



HAL
open science

Étude des propriétés contractiles des fibroblastes du ganglion lymphatique au cours de la mise en place de la niche pré-métastatique du mélanome

Christopher Rovera

► To cite this version:

Christopher Rovera. Étude des propriétés contractiles des fibroblastes du ganglion lymphatique au cours de la mise en place de la niche pré-métastatique du mélanome. Biologie moléculaire. Université Côte d'Azur, 2020. Français. NNT : 2020COAZ6013 . tel-03128920

HAL Id: tel-03128920

<https://theses.hal.science/tel-03128920v1>

Submitted on 2 Feb 2021

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

Etude des propriétés contractiles des fibroblastes
du ganglion lymphatique au cours de la mise en
place de la niche pré-métastatique du mélanome

Christopher ROVERA

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 (Interactions
moléculaires et cellulaires) d'Université Côte d'Azur

Co-Dirigée par :

Dr Virginie Prod'Homme

Dr Sophie Tartare-Deckert

Soutenue le : 14 Septembre 2020

Devant le jury, composé de :

Dr Bernard Mari, *DR CNRS, Université Côte d'Azur*

Dr Emmanuel Donnadiou, *DR CNRS, Université de Paris*

Pr Marie-Dominique Galibert, *PU-PH, Université de Rennes*

Dr Marc Bajenoff, *DR CNRS, Université d'Aix-Marseille*

Dr Sophie Tartare-Deckert, *DR Inserm, Université Côte d'Azur*

Dr Virginie Prod'Homme, *DR Inserm, Université Côte d'Azur*

Etude des propriétés contractiles des fibroblastes du ganglion lymphatique au cours de la mise en place de la niche pré-métastatique du mélanome

Jury :

Président du Jury

M. Bernard Mari, DR CNRS, Université Côte d'Azur

Rapporteurs

Mme. Marie-Dominique Galibert, PU-PH, Université de Rennes

Mr. Emmanuel Donnadiou, DR CNRS, Université de Paris

Examineur

Mr. Marc Bajenoff, DR CNRS, Université d'Aix-Marseille

Invités – Co-directrice de thèse :

Dr Sophie Tartare-Deckert, DR Inserm, Université Côte d'Azur

Dr Virginie Prod'Homme, DR Inserm, Université Côte d'Azur

Résumé de la thèse

Le mélanome est le cancer de la peau le plus agressif. Il est caractérisé par une progression rapide des métastases, et une forte plasticité des cellules tumorales. On distingue des cellules au phénotype prolifératif avec une signature MITF^{high} AXL^{low} et des cellules au profil invasif dé-différencié AXL^{high} MITF^{low}. Ces cellules peuvent transiter d'un phénotype à l'autre en fonction des signaux du microenvironnement. Le mélanome possède un fort tropisme pour le ganglion lymphatique. Il sécrète des vésicules extracellulaires et des facteurs solubles capables de migrer dans le ganglion drainant et de reprogrammer les cellules du ganglion pour créer une niche pré-métastatique favorable à l'implantation tumorale. Dans le ganglion lymphatique, les Cellules Réticulaires Fibroblastiques (FRC) sont des myofibroblastes qui contrôlent l'architecture du ganglion ainsi que sa dilatation lors des réponses immunitaires. Les FRC sécrètent également des chimiokines et des cytokines ainsi qu'un réseau matriciel de conduits qui régulent le recrutement, la survie, l'activation et la circulation des cellules immunitaires. La modification architecturale du ganglion pré-métastatique est une des caractéristiques des cancers lymphophiles, comme le mélanome, mais les liens entre les facteurs sécrétés par le mélanome et les propriétés contractiles des FRC ne sont pas connus. Au cours de ma thèse, j'ai étudié l'effet des facteurs sécrétés par le mélanome sur les propriétés contractiles des FRC. J'ai identifié que les protéines sécrétées par les cellules de mélanome invasives à signature AXL^{high} MITF^{low}, mais pas par les cellules au phénotype prolifératif, inhibent la contractilité du squelette d'actomyosine des FRC en inhibant la voie RHOA et RHO-kinase (ROCK) et le co-activateur transcriptionnel mécanosensible YAP, ce qui conduit à une diminution des fibres de stress et à une modulation de la morphologie des FRC. Ces effets sont indépendants des vésicules extracellulaires sécrétées par les mélanomes invasifs, et sont induits par l'inhibition de JAK1 et du facteur de transcription en aval, STAT3. Mes résultats suggèrent donc que les facteurs sécrétés par les cellules de mélanome invasives pourraient moduler les propriétés biomécaniques du ganglion pré-métastatique. Ils montrent également que la contractilité spontanée de l'actomyosine dans les FRC humains est déterminée par l'activité basale de JAK1-STAT3 en amont des voies de signalisation RHOA-ROCK et YAP. Par ailleurs, j'ai montré que les facteurs sécrétés par les lignées de mélanome invasives induisent également l'activation et la prolifération des FRC, ainsi que la modification du profil de cytokines et chimiokines sécrétées par les FRC. Mes travaux de thèse démontrent que les facteurs sécrétés par les mélanomes invasifs reprogramment profondément les FRC dans le ganglion pré-métastatique. Ils participent à une meilleure compréhension des interactions entre le mélanome et le ganglion lymphatique qui pourrait aboutir à la mise au point de nouveaux biomarqueurs ou de nouvelles cibles thérapeutiques pour mieux identifier et traiter les patients présentant un risque de métastase ganglionnaire.

Mots-clés :

Mélanome , Cellules Réticulaires Fibroblastiques , ganglion lymphatique , niche pré-métastatique , Contraction

Abstract :

Melanoma is the most aggressive skin cancer. It is characterized by a rapid progression of metastasis and a high plasticity of tumoral cells. We distinguish melanoma cells with proliferative phenotype, associated to the signature MITF^{high} AXL^{low} and cells with the invasive un-differentiated profile AXL^{high} MITF^{low}. These cells can switch from a phenotype to the other following stimulation with signals from the microenvironment. Melanoma has a strong tropism for the lymph node. Melanoma cells secrete extracellular vesicles and soluble factors able to reach the draining lymph node and to reprogram lymph node cells, in order to create a favorable pre-metastatic niche for tumor implantation. In the lymph node, Fibroblastic Reticular Cells (FRC) are myofibroblasts that control lymph node architecture and its dilatation during immune responses. FRC secrete also chemokines and cytokines, and a complex network of conduits that regulate recruitment, la survival, activation and the circulation of immune cells. The architectural modification of the pre-metastatic lymph node is one of the characteristics of lymphophilic cancers, as melanoma, but the links between melanoma secreted factors and FRC contractile properties are not known. During my thesis, I studied the effects of melanoma secreted factors on FRC contractile properties. I identified that the secreted proteins of invasive melanoma cells with the signature AXL^{high} MITF^{low}, but not the factors from melanoma with proliferative signature, inhibit FRC actomyosin contractility by inhibiting the RHO-A and RHO-kinase (ROCK) pathway, and the mechanosensitive transcriptional co-activator YAP, leading to the diminution of stress fibers and the modulation of FRC morphology. These effects are independent of extracellular vesicles secreted by invasive melanoma, and are induced by the blocking of JAK1 and the transcription factor STAT3. My results suggest that secreted factors from invasive melanoma cells may modulate the biomechanical properties of the pre-metastatic lymph node. I demonstrate also that FRC actomyosin spontaneous contractility is controlled by the basal activity of the JAK1-STAT3 pathway, upstream of the RHOA-ROCK and YAP signaling pathways. Otherwise, I demonstrated that invasive melanoma secreted factors induce the activation and the proliferation of FRC, and the modification of the cytokine and chemokine landscape secreted by the FRC. My thesis work demonstrates that invasive melanoma secreted factors deeply reprogram FRC in the pre-metastatic lymph node. They allow us to better understand the interactions between melanoma and lymph node which could lead to the development of new biomarkers or new therapeutic targets to better identify and treat patients at risk of lymph node metastasis.

Key-words:

Melanoma, Fibroblastic Reticular Cells, Lymph Node, Pre-metastatic niche, Contraction

Remerciements

Je remercie profondément les membres du jury d'avoir accepté d'évaluer mon travail et de me faire partager leur expertise. Merci au Docteur **Marie-Dominique Galibert** et au Docteur **Emmanuel Donnadieu**, qui me font l'honneur d'être les rapporteurs de cette thèse, merci au Docteur **Marc Bajenoff**, d'avoir accepté de faire partie de ce jury en tant qu'examinateur, et au Docteur **Bernard Mari**, d'être président de ce jury. Merci beaucoup à mes deux directrices de thèse, Docteur **Virginie Prod'Homme** et Docteur **Sophie Tartare-Deckert**, d'être également présentes dans ce jury, pour cet achèvement de quatre années de travail.

Un grand merci, tout d'abord, à toi **Virginie**. Il y a maintenant plus de quatre ans, tu m'as accepté en tant que master sur ce projet. Ton parcours et ton travail m'ont plu dès de le départ, au croisement de la cancérologie et de l'immunologie. Pour toi, ni les ganglions ni les fibroblastes n'ont de secret ! Merci pour toute la confiance que tu m'as donnée, pour ton soutien permanent pendant ces années, pendant les moments de doute lorsque je n'arrivais pas à avancer, lorsque les résultats n'étaient pas au rendez-vous. Tu as toujours été là pour que l'on trouve des solutions, ou de nouvelles voies à explorer. Merci pour ton infinie patience et ton engagement qui m'ont poussé à donner le meilleur de moi-même. Mais merci, merci surtout, pour tout ce que tu m'as appris. Je pense très sincèrement que tu fais partie des directrices de thèse avec qui tout doctorant aimerait travailler, bien sûr pour ta disponibilité, le fait que l'on puisse échanger quasiment à tout moment, mais encore plus pour tout ce que inspires et ce que tu veux transmettre à tes étudiants. Ce fut vraiment un bonheur de travailler avec toi. Merci pour ton exigence de rigueur, d'organisation et de méthode, trois piliers du métier de chercheur, et ce que tu m'as appris pour m'améliorer en ce sens. Merci pour ta gentillesse, merci de m'avoir fait partager ton enthousiasme et ta passion pour ton travail. Tu es une chercheuse brillante, engagée pour les projets que tu mènes et pour les étudiants que tu encadres, et cela a été non seulement une fierté de travailler avec toi, mais aussi un modèle que je souhaite suivre plus tard. Je te souhaite beaucoup de bonheur avec les ganglions lymphatiques, mais surtout beaucoup de réussites pour la suite de ta carrière de chercheuse, et beaucoup beaucoup de bonheur avec tes enfants et ton mari !

Merci beaucoup à toi **Sophie** de m'avoir accepté dans ton équipe. Ton enthousiasme pour faire avancer tous ces projets si passionnants est sans faille. Je sais également ton engagement pour le dynamisme scientifique de notre centre de recherche, et plus largement dans la région, et je suis extrêmement fier d'avoir fait partie des étudiants d'une grande scientifique qui apporte beaucoup à la recherche contre le cancer. Merci pour ton soutien, pour la confiance que tu m'as portée. Merci de m'avoir aidé à me refocaliser lorsque j'en avais besoin, merci pour la sagesse de tes conseils qui m'ont toujours été précieux. Merci pour ta gentillesse et l'attention que tu m'as portée pendant ces années. Je te souhaite beaucoup de bonheur et de réussites.

Merci à toi **Marcel**, pour ta confiance, merci pour tes conseils, nombreux dès qu'il s'agissait de faire pour moi un peu de biochimie ! Merci pour tes retours en lab meeting, parfois énergiques, mais toujours précieux. Merci pour ton engagement dans la direction de notre équipe, ton exigence pour que l'on donne le meilleur de nous-mêmes.

Merci aux membres de mon comité de thèse, le Docteur **Cédric Gaggioli** et le Docteur **Fatima Mechta-Grigoriou**, pour leur soutien renouvelé par trois fois, leur expertise très précieuse offerte à plusieurs moments cruciaux de ma thèse, et leurs suggestions qui se sont révélées être fructueuses de résultats.

Merci à toute l'équipe pour m'avoir soutenu, conseillé, aidé et surtout de m'avoir fait partager plein de bons moments.

Merci à toi **Christophe**, spécialiste de la mécanotransduction et de YAP, pour tes conseils avisés dès que j'en avais besoin, à chaque réunion d'équipe comme en d'autres moments. Merci pour ta disponibilité et ton expertise qui m'ont beaucoup apporté. Je te souhaite plein de réussites pour la suite de ta carrière !

Merci à **Michael** pour tes conseils, ta bonne humeur, merci aussi pour nos discussions sur le projet toujours constructives et le soutien que tu m'as apporté.

Merci à **Fred** pour tes conseils, ton aide pour la cytométrie en flux et ta bonne humeur !

Merci à **Lauren** pour ta bonne humeur, ton soutien et pour les bons moments partagés ! Merci pour ton engagement dans le bon fonctionnement de l'équipe. Merci pour tes conseils, ton aide quand j'en avais besoin. Je te souhaite beaucoup de bonheur et de réussites pour la suite !

Merci à **Ilona (Ilonette)** pour ton soutien, tes conseils, ta présence ! Merci pour tout ce que tu as fait pour le labo. Merci pour l'aide que tu m'as apporté tout au long de mon master et mon doctorat. Je te souhaite beaucoup de bonheur pour la suite, ton post-doc aux États-Unis qui sera certainement aussi brillant que ta thèse ! Donne-nous souvent des nouvelles !

Un grand merci à **Margaux / Margette** (ça dépend de la transition phénotypique). On est arrivé au labo en même temps, moi en M2, toi en M1. Quatre ans et demi que l'on partage l'aventure de la science ! Merci pour tout ce que tu m'as apporté, les manips que nous avons réfléchi ensemble, nos discussions sur les problèmes que l'on rencontrait. Parfois, les meilleures solutions ont surgi de ces discussions ! Merci pour ta passion, ton soutien, tes conseils encore et toujours ! J'espère que je t'aurai rendu la pareille. Merci d'avoir été toujours à mon écoute, merci pour tous ces moments partagés, d'avoir apprécié et partagé mes délires entre biologie et astrophysique. Tu es une très belle personne Margaux, dévouée à tes amis qui croient en toi et dont je fais partie. Tu es passionnée, talentueuse, et tu iras très loin dans ta carrière. Bravo pour ce que tu as accompli pendant ces années, tu peux en être très fière !

Merci beaucoup à **Serena (Serenette / La Serenissima / The Queen of Cats, ça dépend des miR)**. Bon, et bien finalement, on va la finir cette thèse ! Commencée quasiment en même temps, terminée presque ensemble ! Merci à toi pour ton soutien, ton écoute, ton amitié, ta sérénité ! *Grazie mille e tanti complimenti per tutto quello che sei*. Bravo à toi pour tout ce que tu as réussi pendant ce doctorat, qu'on a vécu ensemble. Merci pour tous ces moments de rigolades que nous avons partagé. Merci pour toute l'affection que tu m'as apportée. Merci de m'avoir permis de reparler un peu italien (ou franglitalien^^) avec toi. Il faut toujours que l'on se donne rendez-vous à Milan !! Ma serenette, je te souhaite beaucoup de bonheur dans toute la suite de ta carrière de brillante scientifique que tu es, la reine des micro-ARN. Tu iras loin, ne te ferme aucune porte et va au bout de tes rêves !

Merci à **Alex** (Alexandrine / **Little One**) et **Pierric (Little Two)**, les inséparables <3 Merci pour votre joie de vivre à tous les deux, les fous rires qu'on a eu ensemble. Vous m'avez vraiment permis de décompresser pendant ces dernières semaines de thèse qui ont été difficiles, et je vous en remercie beaucoup !! Alex, je te souhaite de faire une thèse brillante comme tu le mérites tant. Tu es une femme courageuse qui n'hésite pas à mener les batailles de front, et il est certain qu'aucune barrière ne te résistera ! Tu as l'intelligence pour réussir et aller loin, et je te fais parfaitement confiance pour cela ! Pierric, toi aussi, je te souhaite de terminer cette thèse avec brio et de continuer une carrière scientifique tout aussi réussie. A tous les deux je vous souhaite beaucoup de réussites et surtout un bonheur commun ! A vous, amateurs d'étoiles, je vous laisse avec cette citation d'Antoine de Saint-Exupéry : « *Aimer, ce n'est pas se regarder l'un l'autre, c'est regarder dans la même direction* » (bon en fait c'est les deux !^^)

Merci à **Ana**, pour ta bonne humeur, ta passion pour ton travail. Merci pour les très bons conseils que tu m'as toujours apporté. Je rêve que tu puisses me montrer un jour Le Cap et l'Afrique du sud, j'espère pouvoir y aller quand tu y retourneras. En attendant, je te souhaite beaucoup de bonheur et plein de réussites pour la grande carrière de biologiste qui s'annonce pour toi !

Merci à **Caroline** pour ton soutien ! Je sais que tu vas bientôt devenir mère, je te souhaite énormément de bonheur avec ton chéri et ton enfant ! Et beaucoup de réussites dans ta carrière de médecin. Je me sens petit avec ma thèse de science quand je sais que toi tu as du en gérer plusieurs. Bravo et beaucoup de bonheur pour la suite !

Merci à tous les anciens membres de l'équipe qui m'ont soutenu et encouragé, à **Marie-Angela**, toujours présente !, à **Aude**, à **Moez**, à **Emilien** et à **Robin**.

Merci beaucoup à **Céline** (« **La petite célinette** » – La mère de SPARC et de G9a), pour ton soutien et ton aide jusqu'à la fin de l'écriture de cette thèse, merci pour nos petits délires de confinement (parce que oui, ce serait cool un parc d'attraction pour souris !). Je voulais te dire de croire en toi coûte que coûte, parce que tu es une scientifique douée qui fera une thèse brillante par le seul fait de son intelligence. Tu voulais être médecin, tu seras chercheuse, et peut-être soigneras tu tout autant de monde par ce moyen. Toi seule décide la route que tu prendras, et ne laisse personne prétendre que cette route te serait barrée. Fonce, tu es la meilleure.

Merci à toutes les personnes du C3M qui m'ont soutenu et accompagnés pendant ces années de master et de thèse. Merci tout d'abord à Maëva et Marie, pour leur aide en tant qu'ingénieur imagerie, et qui m'ont beaucoup appris. Merci à mes amis de promo au C3M, à **Fabien** (toujours présent aussi ! Plein de réussites à toi !), à **Rana** (Beaucoup de réussites pour ton post-doc à Paris !), à **Charlotte** (qui soutient en même temps que moi, et oui désolé je t'ai piqué l'amphi^^, beaucoup de bonheur et réussites à toi !). Merci aussi à **Florian** et à **Juan** avec qui j'ai organisé les conférences jeunes chercheurs du C3M.

Merci à tous mes amis rencontrés à l'université, dont beaucoup ont suivi la même voie que moi vers l'enseignement. Merci à **Cécilia**, à **Marine**, à **Camille**, à **Joffrey**. Nous allons tous finir docteurs ès science, et peut-être un jour enseignant-chercheur. Le temps passe vite. Merci pour votre présence, votre soutien !

Merci à mes plus anciens amis. Un énorme merci à mes amis de prépa avec qui j'ai toujours gardé contact, et dont certains sont déjà docteurs !

On s'était dit rendez-vous dans dix ans, même jour, même heure, mêmes pommes...

Merci aux *King's Hawaiian* pour nos si belles soirées ensemble, entre pizzas, restos et escape game, merci beaucoup à **Margaux**, à **Laura** et au **Dr Paul Ghislain**, les vétérinaires !!, et merci beaucoup au **Dr Marion Tiberti** pour leur soutien indéfectible depuis tant d'années ! **Margaux**, tu me fais rêver avec ton poste d'ingénieur à New York. La période est difficile en ce moment, mais j'espère que les choses rentreront dans l'ordre et que tu pourras continuer cette belle aventure rapidement ! **Laura**, te voilà maman d'une petite fille depuis quelques mois, qui est tellement belle ! Je te souhaite un bonheur infini avec ta famille et pleins de réussites ! **Paul**, je suis tellement fier de tout ce que tu as accomplis également depuis la prépa. Te voilà docteur vétérinaire, brillant et reconnu. Je voulais encore t'adresser un grand bravo et te souhaiter beaucoup de bonheur pour la suite ! **Marion**, alors c'est parti, le post-doc à Francfort ! Tellement tellement fier de toi ! Tu seras brillante, comme d'habitude, je ne me fais aucune inquiétude pour ça. Bravo encore et toujours !!

Merci aussi à **Magali (Dr Magali Mignot** excuse-moi !!) pour ces beaux moments passés avec toi pendant la thèse, à Toulouse et à Nice ! Il y a presque un an j'étais là pour voir ta soutenance de thèse vétérinaire, passionnante, et maintenant c'est mon tour ! Je suis vraiment très fier de ce que tu as accomplis depuis toutes ces années, les efforts ont payé, et continueront à payer ! Merci pour le soutien que tu m'as toujours porté et que je tenterai toujours de te rendre ! Je te souhaite beaucoup de bonheur et de réussites dans ta carrière, cette carrière de vétérinaire que tu rêvais depuis tant de temps !

Juliiiiie !!!! Tu croyais que j'allais t'oublier ?? C'est râté ! **Julie (Eiluj – Djoulaille - Jujudu83)**, merci également pour ton soutien si fort durant toutes ces années ! Merci pour nos moments partagés, que j'espère retrouver vraiment bientôt !

Merci à **Killian**, le futur vétérinaire roumain (ça fait bizarre présenté comme ça^^). Merci pour ton soutien, nos soirées partagées. Je te souhaite beaucoup de bonheur et de réussites pour la fin de tes études, et surtout de réaliser enfin ce rêve que tu chéris depuis la prépa. Tu t'es donné à fond, tu es parti loin pour réussir, les efforts vont réussir. Bravo pour ton courage !

Merci à tous mes autres amis qui m'ont soutenu depuis tant d'années. Merci à **Nicola**, à **Chloé**, à **Marion** Valers, un grand merci aussi à **Léa** et à **Enzo**, pour m'avoir fait croire en mes rêves et persévérer jusqu'au bout. J'espère que nous aurons encore l'occasion de nous voir et partager de bons moments !

Merci aussi à **Elise**. Merci pour l'amitié que tu m'as offert pendant tant de temps et pour ces week-ends passés en ta compagnie et celle de tes deux amours, Hervé et Hailey. Merci pour le soutien et l'affection que tu m'as apporté et que je garde comme trésor. Bravo pour tout ce que tu as accomplis toi aussi ! Je vous adresse tous mes vœux de bonheur !

Un immense merci enfin à ma famille, à ma sœur, **Kelly**, et à **mon Père** et **ma Mère** pour m'avoir soutenu et aidé, tous les jours. Je vous aime tellement ! Ma petite sœur, j'ai commencé cette thèse en même temps que tu entrais au Cours Florent, et te voilà maintenant comédienne professionnelle. Je voulais te dire combien je suis fier de ce que tu as accompli, du courage et de la persévérance

dont tu fais preuve qui sont pour moi une vraie source d'inspiration <3 Je t'aime je t'aime je t'aime !
Maman, Papa, merci pour votre soutien permanent, merci de m'avoir poussé et m'avoir donné les
moyens de réaliser mon rêve ! Je vous aime plus tout !

Merci à toutes les autres personnes que je n'aurais pas cité qui m'ont soutenu, aidé, ou fait passer de
bons moments ces quatre dernières années. Vous êtes toutes et tous un trésor que je garde dans
mon cœur.

Table des matières

Introduction bibliographique	3
Avant-propos.....	4
Partie I. Rôles et éducation du microenvironnement tumoral	6
A. Le microenvironnement contrôle le développement tumoral	7
1) Les tumeurs se développent préférentiellement dans certains tissus	7
2) Le microenvironnement est indispensable au développement tumoral	8
3) La composition du microenvironnement tumoral	9
B. L'éducation pré-métastatique.....	12
1) Principes généraux	12
2) Les signaux pré-métastatiques.....	12
3) La préparation de la niche pré-métastatique.....	17
C. Les fibroblastes du microenvironnement tumoral.....	21
1) Fibroblastes et myofibroblastes.....	21
2) Les fibroblastes associés au cancer	24
Partie 2 : Le Mélanome Cutané.....	44
A. Du mélanocyte au développement métastatique	44
1. Structure et fonctions des cellules de la peau	44
2. Les cancers de la peau : origines et épidémiologie.....	52
3. Les mécanismes biologiques de la progression du mélanome	56
4. La dissémination du mélanome métastatique.....	75
B. La prise en charge médicale du mélanome.....	84
1) Le diagnostic du mélanome	84
2) La chirurgie et l'imagerie : entre diagnostic, suivi et traitement.....	85
3) Les traitements adjuvants et néo-adjuvants.....	89
5. Les traitements contre les métastases distantes	89
Partie III : Le ganglion lymphatique entre immunité et mélanome	97
A. Le ganglion lymphatique est le siège de la réponse immunitaire adaptative.....	97
1) La place du ganglion dans le système lymphatique	97
2) La structure et la composition du ganglion lymphatique.....	101
B. Les FRC façonnent le ganglion lymphatique et la réponse immunitaire.....	106
1) Origine et hétérogénéité des FRC	106
3) Les rôles des FRC dans le ganglion en homéostasie.....	111

4) Les FRC régulent la réponse immunitaire et le retour à l'homéostasie	116
C. Le ganglion lymphatique dans la progression tumorale	123
1) L'implication des structures lymphoïdes dans la réponse immunitaire anti-tumorale	123
2) L'éducation pré-métastatique du ganglion lymphatique dans le mélanome	124
3) Le ganglion métastatique	129
Résultats	131
Problématique et objectifs	132
Les FRC sont des fibroblastes spontanément contractiles qui partagent des propriétés avec les CAF	133
Les FRC sont activés et éduqués par le sécrétome de mélanome invasif.....	138
Les facteurs sécrétés par les mélanomes invasifs inhibent la contraction des FRC.....	146
Les facteurs sécrétés par les mélanomes invasifs inhibent la voie RhoA-ROCK-actomyosine	150
L'inhibition de la contractilité des LN-F est associée à la diminution de l'activité de YAP	153
La voie JAK1-STAT3 est inhibée par les facteurs sécrétés par les mélanomes invasifs et contrôle la contraction spontanée des LN-F	156
La voie JAK1-STAT3 contrôle YAP et le cytosquelette d'actine	160
Les protéines solubles sécrétées par les mélanomes invasifs sont suffisantes pour inhiber la contraction des LN-F	162
Discussion	167
Les FRC sont des myofibroblastes avec des caractéristiques proches des CAF.	168
L'identification inédite des voies JAK1/STAT3 et YAP dans le contrôle de la contraction des FRC.	168
Les facteurs sécrétés par les mélanomes invasifs éduquent les FRC.....	169
Les facteurs tumoraux impliqués dans l'inhibition de la contraction des FRC.....	172
La plasticité phénotypique des mélanomes ne se réduit pas à la bipartition proliférative/invasive	173
L'éducation des FRC <i>in vitro</i> permet d'expliquer les modifications architecturales du ganglion pré-métastatique.....	174
Conclusion et perspectives.....	176
Références.....	182
Annexes	218

Introduction bibliographique

Avant-propos

Le mélanome cutané est un cancer des plus agressifs. Comme tous les cancers, il est issu de la transformation maligne de cellules, ici les mélanocytes de l'épiderme, à la suite de l'acquisition de mutations oncogéniques. Cependant ces mutations ne sont pas suffisantes. La progression du cancer depuis une lésion cutanée bénigne jusqu'aux métastases dans les tissus distants, n'est permise que si le microenvironnement entourant les cellules tumorales est favorable à ce développement : une idée qui remonte à l'hypothèse de la graine et du sol de Stephen Paget, vieille de presque un siècle et demi (*Paget, 1889*).

La thématique de mon doctorat sont les interactions cellulaires et moléculaires. Mon projet de thèse s'inscrit complètement dans cette thématique, puisque j'étudie les interactions entre le mélanome et son microenvironnement au cours du processus métastatique. Les interactions mises en jeu sont complexes pour créer un microenvironnement favorable au développement favorable. Il émerge désormais que pour que la progression métastatique puisse avoir lieu, les cellules tumorales doivent reprogrammer la niche métastatique cible avant de le coloniser, un processus appelé « éducation pré-métastatique » (*Peinado et al., 2017*).

Certains tissus semblent plus favorables au développement tumoral. Dans le mélanome, le ganglion lymphatique est une passerelle dans la progression métastatique, point de passage récurrent des cellules tumorales et surtout premier site métastatique, qui permet aux cellules tumorales de transiter des tissus et du système lymphatique vers la circulation sanguine et les organes distants. Le ganglion lymphatique est également la limite dans le traitement du mélanome, puisque tant que les métastases n'envahissent pas les ganglions sentinelles de la tumeur, la solution chirurgicale est encore possible. A ce jour, malgré l'essor des thérapies ciblées et des immunothérapies, il n'existe toujours pas de traitement systématiquement efficace pour traiter les phases les plus avancées de la maladie. En dépit de tout cela, le ganglion lymphatique reste un organe peu exploré par la recherche contre le mélanome, en particulier dans les modèles animaux, qui s'est longtemps intéressée aux métastases tardives comme les poumons (Voir **Partie II**).

Avec mon équipe, sous la direction des Dr Sophie Tartare-Deckert et Virginie Prod'Homme, j'ai voulu comprendre comment les fibroblastes du ganglion lymphatique, les myofibroblastes qui en régulent l'architecture et l'élasticité, sont modifiés par les facteurs sécrétés par les cellules tumorales. En effet, nous avons observé dans l'équipe sur un modèle murin que la composition, l'architecture et les propriétés biomécaniques du ganglion sont drastiquement modifiées dans le ganglion pré-métastatique (Voir **Résultats**). De plus, les fibroblastes sont les « chefs d'orchestre » du microenvironnement tumoral, et leur réputation dans la création d'un environnement malin qui favorise la progression tumorale et métastatique n'est plus à faire. Une grande partie des fibroblastes activés de la

tumeur (les CAF) sont des myofibroblastes, des cellules contractiles qui vont moduler les propriétés biomécaniques du microenvironnement tumoral (Voir **Partie I** ; *Kalluri, 2016*).

Dans l'introduction bibliographique, je présenterai d'abord le concept de microenvironnement tumoral et je m'attarderai plus longuement sur les fibroblastes, les myofibroblastes et les fibroblastes associés au cancer. Ce sera l'occasion de présenter les mécanismes fondamentaux de la contraction cellulaire dans ces cellules. Dans une seconde partie, j'exposerai la progression du mélanome, en insistant de nouveau sur le rôle du microenvironnement, et je décrirai les solutions thérapeutiques qui existent aujourd'hui. Je préciserai notamment le rôle du ganglion lymphatique dans le diagnostic du mélanome et les enjeux thérapeutiques de ce tissu. Dans une troisième partie, je présenterai la structure et les fonctions du ganglion lymphatique et de ses fibroblastes. Je terminerai enfin sur ce qui est connu à propos de l'éducation pré-métastatique du ganglion lymphatique.

Les résultats que je vous présenterai ensuite montrent que les cellules tumorales sécrètent des facteurs capables d'éduquer les fibroblastes du ganglion lymphatique, et de modifier leur capacité à remodeler les propriétés biomécaniques de leur environnement. En particulier, je montre que les facteurs sécrétés par les cellules de mélanomes de type invasives, des cellules dé-différenciées capables d'initier le développement des métastases, inhibent la contractilité des fibroblastes par la régulation de la voie JAK/STAT, jamais décrite pour les fibroblastes ganglionnaires. Jusqu'ici, seule la voie PDPN/ERM était décrite pour contrôler la contractilité des FRC, lors de la réponse immunitaire (Voir **Partie III** ; *Acton et al., 2014* ; *Astarita et al., 2015*). Mes résultats m'ont ainsi permis de découvrir un nouveau mécanisme régulant la contractilité des FRC.

Partie I. Rôles et éducation du microenvironnement tumoral

Le microenvironnement tumoral est défini comme la composante non-maligne de la tumeur. On parle aussi de *stroma*, un mot emprunté du grec *στομα* qui signifie « tapis, couverture » : c'est le tissu de soutien des cellules tumorales. Cependant, si les cellules qui composent ce stroma ne prolifèrent pas de manière aberrante, penser que le microenvironnement tumoral ne joue aucun rôle dans la progression du cancer est bien évidemment une erreur. Les cellules tumorales modifient leur microenvironnement pour faciliter leur prolifération, leur survie et leur migration dans le tissu métastatique. La façon dont le stroma réagit aux cellules tumorales dépend de l'échelle spatiale concernée (tissu, organe, organisme) et du stade métastatique (évolution temporelle).

Les modifications stromales peuvent en effet être induites à proximité directe des cellules tumorales ou dans un tissu distant, par des facteurs sécrétés par les cellules tumorales ou d'autres cellules stromales reprogrammées. Dans ce dernier cas, on parle d'éducation de la niche pré-métastatique. Le cancer est ainsi associé à des processus pré-métastatiques et métastatiques de plus ou moins grande échelle impliquant des modifications du microenvironnement telles que ses propriétés biomécaniques, immunitaires et inflammatoires, ou métaboliques. Ces processus mettent en jeu des acteurs communs mais aux caractéristiques hétérogènes.

Les fibroblastes du stroma tumoral en particulier jouent un rôle de chef d'orchestre du microenvironnement. Dans cette partie de mon manuscrit, je décrirai l'activation des fibroblastes en fibroblastes associés au cancer, leurs caractéristiques et leur hétérogénéité. Cet exposé ne se restreint pas au seul cas du mélanome, un grand nombre de mécanismes ayant été découverts sur d'autres cancers, mais leur implication dans le mélanome sera discutée.

*

* *

A. Le microenvironnement contrôle le développement tumoral

1) Les tumeurs se développent préférentiellement dans certains tissus

a. Un peu d'histoire des sciences : l'hypothèse de la graine et du sol

La connaissance du cancer remonte à l'antiquité. Hippocrate, le célèbre médecin grec du Vème siècle avant J-C, en fait la première description connue dans le monde occidental. La nature de ces tumeurs échappe pourtant à la science jusqu'à la fin du XVIIIème siècle, faute d'une méthode scientifique permettant de créer des connaissances vérifiables. C'est finalement au siècle de Claude Bernard, à qui on attribue la naissance de la « *médecine expérimentale* », que les choses vont évoluer. C'est le XIXème siècle, pendant lequel on comprend l'organisation du corps en tissus (Xavier Bichat), que l'unité de base du vivant et donc de l'organisme sont les cellules (Matthias Schleiden et Theodor Schwann), que toutes les cellules proviennent d'autres cellules (Rudolf Virchow) et que celles-ci évoluent dans un environnement intérieur maintenu dans un état physico-chimique régulé, que l'on appelle « l'homéostasie » (Claude Bernard).

A la fin du XIXème siècle, on sait que le cancer provient de cellules des tissus de notre organisme, et forment des corps tumoraux d'un point originel vers des points secondaires, qu'on appelle alors des métastases. En 1889, Stephen Paget, un chirurgien anglais, observe des nécropsies de patientes atteintes de cancer du sein. Stephen Paget comprend que certains organes sont le siège de métastases beaucoup plus souvent que d'autres, et que cela ne peut être le fruit du hasard. Il compare ses résultats avec des nécropsies d'autres cancers, comme le cancer de l'ovaire ou le mélanome. Il retrouve systématiquement beaucoup plus de métastases dans le foie que dans d'autres organes comme la rate, pour lesquels il considère qu'il y avait pourtant autant de risques que les cellules tumorales y soient mécaniquement retenues dans de petits vaisseaux par embolie. Selon lui, cela ne peut s'expliquer que par le fait que les cellules tumorales aient, tel un organisme à part entière, besoin d'un sol favorable pour se nourrir et se multiplier. Il émet alors l'hypothèse de la graine et du sol, selon laquelle les cellules tumorales sont des graines, qui ont besoin d'un environnement, c'est-à-dire d'un sol favorable, pour former une tumeur complète (*Paget, 1889*).

Contre les indications de Stephen Paget, Ewing considère qu'au contraire le site des métastases n'est dicté que par des questions d'architecture et de propriétés mécaniques du système vasculaire, et que le blocage des cellules par embolie dans certains vaisseaux suffit à expliquer la répartition des cellules métastatiques (*Ewing, 1928*). L'hypothèse va faire l'objet d'un débat scientifique pendant encore un siècle (*Fidler, 2002*).

b. Un environnement favorable ou une raison purement mécanique ?

Finalement, la science expérimentale moderne apporte des réponses plus nuancées à la question de savoir si la répartition métastatique est conditionnée par un environnement propice au développement tumoral, ou si les cellules tumorales s'implantent dans un tissu pour des raisons purement mécaniques. Les cellules tumorales injectées dans le sang dans des modèles animaux se plient effectivement aux contraintes du système vasculaire et forment des embolies capillaires préférentiellement dans certains organes (*Coman et al., 1951*). D'autres auteurs montrent chez le lapin que des cellules de carcinome forment des métastases plus larges dans le foie que dans le poumon, indépendamment du contexte vasculaire, que les cellules soient injectées dans la veine porte du foie ou l'artère hépatique (*Lucke et al., 1952*). Ces deux études sont les premières à montrer que la répartition des cellules tumorales est dépendante à la fois de l'environnement et de contraintes mécaniques du système vasculaire.

On sait aujourd'hui qu'il existe en réalité un dialogue qui s'établit entre les cellules tumorales, les cellules vasculaires et les cellules du tissu cible des métastases. Comme nous le verrons pour le mélanome, les cellules tumorales interagissent avec les plaquettes, les cellules endothéliales et les leucocytes dans la circulation, et forment des embolies qui facilitent leur implantation dans le tissu cible. Certaines routes sont également favorisées, avec une migration des cellules tumorales qui peut se faire de manière extravasculaire, ou bien en empruntant le système lymphatique qui permet leur dissémination dans de nombreux autres organes (*Pereira et al., 2018 ; Brown et al., 2018 ; Keller et Pantel, 2019*). A tous les stades de leur progression, les cellules tumorales reprogramment leur environnement et modifient notamment les propriétés biomécaniques, par exemple en activant les fibroblastes qui vont produire une matrice extracellulaire (MEC) plus rigide (*Calvo et al., 2013*). Les propriétés biomécaniques de l'environnement vasculaire ou interstitiel font partie intégrante du profil pro-tumoral ou anti-tumoral du microenvironnement.

La différence entre un environnement pro-tumoral ou anti-tumoral est désormais bien caractérisée. Mais elle dépend aussi des cellules tumorales, qui sont éduquées et sélectionnées par le chemin métastatique qu'elles ont suivi. Leurs propriétés mécaniques, leur capacité à migrer, à adhérer à d'autres cellules ou à la matrice extracellulaire, à s'adapter aux conditions immunologiques et métaboliques du site métastatique, font qu'il existe entre la tumeur primaire et les différents sites métastatiques une forte hétérogénéité tumorale et stromale (*Fidler, 2002 ; Voir Partie II*).

2) Le microenvironnement est indispensable au développement tumoral

Qu'il puisse exister des environnements plus favorables que d'autres au développement tumoral fait-il du stroma une condition nécessaire à la progression tumorale ? Une meilleure compréhension des caractéristiques fondamentales des cancers ces dernières années a poussé à remettre en cause le dogme selon lequel le développement tumoral était seulement contrôlé par les oncogènes.

Les travaux de Mina Bissel et d'autres équipes ont notamment permis de montrer qu'un microenvironnement corrompu est nécessaire au développement tumoral et que la réimplantation de cellules tumorales dans un microenvironnement sain inhibe le développement tumoral (*Radiski et al., 2001*).

Par exemple, des tératocarcinomes murins réinjectés dans une blastula de souris se multiplient et se différencient en cellules normales (*Illmensee et Mintz, 1976*). Certains virus oncogéniques comme le virus du sarcome de Rous conduisent à la tumorigenèse des cellules infectées en culture, mais pas dans un embryon de quatre jours (*Dolberg et Bissel, 1984*). Dans un modèle de co-culture organotypique d'épiderme, un surplus de kératinocytes normaux (12 pour 1 malin) empêche le développement de kératinocytes dysplastiques (*Javaherian et al., 1998*). Toutes ces études montrent que le microenvironnement est un acteur clé du développement tumoral.

3) La composition du microenvironnement tumoral

Les composants du microenvironnement (**Figure 1**) varient en fonction du tissu, mais dans le cas des tumeurs solides, il s'agit des composants communs aux tissus conjonctifs :

- Les **fibroblastes**, résidents et activés par les cellules tumorales, ou recrutés dans la tumeur, que l'on va appeler des **CAF** (Cancer-Associated Fibroblasts)

Ils présentent des niveaux d'activation variables, marqués par une hétérogénéité entre des profils plutôt myofibroblastiques, contractiles, capables d'exercer une tension mécanique sur l'environnement, et des profils plutôt inflammatoires, immunosuppresseurs et pro-angiogéniques (*Ohlund et al., 2017 ; Costa et al., 2018 ; Kalluri et al., 2016 ; Davidson et al., 2020*)

- La **matrice extracellulaire**, de la lame basale en contact direct avec un épithélium, ou qui constitue le corps du tissu conjonctif. Celle-ci est synthétisée par les CAF, les cellules tumorales ou les cellules immunitaires infiltrants la tumeur.

Sa composition et sa structure varie avec la localisation au sein de la tumeur et le stade d'activation des cellules du microenvironnement. La matrice est constituée de fibres de glycoprotéines dont les plus abondantes sont le collagène, principalement sous forme de collagène I et de collagène III, la fibronectine (dont l'isoforme caractéristique produite par les myofibroblastes, la fibronectine EDA), la laminine et l'élastine (*Tomasek et al., 2002*). Ces fibres emprisonnent des cytokines (TGF β), et

renferment des enzymes qui permettent leur dégradation (métalloprotéinases MMP et ADAM) ou leur réticulation (LOX et LOXL) (*Bonnans et al., 2014*).

- Les **péricytes** des vaisseaux sanguins et les cellules endothéliales sanguines (**BEC, Blood Endothelial Cells**) et lymphatiques (**LEC, Lymphatic Endothelial Cells**) de vaisseaux déjà présents ou néoformés.
- Les **cellules immunitaires**, parmi lesquelles il faut distinguer celles déjà résidentes au moment du développement de la tumeur, en général des **macrophages**, des **mastocytes** et des **cellules dendritiques**, et celles qui sont recrutées via la circulation, telles que les **neutrophiles**, les **lymphocytes** et des **cellules myéloïdes immunosuppressives (MDSC)**.

Les cellules immunitaires peuvent générer une réponse pro-tumorale, telle que la réponse cytotoxique favorisée par les lymphocytes T CD4+ de type Th1, les macrophages de type M1, les cellules dendritiques activées, et médiée par les lymphocytes T CD8+ et les lymphocytes NK. Le microenvironnement peut devenir immunosuppresseur, avec un profil immunologique tourné vers les lymphocytes T CD4+ Foxp3+ régulateurs et les macrophages de type M2 et les MDSC (*Quail et Joyce, 2013*).

Plus récemment, la question de l'impact du **microbiote** dans le microenvironnement des muqueuses a été soulevée. Des bactéries extracellulaires sont retrouvées dans le microenvironnement tumoral et des bactéries intracellulaires à l'intérieur même des cellules tumorales ou immunitaires, en particulier les macrophages. Elles influent de cette manière sur le métabolisme et l'inflammation à l'intérieur de la tumeur (*Nejman et al., 2020*). Ces bactéries sont capables de métaboliser les molécules thérapeutiques et peuvent moduler la réponse aux chimiothérapies et aux immunothérapies (*Garrett, 2015*).

Le microenvironnement tumoral est également caractérisé de manière **biochimique** et **biophysique**. Les acteurs cellulaires du microenvironnement sécrètent des molécules pro-inflammatoires, pro-angiogéniques, immunosuppressives, des métabolites, voire des vésicules extracellulaires, et modifient la composition et la structure de la matrice extracellulaire. Les mêmes conditions ne sont pas rencontrées en périphérie de la tumeur qu'en son centre. Ainsi, un faible apport en dioxygène et en nutriments dans des zones peu vascularisées génère un **environnement hypoxique** et une reprogrammation métabolique des cellules tumorales, des fibroblastes et des cellules immunitaires résidentes.

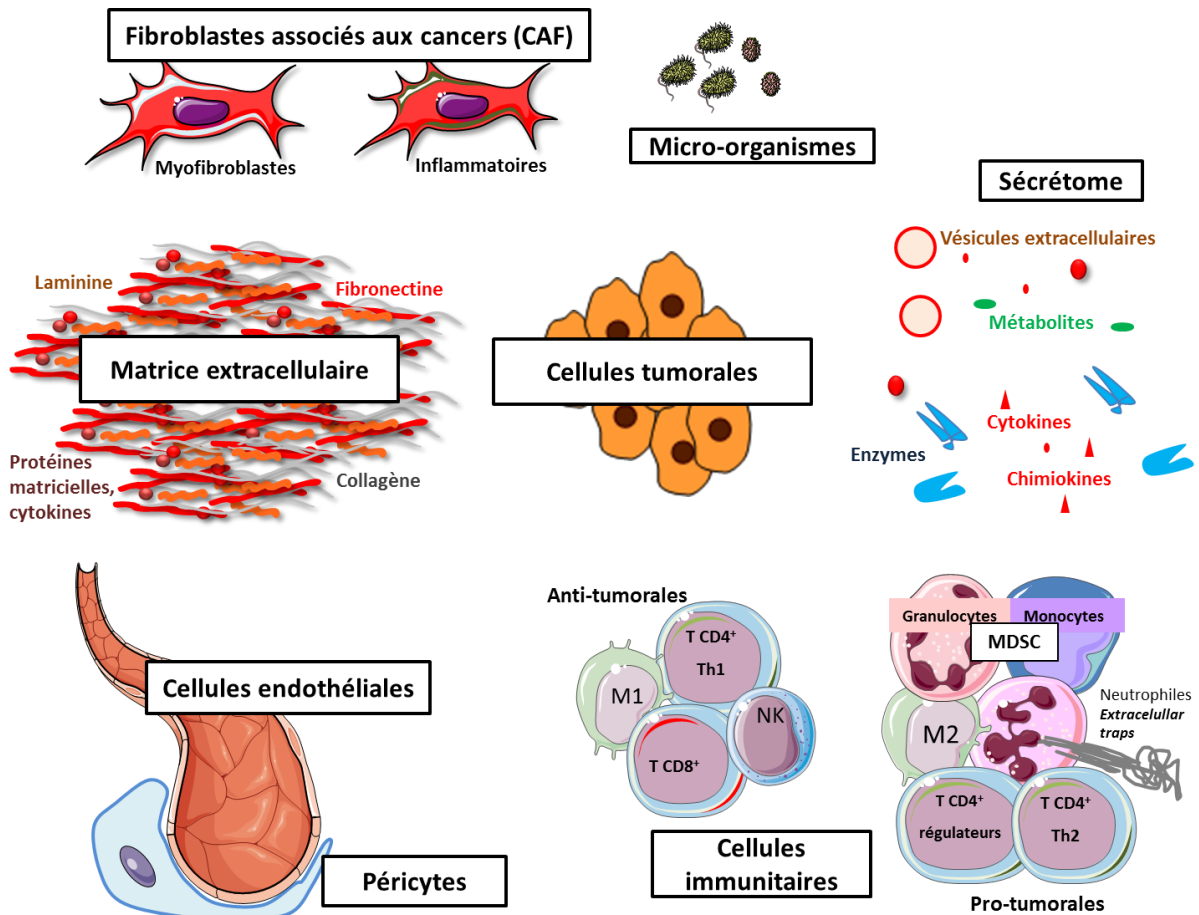


Figure 1 : La composition du microenvironnement tumoral

Le microenvironnement tumoral se compose des cellules tumorales et de l'ensemble des cellules stromales avec lesquelles elles interagissent.

Il y a les composantes cellulaires du microenvironnement. Ce sont (A) les **fibroblastes**, dont le profil phénotypique varie entre des cellules myofibroblastiques et des cellules pro-inflammatoires (Kalluri, 2016 ; Helms et al., 2020). (B) Les cellules **endothéliales**, sanguines ou lymphatiques, forment la paroi des vaisseaux et (C) les **péricytes** sont des cellules mésenchymales qui les entourent. (D) Les **cellules immunitaires** quant à elles se répartissent entre les cellules anti-tumorales (gauche) et les cellules pro-tumorales (droite). Le profil anti-tumoral comprend les lymphocytes T CD4⁺ Th1, les lymphocytes T CD8⁺, les macrophages M1 et les lymphocytes NK. Le profil pro-tumoral comprend les MDSC, qui peuvent être de nature monocytique ou granulocytaire, d'autres cellules myéloïdes apparentées comme les macrophages de profil M2 et les neutrophiles pro-inflammatoires. Entre autres, ces derniers éjectent des filets de chromatine (« extracellular traps ») dans l'environnement qui favorisent l'inflammation intratumorale (Albregues et al., 2018). Parmi les cellules immunitaires pro-tumorales on trouve également les lymphocytes T CD4⁺ régulateurs et les lymphocytes T CD4⁺ Th2 qui favorisent la tolérance immunitaire. (E) Des **micro-organismes** peuvent aussi faire partie du microenvironnement tumoral.

Il y a ensuite les composantes moléculaires : les cellules endothéliales, tumorales et surtout les fibroblastes sécrètent la **matrice extracellulaire** (F). On trouve également un ensemble de molécules, de vésicules et de particules sécrétées qui forment le **sécrétome tumoral** (G). Ce sont des cytokines, des chimiokines, des enzymes, des métabolites, et les vésicules et particules extracellulaires. Ce sont les médiateurs du dialogue et de la différenciation des cellules du microenvironnement. Ils gouvernent entre autres le profil pro ou anti-tumoral des cellules immunitaire et l'activation des CAF.

B. L'éducation pré-métastatique

1) Principes généraux

Les cellules tumorales forment des métastases dans des tissus dont le microenvironnement est favorable. Certains organes sont favorisés au détriment d'autres : on parle d'**organotropisme** pour qualifier cette implantation préférentielle des cellules tumorales. Cependant, la composition du microenvironnement des différents organes est riche, variable et hétérogène : certains acteurs cellulaires et moléculaires sont plutôt pro-tumorigéniques, favorisant l'angiogenèse ou la tolérance immunitaire, et d'autres sont plutôt anti-tumorigéniques, empêchant l'invasion tumorale et favorisant la réponse cytotoxique (*Quail et Joyce, 2013*).

Pour envahir de nouveaux tissus, les cellules tumorales orientent le tissu cible des métastases vers une composition et des propriétés pro-tumorales. La progression tumorale au sein de la tumeur primaire, ou plus tard dans les métastases, génère en effet la production de **signaux tumoraux** ou **issus du stroma** qui vont modifier d'autres tissus à distance en reprogrammant et en recrutant des cellules stromales. La formation préférentielle dans certains tissus de niches pré-métastatiques capables de soutenir la prolifération, la survie ou l'invasion des cellules tumorales, s'explique par la diffusion hétérogène des signaux pré-métastatiques dans l'organisme et par la réponse différente des acteurs cellulaires « éduqués » par ces signaux selon les tissus.

Il y a donc deux dimensions à prendre en compte dans l'éducation pré-métastatique. La première est **spatiale** : tous les tissus n'ont pas accès ou ne réagissent pas de la même manière aux signaux reçus de la tumeur primaire. La seconde est **temporelle** : le processus métastatique est une séquence d'évènements ordonnés dont le dialogue avec le tissu cible des métastases fait partie. L'éducation pré-métastatique consiste donc en une séquence d'évènements n'impliquant pas les mêmes signaux moléculaires ni les mêmes cellules qui amène du tissu sain vers la métastase (*Liu et Cao, 2016*).

2) Les signaux pré-métastatiques

Les signaux pré-métastatiques sont des facteurs sécrétés, qui peuvent se présenter sous forme de **molécules solubles** (cytokines, chimiokines, métabolites) ou de **particules et vésicules extracellulaires** (exomères, exosomes, microvésicules) (*Karagianis et al., 2010*). Le plus souvent, ces facteurs agissent de manière locale avec une action autocrine ou paracrine mais ils sont également retrouvés dans la circulation, et sont captés au niveau de la niche pré-métastatique. Ils peuvent être capturés ou filtrés par la matrice extracellulaire ou les endothélia.

Les signaux pré-métastatiques parviennent également à la moelle osseuse et permettent le recrutement de cellules progénitrices dérivées de la moelle osseuse, les BMDC. Ce terme générique comprend des cellules de nature fibroblastique (MSC, cellules stromales mésenchymateuses) ou leucocytaires (cellules myéloïdes). Activées et éduquées, elles produisent leur propre sécrétome (*Liu et Ciao, 2016*).

a. La caractérisation du sécrétome tumoral

Un ensemble de signaux moléculaires sont émis en conséquence de différents phénomènes connus pour favoriser la progression tumorale. La sécrétion de **signaux angiogéniques** est par exemple induite en condition hypoxique (*Carmeliet et Jain, 2000*). Le développement tumoral s'accompagne également d'une inflammation locale puis progressivement généralisée. Les **signaux inflammatoires** sont en particulier émis par les macrophages associés à la tumeur (TAM) (*Biswas et Montavani, 2010*), les CAF ou les cellules tumorales elles-mêmes, et favorisent l'activation des fibroblastes, la tolérance immunitaire et la transition phénotypique des cellules tumorales (*Quail et Joyce, 2013*). Enfin, le **sécrétome desmoplastique** est émis par les CAF. Il consiste en la sécrétion de facteurs de croissance favorisant l'angiogenèse et la survie tumorale, de cytokines et de chimiokines favorisant la tolérance immunitaire et l'invasion tumorale, d'enzymes de remodelage de la matrice extracellulaire et de métabolites (acides aminés, lactate) favorisant la prolifération tumorale (*Karagianis et al., 2010 ; Kalluri et al., 2016*).

Les facteurs impliqués sont caractérisés par des techniques de spectrométrie de masse. Réalisée sur le surnageant de culture de lignées de mélanome, elle révèle par exemple des différences notables par exemple entre des cellules de profil prolifératif et des cellules de profil dé-différencié et invasif, avec un enrichissement chez ces dernières en chimiokines, cytokines et matriprotéines (*Mathias et al., 2009 ; Tichet et al., 2015*). Un certain nombre de facteurs communs sont également retrouvés entre des cellules tumorales de mélanome et des cellules stromales associées (*Paulistschke et al., 2008*). La caractérisation des vésicules extracellulaires demande une méthodologie différente, basée sur des cycles d'ultracentrifugation permettant d'isoler les vésicules en fonction de leur taille.

b. Les facteurs sécrétés solubles

Les facteurs sécrétés solubles rassemblent donc :

- Des **facteurs de croissance** : FGF (*Fibroblast Growth Factor*), HGF (*Hepatocyte Growth Factor*), PDGF (*Platelet-Derived Growth Factor*), VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*), PlGF (*Placental Growth Factor*).
- Des **cytokines** (TNF α , TGF β , IL6, LIF, G-CSF...) et les chimiokines (SDF1, CCL2, ...),
- Des **enzymes** (les lysyl-oxydases LOX et LOXL, les métalloprotéinases MMP, ...),

- Des **protéines** et des **glycoprotéines** matricielles ou matricellulaires (SPARC, CTGF, Ténascine C, ...),
- D'autres petites protéines ou peptides bioactifs (protéines S100 et SAA), ou produits du clivage des protéases. Certaines protéases nécessitent elles-mêmes une activation par d'autres protéases (KLK, uPA, MMP).
- D'autres biomolécules, par exemple issues du métabolisme (**acides nucléiques, acides aminés, lipides** ou **glucides** bioactifs).

La sécrétion de ces molécules est le résultat de l'inter-activation de voies de signalisation parmi les acteurs du microenvironnement. L'hypoxie engendre un programme transcriptionnel médié par le facteur HIF1 α , qui contrôle l'expression de cytokines et de chimiokines. Les facteurs de croissance et certaines cytokines inflammatoires permettent l'activation de voies mitogéniques (voies des MAPK, voies PI3K-AKT) et des voies de signalisation propres aux cytokines (JAK-STAT), ces dernières aboutissant à la sécrétion d'autres cytokines et chimiokines. Cette inter-activation permet à l'éducation pré-métastatique de se répandre facilement dans une niche localisée.

Le sécrétome angiogénique comprend des facteurs de croissance (VEGF-A, PDGF α), des cytokines (IL6) et la métalloprotéinase MMP9. Le PDGF agit sur les fibroblastes, les cellules endothéliales et les péricytes et favorisent leur prolifération et la sécrétion de VEGF. L'IL-6 stimule également l'angiogenèse en condition hypoxique (*Gopinathan et al., 2015*). La MMP9 libère les facteurs angiogéniques de la matrice pour les rendre disponibles aux cellules endothéliales (*Bergers et al., 2000*).

Le sécrétome inflammatoire comprend notamment des cytokines (TGF β , TNF α , G-CSF), des chimiokines (SDF1, CCL2), des facteurs de croissance (VEGF-A, PlGF) et les protéines S100A8/A9. Leurs effets ont principalement été observés dans la préparation de la niche pré-métastatique pulmonaire vers un profil immuno-tolérant. Le TNF α , le TGF β et le VEGF-A induisent l'expression des protéines S100A8/A9 (*Hiratsuka et al., 2008*). Le VEGF-A et le PlGF permettent le recrutement de BMDC VEGFR1⁺ dans les niches pré-métastatiques enrichies en fibronectine. On retrouve par ailleurs ces cellules VEGFR1⁺ dans les ganglions pré-métastatiques de carcinomes mammaires (*Kaplan et al., 2005*). En condition hypoxique, la sécrétion de G-CSF permet le recrutement et la différenciation de MDSC (*Chafe et al., 2015*). Enfin, la chimiokine CCL2 permet le recrutement de macrophages pro-tumoraux et de lymphocytes T régulateurs (*van Deventer et al., 2013*).

Le sécrétome desmoplastique comprend principalement le TGF β , qui joue un rôle majeur dans la différenciation des myofibroblastes, les cytokines inflammatoires, et la matrice extracellulaire. Les propriétés biophysiques de la matrice extracellulaire des niches pré-métastatiques sont modifiées par la sécrétion accrue de fibres de collagène et de fibronectine (*Kaplan et al., 2005*), en particulier la forme EDA de la fibronectine (*Natali et al., 1995*), des enzymes de réticulation du collagène (LOX et LOXL2) dont la sécrétion est

augmentée en hypoxie (Gilkes *et al.*, 2014) et les protéines matricellulaires, dont SPARC (*Secreted Protein Acidic and Rich in Cystein*), CTGF (*Connective Tissue Growth Factor*) et la ténascine C sont les plus caractéristiques (Hoye *et Erler*, 2016). Ce remodelage de la matrice extracellulaire permet le maintien de l'activation des fibroblastes et facilite l'invasion tumorale.

c. Les vésicules et particules extracellulaires

Les vésicules extracellulaires présentent une grande variété de tailles, de compositions et de marqueurs. On distingue les exosomes, d'une taille comprise entre 50 et 150nm de diamètre des microvésicules qui sont plus larges. Elles sont toutes composées d'une bicouche lipidique et peuvent transporter un grand nombre de biomolécules (microARN, ADN, protéines, métabolites) (**Figure 2**). Les exomères sont des particules plus petites que les exosomes, constituant des complexes de protéines, lipides et acides nucléiques, mais dépourvus d'une bicouche lipidique, et qui ne peuvent donc répondre à l'appellation de vésicules (Zhang *et al.*, 2018). Par la suite, j'utiliserai tout de même le terme générique de vésicules extracellulaires pour englober ces particules, sauf dans le cas où un sous-type de ces vésicules est exclusivement impliqué.

Les vésicules extracellulaires servent de cargo pour le transfert de biomolécules actives. Or, ce transport est dirigé, c'est-à-dire que les vésicules extracellulaires sont particulièrement sujettes au phénomène d'organotropisme. Le site d'installation des vésicules extracellulaires dépend de leur taille et des récepteurs d'adhésion qu'elles portent en surface, en particulier les intégrines. Dans un modèle de carcinome mammaire, les exosomes portant les intégrines $\alpha_6\beta_1$ et $\alpha_6\beta_4$ ont tendance à se nicher dans les poumons tandis que ceux portant les intégrines $\alpha_v\beta_5$ se logent dans le foie. En particulier, les intégrines $\alpha_6\beta_4$ et $\alpha_v\beta_5$ sont nécessaires à l'intégration des exosomes dans les cellules cibles et l'expression de gènes pro-inflammatoires tels que ceux qui codent pour les protéines S100 (Hoshino *et al.*, 2015).

Dans le mélanome, les protéines transportées par les exosomes jouant un rôle dans l'établissement de la niche pré-métastatique sont la podoplanine, qui favorise l'adhésion cellulaire et la lymphangiogenèse (Carasco-Ramirez *et al.*, 2016) et la protéine c-MET qui permet l'éducation des BMDC dans la moelle osseuse et leur recrutement dans la niche pré-métastatique (Peinado *et al.*, 2012). La reprogrammation métabolique des fibroblastes associés au mélanome est permise par les microARN miR155 et miR210 transportés par les exosomes provenant des cellules tumorales (Shu *et al.*, 2018).

De manière générale, les vésicules extracellulaires permettent d'augmenter la perméabilité endothéliale par la dérégulation des jonctions intercellulaires via des microARN (DiModica *et al.*, 2017), la mise en place d'un environnement immunotolérant par le recrutement et l'éducation de cellules immunosuppressives (Peinado *et al.*, 2012) et l'induction directe de l'anergie des lymphocytes T et NK (Wen *et al.*, 2017), et en favorisant le remodelage de la matrice extracellulaire par les fibroblastes (Hoshino *et al.*, 2015).

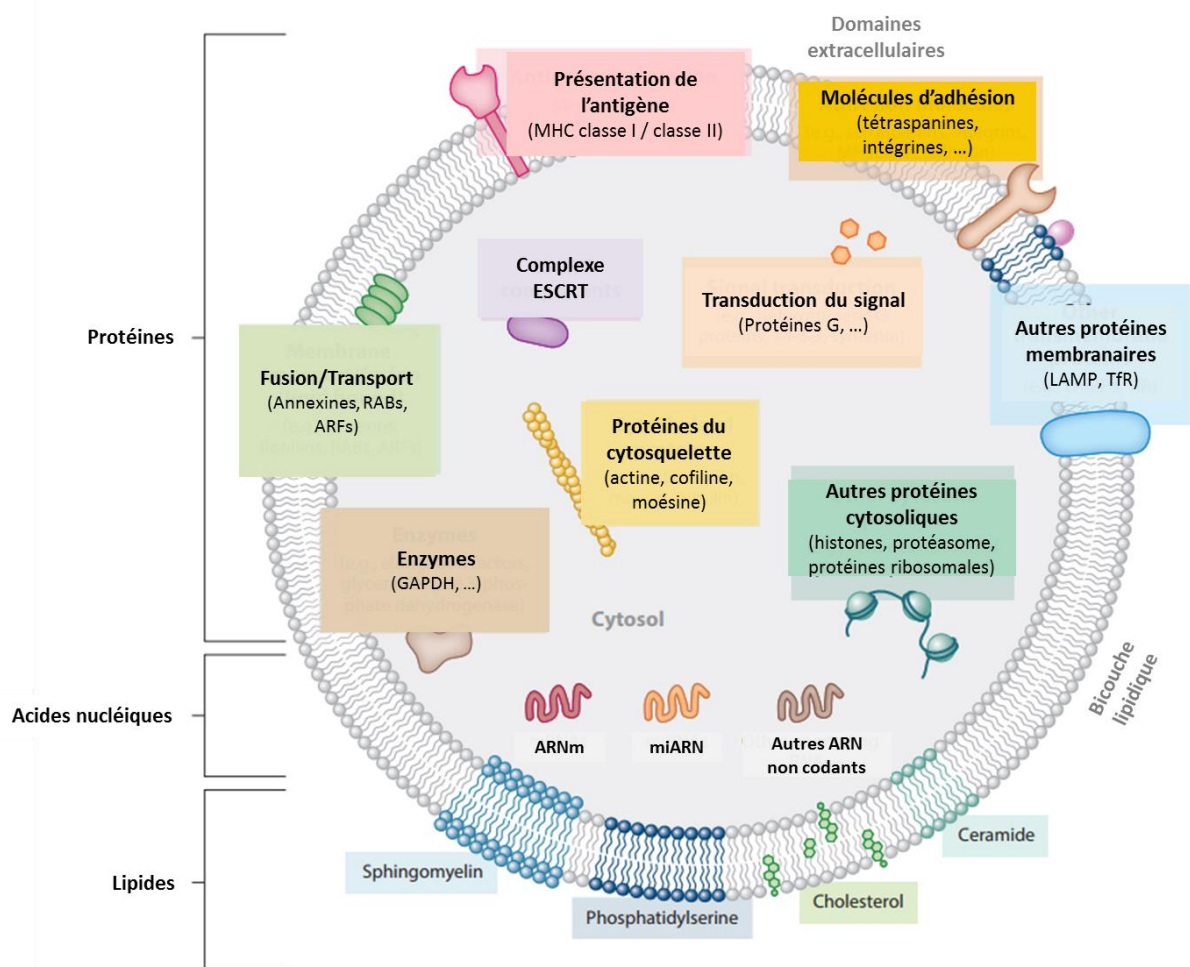


Figure 2 : La composition des exosomes, d'après Colombo et al., 2014

Les exosomes sont constituées d'une bicouche lipidique renfermant un vaste ensemble de molécules qui sont transportées jusqu'aux cellules avec lesquelles les exosomes fusionnent. Il y a les lipides membranaires dont la plupart sont réexposées sur l'hémi-membrane externe (shingomyéline, phosphatidylsérine, cholestérol et céramide). Les exosomes portent à leur membrane des molécules d'adhésion, dont les **tétraspanines** qui sont des marqueurs importants pour classer les vésicules extracellulaires. Les exosomes portent en particulier **CD9**, **CD63** et **CD81**. Les exosomes portent également à leur surface des **intégrines**, dont dépend l'organotropisme exosomal, des molécules de présentation de l'antigène (CMH) et d'autres protéines membranaires. Les exosomes portent également des **protéines de signalisation**, des protéines du **cytosquelette**, des **enzymes** et des **ARN**, sous forme d'ARN messagers, de micro-ARN ou d'autres ARN non codants.

3) La préparation de la niche pré-métastatique

a. Dynamique spatio-temporelle de l'éducation pré-métastatique

La préparation de la niche pré-métastatique et sa colonisation par les cellules métastatiques suivent un processus rassemblant des événements moléculaires et cellulaires selon un certain ordre spatial et temporel (**Figure 3**). Lorsque la tumeur primaire devient invasive et que les cellules tumorales rentrent en contact avec les fibroblastes et la vascularisation, l'échange de signaux moléculaires tels que des cytokines (TGF β , IL-6, TNF α), des chimiokines (SDF1), des molécules angiogéniques (VEGF) et des vésicules extracellulaires provoque l'inflammation locale du tissu. Mais pas seulement, puisque la composition en cellules immunitaires des organes lymphoïdes primaires (moelle osseuse) et secondaires (rate et ganglion lymphatique) est également modifiée par certains de ces facteurs. La plupart des cellules de ces organes sont ensuite recrutées dans le microenvironnement tumoral de la tumeur primaire ou des sites pré-métastatiques (*McAllister et Weinberg, 2014*). L'éducation pré-métastatique met progressivement en jeu des niches variées dont certaines seulement seront envahies par les métastases. La niche pré-métastatique devient ainsi un lieu d'implantation privilégiée à la fois pour les cellules tumorales mais aussi pour des cellules non-malignes mais éduquées.

La mise en place des sites tumoraux secondaires est initiée par des facteurs sécrétés solubles et des vésicules extracellulaires issus de la tumeur qui permettent le recrutement de BMDC et l'activation des fibroblastes résidents. On aboutit alors au stade de niche pré-métastatique **immature**. D'autres phénomènes doivent s'ajouter à cette étape de préparation. Le remodelage de la matrice extracellulaire et l'augmentation locale du nombre de cellules activées créent un environnement hypoxique qui favorise l'angiogenèse. Il a été ainsi montré chez la souris après injection de lignées cellulaires de différents cancers dont le mélanome que la production de **G-CSF** depuis la tumeur primaire conduit au recrutement depuis la moelle osseuse de cellules myéloïdes pro-angiogéniques (*Shojaei et al., 2007*). Le **VEGF-A** et le **PIGF** permettent le recrutement de cellules progénitrices de la moelle osseuse VEGFR1+ pro-angiogéniques vers la tumeur primaire et les sites pré-métastatiques, à l'instar du poumon où les fibroblastes produisent une niche favorable à leur installation riche en fibronectine (*Kaplan et al., 2005*). Des **exosomes** sécrétés par la tumeur primaire permettent également d'engager des cellules progénitrices pro-angiogéniques de la moelle osseuse. Dans cette étude, les auteurs montrent que les mélanomes transfèrent aux cellules dérivées de la moelle osseuse l'oncoprotéine **Met**, qui permet la mobilisation de ces cellules vers les sites tumoraux (*Peinado et al., 2012*).

On parle alors de **niche pré-métastatique mature** (*Lu et Ciao, 2016 ; Peinado et al., 2017*). Certaines cellules tumorales peuvent alors s'installer dans la niche pré-métastatique. La plupart y restent dans un état de **dormance**. La dormance cellulaire est caractérisée par un arrêt du cycle cellulaire. Les mécanismes induisant la dormance cellulaire sont nombreux et

complexes. A titre d'exemple, elle peut être directement induite dans la niche pré-métastatique par des signaux issus de la matrice extracellulaire et du système immunitaire résident, en particulier des cytokines issues de lymphocytes Th1 (IFN- γ) (*Shankaran et al., 2001*). De cette manière, des micrométastases dormantes peuvent se maintenir pendant des années dans la niche pré-métastatique en attendant le développement final de la niche vers la macro-métastase. Il ne s'agit pas cependant du schéma exclusif d'évolution de la niche pré-métastatique. Dans tous les cas, la formation finale de **macro-métastases** s'accompagne de sa conversion immunologique vers un profil pro-tumoral de tolérance immunitaire, et une angiogenèse ou une lymphangiogenèse active permettant l'installation et la prolifération de davantage de cellules tumorales.

b. Les caractéristiques de la niche pré-métastatique

Les caractéristiques qu'acquissent les niches pré-métastatiques au cours de cette progression sont donc dans un premier temps la génération d'une **inflammation** locale, avec le recrutement de BMDC et de cellules au potentiel immunosuppresseur, l'**activation des fibroblastes résidents** et leur **reprogrammation** métabolique, et la **perméabilisation des vaisseaux sanguins**. Cela permet l'installation de quelques cellules tumorales sous la forme de micrométastases, souvent dormantes. Dans un second temps, l'**angiogenèse** et la **lymphangiogenèse** sont accélérées et les conditions immunologiques se dégradent vers une inflammation généralisée, qui favorise la **tolérance immunitaire**, puis l'installation de nouvelles cellules tumorales et la formation de la niche métastatique (*Lu et Cioa, 2016*).

Nous savons qu'un ensemble de cytokines et de petites protéines bioactives induisent l'inflammation. L'évolution de la niche pré-métastatique est ainsi caractérisée par un environnement riche en cytokines inflammatoires telles que le **TNF α** , qui induit l'expression des protéines **S100A8/A9**. Dans la niche pré-métastatique pulmonaire, ces dernières induisent l'expression des **protéines SAA** qui permettent le recrutement de cellules myéloïdes et des cellules tumorales. Les exosomes qui transportent le récepteur MET permettent la mobilisation des BMDC (*Peinado et al., 2012*).

L'immunosuppression est principalement gouvernée par des cytokines produites par les fibroblastes et les cellules tumorales, telles que le **TGF β** , l'**IL6**, la prostaglandine E2 (**PGE2**) (*Kalluri et al., 2016*), et par les exosomes qui induisent l'anergie des lymphocytes T et NK (*Wen et al., 2017*). La chimiokine **CCL2** permet le recrutement de macrophages pro-tumoraux, inhibe la maturation des lymphocytes NK et induit l'expression de G-CSF pour la différenciation des cellules myéloïdes (*Qian et al., 2011*).

La perméabilité des vaisseaux sanguins et lymphatiques, l'angiogenèse et la lymphangiogenèse sont quant à eux permis par les métalloprotéinases, telles que la **MM9** produite par les CAF, le **VEGF-A** produit par les CAF, les cellules tumorales, et les BMDC, et les exosomes qui permettent la mobilisation de ces dernières (*Lu et Cioa, 2016*). La lymphangiogenèse est un phénomène pré-métastatique caractéristique du ganglion

lymphatique. Les cellules tumorales de mélanome sécrètent **VEGF-C** et **Midkine/NEGF2** (*Neurite Growth Factor 2*) et induisent la lymphangiogenèse dans le ganglion lymphatique (*Lund et al., 2012 ; Olmeda et al., 2017*). L'IL6 produite par les cellules tumorales de carcinome mammaire permet également d'induire la lymphangiogenèse en stimulant l'expression de CCL5 et de VEGF par les cellules endothéliales lymphatiques, permettant l'attraction des cellules tumorales CCR5⁺ (*Lee et al., 2014*). Les exosomes tumoraux permettent le remodelage vasculaire du ganglion lymphatique en induisant l'expression de VEGF-B, de HIF1 α et de la thrombospondine 1 dans le stroma lymphatique (*Li et al., 2009 ; Hood et al., 2011*).

L'organotropisme est enfin une propriété intrinsèque des niches pré-métastatiques, qui dépend de l'accessibilité de la niche aux cellules tumorales (grâce aux vaisseaux, à la matrice extracellulaire), le maintien de conditions de survie (ressources métaboliques, facteurs de croissance, immunosuppression), mais également de signaux d'attraction. A ce titre, les chimiokines émises par les niches pré-métastatiques sont cruciales pour permettre l'entrée de cellules tumorales dans la niche. Le ganglion lymphatique, dont l'éducation pré-métastatique renforce la vascularisation, émet les chimiokines CCL19, CCL21 et SDF1 en quantité, ce qui permet l'attraction de cellules tumorales CCR7⁺ et CXCR4⁺ (*Lu et Cioa, 2016 ; Voir partie II*).

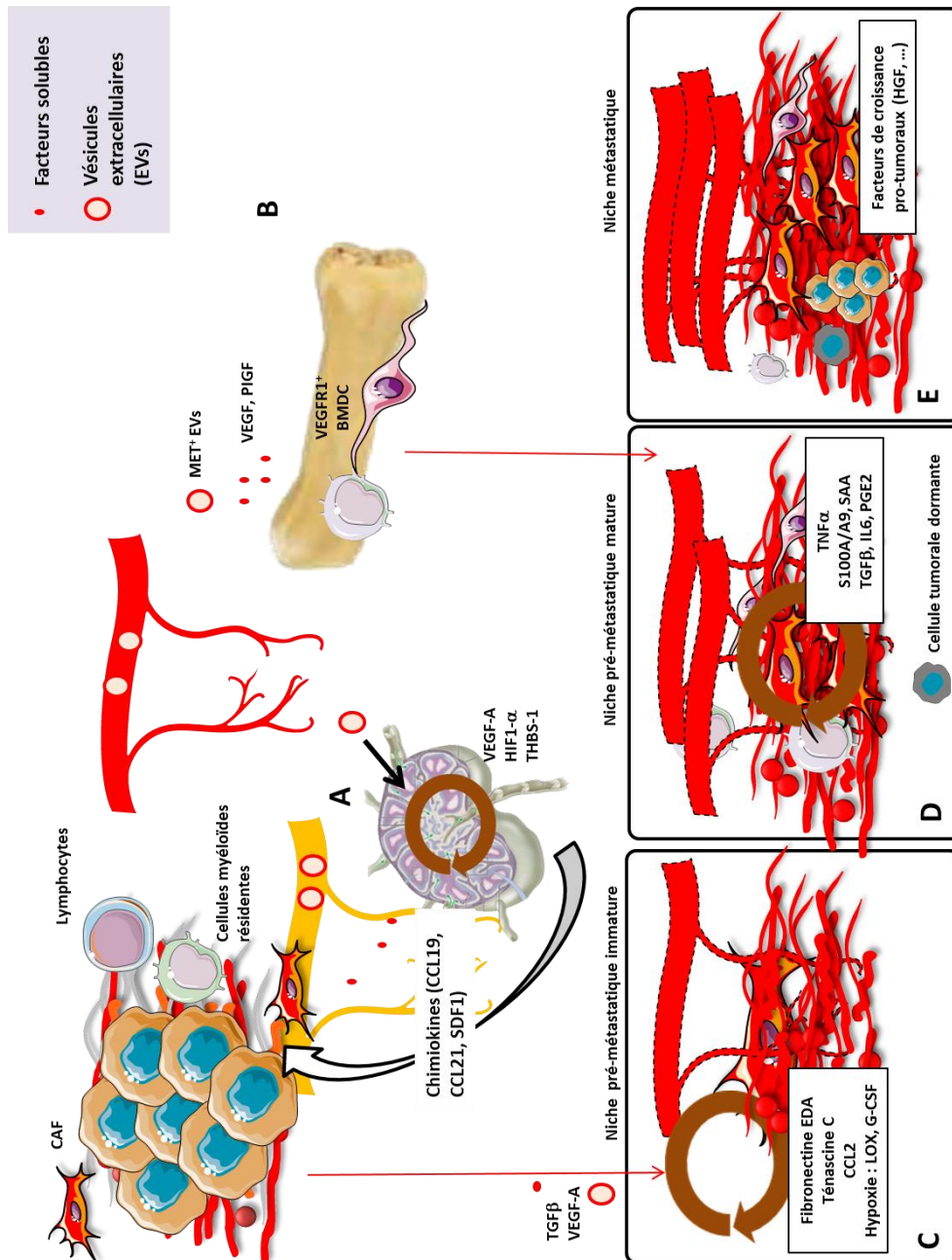


Figure 3 : La préparation de la niche pré-métastatique. Les cellules de la tumeur primaire sécrètent des facteurs solubles ou des vésicules extracellulaires qui atteignent la moelle osseuse, le ganglion lymphatique, ou des tissus cibles des métastases plus distants. Les exosomes et certains facteurs solubles permettent (A) la lymphangiogenèse dans le ganglion lymphatique, (B) induisent l'activation des BMDC dans la moelle osseuse. (C) L'initiation de la niche pré-métastatique est permise par des facteurs pro-fibrotiques (TGF β) et pro-angiogéniques. Les fibroblastes activés sécrètent une matrice riche en fibronectine et en protéines matricellulaires. L'hypoxie générée induit également la sécrétion de chimiokines et d'enzymes de réticulation du collagène. On aboutit à la niche pré-métastatique immature. (D) La niche évolue progressivement vers un état inflammatoire puis immunotolérant qui permet l'installation de cellules tumorales dormantes. C'est la niche pré-métastatique mature. (E) L'installation de nouvelles cellules tumorales dans un environnement immunosupprimé, néo-vascularisé et fibrotique permet la formation de macro-métastases et le réveil des cellules tumorales dormantes.

Nous allons voir maintenant que les cellules stromales qui orchestrent ce dialogue permanent entre les cellules tumorales et le microenvironnement sont les fibroblastes.

C. Les fibroblastes du microenvironnement tumoral

1) Fibroblastes et myofibroblastes

a. Fonctions et variété des fibroblastes

Les fibroblastes sont des cellules d'origine mésenchymale qui assurent l'intégrité tissulaire. Ils produisent la matrice extracellulaire et sont activés par les signaux mécaniques et les dommages tissulaires. Leur identification n'est pas aisée et repose sur l'association de plusieurs critères (*Sahai et al., 2020*) :

- Des **marqueurs moléculaires** telles que la vimentine, composant majeur des filaments intermédiaires du cytosquelette, le PDGFR- α (*Platelet-derived growth factor receptor A*) ou S100A4/FSP-1 (*Fibroblast Specific Protein 1*). Les fibroblastes se distinguent des autres populations stromales par l'absence de marqueurs endothéliaux (CD31) ou leucocytaires (CD45).
- Des **caractéristiques morphologiques** et **structurales** distinctives *in vivo* comme *in vitro*, telle que leur taille, leur étalement et de nombreux points d'adhésion focale associée au cytosquelette d'actine.
- Leur **localisation dans les stromas** tissulaires, en soutien des cellules épithéliales sus-jacentes.

Les fibroblastes diffèrent en fonction de leur localisation dans l'organisme, selon l'organe, et parfois même au sein d'un même organe voire d'un même tissu. Dans la majorité des tissus conjonctifs lâches, les fibroblastes sont dits **quiescents** (*Kalluri et al., 2016*). Ce sont des fibroblastes de morphologie allongée, en forme de broche, peu prolifératifs et ne possédant pas de secrétome actif. Ils ne sécrètent de la matrice que lorsque celle-ci doit être renouvelée, et maintiennent un état métabolique et épigénétique stable. **Les fibroblastes du derme** correspondent à cette description. Ce sont des cellules **faiblement contractiles** qui sécrètent une matrice riche en **élastine** et en **collagène de type I** (*Thulabandu et al., 2017*).

b. La génération des myofibroblastes

D'autres fibroblastes possèdent des propriétés contractiles, on les appelle des **myofibroblastes**. Les myofibroblastes sont des cellules que l'on retrouve dans de nombreux tissus dans un contexte physiologique ou pathologique. Les myofibroblastes ont été

caractérisés comme des cellules dotées de microstructures particulières appelés **faisceaux d'actine**, **faisceaux contractiles**, ou **fibres de stress**. Un sous-type d'actine, nommé **α -SMA** et codé par le gène ACTA2, constitue ces faisceaux d'actine, et est un marqueur myofibroblastique (*Gabbiani et al., 2003*).

Dans certains organes, les fibroblastes maintiennent un état basal d'activation y compris à l'homéostasie, ce qui permet de conserver la tension biomécanique. Ils possèdent des marqueurs de type myofibroblastique (dont α -SMA). On les retrouve dans des tissus conjonctifs spécialisés et mécaniquement très sollicités (*Tomasek et al., 2002*), comme les **tissus péri-alvéolaires** dans le poumon (*Kapanci et al., 1992*), ou dans les tissus lymphoïdes comme le **ganglion lymphatique** (*Tocannier-Pelte et al., 1987*).

Mais la génération de myofibroblastes a le plus souvent lieu à partir de fibroblastes quiescents pour répondre à un stress temporaire (**Figure 4**). Dans la peau, les fibroblastes sont activés lors d'un dommage tissulaire (par exemple une blessure). Le stress mécanique lié à la blessure permet de générer des **proto-myofibroblastes**, qui développent des adhésions focales avec la matrice et des faisceaux contractiles associés. Ils sécrètent alors **du TGF β** , synthétisent et remodelent la nouvelle matrice extracellulaire pour réparer la lésion, et **échangent des signaux inflammatoires** avec les cellules résidentes de l'immunité innée. Ils deviennent alors des myofibroblastes différenciés exprimant α -SMA et une forme particulière de fibronectine (EDA-FN). Il s'agit ici d'une réponse physiologique, temporaire et réversible, suivi ou par la mort cellulaire des myofibroblastes (« *nemosis* ») ou leur possible dédifférenciation en fibroblastes quiescents (*Hinz, 2007*).

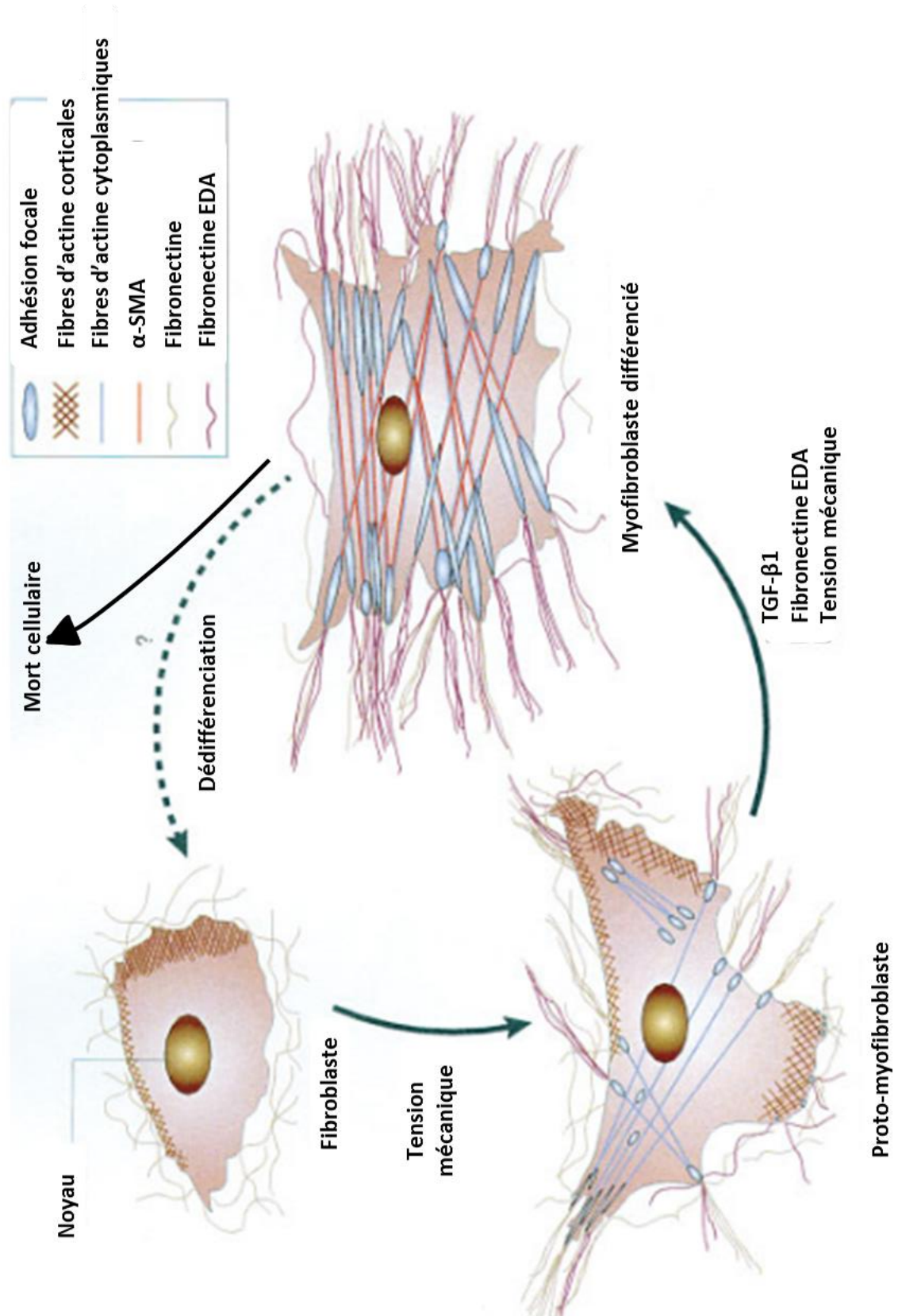


Figure 4 : La différenciation des myofibroblastes (D'après Tomasek et al., 2002 ; Hinz, 2007)

La dérégulation des myofibroblastes et leur suractivation chronique par des signaux mécaniques et biochimiques conduit à la formation d'un tissu cicatriciel persistant puis à la fibrose (Diazzi *et al.*, 2020). Il s'agit alors d'une situation pathologique que l'on retrouve notamment dans le cancer.

2) Les fibroblastes associés au cancer

a. Origine et hétérogénéité des fibroblastes associés au cancer

Les fibroblastes jouent un rôle essentiel dans l'établissement et l'évolution du microenvironnement tumoral. Ainsi, la formation d'un tissu fibrotique est récurrente dans l'évolution du microenvironnement tumoral, telle une « *blessure qui ne guérit jamais* », et elle est directement médiée par l'activation des fibroblastes en fibroblastes associés au cancer (CAF) et le remodelage de la matrice extracellulaire par ces derniers (Dvorak *et al.*, 1986).

1. Origine des CAF

Des études basées sur des modèles animaux avec des cellules marquées par un transgène conditionnel (Raz *et al.*, 2018), ou des études par séquençage en single-cell de la tumeur (Bartoschek *et al.*, 2018), montrent que les CAF peuvent être issus des différentes populations stromales résidentes ou de cellules recrutées dans la tumeur.

C'est dans le carcinome que les premières observations à ce sujet ont été faites. Parmi les origines possibles des CAF, on trouve principalement les **fibroblastes résidents** du tissu primaire ou métastatique (Orimo *et al.*, 2005). Parmi les cellules pouvant être recrutées, on trouve les **cellules mésenchymales dérivées de la moelle osseuse** (MSC) (Quante *et al.*, 2011). Elles peuvent former une population distincte dans la tumeur, n'exprimant pas PDGFR α et ayant une fonction fortement pro-angiogénique (Raz *et al.*, 2018). D'autres publications indiquent que les CAF peuvent également provenir d'**adipocytes** (Bochet *et al.*, 2013), de **cellules endothéliales** (Zeisberg *et al.*, 2007) ou de **péricytes** (Bartoschek *et al.*, 2018).

Ces cellules partagent le lignage mésenchymal, et le contexte inflammatoire ou fibrotique du microenvironnement tumoral reprogrammerait ces cellules vers un phénotype activé qu'ils avaient pendant le développement. Il semble en effet que le caractère quiescent, non-activé, des fibroblastes sains soit acquis après le développement (Kalluri, 2016). Or, une **reprogrammation épigénétique** est observée autant dans les fibroblastes résidents que les fibroblastes recrutés, au travers par exemple d'une hypométhylation de l'ADN (Quante *et al.*, 2011). Cette reprogrammation, **irréversible**, est induite par le TGF β .

b. Hétérogénéité des CAF

Les études portant sur l'origine des CAF dans divers cancers ont mis en lumière leur hétérogénéité phénotypique. De manière concordante dans plusieurs cancers, plusieurs études distinguent des populations de CAF présentant des niveaux d'activation et des propriétés différentes. En particulier, toutes les populations de CAF ne présentent pas la même contractilité ni la même propension à créer un environnement immunosuppresseur. On trouve ainsi des **CAF aux propriétés myofibroblastiques, fortement contractiles, et remodelant la matrice extracellulaire**. D'autres CAF au contraire sont moins contractiles, et exercent une fonction plutôt **inflammatoire** ou **immunomodulatrice** et **pro-angiogénique**. D'autres populations moins activées peuvent aussi exister et passer vers l'un de ces phénotypes (*Kalluri, 2016*). Ils sont discernables par un ensemble de marqueurs présentés dans la **Figure 5**.

Pour comprendre l'hétérogénéité des CAF au sein de la tumeur, les équipes qui s'y sont intéressés ont croisé les données issues de cytométrie en flux, d'analyse de l'expression génique en single-cell, et d'analyses histologiques en immunofluorescence ou en immunohistochimie. Ces études montrent que les différentes populations de CAF se distinguent en termes de marqueurs et de phénotypes, mais également en termes de localisation et d'origine. Elles démontrent l'existence de populations de CAF myofibroblastiques αSMA^+ contractiles distinctes de populations de CAF sécrétoires, pouvant être inflammatoires ou immunosuppresseurs, qui conservent une morphologie étoilée signe de leur activation, mais expriment fortement **FAP** et des cytokines et chimiokines comme **IL6** et **CXCL12**.

Dans le carcinome pancréatique (PDAC – *Pancreatic Ductal Adeno-Carcinoma*), trois populations de CAF ont été identifiées : la première correspond à des CAF myofibroblastiques (**myCAF**), la seconde à des CAF inflammatoires (**iCAF**) et la troisième, plus rare, à des CAF capables de présenter des antigènes (**apCAF**) aux lymphocytes T par le CMH de classe II (*Elyada et al., 2019 ; Helms et al., 2020*). Les CAF myofibroblastiques sont $\alpha\text{SMA}^{\text{high}} \text{IL6}^{\text{Neg}}$ et se situent à proximité des cellules tumorales. Les CAF inflammatoires sont $\alpha\text{SMA}^{\text{Neg}} \text{IL6}^{\text{High}}$ et se situent plus en périphérie (*Ohlund et al., 2017*). Cette dichotomie de localisation s'explique par un dialogue entre les cellules tumorales et les CAF. Les cellules tumorales sécrètent de l'**IL-1**, capable de diffuser dans la tumeur et qui induit le phénotype inflammatoire des CAF distants. Les cellules tumorales sécrètent également du **TGF β** , une cytokine dont la diffusion est limitée par la matrice extracellulaire, qui antagonise l'effet de l'**IL-1** en diminuant l'expression de l'**IL1-R1**, et en induisant la différenciation en myofibroblastes des CAF proximaux (*Biffi et al., 2018*).

On retrouve cette bipartition phénotypique dans les CAF de carcinome mammaire et de mélanome. Dans les tumeurs les plus agressives du carcinome mammaire (« *triple-négatives* »), deux populations de CAF sont enrichies parmi quatre populations, les deux autres étant retrouvées dans le pourtour des tumeurs ou dans des tumeurs moins

agressives. Ces deux populations de CAF majoritaires sont identifiées dans la tumeur primaire comme dans les ganglions axillaires. Il s'agit d'une population $\alpha\text{SMA}^{\text{high}} \text{FAP}^{\text{Nég}}$ myofibroblastique appelée **CAF-S4**, capable de remodeler la matrice extracellulaire et favorise l'invasion tumorale et d'une population $\alpha\text{SMA}^{\text{high}} \text{FAP}^{\text{high}}$ appelée **CAF-S1**, moins contractile, et de phénotype sécrétoire (Costa et al., 2018 ; Pelon et al., 2020). De manière intéressante, des populations analogues sont retrouvées dans les tumeurs de mélanome. On y retrouve trois populations de CAF, dont une population de CAF sécrétoires CAF-S1 $\text{PDPN}^+ \text{PDGFR}\alpha^+ \text{CD34}^+$, une population de CAF (CAF-S2) « desmoplastique » $\text{PDPN}^+ \text{PDGFR}\alpha^+$, exprimant des gènes de la matrice extracellulaire, et une population de CAF myofibroblastique (CAF-S3) αSMA^+ (Davidson et al., 2020). Les CAF-S1 de carcinome mammaire et de mélanome ont en commun de surexprimer des molécules inflammatoires, des cytokines, et surtout des chimiokines, dont CXCL12. Dans le carcinome mammaire, les CAF sécrétant CXCL12 favorisent la transition phénotypique des cellules tumorales vers un phénotype invasif (Pelon et al., 2020) et expriment des co-récepteurs de la réponse T et des molécules d'adhésion (**OX40L, PDL2, JAM2**) qui permettent le maintien des lymphocytes T régulateurs (Costa et al., 2018). En accord avec le fait que les CAF-S1 de carcinome mammaire sont FAP^+ , d'autres études montrent que les CAF FAP^+ ou $\text{FAP}^+ \text{PDPN}^+$ favorisent le recrutement de MDSC (Chen et al., 2018) ou l'anergie des lymphocytes T (Cremasco et al., 2018). Les CAF-S1 de mélanome favorisent de leur côté l'accumulation de macrophages par la sécrétion de molécules du complément comme C3a (Davidson et al., 2020). Ensemble, ces études montrent que ces CAF sécrétoires partagent un profil immunosuppresseur.

Au cours du développement de la tumeur, des sous-populations de CAF émergent et peuvent devenir localement prépondérantes et former des niches pro-tumorales. Dans le PDAC, une population de CAF myofibroblastiques LRRC15^+ émerge dans les tumeurs avancées, associée à une mauvaise réponse de la tumeur aux immunothérapies (Dominguez et al., 2019). Dans le carcinome mammaire et le cancer du poumon, une population de CAF $\text{CD10}^+ \text{GPR77}^+$ assure une niche pour les cellules souches cancéreuses. Ils correspondent à des CAF sécrétoires $\alpha\text{SMA}^+ \text{FAP}^+$ qui expriment IL6 et IL8 favorisant la chimiorésistance des cellules tumorales (Shicheng et al., 2018).

La question de l'hétérogénéité soulève bien sûr celle du rôle des fibroblastes dans le microenvironnement, en particulier de savoir s'ils sont plutôt en faveur ou en défaveur du développement tumoral. On comprend à présent que différentes populations de CAF favorisent l'invasion (Pelon et al., 2020), la survie tumorale (Dominguez et al., 2019 ; Shicheng et al., 2018), ou l'enrichissement du microenvironnement en cellules immunosuppressives (Costa et al., 2018 ; Davidson et al., 2020). Ils offrent des marqueurs spécifiques qui permettent de donner un statut au microenvironnement « favorable » ou « défavorable » au développement tumoral.

Nom du gène	Nom de la protéine	Population(s) associée(s)	Rôles associés
ACTA2	α -SMA (α -Smooth Muscle Actin)	CAF-S4 et CAF-S1 (<i>Costa et al., 2018 ; Pelon et al., 2020</i>), myCAF (<i>Ohlund et al., 2017</i>); CAF-S3 (<i>Davidson et al., 2020</i>)	Formation des faisceaux contractiles
CAV1	Cavéoline 1	Toutes (<i>Costa et al., 2018</i>)	Mécanotransduction (<i>Moreno-Vicente et al., 2018</i>)
FAP	Fibroblast Activation Protein Alpha	CAF-S1 (<i>Costa et al., 2018</i>), fibroblastes immunosuppresseurs (<i>Zhang et al., 2016 ; Chen et al., 2018 ; Cremasco et al., 2018</i>)	Activation, immunosuppression (<i>Kraman et al., 2010 ; Yang et al., 2016</i>)
FSP1	Fibroblast Specific Protein 1 – S100A4	CAF-S1 (<i>Costa et al., 2018</i>)	Activation
ITGB1	Intégrine β 1	CAF-S4, CAF-S1 (<i>Costa et al., 2018</i>)	Formation des adhésions focales, interaction avec la matrice extracellulaire
PDPN	Podoplanine	CAF-S1 (<i>Costa et al., 2018 ; Davidson et al., 2020</i>)	Invasion (<i>Neri et al., 2015</i>)
PDGFRα	Récepteur au PDGF (isoforme α)	CAF-S1 et CAF-S2 (<i>Davidson et al., 2020</i>)	Prolifération induite par les facteurs de croissance
PDGFRβ	Récepteur au PDGF (isoforme β)	CAF-S1 (<i>Costa et al., 2018</i>)	Prolifération induite par les facteurs de croissance
CD10	Néprilysine	CAF CD10 ⁺ GPR77 ⁺ (<i>Shicheng et al., 2018</i>)	/
GPR77	G protein-coupled receptor 77	CAF CD10 ⁺ GPR77 ⁺ (<i>Shicheng et al., 2018</i>)	Récepteur de C5a, Activation des CAF par NF κ B
LRRC15	Leucine Rich Repeat Containing 15	myCAF LRRC15 ⁺ (<i>Dominguez et al., 2019</i>)	/

Figure 5 : Noms et fonctions des marqueurs des populations de CAF

c. Les facteurs qui induisent l'activation des CAF

La génération des CAF est un processus progressif mais irréversible qui est induit par un ensemble de signaux extérieurs (*Kalluri, 2016 ; Sahai et al., 2020*) tels que (**Figure 6**) :

- Des molécules sécrétées. Il s'agit des **cytokines** émises par les cellules tumorales, d'autres cellules stromales résidentes ou recrutées dans la tumeur, ou encore circulantes depuis les autres sites tumoraux. Ce sont le **TGF β** , des ligands des récepteurs à activité tyrosine kinase, comme le **PDGF** ou le **FGF**, et des cytokines inflammatoires (**IL-1, IL-6, LIF** et **TNF α**) (*Erez et al., 2010 ; Sanz-Moreno et al., 2011 ; Albregues et al., 2014, 2015*). La voie NF- κ B induit l'activation des CAF grâce à l'action de l'IL-1 (*Erez et al., 2010*) ou de molécules du complément (**C5a**) produites de manière autocrine par les CAF (*Shicheng et al., 2018*).
- Un stress physiologique, comme le **stress oxydatif** (émission de ROS) (*Sahai et al., 2020*) ou la **dérégulation métabolique**. Les CAF subissent notamment une **reprogrammation métabolique** (*Avagliano et al., 2018*)
- Des **dommages à l'ADN** induits par les thérapies (*Fordyce et al., 2010*).
- Des modifications dans la **composition** et la **rigidité** de la **matrice extracellulaire** (*Calvo et al., 2013*), qui peuvent être induites par les thérapies (*Hirata et al., 2015*).
- Des contacts intercellulaires médiés par **Notch** (*Strell et al., 2019*).
- Des **exosomes** qui transportent et transfèrent des **intégrines** et des **microARN**, induisant la production de fibronectine (*Hoshino et al., 2015*) et la reprogrammation métabolique (*La Shu et al., 2018*) des CAF.

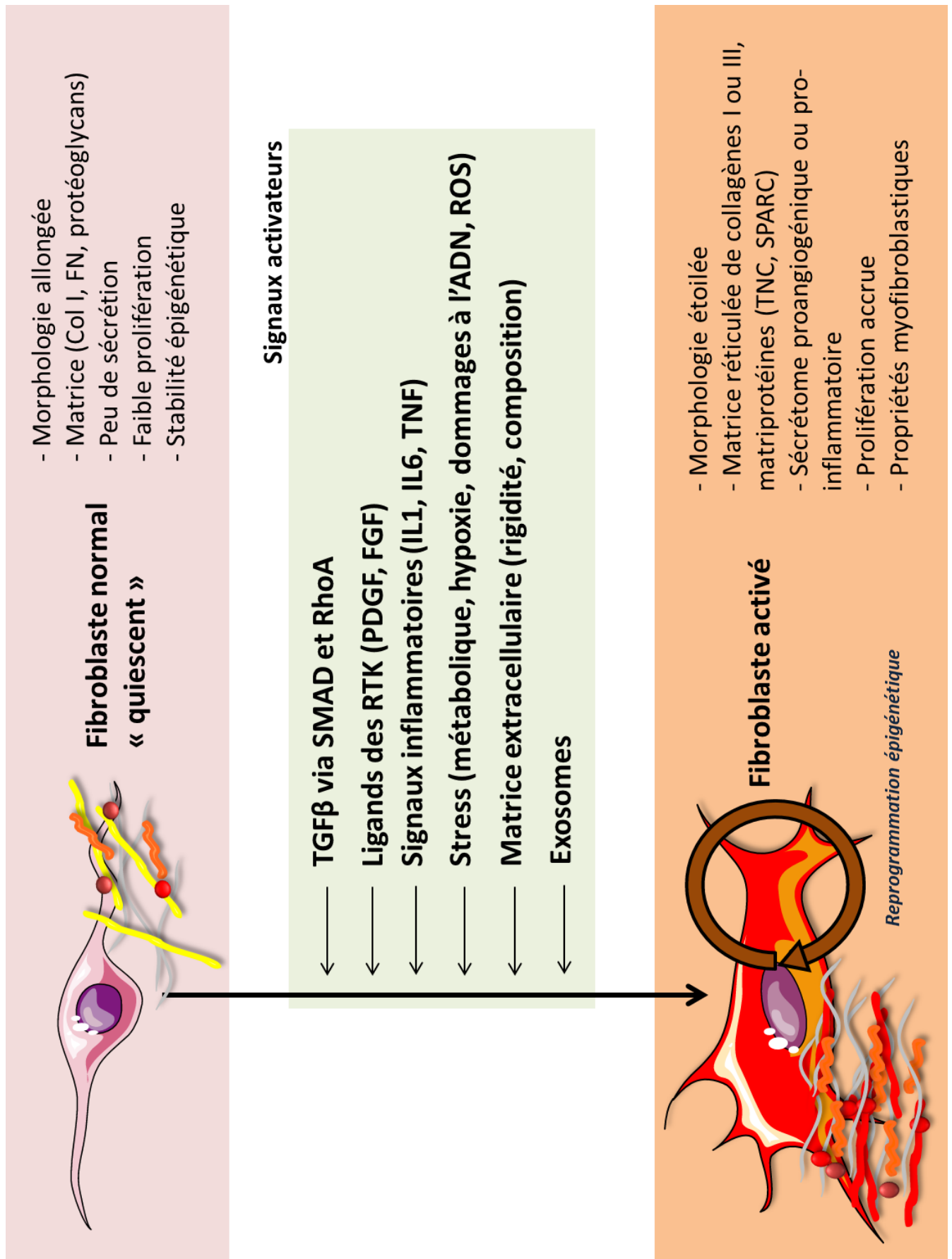


Figure 6 : Les facteurs qui activent les fibroblastes associés au cancer

d. L'induction des CAF myofibroblastiques

Je vais présenter comment les propriétés des myofibroblastes sont mises en place, et en particulier celles des CAF myofibroblastiques. Ces cellules intègrent des signaux du microenvironnement pour adapter la tension qu'elles exercent autour d'elles. Ce mécanisme est appelé mécanotransduction. Il met en jeu le **cytosquelette**, les **récepteurs d'attache** aux fibres de la matrice extracellulaire, et la **matrice extracellulaire** elle-même.

La mécanotransduction permet la conversion de signaux mécaniques extérieurs et biochimiques associés en signaux biochimiques intracellulaires. Des récepteurs membranaires de la matrice extracellulaire couplés au cytosquelette sont engagés lorsqu'une tension mécanique est ressentie et activent des voies de signalisation directes vers ce même cytosquelette, ou plus indirectes par la régulation de l'expression génétique. Dans une situation normale, ces mécanismes aboutissent à une réponse transitoire du myofibroblaste pour rétablir l'homéostasie. Dans le microenvironnement tumoral, les voies de mécanotransduction sont auto-entretenues et maintenues de manière chronique, amenant à une reprogrammation transcriptionnelle du myofibroblaste et à la génération des CAF myofibroblastiques.

