenetic Protein Activity by the Microfibril Component Fibrillin-1. *J. Biol. Chem.* **291**, 12732–12746, 10.1074/jbc.M115.704734
42. Sengle, G., Charbonneau, N. L., Ono, R. N., Sasaki, T., Alvarez, J., Keene, D. R., Bächinger, H. P., and Sakai, L. Y. (2008) Targeting of bone morphogenetic protein growth factor complexes to fibrillin. *J. Biol. Chem.* **283**, 13874–13888, 10.1074/jbc.M707820200
43. Aono, A., Hazama, M., Notoya, K., Taketomi, S., Yamasaki, H., Tsukuda, R., Sasaki, S., and Fujisawa, Y. (1995) Potent ectopic bone-inducing activity of bone morphogenetic protein-4/7 heterodimer. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **210**, 670–677, 10.1006/bbrc.1995.1712
44. Isaacs, M. J., Kawakami, Y., Allendorph, G. P., Yoon, B.-H., Izpisua Belmonte, J. C., and Choe, S. (2010) Bone morphogenetic protein-2 and -6 heterodimer illustrates the nature of ligand-receptor assembly. *Mol. Endocrinol.* **24**, 1469–1477, 10.1210/me.2009-0496
45. Israel, D. I., Nove, J., Kerns, K. M., Kaufman, R. J., Rosen, V., Cox, K. A., and Wozney, J. M. (1996) Heterodimeric bone morphogenetic proteins show enhanced activity in vitro and in vivo. *Growth Factors* **13**, 291–300
46. Valera, E., Isaacs, M. J., Kawakami, Y., Izpisua Belmonte, J. C., and Choe, S. (2010) BMP-2/6 heterodimer is more effective than BMP-2 or BMP-6 homodimers as inductor of differentiation of human embryonic stem cells. *PLoS ONE* **5**, e111167, 10.1371/journal.pone.0011167
47. Sebald, W., Nickel, J., Zhang, J.-L., and Mueller, T. D. (2004) Molecular recognition in bone morphogenetic protein (BMP)/receptor interaction. *Biol. Chem.* **385**, 697–710, 10.1515/BC.2004.086
48. Allendorph, G. P., Isaacs, M. J., Kawakami, Y., Izpisua Belmonte, J. C., and Choe, S. (2007) BMP-3 and BMP-6 structures illuminate the nature of binding specificity with receptors. *Biochemistry* **46**, 12238–12247, 10.1021/bi700907k
49. Mahlawat, P., Ilangovan, U., Biswas, T., Sun, L.-Z., and Hinck, A. P. (2012) Structure of the Alk1 extracellular domain and characterization of its bone morphogenetic protein (BMP) binding