1. Le cytosquelette des myofibroblastes

L'exercice d'une tension par les myofibroblastes nécessite le concours de toutes les fibres du cytosquelette, en particulier les filaments intermédiaires et les microfilaments d'actine. La contraction cellulaire repose en effet sur des déformations cellulaires qui nécessitent à la fois la robustesse et l'élasticité de la membrane plasmique. Les myofibroblastes forment un réseau de filaments intermédiaires, composés de **vimentine** comme les autres fibroblastes, ou parfois de **desmine** que l'on retrouve ordinairement dans les cellules musculaires striées (*Gabbiani, 1992 ; Shiga et al., 2015*). Les myofibroblastes développent en plus un réseau de filaments d'actine dont l'organisation est différente de celle des autres cellules mésenchymales. Les filaments d'actine corticaux qui permettent la formation des protrusions membranaires sont progressivement complétés par des structures plus complexes appelés **faisceaux contractiles** ou **fibres de stress**. Ils sont constitués de microfilaments comprenant l'isoforme **α SMA** de l'actine, associés à des protéines motrices, les **fibres de myosine** (*Tomasek et al., 2002*). Dans les CAF, les fibres de stress peuvent également être associées aux **septines**, des protéines GTPases capables elles-aussi de s'associer en fibres (*Calvo et al., 2015*). Les fibres de stress sont ainsi caractéristiques du **cytosquelette d'acto-myosine** des myofibroblastes. La contractilité de ce cytosquelette est la résultante de plusieurs mécanismes : la **polymérisation de l'actine**, son **assemblage en structures rigides** et le **déplacement de la myosine** sur l'actine par un changement conformationnel.

i. La polymérisation de l'actine

Les fibres du cytosquelette d'actine s'assemblent à partir de petites sous-unités protéiques. La sous-unité d'actine possède une structure globulaire avec un site de liaison de l'ADP ou de l'ATP que l'on appelle actine G (**actine globulaire**). Les sous-unités s'assemblent les unes à la suite des autres et forment deux protofilaments, qui eux-mêmes forment un filament d'actine, que l'on appelle actine F (**actine fibrillaire**). La polymérisation de l'actine est régulée par plusieurs mécanismes : d'abord la **nucléation**, qui permet l'agglutination des premières sous-unités d'actine G, et d'autre part l'**assemblage** des sous-unités dans un **sens privilégié**. L'actine G liée à l'ATP possède une conformation favorisant son assemblage par rapport aux sous-unités liées à l'ADP. C'est la concentration d'actine G qui détermine la vitesse de polymérisation, avec une concentration critique en dessous de laquelle le filament d'actine décroît. Il y a en permanence assemblage et désassemblage à chaque extrémité des filaments, mais l'assemblage devient plus fréquent là où la concentration locale d'actine G est plus élevée que le seuil critique. Quand la nucléation a commencé, il se forme alors une première extrémité du filament, riche en sous-unités liées à l'ATP, que l'on appelle l'**extrémité positive**, ou **extrémité barbue**. C'est celle qui croît le plus vite. Au fur et à mesure que de nouvelles sous-unités s'assemblent, les premières hydrolysent l'ATP en ADP, et il se forme alors l'extrémité négative, où les sous-unités auront plutôt tendance à se désassembler. Il s'agit de l'**extrémité négative**, ou **extrémité pointue**. La croissance de cette extrémité est réduite, et l'équilibre y est progressivement déplacé vers le désassemblage (*Pantaloni et al.*, 1985).

La régulation de la polymérisation a lieu à la fois sur la nucléation et sur l'élongation des filaments. La formation de structures plus rigides est ainsi permise par une nucléation latérale de nouveaux microfilaments grâce au **complexe ARP2/3** (*Mullins et al.*, 1998). Les protéines ARP2/3 sont apparentées à l'actine mais ne peuvent pas elles-mêmes s'assembler entre elles. Elles forment un complexe qui permet l'assemblage d'un nouveau microfilament en le maintenant à son extrémité négative et en restant fixé sur un microfilament plus ancien. Ce système conduit à la formation de fibres d'actine sous la forme d'un réseau dense et ramifié. Il peut aussi se former des faisceaux denses de microfilaments d'actine parallèles. Dans ce cas, c'est la **formine** qui permet la formation de ces nouveaux microfilaments parallèles (**Figure 7**). La formine se maintient à l'extrémité positive du microfilament (*Zigmond et al.*, 2004).

D'autres protéines accélèrent cette fois-ci l'élongation des microfilaments, notamment la **profiline** qui stabilise les sous-unités d'actine G liées à l'ATP et favorise leur fixation à l'extrémité positive du microfilament. D'autres encore favorisent la dissociation des microfilaments, comme la **cofiline** (*Mizuno*, 2012). La cofiline, quand elle n'est pas phosphorylée, déstabilise l'extrémité négative en se liant aux sous-unités d'actine liées à l'ADP et en accélérant leur dissociation. La phosphorylation de la cofiline inactive cette fonction et favorise le maintien de la longueur des microfilaments d'actine (**Figure 7**).

Enfin, des protéines associées permettent aux microfilaments d'actine d'interagir entre eux et avec les membranes, et permettent donc leur stabilisation. La protéine **alpha-actinine** permet l'espacement des microfilaments d'actine parallèles et l'insertion éventuelle des fibres de myosine. On retrouve cette protéine au niveau des adhésions focales, en association avec d'autres telles que la **vinculine**, la **taline**, et bien sûr les **intégrines**. Elles permettent l'ancrage du cytosquelette à la membrane (*Geiger et al.*, 2009). D'autres protéines ont un rôle majeur dans l'ancrage du cytosquelette à la membrane : ce sont les protéines **ERM (Ezrine, Radixine, Moésine)**. Les protéines ERM se trouvent sur la face cytoplasmique de la membrane plasmique (*Fehon et al.*, 2010). Quand elles sont phosphorylées ou qu'elles lient le PIP2 (*Phospho-inositide bi-phosphate*), un changement de conformation s'opère, elles s'allongent et lient d'une part les filaments d'actine et d'autre part des protéines de la membrane comme CD44 ou la podoplanine (PDPN).

ii. La contraction des fibres de stress

Les faisceaux contractiles, ou fibres de stress, sont l'association de fibres d'actine et de myosine. La myosine est une famille de protéines motrices que l'on retrouve dans toutes les cellules contractiles. Dans les myofibroblastes, c'est la myosine II qui est impliquée dans la contraction. Elle se compose d'un dimère de deux chaînes polypeptidiques, qu'on appelle chaînes lourdes (**MHC – Myosine Heavy Chain**) dont chacune possède un domaine de tête globulaire en N-terminal. C'est ce domaine qui permet l'interaction avec l'actine et la génération de la force motrice. Les deux chaînes se prolongent avec une longue hélice α qui permet la dimérisation des deux chaînes lourdes. A la charnière entre les deux domaines s'insèrent deux chaînes légères (**MLC – Myosine Light Chain**) ayant une fonction régulatrice.

Le mouvement de la myosine sur l'actine se réalise en quelques étapes bien identifiées (*Rayment et al.*, 1993). D'abord, la tête de la myosine est attachée à l'actine. Dans la seconde étape, la fixation d'une molécule d'ATP libre du filament d'actine la tête de la myosine. Ensuite, l'ATP est hydrolysée par la myosine en ADP. Celle-ci reste alors en conformation « armée », c'est-à-dire que la tête d'avance sur une longueur de 5nm. C'est ensuite que le groupement phosphate est libéré, la myosine se rattache au filament d'actine, et enfin l'ADP est libérée, générant la force qui ramène la tête de la myosine à sa position initiale relative à la molécule de myosine, résultant en l'avancement de la molécule entière par rapport à l'actine. Les chaînes légères de la myosine permettent de placer la myosine dans sa conformation initiale de liaison avec l'actine. En effet, si les chaînes légères ne sont pas actives, c'est-à-dire si elles ne sont pas phosphorylées, elles maintiennent les têtes globulaires et la queue de la myosine dans un état enroulé qui ne permet pas la fixation de l'actine. La phosphorylation des chaînes légères permet à la myosine de présenter ses sites de liaison à l'actine.

2. La réception et l'intégration des signaux extérieurs

i. Les récepteurs des signaux extérieurs

Les myofibroblastes intègrent des signaux extérieurs de deux nature : biophysique et biochimique. Ils disposent de récepteurs membranaires spécifiques de certaines des fibres de la matrice extracellulaire, et d'autres récepteurs auxquels se lient des cytokines. Les récepteurs membranaires des fibres de la matrice extracellulaire sont les **intégrines** et les **DDR (Discoïdin domain receptors)**. Les intégrines sont une famille de récepteurs qui sont activés suite à la dimérisation d'une **sous-unité α** et d'une **sous-unité β** , dont les combinaisons multiples permettent la liaison du **collagène**, de la **fibronectine** ou de la **laminine**. Les DDR existent sous deux formes, DDR-1 et DDR-2, qui ne lient que le collagène. DDR1 facilite la liaison de la myosine dans les fibres de stress, ce qui permet la transmission des forces contractiles intracellulaires sur l'exercice d'une tension sur les fibres de collagène. La liaison des intégrines aux fibres de la matrice extracellulaire conduit à leur regroupement dans un complexe membranaire où sont recrutées des protéines de liaison cytoplasmique au cytosquelette (**taline** puis **paxiline** et **vinculine**), et de kinases telles que FAK. Ce processus est appelé la maturation de l'adhésion focale. Il est accompagné par le recrutement d'autres récepteurs à proximité de l'adhésion focale (TGF β R, IL1-R). Les myofibroblastes intègrent par les adhésions focales des signaux inflammatoires tels que l'IL-1 ou bien le TGF β latent libéré des fibres de la fibronectine par l'exercice d'une tension sur la matrice.

ii. Les Rho-GTPases transmettent le signal au cytosquelette d'actomyosine

Ces signaux aboutissent à l'activation des Rho-GTPases. Ce sont de petites protéines G qui transitent d'un état inactif lié au GDP à un état actif lié au GTP, un processus régulé par les **GEF (Guanine-Exchange Factor)** qui jouent le rôle d'activateurs et les **GAP (GTPase-Activating Protein)** qui jouent le rôle d'inactivateurs. La formation des fibres de stress nécessaires à la contraction des myofibroblastes est principalement gouvernée par les RhoGTPases de la famille **Rho**. On distingue les isoformes RhoA, RhoB et RhoC. **RhoA** est notamment impliquée dans l'activation de la kinase **ROCK (Rho-associated coiled-coil-containing protein kinase)**, qui joue ensuite sur deux tableaux (**Figure 7**) :

- L'**activation des chaînes légères de la Myosine II** (Phosphorylation activatrice de MLC2 - **Myosin Light Chain 2** - ou phosphorylation inhibitrice de la phosphatase **MYPT1 (Myosin phosphatase target subunit-1)**).

- L'activation des protéines **ERM**, de kinases tels que les **LIMK** (inhibition de la cofiline), et de la profiline qui favorisent la **polymérisation de l'actine**.

La transduction du signal biomécanique extérieur vers le cytosquelette d'actomyosine par cette voie RhoA-ROCK est centrale dans l'activation des propriétés myofibroblastiques des CAF et le remodelage des fibres de collagène en retour.

Dans le carcinome spinocellulaire, les CAF guident l'invasion collective de cellules tumorales en formant des voies en laissant des fibres de collagène épaisses derrière eux, grâce à l'exercice d'une tension sur la matrice permise par les intégrines $\alpha3$ et $\alpha5$. Ce mécanisme est bloqué par l'inhibition de ROCK (*Gaggioli et al., 2007*). De même, l'augmentation de la tension intratumorale via l'augmentation de l'assemblage de collagène est augmentée par la mise en jeu de la voie RhoA-ROCK-LIMK (*Samuel et al., 2011*). Les propriétés myofibroblastiques des CAF de carcinome pulmonaire, favorisant leur migration, sont aussi induites par la surexpression par les CAF de la podoplanine au niveau du front de migration et l'activation subséquente de la voie ERM-RhoA-ROCK et inhibition de la cofiline (*Neri et al., 2015*). Enfin, CDC42EP3, une autre RhoGTPase, est également impliquée dans l'induction de la contractilité des CAF et le remodelage de la matrice. Elle favorise l'assemblage des septines 2 et 7 dans les fibres de stress, et sert donc de messager complémentaire dans la mécanotransduction par les RhoGTPases (*Calvo et al., 2015*).

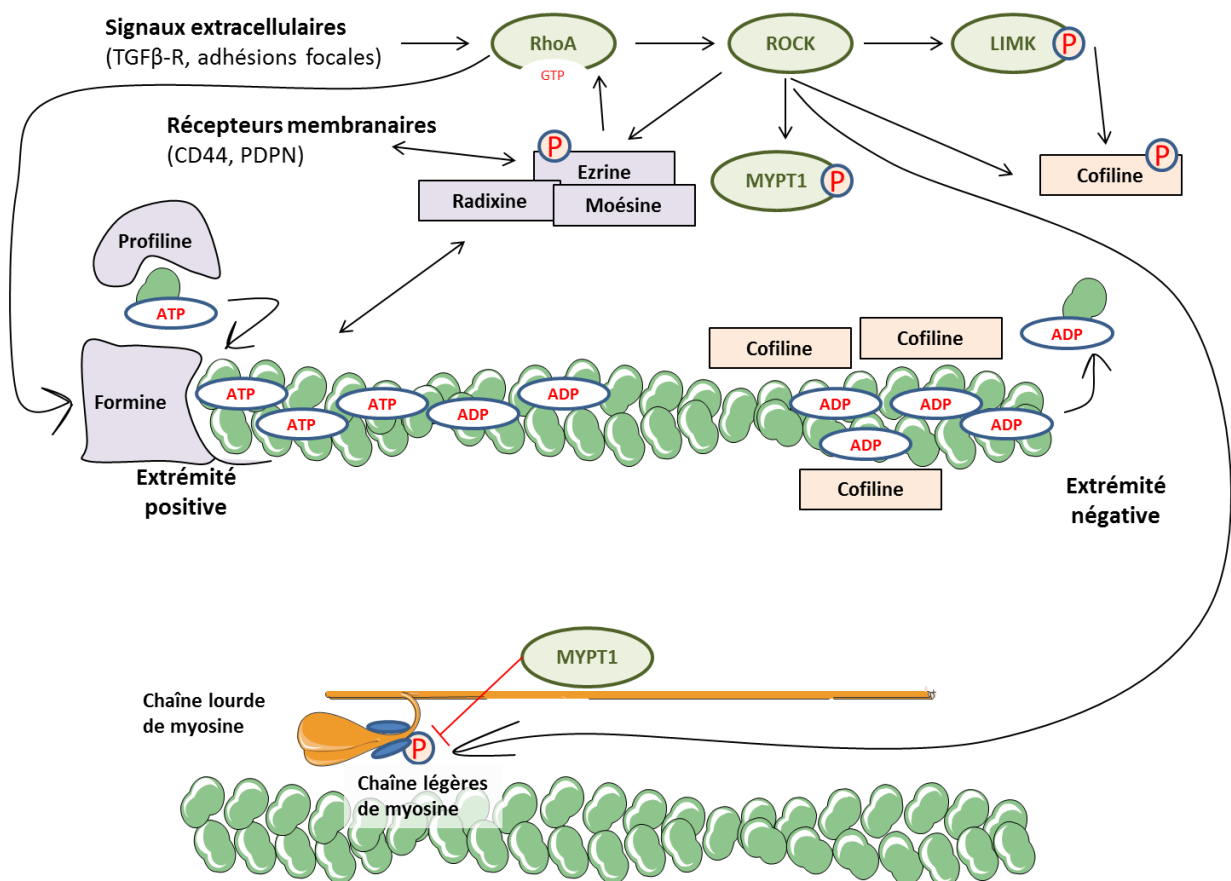


Figure 7 : La régulation de la polymérisation de l'actine et de l'activité des fibres de stress

iii. Les facteurs de transcription de la mécanotransduction

Les voies de la mécanotransduction que je viens de décrire aboutissent également à une reprogrammation de la transcription dans les myofibroblastes. Cette reprogrammation est permise par un ensemble de facteurs et co-facteurs de transcription appelés (*Dupont et al., 2011 ; Calvo et al., 2013 ; Foster et al., 2017*) :

- **MRTF** (*Myocardin related transcription factor*)
- **SRF** (*Serum Response Factor*)
- **YAP** (*Yes-Associated Protein*)
- **TAZ** (*PDZ-binding motif*)
- **TEAD** (*TEA domain family member 1*)

Les facteurs de transcription MRTF et SRF gouvernent la capacité des fibroblastes à réagir aux changements de rigidité de la matrice extracellulaire en régulant l'expression de gènes impliqués dans la contraction du cytosquelette d'actine (*Olson et Nordheim, 2010*). C'est le niveau d'actine G, c'est-à-dire de monomères d'actine libres dans le cytoplasme, qui fait le lien entre les signaux extérieurs activateurs et l'activité de MRTF et SRF. MRTF et SRF intègrent les signaux issus des Rho-GTPases sont entre autres activées par les kinases activées par l'engagement des intégrines en interaction avec une matrice rigide (**FAK, ILK, SRC**) (*Geiger et al., 2009*), **l'activation du récepteur au TGF β** (*Foster et al., 2017*), et l'activation des **récepteurs à activité tyrosine kinase** via la liaison physique des Rho-GEFs (*Schiller, 2006*). Les Rho-GTPases agissent ensuite via ROCK en inhibant l'activité de régulateurs négatifs de la polymérisation de l'actine (Cofiline) ou en activant l'activité de régulateurs positifs de la polymérisation de l'actine (LIMK). Ainsi, le niveau d'actine G diminue dans le cytoplasme et MRTF est transporté à l'intérieur du noyau (**Figure 8**).

Les facteurs de transcription YAP et TAZ sont plus connus dans la **voie de signalisation Hippo**, qui régule la polarité cellulaire, la prolifération et l'apoptose en fonction des interactions intercellulaires et cellule-matrice. L'activité de YAP et TAZ est gouvernée par une série de phosphorylations, la **première activatrice de LATS1/2 par MST1/2**, la **deuxième inhibitrice de YAP/TAZ par LATS1/2**. Lorsque YAP et TAZ sont phosphorylés, ils sont séquestrés dans le cytoplasme par une protéine 14-3-3 et dégradés. Les RhoGTPases régulent YAP en **bloquant l'action des protéines MST1/2 sur les protéines LATS1/2**, empêchant l'action inhibitrice de ces derniers, et activant YAP/TAZ qui sont transportés dans le noyau (*Meng et al., 2016*). Cependant, le rôle de YAP/TAZ dans la mécanotransduction est désormais bien décrit. L'activité de YAP/TAZ est induite par les signaux biomécaniques extérieurs via les modifications du cytosquelette d'actomyosine induites par RhoA, mais cela peut avoir lieu indépendamment de la voie Hippo (*Dupont et al., 2011*). Dans les CAF, les facteurs MRTF-SRF d'une part et YAP-TAZ d'autre part coopèrent pour l'établissement d'un phénotype contractile (*Foster et al., 2017*). MRTF gouverne l'expression de gènes associés à la contraction et à l'adhésion à la matrice (ACTA2 qui code pour **α -SMA, intégrines**). YAP permet l'expression d'autres gènes associés au cytosquelette d'actine (**ANLN, DIAPH3** et

MYL9 qui code pour MLC2) (Calvo et al., 2013). Le renforcement de l'expression de protéines favorisant un cytosquelette d'actine développé permet le maintien de la signalisation MRTF et YAP et donc du phénotype myofibroblastique. Ensemble, MRTF et YAP co-régulent également des protéines matricellulaires qui participent à la rigidification de la matrice extracellulaire, tels que **CYR61** et **CTGF** (Figure 8). L'activité transcriptionnelle de MRTF et YAP est ainsi maintenue par les propriétés myofibroblastiques des CAF, et renforcée par la rigidification de la matrice extracellulaire (Foster et al., 2017).

iv. Le maintien des propriétés contractiles des CAF

Le maintien du phénotype contractile des CAF myofibroblastiques fait de cette manière appel à des voies de signalisation qui aboutissent à l'activation de RhoGTPases, en particulier **RhoA**. Plusieurs études suggèrent que cette activation nécessite le concours de la matrice extracellulaire et de plus facteurs sécrétés (Figure 9). La rigidification de la matrice produite par les CAF conduit à l'accumulation nucléaire du facteur de transcription SNAIL, qui favorise l'activité de YAP et la production d'une matrice abondante (Zhang et al., 2016). Parmi les facteurs sécrétés, la principale cytokine connue pour induire l'activation des fibroblastes est le **TGF β** par l'intermédiaire du **TGF β R** et de **SMAD2**. Or, dans le carcinome mammaire, la molécule **Wnt7 α** semble nécessaire pour potentialiser la signalisation du TGF β R (Avgustinova et al., 2015). Dans le carcinome cutané, les cytokines inflammatoires comme l'IL6 ou le LIF, induit l'activation de ROCK via JAK1 (Sanz-Moreno et al., 2011). Or, le TGF β sécrété par les cellules tumorales induit également dans les fibroblastes dermiques, via les SMAD, la sécrétion de LIF qui agit de manière autocrine et paracrine (Albregues et al., 2014). Le LIF active la voie **JAK1-STAT3**. Il interagit avec le récepteur LIFR, qui se couple avec GP130. La dimérisation de ces deux sous-unités permet leur trans-phosphorylation sur des domaines SH2, puis la fixation des protéines JAK1 et leur phosphorylation activatrice. JAK1 peut ensuite activer RhoA et STAT3 dont l'activation est maintenue par une boucle de régulation épigénétique, en permettant l'expression de la méthyltransférase **DNMT3b**, une méthylation inhibitrice du promoteur de la phosphatase **SHP1**, et donc le maintien de la phosphorylation de JAK1 et de STAT3 (Albregues et al., 2015). De manière récurrente, les fibroblastes activés présentent des **profils hyper-méthylés** par rapport à des fibroblastes quiescents, et cela semble être un **marqueur du phénotype myofibroblastique** (Betchel et al., 2010).

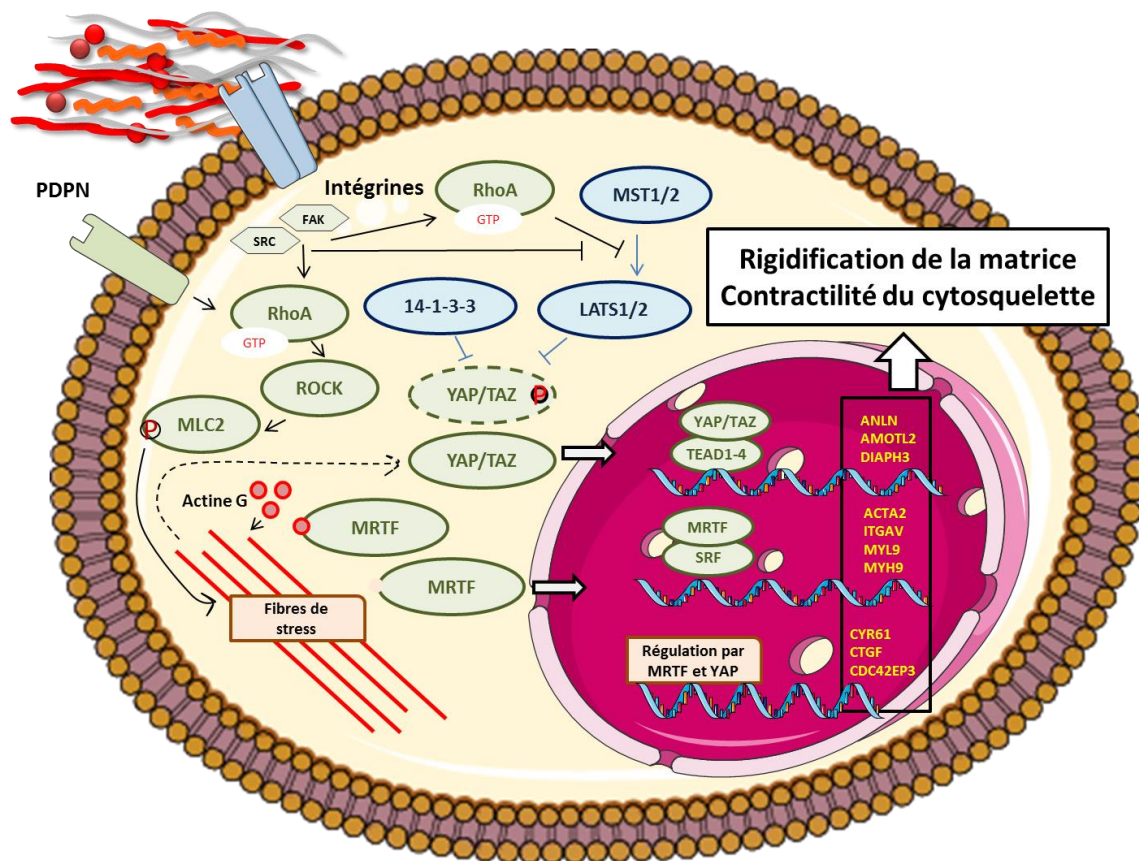


Figure 8 : La régulation de l'activité de YAP/TAZ et MRTF/SRF dans les myfibroblastes et les CAF

e. L'activation des CAF inflammatoires et sécrétoires

La voie **NF- κ B** a été identifiée pour être impliquée dans l'induction du phénotype **pro-inflammatoire** des CAF dans un modèle de carcinome cutané (Erez *et al.*, 2010). Ces auteurs proposent que l'IL-1 β produite par les cellules immunitaires résidentes active les fibroblastes environnants par la voie NF- κ B. En retour, CAF promeuvent l'angiogenèse et le recrutement de macrophages. Dans le carcinome pancréatique, c'est également la voie NF- κ B qui est mise en jeu pour induire les CAF inflammatoires via l'IL-1 produit par les cellules tumorales (Biffi *et al.*, 2018). De manière intéressante, l'induction de cette voie de signalisation aboutit à une boucle d'autoactivation analogue à celle décrite par Albregues *et al.*, 2014, dans laquelle la **production de LIF** est accrue, et active de manière chronique la voie **JAK-STAT** et la production de cytokines et chimiokines inflammatoires comme l'IL6 ou CXCL1. Enfin, dans le carcinome mammaire et le cancer du poumon, l'activation des CAF CD10⁺ GPR77⁺ qui soutiennent la niche des cellules souches cancéreuses est soutenu par la voie NF κ B induit par la voie **C5a-GPR77** et qui induit la production des cytokines IL6 et IL8 (Shicheng *et al.*, 2018).

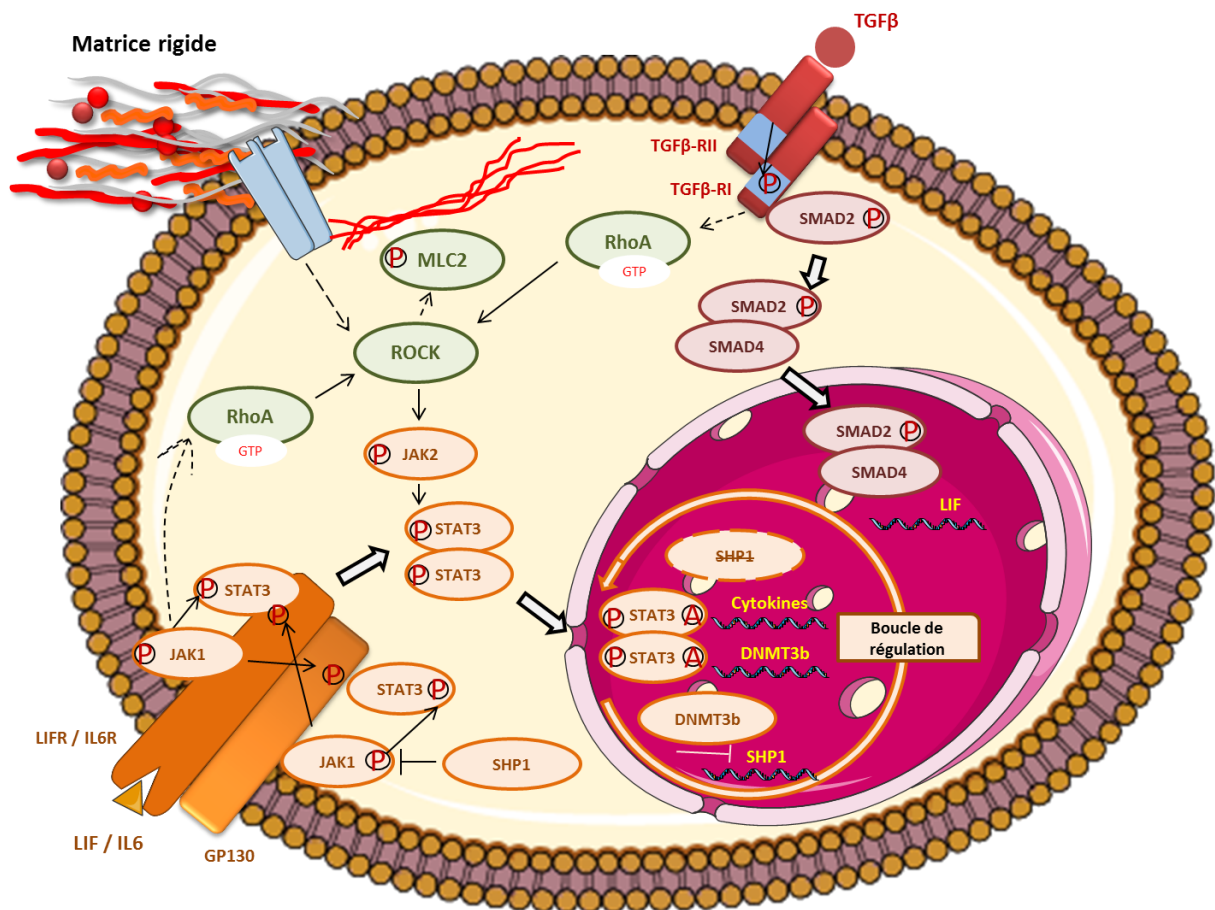


Figure 9 : La régulation des voies TGFβ-SMAD et JAK-STAT dans les myofibroblastes et les CAF

f. Les CAF favorisent un environnement pro-tumoral

Après avoir présenté les différents sous-types de CAF, aux propriétés et aux localisations différentes, je vais présenter ces propriétés et les mécanismes sous-jacents, et montrer que les CAF favorisent le développement tumoral et l'établissement de métastases par trois modes d'action principaux : (1) le **remodelage de la matrice extracellulaire**, (2) la **sécrétion de facteurs d'action paracrine (facteurs de croissance, facteurs angiogéniques, cytokines ou chimiokines)**, et (3) la **régulation du métabolisme**.

Ces modifications favorisent (**Figure 10**) :

- La **croissance** des **cellules tumorales** (survie, prolifération, métabolisme) et **endothéliales** (angiogénèse).
- La **formation des métastases** (invasion/infiltration et attraction/recrutement des **cellules tumorales** et **immunitaires immunosuppressives**).
- La **résistance thérapeutique**.

- Les CAF **sécrètent, assemblent et remodelent** la **matrice extracellulaire**

Les CAF produisent et assemblent une matrice extracellulaire qui devient progressivement de plus en plus dense et rigide. C'est ce que l'on appelle la réaction desmoplastique, qui est caractéristique d'un environnement fibrotique, et donc pro-tumoral. Cela suppose plusieurs facultés pour les fibroblastes (*Boonans et al., 2014*) : déposer une quantité importante de fibres de glycoprotéines telles que le collagène, la fibronectine et la laminine ; dégrader la matrice extracellulaire, notamment au niveau des fronts de migration (*Gaggioli et al., 2007*); et lier les fibres de collagène entre elles telle une toile d'araignée. Les deux dernières propriétés tiennent de la faculté à remodeler la matrice extracellulaire. La fibronectine joue également un rôle de liant du fait de sa structure en dimère reliés par deux ponts disulfures en C-terminal et disposant sur chacun de ses bras de motifs de liaison au collagène, à la laminine et aux récepteurs cellulaires.

Le dépôt d'une matrice extracellulaire alignée est intrinsèquement lié à la contractilité des CAF. Il fait intervenir les GTPases **Rho** et **Rab** et les **intégrines**. Les intégrines impliquées dépendent du cancer. Elles sont l'association d'une chaîne α parmi 18 isoformes et d'une chaîne β parmi 8 isoformes, pouvant s'associer en 24 différents dimères. Les intégrines permettent l'interaction avec les **fibres de collagènes** (ex : intégrine $\alpha11\beta1$), de la **fibronectine** via le motif RGD (ex : $\alpha5\beta1$) et de **laminine** (ex : $\alpha3\beta1$). Le remodelage de la matrice extracellulaire par les CAF est permis essentiellement par les intégrines dotées de la sous unité $\beta1$ qui permet la formation des adhésions focales, l'activation de RhoA et le renforcement de la liaison à la matrice extracellulaire avec le cytosquelette d'actomyosine par l'induction de ROCK et MLC2. Dans les carcinomes mammaires et pancréatiques, ce sont les intégrines $\alpha5\beta1$ qui sont mises en jeu pour aligner les fibres de fibronectine. Dans le carcinome pancréatique, les intégrines $\alpha3\beta1$ permettent l'organisation des fibres de laminine. Dans les deux carcinomes précédemment cités et le cancer du poumon, les intégrines $\alpha11\beta1$ permettent l'organisation des fibres de collagène (*Zeltz et al., 2019*).

Pour le remodelage de la matrice, les CAF font également intervenir des enzymes de dégradation de la matrice extracellulaire (métalloprotéinases, adamalysines ADAMS et ADAMTS) et des enzymes de liaison des fibres de collagène. Ce sont les enzymes de la famille des LOX (*Lysis OXidase*), et des PLOD (*Lysyl-hydroxylases*) et P4H (*Prolyl-4-hydroxylases*). Les métalloprotéinases **MMP2** et **MMP9** ont été particulièrement décrites dans le remodelage de la matrice extracellulaire au sein des tumeurs (*Singer et al., 2002*). Elles permettent notamment le relargage des facteurs de croissance (TGF β , VEGF) capturés par la matrice qui promeuvent l'activation des fibroblastes et l'angiogenèse. Parmi les enzymes de réticulation du collagène, les enzymes **LOX** et **LOXL2** sont particulièrement décrites pour favoriser la tumorigenèse et la progression métastatique. Les CAF sont capables de relier les fibres de collagène entre elles grâce à ces enzymes, ce qui est le principal mécanisme pour augmenter la rigidité de la matrice. Les CAF sécrètent une isoforme particulière de fibronectine appelée **fibronectine EDA** (*Rybak et al., 2007*) importante dans la mise en place de leurs propriétés

myofibroblastiques et la création de l'environnement fibrotique. Les CAF sécrètent de plus des matriprotéines caractéristiques des environnements fibrotiques. La matriprotéine **CTGF**, dont l'expression est régulée par YAP, favorise la migration et la prolifération tumorale ainsi que l'angiogenèse (Hale et al., 2013). La périostine (**POSTN**) favorise la survie des cellules souches cancéreuses et la progression tumorale (Yu et al., 2018). Une autre matriprotéine apparentée à la fibronectine est la **ténascine C**, qui favorise l'invasion et la survie tumorale dans le mélanome (De Wever et al., 2004 ; Shao et al., 2015). Les CAF sécrètent également en abondance la protéine matricellaire **SPARC**, qui joue le rôle de protéine adaptatrice favorisant l'assemblage des fibres de collagène (Hale et al., 2013). Or, SPARC favorise la transition phénotypique des mélanomes (Robert et al., 2006), la survie (Fenouille et al., 2011) et l'invasion tumorales (Tichet et al., 2015).

Les cellules tumorales réagissent ainsi à la rigidité de la matrice, le plus souvent associée à l'augmentation de la densité en collagène, en fibronectine et à la présence de certaines matriprotéines. Les voies de signalisation induites sont nombreuses et permettent de contourner les inhibitions spécifiques des thérapies ciblées. La ténascine C peut activer le récepteur à l'EGF et conséquemment la voie AKT qui contrôle l'expression de gènes d'échappement à l'apoptose (Shao et al., 2015). La rigidité de la matrice quant à elle est perçue par les intégrines $\beta 1$, la tension ressentie provoquant la formation d'adhésions focales et l'activation de la kinase FAK qui permet une réactivation de la voie des MAPK (Hirata et al., 2015). Pour la migration des leucocytes, l'impact de la matrice des CAF est double. Certains composants, l'acide hyaluronique et le versican, de la matrice sécrétée par les CAF, **favorisent l'infiltration de macrophages pro-tumoraux**, les macrophages M2, dans un modèle de carcinome mammaire (Kobayachi et al., 2010). En revanche, la rigidification de la matrice, en particulier l'enrichissement en collagène, **empêche la migration de lymphocytes T** helpers et cytotoxiques, restreignant leur localisation dans les zones périvasculaires (Salmon et al., 2012). La rigidification de la matrice aboutit également à création d'un environnement hypoxique qui favorise l'expression des gènes du collagène, des enzymes de réticulation du collagène, l'infiltration et la différenciation de MDSC (Jiang et al., 2017).

- Les CAF sécrètent des **facteurs de croissance**, des **facteurs angiogéniques**, des **cytokines** et des **chimiokines**.

Le sécrétome des CAF est très varié et favorise l'immunosuppression du microenvironnement, la prolifération et la survie tumorale, notamment en réponse aux thérapies, la transition phénotypique des cellules tumorales et l'angiogenèse.

Pour générer un microenvironnement immunosupprimé, les CAF sécrètent des facteurs qui orientent la composition immunitaire du microenvironnement vers des cellules immunosuppressives et bloquent l'activité des cellules immunitaires anti-tumorales.

Les CAF induisent ainsi le recrutement et la rétention de cellules immunosuppressives comme les lymphocytes T régulateurs en sécrétant CXCL12 et en exprimant les molécules de surface OX40L, PDL2 et JAM2 qui permettent leur adhésion (Costa et al., 2018), mais de MDSC grâce à la chimiokine CCL2 et de macrophages grâce à la chimiokine CXCL14 (Monteran et Erez, 2019 ; Yang et al., 2016). Les CAF sécrètent de plus les cytokines TGF β et IL-6 et induisent par ce moyen l'anergie des lymphocytes T helpers et cytotoxiques, favorisant la polarisation des lymphocytes T en lymphocytes T régulateurs (Kalluri et al., 2016). D'autres cytokines orientent la repolarisation des macrophages (GM-CSF, M-CSF) vers le phénotype pro-tumoral M2 (Monteran et Erez, 2016). Enfin, les CAF induisent l'extinction de l'activité cytotoxique des lymphocytes T CD8 grâce à la sécrétion d'IL-10 tandis que la PGE2 favorise la polarisation vers des lymphocytes T régulateurs et l'inhibition des cellules NK (Balsamo et al., 2009 ; Jiang et al., 2017).

Les CAF sécrètent également des facteurs de croissance qui favorisent la **survie des cellules tumorales** (HGF, EGF, IGF) (Straussman et al., 2012 ; Chen et al., 2014). Le HGF produit par les CAF permet de réactiver la voie des MAPK bloquée par les inhibiteurs de BRAF dans le mélanome. Il s'agit donc d'un mécanisme permettant une résistance thérapeutique immédiate aux thérapies ciblées (Straussman et al., 2012). Les CAF favorisent la survie tumorale également par la sécrétion de cytokines inflammatoires. J'ai évoqué le rôle de l'IL6 et de l'IL8 dans la survie des cellules souches cancéreuses (Shicheng et al., 2018). L'IL6 active via JAK-STAT et PI3K-AKT les voies de signalisation de la prolifération (E2F) et des facteurs anti-apoptotiques (BCL-2) (Kumari et al., 2016).

Par ailleurs, les CAF favorisent la **transition phénotypique des cellules tumorales**. Le TGF β , ainsi que certains ligands de la famille WNT (**WNT5A**), font partie des principaux facteurs sécrétés par les CAF qui induisent la transition phénotypique des mélanomes vers un profil invasif et dédifférencié, résistant aux thérapies (Hoek et al., 2006 ; Weeraratna et al., 2002). C'est le cas également du **TNF α** dont la source principale sont les cellules immunitaires de l'environnement fibrotique et inflammatoire créé par les CAF (Landsberg et al., 2012 ; Riesenberger et al., 2015).

Enfin les CAF **favorisent l'angiogénèse** par la production de nombreux facteurs angiogéniques tels que le VEGF-A et des métalloprotéinases (parmi lesquelles on retrouve la MMP9) qui favorisent la pousse des vaisseaux dans la matrice fibrotique produite. Comme nous l'avons vu précédemment, le VEGF-A permet également d'attirer des cellules dérivées de la moelle osseuse qui apportent un surplus de ces facteurs et métalloprotéinases et favorisent l'angiogénèse. Les CAF produisent également du TGF β , de l'IL-6 et du PDGF α sont d'autres facteurs qui induisent la prolifération des cellules endothéliales (Kalluri, 2016). Ainsi, les CAF contrôlent l'apport en nutriments et en dioxygène au sein d'une tumeur dont ils adaptent le métabolisme.

- Les CAF contrôlent l'activité métabolique à l'intérieur de la tumeur.

Les CAF sont capables de réguler l'activité métabolique à la fois des cellules immunitaires et des cellules tumorales. Il s'agit du troisième mode d'action des CAF pour réguler la prolifération, la survie et la plasticité tumorale, et pour contrôler l'activité des cellules immunitaires.

Un certain nombre de facteurs induisent la mise en place d'un effet Warburg propre aux CAF. L'effet Warburg consiste en un basculement d'une production d'Adénosine Tri-Phosphate (ATP) à partir de la **phosphorylation oxydative** mitochondriale vers une production d'ATP principalement par la **glycolyse**. Le TGF β , le PDGF, l'induction de HIF1 α par l'hypoxie, induisent une transition d'une production d'ATP par la phosphorylation oxydative mitochondriale vers la glycolyse aérobie. Parce que la prolifération nécessite une production soutenue de nouvelles protéines, d'autres voies cataboliques sont induites telles que la glutaminolyse et les voies associées aux acides aminés et aux lipides. La mise en place de ces voies métaboliques permet un échange de métabolites avec les cellules tumorales, dont la seule glycolyse ne permet pas d'apporter suffisamment d'intermédiaires carbonés pour soutenir leur prolifération active. Ainsi, les CAF fournissent du lactate et des acides gras aux cellules tumorales, ce qui permet de soutenir le cycle de Krebs et la phosphorylation oxydative pour ces cellules (*Kalluri, 2016*). De plus, l'activation par la matrice fibrotique de la voie YAP/TAZ dans les deux partenaires de cette **symbiose métabolique** permet l'expression de l'enzyme GLS1 et du transporteur SLC1A3. Les CAF apportent de l'aspartate aux cellules tumorales et les cellules tumorales apportent du glutamate aux CAF. L'aspartate permet de maintenir actif le cycle de Krebs et la synthèse des intermédiaires carbonés nécessaires dans les cellules tumorales et le glutamate permet le maintien de l'état rédox dans les CAF et la néo-synthèse de la matrice extracellulaire (*Bertero et al., 2019*).

En exprimant des enzymes telles que IDO1 et les arginases ARG1 et ARG2, les CAF régulent également la biodisponibilité du tryptophane et de l'arginine, ce qui inhibe la prolifération, l'activation et la production de cytokines des lymphocytes. Là où une symbiose métabolique se met en place avec les cellules tumorales, les CAF établissent donc une compétition métabolique avec les cellules immunitaires (*Molon et al., 2016*).

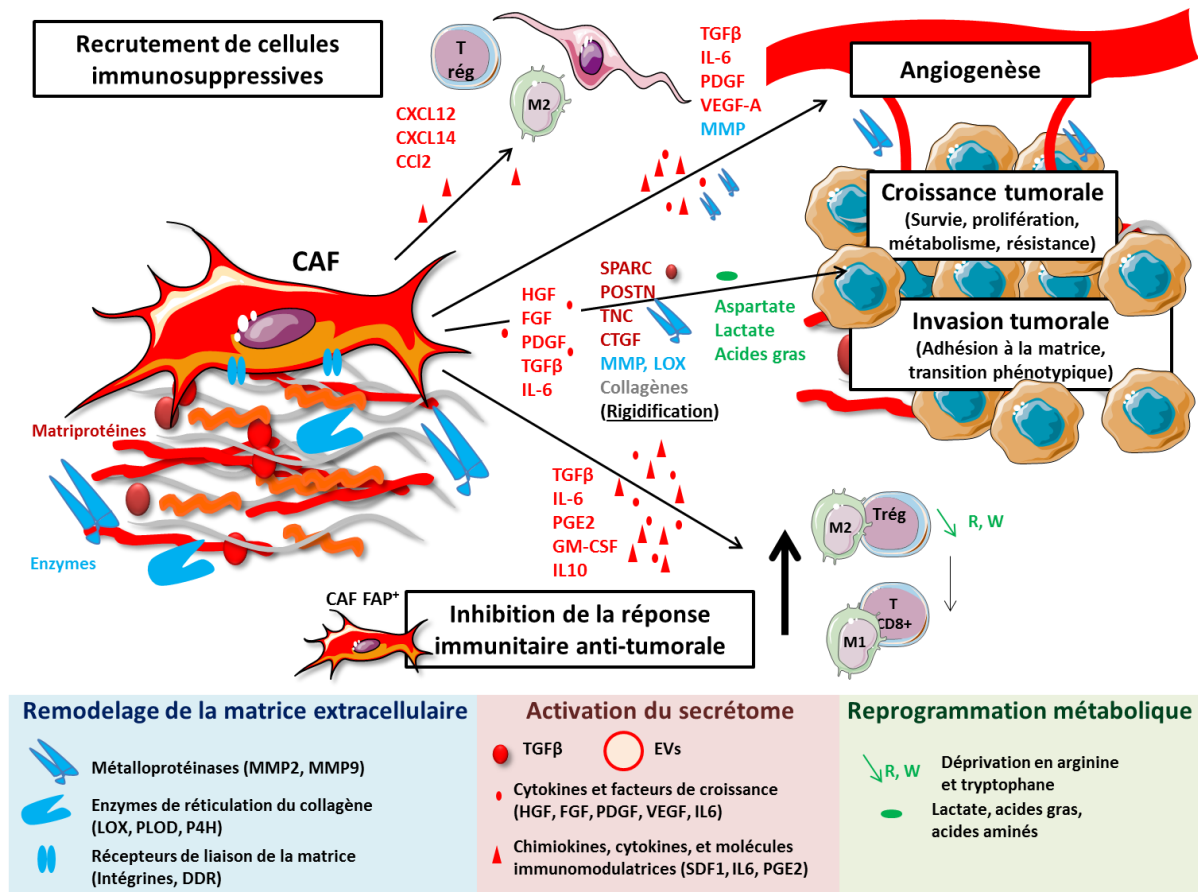


Figure 10 : Les CAF contrôlent le microenvironnement tumoral

Les fibroblastes sont des acteurs clés du microenvironnement tumoral. Les CAF sont induits par la transformation maligne des cellules tumorales, et sont nécessaires à l'établissement d'un sol propice à la tumorigenèse et au développement métastatique. Leur activation en myofibroblastes permet aux CAF de remodeler la matrice extracellulaire et créer un environnement fibrotique propice à l'acquisition de propriétés agressives telles que l'invasion tumorale et la résistance aux thérapies. Leur statut de chef d'orchestre du sécrétome et du métabolisme au sein de la tumeur leur permet de contrôler la réponse anti-tumorale et d'offrir aux cellules tumorales les ressources nécessaires à leur développement. Cibler les CAF est aujourd'hui une stratégie porteuse de beaucoup d'espoirs thérapeutiques. La recherche s'oriente sur des anticorps pour cibler les acteurs moléculaires de l'immunosuppression ou bien bloquer les cytokines (TGFβ) et les chimiokines (SDF1) ou leurs récepteurs respectifs pour empêcher le dialogue entre CAF et cellules tumorales (*Sahai et al., 2020*).

Partie 2 : Le Mélanome Cutané

A. Du mélanocyte au développement métastatique

Le mélanome cutané débute avec la transformation maligne des mélanocytes, les cellules responsables de la pigmentation de la peau situées à l'interface entre l'épiderme et le derme. L'objectif de cette partie est de présenter l'organisation de la peau et la biologie des mélanocytes sains, et de montrer comment une succession d'événements à l'échelle cellulaire, d'ordre génétique et épigénétique, mais aussi à l'échelle tissulaire voire systémique, reposant sur un dialogue entre cellule cancéreuse et microenvironnement, conduisent à la tumeur (*tumorigenèse*, ou ici *mélanomagenèse*) et aux métastases (*progression métastatique*). Cela me permettra d'expliquer pourquoi le mélanome est un cancer particulièrement agressif, avec le support des plus récentes données épidémiologiques disponibles.

*

* *

1. Structure et fonctions des cellules de la peau

a. La peau est un organe stratifié servant de barrière et d'interface

La peau est un organe du système tégumentaire : il est directement en contact avec le milieu extérieur, et joue d'abord un rôle de **barrière face à l'environnement extérieur**, contre les organismes pathogènes et les agressions physiques comme les variations de température et les rayons UV provenant du Soleil. C'est un organe stratifié constitué de trois tissus principaux : un épithélium appelé **épiderme**, et deux tissus conjonctifs : le **derme** et l'**hypoderme (Figure 11)**. Localement, l'épaisseur et la composition de ces couches sont variables et font qu'il existe en réalité plusieurs peaux, de structure hétérogène et adaptée en fonction des régions du corps. De plus, ces couches n'ont pas une organisation parfaitement linéaire : l'épiderme s'invagine pour former les follicules pileux, et le derme et l'hypoderme présentent une dense irrigation sanguine, lymphatique, et de nombreuses terminaisons nerveuses. C'est ainsi que la peau peut aussi remplir une fonction **d'interface d'échange** (régulation de la température du corps, perception du toucher). La diversité cellulaire de la peau fait de cet organe un environnement complexe dans lequel les interactions intercellulaires sont essentielles.

Les trois prochaines sous-parties développent la structure, la fonction et les interactions des cellules de l'épiderme et du derme. J'introduirai la biologie du mélanocyte et insisterai sur quelques types cellulaires et interactions moléculaires physiologiques qui sont importantes pour expliquer la progression du mélanome.

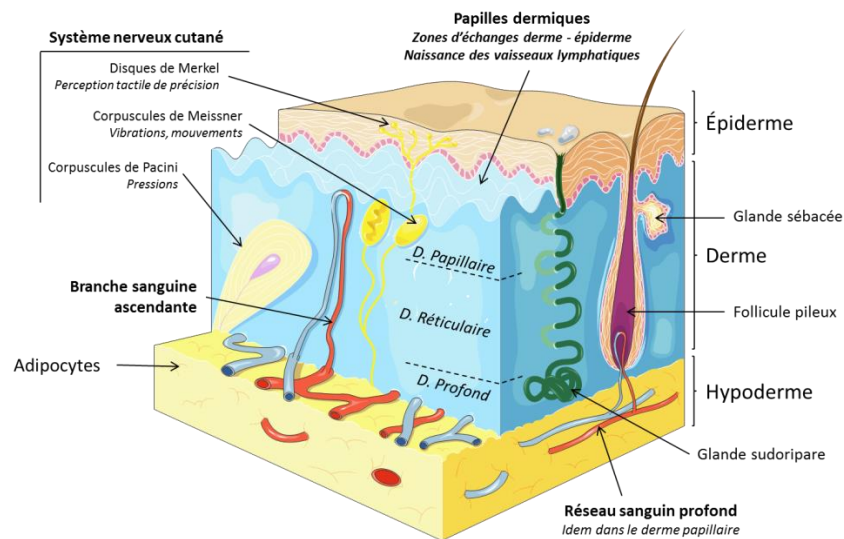


Figure 11 : Structures et fonctions des tissus de la peau. La peau se compose de trois tissus : l'épiderme, le derme, et l'hypoderme. Le focus est porté ici sur les structures du derme. On y trouve un tissu conjonctif majoritairement composé de fibroblastes et de matrice extracellulaire dont la structure change entre le derme papillaire et le derme profond. On trouve également le système nerveux cutané, avec plusieurs types de terminaisons nerveuses spécialisées dans la perception du toucher. Enfin, un riche réseau de vaisseaux sanguins et lymphatiques apportent nutriments et dioxygène jusqu'à l'épiderme non vascularisé et drainent déchets, antigènes et cellules immunitaires.

b. L'épiderme est majoritairement constitué de kératinocytes

L'**épiderme** est un épithélium stratifié et pavimenteux, dans lequel on retrouve trois types cellulaires : les **mélanocytes**, les **cellules de Langerhans**, mais surtout les **kératinocytes** majoritaires à 80%. Ces derniers se différencient à partir de cellules progénitrices contenues dans la *couche germinative* qui repose sur la lame basale, une fine couche de matrice extracellulaire qui les sépare du derme sous-jacent et à laquelle elles sont reliées par des héli-desmosomes. Les kératinocytes suivent un processus de kératinisation progressive en passant par la *couche épineuse*, en générale la plus large, dans laquelle on les retrouve reliés par des desmosomes. Les kératinocytes les plus âgés, c'est-à-dire les plus superficiels, s'aplatissent, perdent leurs contacts intercellulaires, et accumulent des grains de kératohyaline (*couche granuleuse*). Ils entament alors un processus de mort cellulaire programmée par apoptose, qui conduit à la formation de la *couche cornée* et du *squame* (**Figure 12**).

C'est cette structure rigide, assurée par de nombreux liens intercellulaires, et par l'accumulation en surface de cellules aplaties et fortement kératinisées, qui remplit primordialement le rôle de barrière face à l'environnement extérieur, en empêchant les pathogènes de pénétrer vers le milieu intérieur, et en servant de tampon face aux agressions physiques extérieures. On retrouve également des cellules de l'immunité innée, les **cellules**

de Langerhans, qui sont des cellules dendritiques présentatrices d'antigènes que l'on retrouve le plus souvent dans la couche épineuse de l'épiderme.

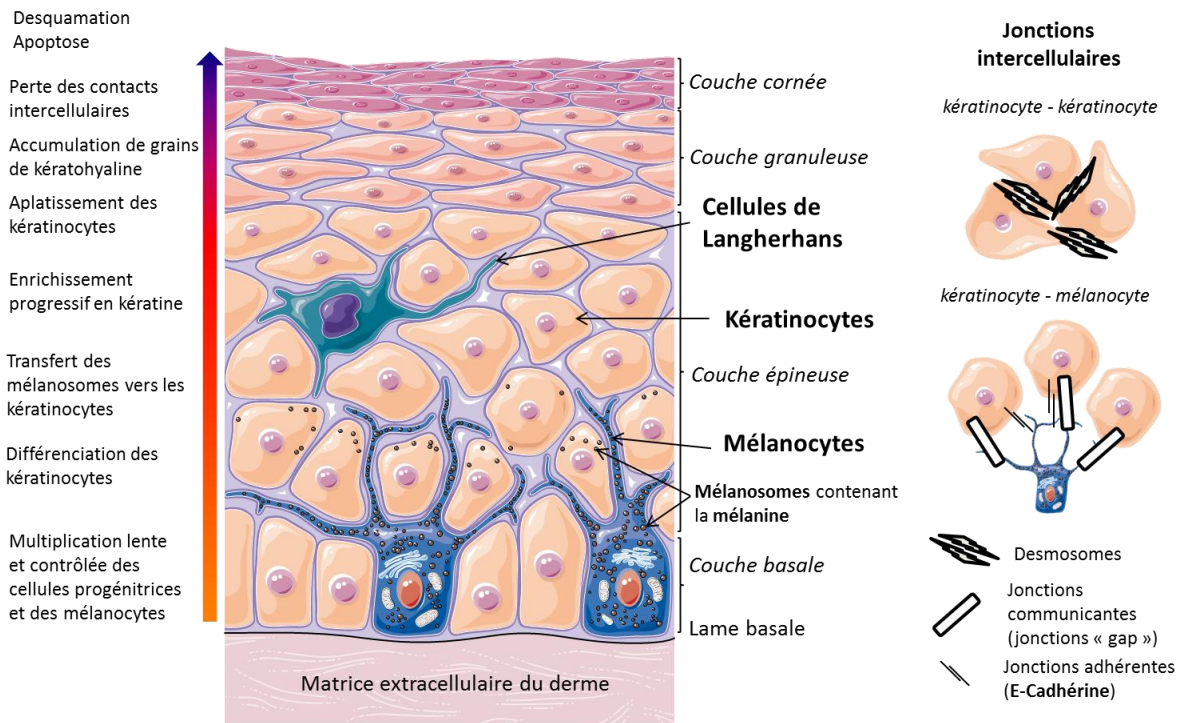


Figure 12 : Structure et interactions intercellulaires de l'épiderme. L'épiderme contient majoritairement de kératinocytes qui suivent un processus de différenciation de la couche basale vers les couches superficielles. Les mélanocytes produisent la mélanine qui est transmise via les mélanosomes aux kératinocytes desquels ils restent connectés par des jonctions communicantes et de jonctions adhérentes contenant l'E-Cadhérine.

c. Les mélanocytes de l'épiderme

Localisation et origine des mélanocytes

Les **mélanocytes cutanés** sont présents dans la couche germinative de l'épiderme et reposent sur la lame basale au même titre que les cellules progénitrices des kératinocytes. On les retrouve aussi au niveau des follicules pileux.

Alors que les kératinocytes ont une origine embryonnaire ectodermique, les **mélanocytes** sont des cellules d'origine **mésodermique**. Ils proviennent en effet de cellules multipotentes de la crête neurale, qui se sont spécialisées en mélanoblastes, les cellules précurseurs des mélanocytes. Les mélanoblastes sont des cellules mésenchymateuses capables de migrer en dehors de la crête neurale, de proliférer, et d'envahir l'ectoderme (*Paluncic et al., 2016*). C'est alors que les mélanoblastes se différencient en mélanocytes, par un processus d'ordre épigénétique qui leur fait perdre la plupart de leurs caractéristiques mésenchymateuses au profit de caractéristiques épithéliales (transition de type « mésenchymato-épithéliale »). Ce processus passe par l'acquisition de marqueurs, comme **KIT** et **TYR** (*Tyrosinase*), et de facteurs de transcription, **SOX10** (*SRY-box transcription factor 10*), **MITF** (*Microphthalmia-associated Transcription Factor*), qui gouvernent la différenciation depuis les cellules souches de la crête neurale en mélanoblastes et en mélanocytes différenciés (*Mort et al., 2015*) (**Figure 13**).

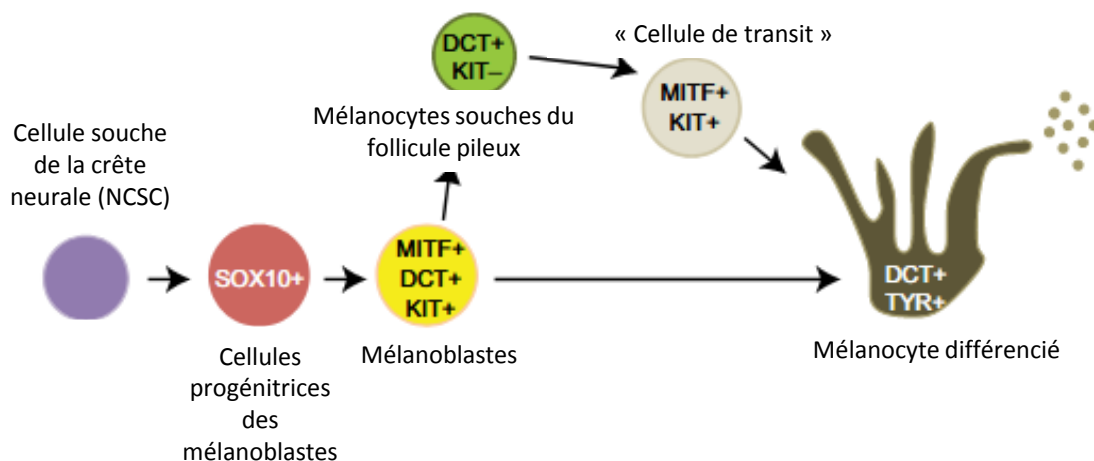


Figure 13 : Le développement des mélanocytes est gouverné par des marqueurs de différenciation.

Les mélanocytes proviennent de cellules souches de la crête neurale qui se sont progressivement différenciées au cours de leur migration jusqu'à la couche basale de l'épiderme. Les marqueurs de différenciation gouvernent le phénotype et la fonction mélanocytaire, tels que MITF ou TYR.

Les mélanocytes assurent la photoprotection des cellules de la peau face aux rayons UV

Les mélanocytes différenciés produisent de la mélanine dans des organites spécialisés appelés mélanosomes, à partir de produits issus de l'oxydation de la tyrosine. Il s'agit d'un processus appelé mélanogenèse. Les mélanosomes matures sont alors transmis aux

kératinocytes voisins. La pigmentation de la peau et des poils résulte d'interactions entre mélanocytes et kératinocytes, accentuées en réaction aux rayons ultra-violet du Soleil.

Le Soleil produit trois types de rayons UV : les UV-A (longueur d'onde comprise entre 315 et 400nm), les UV-B (280-315nm) et les UV-C (100-280nm). Les UV-C sont filtrés par la couche d'ozone, mais les UV-A et les UV-B peuvent pénétrer assez profondément dans la peau et causer des dommages cellulaires et tissulaires importants. Les UV-A sont très peu filtrés par l'atmosphère. Ils provoquent un déséquilibre dans la synthèse des protéines de la matrice extracellulaire (accumulation de fibres désorganisées d'élastine : « *élastose solaire* ») et la production de radicaux libres comme les espèces réactives de l'oxygène (ROS, *Reactive Oxygen Species*), ce qui génère un stress oxydant qui endommage l'ADN, causant des altérations génétiques. Les UV-B, plus énergétiques, sont considérés comme plus cancérigènes que les UV-A bien qu'ils soient davantage filtrés par l'atmosphère. Les UV-B génèrent également des ROS mais peuvent aussi provoquer des dommages directement sur la molécule d'ADN, en induisant la formation de dimères cyclobutane-pyrimidine et pyrimidine-pyrimidone (Mouret et al., 2008). La cellule normale possède un système de réparation de ces dommages à l'ADN induit par le stress UV qui est la machinerie d'excision des nucléotides dont deux facteurs sont régulés par USF-1 (*Upstream Stimulatory Factor 1*), ce qui en fait un facteur de transcription clé dans la stabilité génomique (Baron et al., 2012).

Les mélanocytes produisent en fait deux types de mélanine : le pigment brun/noir « eumélanine », qui absorbe bien les rayons UV, et le pigment orange/jaune « phéomélanine », moins protecteur. La proportion de ces deux types de mélanine, du nombre de mélanocytes par rapport au nombre de kératinocytes, et la capacité à transférer les mélanosomes des mélanocytes aux kératinocytes, est responsable du panel progressif de couleurs de peau que l'on retrouve au sein de l'humanité. Les dermatologues distinguent cinq phototypes, dont les plus clairs (phototypes I et II) présentent un niveau accru de réaction de la peau aux rayons UV (coups de soleil, brûlures) et davantage de risque de développer des cancers de la peau. En condition normale, lorsque les rayons UV atteignent les kératinocytes, le stress oxydant engendré active la production par ces derniers de l'hormone α -MSH (***α -Melanocyte Stimulating Hormone***) via une voie de signalisation impliquant p53 (Cui et al., 2007). L'hormone α -MSH agit de façon paracrine en se fixant sur le récepteur MC1R (***MelanoCortin-1 Receptor***) sur les mélanocytes, ce qui active l'expression du facteur de transcription MITF. MITF régule l'expression des gènes impliqués dans la biogenèse des mélanosomes, la synthèse de mélanine, et le transfert des mélanosomes vers les kératinocytes (Gaggioli et al., 2003). L'hormone α -MSH, mais aussi d'autres facteurs produits par les kératinocytes (endothelin, FGF -***Fibroblast Growth Factor***-, HGF -***Hepatocyte Growth Factor***-, LIF -***Leukemia Inhibitory Factor***-) induisent également la prolifération des mélanocytes, ce qui renforce la photoprotection de la peau contre les rayons UV (Hirobe et al., 2005) (Figure 14).

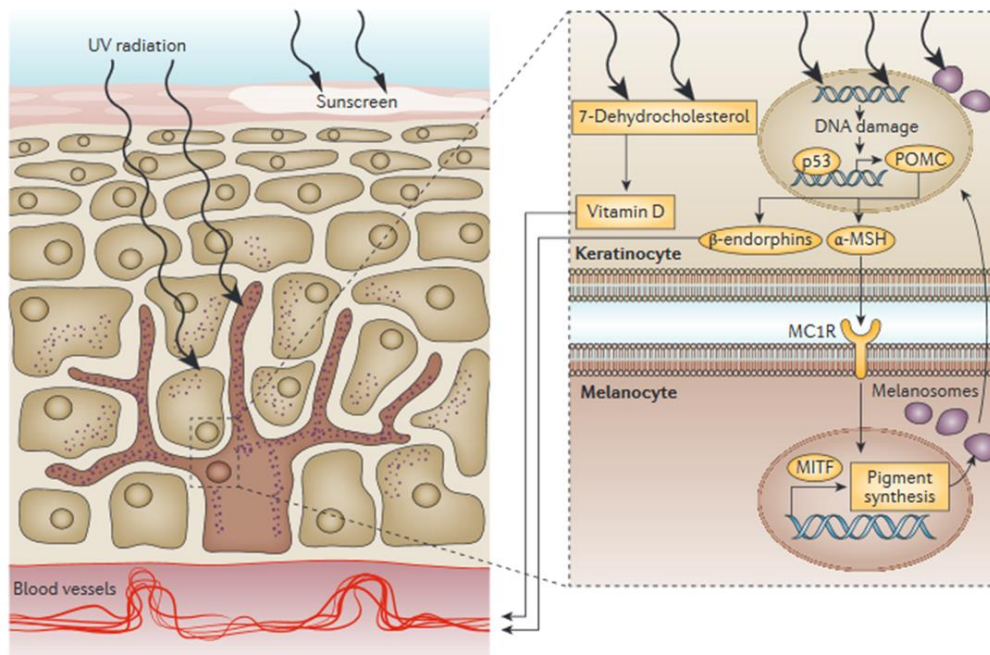


Figure 14 : Les interactions entre kératinocytes et mélanocytes sont cruciales pour la photoprotection de la peau (D'après *Schadendorf et al., 2015*). Les kératinocytes réagissent aux rayons UV en produisant l'hormone α -MSH. Elle induit via le récepteur MC1R sur les mélanocytes la synthèse de mélanine grâce à la mise en place d'un programme transcriptionnel conduit par le facteur de transcription MITF. La mélanine est stockée dans les mélanosomes, dont la grande majorité est transmise aux kératinocytes avoisinants.

Structure générale du derme

Le derme est un tissu conjonctif qui assure la **rigidité** et l'**élasticité** de la peau, qui sert d'assise à l'épiderme sus-jacent et qui renferme de nombreux vaisseaux sanguins et lymphatiques nécessaires à la nutrition de l'épiderme. Il contient d'autres structures multicellulaires :

- Des **glandes** : les glandes sébacées, qui débouchent dans la partie supérieure du follicule pileux et sécrètent le sébum qui limite le dessèchement de la peau, et les glandes sudoripares, qui sécrètent la sueur et participent donc à la régulation de la température du corps par la transpiration.
- Des **muscles lisses**, dont le rôle principal est l'érection du poil.
- Le **système nerveux cutané**, qui fait partie du système nerveux périphérique. Il est composé d'une minorité de fibres nerveuses autonomes, motrices et sécrétrices, et qui régulent l'activité des glandes sudoripares, la vasomotricité et la thermorégulation, et d'une majorité de fibres nerveuses sensorielles sensibles à l'étirement, la vibration, la température et la douleur.

Les fibroblastes et la matrice extracellulaire

La composante principale du derme est une **matrice extracellulaire** majoritairement constituée de fibres de **collagène** (en particulier le collagène I), d'**élastine** et de fibrilline, qui ensemble forment les fibres élastiques du derme. La matrice extracellulaire est sécrétée par les **fibroblastes du derme**. Le derme se subdivise en trois sous-couches : derme **papillaire**, **réticulaire** et **profond** (**Figure 11**). Les fibroblastes du derme n'ont pas les mêmes propriétés. Ainsi, les **fibroblastes réticulaires**, davantage impliqués dans les processus de cicatrisation, sécrètent des fibres de collagène plus larges et organisées que les **fibroblastes papillaires** (*Thulabandu et al., 2017*).

Vascularisation du derme

Le derme est richement vascularisé, grâce à un réseau sanguin et lymphatique dense.

Le réseau sanguin, artériel et veineux, est structuré entre deux réseaux parallèles à la surface de la peau. Le premier est situé dans le derme papillaire. De ce réseau partent des capillaires sanguins qui gagnent des invaginations du derme vers l'épiderme, les papilles dermiques. Elles augmentent la surface d'échange afin de nourrir l'épiderme sus-jacent. L'autre est situé dans le derme profond. Entre ces deux réseaux partent des branches perpendiculaires qui les relient. Certaines de ces branches donnent naissance à d'autres capillaires qui irriguent les follicules pileux et les glandes sébacées et sudoripares.

Contrairement au réseau sanguin, le réseau lymphatique fonctionne à sens unique. Sa fonction principale est de **drainer l'excédent de liquide interstitiel**, de **protéines** et de **déchets**, et en particulier d'éventuels **antigènes** libres dans la circulation ou transportés vers les organes lymphoïdes secondaires par des cellules présentatrices d'antigène. Dans la peau, les vaisseaux lymphatiques débutent anatomiquement entre les capillaires sanguins des papilles dermiques (**Figure 15**) et gagnent des vaisseaux plus gros situés plus profondément dans le derme, en restant contigus aux vaisseaux sanguins. Les vaisseaux lymphatiques fusionnent en de plus gros vaisseaux, quittent la peau et aboutissent aux **ganglions lymphatiques** drainants, qui filtrent la lymphe et sont le siège de la réponse immunitaire adaptative et anti-tumorale (**Voir III, 1**).

La formation de nouveaux vaisseaux sanguins et lymphatiques porte respectivement le nom d'**angiogenèse** et de **lymphangiogenèse**. Elle intervient en cas de rupture de l'intégrité du derme, au cours du processus de cicatrisation. Elle nécessite la migration et la prolifération des **cellules endothéliales sanguines** (**BEC – Blood Endothelial Cells**) et des **cellules endothéliales lymphatiques** (**LEC – Lymphatic Endothelial Cells**). Il est connu que la rupture du flux sanguin engendre une diminution locale de la pression partielle en dioxygène, l'hypoxie, ce qui induit la production du VEGF-A (**Vascular Endothelial Growth Factor A**) par une voie de signalisation impliquant le facteur de transcription HIF (**Hypoxia-Inducible Factor**). Le VEGF-A interagit avec le récepteur VEGFR-1 (**Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 1**) des BEC et stimule l'angiogenèse. D'autre part, les fibroblastes du derme

sécrètent pendant la cicatrisation le VEGF-C qui interagit principalement avec le récepteur VEGFR-3 des LEC et induit la lymphangiogenèse (Skobe et Detmar, 2000).

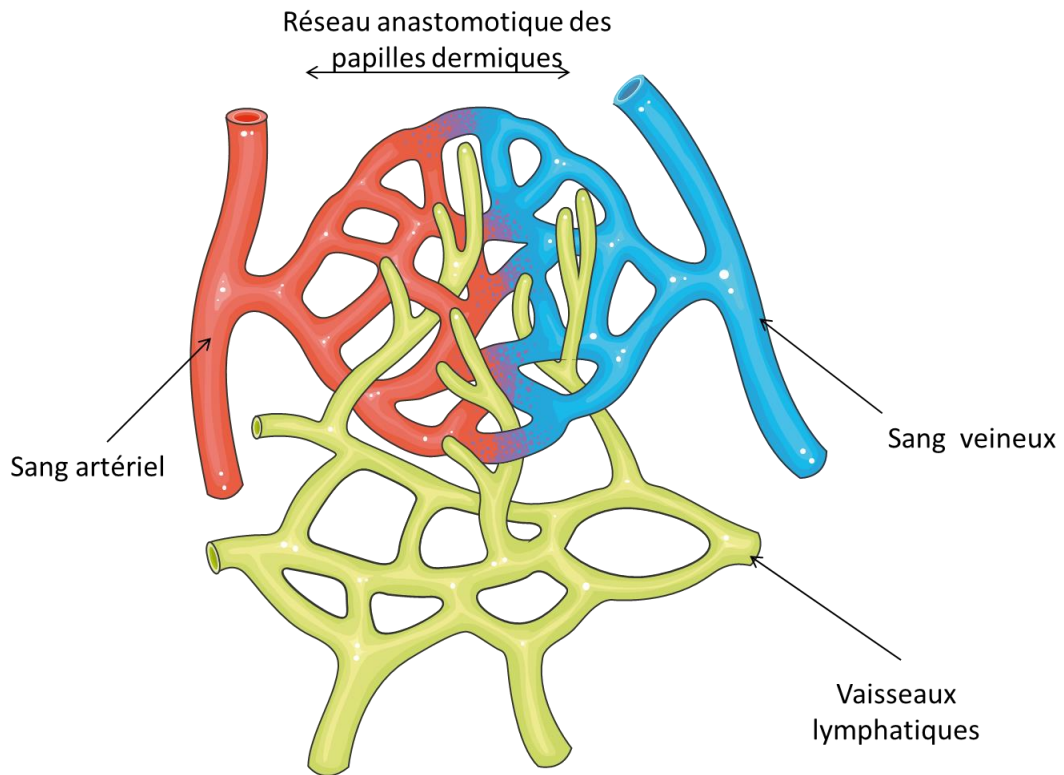


Figure 15 : Anatomie des réseaux sanguins et lymphatiques dans les papilles dermiques. Les papilles dermiques sont les principales zones d'échange entre le derme et l'épiderme. Les nutriments et le dioxygène sont apportés par le sang artériel via un réseau dense de capillaires qui communique avec le sang veineux. Ce réseau anastomotique augmente la surface d'échange, ce qui permet de récupérer les déchets métaboliques de l'épiderme non vascularisé. D'entre ce réseau partent les vaisseaux lymphatiques qui drainent déchets, antigènes et cellules immunitaires vers les ganglions drainants.

2. Les cancers de la peau : origines et épidémiologie

Selon l'INCA (*Institut National du Cancer*), le nombre de nouveaux cas de cancers de la peau a triplé entre 1980 et 2012, cette augmentation étant majoritairement dû à l'augmentation de l'exposition aux rayons UV solaires et artificiels. Quarante-vingt mille cancers de la peau sont diagnostiqués chaque année en France.

a. Les carcinomes

Les cancers de la peau les plus fréquents sont les **carcinomes**, puisqu'ils représentent **95% des cancers de la peau**. Ils surviennent majoritairement après 50 ans, sur les zones découvertes du corps, en contact direct avec la lumière du soleil. De fait, ils sont le plus souvent dus à une exposition au soleil excessive et chronique.

Il en existe de deux types. Le **carcinome basocellulaire** est le plus fréquent (70% des cancers de la peau). L'évolution de ces cancers est lente, localisée, et ne donne jamais de métastases. Ils peuvent cependant s'étendre en surface s'ils ne sont pas pris en charge rapidement et resurgir si l'exérèse chirurgicale n'a pas été suffisamment large. L'origine cellulaire des carcinomes *basocellulaires* sont les **cellules progénitrices de l'épiderme** dans les zones interfolliculaires, ces cellules souches unipotentes de la couche germinative qui se différencient normalement en kératinocytes. Leur transformation maligne se traduit par l'arrêt de la différenciation et l'invasion loco-régionale de l'épiderme adjacent et du derme sous-jacent.

Les **carcinomes spinocellulaires** sont moins fréquents (**20% des cancers de la peau**) mais plus agressifs et peuvent **métastaser** vers les **ganglions lymphatiques** et les **organes distants**. Ils trouvent souvent leur origine parmi les **kératinoses actiniques**, des lésions précancéreuses directement induites par une altération des kératinocytes superficiels due à une exposition répétée aux rayons du Soleil. D'une manière générale, les carcinomes *spinocellulaires* trouvent leur origine parmi les **kératinocytes différenciés de la couche épineuse**. Sa progression est caractéristique des cancers épithéliaux agressifs et métastatiques.

b. Le mélanome cutané

Données épidémiologiques

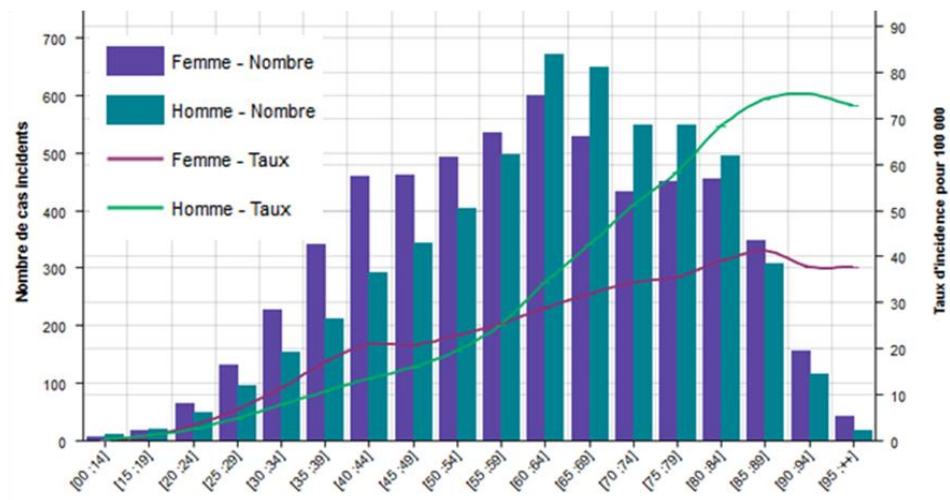
Le mélanome cutané trouve son origine dans la transformation maligne des **mélanocytes**. Ce cancer reste un fléau pour les patients qui en sont atteints. Il représente en effet 1,6% des cancers dépistés annuellement et **10%** des cancers de la peau incidents, mais il est responsable de **80% des décès** associés à ce type de cancer. Toujours selon l'INCA, l'incidence du mélanome est en augmentation depuis 1980, mais cette augmentation se ralentit depuis 2005, du fait d'une prise de conscience des risques liés aux rayons UV.

Du fait que le mélanome soit au moins en partie dû à l'exposition aux rayons UV, cela engendre deux conséquences d'un point de vue épidémiologique : une **augmentation de l'incidence** et de la mortalité dû au mélanome **avec l'âge**, et le fait que l'incidence du mélanome soit plus élevée dans les zones géographiques comportant une importante proportion de personnes au phototype clair (I et II).

L'augmentation de l'incidence du mélanome avec l'âge (**Figure 16** : proportion d'individus atteints maximal parmi les personnes les plus âgées) s'explique par l'accumulation de dommages cellulaires et génétiques dû aux rayons UV au cours de la vie. Les courbes de mortalité sont d'ailleurs décalées vers les tranches d'âges les plus élevées par rapport aux courbes d'incidence, mais cela ne doit pas cacher le fait que l'incidence du mélanome augmente chez les personnes les plus jeunes.

Le rapport entre l'incidence et la pyramide des âges dans les pays développés fait que la majorité des cas de mélanome sont diagnostiqués entre 40 et 60 ans, même si comme nous venons de le voir, un nombre non négligeable de cas sont diagnostiqués pendant l'adolescence et chez les personnes âgées. On peut remarquer particulièrement que l'âge médian de développement du mélanome, aux alentours de 50 à 60 ans, coïncide avec celui d'autres tumeurs solides, cancer du sein, du poumon ou du colon (*Schadendorf et al., 2015*).

Incidence en France (données INCA pour 2012)



Mortalité en France (données INCA pour 2012)

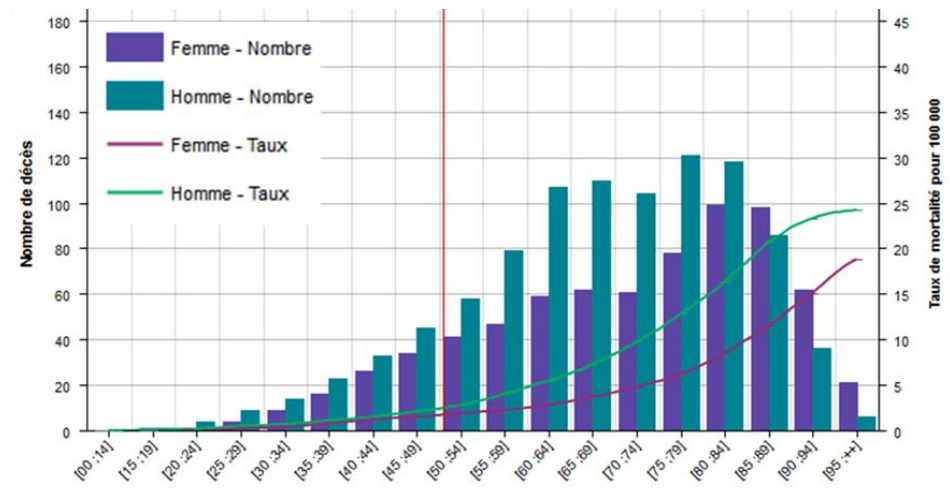


Figure 16 : L'incidence et la mortalité du mélanome en France est dépendante de l'âge. *En haut.* Incidence du mélanome en France en nombre de cas chez la femme (histogramme violet) et chez l'homme (histogramme vert), ou en proportion (courbes) pour 100.000 individus, en fonction de tranches d'âge de 5 ans. *En bas.* Mortalité du mélanome selon les mêmes critères.

De la même manière, l'incidence du mélanome est plus importante en Europe du Nord et en Amérique du Nord où la proportion d'individus de phototype clair est la plus élevée mais aussi dans des zones comme l'Afrique du Sud et surtout l'Australie et Nouvelle Zélande où la proportion d'individus de phototype clair est grande, où la puissance solaire est plus importante dû à la proximité des tropiques, et où l'ensoleillement est plus fort dû à un climat méditerranéen à aride (**Figure 17**).

Incidence dans le monde (d'après *Globocan 2012, Schadendorf et al., 2015*)

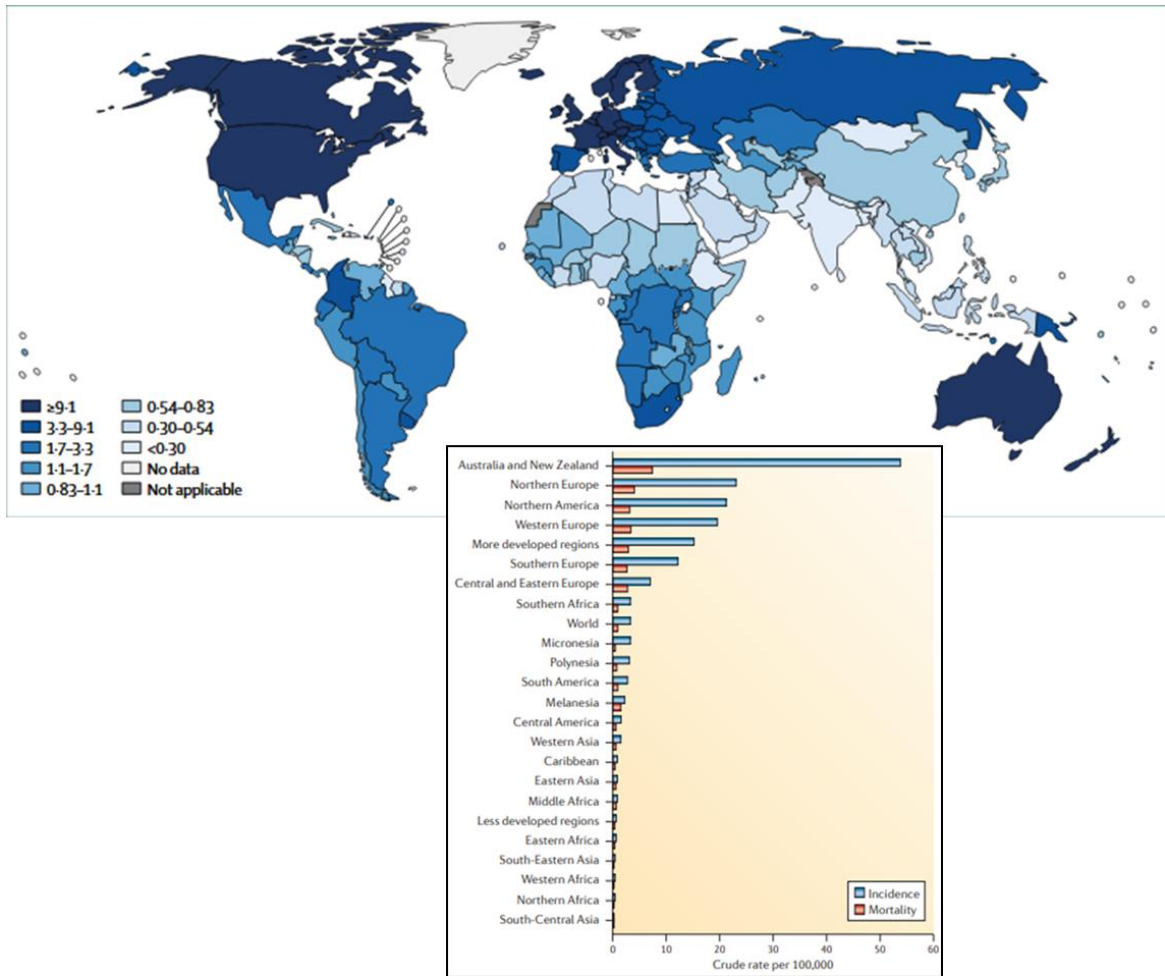


Figure 17 : L'incidence et la mortalité du mélanome est dépendante de la situation géographique. *En haut*, Nombre de cas pour 100.000 personnes selon les pays du monde. *En bas*, Incidence et mortalité du mélanome selon des zones géographiques définies.

La mortalité du mélanome est moins dépendante de la situation géographique et reste relativement proportionnelle à l'incidence, même en Australie et Nouvelle-Zélande où les efforts portés sur la prévention mais surtout sur le diagnostic sont particulièrement importants. En Australie d'ailleurs, l'incidence du mélanome diminue depuis 2005. Au contraire, on observe des variations notables entre les pays développés et les pays en développement en raison de l'inégalité de l'offre médicale de diagnostic et de traitement.

Facteurs de risques

Le principal facteur de risque du mélanome est **extrinsèque**, c'est l'exposition aux rayons UV. Ce sont notamment les UV-A et les UV-B qui proviennent d'une source naturelle comme le Soleil et les UV-A d'une source artificielle comme les cabines de bronzage. La **répétition de coups de soleil pendant l'enfance** est notamment un facteur augmentant la probabilité de développer un mélanome plus tard.

Cependant, une grande partie des facteurs de risque sont intrinsèques aux individus. C'est le cas des personnes de **phototypes de niveaux I et II**, caractérisés par une peau claire sensible aux coups de soleil, qui développent plus facilement des grains de beauté et des taches de rousseurs. Un **nombre de grains de beauté supérieur à 100** fait partie des facteurs de risques du mélanome (*Gandini et al., 2005*).

Parmi les facteurs intrinsèques, on retrouve également l'**immunodépression**. Les personnes ayant un système immunitaire affaibli, par exemple avec la prise d'anti-rejets suite à une transplantation, ont plus de risques de développer un mélanome (*Vajdic et al., 2009*).

Enfin, il existe un certain nombre de mutations génétiques générant des prédispositions au mélanome. Les gènes affectés contrôlent le cycle cellulaire et la production de la mélanine. On estime ainsi à environ 8% les patients atteints d'un mélanome dû à une prédisposition héréditaire. Parmi ces patients, 40% possèdent une mutation sur le locus **CDKN2A**, qui inhibe la sénescence des cellules tumorales en début de progression de mélanome, tout comme le gène **CDK4**. Ces gènes sont dits de **haute pénétrance**, c'est-à-dire présentant un risque élevé de conduire au développement d'un mélanome s'ils sont mutés. D'autres mutations ont une plus faible pénétrance. On trouve des mutations sur le gène **MC1R**, associées à une proportion plus élevée de phéomélanine, avec un phénotype « cheveux roux » et une faible propension de la peau au bronzage. Un rapport élevé de phéomélanine par rapport à l'eumélanine favorise le stress oxydant généré par les rayons UV et l'apparition d'autres mutations. D'autres gènes associés à la différenciation et la fonction des mélanocytes sont également retrouvés mutés, à l'instar de **MITF**, amplifié dans 4 à 21% des mélanomes (*Garraway et al., 2005*), **SOX10** et **TYR**.

Le risque de développer un mélanome métastatique suite au diagnostic du mélanome primaire dépend essentiellement de son **épaisseur**. Nous verrons que le stade d'avancée du mélanome est en effet associé à une classification histologique reflétant l'infiltration de la tumeur dans l'épiderme et le derme. Une tumeur infiltrante est une tumeur ayant potentiellement disséminé des cellules tumorales dans la circulation et d'autres organes, qui peuvent donner des métastases.

3. Les mécanismes biologiques de la progression du mélanome

a. Les hallmarks du mélanome

Les cancers sont des pathologies complexes qui reposent sur la prolifération anarchique de cellules tumorales au sein du tissu qui l'entoure et qui constitue le microenvironnement tumoral. Hanahan et Weinberg développent l'hypothèse selon laquelle la formation d'un cancer est issue de l'accumulation de caractéristiques malignes qui conduisent progressivement une cellule dite « normale » à devenir une cellule « maligne ».

L'accumulation de ces nouvelles caractéristiques est permise par l'**activation constitutive de signaux de transduction oncogéniques**, grâce à une série de **mutations aléatoires spontanées ou induites** ; par des **modifications épigénétiques** promues par l'effet interne de ces mutations ou par des effets externes dues au microenvironnement tumoral ; et enfin grâce à des **modifications de ce microenvironnement tumoral** par la cellule cancéreuse (*Hanahan et Weinberg, Cell, 2000*).

Pour le mélanome, l'action combinée de « **mutations drivers** », de **mutations génétiques secondaires**, de **modifications épigénétiques**, et du **dialogue entre microenvironnement et cellule tumorale** amène du mélanocyte sain au mélanome par l'**acquisition progressive et séquentielle** de plusieurs ou de la totalité des caractéristiques suivantes (*Hanahan et Weinberg, Cell, 2011*) (*Figure 18*) :

- **Hyperactivation des voies de signalisation induisant la prolifération cellulaire, indépendamment de la présence de facteurs de croissance.**

Exemples : Voie **Ras-Raf-MAPK** (*Mitogen-Activated Protein Kinase*) et **PI3K-AKT-mTOR** (*PhosphoInositide 3-Kinases – Protein Kinase B – mammalian Target Of Rapamycin*).

Certaines de ces mutations sont exclusives les unes des autres et constituent un sous-type génomique du mélanome reconnu par le *Cancer Genome Atlas* : c'est le cas des mutations affectant **BRAF** (52% des tumeurs, 35% pour la seule mutation **BRAF^{V600E}**) et **RAS** (28% des tumeurs).

- **Echappement aux mécanismes de blocage de la prolifération cellulaire.**

Exemples : Mutations invalidant les gènes suppresseurs de tumeurs **NF1** (*NeuroFibromatose 1*), **TP53** (*Tumor Protein 53*), et **CDKN2A** (*Cyclin-dependant kinase inhibitor 2A*) qui code deux régulateurs du cycle cellulaire : **P16^{INK4A}** (contrôle du passage de la phase G1 à S) et **P14^{ARF}** (sortie de la phase G2, impliqué dans l'activation de P53).

- **Résistance à la mort cellulaire programmée.**

Exemples : Mutations invalidant **TP53**, hyperactivation de la voie **PI3K-AKT-mTOR**, diminution de l'expression de la protéine pro-apoptotique **BAD** (*Bcl2-associated Death promoter*).

- Echappement à la sénescence.

Exemples : mutation sur le promoteur ou amplification du gène **TERT** (*TElomerase Reverse Transcriptase*), codant pour l'une des sous-unités de la télomérase, l'enzyme responsable de l'élongation des télomères et l'échappement à la sénescence.

- Induction d'une angiogenèse chronique.

Dans le cas de nombreuses tumeurs solides, l'angiogenèse est chronique et aboutit à la pousse permanente de nouveaux vaisseaux sanguins. C'est ce que l'on appelle le « **switch angiogénique** ». Les cellules tumorales et certaines cellules du microenvironnement tumoral comme les fibroblastes surexpriment et sécrètent des facteurs angiogéniques tels que le **VEGF-A** et des métalloprotéinases tels que **MMP9** qui favorisent la libération du VEGF-A de la matrice extracellulaire et la pousse des vaisseaux au travers de cette matrice.

- Mise en place d'une transition vers un profil invasif.

Le mélanome primaire se caractérise par une **hétérogénéité intratumorale** due à la présence de différents profils transcriptionnels associés à différents profils phénotypiques allant de la cellule tumorale « proliférative » à la cellule tumorale « invasive ».

L'acquisition d'un phénotype invasif permet aux cellules tumorales de former des métastases. Cela nécessite plusieurs mécanismes cellulaires (*Zbytek et al., 2008*) : (1) organisation du cytosquelette d'actine en **fibres de stress** et formation d'**adhésions focales à intégrines** amenant à l'acquisition d'une **morphologie fibroblastique** et à l'augmentation de la **motilité cellulaire** ; (2) expression et sécrétion d'enzymes de **dégradation de la matrice extracellulaire** ; (3) capacité à faire la **diapédèse** entre les cellules endothéliales des vaisseaux sanguins ; (4) capacité à survivre dans la circulation en évitant le stress des forces de cisaillement et la mort cellulaire par anoïkis, notamment par **l'interaction avec les plaquettes sanguines** ; (5) adaptation à l'environnement du nouveau tissu par la formation de nouvelles adhésions entre les cellules tumorales de la micrométastase et les cellules et la matrice du microenvironnement.

- Echappement à la réponse immunitaire et génération d'une inflammation pro-tumorale.

Plusieurs des caractéristiques majeures de la cellule tumorale regardant ses interactions avec le microenvironnement concernent le dialogue avec les cellules de l'immunité. Deux phénomènes distincts ont lieu : d'une part la capacité à **éviter l'élimination par le système immunitaire**, et d'autre part la **génération d'une réponse inflammatoire** favorisant plusieurs des autres caractéristiques du mélanome.

On observe l'infiltration de cellules immunitaires dans les microenvironnements tumoraux de la tumeur primaire comme des métastases : par exemple, des lymphocytes T cytotoxiques, des lymphocytes Natural Killer (NK) ou des cellules myéloïdes. Cette réponse immunitaire est à double tranchant : elle peut-être **anti-tumorale** ou **pro-tumorale**.

Les lymphocytes T cytotoxiques et NK forment ainsi une réponse initialement efficace pour éliminer des cellules malignes, de par la reconnaissance d'**antigènes tumoraux** et d'autres caractéristiques tumorales comme l'**internalisation des CMH (Complexes Majeurs d'Histocompatibilité)** de classe I. Une voie majeure utilisée par les mélanomes pour éviter l'élimination par les lymphocytes T cytotoxiques est celle de l'expression de régulateurs négatifs de leur activation, les molécules PD-L1 (**Programmed Death Ligand 1**) et PD-L2. L'inhibition de cette voie par des anticorps bloquants est l'une des principales stratégies d'**immunothérapies** contre le mélanome. Des cellules du microenvironnement tumoral comme les **CAF** ont également une action immunosuppressive par ce type de récepteurs immunorégulateurs ou par des cytokines.

De plus, les cellules de mélanome et les fibroblastes du microenvironnement favorisent le **recrutement** de **cellules immunosuppressives**, par exemple des **MDSC**. De manière intéressante, l'infiltration des cellules immunitaires dans le microenvironnement tumoral est associée à l'activation d'une voie de signalisation impliquée dans la prolifération et l'invasion des mélanomes et à la transition vers un phénotype invasif. A titre d'exemples, l'**hyperactivation de la voie β -caténine** est inversement associée à l'infiltration de lymphocytes T (*Spranger et al., 2015*) et la **dérégulation de MITF** est reliée à un phénotype pro-inflammatoire des cellules tumorales favorisant le recrutement de cellules myéloïdes immunosuppressives par des cytokines (*Riesenberg et al., 2015*).

Pourtant, le mélanome fait partie des cancers les plus immunogéniques, principalement du fait des rayons UV et de leur action hautement mutagénique, permettant de générer plus facilement des néo-antigènes tumoraux permettant l'activation initiale des lymphocytes T. C'est pour cette raison que les immunothérapies, qui lèvent les freins de la réponse immunitaire, sont efficaces (*Passarelli et al., 2017*).

- **Reprogrammation du métabolisme énergétique.**

Les cellules tumorales engagent une reprogrammation du métabolisme énergétique afin de soutenir une prolifération active même dans des conditions d'appauvrissement en dioxygène et en nutriments. Le phénomène le plus connu est l'**Effet Warburg**.

Le basculement énergétique vers la glycolyse et le métabolisme des acides aminés a été montré comme associé à certaines mutations (**BRAF, RAS, TP53**) mais aussi à la transition vers un phénotype invasif et à l'interaction avec les CAF et la matrice extracellulaire (Parmenter et al., 2014 ; Bertero et al., 2019).

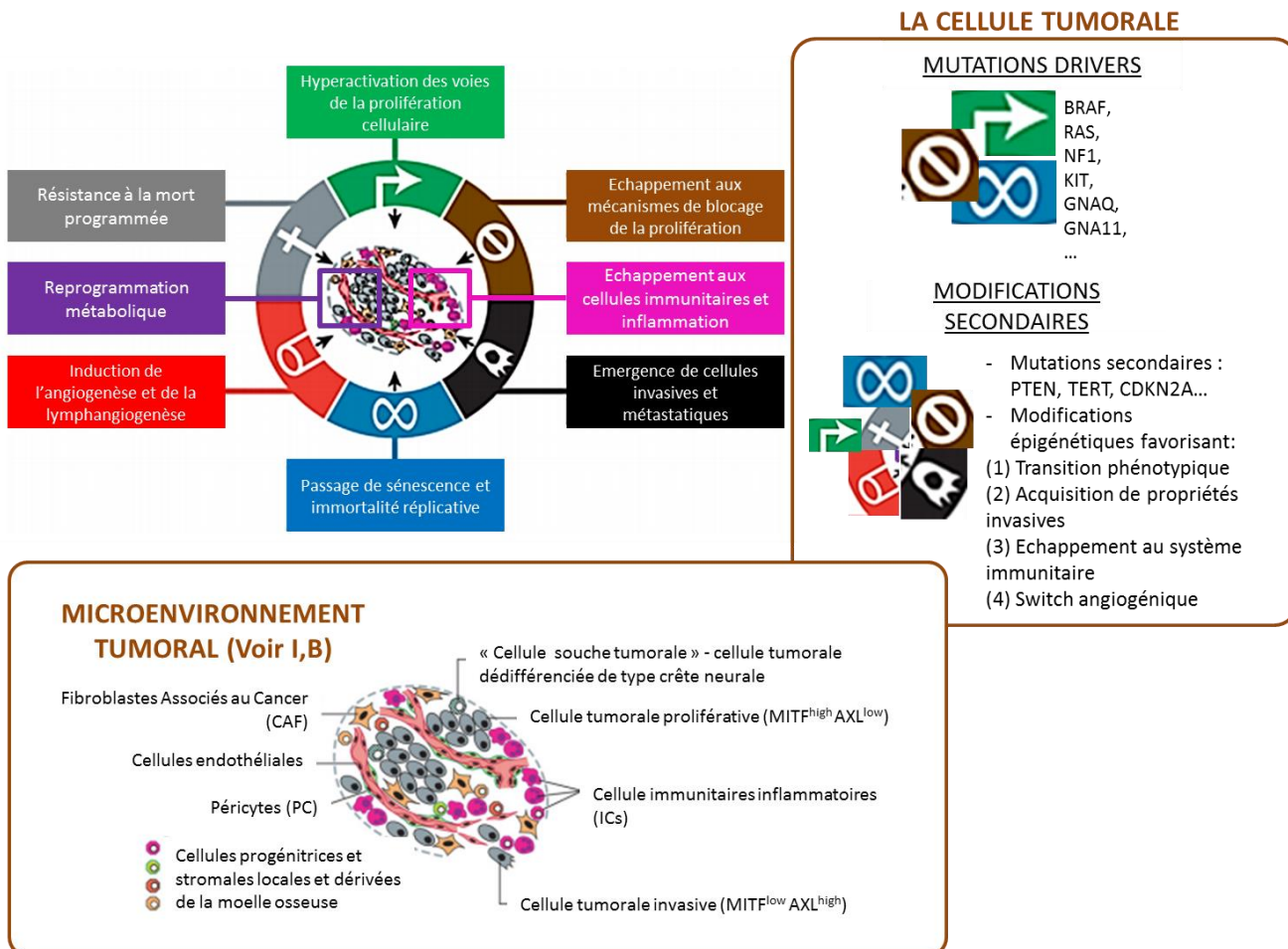


Figure 18 : Les hallmarks caractéristiques du mélanome, adaptés des hallmarks du cancer d'après Hanahan et Weinberg. Les cellules malignes du mélanome se caractérisent par l'acquisition progressive et séquentielle de propriétés les amenant à former une tumeur invasive et à former des métastases très agressives. L'acquisition de ces propriétés nécessite le concours du microenvironnement tumoral et engendre une hétérogénéité intratumorale rendant les traitements actuels inefficaces dans la plupart des cas.

b. La classification histologique et moléculaire du mélanome

L'acquisition de ces caractéristiques suit une séquence variable selon les mélanomes mais qui répond à un schéma général établi par Clark et al. en 1969, et aujourd'hui utilisé dans le diagnostic des stades de ce cancer. Ce schéma général amène du **mélanocyte** vers une **tumeur radiale (RGP – Radial Growth Phase)** localisée en surface dans l'épiderme, puis une **tumeur verticale invasive (VGP – Vertical Growth Phase)** pénétrant le derme. Il est traduit en diagnostic histologique par les **niveaux de Clark** et l'**indice de Breslow** qui rendent compte respectivement de l'**infiltration de la tumeur** et de son **épaisseur (Figure 19)**.

L'indice de Breslow est toujours utilisé pour donner une valeur pronostique à la progression du mélanome chez les patients (*Breslow, Ann Surg, 1970*). Il est aujourd'hui complété par une classification plus générale qui tient compte de la localisation et du nombre de métastases.

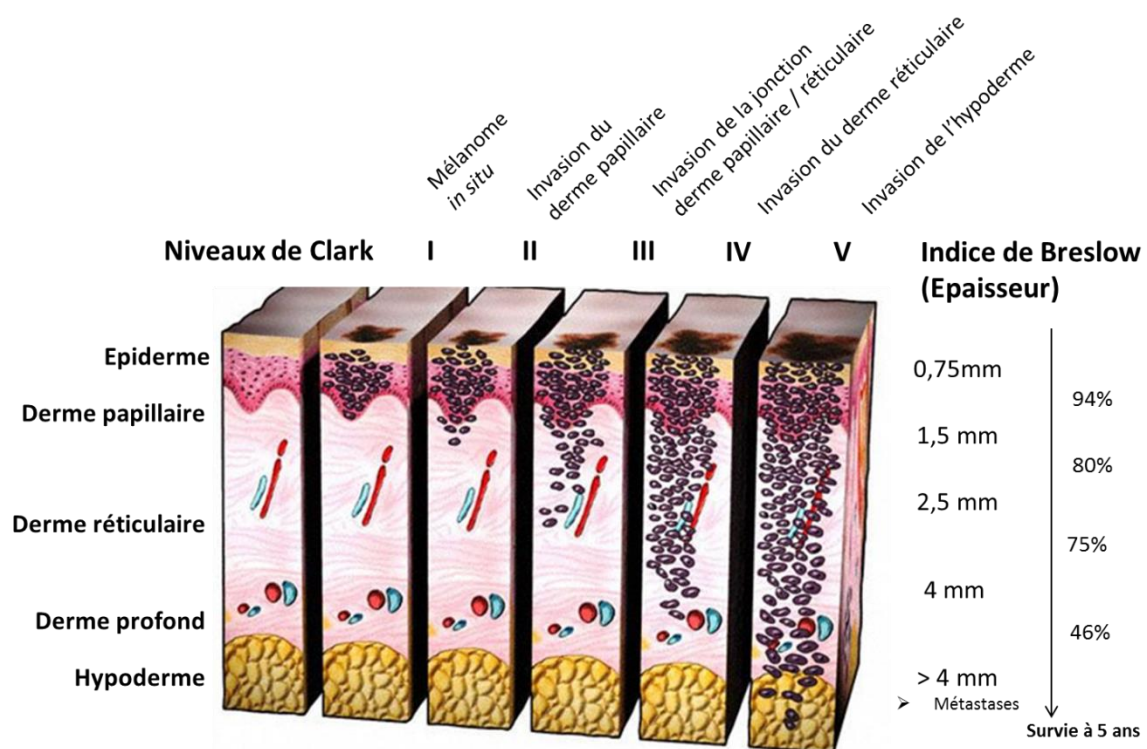


Figure 19 : La classification histologique du mélanome primaire.

Le diagnostic du mélanome se tourne également vers une médecine personnalisée, moléculaire, qui repose sur la **classification mutationnelle** des cellules tumorales, établie par le *Cancer Genome Atlas* à partir de tumeurs primaires et de métastases issues de 333 patients (*Abkani et al., 2015*) (**Figure 20**) :

- Les mélanomes mutés **BRAF (52%)**. La mutation la plus courante concerne la substitution de la valine 600 par l'acide glutamique (**BRAF^{V600E}**). Cette mutation représente à elle seule 35% de mélanomes.
- Les mélanomes mutés **NRAS (28%)**, dont 90% sont des mutations activatrices remplaçant la glutamine Q61 par une arginine (Q61R), de manière moins fréquente par une leucine (Q61L) et une histidine (Q61H).
- Les mélanomes mutés **NF1 (14%)**.
- Les mélanomes **Triple-WT (14,5%)** mais présentant un enrichissement en mutations sur **KIT** ou plus rarement sur **GNAQ (G Protein Subunit alpha Q)** et **GNA11**.

Dans ton schéma, met en toutes lettres BRAF inhibiteur et MEK inhibiteur. Tu dois plus détailler ta voie des MAPK dans les hallmarks pour qu'on comprenne



333 patients

Analyses d'échantillons sains ou de tumeurs primaires / métastatiques

Quatre sous-types mutationnels de mélanome

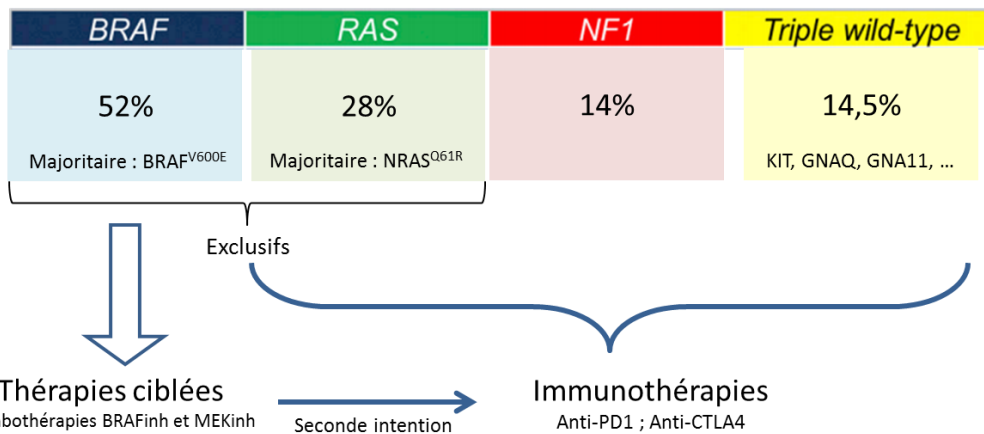


Figure 20 : La classification mutationnelle des mélanomes par le Cancer Genome Atlas (Abkani et al., 2015). Les mélanomes sont classés selon les mutations des gènes *BRAF*, *NRAS* et *NF1*, ou l'absence de mutation sur ces trois gènes (mélanomes triple WT avec des mutations drivers sur d'autres gènes). Ces mutations servent aujourd'hui d'élément décisionnel pour le choix des traitements du mélanome métastatique. Les patients dont la tumeur est mutée *BRAF* sont traités avec les thérapies ciblées en première ligne, puis avec les immunothérapies en cas de résistance ou de rechute. Les patients des trois autres sous-types sont dirigés vers les immunothérapies.

Parce qu'elles sont retrouvées dans la plupart des lésions mélanocytiques, ces mutations sont considérées comme étant les **mutations drivers** de la mélanomagenèse. Mais nous allons voir qu'elles ne sont pas suffisantes pour générer un mélanome. Les sous-parties suivantes exposent la progression du mélanome primaire et l'acquisition chronologique des hallmarks de ce cancer. Nous mettrons en correspondance la classification histologique de Clark, l'acquisition des mutations drivers et secondaires, et des hallmarks des cellules tumorales du mélanome.

c. L'initiation de la transformation du mélanocyte

La très grande majorité des mélanomes primaires est issue de **mélanocytes sains**. Cependant, dans **10% à 20%** des cas les mélanomes proviennent de lésions précurseurs, c'est-à-dire des **néoplasmes mélanocytiques** présentant localement un risque accru de progresser en mélanome.

La première de ces lésions est le **grain de beauté bénin**, ou **naevus**, qui se caractérise par la prolifération limitée de mélanocytes présentant souvent la mutation *BRAF*^{V600E}, mais qui est maintenu dans un état « quasi-sénescent ». Ainsi, les grains de beauté bénins **n'évoluent pas au cours du temps**, voire régressent après l'âge de 50 ans. Il existe en effet une balance

entre la **prolifération accrue**, la **mort cellulaire** due au stress oncogénique, et la **restriction de la croissance par le système immunitaire** infiltrant du grain de beauté. Cela est un bel exemple montrant qu'une seule mutation oncogénique ne peut aboutir à une lésion maligne.

Des lésions plus avancées se distinguent du naevus bénin par l'une de ces caractéristiques : **asymétrie (A)**, **bords irréguliers (B)**, **hétérogénéité de couleur (C)**, de **diamètre supérieur à 5mm (D)** et **évolution au cours du temps (E)**. Il s'agit de la règle ABCDE.

C'est le cas du **naevus dysplastique**. Ce type de lésion présente un risque supplémentaire de donner un mélanome, parfois surnommé « **néoplasme intermédiaire** », et doit être surveillé. Il répond parfois à trois des cinq règles ABCDE : **asymétrie (A)**, **bords irréguliers (B)** et **couleur hétérogène (C)**. Ils se différencient des naevi bénins par une première mutation driver de type **NRAS** ou **BRAF^{non-V600E}** et par d'autres mutations drivers notamment sur **TERT** ou son promoteur et **CDKN2A**, induisant un phénotype plus résistant à la sénescence. Mais la progression de ce type de lésion est en principe contenue par le système immunitaire, en particulier l'**infiltrat lymphocytaire** du derme papillaire.

Pour donner un cancer, il faut donc que d'autres caractéristiques soient acquises, au niveau **mutationnel**, **épigénétique** et **micro-environnemental**. Une première chose doit être précisée : comme aperçu plus haut, la plupart des mutations sont **exclusives** les unes des autres (BRAF avec NRAS), et correspondent à une **classification moléculaire** du mélanome et des **origines anatomiques différentes (Figure 21)**.

On distingue ainsi les mélanomes **CSD (Chronically Sun-Damaged)** et **non-CSD**. Les mélanomes **CSD** se développent sur les peaux exposées régulièrement au soleil, à savoir la tête, la nuque et les parties dorsales des membres. Ils ont une signature mutationnelle de type **NRAS**, **NF1**, ou **BRAF^{non-V600E}** fortement associée aux rayons UV : dimères pyrimidine-cyclobutane et pyrimidine-pyrimidone résultant en des mutations de type CC-->TT ou (C/T)C->(C/T)T. Ils peuvent être associés dans la plupart des cas à l'évolution d'une lésion dysplastique. L'incidence de ce type de mélanome croît avec l'âge. Les mélanomes **non-CSD** ont généralement une signature mutationnelle de type **BRAF^{V600E}**, avec une signature UV intermédiaire. Ils peuvent être associés à l'évolution d'un naevus bénin. L'incidence du mélanome non-CSD atteint son maximum autour de l'âge de 50 ans. Ils se développent sur des parties moins exposées, le dos, le ventre, les bras et les jambes.

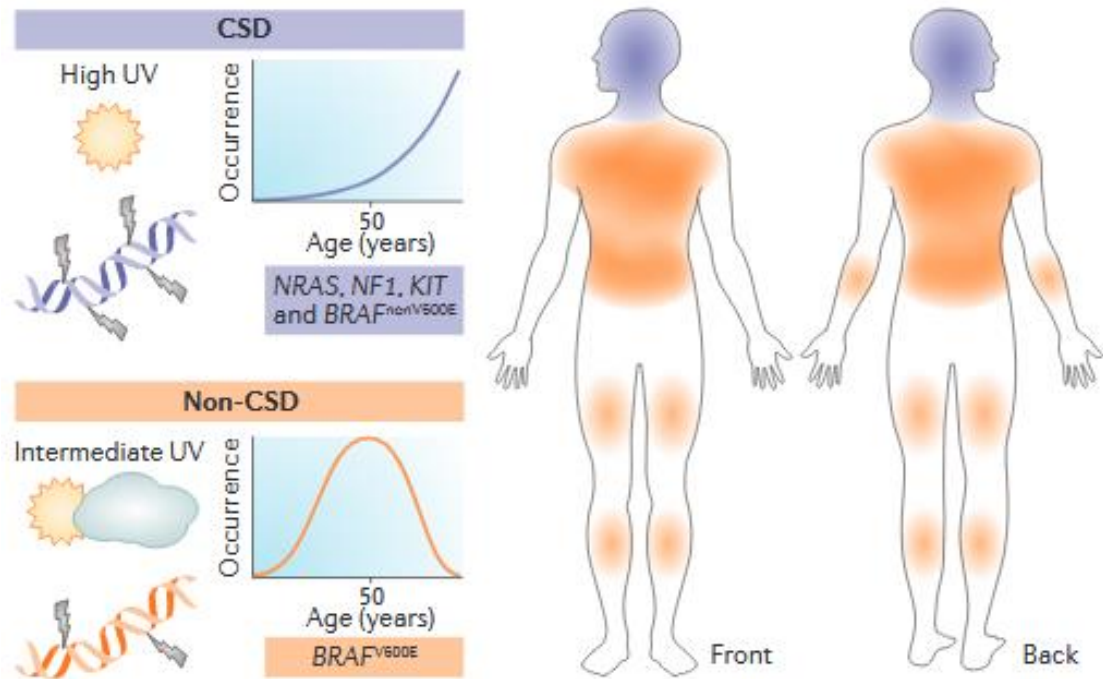


Figure 21 : Les mélanomes n’ont pas la même signature et la même évolution selon qu’ils soient associés à des dommages chroniques aux rayons UV (CSD) ou non (NON-CSD). D’après Shain et al., 2016. Les mélanomes CSD sont caractérisés par une signature $BRAF^{non-V600E}$, KIT, NF1 ou NRAS, et connaissent une incidence croissante avec l’âge. Les mélanomes NON-CSD sont caractérisés par la mutation $BRAF^{V600E}$, peuvent être associés à l’évolution d’un naevus bénin, et atteignent une incidence maximale autour de 50 ans.

L’initiation de la mélanomagenèse passe ainsi par l’acquisition d’une mutation activatrice sur l’un des principaux oncogènes décrits par le *Cancer Genome Atlas*, et codant pour un second messenger de la voie des MAPK, **BRAF**, ou certains des autres seconds messagers situés en amont de la voie : **NRAS**, **NF1**, **GNAQ** ou **GNA11**. Normalement active seulement en réponse à des facteurs de croissance se fixant sur des récepteurs à activité tyrosine kinase, tels que le PDGFR. L’activation du récepteur conduit à sa dimérisation et la transphosphorylation sur des motifs SH2, permettant l’ancrage de protéines adaptatrices qui vont permettre de rassembler des protéines de type GEF. Ces GEF activent N-RAS, une GTPase monomérique, en induisant le remplacement du GDP par le GTP. RAS étant ainsi activée, il induit une cascade de phosphorylation entre des sérine-thréonine kinases de la famille des MAPK. Ces enzymes phosphorylent leur substrat en tirant le groupe phosphate de l’ATP. La première est une MAPKKK, **BRAF**. BRAF phosphoryle une MAPKK, **MEK**. Enfin, MEK phosphoryle une MAPK, ERK1/2. ERK1/2 ainsi activée transloque dans le noyau et se retrouve compris dans un complexe régulateur de la transcription de gènes, notamment impliqués dans la prolifération cellulaire. La voie des MAPK est normalement maintenue inactive en absence de ligand activant le récepteur initial, car la GTPase RAS est inactivée par **NF1**, une protéine GAP qui permet le relargage du GTP. Les mutations citées précédemment rendent la **voie des MAPK constitutivement active**.

Cependant, comme ce qu'il se passe avec le naevus bénin, l'hyperactivation de la voie des MAPK conduit au phénomène de « **sénescence induite par les oncogènes** » et donc n'aboutit pas à une prolifération cellulaire effrénée. Certains mécanismes de contrôle du cycle cellulaire doivent d'abord être dépassés pour permettre la progression du mélanome.

d. La progression du mélanome in situ : Passage de sénescence et modifications secondaires

La première phase de progression du mélanome se traduit par la prolifération de cellules de mélanome localisée dans l'épiderme. C'est le mélanome *in situ*, appelé le stade histologique RGP dans la classification de Clark. Il existe en réalité deux modes de croissance de la tumeur *in situ*, selon que l'on considère les mélanomes CSD et les mélanomes non CSD. Les mélanomes non-CSD, mutés BRAF^{V600E}, ont une **croissance pagetoïde**, c'est-à-dire que les mélanocytes prolifèrent seuls ou regroupés dans **toutes les couches de l'épiderme**. A l'inverse, la prolifération des mélanocytes uniquement dans la **couche basale**, appelée **croissance lentigineuse**, est une caractéristique des mélanomes CSD, forme de croissance également retrouvée dans les mélanomes des muqueuses.

Le développement du mélanome *in situ* repose essentiellement sur l'acquisition de mutations secondaires pour outrepasser la sénescence induite par les oncogènes. C'est ce que l'on appelle le **passage de sénescence**. De manière analogue avec le naevus dysplasique, les gènes les plus fréquemment mutés dans le mélanome *in situ* contrôlent les checkpoints du cycle cellulaire (**CDKN2A**) et la longueur des télomères (**TERT**). Mais on retrouve aussi des gènes impliqués dans la stabilité du génome (**TP53**), la signalisation induisant la prolifération et la survie cellulaire (**PI3K, AKT, PTEN**) et la différenciation et l'adhésion cellulaire des mélanocytes (**MITF, WNT, β-caténine**).

Ainsi, la mutation oncogénique BRAF^{V600E} induit un phénotype sénescence par l'expression de **p16^{INK4A}** et l'activation du checkpoint dépendant de la Cycline D et de CDK4, **empêchant l'entrée en phase S**. Des mutations sur le gène **CDKN2A** sont d'ailleurs caractéristiques des mélanomes familiaux. Et de manière intéressante, les mutations sur le gène TP53 sont à ce stade du mélanome relativement rare par rapport à d'autres cancers. Une explication souvent avancée dans la littérature est la mutation de **p14^{ARF}**, l'autre protéine codée par le locus CDKN2A, dont la fonction normale est de prévenir la dégradation de p53 par le protéasome en séquestrant l'ubiquitine ligase **MDM2 (Mouse Double Minute 2)**. Cette dégradation rétablie, la mutation de p14^{ARF} favorise le passage de sénescence sans que l'inactivation de p53 ne soit nécessaire (**Figure 22**).

Toujours de manière analogue au naevus dysplasique, des mutations du **promoteur** ou de la partie codante de **TERT** sont parmi les événements mutationnels secondaires du mélanome les plus précoces, souvent induits par les rayons UV. Cela permet de régénérer les extrémités

des télomères et éviter le phénomène de sénescence liée au raccourcissement des chromosomes en-deçà d'une certaine longueur, et donc au-delà d'un certain nombre de divisions cellulaires, la **limite de Hayflick**. C'est cette capacité qui est caractéristique de « **l'immortalisation** » des cellules tumorales.

Cependant, et à la différence du naevus dysplasique, d'autres mutations secondaires ou tertiaires, et des événements épigénétiques, peuvent survenir pendant la phase RGP du mélanome, préparant son devenir invasif.

Il s'agit d'abord de la perte de **PTEN** (*Phosphatase and tensin homolog*), intervenant dans la voie PI3K-AKT-mTOR. Les PI3K dites de classe I sont activées via les protéines RAS de la voie des MAPK, mais surtout par certains récepteurs à activité tyrosine kinase en réponse à des facteurs de croissance et / ou des signaux de survie. Elles catalysent la conversion du lipide membranaire **PIP2** (*Phosphatidyl-inositol(4,5)biphosphate*) en **PIP3** (*Phosphatidyl-inositol(3,4,5)triphosphate*). Le PIP3 sert d'ancrage membranaire à la kinase PDK1 qui active les sérines-thréonines kinases AKT, dont l'activation complète est permise par une autre phosphorylation par le complexe mTORC2. Les kinases AKT régulent un grand nombre de fonctions favorisant la **survie cellulaire** (apoptose, métabolisme, cycle cellulaire, synthèse protéique). La protéine PTEN intervient normalement dans la **reconversion du PIP3 en PIP2**, c'est donc un régulateur négatif de l'activation des kinases AKT. La perte de PTEN conduit au maintien de l'activité des protéines AKT même en l'absence de signaux de survie. Des résultats obtenus sur un modèle murin (*Tyr::creER; Bra^f^{Ca/+}; PTEN^{lox/Lox}*) dont les mélanocytes seuls expriment BRAF^{V600E} et sont déplétés de PTEN montrent que la coopération de la mutation driver BRAF^{V600E} et la perte de PTEN est suffisante pour générer un mélanome métastatique (*Dankort et al., 2009*), parce que les effets d'une activation de la voie AKT vont au-delà du simple passage de sénescence, et favorisent le phénotype invasif et métastatique des cellules tumorales. C'est notamment par l'activation de la voie AKT-mTOR que la reprogrammation métabolique des cellules tumorales est induite (*Figure 22*).

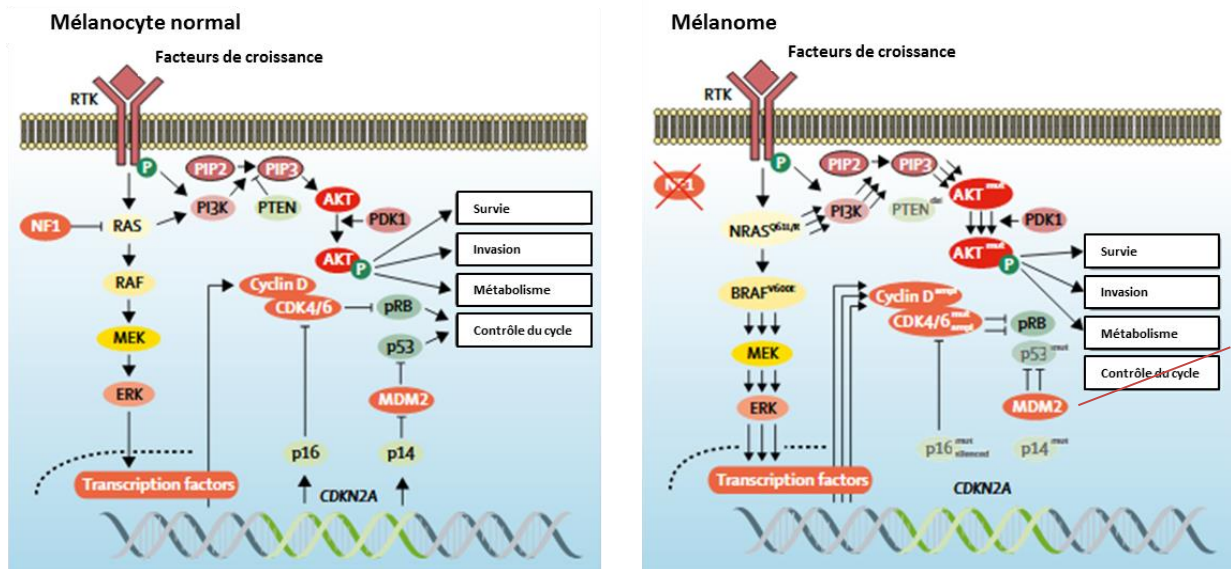


Figure 22 : L'hyperactivation des voies oncogéniques des MAPK, PI3K-PTEN-AKT et l'inhibition de la voie CDKN2A-P53 engendre la prolifération anarchique des cellules tumorales et le passage de sénescence. D'après Schadendorf et al., 2018. A gauche. Dans les mélanocytes, la prolifération est induite par les facteurs de croissance, et modulée par des régulateurs négatifs de la voie des MAPK comme NF1, de la voie PI3K-AKT comme PTEN, et du passage en phase S par les protéines codées par le gène CDKN2A. A droite. Dans le mélanome, des mutations invalidantes ont lieu sur NF1, PTEN, P16, P14, la cycline D et CDK4, et des mutations rendent constitutivement actifs BRAF ou NRAS.

La voie **Wnt-β-caténine** est une voie impliquée dans la différenciation, l'adhésion et la prolifération des mélanocytes. Seulement 3% des mélanomes sont mutés sur la β-caténine, mais les voies de signalisation qui en sont dépendantes sont reliées aux voies des MAPK et PI3K-AKT-mTOR, ainsi qu'au facteur de transcription de différenciation mélanocytaire MITF. La β-caténine est normalement associée à l'**E-Cadhérine** ou au complexe protéique composée des protéines Axin, GSK3, CK1α et APC, phosphorylée et dégradée par le protéasome. La fixation du ligand Wnt sur son récepteur induit l'inhibition de GSK3, et l'accumulation de la β-caténine dans le cytoplasme. La β-caténine ainsi libérée transloque dans le noyau et induit l'expression de gènes impliqués dans la **prolifération** (C-Myc, Cyclin D1) et la **différenciation mélanocytaire** (MITF, ZEB1). Or, l'activation des MAPK et des PI3K inhibe la kinase GSK3, et libère la β-caténine, favorisant là encore un phénotype prolifératif au début de la progression du mélanome. De plus, le facteur de transcription MITF favorise la **survie cellulaire** en induisant l'expression de protéines anti-apoptotiques, comme BCL-2. Enfin, l'activation de la voie β-caténine participe, conjointement à la voie mTOR, à la reprogrammation métabolique du mélanome, via des modifications transcriptionnelles induites par HIF-1α qui favorisent la prolifération cellulaire même en condition d'hypoxie.

L'ensemble des voies décrites ici aboutissent au maintien de la prolifération cellulaire malgré la sénescence induite par les oncogènes. Ils reposent grandement sur des mutations, et l'activation subséquente de voies de signalisation impliqués dans la survie cellulaire, mais aussi sur des modifications du **programme transcriptionnel** de la cellule tumorale. Cette

reprogrammation aboutit à des changements dans le métabolisme cellulaire, et ouvre la voie à un processus de dédifférenciation des cellules tumorales qui deviennent invasives.

e. La transition vers un profil invasif : Hétérogénéité et plasticité phénotypiques

L'étape suivante de la progression du cancer est le mélanome invasif, caractérisé dans la classification de Clark par le stade histologique VGP. Certaines cellules tumorales deviennent invasives, traversent la lame basale, et pénètrent le derme. Elles sont alors en contact avec les fibres de la matrice extracellulaire, les fibroblastes dermiques et les vaisseaux sanguins et lymphatiques.

Cependant, toutes les cellules de la tumeur radiale ne vont pas engager ce processus. Il y a en effet une **hétérogénéité intratumorale**, de nature **transcriptionnelle** et **phénotypique**, qui fait de la tumeur un patchwork de cellules aux propriétés prolifératives, intermédiaires et invasives. Cette capacité de faire une transition progressive d'un phénotype à l'autre est appelée **transition phénotypique** et est caractéristique de la **plasticité du mélanome**, à tous les stades de son développement : on la retrouve non seulement dans la tumeur primaire, mais elle est aussi nécessaire à l'installation des cellules tumorales dans le tissu métastatique (*Kim et al., 2017*), et fait partie intégrante de la problématique de résistance aux thérapies ciblées actuelles (*Tirosh et al., 2016 ; Tsoi et al., 2018 ; Rambow et al., 2018*).

La mise en évidence de l'hétérogénéité intra-tumorale

L'hétérogénéité des cellules tumorales est d'abord observée pour des lignées tumorales *in vitro*, avec une dichotomie entre des cellules aux propriétés prolifératives et des cellules aux propriétés invasives, indépendamment de la mutation BRAF ou NRAS. Cette dichotomie s'accompagne de signatures transcriptionnelles différentes. Une signature transcriptionnelle de type **Wnt/β-caténine** gouverne le profil prolifératif, tandis qu'une signature **TGFβ-SMAD** gouverne le profil invasif, avec la perte il manque la fin de ta phrase (*Hoek et al., 2006*). MITF et SOX10 sont deux master-régulateurs de l'état différencié des mélanocytes et sont caractéristiques du profil prolifératif, alors qu'ils sont perdus pour les cellules au profil invasif. Une étude de la même année rapporte que la β-caténine interagit avec **MITF** pour induire l'expression de ses gènes cibles (*Schepsky et al., 2006*), et l'activité de la β-caténine est fortement reliée au maintien des E-cadhérines qui sont rapidement perdues lors de la transition phénotypique (*Komiya et al., 2008 ; Haass et al., 2005*). L'analyse plus poussée du transcriptome de lignées de mélanome et de tumeurs primaires ou métastatiques de patients sur cellule unique (*single cell*) a permis de retrouver la dichotomie entre des cellules de profil différencié, avec l'expression de **MITF** et de ses gènes cibles comme **TYR**, **PMEL** et **MLANA**, et des cellules au profil dédifférencié, n'exprimant pas MITF, mais exprimant les récepteurs **AXL** et **NGFR**, ce dernier étant caractéristique du lignage neural (*Tirosh et al., 2016*). Ensemble, ces études mettent en évidence une bipartition intratumorale entre les

cellules prolifératives différenciées MITF^{high} AXL^{low} et les cellules invasives différenciées AXL^{high} MITF^{low}.

Ainsi, la plasticité phénotypique du mélanome serait le fait de facteurs intrinsèques liés à l'activation ou l'inhibition de certaines voies de signalisation de la différenciation mélanocytaire, mais surtout à des facteurs extrinsèques liés au microenvironnement. La signature transcriptionnelle et des sécrétomes des lignées invasives révèle l'expression de facteurs (TGFβ1, CTGF, Wnt5a) connus pour renforcer la voie TGFβ-SMAD et inhiber la signalisation β-caténine (Hoek *et al.*, 2006). Le TGFβ favorise l'activation des CAF, tandis que CTGF est une matrisprotéine commune des matrices des CAF myofibroblastiques. Or, les tumeurs riches en cellules AXL^{high} ont aussi une **forte abondance en CAF**, contrairement aux tumeurs riches en cellules MITF^{high}. L'analyse transcriptionnelle pour chaque type cellulaire montre que les CAF expriment des gènes associés à l'infiltration de lymphocytes T, et que ces lymphocytes T expriment des **co-récepteurs inhibiteurs** de la réponse T (PD1, TIM3). Ainsi, le profil invasif et dédifférencié est associé à un microenvironnement protumoral caractérisé par la présence de fibroblastes activés et d'une inflammation avec des lymphocytes T immunomodulés (Tirosh *et al.*, 2016).

L'hétérogénéité intratumorale est également modulée par les inhibiteurs de BRAF et de MEK, qui génèrent des cellules résistantes de profil différencié ou dédifférencié, plus variés que ce que les modèles prédisaient jusqu'alors. Quatre profils au moins sont caractérisés par une dédifférenciation progressive induite par les thérapies ciblées (Tsoi *et al.*, 2018). On passe d'un état différencié **mélanocytaire, prolifératif, sensible aux thérapies**, avec un profil transcriptionnel MITF^{high} SOX10^{high} SOX9^{low} SMAD3^{low} β-caténine^{high} vers un état **invasif, dédifférencié et résistant aux thérapies** avec un profil transcriptionnel MITF^{low} SOX10^{low} SOX9^{high} SMAD3^{high} β-caténine^{low} en passant par un état **transitoire différencié** MITF^{high} AXL^{low} (**perte de la β-caténine**, mais maintien de MITF et de SOX10) et par un état de type **crête neural** MITF^{low} AXL^{high} (NCSC: « *neural-crest like* »), en cours de dédifférenciation et avec une **signature AXL et TGFβ** (expression de SMAD3) partagée avec l'état complètement dédifférencié.

Une autre étude s'est concentrée sur l'analyse en single cell de tumeurs issues d'un modèle murin de xénogreffes dérivées de patients (PDX, *patient-derived xenograft*) (Rambow *et al.*, 2018). Ce modèle permet de reproduire *in vivo* la dynamique de la croissance tumorale sous traitement aux thérapies ciblées. Suite au traitement des souris avec la combinaison dabrafénib/tramétinib, les tumeurs régressent, deviennent invisibles puis une résistance s'installe parmi quelques cellules qui forment ce qui est appelé la **MRD**, pour *Minimal Residual Disease*, amenant la tumeur à recroître au bout de 50 jours en moyenne. Rambow *et al* montrent que des événements mutationnels secondaires (MEK1, NRAS, BRAF) mais surtout une adaptation phénotypique permet la MRD, mais selon un schéma différent de celui présenté jusqu'à présent. L'exposition aux inhibiteurs de BRAF et de MEK fait passer les cellules tumorales prolifératives MITF^{high} vers un état « **starvé** », peu prolifératif, mais

toujours différencié, exprimant par exemple les gènes cibles de MITF que sont SOX10 et PAX3 (*Paired Box Gene 3*). Ce n'est qu'ensuite que les cellules tumorales vont être déterminées, par des facteurs de l'environnement, vers un ensemble d'états **résistants aux thérapies** mais **non prolifératifs**, dont le premier type est paradoxalement **MITF^{high}** avec un **profil hyper-différencié**, ou vers deux autres états dédifférenciés, l'un caractéristique de l'**état invasif** et l'autre d'un **état NCSC**. Cet état NCSC est un état apparenté à l'état l'invasif, favorisé pendant l'exposition aux thérapies ciblées mais reste transitoire, c'est-à-dire réversible vers l'état prolifératif après l'arrêt de l'exposition.

Cette étude montre qu'il existe un système de **Rhéostat de MITF** induit par les thérapies ciblées, avec la génération d'une résistance dans la plupart des mélanomes, comme montré par *Tsoi et al., 2018*. Les thérapies ciblées induisent la dédifférenciation et la génération de cellules MITF^{low} AXL^{high} invasives, *mais aussi* avec la reformation d'une population différenciée mais non proliférative MITF^{high} elle aussi résistante (*Rambow et al., 2019*).

En conclusion, l'hétérogénéité intratumorale se caractérise par :

- La transition entre plusieurs profils transcriptionnels et phénotypiques favorisée par les thérapies actuelles (*Tsoi et al., 2018 ; Rambow et al., 2018*).
- Des mécanismes amenant à la diminution de la prolifération et l'acquisition de propriétés invasives, favorisés par un microenvironnement riche en CAF et/ou enflammé (*Tirosh et al., 2016*), microenvironnement favorisé par les thérapies (Voir **II,B**).
- Une plasticité entre ces différents états, permettant de revenir à des profils différenciés ou dédifférenciés à partir de profils transitoires (*Rambow et al., 2018*).

Les mécanismes de la plasticité phénotypique

L'étude de l'hétérogénéité intratumorale met en lumière les différents mécanismes à l'œuvre dans la plasticité phénotypique. Ils reposent sur l'interaction entre les cellules tumorales et leur microenvironnement et sur des modifications épigénétiques aboutissant à la reprogrammation transcriptionnelle et phénotypique d'une partie des cellules tumorales.

Jusqu'à il a encore quelques années, le paradigme pour expliquer le passage du phénotype prolifératif au phénotype invasif était la **transition épithélio-mésenchymateuse (EMT)**. Comme les mélanocytes n'ont pas une origine épithéliale et qu'ils ne partagent pas toutes les caractéristiques de cellules épithéliales, on parle plutôt de pseudo-EMT (**pEMT**). Nous l'avons déjà vu, le « switch cadhérine », c'est-à-dire la perte de la E-cadhérine au profit de la N-cadhérine, permet aux cellules tumorales de se détacher des cellules environnantes. Ce switch est en fait gouverné par des facteurs de transcription bien connus dans l'EMT comme **SNAIL, SLUG, ZEB1/2 et TWIST1**. L'activation de la voie des MAPK engendre la **dérégulation de SLUG et ZEB2** et l'**expression des facteurs ZEB1 et TWIST1**, résultant en la down-régulation de MITF (*Caramel et al., 2013*). SNAIL est aussi impliqué dans la diminution de

l'expression de marqueurs épithéliaux conduisant le mélanocyte à se séparer de ses autres attaches intercellulaires (claudines et occludines constituant les jonctions serrées) et à prendre une morphologie fibroblastique ; il conduit aussi à l'expression des métalloprotéinases nécessaires à l'invasion de la matrice dermique (*Paluncic et al., 2016*).

Cependant, ces mécanismes ne sont qu'une facette de la plasticité phénotypique. De manière intéressante, c'est vraiment l'ensemble du paysage épigénétique de la cellule tumorale qui est modifié. Ainsi, les zones de chromatine ouvertes des cellules au phénotype prolifératif sont les mêmes que pour les mélanocytes, alors que celles des cellules au phénotype invasif sont les mêmes que les fibroblastes du derme. On s'aperçoit que les master-régulateurs de cette reprogrammation épigénétique sont surtout les facteurs de transcription **SOX10/MITF** pour le profil prolifératif, et **AP-1/TEADs** pour le profil invasif (*Verfaillie et al., 2015*).

On comprend désormais que des facteurs solubles du microenvironnement, provenant des CAF ou des cellules immunitaires, tels que le **TGFβ** (*Hoek et al., 2006*), **WNT5A** (*Weeraratna et al., 2002*) et le **TNF** (*Landsberg et al., 2012*) sont capables d'induire le phénotype invasif. Mais pas seulement : il y a interaction des cellules tumorales avec les CAF et leur matrice extracellulaire, dont l'abondance, la réticulation et donc la rigidité est accrue. Les mélanomes sentent cette rigidité par la voie **YAP/TAZ**, des facteurs de transcription dont l'activation est gouvernée par l'appareil mécanosenseur de la cellule : intégrines et cytosquelette d'actine. Hors, si l'expression de MITF est maintenue par les cellules tumorales en présence seule de la matrice extracellulaire via l'association de YAP (**Yes Associated Protein**) avec PAX3, protéine codée par l'un des gènes cibles de MITF, la combinaison d'une matrice rigide avec l'exposition au TGFβ des fibroblastes permet l'association de YAP avec **TEAD**, et l'acquisition du phénotype invasif par l'action combinée des facteurs de transcription **YAP, TEAD** et **SMAD** via la dérégulation de MITF (*Miskolczi et al., 2018*).

L'exposition des cellules tumorales aux inhibiteurs de BRAF induit aussi dans les cellules tumorales une reprogrammation conduisant à un phénotype dédifférencié de type CAF. Les cellules résistantes mettent en effet en place une boucle autocrine durant laquelle elles acquièrent un phénotype mésenchymal myofibroblastique, remodelent leur propre matrice en une matrice plus rigide. Cela active et entretient les voies de mécanotransduction assurées par YAP et MRTF, et permet en retour de maintenir le remodelage de leur matrice. Cette boucle permet aux cellules résistantes de contrer les effets cytostatiques des inhibiteurs de BRAF (*Girard et al., 2020*).

D'autres facteurs du microenvironnement gouvernent la plasticité phénotypique. C'est le cas de l'**inflammation** : le TNF est produit par les neutrophiles, les lymphocytes T activés et les cellules myéloïdes. Cela engendre chez les mélanomes la **répression de MITF** et l'**expression de JUN**, qui est une sous-unité d'AP-1, et l'acquisition du phénotype invasif MITF^{low} AXL^{high} (*Riesenberg et al., 2015*). Certaines conditions métaboliques à l'intérieur du microenvironnement tumoral, en particulier l'**hypoxie** (*Cheli et al., 2012*) et la **déprivation**

en glucose ou en glutamine, sont aussi connues pour induire un phénotype invasif (*Figure 23*).

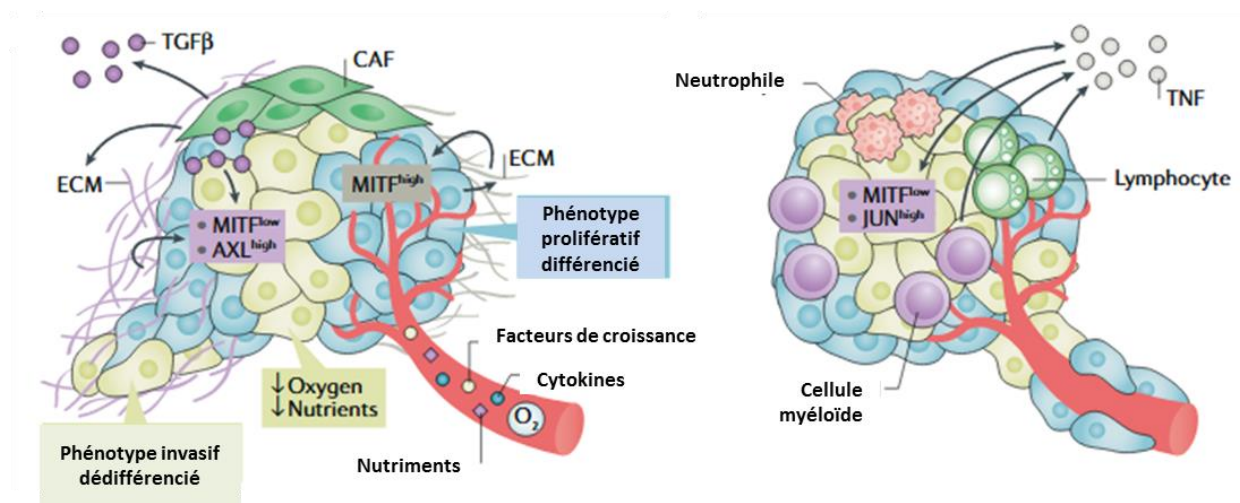


Figure 23 : La transition phénotypique est sous le contrôle de facteurs du microenvironnement. D'après Arozarena et al., 2019. *Gauche.* La transition d'un phénotype prolifératif différencié à un phénotype invasif dédifférencié est influencée par le TGFβ sécrété par les CAF, la rigidité et l'organisation de la matrice extracellulaire (ECM), ainsi que des cytokines, des facteurs de croissance, et l'appauvrissement en nutriments et en dioxygène. *Droite.* L'inflammation chronique du microenvironnement tumoral favorise aussi le passage vers un profil invasif via l'action du TNF qui induit un état MITF^{low} JUN^{high}.

Les mécanismes de la plasticité phénotypique sont ainsi de mieux en mieux compris, mais aussi la fonction de ce phénomène dans la progression du mélanome. La plasticité phénotypique participe à la **résistance aux thérapies**, mais c'est avant tout un mécanisme nécessaire à la **croissance tumorale** et à l'**établissement des métastases**. Le passage par un état transitoire dédifférencié de type crête neurale permet de réconcilier le concept de **plasticité phénotypique** et de **cellule souche cancéreuse**, l'existence de cette dernière étant controversée dans le mélanome (Arozarena et Wellbrock, 2019). La plasticité phénotypique permet de comprendre que la croissance tumorale du mélanome plutôt que d'être soutenue par quelques cellules au potentiel souche, le serait en fait par la transition de cellules prolifératives en cellules dédifférenciées, capables de devenir ensuite invasives ou bien de revenir vers un état différencié et prolifératif. Pour former des métastases, les cellules tumorales doivent ainsi passer par un état invasif MITF^{low} AP-1⁺, qui est plus résistant à l'anoïkis (Maurus et al., 2017), ce qui leur permet de rentrer et de survivre dans la circulation, en sortir et revenir à un état prolifératif et différencié pour s'établir dans un nouveau tissu. Il a en effet été montré dans un modèle de poisson-zèbre que l'initiation des métastases nécessite un retour vers le profil prolifératif et différencié médié par la protéine EDN3 (*Endothéline 3*) exprimée par le microenvironnement (Kim et al., 2012), qui avait déjà été impliquée dans la différenciation des mélanocytes depuis les progéniteurs de la crête neurale pendant le développement embryonnaire (Baynash et al., 1994).

Les mécanismes de la plasticité phénotypique reposent donc :

- Sur une transition de type épithélio-mésenchymateuse médiée par les facteurs de transcription SNAIL, ZEB1 et TWIST1 mais aussi par l'induction des voies de mécanotransduction aboutissant à l'activation de YAP-TEAD, du TGF β -SMAD et JUN et AP-1
- Sur la reconnaissance de ligands exprimés par un microenvironnement fibrotique et enflammé tels que le TGF β , EDN3, ou le TNF.
- Par d'autres modifications du microenvironnement engendrant un stress cellulaire, comme l'hypoxie, le manque de nutriments ou les thérapies.
- Sur une reprogrammation épigénétique et métabolique, favorisée par les facteurs cités précédemment, amenant à l'acquisition transitoire d'un profil invasif et/ou dédifférencié permettant le retour à un phénotype prolifératif et différencié pour initier les métastases.

La **figure 24** résume la succession des évènements qui conduisent du mélanocyte sain à la tumeur primaire. Cette séquence n'est pas absolue, elle dépend de la lésion précurseur (*Shain et Bastian, 2016*), et de modifications hétérogènes parmi les cellules tumorales induites par les mutations (*Paluncic et al., 2016*) et le microenvironnement (*Arozarena et Wellbrock, 2019*).

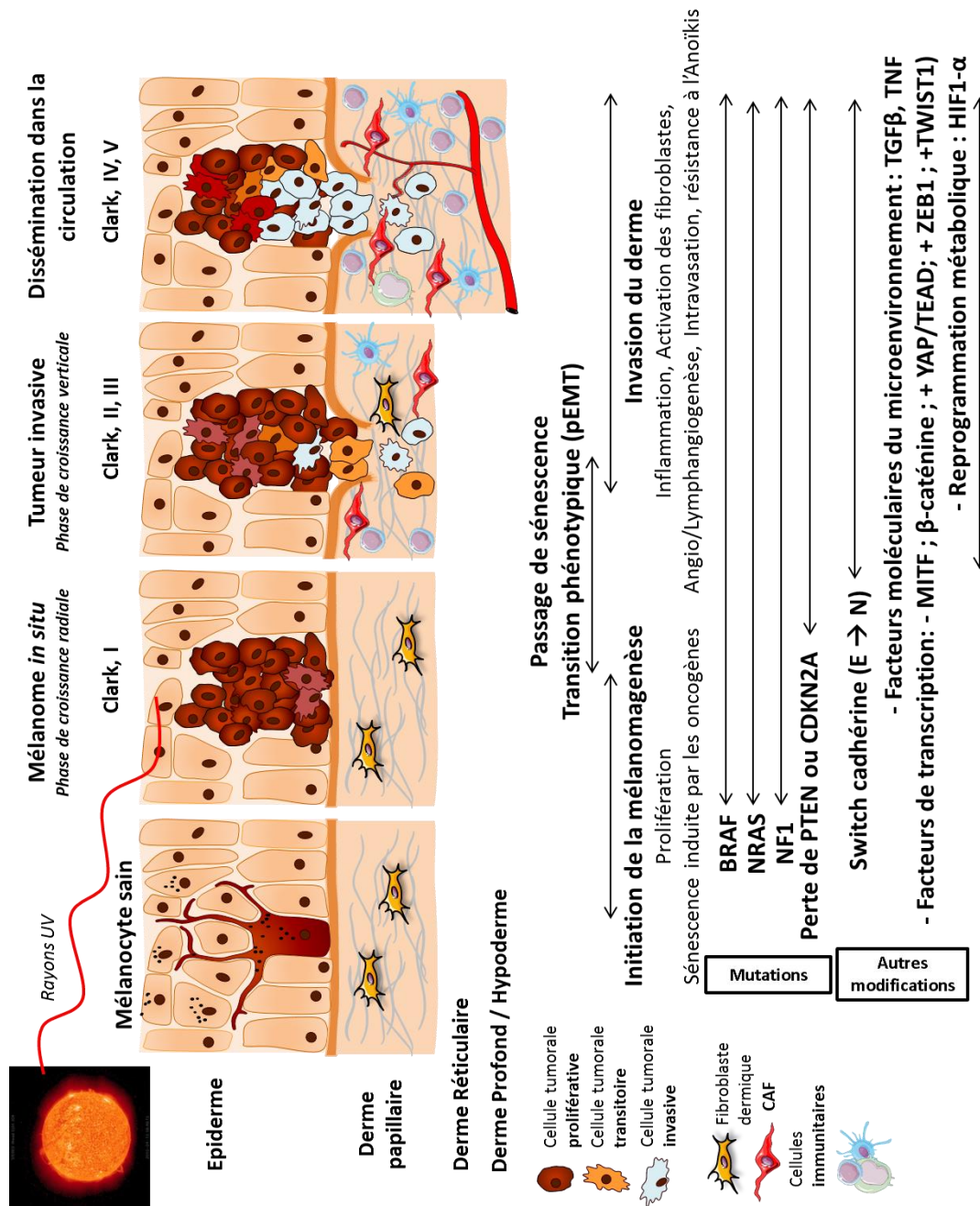


Figure 24 : La progression du mélanome primaire est dirigée par l'acquisition de mutations et de modifications épigénétiques contrôlées par le microenvironnement tumoral. Le mélanocyte sain peut acquérir des mutations via l'action d'agents mutagènes dont les principaux sont les rayons UV-A et UV-B, ou bien par des erreurs spontanées de réplication. Ces mutations affectent des oncogènes qui engendrent une prolifération accrue des mélanocytes dont la transformation maligne est complétée par le passage de sénescence grâce à des mutations secondaires. Il se forme alors un mélanome *in situ*, au sein duquel certaines cellules entament une transition vers un profil invasif sous l'action de facteurs du microenvironnement tumoral et de modifications épigénétiques. L'invasion du derme est accompagnée d'une inflammation, de l'activation des fibroblastes dermiques en CAF, de la formation de nouveaux vaisseaux sanguins et lymphatiques, de l'intravasation des cellules tumorales dans les vaisseaux et de la résistance de ces dernières à l'anoïkis, la mort cellulaire induite par la perte des attaches à l'ECM.

4. La dissémination du mélanome métastatique

a. Les voies de la progression métastatique du mélanome

Le mélanome peut former plusieurs types de métastases à partir de la tumeur primaire. On distingue d'abord les **métastases loco-régionales**, qui sont dites **satellites**, au sein de la peau dans le derme ou l'hypoderme ; **en transit**, dans les régions vascularisées entre le derme et les ganglions lymphatiques drainants ; et enfin **dans les ganglions** eux-mêmes (Adler *et al.*, 2016). On distingue ensuite les métastases dans les **tissus distants et vitaux**, le plus souvent le **foie**, les **os**, les **poumons** et le **système nerveux central**.

La localisation de ces métastases dépend du **drainage sanguin et lymphatique** entre la tumeur primaire et le tissu cible, et du **microenvironnement** du tissu cible.

La première étude de référence rapportant des données épidémiologiques précises quant au lieu et la fréquence des métastases date de 2002 (Meier *et al.*, 2002), portant sur trois mille patients ayant développé un mélanome primaire, dont 466 ont développé des métastases. Parmi eux, 21,7% ont d'abord développé des métastases satellites ou en transit, 50,2% dans les ganglions régionaux et enfin 28,7% directement dans les organes distants. La route suivie par les cellules tumorales depuis la tumeur primaire vers les métastases ne semble pas être la même selon les patients mais leur progression semble être de durée analogue quelque-soit la route suivie. Ainsi, si il faut entre 16 et 17 mois pour que des métastases loco-régionales se forment, il en faut 25 pour former des métastases distantes, que la progression se fasse via les ganglions ou non. La compréhension des premiers stades métastatiques est donc cruciale : dans cette étude, 57% des patients avec des métastases distantes sont décédés.

Le débat s'est longtemps porté sur trois modèles possibles de progression métastatique pour le mélanome (Adler *et al.*, 2016 ; Tejera-Vaquerizo *et al.*, 2007):

- Le **modèle de propagation par étapes**, pour lequel les métastases se répandent d'abord dans les ganglions puis dans les organes vitaux.
- Le **modèle de propagation simultanée**, où les métastases se répandent quelque-soit le patient à la fois par la circulation sanguine vers les organes distants, et via les ganglions lymphatiques (Pizarro, 2015).
- Le **modèle de propagation différenciée**, pour lequel la progression du mélanome suit des routes multiples et indépendantes, qui varient selon les patients. C'est aujourd'hui le modèle qui rend compte le mieux des résultats des études cliniques portant sur la lymphadénectomie.

Les ganglions lymphatiques sont pour au moins la moitié des cas le premier site métastatique du mélanome. Les ganglions drainants la tumeur primaire sont appelés les

ganglions sentinelles, dont la résection est la plupart du temps réalisée pour obtenir un pronostic sur l'évolution de la maladie. Plusieurs études ont porté sur l'intérêt pour la survie des patients de la résection du ganglion sentinelle ou du curage ganglionnaire complet (**CLND, Complete Lymph Node Dissection**) en cas de ganglion sentinelle positif. En accord avec les modèles de propagation simultanée ou différenciée qui suppose que le ganglion n'est pas l'unique chemin suivi par les métastases, l'étude MSLT-1 concluait que la résection des ganglions drainants ne conduisait pas à un avantage sur l'espérance de vie des patients, mais permettait le contrôle de la progression métastatique régionale (*Morton et al., 2014*). L'étude MSLT-2 confirme le contrôle de la progression métastatique régionale, prévenant l'aggravation de la maladie sur la période de l'essai clinique (*Faries et al., 2017*). La méta-analyse la plus récente conclut que si la résection des ganglions sentinelles n'améliore pas la survie des patients par rapport au groupe maintenu en observation, un avantage semble apporté sur la progression métastatique lorsque la résection se fait le plus rapidement possible après le diagnostic. Ces différentes études montrent que le contrôle de la progression métastatique par la voie lymphatique ne permet pas d'empêcher la formation de métastases distantes, mais permet de rallonger la période avant récurrence (*Disease-Free Survival*) si la résection des ganglions est effectuée dans les quelques mois suivant le diagnostic même si cette période reste à plus précisément déterminer (*Delgado et al., 2017*).

Les essais cliniques en matière de lymphadénectomie permettent ainsi de rendre compte de l'importance de la progression métastatique loco-régionale dans le devenir de la maladie. La lymphadénectomie et l'analyse des ganglions sentinelles permettent de donner un pronostic sur la survie des patients. L'invasion des ganglions sentinelles par les cellules tumorales est ainsi un marqueur indéniable de la progression métastatique. Ces travaux donnent enfin des indications sur les routes suivies par les métastases entre la tumeur primaire et les tumeurs distantes, et de plus récents tendent à montrer la complexité et la variété des chemins suivis.

Le système vasculaire est bien sûr indispensable à la migration des cellules tumorales entre les organes. Certaines cellules tumorales se propagent dans la circulation sanguine, et sont détectables chez des patients atteints de métastases régionales grâce à des marqueurs de **Cellules Tumorales Circulantes (CTC)** (*Reid et al., 2015*). D'autres cellules tumorales sont capables de migrer autour de l'endothélium des vaisseaux sanguins et lymphatiques, un mécanisme appelée **migration extravasculaire** (*Lugassy et al., 2007*).

Pour mieux comprendre l'ordre dans lequel les cellules tumorales se disséminent, une analyse de l'exome de cellules issues de tumeurs primaires et de métastases régionales ou distantes chez huit patients a permis de reconstituer l'arbre phylogénétique des cellules tumorales (*Sanborn et al., 2015*). Cette étude met en lumière le fait que des clones différents issus de la tumeur primaire peuvent former des métastases hétérogènes, de façon parallèle et non sérielle. On retrouve ainsi dans un même patient des clones ayant formé une métastase dans le cerveau et d'autres dans les ganglions, et des clones qui ont envahi les

deux organes. Les résultats de cette étude montrent toutefois que l'invasion loco-régionale des ganglions lymphatiques est un phénomène largement majoritaire, et que des cellules tumorales peuvent réaliser des **cycles de réinstallation** entre les différents sites métastatiques, via les ganglions qui servent de passerelles privilégiées entre le site primaire et les sites métastatiques.

Enfin, deux récentes publications ont éclairci le rôle des ganglions lymphatiques dans la dissémination métastatique chez la souris. Grâce à l'expression stable de sondes fluorescentes photoconvertibles dans des cellules tumorales (carcinomes et mélanomes), des cellules tumorales circulantes issues du ganglion lymphatique ont été détectées dans le sang (*Pereira et al.*, 2018). Cette étude démontre également que l'on retrouve des cellules tumorales dans les poumons, mais en plus faible nombre si on opère la résection des ganglions drainant la tumeur primaire auparavant. En accord avec les résultats de la seconde étude réalisée avec des cellules de carcinomes mammaires (*Brown et al.*, 2018), les cellules tumorales arrivent dans les ganglions lymphatiques par la région sous-capsulaire, pénètrent dans le cortex et envahissent les capillaires sanguins par lesquels elles se répandent vers les organes distants, mais ne passent pas par les vaisseaux lymphatiques efférents.

L'ensemble de ces études font de la voie « Vaisseaux lymphatiques → Ganglions Lymphatiques → Capillaires et circulation sanguine → Métastases distantes » une **voie de dissémination métastatique privilégiée** pour les carcinomes et le mélanome.

b. Les mécanismes cellulaires de la progression métastatique

La formation des métastases implique de nombreux processus cellulaires telle que la migration et l'invasion du derme, le passage dans ou autour des vaisseaux sanguins et lymphatiques, et la colonisation du site métastatique (*Pandya et al.*, 2016). Pour cela, plusieurs mécanismes coopèrent pour faciliter la migration tumorale. Ce sont ceux qui assurent la **motilité** des cellules tumorales, leur **invasion** de la **matrice extracellulaire**, la **résistance à l'anoïkis**, le **chimiostatisme**, l'**organotropisme**, l'**angiogenèse**, la **lymphangiogenèse**, l'**intravasation**, l'**extravasation** et l'**échappement au système immunitaire** (*Zbytek et al.*, 2008).

Le mouvement des cellules tumorales

Au niveau moléculaire, la migration met en jeu la transition épithélio-mésenchymateuse et la transition phénotypique, qui conduit à un phénotype cellulaire de type invasif. Les cellules invasives prennent des caractéristiques mésenchymateuses, disposent d'adhésions focales à intégrines, d'un appareil contractile basé sur le cytosquelette d'actine et de myosine et d'un appareil sécrétoire pour libérer des protéases. Il existe cependant plusieurs modes de migration adaptés au microenvironnement (collective, mésenchymale ou amiboïde).

Le mouvement amiboïde est bien décrit dans le mélanome. Au niveau moléculaire, il repose sur l'augmentation de la contractilité cellulaire grâce aux voies **RhoA/RhoC-ROCK1/2** et

l'activation de l'**ezrine** (Sahai et Marshall., 2003). Dans le mélanome, ce type de mouvement est favorisé par un environnement riche en cytokines tels que le **TGF β** et l'**IL6**, cette dernière activant la voie **JAK1-STAT3**, aboutissant à l'activation du cytosquelette d'actine par la voie RhoA-ROCK (Sanz-Moreno et al., 2011). En retour, la mise en place du mouvement amiboïde et en particulier l'activation de la voie ROCK-MLC2 induit la sécrétion de l'**IL1 α** et la voie **NF- κ B**, qui activent la sécrétion de **molécules immunomodulatrices** et le recrutement de **monocytes** et de **macrophages pro-tumoraux**, ces derniers favorisant l'**angiogenèse locale** (Georgouli et al., 2019). Ce mode de déplacement des cellules tumorales est ainsi relié à d'autres mécanismes favorisant la migration tumorale, que sont l'échappement au système immunitaire et l'angiogenèse.

Pour migrer, les cellules tumorales invasives sécrètent aussi de nombreuses enzymes capables de dégrader ou de remodeler la matrice extracellulaire. Ce sont essentiellement des protéases telles que les **métalloprotéinases (MMP)**, les protéases de la famille des **ADAMs**, ou les **cathepsines** (Frohlich et al., 2001) et d'autres **élastases** (Pocza et al., 2008). Le derme étant particulièrement riche en élastine, la protéolyse de ces fibres est essentielle pour l'invasion du tissu. D'un autre côté, les cellules tumorales sécrètent des enzymes de réticulation du collagène de la famille des **LOX**, dont il avait été primordialement montré dans le carcinome mammaire qu'elles permettaient la rigidification des fibres de collagène, et donc le renforcement des adhésions focales facilitant la migration (Levental et al., 2009).

Organotropisme et chimiotaxisme

La migration des cellules tumorales repose aussi sur des mécanismes qui favorisent l'invasion de certains environnements plutôt que d'autres. On appelle ce phénomène l'organotropisme, qui dépend notamment de caractéristiques intrinsèques à la cellule tumorale, que nous allons examiner maintenant, et de l'éducation pré-métastatique (**Voir Partie I,B**).

Les principales molécules qui gouvernent l'organotropisme des cellules tumorales sont les **sous-types d'intégrines** et les **récepteurs aux chimiokines** dont elles disposent.

Les intégrines sont constituées de deux sous-unités, une **sous-unité α** et une **sous-unité β** . Il existe 18 isoformes de la sous-unité α , et 8 isoformes de la sous-unité β , pouvant s'associer en 24 sous-types d'intégrines. Les **intégrines $\alpha_4\beta_1$** favorisent la migration des cellules tumorales vers les **ganglions lymphatiques** en permettant leur adhésion aux LECs par VCAM1 (Hieken et al., 1996 ; Klemke et al., 2007). Les **intégrines $\alpha_v\beta_3$** , qui lient notamment la vitronectine et la fibronectine, favorisent un tropisme **pulmonaire** et l'**angiogenèse** en induisant la sécrétion de VEGF (Hieken et al., 1999 ; Huang et al., 2018). Rappelons que les intégrines sont également responsables du tropisme des exosomes dans l'éducation pré-métastatique (Hoshino et al., 2015 ; Voir **Partie I,B**)

Les récepteurs aux chimiokines quant à eux sont des récepteurs à sept domaines transmembranaires couplés aux protéines G. Les récepteurs de la famille CXCR sont activés par les chimiokines de la famille CXC, et les récepteurs CCR sont activés par les chimiokines de la famille CC. Décrit pour le mélanome. Par exemple, l'expression du récepteur **CXCR4** (spécifique du sdf1) favorise l'invasion du foie. L'expression du récepteur **CCR7** reconnaissant la chimiokine **CCL21, sécrétée en abondance dans le ganglion lymphatique**, favorise plutôt un tropisme **lymphatique** (Takeuchi et al., 2004).

Les intégrines et les chimiokines ne sont cependant pas les seuls acteurs de l'organotropisme. L'**IL-6** et **IL-8** disposent d'un pouvoir chémoattractant permettant le recrutement des cellules tumorales circulantes dans des sites déjà métastasés (Kim et al., 2009).

C'est ainsi la capacité des cellules tumorales à adhérer à certains substrats grâce à des sous-types adaptés d'intégrines, des récepteurs les rendant sensibles à des gradients de certaines chimiokines sur les routes des métastases, et probablement l'action combinée d'autres gènes, qui leur permettent de migrer spécifiquement vers certains tissus plutôt que d'autres, et de s'y installer.

Le rôle des vaisseaux sanguins lymphatiques dans la progression métastatique

Les vaisseaux sanguins et lymphatiques forment des routes privilégiées entre les différents organes.

L'un des premiers phénomènes décrits permettant la progression métastatique est l'**angiogenèse tumorale**. Comme nous l'avons vu en **I,A,1,d**, elle est essentiellement médiée par des cytokines de la famille du VEGF reconnues par les récepteurs VEGFR sur les BEC. Certains isoformes peuvent toutefois être anti-angiogéniques. Or, dans le microenvironnement tumoral, un switch angiogénique s'opère. Il permet d'abord l'expression et la sécrétion d'isoformes pro-angiogéniques tels que **VEGF-A165** et **VEGF-A121** via l'épissage alternatif des ARNm du gène VEGF (Pritchard-Jones et al., 2007). Cependant, d'autres cytokines rentrent en jeu, notamment le **FGF** libéré de la matrice extracellulaire par l'action des MMP (Vacca et al., 2000). Des chimiokines peuvent avoir également des propriétés angiogéniques ou angiostatiques. Dans le mélanome, certains récepteurs de chimiokines angiogéniques tels que CXCR2, CXCR3 ou CXCR7 sont surexprimés par les cellules endothéliales sous l'action de cytokines ou de l'hypoxie (Schutysse et al., 2007).

De manière analogue à l'angiogenèse, les cellules tumorales et le microenvironnement tumoral facilitent la lymphangiogenèse tumorale. La lymphangiogenèse, et en particulier l'immunomarquage du récepteur **VEGFR-3 dans la tumeur primaire**, est depuis une quinzaine d'années devenu un marqueur privilégié permettant de prédire l'invasion des ganglions lymphatiques (Clarjjs et al., 2002 ; Dadras et al., 2005). Ce mécanisme de progression semble être privilégié au début du processus métastatique du fait de la plus

faible épaisseur de l'endothélium. Comme pour la lymphangiogenèse physiologique, c'est le facteur **VEGF-C** qui est majeur dans l'induction de la prolifération et de la migration des LEC, et sert également de marqueur de progression métastatique lorsqu'il est détecté dans le sérum (*Vihinen et al., 2007*). Mais plusieurs études démontrent que le **VEGF-A** interagissant avec le récepteur **VEGFR-2** peut également induire la lymphangiogenèse tumorale, notamment la lymphangiogenèse dans les ganglions lymphatiques à un stade pré-métastatique (*Hirakawa et al., 2005*).

Comme évoqué plus haut, la migration peut se faire autour des vaisseaux sanguins. C'est ce que l'on appelle la migration extravasculaire ou angiotropisme (*Barnhill et al., 2004 ; Lugassy et al., 2007*). Mais c'est la circulation à l'intérieur des vaisseaux sanguins et lymphatiques qui est la plus documentée. Cette dernière suppose de faciliter le passage des cellules tumorales entre les cellules endothéliales, l'entrée étant appelée **intravasation** et la sortie **extravasation**. Il faut pour cela augmenter la **perméabilité** de l'endothélium. L'adhésion entre les cellules endothéliales est en grande partie médiée par des jonctions d'ancrage telles que celles assurées par les cadhérines comme la **VE-Cadhérine** et les immunoglobulines telles que **VCAM1**. Ces jonctions sont renforcées par le cytosquelette d'actine et sont par conséquent très dépendantes de la contractilité des cellules endothéliales. Nous avons ainsi décrit que la glycoprotéine **SPARC**, sécrété par les mélanomes invasifs, augmente la perméabilité vasculaire en augmentant la contractilité des cellules endothéliales et facilite les métastases pulmonaires chez la souris (*Tichet et al., 2015*).

La migration trans-endothéliale des cellules tumorales est ainsi assurée par l'**affaiblissement des jonctions intercellulaires** entre les cellules endothéliales. Elle est également permise par la **sécrétion de métalloprotéinases** (MMP-1,2,9,14) et de **laminine** par les cellules tumorales pour traverser la matrice extracellulaire qui entoure les vaisseaux sanguins et pour faciliter la prolifération et la migration des cellules endothéliales elles-mêmes (*Seftor et al., 2001*). De plus, les **intégrines** favorisant les métastases lymphatiques et pulmonaires citées précédemment ($\alpha_4\beta_1$ et $\alpha_v\beta_3$) permettent aux cellules tumorales d'adhérer aux cellules endothéliales, en interagissant avec les récepteurs VCAM1 et L1CAM (*Klemke et al., 2007*).

Au cours de la migration à l'intérieur du vaisseau, l'interaction des cellules tumorales avec **les cellules endothéliales, les plaquettes et certaines cellules immunitaires** leur permet de limiter le stress dû aux **forces de cisaillement** dans la circulation, et participe à la **résistance à l'Anoïkis**. Alors qu'une thrombocytopenie (diminution de la quantité de plaquettes dans le sang) est associée à moins de métastases dans beaucoup de cancers, dont le mélanome, l'hypothèse d'une interaction entre cellules tumorales et plaquettes a été proposée très tôt (*Gasic et al., 1973*). Plus tard, plusieurs études démontrent que les cellules tumorales activent effectivement les plaquettes dans la circulation, et que cette interaction repose sur l'échange de biomolécules (*Keller et Plantel, 2019*) telles que des protéines et des ARNm (**activation et éducation des plaquettes**) et sur l'adhésion intercellulaire grâce à la **Sélectine**

P (Kim et al., 1998). Dans le sang, la sélectine P permet aussi l'interaction avec les monocytes, et l'amélioration progressive des techniques d'imagerie permet de comprendre que les cellules tumorales forment en fait des complexes cellulaires leur permettant de ne pas être reconnues par les cellules immunitaires (Borsig et al., 2001). A cela s'ajoute encore des observations sur deux autres modes d'association des cellules tumorales à d'autres types cellulaires dans le sang. Les mélanomes peuvent aussi interagir avec les neutrophiles, ce qui améliore leur adhésion et leur déplacement sur les cellules endothéliales, ainsi que leur extravasation (Liang et al., 2008). Ici, la migration du complexe cellulaire est permise par la **sélectine E** des cellules endothéliales qui permet d'abord l'adhésion de faible énergie à l'endothélium. Puis c'est l'interaction entre l'immunoglobuline **ICAM** sur les cellules endothéliales et l'**intégrine $\beta 2$** des neutrophiles qui entre en jeu. Un autre mécanisme est la fusion cellulaire entre certaines cellules tumorales et macrophages. Longtemps supposée, observée *in vitro* sans être démontrée comme étant physiologiquement relevante, une récente étude démontre la détectabilité de ces hybrides cellulaires dans la circulation sanguine chez l'homme. Elle démontre également chez la souris, que ces hybrides peuvent se diviser et donner des clones gardant des propriétés **invasives** et **chimiotactiques propres aux macrophages**, notamment grâce à l'expression du récepteur **CSF1R**. Ils participent à l'hétérogénéité intratumorale (Gast et al., 2018). Là encore, ce mécanisme peut aussi être un moyen pour les cellules tumorales d'éviter la mort par Anoïkis et de se camoufler des cellules immunitaires.

L'exposé de ces différents mécanismes de migration met en lumière leur coopération pour soutenir la formation de métastases lymphatiques et distantes selon des routes multiples. La complexité de ces mécanismes, le fait que les cellules tumorales peuvent transiter d'un mode de migration à l'autre, interagir avec d'autres types cellulaires, participe à l'**hétérogénéité intratumorale** et à l'**hétérogénéité inter-métastatique**, ce qui rend difficile le ciblage du processus métastatique. Aujourd'hui, ces mécanismes sont cependant de mieux en mieux compris et mettent en lumière l'importance des premiers stades de la progression des métastases. La **figure 25** résume les routes suivies par le mélanome métastatique, depuis la tumeur primaire jusqu'aux tissus cibles et rappelle les mécanismes mis en jeu pour l'établissement de propriétés invasives (transition phénotypique), l'invasion du tissu primaire et de la circulation, le transit dans les ganglions régionaux ou la sécrétion de facteurs dans la circulation qui permettent l'éducation pré-métastatique des tissus cibles.

*

* *

Je termine ici la présentation de la progression du mélanome, du mélanocyte aux métastases. Cette présentation s'est concentrée sur la biologie des cellules tumorales, les modifications qu'elles subissent et les interactions qu'elles établissent avec leur environnement. Nous allons à présent voir comment les connaissances accumulées à ce sujet ont permis de réadapter la prise en charge médicale du mélanome, devenue personnalisée.

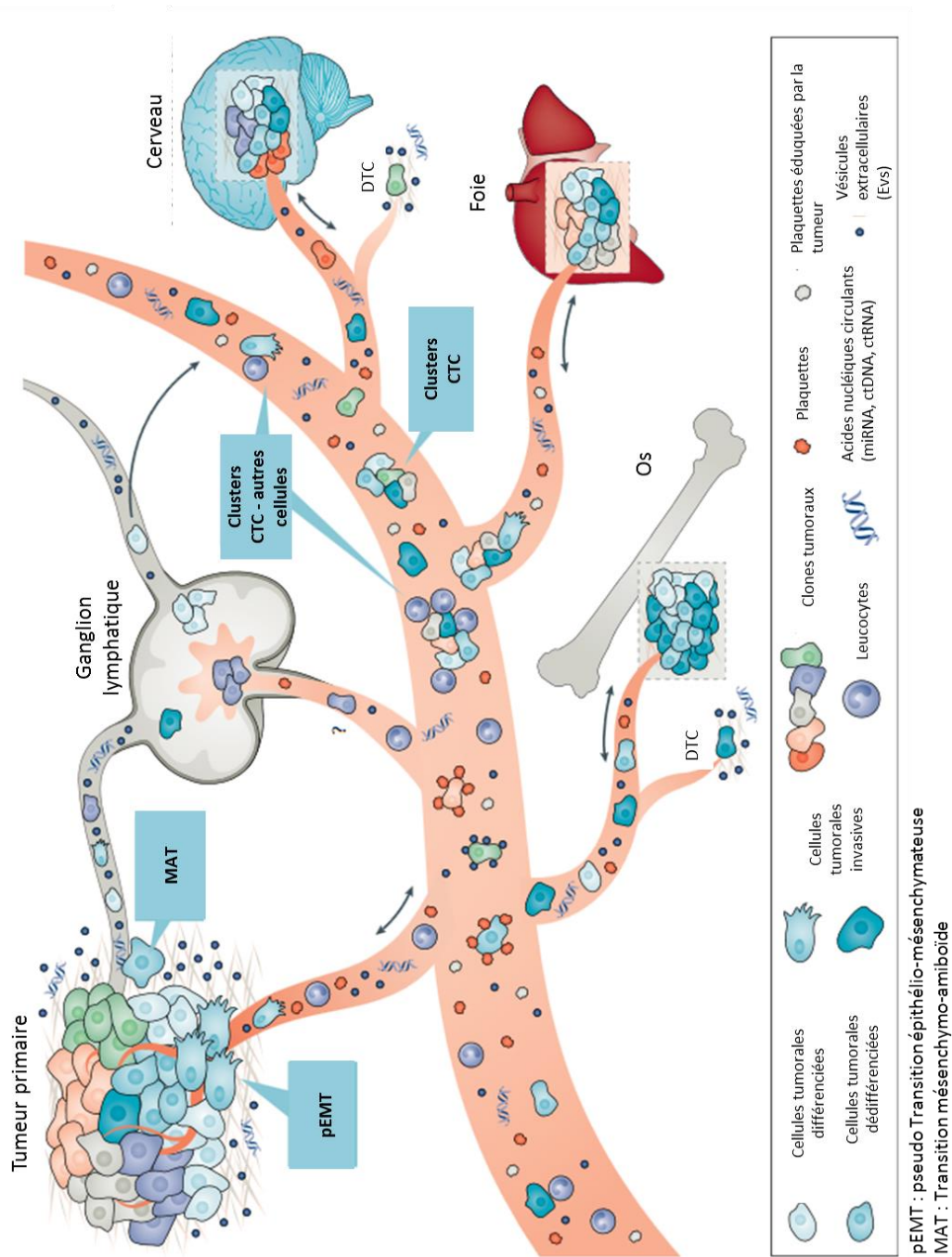


Figure 25 : Les routes et processus métastatiques du mélanome. D'après Keller et Pantel, 2019. Les cellules tumorales de la tumeur primaire engagent une transition phénotypique vers un profil mésenchymateux et invasif, puis la plupart réalisent une autre transition vers une motilité de type amiboïde. Le cytosquelette, les métalloprotéinases, les récepteurs aux chimiokines et les intégrines jouent un rôle essentiel dans la progression des cellules tumorales dans le tissu primaire, leur intravasation dans les vaisseaux sanguins et lymphatiques et leur installation dans les ganglions lymphatiques et/ou les organes distants. Les cellules tumorales sécrètent et répondent à des facteurs solubles ou des vésicules extracellulaires pour modifier l'environnement dans lequel elles se situent. Dans la circulation, elles s'associent en complexes cellulaires avec les plaquettes et certaines cellules immunitaires. CTC : cellules tumorales circulantes. DTC : cellules tumorales dormantes.

B. La prise en charge médicale du mélanome

Le mélanome cutané est un cancer qui est traité efficacement s'il est diagnostiqué précocement à un stade localisé, avant que la tumeur ne devienne invasive. Nous allons faire le point sur la stadification actuelle de la maladie et les stratégies thérapeutiques employées à chacun de ces stades. Nous verrons s'il est possible de prévenir la progression métastatique en s'intéressant aux premiers stades métastatiques, dans le ganglion lymphatique notamment. Pour les stades tardifs, avec des métastases généralisées, les traitements actuels restent inefficaces pour environ un patient sur deux, bien que la recherche et la clinique aient fait des progrès considérables depuis une vingtaine d'années. Une médecine personnalisée est apparue avec l'émergence des thérapies ciblées et des immunothérapies, améliorant l'efficacité du traitement ainsi que l'impact des effets secondaires par rapport à la chimiothérapie classique. Les patients traités de cette manière sont toutefois sujets pour plus de la moitié d'entre eux à des résistances et des rechutes.

*

* *

1) Le diagnostic du mélanome

Le diagnostic précoce du mélanome est réalisé par le repérage de lésions mélanocytiques sur la peau par un dermatologue. Une telle lésion est suspectée d'être un mélanome si elle présente au moins l'une de ces caractéristiques : **Asymétrie**, **Bords irréguliers**, **Couleur hétérogène**, **Diamètre > 5mm**, **Evolution au cours du temps**. C'est la **règle ABCDE**. Ce diagnostic visuel est aujourd'hui facilité par la dermoscopie, un dispositif optique manuel qui fonctionne comme une très forte loupe grossissante avec épiluminescence. S'il y a suspicion de mélanome, le dermatologue procède à l'exérèse chirurgicale de la lésion qui fait ensuite l'objet d'une analyse anatomo-pathologique.

J'ai déjà présenté la classification histologique et moléculaire du mélanome, qui rend bien compte de son évolution. Toutefois, en clinique, on accompagne ce diagnostic d'autres indicateurs anatomo-pathologiques pour guider le choix du traitement.

Nous avons ainsi indiqué qu'il existait une classification différente de celle élaborée initialement par Breslow qui ne rend compte que de l'épaisseur tumorale. Cette classification plus récente est appelée **classification TNM**, dont la dernière version date de 2017. Elle est élaborée par l'*AJCC (American Joint Committee on Cancer)*. Elle associe des indications sur la tumeur (**T**) (épaisseur de Breslow, ulcérations, index mitotique : nombre de mitoses au mm²), l'envahissement des ganglions lymphatiques (Node, **N**) (nombre de ganglions envahis, présence de micro-métastases ou de macro-métastases) et le site des métastases (**M**) à distance auquel s'ajoute la mesure de la LDH (lactate déshydrogénase) sérique (**Figure 26**).

Une fois ces différents diagnostics réalisés, la stade du mélanome est établi et oriente vers différents choix de traitements.

- Le **stade 0** correspond au **mélanome *in situ*** sans invasion.

- Le **stade I** est établi pour un **mélanome invasif d'épaisseur inférieure à 1 mm**. Aux stades 0 et I, on réalise l'exérèse de la tumeur cutanée et récupérant les marges saines. Concrètement, suite à l'exérèse d'une lésion mélanocytaire par le dermatologue, seules les données sur la tumeur primaire sont recueillies (épaisseur, index mitotique, ulcération). Si le mélanome est plus avancé, alors on réalise un test moléculaire pour identifier la ou les mutations tumorales.

- Le **stade II** correspond aux **mélanomes primaires invasifs plus profonds**. C'est à ce stade que l'on propose généralement l'**exérèse du ganglion lymphatique sentinelle**. On oriente les patients vers des **traitements adjuvants** pour prévenir les métastases ganglionnaires et distantes.

- Le **stade III** est établi lorsque des métastases ganglionnaires sont avérées. On propose un diagnostic plus avancé avec les **techniques d'imagerie**.

- Le **stade IV** correspond au mélanome avec des métastases distantes non résécables. En fonction du statut mutationnel du mélanome, on oriente les patients vers les **thérapies ciblées** (inhibiteurs de BRAF, ...) ou les **immunothérapies**.

2) La chirurgie et l'imagerie : entre diagnostic, suivi et traitement

La chirurgie est le premier traitement pour le mélanome localisé, mais c'est surtout un outil de diagnostic indispensable. Dans le cas du mélanome *in situ*, c'est une opération bénigne qui consiste à retirer la lésion ainsi que des marges plus ou moins larges en fonction de l'épaisseur de la tumeur.

Sur ces pièces de mélanomes primaires, un certain nombre d'analyses histologiques peuvent être conduites, outre celles qui servent à l'établissement du stade TNM. L'infiltration des cellules immunitaires au sein de la tumeur est étudiée. Celle-ci peut être focale ou diffuse. Ces différences peuvent être utiles pour le choix d'immunothérapie car une infiltration diffuse est associée à un meilleur pronostic (*Clemente et al., 1996*). Les anatomo-pathologistes réalisent également des colorations hématoxyline/éosine et repèrent par ce moyen des cellules tumorales migrant par angiotropisme, dont nous avons vu qu'il s'agissait d'une voie de migration importante dès le début de la progression tumorale. Par un immunomarquage de la podoplanine, ils repèrent également si il y a une lymphangiogenèse active dans la tumeur primaire, associée au risque de progression loco-régionale (*Dadras et al., 2005*) (**Figure 27**).

La résection du ganglion sentinelle est essentiellement un moyen de diagnostic avancé du stade du mélanome lorsque les analyses précédemment citées sont au moins partiellement

positives. Les mêmes analyses faites sur la tumeur primaire sont réalisées sur ces ganglions afin de mesurer l'infiltration tumorale (micrométastases ou macrométases) et le niveau de lymphangiogenèse, qui est une caractéristique précoce de l'éducation pré-métastatique du ganglion.

Si l'épaisseur de la tumeur primaire est supérieure à 1mm, on pratique l'exérèse du ganglion lymphatique sentinelle, c'est-à-dire le ou les ganglions drainant les plus proches de la tumeur. Si l'envahissement du ganglion sentinelle est avéré, alors d'autres examens sont réalisés pour mesurer l'étendue des métastases. Ce sont essentiellement des techniques d'imagerie, telles que :

- **L'échographie loco-régionale** de la chaîne de ganglions lymphatiques, qui permet de repérer des changements de structures des ganglions (gonflement, ...) qui peuvent traduire l'envahissement par les métastases.
- La **tomodensitométrie**, qui produit des images en trois dimensions par rayons X après injection d'un produit de contraste. Cette technique permet de repérer des zones de tissu plus dense même de petites tailles, qui peuvent être le signe de la formation de métastases.
- La tomographie par émission de positons (**PET-Scan**), qui se base sur le fait que les cellules tumorales vont assimiler plus fortement que les tissus sains un marqueur faiblement radioactif (le fluorodésoxyglucose). Cette technique permet d'établir une image en 3D de la répartition des cellules cancéreuses dans l'ensemble du corps.

D'autres ganglions du bassin ganglionnaire peuvent être retirés et analysés pour mesurer l'étendue de la progression des métastases. Toutefois, l'intérêt de cette chirurgie plus invasive que la résection de la tumeur primaire est sujet à controverse, car elle est associée à des effets secondaires non négligeables (développement de lymphœdèmes) et n'améliore pas la survie des patients (*Morton et al. 2014 ; Faries et al., 2017*). On préfère un suivi régulier des patients par imagerie, d'autres ganglions du bassin pouvant être retirés si celles-ci détectent des problèmes sur certains de ces ganglions.

Classification T		Classification N	
T0	Pas de tumeur primaire détectée	N0	Pas de ganglions lymphatiques régionaux atteints
Tis	Mélanome in situ	N1	Un ganglion lymphatique atteint, avec micro-métastase, macro-métastase, ou métastases en transit ou satellites
T1	A	N2	Deux ou trois ganglions affectés, avec au moins un ganglion atteint et métastases en transit ou satellites
	B		
T2	A	N3	Au moins quatre ganglions atteints, ou au moins deux ganglions atteints et métastases satellites
	B		
T3	A	Classification M	
	B	M0	Pas de métastases distantes
T4	A	M1	Métastases distantes...
	B		... dans la peau
			... dans le poumon
			... dans d'autres organes à part le système nerveux central
			... dans le système nerveux central

Stadification						
Stade	Classe T	Classe N	Classe M	Chirurgie	Traitement adjuvant	Thérapie
0	Tis	N0	M0	Résection de la tumeur primaire + marges saines en fonction de l'épaisseur		
1A	T1A/B	N0	M0			
1B	T2A	N0	M0	Résection de la tumeur primaire + marges saines + ganglion sentinelle		
2A	T2B ou T3A	N0	M0			
2B	T3B, T4A/B	N0	M0	Résection des ganglions atteints (ne suffit pas, les métastases ont probablement déjà envahi d'autres organes)	Oui (interférons, thérapies ciblées, immunothérapies)	Traitement adjuvant (interférons, thérapies ciblées ou immunothérapies)
2C	T0	N1b/c	M0			
3A	T1A/B à T2A	N1a ou N2a	M0	Pas de solution chirurgicale		
3B	T0 à T3A	N1c à N3c	M0			
3C	T1A à T4B	N1a à N3c	M0			
3D	T4B	N3a à N3c	M0			
4	T0 ou Tis à T4B	N0 à N3C	M1			Thérapies ciblées ou immunothérapies

Figure 26 : La classification Tumor-Node-Metastasis, d'après l'AJCC.

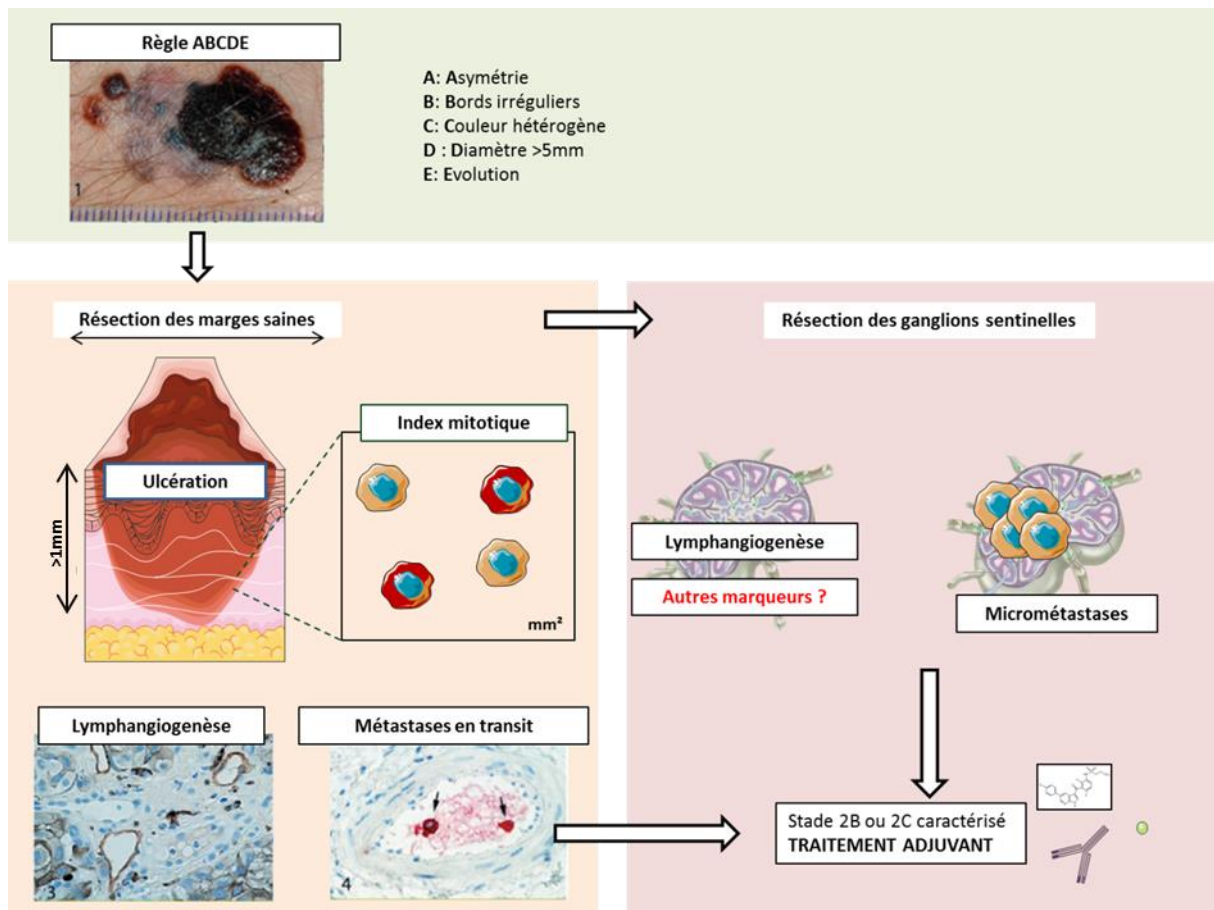


Figure 27 : La prise en charge précoce du mélanome. Le mélanome est diagnostiqué à partir de lésions cutanées obéissant à au moins l'une des cinq règles ABCDE. S'il y a suspicion, on retire la lésion plus une certaine marge de tissu sain en fonction de son épaisseur. Des analyses sont réalisées en anatomo-pathologie pour caractériser l'ulcération, l'index mitotique et l'envahissement local des vaisseaux (métastases en transit) grâce à un marquage hématoxyline-éosine ou un immunomarquage contre MLNA (*Protein Melan-A*). La lymphangiogenèse peut également être caractérisée par immunomarquage contre la podoplanine (*Dadras et al., 2005*). En fonction des résultats de ces analyses, le ganglion sentinelle ou les ganglions régionaux peuvent être retirés. Cependant, à part des marqueurs de lymphangiogenèse ou d'invasion vasculaire, la médecine est en manque de marqueurs précoces. En cas d'invasion locale des vaisseaux ou de ganglions, le stade 2B ou 2C de la classification est caractérisé et on oriente généralement les patients vers des traitements adjuvants (inhibiteurs des checkpoints immunitaires, thérapies ciblées, interférons α) (*Schadendorf et al., 2018*) (Photos de *Vernez et Hohl, 2011*).

3) Les traitements adjuvants et néo-adjuvants

La médecine se tourne désormais vers l'utilisation de traitements adjuvants dès le stade II ou III du mélanome. L'objectif de la thérapie adjuvante est de prévenir la récurrence de métastases après la résection de la tumeur ou de prévenir le développement de celle-ci si elle est non résectable. Les thérapies néo-adjuvantes ont pour objectif de limiter la croissance tumorale en vue de la résection chirurgicale ou d'un autre traitement. L'**interféron α** (IFN- α) peut être employé dès le stade II (*Kirkwood et al.*, 1996). Comme toutes les molécules de cette famille, son intérêt est le même que dans les infections virales : les cellules répondant aux IFN augmentent la présentation des antigènes par le CMH de classe I aux lymphocytes T CD8, ce qui renforce la réponse immunitaire cytotoxique. Les thérapies ciblées et d'immunothérapies déjà utilisées en stade IV sont également utilisées comme traitements adjuvants. La FDA a approuvé l'utilisation des **inhibiteurs de BRAF^{V600E} et de MEK (Dabrafénib et Tramétinib)** pour les patients ayant subi la résection d'un mélanome de stade III muté **BRAF^{V600E}** (*Long et al.*, 2017). De même, les anticorps ciblant des récepteurs inhibiteurs de l'activation des lymphocytes sont utilisés comme traitements adjuvants. L'**ipilimumab**, un anti-CTLA4, est approuvé par la FDA pour les patients au stade III qui ont subi une lymphadénectomie (*Eggermont et al.*, 2015), et le **nivolumab**, un anti-PD1, pour les patients ayant subi une résection de tumeur de stade III ou IV (*Weber et al.*, 2017).

5. Les traitements contre les métastases distantes

a. Des thérapies personnalisées

Je vais détailler les stratégies et les mécanismes sous-jacents des plus récentes stratégies thérapeutiques contre le mélanome métastatique : les thérapies ciblées et les immunothérapies. Ces thérapies répondent à une logique personnalisée de la médecine, puisque l'orientation vers l'un ou plusieurs de ces traitements est déterminée à la fois par le diagnostic moléculaire et le diagnostic anatomo-pathologique du mélanome propre à chaque patient.

Les thérapies ciblées inhibent la voie des MAPK (inhibiteurs de BRAF et de MEK) et sont proposées en première intention aux patients dont la tumeur présente une mutation activatrice de la kinase BRAF. Les autres patients sont traités par les immunothérapies, notamment les anti-PD1 et les anti-CTLA4, qui servent également de seconde ligne de traitement en cas d'échec des thérapies ciblées (Voir **figure 20**).

b. Les thérapies ciblées

Aujourd'hui, deux combinaisons d'un inhibiteur spécifique de la kinase BRAF^{V600E} et de MEK sont proposées aux patients :

- Le Vémurafénib (PLX4032) associé au Cobimétinib (*Larkin et al.*, 2014)
- Le Dabrafénib associé au Tramétinib (*Long et al.*, 2015 ; *Robert et al.*, 2015).

Les tumeurs répondent à ces traitements chez un grand nombre de patients, à savoir 50% avec le traitement inhibiteur de BRAF (*Chapman et al., 2011*) et jusqu'à 70% avec la combinaison avec l'inhibiteur de MEK. En plus d'une meilleure réponse, la combinaison des deux inhibiteurs montre un gain d'au moins neuf mois avant l'apparition de rechutes par rapport au traitement avec l'inhibiteur de BRAF seul (*Larkin et al., 2014*). Par rapport aux chimiothérapies classiques, l'inhibition spécifique de la mutation de BRAF permet de limiter les effets secondaires, qui ne sont toutefois pas inexistantes. Les effets les plus courants sont cutanés, par l'induction d'une photosensibilisation (brûlures) ou de réactions allergiques. D'autres effets, du même type que ceux induits par les chimiothérapies peuvent aussi apparaître.

Il existe aussi des thérapies ciblées pour les patients présentant des tumeurs triple-WT mutées sur KIT, un récepteur à activité tyrosine kinase. La mutation KIT est principalement retrouvée dans les mélanomes des extrémités et des muqueuses. Les thérapies ciblées concernées sont également des inhibiteurs sélectifs : l'**imatinib** et le **nilotinib**. Ils permettent la régression de la tumeur dans un quart des cas et empêche la progression du mélanome jusqu'à 50% des cas.

Mode d'action des inhibiteurs de BRAF^{V600E}

La voie des MAPK est maintenue inactive en absence de ligand activant le récepteur initial, car la GTPase RAS est inactivée par NF1, une protéine GAP qui permet le relargage du GTP.

La mutation V600E de BRAF rend la MAPKKK hyperactive. En effet, l'entrée de l'ATP dans son domaine d'ancrage est contrôlée par un autre domaine, qui contient la valine 600, et qui sert de barrière quand elle n'est pas phosphorylée. Quand cette valine est mutée, la protéine reste dans sa conformation active, avec le passage vers le domaine d'ancrage de l'ATP ouvert (*Wan et al., 2004*). Ainsi, BRAF^{600E} reste active indépendamment de l'activation par RAS et de la liaison du récepteur à son ligand. Le Vémurafénib empêche la conformation active de la protéine car sa structure disposant de plusieurs cycles aromatiques lui donne une bonne affinité pour le domaine d'ancrage de l'ATP. Le Dabrafénib dispose du même type d'action.

Résistances aux inhibiteurs des MAPK

La résistance aux inhibiteurs des MAPK est issue de voies nombreuses.

Les premières décrites aboutissent à la réactivation d'autres voies de la survie cellulaire, contournant de fait les kinases inhibées par les thérapies ciblées. La plupart de ces résistances sont **innées et intrinsèques**. Ainsi la résistance des mélanomes BRAF^{WT} peut s'expliquer par d'autres mutations, telles que la mutation de PTEN qui permet l'activation constitutive de la voie PI3K-AKT. La mutation sur NF1, qui permet le maintien de l'activité de NRAS, peut également aboutir à l'activation de la PI3K (*Kuru et Biusam, 2017*) (*Figure 28*).

Même pour les mélanomes BRAF^{V600E}, la plupart de ces mutations, telles que la perte de PTEN, sont acquises pendant la tumorigenèse et engendrent l'activation de ces voies parallèles. D'autres modifications sont ainsi du ressort des résistances **intrinsèques mais acquises (Figure 28)**. La voie des MAPK elle-même est réactivée. Ainsi, l'expression d'une autre kinase apparentée, appelée COT, est augmentée par l'inhibition de BRAF. Cette kinase est suffisante pour réactiver MEK (*Johannessen et al., 2010*). Un autre isoforme de RAF, CRAF, permet également de réactiver MEK (*Doudican et Orlow, 2017*).

D'autres résistances sont enfin **acquises et extrinsèques**, puisque ces voies de substitution peuvent être réactivées par des facteurs sécrétés par le microenvironnement et les thérapies elles-mêmes, tels que le HGF sécrété par les CAF qui induit lui-même la voie PI3K-AKT (*Straussman et al., 2012*), et la rigidification de la matrice par les CAF (*Hirata et al., 2015*) ou les mélanomes eux-mêmes (*Girard et al., 2020*) qui induit les voies de la mécanotransduction (Intégrines β 1, FAK et réactivation de ERK ; l'activité de YAP/MRTF), l'expression de gènes de survie et de prolifération, et la plasticité phénotypique (**Figure 28**).

La **plasticité phénotypique** est précisément le mécanisme par lequel des résistances et des rechutes apparaissent chez tant de patients. Ainsi qu'expliqué précédemment, le modèle le plus récent de la résistance par la plasticité phénotypique est celui du **rhéostat de MITF**. Les thérapies ciblées engendrent une phase de transition appelée MRD (*Minimal Residual Disease*) durant laquelle quelques cellules de la tumeur initiale vont passer à un état starvé, **peu prolifératif, différencié** et de fait **résistant**. Ces cellules tumorales résiduelles s'orientent ensuite vers des **états également résistants** aux thérapies qui sont **dédifférenciés** MITF^{low} (invasif ou « crête neurale ») ou au contraire **hyperdifférenciés** MITF^{high} (*Rambow et al., 2019*).

Cette orientation vers différents profils est gouvernée par des facteurs extrinsèques issus du microenvironnement. Ainsi, la voie YAP/TEAD et TGF β -SMAD coopèrent dans l'acquisition du phénotype invasif, avec la dérégulation de MITF et l'augmentation de l'expression de CTGF, CYR61 et AXL (*Miskolczi et al., 2018 ; Kozar et al., 2019*). Et nous avons montré que la rigidification de la matrice induite par les inhibiteurs de BRAF conduit à une transition vers un phénotype myofibroblastique, résistant et dédifférencié grâce aux facteurs de la mécanotransduction YAP et MRTF (*Girard et al., 2020*).

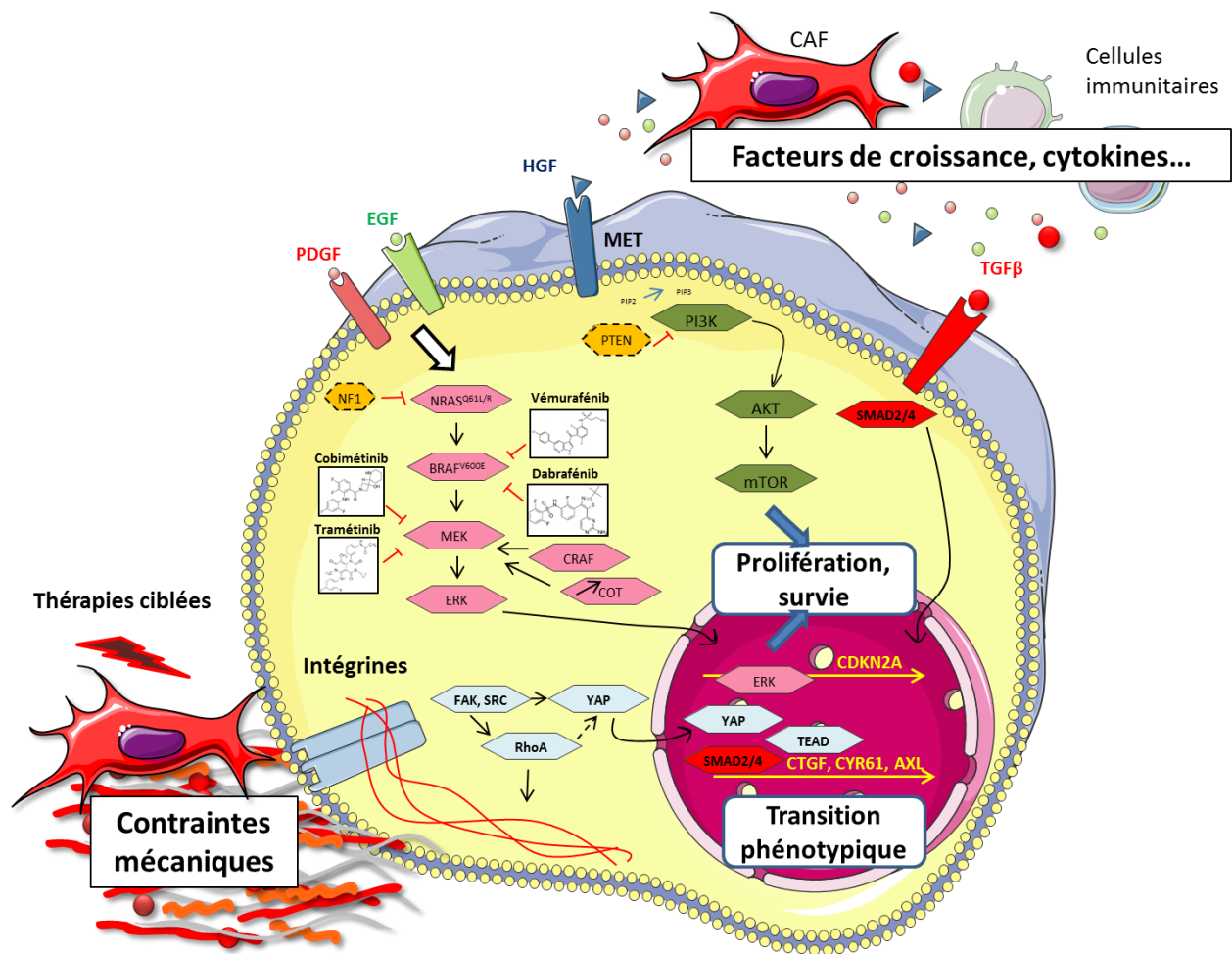


Figure 28 : Cibles moléculaires des thérapies ciblées et mécanismes de résistance.

Résistances innées et intrinsèques. Mutations de NF1 et PTEN qui lève le frein initial des voies MAPK et PI3K-AKT. **Résistances acquises et intrinsèques.** Réactivation de MEK par CRAF ou par la surexpression de COT. **Résistances acquises et extrinsèques.** Les facteurs sécrétés du microenvironnement éduqué (*facteurs de croissance, cytokines*) par les cellules tumorales favorisent la réactivation des voies MAPK et PI3K (PDGF, EGF, HGF) ou la transition phénotypique (TGFβ-SMAD). La rigidification de la matrice (*contraintes mécaniques*) favorise la transition phénotypique et l'entretien d'une matrice pro-survie.

c. Les immunothérapies

Les immunothérapies les plus utilisées contre le mélanome bloquent les points de contrôle de l'activation des lymphocytes. Ce sont des anticorps monoclonaux dirigés contre les régulateurs négatifs de cette activation, en particulier CTLA-4 et PD-1. L'identification de ces régulateurs et surtout la démonstration que l'inhibition de CTLA-4 (*Leach, Krummel et Allison, 1996*) et de PD-1 (*Iwai, Terawaki, Honjo, 2005*) favorisent la réponse anti-tumorale ont valu le **Prix Nobel de Physiologie et de Médecine de 2018** à James Allison et Tasuku Honjo.

Mode d'action des checkpoints de la réponse immunitaire

Quand est-ce que les régulateurs négatifs de la réponse immunitaire interviennent ? Les lymphocytes T sont activés par un ensemble de trois signaux : (1) l'interaction de l'antigène porté par le CMH de classe I, porté par l'ensemble des cellules de l'organisme, ou de classe II, porté par les cellules présentatrices d'antigène, avec le TCR des respectifs lymphocytes T CD8+ et des lymphocytes T CD4+ ; (2) un signal de co-stimulation provenant de l'interaction de CD28 avec son ligand B7 (on aboutit à ce moment-là à la formation de la synapse immunologique qui permet le signal d'activation dans le lymphocyte) ; (3) l'environnement cytokinique qui détermine son devenir (polarisation). Les lymphocytes T CD4+ produisent de l'IL-2 suite à leur activation. L'activation de lymphocytes T CD8+ cytotoxiques nécessite souvent la coopération d'une cellule dendritique éduquée et d'un lymphocyte Th1. Elle a lieu le plus souvent dans les ganglions drainants la tumeur. Dans ce cas, les deux lymphocytes sont stimulés ensemble, et l'IL-2 produit par les lymphocytes T CD4+ participe à l'activation des T CD8+ (**Figure 29**)

Les molécules CTLA-4 et PD1 viennent pondérer l'effet co-stimulateur des molécules B7 et CD28. Dans un contexte physiologique, ce type de signal négatif permet de maintenir la tolérance périphérique, et de réguler la durée et l'amplitude de la réponse immunitaire pour éviter des dommages tissulaires importants. Concrètement, CTLA-4 est exprimée sur les lymphocytes T activés et entre en compétition avec CD28 sur les lymphocytes pour interagir avec B7 sur les cellules présentatrices d'antigène. PD-1 est exprimé sur les lymphocytes mémoires et effecteurs et apporte un signal de régulation négative en interagissant avec PD-L1 (B7-H1) et PD-L2 (B7-DC) sur les cellules présentatrices d'antigène.

Intérêt thérapeutique

Les anticorps monoclonaux utilisés comme immunothérapie sont donc :

- L'**ipilimumab** : anti-CTLA4.
- Le **nivolumab** et le **pembrolizumab** : anti-PD1.
- L'**atezolizumab** : anti-PDL1.

Ils permettent une solution thérapeutique pour les patients dont les tumeurs ont d'autres mutations que BRAF^{V600E} qui est souvent plus durable. Ils provoquent cependant de forts effets secondaires, notamment des réactions immunes. Les anti-PD1 sont mieux tolérés que l'anti-CTLA4, mais seuls 20% (Weber *et al.*, 2015 ; Larkin *et al.*, 2018) à 40% (Robert *et al.*, 2015) des patients répondent en utilisant juste l'une de ces thérapies. On peut monter jusqu'à 50% de réponse en utilisant une combinaison d'un anti-PD1 (Nivolumab) et d'un anti-CTLA4 (Ipilimumab) (Larkin *et al.*, 2015 ; Wolchok *et al.*, 2017) mais avec une aggravation encore notable des effets secondaires.

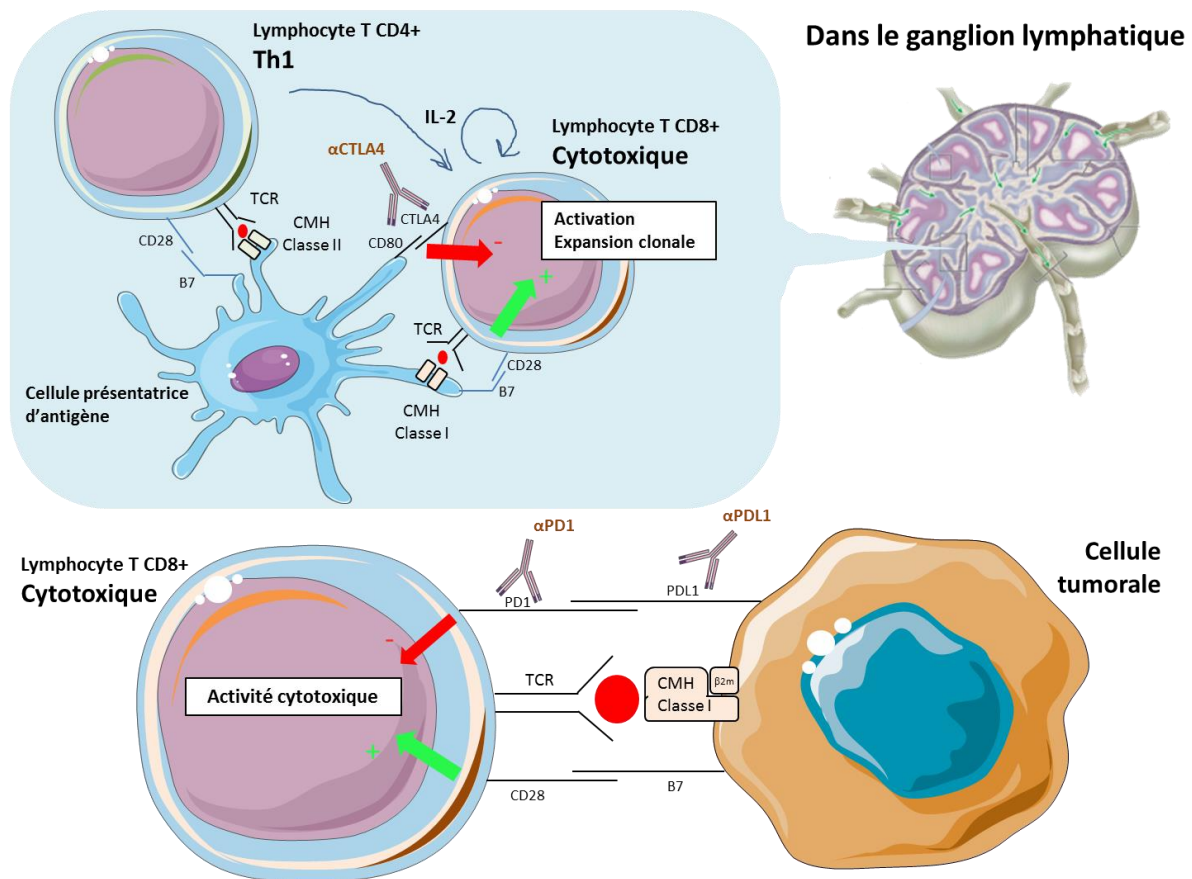


Figure 29 : Mode d'action des inhibiteurs des checkpoints de la réponse immunitaire.

Résistances

Les immunothérapies sont également sujettes à des résistances et des rechutes. Environ 60% des patients présentent des tumeurs initialement résistantes aux anti-PD1 et 20% à 30% des patients qui répondent au traitement rechutent dans les mois ou les années qui suivent.

La recherche s'est portée depuis le début sur les mécanismes amenant à ces résistances et a permis l'identification de biomarqueurs pour mieux orienter les choix thérapeutiques et mieux prévenir les risques de rechute. Ces biomarqueurs peuvent concerner la reconnaissance des cellules tumorales par les cellules de l'immunité adaptative (**présentation de l'antigène**), la présence de cellules ou de facteurs immunosuppresseurs (tels que **PDL1**), la présence, la localisation et la répartition de l'**infiltrat lymphocytaire**, ainsi que cela est fait pour la tumeur primaire et le ganglion sentinelle, et enfin l'**activité de la signalisation IFN γ** au sein de la tumeur (Schadendorf et al., 2018).

En effet, si les immunothérapies permettent de lever des freins à l'activation de la réponse lymphocytaire adaptative, des résistances innées et acquises peuvent émerger en fonction du profil immunologique et oncologique de la tumeur qui peuvent là aussi être **intrinsèques à la cellule tumorale** (présentation de l'antigène, statut mutationnel, signalisation IFN γ perdue) ou **extrinsèques** (infiltration des lymphocytes, ...) (Sharma et al., 2017).

Résistances intrinsèques. La résistance peut-être causée par une diminution de la présentation des antigènes via la **mutation** ou la **perte d'expression** du **CMH de classe I**, de la **β 2-microglobuline**, ou de **TAP**, un transporteur du réticulum endoplasmique permettant l'association CMH-peptide, ou encore la **perte de la signalisation IFN γ** . Par ailleurs, la **déplétion de PTEN** ou la **suractivation de la voie β -caténine** conduit à la **diminution de l'infiltration immunitaire** (lymphocytes T CD8, cellules dendritiques). Enfin, la perte de la signalisation IFN γ conduit aussi à un recrutement diminué de cellules immunitaires, et protège les cellules tumorales de ses effets pro-apoptotiques et anti-prolifératifs. (*Sharma et al., 2017*).

Résistances extrinsèques. Les résistances extrinsèques peuvent être dues à la présence de cellules immunitaires immunosuppressives, comme les lymphocytes T régulateurs, les macrophages M2 ou les cellules myéloïdes immunosuppressives. Par ailleurs, le remodelage de la matrice extracellulaire (densification et rigidification) et la reprogrammation métabolique du microenvironnement (sécrétion de lactate et d'IDO) restreint l'activité des lymphocytes T cytotoxiques au niveau des marges d'invasion et en zone péri-vasculaire (*Syn et al., 2017 ; Salmon et al., 2012*).

Dans le mélanome, on distingue ainsi quatre types de microenvironnements associés à un risque plus ou moins important de résistance primaire ou acquise (*Teng et al., 2015*). Ils sont basés sur le niveau d'infiltration lymphocytaire (TIL, *Tumor Infiltrating Lymphocytes*) et l'expression de la molécule PDL1.

Type 1 : Les tumeurs TIL⁺ PDL1⁺ sont très représentées (38% des patients) et sont celles qui **répondent le mieux aux immunothérapies**. Les lymphocytes infiltrants sont efficacement réactivés par les inhibiteurs des points de contrôles immunologiques.

Type 2 : Les tumeurs TIL⁻ PDL1⁻ sont les plus représentées (41% des patients) et sont associées au plus mauvais pronostic. Le microenvironnement de ces tumeurs ne contient que des cellules dendritiques et des macrophages, et maintient un état d'ignorance immunitaire.

Type 3 : Les tumeurs TIL⁻ PDL1⁺ sont les moins représentées (1% des patients). L'expression de PDL1 est maintenue par les voies oncogéniques.