Bioactive BMP9-10 heterodimers in blood

- properties. *Biochemistry* **51**, 6328–6341, 10.1021/bi300942x
50. Townson, S. A., Martinez-Hackert, E., Greppi, C., Lowden, P., Sako, D., Liu, J., Ucran, J. A., Liharska, K., Underwood, K. W., Seehra, J., Kumar, R., and Grinberg, A. V. (2012) Specificity and structure of a high affinity activin receptor-like kinase 1 (ALK1) signaling complex. *J. Biol. Chem.* **287**, 27313–27325, 10.1074/jbc.M112.377960
 51. Herrera, B., van Dinther, M., Ten Dijke, P., and Inman, G. J. (2009) Autocrine bone morphogenetic protein-9 signals through activin receptor-like kinase-2/Smad1/Smad4 to promote ovarian cancer cell proliferation. *Cancer Res.* **69**, 9254–9262, 10.1158/0008-5472.CAN-09-2912
 52. Luo, J., Tang, M., Huang, J., He, B.-C., Gao, J.-L., Chen, L., Zuo, G.-W., Zhang, W., Luo, Q., Shi, Q., Zhang, B.-Q., Bi, Y., Luo, X., Jiang, W., Su, Y., et al. (2010) TGFbeta/BMP type I receptors ALK1 and ALK2 are essential for BMP9-induced osteogenic signaling in mesenchymal stem cells. *J. Biol. Chem.* **285**, 29588–29598, 10.1074/jbc.M110.130518
 53. Mazerbourg, S., Sangkuhl, K., Luo, C.-W., Sudo, S., Klein, C., and Hsueh, A. J. W. (2005) Identification of receptors and signaling pathways for orphan bone morphogenetic protein/growth differentiation factor ligands based on genomic analyses. *J. Biol. Chem.* **280**, 32122–32132, 10.1074/jbc.M504629200
 54. Shimmi, O., Ralston, A., Blair, S. S., and O'Connor, M. B. (2005) The crossveinless gene encodes a new member of the Twisted gastrulation family of BMP-binding proteins which, with Short gastrulation, promotes BMP signaling in the crossveins of the Drosophila wing. *Dev. Biol.* **282**, 70–83, 10.1016/j.ydbio.2005.02.029
 55. Miller, A. F., Harvey, S. A., Thies, R. S., and Olson, M. S. (2000) Bone morphogenetic protein-9. An autocrine/paracrine cytokine in the liver. *J. Biol. Chem.* **275**, 17937–17945
 56. Breitkopf-Heinlein, K., Meyer, C., König, C., Gaitantzi, H., Addante, A., Thomas, M., Wiercinska, E., Cai, C., Li, Q., Wan, F., Hellerbrand, C., Valous, N. A., Hahnel, M., Ehrling, C., Bode, J. G., et al. (2017) BMP-9 interferes with liver regeneration and promotes liver fibrosis. *Gut* **66**, 939–954, 10.1136/gutjnl-2016-313314
 57. David, L., Mallet, C., Keramidas, M., Lamandé, N., Gasc, J.-M., Dupuis-Girod, S., Plauchu, H., Feige, J.-J., and Bailly, S. (2008) Bone morphogenetic protein-9 is a circulating vascular quiescence factor. *Circ. Res.* **102**, 914–922, 10.1161/CIRCRESAHA.107.165530

Annexe 4

C.A. Girard, R. Ben Jouira, M. Lecacheur, I. Berestjuk, S. Diazi, R. Didier, V. Prod'homme, A. Mallavialle, C. Pandiani, F. Larbret, A. Pottier, M. Gesson, S. Pisano, S. Audebert, B. Mari, C. Gaggioli, E. Leucci, J.C. Marine, M. Deckert, S. Tartare-Deckert. **MAPK-targeting therapies induce a cancer cell-autonomous matrix reprogramming in tumor mechanics and drug resistance**

ABSTRACT

Resistance to targeted drugs in melanoma is a consequence of both acquisition of genetic alterations and non-genetic events such as transcriptional reprogramming. De-differentiation into a mesenchymal-like state, featuring an up-regulation of receptor tyrosine kinases, has been described as an escape mechanism to BRAF inhibitors (BRAFi). Despite growing evidence that the tumor microenvironment plays key roles in such transcriptional events, little is known about molecular mechanisms involved. Here, we demonstrate that mesenchymal resistance endows melanoma cells with elevated sensitivity to extracellular matrix (ECM) mechanical cues through activation of β 1-integrin/focal adhesion and YAP pathways. This subset of resistant cells also produces and contracts its ECM that protects drug-naïve cells from anti-proliferative responses to BRAF and MEK inhibition. We find that melanoma cells rapidly adapt to targeted agents by inducing mechanical signaling and ECM-dependent resistant program. Collagen remodeling and stiffening were also observed *in vivo* upon exposure of xenografts and PDX tumors to BRAFi. Thus, targeted therapies can redirect melanoma cells toward an ECM remodeling program that affects tumor mechanical features, potentially contributing to non-genetic-driven drug resistance and disease relapse.

Article *soumis*

Fin