Type 4 : Les tumeurs TIL⁺ PDL1⁻ sont les plus paradoxales. L'infiltrat lymphocytaire est présent et l'expression de PDL1 y est faible. Ce sont toutefois des tumeurs qui présentent une forte hétérogénéité avec la présence de macrophages M2 et de cellules myéloïdes immunosuppressives qui maintiennent un état de tolérance au sein de ces tumeurs.

Pour pallier aux résistances, un grand nombre de stratégies existent. De nombreuses combinaisons entre immunothérapies et thérapies ciblées, pour bloquer les voies oncogéniques, sont à l'étude. Des essais cliniques sont également en cours pour tester l'effet d'inhibiteurs métaboliques (inhibiteurs d'IDO, ...), bloquer les signaux immunomodulateurs

du microenvironnement (inhibiteurs du CSF1R contre les macrophages, anti-TIM3, ...) (*Sharma et al., 2017*) ou associer d'autres technologies d'immunothérapies, telles que le transfert adoptif de cellules immunitaires modifiées, tel que les cellules CAR-T (*Rosenberg et al., 2011*). Les cellules CAR-T sont des lymphocytes T du patient dont on modifie le TCR par génie génétique. La construction transférée aux lymphocytes permet à elle seule la reconnaissance spécifique d'antigènes tumoraux et la transduction du signal d'activation. Toutefois, cette technologie reste soumise aux mêmes restrictions que les inhibiteurs des points de contrôle de l'activation lymphocytaire du fait qu'elle est sujette à des mécanismes de résistance analogues (dont la perte de la présentation de l'antigène par les cellules tumorales est le principal) et des effets secondaires tels que l'orage cytokinique qui limite ses effets et oblige à une surenchère thérapeutique (*Davila et al., 2014*). Ce sont des traitements qui demandent encore de nombreuses investigations pour limiter les effets secondaires et augmenter leur efficacité, notamment en favorisant l'infiltration de ces lymphocytes au sein de la tumeur.

*

* *

Aujourd'hui, la prise en charge du mélanome se modernise et se personnalise. Des traitements de plus en plus efficaces se développent pour guérir le mélanome métastatique, bien que les phénomènes de résistance restent prépondérants. Pour les limiter, la recherche se porte beaucoup sur l'analyse fine et personnalisée de biomarqueurs au sein des cellules tumorales (plasticité phénotypique) et dans le microenvironnement tumoral (composition immunitaire, moléculaire). Cependant, du fait qu'il n'existe pas à ce jour de traitement systématique pour tous les patients, la prise en charge du mélanome aux stades les plus précoces reste essentielle. Le stade de l'envahissement du ganglion sentinelle est critique pour l'évolution de la maladie, et une meilleure compréhension des mécanismes de l'invasion loco-régionale peut permettre de développer de nouveaux marqueurs et de limiter la progression des métastases.

Partie III : Le ganglion lymphatique entre immunité et mélanome

A. Le ganglion lymphatique est le siège de la réponse immunitaire adaptative

Les ganglions lymphatiques sont des acteurs essentiels du système lymphatique et immunitaire. Ils jouent un rôle essentiel mais contradictoire dans la progression tumorale. Ce sont des sentinelles chargées de l'immuno-surveillance anti-tumorale, et en même temps des lieux privilégiés pour la création de niches métastatiques immunotolérantes. Cet antagonisme est le reflet des fonctions immunologiques du ganglion, qui active et contrôle la réponse immunitaire.

1) La place du ganglion dans le système lymphatique

Le système lymphatique est constitué des vaisseaux lymphatiques, ainsi que d'un ensemble d'organes dits lymphoïdes dont font partie les ganglions lymphatiques. Ce système joue un rôle de transport cellulaire, en particulier des lymphocytes et autres leucocytes, de transport moléculaire (hormones, fluides, déchets), et assure la réponse immunitaire. Le système lymphatique est également une voie de dissémination privilégiée de nombreux cancers dits lymphophiles : mélanome, carcinome mammaire, carcinome pancréatique, ...

a. Les ganglions font partie des organes lymphoïdes secondaires

Les organes lymphoïdes sont responsables du développement et de l'activation des cellules immunitaires. On distingue les **organes lymphoïdes primaires** et les **organes lymphoïdes secondaires**.

Les organes lymphoïdes primaires rassemblent la **moelle osseuse** et le **thymus**. Ils permettent respectivement la **maturation** des lymphocytes B et des lymphocytes T. Ils jouent un rôle dans la **tolérance centrale** en induisant l'apoptose des lymphocytes réactifs contre des auto-antigènes (*Ashton-Rickardt et al.*, 1994).

Les organes lymphoïdes secondaires (**SLO**) rassemblent les **ganglions lymphatiques** (ou **nœuds lymphatiques**), la **rate**, et des tissus lymphoïdes spécialisés des muqueuses (**MALT**) comme les plaques de Peyer au niveau de l'intestin. Les SLO sont clés dans l'immuno-surveillance contre les pathogènes et le développement tumoral. La rate l'immuno-surveillance du sang ; tandis que le ganglion lymphatique récupère la lymphe des tissus périphériques et permet une **immuno-surveillance tissulaire loco-régionale** (*Mueller et Germain*, 2009). Les SLO sont le lieu de l'**activation** et de la régulation de la réponse immunitaire adaptative. Ils jouent un rôle dans la **tolérance périphérique** en induisant l'anergie ou l'apoptose des lymphocytes auto-réactifs (*Turley et al.*, 2010).

b. Les ganglions au carrefour des systèmes sanguins et lymphatiques

Les **ganglions lymphatiques** sont nombreux dans l'organisme. On les retrouve à proximité des interfaces entre le milieu extérieur et le milieu intérieur. Ils drainent la lymphe circulant au niveau des épithéliums associés, sous la peau, autour des intestins ou des poumons. Ils peuvent se présenter en amas ou sous forme de chaînes ganglionnaires le long du système vasculaire lymphatique (**Figure 30**). Il existe des ganglions lymphatiques superficiels, sous la peau, tels que les ganglions inguinaux ou les ganglions axillaires, et des ganglions profonds, tels que les ganglions thoraciques et abdominaux.

Les ganglions lymphatiques drainent et filtrent la lymphe issue des organes périphériques et collectée par de fins capillaires lymphatiques qui se jettent dans des vaisseaux lymphatiques de plus en plus gros (*Drinkler et al., 1934*). La lymphe afférente contient **antigènes, déchets**, ainsi que des cellules présentatrices d'antigène comme les **cellules dendritiques migratoires**. La paroi de ces vaisseaux est très fine et très lâche, composée d'une couche de cellules endothéliales apposées les unes aux autres, ce qui facilite le passage du liquide interstitiel et des leucocytes. La lymphe arrive dans le ganglion par les vaisseaux lymphatiques afférents et en ressort par le vaisseau lymphatique efférent.

Le ganglion lymphatique est relié au système vasculaire sanguin de deux manières. Il est irrigué par l'artère et la veine lymphatique qui se subdivisent en de multiples branches et se terminent par un réseau de capillaires, les **veinules à endothélium épais (High Endothelial Venules, HEV)**. Les HEV permettent l'entrée des lymphocytes dans le ganglion (*Girard et al., 2012*), mais donne également aux cellules tumorales un accès direct et privilégié à la circulation sanguine (*Pereira et al., 2018, Brown et al., 2018*). D'un autre côté, les vaisseaux lymphatiques efférents se rassemblent dans les vaisseaux lymphatiques collecteurs et rejoignent la circulation sanguine par le plus gros vaisseau lymphatique du corps, le canal thoracique, qui se jette dans la circulation sanguine au niveau de la veine sous-clavière (**Figure 30**). Il s'agit de la principale voie de sortie des lymphocytes activés, mais ils peuvent servir également de voie de sortie pour les cellules tumorales, qui se dirigent ensuite vers les tissus périphériques et distants.

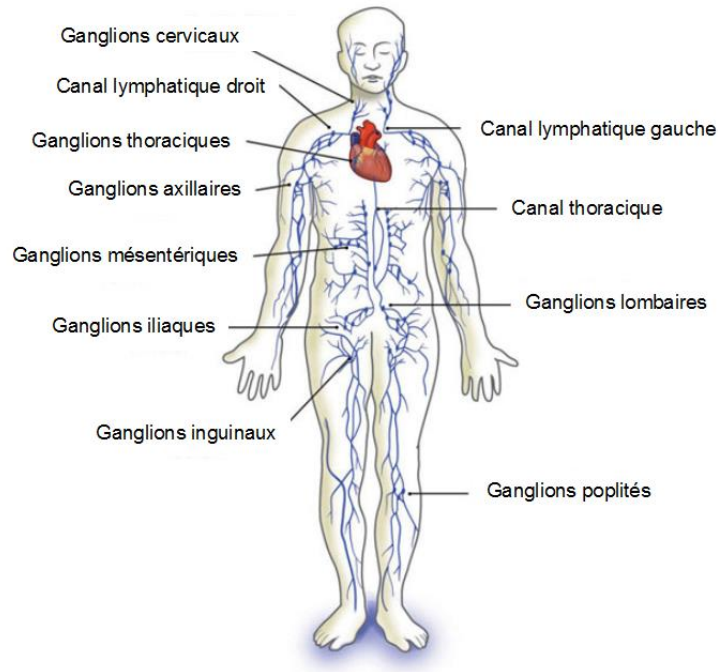


Figure 30 : Les ganglions lymphatiques et la circulation lymphatique

c. Les ganglions lymphatiques assurent l'immuno-surveillance régionale

Les ganglions lymphatiques jouent un rôle clé au cours de la réponse immunitaire en favorisant les **chances de rencontre** entre les antigènes, les cellules présentatrices d'antigène et les rares lymphocytes spécifiques qui patrouillent dans le sang. Les lymphocytes sont les acteurs de la **réponse immunitaire adaptative**. On distingue la **réponse humorale**, médiée par les lymphocytes B grâce à la production d'anticorps, et la réponse **cellulaire**, médiée par les lymphocytes T. La réponse immunitaire adaptative répond à deux principes : la **spécificité** et la **mémoire** de l'antigène.

Pour permettre une réponse immunitaire efficace, les ganglions servent de **niches** permettant la **circulation**, le **maintien** et la **survie** des lymphocytes. Les lymphocytes naïfs circulent d'un ganglion à l'autre, en y recevant des signaux de survie ou bien des signaux d'activation. Ils sont recrutés depuis le sang, maintenus par les cellules stromales pour permettre la rencontre de l'antigène, et redirigés vers la lymphe grâce à des gradients de chimiokines. Ce schéma de recrutement et de maintien des lymphocytes dans le ganglion favorise la rencontre de l'antigène en permettant aux lymphocytes de circuler à l'intérieur de l'organe entre 8 à 12 heures pour les lymphocytes T et 24 heures pour les lymphocytes B (Tomura et al., 2008).

Les lymphocytes B et T circulant dans le ganglion sont activés lors de la rencontre avec l'antigène dont ils sont spécifiques. L'activation des lymphocytes T CD4⁺, dits « **helper** », consiste en l'interaction du lymphocyte avec une cellule présentatrice d'antigène, soit une

cellule dendritique migratoire provenant des tissus périphériques (*Kissenpfennig et al., 2005*) soit d'une **cellule dendritique résidente** du ganglion captant un antigène circulant (*Sixt et al., 2005*). L'activation induit la maturation des lymphocytes spécifiques, leur prolifération clonale (*expansion clonale*) et leur polarisation vers un phénotype de Th1, Th2, Th17 ou encore T régulateurs en fonction de l'environnement cytokinique. Les lymphocytes T régulateurs peuvent également être induits par certaines populations de cellules dendritiques immunotolérantes (*Turley et al., 2010*). Les lymphocytes T CD8⁺ quant à eux sont activés grâce à la coopération entre une cellule dendritique et un lymphocyte *helper* polarisé Th1.

L'activation des lymphocytes B suit un schéma différent. Les lymphocytes B reconnaissent les antigènes sous leur forme native, et peuvent capter grâce à leurs immunoglobulines les antigènes circulants, ou bien interagir avec des complexes antigènes-anticorps présentés par les fibroblastes de la zone B. Si certains antigènes sont capables d'induire seuls l'activation des lymphocytes B (*antigènes thymo-indépendants*), d'autres nécessitent une présentation par une cellule dendritique et la coopération avec un lymphocyte T CD4⁺ *helper* (*antigènes thymodépendants*).

Mais la rencontre avec l'antigène ne résulte pas automatiquement en l'activation du lymphocyte spécifique. Les ganglions lymphatiques sont aussi le siège de la **tolérance périphérique**. En effet, les cellules stromales ou dendritiques expriment des autoantigènes sur le CMH (*Baptista et al., 2014*). Cela induit la délétion ou l'anergie des lymphocytes qui possèdent des récepteurs ces complexes CMH-autoantigènes.

Les ganglions lymphatiques sont également des niches pour les lymphocytes mémoires. La plupart des lymphocytes activés dans le ganglion deviennent des cellules effectrices. Celles-ci migrent vers les tissus distants pour éliminer les pathogènes ou les cellules tumorales. Quelques autres lymphocytes vont devenir mémoires et se répartir dans et/ou recirculer entre différentes niches en tant qu'effecteurs-mémoires (T_{em}) ou centraux-mémoires (T_{cm}). Les lymphocytes T_{cm} conservent un tropisme semblable aux lymphocytes T naïfs, et patrouillent d'un ganglion à l'autre en y recevant des signaux de survie, ou d'activation s'ils rencontrent de nouveau l'antigène dont ils sont spécifiques.

Ainsi, les ganglions offrent un environnement propice au maintien, à la circulation et à l'activation des lymphocytes spécifiques contre les antigènes drainés depuis les sites périphériques. Ils sont les organes clés de l'immuno-surveillance loco-régionale contre les pathogènes et les cellules tumorales. Je vais à présent détailler la structure et la composition de cet environnement ganglionnaire.

2) La structure et la composition du ganglion lymphatique

La structure du ganglion est adaptée à sa fonction. Le ganglion est doté d'une architecture dynamique, qui évolue entre l'état homéostatique, réponse immunitaire aigüe et la réaction chronique du ganglion à l'infection ou au développement tumoral.

a. La compartimentalisation du ganglion lymphatique

Les ganglions lymphatiques sont des organes réniformes et fortement compartimentés (**Figure 31**). On distingue les structures lymphatiques (vaisseaux afférents et efférent, et les sinus lymphatiques qui traversent le ganglion), les structures intérieures constituées de cellules stromales qui forment un réseau matriciel interagissant avec les leucocytes et les cellules endothéliales, et les structures sanguines, dont les HEV font partie.

Les ganglions sont entourés d'une capsule essentiellement composée de matrice extracellulaire et de quelques adipocytes, et qui n'est entrecoupée que par les vaisseaux lymphatiques afférents et le vaisseau lymphatique efférent.

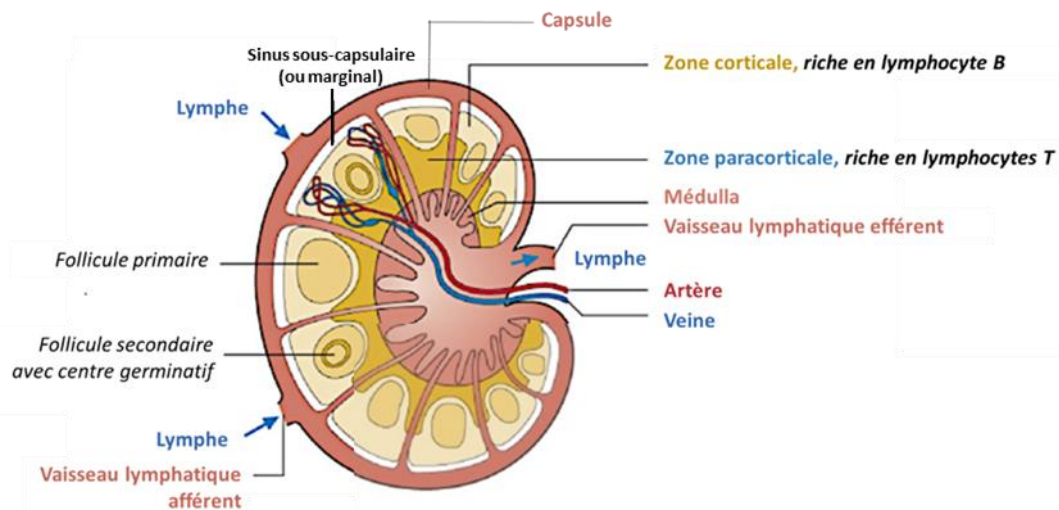


Figure 31 : La compartimentalisation du ganglion

Les vaisseaux lymphatiques afférents se jettent dans l'espace situé juste sous la capsule, le **sinus sous-capsulaire** (ou marginal), dans lequel se déverse la lymphe chargée de molécules (cytokines, antigènes, ...), de lymphocytes et de cellules dendritiques issus des tissus périphériques. L'intérieur du ganglion est cloisonné en plusieurs compartiments arrangés côte à côte, les **lobules lymphoïdes**. Chaque lobule s'étend du hile au sinus marginal et est composé d'une **zone corticale** (Cortex ou « zone B »), d'une **zone paracorticale** (Paracortex ou « zone T ») et accueille une des branches de la vascularisation sanguine du ganglion. Les lobules sont séparés par les sinus transverses qui aboutissent dans la médulla du ganglion. Celle-ci constituée de larges canaux, les **sinus médullaires**, qui convergent vers le hile et qui permettent la percolation de la lymphe du sinus marginal jusqu'au vaisseau lymphatique efférent.

Le plancher du sinus marginal est parsemé de fibroblastes appelés **Cellules Réticulaires Marginales** (MRC) et de macrophages qui capturent une partie des antigènes mais surtout les grosses molécules, particules et micro-organismes (*Katakai et al., 2012*). Les MRC forment un réseau matriciel capable de récupérer une partie des molécules de la lymphe afférente et de les transférer vers le cortex externe (*Roozendaal et al., 2009*). Le cortex externe contient les **follicules primaires** majoritairement habités par les lymphocytes B et un réseau de fibroblastes appelés **Cellules Dendritiques Réticulaires** (FDC) qui communique avec le réseau de MRC sus-jacent (**Figure 32**). Les follicules primaires évoluent en **centres germinatifs** lors de l'activation de la réponse humorale.

Sous le cortex, on trouve la zone T, appelée aussi **paracortex** ou **cortex interne**. Elle est séparée des follicules primaires par une marge périphérique appelée **crête corticale**, particulièrement enrichie en cellules dendritiques et en HEV, et qui sert donc de zone privilégiée pour l'entrée des lymphocytes T et des lymphocytes B naïfs et mémoires avant leur migration dans leur zones respectives (*Katakai et al., 2004*). La crête corticale est associée à une région de composition semblable située entre les follicules primaires, portant à ce titre le nom de **région interfolliculaire**. Ces régions communiquent avec le paracortex via les cordons paracorticaux qui se poursuivent jusqu'à la medulla.

Les **cordons paracorticaux** sont les unités structurales les plus importantes du paracortex. Ils s'organisent ainsi : un HEV est situé en leur centre, entouré de cellules périvasculaires (PvC) récemment caractérisées comme des péricytes Itga7⁺ (*Malhotra et al., 2012 ; Rodda et al., 2018*). Tout autour, les **cellules réticulaires fibroblastiques** (*Fibroblastic Reticular Cells, FRC*) forment un réseau en trois dimensions de conduits de matrice extracellulaire (**Figure 33**).

Ils sont constitués d'un cœur de fibres de **collagène** (de type I, III et XIV), associées à des protéoglycans (fibromoduline, décorine, biglycan), et entourées de microfibrilles de **fibrilline** présentant l'antigène reconnu par **ERTR7**. L'architecture en tube de ces conduits est permise par une lame basale cylindrique qui entoure l'ensemble, constitué de collagène IV, de laminine 8/10 et de protéoglycans, notamment sous la forme d'héparane-sulfate (*Gretz, Anderson et Shaw, 1997 ; Sixt et al., 2005 ; Roozendaal et al., 2009 ; Malhotra et al., 2012*).

Les FRC organisent ce réseau réticulaire dans une large partie du ganglion lymphatique, dans le paracortex, la crête corticale et les régions interfolliculaires. Ce réseau forme un ensemble de conduits de matrice qui sont entièrement recouverts par la face concave des FRC jointifs entre eux. Les cellules immunitaires se retrouvent autour de ces conduits, à l'intérieur de « **corridors** » dont les murs sont délimités par les faces convexes des FRC et n'interagissent pas directement avec la matrice du conduit (*Willard-Marck, 2006*).

Enfin, la medulla situé à proximité du hile du ganglion est une zone riche en vaisseaux sanguins qui récupère la lymphe arrivant dans les sinus médullaires. Cette région accueille

en particulier les plasmocytes, c'est-à-dire les lymphocytes B activés et sécréteurs d'anticorps et sert d'antichambre au vaisseau lymphatique efférent.

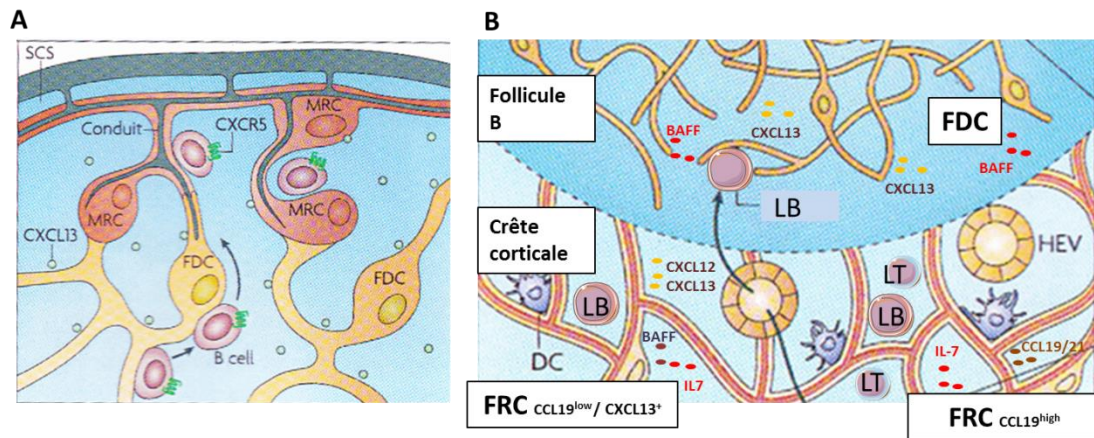


Figure 32 : Microstructure des zones corticales. (A) Interface entre le sinus sous-capsulaire (SCS) bordé par les MRC et la partie supérieure des follicules B. (B) Interface entre la crête corticale et la partie inférieure des follicules B. C'est une zone de rencontre des lymphocytes T et des lymphocytes B formée par différentes populations de fibroblastes (FDC et FRC) (Mueller et Germain, 2009 ; Katakai et al., 2004 ; Mionnet et al., 2013).

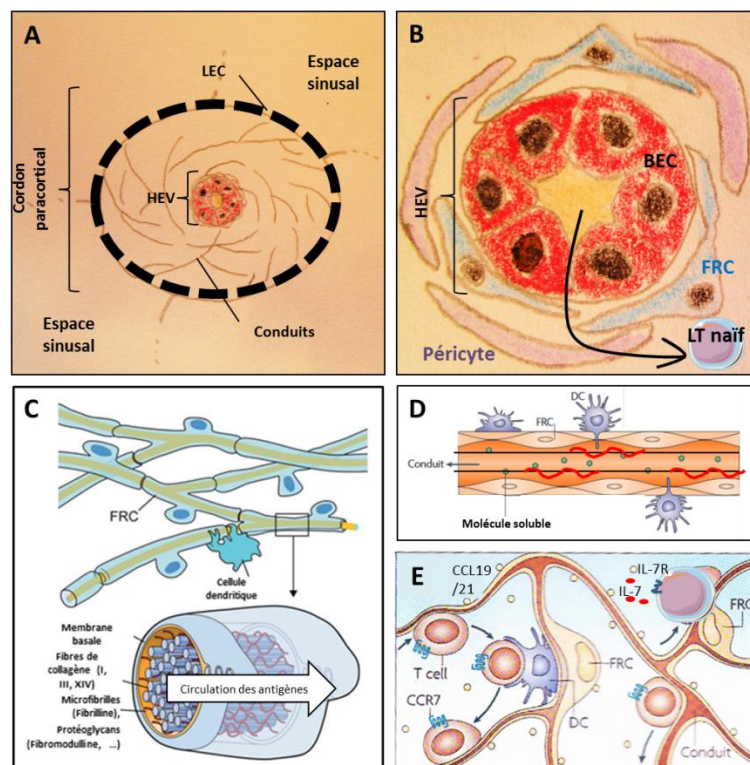


Figure 33 : Microstructure de la zone T. (A) Les cordons paracorticaux forment autour des HEV un réseau de conduits entourés par les FRC. (B) Les HEV forment un endothélium épais entouré par les FRC et les péricytes. C'est la zone d'entrée des lymphocytes naïfs. (C) Structure des conduits formés par les FRC. (D) Les cellules dendritiques récupèrent des antigènes circulant à l'intérieur des conduits entre les fibres de la matrice légende le truc rouge (. (E) Les FRC produisent les chimiokines.

CCL19 et CCL21 qui induisent le recrutement des lymphocytes T et sécrètent l'IL-7 qui favorise la survie des lymphocytes T naïfs et centraux-mémoires (Mueller et Germain, 2009).

b. Les cellules stromales organisent la structure du ganglion

La structure du ganglion lymphatique repose sur des cellules endothéliales et des cellules mésenchymateuses. Les cellules mésenchymateuses constituent un réseau de conduits de matrice extracellulaire formé par les MRC au niveau du plancher du sinus marginal, par les FDC dans les follicules et par les FRC dans le paracortex et les zones entourant les follicules telles que la crête corticale et les zones interfolliculaires. Les cellules endothéliales constituent le réseau de HEV et de sinus lymphatiques, respectivement formés par les cellules endothéliales sanguines (BEC) et les cellules endothéliales lymphatiques (LEC).

Ces différentes populations peuvent se distinguer grâce à deux marqueurs lymphatiques : la glycoprotéine podoplanine (PDPN, appelée aussi GP38) et la molécule d'adhésion PECAM-1 (*Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule*/ CD31). Les FRC et les MRC, d'origine commune, sont les cellules **GP38⁺ CD31⁻** ; les LEC sont **GP38⁺ CD31⁺** et les BEC sont **GP38⁻ CD31⁺**. Les FDC sont des cellules GP38^{low}. Elles sont distinctes des **cellules doubles-négatives** parmi lesquelles on retrouve les **cellules périvasculaires Itgα7⁺** et des **fibroblastes exprimant AIRE** essentiellement retrouvés dans les zones péri-folliculaires (Turley et al., 2010 ; Malhotra et al., 2012).

Les cellules endothéliales

- Les LEC (**GP38⁺ CD31⁺**) forment la paroi des vaisseaux lymphatiques afférents et efférents, ainsi que des sinus lymphatiques qui traversent le ganglion : sinus marginal, sinus transverses et sinus médullaires. Leur paroi constituée d'une monocouche de cellules endothéliales est suffisamment lâche pour laisser traverser facilement les antigènes, chimiokines, cytokines et les cellules. Les LEC participent au maintien des lymphocytes T naïfs en produisant de l'IL-7 (Malhotra et al., 2012).
- Les BEC (**GP38⁻ CD31^{high}**) constituent la paroi des HEV, dont la paroi est plus épaisse que celle des capillaires d'autres organes, ainsi que d'autres vaisseaux sanguins, plus larges, nombreux dans la médulla. Les BEC expriment des ligands des récepteurs d'installation (*homing*) des lymphocytes, en particulier des immunoglobulines telles que **PECAM-1/CD31** (Malhotra et al., 2012), ou des complexes glycoprotéiques tels que l'adressine **PNAd** (dont la sialomucine CD34 fait partie) exprimée au niveau des HEV (Streeter et al., 1988 ; Berg et al., 1991 ; Butcher et Picker, 1996).

Les cellules mésenchymateuses

- Les **cellules péri-vasculaires** forment un ensemble de cellules caractérisées notamment par le marqueur **Itga7** (*Malhotra et al., 2012 ; Rodda et al., 2018*). Elles comprennent les **péricytes contractiles** autour des HEV (*Malhotra et al., 2012*).
 - Deux populations de péricytes ont été caractérisées plus récemment, confirmant l'existence d'une population spécifique de péricytes située autour des HEV (**CD36⁺**), et une population de péricytes enveloppant les vaisseaux de la capsule et du hile (**NG2⁺**) (*Eom et al., 2020*).
- Les **cellules adventitielles CD34⁺** retrouvées autour des vaisseaux sanguins plus gros dans la medulla et dans la capsule du ganglion (*Rodda et al., 2018 ; Pezoldt et al., 2018*)
- Les **TRC (T-Zone Reticular Cells)** sont les FRC de la zone paracorticale. Ils font l'objet d'une description structurelle et fonctionnelle en **Partie III.B.**
- Les **MRC** sont des fibroblastes réticulaires GP38⁺ CD31⁻ **MADCAM-1⁺** qui sécrètent le **RANKL/TNFSF11** favorisant la survie des lymphocytes B (*Katakai et al., 2008 ; Rodda et al., 2018*). Il s'agit de la première population fibroblastique rencontrée par les antigènes et cellules arrivant par les vaisseaux afférents. Conjointement aux FDC, ils expriment la chimiokine **CXCL13** qui joue un rôle majeur dans le développement du ganglion et permet l'attraction des lymphocytes B dans les follicules (*Fletcher et al., 2015*).
- Les **FDC** sont les principales cellules mésenchymateuses des follicules CD31⁻ CD35⁺ GP38^{low}. Elles assurent le recrutement et le maintien des lymphocytes B dans le follicule par la sécrétion de **CXCL13** et de **BAFF (B-Cell activating factor)** et expriment des récepteurs Fc (CD16, CD23 et CD32) et du complément (CD21 et **CD35**) qui leur permettent de fixer les antigènes sous la forme de complexes immuns pour activer les LB (voir **Partie III.A.3**) (*Mueller et Germain, 2009*).
- Les **MedRC (Medullary Reticular Cells)** forment un réseau de fibroblastes réticulaires GP38⁺ CD31⁻ dans le parenchyme médullaire qui sécrètent BAFF, CXCL12 et l'**IL6**. Par la sécrétion d'IL6, les MedRC favorisent la différenciation et le maintien des plasmocytes dans la medulla (*Huang et al., 2018*).

Des variations entre les ganglions drainant différents tissus sont toutefois observées, notamment entre les ganglions de peau (p-LN) et les ganglions mésentériques (m-LN). Les FRC conservent leurs spécificités en termes de propriétés et d'expression génique par rapport aux autres cellules stromales du ganglion, quelle que soit sa localisation (*Malhotra et al., 2012*). Cependant, les FRC peuvent avoir des caractéristiques plus ou moins marquées selon les ganglions considérés. Ils sont plus nombreux dans les p-LN que dans les m-LN (*Fletcher et al., 2011*). Les FRC des p-LN expriment davantage de cytokines inflammatoires telles que l'IL-6, qui peuvent être la conséquence de la différence d'exposition à certains antigènes selon la localisation du ganglion (*Fletcher et al., 2011*). Les m-LN sont en effet

continuellement exposés à des motifs associés aux pathogènes issus du microbiote et sont marqués par une situation de tolérance immunologique avec de plus nombreux T régulateurs (*Hadis et al., 2011*). Le microbiote intestinal induit en fait une reprogrammation transcriptionnelle qui conduit à la répression des gènes associés à l'inflammation dans les cellules mésenchymales et les cellules dendritiques des m-LN (*Pezoldt et al., 2018*).

B. Les FRC façonnent le ganglion lymphatique et la réponse immunitaire

Les Cellules Réticulaires Fibroblastiques (**FRC**) organisent la structure réticulaire de plusieurs zones du ganglion lymphatique. Il s'agit d'une population stromale de première importance dans la régulation de l'architecture ganglionnaire au cours de la réponse immunitaire. Les FRC façonnent l'architecture du ganglion lymphatique, régulent ses propriétés biomécaniques, et contrôlent la réponse immunitaire pendant tout son déroulement.

1) Origine et hétérogénéité des FRC

a. Le développement des FRC

Les FRC sont les cellules stromales les plus nombreuses du ganglion lymphatique, pouvant représenter 20 à 50% de la portion mésenchymateuse. Au cours du développement embryonnaire, elles sont issues de la différenciation des **LTo** (***Mesenchymal lymphoid tissue organizer cells***), des cellules précurseurs qui peuvent être spécifiées à partir d'adipocytes ou d'autres cellules mésenchymateuses à partir de signaux issus de l'environnement proche tels que la lymphotoxine β (*Bezenec et al., 2012*) ou l'acide rétinoïque provenant des neurones (*Van de Pavert et al., 2009*) (**Figure 7**). Les LTo entrent alors dans un processus de maturation durant lequel ils deviennent réactifs à un ensemble de signaux dont la sensibilité est conservée dans les FRC adultes.

Le ganglion lymphatique est en effet issu d'une structure archaïque (*anlage*) qui s'établit à partir du dialogue entre les LTo et des cellules de nature hématopoïétique. Les LTo sécrètent la chimiokine CXCL13 qui attire les **LTi** CXCR5⁺ (***Lymph node tissue inducer cells***). Les LTi font partie des cellules lymphoïdes innées. Elles produisent différents signaux dont la lymphotoxine $\alpha 1\beta 2$ et RANKL (*Onder et Ludewig, 2018*) (**Figure 7**). Les LTo qui possèdent les récepteurs LT β R et RANK répondent à ces signaux par une maturation au cours de laquelle ils expriment les chimiokines CCL19, CCL21 et les molécules d'adhésion VCAM1 et ICAM1 (*Fletcher et al., 2015*). Cela conduit progressivement à l'accumulation des lymphocytes. Les LTo entament de leur côté un processus de différenciation et donnent un premier lignage qui maintient l'expression de CXCL13, d'abord avec les MRC puis les FDC. Les LTo matures donnent en parallèle un second lignage, les FRC, qui maintient l'expression de CCL19 et CCL21. La formation des conduits de matrice est l'étape suivante, qui nécessite une coopération étroite entre les FRC et les lymphocytes. L'apport de nouveaux signaux par ces

derniers (TNF α , lymphotoxine α) induit la formation par les FRC des fibres réticulaires contenant l'antigène reconnu par l'anticorps ERTR7 (**Figure 34**). En dégradant la matrice pré-existante, les FRC entourent les fibres néo-formées et forment les conduits (*Katakai et al., 2004*). A la naissance, les FRC forment un réseau dense dans la zone paracorticale, riche en HEV, lieu d'entrée des lymphocytes et zone d'installation des cellules dendritiques, alors que le réseau dans les zones périphériques est encore clairsemé. Ce n'est qu'au début du développement post-natal que les FDC se différencient à l'arrivée de lymphocytes B matures et la réception d'antigènes provenant du sinus marginal. Les FDC viennent alors remplacer les FRC autour de leurs propres conduits, et connectent progressivement les conduits de la zone paracorticale au réseau sous-capsulaire (*Bajenoff et Germain, 2009*) (**Figure 34**).

Dans l'organisme adulte, on se retrouve ainsi avec une population de FRC bien différenciée et formant des niches distinctes des autres cellules mésenchymateuses du ganglion. Les FRC sont des myofibroblastes caractérisés par l'expression de récepteurs hérités des LTo matures, dont LT β R, la podoplanine, des immunoglobulines VCAM1 et ICAM1 et par les chimiokines CCL19 et CCL21. Ces molécules sont impliquées dans la plupart des fonctions des FRC. La spécification des FRC pendant le développement embryonnaire nécessite la coopération entre deux voies indépendantes, la lymphotoxine par LT β R, et la signalisation YAP/TAZ, qui empêchent le retour à un état adipeux, et permet l'acquisition et le maintien des propriétés myofibroblastiques et de la sécrétion des chimiokines (*Choi et al., 2020*).

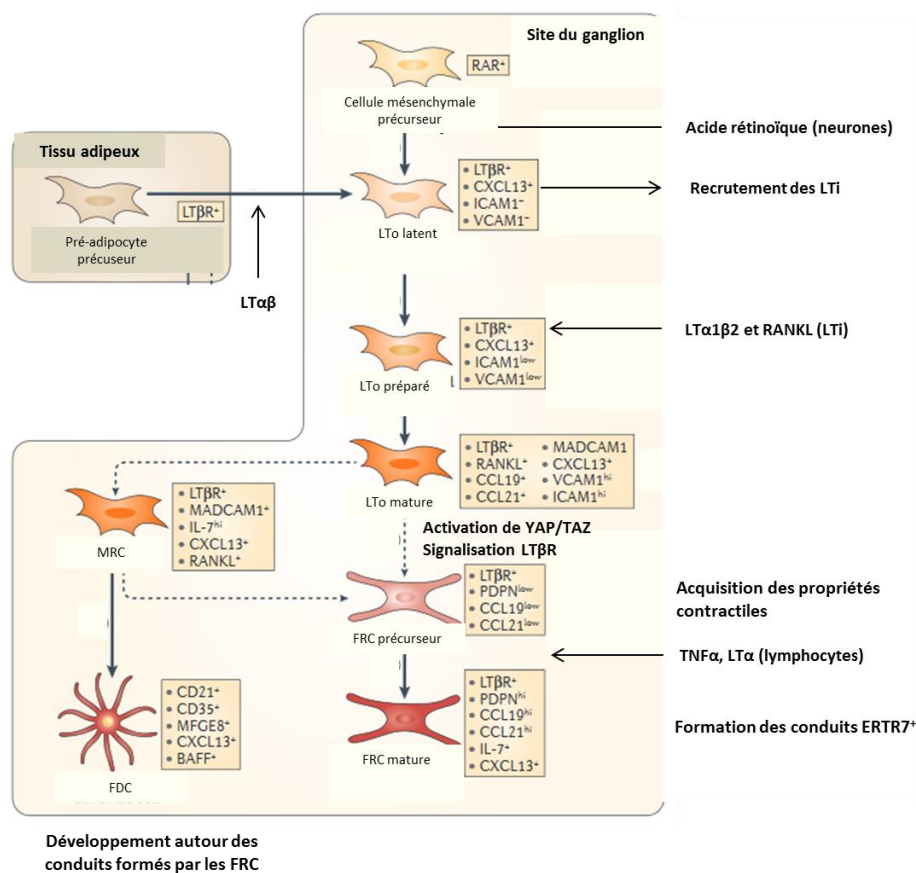


Figure 34 : Le développement des FRC, des MRC et des FDC dans le ganglion. D'après Fletcher et al., 2015. Les cellules mésenchymateuses organisatrices (LTo) sont induites à partir d'autres cellules mésenchymateuses ou d'adipocytes. Ces cellules réagissent à des signaux caractéristiques de cellules lymphoïdes, tels que la lymphotoxine ou le RANKL (Onder et Ludwig, 2018). Les FRC se différencient à partir de précurseurs déterminés par la coopération de deux voies de signalisation, LT β R et YAP/TAZ (Choi et al., 2020), acquièrent leurs propriétés contractiles puis forment les conduits de matrice (Katakai et al., 2004).

b. Hétérogénéité des FRC

Cependant, les FRC ne forment pas une population homogène. Il existe des sous-populations spécifiques de niches avec des marqueurs et des propriétés propres.

Les FRC se répartissent en six populations au moins (Mionnet et al., 2013 ; Rodda et al., Pezoldt et al., 2018 ; Huang et al., 2018) (**Figure 33 ; Figure 35**). Ce sont les **TRC** des zones paracorticales et périphériques, et d'autres populations mises en évidence par scRNAseq : les cellules stromales **Inmt**⁺ (Indoléthylamine N-méthyltransférase), les cellules stromales **Nr4a1**⁺ (Nuclear receptor subfamily 4 group A member 1), et les cellules stromales **CD34**⁺.

1) Hétérogénéité des TRC

Les TRC se répartissent en trois ou quatre groupes (Rodda et al., 2018 ; Pezoldt et al., 2018) :

- Les **TRC CCL19**^{high}, qui forment les conduits dans le paracortex.

Ils expriment CCL19. Ce sont les FRC qui forment les conduits dans les cordons paracorticaux, exprimant le collagène caractéristique du cœur des conduits qui est le collagène XIV et la fibromoduline (Malhotra et al., 2012).

- Les **TRC Ch25h**⁺ **CCL19**^{low} **CXCL13**⁺ qui sont au contact des follicules B, associés ou non à une population de FRC CD21⁻ CXCL13⁺ dans les follicules B.

Les TRC Ch25h CCL19^{low} sont situés au contact des follicules B et dans les zones interfolliculaires. Ils ont une signature transcriptionnelle caractérisée par une faible expression de CCL19 qui les rapproche des FDC, puisqu'ils expriment la cytokine BAFF permettant le maintien des lymphocytes B, mais qui les classe tout de même parmi les FRC car ils expriment CCL21 et l'IL-7, permettant le recrutement et le maintien des lymphocytes T naïfs. Cette population pourrait participer à l'activation des lymphocytes B, qui nécessite la coopération de lymphocytes T se différenciant en lymphocytes T folliculaires helpers (T_{FH}) dans les centres germinatifs (Fazilleau et al., 2009). Les TRC Ch25h sont en effet à l'interface de rencontre de la zone B et de la zone T, et semblent ainsi correspondre aux caractéristiques stromales de la crête corticale précédemment décrite (Katakai et al., 2004), lieu privilégié d'entrée des lymphocytes T et B naïfs et de rencontre pour l'activation des lymphocytes T et B, dont ces TRC pourraient être l'une des composantes mésenchymateuses. Les TRC CCL19^{low} pourraient également contenir une population de FRC

décrite par ailleurs comme induite par la lymphotoxine β et émergeant au cours de l'inflammation (*Mionnet et al.*, 2013). Elles ont en commun l'expression de CXCL13 et de BAFF, et n'expriment pas CD21, ce qui les distingue bien des FDC.

- Les **TRC CXCL9⁺** qui partagent une signature d'activation et d'immunomodulation.

Une autre composante possible de ces zones péri-corticales serait les TRC CXCL9⁺ que l'on trouve également dans les zones interfolliculaires. Ils sont aussi présents à l'intérieur de la zone T. Comme tous les FRC, ils expriment CCL19, CCL21 et l'IL7. Ils sont caractérisés par l'expression des chimiokines CXCL9 et CXCL10 et expriment le MHC de classe II ainsi que d'autres gènes impliqués dans la tolérance périphérique. Cette signature transcriptionnelle laisse penser que ce sous-type serait issu de l'activation des TRC CCL19^{high} par la réponse interféron anti-virale connue pour induire ces chimiokines. L'augmentation de CXCL9 parmi plusieurs populations stromales du ganglion est ainsi caractéristique de la réponse à une infection virale dans la peau (*Gregory et al.*, 2017). CXCL9 et CXCL10 permettent le recrutement des lymphocytes T CD8⁺ centraux-mémoires (*Sung et al.*, 2012), ce qui est là encore cohérent avec le fait que l'on retrouve plus de lymphocytes mémoires dans la crête corticale (*Katakai et al.*, 2004).

L'hétérogénéité phénotypique des TRC est ainsi caractérisée par la présence d'une population (**TRC CCL19^{high}**) qui forme le réseau de conduits dans le paracortex et assure le maintien des lymphocytes T naïfs, et de deux populations de niches, l'une potentiellement importante pour les interactions entre lymphocytes B et lymphocytes T (**TRC CCL19^{low} Ch25h⁺**) et l'autre correspondant à un état d'activation potentiellement impliquée dans le maintien de la tolérance des lymphocytes T à l'état homéostatique et le repositionnement des lymphocytes T mémoires pendant la réponse immunitaire secondaire (**TRC CXCL9⁺**). La fonction de chacune de ces populations, bien que corroborée par la signature transcriptionnelle de chacune et un ensemble d'études portant sur la répartition des lymphocytes dans le ganglion, doit encore faire l'objet d'investigations.

2) Les autres populations de FRC et les FRC activés

Il existe aussi d'autres populations de fibroblastes réticulaires caractéristiques de certaines structures et niches ganglionnaires. Il s'agit des **FRC Inmt⁺** que l'on trouve dans la médulla, des **FRC Nr4a1⁺** identifiés dans la médulla et le paracortex et des **FRC CD34⁺** qui forment eux-mêmes un ensemble hétérogène de cellules adventitielles que l'on retrouve autour des gros vaisseaux dans la médulla et de fibroblastes dans la capsule ganglionnaire.

Les FRC Inmt⁺ sont des fibroblastes qui sont situés dans les cordons médullaires et qui comprennent les MedRC que j'ai décrits plus haut. Le marqueur Inmt n'est pas spécifique de cette population mais son expression est particulièrement enrichie dans ces cellules (*Rodda et al.*, 2018). Ces cellules expriment fortement CXCL12, mais également CXCL13 et TNFSF13b (*tumor necrosis factor ligand superfamily member 13*) qui favorisent le recrutement des

plasmocytes et leur sortie du ganglion vers le vaisseau efférent (Rodda et al., 2018 ; Huang et al., 2018).

Les FRC Nr4a1⁺ sont des fibroblastes activés et disséminés dans le ganglion, en particulier dans la médulla et le paracortex (Rodda et al., 2018 ; Pezoldt et al., 2018). Le marqueur Nr4a1 est ici associé à un profil transcriptionnel dans lequel les gènes associés à la réponse inflammatoire précoce (**Fosb**, **NFκB**) sont surexprimés par rapport aux autres populations du ganglion (Rodda et al., 2018).

Les cellules stromales CD34⁺ sont décrites dans les p-LN autour des gros vaisseaux dans la médulla, elles sont alors appelées cellules adventitielles, distinctes des cellules endothéliales lymphatiques car **PDPN⁺ BST1⁻ACTA2⁻CD31⁻CD34⁺**, ou comme fibroblastes de la capsule ganglionnaire, un phénotype attesté par l'expression d'un ensemble de gènes de la matrice extracellulaire (**Col5a3**, **Fbln1**, ...) (Rodda et al., 2018). Il semble toutefois que la diversité de ces cellules CD34⁺ soit plus vaste que cette description initiale et surtout que le rôle et la proportion des cellules CD34⁺ évolue entre les ganglions lymphatiques. Pezoldt et al., 2018 décrit ainsi quatre populations de cellules CD34⁺ se différenciant par des signatures transcriptionnelles et ne se retrouvant pas dans tous les ganglions. La population **CD34⁺ Aldh1a2⁺** est davantage retrouvée dans les m-LN et semble caractéristique de l'état d'activation et des propriétés immunomodulatrices de ces ganglions. Les signatures transcriptionnelles associées aux cellules stromales CD34⁺ sont également enrichies dans les ganglions métastatiques de mélanome (Eom et al., 2020).

De manière plus générale, des sous-populations de FRC peuvent acquérir des marqueurs suite à l'activation de la réponse immunitaire ou du développement tumoral. Au cours de la réponse immunitaire, les FRC surexpriment également la **podoplanine** (Acton et al., 2014 ; Astarita et al., 2015). Par ailleurs, au cours de la formation des centres germinatifs, les FDC ou les FRC peuvent se différencier en **cellules réticulaires exprimant CXCL-12 (CRC)** qui régulent l'architecture de la zone de différenciation des plasmocytes (Bannard et al., 2013 ; Rodda et al., 2018). Les cellules Nr4a1⁺ et les cellules CD34⁺ Aldh1a2⁺ sont deux exemples de cellules qui émergent dans les ganglions activés (Rodda et al., 2018 ; Pezoldt et al., 2018). Enfin, les cellules CD34⁺ et d'autres FRC acquièrent également le marqueur FAP dans les ganglions métastatiques, ce qui soutient l'idée qu'ils peuvent être à l'origine de différentes populations de CAF (Eom et al., 2020).

Les FRC représentent donc un ensemble de fibroblastes formant un réseau réticulaire hétérogène et spécifique des zones et des niches dans lesquels ils sont situés. Ils peuvent réagir aux signaux d'activation propre à la réponse immunitaire, en surexprimant certains marqueurs voire en se différenciant en de nouvelles sous-populations. Malgré cette diversité, ils partagent un ensemble de fonctions dans la régulation de l'activité immunitaire du ganglion et dans son architecture.

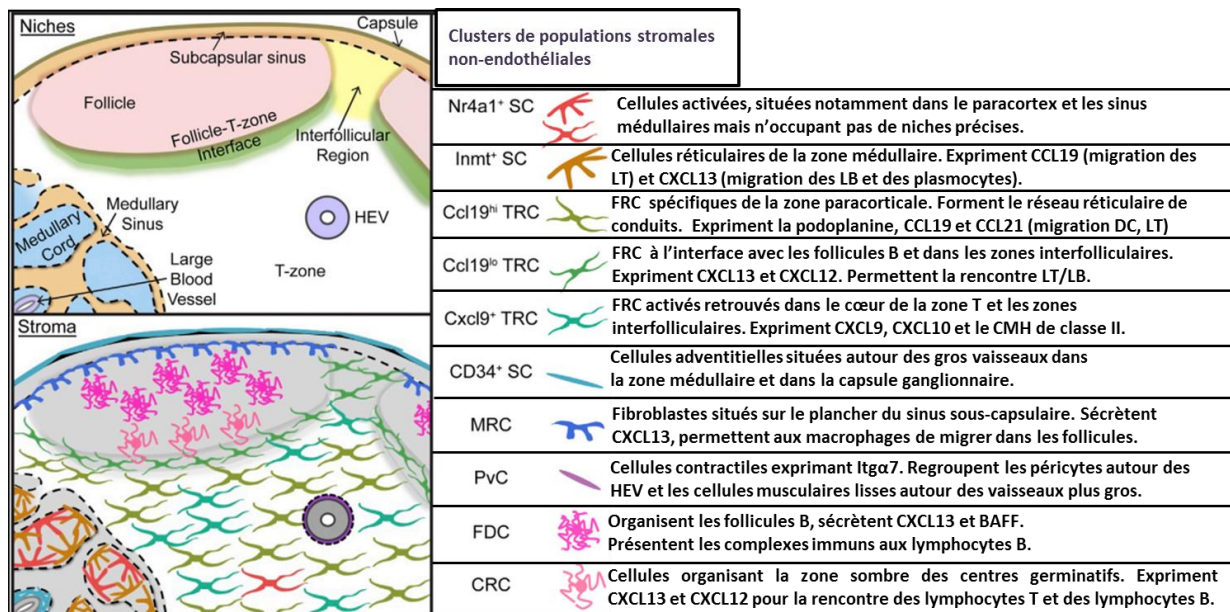


Figure 35 : Des populations mésenchymales spécifiques de niches (D'après Rodda et al., 2015 et Rodda et al., 2018).

3) Les rôles des FRC dans le ganglion en homéostasie

Les FRC jouent de nombreux rôles dans le ganglion en homéostasie. Ils forment un réseau réticulaire de conduits permettant la circulation des molécules à l'intérieur (cytokines, chimiokines, antigènes) et des cellules autour. Les FRC offrent ainsi un système de routes qui permet de diriger les cellules immunitaires, de les maintenir stables quelques heures dans une zone donnée en assurant leur survie, et de permettre la rencontre de l'antigène pour leur activation éventuelle.

a. Les FRC permettent la survie et la circulation des cellules immunitaires

Les dynamiques cellulaires à l'intérieur du ganglion sont de mieux en mieux comprises, notamment grâce à l'utilisation de techniques de microscopie de précision (confocale, électronique) et l'émergence de la microscopie intravitale multi-photons qui permet de mieux rendre compte des interactions cellules-cellules à petite échelle (Bajenoff et Germain, 2007). L'utilisation de ces techniques d'imagerie permet justement de se rendre compte que le réseau formé par les FRC et les FDC est inter-communicant et régule le trafic des lymphocytes T et B (Bajenoff et al., 2006). Ainsi les lymphocytes T et les lymphocytes B naifs sur tous deux capables de migrer sur le réseau de FRC depuis les HEV. Les lymphocytes T se maintiennent dans le paracortex et les lymphocytes B gagnent les follicules primaires par la suite.

Les FRC sont donc les principales cellules stromales de la zone T avec qui les lymphocytes T naifs et les cellules dendritiques adhèrent. Dans cette zone, les **TRC CCL19^{high}** sécrètent de hauts niveaux de **CCL19**, de **CCL21** et d'**IL7**, qui permettent le recrutement et la survie des lymphocytes T naifs et centraux-mémoires **IL7R⁺ CCR7⁺** (Link et al., 2007 ; Asperti-Boursin et

al., 2007) et des cellules dendritiques matures CCR7⁺ (**Figure 36A**). Les chimiokines peuvent pénétrer dans les HEV et être captées par les BEC, permettant l'arrêt des cellules immunitaires, le renforcement des adhésions de forte énergie (LFA-1/ICAM1), et la transmigration vers le parenchyme réticulaire. Les FRC expriment les immunoglobulines VCAM1 et ICAM1 qui permettent l'attachement des lymphocytes exprimant les intégrines $\alpha 4\beta 1$ et LFA-1. La migration des cellules dendritiques sur le réseau de FRC est permise par l'interaction du récepteur lectine de type C (**CLEC2**, codé par le gène **CLEC1B**) avec la podoplanine des FRC (*Acton et al.*, 2012).

Les FRC des zones périphériques, en particulier les **FRC CCL19^{low} CXCL13^{high}** de la crête corticale et des follicules (*Katakai et al.*, 2004 ; *Mionnet et al.*, 2013 ; *Rodda et al.*, 2018) soutiennent par ailleurs la survie, la localisation et l'activation des lymphocytes B (**Figure 36B**). Ces FRC sécrètent en effet un plus large panel de chimiokines, dont CXCL12, CXCL13 et CCL21 qui permet la rencontre des lymphocytes B, des cellules dendritiques, et des lymphocytes T naïfs ou activés (T_{FH}) au cours de la maturation des centres germinatifs.

On voit ainsi que l'hétérogénéité des FRC à l'échelle de l'organe mais aussi dans certaines zones, notamment aux interfaces entre les différents compartiments, permet d'organiser la rencontre et la coopération des deux populations lymphocytaires ségréguées dans des compartiments différents. Le maintien de la localisation des cellules immunitaires et leur mouvement entre différentes zones de l'organe est en fait permis par les gradients moléculaires résultant de la sécrétion localisée des chimiokines et du haut niveau de compartimentalisation de l'organe. Les différentes populations de FRC permettent ainsi la mise en place d'une part d'un gradient croissant de chimiokines CCL21 et CCL19 entre les HEV et le parenchyme de la zone T, qui permet le recrutement des lymphocytes T dans le paracortex, et d'autre part d'un gradient croissant dans les zones folliculaires et périfolliculaires des chimiokines CXCL12 et CXCL13 qui permet le recrutement des lymphocytes B et T dans ces zones.

Toutefois, en situation homéostatique, le maintien des lymphocytes dans le ganglion est toujours transitoire. C'est un processus d'immuno-surveillance qui suppose que les lymphocytes ne restent pas plus de quelques heures dans le ganglion, et doivent au contraire sortir et re-circuler entre la lymphe, le sang et les organes lymphoïdes secondaires. La sortie des lymphocytes nécessite donc d'autres gradients de chimiokines. Cette sortie se réalise par les sinus paracorticaux et médullaires. Elle est induite par un gradient de **Sphingosine-1-Phosphate** produit par les cellules endothéliales lymphatiques, qui est perçu par les lymphocytes T grâce au récepteur S1P1R. De manière intéressante, les récepteurs **S1P1R** et CCR7 agissent sur la motilité des lymphocytes via les mêmes protéines G, ce qui laisse supposer que le maintien transitoire des lymphocytes résulte d'un équilibre entre la force du signal pro-maintien issu des FRC (CCL21, CCL19) et des signaux pro-sortie issus de la lymphe (*Cyster et Schwab*, 2012). Dans la zone médullaire, les **FRC Inmt⁺** favorisent la survie

et sortie des plasmocytes par la sécrétion de **CXCL12** et **CXCL13** vers les vaisseaux lymphatiques efférents.

b. Les FRC permettent la circulation des molécules à l'intérieur de conduits de matrice extracellulaire.

Le ganglion lymphatique est une éponge qui filtre la plupart des molécules drainées par la lymphe afférente. Ce filtre est principalement assuré par le réseau de MRC et par les macrophages de la zone sous-capsulaire (*Roozendaal et al., 2009*). Ils ne donnent accès au réseau de FRC sous-jacent que pour les molécules de moins de 70kDa (*Gretz et al., 2000 ; Sixt et al., 2005 ; Roozendaal et al., 2009*). Cela permet aux pathogènes et aux larges antigènes, comme le LPS, de ne pas rentrer dans le cortex du ganglion et de ne pas perturber l'activation de la réponse immunitaire. Ce filtre bloque également la plupart des vésicules extracellulaires issues des tumeurs de mélanome (*Pucci et al., 2016*). Cependant, ce processus de filtration concerne les molécules provenant du sinus marginal. Des molécules produites dans le parenchyme des lobules ganglionnaires comme les IgM (>70kDa) issues de la réponse B dans les follicules sont capables d'emprunter les conduits (*Thierry et al., 2018*). Dans tous les cas, les antigènes plus petits sont canalisés efficacement du sinus marginal vers les HEV, ou vers les corridors corticaux et paracorticaux, où ils sont pris en charge par les cellules présentatrices d'antigène. De la même manière, les chimiokines sécrétées par les fibroblastes sont canalisées vers les HEV et permettent le recrutement des lymphocytes naïfs (*Gretz et al., 2000*)

La structure des conduits est assurée par la morphologie polarisée des FRC de type **apico-basale**. En effet, les FRC s'organisent autour des conduits selon les mêmes caractéristiques qu'un épithélium unistratifié. Les FRC interagissent entre eux dans le sens longitudinal du conduit grâce à des jonctions adhérentes parmi lesquelles on trouve la cadhérine-11 (*Malhotra et al., 2012*). Sur la face des FRC en contact avec les lymphocytes (*côté apical*), la matrice est très fine, essentiellement composée de quelques fibres de collagène IV qui facilitent la migration des lymphocytes et présentent des chimiokines (*Yang et al., 2007 ; Roozendaal et al., 2008*). Sur la face opposée des FRC (*côté basal*), le cytosquelette de microtubules est ancré par le pôle positif aux récepteurs de la laminine via la protéine adaptatrice LL5 β (*Hotta et al., 2010 ; Martinez et al., 2019*). Les FRC sécrètent par ce moyen des fibres alignées caractéristiques des tissus conjonctifs dans le cœur du conduit (collagène I, III, XIV) et caractéristiques des lames basales épithéliales dans les couches externes du conduit (collagène IV). Les FRC sécrètent également des fibres caractéristiques de ces conduits, comme ceux de fibromoduline, mais aussi des métalloprotéinases (MMP) et des peptidases de la famille ADAMTS, assurant le renouvellement et l'entretien des conduits (**Figure 36A**).

c. Les FRC maintiennent l'intégrité des HEV

Les FRC périvasculaires possèdent des fonctions spécialisées dans le maintien de l'intégrité des HEV (**Figure 36C**). Ainsi, L'interaction CLEC2-PDPN permet le maintien de l'intégrité endothéliale pendant la migration des lymphocytes (*Herzog et al., 2013*). La molécule CLEC2 est exprimée par les plaquettes sanguines. L'interaction de CLEC2 avec la podoplanine des FRC environnants conduit à l'agrégation des plaquettes et le relargage de S1P qui vient renforcer les liaisons inter-endothéliales médiées par la VE-cadhérine. Cette interaction permet également d'éviter la perte de l'intégrité vasculaire pendant de fortes réactions inflammatoires, limite le choc cytokinique et favorise la circulation et le recrutement de macrophages pour contrer la croissance bactérienne. Elle est ainsi essentielle au maintien de l'intégrité du ganglion (*Raves et al., 2017*).

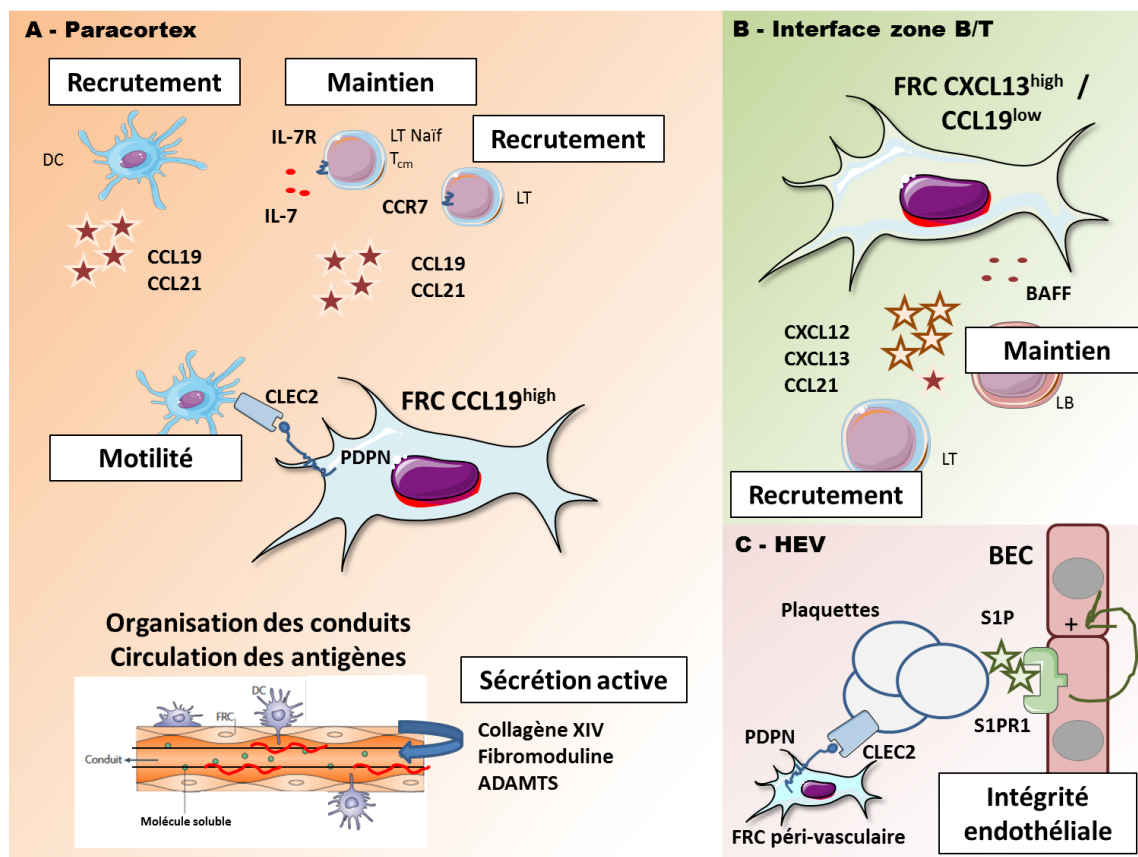
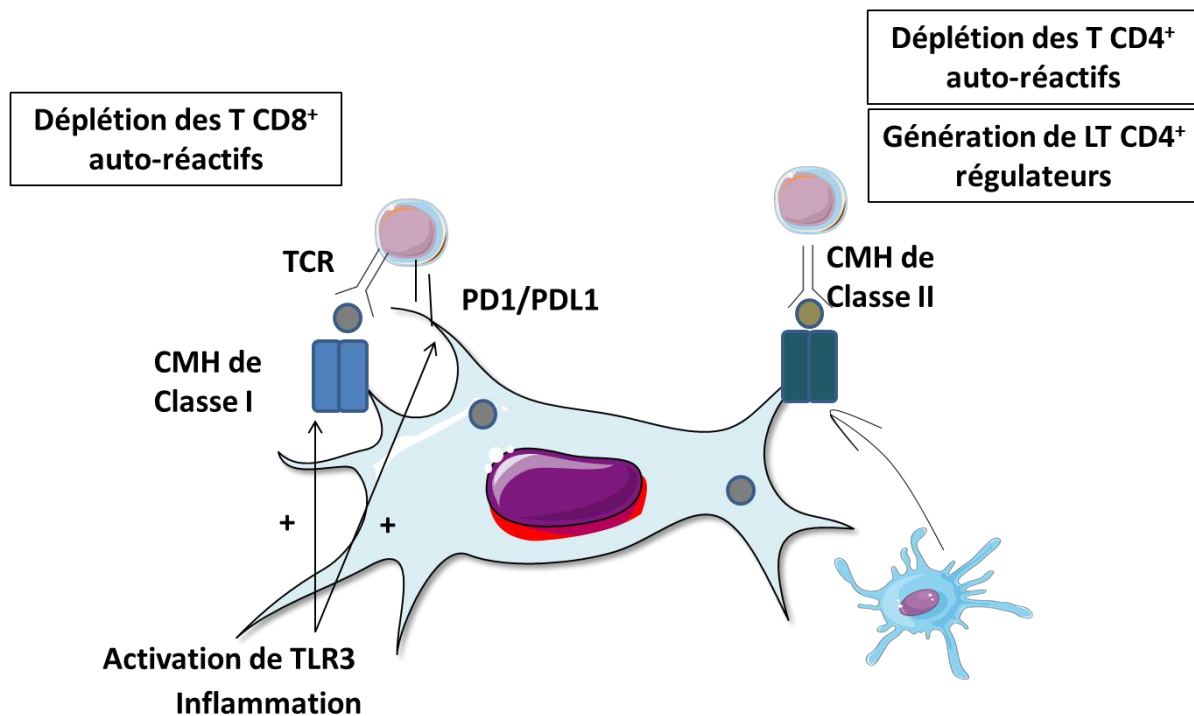


Figure 36 : Les rôles des FRC dans l'homéostasie ganglionnaire. (A) Les FRC du paracortex recrutent et maintiennent la survie des lymphocytes et des cellules dendritiques. Ils sécrètent et renouvellent les conduits de matrice extracellulaire. **(B)** Les FRC péri-folliculaires maintiennent et recrutent les lymphocytes T et B. **(C)** Les FRC périvasculaires soutiennent l'intégrité endothéliale par l'interaction CLEC2-PDPN.

d. Les FRC induisent la tolérance périphérique

Les FRC sont capables d'exprimer des auto-antigènes pour induire la délétion ou l'anergie des lymphocytes T auto-réactifs. C'est en particulier le cas de certains antigènes des mélanocytes différenciés, comme MLANA. Il semble ainsi que le ganglion constitue un environnement naturellement immunotolérant pour la plupart des antigènes de différenciation mélanocytiques, ce qui peut limiter la réponse immunitaire anti-mélanome, et en tout cas expliquer l'existence de nodules mélanocytiques bénins que l'on retrouve dans certains ganglions, qui évoluent parfois en mélanome (*Shain et al.*, 2016).

L'expression de ces auto-antigènes est gouvernée par le facteur de transcription DEAF1 (*epidermal autoregulatory factor 1 homologue*), qui est différent de AIRE mais fonctionne sur le même principe (*Fletcher et al.*, 2010). Les FRC présentent ces antigènes sur le CMH de classe I et induisent l'anergie et la délétion des lymphocytes T CD8⁺ auto-réactifs. A l'homéostasie, les lymphocytes T CD8⁺ interagissent avec les FRC qui expriment ainsi des antigènes périphériques et avec les cellules dendritiques immatures qui présentent des antigènes sur le CMH de classe I, induisant leur délétion. Dans un cadre d'activation immunitaire, suivant par exemple l'exposition à des motifs de dangers via TLR3, les FRC surexpriment les molécules de CMH de classe I ainsi que les co-récepteurs inhibiteurs CD80 et PD-L1 et induisent la tolérance des lymphocytes T CD8⁺ spécifiques d'auto-antigènes (*Turley et al.*, 2010). Les FRC sont enfin capables d'induire la tolérance des T CD4⁺ par l'acquisition de complexes CMH de classe II – auto-antigène directement des cellules dendritiques via des contacts cellules-cellules ou par vésicules extracellulaires (*Dubrot et al.*, 2014) (**Figure 37**)



- Auto-antigènes exprimés via DEAF1: *MLANA*
- Auto-antigènes transférés depuis les cellules dendritiques

Figure 37 : Les mécanismes de la tolérance périphérique induite par les FRC

Les FRC maintiennent la tolérance périphérique des lymphocytes T CD8⁺ en exprimant des auto-antigènes, en particulier de différenciation mélanocytaire tels que *MLANA*, sur le CMH de classe I. En cas d'inflammation, les FRC surexpriment le CMH de classe I et les co-récepteurs d'inhibition PDL1. Les cellules dendritiques peuvent aussi transférer le CMH de classe II sur les FRC, ce qui leur permet de déléter les lymphocytes T CD4⁺ autoréactifs et générer des lymphocytes T CD4⁺ régulateurs.

4) Les FRC régulent la réponse immunitaire et le retour à l'homéostasie

Je vais maintenant expliquer comment les propriétés des FRC sont modifiées au cours de la réponse immunitaire et comment les FRC permettent le retour à l'état homéostatique. La réponse des FRC à l'infection consiste notamment à permettre le recrutement et l'expansion clonale des lymphocytes, à assurer le gonflement du ganglion, le remodelage des structures internes, et le retour à l'état homéostatique en induisant la tolérance périphérique, la recirculation des lymphocytes naïfs et le maintien de lymphocytes mémoires.

a. Les FRC régulent l'élasticité du ganglion pendant l'infection

Lors de la réponse immunitaire, le ganglion gonfle pour accommoder le recrutement et la prolifération des cellules immunitaires, en particulier l'expansion clonale des lymphocytes.

Pour pallier à des dégâts tissulaires, les FRC sont les acteurs de ce changement en augmentant l'élasticité du ganglion.

L'élasticité du ganglion est le résultat d'au moins trois mécanismes biologiques :

- L'inhibition de la contraction spontanée des FRC
- L'induction de la prolifération des FRC
- Le maintien des conduits de matrice extracellulaire

Ces mécanismes sont gouvernés par les interactions entre les cellules dendritiques, les lymphocytes T et les FRC. Parmi ces interactions, la liaison de CLEC2-podoplanine entre les cellules dendritiques et les FRC joue un rôle majeur.

L'inhibition de la contractilité des FRC

Lors d'une infection, les cellules dendritiques issues du site d'inflammation entrent en contact avec les LEC et les FRC qui expriment la podoplanine, ce qui facilite leur migration jusqu'à la zone T.

La podoplanine est une glycoprotéine transmembranaire de type I de type sialomucine, dont la partie extracellulaire comprend de multiples domaines « *Platelet aggregation-stimulating domain* » (PLAG) contenant des résidus sérine-thréonines pouvant être O-glycosylés et qui sont reconnus par CLEC2 (Kato et al., 2008) (**Figure 38A**). Elle comprend également un domaine transmembranaire permettant la liaison des protéines ERM (Martin-Villard et al., 2006). La podoplanine peut également interagir avec d'autres protéines membranaires comme CD44, une interaction qui favorise la migration cellulaire dans les lignées tumorales agressives (Martin-Villard et al., 2010) ou avec CD9 via leurs domaines transmembranaires (Nakazawa et al., 2008). L'expression de la podoplanine est régulée par un ensemble de facteurs pouvant être d'origine inflammatoire ou desmoplastique, à l'instar de l'IL6, de l'IL1 ou du TGFβ (Astarita et al., 2012).

A l'état homéostatique, la podoplanine lie les protéines ERM, ce qui permet l'activation de la voie RhoA/ROCK et la phosphorylation des chaînes légères de la myosine II (MLC2) et donc la contraction du cytosquelette d'actomyosine des FRC. L'activité de RhoA est contrôlée dans ce contexte par ARHGEF2 (Acton et al., 2014). Lorsque la podoplanine interagit avec CLEC2, cela provoque le déplacement de la podoplanine dans des radeaux lipidiques riches en cholestérol, conduisant au découplage de la podoplanine et des protéines ERM (Acton et al., 2014). De manière intéressante, c'est la partie transmembranaire de la podoplanine qui est impliquée dans ce découplage, ce qui suppose une interaction inhibitrice avec un de ses partenaires, parmi lesquels CD44 est connu pour se localiser dans les radeaux lipidiques. Les mécanismes précis induisant le découplage reste encore à élucider. Le découplage conduit à la désactivation de RhoA, donc à la perte de contractilité médiée par la phosphorylation de MLC2 et à la diminution de l'activité de YAP (**Figure 38B**) (Astarita et al., 2015).

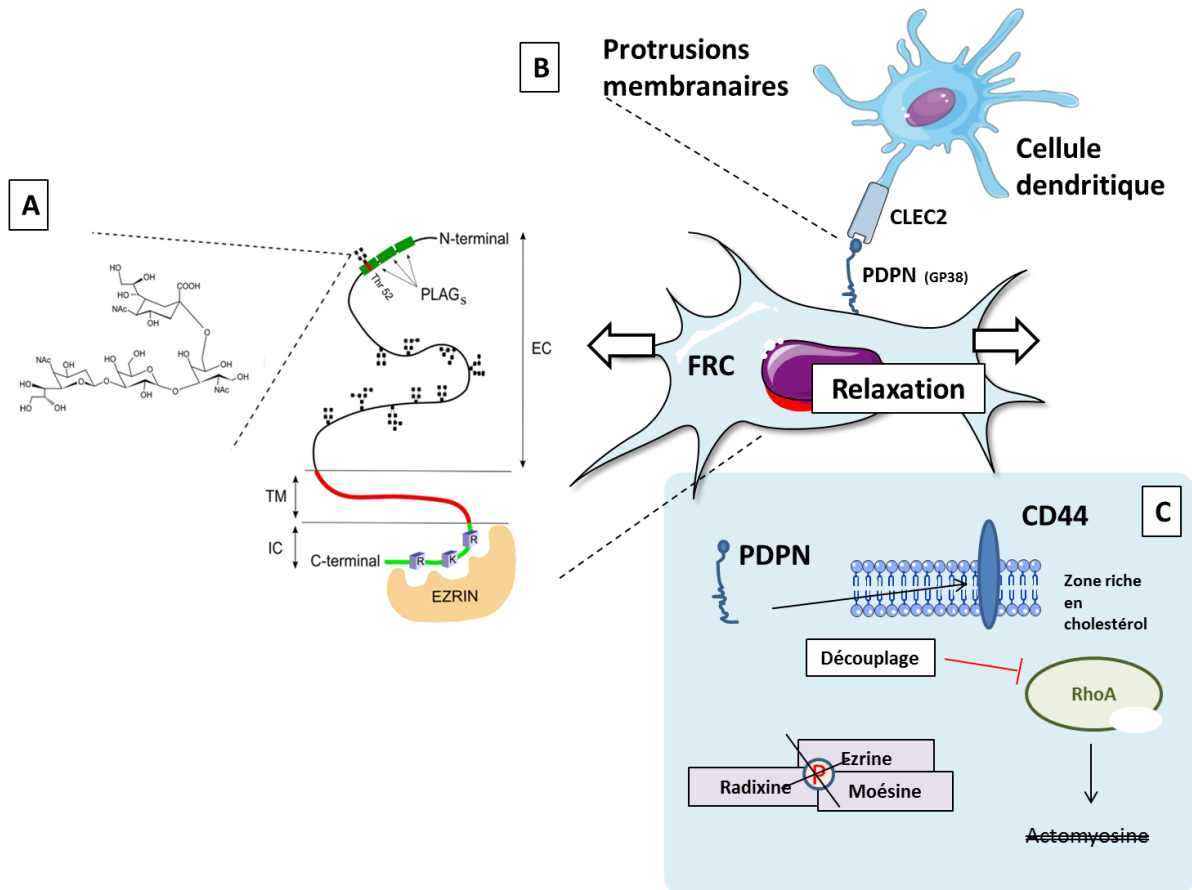


Figure 38 : Le dialogue PDPN-CLEC2 entre les FRC et les cellules dendritiques. (A) La structure de la podoplanine et de CLEC2. La PDPN dispose de domaines d'attaches à l'eitrine dans sa courte partie cytoplasmique et des domaines PLAG permettant la liaison à CLEC2 dans la partie extracellulaire grâce aux acides aminés O-glycosylés (Ugorski et al., 2016 ; Nagae et al., 2014). (B) Les cellules dendritiques expriment CLEC2 en surface, leur permettant d'interagir avec la podoplanine des FRC (Acton et al., 2012 ; Acton et al., 2014). (C) L'interaction de la PDPN avec CLEC2 induit le découplage de la PDPN d'avec les protéines ERM, et l'arrêt de la contraction spontanée des FRC (Acton et al., 2014 ; Astarita et al., 2015).

L'induction de la prolifération des FRC

La prolifération des FRC est un évènement secondaire accompagnant le gonflement du ganglion qui est induit par l'interaction CLEC2-podoplanine, qui suit l'inhibition de la contraction (Astarita et al., 2015 ; Yang et al., 2013). D'autres signaux induisent la prolifération des FRC. Les cellules dendritiques activent les FRC avec des cytokines inflammatoires comme l'IL-1 β . D'autres cytokines telles que le TNF α ou le PDGF sont impliquées, mais à un niveau plus restreint. Ce sont surtout les signaux provenant des lymphocytes activés qui soutiennent l'expansion des FRC. Les lymphocytes T sont attrapés par le réseau de FRC et sécrètent la lymphotoxine α 1 β 2 et le RANKL (Yang et al., 2013).

Le maintien des conduits de matrice extracellulaire

L'élasticité du ganglion suppose que celui-ci conserve sa microstructure. Alors que le ganglion peut gonfler jusqu'à prendre une taille quatre à cinq fois plus importante, le réseau de conduits maintient une remarquable intégrité. En effet, en situation d'inflammation ganglionnaire, la fuite de grosses molécules en dehors des conduits est limitée. Pour maintenir l'intégrité des conduits, les FRC réduisent l'assemblage des fibres de la matrice. L'interaction de CLEC2 avec la podoplanine induit ainsi à l'intérieur des FRC (*Martinez et al.*, 2019) (**Figure 40**) :

- Une reprogrammation transcriptionnelle comprenant la diminution de l'expression des protéases ADAMTS et l'augmentation de l'expression d'inhibiteurs de ces protéases (TIMPS).
- L'arrêt du regroupement des protéines LL5 β au niveau des adhésions focales, qui sont perdues suite à la désactivation de la voie RhoA/ROCK, ce qui conduit à l'arrêt du dépôt de matrice par les microtubules.

On observe ainsi une légère diminution de la quantité de collagène et de laminine dans le ganglion inflammé, ce qui permet de rendre le réseau plus élastique tout en assurant le maintien de l'intégrité des conduits en empêchant la dégradation de la matrice préexistante. La captation des antigènes par les cellules dendritiques et macrophages résidents est ainsi maintenue pendant l'expansion du ganglion.

b. Les FRC contrôlent l'activation des lymphocytes

Afin de maintenir l'architecture du ganglion pendant l'expansion du ganglion, un autre levier d'action des FRC est le contrôle de l'activation des lymphocytes, c'est-à-dire la mise en place de réponses régulatrices pour empêcher un emballement de la prolifération lymphocytaire et les dommages tissulaires que cela pourrait causer.

Les FRC limitent l'activation et la prolifération des lymphocytes

L'inhibition de la prolifération des lymphocytes est principalement induite par un ensemble de facteurs produits par les FRC. Les FRC limitent l'activation des lymphocytes en sécrétant du **TGF β** et de la prostaglandine E2 (**PGE2**), connus pour leurs fonctions immunomodulatrices, ou en exprimant l'enzyme indoléamine-2,3-dioxygénase (**IDO**), qui provoque la dégradation du tryptophane et l'arrêt du cycle cellulaire des lymphocytes T (*Knoblich et al.*, 2018) (**Figure 10**). Dans un contexte d'activation immunitaire, notamment de la réponse cytotoxique, les FRC répondent à l'IFN γ émis par les lymphocytes T CD8⁺ en sur-exprimant l'enzyme iNOS et en produisant du monoxyde d'azote (NO). Le NO inhibe en retour l'activation et la prolifération des lymphocytes (*Siegert et al.*, 2011 ; *Lukacs-kornek et al.*, 2011). Lors de la réponse anti-virale, les FRC surexpriment l'enzyme co-oxygénase 2 (COX2) pour produire du PGE2 (*Schaeuble et al.*, 2019) (**Figure 10**). Certains des signaux que je viens de citer permettent de générer des cellules immunosuppressives. Le NO limite l'activation des cellules dendritiques, tandis que le TGF β favorise la polarisation des

lymphocytes T vers un profil régulateur. La génération de lymphocytes T régulateurs est également favorisée par l'expression du CMH de classe II et de co-récepteurs inhibiteurs par les FRC (Fletcher *et al.*, 2015).

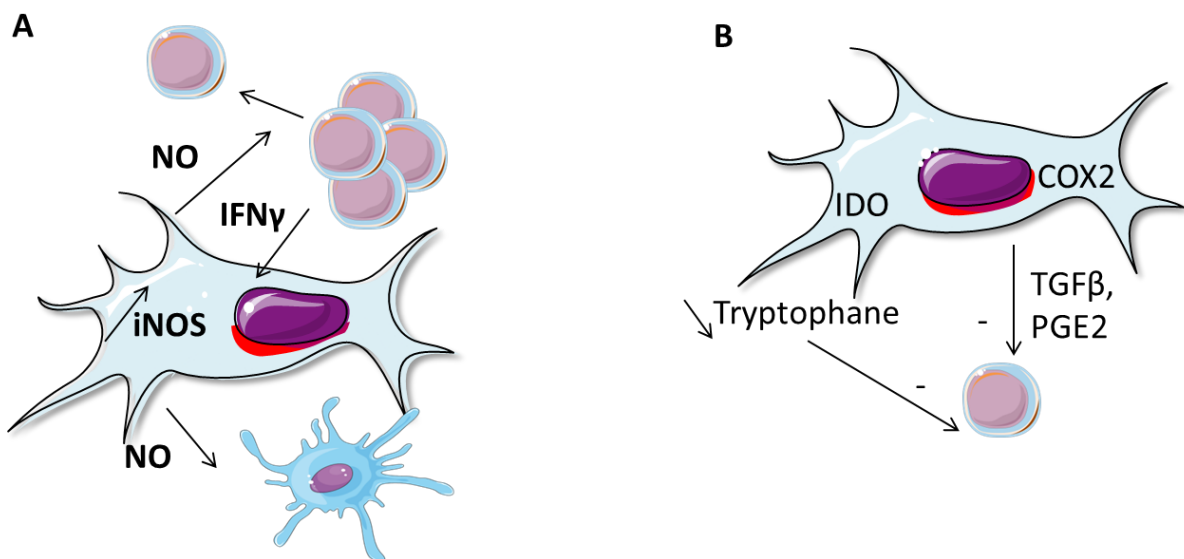


Figure 39 : Les FRC inhibent l'activation des lymphocytes. (A) Dans une situation de réponse immunitaire T CD8⁺ avec présence d'IFN γ , les FRC répondent en produisant du monoxyde d'azote, anergisant les lymphocytes T et les cellules dendritiques. (B) En toute situation, les FRC maintiennent un état tolérogénique dans le ganglion en sécrétant des molécules immunomodulatrices et en limitant l'apport en tryptophane disponible pour la prolifération des lymphocytes.

L'ensemble de ces mécanismes font des FRC des cellules majeures dans l'initiation et la régulation de la réponse immunitaire et dans le maintien de l'architecture de l'organe. Les FRC limitent ainsi les réponses effectrices à l'intérieur du ganglion, mais favorisent la rencontre entre les cellules nécessaires à l'activation de la réponse immunitaire par la sécrétion des chimiokines CCL19 et CCL21, et servent de niche de survie pour les lymphocytes naïfs et centraux-mémoires par la sécrétion de l'IL-7. Le maintien de l'élasticité et de la microarchitecture ganglionnaire à l'homéostasie comme pendant la réponse immunitaire permet ainsi de pérenniser la circulation des lymphocytes et des antigènes nécessaire à la génération d'une réponse spécifique. C'est l'équilibre entre ces signaux favorisant la rencontre de partenaires immunitaires et d'autres signaux limitant les réponses effectrices qui permet aux FRC de préserver l'architecture ganglionnaire propice aux fonctions de l'organe.

c. Les FRC permettent les réparations tissulaires en cas de dommages

Malgré le maintien de l'élasticité du ganglion et le contrôle de l'activation et de la prolifération des lymphocytes, il se peut que le ganglion connaisse des dommages tissulaires.

Les FRC : cibles des infections virales

C'est notamment le cas lors d'infections virales. En effet, contrairement aux autres pathogènes, les particules virales sont suffisamment petites pour gagner le cortex et le paracortex du ganglion. La plupart de ces virus, dont le LCMV (*Lymphocytic Choriomeningitis Virus*) sert de modèle d'étude, infectent les FRC conduisant à leur suppression par les lymphocytes T CD8⁺.

Notons que les FRC peuvent se défendre contre la lyse induite par les lymphocytes T CD8⁺ en induisant l'anergie des lymphocytes T CD8⁺ grâce à l'expression du co-récepteur inhibiteur PD-L1 (*Mueller et al., 2007*). Il s'agit cependant d'un jeu d'équilibre entre les FRC et l'infection virale, qui peut amener à une réponse chronique, caractérisée par la génération de lymphocytes T régulateurs en grand nombre, source de TGFβ. Le TGFβ peut ensuite induire une synthèse anormale de collagène par les FRC, c'est-à-dire une réponse fibrotique. La production d'une matrice fibrotique induit la séquestration des cytokines et chimiokines nécessaire à la survie des FRC et des lymphocytes, et la perte fonctionnelle du ganglion lymphatique (*lymphopénie*) (*Zeng et al., 2011*). C'est ce même mécanisme pro-fibrotique qui peut amener à la perte fonctionnelle du ganglion lymphatique lors de la progression métastatique.

Les signaux induisant la réparation tissulaire

Cependant, suite à des dommages causés par une réponse aigüe, courte dans le temps, les FRC sont capables d'attirer des cellules spécialisées dans la réparation tissulaire. Les FRC sécrètent en effet de l'IL-7, conjointement avec d'autres cellules stromales comme les LEC (*Onder et al., 2012*), ce qui permet de recruter des cellules lymphoïdes innées tels que les LTi/ILC3 (*Scandella et al., 2008*). Comme pendant le développement embryonnaire, ces cellules produisent la lymphotoxine α1β2 et permettent la formation d'un nouveau réseau de FRC à l'endroit endommagé.

La séquence des régulations opérées par les FRC pendant la réponse immunitaire est présentée en **figure 40**.

En conclusion de cette partie sur les FRC, je vous ai montré que le ganglion lymphatique est un organe dont l'architecture est finement régulée par les FRC en condition d'homéostasie et pendant la réponse immunitaire, afin d'optimiser la rencontre et l'activation des cellules immunitaires, tout en évitant une réponse inflammatoire incontrôlée pouvant conduire à des dommages irréversibles dans le ganglion. Je vais maintenant décrire les rôles paradoxaux que joue le ganglion lymphatique dans la progression tumorale et quels sont les mécanismes de l'éducation pré-métastatique du ganglion.

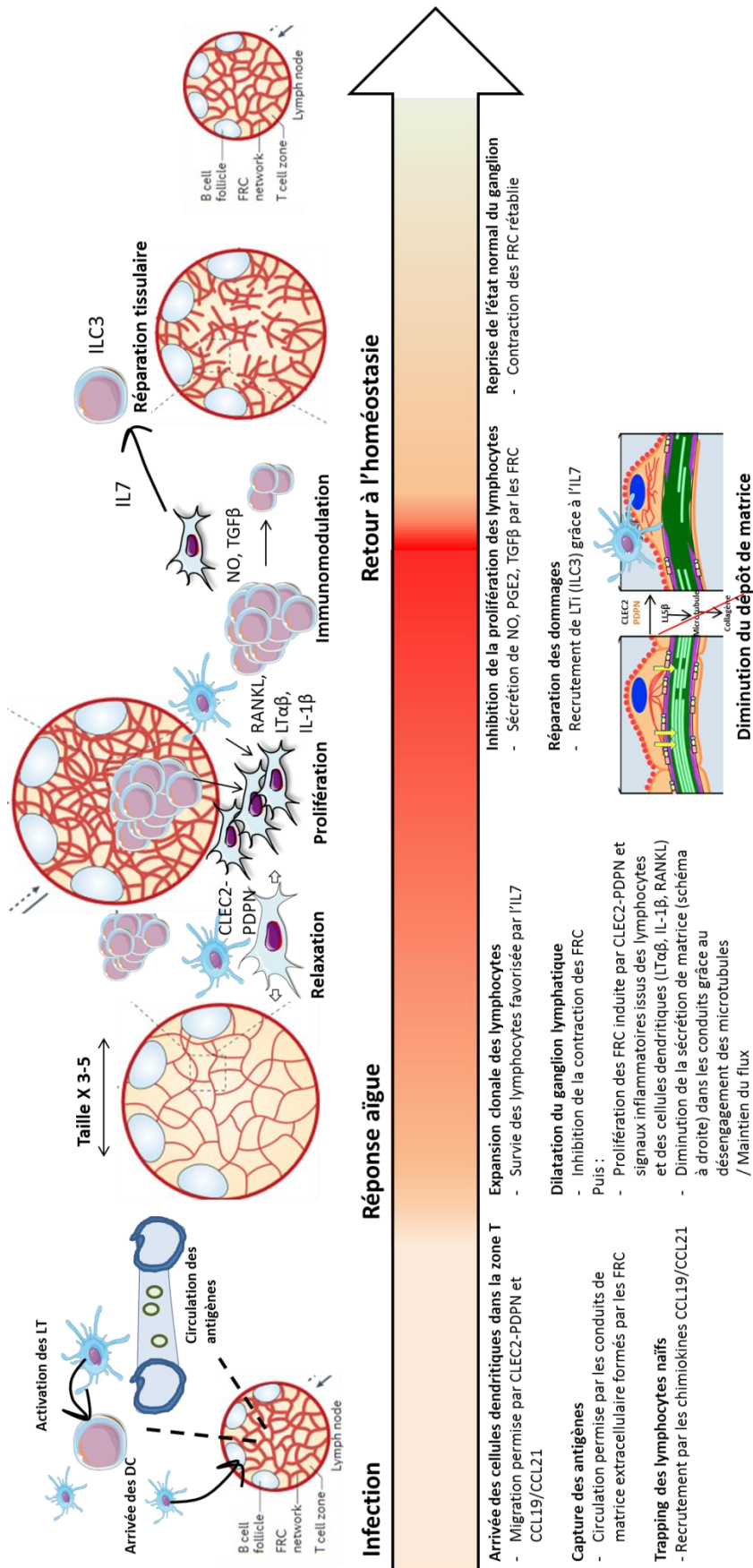


Figure 40 : Le rôle des FRC au cours de la réponse immunitaire

C. Le ganglion lymphatique dans la progression tumorale

1) L'implication des structures lymphoïdes dans la réponse immunitaire anti-tumorale

a. Les acteurs cellulaires de la réponse immunitaire anti-mélanome

La réponse anti-tumorale consiste à éliminer spécifiquement les cellules anormales, de la même manière que pour les cellules infectées par un virus. Cette élimination repose sur des cellules de réponse immunitaire innée (lymphocytes NK) et de cellules de la réponse immunitaire adaptative. En tant que siège de la réponse immunitaire adaptative, le ganglion lymphatique doit permettre la génération d'une réponse immunitaire anti-tumorale dirigée contre les antigènes tumoraux.

C'est donc la réponse cytotoxique qui est ordinairement impliquée, dont les cellules effectrices sont les lymphocytes T CD8⁺ et les cellules NK. L'activation des lymphocytes T CD8⁺ met en jeu comme auxiliaires les lymphocytes T CD4⁺ Th1 IFN γ ⁺. Les lymphocytes T CD8⁺ reconnaissent un peptide antigénique anormal présenté sur le CMH de Classe I. Les cellules NK sont des cellules de l'immunité innée qui sont activées soit par l'absence du CMH de Classe I, soit par des anticorps qu'ils reconnaissent avec un récepteur Fc. Dans le ganglion, les antigènes tumoraux sont capturés par les macrophages sous-capsulaires (*Pucci et al.*, 2016), puis transférés aux FDC pour être présentés aux lymphocytes B, dont la différenciation en plasmocytes permet la sécrétion d'anticorps anti-tumoraux (*Coronella-Wood et al.*, 2003). Les cellules NK sont directement impliquées dans le contrôle des métastases ganglionnaires en étant recrutées par les cellules dendritiques (*Ferlazzo et al.*, 2004 ; *Chen et al.*, 2005). Les cellules ainsi activées vont migrer vers les sites tumoraux distants et éliminer les cellules tumorales. Des structures lymphoïdes tertiaires peuvent également se développer au sein ou en périphérie des tumeurs, qui sont associées à un meilleur pronostic dans les cancers solides, dont le mélanome, et sont le siège d'une réponse immunitaire anti-tumorale (*Sautès-Friedman et al.*, 2016 ; *Dieu-Nosjean et al.*, 2008).

b. Quand la réponse immunitaire anti-mélanome devient inefficace

Le système immunitaire maintient ainsi une pression constante contre l'évolution des lésions mélanocytiques et prévient l'apparition du mélanome (*Shain et Bastian*, 2016). Au contraire, l'évolution du mélanome est signe d'une réponse immunitaire inefficace. Pour le comprendre, de nombreuses études ont cherché à identifier des lymphocytes spécifiques d'antigènes tumoraux et à évaluer leur efficacité *in vitro* ou *in vivo* par transfert adoptif chez la souris. On retrouve dans la circulation effectivement des lymphocytes T CD8⁺ anti-mélanome mais qui ne répondent plus et semblent anergiques (*Lee et al.*, 1999). Toutefois, d'autres études montrent que des lymphocytes T CD4⁺ et T CD8⁺ spécifiques d'antigènes tumoraux tels que MELAN-A ou MAGE-1 sont présents dans les ganglions de patients atteints de mélanome de stade III. *In vitro*, ces lymphocytes maintiennent l'expression de cytokines et sont capables d'éliminer des cellules tumorales, et lorsqu'ils sont transférés

dans des souris ces lymphocytes améliorent leur survie (Zhang et al., 2015). Cela indique que le ganglion peut effectivement remplir son rôle dans la mise en place d'une réponse cytotoxique anti-tumorale, et donc que d'autres mécanismes viennent contrebalancer cette réponse chez les patients pour lesquels les ganglions deviennent des sites métastatiques. Or, au cours de l'éducation pré-métastatique, le ganglion passe progressivement d'un état réactif, avec la génération temporaire d'une réponse effectrice cytotoxique, vers un état durable d'immunosuppression (Cochran et al., 2006; Sleeman et al., 2015).

2) L'éducation pré-métastatique du ganglion lymphatique dans le mélanome

J'ai montré en partie **I.B** les grands principes et mécanismes qui gouvernent l'éducation des niches métastatiques. Des **facteurs sécrétés solubles** ou sous formes de **vésicules** ou **particules extracellulaires** modifient à distance le phénotype des cellules de la niche, induisant leur **activation** (réaction fibrotique des CAF, prolifération des cellules endothéliales et immunitaires), leur **recrutement** (cellules myéloïdes immunosuppressives, fibroblastes pro-angiogéniques) ou une **transition phénotypique** (polarisation des lymphocytes T, des macrophages, activation des fibroblastes). C'est un processus progressif qui s'autorégule du fait de **modifications biochimiques** et **biophysiques locales** et **systemiques**, avec la création d'un environnement chargé en **molécules inflammatoires** ou **immunomodulatrices**, ou **plus rigide** (tension et organisation de la matrice extracellulaire), ou dont **l'équilibre métabolique est modifié** (déprivation en acides aminés, en glucides, en dioxygène, relargage de métabolites secondaires).

Le ganglion forme un environnement particulier à plusieurs titres, dont l'homéostasie est finement régulée par les FRC. L'entrée et la circulation des molécules et des cellules suivent des voies définies et bien délimitées, au travers des sinus et des conduits du réseau interne. C'est un organe riche en cellules immunitaires, capables de répondre aux antigènes tumoraux, mais dont la réponse est aussi régulée par les FRC. Enfin, le ganglion forme une structure élastique capable d'accueillir un nombre de cellule beaucoup plus important qu'à l'état basal. Je vais à présent montrer comment l'éducation pré-métastatique du ganglion prépare cette niche particulière à l'implantation et au développement tumoral.

a. La génération d'un environnement immunosuppresseif dans le ganglion

L'induction d'un environnement suppressif dans les ganglions régionaux drainants le mélanome est un phénomène précoce qui a lieu avant l'entrée des cellules tumorales. C'est l'un des premiers phénomènes induit dans le ganglion par les facteurs sécrétés tumoraux.

On retrouve dans les ganglions régionaux une signature de type tolérogénique, avec **moins de lymphocytes T CD8⁺** (Mansfield et al., 2011), **plus de lymphocytes T régulateurs**, et **moins de cellules dendritiques conventionnelles immunogéniques CD11c⁺**. La fréquence de ces cellules dendritiques est également diminuée dans les tumeurs primaires correspondantes, ce qui donne un marqueur de pronostic précoce sur l'envahissement du

ganglion sentinelle (Ma et al., 2012). Par ailleurs, le nombre de lymphocytes T régulateurs augmente dans les ganglions drainants des tumeurs de mélanome chez la souris (Riedel et al., 2016) (**Figure 41**).

Dans des ganglions sentinelles humains, l'activation des lymphocytes est aussi inhibée par la baisse d'expression des co-récepteurs activateurs CD80 et CD86 (Essner et Kojima, 2001) et du CMH de classe II (Huang et al., 2000) sur les cellules dendritiques matures (**Figure 41**). Bien que ce ne soit qu'une hypothèse, ces modifications pourraient être induites par les exosomes. Les exosomes de mélanome apportent des antigènes aux cellules dendritiques (Welfers et al., 2001) et induisent dans le ganglion lymphatique la surexpression d'un certain nombre de cytokines, parmi lesquelles le TNF α dans les LEC (Hood et al., 2009 ; Hood et al., 2011). Etant donné les interactions entre cellules dendritiques, lymphocytes T CD8⁺ et LEC, les auteurs suggèrent que ce dialogue peut être à l'origine de la dérégulation des signaux activateurs dans les cellules dendritiques (Hood, 2016).

L'ensemble de ces modifications peuvent servir de marqueurs précoces sur l'évolution loco-régionale du mélanome (Ma et al., 2012 ; Cochran et al., 2006).

b. Le remodelage vasculaire

Les sinus lymphatiques et vaisseaux sanguins sont profondément remodelés pendant l'éducation pré-métastatique du ganglion. Le phénomène prédominant est la lymphangiogenèse. La lymphangiogenèse est également un des processus très précoces, concomitant à la mise en place de l'immunosuppression, dans l'établissement de la niche pré-métastatique du ganglion lymphatique. L'angiogenèse semble au contraire relativement réduite (Harrell et al., 2007), avec une diminution du nombre global de HEV (Sleeman, 2015) dans les zones atteintes par les exosomes tumoraux, qui induisent dans les cellules stromales du ganglion l'expression de VEGF-A et de HIF-1 α (Hood et al., 2011). Dans un modèle murin d'éducation pré-métastatique, le nombre de BEC et de LEC est augmenté dans les ganglions drainants les cellules tumorales, signe que lymphangiogenèse et angiogenèse ont bien lieu dans les ganglions pré-métastatiques du mélanome (Riedel et al., 2016).

La lymphangiogenèse est notamment induite par le facteur de croissance **Midkine**, qui agit via la voie mTOR (Olmeda et al., 2017) et elle est favorisée par l'augmentation du nombre de lymphocytes B et T dans le ganglion (Harrell et al., 2007). Le remodelage des sinus lymphatiques du ganglion résulte d'une reprogrammation profonde des LEC, associée à une recombinaison de la matrice extracellulaire intra-ganglionnaire. Ainsi les LEC sur-expriment les **intégrines $\alpha 2 \beta$** qui leur permettent d'interagir avec le **fibrinogène**, le *facteur I de la coagulation* normalement présent dans le plasma qui forme ici une matrice répartie dans le stroma ganglionnaire (Commerford et al., 2018) (**Figure 41**).

c. L'éducation des FRC

Jusqu'ici étudiés avant tout pour leurs nombreuses propriétés dans la régulation de la réponse immunitaire, le rôle des FRC dans l'éducation pré-métastatique du ganglion n'a fait

l'objet que d'une seule publication pour le mélanome (Riedel et al., 2016). Ce sont pourtant les cellules stromales les plus abondantes du ganglion, et ce sont elles qui régulent la microarchitecture et l'élasticité d'un organe carrefour de l'invasion tumorale.

D'après cette étude, les FRC font l'objet de profonds remaniements sous l'action des facteurs sécrétés de mélanome. Une seule équipe s'est pour le moment intéressée aux modifications qu'ils subissent au stade pré-métastatique chez la souris (Riedel et al., 2016). Leur étude se porte sur des ganglions drainants des mélanomes établis suite à une injection de la lignée B16 ou des mélanomes spontanés dans un modèle *Tyr^{Cre}Braf^{CA}Pten^{lox}*.

Les FRC des ganglions drainant les tumeurs, dont le transcriptome est comparé avec une condition contrôle en RNAseq, montrent un **état d'activation** associé à leur prolifération comme en atteste leur nombre plus élevé et des marquages au Ki67, et à la avec la surexpression des gènes associés à la contractilité des CAF (**ACTA2**) et des FRC (**PDPN**) et d'autres gènes caractéristiques de l'activation (**S100A4**, **vimentine** et **fibronectine**). En accord avec ces résultats, ils présentent une contractilité accrue *ex vivo* comparativement aux FRC contrôles.

L'éducation des FRC semble provoquer la rupture de leurs fonctions de recrutement et de maintien des lymphocytes. Ils acquièrent un nouveau profil de sécrétion de cytokines et de chimiokines, avec la dérégulation de gènes associés au recrutement des cellules immunitaires, qui tend à créer un environnement **plus tolérogénique** (plus de lymphocytes T régulateurs) et moins prompt à l'activation des lymphocytes (**moins de lymphocytes T naïfs**). Cela s'explique notamment par le fait qu'ils sécrètent **moins de CCL21** et **moins d'IL7** (Figure 41). C'est en fait la structure globale du ganglion lymphatique qui est bouleversée, avec la perte de la délimitation entre les zones T et les zones B, la présence de lymphocytes B autour des HEV et de lymphocytes T dans les vésicules.

L'exposition aux facteurs tumoraux modifie également le remodelage de la matrice par les FRC. D'après les données de RNAseq, les FRC des ganglions drainants expriment **plus de collagènes**, notamment de **collagène 3a**, **plus de fibronectine**, et davantage de matriprotéines comme **SPARC** (Figure 41). Suite à ces changements, l'analyse des ganglions en microscopie montre que l'architecture des conduits est modifiée. Ces derniers sont plus larges et laissent diffuser plus profondément de petites molécules comme du dextran injecté. Cela suggère que des molécules comme les facteurs tumoraux (cytokines, chimiokines, exosomes...) pourraient diffuser plus profondément dans le ganglion lymphatique et moduler des populations cellulaires situées au cœur de celui-ci.

d. Vers un environnement pro-tumoral ?

L'éducation pré-métastatique du ganglion lymphatique semble ainsi conduire à de profonds changements dans l'architecture du ganglion en affectant à la fois le réseau lymphatique (Commerford et al., 2018), et le réseau matriciel et architectural maintenu par les FRC (Riedel et al., 2016). Mieux comprendre l'impact de l'éducation pré-métastatique sur la régulation

des propriétés biomécaniques des FRC, ainsi que sur le dialogue qui s'établit entre les FRC et les cellules immunitaires reste crucial pour mieux comprendre si cette recomposition conduit à un environnement favorable à l'installation tumorale.

La recomposition de la structure réticulaire lors d'infections virales comme le HIV, conduit à une hyper-sécrétion de collagène, moins de sécrétion d'IL7, un accès réduit des lymphocytes aux cytokines et aux chimiokines et induit l'apoptose des FRC naïfs (Zeng *et al.*, 2012). Lors de la progression tumorale la sécrétion de matriprotéines tels que la ténascine C ou SPARC inhibe la prolifération des lymphocytes T (Parekh *et al.*, 2005) et le maintien de macrophages et de neutrophiles pro-tumoraux (Alvarez *et al.*, 2005). J'ai également évoqué que les matrices riches en fibronectine contraignent les lymphocytes en dehors de ces zones de matrice dense (Salmon *et al.*, 2012). On constate ainsi que la réorganisation du milieu stromal et de la matrice extracellulaire modifie complètement les réponses immunitaires et la migration des cellules tumorales et immunitaires (Peranzoni *et al.*, 2013). Par ailleurs, un espacement plus large du réseau de FRC (Riedel *et al.*, 2016) peut conduire à moins de contact avec les lymphocytes et une activation moins efficace (Astarita *et al.*, 2015)

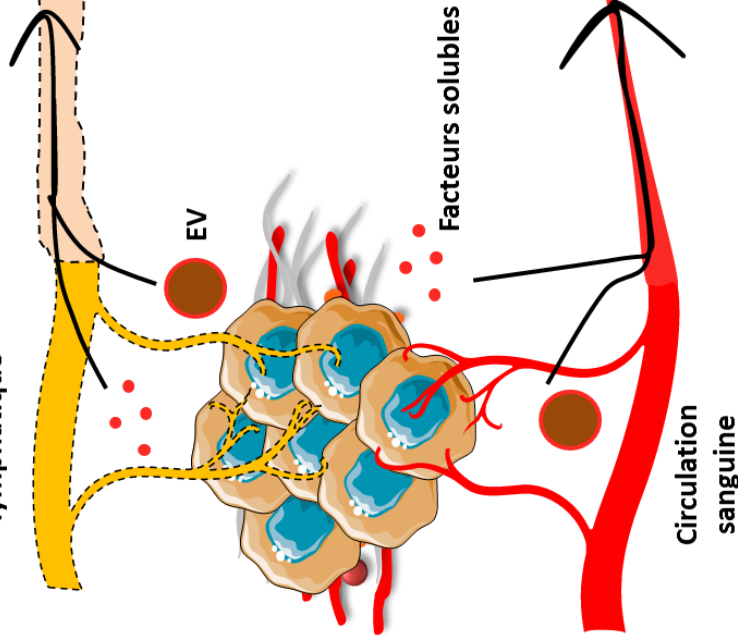
Les modifications observées dans les ganglions pré-métastatiques, comme la réorganisation des conduits, le dépôt de nouvelles fibres tel que le fibrinogène, et l'activation des FRC, suggèrent que l'environnement ganglionnaire passe d'un statut favorable au mouvement, au maintien et à l'activité des lymphocytes, vers un statut immunosupprimé, et dont les caractéristiques concernant la matrice extracellulaire, le remodelage vasculaire et l'activation des FRC sont analogues à celles des environnements pro-tumoraux.

Les observations faites dans le ganglion pré-métastatique, avec la réorganisation des conduits, le dépôt de nouvelles fibres tel que le fibrinogène, et l'activation des FRC, semblent conduire de l'environnement réticulaire favorable au mouvement et au maintien des lymphocytes vers un environnement immunosupprimé et dont les caractéristiques concernant la matrice extracellulaire, le remodelage vasculaire et l'activation des FRC sont analogues à celles des environnements pro-tumoraux.

Ganglion lymphatique

Tumeur primaire

Circulation lymphatique



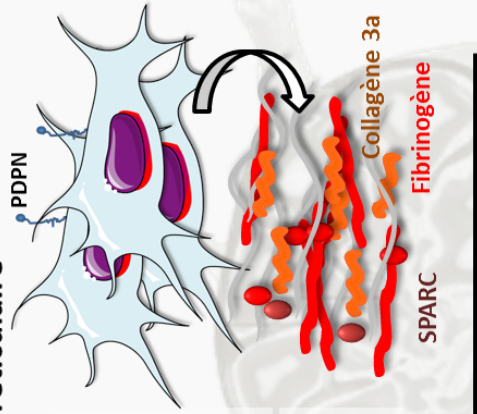
Remodelage réticulaire

Activation des FRC

- Augmentation de la prolifération
- Augmentation de l'expression de la PDPN (stade pré-métastatique) et de FAP (stade métastatique)
- Expression accrue de protéines de la matrice (Collagène 3a, Fibronectine, SPARC)
- Diminution de l'expression de cytokines et chimiokines (IL-7, CCL19, CCL21)

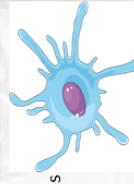
Modifications du réseau matriciel

- Plus grande perméabilité des conduits
- Accumulation de fibrinogène dans le stroma réticulaire



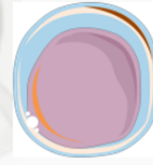
Cellules dendritiques

- Moins de DC conventionnelles
- Dérégulation du CMH de Classe II
- Dérégulation de CD80/82 (exosomes?)



Lymphangiogenèse

- Induction de la prolifération des LEC
- Midkine induit la lymphangiogenèse et la perméabilité vasculaire
- Augmentation de l'interaction des LEC avec le fibrinogène par $\text{Int}\alpha 2\beta$



Lymphocytes

- Plus de lymphocytes Trég
- Polarisation Th2 (IL10)
- Moins de lymphocytes T CD8+
- Diminution de l'expression de CCL19/21 par les FRC

Angiogenèse

- Les exosomes induisent l'expression dans le stroma ganglionnaire de facteurs pro-angiogéniques dans le stroma ganglionnaire (VEGF-A, HIF1- α)
- Augmentation du nombre de BEC mais pas de vaisseaux plus nombreux

Immunomodulation

Remodelage vasculaire

Figure 41 : Les facteurs sécrétés de la tumeur primaire engendrent des modifications dans les ganglions drainants.

3) Le ganglion métastatique

L'éducation pré-métastatique semble ainsi être un mécanisme efficace pour bloquer la réponse immunitaire et réorganiser le stroma vers le microenvironnement pro-tumoral tel que décrit en **Partie I** dans lequel les CAF favorisent l'invasion tumorale. Au stade métastatique, un dialogue reposant sur des chimiokines, des cytokines, des contacts intercellulaires et le métabolisme se met en place entre les cellules tumorales et les cellules du stroma pour favoriser l'implantation tumorale dans le ganglion.

Les populations immunitaires des ganglions de mélanome montrent que ces ganglions métastatiques ont bien dérivé vers un profil immunosuppresseur. L'augmentation de la quantité de lymphocytes T régulateurs diminue l'infiltration des lymphocytes T et induit la sécrétion de molécules immunomodulatrices comme l'**IL10**, caractéristique de la polarisation Th2, ou le **TGFβ** (Viguier *et al.*, 2004).

Les populations mésenchymales des ganglions atteints par les cellules tumorales ont été caractérisées dans le mélanome et le carcinome mammaire. J'ai exposé comment les CAF de carcinome mammaire présentent des CAF ayant la même hétérogénéité que ce que l'on trouve dans la peau (Pelon *et al.*, 2020, Costa *et al.*, 2018). On retrouve une dichotomie entre une population de CAF sécrétant des cytokines et des chimiokines (CAF-S1) et une population de CAF contractile qui réorganise les fibres de collagène (CAF-S4). Les CAF-S1 sécrètent la chimiokine CXCL12 qui permet la chimiotaxie des cellules tumorales et la cytokine TGFβ qui permet d'induire la transition phénotypique vers un profil invasif, avec dérégulation de l'E-cadhérine au profit de la vinculine. Les CAF-S4 exercent leurs propriétés contractiles et produisent une matrice dense en collagène. Ils guident les cellules tumorales dans cette matrice par contact cellule-cellule via NOTCH. L'origine de ces différentes populations reste inconnue mais les auteurs suggèrent à partir des profils transcriptionnels de chaque sous-type que les CAF-S1 et les CAF-S4 seraient issus des cellules stromales périvasculaires, les cellules CD34⁺ pour les CAF-S1 et les péricytes Itgα7⁺ pour les CAF-S4.

Dans le mélanome, une dichotomie analogue existe, bien qu'elles ne semblent pas concerner les mêmes cellules. Les ganglions métastatiques sont ainsi enrichis en deux populations activées que sont des cellules stromales CD34⁺ PDPN^{-/low} et les FRC, dont l'expression génique étudiée par puces à ADN révèle que la première surexprime des gènes de la matrice extracellulaire tandis que les FRC surexpriment des gènes impliqués dans la présentation de l'antigène et les chimiokines (Eom *et al.*, 2020). Ces résultats suggèrent que ces deux types cellulaires récapitulent la dichotomie entre CAF desmoplastique/contractile d'une part et CAF sécrétoire/inflammatoire d'autres part. De manière intéressante, ces deux populations surexpriment toutes deux FAP, connu pour promouvoir l'induction du phénotype immunosuppresseur des CAF (Yang *et al.*, 2016 ; Eom *et al.*, 2020).

Ces résultats indiquent que le ganglion métastatique acquiert un statut pro-tumoral par l'activation de ces cellules mésenchymales et la recomposition de sa composante immunitaire vers un profil immunosuppresseur.

*

* *

Le ganglion lymphatique, organe clé de la réponse immunitaire anti-tumorale, devient ainsi une niche privilégiée de l'invasion tumorale. Le rôle de ses composantes stromales, en particulier des FRC, dans la transformation des propriétés biomécaniques et immunologiques du microenvironnement ganglionnaire, est essentiel pour la génération d'un stroma favorable aux cellules tumorales. Les interactions de mieux en mieux comprises entre fibroblastes, cellules immunitaires et cellules tumorales dans le ganglion au niveau pré-métastatique et métastatique offrent de nouveaux biomarqueurs et éventuellement de nouvelles cibles thérapeutiques pour empêcher la progression des métastases loco-régionales, dernière étape avant les métastases distantes et l'implication de la survie des patients.

Résultats

Problématique et objectifs

Les mélanomes se distinguent par plusieurs profils phénotypiques, associés à des signatures différentes. La signature différenciée-proliférative est caractérisée par les marqueurs MITF^{high} AXL^{low} et la signature dédifférenciée-invasive est caractérisée par les marqueurs MITF^{low} AXL^{high} (Hoek et al., 2008). La composition du sécrétome d'une lignée caractéristique de la signature proliférative (Mel501) et d'une lignée caractéristique de la signature invasive (1205Lu) a été comparée par spectrométrie de masse (Stéphane Audebert, CRCM, Marseille). Nous avons ainsi montré dans l'équipe que la signature invasive est caractérisée par un sécrétome riche en cytokines, chimiokines et matriprotéines qui favorisent leurs propriétés pro-métastatiques. Par exemple, les 1205Lu surexpriment la protéine pentraxine-3 (PTX3) qui induit de manière autocrine une voie inflammatoire favorisant le phénotype invasif de ces cellules (Rathore et al., 2019). Les 1205Lu sécrètent également beaucoup plus la matriprotéine SPARC qui agit de manière paracrine sur les cellules endothéliales pour favoriser la migration trans-endothéliale et l'installation dans la niche métastatique pulmonaire (Tichet et al., 2015). Ces facteurs sécrétés font ainsi partie intégrante d'un dialogue moléculaire entre les cellules métastatiques et leur microenvironnement. Toutefois, le rôle de ce sécrétome dans la préparation à distance de la niche pré-métastatique du ganglion lymphatique n'est pas encore complètement compris.

Le ganglion lymphatique est l'un des premiers sites métastatiques du mélanome, une passerelle fréquemment empruntée par les cellules métastatiques pour envahir d'autres organes (Cochran et al., 2006). Des observations concordantes réalisées dans le diagnostic de ganglions sentinelles et l'étude des ganglions drainants les tumeurs dans des modèles animaux montrent le gonflement de ces ganglions lymphatiques (Sleeman et al., 2015 ; Riedel et al., 2016). Or, les FRC régulent l'architecture et l'élasticité du ganglion lymphatique aussi bien en homéostasie que pendant la réponse immunitaire (Acton et al., 2014 ; Astarita et al., 2015). Dans ce contexte, j'ai réalisé mon projet de thèse pour comprendre si et comment le sécrétome de mélanome module les propriétés des FRC du ganglion drainant.

Au cours de ma thèse, j'ai cherché à comprendre :

- Si les facteurs sécrétés de mélanome éduquent les FRC, c'est-à-dire induisent des modifications qui favorisent la progression tumorale, et si cela dépend du profil phénotypique des mélanomes.
- Si les facteurs sécrétés de mélanome modulent des propriétés contractiles des FRC, et si cela dépend aussi du profil phénotypique des mélanomes.
- Par quelles voies de signalisation les facteurs sécrétés de mélanome modulent les propriétés contractiles des FRC.
- Quels facteurs sécrétés de mélanome modulent les propriétés contractiles de mélanome.

Les FRC sont des fibroblastes spontanément contractiles qui partagent des propriétés avec les CAF

Les fibroblastes ganglionnaires (LN-F) que j'ai utilisés au cours de ma thèse sont issus de ganglions de donneurs sains (*Sciencell*). Afin de s'assurer qu'il s'agit bien de FRC, j'ai analysé l'expression de marqueurs spécifiques des principales populations stromales du ganglion à partir de données de puces à ADN (**Fig1A**) et par cytométrie en flux (**Fig1B**). Les LN-F n'expriment pas le marqueur immunitaire CD45 (PTPRC), le marqueur endothélial CD31 (PECAM1), ni les marqueurs associés à d'autres populations comme les FDC (CR1, CR2, MADCAM-1), mais expriment des marqueurs caractéristiques des FRC comme la PDPN, PDGFR α , PDGFR β et CXCL12/SDF1. L'expression des chimiokines CCL19 et CCL21 est par contre quasiment perdue, comme cela a déjà été montré pour les FRC mis en culture (*Knoblich et al., 2018 ; Siegert et al., 2011*).

Plusieurs travaux précédents ont déjà montré que les FRC sont des myofibroblastes spontanément contractiles (*Acton et al., 2014 ; Astarita et al., 2015 ; Malhotra et al., 2012*). Afin d'analyser la contractilité des LN-F dans un contexte biomécanique proche du ganglion, nous avons mesuré en nanoindentation une rigidité d'environ 0,2 kPa dans la zone paracorticale du ganglion (*non montré*). J'ai confirmé que lorsque les LN-F sont capables de contracter spontanément une matrice de collagène 3D de rigidité analogue (**Fig1C**). Ils démontrent la même capacité à exercer une tension sur leur matrice environnante que les CAF de peau et de ganglion issus de patients atteints de mélanome (*Jean-Philippe Lacour, service de dermatologie du CHU de Nice*) (**Fig1D**). A l'inverse, des fibroblastes quiescents tels que ceux issus du derme ne sont pas contractiles, mais le deviennent quand ils sont activés par des signaux pro-fibrotiques tels que le TGF β , récapitulant un phénotype de type CAF (**Fig1D**). Les LN-F et les CAF sont insensibles au TGF β , ce qui démontre qu'ils maintiennent spontanément un état activé et contractile. Cet état est inhibé par l'inhibiteur de ROCK Y-27632, et par conséquent contrôlé par la contraction de l'actomyosine via ROCK (**Fig1C/D**). En accord avec ces résultats, les LN-F ont davantage de fibres de stress et de YAP nucléaire que les fibroblastes de peau, qui sont des marqueurs du potentiel contractile des cellules (**Fig1E/F**). L'activité de YAP est plus importante dans les LN-F, comme le montre la surexpression de ses gènes cibles par rapport aux fibroblastes de peau (*CTGF, CYR61 et ANKRD1*) (**Fig2A**). La stimulation des fibroblastes de peau avec du TGF β conduit également à la formation de fibres de stress et à la relocalisation de YAP dans le noyau (**Fig1E/F**).

La contractilité du cytosquelette d'actomyosine et l'activité de YAP permettent aux CAF de produire et de remodeler une matrice extracellulaire mieux organisée et plus rigide (*Calvo et al., 2013*). D'une manière générale, le remodelage d'une matrice dense en collagène et en protéines matricellulaires est plutôt associé, dans les CAF, à un profil contractile (*Pelon et al., 2020 ; Helms et al., 2020*). Les fibroblastes de peau sécrètent peu de matrice car ce ne sont pas des cellules activées. Les LN-F au contraire produisent ainsi une matrice plus épaisse et plus riche en fibres de fibronectine et de collagène I, organisées en faisceaux, que les fibroblastes de peau (**Fig1G/H/I**). Cela est cohérent avec le fait que dans le ganglion, les FRC produisent des conduits de matrice dont le cœur est constitué de collagène de type I (*Malhotra et al., 2012*) et la membrane basale de fibronectine (*Sixt et al., 2005*). Par RT-qPCR, on observe aussi que les LN-F expriment des protéoglycans typiques de la matrice de ces conduits, tels que la fibromoduline (*FMOD*) et la décorine (*DCN*) (**Fig2C**).

En plus de propriétés communes, les LN-F partagent aussi des marqueurs caractéristiques des CAF. Les analyses par RT-qPCR révèlent que par rapport aux fibroblastes de peau, les LN-F expriment plus fortement des marqueurs typiques des CAF myofibroblastiques, dont les principaux sont α -SMA (ACTA2) et EDA-FN (Hinz et al., 2001 ; Tomasek et al., 2002), et des marqueurs plutôt caractéristiques de CAF immunomodulateurs tel que FAP (Costa et al., 2018 ; Zhang et al., 2016) (**Fig 1J**). De la même manière, les analyses par Western Blot montrent que les LN-F expriment à haut niveau FAP, PDGFR β et confirment l'expression de la fibronectine observée sur les matrices. Le niveau d'expression de α -SMA et de fibronectine dans les fibroblastes de peau stimulés au TGF β est augmenté par rapport aux fibroblastes de peau normaux, ce qui confirme l'induction de leur phénotype myofibroblastique. (**Fig1K**). Les fibroblastes de peau expriment toutefois déjà à l'état basal la plupart des marqueurs communs aux fibroblastes au même niveau que les LN-F (PDGFR β , ITGB1, CAV-1), voire davantage pour certains marqueurs (S100A4, PDGFR α) (**Fig 1J/K**). Les CAF expriment aussi pour la plupart des récepteurs et des facteurs sécrétés immunorégulateurs (Kalluri, 2016 ; Monteran et Erez, 2019). Nos données obtenues par puces à ADN montrent ainsi que les LN-F expriment des récepteurs immunorégulateurs (Costa et al., 2018) dont des régulateurs positifs de la réponse T, DPP4 et CD276, et des régulateurs négatifs tels que PD-L2 (PDCD1LG2) et JAM (**Fig2B**).

Ces résultats m'ont permis de valider que les LN-F possèdent une signature moléculaire et phénotypique caractéristique des FRC et d'identifier qu'ils partagent des signatures et des propriétés communes avec les CAF.

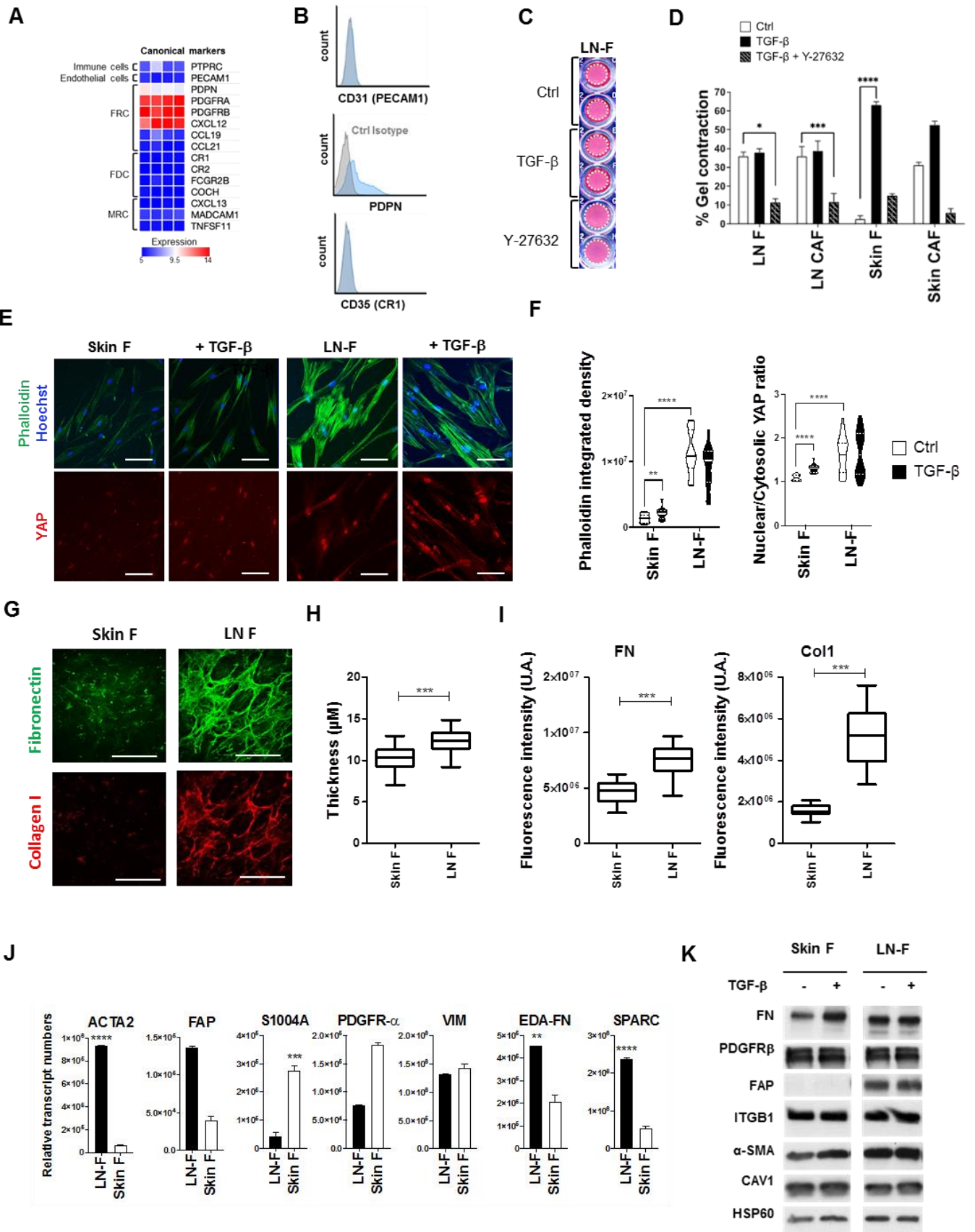


Figure 1. LN-F have a CAF-like phenotype associated with spontaneous contraction and the expression of CAF markers.

- (A) Microarray analysis of LN-F showing the canonical markers expressed by the main cell subsets in the LN: immune cells, endothelial cells, FRC, Follicular Dendritic Cells (FDC) and Marginal Reticular Cells (MRC).
- (B) Analysis by flow cytometry of the expression of CD31 (PECAM1), PDPN and CD35 (CR1) on LN-F (in blue, n = 3). The staining with a control isotype mAb is shown (in grey).
- (C) Pictures of LN-F from 4 donors embedded in a 3D collagen gel and treated with control medium (Ctrl), TGF- β (2ng/ml) and the ROCK inhibitor Y-27632 (10 μ M) for 8 days
- (D) 3D collagen gel contraction induced by LN-F, normal skin F and CAF isolated from skin or LN melanomas and treated with control medium (Ctrl), TGF- β (2ng/ml) and Y-27632 (10 μ M) for 7 days (n = 2 to 7 for each cell type, in triplicate; mean +/- SEM; p-Val (*)<0.05, (***)<0.001, (****)<0.0001)
- (E) Immunofluorescence analysis of Phalloidin, Hoechst and YAP in Skin F and LN-F grown for 4 days in control medium or with TGF- β (2ng/ml) (Scale bar = 100 μ m).
- (F) Quantification of F-actin fibers (phalloidin integrated density) (n = 19 cells; median +/- quartiles) and YAP localization (n = 22 cells; median +/- quartiles); p-Val (**)<0.01, (****)<0.0001).
- (G) Immunofluorescence analysis of fibronectin and collagen I in decellularized matrices of Skin F or LN-F treated for four days with control medium (Ctrl) or TGF- β (2ng/ml) (Scale bar = 100 μ m)
- (H) Quantification of matrix thickness on a 2D Z-stack of the 3D reconstitution of the matrix (***) p<0,001).
- (I) Quantification of fibronectin and collagen I fluorescence (***) p<0,001)
- (J) Quantification by qRT-PCR of the expression of CAF markers in LN-F and skin F (n = 2, in duplicate; mean +/- SEM; p-Val (**)<0.01, (***)<0.001, (****)<0.0001).
- (K) Immunoblotting of CAF markers (FN, PDGFR β , FAP, ITGB1, α -SMA and CAV1) in Skin F and LN-F cultured for 4 days in control medium (Ctrl) or treated by TGF- β (2ng/ml). HSP60 is used as a loading control.

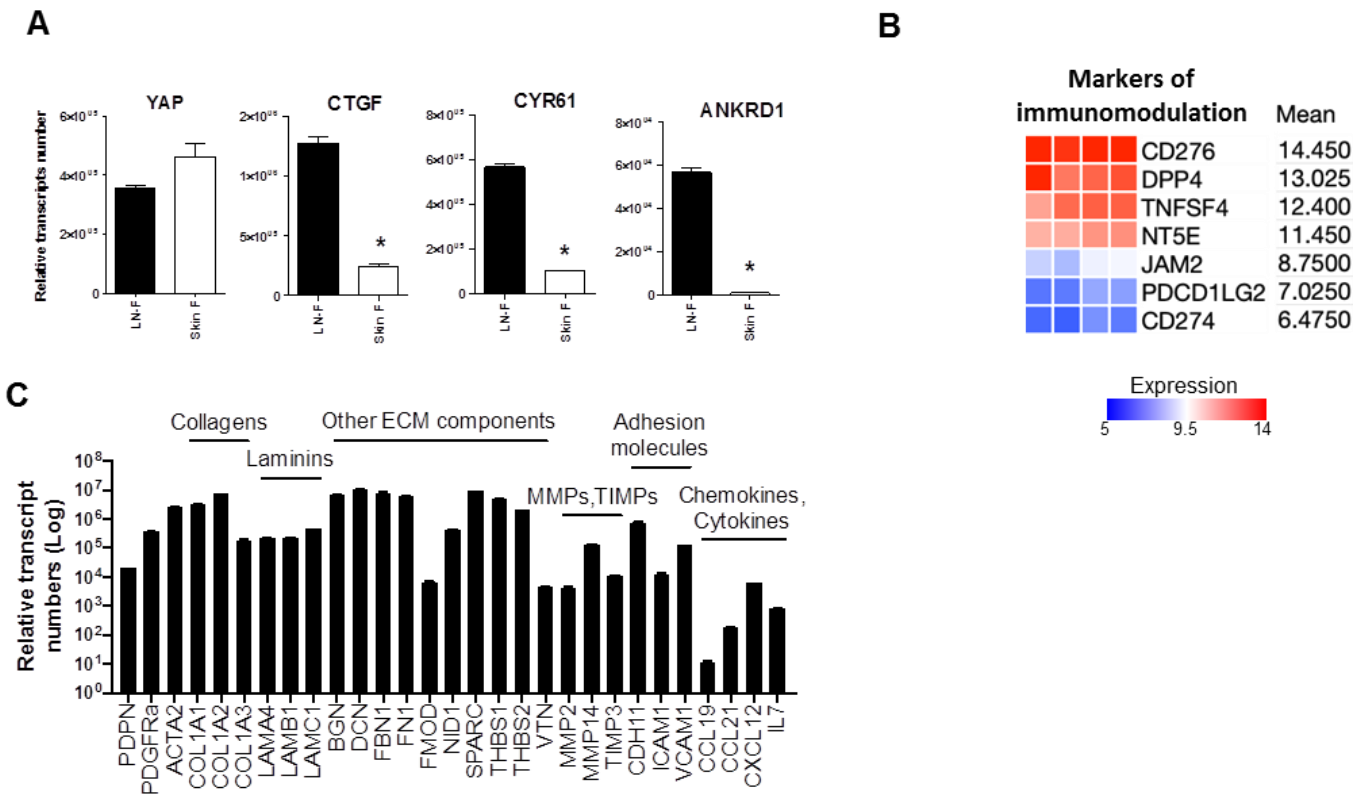


Figure 2 : LN-F share typical markers of CAF and FRC

- (A) Quantification by qRT-PCR of the expression of YAP et and its target genes CTGF, CYR61 and ANKRD1 in LN-F and Skin F (n=2, in duplicated; Mean +/- S.E.M; p-Val (*<0,1).
- (B) Microarray analysis of the expression of CAF immunoregulative markers in LN-F.
- (C) Quantification by qRT-PCR of the expression of characteristic markers of FRC in LN-F (n=2, en duplicat; Mean +/- SEM).

Les FRC sont activés et éduqués par le sécrétome de mélanome invasif

J'ai ensuite cherché à savoir si les FRC peuvent être reprogrammés par les facteurs sécrétés par le mélanome. Pour reproduire *in vitro* la reprogrammation des FRC dans le ganglion pré-métastatique sous l'action des facteurs sécrétés par le mélanome, je traite les LN-F avec le milieu conditionné d'une lignée de mélanome proliférative (Mel501) et invasive (1205Lu), caractéristiques de ces deux profils et dont le sécrétome a été caractérisé en spectrométrie de masse.

Activation et prolifération des LN-F

L'activation des FRC est caractérisée pendant la réponse immunitaire par la prolifération des FRC et la surexpression de la podoplanine, induites par des signaux reçus des cellules dendritiques (CLEC2) et des lymphocytes (LT $\alpha\beta$) (Astarita *et al.*, 2015 ; Yang *et al.*, 2013). Afin de savoir si les LN-F sont activés par les facteurs sécrétés par le mélanome, j'ai donc observé l'expression de la podoplanine par cytométrie en flux et par RT-qPCR ainsi que leur prolifération à l'aide d'un test MTT et par comptage des cellules. Les facteurs sécrétés par la lignée 1205Lu, mais pas par la lignée Mel501, induisent la surexpression de la podoplanine membranaire (**Fig3A/B**), ainsi que la prolifération des LN-F (**Fig3C**). Ces résultats confirment les modifications observées *in vivo* dans la littérature pour les FRC des ganglions pré-métastatiques (Riedel *et al.*, 2016). Les LN-F traités avec le milieu conditionné de 1205Lu, mais pas ceux traités avec les facteurs sécrétés par les Mel501, surexpriment aussi au niveau transcriptionnel les marqueurs de l'activation des fibroblastes, dont PDPN et FAP, et des protéines sécrétées, tels que la TNC et le LIF (**Fig3B**).

Pour identifier quels facteurs induisent la prolifération des LN-F dans le sécrétome des cellules 1205Lu, ceux-ci ont été traités avec les cytokines TGF β et LIF impliquées dans l'activation des CAF (Albregues *et al.*, 2014). La LT $\alpha\beta$ est utilisée comme contrôle positif. La prolifération n'est pas activée par le TGF β mais elle est activée par le LIF (**Fig3D**). Le LIF active les CAF par la voie GP130/LIFR - JAK1/2 - STAT3 (Albregues *et al.*, 2014). En accord avec ce résultat, l'inhibition de JAK1/2 par le Ruxolitinib empêche l'induction de la prolifération par les facteurs sécrétés par les 1205Lu (**Fig3E**). Le LIF est largement surexprimé (*d'un facteur 100*) dans le sécrétome des 1205Lu par rapport à celui des Mel501 (**Fig7E**). Par ailleurs, le LIF peut aussi agir de manière autocrine. Il est surexprimé par les LN-F éduqués par les 1205Lu comparé aux LN-F contrôles (**Fig2F**). Ces résultats suggèrent que l'activation de la prolifération des LN-F par les facteurs sécrétés par les 1205Lu est dépendante de la voie LIF-JAK1/2.

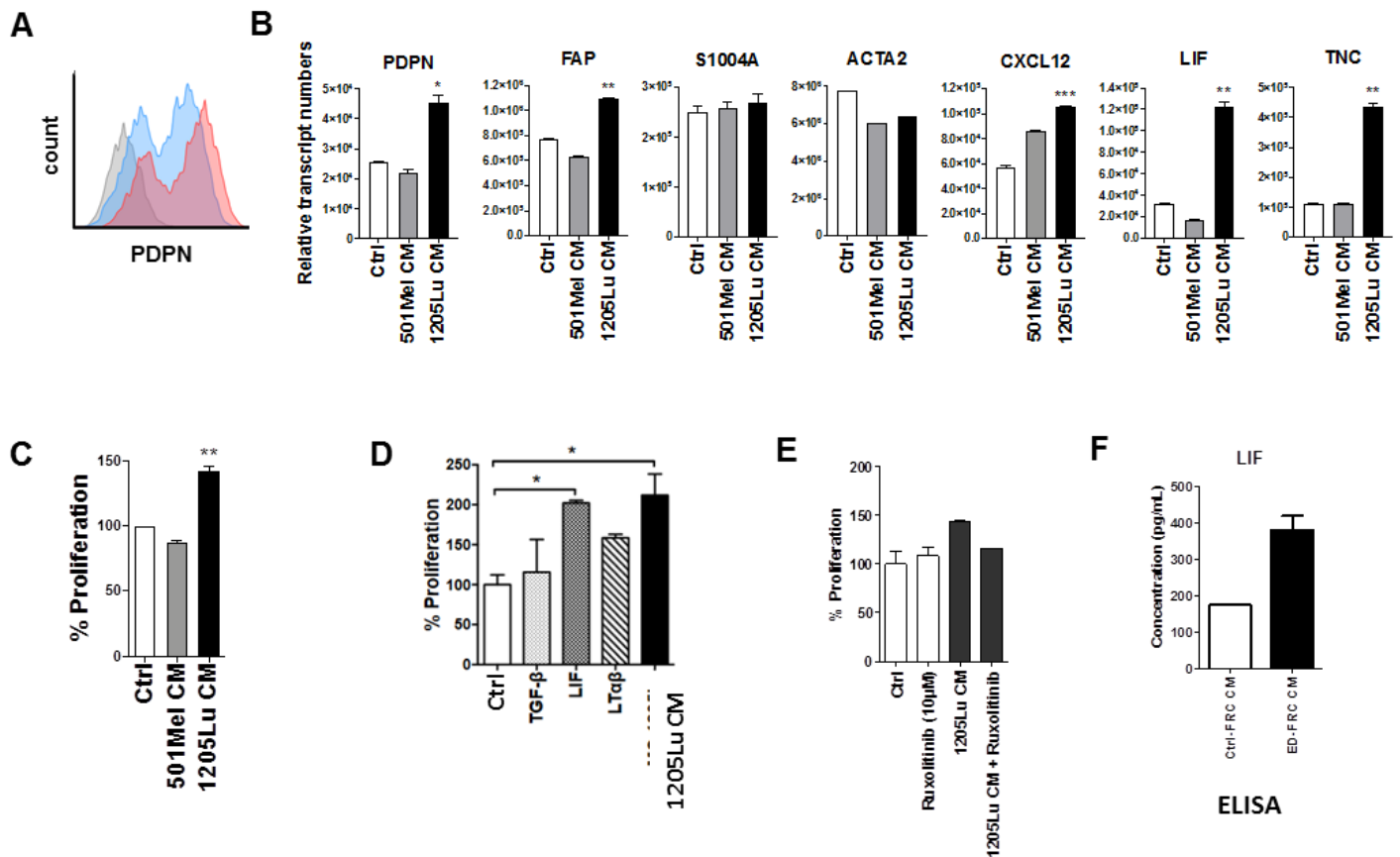


Figure 3 : LN-F treated with 1205Lu CM are activated

- (A) Representative FACS analysis of PDPN surface expression on LN-F cultured for 5 days with 1205Lu CM (in red) or ctrl medium (in blue). The staining with a control isotype mAb is shown in grey (n = 4).
- (B) Quantification by qRT-PCR of the expression of CAF markers in LN-F and skin F (n = 2, in duplicate; mean +/- SEM; p-Val (**)<0.01, (***)<0.001, (****)<0.0001).
- (C) Proliferation of LN-F after 6 days with ctrl medium, 501Mel CM or 1205Lu CM (n = 2, in triplicate; mean +/- SEM; p-Val (**)<0.01).
- (D) Proliferation of LN-F after 6 days with ctrl medium(Ctrl), TGF- β (2ng/ml), LIF (2ng/ml), LT α β (10ng/ml) or 1205Lu CM (n=3, in triplicate; mean +/- SEM ; p-Val (*)<0,1).
- (E) Proliferation of LN-F after 6 days with control medium (Ctrl), ruxolitinib (10 μ M), 1205Lu CM, or with le 1205Lu CM + ruxolitinib (10 μ M) (in triplicate; mean +/- SEM).
- (F) Concentration of LIF measured by ELISA in the conditioned medium of control LN-F (Ctrl-FRC CM) or in the conditioned medium of LN-F treated for one week with 1205Lu CM (ED-FRC CM) (in duplicate; mean +/- SEM).

Education du secretome et de la matrice des LN-F

Dans le ganglion lymphatique, les FRC sécrètent des cytokines, des chimiokines (CCL19, CCL21, CXCL12) et une matrice qui permettent le recrutement, la circulation et la rencontre des lymphocytes et des cellules dendritiques. Les récepteurs de certaines de ces chimiokines sont également exprimés par les cellules de mélanome, comme CXCR4 et CCR7 (Joyce et Pollard, 2009 ; Takeuchi et al., 2004). Les lymphocytes et les cellules de mélanome expriment également des intégrines communes qui favorisent le tropisme ganglionnaire, dont les intégrines $\alpha 4\beta 1$ (VLA-4) (Klemke et al., 2007).

J'ai ensuite voulu comprendre comment l'éducation des LN-F affecte en retour des cellules tumorales et immunitaires. La migration de ces cellules est contrôlée par les facteurs sécrétés et la matrice extracellulaire. Afin de savoir comment l'éducation par les cellules de mélanome change les propriétés chimiotactiques de son sécrétome, j'ai réalisé des expériences de chambres de Boyden en comparant la migration des 1205Lu et des cellules immunitaires vers le milieu conditionné de LN-F contrôle (Ctrl-FRC CM) ou vers le milieu conditionné de LN-F traités avec le milieu conditionné de 1205Lu pendant une semaine (ED-FRC CM).

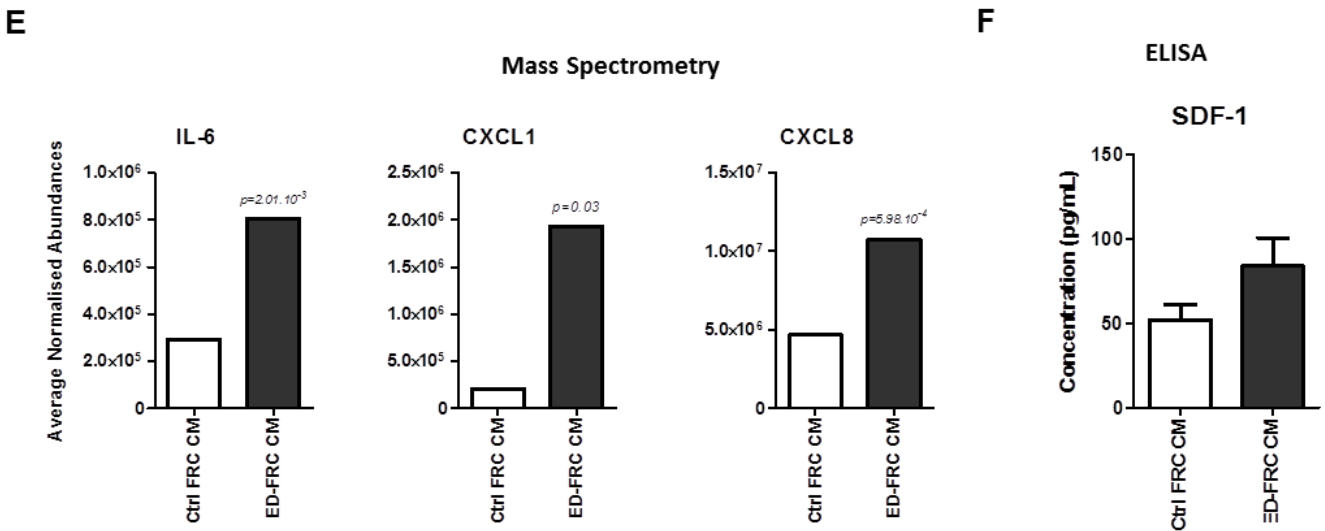
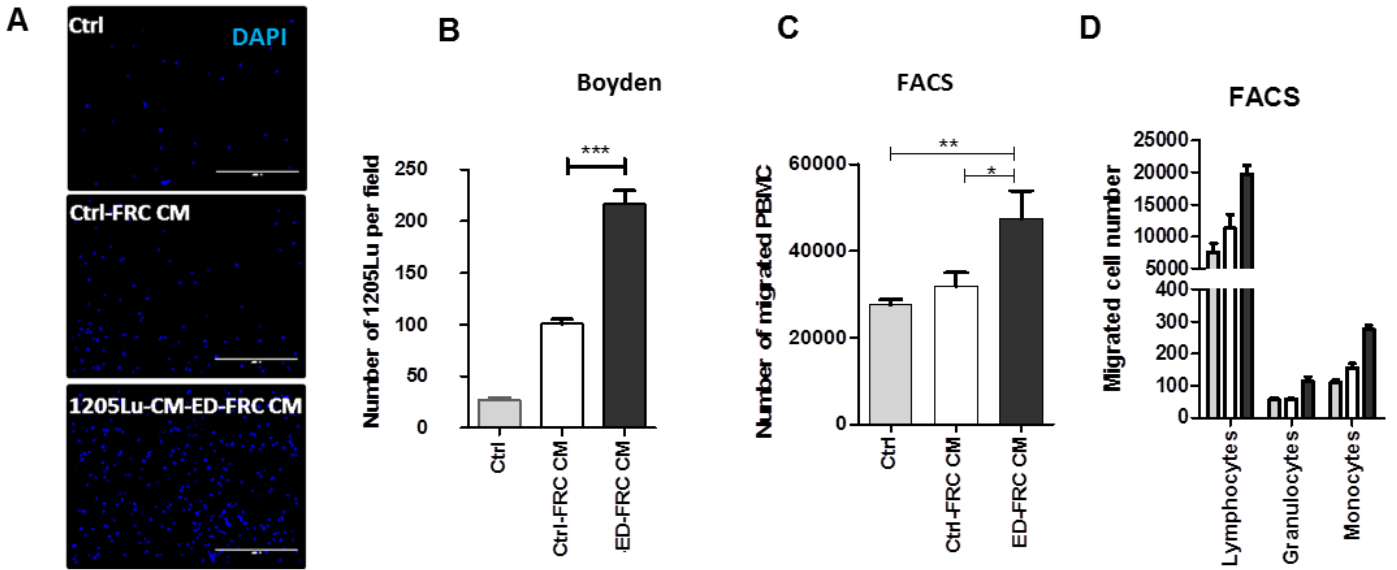
J'ai constaté que le sécrétome des LN-F éduqués facilite la transmigration d'un nombre plus important de cellules 1205Lu (**Fig4A/B**). De la même manière, des PBMC (*Peripheral Blood Mononuclear Cells*) issus de sang de donneurs sains (EFS) sont davantage attirés par le sécrétome des LN-F éduqués que par le sécrétome des LN-F contrôles. En analysant par FACS les marqueurs des PBMC ayant migré, j'ai observé que cette migration augmentée de cellules immunitaires vers le sécrétome de LN-F éduqués concerne aussi bien les lymphocytes, les granulocytes que les monocytes.

Pour expliquer ces résultats, la modification de l'expression des cytokines et des chimiokines par l'éducation par les 1205Lu a été étudiée dans les LN-F de trois manières. L'analyse du sécrétome des LN-F par spectrométrie de masse et par ELISA ainsi que l'analyse par puces à ADN du transcriptome des LN-F contrôles et traités avec le milieu conditionné de 1205Lu. Ces analyses révèlent un grand nombre de modifications dans l'expression et la sécrétion des cytokines et des chimiokines. Parmi les plus différenciellement exprimées et sécrétées, on trouve un certain nombre de cytokines et chimiokines inflammatoires (IL-6, IL-8/CXCL8, CXCL1) (**Fig4E**). L'IL-6 et l'IL-8/CXCL8 sont deux cytokines dont l'expression et la sécrétion sont particulièrement augmentées par les LN-F éduqués (**Fig4E/H**). Dans le ganglion, l'IL-6 favorise aussi la transmigration des lymphocytes dans l'endothélium des HEV (Fisher et al., 2015). L'IL-6 et l'IL-8 jouent un rôle paradoxal dans le microenvironnement tumoral en favorisant la différenciation de cellules immunomodulatrices (macrophages M2, cellules dendritiques régulatrices) et le recrutement de cellules immunitaires variées, en particulier les neutrophiles pour l'IL-8. La chimiokine CXCL1 est également beaucoup plus sécrétées par les LN-F éduqués. Elle est produite par les CAF de la tumeur primaire pour attirer les neutrophiles (Monteran et Erez, 2010). Les LN-F éduqués expriment et sécrètent aussi à hauts niveaux la chimiokine CXCL12, qui possède un fort pouvoir chimiotactique à la fois sur les cellules tumorales et les cellules immunitaires (**Fig4F**). Elle se distingue de la plupart des cytokines et chimiokines caractéristiques des FRC qui ne sont pas ou peu différenciellement exprimées (CCL21, CXCL13) (**Fig4H**). Ces cytokines et chimiokines (CXCL12, IL-6, CXCL8, CXCL1) sont de potentiels candidats pour expliquer le chimiotactisme accru du sécrétome des LN-F éduqués.

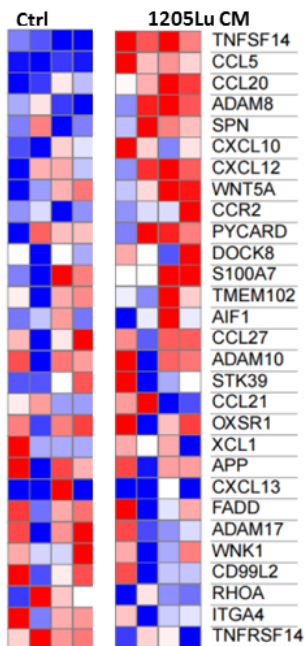
Pour savoir comment la matrice des LN-F contrôles et des LN-F éduqués affecte la migration des cellules tumorales et immunitaires, j'ai effectué des expériences de migration en chambre de Boyden vers un gradient de sérum en tapissant la membrane de séparation avec de la gélatine, la matrice des LN-F contrôles (*Ctrl-FRC Matrix*) ou la matrice des LN-F traités par le milieu conditionné de 1205Lu (*ED-FRC Matrix*). Cette fois, les résultats concernant les cellules tumorales et les cellules immunitaires s'opposent. La transmigration des 1205Lu est augmentée en présence de la matrice des LN-F éduqués par rapport à celle des LN-F contrôles (**Fig5A**). Pour les PBMC au contraire, la migration est réduite en présence de matrice par rapport au contrôle de gélatine, qu'elle ait été produite par les LN-F contrôles ou éduqués (**Fig5B**).

J'ai caractérisé la matrice des LN-F contrôles et des LN-F éduqués. J'observe que l'activation des LN-F éduqués par le milieu conditionné de 1205Lu est associée à une production accrue de fibres matricielles (collagène I, fibronectine). La matrice des LN-F éduqués est donc plus riche en collagène et en fibronectine et montre également une meilleure organisation de ces fibres (**Fig5C/D**). Les LN-F éduqués surexpriment aussi certaines protéines et enzymes matricellulaires, dont la ténascine C, SPARC et LOXL2, qui sont également plus abondantes dans leur matrice extracellulaire (**FigE/F**). Ces trois protéines interagissent avec les fibres de collagène et favorisent leur interconnexion (LOXL2) et leur assemblage en fibrilles organisées (TNC, SPARC) (*Gerarduzzi et al., 2020*). Ces résultats vont dans le sens d'une matrice plus dense, de nature fibrotique, un état connu pour favoriser l'invasion tumorale mais provoquant l'exclusion des lymphocytes (*Salmon et al., 2012 ; Bonnans et al., 2014*).

L'ensemble de ces résultats montre que les facteurs sécrétés par une lignée de mélanome invasif, les 1205Lu, activent et éduquent les LN-F. Les LN-F activés sécrètent des cytokines, des chimiokines et une matrice favorisant l'invasion tumorale. Les LN-F subissent ainsi une activation et une reprogrammation profonde affectant nombre de leurs fonctions. La prolifération, la sécrétion de cytokines et de chimiokines et la production d'un réseau de matrice extracellulaire sont trois des propriétés majeures des FRC pour réguler l'architecture et la fonction du ganglion.



G GO_POSITIVE_REGULATION_OF_T_CELL_MIGRATION



H BIOCARTA_CYTOKINE_PATHWAY

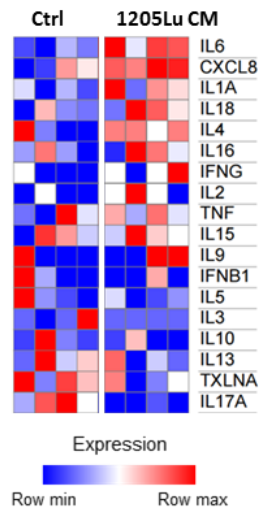


Figure 4 : Educated LN-F recrute more 1205Lu and immune cells through a remodeled secretome

- (A) Picture of Hoechst staining of the nuclei of 1205Lu that migrated under the membrane of the boyden chamber. Barre d'échelle : 100µm.
- (B) Quantification of the number of 1205Lu that migrated towards control medium (Ctrl), conditioned medium of control LN-F (Ctrl-FRC CM) or conditioned medium of educated LN-F with 1205Lu CM (ED-FRC CM). (n=2, in quadruplicates; Mean +/- S.E.M; p-Val (***)<0.001)
- (C) Quantification by flux cytometry of the number of PBMC that migrated towards control medium (Ctrl), conditioned medium of control LN-F (Ctrl-FRC CM) or conditioned medium of educated LN-F with 1205Lu CM (ED-FRC CM). (n=2; in triplicates; Mean +/- S.E.M; p-Val(*)<0.1; p-Val(**)<0.01.
- (D) Quantification by flux cytometry of subpopulation of PBMC that migrated in (C).
- (E) Mass spectrometry analysis of normalized mean abundances of IL6, IL8/CXCL8 and CXCL1 in conditioned medium of control LN-F or educated LN-F with 1205Lu CM.
- (F) Concentration of SDF-1 measured by ELISA in the conditioned medium of control LN-F (Ctrl-FRC CM) or in the conditioned medium of LN-F treated for one week with 1205Lu CM (ED-FRC CM) (in duplicate; mean +/- SEM).
- (G) Microarray analysis of the relative expression of genes from GO_POSITIVE_REGULATION_OF_T_CELL_MIGRATION geneset.
- (H) Microarray analysis of the relative expression of genes from BIOCARTA_CYTOKINE_PATHWAY geneset.

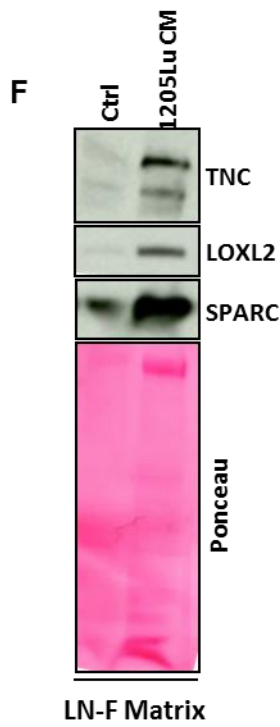
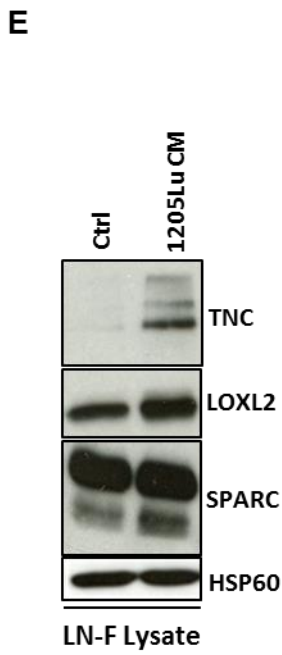
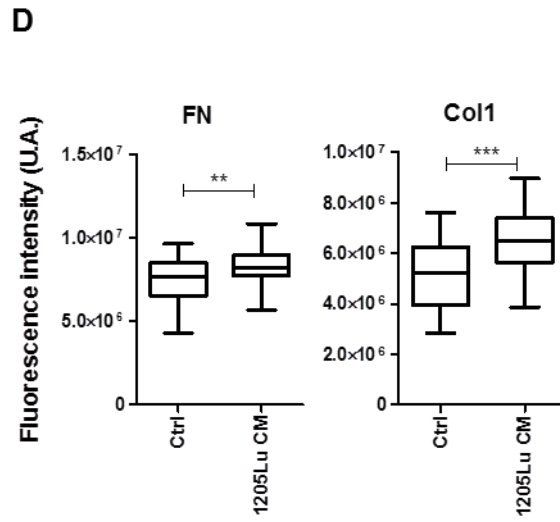
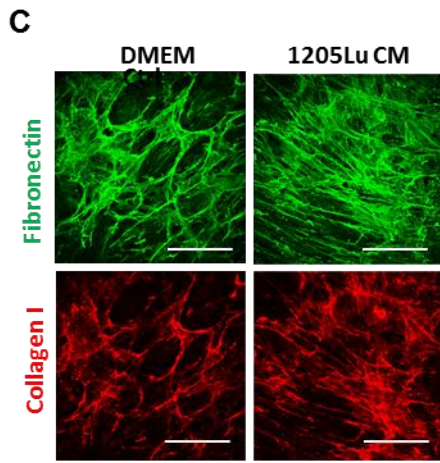
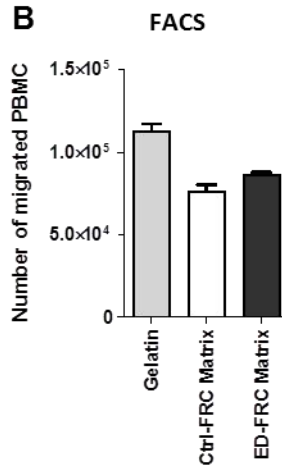
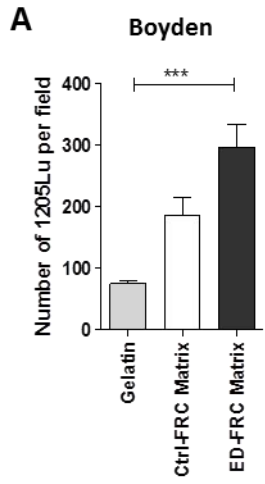


Figure 5 : Educated LN-F recrute more 1205Lu through a remodeled matrix

- (A) Quantification of the number of 1205Lu that migrated through gelatin (Ctrl), decellularized matrix from control LN-F (Ctrl-FRC Matrix) or from educated LN-F by conditioned medium of 1205Lu (ED-FRC Matrix). (n=2, in duplicates; Mean +/- S.E.M; p-Val (***)<0.001)
- (B) Quantification of the number of PBMC that migrated through gelatin (Ctrl), decellularized matrix from control LN-F (Ctrl-FRC Matrix) or from educated LN-F by conditioned medium of 1205Lu (ED-FRC Matrix). (n=2; en triplicats; moyenne +/- écart-type).
- (C) Immunofluorescence analysis of fibronectin and collagen I in decellularized matrices of control LN-F or LN-F educated with 1205Lu CM (Scale bar = 100 μ m)
- (D) Quantification of fibronectin and collagen I fluorescence on a 2D Z-stack of the 3D reconstitution of the matrix (** p<0.01 ; *** p<0.001).
- (E) Immunoblot of matricellular proteins (TNC, LOXL2, SPARC) from cellular lysate of LN-F treated for 4 days with control medium (Ctrl) ou or 1205Lu CM. HSP60 est utilisé comme contrôle de charge.
- (F) Immunoblot of matricellular proteins (TNC, LOXL2, SPARC) from decellularized matrices of LN-F treated for 4 days with control medium (Ctrl) ou or 1205Lu CM. The « *Rouge Ponceau* » is an indicator total quantity of matrix made by LN-F.

Les facteurs sécrétés par les mélanomes invasifs inhibent la contraction des FRC

Une dernière propriété est leur contractilité. Je me suis donc demandé si les facteurs sécrétés par la lignée invasive 1205Lu et d'autres lignées invasives ou prolifératives de mélanome affectent la contractilité des LN-F.

Pour établir la signature proliférative ou invasive des lignées de mélanome disponibles au laboratoire, j'ai étudié l'expression de MITF et AXL dans ces lignées par RT-qPCR. J'ai ainsi identifié que les Mel501, les Mewo, les SK-Mel-28 et les WM164 partagent une signature MITF^{high} AXL^{low} caractéristique du profil différencié et prolifératif, tandis que les lignées 1205Lu, WM793 et WM2032 partagent une signature MITF^{low} AXL^{high} caractéristique du profil dédifférencié et invasif (**Fig6A**). Ces deux profils sont indépendants des mutations oncogéniques des différentes lignées : les 1205Lu et les Mel501 sont mutées BRAF tandis que les WM2032 sont mutées NRAS. Nous retrouvons ainsi dans les mélanomes du laboratoire la dichotomie observée initialement par *Hoek et al.* 2008, à l'origine d'une série de travaux montrant que les mélanomes sont des cellules tumorales particulièrement plastiques, pouvant transiter sous la pression de l'environnement et des thérapies entre un état prolifératif différencié sensible aux thérapies, et des états non prolifératifs différenciés ou dédifférenciés, et résistants (*Tsoi et al.*, 2018 ; *Rambow et al.*, 2018).

Afin d'analyser la contractilité des FRC en présence des facteurs sécrétés de mélanome, j'ai placé les LN-F dans des gels de collagène 3D et je les ai traités avec le milieu conditionné des mélanomes. De manière remarquable, la contraction spontanée des LN-F est maintenue lorsque les gels sont traités avec le milieu conditionné des mélanomes prolifératifs. Au contraire, la contraction est inhibée par un ensemble de milieux conditionnés qui correspondent aux lignées de profil invasif (**Fig6C**) Je n'ai pas caractérisé la lignée Sbcl2, mais que celle-ci est décrite comme invasive (*Tsoi et al.*, 2018). J'ai confirmé ces résultats avec le milieu conditionné de mélanomes isolés plus récemment de patients. Les mélanomes MNC1, MM029 et MM099 ont un profil invasif avec la signature MITF^{low} AXL^{high} au contraire de la lignée MM074 qui a un profil prolifératif avec la signature MITF^{high} AXL^{low} (**Fig6B**). Les milieux conditionnés issus des trois mélanomes invasifs inhibent la contraction des LN-F, alors que celui de MM074 maintient la contraction spontanée. Ces résultats sont surprenants, en effet le milieu conditionné des cellules tumorales invasives est riche en TGFβ et en cytokines de la famille de l'IL6, ainsi que montré pour les 1205Lu (**Fig11F**). Or ces cytokines induisent l'activation des propriétés contractiles des fibroblastes sains d'autres tissus, comme ceux de peau (*Sanz-Moreno et al.*, 2011 ; *Ballester et al.*, 2019). Les fibroblastes de ganglion sont donc particuliers en ce qu'ils partagent à l'état basal des propriétés de myofibroblastes avec les CAF et perdent leur contractilité sous l'action des facteurs tumoraux connus par ailleurs pour être pro-fibrotiques. C'est la première fois que l'on observe l'inhibition de la contraction de fibroblastes par des facteurs sécrétés tumoraux.

De manière très intéressante également, je confirme ces résultats avec des lignées de cancer du sein. Le milieu conditionné d'une lignée peu invasive, les MCF7, maintient la contraction spontanée, et le milieu conditionné d'une lignée très invasive, les MDA-MB-231, inhibe la contraction (**Fig6E**) (*Gest et al.*, 2013). Cela montre en plus que l'inhibition de la contraction des LN-F par les facteurs sécrétés de cellules invasives n'est pas spécifique du mélanome, mais se retrouve dans au moins un autre cancer lymphophile.

Il peut sembler paradoxal que le milieu conditionné des mélanomes invasifs active les LN-F (**Fig3**) et inhibent leur contraction en parallèle. Il s'agit cependant d'un processus analogue à l'activation des FRC lors d'une réponse immunitaire, qui est associée à leur prolifération, la surexpression de la podoplanine, la relaxation cytosquelette actine (Yang *et al.*, 2013 ; Astarita *et al.*, 2015). Cela suggère donc que la relaxation des LN-F est une réponse fonctionnelle des LN-F activés, de la même manière que la réponse des FRC aux signaux des cellules dendritiques et des lymphocytes lors de la réponse immunitaire. Cela montre également que les milieux conditionnés des cellules prolifératives (Mel501) n'ont pas la même capacité à activer les LN-F que les facteurs sécrétés par les mélanomes invasifs (1205Lu), ce qui pourrait influencer leurs capacités à métastaser dans le ganglion.

Un point commun entre la réponse induite par les facteurs sécrétés par les mélanomes invasifs et la réponse immunitaire sur la contraction des LN-F est leur caractère réversible. Dans les CAF, l'activation des propriétés myofibroblastiques résulte d'un processus de différenciation progressive mettant en jeu des marques épigénétiques stables (Albregues *et al.*, 2015). Dans les FRC, l'inhibition de la contraction observée lors de la réponse immunitaire est au contraire transitoire. Elle résulte de la rupture de la signalisation entre la PDPN et les protéines de la famille ERM induite par l'interaction de la PDPN avec CLEC2. La signalisation PDPN-ERM est rétablie quelques temps après la fin de l'interaction notamment grâce à la surexpression de la podoplanine (Astarita *et al.*, 2015). Dans une expérience de contraction, j'ai retiré le milieu conditionné de 1205Lu après une exposition de 2, 4 ou 8 jours. Les LN-F récupèrent le niveau de contraction des LN-F Ctrl quel que soit le temps d'exposition (**Fig3F**), ce qui signifie que l'inhibition de la contraction des LN-F est un phénomène réversible, nécessitant la présence des facteurs sécrétés par le mélanome invasif pour être maintenue. On ne peut cependant exclure qu'une exposition plus longue provoque une transition phénotypique stable par l'apposition de marques épigénétiques. Toutefois, l'inhibition est relativement rapide, et on peut observer ses conséquences sur la diminution du diamètre du gel contenant les LN-F dès 24 heures. Elle doit donc résulter de la modulation de phénomènes cellulaires précoces, tels que des voies de signalisation par modification post-traductionnelle (principalement les mécanismes de phosphorylation / déphosphorylation) et/ou de la transcription de gènes au *turn-over* rapide.

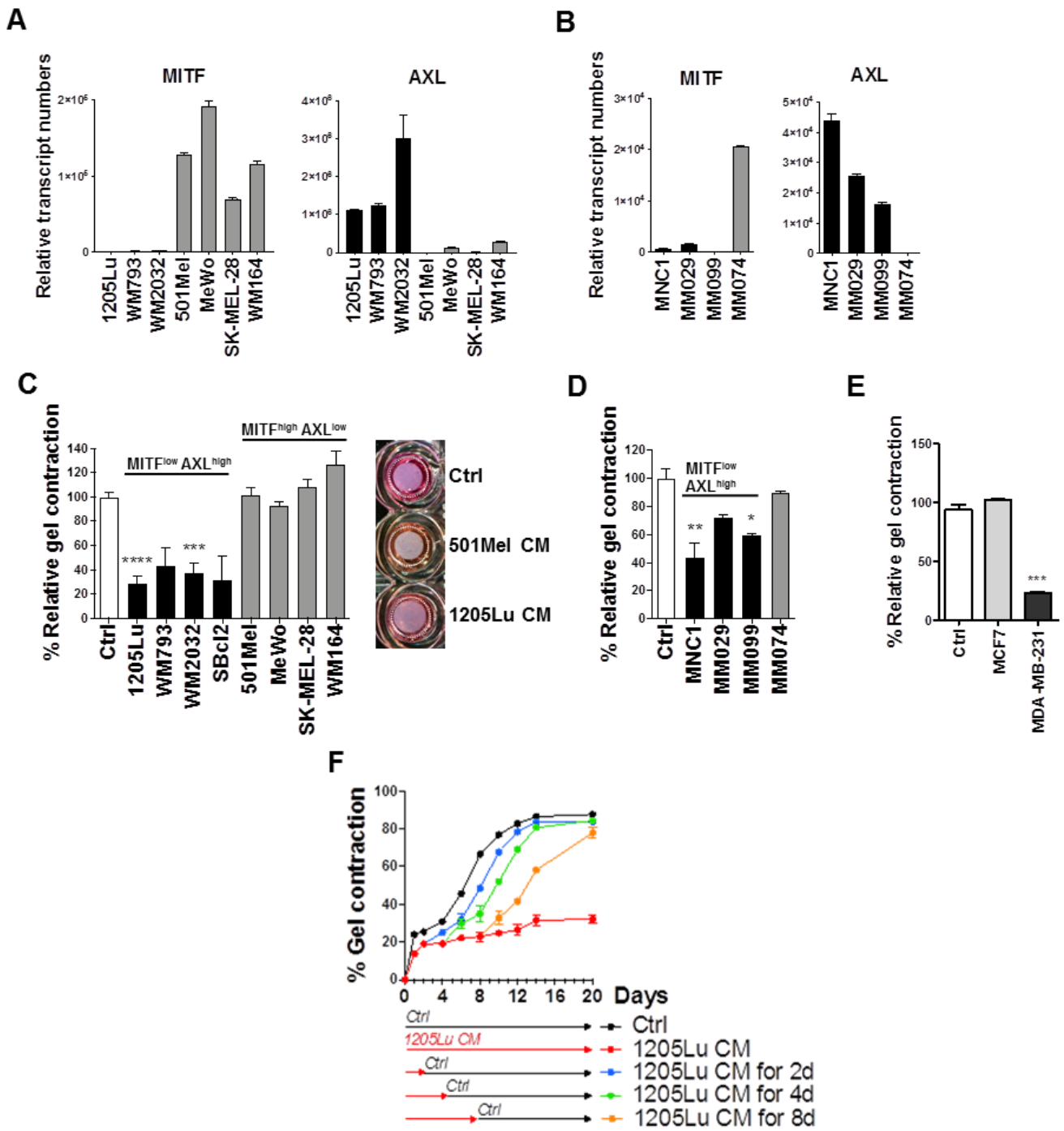


Figure 6 : Secreted factors of invasive cancer cells inhibit contractile properties of LN-F

(A/B) Quantification by qRT-PCR of the expression of MITF and AXL genes in (A) melanoma cell lines or (B) short term melanomas isolated from patients (n = 2, in duplicate; mean +/- SEM).

(C) Representative picture and quantification of LN-F contraction of a 3D collagen gel after 7 days culture with Ctrl medium or CM from invasive MITF^{low} AXL^{high} (black) or proliferative MITF^{high} AXL^{low} (grey) melanoma cell lines (n = 3, in triplicate; mean +/- SEM; p-Val (***)<0.001, (****)<0.0001).

(D) LN-F gel contraction after 7 days incubation with CM from invasive MITF^{low} AXL^{high} (black) or proliferative MITF^{high} AXL^{low} (grey) short term patient melanomas (n = 3, in triplicate; mean +/- S.E.M; p-Val (*)<0.05, (**)<0.01).

(E) Quantification of LN-F contraction of a 3D collagen gel after 7 days culture with Ctrl medium (Ctrl), conditioned medium of a few invasive mammary carcinoma cell line (MCF-7) or conditioned medium of a high invasive mammary carcinoma cell line (MDA-MB-231) (in quadruplicate, Mean +/- S.E.M)

(F) Time-lapse analysis of LN-F gel contraction (n = 2, in quadruplicate; mean +/- SEM). The 1205Lu CM is replaced by ctrl medium after 2, 4 or 8 days.

Les facteurs sécrétés par les mélanomes invasifs inhibent la voie RhoA-ROCK-actomyosine

Pour identifier les voies moléculaires inhibant la contraction des LN-F, j'ai analysé les résultats de puces à ADN comparant le transcriptome des LN-F contrôles et éduqués 2 jours par le milieu conditionné des 1205Lu. J'ai sélectionné les 1110 gènes dont l'expression est diminuée avec un $\text{LogFC} \leq -0,5$ dans les LN-F éduqués par rapport aux LN-F contrôles (**Fig7A**) et je les ai analysés par GSEA (*Gene Set Enrichment Analysis*). Les voies identifiées concernent la régulation de la polymérisation de l'actine, de l'activité des RhoGTPases et des co-activateurs transcriptionnels de la mécanotransduction YAP et TEAD2 (**Fig7B**).

La contraction de l'actomyosine est le résultat d'interactions au sein d'un réseau complexe d'inter-régulation entre activateurs et inhibiteurs de la polymérisation de l'actine et de l'activité des RhoGTPases. De plus, l'actomyosine est au cœur d'un dialogue entre l'environnement (matrice extracellulaire, adhésions cellulaires) et de nombreuses fonctions cellulaires (division cellulaire, mort cellulaire, trafic intracellulaire), et permet à la fois à la cellule de modifier son environnement et de répondre aux changements qui y ont lieu. Les protéines impliquées dans la contraction des cellules non musculaires ont été regroupées sous le nom de contractome dans une étude de 2015 et leurs inter-régulations ont été cartographiées (*Zaidel-Bar et al., 2015*). Nos données de transcriptomique ont permis d'identifier des gènes codant pour des protéines du contractome dont l'expression est diminuée dans les LN-F éduqués (**Fig7C**). En accord avec les analyses GSEA, la diminution de l'expression de GTPases (comme RhoA) et de plusieurs des ARHGEF et ARHGAP fait partie des événements les plus remarquables. On peut noter la diminution d'expression de ARHGEF2 qui est un des principal régulateurs de RhoA et qui a été décrit dans la contraction des LN-F (*Acton et al., 2014*). En **figure 7D**, les GSEA plot montrent que la diminution d'expression des gènes impliqués dans le cytosquelette d'actine et l'organisation du cytosquelette d'actomyosine sont des événements significatifs qui ont lieu dans le transcriptome des LN-F éduqués (*GO_Actin_Skeleton : p-value <0.001 et NES -1.78 ; GO_Actomyosin_Structure_Organization : p-value <0.01 et NES -1.52*). Les gènes les plus différenciellement dérégulés des voies citées en **Fig7B** sont également présentés dans la **figure S4** (Voir **Article**).

Pour formellement confirmer la modulation des voies Rho-GTPases et de l'actomyosine, j'ai réalisé des tests de contraction de LN-F avec l'inhibiteur de la kinase ROCK (Y-27632), située en aval de RhoA et en amont de MLC2. Le Y-27632 inhibe la contraction de LN-F issus de 4 donneurs différents, ce qui confirme que cette voie est majeure pour la contraction des LN-F (**Fig7E**). Dans des LN-F contrôles, éduqués avec les milieux conditionnés de Mel501 ou de 1205Lu, ou traités avec du Y-27632, j'ai observé par immunofluorescence les fibres de stress d'actine (actine F) marquées à la phalloïdine et la phosphorylation de MLC2, qui sont des marqueurs de la contraction du cytosquelette d'actomyosine des cellules (**Fig7F**). La quantité d'actine F et de P-MLC2 dans LN-F traités avec le milieu conditionné de Mel501 est semblable à celle des LN-F contrôles, voire un peu plus importante pour l'actine F. Cela montre que les facteurs sécrétés d'un mélanome prolifératif ne module pas négativement le cytosquelette d'actomyosine. Au contraire, les LN-F éduqués par le milieu conditionné de 1205Lu montrent significativement moins de P-MLC2 et d'actine F, de la même manière que lorsque les LN-F sont traités avec le Y-27632. Cela démontre que les facteurs sécrétés d'un mélanome invasif engendrent la diminution de la polymérisation de l'actine et la désactivation des chaînes légères de la myosine II. De manière intéressante, *Astarita et al.*, montrent que le blocage

de la contractilité des FRC engendre un changement de morphologie drastique vers l'élongation cellulaire. J'ai observé le même phénomène, comme montré par une augmentation de l'index morphologique (Fig7F/G).

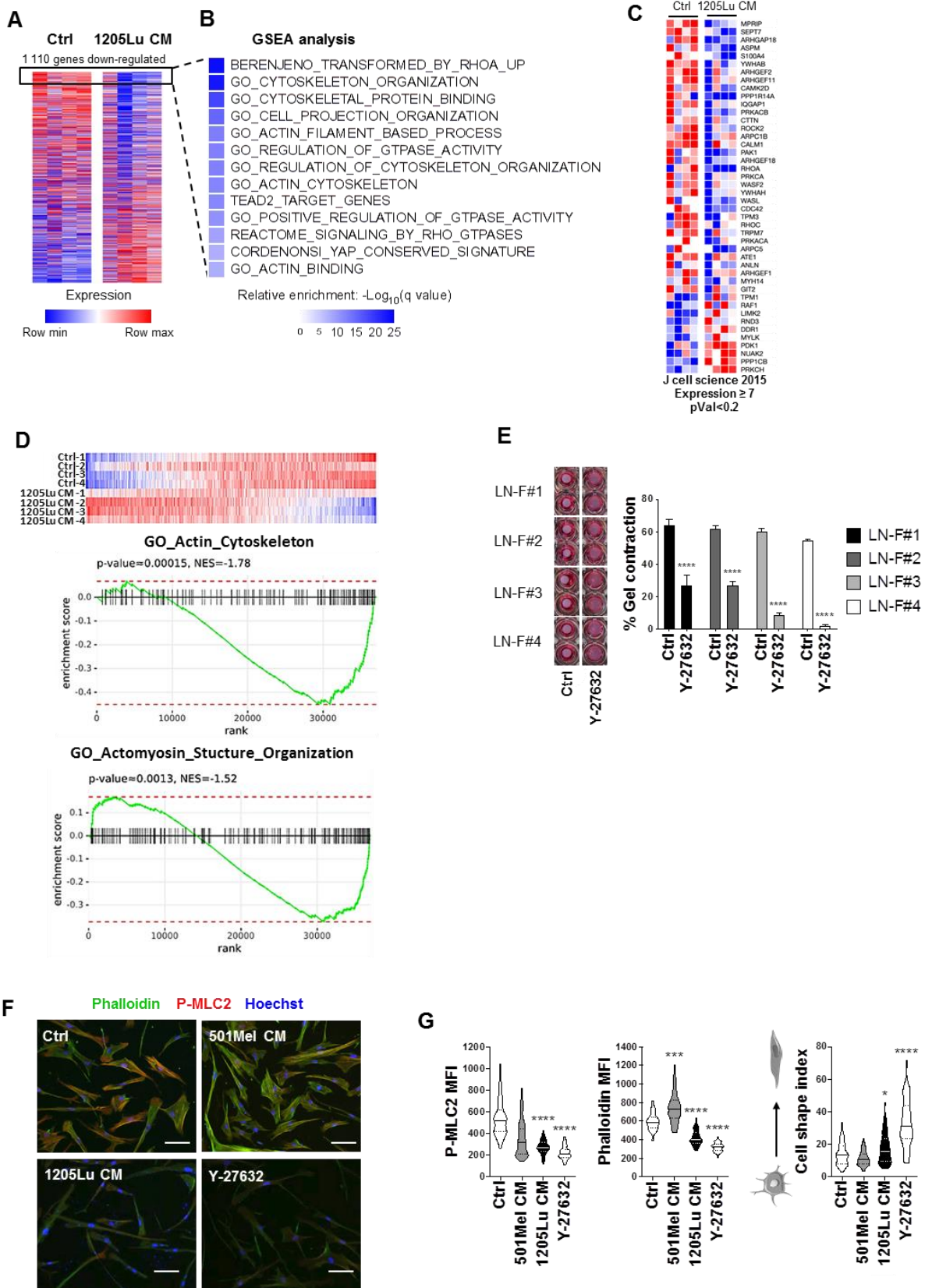


Figure 7: Invasive melanoma secreted factors inhibit the ROCK-actomyosin-mediated LN-F contractility

(A) Microarray comparison of genes expressed in Ctrl and 1205Lu CM-treated LN-F. The most down-regulated genes in 1205Lu-reprogrammed LN-F (with $\text{LogFC} \leq -0.5$) are surrounded.

(B) Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) of the 110 most down-regulated genes in 1205Lu-reprogrammed LN-F.

(C) Genes involved in the actomyosin contractility in non-muscle cells (contractome) most significantly up- or down-regulated ($p\text{Val} < 0.05$) in 1205Lu-reprogrammed LN-F.

(D) GSEA-Plots quantifying the enrichment of associated genes to actin cytoskeleton and to organization and structure of actomyosin among genes of the microarray.

(E) Pictures of LN-F from 4 donors embedded in a 3D collagen gel and treated with control medium (Ctrl) and the ROCK inhibitor Y-27632 (10 μM) for 8 days (left). Quantification of the % gel contraction (in quadruplicate; mean \pm SEM; $p\text{-Val} (****) < 0.0001$) (right).

(F) Immunofluorescence analysis of phalloidin, P-MLC2 and Hoechst in LN-F grown for 7 days with 1205Lu or 501Mel CM (Scale bar = 100 μm).

(G) Quantification of mean fluorescence intensities (MFI) of active pS19 MLC2 (P-MLC2), F-actin stress fibers (phalloidin) and the cell shape index ($n = 45$ cells; median \pm quartiles; $p\text{-Val} (*) < 0.05$, $(***) < 0.001$, $(****) < 0.0001$).

L'inhibition de la contractilité des LN-F est associée à la diminution de l'activité de YAP

J'ai voulu également vérifier que les LN-F présentent une diminution de l'activité de YAP comme suggéré par les données de GSEA (**Fig7B**). Plus précisément, il existe des signatures concordantes apportées par les analyses GSEA des puces à ADN montrant la diminution de l'expression de gènes dépendant de YAP (**Fig8A, haut**) et de son partenaire transcriptionnel TEAD2 (**Fig8B, bas**). Les signatures GSEA vont donc dans le sens d'une diminution de l'activité de YAP-TEAD dans les LN-F éduqués par la lignée invasive 1205Lu. Pour aller plus loin et confirmer que l'activité transcriptionnelle de YAP est inhibée par les facteurs sécrétés de mélanomes invasifs, j'ai réalisé des expériences de marquage de YAP en immunofluorescence ainsi que RT-qPCR sur les gènes cibles de YAP.

Du fait que YAP soit particulièrement sensible à la rigidité du microenvironnement (*Dupont et al., 2011*), j'ai ensemencé les LN-F sur des hydrogels d'acrylamide et de polyacrylamide de rigidité contrôlée telle que nous l'avons mesuré sur les ganglions (0,2kPa). Cependant, en 2 dimensions sur un hydrogel de 0,2 kPa, l'activité de YAP est réduite et peu variable (*Dupont et al., 2011*). J'ai donc choisi d'étudier les modifications de YAP sur des hydrogels avec une rigidité de 2,8 kPa, qui s'est révélée optimale pour mesurer l'activité de YAP, que j'ai évalué en visualisant par immunofluorescence les changements de localisation de YAP entre noyau et cytoplasme et en analysant par RT-qPCR l'expression de ses gènes cibles.

Par immunofluorescence, j'ai ainsi constaté que YAP est relocalisé dans le cytoplasme des LN-F ensemencés sur hydrogels de 2,8kPa et éduqués par les facteurs sécrétés de lignées invasives (1205Lu, WM2032 et WM793), au contraire des LN-F en condition contrôle ou éduqués avec les facteurs sécrétés de lignées prolifératives (Mel501, SKMel28) (**Fig8B/D**). Cette relocalisation de YAP est associée à une morphologie cellulaire allongée comme l'indique l'augmentation de l'index morphologique des LN-F éduqués avec le milieu conditionné des mélanomes invasifs (**Fig8B/C**). Toujours en accord avec ces résultats, le milieu conditionné de 1205Lu inhibe l'expression des gènes cibles de YAP *CYR61*, *CTGF* et *SDPR*. Même s'ils sont moins marqués pour les raisons indiquées plus haut, les résultats sont similaires dans les LN-F traités avec le milieu conditionné de 1205Lu sur les hydrogels de 0,2kPa (**Fig8F/G/H**).

Ces résultats font de YAP un marqueur spécifique de l'état de contraction des LN-F. Afin de montrer que YAP contrôle la contraction des FRC, j'ai réalisé un test de contraction avec des LN-F dont l'expression de YAP a été diminuée ou éteinte par siARN (siYAP). J'ai vérifié la déplétion de YAP par RT-qPCR et Western Blot (**Fig8I**). Les LN-F déplétés en YAP présentent une contraction quasiment abolie (**Fig 8J**), faisant de YAP un master-gène de la contraction des LN-F. Mes résultats indiquent que non seulement YAP est associé à la régulation des propriétés contractiles des LN par les facteurs sécrétés de mélanomes invasifs, mais surtout qu'il contrôle directement la contraction spontanée des FRC. S'il était déjà montré que YAP contrôle la spécification des cellules précurseurs des FRC dans le ganglion lymphatique (*Choi et al., 2020*), c'est la première fois que l'on montre que YAP contrôle les propriétés contractiles basales des LN-F matures.

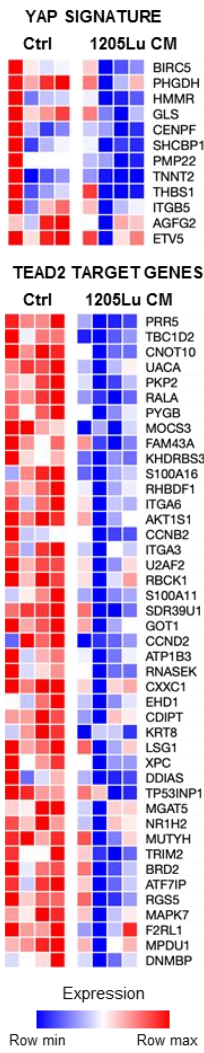
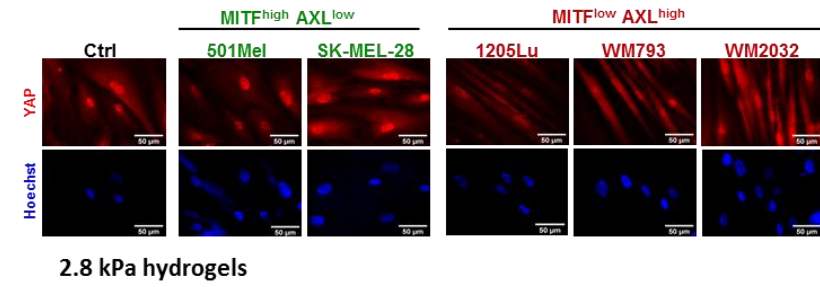
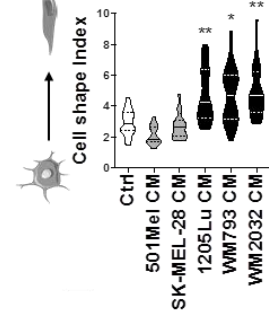
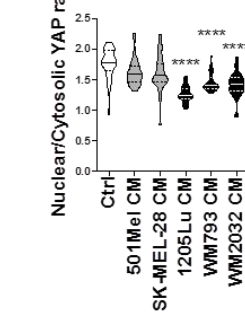
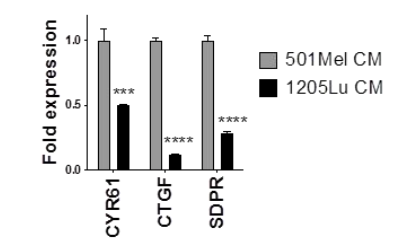
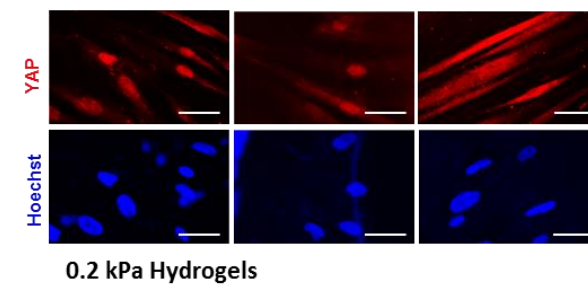
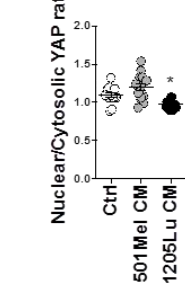
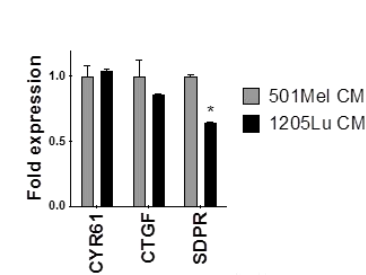
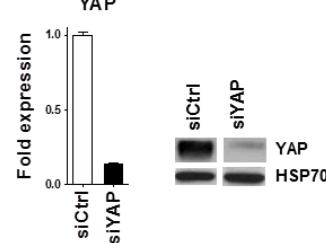
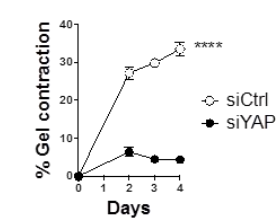
A**B****C****D****E****F****G****H****I****J**

Figure 8. The inhibition of LN-F contraction induced by invasive melanoma CM is associated with decreased YAP activity.

(A) Top genes down-regulated in 1205Lu CM-treated LN-F in the Cordenonsi YAP conserved Signature and (LogFC \leq - 0.5) (*up*) and top TEAD2 target genes down-regulated in 1205Lu CM-treated LN-F (LogFC \leq - 0.5, pVal \leq 0.05) (*down*).

(B) Immunofluorescence analysis of YAP and Hoechst localization in LN-F plated on 2.8 kPa hydrogels and treated 4 days with ctrl medium, proliferative or invasive melanoma CM. Scale bar = 50 μ m.

(C) Analysis of the cell shape index of LN-F plated on 2.8 kPa hydrogels and treated 4 days with ctrl medium, proliferative or invasive melanoma CM (n = 20 cells; median +/- quartiles; p-Val (*) $<$ 0.05, (**) $<$ 0.01).

(D) Quantification of YAP nuclear and cytosolic localization in LN-F plated on 2.8 kPa hydrogels and treated 4 days with ctrl medium, proliferative or invasive melanoma CM (n = 32 cells; median +/- quartiles; p-Val (****) $<$ 0.0001).

(E) Quantification by qRT-PCR of the expression of YAP target genes in LN-F plated on 2.8 kPa hydrogels and treated 4 days with 501Mel CM or 1205Lu CM (n = 2, in duplicate; mean +/- SEM; p-Val (***) $<$ 0.001, (****) $<$ 0.0001)

(F) Immunofluorescence analysis of YAP and Hoechst localization in LN-F plated on 0.2 kPa hydrogels and treated 4 days with 501Mel CM or 1205Lu CM. Scale bar = 50 μ M.

(G) Quantification of YAP nuclear and cytosolic localization in LN-F plated on 0.2 kPa hydrogels and treated 4 days with 501Mel CM or 1205Lu CM (n = 15 cells, mean +/- SEM, p-Val (*) $<$ 0.05).

(H) Quantification by qRT-PCR of the expression of YAP target genes by LN-F plated on 0.2 kPa hydrogels and treated 4 days with with 501Mel CM or 1205Lu CM (n = 2 in duplicate, mean +/- SEM, p-Val (*) $<$ 0.05).

(I) Quantification by qRT-PCR (left) and immunoblot (right) of the extinction of YAP expression by siRNA (siYAP) in the experiment shown in J. A ctrl siRNA (siCtrl) is used as a ctrl of transfection (n = 2, in duplicate; mean +/- SEM).

(J) Quantification of 3D Collagen contraction assay of LN-F transfected with siCtrl or siYAP (n = 2, in quadruplicate; p-Val (****) $<$ 0.0001).

La voie JAK1-STAT3 est inhibée par les facteurs sécrétés par les mélanomes invasifs et contrôle la contraction spontanée des LN-F

Après avoir identifié que les facteurs sécrétés par les mélanomes invasifs régulent la contraction des LN-F en inhibant la signalisation dépendante de ROCK-actomyosine et de YAP, j'ai voulu caractériser la voie de signalisation faisant le lien entre les facteurs tumoraux extracellulaires et ces signaux intracellulaires.

L'une des voies les plus naturelles à étudier est bien entendu la voie CLEC2-PDPN-ERM qui est connue pour réguler la contraction des FRC en récapitulant l'ensemble des effets observés sur les LN-F traités par les milieux conditionnés de mélanomes invasifs : modification de la morphologie cellulaire, inhibition de RhoA et des fibres d'actomyosine, relocalisation de YAP (*Acton et al.*, 2014 ; *Astarita et al.* 2015). CLEC2 est le seul ligand connu pour interagir avec la podoplanine et induire ces effets. Or, CLEC2 n'est détecté ni à la surface (**Fig9A**), ni dans le sécrétome (analyse par spectrométrie de masse) des mélanomes Mel501 ou 1205Lu. En absence de CLEC2, la podoplanine se lie au complexe ERM qui est phosphorylé. J'ai observé par western-blot que la phosphorylation d'ERM n'est pas modulée sous l'action des facteurs sécrétés par les Mel501 ou 1205Lu (**Fig9B**). L'absence de CLEC2 et de modulation de la phosphorylation d'ERM supportent l'idée que la voie CLEC2-PDPN-ERM n'est pas impliquée dans la modulation des propriétés contractiles des LN-F par les facteurs sécrétés tumoraux. Cependant, cette expérience confirme que le milieu conditionné de 1205Lu augmente les niveaux cellulaires de podoplanine, et diminue ceux de α -SMA. Ces deux résultats supportent encore une fois l'idée que les LN-F éduqués par les 1205Lu sont dans un état activé dont la réponse physiologique aux facteurs tumoraux est associée à l'inhibition des fibres de stress.

Je me suis alors tourné vers les mécanismes connus pour réguler la contraction des myofibroblastes et des CAF. L'activation des propriétés myofibroblastiques des CAF est en particulier induite par le TGF β , dont le récepteur TGFBR1 active la voie SMAD2/4, et les cytokines inflammatoires de la famille de l'IL6 (IL6, LIF), dont une sous-unité commune de leurs récepteurs, GP130, permet l'activation de la voie JAK1/2-STAT3. Dans le carcinome cutané, la boucle d'activation passe notamment par le TGF β tumoral et le LIF sécrété par les fibroblastes permettant le maintien de la voie JAK1-STAT3 explique mieux (*Sanz-Moreno et al.*, 2001 ; *Albregues et al.*, 2014). Or, le TGF β , l'IL6 et le LIF sont parmi les cytokines les plus différenciellement sécrétées entre les 1205Lu et les Mel501 (*Tichet et al.*, 2015 ; **Fig11F**).

Pour tester l'implication du TGF β et des cytokines de la famille de l'IL-6, j'ai réalisé un test de contraction avec du TGF β ou du LIF recombinants. Ces cytokines n'induisent pas de modulation de la contractilité des LN-F (**Fig9E**). On peut donc exclure le rôle de TGF β ou de LIF exogène comme dans parmi les facteurs tumoraux dans la régulation de la contractilité des LN-F. De manière intéressante toutefois, j'ai observé en western blot que STAT3 est phosphorylé dans les LN-F quiescents. En réalisant une cinétique avec de courtes expositions aux milieux conditionnés (20 minutes) puis plus longues (2h, 24h, 4 jours), j'ai constaté que le traitement avec les facteurs sécrétés par les 1205Lu induit une forte phosphorylation activatrice de STAT3 dans les premières minutes d'exposition (ici 20 minutes), qui est ensuite déphosphorylée très rapidement par rapport aux LN-F contrôles ou traités avec le milieu conditionné de Mel501. Cette déphosphorylation est visible dès quelques heures (2h, 24h) et se maintient à long terme au moins pendant 4 jours (**Fig9C**). La déphosphorylation de STAT3

est confirmée avec les milieux conditionnés d'autres lignées invasives, et n'est pas induite par les facteurs sécrétés par les lignées prolifératives. (**Fig9D**). De manière concordante, l'inhibition de JAK1/2 par le Ruxolitinib inhibe la contraction de LN-F issus de quatre donneurs comme l'inhibiteur de ROCK, mais pas le SB-431542 qui inhibe le TGF β R (**Fig9F**). L'inhibition de JAK1/2 conduit également à la déphosphorylation de MLC2 constatée par Western Blot (**Fig9G**) et récapitule l'inhibition de RhoA par le milieu conditionné de 1205Lu observée en GLISA (**Fig9H**). L'activité de RhoA semble ainsi être sous le contrôle de JAK. L'immunoblot de P-MLC2 et P-STAT3 permet par ailleurs de se rendre compte que la voie JAK-STAT est en amont de la voie ROCK-MLC2 du fait que le Y-27632 n'induit pas la déphosphorylation de STAT3 (**Fig9G**). Ensemble, ces résultats suggèrent que le milieu des mélanomes invasifs inhibe la contraction des LN-F en dérégulant dès 2h puis sur le long terme l'activité de JAK-STAT3 puis de RhoA-ROCK-MLC2. Ensemble, ces résultats montrent que les facteurs sécrétés de 1205Lu inhibent la voie JAK/STAT3, mais aussi que l'inhibition de JAK/STAT3 par le Ruxolitinib inhibe la contraction spontanée des FRC. Je montre ainsi que la voie JAK/STAT3 contrôle la contraction spontanée des FRC, ce qui n'a jusqu'à ici jamais été montré.

En éteignant l'expression de JAK1 ou JAK2 par siARN, j'ai observé que la contraction des LN-F est spécifiquement contrôlée par JAK1 et non par JAK2, ainsi qu'il a été montré pour les CAF de carcinome cutané (*Albregues et al.*, 2014) (**Fig9I**). La déplétion de STAT3 par la même approche inhibe aussi la contraction des LN-F, ce qui confirme qu'il y a bien un contrôle de la contraction par la voie des cytokines JAK et STAT (**Fig9J**).

Une potentielle explication de la désactivation à long terme de la voie JAK1-STAT3 par le milieu conditionné des mélanomes invasifs est une désensibilisation de la voie. Les cellules tumorales invasives acquièrent un sécrétome chargé en cytokines, chimiokines et protéases qui favorisent leur migration (*Karagianis et al.*, 2010 ; *Mathias et al.*, 2009). Les 1205Lu en particulier sécrètent de nombreuses cytokines qui activent la voie JAK-STAT et qui peuvent expliquer la très forte augmentation de P-STAT3 observée dans les minutes suivant le début de l'exposition au milieu conditionné. Or, l'activation de la voie JAK-STAT induit l'expression ou l'activation de régulateurs négatifs parmi lesquels on trouve le microARN miR146a (*Ren et al.*, 2016), les membres de la famille des SOCS (*Suppressor of Cytokine Signaling*) (*Starr et al.*, 1997), les tyrosine-phosphatases dont PTPN2 (*Shields et al.*, 2008) et INPP5F (*Inositol-Polyphosphate-5-Phosphate F*) (*Kim et al.*, 2014). Ce n'est pas logique de le présenter comme ça. Parle des résultats GSEA, puis de tes hypothèses. De manière remarquable, les données de transcriptomique ne révèlent pas de signature de la voie JAK-STAT dans les gènes dont l'expression est diminuée dans les LN-F éduqués par les 1205Lu (**Fig7B**) mais on retrouve une surexpression de ces différents régulateurs négatifs dans les LN-F éduqués (**Fig9K**). Les tyrosine-phosphatases étant surtout très régulées au niveau post-traductionnel, j'ai voulu savoir si bloquer leur activité à l'aide de l'orthovanadate de sodium permet de rétablir la phosphorylation de STAT3 et la contraction des LN-F. C'est effectivement ce que l'on observe (**Fig9L**), suggérant le rôle de tyrosine-phosphatases dans la régulation de la voie JAK-STAT et de la contraction des LN-F par les facteurs sécrétés par les 1205Lu.

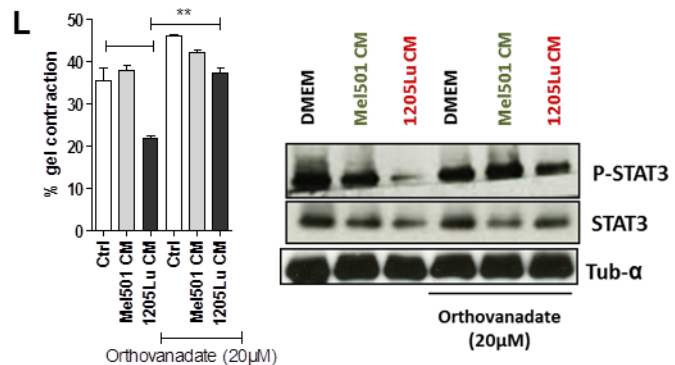
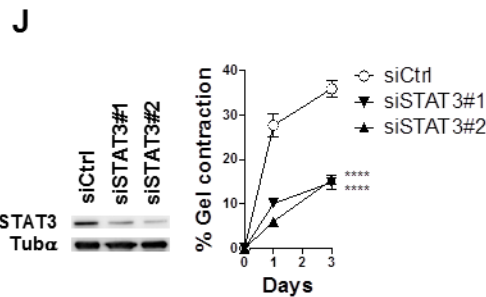
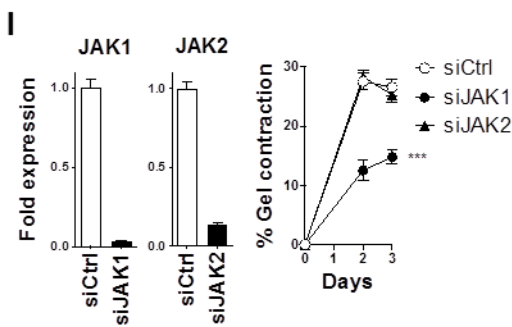
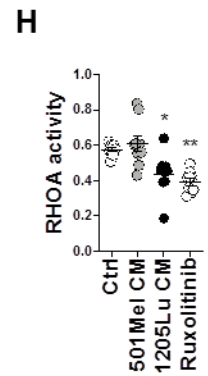
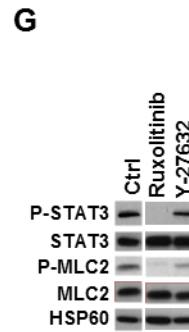
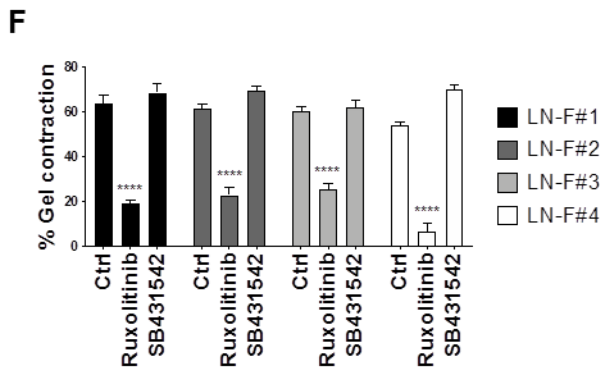
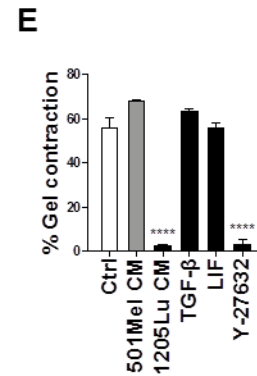
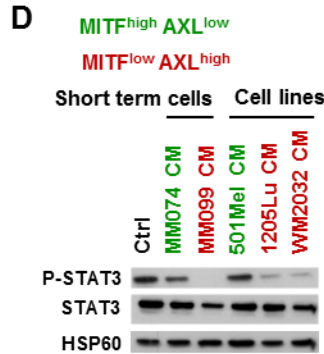
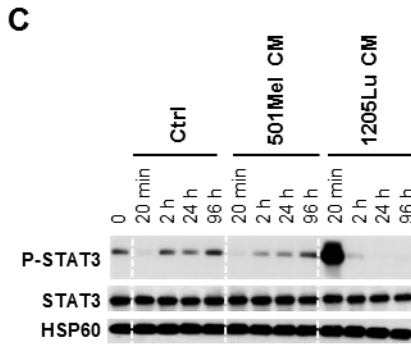
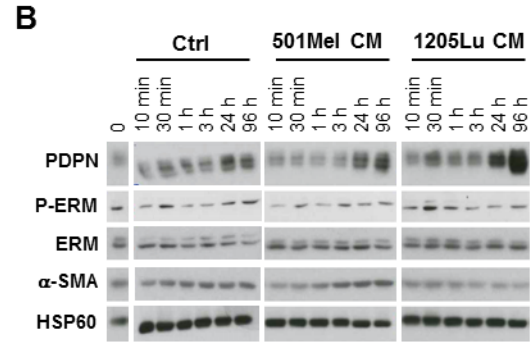
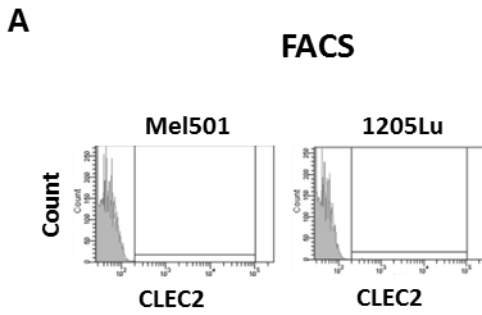


Figure 9 : The JAK1-STAT3 pathway is inhibited by invasive melanoma CM and controls LN-F contraction.

(A) Flow cytometry analysis of CLEC2 expression on Mel501 and 1205Lu membrane surface

(B) Immunoblotting of PDPN, P-ERM, ERM and α -SMA in LN-F cultured in Ctrl medium, 501Mel CM or 1205Lu CM for 10 min, 30 min, 1 h, 3 h, 24 h and 96 h. HSP60 is used as a loading control.

(C) Immunoblotting of P-STAT3 and STAT3 in LN-F cultured in Ctrl medium, 501Mel CM or 1205Lu CM for 20 min, 2 h, 24 h and 96 h. HSP60 is used as a loading control.

(D) Immunoblotting of P-STAT3 and STAT3 in LN-F cultured for 96 h in Ctrl medium or CM from short term isolated melanomas (MM074 and MM099) or melanoma cell lines (501Mel, 1205Lu, WM2032). HSP60 is used as a loading control.

(E) Quantification of gel contraction by LN-F treated by Ctrl medium, 501Mel CM, 1205Lu CM, TGF- β 1 (2 ng/ml), LIF (2 ng/ml) or Y-27632 (10 μ M) for 6 days (n = 3, in triplicate; mean +/- SEM; p-Val (***)<0.0001).

(F) Quantification of gel contraction by LN-F treated by 10 μ M of TGF- β R1 inhibitor (SB431542) or Ruxolitinib for 8 days (n = 3, in quadruplicate; mean +/- SEM; p-Val (***)<0.0001).

(G) Immunoblotting of P-STAT3, STAT3, P-MLC2 and MLC2 in LN-F treated 4 days by Ruxolitinib (10 μ M) or Y-27632 (10 μ M). HSP60 is used as a loading control.

(H) RHOA activity measured by G-LISA assay in cell lysates of LN-F treated 4 days with 501Mel CM, 1205Lu CM or Ruxolitinib (10 μ M) (n = 3, in triplicate; mean +/- SEM; p-Val (*)<0.05, (**)<0.01).

(I) Quantification by qRT-PCR of the extinction of JAK1 and JAK2 expression by siRNAs (siJAK1 and siJAK2) (n = 2, in duplicate) (left) and quantification of gel contraction by LN-F transfected with siJAK1 or siJAK2 (n = 2, in triplicate; mean +/- SEM; p-Val (**)<0.01) (right). A ctrl siRNA (siCtrl) is used as a ctrl of transfection.

(J) Immunoblotting of STAT3 and Tubulin α 2 days after the extinction of STAT3 expression by 2 siRNAs (siSTAT3#1 and siSTAT3#2) (left). Quantification of gel contraction by LN-F after siRNA-mediated inhibition of STAT3 (n = 2, in quadruplicate; mean +/- SEM; p-Val (***)<0.0001) (right). siCtrl is used as a control of siRNA transfection.

(K) Differentially expressed genes between Ctrl and 1205Lu CM-treated LN-F identified in the GO negative regulation of receptor signaling pathway via STAT.

(L) Quantification of gel contraction by LN-F embedded in 3D collagen gel treated with control medium (Ctrl), Mel501 CM or 1205Lu CM, with or without orthovanadate (n=2; in triplicate). Immunoblot of P-STAT3, STAT3 in each of these conditions of LN-F treated during 4 days. Tubulin α is used as loading control.

L'ensemble de ces résultats font de la voie JAK1-STAT3 un système inédit de régulation de la contractilité des FRC et la principale voie régulée par les facteurs sécrétés par les mélanomes invasifs dans l'inhibition de la contractilité des FRC.

J'ai donc identifié deux voies de signalisation qui régulent la contractilité des LN-F: la voie JAK1-STAT3 et YAP.

La voie JAK1-STAT3 contrôle YAP et le cytosquelette d'actine

Afin de comprendre les interactions entre la voie JAK1-STAT3, l'activité de YAP et le cytosquelette d'actine, j'ai comparé la polymérisation de l'actine et la localisation de YAP en condition d'inhibition de JAK1 (siARN JAK1, Ruxolitinib), de STAT3 (siARN STAT3) et de ROCK (Y-27632). Il est connu que l'activité de YAP est dépendant de la voie RhoA-ROCK et de la contraction de l'actomyosine (*Dupont et al.*, 2011). Cela est bien confirmé par la relocalisation cytoplasmique de YAP (**Fig10A/B**) associée à l'élongation cellulaire (**Fig10A/D**) et à la formation de fibres de stress (**Fig10A/C**) observées dans les LN-F traités avec le Y-27632. L'effet est le même lorsque JAK1/2 est inhibé par le Ruxolitinib, ou lorsque JAK1 est déplété par siARN. JAK1 contrôle donc directement YAP, ou indirectement via ROCK et la formation des fibres de stress. La déplétion de STAT3 conduit également à la relocalisation cytoplasmique de YAP (**Fig10F**), la diminution des fibres de stress (**Fig10G**), et la diminution de la transcription des gènes cibles de YAP *CYR61* et *CTGF* de la même manière que la déplétion de YAP lui-même (**Fig10H**).

Ces résultats montrent que dans les LN-F, JAK1 régule via STAT3 l'activité basale de YAP et la contraction spontanée du cytosquelette d'actine.

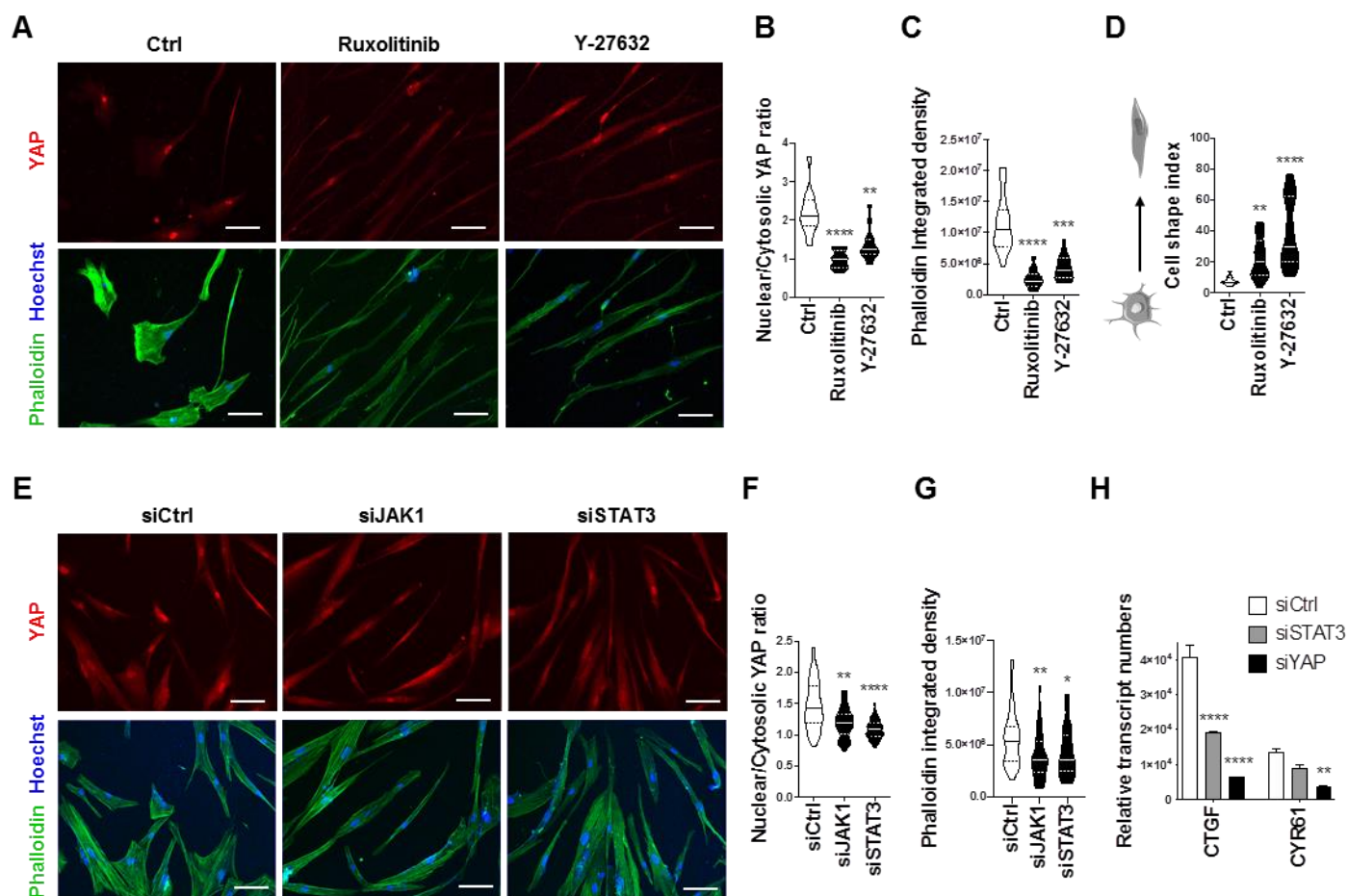


Figure 10. The JAK1-STAT3 pathway controls YAP and the polymerization of the actin cytoskeleton.

(A) Immunofluorescence analysis of YAP, Phalloidin and Hoechst in LN-F treated for 4 days with Ruxolitinib (10 μ M) or Y-27632 (10 μ M). Scale bar = 100 μ m.

(B) Quantification of YAP localization (n = 13 cells; median +/- quartiles; p-Val (**)<0.01, (****)<0.0001).

(C) Quantification of F-actin stress fibers (phalloidin integrated density) (n = 15 cells; median +/- quartiles; p-Val (***)<0.001, (****)<0.0001).

(D) Quantification of the cell shape index (n = 20 cells; median +/- quartiles; p-Val (**)<0.01, (****)<0.0001).

(E) Immunofluorescence analysis of YAP, Phalloidin and Hoechst in LN-F depleted from YAP (siYAP) or STAT3 (siSTAT3) expression by siRNA. The siCtrl siRNA is used as a control of transfection. Scale bar = 100 μ m.

(F) Quantification of YAP localization (n = 50 cells; median +/- quartiles; p-Val (**)<0.01, (****)<0.0001).

(G) Quantification of F-actin stress fibers (phalloidin integrated density) (n = 44 cells; median +/- quartiles; p-Val (*)<0.05, (**)<0.01).

(H) Quantification by qRT-PCR of the expression of YAP target genes (n = 2, in duplicate; mean +/- SEM; p-Val (**)<0.01, (****)<0.0001).

Les protéines solubles sécrétées par les mélanomes invasifs sont suffisantes pour inhiber la contraction des LN-F

Afin d'identifier les facteurs sécrétés par les mélanomes invasifs inhibant la contraction des LN-F, j'ai fractionné les différents constituants du milieu conditionné des 1205Lu. Le sécrétome des mélanomes se compose en partie de vésicules extracellulaires qui servent de cargo pour un grand nombre de molécules, tels que des protéines cytosoliques et membranaires (*Peinado et al.*, 2012, *Hoshino et al.*, 2015), des lipides, des micro-ARN (*La Shu et al.*, 2018) ou des fragments d'ADN (*Karagianis et al.*, 2010), et participent à l'éducation pré-métastatique en favorisant le recrutement de cellules stromales, l'inflammation ou la reprogrammation métabolique de l'environnement. Ils transportent notamment des protéines du cytosquelette (actine, myosine) ou des régulateurs de la polymérisation (Arp2/3, WASP, RabGTPases, cofilines), qui se retrouvent dans les vésicules au moment de leur formation, et qui peuvent être transférées dans les cellules cibles (*Colombo et al.*, 2014). Leur rôle dans la régulation de la contractilité cellulaire n'est cependant pas établi.

Pour étudier l'implication des vésicules extracellulaires sécrétées par les cellules 1205Lu dans l'inhibition de la contraction des LN-F, je les ai isolées à partir du milieu conditionné de 1205Lu par ultracentrifugation. J'ai vérifié leur purification par Western Blot grâce aux marqueurs spécifiques de ces vésicules, les tétraspanines CD9, CD63 et CD81, ainsi que la protéine chaperonne HSP70 (**Fig11A**). J'ai ensuite testé la contraction des LN-F en présence du milieu conditionné complet de 1205Lu, du milieu conditionné déplété des vésicules ou des vésicules concentrées à 5 µg/mL. La concentration réelle des vésicules est de 0,46 µg/mL dans le milieu conditionné. Les LN-F ne réagissent pas aux préparations de vésicules concentrées, ils maintiennent le même niveau de contraction que les LN-F contrôles. De plus, le milieu conditionné déplété en vésicules induit le même niveau d'inhibition de la contraction que le milieu complet (**Fig11B**). Les milieux conditionnés déplétés en vésicules extracellulaires de deux autres lignées invasives (WM2032 et MM099) préservent également leurs capacités d'inhibition de la contraction des LN-F (**Fig11C**). Ces résultats montrent que la fraction soluble du milieu conditionné est suffisante pour induire l'inhibition de la contraction des LN-F.

Je me suis donc intéressé à la fraction soluble, essentiellement composée de protéines et de lipides. Afin de savoir si les facteurs tumoraux inhibant la contraction des LN-F sont des protéines, j'ai chauffé le milieu conditionné à 95°C pour dénaturer la structure tridimensionnelle des protéines, plus sensible à la chaleur que celle des lipides ou j'ai dégradé les protéines du milieu conditionné des 1205Lu en ajoutant la sérine-protéinase K. Par ailleurs, pour éviter des effets indésirables de la protéinase K sur les LN-F, je l'ai ensuite inactivée par le PMSF (*PhenylMethylSulfonyl Fluoride*). Le PMSF est également ajouté au milieu conditionné de 1205Lu non traité par la protéinase K pour s'assurer qu'il n'influence pas son inhibition de la contraction des LN-F (**Fig11D/E**). La dénaturation ou la dégradation des protéines conduit dans les deux cas à la perte de la capacité du milieu conditionné de 1205Lu à inhiber la contraction des LN-F. Les facteurs tumoraux impliqués sont donc des protéines.

Le nombre de protéines candidates dans le milieu conditionné des cellules 1205Lu est élevé. D'autant que le fait que l'inhibition de la contraction des LN-F soit potentiellement induite par la désensibilisation de la voie JAK-STAT ne permet pas d'exclure un effet combiné de plusieurs cytokines. De fait, les 1205Lu expriment beaucoup plus de cytokines, chimiokines et protéases (qui peuvent permettre d'activer ou désactiver d'autres protéines) que les Mel501 (**Fig11F**). Les 1205Lu

expriment de très hauts niveaux de TGF β , des cytokines inflammatoires tels que IL6 ou LIF, les chimiokines IL8, CSF1, CCL2, les inhibiteurs de métalloprotéases TIMP1 et TIMP2, les métalloprotéases MMP2 et MMP14, et des protéines de la matrice ou des régulateurs de l'assemblage des fibres de collagène. Nombre de ces molécules, et d'autres non citées ici mais exprimées par les 1205Lu, activent des récepteurs à activité tyrosine kinase dont les signaux sont intégrés par JAK-STAT.

Afin d'être plus sélectif, j'ai fractionné les protéines du milieu conditionné dépleté des vésicules extracellulaires en fonction de leur taille sur des colonnes de filtration séparant les fractions supérieures ou inférieures à 3kDa, 5kDa, 10kDa, 30kDa, 50kDa ou 100kDa (**Fig11G**). De manière reproductible, les fractions de milieu conditionné de 1205Lu contenant les protéines de taille supérieure à 100kDa ou de taille inférieure à 30kDa n'inhibent pas la contraction des LN-F, au contraire des fractions contenant les protéines supérieures à 30kDa (**Fig 11H**). Des résultats semblables sont obtenus avec le milieu conditionné de WM2032 entre 50kDa et 100kDa (**Fig11I**). La séparation n'étant pas de précision exacte, on peut néanmoins supposer qu'un ou plusieurs facteurs de taille comprise entre 30kDa et 100kDa sont nécessaires pour inhiber la contraction des LN-F.

En utilisant la base de données Uni-Prot réunissant les tailles théoriques des protéines et leur localisation intracellulaire, membranaire ou extracellulaire, j'ai établi une liste de protéines candidates concordante avec ces poids moléculaires. Le graphe présenté en **figure 11J** montre l'expression relative des protéines détectées dans le milieu conditionné de 1205Lu de taille théorique supérieure à 50kDa et inférieure à 100kDa et parmi celles-ci, les protéines déjà décrites comme sécrétées. L'exclusion des protéines de taille supérieure à 100kDa permet de rejeter l'hypothèse d'un rôle de grosses protéines ou de gros complexes protéiques, comme les protéines et fibres de la matrice extracellulaire. De même, l'exclusion des protéines de petites tailles fait que l'on ne retrouve pas de cytokines ou de chimiokines dans la liste de potentiels candidats. On retrouve cependant un certain nombre d'enzymes, des protéines du complément, et des protéines du choc thermique. Nous évoquerons le rôle de ces protéines en discussion.

Cependant il y a plusieurs écueils : (1, *concernant la taille*) les protéines peuvent être associées entre elles, et il se peut que de plus petites protéines soient impliquées et qu'elles soient filtrées avec des protéines plus grosses ; et (2, *concernant la localisation*) les cellules tumorales en culture peuvent émettre de petites vésicules libérant leur contenu dans le milieu alors que ce contenu est décrit comme intracellulaire. Le milieu conditionné de Mel501 et de 1205Lu analysé en spectrométrie de masse était complet, c'est-à-dire qu'il comprenait encore des vésicules extracellulaires. Pour aller plus loin, l'objectif serait de comparer en spectrométrie de masse des milieux conditionnés ultracentrifugés et concentrés (Voir **conclusion et perspectives**).

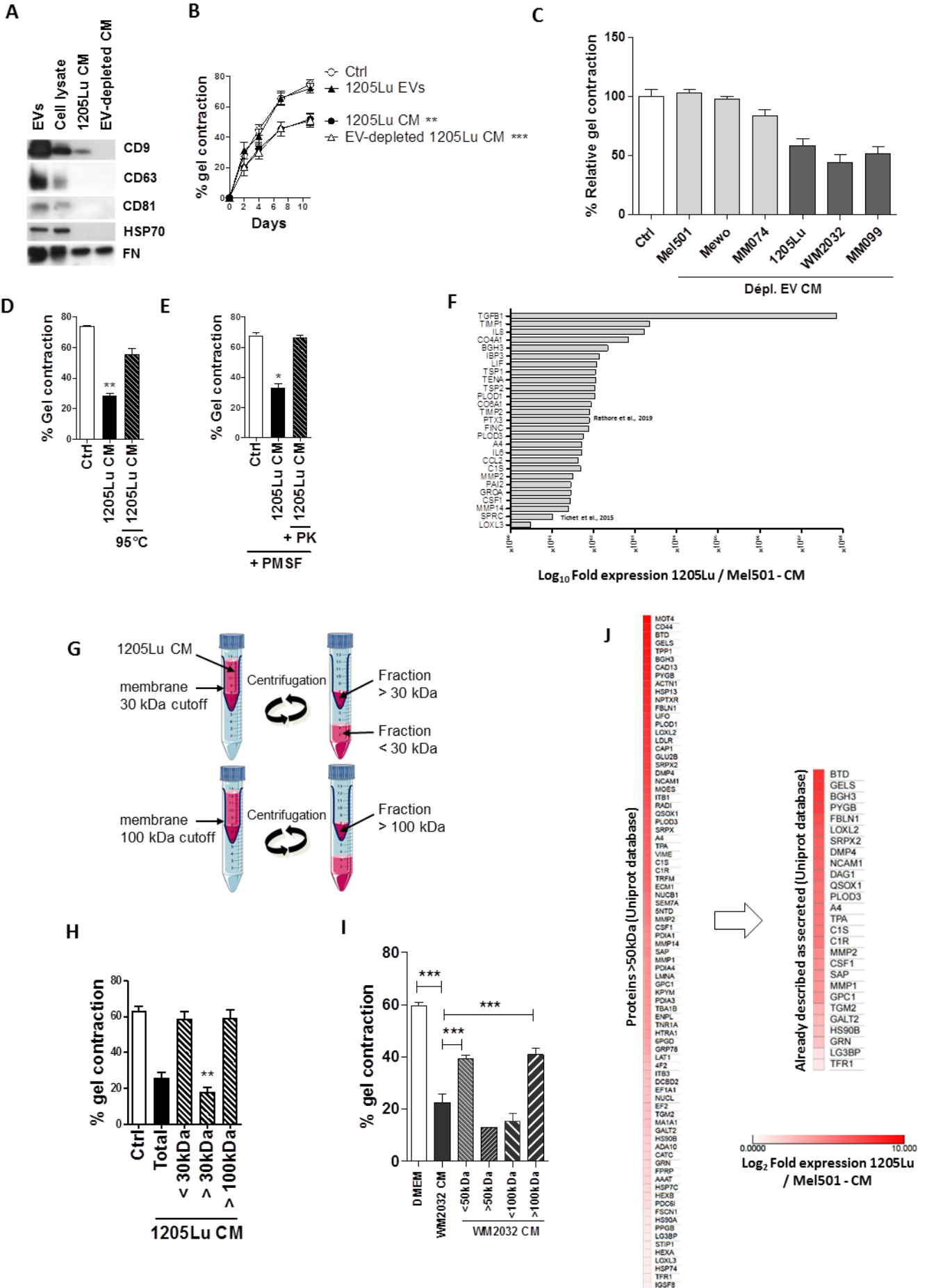


Figure 11. Soluble proteins secreted by invasive melanoma inhibit LN-F contraction.

(A) Extravesicles (EVs) were isolated from the 1205Lu CM. The immunoblot shows the Evs-specific markers CD9, CD63, CD81 and HSP70 increased in 1205Lu EVs (15 µg) compared to the 1205Lu cell lysate (15 µg), and absent from the EV-depleted 1205Lu CM. FN is present in all samples and is used as a loading control.

(B) Time-lapse gel contraction of LN-F incubated with ctrl medium or samples immunoblotted in A, i.e. 1205Lu CM, EV-depleted 1205Lu CM, and 1205Lu EVs (5 µg/ml) (n = 2, in quadruplicate; mean +/- SEM; p-Val (**)<0.01, (***)<0.001).

(C) Gel contraction assay of LN-F treated with EV-depleted conditioned medium of three proliferative (*grey*) and invasive (*black*) melanomas.

(D) Gel contraction assay of LN-F treated with 1205Lu CM or 95°C heated 1205Lu CM (n = 3, in quadruplicate; mean +/- SEM; p-Val (**)<0.01).

(E) Gel contraction assay of LN-F treated with Ctrl medium, 1205Lu CM or 1205Lu CM treated with Proteinase K (PK). The proteases were inactivated in the three conditions with phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) before incubation with LN-F (n = 2, in triplicate; mean +/- SEM; p-Val (*)<0.05).

(F) Log₁₀ fold expression in mass spectrometry analysis between 1205Lu and 501Mel CM of some cytokines, chemokines, enzymes or matrix components involved in the tumor microenvironment remodeling (Tichet *et al.*, 2015).

(G) The 1205Lu CM was fractionated by centrifugation using 30 kDa or 100 kDa cutoff membranes. The 1205Lu CM fractions with 1205Lu factors bellow 30 kDa (< 30 kDa), above 30 kDa (> 30 kDa) and above 100 kDa (> 100 kDa) were harvested and tested in the gel contraction assay shown in H.

(H) Gel contraction assay of LN-F treated with the full 1205Lu CM or 1205Lu-CM fractions bellow 30 kDa (< 30 kDa), above 30 kDa (> 30 kDa) and above 100 kDa (> 100 kDa) (n = 4, in quadruplicate; mean +/- SEM; p-Val (**)<0.01).

Gel contraction assay of LN-F treated with the full WM2032 CM or WM2032-CM fractions bellow 50 kDa (< 50 kDa), above 50 kDa (> 50 kDa), bellow 100 kDa (< 100 kDa) and above 100 kDa (> 100 kDa) (in quadruplicate; mean +/- SEM; p-Val (**)<0.01).

(J) Log₂ Fold expression in mass spectrometry between 1205Lu CM and Mel501 CM of proteins up-secreted with theoretical MW>50kDa (*left*), and among them proteins with indicated known reported secretion or localization in the extracellular compartment (*right*). Mass spectrometry raw data from Tichet *et al.*, 2015. Database informations on proteins from Uniprot.

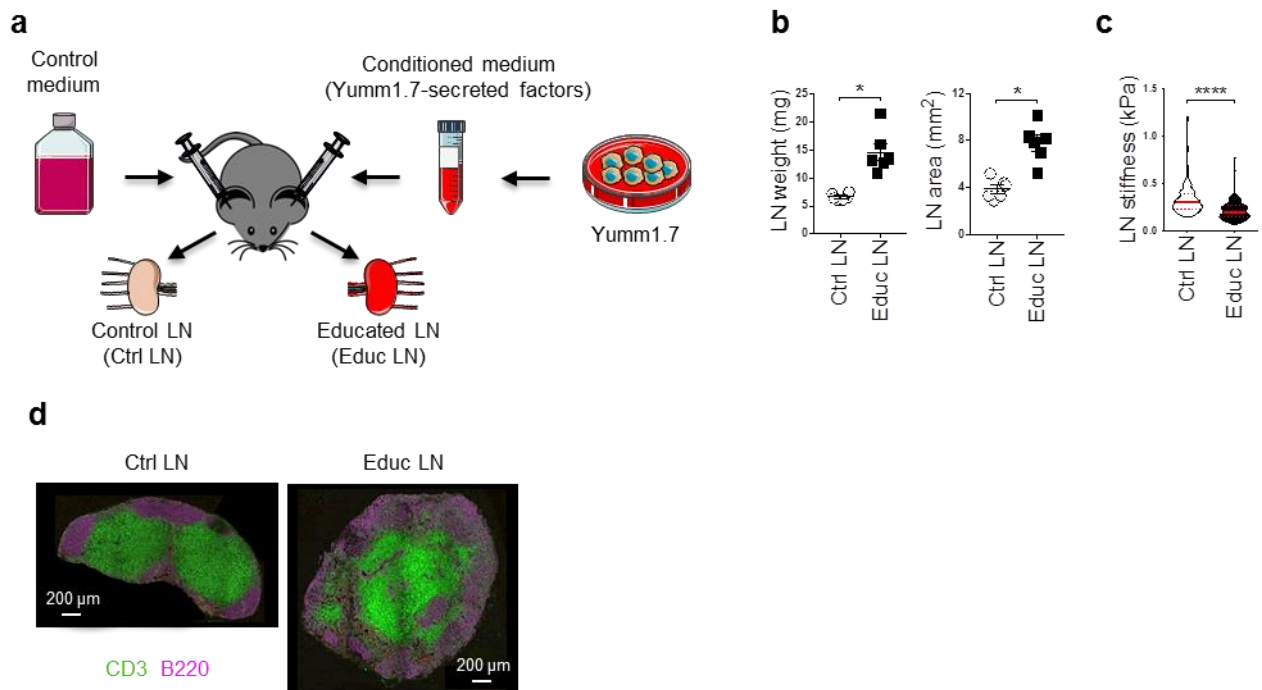


Figure. 12 Melanoma-derived cues educate the draining LN.

a Control medium or Yumm1.7-secreted-factors were injected in each ear of syngenic mice and control (Ctrl) and educated (Educ) draining LN were harvested and analysed.

b Weight and size of Ctrl and Educ LN (n = 6, * $p < 0.05$; Two-tailed Wilcoxon matched-pairs signed rank test).

c Atomic force microscopic (AFM) analysis of Ctrl and Educ LN stiffness (10 μM -thick LN section). Violin plot showing median and quartiles represents one of two independent experiments (n > 120 measures) (**** $p < 0.0001$; Unpaired Mann–Whitney test).

d Immunohistofluorescence staining of Ctrl and Educ LN sections showing T cell (CD3) and B cell (B220) localization.

Discussion

Les FRC sont des myofibroblastes avec des caractéristiques proches des CAF.

J'ai montré au cours de ma thèse, pour la première fois, que les FRC humains partagent des propriétés de myofibroblastes similaires à la description des FRC murins dans la littérature (*Malhotra et al.*, 2012 ; *Acton et al.*, 2014 ; *Astarita et al.*, 2015). Les FRC sont également très semblables aux CAF. Ils maintiennent un état contractile basal, et sécrètent une matrice abondante. Les FRC expriment fortement la PDPN (**Fig3A**), comme les CAF des tumeurs agressives du mélanome (*Kan et al.*, 2014), ainsi que d'autres marqueurs caractéristiques des CAF de profil myofibroblastique (FAP, α -SMA), et notamment des fibres et protéines matricielles (EDA-FN, SPARC) (**Fig 1J/K**, **Fig 5E/F**). Ensemble ces molécules soutiennent l'invasion tumorale. En effet, dans les CAF, la formation de fibres de stress d'actomyosine est renforcée par α -SMA (*Tomasek et al.*, 2002) et la PDPN, cette dernière agissant via la voie RHO-ROCK pour diriger le remodelage de la matrice en faisceaux de collagène et favoriser la progression tumorale (*Neri et al.*, 2015). Dans les FRC, la PDPN contrôle également la contraction via la voie ERM-RHO-ROCK et le dépôt de la matrice via les microtubules et les intégrines (*Acton et al.*, 2014 ; *Astarita et al.*, 2015 ; *Martinez et al.*, 2019).

L'identification inédite des voies JAK1/STAT3 et YAP dans le contrôle de la contraction des FRC.

Mes résultats montrent de manière inédite que les voies JAK1/STAT3 et YAP coopèrent et contrôlent la contraction des FRC (**Fig8/9/10**). Jusqu'à présent, le facteur de transcription YAP était essentiellement décrit dans les FRC comme un marqueur de l'état de tension intracellulaire induit par la contraction du squelette d'actomyosine (*Astarita et al.*, 2015). Dans les CAF, YAP et la voie RHO-ROCK interagissent et s'entre-régulent, contrôlant ainsi le cytosquelette d'actomyosine (*Calvo et al.*, 2013). Plus précisément, l'activité de YAP est permise par l'association des facteurs de transcription TEAD, et résulte d'un dialogue entre le stress mécanique extérieur et le remodelage du cytosquelette (*Foster et al.*, 2017). Dans les FRC, j'ai retrouvé une signature d'expression génique caractéristique de YAP et TEAD2. De plus, l'activité de YAP a récemment été décrite dans la spécification des propriétés myofibroblastiques chez les précurseurs des FRC pendant le développement embryonnaire (*Choi et al.*, 2020). Cependant, le contrôle de l'activité de YAP dans les FRC matures n'était pas connu.

Par des approches de déplétion avec des siARN et l'utilisation d'inhibiteurs pharmacologiques, j'ai constaté que l'activité de YAP est contrôlée par la voie de signalisation JAK1-STAT3 (**Fig10**) dont l'activité est maintenue à un état basal dans les FRC (**Fig9C/D**). Les FRC maintiennent probablement cette activité basale de manière autocrine, comme le suggèrent mes résultats montrant que les FRC sécrètent du LIF et de l'IL6 (**Fig2J/K/L**). De manière intéressante, il a été décrit dans les CAF que cette voie contrôle la contraction via RhoA-ROCK-MLC2 et que la contraction de l'actomyosine permet en retour l'activité de STAT3 (*Sanz-Moreno et al.*, 2011). Il y a donc une communauté d'acteurs dans le contrôle de la contraction par YAP et par JAK1/STAT3. Mes résultats ne permettent pas cependant d'élucider la séquence complète de la signalisation contrôlant la contraction du cytosquelette d'actomyosine des FRC. Il n'est pas clair si JAK1/STAT3 active en parallèle les deux voies YAP et RhoA/ROCK, ou si JAK1/STAT3 active l'une ou l'autre de ces voies qui ensuite régule la troisième, alors même qu'il est connu que YAP et RhoA/ROCK se régulent réciproquement (*Dupont et al.*, 2011).

Dans les CAF, l'activité JAK1/STAT3 est soutenue par la sécrétion autocrine de LIF induite par le TGF β tumoral (Albregues et al., 2014). Cela soutient l'idée d'un maintien de la voie JAK1/STAT3 par les cytokines ou facteurs de croissance produits par les FRC eux-mêmes, qui conduirait au maintien de la contraction. Le TGF β et le LIF recombinant n'induisent toutefois pas la modulation de la contraction des FRC (Fig9E), indiquant soit que ce ne sont pas ces cytokines qui induisent la voie JAK1/STAT3, soit que leur niveau d'expression endogène est suffisant pour induire la contraction maximale des FRC.

Pris ensemble, ces résultats montrent que la contractilité des FRC est contrôlée non seulement par la voie PDPN-ERM, mais aussi par la voie JAK1/STAT3 commune aux CAF qui aboutissent toutes à l'activation de la voie RhoA-ROCK-MLC2 et la formation des fibres de stress.

Les facteurs sécrétés par les mélanomes invasifs éduquent les FRC

L'action des facteurs sécrétés par les mélanomes invasifs est surprenante. J'ai identifié que les facteurs sécrétés par les mélanomes décrits comme invasifs, avec une signature MITF^{low} AXL^{high}, indépendamment de leur mutation inhibent la capacité des FRC à contracter la matrice des gels de collagène 3D (Fig6C/D). J'ai montré que cette propriété des sécrétomes tumoraux invasifs se reproduit avec des cellules invasives d'un autre cancer lymphophiles. Les facteurs sécrétés des mélanomes invasifs inhibent la voie JAK-STAT3 (Fig 9C/D), l'activité transcriptionnelle de YAP (Fig8) et la voie RhoA/ROCK/MLC2 (Fig9H ; Fig6D/G). Paradoxalement, ils induisent aussi une réponse d'activation des FRC, qui surexpriment la podoplanine et FAP (Fig 3A/2B), prolifèrent davantage (Fig 3B), sécrètent une matrice plus riche en collagène et en fibronectine (Fig5M), et plus de cytokines inflammatoires (Fig 4E/F/G/H), amenant les FRC vers un phénotype pro-tumoral qui se traduit par l'augmentation des propriétés pro-chimiotactiques du sécrétome et la matrice extracellulaire envers les cellules tumorales (Fig 4B et 5A).

De plus, les FRC éduqués produisent un sécrétome qui augmente la migration des cellules tumorales et immunitaires (Fig4B/C). Dans ce sécrétome, on retrouve des cytokines et des chimiokines (CXCL1, IL6, CXCL8) qui favorisent le recrutement de cellules immunitaires immunosuppressives comme des neutrophiles ou des MDSC (Monteran et Erez, 2019). Je montre aussi que les FRC produisent une matrice pro-tumorale, composée entre autre de fibronectine et de ténascine C connues pour favoriser l'invasion tumorale (Attieh et al., 2017 ; Lowy et al., 2015), phénomène que l'on confirme avec la migration de 1205Lu augmentée avec la matrice des FRC éduqués (Fig 5A). Par contre, la matrice des FRC éduqués n'améliore ni ne contraint davantage la migration des cellules immunitaires par rapport à la matrice des FRC naïfs (Fig 5B). Je montre ainsi que les FRC éduqués favorisent le recrutement de cellules tumorales invasives, et produisent un sécrétome favorable à la migration de cellules immunitaires pro-tumorales. L'examen plus précis des populations lymphocytaires et myéloïdes recrutées par le sécrétome des FRC éduqués permettrait de mieux comprendre l'impact de cette éducation sur le profil immunosuppressif de la niche pré-métastatique. Par ailleurs, le rôle de l'inhibition de la contraction et de la prolifération des FRC dans l'invasion tumorale n'est pas clair et doit être testée *in vivo*, ce sont toutefois deux modifications permettant de relâcher la tension interne dans le ganglion lymphatique, et permettre l'entrée de davantage de cellules tout en maintenant l'intégrité de l'organe. C'est ce phénomène qui permet le recrutement massif de lymphocytes et leur expansion clonale dans le ganglion pendant la réponse immunitaire tout en préservant la microstructure du ganglion (Acton et al., 2014).

De manière intéressante, cette activation cellulaire paradoxale associant perte de la contraction, augmentation de la prolifération et de la production de la matrice a été décrite dans l'éducation pré-métastatique des péricytes (*Murgai et al., 2017*). Des phénomènes analogues à mes résultats sur les FRC éduqués par le mélanome ont lieu, comme la perte de α -SMA (*voir Fig 9B*) ou l'augmentation de la sécrétion de fibronectine (*Fig 5N*). Cela suggère que l'éducation pré-métastatique des FRC pourrait être une transition phénotypique associée à l'inhibition des propriétés contractiles, l'activation de la prolifération et la sécrétion de matrice et de cytokines inflammatoires. Mes résultats suggèrent par ailleurs que cette transition phénotypique est réversible et nécessite le maintien de l'exposition aux facteurs sécrétés de mélanome. En effet, traiter des FRC contrôles avec le milieu conditionné de FRC éduqués par le mélanome ne permet pas d'inhiber la contraction des FRC contrôles (*résultats non montrés*). De plus, les FRC reviennent à un état contractile même après huit jours d'exposition aux facteurs tumoraux (*Fig 6F*). Cela montre que les facteurs sécrétés de mélanome invasif induisent des effets directs et temporaires reposant sur des cascades de phosphorylation et des modifications rapides du cytosquelette et de l'expression génique qui nécessitent le maintien de l'exposition directe aux facteurs tumoraux. Cela signifie également que l'état naïf des FRC est plus stable que celui des FRC éduqués, au moins sur la durée d'exposition aux facteurs sécrétés testés au laboratoire. Il se peut cependant qu'une exposition plus longue provoque des changements plus profonds d'ordre épigénétique.

L'éducation des FRC résulte donc d'un ensemble de modifications induites par le sécrétome des mélanomes invasifs. Le sécrétome de ces cellules invasives peut par ailleurs permettre de comprendre comment cette éducation paradoxale des FRC est induite, entre inhibition des voies de la contraction d'un côté, et activation des FRC de l'autre. Les mélanomes invasifs sécrètent en abondance des facteurs de croissance dont le TGF β , des cytokines de la famille de l'IL-6, qui sont largement décrits dans l'activation des myofibroblastes et l'augmentation de la contractilité de l'actomyosine (*Tomasek et al., 2002 ; Kalluri, 2016*). La plupart de ces molécules activent des récepteurs dont les signaux sont intégrés par la voie JAK-STAT. La voie JAK-STAT peut, en effet, être activée par un large panel de facteurs de croissance activant des récepteurs à activité tyrosine kinase. Si, comme je l'ai présenté plus haut, l'ajout de TGF β et le LIF ne module pas la contraction des FRC, ils peuvent cependant avoir d'autres effets sur les FRC. Par exemple, mes résultats suggèrent que la prolifération des FRC est induite par les facteurs tumoraux de manière dépendante de JAK et peut-être induite par l'ajout de LIF (*Fig 3C/D*). De fait, la voie JAK-STAT est fortement activée par l'ajout des facteurs sécrétés par les cellules 1205Lu sur un laps de temps très court puis est rapidement inhibée au-delà de deux heures (*Fig 9C*). Le TGF β est également connu dans les CAF pour induire l'expression de facteurs de croissance ou de cytokines comme l'IL6 et CXCL12 (*Derynck et al., 2020*), qui sont effectivement davantage sécrétés par les FRC éduqués (*Fig 4E/F*). Le TGF β est aussi décrit pour favoriser dans les myofibroblastes la production de collagène (*Wei et al., 2017*). En accord avec cela, les facteurs tumoraux des cellules invasives induisent un assemblage plus important et plus organisé des faisceaux de collagène et de fibronectine dans la matrice extracellulaire des FRC (*Fig 5C*), ainsi que la sécrétion de protéines matricellulaires comme la ténascine C (*Fig 5E/F*), cette dernière étant connue pour favoriser en retour la signalisation du TGF β (*Carey et al., 2009*). Le rôle de ces cytokines dans l'activation des FRC n'est donc pas à exclure.

L'activation des FRC se traduit également par la surexpression de la podoplanine (*Fig3A*), caractéristique de l'activation des FRC pendant la réponse immunitaire (*Yang et al., 2014 ; Astarita et al., 2015*). De manière intéressante, la surexpression de la podoplanine été montrée comme

conjointement induite par la voie TGF β -SMAD et par la voie JAK-STAT dans les kératinocytes durant la cicatrisation (Honma *et al.*, 2012). Le rôle de la podoplanine dans l'inhibition de la contraction des FRC n'est d'ailleurs pas complètement exclu. En effet, les facteurs sécrétés par les mélanomes invasifs induisent les mêmes effets que l'interaction de CLEC2 avec la podoplanine, c'est-à-dire un blocage ou une invalidation de la podoplanine (Acton *et al.*, 2014 ; Astarita *et al.*, 2015). On retrouve des phénomènes analogues, tels que l'élongation cellulaire, la diminution des fibres de stress (**Fig6G**), la relocalisation de YAP vers le cytoplasme (**Fig 7**), l'augmentation de la prolifération (**Fig3B**) et de l'expression de la podoplanine (**Fig 3A**).

Or, le récepteur des facteurs tumoraux induisant les effets intracellulaires que l'on observe (inhibition de JAK1/STAT3, relocation de YAP, inhibition de la contraction des FRC) n'est pas connu. L'absence de CLEC2 sécrété par les mélanomes (**Fig9A**) et de modulation dans la phosphorylation de ERM (**Fig9B**) permet d'exclure l'axe CLEC2-ERM-PDPN. Cependant la similarité des effets induits par les facteurs tumoraux avec la ceux induits par la liaison CLEC2/PDPN ou le blocage de la podoplanine permet de soulever au moins deux hypothèses :

- Soit le récepteur (récepteur de cytokines, de chimiokines ou de facteurs de croissance) et les effets intracellulaires que l'on observe sont indépendants de la podoplanine. La similarité constatée dans ces effets n'est donc lié qu'à la convergence des mécanismes plus tard dans la signalisation, avec la désactivation de l'axe RhoA-ROCK-MLC2 et la relocation de YAP.

- Soit le récepteur est la podoplanine ou l'un de ses partenaires. L'hypothèse que le récepteur soit la podoplanine est soutenue par le fait que JAK1 possède un domaine FERM, le même domaine qui permet aux protéines ERM de se lier à la podoplanine. L'hypothèse que ce soit l'un de ses partenaires est soutenue justement par le fait que la podoplanine dispose d'un grand nombre de partenaires, notamment membranaires, qui varient beaucoup selon les types cellulaires (CD44, CD9, ...) et induisent des effets divers sur le cytosquelette d'actine et la migration cellulaire (Astarita *et al.*, 2012). Par ailleurs, Astarita *et al.*, 2015 suggèrent que l'inhibition de la voie PDPN-ERM par la liaison de CLEC2 est due à la liaison de la podoplanine avec l'un de ces partenaires et la séquestration de la podoplanine dans des radeaux lipidiques. Il serait dès lors possible que les facteurs sécrétés par le mélanome augmentent l'expression de la protéine partenaire, active la podoplanine ou au contraire la séquestre dans un domaine l'empêchant d'interagir avec ses seconds messagers intra-cellulaires, possiblement JAK1. Un tel mécanisme pourrait faire le lien entre la podoplanine, seul récepteur membranaire à avoir été décrite pour contrôler la contraction des FRC jusqu'ici, et la voie JAK1-STAT3 que j'ai identifié également pour cette fonction.

Finalement, mes résultats suggèrent que le sécrétome des mélanomes invasifs comprend un grand nombre de molécules induisant des effets variés. Il reste à déterminer si les diverses modifications induites par l'éducation des FRC résultent des mêmes facteurs et des mêmes récepteurs. Or, mes résultats tendent à montrer que les FRC réagissent à un ensemble de facteurs qui induisent leur activation et l'inhibition des voies associées à la contraction spontanée des FRC, ainsi que cela se passe lors de la réponse immunitaire. Plus précisément, je montre ici que les facteurs sécrétés de mélanomes invasifs contiennent des cytokines et des facteurs de croissance (IL6, LIF, TGF β) qui permettent d'expliquer les modifications de prolifération et de sécrétome dans les FRC éduqués. Le rôle de ces molécules reste toutefois à être démontré formellement. Et je montre aussi que ces cytokines ne sont pas impliquées dans la modulation des propriétés contractiles FRC par les facteurs

tumoraux (**Fig9E**), mais que la voie JAK1/STAT3 est modulée par le sécrétome des mélanomes invasifs (**Fig9C/D**) et contrôle la contraction spontanée des FRC (**Fig9I/J**). Pour faire le lien, il s'agit d'identifier le récepteur liant JAK1 tout en amont de la signalisation intracellulaire. Une hypothèse porterait à impliquer la podoplanine ou l'un de ses partenaires dans la modulation de l'activité de JAK1. Une autre serait d'impliquer des facteurs différents agissant via un récepteur inconnu (RTK, récepteurs liés aux protéines G) dont la signalisation dépendante résulte dans la désactivation de JAK1/STAT3. Une meilleure compréhension de ces mécanismes nécessite (1) de mieux comprendre l'ordre dans lequel les inhibitions des diverses voies de signalisation de la contraction des FRC interagissent ; et (2) d'identifier le ou les facteurs tumoraux impliqués dans l'inhibition de la contraction des FRC.

Les facteurs tumoraux impliqués dans l'inhibition de la contraction des FRC

Dans le but d'identifier ces facteurs impliqués dans l'inhibition de la contraction des FRC, j'ai récupéré l'analyse des données de spectrométrie de masse du milieu conditionné des deux lignées les plus représentatives des profils prolifératifs et invasifs (Mel501 et 1205Lu) (*Tichet et al.*, 2015). A partir de cette analyse, j'ai listé les protéines les plus exprimées dans le sécrétome des 1205Lu par rapport à celui des Mel501. Cela m'a permis de valider que la lignée invasive 1205Lu sécrète plus de facteurs de croissance, plus de cytokines et de chimiokines inflammatoires et plus de protéases. Cela a été observé pour plusieurs cancers, à savoir que la transition phénotypique tumorale induit une profonde recomposition du sécrétome des cellules invasives, qui sécrètent plus de molécules qui favorisent l'invasion tumorale (*Mathias et al.*, 2009 ; *Karagianis et al.*, 2010). Dans le mélanome, les cytokines inflammatoires (IL6, TGF β) et les facteurs de croissance (PDGF, Midkine) favorisent la tumorigenèse, l'invasion tumorale (*Melnikova et al.*, 2009) et les métastases ganglionnaires (*Olmeda et al.*, 2017). Parmi ces cytokines, le TGF β et celles de la famille de l'IL6 sont des candidats qui pourraient induire l'activation d'un certain nombre de propriétés des FRC (prolifération, matrice et sécrétome) mais qui ne sont pas impliquées dans la régulation de la contraction (**Fig9E**).

Les vésicules extracellulaires sécrétées par les tumeurs sont décrites pour jouer un rôle majeur dans le remodelage du stroma ganglionnaire, en favorisant la lymphangiogenèse, l'angiogenèse et le recrutement de cellules dérivées de la moelle osseuse (*Hood et al.*, 2011 ; *Peinado et al.*, 2012). Cependant, j'ai montré grâce à l'ultracentrifugation des milieux conditionnés que les vésicules extracellulaires ne sont pas impliquées dans l'inhibition de la contraction des FRC (**Fig11A-C**). J'ai par ailleurs identifié que les facteurs sécrétés impliqués sont des protéines solubles d'une taille comprise entre 30 et 100 kDa (**Fig11D-I**).

Dans l'analyse des données de spectrométrie de masse, je retrouve beaucoup de protéines décrites comme intracellulaires ou membranaires, qui peuvent être issues des vésicules extracellulaires conservées dans les milieux analysés. Parmi les protéines décrites comme sécrétées, on trouve des cytokines (IL6, IL8), des chimiokines (CCL2, GROA, CSF1), des protéines du complément (C1S, C1R), des enzymes impliquées dans le remodelage de la matrice (LOXL2, TPA, MMP1, MMP2, QSOX1), ou dans le métabolisme des lipides (SAP, BTD), des protéines chaperonnes dont les protéines de choc thermique qui favorisent l'invasion tumorale (HSP90) (*Santos et al.*, 2017) ou encore des protéines matricielles (**Fig11F**).

En tenant compte de la taille théorique minimale et maximale des isoformes de chaque protéine de quelles protéines, j'ai identifié plus d'une cinquantaine de candidats (**Fig11J**, *Gauche*). Afin de

raccourcir la liste, j'ai sélectionné les protéines décrites comme étant extracellulaires ou sécrétées. J'obtiens une liste d'une trentaine de candidats parmi lesquels on retrouve C1S, C1R, HSP90, TPA, QSOX1, SAP, LTD. Les cytokines en sont exclues car elles sont trop petites (en général autour de 20kDa), de la même manière que les grosses protéines matricielles comme les télescines, les thrombospondines, la fibronectine ou le collagène. Cependant, cette approche a des limites. Les protéines impliquées dans l'inhibition de la contraction des FRC peuvent être associées à d'autres molécules, et donc la taille théorique de ces protéines peut être très différente de celle que j'ai identifiée expérimentalement entre 30 et 100 kDa. Elles peuvent aussi être des fragments de protéines clivées par les enzymes peptidases qui sont elles-mêmes davantage sécrétées. De plus, je conserve dans cette analyse des protéines contenues potentiellement dans les vésicules extracellulaires.

Afin de palier à ce problème, j'ai collecté les milieux conditionnés de trois lignées prolifératives (Mel501, Mewo, MM074) et trois lignées invasives (1205Lu, WM2032, MM099), que j'ai déplétés en vésicules extracellulaires, et dont j'ai concentré les protéines avec un poids moléculaire supérieur à 30 kDa. L'analyse par spectrométrie de masse de ces échantillons (*collaboration Stéphane Audebert, CRCM, Marseille*), permettra de sélectionner les protéines systématiquement surexprimées dans le milieu conditionné des trois lignées de mélanome invasives par rapport aux trois lignées prolifératives. L'objectif est de réduire la liste des protéines candidates, tout en s'affranchissant des limites issues de poids théorique, à un nombre compatible avec la déplétion de chaque candidat par siRNA ou par immunoprécipitation, et valider ainsi les candidats en test de contraction (*Voir conclusion et perspectives*).

La plasticité phénotypique des mélanomes ne se réduit pas à la bipartition proliférative/invasive

J'ai montré ainsi au cours de ma thèse que les facteurs sécrétés par les mélanomes de profil invasif avec une signature $MITF^{low} AXL^{high}$ activent les FRC et inhibent leur contraction spontanée. Cet effet est spécifique du profil invasif car il n'est pas induit par les facteurs sécrétés des mélanomes prolifératifs $MITF^{high} AXL^{low}$. Je n'ai cependant caractérisé que les marqueurs de ces deux profils établis par *Hoek et al.*, 2008. La question reste ouverte de savoir à quel moment les cellules tumorales acquièrent un profil de sécrétion apte à induire ces effets, même si les évidences s'accumulent que les cellules qui acquièrent un phénotype invasif sécrètent un ensemble de cytokines, facteurs de croissance et enzymes lui permettant d'envahir le tissu environnant. On sait cependant que dans le mélanome cette transition d'un phénotype différencié et peu invasif vers un phénotype dédifférencié et invasif est un processus progressif qui passe par des états intermédiaires, qui sont bien mis en évidence dans les modèles de résistance (*Tsoi et al.*, 2018 ; *Rambow et al.*, 2019), et en particulier par un état caractéristique du stade embryonnaire des mélanocytes, de type crête neural, notamment induit par des signaux inflammatoires (*Tsoi et al.*, 2018). Il faudrait donc caractériser plus finement les lignées du laboratoire en fonction des marqueurs de ces signatures de profils intermédiaires. Cela permettrait d'inclure plus de lignées pour avoir un échantillon représentatif de chaque stade (*voir Conclusion et perspectives*). *Tsoi et al.*, 2018 distingue les cellules mélanocytiques différenciées $MITF^{high} CTNNB1^{high} SOX10^{high} SOX9^{low} SMAD3^{low} AXL^{low} NGFR^{low} EGFR^{low} ERBB3^{high}$; les cellules transitoires $MITF^{high} CTNNB1^{int} SOX10^{high} SOX9^{low} SMAD3^{low/int} AXL^{int} NGFR^{int} EGFR^{low} ERBB3^{high}$; les cellules de type crête neurale $MITF^{low} CTNNB1^{low} SOX10^{high} SOX9^{low/int} SMAD3^{high} AXL^{high} NGFR^{high} EGFR^{int} ERBB3^{high}$; et les cellules dédifférenciées $MITF^{low} CTNNB1^{low}$

SOX10^{low} SOX9^{high} SMAD3^{high} AXL^{high} NGFR^{int} EGFR^{high} ERBB3^{low} (Voir Introduction – Partie II). Caractériser les lignées de mélanome avec davantage de marqueurs peut ainsi permettre de mieux appréhender l'influence de l'hétérogénéité intratumorale et de la transition phénotypique sur la capacité de ces cellules à modifier les propriétés contractiles des FRC.

L'éducation des FRC *in vitro* permet d'expliquer les modifications architecturales du ganglion pré-métastatique

Nous avons mis au point dans l'équipe un modèle d'éducation pré-métastatique chez la souris. Nous avons analysé la structure de ganglions lymphatiques drainants l'injection de milieu conditionné de la lignée de mélanome Yumm1.7, de signature invasive MITF^{low} (Fig12A). Ces ganglions sont plus gros (Fig12B) et montrent une architecture remodelée avec la perte de compartimentalisation des lobules internes. Ces observations sont validées dans d'autres modèles d'éducation pré-métastatique (Riedel et al., 2016). En particulier les zones B infiltrent les zones T, et la frontière entre le cortex et le paracortex disparaît (Fig12D). Les propriétés biomécaniques du ganglion lymphatique sont également modifiées. Ainsi, les ganglions drainants l'injection de milieu conditionné sont plus élastiques, ainsi que démontré par microscopie à force atomique (Plateforme MICA, Sabrina Pisano, IRCAN) et nanoindentation (Fig12C).

Ces résultats sont concordants avec les résultats que j'ai obtenus *in vitro* sur des FRC humains : les facteurs sécrétés par les mélanomes invasifs inhibent leur contraction et stimulent leur prolifération. Ces deux mécanismes permettent le gonflement rapide du ganglion lors de la réponse immunitaire (Yang et al., 2014 ; Acton et al., 2014 ; Astarita et al., 2015). Le gonflement du ganglion est un phénomène que l'on observe dans les ganglions sentinelles en diagnostic (Sleeman et al., 2015) et qui est validé dans les modèles murins expérimentaux de niche pré-métastatique étudiés par d'autres équipes (Commerford et al., 2018 ; Riedel et al., 2016). Riedel et al., 2016 montre également la perte de la compartimentalisation des lobules internes entre zones B et T dans le ganglion drainant. Je confirme également dans les FRC *in vitro* plusieurs des phénomènes observés par ces auteurs dans les ganglions drainants de tumeurs, tels que la prolifération des FRC et la modification de leur sécrétome et de leur matrice. Je montre en particulier l'augmentation de la sécrétion de chimiokines, comme CXCL12, dont le récepteur CXCR4 est partagé par les lymphocytes B et les lymphocytes T, ce qui peut expliquer la perte de compartimentalisation interne. Riedel et al., 2016 constatent cependant que le milieu conditionné de la lignée murine de mélanome proliférative B16.F10 MITF^{high} induit davantage de contraction des FRC murins dans les gels de collagène. Cela reste toutefois concordant avec ce que j'observe pour les FRC humains traités dans les gels de collagène avec le milieu conditionné de la plupart des lignées prolifératives humaines.

Afin de valider les modifications observées *in vitro*, j'ai commencé à mettre au point au cours de ma thèse un marquage en immunofluorescence permettant de rendre compte à la fois de l'activité de STAT3 (marquage P-STAT3), de YAP et de l'actine afin de pouvoir comparer les FRC d'un ganglion éduqué et d'un ganglion naïf sur ces trois paramètres. Ce modèle servira à valider l'effet du milieu conditionné des mélanomes invasifs et prolifératifs *in vivo*. Ce modèle pourrait également servir à tester des milieux conditionnés d'autres lignées ou déplétés d'un ou de plusieurs candidats, des protéines recombinantes ou des molécules (anticorps / inhibiteurs) qui bloquent les voies impliqués dans la régulation de la contraction des FRC.

Une autre question porte sur les conséquences de l'éducation pré-métastatique des FRC sur l'invasion ganglionnaire des cellules tumorales. Nos résultats suggèrent que l'inhibition de la contraction des FRC par les facteurs sécrétés de mélanomes invasifs augmente l'élasticité du réseau de FRC et permettrait le gonflement du ganglion et la diminution de sa rigidité interne. Or, les cellules tumorales qui arrivent dans le ganglion lymphatique sont des cellules invasives issues de la tumeur primaire, cependant les travaux de divers équipes suggèrent que la formation de macro-métastases suite à l'extravasation nécessite un retour des cellules tumorales vers un profil prolifératif (Kim *et al.*, 2012). Or, le profil phénotypique des cellules de mélanome dépend des signaux mécaniques que les cellules tumorales perçoivent, un environnement rigide favorisant un profil invasif (Butcher *et al.*, 2009). Cela suggère que le ganglion éduqué, plus élastique, pourrait favoriser ce retour des cellules tumorales vers un profil prolifératif et favoriser ainsi le développement de macro-métastases ganglionnaires. Un autre point est que la réorganisation architecturale des FRC modifie la circulation des lymphocytes naïfs (Riedel *et al.*, 2016), ce qui pourrait affecter la génération d'une réponse anti-tumorale efficace même si cela reste à déterminer. Les FRC éduqués semblent toutefois acquérir un profil pro-tolérologique, avec la sécrétion de cytokines (**Fig4**) (IL6, IL8) décrites pour permettre la différenciation ou le recrutement de cellules immunitaires immunosuppressives. Les facteurs sécrétés des FRC éduqués permettent d'ailleurs un recrutement accru de cellules tumorales (**Fig4**). Il serait intéressant de valider ces résultats *in vivo* en réalisant par exemple un marquage des ganglions par immunofluorescence ou *ex vivo* avec un marquage en cytométrie de flux contre les cytokines et chimiokines. Une autre option serait d'associer le marquage en immunofluorescence des FRC de l'activité de P-STAT3, de YAP ou de l'actine, avec un marquage sur la répartition des cellules immunitaires (Tregs, T CD8⁺).

Conclusion et perspectives

Dans le but de mieux appréhender les processus précoces de métastase du mélanome, j'ai cherché à comprendre pendant ma thèse si, et comment, les facteurs sécrétés par le mélanome modulent les propriétés des FRC de la niche pré-métastatique du ganglion lymphatique. Dans un premier temps, j'ai montré que les facteurs sécrétés par les mélanomes avec une signature dédifférenciée-invasive (MITF^{low} AXL^{high}) reprogramment profondément les FRC humains *in vitro*, au contraire des mélanomes avec une signature différenciée-proliférative (MITF^{high} AXL^{low}). Ces facteurs tumoraux activent les FRC, augmentent leur prolifération, inhibent leur contraction spontanée, et induisent une reprogrammation de leur sécrétome ainsi que le remodelage de leur matrice extracellulaire (**Schéma-bilan, C**).

Dans le ganglion naïf, les FRC forment des conduits de matrice extracellulaire et sécrètent cytokines et chimiokines qui permettent le recrutement et la survie des lymphocytes (Fletcher *et al.*, 2015). Ils régulent également l'activation des lymphocytes T et maintiennent la tolérance périphérique (Knoblich *et al.*, 2018 ; Turley *et al.*, 2010). Les FRC éduqués sécrètent plus de cytokines et chimiokines inflammatoires, ainsi qu'une matrice plus riche en fibronectine, en collagène et en matriprotéines telles que la TNC ou SPARC, favorisant la migration des cellules tumorales invasives. Les chimiokines sécrétées par les FRC éduqués permettent également l'attraction de davantage de lymphocytes et de cellules myéloïdes. Les facteurs sécrétés par les mélanomes invasifs, ceux capables de former des métastases, reprogramment donc les FRC vers un phénotype activé et pro-tumoral *in vitro*. Je n'ai cependant pas poussé l'étude de ces propriétés-là davantage. Afin de mieux comprendre comment la modulation du sécrétome des FRC éduqués influence l'installation d'un environnement pro-tumoral, une analyse plus détaillée des sous-populations lymphocytaires ou myéloïdes recrutées peut être réalisée. Un environnement immunosuppresseur est en effet caractéristique des ganglions sentinelles (Cochran *et al.*, 2006). Un autre projet est d'ailleurs en développement au laboratoire afin de comprendre si le sécrétome des FRC éduqués régule l'activité des lymphocytes et oriente ces cellules vers un profil immunotolérant.

Après avoir établi que les FRC étaient reprogrammés par le sécrétome de mélanome, j'ai choisi de focaliser mon attention sur la caractérisation des mécanismes moléculaires de la régulation de la contraction des FRC par le mélanome. L'inhibition de la contraction des FRC humains par des facteurs tumoraux est un phénomène inédit et qui peut sembler paradoxal au premier abord. En effet, les facteurs tumoraux décrits jusqu'à présent induisent la contractilité et l'activation des fibroblastes, ainsi que leur différenciation en CAF (Sanz-Moreno *et al.*, 2011 ; Albrengues *et al.*, 2014). Cependant, j'ai montré qu'à l'état basal les FRC diffèrent des fibroblastes d'autres tissus, comme le derme, et qu'ils partagent les propriétés myofibroblastiques, les marqueurs d'activation et la capacité à produire et assembler une matrice extracellulaire riche et organisée comme les CAF. C'est notamment la première fois que l'on montre que les FRC humains sont eux-aussi contractiles, les travaux précédents ayant été réalisés chez la souris. Je montre que les facteurs sécrétés par les mélanomes invasifs activent les FRC, ce qui se traduit par une augmentation de leur prolifération et de leur expression de la podoplanine. Je montre également que l'inhibition de la contraction des FRC est un phénomène réversible. La réaction des FRC aux facteurs tumoraux est ainsi semblable à celle qui se déroule lors de la réponse immunitaire et la dilatation du ganglion lymphatique, durant laquelle les FRC se relâchent temporairement, puis prolifèrent et surexpriment la podoplanine pour permettre un retour à l'homéostasie (Acton *et al.*, 2014 ; Astarita *et al.*, 2015).

En me basant sur les précédents travaux réalisés sur les mécanismes de la contraction des CAF (*Calvo et al., 2013 ; Foster et al., 2017 ; Albrengues et al., 2014, 2015*), j'ai pu montrer de manière inédite que la contraction des FRC est contrôlée par YAP et la voie JAK1-STAT3. Mes travaux de thèse m'ont permis d'identifier les mécanismes moléculaires conduisant à l'inhibition de la contraction des FRC. J'ai découvert que les facteurs sécrétés par les mélanomes invasifs inhibent justement la voie JAK1-STAT3, l'activité transcriptionnelle de YAP et l'axe RhoA-ROCK-MCL2 conduisant à la contraction des fibres d'actomyosine (**Schéma-Bilan, B**). Les voies YAP et RhoA-ROCK-MCL2 sont connues pour s'entre-réguler (*Dupont et al., 2011*) et il sera intéressant de déterminer la séquence exacte des inhibitions qui conduisent à l'arrêt de la contraction des FRC.

Pour cela, il reste à déterminer si JAK1-STAT3 active en parallèle YAP et RhoA, ou si JAK1-STAT3 active YAP ou RhoA et que YAP et RhoA s'entre-régulent ensuite. Concrètement, il s'agit de comprendre si la relocalisation de YAP est une étape intermédiaire entre la dérégulation de la voie JAK1-STAT3 ou bien une conséquence du relâchement de la tension intracellulaire dans le FRC. La surexpression d'une forme constitutivement active de YAP dans les FRC permettra de répondre à cette question. Il reste également à déterminer le (ou les) récepteur(s) membranaire(s) qui lie JAK1, donc le point en amont de la voie de signalisation induite par les facteurs tumoraux, et comment ce signal est inhibé par les facteurs sécrétés du mélanome. Nous pourrions faire une IP de JAK1 pour identifier ses récepteurs partenaires. Par western blot, nous pourrions tester s'il s'agit de la podoplanine ou de l'un de ses partenaires, et par spectrométrie de masse tous les récepteurs partenaires de JAK1.

J'ai également identifié que les facteurs tumoraux qui inhibent la contraction des FRC sont des protéines solubles, ou des complexes protéiques, de poids moléculaire compris entre 30kDa et 100kDa sécrétés par les mélanomes invasifs. Les vésicules extracellulaires ne sont donc pas impliquées, bien qu'elles soient particulièrement décrites dans la préparation de la niche pré-métastatique (*Hood et al., 2011 ; Peinado et al., 2017*). Cette fourchette de taille m'a permis de déterminer une liste de candidats potentiels parmi les facteurs sécrétés par la lignée de mélanome invasive 1205Lu et la lignée proliférative Mel501 identifiés précédemment par spectrométrie de masse (*Tichet et al., 2015*), en sélectionnant les protéines les plus surexprimées dans le sécrétome des 1205Lu. Pour restreindre la liste des protéines candidates, les milieux conditionnés de trois lignées de mélanomes prolifératives et de trois lignées invasives, déplétés en vésicules extracellulaires, seront analysés par spectrométrie de masse. Cela permettra de tester le rôle de ces protéines sur l'inhibition de la contraction des FRC par des approches de siARN pour identifier le (ou les) facteur tumoral(/aux) impliqué(s).

Le fait que seuls les mélanomes invasifs produisent un sécrétome inhibant la contraction des FRC renforce le concept développé ces dernières années par plusieurs équipes (*Kim et al., 2012 ; Maurus et al., 2017 ; Rambow et al., 2018*), montrant qu'une transition phénotypique des cellules de mélanome est nécessaire à la progression métastatique. Notre équipe a déjà montré que le sécrétome des cellules invasives favorise la migration métastatique du mélanome (*Tichet et al., 2015 ; Rathore et al., 2019*), et je complète ces données en montrant que le sécrétome de mélanomes invasifs permet de préparer la niche pré-métastatique. Cependant, les données de la littérature montrent que la plasticité du mélanome ne se résume pas à deux phénotypes, prolifératif et invasif, et des profils intermédiaires ou associés à la résistance thérapeutique ont été décrits (*Tsoi et al., 2018 ; Rambow et al., 2018*). L'éducation des FRC et la modulation de leurs propriétés

contractiles par des mélanomes présentant ces différents profils seront donc étudiées en caractérisant plus finement les mélanomes disponibles au laboratoire, ou en induisant la transition phénotypique d'une lignée de mélanome proliférative par une exposition aux thérapies ciblées ou la surexpression de certaines protéines (LOXL2, SPARC) dont le rôle dans la transition phénotypique est à l'étude au laboratoire. Ces expériences permettront de mieux comprendre comment les cellules tumorales acquièrent la capacité à préparer la niche pré-métastatique.

L'ensemble des données obtenues sur les FRC humains *in vitro* permettent d'expliquer un certain nombre de modifications que nous avons observées dans un modèle murin syngénique d'éducation pré-métastatique du ganglion lymphatique. L'inhibition de la contraction des FRC et leur prolifération permet d'expliquer la dilatation et l'augmentation de l'élasticité du ganglion drainant les facteurs tumoraux d'une lignée murine de mélanome invasif (Yumm1.7). La modification du sécrétome des FRC dans le ganglion drainant la tumeur, par exemple la surexpression de CXCL12, est également en accord avec le bouleversement de la microarchitecture ganglionnaire, et la rupture partielle de la compartimentalisation des lobules internes entre les zones T et B. En particulier, CXCL12 favorise les propriétés chimiotactiques d'un grand nombre de cellules, dont les lymphocytes T et B. Ces résultats sont aussi en accord avec d'autres études développant des modèles expérimentaux d'éducation pré-métastatique du ganglion. Nous confirmons ainsi que l'éducation des FRC dans le ganglion drainant la tumeur conduit à leur prolifération, la modification de leur sécrétome et la composition de leur matrice (Riedel *et al.*, 2016). Riedel *et al.*, montrent par contre que les FRC traités avec le milieu conditionné de la lignée de mélanome proliférative B16.F10 contractent davantage les gels de collagène, mais cela reste en accord avec ce que j'obtiens avec le milieu conditionné de certaines lignées prolifératives humaines. Mes résultats suggèrent que les mélanomes invasifs éduquent les FRC à distance pour créer une niche biomécanique qui favorise les métastases.

Pour confirmer les résultats que j'ai obtenus sur la modification des propriétés contractiles des FRC *in vitro* dans notre modèle murin syngénique *in vivo*, nous pourrions comparer l'activité contractile des FRC dans les ganglions drainants, l'expression des fibres de stress d'actine, la localisation cellulaire de YAP et la phosphorylation de STAT3 et de MLC2, qui seront analysées par microscopie. Si ces résultats sont validés, ils pourraient servir de nouveaux marqueurs précoces de l'éducation pré-métastatique. D'autres marqueurs déjà rapportés dans la littérature, que j'ai confirmés *in vitro*, peuvent être vérifiés sur notre modèle murin syngénique *in vivo*, comme la prolifération des FRC et la surexpression de la podoplanine. Le modèle murin servira également à valider la protéine tumorale responsable de la relaxation du cytosquelette des FRC identifiée *in vitro*. Enfin, il faudra analyser dans le modèle murin si la modification des propriétés contractiles des FRC dans le ganglion pré-métastatique favorise l'implantation tumorale dans le ganglion lymphatique, en traitant les souris avec du milieu conditionné de mélanomes invasifs ou en utilisant des inhibiteurs de JAK (Ruxolitinib) ou de YAP (Verteporfine).

A plus long terme, mes résultats pourraient permettre d'établir de nouveaux marqueurs ou de nouvelles cibles thérapeutiques. Les marqueurs (surexpression de la podoplanine, relocalisation de YAP, diminution des fibres d'actine) pourraient permettre d'identifier des modifications précoces dans le ganglion pré-métastatique, peut-être même avant les marqueurs déjà utilisés qui repèrent la lymphangiogenèse. Cela permettrait d'orienter rapidement les patients dont les ganglions régionaux présentent ces modifications vers des thérapies plus adaptées. De nouveaux traitements adjuvants,

dont les inhibiteurs de JAK (Ruxolitinib) et de YAP (Verteporfine) déjà utilisés dans le traitement d'autres pathologies, pourraient ainsi être développés ou redéployés pour bloquer la communication à distance entre les mélanomes invasifs et les FRC, ce qui empêcherait la formation de la niche biomécanique et immunologique dans le ganglion pré-métastatique et donc les métastases. Ces nouvelles stratégies permettraient de prévenir les métastases loco-régionales et permettre à davantage de patients de ne pas développer des métastases distantes encore trop souvent mortelles.

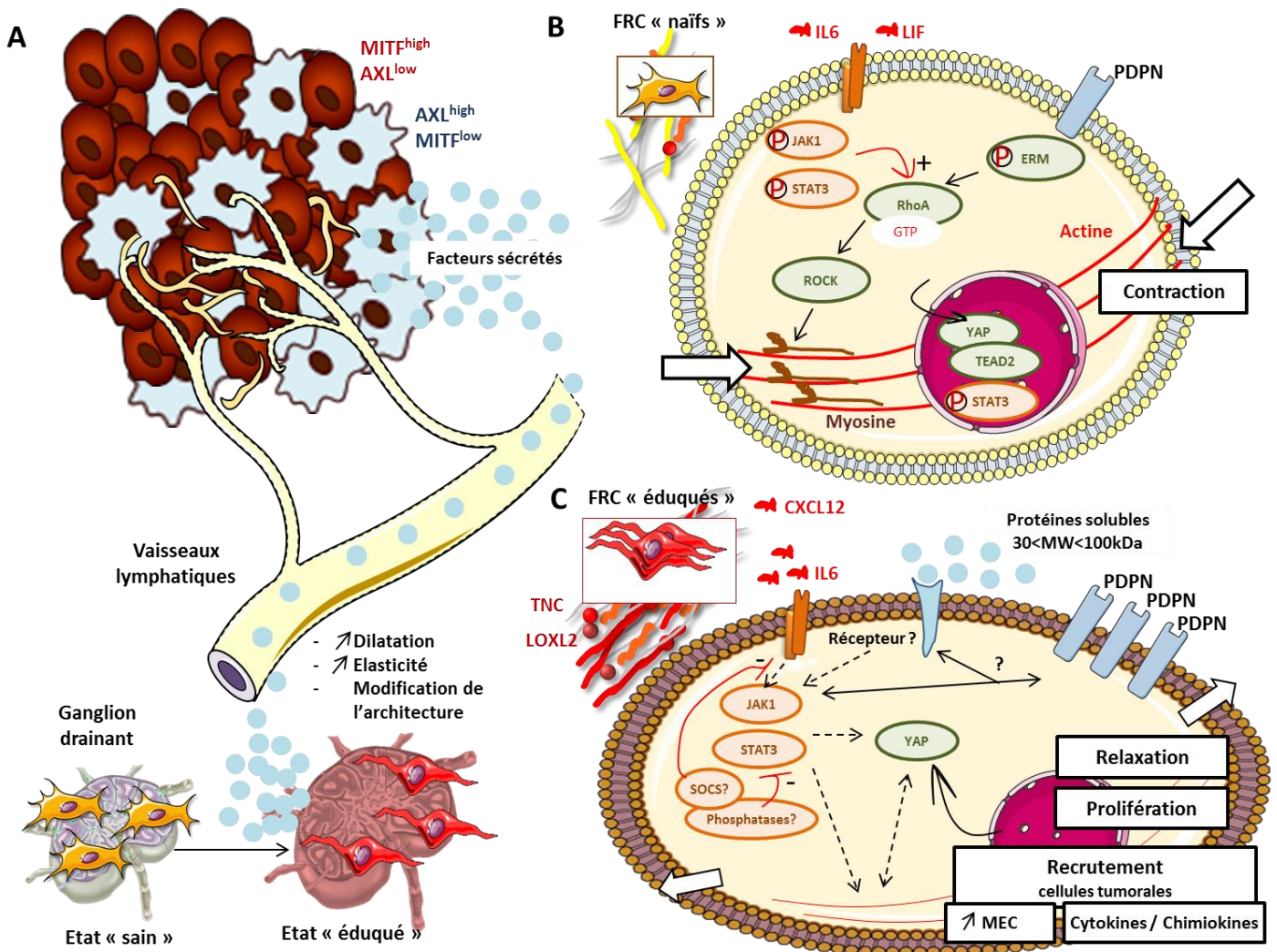


Schéma bilan

(A) **Modèle proposé de l'éducation pré-métastatique.** Les cellules tumorales de profil invasif sécrètent des facteurs qui gagnent le ganglion lymphatique et induisent des changements dans sa taille (dilatation), ses propriétés biomécaniques (augmentation de l'élasticité), et le démantèlement de sa microarchitecture interne.

(B) **Le contrôle de la contraction en situation naïve.** Les FRC sécrètent des facteurs qui maintiennent l'activité de JAK1-STAT3. La podoplanine active également les protéines ERM. L'activation de ces voies aboutissent à l'activation de la voie RhoA-ROCK-MLC2 et la contraction des fibres d'actomyosine. La contraction est également maintenue par l'activité transcriptionnelle de YAP.

(C) **Les facteurs sécrétés de mélanomes invasifs activent les FRC et inhibent leur contraction spontanée.** Les facteurs sécrétés des mélanomes invasifs induisent la prolifération des FRC, et la sécrétion de matrice, de cytokines et de chimiokines favorisant la migration tumorale. Ils induisent également l'inhibition de la contraction des FRC via une ou plusieurs protéines ou complexes de protéines de taille comprise entre 30kDa et 100kDa inhibent la voie JAK1/STAT3 via un récepteur inconnu, qui peut être soit un récepteur des cytokines, soit la podoplanine ou l'un de ses partenaires, soit un autre récepteur. Ils induisent l'arrêt de la signalisation RhoA-ROCK-MLC2. Ces mêmes protéines ou d'autres molécules induisent l'activation des FRC qui prolifèrent davantage et expriment plus de podoplanine en surface. Le lien entre la voie podoplanine et la voie JAK1-STAT3 n'est pas connu s'il existe. La désactivation de JAK1-STAT3 peut également résulter de l'engagement de protéines inhibitrices comme des tyrosine-phosphatases ou bien les SOCS. Dans cette cascade de modifications, YAP est transloqué vers le cytoplasme. Savoir s'il s'agit d'un évènement précoce participant à l'inhibition de la contraction ou bien s'il s'agit d'une conséquence de l'inhibition du squelette reste une question non élucidée.

Références

Acton SE, Astarita JL, Malhotra D, et al. Podoplanin-rich stromal networks induce dendritic cell motility via activation of the C-type lectin receptor CLEC-2. *Immunity*. 2012;37(2):276-289. doi:10.1016/j.immuni.2012.05.022

Acton SE, Farrugia AJ, Astarita JL, et al. Dendritic cells control fibroblastic reticular network tension and lymph node expansion. *Nature*. 2014;514(7523):498-502. doi:10.1038/nature13814

Adler, Nikki R., Andrew Haydon, Catriona A. McLean, John W. Kelly, et Victoria J. Mar. « Metastatic Pathways in Patients with Cutaneous Melanoma ». *Pigment Cell & Melanoma Research* 30, n° 1 (janvier 2017): 13-27. <https://doi.org/10.1111/pcmr.12544>.

Akbani, Rehan, Kadir C. Akdemir, B. Arman Aksoy, Monique Albert, Adrian Ally, Samirkumar B. Amin, Harindra Arachchi, et al. « Genomic Classification of Cutaneous Melanoma ». *Cell* 161, n° 7 (juin 2015): 1681-96. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.05.044>.

Albregues, Jean, Isabelle Bourget, Catherine Pons, Vincent Butet, Paul Hofman, Sophie Tartare-Deckert, Chloe C. Feral, Guerrino Meneguzzi, et Cedric Gaggioli. « LIF Mediates Proinvasive Activation of Stromal Fibroblasts in Cancer ». *Cell Reports* 7, n° 5 (juin 2014): 1664-78. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.04.036>.

Albregues, Jean, Mario A. Shields, David Ng, Chun Gwon Park, Alexandra Ambrico, Morgan E. Poindexter, Priya Upadhyay, et al. « Neutrophil Extracellular Traps Produced during Inflammation Awaken Dormant Cancer Cells in Mice ». *Science* 361, n° 6409 (28 septembre 2018): eaao4227. <https://doi.org/10.1126/science.aao4227>.

Alvarez MJ, Prada F, Salvatierra E, Bravo AI, Lutzky VP, Carbone C, Pitossi FJ, Chuluyan HE, Podhajcer OL (2005) Secreted protein acidic and rich in cysteine produced by human melanoma cells modulates polymorphonuclear leukocyte recruitment and antitumor

cytotoxic capacity. *Cancer Res* 65(12):5123–5132. doi:10.1158/0008-5472.CAN-04-1102

Ashton-Rickardt PG, Bandeira A, Delaney JR, et al. Evidence for a differential avidity model of T cell selection in the thymus. *Cell*. 1994;76(4):651-663. doi:10.1016/0092-8674(94)90505-3

Asperti-Boursin F, Real E, Bismuth G, Trautmann A, Donnadieu E. CCR7 ligands control basal T cell motility within lymph node slices in a phosphoinositide 3-kinase-independent manner. *J Exp Med*. 2007;204(5):1167-1179. doi:10.1084/jem.20062079

Astarita JL, Cremasco V, Fu J, et al. The CLEC-2-podoplanin axis controls the contractility of fibroblastic reticular cells and lymph node microarchitecture. *Nat Immunol*. 2015;16(1):75-84. doi:10.1038/ni.3035

Arozarena, Imanol, et Claudia Wellbrock. « Phenotype Plasticity as Enabler of Melanoma Progression and Therapy Resistance ». *Nature Reviews Cancer* 19, n° 7 (juillet 2019): 377-91. <https://doi.org/10.1038/s41568-019-0154-4>.

Avgustinova, Alexandra, Marjan Irvani, David Robertson, Antony Fearn, Qiong Gao, Pamela Klingbeil, Andrew M. Hanby, et al. « Tumour Cell-Derived Wnt7a Recruits and Activates Fibroblasts to Promote Tumour Aggressiveness ». *Nature Communications* 7, n° 1 (avril 2016): 10305. <https://doi.org/10.1038/ncomms10305>.

Baptista AP, Roozendaal R, Reijmers RM, et al. Lymph node stromal cells constrain immunity via MHC class II self-antigen presentation. *Elife*. 2014;3:e04433. Published 2014 Nov 19. doi:10.7554/eLife.04433

Bajénoff M, Egen JG, Koo LY, et al. Stromal cell networks regulate lymphocyte entry, migration, and territoriality in lymph nodes. *Immunity*. 2006;25(6):989-1001. doi:10.1016/j.immuni.2006.10.011

Bannard, Oliver, Robert M. Horton, Christopher D.C. Allen, Jinping An, Takashi Nagasawa, et Jason G. Cyster. « Germinal Center Centroblasts Transition to a Centrocyte Phenotype

According to a Timed Program and Depend on the Dark Zone for Effective Selection ». *Immunity* 39, n° 5 (novembre 2013): 912-24. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2013.08.038>.

Barnhill, Raymond L, Mengliang Ye, Aude Batistella, Marc-Henri Stern, Sergio Roman-Roman, Rémi Dendale, Olivier Lantz, et al. « The Biological and Prognostic Significance of Angiotropism in Uveal Melanoma ». *Laboratory Investigation* 97, n° 6 (juin 2017): 746-59. <https://doi.org/10.1038/labinvest.2017.16>.

Baron, Yorann, Sébastien Corre, Nicolas Mouchet, Sophie Vulont, Sharon Prince, et Marie-Dominique Galibert. « USF-1 Is Critical for Maintaining Genome Integrity in Response to UV-Induced DNA Photolesions ». Édité par James E. Cleaver. *PLoS Genetics* 8, n° 1 (26 janvier 2012): e1002470. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002470>.

Bartoschek, Michael, Nikolay Oskolkov, Matteo Bocci, John Lövrot, Christer Larsson, Mikael Sommarin, Chris D. Madsen, et al. « Spatially and Functionally Distinct Subclasses of Breast Cancer-Associated Fibroblasts Revealed by Single Cell RNA Sequencing ». *Nature Communications* 9, n° 1 (décembre 2018): 5150. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-07582-3>.

Baynash AG, Hosoda K, Giaid A, et al. Interaction of endothelin-3 with endothelin-B receptor is essential for development of epidermal melanocytes and enteric neurons. *Cell*. 1994;79(7):1277-1285. doi:10.1016/0092-8674(94)90018-3

Bechtel, Wibke, Scott McGoohan, Elisabeth M Zeisberg, Gerhard A Müller, Hubert Kalbacher, David J Salant, Claudia A Müller, Raghu Kalluri, et Michael Zeisberg. « Methylation Determines Fibroblast Activation and Fibrogenesis in the Kidney ». *Nature Medicine* 16, n° 5 (mai 2010): 544-50. <https://doi.org/10.1038/nm.2135>.

Berg, E L, M K Robinson, R A Warnock, et E C Butcher. « The Human Peripheral Lymph Node Vascular Addressin Is a Ligand for LECAM-1, the Peripheral Lymph Node Homing Receptor. » *The Journal of Cell Biology* 114, n° 2 (15 juillet 1991): 343-49. <https://doi.org/10.1083/jcb.114.2.343>.

Bergers, Gabriele, Rolf Brekken, Gerald McMahon, Thiennu H. Vu, Takeshi Itoh, Kazuhiko Tamaki, Kazuhiko Tanzawa, et al. « Matrix Metalloproteinase-9 Triggers the Angiogenic Switch during Carcinogenesis ». *Nature Cell Biology* 2, n° 10 (octobre 2000): 737-44. <https://doi.org/10.1038/35036374>.

Bertero, Thomas, William M. Oldham, Eloise M. Grasset, Isabelle Bourget, Etienne Boulter, Sabrina Pisano, Paul Hofman, et al. « Tumor-Stroma Mechanics Coordinate Amino Acid Availability to Sustain Tumor Growth and Malignancy ». *Cell Metabolism* 29, n° 1 (janvier 2019): 124-140.e10. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2018.09.012>.

Biffi G, Oni TE, Spielman B, et al. IL1-Induced JAK/STAT Signaling Is Antagonized by TGF β to Shape CAF Heterogeneity in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Cancer Discov.* 2019;9(2):282-301. doi:10.1158/2159-8290.CD-18-0710

Bochet, L., C. Lehuede, S. Dauvillier, Y. Y. Wang, B. Dirat, V. Laurent, C. Dray, et al. « Adipocyte-Derived Fibroblasts Promote Tumor Progression and Contribute to the Desmoplastic Reaction in Breast Cancer ». *Cancer Research* 73, n° 18 (15 septembre 2013): 5657-68. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-13-0530>.

Bonnans, Caroline, Jonathan Chou, et Zena Werb. « Remodelling the Extracellular Matrix in Development and Disease ». *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 15, n° 12 (décembre 2014): 786-801. <https://doi.org/10.1038/nrm3904>.

Borsig, L., R. Wong, R. O. Hynes, N. M. Varki, et A. Varki. « Synergistic Effects of L- and P-Selectin in Facilitating Tumor Metastasis Can Involve Non-Mucin Ligands and Implicate Leukocytes as Enhancers of Metastasis ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99, n° 4 (19 février 2002): 2193-98. <https://doi.org/10.1073/pnas.261704098>.

Butcher, E. C., et L. J. Picker. « Lymphocyte Homing and Homeostasis ». *Science* 272, n° 5258 (5 avril 1996): 60-67. <https://doi.org/10.1126/science.272.5258.60>.

Calvo, Fernando, Nil Ege, Araceli Grande-Garcia, Steven Hooper, Robert P. Jenkins, Shahid I. Chaudhry, Kevin Harrington, et al. « Mechanotransduction and YAP-Dependent Matrix Remodelling Is Required for the Generation and Maintenance of Cancer-Associated

Fibroblasts ». *Nature Cell Biology* 15, n° 6 (juin 2013): 637-46. <https://doi.org/10.1038/ncb2756>.

Calvo, Fernando, Romana Ranftl, Steven Hooper, Aaron J. Farrugia, Emad Moeendarbary, Andreas Bruckbauer, Facundo Batista, Guillaume Charras, et Erik Sahai. « Cdc42EP3/BORG2 and Septin Network Enables Mechano-Transduction and the Emergence of Cancer-Associated Fibroblasts ». *Cell Reports* 13, n° 12 (décembre 2015): 2699-2714. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.11.052>.

Caramel, Julie, Eftychios Papadogeorgakis, Louise Hill, Gareth J. Browne, Geoffrey Richard, Anne Wierinckx, Gerald Saldanha, et al. « A Switch in the Expression of Embryonic EMT-Inducers Drives the Development of Malignant Melanoma ». *Cancer Cell* 24, n° 4 (octobre 2013): 466-80. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2013.08.018>.

Carmeliet P, Jain RK. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature*. 2000;407(6801):249-257. doi:10.1038/35025220

Carrasco-Ramírez, Patricia, David W. Greening, Germán Andrés, Shashi K. Gopal, Ester Martín-Villar, Jaime Renart, Richard J. Simpson, et Miguel Quintanilla. « Podoplanin Is a Component of Extracellular Vesicles That Reprograms Cell-Derived Exosomal Proteins and Modulates Lymphatic Vessel Formation ». *Oncotarget* 7, n° 13 (29 mars 2016): 16070-89. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.7445>.

Chafe, S. C., Y. Lou, J. Sceneay, M. Vallejo, M. J. Hamilton, P. C. McDonald, K. L. Bennewith, A. Moller, et S. Dedhar. « Carbonic Anhydrase IX Promotes Myeloid-Derived Suppressor Cell Mobilization and Establishment of a Metastatic Niche by Stimulating G-CSF Production ». *Cancer Research* 75, n° 6 (15 mars 2015): 996-1008. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-14-3000>.

Chapman, Paul B., Axel Hauschild, Caroline Robert, John B. Haanen, Paolo Ascierto, James Larkin, Reinhard Dummer, et al. « Improved Survival with Vemurafenib in Melanoma with BRAF V600E Mutation ». *New England Journal of Medicine* 364, n° 26 (30 juin 2011): 2507-16. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1103782>.

Chen S, Kawashima H, Lowe JB, Lanier LL, Fukuda M (2005) Suppression of tumor formation in lymph nodes by L-selectin mediated natural killer cell recruitment. *J Exp Med* 202:1679–1689

Clarijs, Ruud, Lia Schalkwijk, Uta B Hofmann, et Dirk J Ruiter. « Induction of Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-3 Expression on Tumor Microvasculature as a New Progression Marker in Human Cutaneous Melanoma », s. d., 8.

Clemente, Claudio G, Martin C Mihm, Rosaria Bufalino, Stefano Zurrada, Paola Collini, et Natale Cascinelli. « Prognostic Value of Tumor Infiltrating Lymphocytes in the Vertical Growth Phase of Primary Cutaneous Melanoma », s. d., 8.

Choi SY, Bae H, Jeong SH, et al. YAP/TAZ direct commitment and maturation of lymph node fibroblastic reticular cells. *Nat Commun.* 2020;11(1):519. Published 2020 Jan 24. doi:10.1038/s41467-020-14293-1

Colombo, Marina, Graça Raposo, et Clotilde Théry. « Biogenesis, Secretion, and Intercellular Interactions of Exosomes and Other Extracellular Vesicles ». *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 30, n° 1 (11 octobre 2014): 255-89. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-101512-122326>.

Coman, Dale R, et Robert P DeLong. « Studies on the Mechanisms of Metastasis. The Distribution of Tumors in Various Organs in Relation to the Distribution of Arterial Emboli », s. d., 8.

« Complete Lymph Node Dissection in Melanoma: A Systematic Review and Meta-Analysis ». *Anticancer Research* 37, n° 12 (3 décembre 2017). <https://doi.org/10.21873/anticanres.12143>.

Commerford CD, Dieterich LC, He Y, et al. Mechanisms of Tumor-Induced Lymphovascular Niche Formation in Draining Lymph Nodes. *Cell Rep.* 2018;25(13):3554-3563.e4. doi:10.1016/j.celrep.2018.12.002

Coronella-Wood JA, Hersh EM (2003) Naturally occurring B-cell responses to breast cancer. *Cancer Immunol Immunother* CII 52: 715–738

Costa, Ana, Yann Kieffer, Alix Scholer-Dahirel, Floriane Pelon, Brigitte Bourachot, Melissa Cardon, Philemon Sirven, et al. « Fibroblast Heterogeneity and Immunosuppressive Environment in Human Breast Cancer ». *Cancer Cell* 33, n° 3 (mars 2018): 463-479.e10. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2018.01.011>.

Cui, Rutao, Hans R. Widlund, Erez Feige, Jennifer Y. Lin, Dara L. Wilensky, Viven E. Igras, John D’Orazio, et al. « Central Role of P53 in the Suntan Response and Pathologic Hyperpigmentation ». *Cell* 128, n° 5 (mars 2007): 853-64. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.12.045>.

Dadras, Soheil S, Bernhard Lange-Asschenfeldt, Paula Velasco, Lynh Nguyen, Anish Vora, Alona Muzikansky, Katharina Jahnke, et al. « Tumor Lymphangiogenesis Predicts Melanoma Metastasis to Sentinel Lymph Nodes ». *Modern Pathology*, 2005, 11.

Dankort, David, David P Curley, Robert A Cartlidge, Betsy Nelson, Anthony N Karnezis, William E Damsky Jr, Mingjian J You, Ronald A DePinho, Martin McMahon, et Marcus Bosenberg. « BrafV600E Cooperates with Pten Loss to Induce Metastatic Melanoma ». *Nature Genetics* 41, n° 5 (mai 2009): 544-52. <https://doi.org/10.1038/ng.356>.

Davidson S, Efremova M, Riedel A, et al. Single-Cell RNA Sequencing Reveals a Dynamic Stromal Niche That Supports Tumor Growth. *Cell Rep.* 2020;31(7):107628. doi:10.1016/j.celrep.2020.107628

Davila, Marco L, Isabelle Riviere, Xiuyan Wang, Shirley Bartido, Jae Park, Kevin Curran, Stephen S Chung, et al. « Efficacy and Toxicity Management of 19-28z CAR T Cell Therapy in B Cell Acute Lymphoblastic Leukemia », s. d., 12.

Deventer, Hendrik W. van, Daniela A. Palmieri, Qing Ping Wu, Everett C. McCook, et Jonathan S. Serody. « Circulating Fibrocytes Prepare the Lung for Cancer Metastasis by

Recruiting Ly-6C⁺ Monocytes Via CCL2 ». *The Journal of Immunology* 190, n° 9 (1 mai 2013): 4861-67. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1202857>.

Di Modica, Martina, Viola Regondi, Marco Sandri, Marilena V. Iorio, Adriana Zanetti, Elda Tagliabue, Patrizia Casalini, et Tiziana Triulzi. « Breast Cancer-Secreted MiR-939 Downregulates VE-Cadherin and Destroys the Barrier Function of Endothelial Monolayers ». *Cancer Letters* 384 (janvier 2017): 94-100. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2016.09.013>.

Diazzi, Serena, Sophie Tartare-Deckert, et Marcel Deckert. « Bad Neighborhood: Fibrotic Stroma as a New Player in Melanoma Resistance to Targeted Therapies ». *Cancers* 12, n° 6 (26 mai 2020): 1364. <https://doi.org/10.3390/cancers12061364>.

Dolberg DS, Bissell MJ. Inability of Rous sarcoma virus to cause sarcomas in the avian embryo. *Nature*. 1984;309(5968):552-556. doi:10.1038/309552a0

Doudican, N A, et S J Orlow. « Inhibition of the CRAF/Prohibitin Interaction Reverses CRAF-Dependent Resistance to Vemurafenib ». *Oncogene* 36, n° 3 (janvier 2017): 423-28. <https://doi.org/10.1038/onc.2016.214>.

Drinker, Cecil K., Madeleine E. Field, et Hugh K. Ward. « THE FILTERING CAPACITY OF LYMPH NODES ». *The Journal of Experimental Medicine* 59, n° 4 (1 avril 1934): 393-405. <https://doi.org/10.1084/jem.59.4.393>.

Dubrot J, Duraes FV, Potin L, et al. Lymph node stromal cells acquire peptide-MHCII complexes from dendritic cells and induce antigen-specific CD4⁺ T cell tolerance. *J Exp Med*. 2014;211(6):1153-1166. doi:10.1084/jem.20132000

Dupont, Sirio, Leonardo Morsut, Mariaceleste Aragona, Elena Enzo, Stefano Giullitti, Michelangelo Cordenonsi, Francesca Zanconato, et al. « Role of YAP/TAZ in Mechanotransduction ». *Nature* 474, n° 7350 (juin 2011): 179-83. <https://doi.org/10.1038/nature10137>.

Dvorak HF. Tumors: wounds that do not heal. Similarities between tumor stroma generation and wound healing. *N Engl J Med.* 1986;315(26):1650-1659. doi:10.1056/NEJM198612253152606

Eggermont, Alexander M M, Vanna Chiarion-Sileni, Jean-Jacques Grob, Reinhard Dummer, Jedd D Wolchok, Henrik Schmidt, Omid Hamid, et al. « Adjuvant Ipilimumab versus Placebo after Complete Resection of High-Risk Stage III Melanoma (EORTC 18071): A Randomised, Double-Blind, Phase 3 Trial ». *The Lancet Oncology* 16, n° 5 (mai 2015): 522-30. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(15\)70122-1](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(15)70122-1).

Eom, Jennifer, Saem Mul Park, Vaughan Feisst, Chun-Jen J. Chen, Joanna E. Mathy, Julie D. McIntosh, Catherine E. Angel, et al. « Distinctive Subpopulations of Stromal Cells Are Present in Human Lymph Nodes Infiltrated with Melanoma ». *Cancer Immunology Research* 8, n° 8 (août 2020): 990-1003. <https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-19-0796>.

Ewing, J. (1928) Neoplastic Diseases. 6th edn. WB Saunders, Philadelphia

Faries, Mark B., John F. Thompson, Alistair J. Cochran, Robert H. Andtbacka, Nicola Mozzillo, Jonathan S. Zager, Tiina Jahkola, et al. « Completion Dissection or Observation for Sentinel-Node Metastasis in Melanoma ». *New England Journal of Medicine* 376, n° 23 (8 juin 2017): 2211-22. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1613210>.

Fehon, Richard G., Andrea I. McClatchey, et Anthony Bretscher. « Organizing the Cell Cortex: The Role of ERM Proteins ». *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 11, n° 4 (avril 2010): 276-87. <https://doi.org/10.1038/nrm2866>.

Ferlazzo G, Pack M, Thomas D, Paludan C, Schmid D, Strowig T, Bougras G, Muller WA, Moretta L, Munz C (2004) Distinct roles of IL-12 and IL-15 in human natural killer cell activation by dendritic cells from secondary lymphoid organs. *Proc Natl AcadSci U S A* 101:16606–16611

Fidler, Isaiah J. « Critical Determinants of Metastasis ». *Seminars in Cancer Biology* 12, n° 2 (avril 2002): 89-96. <https://doi.org/10.1006/scbi.2001.0416>.

———. « The Organ Microenvironment and Cancer Metastasis ». *Differentiation* 70, n° 9-10 (décembre 2002): 498-505. <https://doi.org/10.1046/j.1432-0436.2002.700904.x>.

Fletcher, Anne L., Deepali Malhotra, Sophie E. Acton, Veronika Lukacs-Kornek, Angelique Bellemare-Pelletier, Mark Curry, Myriam Armant, et Shannon J. Turley. « Reproducible Isolation of Lymph Node Stromal Cells Reveals Site-Dependent Differences in Fibroblastic Reticular Cells ». *Frontiers in Immunology* 2 (2011). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2011.00035>.

Foster, Charles T., Francesco Gualdrini, et Richard Treisman. « Mutual Dependence of the MRTF–SRF and YAP–TEAD Pathways in Cancer-Associated Fibroblasts Is Indirect and Mediated by Cytoskeletal Dynamics ». *Genes & Development* 31, n° 23-24 (1 décembre 2017): 2361-75. <https://doi.org/10.1101/gad.304501.117>.

Gabbiani, G. « The Myofibroblast in Wound Healing and Fibrocontractive Diseases: The Myofibroblast ». *The Journal of Pathology* 200, n° 4 (juillet 2003): 500-503. <https://doi.org/10.1002/path.1427>.

Gaggioli, Cedric, Roser Busca, Patricia Abbe, Jean-Paul Ortonne, et Robert Ballotti. « Microphthalmia-Associated Transcription Factor (MITF) Is Required but Is Not Sufficient to Induce the Expression of Melanogenic Genes ». *Pigment Cell Research* 16, n° 4 (août 2003): 374-82. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0749.2003.00057.x>.

Gaggioli, Cedric, Steven Hooper, Cristina Hidalgo-Carcedo, Robert Grosse, John F. Marshall, Kevin Harrington, et Erik Sahai. « Fibroblast-Led Collective Invasion of Carcinoma Cells with Differing Roles for RhoGTPases in Leading and Following Cells ». *Nature Cell Biology* 9, n° 12 (décembre 2007): 1392-1400. <https://doi.org/10.1038/ncb1658>.

Gandini, Sara, Francesco Sera, Maria Sofia Cattaruzza, Paolo Pasquini, Orietta Picconi, Peter Boyle, et Carmelo Francesco Melchi. « Meta-Analysis of Risk Factors for Cutaneous Melanoma: II. Sun Exposure ». *European Journal of Cancer* 41, n° 1 (janvier 2005): 45-60. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2004.10.016>.

Garraway, Levi A., Hans R. Widlund, Mark A. Rubin, Gad Getz, Aaron J. Berger, Sridhar Ramaswamy, Rameen Beroukhim, et al. « Integrative Genomic Analyses Identify MITF as a Lineage Survival Oncogene Amplified in Malignant Melanoma ». *Nature* 436, n° 7047 (juillet 2005): 117-22. <https://doi.org/10.1038/nature03664>.

Garrett, Wendy S. « Cancer and the Microbiota ». *Science* 348, n° 6230 (3 avril 2015): 80-86. <https://doi.org/10.1126/science.aaa4972>.

Gasic et al., Thrombogenic activity of mouse and human tumors: effects on platelets, coagulation, and fibrinolysis, and possible significance for metastases, *Zeitschrift für Krebsforschung und Klinische Onkologie* (1976)

Gast, Charles E., Alain D. Silk, Luai Zarour, Lara Riegler, Joshua G. Burkhart, Kyle T. Gustafson, Michael S. Parappilly, et al. « Cell Fusion Potentiates Tumor Heterogeneity and Reveals Circulating Hybrid Cells That Correlate with Stage and Survival ». *Science Advances* 4, n° 9 (septembre 2018): eaat7828. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aat7828>.

Geiger, Benjamin, Joachim P. Spatz, et Alexander D. Bershadsky. « Environmental Sensing through Focal Adhesions ». *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 10, n° 1 (janvier 2009): 21-33. <https://doi.org/10.1038/nrm2593>.

Georgouli, Mirella, Cecilia Herraiz, Eva Crosas-Molist, Bruce Fanshawe, Oscar Maiques, Anna Perdrix, Pahini Pandya, et al. « Regional Activation of Myosin II in Cancer Cells Drives Tumor Progression via a Secretory Cross-Talk with the Immune Microenvironment ». *Cell* 176, n° 4 (février 2019): 757-774.e23. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.12.038>.

Gilkes, Daniele M., Gregg L. Semenza, et Denis Wirtz. « Hypoxia and the Extracellular Matrix: Drivers of Tumour Metastasis ». *Nature Reviews Cancer* 14, n° 6 (juin 2014): 430-39. <https://doi.org/10.1038/nrc3726>.

Girard, Christophe A., Margaux Lecacheur, Rania Ben Jouira, Ilona Berestjuk, Serena Diazzi, Virginie Prod'homme, Aude Mallavialle, et al. « A Feed-Forward Mechanosignaling Loop Confers Resistance to Therapies Targeting the MAPK Pathway in BRAF-Mutant Melanoma ».

Cancer Research 80, n° 10 (15 mai 2020): 1927-41. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-19-2914>.

Girard, Jean-Philippe, Christine Moussion, et Reinhold Förster. « HEVs, Lymphatics and Homeostatic Immune Cell Trafficking in Lymph Nodes ». *Nature Reviews Immunology* 12, n° 11 (novembre 2012): 762-73. <https://doi.org/10.1038/nri3298>.

Gopinathan G, Milagre C, Pearce OM, et al. Interleukin-6 Stimulates Defective Angiogenesis. *Cancer Res.* 2015;75(15):3098-3107. doi:10.1158/0008-5472.CAN-15-1227

Greenstein, Amy, Adel Giaid, et James A Richardson. « Interaction of Endothelin-3 with Endothelin-B Receptor Is Essential for Development of Epidermal Melanocytes and Enteric Neurons », s. d., 9.

Gregory, Julia L., Anne Walter, Yannick O. Alexandre, Jyh Liang Hor, Ruijie Liu, Joel Z. Ma, Sapna Devi, et al. « Infection Programs Sustained Lymphoid Stromal Cell Responses and Shapes Lymph Node Remodeling upon Secondary Challenge ». *Cell Reports* 18, n° 2 (janvier 2017): 406-18. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.12.038>.

Gunn MD, Tangemann K, Tam C, Cyster JG, Rosen SD, Williams LT. A chemokine expressed in lymphoid high endothelial venules promotes the adhesion and chemotaxis of naive T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998;95(1):258-263. doi:10.1073/pnas.95.1.258

Haass, Nikolas K., Keiran S. M. Smalley, Ling Li, et Meenhard Herlyn. « Adhesion, Migration and Communication in Melanocytes and Melanoma ». *Pigment Cell Research* 18, n° 3 (juin 2005): 150-59. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0749.2005.00235.x>.

Hale, Matthew David, Jeremy David Hayden, et Heike Irmgard Grabsch. « Tumour-Microenvironment Interactions: Role of Tumour Stroma and Proteins Produced by Cancer-Associated Fibroblasts in Chemotherapy Response ». *Cellular Oncology* 36, n° 2 (avril 2013): 95-112. <https://doi.org/10.1007/s13402-013-0127-7>.

Hanahan, Douglas, et Robert A Weinberg. « The Hallmarks of Cancer ». *Cell* 100, n° 1 (janvier 2000): 57-70. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81683-9](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81683-9).

Hanahan, Douglas, et Robert A. Weinberg. « Hallmarks of Cancer: The Next Generation ». *Cell* 144, n° 5 (mars 2011): 646-74. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>.

Harrell, Maria I., Brian M. Iritani, et Alanna Ruddell. « Tumor-Induced Sentinel Lymph Node Lymphangiogenesis and Increased Lymph Flow Precede Melanoma Metastasis ». *The American Journal of Pathology* 170, n° 2 (février 2007): 774-86. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2007.060761>.

———. « Tumor-Induced Sentinel Lymph Node Lymphangiogenesis and Increased Lymph Flow Precede Melanoma Metastasis ». *The American Journal of Pathology* 170, n° 2 (février 2007): 774-86. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2007.060761>.

Helms, Erin, M. Kathrina Onate, et Mara H. Sherman. « Fibroblast Heterogeneity in the Pancreatic Tumor Microenvironment ». *Cancer Discovery* 10, n° 5 (mai 2020): 648-56. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-19-1353>.

Hieken TJ, Ronan SG, Farolan M, Shilkaitis AL, Das Gupta TK. Beta 1 integrin expression: a marker of lymphatic metastases in cutaneous malignant melanoma. *Anticancer Res.* 1996;16(4B):2321-2324..

Hinz, Boris. « Formation and Function of the Myofibroblast during Tissue Repair ». *Journal of Investigative Dermatology* 127, n° 3 (mars 2007): 526-37. <https://doi.org/10.1038/sj.jid.5700613>.

Hirakawa S, Kodama S, Kunstfeld R, Kajiya K, Brown LF, Detmar M. VEGF-A induces tumor and sentinel lymph node lymphangiogenesis and promotes lymphatic metastasis. *J Exp Med.* 2005;201(7):1089-1099. doi:10.1084/jem.20041896

Hiratsuka, Sachie, Akira Watanabe, Yoshiko Sakurai, Sachiko Akashi-Takamura, Sachie Ishibashi, Kensuke Miyake, Masabumi Shibuya, Shizuo Akira, Hiroyuki Aburatani, et Yoshiro

Maru. « The S100A8–Serum Amyloid A3–TLR4 Paracrine Cascade Establishes a Pre-Metastatic Phase ». *Nature Cell Biology* 10, n° 11 (novembre 2008): 1349-55. <https://doi.org/10.1038/ncb1794>.

Hirobe, Tomohisa. « Role of Keratinocyte-Derived Factors Involved in Regulating the Proliferation and Differentiation of Mammalian Epidermal Melanocytes ». *Pigment Cell Research* 18, n° 1 (février 2005): 2-12. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0749.2004.00198.x>.

Hoek, Keith S., Natalie C. Schlegel, Patricia Brafford, Antje Sucker, Selma Ugurel, Rajiv Kumar, Barbara L. Weber, et al. « Metastatic Potential of Melanomas Defined by Specific Gene Expression Profiles with No BRAF Signature ». *Pigment Cell Research* 19, n° 4 (août 2006): 290-302. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0749.2006.00322.x>.

Hoshino, Ayuko, Bruno Costa-Silva, Tang-Long Shen, Goncalo Rodrigues, Ayako Hashimoto, Milica Tesic Mark, Henrik Molina, et al. « Tumour Exosome Integrins Determine Organotropic Metastasis ». *Nature* 527, n° 7578 (novembre 2015): 329-35. <https://doi.org/10.1038/nature15756>.

Hotta, A., Kawakatsu, T., Nakatani, T., Sato, T., Matsui, C., Sukezane, T., Akagi, T., Hamaji, T., Grigoriev, I., Akhmanova, A., et al. (2010). Laminin-based cell adhesion anchors microtubule plus ends to the epithelial cell basal cortex through LL5alpha/beta. *J. Cell Biol.* 189, 901–917.

Høye, Anette M., et Janine T. Eler. « Structural ECM Components in the Premetastatic and Metastatic Niche ». *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 310, n° 11 (1 juin 2016): C955-67. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00326.2015>.

Huang, Hsin-Ying, Ana Rivas-Caicedo, François Renevey, Hélène Cannelle, Elisa Peranzoni, Leonardo Scarpellino, Debbie L. Hardie, et al. « Identification of a New Subset of Lymph Node Stromal Cells Involved in Regulating Plasma Cell Homeostasis ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 115, n° 29 (17 juillet 2018): E6826-35. <https://doi.org/10.1073/pnas.1712628115>.

Illmensee, K., et B. Mintz. « Totipotency and Normal Differentiation of Single Teratocarcinoma Cells Cloned by Injection into Blastocysts. » *Proceedings of the National Academy of Sciences* 73, n° 2 (1 février 1976): 549-53. <https://doi.org/10.1073/pnas.73.2.549>.

Javaherian, Ashkan, Michael Vaccariello, Norbert E Fusenig, et Jonathan A Garlick. « Normal Keratinocytes Suppress Early Stages of Neoplastic Progression in Stratified Epithelium », s. d., 9.

Johannessen, Cory M., Jesse S. Boehm, So Young Kim, Sapana R. Thomas, Leslie Wardwell, Laura A. Johnson, Caroline M. Emery, et al. « COT Drives Resistance to RAF Inhibition through MAP Kinase Pathway Reactivation ». *Nature* 468, n° 7326 (décembre 2010): 968-72. <https://doi.org/10.1038/nature09627>.

Kalluri, Raghu. « The Biology and Function of Fibroblasts in Cancer ». *Nature Reviews Cancer* 16, n° 9 (septembre 2016): 582-98. <https://doi.org/10.1038/nrc.2016.73>.

Kang, Yibin, Peter M. Siegel, Weiping Shu, Maria Drobnjak, Sanna M. Kakonen, Carlos Cordón-Cardo, Theresa A. Guise, et Joan Massagué. « A Multigenic Program Mediating Breast Cancer Metastasis to Bone ». *Cancer Cell* 3, n° 6 (juin 2003): 537-49. [https://doi.org/10.1016/S1535-6108\(03\)00132-6](https://doi.org/10.1016/S1535-6108(03)00132-6).

Kapanci, Y, C Ribaux, C Chaponnier, et G Gabbiani. « Cytoskeletal Features of Alveolar Myofibroblasts and Pericytes in Normal Human and Rat Lung. » *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 40, n° 12 (décembre 1992): 1955-63. <https://doi.org/10.1177/40.12.1333502>.

Kaplan, Rosandra N., Rebecca D. Riba, Stergios Zacharoulis, Anna H. Bramley, Loïc Vincent, Carla Costa, Daniel D. MacDonald, et al. « VEGFR1-Positive Haematopoietic Bone Marrow Progenitors Initiate the Pre-Metastatic Niche ». *Nature* 438, n° 7069 (décembre 2005): 820-27. <https://doi.org/10.1038/nature04186>.

Karagiannis, George S., Maria P. Pavlou, et Eleftherios P. Diamandis. « Cancer Secretomics Reveal Pathophysiological Pathways in Cancer Molecular Oncology ». *Molecular Oncology* 4, n° 6 (décembre 2010): 496-510. <https://doi.org/10.1016/j.molonc.2010.09.001>.

Katakai T, Hara T, Sugai M, Gonda H, Shimizu A. Lymph node fibroblastic reticular cells construct the stromal reticulum via contact with lymphocytes. *J Exp Med*. 2004;200(6):783-795. doi:10.1084/jem.20040254

Katakai T, Hara T, Lee JH, Gonda H, Sugai M, Shimizu A. A novel reticular stromal structure in lymph node cortex: an immuno-platform for interactions among dendritic cells, T cells and B cells. *Int Immunol*. 2004;16(8):1133-1142. doi:10.1093/intimm/dxh113

Katakai T, Suto H, Sugai M, et al. Organizer-like reticular stromal cell layer common to adult secondary lymphoid organs. *J Immunol*. 2008;181(9):6189-6200. doi:10.4049/jimmunol.181.9.6189

Kato Y, Kaneko MK, Kunita A, Ito H, Kameyama A, Ogasawara S, Matsuura N, Hasegawa Y, Suzuki-Inoue K, Inoue O, et al. Molecular analysis of the pathophysiological binding of the platelet aggregation-inducing factor podoplanin to the C-type lectin-like receptor CLEC-2. *Cancer Sci*. 2008;99:54–61.

Keller, Laura, et Klaus Pantel. « Unravelling Tumour Heterogeneity by Single-Cell Profiling of Circulating Tumour Cells ». *Nature Reviews Cancer* 19, n° 10 (octobre 2019): 553-67. <https://doi.org/10.1038/s41568-019-0180-2>.

Kim, Isabella S., Silja Heilmann, Emily R. Kansler, Yan Zhang, Milena Zimmer, Kajan Ratnakumar, Robert L. Bowman, et al. « Microenvironment-Derived Factors Driving Metastatic Plasticity in Melanoma ». *Nature Communications* 8, n° 1 (avril 2017): 14343. <https://doi.org/10.1038/ncomms14343>.

Kim, Mi-Young, Thordur Oskarsson, Swarnali Acharyya, Don X. Nguyen, Xiang H.-F. Zhang, Larry Norton, et Joan Massagué. « Tumor Self-Seeding by Circulating Cancer Cells ». *Cell* 139, n° 7 (décembre 2009): 1315-26. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.11.025>.

Kim, Young J., Lubor Borsig, Nissi M. Varki, et Ajit Varki. « P-Selectin Deficiency Attenuates Tumor Growth and Metastasis ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95, n° 16 (4 août 1998): 9325-30. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.16.9325>.

Kirkwood, J M, M H Strawderman, M S Ernstoff, T J Smith, E C Borden, et R H Blum. « Interferon Alfa-2b Adjuvant Therapy of High-Risk Resected Cutaneous Melanoma: The Eastern Cooperative Oncology Group Trial EST 1684. » *Journal of Clinical Oncology* 14, n° 1 (janvier 1996): 7-17. <https://doi.org/10.1200/JCO.1996.14.1.7>.

Kissenpfennig A, Henri S, Dubois B, et al. Dynamics and function of Langerhans cells in vivo: dermal dendritic cells colonize lymph node areas distinct from slower migrating Langerhans cells. *Immunity*. 2005;22(5):643-654. doi:10.1016/j.immuni.2005.04.004

Kiuru, Maija, et Klaus J Busam. « The NF1 Gene in Tumor Syndromes and Melanoma ». *Laboratory Investigation* 97, n° 2 (février 2017): 146-57. <https://doi.org/10.1038/labinvest.2016.142>.

Klemke, Martin, Tatjana Weschenfelder, Mathias H. Konstandin, et Yvonne Samstag. « High Affinity Interaction of Integrin A4β1 (VLA-4) and Vascular Cell Adhesion Molecule 1 (VCAM-1) Enhances Migration of Human Melanoma Cells across Activated Endothelial Cell Layers ». *Journal of Cellular Physiology* 212, n° 2 (août 2007): 368-74. <https://doi.org/10.1002/jcp.21029>.

Knoblich, Konstantin, Sara Cruz Migoni, Susan M. Siew, Elizabeth Jinks, Baksho Kaul, Hannah C. Jeffery, Alfie T. Baker, et al. « The Human Lymph Node Microenvironment Unilaterally Regulates T-Cell Activation and Differentiation ». Édité par Avinash Bhandoola. *PLOS Biology* 16, n° 9 (4 septembre 2018): e2005046. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.2005046>.

Kobayashi, N., S. Miyoshi, T. Mikami, H. Koyama, M. Kitazawa, M. Takeoka, K. Sano, et al. « Hyaluronan Deficiency in Tumor Stroma Impairs Macrophage Trafficking and Tumor Neovascularization ». *Cancer Research* 70, n° 18 (15 septembre 2010): 7073-83. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-4687>.

Kozar, Ines, Christiane Margue, Sonja Rothengatter, Claude Haan, et Stephanie Kreis. « Many Ways to Resistance: How Melanoma Cells Evade Targeted Therapies ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer* 1871, n° 2 (avril 2019): 313-22. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2019.02.002>.

Kumari, Neeraj, B. S. Dwarakanath, Asmita Das, et Anant Narayan Bhatt. « Role of Interleukin-6 in Cancer Progression and Therapeutic Resistance ». *Tumor Biology* 37, n° 9 (septembre 2016): 11553-72. <https://doi.org/10.1007/s13277-016-5098-7>.

Landsberg, Jennifer, Judith Kohlmeyer, Marcel Renn, Tobias Bald, Meri Rogava, Mira Cron, Martina Fatho, et al. « Melanomas Resist T-Cell Therapy through Inflammation-Induced Reversible Dedifferentiation ». *Nature* 490, n° 7420 (octobre 2012): 412-16. <https://doi.org/10.1038/nature11538>.

LäœCKEC, B, P Woo, L Berwicka, et Ndp Nowell. « Differential Growth of Metastatic Tumors in Liver and Lung ». *Cancer Research*, s. d., 7.

Larkin, James, Paolo A. Ascierto, Brigitte Dréno, Victoria Atkinson, Gabriella Liskay, Michele Maio, Mario Mandalà, et al. « Combined Vemurafenib and Cobimetinib in *BRAF* -Mutated Melanoma ». *New England Journal of Medicine* 371, n° 20 (13 novembre 2014): 1867-76. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1408868>.

Levental, Kandice R., Hongmei Yu, Laura Kass, Johnathon N. Lakins, Mikala Egeblad, Janine T. Erler, Sheri F.T. Fong, et al. « Matrix Crosslinking Forces Tumor Progression by Enhancing Integrin Signaling ». *Cell* 139, n° 5 (novembre 2009): 891-906. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.10.027>.

Lee PP, Yee C, Savage PA, et al. Characterization of circulating T cells specific for tumor-associated antigens in melanoma patients. *Nat Med.* 1999;5(6):677-685. doi:10.1038/9525

Liang, Shile, Margaret J. Slattery, Desiree Wagner, Scott I. Simon, et Cheng Dong. « Hydrodynamic Shear Rate Regulates Melanoma-Leukocyte Aggregation, Melanoma

Adhesion to the Endothelium, and Subsequent Extravasation ». *Annals of Biomedical Engineering* 36, n° 4 (avril 2008): 661-71. <https://doi.org/10.1007/s10439-008-9445-8>.

Link, Alexander, Tobias K Vogt, Stéphanie Favre, Mirjam R Britschgi, Hans Acha-Orbea, Boris Hinz, Jason G Cyster, et Sanjiv A Luther. « Fibroblastic Reticular Cells in Lymph Nodes Regulate the Homeostasis of Naive T Cells ». *Nature Immunology* 8, n° 11 (novembre 2007): 1255-65. <https://doi.org/10.1038/ni1513>.

Liu, Yang, et Xuetao Cao. « Characteristics and Significance of the Pre-Metastatic Niche ». *Cancer Cell* 30, n° 5 (novembre 2016): 668-81. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2016.09.011>.

Long, Georgina V., Axel Hauschild, Mario Santinami, Victoria Atkinson, Mario Mandalà, Vanna Chiarion-Sileni, James Larkin, et al. « Adjuvant Dabrafenib plus Trametinib in Stage III *BRAF* -Mutated Melanoma ». *New England Journal of Medicine* 377, n° 19 (9 novembre 2017): 1813-23. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1708539>.

Long, Georgina V, Daniil Stroyakovskiy, Helen Gogas, Evgeny Levchenko, Filippo de Braud, James Larkin, Claus Garbe, et al. « Dabrafenib and Trametinib versus Dabrafenib and Placebo for Val600 *BRAF*-Mutant Melanoma: A Multicentre, Double-Blind, Phase 3 Randomised Controlled Trial ». *The Lancet* 386, n° 9992 (août 2015): 444-51. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(15\)60898-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(15)60898-4).

Longmore, Greg. « Mechanical Signals Regulate and Activate SNAIL1 Protein to Control the Fibrogenic Response of CAFs ». *Journal of Cell Science*, s. d., 44.

Lugassy, Claire, Sohila Zadrán, Laurent A. Bentolila, Madhuri Wadehra, Roshini Prakash, S. Thomas Carmichael, Hynda K. Kleinman, Bruno Péault, Lionel Larue, et Raymond L. Barnhill. « Angiotropism, Pericytic Mimicry and Extravascular Migratory Metastasis in Melanoma: An Alternative to Intravascular Cancer Dissemination ». *Cancer Microenvironment* 7, n° 3 (décembre 2014): 139-52. <https://doi.org/10.1007/s12307-014-0156-4>.

Lukacs-Kornek, Veronika, Deepali Malhotra, Anne L Fletcher, Sophie E Acton, Kutlu G Elpek, Prakriti Tayalia, Ai-ris Collier, et Shannon J Turley. « Regulated Release of Nitric Oxide by

Nonhematopoietic Stroma Controls Expansion of the Activated T Cell Pool in Lymph Nodes ». *Nature Immunology* 12, n° 11 (novembre 2011): 1096-1104. <https://doi.org/10.1038/ni.2112>.

LUCKE B, BREEDIS C, WOO ZP, BERWICK L, NOWELL P. Differential growth of metastatic tumors in liver and lung; experiments with rabbit V2 carcinoma. *Cancer Res.* 1952;12(10):734-738.

Lund AW, Duraes FV, Hirosue S, et al. VEGF-C promotes immune tolerance in B16 melanomas and cross-presentation of tumor antigen by lymph node lymphatics. *Cell Rep.* 2012;1(3):191-199. doi:10.1016/j.celrep.2012.01.005

Ma, Michelle W, Ratna C Medicherla, Meng Qian, Eleazar Vega-Saenz de Miera, Erica B Friedman, Russell S Berman, Richard L Shapiro, et al. « Immune Response in Melanoma: An in-Depth Analysis of the Primary Tumor and Corresponding Sentinel Lymph Node ». *Modern Pathology* 25, n° 7 (juillet 2012): 1000-1010. <https://doi.org/10.1038/modpathol.2012.43>.

Mansfield AS, Holtan SG, Grotz TE, et al. Regional immunity in melanoma: immunosuppressive changes precede nodal metastasis. *Mod Pathol.* 2011;24(4):487-494. doi:10.1038/modpathol.2010.227

Malhotra D, Fletcher AL, Astarita J, et al. Transcriptional profiling of stroma from inflamed and resting lymph nodes defines immunological hallmarks. *Nat Immunol.* 2012;13(5):499-510. Published 2012 Apr 1. doi:10.1038/ni.2262

Martinez, Victor G., Valeriya Pankova, Lukas Krasny, Tanya Singh, Spyridon Makris, Ian J. White, Agnesska C. Benjamin, et al. « Fibroblastic Reticular Cells Control Conduit Matrix Deposition during Lymph Node Expansion ». *Cell Reports* 29, n° 9 (novembre 2019): 2810-2822.e5. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.10.103>.

Martín-Villar, Ester, Beatriz Fernández-Muñoz, Maddy Parsons, Maria M. Yurrita, Diego Megías, Eduardo Pérez-Gómez, Gareth E. Jones, et Miguel Quintanilla. « Podoplanin Associates with CD44 to Promote Directional Cell Migration ». Édité par Jonathan Chernoff.

Molecular Biology of the Cell 21, n° 24 (15 décembre 2010): 4387-99.
<https://doi.org/10.1091/mbc.e10-06-0489>.

Maurus, K, A Hufnagel, F Geiger, S Graf, C Berking, A Heinemann, A Paschen, et al. « The AP-1 Transcription Factor FOSL1 Causes Melanocyte Reprogramming and Transformation ». *Oncogene* 36, n° 36 (septembre 2017): 5110-21. <https://doi.org/10.1038/onc.2017.135>.

Meier, F., S. Will, U. Ellwanger, B. Schlagenhauff, B. Schittek, G. Rassner, et C. Garbe. « Metastatic Pathways and Time Courses in the Orderly Progression of Cutaneous Melanoma ». *British Journal of Dermatology* 147, n° 1 (juillet 2002): 62-70.
<https://doi.org/10.1046/j.1365-2133.2002.04867.x>.

Meng, Zhipeng, Toshiro Moroishi, et Kun-Liang Guan. « Mechanisms of Hippo Pathway Regulation ». *Genes & Development* 30, n° 1 (1 janvier 2016): 1-17.
<https://doi.org/10.1101/gad.274027.115>.

Mionnet, C., Mondor, I., Jorquera, A., Loosveld, M., Maurizio, J., Arcangeli, M.-L., Ruddle, N.H., Nowak, J., Aurrand-Lions, M., Luche, H., and Bajenoff, M. (2013). Identification of a new stromal cell type involved in the regulation of inflamed B cell follicles. *PLoS Biol.* 11, e1001672.

Minn, Andy J., Gaorav P. Gupta, Peter M. Siegel, Paula D. Bos, Weiping Shu, Dilip D. Giri, Agnes Viale, Adam B. Olshen, William L. Gerald, et Joan Massagué. « Genes That Mediate Breast Cancer Metastasis to Lung ». *Nature* 436, n° 7050 (juillet 2005): 518-24.
<https://doi.org/10.1038/nature03799>.

Miskolczi, Zsafia, Michael P. Smith, Emily J. Rowling, Jennifer Ferguson, Jorge Barriuso, et Claudia Wellbrock. « Collagen Abundance Controls Melanoma Phenotypes through Lineage-Specific Microenvironment Sensing ». *Oncogene* 37, n° 23 (juin 2018): 3166-82.
<https://doi.org/10.1038/s41388-018-0209-0>.

Mizuno, Kensaku. « Signaling Mechanisms and Functional Roles of Cofilin Phosphorylation and Dephosphorylation ». *Cellular Signalling* 25, n° 2 (février 2013): 457-69. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2012.11.001>.

Molon, Barbara, Bianca Cali, et Antonella Viola. « T Cells and Cancer: How Metabolism Shapes Immunity ». *Frontiers in Immunology* 7 (1 février 2016). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00020>.

Monteran, Lea, et Neta Erez. « The Dark Side of Fibroblasts: Cancer-Associated Fibroblasts as Mediators of Immunosuppression in the Tumor Microenvironment ». *Frontiers in Immunology* 10 (2 août 2019): 1835. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01835>.

Mort, R.L., I. J. Jackson, et E. E. Patton. « The Melanocyte Lineage in Development and Disease ». *Development* 142, n° 7 (1 avril 2015): 1387-1387. <https://doi.org/10.1242/dev.123729>.

Morton, Donald L., John F. Thompson, Alistair J. Cochran, Nicola Mozzillo, Omgo E. Nieweg, Daniel F. Roses, Harold J. Hoekstra, et al. « Final Trial Report of Sentinel-Node Biopsy versus Nodal Observation in Melanoma ». *New England Journal of Medicine* 370, n° 7 (13 février 2014): 599-609. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1310460>.

Mouret, Stéphane, Marie Charveron, Alain Favier, Jean Cadet, et Thierry Douki. « Differential Repair of UVB-Induced Cyclobutane Pyrimidine Dimers in Cultured Human Skin Cells and Whole Human Skin ». *DNA Repair* 7, n° 5 (mai 2008): 704-12. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2008.01.005>.

Mueller SN, Matloubian M, Clemens DM, et al. Viral targeting of fibroblastic reticular cells contributes to immunosuppression and persistence during chronic infection. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(39):15430-15435. doi:10.1073/pnas.0702579104

Mueller, Scott N., et Ronald N. Germain. « Stromal Cell Contributions to the Homeostasis and Functionality of the Immune System ». *Nature Reviews Immunology* 9, n° 9 (septembre 2009): 618-29. <https://doi.org/10.1038/nri2588>.

Mullins, R. D., J. A. Heuser, et T. D. Pollard. « The Interaction of Arp2/3 Complex with Actin: Nucleation, High Affinity Pointed End Capping, and Formation of Branching Networks of Filaments ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95, n° 11 (26 mai 1998): 6181-86. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.11.6181>.

Natali, Pg, Mr Nicotra, F Di Filippo, et A Bigotti. « Expression of Fibronectin, Fibronectin Isoforms and Integrin Receptors in Melanocytic Lesions ». *British Journal of Cancer* 71, n° 6 (juin 1995): 1243-47. <https://doi.org/10.1038/bjc.1995.240>.

Nagae M, Morita-Matsumoto K, Kato M, Kaneko MK, Kato Y, Yamaguchi Y. A platform of C-type lectin-like receptor CLEC-2 for binding O-glycosylated podoplanin and nonglycosylated rhodocytin. *Structure*. 2014;22(12):1711-1721. doi:10.1016/j.str.2014.09.009

Neri, Shinya, Genichiro Ishii, Hiroko Hashimoto, Takeshi Kuwata, Kanji Nagai, Hiroshi Date, et Atsushi Ochiai. « Podoplanin-Expressing Cancer-Associated Fibroblasts Lead and Enhance the Local Invasion of Cancer Cells in Lung Adenocarcinoma: PDPN-CAFs Lead and Enhance Cancer Cell Invasion ». *International Journal of Cancer* 137, n° 4 (15 août 2015): 784-96. <https://doi.org/10.1002/ijc.29464>.

Öhlund, Daniel, Abram Handly-Santana, Giulia Biffi, Ela Elyada, Ana S. Almeida, Mariano Ponz-Sarvisé, Vincenzo Corbo, et al. « Distinct Populations of Inflammatory Fibroblasts and Myofibroblasts in Pancreatic Cancer ». *Journal of Experimental Medicine* 214, n° 3 (6 mars 2017): 579-96. <https://doi.org/10.1084/jem.20162024>.

Onder, Lucas, et Burkhard Ludewig. « A Fresh View on Lymph Node Organogenesis ». *Trends in Immunology* 39, n° 10 (octobre 2018): 775-87. <https://doi.org/10.1016/j.it.2018.08.003>.

Olmeda D, Cerezo-Wallis D, Riveiro-Falkenbach E, et al. Whole-body imaging of lymphovascular niches identifies pre-metastatic roles of midkine. *Nature*. 2017;546(7660):676-680. doi:10.1038/nature22977

Orimo, Akira, Piyush B. Gupta, Dennis C. Sgroi, Fernando Arenzana-Seisdedos, Thierry Delaunay, Rizwan Naeem, Vincent J. Carey, Andrea L. Richardson, et Robert A. Weinberg. « Stromal Fibroblasts Present in Invasive Human Breast Carcinomas Promote Tumor Growth and Angiogenesis through Elevated SDF-1/CXCL12 Secretion ». *Cell* 121, n° 3 (mai 2005): 335-48. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.02.034>.

Paluncic, Jasmina, Zaklina Kovacevic, Patric J. Jansson, Danuta Kalinowski, Angelika M. Merlot, Michael L.-H. Huang, Hiu Chuen Lok, Sumit Sahni, Darius J.R. Lane, et Des R. Richardson. « Roads to Melanoma: Key Pathways and Emerging Players in Melanoma Progression and Oncogenic Signaling ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1863, n° 4 (avril 2016): 770-84. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2016.01.025>.

Pandya, Pahini, Jose L. Orgaz, et Victoria Sanz-Moreno. « Modes of Invasion during Tumour Dissemination ». *Molecular Oncology* 11, n° 1 (janvier 2017): 5-27. <https://doi.org/10.1002/1878-0261.12019>.

Pantaloni, D., T. L. Hill, M. F. Carlier, et E. D. Korn. « A Model for Actin Polymerization and the Kinetic Effects of ATP Hydrolysis. » *Proceedings of the National Academy of Sciences* 82, n° 21 (1 novembre 1985): 7207-11. <https://doi.org/10.1073/pnas.82.21.7207>.

Parekh K, Ramachandran S, Cooper J, Bigner D, Patterson A, Mohanakumar T (2005) Tenascin-C, over expressed in lung cancer down regulates effector functions of tumor infiltrating lymphocytes. *Lung Cancer* 47(1):17–29. doi:10.1016/j.lungcan.2004.05.016

Parfejevs, Vadims, Julien Debbache, Olga Shakhova, Simon M. Schaefer, Mareen Glausch, Michael Wegner, Ueli Suter, Una Riekstina, Sabine Werner, et Lukas Sommer. « Injury-Activated Glial Cells Promote Wound Healing of the Adult Skin in Mice ». *Nature Communications* 9, n° 1 (décembre 2018): 236. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-01488-2>.

Parmenter, T. J., M. Kleinschmidt, K. M. Kinross, S. T. Bond, J. Li, M. R. Kaadige, A. Rao, et al. « Response of BRAF-Mutant Melanoma to BRAF Inhibition Is Mediated by a Network of

Transcriptional Regulators of Glycolysis ». *Cancer Discovery* 4, n° 4 (1 avril 2014): 423-33. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-13-0440>.

Passarelli A, Mannavola F, Stucci LS, Tucci M, Silvestris F. Immune system and melanoma biology: a balance between immunosurveillance and immune escape. *Oncotarget*. 2017;8(62):106132-106142. Published 2017 Oct 31. doi:10.18632/oncotarget.22190

Paulitschke, V., Kunstfeld, R., et al., 2009. Entering a new era of rational biomarker discovery for early detection of melanoma metastases: secretome analysis of associated stroma cells. *J. Proteome Res.* 8 (5), 2501e2510.

Peinado, Héctor, Maša Alečković, Simon Lavotshkin, Irina Matei, Bruno Costa-Silva, Gema Moreno-Bueno, Marta Hergueta-Redondo, et al. « Melanoma Exosomes Educate Bone Marrow Progenitor Cells toward a Pro-Metastatic Phenotype through MET ». *Nature Medicine* 18, n° 6 (juin 2012): 883-91. <https://doi.org/10.1038/nm.2753>.

Pelon, F., Bourachot, B., Kieffer, Y. *et al.* Cancer-associated fibroblast heterogeneity in axillary lymph nodes drives metastases in breast cancer through complementary mechanisms. *Nat Commun* **11**, 404 (2020). <https://doi-org.proxy.insermbiblio.inist.fr/10.1038/s41467-019-14134-w>

Peranzoni, Elisa, Ana Rivas-Caicedo, Houcine Bougherara, Hélène Salmon, et Emmanuel Donnadieu. « Positive and Negative Influence of the Matrix Architecture on Antitumor Immune Surveillance ». *Cellular and Molecular Life Sciences* 70, n° 23 (décembre 2013): 4431-48. <https://doi.org/10.1007/s00018-013-1339-8>.

Pereira, Ethel R., Dmitriy Kedrin, Giorgio Seano, Olivia Gautier, Eelco F. J. Meijer, Dennis Jones, Shan-Min Chin, et al. « Lymph Node Metastases Can Invade Local Blood Vessels, Exit the Node, and Colonize Distant Organs in Mice ». *Science* 359, n° 6382 (23 mars 2018): 1403-7. <https://doi.org/10.1126/science.aal3622>.

Pezoldt, Joern, Maria Pasztoi, Mangge Zou, Carolin Wiechers, Michael Beckstette, Guilhem R. Thierry, Ehsan Vafadarnejad, et al. « Neonatally Imprinted Stromal Cell Subsets Induce

Tolerogenic Dendritic Cells in Mesenteric Lymph Nodes ». *Nature Communications* 9, n° 1 (décembre 2018): 3903. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-06423-7>.

Pizarro, Á. « Models of Melanoma Spread and Final Results of the Multicenter Selective Lymphadenectomy Trial-I ». *Actas Dermo-Sifiliográficas (English Edition)* 106, n° 2 (mars 2015): 82-85.

<https://doi.org/10.1016/j.adengl.2014.12.001>.

Pocza, Peter, Helga Süli-Vargha, Zsuzsa Darvas, et Andras Falus. « Locally Generated VGVAPG and VAPG Elastin-Derived Peptides Amplify Melanoma Invasion via the Galectin-3 Receptor ». *International Journal of Cancer* 122, n° 9 (12 décembre 2007): 1972-80. <https://doi.org/10.1002/ijc.23296>.

Pritchard-Jones, R O, D B A Dunn, Y Qiu, A H R Varey, A Orlando, H Rigby, S J Harper, et D O Bates. « Expression of VEGFxxx, the Inhibitory Isoforms of VEGF, in Malignant Melanoma ». *British Journal of Cancer* 97, n° 2 (juillet 2007): 223-30. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6603839>.

Quail DF, Joyce JA. Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. *Nat Med.* 2013;19(11):1423-1437. doi:10.1038/nm.3394

Quante, Michael, Shui Ping Tu, Hiroyuki Tomita, Tamas Gonda, Sophie S.W. Wang, Shigeo Takashi, Gwang Ho Baik, et al. « Bone Marrow-Derived Myofibroblasts Contribute to the Mesenchymal Stem Cell Niche and Promote Tumor Growth ». *Cancer Cell* 19, n° 2 (février 2011): 257-72. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2011.01.020>.

Radisky, Derek, Carmen Hagios, et Mina J Bissell. « Tumors Are Unique Organs Defined by Abnormal Signaling and Context ». *Seminars in Cancer Biology* 11, n° 2 (avril 2001): 87-95. <https://doi.org/10.1006/scbi.2000.0360>.

Rambow, Florian, Aljosja Rogiers, Oskar Marin-Bejar, Sara Aibar, Julia Femel, Michael Dewaele, Panagiotis Karras, et al. « Toward Minimal Residual Disease-Directed Therapy in

Melanoma ». *Cell* 174, n° 4 (août 2018): 843-855.e19. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.06.025>.

Rayes, J., Lax, S., Wichaiyo, S. et al. The podoplanin-CLEC-2 axis inhibits inflammation in sepsis. *Nat Commun* 8, 2239 (2017). <https://doi-org.proxy.insermbiblio.inist.fr/10.1038/s41467-017-02402-6>

Rayment, I, H. Holden, M Whittaker, C. Yohn, M Lorenz, K. Holmes, et R. Milligan. « Structure of the Actin-Myosin Complex and Its Implications for Muscle Contraction ». *Science* 261, n° 5117 (2 juillet 1993): 58-65. <https://doi.org/10.1126/science.8316858>.

Raz, Yael, Noam Cohen, Ophir Shani, Rachel E. Bell, Sergey V. Novitskiy, Lilach Abramovitz, Carmit Levy, et al. « Bone Marrow–Derived Fibroblasts Are a Functionally Distinct Stromal Cell Population in Breast Cancer ». *Journal of Experimental Medicine* 215, n° 12 (3 décembre 2018): 3075-93. <https://doi.org/10.1084/jem.20180818>.

Reid, Anna L., James B. Freeman, Michael Millward, Melanie Ziman, et Elin S. Gray. « Detection of BRAF-V600E and V600K in Melanoma Circulating Tumour Cells by Droplet Digital PCR ». *Clinical Biochemistry* 48, n° 15 (octobre 2015): 999-1002. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2014.12.007>.

Ribatti, D., Mangialardi, G., & Vacca, A. (2006). *Stephen Paget and the “seed and soil” theory of metastatic dissemination. Clinical and Experimental Medicine*, 6(4), 145–149.

Riesenberg, Stefanie, Angela Groetchen, Robert Siddaway, Tobias Bald, Julia Reinhardt, Denise Smorra, Judith Kohlmeyer, et al. « MITF and C-Jun Antagonism Interconnects Melanoma Dedifferentiation with pro-Inflammatory Cytokine Responsiveness and Myeloid Cell Recruitment ». *Nature Communications* 6, n° 1 (décembre 2015): 8755. <https://doi.org/10.1038/ncomms9755>.

Robert, Caroline, Boguslawa Karaszewska, Jacob Schachter, Piotr Rutkowski, Andrzej Mackiewicz, Daniil Stroiakovski, Michael Lichinitser, et al. « Improved Overall Survival in

Melanoma with Combined Dabrafenib and Trametinib ». *New England Journal of Medicine* 372, n° 1 (1 janvier 2015): 30-39. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1412690>.

Robert, Guillaume, Cédric Gaggioli, Olivier Bailet, Carine Chavey, Patricia Abbe, Edith Aberdam, Emilie Sabatié, et al. « SPARC Represses E-Cadherin and Induces Mesenchymal Transition during Melanoma Development ». *Cancer Research* 66, n° 15 (1 août 2006): 7516-23. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-3189>.

Rosenberg, S. A., J. C. Yang, R. M. Sherry, U. S. Kammula, M. S. Hughes, G. Q. Phan, D. E. Citrin, et al. « Durable Complete Responses in Heavily Pretreated Patients with Metastatic Melanoma Using T-Cell Transfer Immunotherapy ». *Clinical Cancer Research* 17, n° 13 (1 juillet 2011): 4550-57. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-11-0116>.

Rybak, Jascha-N., Christoph Roesli, Manuela Kaspar, Alessandra Villa, et Dario Neri. « The Extra-Domain A of Fibronectin Is a Vascular Marker of Solid Tumors and Metastases ». *Cancer Research* 67, n° 22 (15 novembre 2007): 10948-57. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-1436>.

Sahai, Erik, Igor Atsaturrov, Edna Cukierman, David G. DeNardo, Mikala Egeblad, Ronald M. Evans, Douglas Fearon, et al. « A Framework for Advancing Our Understanding of Cancer-Associated Fibroblasts ». *Nature Reviews Cancer* 20, n° 3 (mars 2020): 174-86. <https://doi.org/10.1038/s41568-019-0238-1>.

Salmon H, Donnadiou E. La matrice extracellulaire - Un obstacle au contact entre lymphocytes T et cellules tumorales [The extracellular matrix: an obstacle to T cell-tumor cell interaction]. *Med Sci (Paris)*. 2012;28(10):824-826. doi:10.1051/medsci/20122810009

Samuel, Michael S., Jose I. Lopez, Ewan J. McGhee, Daniel R. Croft, David Strachan, Paul Timpson, June Munro, et al. « Actomyosin-Mediated Cellular Tension Drives Increased Tissue Stiffness and β -Catenin Activation to Induce Epidermal Hyperplasia and Tumor Growth ». *Cancer Cell* 19, n° 6 (juin 2011): 776-91. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2011.05.008>.

Sanborn, J. Zachary, Jongsuk Chung, Elizabeth Purdom, Nicholas J. Wang, Hojabr Kakavand, James S. Wilmott, Timothy Butler, et al. « Phylogenetic Analyses of Melanoma Reveal Complex Patterns of Metastatic Dissemination ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 112, n° 35 (1 septembre 2015): 10995-0. <https://doi.org/10.1073/pnas.1508074112>.

Sanz-Moreno, Victoria, Cedric Gaggioli, Maggie Yeo, Jean Albregues, Fredrik Wallberg, Amaya Viros, Steven Hooper, et al. « ROCK and JAK1 Signaling Cooperate to Control Actomyosin Contractility in Tumor Cells and Stroma ». *Cancer Cell* 20, n° 2 (août 2011): 229-45. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2011.06.018>.

Sautès-Fridman C, Lawand M, Giraldo NA, et al. Tertiary Lymphoid Structures in Cancers: Prognostic Value, Regulation, and Manipulation for Therapeutic Intervention. *Front Immunol.* 2016;7:407. Published 2016 Oct 3. doi:10.3389/fimmu.2016.00407

Scandella E, Bolinger B, Lattmann E, et al. Restoration of lymphoid organ integrity through the interaction of lymphoid tissue-inducer cells with stroma of the T cell zone. *Nat Immunol.* 2008;9(6):667-675. doi:10.1038/ni.1605

Schadendorf, Dirk, Alexander C J van Akkooi, Carola Berking, Klaus G Griewank, Ralf Gutzmer, Axel Hauschild, Andreas Stang, Alexander Roesch, et Selma Ugurel. « Melanoma ». *The Lancet* 392, n° 10151 (septembre 2018): 971-84. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)31559-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)31559-9).

Schadendorf, Dirk, David E. Fisher, Claus Garbe, Jeffrey E. Gershenwald, Jean-Jacques Grob, Allan Halpern, Meenhard Herlyn, et al. « Melanoma ». *Nature Reviews Disease Primers* 1, n° 1 (décembre 2015): 15003. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2015.3>.

Schaeuble, Karin, Hélène Cannelle, Stéphanie Favre, Hsin-Ying Huang, Susanne G. Oberle, Daniel E. Speiser, Dietmar Zehn, et Sanjiv A. Luther. « Attenuation of Chronic Antiviral T-Cell Responses through Constitutive COX2-Dependent Prostanoid Synthesis by Lymph Node Fibroblasts ». Édité par Avinash Bhandoola. *PLOS Biology* 17, n° 7 (15 juillet 2019): e3000072. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000072>.

Schepsky, Alexander, Katja Bruser, Gunnar J. Gunnarsson, Jane Goodall, Jón H. Hallsson, Colin R. Goding, Eirikur Steingrímsson, et Andreas Hecht. « The Microphthalmia-Associated Transcription Factor Mitf Interacts with β -Catenin To Determine Target Gene Expression ». *Molecular and Cellular Biology* 26, n° 23 (1 décembre 2006): 8914-27. <https://doi.org/10.1128/MCB.02299-05>.

Schiller, Martin R. « Coupling Receptor Tyrosine Kinases to Rho GTPases—GEFs What's the Link ». *Cellular Signalling* 18, n° 11 (novembre 2006): 1834-43. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2006.01.022>.

Schutyser, Evemie, Yingjun Su, Yingchun Yu, Mieke Gouwy, Snjezana Zaja, Jo van Damme, et Ann Richmond. « Hypoxia Enhances CXCR4 Expression in Human Microvascular Endothelial Cells and Human Melanoma Cells », 2009, 23.

Seftor, Richard E B, Elisabeth A Seftor, Naohiko Koshikawa, Paul S Meltzer, Lynn M G Gardner, Martin Bilban, William G Stetler-Stevenson, Vito Quaranta, et Mary J C Hendrix. « Cooperative Interactions of Laminin 5 α 2 Chain, Matrix Metalloproteinase-2, and Membrane Type-1-Matrix/Metalloproteinase Are Required for Mimicry of Embryonic Vasculogenesis by Aggressive Melanoma », s. d., 6.

Shain, A. Hunter, et Boris C. Bastian. « From Melanocytes to Melanomas ». *Nature Reviews Cancer* 16, n° 6 (juin 2016): 345-58. <https://doi.org/10.1038/nrc.2016.37>.

Shankaran, Vijay, Hiroaki Ikeda, Allen T Bruce, J Michael, Paul E Swanson, et Lloyd J Old. « Pillars Article: IFN γ and Lymphocytes Prevent Primary Tumour Development and Shape Tumour Immunogenicity. *Nature*. 2001. 410: 1107–1111 », s. d., 6.

Shao, Hanshuang, John M Kirkwood, et Alan Wells. « Tenascin-C Signaling in Melanoma ». *Cell Adhesion & Migration* 9, n° 1-2 (2 janvier 2015): 125-30. <https://doi.org/10.4161/19336918.2014.972781>.

Sharma, Padmanee, Siwen Hu-Lieskovan, Jennifer A. Wargo, et Antoni Ribas. « Primary, Adaptive, and Acquired Resistance to Cancer Immunotherapy ». *Cell* 168, n° 4 (février 2017): 707-23. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.01.017>.

Schenkel JM, Masopust D. Tissue-resident memory T cells. *Immunity*. 2014;41(6):886-897. doi:10.1016/j.immuni.2014.12.007

Shiga, Kazuyoshi, Masayasu Hara, Takaya Nagasaki, Takafumi Sato, Hiroki Takahashi, et Hiromitsu Takeyama. « Cancer-Associated Fibroblasts: Their Characteristics and Their Roles in Tumor Growth ». *Cancers* 7, n° 4 (11 décembre 2015): 2443-58. <https://doi.org/10.3390/cancers7040902>.

Singer, Christian F., Nicole Kronsteiner, Erika Marton, Marion Kubista, Kevin J. Cullen, Kora Hirtenlehner, Michael Seifert, et Ernst Kubista. « MMP-2 and MMP-9 Expression in Breast Cancer-Derived Human Fibroblasts Is Differentially Regulated by Stromal-Epithelial Interactions ». *Breast Cancer Research and Treatment* 72, n° 1 (mars 2002): 69-77. <https://doi.org/10.1023/A:1014918512569>.

Siegert S, Huang HY, Yang CY, et al. Fibroblastic reticular cells from lymph nodes attenuate T cell expansion by producing nitric oxide. *PLoS One*. 2011;6(11):e27618. doi:10.1371/journal.pone.0027618

Sixt, Michael, Nobuo Kanazawa, Manuel Selg, Thomas Samson, Gunnel Roos, Dieter P. Reinhardt, Reinhard Pabst, Manfred B. Lutz, et Lydia Sorokin. « The Conduit System Transports Soluble Antigens from the Afferent Lymph to Resident Dendritic Cells in the T Cell Area of the Lymph Node ». *Immunity* 22, n° 1 (janvier 2005): 19-29. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2004.11.013>.

Skobe, Mihaela, et Michael Detmar. « Structure, Function, and Molecular Control of the Skin Lymphatic System ». *Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings* 5, n° 1 (décembre 2000): 14-19. <https://doi.org/10.1046/j.1087-0024.2000.00001.x>.

Spranger, Stefani, Riyue Bao, et Thomas F. Gajewski. « Melanoma-Intrinsic β -Catenin Signalling Prevents Anti-Tumour Immunity ». *Nature* 523, n° 7559 (juillet 2015): 231-35. <https://doi.org/10.1038/nature14404>.

Straussman, Ravid, Teppei Morikawa, Kevin Shee, Michal Barzily-Rokni, Zhi Rong Qian, Jinyan Du, Ashli Davis, et al. « Tumour Micro-Environment Elicits Innate Resistance to RAF Inhibitors through HGF Secretion ». *Nature* 487, n° 7408 (juillet 2012): 500-504. <https://doi.org/10.1038/nature11183>.

Streeter, P R, B T Rouse, et E C Butcher. « Immunohistologic and Functional Characterization of a Vascular Addressin Involved in Lymphocyte Homing into Peripheral Lymph Nodes. » *Journal of Cell Biology* 107, n° 5 (1 novembre 1988): 1853-62. <https://doi.org/10.1083/jcb.107.5.1853>.

Su, Shicheng, Jianing Chen, Herui Yao, Jiang Liu, Shubin Yu, Liyan Lao, Minghui Wang, et al. « CD10+GPR77+ Cancer-Associated Fibroblasts Promote Cancer Formation and Chemoresistance by Sustaining Cancer Stemness ». *Cell* 172, n° 4 (février 2018): 841-856.e16. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.01.009>.

Sung, Jung Hwan, Han Zhang, E. Ashley Moseman, David Alvarez, Matteo Iannaccone, Sarah E. Henrickson, Juan C. de la Torre, Joanna R. Groom, Andrew D. Luster, et Ulrich H. von Andrian. « Chemokine Guidance of Central Memory T Cells Is Critical for Antiviral Recall Responses in Lymph Nodes ». *Cell* 150, n° 6 (septembre 2012): 1249-63. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.08.015>.

Takeuchi, H. « CCL21 Chemokine Regulates Chemokine Receptor CCR7 Bearing Malignant Melanoma Cells ». *Clinical Cancer Research* 10, n° 7 (1 avril 2004): 2351-58. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-03-0195>.

Tejera-Vaquerizo, A., M.V. Barrera-Vigo, I. Fernández-Canedo, N. Blázquez-Sánchez, M. Mendiola-Fernández, A. Fernández-Orland, R. Bosch-García, M. de Troya-Martín, et E. Herrera-Ceballos. « Longitudinal Study of Different Metastatic Patterns in the Progression of Cutaneous Melanoma ». *Actas Dermo-Sifiliográficas (English Edition)* 98, n° 8 (janvier 2007): 531-38. [https://doi.org/10.1016/S1578-2190\(07\)70508-5](https://doi.org/10.1016/S1578-2190(07)70508-5).

Teng, Michele W.L., Shin Foong Ngiow, Antoni Ribas, et Mark J. Smyth. « Classifying Cancers Based on T-Cell Infiltration and PD-L1 ». *Cancer Research* 75, n° 11 (1 juin 2015): 2139-45. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-15-0255>.

Thulabandu, Venkata, Demeng Chen, et Radhika P. Atit. « Dermal Fibroblast in Cutaneous Development and Healing: Dermal Fibroblast in Cutaneous Development and Healing ». *Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology* 7, n° 2 (mars 2018): e307. <https://doi.org/10.1002/wdev.307>.

Tichet, Mélanie, Virginie Prod'Homme, Nina Fenouille, Damien Ambrosetti, Aude Mallavialle, Michael Cerezo, Mickaël Ohanna, et al. « Tumour-Derived SPARC Drives Vascular Permeability and Extravasation through Endothelial VCAM1 Signalling to Promote Metastasis ». *Nature Communications* 6, n° 1 (novembre 2015): 6993. <https://doi.org/10.1038/ncomms7993>.

Tirosh, I., B. Izar, S. M. Prakadan, M. H. Wadsworth, D. Treacy, J. J. Trombetta, A. Rotem, et al. « Dissecting the Multicellular Ecosystem of Metastatic Melanoma by Single-Cell RNA-Seq ». *Science* 352, n° 6282 (8 avril 2016): 189-96. <https://doi.org/10.1126/science.aad0501>.

Toccanier-Pelte, Marie-Francoise, Omar Skalli, Yusuf Kapanci, et Giulio Gabbiani. « Characterization of Stromal Cells With Myoid Features in Lymph Nodes and Spleen in Normal and Pathologic Conditions » 129 (s. d.): 10.

Tomasek, James J., Giulio Gabbiani, Boris Hinz, Christine Chaponnier, et Robert A. Brown. « Myofibroblasts and Mechano-Regulation of Connective Tissue Remodelling ». *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 3, n° 5 (mai 2002): 349-63. <https://doi.org/10.1038/nrm809>.

Tomura, M., N. Yoshida, J. Tanaka, S. Karasawa, Y. Miwa, A. Miyawaki, et O. Kanagawa. « Monitoring Cellular Movement in Vivo with Photoconvertible Fluorescence Protein "Kaede" Transgenic Mice ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105, n° 31 (5 août 2008): 10871-76. <https://doi.org/10.1073/pnas.0802278105>.

Tsoi, Jennifer, Lidia Robert, Kim Paraiso, Carlos Galvan, Katherine M. Sheu, Johnson Lay, Deborah J.L. Wong, et al. « Multi-Stage Differentiation Defines Melanoma Subtypes with Differential Vulnerability to Drug-Induced Iron-Dependent Oxidative Stress ». *Cancer Cell* 33, n° 5 (mai 2018): 890-904.e5. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2018.03.017>.

Turley SJ, Fletcher AL, Elpek KG. The stromal and haematopoietic antigen-presenting cells that reside in secondary lymphoid organs. *Nat Rev Immunol*. 2010;10(12):813-825. doi:10.1038/nri2886

Vajdic, Claire M., et Marina T. van Leeuwen. « Cancer Incidence and Risk Factors after Solid Organ Transplantation ». *International Journal of Cancer* 125, n° 8 (15 octobre 2009): 1747-54. <https://doi.org/10.1002/ijc.24439>.

Verfaillie, Annelien, Hana Imrichova, Zeynep Kalender Atak, Michael Dewaele, Florian Rambow, Gert Hulselmans, Valerie Christiaens, et al. « Decoding the Regulatory Landscape of Melanoma Reveals TEADS as Regulators of the Invasive Cell State ». *Nature Communications* 6, n° 1 (mai 2015): 6683. <https://doi.org/10.1038/ncomms7683>.

Vernez, M, et D Hohl. « Diagnostic histopathologique du mélanome primaire en 2011, et après ? » *Revue Médicale Suisse*, 2011, 6.

Vihinen, Pia P., Johanna Hilli, Meri-Sisko Vuoristo, Kari J. Syrjänen, Veli-Matti Kähäri, et Seppo O. Pyrhönen. « Serum VEGF-C Is Associated with Metastatic Site in Patients with Malignant Melanoma ». *Acta Oncologica* 46, n° 5 (janvier 2007): 678-84. <https://doi.org/10.1080/02841860600965020>.

Wan, Paul T.C, Mathew J Garnett, S.Mark Roe, Sharlene Lee, Dan Niculescu-Duvaz, Valerie M Good, Cancer Genome Project, et al. « Mechanism of Activation of the RAF-ERK Signaling Pathway by Oncogenic Mutations of B-RAF ». *Cell* 116, n° 6 (mars 2004): 855-67. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(04\)00215-6](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(04)00215-6).

Weber, Jeffrey, Mario Mandala, Michele Del Vecchio, Helen J. Gogas, Ana M. Arance, C. Lance Cowey, Stéphane Dalle, et al. « Adjuvant Nivolumab versus Ipilimumab in Resected

Stage III or IV Melanoma ». *New England Journal of Medicine* 377, n° 19 (9 novembre 2017): 1824-35. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1709030>.

Weber, Jeffrey S, Sandra P D'Angelo, David Minor, F Stephen Hodi, Ralf Gutzmer, Bart Neyns, Christoph Hoeller, et al. « 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, n° 4 (avril 2015): 375-84. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(15\)70076-8](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(15)70076-8).

Weeraratna, Ashani T., Yuan Jiang, Galen Hostetter, Kevin Rosenblatt, Paul Duray, Michael Bittner, et Jeffrey M. Trent. « Wnt5a Signaling Directly Affects Cell Motility and Invasion of Metastatic Melanoma ». *Cancer Cell* 1, n° 3 (avril 2002): 279-88. [https://doi.org/10.1016/S1535-6108\(02\)00045-4](https://doi.org/10.1016/S1535-6108(02)00045-4).

Wen, Chuan, Robert C. Seeger, Muller Fabbri, Larry Wang, Alan S. Wayne, et Ambrose Y. Jong. « Biological Roles and Potential Applications of Immune Cell-Derived Extracellular Vesicles ». *Journal of Extracellular Vesicles* 6, n° 1 (décembre 2017): 1400370. <https://doi.org/10.1080/20013078.2017.1400370>.

Willard-Mack, Cynthia L. « Normal Structure, Function, and Histology of Lymph Nodes ». *Toxicologic Pathology* 34, n° 5 (août 2006): 409-24. <https://doi.org/10.1080/01926230600867727>.

Wolchok, Jedd D., Vanna Chiarion-Sileni, Rene Gonzalez, Piotr Rutkowski, Jean-Jacques Grob, C. Lance Cowey, Christopher D. Lao, et al. « Overall Survival with Combined Nivolumab and Ipilimumab in Advanced Melanoma ». *New England Journal of Medicine* 377, n° 14 (5 octobre 2017): 1345-56. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1709684>.

Zbytek, Blazej, J Andrew Carlson, Jacqueline Granese, Jeffrey Ross, Martin Mihm, et Andrzej Slominski. « Current Concepts of Metastasis in Melanoma ». *Expert Review of Dermatology* 3, n° 5 (octobre 2008): 569-85. <https://doi.org/10.1586/17469872.3.5.569>.

Zeisberg, E. M., S. Potenta, L. Xie, M. Zeisberg, et R. Kalluri. « Discovery of Endothelial to Mesenchymal Transition as a Source for Carcinoma-Associated Fibroblasts ». *Cancer Research* 67, n° 21 (1 novembre 2007): 10123-28. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-3127>.

Zhang, Haiying, Daniela Freitas, Han Sang Kim, Kristina Fabijanic, Zhong Li, Haiyan Chen, Milica Tesic Mark, et al. « Identification of Distinct Nanoparticles and Subsets of Extracellular Vesicles by Asymmetric Flow Field-Flow Fractionation ». *Nature Cell Biology* 20, n° 3 (mars 2018): 332-43. <https://doi.org/10.1038/s41556-018-0040-4>.

Zigmond, Sally H. « Formin-Induced Nucleation of Actin Filaments ». *Current Opinion in Cell Biology* 16, n° 1 (février 2004): 99-105. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2003.10.019>.

Annexes

ANNEXE 1 : Publication en premier auteur *soumise*

ANNEXE 2 : Publication en révision (4^{ème} auteur)

Invasive dedifferentiated melanoma cells inhibit JAK1-STAT3-driven actomyosin contractility of human fibroblastic reticular cells of the lymph node

Christopher Rovera^{1,2}, Ilona Berestjuk^{1,2}, Serena Diazzi^{1,2}, Margaux Lecacheur^{1,2}, Aude Mallavialle^{1,2}, Christophe Girard^{1,2}, Jean Albregues³, Marcel Deckert^{1,2}, Sophie Tartare-Deckert^{1,2*}, Virginie Prod'homme^{1,2*}

¹Université Côte d'Azur, Inserm, C3M, Nice, France

²Equipe labellisée Ligue Contre le Cancer 2016, Nice, France

³Université Côte d'Azur, CNRS, Inserm, IRCAN, Nice, France

*Co-last authors

Running title: Invasive melanomas modulate lymph node fibroblast contractile properties

Corresponding Authors:

Virginie Prod'homme, Inserm UMR1065/C3M, 151 Route de Ginestière BP2 3194, F-06204 Nice cedex 3 France. Phone: 33 489 064313; email: prodhomme@unice.fr

Sophie Tartare-Deckert, Inserm UMR1065/C3M, 151 Route de Ginestière BP2 3194, F-06204 Nice cedex 3 France. Phone: 33 489 064310; email: tartare@unice.fr

Conflict of interest: The authors declare no potential conflicts of interest.

Abstract

Fibroblastic reticular cells (FRCs) are immunologically specialized myofibroblasts of the lymph node (LN) controlling the size and microarchitecture of the lymphoid organ, partly through their contractile properties. LN swelling is a hallmark of tumor-draining LN in lymphophilic cancers such as cutaneous melanoma, a very aggressive and heterogeneous tumor with high risk of early metastasis. Melanoma cells can dynamically shift between proliferative melanocytic phenotypes and invasive dedifferentiated phenotypes, which are characterized by distinct transcriptional signatures. Secretion of multiple factors by tumor cells, such as extracellular vesicles (EVs), soluble growth factors or proinflammatory cytokines promotes LN stroma remodeling and metastatic spreading. But how FRCs integrate these pro-metastatic signals and modulate their contractile functions remains poorly characterized. Here, we show that factors secreted by invasive melanoma cells, but not by proliferative cells, strongly inhibit FRC actomyosin-dependent contractile forces by decreasing the activity of the RHOA-RHO-kinase (ROCK) pathway and of the mechano-responsive transcriptional co-activator YAP, leading to a decrease in F-actin stress fibers and cell elongation. Transcriptional profiling and biochemical analyses indicate that FRCs actomyosin cytoskeleton relaxation is driven by inhibition of JAK1 and its downstream transcription factor STAT3 and is associated with increased FRCs proliferation and activation. Interestingly, invasive melanoma cells reduce FRC contractility in vitro independently of EVs secretion. These data show that FRCs are specifically modulated by proteins secreted by invasive dedifferentiated melanoma cells and suggest that melanoma-derived cues could modulate the biomechanical properties of distant LN before metastatic invasion. They also highlight that JAK1-STAT3 and YAP signaling pathways contribute to the maintenance of the resting potential of spontaneous contractile human FRCs.

Introduction

Melanoma is a very aggressive skin cancer due to its high propensity to metastasis and cellular plasticity. Melanomas comprise phenotypically and functionally heterogeneous cancer cells. Melanoma cells are highly plastic and during metastatic progression they are able to dynamically shift between different phenotypic behaviors. These phenotypes are defined by distinct transcriptional profiles, which relate to different differentiation states ranging from a proliferative melanocytic to a mesenchymal invasive dedifferentiated phenotype (1-5). The proliferative state is characterized by high expression of the melanocyte lineage-specific transcription factor MITF and low expression of the tyrosine kinase receptor AXL, whereas the invasive state show low expression of MITF and high expression of AXL. Melanoma cells harboring the invasive MITF^{low} AXL^{high} signature display a mesenchymal and mechanical phenotype associated with intrinsic drug resistance (6-8). Whether the proliferative and invasive melanoma cell phenotypes differ in their ability to communicate with the metastatic stromal host niche remains poorly understood.

Cutaneous melanoma is a cancer with an inherent potential for lymph node (LN) colonization, an event that has been shown to contribute to systemic metastasis (9,10). Melanoma cells secrete extracellular vesicles (EVs) (11,12) and soluble factors (13) migrating to the pre-metastatic LN and conditioning immune cells (14), lymphatic endothelial cells (13,15) and fibroblastic reticular cells (FRCs) (16). This reprogramming of the LN microenvironment creates a favorable niche to support metastatic growth and development (17).

FRCs are immunospecialized myofibroblasts of lymphoid organs. They express podoplanin (PDPN, also known as GP38), but not the endothelial CD31 marker (also known as PECAM1). Several subsets have been identified by single cell RNA sequencing (18,19). FRCs form a network in close contact with T cells and dendritic cells (DCs) in the LN paracortical area and regulate immune cell recruitment, survival and activation (20). With a notable spontaneous contractibility (21-23) and the secretion and remodeling of a dense reticular network of conduits (23-25), FRCs control the elasticity and the microarchitecture of the LN. PDPN was shown to drive the actomyosin contractility of FRCs through the binding of proteins from the ezrin, radixin and moesin (ERM) family, leading to the activation of RHOA (21,22,26,27).

During an immune response, migratory DCs with high expression of C-type lectin-like receptor 2 (CLEC2) are recruited to the LN. CLEC2 binding to PDPN on FRCs dismantles the PDPN-ERM interaction, inhibiting actomyosin contractility and resulting in FRC stretching allowing rapid LN expansion (21,22).

In other tissues, like the skin, quiescent fibroblasts are not spontaneously contractile but are activated to myofibroblasts by factors secreted during wound healing or tumor progression, such as TGF- β and IL-6 family cytokines (28). Factors secreted by tumor cells transform fibroblasts in the tumor vicinity to cancer associated fibroblasts (CAFs) (29). CAFs are characterized by a contractile phenotype and the high expression of markers like α -smooth muscle actin (α -SMA, also known as ACTA2), platelet derived growth factor receptor- α (PDGFR- α) and PDGFR- β , fibroblast activation protein α (FAP), fibroblast-specific protein-1 (FSP1, also known as S100A4), fibronectin (FN) and an isoform of FN containing the EDA domain (EDA-FN), vimentin (VIM) or secreted protein acidic and cysteine rich (SPARC) (29). In CAFs, actomyosin contractility is generated by RHO and RHO-kinase (ROCK) signaling, leading to increased phosphorylation of the myosin light-chain 2 (MLC2) (30), and by the activation of the mechano-responsive transcriptional co-activator yes-activated protein (YAP) (31,32). Cytokines from the IL6 family (IL6, LIF, OSM) have been shown to induce RHO-ROCK-dependent CAF contractility through the GP130-JAK1-STAT3 pathway (33,34). TGF- β increases actomyosin contractility in fibroblasts by promoting LIF expression, which subsequently epigenetically activates JAK-STAT signaling (35). Actomyosin contraction in CAFs is associated with cell shape remodeling, increased F-actin stress fibers and drives force-mediated matrix remodeling (30,31).

Malignant LN colonization is preceded by pre-metastatic LN swelling (15,16), but it remains incompletely understood whether (and how) tumor-derived cues alter FRCs specific contractile properties during pre-metastatic LN reprogramming. In this study, we characterized the modulation of the actomyosin contractility of isolated human FRCs treated with factors secreted by proliferative or invasive melanoma cells and investigated the underlying signaling pathways and the nature of the tumoral factor(s) responsible.

Results

Lymph node fibroblasts harbor a CAF-like phenotype associated with spontaneous cell contraction

To investigate the interactions between melanoma cells and FRCs, we used primary fibroblasts isolated from human LNs. Because several mesenchymal subsets have been described in the LN (19,23), we performed a characterization of LN fibroblasts (LN-F) used in our study using microarray profiling, qRT-PCR and flow cytometry analysis (**Fig. S1**). We found that genes expressed by LN-F were typical of FRCs (PECAM1⁻ / PDPN⁺ / CR2⁻ / MADCAM1⁻), the most abundant mesenchymal subset. Flow cytometry analysis validated in LN-F the PDPN⁺CD31⁻CD35⁻ FRCs identity markers. In accordance with other studies performed on cultured human FRCs, we noticed that the FRC-specific chemokines CCL19 and CCL21 were poorly expressed in LN-F (36,37) (**Fig. S1**).

LN FRCs are specialized myofibroblasts with spontaneous contractile properties (21-23). Indeed, when embedded in a collagen-based three-dimensional (3D) matrix, LN-F isolated from 4 different donors all demonstrated basal force-mediated matrix remodeling, driven by the ROCK-actomyosin pathway and inhibited by the ROCK inhibitor Y-27632 (**Fig. 1A**). LN-F displayed the same high propensity to drive 3D collagen matrix remodeling than primary CAFs isolated from skin or LN melanomas (**Fig. 1B**). However, primary skin fibroblasts (skin-F) were not able to contract the 3D collagen matrix unless activated to a CAF-like phenotype with TGF- β . LN-F spontaneous contraction was not modulated by TGF- β , but the contractile properties of LN-F, TGF- β -activated skin-F and CAFs were all dependent of the ROCK-actomyosin pathway and inhibited by the ROCK inhibitor Y-27632. In CAFs, contractile activity was associated with formation of F-actin stress fibers and YAP re-localization to the nucleus (31). In agreement with the 3D matrix remodeling results, LN-F had enhanced basal levels of F-actin stress fibers and YAP nuclear localization than skin-F (**Fig. 1C, D**). In contrast to TGF- β -activated skin-F, F-actin stress fibers and YAP nuclear localization were not increased by TGF- β treatment in LN-F. qRT-PCR analysis revealed that expression of several CAF markers like *ACTA2* (α -SMA),

FAP, *EDA-FN* or *SPARC* was much higher in LN-F compared to skin-F, suggesting that resting FRCs share many properties with CAFs (**Fig. 1E**). Immunoblot analysis also showed TGF- β -independent high expression of FN, PDGFR- β , FAP and α -SMA in resting LN-F, to levels equivalent or higher to TGF- β -activated skin-F (**Fig. 1F**). This is consistent with the notion that high α -SMA expression was associated with fibroblast contractility (38). Collectively, these results validate the FRC signature of LN-F and reveal that quiescent LN-F display some phenotypic and functional properties of CAFs. Our aim was then to investigate whether, and how, melanoma cells modulate fibroblast contractile properties of the LN metastatic niche.

Factors secreted by invasive dedifferentiated melanoma cells with a MITF^{low} AXL^{high} signature inhibit LN-F contraction

To recapitulate the melanoma distant reprogramming of FRCs in the pre-metastatic LN, we treated LN-F with conditioned medium (CM) harvested from several melanoma cell line cultures. This CM contained all the factors secreted by melanoma cells. We used 3D collagen matrix assays to assess the effect of melanoma CM on LN-F cell contraction. Factors secreted by tumor cells, like TGF- β , are known to induce fibroblast actomyosin contraction, as during CAF differentiation. Strikingly, we observed that CM secreted by a set of melanoma cell lines (1205Lu, WM793, WM2032, SBCI2) drastically inhibited LN-F spontaneous contraction, while another set (501Mel, MeWo, SK-MEL-28, WM164) showed have any effect (**Fig. 2A**).

Melanoma cells are highly plastic, harboring phenotypes going from proliferative-melanocytic, with MITF^{high} AXL^{low} expression, to invasive-dedifferentiated with MITF^{low} AXL^{high} expression (1-5). This prompted us to analyze the ability of these two subsets of melanoma cell populations to modulate LN-F contractile function. We analyzed MITF and AXL gene expression levels in the different melanoma cell lines by qRT-PCR and discovered that all melanoma cell lines inhibiting LN-F contraction had an invasive-dedifferentiated MITF^{low} AXL^{high} signature (**Fig S2A**). We confirmed our observation with short-term patient melanoma cultures as we observed that CM from the invasive MNC1, MM029 and MM099 melanomas inhibited LN-F cell contraction, but not the CM from the proliferative MM074 melanoma cells (**Fig. 2B**

and S2B). Our results demonstrate that the ability to modulate LN-F contraction is part of the invasive signature of melanoma cells.

To get a more comprehensive view of the effect of factors secreted by invasive and proliferative melanomas on LN-F reprogramming, we carried out the study with two representative melanoma cell lines displaying the proliferative MITF^{high} AXL^{low} phenotype (501Mel) or the invasive-dedifferentiated MITF^{low} AXL^{high} phenotype (1205Lu). During a LN immune response, FRC activation is associated with proliferation, up-regulation of PDPN and other markers of fibroblast activation, and disruption of the RHOA-ROCK-mediated actomyosin cytoskeleton contraction due to the interaction of PDPN with CLEC2 (21,22,39). Similarly, 1205Lu-derived CM (1205Lu CM) stimulated the proliferation of LN-F (**Fig. 2C**) and increased the surface expression of PDPN observed by flow cytometry whereas 501Mel CM had no effect (**Fig. 2D**). The gene expression of several markers of activation like *PDPN*, *FAP*, *CXCL12*, *LIF* and *TNC* was also increased by 1205Lu CM, but *S100A4* (FSP1) and *ACTA2* (α -SMA) were not affected (**Fig. S3A**). Mass spectrometry (MS) analysis also revealed that 1205Lu-activated LN-F produced more extracellular matrix proteins (TNC, FN) and secreted more IL-6, validating the functional activation of LN-F (**Fig. S3B**). These results indicate that inhibition of contractile activity of FRCs induced by invasive dedifferentiated melanoma CM is a functional response of activated LN-F, rather than an inhibition, and is similar to the FRCs behavior observed during immune challenge. Importantly, our observations suggest that factors secreted by invasive and proliferative melanoma do not share the same abilities to reprogram LN-F (**Fig. S3A**).

The ability of fibroblasts to contract a collagen gel matrix is regulated by forces generated by the actomyosin cytoskeleton (30,31). To gain more insights about the modulation of LN-F contraction by invasive melanoma CM, we examined F-actin organization and phosphorylation of the ROCK substrate MLC2 in control or LN-F treated with 501Mel CM or 1205Lu CM by fluorescence staining. Y-27632, a drug inhibiting ROCK-mediated actomyosin contraction was used as control (**Fig. 2E, F**). We observed similar changes related to the inhibition of actomyosin contraction (31) in LN-F treated with Y-27632 or 1205Lu CM, like decreased MLC2 S19 phosphorylation, less F-actin stress fibers and the remodeling of the cell morphology

from a stellate to a fusiform shape. Tumor cells drive the conversion of fibroblasts into CAFs with myofibroblast properties through epigenetic modifications (35,40,41). However, when the 1205Lu CM was removed from LN-F cultures in 3D collagen matrix assays, LN-F recovered their spontaneous contractile ability and were able to contract collagen to the same level as resting LN-F (**Fig. 2G**). Thus, melanoma-induced inhibition of LN-F contraction is a reversible process and requires the presence of invasive melanoma cells secreted factors to be maintained.

In order to identify molecular pathways responsible for inhibition of LN-F contraction by invasive melanoma CM, we performed microarray-based gene expression profiling on LN-F cultured in control conditions or in presence of 1205Lu CM (**Fig. 2H**). From the 25 000 most expressed genes in LN-F, we selected genes differentially expressed (DEGs) with an absolute LogFC ≥ 0.5 and an adjusted pValue ≤ 0.6 . We identified a set of 1 113 DEGs up-regulated in 1205Lu CM-treated LN-F compared to ctrl LN-F, and a set of 1 110 DEGs down-regulated, validating the transcriptional reprogramming of LN-F by the CM from invasive melanoma cells. Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) of the 1 110 down-regulated genes validated the inhibition of pathways related to actin cytoskeleton polymerization, RHOA GTPase activity and also pointed towards the regulation of the mechano-responsive transcriptional co-activator YAP and its co-transcription factor TEAD2 in 1205Lu-reprogrammed LN-F (**Fig. 2I and S4**). However, only few DEGs were found significantly enriched in the “contractome” pathway, a set of genes controlling actomyosin contractility in non-muscle cells (42) (**Fig. 2J**). From these DEGs, several GTPase-activating proteins (GAPs) and guanine nucleotide exchange factors (GEFs) regulating Rho GTPases were identified, such as ARHGEF2 (GEF-H1), which is required for RHO-mediated PDPN-induced contractility of FRCs (21).

1205Lu CM-mediated suppression of LN-F contraction is associated with impaired YAP activity

To validate the inhibition of the YAP signature pathway identified by GSEA (**Fig. 2I and 3A**), we investigated the effect of invasive and proliferative melanoma CM on YAP nuclear localization and activation. YAP is sensitive to the cell microenvironment

stiffness (32). The LN stiffness in the paracortical area was measured to 0.2 kPa by nanoindentation, and was similar to the one of 3D collagen gels used to assess the LN-F contraction (data not shown). However, in 2D cell culture conditions YAP activity is reduced in such soft hydrogel (32) we thus decided to examine the effect of melanoma cell CM on stiffer hydrogels (2.8 kPa), allowing the optimal visualization of changes in YAP localization and activity.

In agreement with the inhibition of LN-F actomyosin-dependent contraction induced by invasive melanoma secreted factors, we observed by immunofluorescence that LN-F incubated with CM from the MITF^{low} AXL^{high} invasive 1205Lu, WM793 or WM2032 cells displayed an elongated shape (**Fig. 3B, C**) with more cytosolic YAP compared to control LN-F (**Fig. 3B, D**). On the contrary, CM prepared from MITF^{high} AXL^{low} proliferative 501Mel or SK-MEL-28 cells induced no significant change on YAP nuclear localization and cell elongation. Consistently, we revealed by qRT-PCR decreased levels of YAP target genes *CYR61*, *CTGF* and *SDPR* induced by the 1205Lu-CM (**Fig. 3E**). We also noticed a decreased expression of genes regulated by the YAP co-transcription factor TEAD2 in LN-F treated with CM from MITF^{low} AXL^{high} invasive 1205Lu cells (**Fig. 3F**). Although less pronounced, results were similar in LN-F treated with 1205Lu CM on 0.2 kPa hydrogels (**Fig. S5A-C**).

To address the contribution of YAP in LN-F actomyosin-dependent contraction, a siRNA approach was used to target YAP in LN-F (**Fig. 3G**). The spontaneous LN-F contraction in a 3D collagen assay was suppressed by YAP knockdown, revealing that YAP was not only a marker of the cell contraction state, but actively controlled LN-F contraction (**Fig. 3H**). Note that depletion of YAP by siRNA had no effect on LN-F proliferation (**Fig. S6B**). Together, our data suggest that relaxation of the FRCs actomyosin network induced by factors secreted by invasive melanoma cells is associated with inhibition of YAP-TEAD2 transcriptional activity.

The JAK1-STAT3 pathway is inhibited by invasive melanoma CM and controls LN-F contraction.

Next, we sought to determine signaling pathways linking relaxation of the actomyosin cytoskeleton and YAP inhibition induced by melanoma secreted factors in LN-F. Previous studies have demonstrated that PDPN drives the actomyosin contraction of FRCs through binding to proteins from the ERM family, which link membrane proteins to the cytoskeleton (26,27). Binding of PDPN to its only known ligand, CLEC2, dismantled the PDPN-ERM interaction and inhibited ERM phosphorylation and PDPN-driven actomyosin contraction (21,22). Our first series of data excluded the contribution of the CLEC2-PDPN-ERM pathway in melanoma-induced LN-F relaxation. Indeed, no significant expression of CLEC2 was detected in 1205Lu melanoma cells (data not shown) and immunoblot analysis showed that ERM phosphorylation was not modulated in 1205Lu CM-treated LN-F (**Fig. 4A**). However, 1205Lu CM increased PDPN expression, as already shown by flow cytometry in Fig. 2D, and inhibited α -SMA, in agreement with LN-F activation and the inhibition of F-actin stress fiber formation.

Because cytokines from the TGF- β and the IL6 family are known to regulate ROCK-mediated actomyosin contraction in myofibroblasts and CAFs (33,34,43), we reasoned that the TGF- β Receptor 1 (TGF- β R1)-SMAD pathway or the glycoprotein 130 (GP130)-JAK1-STAT3 pathway should be involved in LN-F contractility. We previously identified by MS analysis that TGF- β , IL-6 and LIF were highly produced by 1205Lu cells compared to 501Mel melanoma cells (44). In agreement with these data, STAT3 phosphorylation was strongly induced 20 min after stimulation of LN-F with 1205Lu CM, but decreased rapidly afterwards and remained inhibited 96 h later (**Fig. 4B**). This indicates that the JAK-STAT3 pathway was specifically and consistently inhibited by the CM from the invasive melanoma cell sub-population. On the contrary, compared with basal STAT3 phosphorylation observed in LN-F before the addition of fresh medium (time 0), STAT3 phosphorylation was decreased after the addition of Ctrl medium or 501Mel CM (20 min), but was back to basal levels in 2 h. These results suggest that resting LN-F activated an autocrine JAK-STAT3 loop, which was interrupted when the LN-F supernatant was replaced by fresh medium. Indeed, we identified by MS that resting LN-F secrete basal levels of IL6 and LIF (**Fig. S3B** and data not shown). Sustained inhibition of STAT3 phosphorylation was also observed after 4 days treatment with CM prepared from other MITF^{low} AXL^{high} invasive melanoma cells, such as the WM2032 cell line or the short-term MM099 cells, while LN-F STAT3 phosphorylation was back to basal levels with CM from the MITF^{high} AXL^{low} proliferative short-term MM074 melanoma cultures (**Fig. 4C**).

In order to validate that the JAK-STAT3 inhibition by 1205Lu CM could inhibit LN-F actomyosin contraction, we next investigated the consequences of the modulation of the TGF- β R1-SMAD and GP130-JAK-STAT3 pathways on spontaneous LN-F contractility. We observed that the spontaneous LN-F contractile properties were not modulated by addition of TGF- β or LIF (**Fig. 4D**), nor by inhibition of the TGF- β R1 signaling by SB431542 (**Fig. 4E**). However, the JAK1/2 inhibitor Ruxolitinib strongly inhibited the spontaneous contraction of LN-F isolated from 4 different donors. This likely represents another yet to be defined pathway regulating FRC contraction, independently of autocrine LIF (**Fig. 4E**). Importantly, immunoblot analysis revealed that Ruxolitinib inhibited both STAT3 and MLC2 phosphorylation, linking the JAK-STAT pathway to actomyosin contraction in LN-F (**Fig. 4F**). Indeed, similar to the effect of 1205Lu CM, but not 501Mel CM, Ruxolitinib inhibited RHOA activity in LN-F, suggesting that suppression of actomyosin contraction induced by 1205Lu CM was mediated through RHOA inhibition by the JAK-STAT pathway (**Fig. 4G**). It is known that Ruxolitinib inhibits both JAK1 and JAK2 kinase activities. Thus, we used siRNAs against JAK1 (siJAK1) and JAK2 (siJAK2) to discriminate which JAK kinase(s) was involved in LN-F contraction. Because JAK1 depletion, and not JAK2, inhibited LN-F-mediated 3D collagen matrix contraction, we identified JAK1 as the main JAK involved in LN-F contraction (**Fig 4H**). Those results were further confirmed with the observation that extinction of STAT3 expression by siRNAs inhibited LN-F gel contraction, suggesting that JAK1 controls LN-F contraction through STAT3 (**Fig. 4I**). Looking back to the GSEA analysis of genes down-regulated in 1205Lu CM-treated LN-F compared to Ctrl LN-F (**Fig 2H, I**), it seemed surprising to us that the JAK-STAT pathway modulation could not be identified. So we repeated the GSEA analysis with the 25 000 more differentially expressed genes from the microarray. Indeed, several genes strongly up-regulated in 1205Lu CM-treated LN-F were related to the negative regulation of the JAK-STAT pathway, such as the MIR146A microRNA (45), members of the SOCS (Suppressor Of Cytokine Signaling) family (46) and the phosphatases PTPN2 (Protein Tyrosine Phosphatase Non-Receptor Type 2) (47) and INPP5F (Inositol Polyphosphate-5-Phosphatase F) (48) (**Fig. 4I**). Together, our results reveal the contribution of JAK1-STAT3 signaling pathway in 1205Lu-mediated suppression of LN-F contraction. Our aim was then to find the link between JAK1-STAT3, YAP and ROCK-MLC2-actomyosin contraction.

The JAK1-STAT3 pathway controls YAP activity and the actin cytoskeleton polymerization.

To identify the role played by JAK1-STAT3 inhibition on YAP function and actin cytoskeleton remodeling, we compared LN-F treated with the JAK1/2 inhibitor Ruxolitinib and the ROCK inhibitor Y-27632 (**Fig. 5A**). In agreement with the role of the RHOA-ROCK pathway in YAP activity and actomyosin polymerization (32), we found that pharmacological inhibition of ROCK induced YAP cytosolic relocation (**Fig. 5B**), decreased F-actin stress fibers (**Fig. 5C**) and caused LN-F to stretch (**Fig. 5D**). Similar observations were made when cells were treated with Ruxolitinib, suggesting that JAK1 could also maintain YAP activity and actomyosin network. This notion was confirmed by the observation that the extinction of JAK1 expression by siRNA (siJAK1) induced YAP cytosolic relocation and inhibited the formation of F-actin stress fibers (**Fig. 5E-G**). Since the same effects were observed after the extinction of STAT3 expression (siSTAT3), we conclude that the JAK1 effects on YAP and actomyosin are mediated by STAT3. Indeed, the transcription of the YAP target genes *CTGF* and *CYR61* was inhibited when expression of YAP or STAT3 was depleted by siRNA (**Fig. 5H**).

Therefore, after deciphering the signaling pathway linking factors secreted by invasive melanomas to the relaxation of the LN-F actomyosin cytoskeleton, we focused our attention on the nature of these tumoral cues.

Invasive melanoma cells release soluble proteins that inhibit LN-F contractility.

The CM contains all the factors secreted by melanoma cells. This includes soluble proteins or lipids and extracellular vesicles (EVs) such as exosomes or microvesicles. EVs are known to promote distal metastatic tumor growth through fibroblast-dependent niche formation (49). Knowing that 1205Lu cells actually secreted much more EVs than 501Mel cells (data not shown), we first investigated if EVs had any effect on the contraction of LN-F actomyosin cytoskeleton. The 1205Lu CM was depleted from EVs by ultracentrifugation and analyzed by immunoblot to control the enrichment of the EVs-specific tetraspanins CD9, CD63 and CD81 and the chaperone protein HSP70 in the EVs fraction and their absence in the EV-depleted 1205Lu CM fraction (**Fig. 6A**). As shown in **Fig. 6B**, the 3D gel contraction by LN-F was inhibited to similar levels after incubation with the EV-depleted 1205Lu CM or the complete 1205Lu CM, while the incubation with concentrated 1205Lu EVs (5 μ g/ml) didn't modulated the spontaneous LN-F contraction. These results suggest any

involvement of melanoma EVs in the regulation of LN-F contraction. Then, we turned our attention towards proteins and lipids secreted independently from EVs. Proteins are more sensitive to heat than lipids. So, because the 1205Lu CM heated to 95°C for 5 min partly lost its ability to inhibit LN-F cell contraction, we hypothesized that proteins, rather lipids, were responsible for the 1205Lu CM-inhibition of LN-F contraction (**Fig. 6C**). To validate this idea, we treated the 1205Lu CM by the broad-spectrum serine protease proteinase K (PK) to degrade proteins and then inactivated PK with the serine protease inhibitor PMSF (PhenylMethylSulfonyl Fluoride) before adding the 1205Lu CM on LN-F. The 1205Lu CM with impaired proteins due to PK treatment was not able anymore to decrease LN-F gel contraction, further confirming the contribution of soluble melanoma-derived proteins in suppression of LN-F contraction (**Fig. 6D**). In addition, to identify more precisely the set of candidate proteins mediating this effect, the 1205Lu CM was filtrated through different membranes with molecular weight (MW) cut-offs ranging from 100 kDa to 3 kDa to fractionate the proteins according to their size (**Fig. 6E**). 1205Lu secreted proteins selected by cut-offs bellow 30 kDa and above 100 kDa did not modify LN-F contraction while proteins selected by cut-offs above 30 kDa retained the ability to inhibit LN-F contraction (**Fig. 6F**). We thus restricted the factors secreted by 1205Lu able to regulate the LN-F actomyosin polymerization to EVs-free proteins with a MW ranging from 30 kDa to 100 kDa.

Discussion

To our best of knowledge, our study shows for the first time that human FRCs are contractile cells similar to murine FRCs (21-23). With their myofibroblast-like phenotype and high expression of PDPN and other markers like FAP or α -SMA, quiescent FRCs share many properties with CAFs suggesting that they could play a similar supportive role in the LN metastatic microenvironment. Indeed, PDPN was identified as a marker of CAFs in a variety of malignancies and is associated with metastasis and poor prognosis (50,51). PDPN expression on CAFs favors force-mediated matrix remodeling through the high activity of the RHO-ROCK pathway and promotes cancer cell invasion (51).

Focusing on the signaling pathway(s) driving the actomyosin contractility of FRCs, we identified that the spontaneous contraction of quiescent FRCs relies on a basal level of YAP and JAK1-STAT3 activation, and not only on the PDPN-ERM pathway as previously identified in mouse FRCs. YAP activation was known to reflect the actomyosin contractile status of FRCs (22) and CAFs (31), and to regulate FRC differentiation during LN development (52). However, we demonstrated that YAP is not only a marker but controls the actomyosin contractility of differentiated FRCs. YAP and the RHO-ROCK pathway are intimately linked, regulating each other and controlling the contraction of the actomyosin cytoskeleton (31,32). We have also shown that the inhibition of JAK1 or STAT3 reduced the actomyosin contractility of FRCs and lead to the inhibition of RHOA and YAP activities. Previous studies have shown that the activation of JAK1-STAT3 signaling increases ROCK-mediated actomyosin contractility in CAFs, and that ROCK signaling induces STAT3 phosphorylation and transcriptional responses. Thus, JAK1-STAT3 and RHO-ROCK are interdependent and cross-regulate each other (34). However, it is still unclear if JAK1-STAT3 controls both YAP and RHOA pathways or if it controls only YAP or RHOA, which then regulate other(s) pathway(s). In CAFs the activation of JAK1-STAT3 relies on TGF- β or IL6 family cytokines (33,34). While TGF- β , IL6 and LIF are highly secreted by 1205Lu cells (44), the addition of recombinant TGF- β or LIF did not modulate FRC contractility, suggesting that the JAK1-STAT3 signaling is independent from the TGF- β and IL6 family cytokines. Collectively, our results support the notion that the RHO-ROCK-driven contractility of human FRCs is not only controlled by the PDPN-ERM pathway, but also by signaling pathways common to CAFs.

Tumors secrete inflammatory factors, such as cytokines from the TGF- β or IL6 family, inducing the activation of myofibroblasts and CAF transformation, both processes associated with an increased actomyosin contractility. Importantly, we discovered here that melanomas with an invasive dedifferentiated signature (MITF^{low} AXL^{high}) secrete factors drastically suppressing force-driven matrix remodeling by FRCs. Factors secreted by invasive melanoma cells but not by proliferative melanoma cells, inhibited JAK1-STAT3 signaling, which decreases RHO-ROCK-MLC2 signaling and YAP activity. These pathways are interconnected and may be regulated through feedback mechanisms. The *JAK-STAT pathway* is a major

signaling mechanism for a wide array of cytokines and growth factor receptors. Further investigations are required to identify receptor(s) involved in actomyosin relaxation of FRCs treated with factors secreted by invasive melanomas.

Because CAF activation by tumoral cues is associated with the acquisition of contractile properties, the inhibition of FRC contractility in presence of melanoma CM was unexpected. However, it is part of the activation process of FRC, like during an immune response (21,22). Indeed we demonstrated that FRCs stimulated with invasive melanoma CM are activated. They proliferated more, up-regulated some markers of activation (FAP, PDPN), and increased the secretion of matrix proteins (FN, TNC) and cytokines (IL6). Changes in cell contractile potential alters fibroblast proliferation, and inflammation is known to trigger FRC proliferation and PDPN expression, while the specific underlying mechanisms remain unknown (21,22,39). Thus, the increased proliferation that we observed in presence of invasive melanoma secreted factors might have stemmed from dysregulated tension or be independently due to some factors secreted by invasive melanoma cells.

Culture of FRCs with factors secreted by invasive melanoma cells strikingly phenocopied the prevention of PDPN signaling by the provision of CLEC2, antibody blockade or genetic deficiency (21,22). It induced similar morphological changes with an elongated cell shape, smaller cell area, less protrusions, decreased stress fibers, less YAP nuclear activation, but also increased proliferation and PDPN expression. So while we excluded the modulation of ERM phosphorylation by melanoma CM, the implication of PDPN in the inhibition of FRC contractility mediated by melanoma CM is still an open question. PDPN can activate the FRC actomyosin machinery independently of the binding of its cytoplasmic tail to ERM proteins, by engaging a neighboring transmembrane protein (22). Our hypothesis is that this unknown transmembrane protein may drive JAK1 signaling and that binding to its ligand secreted by invasive melanomas could dissociate such interaction. An alternative could be that JAK1 may directly bind to the PDPN cytoplasmic tail. Indeed, JAK1 contains a FERM domain in its N-terminal portion, like ERM proteins, and this domain is responsible for direct binding to the cytoplasmic tail of integral membrane proteins (53). Indeed, the range of physiological effects downstream of PDPN, such as cell contraction, migration, proliferation or differentiation may be due to different protein

interactions in diverse cell types (51). Several binding partners such as CD9 (54) and CD44 (55) have already been identified and regulate PDPN signaling.

We also observed that the CM produced by 1205Lu-activated FRCs was unable to suppress the contraction of control FRCs (data not shown), indicating that the inhibition of FRC contraction is directly induced by a paracrine melanoma factor, and not by the activation of an autocrine signaling loop in FRC. This is consistent with the fact that up to 8 days stimulation with melanoma CM provided a reversible signal to FRCs (**Fig. 2G**). Indeed, a 7-days stimulation with TGF- β or LIF is sufficient to induce sustained CAF activation through the induction of epigenetic mechanisms and autocrine regulatory loops (33,35), while we cannot exclude the possibility that similar process could take longer in FRCs.

It is established that paracrine secretion of multiples molecules, including TGF- β , growth factors, and proinflammatory molecules such as IL6 family cytokines, by melanoma cells, promotes tumorigenesis (56) and LN metastasis (13). Melanoma EVs have been particularly described as potent inducers of LN pre-metastatic niches (11,12). However, EVs from 1205Lu cells didn't induce gel remodeling by FRCs and thus we focused our attention on melanoma soluble factors, and particularly on proteins. Indeed, 1205Lu CM with heat- or PK-degraded proteins lost its ability to inhibit FRC contraction. In previous studies, we analyzed by MS the proteins secreted by invasive 1205Lu and proliferative 501Mel cell lines. We identified that 1205Lu cells secreted higher levels of cytokines, chemokines, growth factors but also matricellular proteins (44,57). The factors known to affect fibroblast actomyosin contraction, and secreted more abundantly by 1205Lu cells (TGF- β , IL6, LIF) didn't affect FRC contractility. We fractionated the 1205Lu CM proteins according to their MW and restrained the candidate proteins to molecules between 30kDa and 100kDa, excluding small peptides or high MW matricellular proteins such as FN, TNC or Thrombospondins. In the light of the melanoma signatures identified (1-5), a detailed analysis of the factors secreted by invasive and proliferative melanomas is necessary to better apprehend their different interactions with the microenvironment and identify those controlling FRC actomyosin contractility.

FRC contractile phenotype regulates LN swelling and tunes LN immunity (21,22). Factors secreted by melanoma in the skin may thus account for LN swelling observed in melanoma draining LN (15,16). One study analyzed in mice the reprogramming of FRC in the melanoma pre-metastatic LN using the proliferative

B16.F10 cell line (16). It showed an increased RHO signaling in B16.F10-draining pre-metastatic LN, and the enhanced capacity of cultured FRCs treated with B16.F10 CM to contract collagen gels. These results are consistent with the increased FRC contractility that we observed *in vitro* with some proliferative human melanomas (**Fig. 2A**), but doesn't enable to conclude on the effect of invasive melanoma on FRC contractility *in vivo*.

LNs from wild-type mice are significantly less stiff and more deformable after immunization or following antibody blockade of PDPN (22), demonstrating that FRC contractility affects LN stiffness. Microenvironment clues such as tissue stiffness (58) control the back and forth switches of melanoma cells between proliferative and invasive states to drive disease progression (1,59). A softer pre-metastatic LN microenvironment could then favor the switch of invasive melanoma cells reaching the LN to proliferative cells able to nucleate a new metastasis. The increased elasticity of the reticular FRC network conferred by actomyosin relaxation could also allow more LN stretching to give space for metastatic development without LN breakdown.

Loss of FRC contractility also led to significant changes in the homeostasis and spacing of FRCs and T cells, with profound consequences for the LN microarchitecture and the population expansion of antigen-specific T cells following immunization. FRC controls immune cell survival and proliferation through cell contacts and secretion of immunoregulatory molecules (20). Spacing of FRC and invading metastatic cells may also regulate tumoral development with similar mechanisms. Loss of FRC contractility thus profoundly reprogram the biomechanical properties and the immune response of the LN and may be essential for the survival and development of metastatic melanoma cells in the LN niche.

Our findings illustrate that FRC activation and actomyosin relaxation in LN might be a prognostic marker of the melanoma invasive capacities, suggesting that the microarchitecture of the FRC reticular network and PDPN expression could be examined in LN at diagnosis. Blocking the distant communication between invasive melanoma and FRC may inhibit the formation of a permissive biomechanical and immunological niche in the pre-metastatic LN, thereby impinging on LN metastasis. We propose that FDA-approved

therapeutic agents such as the JAK inhibitor Ruxolitinib, or inhibitors of STAT3 activity, may be useful agents to prevent cancer dissemination through lymphatics.

Material and methods

Isolation and culture of primary fibroblasts and CAFs

Primary human LN-F were purchased from ScienCell Research Laboratories. LN-F were amplified in Fibroblast Medium (ScienCell) supplemented with 1% Fibroblast Growth Supplement (ScienCell), 10% Fetal Bovine Serum (FBS, *Gibco*) and 100 µg/ml Penicillin/Streptomycin solution (P/S, *Gibco*). Skin F were isolated as described previously (63). Melanoma skin or LN clinical specimens (n= 9) were obtained with written informed consent from patients and the study was approved by local ethic committees (Nice Hospital Center and University Côte d'Azur). Briefly, the sample was cut into small pieces and digested with collagenase and dispase. Following filtration of large debris, the solution was serially centrifuged and the final pellet was re-suspended in Dulbecco's modified Eagle Medium (DMEM) supplemented with 10% FBS and seeded in a tissue culture dish. After 30 min, CAFs have adhered to the dish whilst other cellular types in suspension were discarded. The identity of CAFs was validated by the expression of classical markers by qRT-PCR and flow cytometry. Skin F and CAFs were cultured in DMEM with 100 µg/ml P/S and 10% FBS. All fibroblasts were starved for 5 to 7 days in DMEM 0.5% FBS (control medium) before any experiment and were then stimulated every two days with control medium or melanoma CM supplemented with 0.5% FBS. They were used until passage 10. In some experiments, cells were treated with 2 µg/ml rh-TGF-β1 (*ImmunoTools*), 2 µg/ml rh-LIF (*Biotechne*) or 10 µM Ruxolitinib (*Euromedex*), Y-27632 or SB431542 (*Selleckchem*).

Melanoma cell culture

Melanoma cell lines were obtained as previously described (44,57,62,64). Short-term cultures of patient melanoma cells MM029, MM074 and MM099 were kindly provided by J.-C. Marine and were described elsewhere (3). Patient melanoma cells (MNC1) were the gift of Robert Ballotti and described previously (65). Cell lines were authenticated for mutations by

PCR and transcriptional profile by qRT-PCR and Immunoblotting. Cells were cultured in DMEM supplemented with 7% FBS and P/S. All melanoma cells were routinely tested for the absence of mycoplasma by PCR.

Preparation of conditioned medium (CM)

Melanoma cells were grown until 80% confluent in full growth medium. Then, cells were washed with PBS and cultured for 24h in medium without FBS. The culture supernatant was harvested and filtered (0.45 μ M) to eliminate cellular debris. In some experiments, EVs and EV-depleted CM were prepared by differential ultracentrifugation as described (44), CM was incubated for 5 min at 95°C, or treated with 100 μ g/ml Proteinase K (ThermoFisher) overnight to degrade proteins and then with 1 mM of PhenylMethylSulfonyl Fluoride (PMSF) (Sigma) to inactivate the Proteinase K. In other experiments, CM was filtrated through different membranes with MW cut-offs of 100, 50, 30, 10 and 3 kDa (Amicon Ultra-4, Millipore) to fractionate the proteins according to their size. Resulting CM, or EVs, were aliquoted and frozen at -80°C until used.

Matrix remodeling assay

Fibroblasts (7.5×10^3 cells) were embedded in 30 μ l of a collagen (Corning) - matrigel (Sigma) mix and seeded in glass-bottom 96-well plate (MatTek). Once the gel was set (1 h at 37°C), it was overlaid with 100 μ l control medium or CM supplemented with 0.5% FBS (with vehicle, cytokines or inhibitors). The gel was photographed every 1 to 3 days. The respective diameters of the well and gel were measured using ImageJ software. The percentage of gel contraction was calculated as followed: $100 - 100 \times (\text{gel area} / \text{well area})$ (33,62).

Proliferation assay

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, or by cell counting. We validated that all drugs and siRNAs tested in matrix remodeling assays didn't affect LN-F survival (**Fig. S6**).

RNAi studies

The siRNAs targeting STAT3#1 (HA13744330), STAT3#2 (HA13744332), JAK1 (SASI_Hs01_00174612) (Sigma), JAK2 (145131) and YAP (HSS115942) (ThermoFisher) were used with the respective control siRNAs: MISSION siRNA Universal Negative Control#1 (Sigma) and a siRNA against the Luciferase Reporter (sense:

CGUACGCGGAAUACUUCGATT, antisense: UCGAAGUAUUCGCGUAC GTT) (ThermoFisher). Transfection of siRNAs was carried out using Lipofectamine RNAiMAX (ThermoFisher) at a final concentration of 50 nM. LN-F were assayed at 2 days post transfection.

Real-time quantitative PCR

Total RNA was extracted using NucleoSpin RNA Plus kit (Macherey-Nagel). Reverse transcription was performed with the High capacity cDNA Reverse Transcription kit (Life Technologies). Quantitative PCR was performed using the Platinum SYBR Green qPCR Supermix (Life Technologies) with the StepOnePlus System (Applied Biosystems). Relative mRNA levels were determined using the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method and *ACTB*, *GAPDH*, *HPRT* and *PPIA* as housekeeping genes.

Microarray experiment

For RNA analysis, LN-F were cultured for 48h with control medium or 1205Lu CM. RNAs from 4 different experiments (biological quadruplicate) were extracted as described above and analyzed on SurePrint G3 Human Gene Expression 8x60K v2 Microarrays (Agilent Technologies) as previously described (66). Data analyses were performed using R. We used the Bioconductor package array QualityMetrics and custom R scripts for quality control. Additional analyses were done using Bioconductor package Limma. Data were normalized using the quantile method. A linear modeling approach was used to calculate log ratios, moderated *t*-statistics, and *P*-values for each comparison of interest. *P*-values were adjusted for multiple testing using the Benjamini–Hochberg method that controls the false discovery rate.

Analysis of functional enrichment in gene signatures in microarray data

After raw data processing, we analyzed the 25 000 genes more expressed in LN-F (average mean expression ≥ 6). To identify pathways down-regulated by 1205Lu CM treatment, we selected the genes down-regulated with $\text{LogFC} \leq -0.5$ in 1205Lu-reprogrammed LN-F and submitted these genes to Gene Set Enrichment Analysis (GSEA). To analyze genes involved in the regulation of the STAT3 pathway, we identified genes common to the “GO negative regulation of receptor signaling pathway via stat” pathway, and differentially expressed with

an absolute LogFC ≥ 0.4 . Results were presented in heatmaps generated with Prism 8 (Graphpad) or Phantasus (<https://genome.ifmo.ru/phantasus>) softwares.

Immunoblot and immunoprecipitation

Cell lysates were prepared using RIPA buffer (Millipore) supplemented with protease and phosphatase inhibitors (Pierce). Proteins were separated by SDS-PAGE and were transferred onto PVDF membranes (GE Healthcare) for immunoblot analysis. Membranes were incubated with the primary antibody overnight, washed and then incubated with the peroxidase-conjugated secondary antibody for 1h. The following primary antibodies were used (diluted 1:1,000): α -SMA (Abcam), CD9, CD63, CD81, CAV1, ITGB1, PDGFR- β , FAP, ERM, P-ERM (T567/T564/T558), P-MLC2 (S19), STAT3, P-STAT3 (Y705) (Cell Signaling Technology), FN, HSP60, HSP70, MLC2, YAP (Santa Cruz Biotechnology) and PDPN (Biolegend). Blots were developed with a chemiluminescence system (ECL, GE Healthcare). For IP assays, cells lysed as described above were incubated in lysis buffer containing Protein G Sepharose beads (Merck) and a JAK1 antibody (Santa Cruz Biotechnology) overnight at 4°C with rocking. Beads were then washed three times with 20 mM Hepes, 150 mM NaCl, 10% Glycerol, 0.1% Triton X-100 supplemented with protease and phosphatase inhibitors. IP products were separated by SDS-PAGE and subjected to immunoblot analysis.

RHOA assay

RHOA activity was measured on LN-F lysates using the RHOA G-LISA Activation Assay kit (Cytoskeleton). Data are the mean \pm SEM of arbitrary units of RHOA activity.

Immunofluorescence analysis

LN-F were grown 4 days on coverslips coated with collagen or on synthetic hydrogels of 2.8 kDa or 0.2 kDa stiffness made as described (67). Then, cells were fixed in 4% paraformaldehyde, permeabilized in PBS 0.3% Triton for 20 min, blocked in PBS 0.1% Triton, 5% Goat Serum for 1h and stained overnight at 4°C with YAP (Santa Cruz Biotechnology) and P-MLC2 (S19) (Cell Signaling Technology) primary antibodies diluted 1:100 in PBS 0.1% Triton, 2% Goat Serum. Following 1h incubation with Alexa Fluor-conjugated secondary antibodies (1:1000, ThermoFisher)

and Texas Red- or Alexa Fluor 488-conjugated Phalloidin (1:200, ThermoFisher), nuclei were stained with Hoechst and coverslips were mounted in Prolong antifade (ThermoFisher). Images were acquired on a wide-field microscope (Leica DM5500B, 40X magnification) or a confocal microscope (Nikon Eclipse Ti, 20X or 40X magnification). Images were analyzed with the Fiji software to quantify the cell shape index, the mean fluorescence per cell (Integrated density) and the nuclear/cytosolic ratio of YAP, assessed with the fluorescence intensity of nucleus (delimited by Hoechst staining) and cytosol.

Generation and analysis of cell-derived ECM (*Figures du manuscrit*)

To study the composition and properties of the matrix, FRC were plated on gelatin culture dishes for 7 days and lysed with PBS 1% Triton 100X PBS 20 μ M NH₄OH. Matrices were then gently washed several times with PBS.

For immunofluorescence analysis, matrices were incubated overnight at 4°C with anti-fibronectin (1:100, *BD Biosciences*) and anti-collagen-I (1:500, *Abcam*). Matrices were observed by confocal microscopy (*Eclipse Ti, Nikon*), generating z-stack from top to bottom of the matrix. Fluorescence intensity was measured on the 3D reconstitution of the Matrix (*NIS – Elements Advanced Research, Nikon*) and thickness was measured on the 2d projection of the 3D reconstitution.

For immunoblot analysis, the matrices were recovered in Laemmli (*Fisher Scientific*) and the western blot was done as described above. The following antibodies were used: Tenascin C (AF3358, *R&D*), SPARC (AF941, *R&D*) and LOXL2 (AF2639, *R&D*).

Flow cytometry

Cells were washed in PBS and incubated at 4°C for 30 minutes in PBS 2% FBS, 2 mM EDTA with CD31-FITC, CD35-PE and GP38/PDPN-APC or control isotypes antibodies (*Biolegend*). Then, cells were washed in PBS and analyzed with BD FACSCANTO II cytometer (*BD Biosciences*) and the FlowJo software.

Migration assay (*Figures du manuscrit*)

Cell migration was studied with Boyden chamber of 8 μ m porosity for melanoma cells and 5 μ m porosity of PBMC (*Corning*). Inserts were equilibrated for 1h at 37°C with DMEM in the

lower and the upper chamber. For PBMC migration, the upper chamber was incubated with 100 µg/ml fibronectin overnight at 4°C before equilibration. For invasion assay with matrices, the upper chamber was prepared as described above with gelatin. After this preparation process, 1205Lu cells migrated for 4 hours and PBMC for 90 minutes. The migrated 1205Lu were stained on the lower part of the membrane with DAPI and counted on pictures taken with epifluorescence microscope EVOS. The migrated PBMC were counted by flow cytometry.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using Prism 8 (GraphPad). Unpaired two-tailed Mann-Whitney tests were used for statistical comparisons between two groups and Kruskal-Wallis tests with Dunn's post-tests or two-way analysis of variance (ANOVA) tests with Sidak's post-tests to compare three or more groups. Histogram plots and curves represent mean ± SEM and Violin plots represent median +/- quartiles. P values ≤ 0.05 were considered statistically significant.

Data availability

The experimental data from microarray have been deposited in the NCBI Gene Expression Omnibus (GEO) database under SuperSerie GSEX containing 2 distinct datasets.

Acknowledgements

We thank R. Ballotti and J.-C. Marine for short-term cultures of melanoma cells, and the "Microscopie Imagerie Côte d'Azur" (MICA) GIS- IBISA platform supported by the GIS IBISA, Conseil Départemental 06 and Région Provence Alpes Côte d'Azur. We acknowledge Maeva Gesson and Marie Irondelle from the C3M imaging facility for their helpful advice. This work was funded by Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (Inserm), Université Côte d'Azur, Canceropôle Provence Alpes Côte d'Azur (Emergence grant to V.P.), Fondation ARC (Projet Fondation ARC to V.P.), Ligue Contre le Cancer (Equipe labellisée 2016 to S.T.-D.) and Institut National du Cancer (INCA_12673 to S.T.-D.). Fundings from National Research Agency (ANR-18-CE14-0019-01 to M.D.), ITMO Cancer Aviesan within the framework of the Cancer Plan and the French Government through the "Investments for the Future" LABEX SIGNALIFE (ANR-11-LABX- 0028-01) are also acknowledged. V.P. is a

recipient of a post-doctoral fellowship from Fondation de France, I.B. is a recipient of a doctoral fellowship from Ligue Contre le Cancer and S.D. is a recipient of a doctoral fellowship from Fondation pour la Recherche Médicale (FRM).

References

1. Hoek KS, Eichhoff OM, Schlegel NC, Dobbeling U, Kobert N, Schaerer L, *et al.* In vivo switching of human melanoma cells between proliferative and invasive states. *Cancer Res* **2008**;68:650-6
2. Hoek KS, Schlegel NC, Brafford P, Sucker A, Ugurel S, Kumar R, *et al.* Metastatic potential of melanomas defined by specific gene expression profiles with no BRAF signature. *Pigment Cell Res* **2006**;19:290-302
3. Rambow F, Rogiers A, Marin-Bejar O, Aibar S, Femel J, Dewaele M, *et al.* Toward Minimal Residual Disease-Directed Therapy in Melanoma. *Cell* **2018**;174:843-55 e19
4. Tirosh I, Izar B, Prakadan SM, Wadsworth MH, 2nd, Treacy D, Trombetta JJ, *et al.* Dissecting the multicellular ecosystem of metastatic melanoma by single-cell RNA-seq. *Science* **2016**;352:189-96
5. Tsoi J, Robert L, Paraiso K, Galvan C, Sheu KM, Lay J, *et al.* Multi-stage Differentiation Defines Melanoma Subtypes with Differential Vulnerability to Drug-Induced Iron-Dependent Oxidative Stress. *Cancer Cell* **2018**;33:890-904 e5
6. Verfaillie A, Imrichova H, Atak ZK, Dewaele M, Rambow F, Hulselmans G, *et al.* Decoding the regulatory landscape of melanoma reveals TEADS as regulators of the invasive cell state. *Nat Commun* **2015**;6:6683
7. Bald T, Quast T, Landsberg J, Rogava M, Glodde N, Lopez-Ramos D, *et al.* Ultraviolet-radiation-induced inflammation promotes angiotropism and metastasis in melanoma. *Nature* **2014**;507:109-13
8. Girard CA, Lecacheur M, Ben Jouira R, Berestjuk I, Diazzi S, Prod'homme V, *et al.* A Feed-Forward Mechanosignaling Loop Confers Resistance to Therapies Targeting the MAPK Pathway in BRAF-Mutant Melanoma. *Cancer Res* **2020**;80:1927-41
9. Brown M, Assen FP, Leithner A, Abe J, Schachner H, Asfour G, *et al.* Lymph node blood vessels provide exit routes for metastatic tumor cell dissemination in mice. *Science* **2018**;359:1408-11
10. Pereira ER, Kedrin D, Seano G, Gautier O, Meijer EFJ, Jones D, *et al.* Lymph node metastases can invade local blood vessels, exit the node, and colonize distant organs in mice. *Science* **2018**;359:1403-7
11. Hood JL, San RS, Wickline SA. Exosomes released by melanoma cells prepare sentinel lymph nodes for tumor metastasis. *Cancer Res* **2011**;71:3792-801

12. Peinado H, Aleckovic M, Lavotshkin S, Matei I, Costa-Silva B, Moreno-Bueno G, *et al.* Melanoma exosomes educate bone marrow progenitor cells toward a pro-metastatic phenotype through MET. *Nat Med* **2012**;18:883-91
13. Olmeda D, Cerezo-Wallis D, Riveiro-Falkenbach E, Pennacchi PC, Contreras-Alcalde M, Ibarz N, *et al.* Whole-body imaging of lymphovascular niches identifies pre-metastatic roles of midkine. *Nature* **2017**;546:676-80
14. Cochran AJ, Huang RR, Lee J, Itakura E, Leong SP, Essner R. Tumour-induced immune modulation of sentinel lymph nodes. *Nat Rev Immunol* **2006**;6:659-70
15. Commerford CD, Dieterich LC, He Y, Hell T, Montoya-Zegarra JA, Noerrellykke SF, *et al.* Mechanisms of Tumor-Induced Lymphovascular Niche Formation in Draining Lymph Nodes. *Cell Rep* **2018**;25:3554-63 e4
16. Riedel A, Shorthouse D, Haas L, Hall BA, Shields J. Tumor-induced stromal reprogramming drives lymph node transformation. *Nat Immunol* **2016**;17:1118-27
17. Liu Y, Cao X. Characteristics and Significance of the Pre-metastatic Niche. *Cancer Cell* **2016**;30:668-81
18. Pezoldt J, Pasztoi M, Zou M, Wiechers C, Beckstette M, Thierry GR, *et al.* Neonatally imprinted stromal cell subsets induce tolerogenic dendritic cells in mesenteric lymph nodes. *Nat Commun* **2018**;9:3903
19. Rodda LB, Lu E, Bennett ML, Sokol CL, Wang X, Luther SA, *et al.* Single-Cell RNA Sequencing of Lymph Node Stromal Cells Reveals Niche-Associated Heterogeneity. *Immunity* **2018**;48:1014-28 e6
20. Fletcher AL, Acton SE, Knoblich K. Lymph node fibroblastic reticular cells in health and disease. *Nat Rev Immunol* **2015**;15:350-61
21. Acton SE, Farrugia AJ, Astarita JL, Mourao-Sa D, Jenkins RP, Nye E, *et al.* Dendritic cells control fibroblastic reticular network tension and lymph node expansion. *Nature* **2014**;514:498-502
22. Astarita JL, Cremasco V, Fu J, Darnell MC, Peck JR, Nieves-Bonilla JM, *et al.* The CLEC-2-podoplanin axis controls the contractility of fibroblastic reticular cells and lymph node microarchitecture. *Nat Immunol* **2015**;16:75-84
23. Malhotra D, Fletcher AL, Astarita J, Lukacs-Kornek V, Tayalia P, Gonzalez SF, *et al.* Transcriptional profiling of stroma from inflamed and resting lymph nodes defines immunological hallmarks. *Nat Immunol* **2012**;13:499-510
24. Martinez VG, Pankova V, Krasny L, Singh T, Makris S, White IJ, *et al.* Fibroblastic Reticular Cells Control Conduit Matrix Deposition during Lymph Node Expansion. *Cell Rep* **2019**;29:2810-22 e5
25. Sixt M, Kanazawa N, Selg M, Samson T, Roos G, Reinhardt DP, *et al.* The conduit system transports soluble antigens from the afferent lymph to resident dendritic cells in the T cell area of the lymph node. *Immunity* **2005**;22:19-29
26. Martin-Villar E, Megias D, Castel S, Yurrita MM, Vilaro S, Quintanilla M. Podoplanin binds ERM proteins to activate RhoA and promote epithelial-mesenchymal transition. *J Cell Sci* **2006**;119:4541-53

27. Wicki A, Lehembre F, Wick N, Hantusch B, Kerjaschki D, Christofori G. Tumor invasion in the absence of epithelial-mesenchymal transition: podoplanin-mediated remodeling of the actin cytoskeleton. *Cancer Cell* **2006**;9:261-72
28. Diazi S, Tartare-Deckert S, Deckert M. Bad Neighborhood: Fibrotic Stroma as a New Player in Melanoma Resistance to Targeted Therapies. *Cancers (Basel)* **2020**;12
29. Kalluri R. The biology and function of fibroblasts in cancer. *Nat Rev Cancer* **2016**;16:582-98
30. Gaggioli C, Hooper S, Hidalgo-Carcedo C, Grosse R, Marshall JF, Harrington K, *et al.* Fibroblast-led collective invasion of carcinoma cells with differing roles for RhoGTPases in leading and following cells. *Nat Cell Biol* **2007**;9:1392-400
31. Calvo F, Ege N, Grande-Garcia A, Hooper S, Jenkins RP, Chaudhry SI, *et al.* Mechanotransduction and YAP-dependent matrix remodelling is required for the generation and maintenance of cancer-associated fibroblasts. *Nat Cell Biol* **2013**;15:637-46
32. Dupont S, Morsut L, Aragona M, Enzo E, Giulitti S, Cordenonsi M, *et al.* Role of YAP/TAZ in mechanotransduction. *Nature* **2011**;474:179-83
33. Albregues J, Bourget I, Pons C, Butet V, Hofman P, Tartare-Deckert S, *et al.* LIF mediates proinvasive activation of stromal fibroblasts in cancer. *Cell Rep* **2014**;7:1664-78
34. Sanz-Moreno V, Gaggioli C, Yeo M, Albregues J, Wallberg F, Viros A, *et al.* ROCK and JAK1 signaling cooperate to control actomyosin contractility in tumor cells and stroma. *Cancer Cell* **2011**;20:229-45
35. Albregues J, Bertero T, Grasset E, Bonan S, Maiel M, Bourget I, *et al.* Epigenetic switch drives the conversion of fibroblasts into proinvasive cancer-associated fibroblasts. *Nat Commun* **2015**;6:10204
36. Knoblich K, Cruz Migoni S, Siew SM, Jinks E, Kaul B, Jeffery HC, *et al.* The human lymph node microenvironment unilaterally regulates T-cell activation and differentiation. *PLoS Biol* **2018**;16:e2005046
37. Siegert S, Huang HY, Yang CY, Scarpellino L, Carrie L, Essex S, *et al.* Fibroblastic reticular cells from lymph nodes attenuate T cell expansion by producing nitric oxide. *PLoS One* **2011**;6:e27618
38. Hinz B, Celetta G, Tomasek JJ, Gabbiani G, Chaponnier C. Alpha-smooth muscle actin expression upregulates fibroblast contractile activity. *Mol Biol Cell* **2001**;12:2730-41
39. Yang CY, Vogt TK, Favre S, Scarpellino L, Huang HY, Tacchini-Cottier F, *et al.* Trapping of naive lymphocytes triggers rapid growth and remodeling of the fibroblast network in reactive murine lymph nodes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2014**;111:E109-18
40. Al-Kharashi LA, Al-Mohanna FH, Tulbah A, Aboussekhra A. The DNA methyltransferase protein DNMT1 enhances tumor-promoting properties of breast stromal fibroblasts. *Oncotarget* **2018**;9:2329-43

41. Qiu W, Hu M, Sridhar A, Opeskin K, Fox S, Shipitsin M, *et al.* No evidence of clonal somatic genetic alterations in cancer-associated fibroblasts from human breast and ovarian carcinomas. *Nat Genet* **2008**;40:650-5
42. Zaidel-Bar R, Zhenhuan G, Luxenburg C. The contractome--a systems view of actomyosin contractility in non-muscle cells. *J Cell Sci* **2015**;128:2209-17
43. Desmouliere A, Geinoz A, Gabbiani F, Gabbiani G. Transforming growth factor-beta 1 induces alpha-smooth muscle actin expression in granulation tissue myofibroblasts and in quiescent and growing cultured fibroblasts. *J Cell Biol* **1993**;122:103-11
44. 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
45. Ren JP, Ying RS, Cheng YQ, Wang L, El Gazzar M, Li GY, *et al.* HCV-induced miR146a controls SOCS1/STAT3 and cytokine expression in monocytes to promote regulatory T-cell development. *J Viral Hepat* **2016**;23:755-66
46. Starr R, Willson TA, Viney EM, Murray LJ, Rayner JR, Jenkins BJ, *et al.* A family of cytokine-inducible inhibitors of signalling. *Nature* **1997**;387:917-21
47. Shields BJ, Hauser C, Bukczynska PE, Court NW, Tiganis T. DNA replication stalling attenuates tyrosine kinase signaling to suppress S phase progression. *Cancer Cell* **2008**;14:166-79
48. Kim HS, Li A, Ahn S, Song H, Zhang W. Inositol Polyphosphate-5-Phosphatase F (INPP5F) inhibits STAT3 activity and suppresses gliomas tumorigenicity. *Sci Rep* **2014**;4:7330
49. van Niel G, D'Angelo G, Raposo G. Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2018**;19:213-28
50. Kan S, Konishi E, Arita T, Ikemoto C, Takenaka H, Yanagisawa A, *et al.* Podoplanin expression in cancer-associated fibroblasts predicts aggressive behavior in melanoma. *J Cutan Pathol* **2014**;41:561-7
51. Quintanilla M, Montero-Montero L, Renart J, Martin-Villar E. Podoplanin in Inflammation and Cancer. *Int J Mol Sci* **2019**;20
52. Choi SY, Bae H, Jeong SH, Park I, Cho H, Hong SP, *et al.* YAP/TAZ direct commitment and maturation of lymph node fibroblastic reticular cells. *Nat Commun* **2020**;11:519
53. Haan S, Margue C, Engrand A, Rolvering C, Schmitz-Van de Leur H, Heinrich PC, *et al.* Dual role of the Jak1 FERM and kinase domains in cytokine receptor binding and in stimulation-dependent Jak activation. *J Immunol* **2008**;180:998-1007
54. Nakazawa Y, Sato S, Naito M, Kato Y, Mishima K, Arai H, *et al.* Tetraspanin family member CD9 inhibits Aggrus/podoplanin-induced platelet aggregation and suppresses pulmonary metastasis. *Blood* **2008**;112:1730-9
55. Martin-Villar E, Fernandez-Munoz B, Parsons M, Yurrita MM, Megias D, Perez-Gomez E, *et al.* Podoplanin associates with CD44 to promote directional cell migration. *Mol Biol Cell* **2010**;21:4387-99

56. Melnikova VO, Bar-Eli M. Inflammation and melanoma metastasis. *Pigment Cell Melanoma Res* **2009**;22:257-67
57. Rathore M, Girard C, Ohanna M, Tichet M, Ben Jouira R, Garcia E, *et al.* Cancer cell-derived long pentraxin 3 (PTX3) promotes melanoma migration through a toll-like receptor 4 (TLR4)/NF-kappaB signaling pathway. *Oncogene* **2019**;38:5873-89
58. Butcher DT, Alliston T, Weaver VM. A tense situation: forcing tumour progression. *Nat Rev Cancer* **2009**;9:108-22
59. Rambow F, Marine JC, Goding CR. Melanoma plasticity and phenotypic diversity: therapeutic barriers and opportunities. *Genes Dev* **2019**;33:1295-318
60. Pelon F, Bourachot B, Kieffer Y, Magagna I, Mermet-Meillon F, Bonnet I, *et al.* Cancer-associated fibroblast heterogeneity in axillary lymph nodes drives metastases in breast cancer through complementary mechanisms. *Nat Commun* **2020**;11:404
61. Faries MB, Thompson JF, Cochran AJ, Andtbacka RH, Mozzillo N, Zager JS, *et al.* Completion Dissection or Observation for Sentinel-Node Metastasis in Melanoma. *N Engl J Med* **2017**;376:2211-22
62. Girard CA, Lecacheur M, Ben Jouira R, Berestjuk I, Diazzi S, Prod'homme V, *et al.* A feed-forward mechanosignaling loop confers resistance to therapies targeting the MAPK pathway in BRAF-mutant melanoma. *Cancer Res* **2020**
63. 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
64. Didier R, Mallavialle A, Ben Jouira R, Domdom MA, Tichet M, Auberger P, *et al.* Targeting the Proteasome-Associated Deubiquitinating Enzyme USP14 Impairs Melanoma Cell Survival and Overcomes Resistance to MAPK-Targeting Therapies. *Mol Cancer Ther* **2018**;17:1416-29
65. Didier R, Mallavialle A, Ben Jouira R, Domdom MA, Tichet M, Auberger P, *et al.* Targeting the Proteasome-Associated Deubiquitinating Enzyme USP14 Impairs Melanoma Cell Survival and Overcomes Resistance to MAPK-Targeting Therapies. *Molecular Cancer Therapeutics* **2018**;17:1416-29
66. Lino Cardenas CL, Henaoui IS, Courcot E, Roderburg C, Cauffiez C, Aubert S, *et al.* miR-199a-5p Is upregulated during fibrogenic response to tissue injury and mediates TGFbeta-induced lung fibroblast activation by targeting caveolin-1. *PLoS Genet* **2013**;9:e1003291
67. Tse JR, Engler AJ. Preparation of hydrogel substrates with tunable mechanical properties. *Curr Protoc Cell Biol*2010.

Fig S1

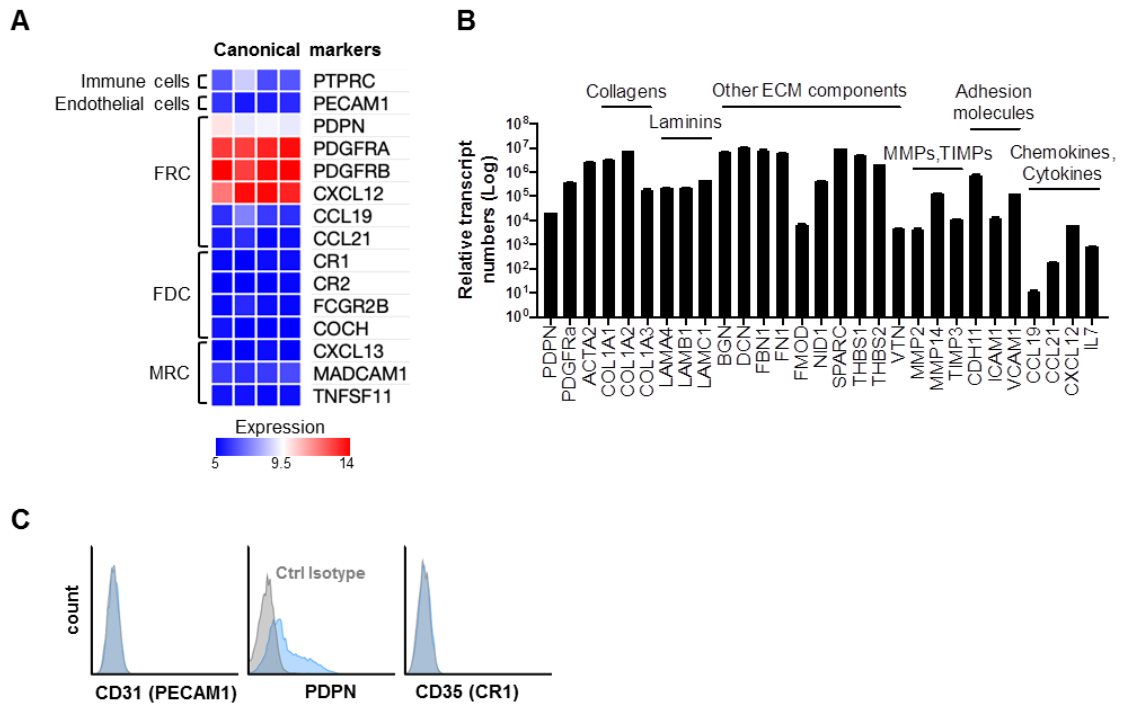


Figure S1. LN-F express the Fibroblastic Reticular Cell (FRC) markers.

- (A) Microarray analysis of LN-F showing the canonical markers expressed by the main cell subsets in the LN: immune cells, endothelial cells, FRC, Follicular Dendritic Cells (FDC) and Marginal Reticular Cells (MRC).
- (B) Representative quantification by qRT-PCR of the expression of FRC-specific markers by LN-F (n = 2, in duplicate; Mean +/- SEM).
- (C) Analysis by flow cytometry of the expression of CD31 (PECAM1), PDPN and CD35 (CR1) on LN-F (in blue, n = 3). The staining with a control isotype mAb is shown (in grey).

Fig 1

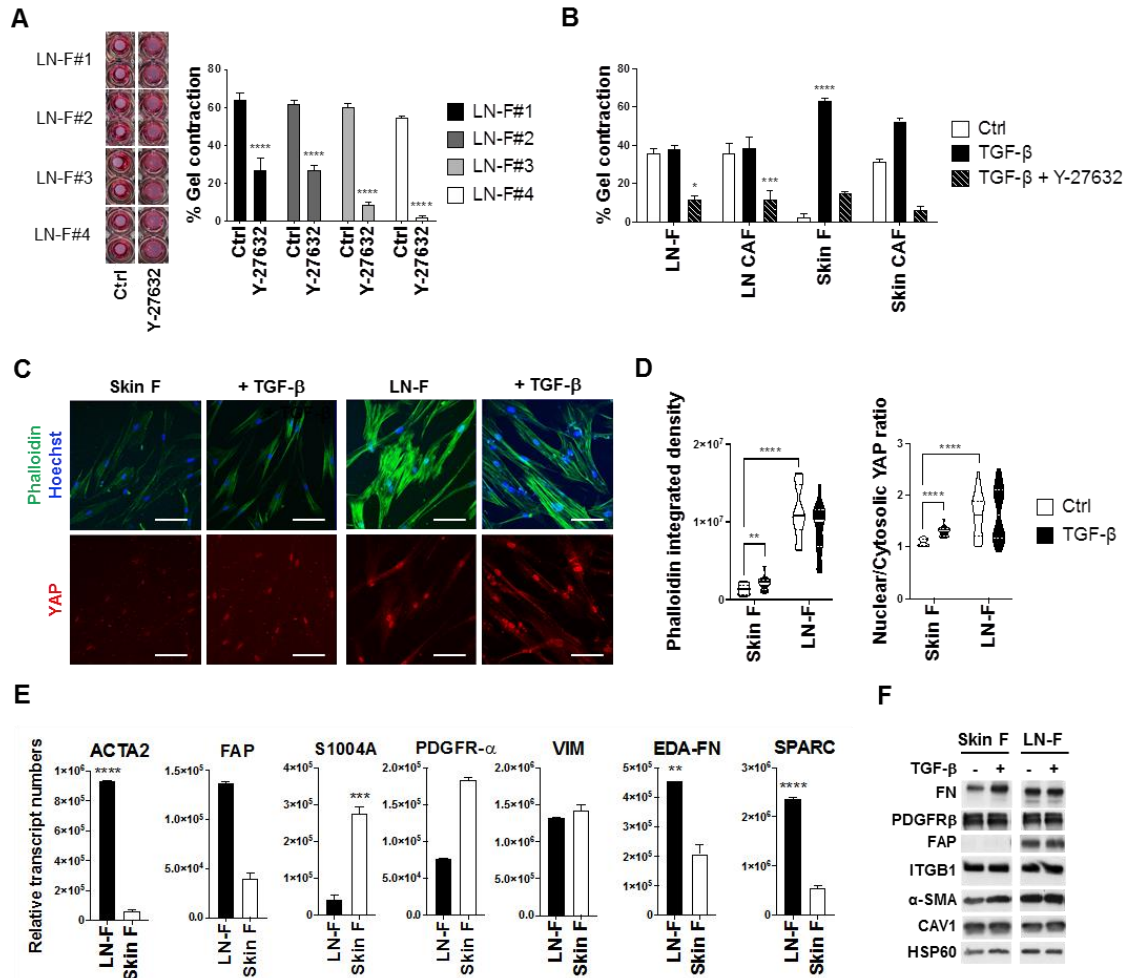


Figure 1. LN-F have a CAF-like phenotype associated with spontaneous contraction and the expression of CAF markers.

(A) Pictures of LN-F from 4 donors embedded in a 3D collagen gel and treated with control medium (Ctrl) and the ROCK inhibitor Y-27632 (10 μ M) for 8 days (left). Quantification of the % gel contraction (in quadruplicate; mean \pm SEM; p-Val (****)<0.0001) (right).

(B) 3D collagen gel contraction induced by LN-F, normal skin F and CAF isolated from skin or LN melanomas and treated with control medium (Ctrl), TGF- β (2ng/ml) and Y-27632 (10 μ M) for 7 days (n = 2 to 7 for each cell type, in triplicate; mean \pm SEM; p-Val (*)<0.05, (***)<0.001, (****)<0.0001).

(C) Immunofluorescence analysis of Phalloidin, Hoechst and YAP in Skin F and LN-F grown for 4 days in control medium or with TGF- β (2ng/ml) (Scale bar = 100 μ m).

(D) Quantification of F-actin fibers (phalloidin integrated density) (n = 19 cells; median \pm quartiles) and YAP localization (n = 22 cells; median \pm quartiles); p-Val (**)<0.01, (****)<0.0001).

(E) Quantification by qRT-PCR of the expression of CAF markers in LN-F and skin F (n = 2, in duplicate; mean \pm SEM; p-Val (**)<0.01, (***)<0.001, (****)<0.0001).

(F) Immunoblotting of CAF markers (FN, PDGFR β , FAP, ITGB1, α -SMA and CAV1) in Skin F and LN-F cultured for 4 days in control medium (Ctrl) or treated by TGF- β (2ng/ml). HSP60 is used as a loading control.

Fig 2

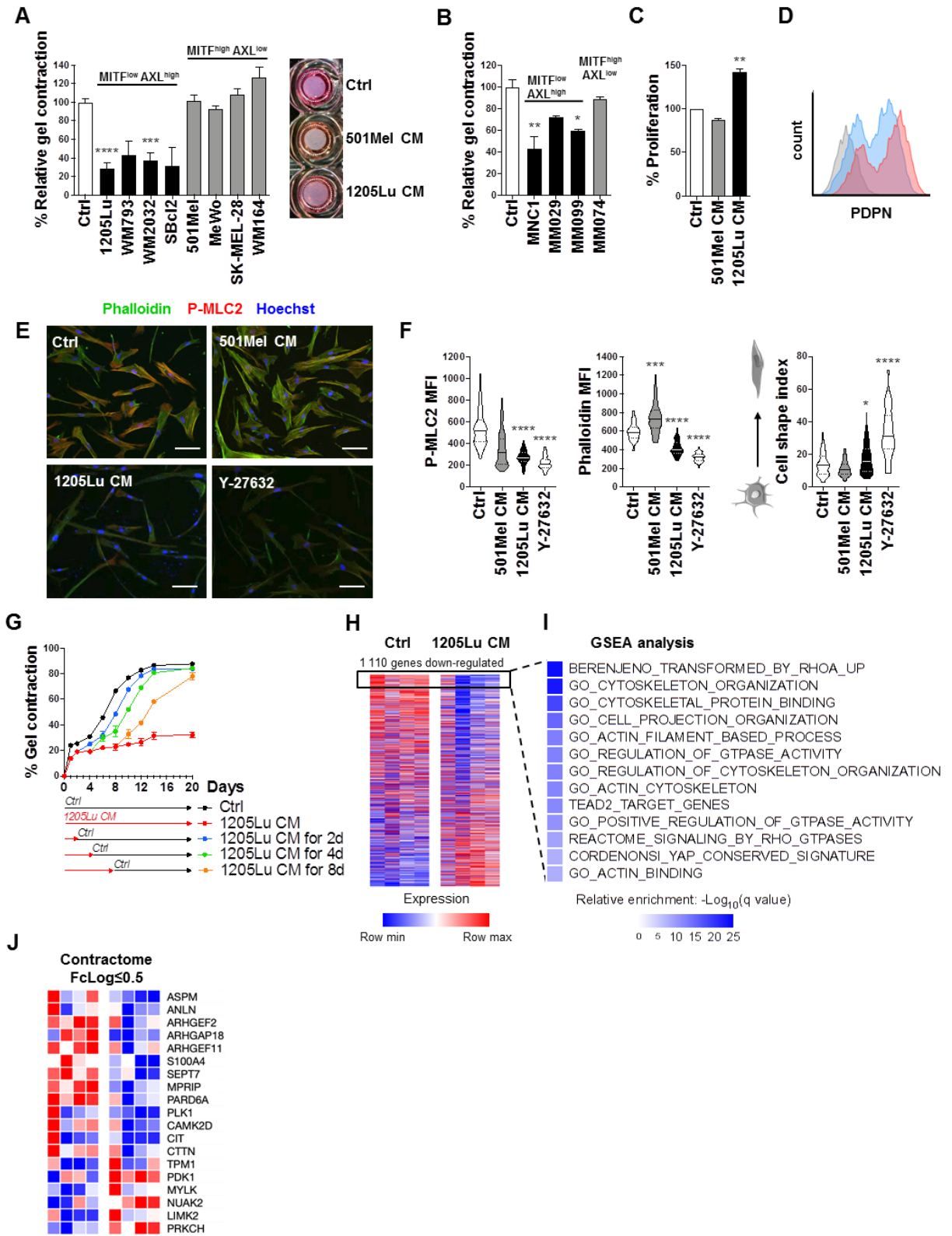


Figure 2. Factors secreted by MITF^{low} AXL^{high} invasive melanoma cells inhibit the contraction of the LN-F actomyosin cytoskeleton.

- (A) Representative picture and quantification of LN-F contraction of a 3D collagen gel after 7 days culture with Ctrl medium or CM from invasive MITF^{low} AXL^{high} (black) or proliferative MITF^{high} AXL^{low} (grey) melanoma cell lines (n = 3, in triplicate; mean +/- SEM; p-Val (***)<0.001, (****)<0.0001).
- (B) LN-F gel contraction after 7 days incubation with CM from invasive MITF^{low} AXL^{high} (black) or proliferative MITF^{high} AXL^{low} (grey) short term patient melanomas (n = 3, in triplicate; mean +/- SEM; p-Val (*)<0.05, (**)<0.01).
- (C) Proliferation of LN-F after 6 days with ctrl medium, 501Mel CM or 1205Lu CM (n = 2, in triplicate; mean +/- SEM; p-Val (**)<0.01).
- (D) Representative FACS analysis of PDPN surface expression on LN-F cultured for 5 days with 1205Lu CM (in red) or ctrl medium (in blue). The staining with a control isotype mAb is shown in grey (n = 4).
- (E) Immunofluorescence analysis of phalloidin, P-MLC2 and Hoechst in LN-F grown for 7 days with 1205Lu or 501Mel CM (Scale bar = 100 μ m).
- (F) Quantification of mean fluorescence intensities (MFI) of active pS19 MLC2 (P-MLC2), F-actin stress fibers (phalloidin) and the cell shape index (n = 45 cells; median +/- quartiles; p-Val (*)<0.05, (***)<0.001, (****)<0.0001).
- (G) Time-lapse analysis of LN-F gel contraction (n = 2, in quadruplicate; mean +/- SEM). The 1205Lu CM is replaced by ctrl medium after 2, 4 or 8 days.
- (H) Microarray comparison of genes expressed in Ctrl and 1205Lu CM-treated LN-F. The most down-regulated genes in 1205Lu-reprogrammed LN-F (with LogFC \leq - 0.5) are surrounded.
- (I) Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) of the 110 most down-regulated genes in 1205Lu-reprogrammed LN-F.
- (J) Genes involved in the actomyosin contractility in non-muscle cells (contractome) most significantly up- or down-regulated (pVal <0.05) in 1205Lu-reprogrammed LN-F.

Fig S2

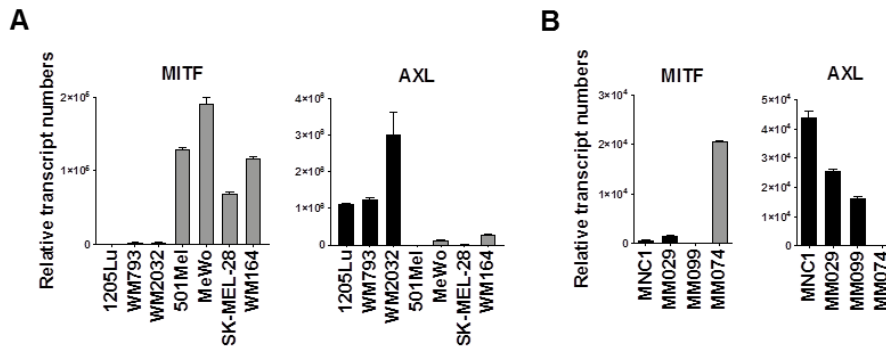


Figure S2. Characterization of the proliferative / invasive signature of melanoma cells.

Quantification by qRT-PCR of the expression of MITF and AXL genes in (A) melanoma cell lines or (B) short term melanomas isolated from patients (n = 2, in duplicate; mean +/- SEM).

Fig S3

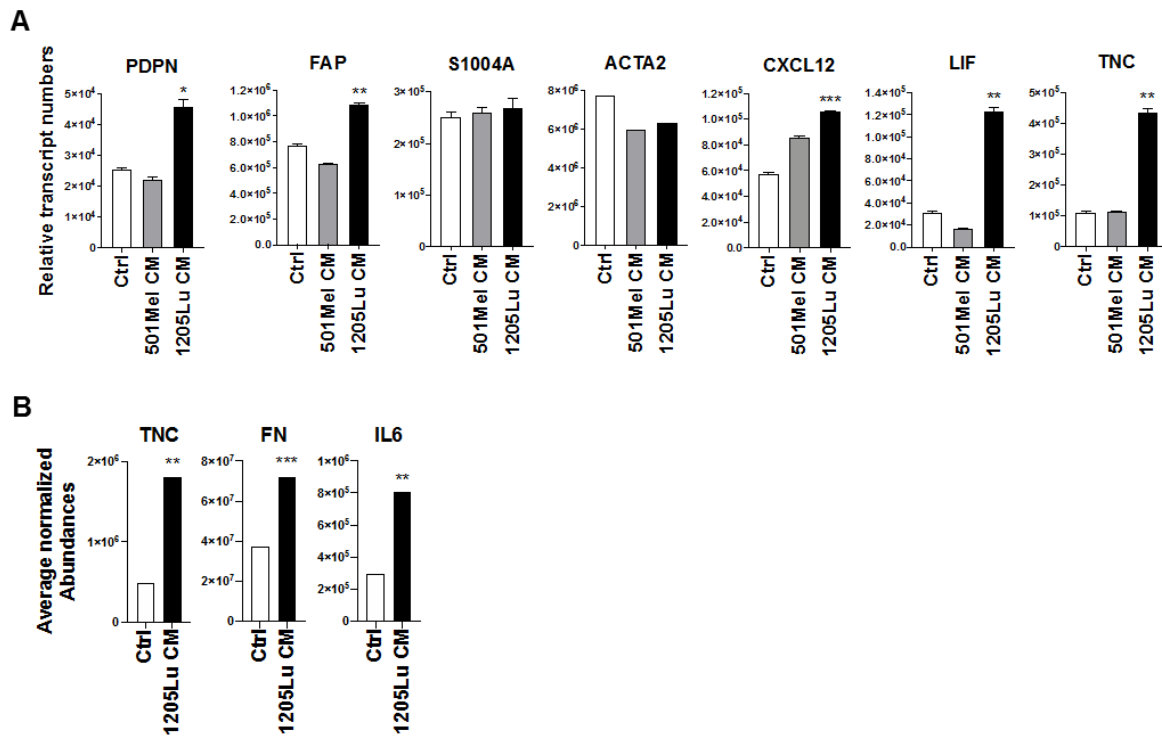


Figure S3. Factors secreted by the 1205Lu invasive melanoma cell line activate LN-F.

(A) Analysis by qRT-PCR of fibroblast activation markers expressed by LN-F cultured for 2 days in ctrl medium, 501Mel CM or 1205Lu CM (n = 2, in duplicate; Mean +/- SEM; p-Val (*) < 0.05, (**) < 0.01, (***) < 0.001).

(B) Detection by mass spectrometry of TNC, FN and IL6 secreted by LN-F treated for 7 days with ctrl medium or 1205Lu CM (n = 2, in triplicate; Mean +/- SEM; p-Val (**) < 0.01, (***) < 0.001).

Fig S4

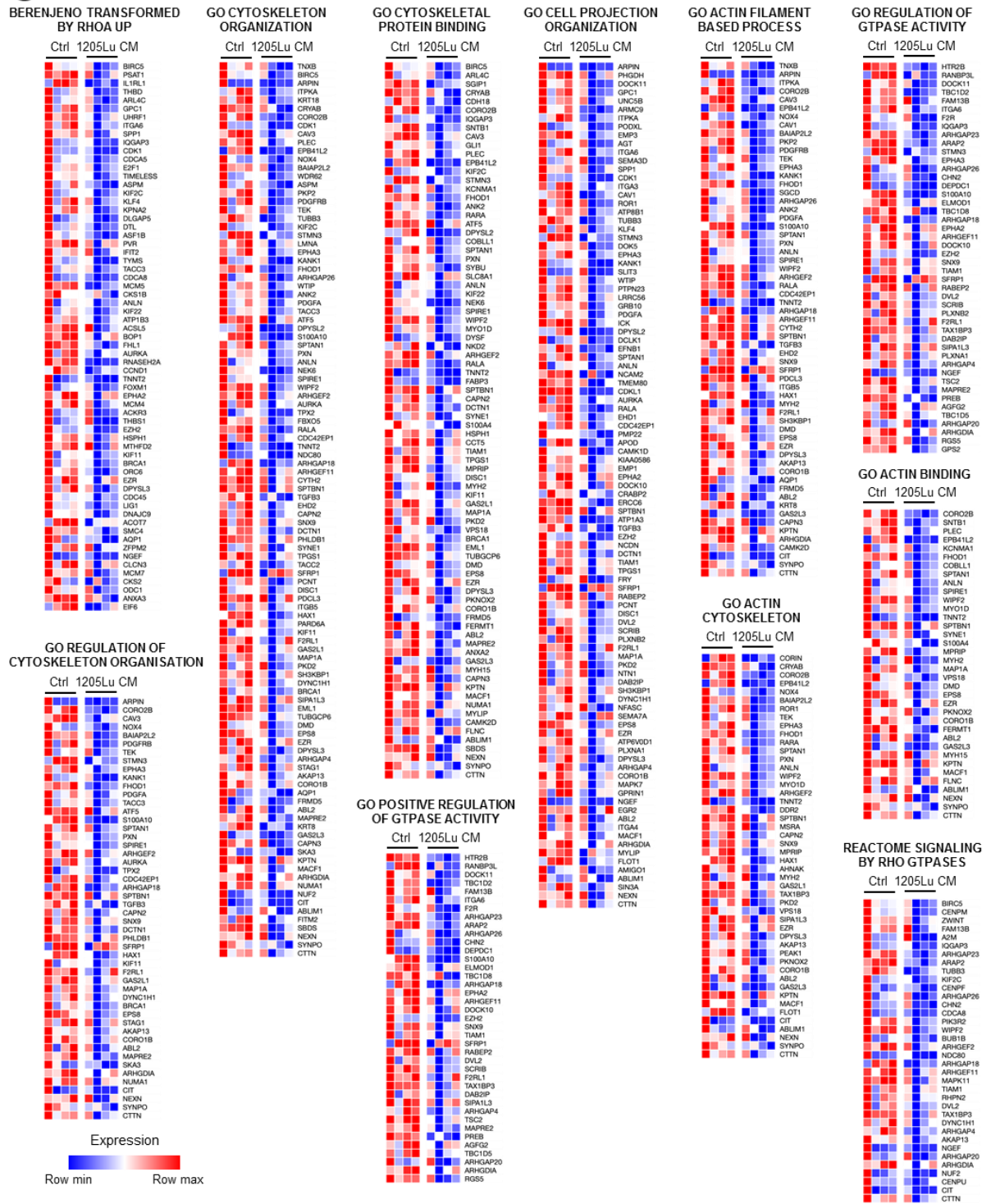


Figure S4. Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) of genes down-regulated in LN-F treated with 1205Lu CM compared to Ctrl LN-F.

Genes expressed by Ctrl LN-F and LN-F treated for 48h with 1205Lu CM were compared by microarray analysis. Genes specifically down-regulated in 1205Lu CM-treated LN-F with $\text{LogFC} \leq -0.5$ were analyzed by GSEA. Pathways with the higher relative enrichment and involved in fibroblast contraction are shown.

Fig 3

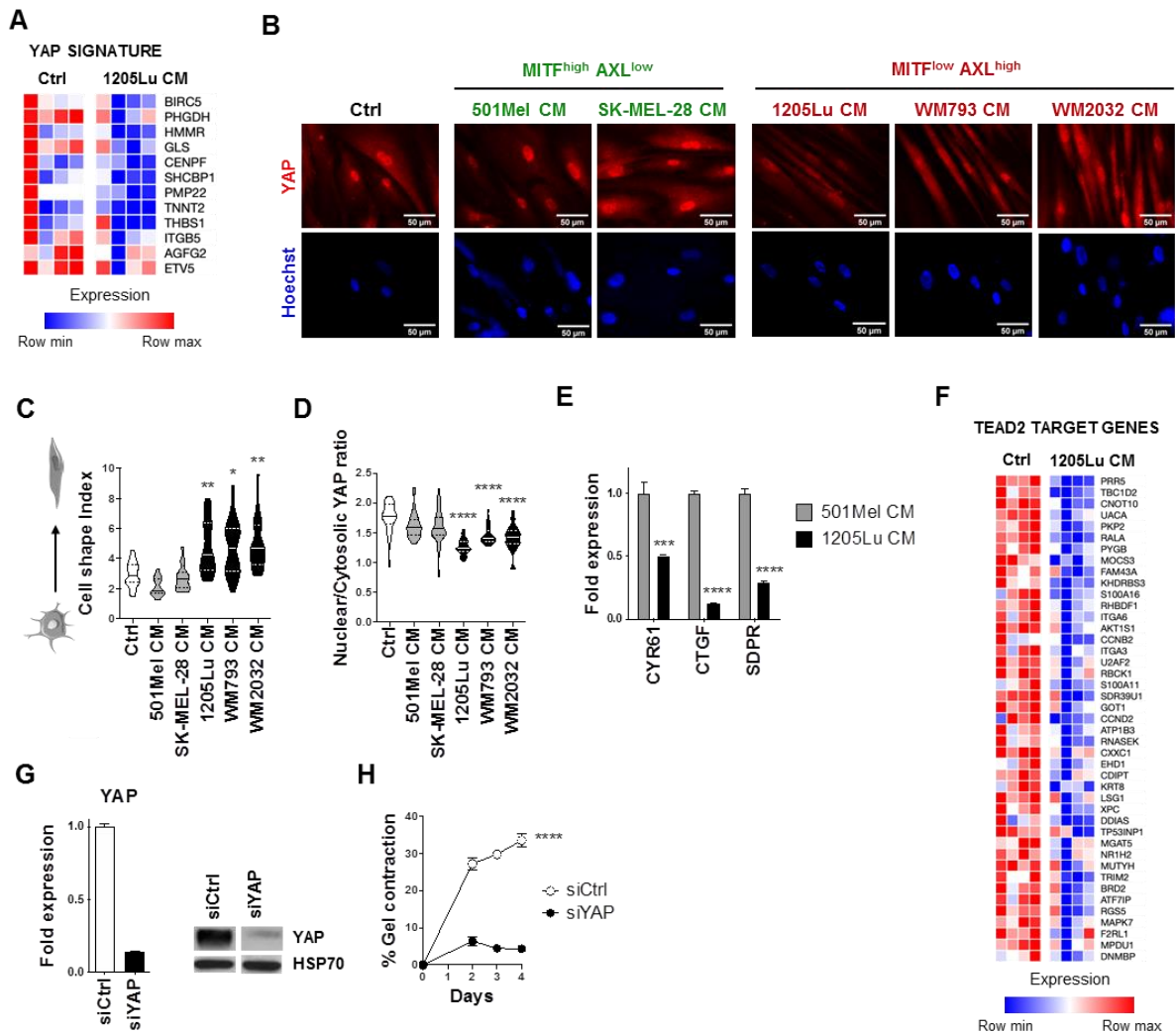


Figure 3. The inhibition of LN-F contraction induced by invasive melanoma CM is associated with decreased YAP activity.

(A) Top genes down-regulated in 1205Lu CM-treated LN-F in the Cordenonsi YAP conserved Signature ($\text{LogFC} \leq -0.5$).

(B) Immunofluorescence analysis of YAP and Hoechst localization in LN-F plated on 2.8 kPa hydrogels and treated 4 days with ctrl medium, proliferative or invasive melanoma CM. Scale bar = 50 μm .

(C) Analysis of the cell shape index of LN-F plated on 2.8 kPa hydrogels and treated 4 days with ctrl medium, proliferative or invasive melanoma CM ($n = 20$ cells; median \pm quartiles; $p\text{-Val}$ ($*$) <0.05 , ($**$) <0.01).

(D) Quantification of YAP nuclear and cytosolic localization in LN-F plated on 2.8 kPa hydrogels and treated 4 days with ctrl medium, proliferative or invasive melanoma CM ($n = 32$ cells; median \pm quartiles; $p\text{-Val}$ ($****$) <0.0001).

(E) Representative quantification by qRT-PCR of the expression of YAP target genes in LN-F plated on 2.8 kPa hydrogels and treated 4 days with 501Mel CM or 1205Lu CM ($n = 2$, in duplicate; mean \pm SEM; $p\text{-Val}$ ($***$) <0.001 , ($****$) <0.0001).

(F) Top TEAD2 target genes down-regulated in 1205Lu CM-treated LN-F ($\text{LogFC} \leq -0.5$, $p\text{Val} \leq 0.05$).

(G) Quantification by qRT-PCR (left) and immunoblot (right) of the extinction of YAP expression by siRNA (siYAP) in the experiment shown in F. A ctrl siRNA (siCtrl) is used as a ctrl of transfection ($n = 2$, in duplicate; mean \pm SEM).

(H) Quantification of 3D Collagen contraction assay of LN-F transfected with siCtrl or siYAP ($n = 2$, in quadruplicate; $p\text{-Val}$ ($****$) <0.0001).

Fig S5

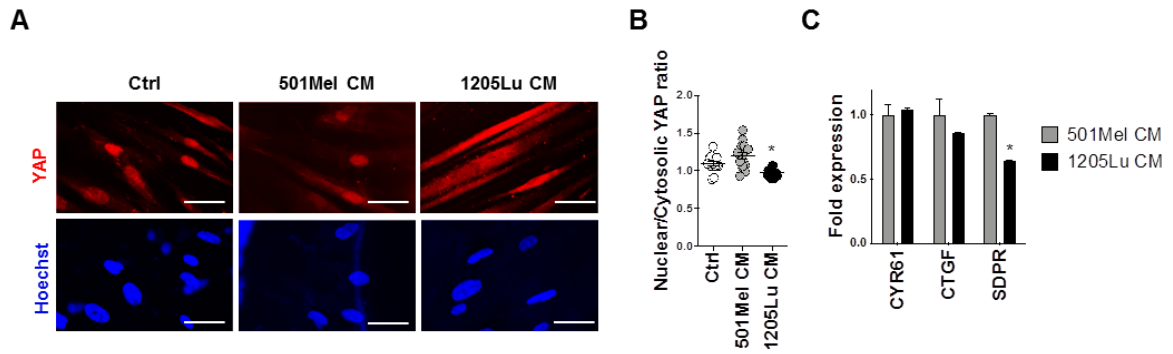


Figure S5. 1205Lu-mediated inhibition of LN-F contraction is associated with decreased YAP activity.

(A) Immunofluorescence analysis of YAP and Hoechst localization in LN-F plated on 0.2 kPa hydrogels and treated 4 days with 501Mel CM or 1205Lu CM. Scale bar = 50 μ m.

(B) Quantification of YAP nuclear and cytosolic localization in LN-F plated on 0.2 kPa hydrogels and treated 4 days with 501Mel CM or 1205Lu CM (n = 15 cells, mean \pm SEM, p-Val (*) < 0.05).

(C) Quantification by qRT-PCR of the expression of YAP target genes by LN-F plated on 0.2 kPa hydrogels and treated 4 days with 501Mel CM or 1205Lu CM (n = 2 in duplicate, mean \pm SEM, p-Val (*) < 0.05).

Fig S6

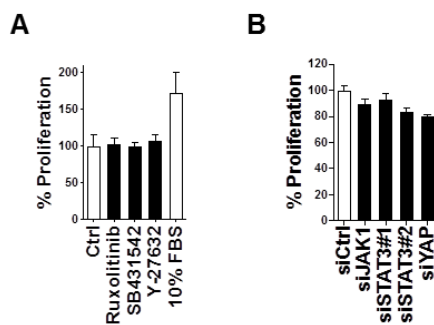


Figure S6. Drugs and siRNAs used in gel contraction assays don't affect LN-F survival.

(A) Proliferation of LN-F incubated 7 days with Ruxolitinib (10 μ M), SB431542 (10 μ M) or Y-27632 (10 μ M) (n = 2 in quadruplicate, mean \pm SEM).

(B) Proliferation for 6 days of LN-F transfected with ctrl siRNA or siRNAs depleting JAK1 (siJAK1), STAT3 (siSTAT3#1 and #2) or YAP (siYAP), expression (n = 2, in duplicate, mean \pm SEM).

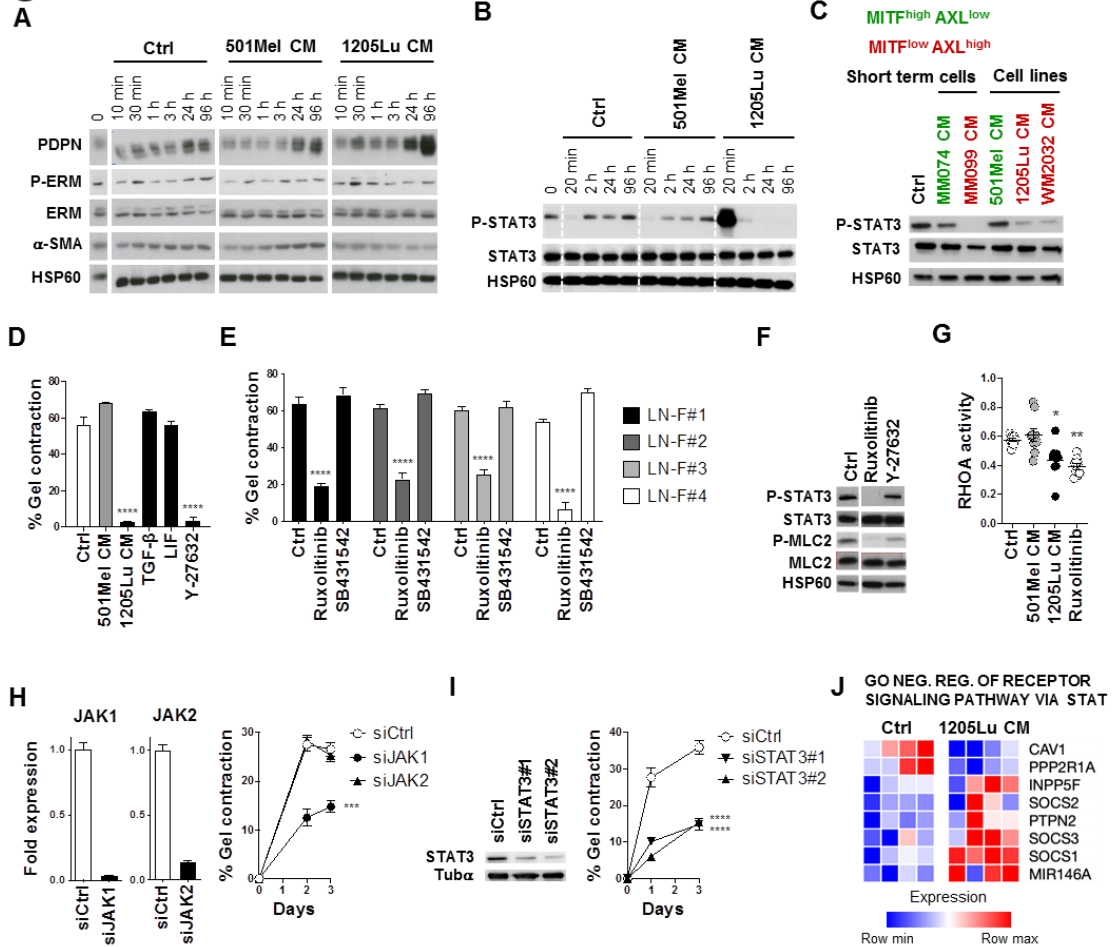
Fig 4

Figure 4. The JAK1-STAT3 pathway is inhibited by invasive melanoma CM and controls LN-F contraction. (A) Immunoblotting of PDPN, P-ERM, ERM and α -SMA in LN-F cultured in Ctrl medium, 501Mel CM or 1205Lu CM for 10 min, 30 min, 1 h, 3 h, 24 h and 96 h. HSP60 is used as a loading control. (B) Immunoblotting of P-STAT3 and STAT3 in LN-F cultured in Ctrl medium, 501Mel CM or 1205Lu CM for 20 min, 2 h, 24 h and 96 h. HSP60 is used as a loading control. (C) Immunoblotting of P-STAT3 and STAT3 in LN-F cultured for 96 h in Ctrl medium or CM from short term isolated melanomas (MM074 and MM099) or melanoma cell lines (501Mel, 1205Lu, WM2032). HSP60 is used as a loading control. (D) Quantification of gel contraction by LN-F treated by Ctrl medium, 501Mel CM, 1205Lu CM, TGF- β 1 (2 ng/ml), LIF (2 ng/ml) or Y-27632 (10 μ M) for 6 days (n = 3, in triplicate; mean \pm SEM; p-Val (****)<0.0001). (E) Quantification of gel contraction by LN-F treated by 10 μ M of TGF- β R1 inhibitor (SB431542) or Ruxolitinib for 8 days (n = 3, in quadruplicate; mean \pm SEM; p-Val (****)<0.0001). (F) Immunoblotting of P-STAT3, STAT3, P-MLC2 and MLC2 in LN-F treated 4 days by Ruxolitinib (10 μ M) or Y-27632 (10 μ M). HSP60 is used as a loading control. (G) RHOA activity measured by G-LISA assay in cell lysates of LN-F treated 4 days with 501Mel CM, 1205Lu CM or Ruxolitinib (10 μ M) (n = 3, in triplicate; mean \pm SEM; p-Val (*)<0.05, (**)<0.01). (H) Quantification by qRT-PCR of the extinction of JAK1 and JAK2 expression by siRNAs (siJAK1 and siJAK2) (n = 2, in duplicate) (left) and quantification of gel contraction by LN-F transfected with siJAK1 or siJAK2 (n = 2, in triplicate; mean \pm SEM; p-Val (**)<0.01) (right). A ctrl siRNA (siCtrl) is used as a ctrl of transfection. (I) Immunoblotting of STAT3 and Tubulin α 2 days after the extinction of STAT3 expression by 2 siRNAs (siSTAT3#1 and siSTAT3#2) (left). Quantification of gel contraction by LN-F after siRNA-mediated inhibition of STAT3 (n = 2, in quadruplicate; mean \pm SEM; p-Val (****)<0.0001) (right). siCtrl is used as a control of siRNA transfection. (J) Differentially expressed genes between Ctrl and 1205Lu CM-treated LN-F identified in the GO negative regulation of receptor signaling pathway via STAT.

Fig 5

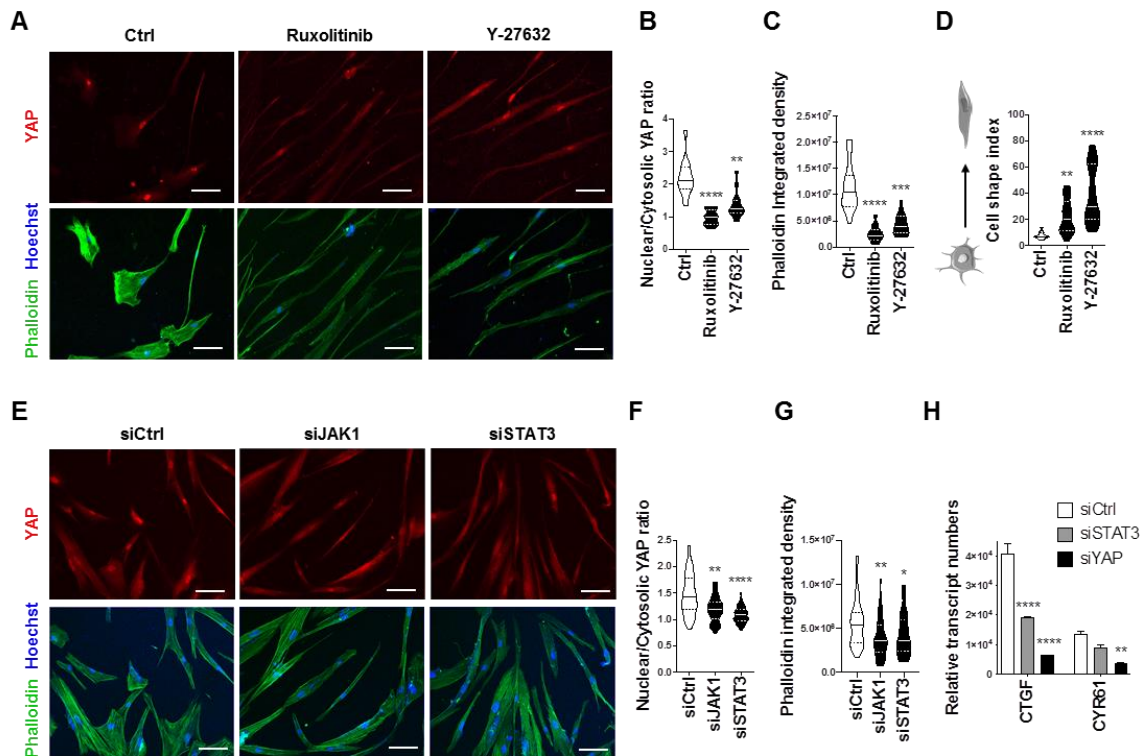


Figure 5. The JAK1-STAT3 pathway controls YAP and the polymerization of the actin cytoskeleton.

(A) Immunofluorescence analysis of YAP, Phalloidin and Hoechst in LN-F treated for 4 days with Ruxolitinib (10 μ M) or Y-27632 (10 μ M). Scale bar = 100 μ m.

(B) Quantification of YAP localization (n = 13 cells; median +/- quartiles; p-Val (**)<0.01, (****)<0.0001).

(C) Quantification of F-actin stress fibers (phalloidin integrated density) (n = 15 cells; median +/- quartiles; p-Val (***)<0.001, (****)<0.0001).

(D) Quantification of the cell shape index (n = 20 cells; median +/- quartiles; p-Val (**)<0.01, (****)<0.0001).

(E) Immunofluorescence analysis of YAP, Phalloidin and Hoechst in LN-F depleted from YAP (siYAP) or STAT3 (siSTAT3) expression by siRNA. The siCtrl siRNA is used as a control of transfection. Scale bar = 100 μ m.

(F) Quantification of YAP localization (n = 50 cells; median +/- quartiles; p-Val (**)<0.01, (****)<0.0001).

(G) Quantification of F-actin stress fibers (phalloidin integrated density) (n = 44 cells; median +/- quartiles; p-Val (*)<0.05, (**)<0.01).

(H) Quantification by qRT-PCR of the expression of YAP target genes (n = 2, in duplicate; mean +/- SEM; p-Val (**)<0.01, (****)<0.0001).

Fig 6

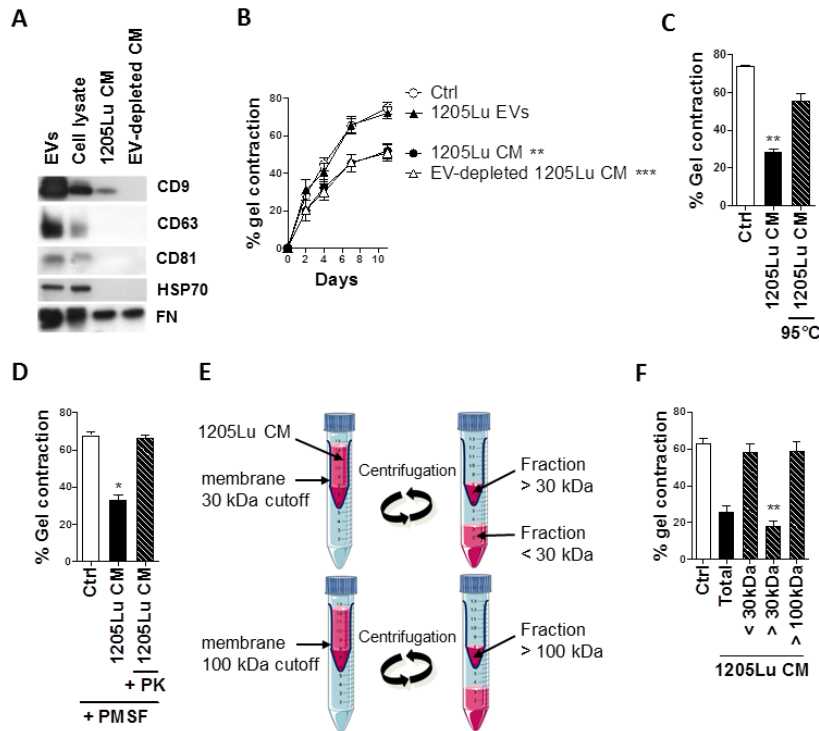


Figure 6. Soluble proteins secreted by invasive melanoma inhibit LN-F contraction.

(A) Extravesicles (EVs) were isolated from the 1205Lu CM. The immunoblot shows the Evs-specific markers CD9, CD63, CD81 and HSP70 increased in 1205Lu EVs (15 μ g) compared to the 1205Lu cell lysate (15 μ g), and absent from the EV-depleted 1205Lu CM. FN is present in all samples and is used as a loading control.

(B) Time-lapse gel contraction of LN-F incubated with ctrl medium or samples immunoblotted in A, i.e. 1205Lu CM, EV-depleted 1205Lu CM, and 1205Lu EVs (5 μ g/ml) (n = 2, in quadruplicate; mean +/- SEM; p-Val (**)<0.01, (***)<0.001).

(C) Gel contraction assay of LN-F treated with 1205Lu CM or 95°C heated 1205Lu CM (n = 3, in quadruplicate; mean +/- SEM; p-Val (**)<0.01).

(D) Gel contraction assay of LN-F treated with Ctrl medium, 1205Lu CM or 1205Lu CM treated with Proteinase K (PK). The proteases were inactivated in the three conditions with phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) before incubation with LN-F (n = 2, in triplicate; mean +/- SEM; p-Val (*)<0.05).

(E) The 1205Lu CM was fractionated by centrifugation using 30 kDa or 100 kDa cutoff membranes. The 1205Lu CM fractions with 1205Lu factors below 30 kDa (< 30 kDa), above 30 kDa (> 30 kDa) and above 100 kDa (> 100 kDa) were harvested and tested in the gel contraction assay shown in F.

(F) Gel contraction assay of LN-F treated with the full 1205Lu CM or 1205Lu fractions below 30 kDa (< 30 kDa), above 30 kDa (> 30 kDa) and above 100 kDa (> 100 kDa) (n = 4, in quadruplicate; mean +/- SEM; p-Val (**)<0.01).

Targeting DDR1 and DDR2 overcomes matrix-mediated melanoma cell adaptation to BRAF-targeted therapy

Ilona Berestjuk^{1,2}, Margaux Lecacheur^{1,2}, Serena Diazzi^{1,2}, Christopher Rovera^{1,2}, Virginie Prod'homme^{1,2}, Aude Mallavialle^{1,2}, Frédéric Larbret^{1,2}, Sabrina Pisano³, Stéphane Audebert⁴, Thierry Passeron^{1,5}, Cédric Gaggioli³, Christophe A. Girard^{1,2}, Marcel Deckert^{1,2*} and Sophie Tartare-Deckert^{1,2*}

¹Université Côte d'Azur, INSERM, C3M, 06204 Nice, France

²Team 11, Equipe labellisée Ligue Contre le Cancer 2016, 06204 Nice, France

³Université Côte d'Azur, CNRS, INSERM, IRCAN, 06107 Nice, France

⁴Aix-Marseille University, CNRS, INSERM, Institut Paoli-Calmettes, CRCM, 13273 Marseille, France

⁵Université Côte d'Azur, Centre Hospitalier Universitaire de Nice, Department of Dermatology, 06204 Nice, France.

*Equal contribution as co-last authors

Running title: DDR1/2 in melanoma resistance

Keywords: melanoma, extracellular matrix, DDR, NF- κ B2, targeted therapies, resistance

Corresponding Author: Sophie Tartare-Deckert tartare@unice.fr, Inserm UMR1065/C3M, 151 Route de Ginestière BP2 3194, F-06204 Nice cedex 3.

Word count : 7,403

Abstract

Resistance to BRAF and MEK inhibitors in BRAF^{V600E} mutant melanomas remains a major obstacle that limits patient benefit. Microenvironment components including the extracellular matrix (ECM) can support tumor cell adaptation and tolerance to targeted therapies, however the underlying mechanisms remain poorly understood. Here, we investigated the process of matrix-mediated drug resistance (MM-DR) in response to BRAF inhibition in melanoma. We demonstrate that physical and structural cues from fibroblast-derived ECM abrogate anti-proliferative responses to BRAF/MEK inhibition. MM-DR is mediated by the drug-induced clustering of DDR1 and DDR2, two tyrosine kinase collagen receptors. Genetic depletion and pharmacological inhibition of DDR1 and DDR2 overcome ECM-mediated resistance to BRAF inhibition. In melanoma xenografts, targeting DDRs by Imatinib enhances BRAF inhibitor efficacy, counteracts drug-induced collagen remodeling and delays tumor relapse. Mechanistically, DDR-mediated MM-DR fosters a targetable pro-survival NIK/IKK α /NF- κ B2 pathway. Our study reveals a novel role of collagen-rich matrix and DDRs in tumor cell adaptation and therapy resistance, thus providing important insights into environment-mediated drug resistance and a pre-clinical rationale for targeting DDR1/2 signaling in combination with BRAF-targeted therapy in melanoma.

Introduction

One of the hallmarks of cancer cells is their remarkable ability to adapt to microenvironmental influences such as the nature of the stroma, including the extracellular matrix (ECM) and therapeutic stress (Pickup et al., 2014). This is particularly true for malignant skin melanoma, which is one of the most aggressive human cancers and refractory diseases (Shain & Bastian, 2016a). Approximately 50% of skin melanomas carry activating mutations in the *BRAF* oncogene, leading to the activation of the mitogen-activated protein kinase (MAPK)/ERK pathway. Inhibition of the *BRAF*^{V600E/K} oncoprotein by BRAF inhibitors (BRAFi) such as Vemurafenib has markedly improved clinical outcome of patients (Flaherty et al., 2012). Despite this, durable responses are rare, and most patients relapse within a year of beginning the treatment. Significant prolonged benefit can be achieved by combining BRAFi and MEK (MAPK/ERK kinase) inhibitors (MEKi) such as Trametinib, yet the development of drug resistance remains the most common clinical outcome (Robert et al., 2019). Acquired resistance to targeted drugs involves mostly genetic alterations of key intracellular regulators of the MAPK signaling pathway, leading to restoration of the pathway and non-genetic alterations that are commonly associated with transcriptional reprogramming and phenotype switching from a “proliferative” to an “invasive” cell state characterized by low expression of MITF and SOX10 and high levels of AXL (Rambow et al., 2019). Such adaptive responses to BRAF pathway inhibition are thought to precede mutation-driven acquired resistance (Smith et al., 2016). However, in addition to mechanisms of resistance intrinsic to the cancer cell, dynamic, *de novo* mechanisms exist, which are orchestrated by the tumor microenvironment and occur during cell adaptation to therapy. Environment-mediated drug resistance (EM-DR) thus appears as an important contributor of cancer cell escape to therapies (Meads et al., 2009). This process has initially been described in multiple myeloma and other hematopoietic malignancies and has been related to minimal residual disease. This phenomenon is gaining importance in the field of melanoma with several studies reporting the involvement of stroma-derived factors in adaptive response and resistance to targeted therapies (Fedorenko et al., 2015, Hirata et al., 2015, Kaur et al., 2016, Straussman et al., 2012, Young et al., 2017). Given the key role of EM-DR enabling the emergence of genetic resistance, an understanding and further identification of EM-DR mechanisms in melanoma may help to develop more effective therapeutic strategies, thereby increasing the efficacy of targeted therapies.

Tumors are complex and adaptive ecosystems that are affected by numerous stromal components that enhance tumor phenotypes and therapy resistance. Cancer-associated fibroblasts (CAFs) are activated fibroblasts and the primary producers of ECM, a highly dynamic structural framework of macromolecules, providing both biochemical and biomechanical cues required for tumor progression (Kalluri, 2016). The ECM is primarily composed of fibrillar and non-fibrillar collagens, hyaluronic acid, proteoglycans, and adhesive glycoproteins such as fibronectin, thrombospondins and SPARC. The ECM also contains matrix-remodeling enzymes and other ECM-associated proteins and acts as a reservoir for cytokines and growth factors. Interactions between cells and ECM elicit intracellular signaling pathways and regulate gene transcription, mainly through cell-surface adhesion receptors including integrins and discoidin domain receptors (DDRs). DDR1 and DDR2 constitute of a unique subfamily of receptor tyrosine kinases and have been identified as non-integrin collagen receptors (Leitinger, 2014, Shrivastava et al., 1997, Vogel et al., 1997). DDR1 and DDR2 are differentiated from each other by their relative affinity for different types of collagens. DDR1 is activated by both fibrillar and non-fibrillar collagens, whereas DDR2 is activated only by fibrillar collagens. Furthermore, their expression and function is associated with fibrotic diseases and cancers. DDR1 or DDR2 are known to control tumor cell proliferation, and invasion, depending on the tumor type and the nature of the microenvironment (Valiathan et al., 2012). However, the functional role of DDR1 or DDR2 kinase activity in mediating sensitivity to anti-cancer therapies and tumor resistance is poorly documented.

Adhesion of tumor cells to ECM is one of the components of EM-DR. However, the influence of matrix-mediated drug resistance (MM-DR) in response to targeted therapies and the nature of ECM receptors driving the MM-DR phenotype in melanoma have not been addressed in detail. To model the contribution of the ECM in melanoma cell responses to BRAF and MEK inhibition, we generated fibroblast-derived 3D ECM from fibroblasts isolated from patient-derived biopsies (melanoma-associated fibroblasts, MAF) and analyzed the process of MM-DR with the aim to identify novel opportunities for microenvironment-targeted therapies. We show that through the pro-survival non-canonical NF- κ B2 pathway DDR1 and DDR2 are key mediators of MM-DR in melanoma. Our findings reveal a previously unidentified role of these collagen-activated tyrosine kinase receptors in mediating BRAF inhibitor tolerance and support the rationale to inhibit DDR1 and DDR2 signaling, which disrupts the therapy-resisting properties of the matrix microenvironment. The use of DDR1/2 inhibitors in a novel combinatorial

therapeutic strategy may be beneficial for melanoma patients in overcoming resistance to BRAF-targeted therapy.

Results

Fibroblast-derived 3D ECM confers drug-protective action to melanoma cells against anti-BRAF^{V600E} therapies

To investigate the potential contribution of MM-DR to targeted therapies in BRAF-mutated melanoma cells, we employed an *in vitro* model of de-cellularized cell-derived 3D ECMs to generate native-like matrices that mimic many structural and biomolecular features typically found *in vivo* (Cukierma et al., 2001). We selected human primary fibroblasts obtained from healthy individuals or purified from patient metastatic melanoma biopsies (melanoma associated fibroblasts, MAFs) and originating from the skin or lymph nodes (LN). The different fibroblast cultures were functionally tested in a 3D collagen matrix contraction assay, which showed that unlike human dermal fibroblasts (HDF), skin and LN MAFs displayed actomyosin contractile activity. Similarly to MAFs, LN normal fibroblasts known as fibroblastic reticular cells (FRC) are myofibroblast-like cells (Fletcher et al., 2015) that showed high propensity to contract collagen (Fig 1A). Cell-derived matrices were then generated denuded of cells and their composition, architecture and rigidity were analyzed using proteomic and microscopic approaches. In our experimental conditions, compared to HDFs, MAFs and FRCs produced and assembled a dense 3D ECM composed of oriented collagen and fibronectin fibers, as shown by picosirius red and immunofluorescence staining of the ECMs (Fig 1B). Proteomic analysis of the different fibroblast-derived ECMs further documented the molecular composition of these matrices, showing enrichment for several types of collagens (Fig. 1C) and core matrisome components including glycoproteins, proteoglycans as well as ECM regulators and ECM-associated proteins (Supplementary Fig S1). Atomic force microscopy (AFM) analysis of ECM stiffness, revealed values for MAF and HDF matrices that were within range of previous observations (Kaukonen et al., 2016) (Fig 1D). We noticed that matrices generated from FRCs and MAFs were stiffer than HDF-derived ECM. Collectively, these observations validate the use of our experimentally derived matrices for functional studies. Next, we tested the effectiveness of the different fibroblast-derived ECMs to protect BRAF^{V600E}-mutated melanoma cells against

the anti-proliferative effect of BRAF oncogenic pathway inhibition. We therefore developed a drug protection assay based on the culture of melanoma cells stably expressing a fluorescent nuclear label cultured on fibroblast-derived matrices (Fig 2A). Tumor cells were then treated with different drugs targeting the mutant BRAF/MAPK pathway (Fig 2B). Cell proliferation was monitored using live cell time-lapse imaging and quantified by counting the number of fluorescent nuclei. Cell growth inhibition induced by BRAFi was abrogated when 501MEL melanoma cells were cultured on MAF-derived ECM, in sharp contrast to standard cell culture conditions where cells were plated either on plastic or on purified collagen I (Fig 2C). Thus, MMDR relies on the topological and molecular features of the ECM. In line with the organization of the 3D matrices depicted in Fig 1, drug protection assays against Vemurafenib revealed that MAF- and FRC-derived matrices display higher protective abilities compared to HDF-derived ECM conferred protection (Fig 2D). Note that throughout the rest of this study we used either FRC- or MAF-derived matrices that exhibit similar functional drug protective activity. Importantly, FRC-derived ECM competently protected 1205Lu cells from the combination of Vemurafenib and Trametinib, which represents the current standard treatment for mutant BRAF melanoma cells (Fig 2E). Cell cycle analysis further showed that experimentally produced ECM from FRCs prevented the G0/G1 cell cycle arrest, induced by the targeted therapy in contrast to the cell culture conditions on plastic (Fig 2F). The ECM therefore transmits signals that prevent the cytostatic action of MAPK pathway inhibitors. At the molecular level, ECM-mediated therapeutic escape of 1205Lu cells from BRAF inhibition was associated with sustained levels of the proliferation markers phosphorylated Rb and E2F1, the survival protein Survivin, and low levels of the cell cycle inhibitor p27KIP1, together with decreased phosphorylation of MEK1/2 and ERK1/2 in presence of the drugs (Fig 2G). Matrices generated by MAFs in addition significantly prevented the inhibitory effect of the dual RAF/MEK inhibitor RO5126766, compared to 501MEL cells on plastic conditions, depicted by the maintained levels of phosphorylated Rb and Survivin and low levels of p27KIP1 (Fig 2H). Upregulation of the pro-apoptotic protein BIM observed in response to RO5126766 was also abrogated in cells plated on fibroblast-derived ECM. Notably, levels of BAX, another pro-apoptotic protein, remained unchanged in the different experimental settings. Similar protective effects were observed when short-term cultures of melanoma cells were plated on FRC- or MAF-derived ECM in presence of Vemurafenib (Fig 2I). Together, these results indicate that fibroblasts assembled

and remodeled matrices that provide a drug tolerant environment for BRAF mutant melanoma cell lines and short-term cultures.

Expression of the collagen receptors DDR1 and DDR2 in melanoma

Previous studies have demonstrated the critical role of ECM receptors belonging to the integrin family in drug resistance (Seguin et al., 2015). Moreover, BRAF inhibition has been described to generate a drug protective mesenchymal stroma with high β 1 integrin/FAK signaling, as a result of the paradoxical action of BRAFi on MAFs (Hirata et al., 2015). Yet, in our experimental settings, we were unable to demonstrate a significant implication of the β 1 integrin /FAK axis in drug protection conferred by fibroblast- derived ECMs. Indeed, addition of blocking β 1 integrin antibodies or depletion of FAK both failed to prevent the protective property of fibroblast-derived ECM against the growth and survival inhibitory signals induced by BRAFi (Supplementary Fig S2).

This prompted us to interrogate the contribution of other ECM receptors in drug tolerance. Keeping in mind the elevated levels of fibrillar collagens found in fibroblast matrices (Fig 1C), we examined the functional implication of the collagen tyrosine kinase receptors DDR1 and DDR2 (Shrivastava et al., 1997, Vogel et al., 1997). The analysis of TCGA datasets for cutaneous melanoma showed that *DDR1* and *DDR2* genes were genetically altered in 20% and 13% of melanoma cases, respectively. Interestingly, a significant fraction of melanomas was found to be associated with high mRNA levels of *DDR1* and *DDR2* (respectively 11% and 7%), consistent with the notion that these collagen receptors may play an important role in the pathogenicity of melanoma (Fig 3A). Immunohistochemical analysis of DDR1 and DDR2 expression in benign (naevus) and malignant melanocytic skin lesions (primary and metastatic), further showed that DDR1 and DDR2 levels significantly increased during melanoma progression, indicating that DDR1 and DDR2 may represent novel prognostic factors in melanoma (Fig 3B). Tumor cell plasticity is critical during melanoma progression and therapeutic response (Arozarena & Wellbrock, 2019). We thus examined the levels of DDR1 and DDR2 in a collection of melanoma cell lines and short-term melanoma cultures, according to cell state differentiation markers. Both DDR1 and DDR2 were expressed in “classic” melanoma cell lines. Notably, high levels of DDR2 were found associated with low levels of melanocytic markers MITF and SOX10 and high levels of the invasive marker AXL in metastatic 1205Lu cells (Fig 3C) and in BRAFi-resistant M229R and M238R cells (Fig 3D). In short-term melanoma cultures, both DDR1 and DDR2 were

detected in MM099 and MM029 cells with the MITF^{low}, SOX10^{low} and AXL^{high} invasive phenotype signature (Fig 3E). The examination of additional public gene expression datasets confirmed that *DDR2* levels were significantly linked to an AXL^{high} melanoma invasive cell population across the Mannheim, Philadelphia and Zurich cohorts (GSE4843, GSE4841 and GSE4840), whereas *DDR1* expression was similarly detected both in MITF^{low} proliferative and AXL^{high} invasive cell phenotypes (Fig 3F) (Widmer et al., 2012). Together, these observations associate *DDR1* and *DDR2* expression with melanoma progression and link *DDR2* to the invasive and therapy-resistant melanoma cell sub-population.

Targeting *DDR1* and *DDR2* impairs ECM-mediated resistance to oncogenic BRAF pathway inhibition

To address the contribution of *DDR1* and *DDR2* in MM-DR, a siRNA approach was used to target *DDR1*, *DDR2* or both in melanoma cells cultured on fibroblast-derived ECM, in presence of BRAF and/or MEK inhibitors. Immunoblot analysis showed specific *DDR1* and *DDR2* protein reduction after siRNA transfection in BRAFi-treated 1205Lu cells (Fig 4A) and in BRAFi/MEKi-treated MM099 cells (Fig 4B). Compared to the single knockdown, the simultaneous knockdown of *DDR1* and *DDR2* overcame MM-DR to BRAF targeted therapy as revealed by decreased levels of phospho-Rb and Survivin in 1205Lu cells (Fig 4A). Similar results were obtained using a second combination of *DDR1/2*-targeting siRNA sequences (Supplementary Fig S3A). In addition, the depletion of both *DDR1* and *DDR2* enhanced the cytotoxic activity of BRAF/MEK co-targeting as shown by the increased cleavage of apoptotic Caspase 3 that was detected in MM099 cells (Fig 4B). *DDRs* are druggable receptors, which are targeted by Imatinib, a tyrosine kinase inhibitor (TKI) developed as an ABL inhibitor but was later shown to inhibit *DDR1* and *DDR2* kinase activities with high efficacy (Day et al., 2008). Imatinib belongs to therapeutic molecules used in the clinic for the treatment of chronic myeloid leukemia (CML) and acute lymphoblastic leukemia (ALL) with the Philadelphia chromosome (Druker et al., 2001). Enzymatic activities of *DDR1* and *DDR2* were also inhibited by other small molecules including *DDR1-IN-1* (Kim et al., 2013). We first confirmed that Imatinib and *DDR1-IN-1* efficiently inhibited type I collagen-induced *DDR1* and *DDR2* tyrosine phosphorylation in 1205Lu cells (Fig 4C). Inhibition of *DDR1/2* kinases by Imatinib or *DDR1-IN-1* suppressed the protective action of MAF-derived ECM against Vemurafenib treatment as evidenced by the strong decrease in cell proliferation observed in 1205Lu cells co-treated with Vemurafenib and *DDR1/2* inhibitors (Fig 4D). Similar potentializing

effects of DDR1/2 inhibitors were observed in drug-protection assays performed on FRC-derived matrices (Supplementary Fig S3B). Mutant BRAF and DDR1/2 co-targeting in melanoma cells plated on MAF-derived ECM decreased levels of phosphorylated Rb and Survivin, and induced Caspase 3 cleavage (Fig 4E). Similar biochemical events were promoted by BRAFi or the combination BRAFi/MEKi in the presence of Nilotinib, a next-generation BCR-ABL inhibitor approved for the treatment of Imatinib-resistant patients and targeting DDR1/2 (Day et al., 2008) (Supplementary Fig S3C). Induction of apoptosis in co-treated melanoma cells was further confirmed using flow cytometry analysis of cell death markers (Fig 4F).

Recent studies have described that collagen binding to DDR1 and DDR2 leads to their activation and clustering and into filamentous membrane structures associated with collagen fibrils (Yeung et al., 2019). We thus examined the spatial distribution of DDR1/2 in melanoma cells plated on collagen I coated plastic dishes or on fibroblast-derived ECM. Immunofluorescence staining of phosphorylated DDR1 and DDR2 revealed that cells cultivated on purified collagen I displayed a globular dot-like distribution of the two receptors, whereas cells seeded on 3D ECM exhibited a significant fraction of DDR1/2 distributed into linear membrane clusters (Fig 5A and B). Interestingly, cell exposure to Vemurafenib dramatically increased the proportion of DDR1/2-containing linear clusters on 3D ECM (Fig 5A and B). Concomitantly, melanoma cell spreading was increased upon BRAF inhibition albeit to lesser extent on 3D ECM (Fig 5C). These data suggests that BRAFi-induced cytoskeletal changes drive the clustering of DDRs along collagen fibers and subsequent MM-DR (Fig 5D).

Together, these findings suggest that DDR1 and DDR2 determine BRAF mutant melanoma cell responsiveness to targeted therapies and that the drug-tolerance action of DDRs is dependent to their enzymatic activities and plasma membrane distribution.

Pharmacological inhibition of DDR1/2 by Imatinib improves BRAFi efficacy, counteracts drug-induced collagen remodeling and delays tumor relapse

The anti-tumor activity of Imatinib combined with Vemurafenib was next assessed in a pre-clinical xenograft model of melanoma. BRAF-mutated melanoma cells 1205Lu were subcutaneously xenografted into nude mice (CDX model), which were exposed to Vemurafenib, Imatinib or Vemurafenib plus Imatinib (Fig 6A). As expected, BRAF inhibition induced a rapid tumor reduction, whereas Imatinib alone did not display a significant anti-melanoma effect (Fig 6B). However, after 12 days, tumors treated with BRAFi alone had resumed growth, whereas

the combination with Imatinib markedly delayed tumor relapse and led to a significant reduction of tumor volume (Fig 6B and D) and weight (Fig 6C). Immunohistochemical analysis of tumor samples further documented that in comparison to single regimens, the combined treatment with Vemurafenib and Imatinib dramatically reduced cell proliferation and led to apoptotic tumor cell death as shown by *in situ* expression of cleaved Caspase 3 and decreased Ki67 (Fig 6D). Consistently, the Vemurafenib/Imatinib combination significantly increased the survival of melanoma-bearing mice (Fig 6E) treated for 30 days without apparent body weight loss or signs of toxicity throughout the study (Fig 6F). Increased collagen deposition has previously been described in melanoma xenografts upon treatment with Vemurafenib (Jenkins et al., 2015). We next investigated collagen content and fiber organization in tumor tissues from mice treated with the mono- or combo-therapy. Histochemical analysis showed that Vemurafenib treatment triggered a profound remodeling of the melanoma ECM stroma (Fig 7A), with marked increase of the collagen fibers' area and thickness, which was suppressed by Imatinib. Collagen color analysis under polarized light showed a decrease of mature orange and red fibers in tumors treated with the combined regimen compared to the single-agent treatment (Fig 7B). Finally, tumor imaging with second harmonic generation (SHG) confirmed the fibrillar nature of the collagen network that was rearranged upon Vemurafenib treatment but not upon the combined Vemurafenib/Imatinib treatment (Fig 7A and C). These data suggest that treatment with Imatinib counteracts the adverse effect of targeted agents on aberrant collagen deposition and organization, a process potentially contributing to drug resistance and relapse.

DDR1/2-mediated MM-DR involves a targetable pro-survival NIK- $\text{IKK}\alpha$ - $\text{NF}\kappa\text{B2}$ pathway

Finally, we wished to better characterize at the molecular level the MM-DR process that is promoted by collagen receptors DDR1 and DDR2. In order to identify MM-DR-related signaling pathways triggered by their tyrosine kinase activity, we performed phospho-kinase screening with protein extracts from melanoma cells cultured on fibroblast-derived matrices or plastic, in the presence of Vemurafenib. Unfortunately, this approach did not reveal any significantly augmented kinase activity or increased phosphorylation of kinase substrates (Supplementary Fig S4). Moreover, consistent with the results of the phospho-kinase screening, we failed to observe by immunoblot analysis any changes in the activity of the AKT survival pathway in 1205Lu and 501MEL cells cultured under MM-DR conditions (Supplementary Fig S5). On the

contrary, biochemical analysis revealed that unlike single-agent treatment, the combined treatment with Vemurafenib and Imatinib dramatically reduced the levels of RelB and phosphorylated p65 in ECM-stimulated melanoma cells following 96 h (Fig 8A). RelA (p65) and RelB are components of the canonical and non-canonical NFκB pathway, respectively (Taniguchi & Karin, 2018). Previous studies have linked the NFκB pathway to melanoma invasion (Rathore, Girard et al., 2019) and growth (De Donatis et al., 2016), as well as intrinsic and environment-mediated drug resistance to MAPK pathway inhibitors (Konieczkowski et al., 2014, Smith et al., 2014, Young et al., 2017). Consistently, siRNA-mediated concomitant depletion of DDR1 and DDR2, which impaired melanoma MM-DR by triggering cell cycle arrest and apoptosis, decreased the expression of RelB, NFκB2 precursor protein p100 and NFκB2 p52 processed form in melanoma cells cultured in MM-DR conditions (Fig 8B). The non-canonical NFκB2/p52-RelB pathway is activated by the upstream kinases NIK (NFκB inducing kinase) and IKKα (IκB kinase) (Fig 8C). Using a pan-IKK inhibitor BMS345541 (Fig 8D) and a recently developed NIK inhibitor (NIKi) (Mondragon et al., 2019) (Fig 8E), we confirmed the implication of the NFκB2 pathway in melanoma MM-DR, as illustrated by decreased cell cycle markers and increased apoptotic markers in BRAFi-treated ECM-stimulated melanoma cells. Similar inhibition of p52 and RelB was found in melanoma cells transfected with DDR1/2-targeting siRNA after exposure to Vemurafenib and Trametinib (Supplementary Fig S6A). Finally, comparable decreased levels of RelB, p100 and p52 were observed following pharmacological targeting of DDR1/2 and NIK in MM-DR conditions (Supplementary Fig S6B). Together, our findings suggest that melanoma cell adaptation to BRAFi/MEKi treatment involves the interaction of tumor cells with the mesenchymal stroma enriched in fibrillar collagen, thereby promoting DDR1/2-dependent activation of the NFκB2-RelB pathway (Fig 9).

Discussion

Preventing melanoma resistance and relapse to therapies targeting the BRAF oncogenic pathway remains a significant challenge in successful disease management. Emerging evidence suggests that stromal components of the tumor microenvironment including the ECM play a key role in establishing resistant niches by allowing melanoma cells to rapidly adapt and tolerate therapeutic drugs before mutation-driven resistance mechanisms are acquired (Meads et al., 2009, Rambow et al., 2019, Smith et al., 2016). We describe here a novel mechanism of

adaptation and tolerance to oncogenic BRAF pathway inhibition involving dynamic interaction of melanoma cells with the ECM. ECM molecular composition, fiber orientation and physical characteristics are profoundly altered in the vast majority of solid tumors (Pickup et al., 2014). By comparing cell-derived matrices produced by normal fibroblast and MAFs, we find that biochemical and mechanical properties of experimentally derived matrices differ remarkably depending on fibroblast origin. MAF-derived ECMs exhibit a high level of fiber organization and increased stiffness compared with ECMs generated by normal dermal fibroblasts. This is in agreement with that has been demonstrated in other studies (Gopal et al., 2017, Kaukonen et al., 2017). Interestingly, we disclose that FRCs, which are resident fibroblasts of the lymph node harbor some phenotypic and functional properties of MAFs. Similar to MAFs, FRCs produce and remodel a stiff ECM enriched in fibrillar collagens. Consistent with this, MAF- and FRC-derived matrices display higher drug protective efficacy to melanoma cells than ECM generated from dermal fibroblasts. However, it is important to note that HDF-derived ECM can confer protection against BRAF inhibition in contrast to classic 2D culture conditions, indicating that MM-DR is dependent of the structural organization of the ECM. Importantly, MM-DR was described with several BRAF mutant melanoma cells, regardless their transcriptional phenotypic signature. FRCs play key role in lymph node immune homeostasis (Fletcher et al., 2015). Our *in vitro* data further indicate that similar to MAFs they have the ability to build a protective ECM niche, which might have potential implications for tumor cell behavior and drug tolerance within the lymphatic metastatic site.

Functionally, we demonstrate that collagen receptors DDR1 and DDR2 mediate MM-DR to oncogenic BRAF targeted therapies through a pro-survival NIK-IKK α -NF κ B2 pathway. DDR1 and DDR2 are unique among the receptor tyrosine kinases family as they represent non-integrin collagen receptors (Leitinger, 2014, Shrivastava et al., 1997, Vogel et al., 1997). Their role during embryonic development, wound healing and fibrosis is well described (Cario, 2018, Leitinger, 2014). On the contrary, their function during cancer development is less clear as they can act either as tumor-promoters or tumor-suppressors, according to the tissue of origin (Valiathan et al., 2012). Moreover, the functional implication of DDR1 or DDR2 kinase activity in mediating sensitivity to anti-cancer therapies remains poorly defined. DDR1 and DDR2 are both expressed at different levels in skin (Cario, 2018), particularly in the epidermis from which cutaneous melanomas originate, following the malignant transformation of melanocytes (Shain & Bastian, 2016b). Overlapping functions have been attributed to DDR1 and DDR2 in melanoma

development with regards to cancer cell growth and invasiveness. A recent study correlated high DDR1 expression in melanoma lesions with poor prognosis and showed that DDR1 controls melanoma cell invasion and survival *in vitro* and in a xenograft melanoma model (Reger de Moura et al., 2019). Other studies have reported that DDR2 depletion in melanoma cell lines reduces their invasive and metastatic abilities (Badiola et al., 2011, Poudel et al., 2015). In line with these observations, analysis of clinical samples representative of melanoma progression displays augmented DDR1 and DDR2 during malignant transition from benign melanocytic lesions to metastatic melanoma. However, examination of melanoma TCGA datasets also indicates a trend towards mutual exclusivity according to high levels of DDR1 or DDR2 mRNA expression, suggesting that their individual function may be coupled to different melanoma phenotypic states. Consistently, analysis of DDRs expression in melanoma cells indicate that high levels of DDR2, but not DDR1, is associated with the AXL^{high} invasive signature also found in therapy-resistant melanoma cells (Muller et al., 2014, Nazarian et al., 2010, Rathore et al., 2019). Whether DDR1 and/or DDR2 expression and signaling contribute to the late phase of acquired resistance remains an open question.

Tumor cell phenotypic switching, which leads to melanoma intra-tumor heterogeneity is currently viewed as a major source of therapeutic escape and relapse (Rambow et al., 2019). In this context, collagen abundance has recently been identified as an important contributor to melanoma phenotype switching through lineage-specific microenvironment sensing (Miskolczi et al., 2018). Moreover, consistent with our observations on BRAFi-treated melanoma tumors, MAPK pathway blockade was shown to increase collagen synthesis *in vitro* (Jenkins et al., 2015, Titz et al., 2016) and collagen deposition *in vivo*, in mutant BRAF cells (Jenkins et al., 2015). We provide evidence for a role of DDR1 and DDR2 during the adaptive phase of tolerance to targeted therapies through MM-DR. Indeed it is tempting to propose that the collagen receptors DDRs represent a major component of the microenvironment-sensing arsenal, driving tumor cell phenotypic plasticity and drug adaptation. Interestingly, β 1 integrin, another ECM receptor that plays a major role in EM-DR (Seguin et al., 2015), has also been linked to adaptive responses to BRAF inhibition via fibronectin-mediated activation of FAK, leading to MAPK pathway reactivation (Fedorenko et al., 2015, Hirata et al., 2015). Contrary to β 1 integrin, engagement of DDRs by fibrillar collagens mediates drug tolerance in the absence of the reactivation of the MAPK pathway. This suggests that DDR1 and DDR2 participate in the early response to BRAF inhibition through a pathway distinct from β 1 integrin engagement.

Although DDR1 and DDR2 display different affinities for collagens, DDR1 is activated by both fibrillar and non-fibrillar collagens whereas DDR2 is activated only by fibrillar collagens (Valiathan et al., 2012). The ECM produced by different types of fibroblasts was found enriched in various matrisome components, including fibrillar and non-fibrillar collagens that activate DDR1/2 clustering into linear membrane structures in melanoma cells, resembling those described in other studies (Agarwal et al., 2007, Yeung et al., 2019). Importantly, receptor clustering on collagen-rich matrices is enhanced upon melanoma cell treatment with BRAFi, thus making the involvement of this process during the early phase of drug adaptation very probable. The exact mechanism underlying the induction of DDR1/2 clustering following MAPK pathway inhibition is however currently unknown. Intriguingly, melanoma cells with acquired resistance to BRAFi exhibit increased actomyosin tension involved in YAP-mediated drug resistance (Kim et al., 2016). It is therefore possible that similarly to acquired resistance the adaptive response of melanoma cells to BRAF inhibition implicates a mechanical remodeling of the actomyosin cytoskeleton. This would result in the assembly of DDR1/2 into supramolecular membrane structures associated with collagen fibrils. Supporting this hypothesis, DDR1 clustering has been shown to involve interactions with collagen and myosin IIA in mice periodontal tissues (Coelho et al., 2017).

As mentioned above, we and others (Jenkins et al., 2015, Titz et al., 2016) have shown that increased collagen deposition is an early response to BRAF inhibition. Our results further revealed that BRAFi treatment increased collagen fiber deposition (Fig 7) and tumor stiffening *in vivo* (data not shown). This supports the notion that DDR1/2 could mediate mechanical signaling from MAF- or FRC-derived stiff ECM, influencing melanoma drug resistance through the creation of a protective niche. Together, these observations support a model in which BRAF targeted drugs fuel a self-feeding mechanism involving collagen-bound DDR1/2 signaling platforms, responsible for collagen network compaction and drug tolerance. We show that DDR1/2 knockdown or the inhibition of their catalytic activity impairs drug tolerance. It would thus be interesting to examine how genetic or pharmacological inhibition of the two receptors affects the assembly of their signaling platforms on melanoma cells. Another important issue revealed by our *in vivo* model of melanoma drug response is the possible implication of stromal DDR1/2 in the therapeutic response. Consistent with this a major role of CAF-derived DDR2 for the organization of collagen fibers and breast cancer metastasis has been reported (Corsa et al.,

2016). DDR1/2 signaling might therefore influence both cancer and stromal cells during tumor adaptation to BRAF inhibition.

To gain insight into DDR1/2-related signaling pathways, we performed a biochemical screen to identify tyrosine kinases or kinase substrates potentially involved in the MM-DR process. Unfortunately, this approach failed probably due to the lack of regulators of the NF κ B pathway in the phospho-antibody array employed. Subsequent biochemical studies revealed that fibroblast-derived matrices enhanced the activation of the non-canonical-NF κ B pathway that accounted for most of melanoma cell tolerance to BRAF inhibition. The NF κ B2/p52-RelB pathway represents a major alternative route of NF κ B signaling (Taniguchi & Karin, 2018), that has been involved in cell adhesion-mediated drug resistance (CAM-DR) in myeloma (Landowski et al., 2003) and in drug resistance in prostate cancer (Nadiminty, Tummala et al., 2013). In melanoma, the NF κ B2 pathway is upregulated compared to melanocytes and prevents melanoma senescence through increase expression of the Polycomb-group protein EZH2 (De Donatis et al., 2016). Here we show that suppression of DDR1/2 signaling impaired MM-DR by reducing the expression of NF κ B2/p52. Interestingly, the siRNA approach indicated that DDR1 and DDR2 compensate for one another, as we observed that both collagen receptors must be knock-downed to fully prevent MM-DR. Consistently, DDR1/2 inhibition by the clinically approved TKI Imatinib improved the action of BRAFi on melanoma treatment by delaying tumor relapse, normalizing collagen network and increasing mice survival. Thus, this combination strategy could be effective in a clinical application as it allows the suppression of the stromal fibrotic reaction induced by oncogenic BRAF pathway inhibition and prevents tumor relapse. In addition, we observe that the inhibition of NIK or IKK, two upstream activators of the non-canonical NF κ B pathway (Taniguchi & Karin, 2018), also abrogated ECM-mediated resistance to BRAFi. How DDR1/2 connect to the NIK-IKK-NF κ B2/p52 pathway is currently unknown. However, it is likely that the DDR1/2 signaling platforms that were identified are implicated. The nature of the NF κ B2/p52 target genes that mediate MM-DR in melanoma is also under investigation.

Finally, our work adds to the emerging notion that DDR1 and DDR2 are becoming attractive targets in anti-cancer therapies. Inhibiting DDR1 or DDR2 with Nilotinib (Jeitany et al., 2018), Dasatinib (Hammerman et al., 2011, von Massenhausen et al., 2016), or other non-approved inhibitors (Ambrogio et al., 2016, Grither & Longmore, 2018) has been shown to decrease tumorigenicity, invasion or metastasis of several types of carcinomas (Corsa et al., 2016)

Importantly, a recent study in melanoma and other solid tumors reported that targeting DDR2 with Dasatinib enhances tumor response to anti-PD-1 immunotherapy (Tu et al., 2019). Together this later study and our study point to the critical role of these collagen receptors in regulating the immune and mesenchyme tumor stroma in melanoma.

In summary, our findings reveal that DDR1/2-mediated MM-DR favors the persistence of drug-tolerant tumor cells during the initial phase of adaptation to MAPK-targeting therapies. We also provide evidence that targeting MM-DR with clinically approved DDR inhibitors may represent an attractive salvage strategy to overcome resistance to oncogenic BRAF inhibition. This combinatorial approach may thus be beneficial for melanoma patients on targeted therapies.

Materials and Methods

Melanoma cells, reagents and antibodies

Melanoma cell lines were obtained as previously described (Didier et al., 2018, Rathore et al., 2019, Tichet et al., 2015). Isogenic pairs of Vemurafenib-sensitive (P) and resistant (R) cells (M229, M238, M249) were provided by R.S. Lo (Nazarian et al., 2010). Short-term cultures of patient melanoma cells MM034, MM074, MM029, MM099 were kindly provided by J.-C. Marine and were described elsewhere (Verfaillie, Imrichova et al., 2015). Melanoma cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) supplemented with 7% fetal bovine serum (FBS) (HyClone) and 1% penicillin/streptomycin solution. Cell lines were used within 6 months between resuscitation and experimentation. To guarantee cell line authenticity, cells 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 MITF. All cell lines were routinely tested for the absence of mycoplasma by PCR. For live imaging and red nuclear labeling 501Mel and 1205Lu cells were transduced with NuLight Red lentivirus reagent (Essen Bioscience) and selected with puromycin (1 µg/ml, Sigma Aldrich).

Culture reagents were purchased from Thermo Fisher Scientific. BRAFi (PLX4032, Vemurafenib), MEKi (GSK1120212, Trametinib), dual RAFi/MEKi (RO5126766), DDR1-IN-1, Nilotinib, and IKK inhibitor BMS345541 were from Selleckchem. Imatinib mesylate was from Enzo Lifescience. NIK inhibitor (NIKi) was described before (Mondragon et al., 2019). FAK inhibitor PF573228 was

from Tocris Bioscience. An equal amount of DMSO was used as vehicle control. Collagen I was from Thermo Fisher Scientific. All other reagents were obtained from Sigma-Aldrich unless stated otherwise. β 1 Integrin blocking antibody (clone A1B2) and control isotype were from Merck Millipore. Information on antibodies used in this study is provided in Supplementary Table 1.

Isolation and culture of primary fibroblasts and MAFs

Human dermal fibroblasts (HDFs) were isolated and maintained as described previously (Robert, Gaggioli et al., 2006). Human lymphatic fibroblasts (FRC#1 and #2) were purchased from ScienCell Research Laboratories. Metastatic melanoma clinical specimens were obtained with written informed consent from each patient and the study was approved by the hospital ethic committee (Nice Hospital Center and University Côte d'Azur). Briefly, the sample was cut into small pieces and digested using collagenase/dispase. Following filtration of the large debris, the solution was serial centrifuged and the final pellet was re-suspended in DMEM supplemented with 10% FBS and seeded in a tissue culture dish. After 30 min, the fibroblasts adhered to the dish whilst other cellular types remained in suspension. Fibroblasts were cultured in fibroblast medium (ScienCell) supplemented with 10% FBS and 1% fibroblast growth supplement (FGS) plus 1% penicillin/streptomycin solution. All experiments were performed with fibroblasts until passage 10. Verification of the identity of MAFs was determined by flow cytometry using classical markers.

Fibroblast-derived 3D ECM and MM-DR assay

3D de-cellularized ECMs were generated as previously described (Beacham et al., 2007). Briefly, gelatin-coated tissue culture dishes were seeded with fibroblasts and cultured for 8 days in complete medium, supplemented with 50 μ g/ml ascorbic acid every 48 h. Cells were then washed with PBS and matrices were de-cellularized using a pre-warmed extraction buffer for 2 minutes (PBS 0.5% Triton X-100, 20 mM NH_4OH). Matrices were then gently washed several times with PBS.

For matrix-mediated drug-resistance (MM-DR) assays, melanoma cells were seeded on top of the de-cellularized 3D matrices for 48 h at 37°C in 5% CO_2 , and cultured in complete medium for a further 48 to 96h in the presence of the various inhibitors, as indicated in the figure

legends. Cells were detached and fixed in 80% ethanol or lysed in lysis buffer for cell cycle and immunoblot analysis, respectively.

Matrix remodeling assay. 5×10^4 fibroblasts were embedded in 100 μ l of collagen I/Matrigel and seeded in a glass bottom 96-well plate (MatTek) and maintained in DMEM supplemented with 10% FBS. Gel contraction was monitored until day 6. The gel area was measured using ImageJ software and the contraction was calculated using the formula $100 \times (\text{well diameter} - \text{gel diameter}) / \text{well diameter}$ as previously described (Albregues et al., 2014).

RNAi studies

Non-targeting control, DDR1#1 (VHS50139), DDR1#2 (HSS187878), DDR2#1 (HSS107350), DDR2#2 (HSS107352) and FAK (PTK2) siRNA duplexes were purchased from Thermo Fisher Scientific. Transfection of siRNA was carried out using Lipofectamine RNAi MAX (Thermo Fisher Scientific), at a final concentration of 50 nM. Unless stated otherwise, cells were assayed at 2 or 4 days post transfection.

Immunoblot and immunoprecipitation

Whole-cell lysates were prepared using lysis buffer containing 50 mM Hepes, 150 mM NaCl, 1.5 mM MgCl_2 , 1 mM EDTA, 10% Glycerol, 1% Triton X-100 supplemented with protease and phosphatase inhibitors (Pierce) and briefly sonicated. Proteins were separated by SDS-PAGE and were transferred onto PVDF membranes (GE Healthcare Life sciences) for immunoblot analysis. Membranes were incubated with the primary antibody overnight, washed and then incubated with the peroxidase-conjugated secondary antibody. Antibodies and working dilution used are listed in Supplementary Table 1. Blots were developed with a chemiluminescence system (GE Healthcare Life Sciences).

For IP assays, cells treated with 10 μ g/ml of collagen I for 18 h with the indicated inhibitors were lysed as described above, then incubated in lysis buffer containing Protein G Sepharose beads (Merck) and an antibody directed against DDR2 overnight at 4°C with rocking. Beads were then washed three times with 20 mM Hepes, 150 mM NaCl, 10% Glycerol, 0.1% Triton X-100 supplemented with protease and phosphatase inhibitors. IP products were separated by SDS-PAGE and subjected to immunoblot analysis.

Proliferation assay

For real time analysis of cell growth using the IncuCyte™ ZOOM imaging system (Essen Bioscience), cells stably expressing the nuclear fluorescent label red NuLight reagent were plated in quadruplicate in complete medium (5×10^3 cells/well for 501MEL and 15×10^3 cells/well for 1205Lu cells) in coated (fibroblast-derived ECM or Collagen type I) or uncoated wells in a 12 well plates. Phase contrast images were taken every hour over a 5-day period. Cell proliferation was quantified by counting the number of fluorescent nuclei over time to give cell growth rate. Growth curves were generated using the IncuCyte™ cell proliferation assay software. Alternatively, cell proliferation was analyzed by counting cells with Hoechst-stained nuclei.

Flow cytometry

Cell cycle profiles were determined by flow cytometry analysis of propidium iodide (PI)-stained cells as previously described (Didier et al., 2018). Melanoma cells cultured on top of fibroblast-derived matrices and treated with the indicated drugs for 48 h were washed, fixed in 80% ethanol and incubated at -20°C for 24 h. Cells were then stained for 20 min at 37°C in buffer containing $40 \mu\text{g/ml}$ PI and $20 \mu\text{g/ml}$ ribonuclease A. Cell cycle profiles were collected on a FACSCanto II (Becton Dickinson). Cell death was evaluated following staining with AnnexinV/PI (eBioscience) and analyzed by flow cytometry as described (Didier et al., 2018).

Immunofluorescence and microscopy

Cells were grown on type I collagen-coated glass coverslips (0.14 mg/ml) or fibroblast derived ECM-coated glass coverslips. After Vemurafenib treatment, cells were rinsed with PBS, fixed in 4% paraformaldehyde (PFA), and incubated in PBS containing 10% normal goat serum (Cell Signaling) for 1 h, then incubated overnight with the indicated primary antibodies diluted in PBS containing 2% normal goat serum. Following incubation with Alexa Fluor-conjugated secondary antibodies, coverslips were mounted in ProLong antifade mounting reagent (Thermo Fisher Scientific). F-actin was stained with Alexa Fluor 488 phalloidin (1:100; Thermo Fisher Scientific). Nuclei were stained with DAPI. Images were captured using a wide field (Leica DM5500B, at x 63 magnification) or Zeiss LSM 510 META laser scanning confocal microscopes. Cell area and globular *versus* linear clusters of cells ($n > 50$) were determined and quantified using the ImageJ software.

Following fixation and incubation with primary antibodies and Alexa Fluor-conjugated secondary antibodies, de-cellularized matrices on coverslips were mounted in ProLong antifade reagent. Images were captured using a wide field microscope (Leica DM5500B, at x 40 magnification). The orientation of fibronectin and collagen fibers was assessed in the immunofluorescence images using ImageJ software. Data were plotted as frequency of distribution.

Cleaved caspase 3 and Ki67 staining was assessed on 5 μ m frozen sections of cell-derived melanoma xenografts. Samples were fixed for 30 min with 3% PFA in PBS, rehydrated for 10 min in Tris 0.1 M, permeabilized in Tris 0.1 M + 1% Triton for 1 h, and then blocked for 1 h in Tris 0.1M containing 1% BSA, 0.3% Triton, anti-CD16/CD32 (FC Block, 1/100). Antibodies were diluted in Tris 0.1M containing 1% BSA, 0.3% Triton and incubated overnight at 4°C. After washes with Tris 0.1M, bound antibodies were detected using Alexa Fluor 488 or Alexa Fluor 594-conjugated secondary antibody. Images were captured using a wide field microscope (Leica DM5500B, at x 40 magnification).

Mass spectrometry analysis

Proteomic analysis of de-cellularized matrices was performed as described in Gopal *et al.* (Gopal et al., 2017). Briefly, ECM proteins were solubilized in urea, reduced and alkylated and proteins were digested with first PNGase F (New England BioLabs), endoproteinase Lys-C (Promega) and high-sequencing-grade trypsin. Each sample was reconstituted in 0.1% trifluoroacetic acid (TFA) 2% acetonitrile and analyzed by liquid chromatography (LC)–tandem mass spectrometry (MS/MS) in an LTQ-Orbitrap-Velos (Thermo Electron, Bremen, Germany) online with a nanoLC Ultimate 3000 chromatography system (Dionex). For protein identification and estimation of abundance, the acquired raw LC Orbitrap MS data were processed using the MASCOT search engine (version 2.4.1). Spectra were searched against a SwissProt Human database. The protein abundance was calculated using the iBAQ score and represented as molar percent.

Phospho-kinase profiling

Phospho-kinase screening was performed using a phospho-kinase array (Proteome Profiler Human Phospho-Kinase Array #ARY003B; R&D Systems) according to the manufacturer's

instructions. After cell extraction, 600µg of protein was added per sample. Array spots were analyzed using ImageJ software.

Atomic force microscopy

Mechanical properties of fibroblast-derived matrices were analyzed by AFM using a Bioscope Catalyst operating in Point and Shoot (Bruker Nano Surfaces), coupled with an inverted optical microscope (Leica DMI6000B, Leica Microsystems Ltd.). The apparent Young's Modulus (E_{app}) was measured on unfixed ECM using a Borosilicate Glass spherical tip (5 µm of diameter) mounted on a cantilever with a nominal spring constant of 0.06 N/m (Novascan Technologies). The force-distance curves were collected using a velocity of 2 µm/s, in relative trigger mode and by setting the trigger threshold to 1 nN. E_{app} values were represented as a boxplot using GraphPad Prism (GraphPad software).

Cell line-derived xenograft (CDX) tumor models

Mouse experiments were carried out in accordance with the Institutional Animal Care and the local ethical committee (CIEPAL-Azur agreement NCE/2018-483). 1×10^6 1205Lu melanoma cells were subcutaneously implanted into both flanks of 6 week old female athymic nude nu/nu mice (Janvier, France). The tumor was measured by caliper and the volume was calculated using the formula: $V = \text{tumor width} \times \text{tumor length}^2 \times 0.5$. When the tumor reached 75 mm³, mice were randomly grouped into control and test groups. Vemurafenib (35 mg/kg) and Imatinib mesylate (75 mg/kg) were delivered (alone or in combination) intraperitoneally three times per week. Mice in the control group were treated with vehicle alone. Mice were treated for 30 days and followed for up to 50 days or until tumors reached a pre-defined volume (1000 mm³). After animal sacrifice, tumors were dissected, weighed, and snap frozen in liquid nitrogen in optimal cutting temperature compound (OCT; Tissue-Tek) (Gentaur) for immunofluorescence analysis or formalin fixed and paraffin embedded for picrosirius red staining or SHG analysis.

Fibrillar collagen imaging

Collagen in de-cellularized matrices or in paraffin-embedded melanoma tissues was stained with picrosirius red using standard protocols. Tumor sections were analyzed by polarized light microscopy as described (Rich & Whittaker, 2005). Images were acquired under polarized

illumination using a light transmission microscope (Zeiss PALM, at 5 x magnification). Fiber thickness was analyzed by the change in polarization color. Birefringence hue and amount were quantified as a percent of total tissue area using ImageJ software.

Second harmonic generation (SHG) imaging of paraffin-embedded melanoma tissues was recorded on a Zeiss 510 NLO microscope (Carl Zeiss Microscopy) with Mai Tai HP DeepSee (Newport Corporation) and 360-440 nm band pass filter.

Tissue microarray analysis

Immunohistochemistry analysis of DDR1 and DDR2 expression was assessed on TMA sections (US Biomax) using VECTASTAIN Elite ABC Kit (Vector Laboratories) with the DAB reagent (Vector Laboratories) and counterstained with haematoxylin (Fisher Scientific), following the manufacturer's instructions. Images were captured on a bright field microscope (Nikon, at 20 x magnification).

Analysis of gene expression from public databases

Publicly available gene expression data sets of human melanoma samples were used to analyze *DDR1* and *DDR2* levels in the Mannheim (GSE4843), Philadelphia (GSE4841), and Zurich (GSE4840) cohorts. Proliferative and invasive melanoma subgroups were defined as previously described (Rathore et al., 2019, Widmer et al., 2012). Survival data from the skin melanoma TCGA database were retrieved using cBioPortal (cbioportal.org).

Statistical analysis

Unless otherwise stated, all experiments were repeated at least three times and representative data/images are shown. Statistical data analysis was performed using GraphPad Prism 8 software. The unpaired two-tailed Mann-Whitney test was used for statistical comparisons between two groups. The Kruskal-Wallis test with the indicated post-tests or two-way analysis of variance test with Sidak's post-test was used to compare three or more groups. Error bars are \pm SEM.

Acknowledgments. We thank Roger Lo for M229P/R, M238P/R and M249P/R melanoma cells and J.C. Marine for short-term cultured melanoma cells. We acknowledge Maeva Gesson and Marie Irondelle from the C3M imaging facility for their helpful advice. We thank the C3M

animal facility and Cédric Matthews for the SHG microscopy analysis (IBDM imaging platform, AMU-Marseille). We also thank Ana Popovic for critical reading of the manuscript. This work was supported by funds from the: Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (Inserm), Ligue Contre le Cancer, Institut National du Cancer (INCA_12673), ITMO 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, and the French Government (National Research Agency, ANR) through the “Investments for the Future” LABEX SIGNALIFE: program reference # ANR-11-LABX-0028-01. We also thank the platform PICSL-FBI (IBDM, AMU-Marseille) a member of France Biolmaging supported by the “Investments for the Future” (ANR-10-INBS-04). The financial contribution of the Conseil général 06, Canceropôle PACA and Region Provence Alpes Côtes d’Azur to the C3M is also acknowledged. I.B. was a recipient of a doctoral fellowship from La Ligue Contre le Cancer.

Author contributions. S.T.D. and M.D. designed the study, analyzed and interpreted data, ensured financial support, and wrote the paper with inputs from I.B., V.P. and C.A.G. I.B. performed the majority of the experiments and analyzed the data with the help of M.L, A.M., S.D., C.R., V.P. and C.A.G. F.L. performed flow cytometry analyses. S.P. performed AFM analyses. S.A. performed mass spectrometry analyses. C.G. and T.P. contributed with reagents and expertise.

Conflict of Interest. T.P. is the co-founder of Yukin Therapeutics. The remaining authors declare no competing interests.

REFERENCES

- Agarwal G, Mihai C, Iscru DF (2007) Interaction of discoidin domain receptor 1 with collagen type 1. *J Mol Biol* 367: 443-55
- Albregues J, Bourget I, Pons C, Butet V, Hofman P, Tartare-Deckert S, Feral CC, Meneguzzi G, Gaggioli C (2014) LIF mediates proinvasive activation of stromal fibroblasts in cancer. *Cell Rep* 7: 1664-1678
- Ambrogio C, Gomez-Lopez G, Falcone M, Vidal A, Nadal E, Crosetto N, Blasco RB, Fernandez-Marcos PJ, Sanchez-Céspedes M, Ren X, Wang Z, Ding K, Hidalgo M, Serrano M, Villanueva A, Santamaria D, Barbacid M (2016) Combined inhibition of DDR1 and Notch signaling is a therapeutic strategy for KRAS-driven lung adenocarcinoma. *Nat Med* 22: 270-7
- Arozarena I, Wellbrock C (2019) Phenotype plasticity as enabler of melanoma progression and therapy resistance. *Nat Rev Cancer* 19: 377-391
- Badiola I, Villace P, Basaldua I, Olaso E (2011) Downregulation of discoidin domain receptor 2 in A375 human melanoma cells reduces its experimental liver metastasis ability. *Oncol Rep* 26: 971-8
- Beacham DA, Amatangelo MD, Cukierman E (2007) Preparation of extracellular matrices produced by cultured and primary fibroblasts. *Curr Protoc Cell Biol* Chapter 10: Unit 10 9
- Cario M (2018) DDR1 and DDR2 in skin. *Cell Adh Migr* 12: 386-393
- Coelho NM, Arora PD, van Putten S, Boo S, Petrovic P, Lin AX, Hinz B, McCulloch CA (2017) Discoidin Domain Receptor 1 Mediates Myosin-Dependent Collagen Contraction. *Cell Rep* 18: 1774-1790
- Corsa CA, Brenot A, Grither WR, Van Hove S, Loza AJ, Zhang K, Ponik SM, Liu Y, DeNardo DG, Eliceiri KW, Keely PJ, Longmore GD (2016) The Action of Discoidin Domain Receptor 2 in Basal Tumor Cells and Stromal Cancer-Associated Fibroblasts Is Critical for Breast Cancer Metastasis. *Cell Rep* 15: 2510-23
- Cukierman E, Pankov R, Stevens DR, Yamada KM (2001) Taking cell-matrix adhesions to the third dimension. *Science* 294: 1708-12
- Day E, Waters B, Spiegel K, Alnadaf T, Manley PW, Buchdunger E, Walker C, Jarai G (2008) Inhibition of collagen-induced discoidin domain receptor 1 and 2 activation by imatinib, nilotinib and dasatinib. *Eur J Pharmacol* 599: 44-53

De Donatis GM, Le Pape E, Pierron A, Cheli Y, Hofman V, Hofman P, Allegra M, Zahaf K, Bahadoran P, Rocchi S, Bertolotto C, Ballotti R, Passeron T (2016) NF- κ B2 induces senescence bypass in melanoma via a direct transcriptional activation of EZH2. *Oncogene* 35: 2735-45

Didier R, Mallavialle A, Ben Jouira R, Domdom MA, Tichet M, Auburger P, Luciano F, Ohanna M, Tartare-Deckert S, Deckert M (2018) Targeting the Proteasome-Associated Deubiquitinating Enzyme USP14 Impairs Melanoma Cell Survival and Overcomes Resistance to MAPK-Targeting Therapies. *Mol Cancer Ther* 17: 1416-1429

Druker BJ, Sawyers CL, Kantarjian H, Resta DJ, Reese SF, Ford JM, Capdeville R, Talpaz M (2001) Activity of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in the blast crisis of chronic myeloid leukemia and acute lymphoblastic leukemia with the Philadelphia chromosome. *N Engl J Med* 344: 1038-42

Fedorenko IV, Wargo JA, Flaherty KT, Messina JL, Smalley KSM (2015) BRAF Inhibition Generates a Host-Tumor Niche that Mediates Therapeutic Escape. *J Invest Dermatol* 135: 3115-3124

Flaherty KT, Hodi FS, Fisher DE (2012) From genes to drugs: targeted strategies for melanoma. *Nat Rev Cancer* 12: 349-61

Fletcher AL, Acton SE, Knoblich K (2015) Lymph node fibroblastic reticular cells in health and disease. *Nat Rev Immunol* 15: 350-61

Gopal S, Veracini L, Grall D, Butori C, Schaub S, Audebert S, Camoin L, Baudalet E, Radwanska A, Beghelli-de la Forest Divonne S, Violette SM, Weinreb PH, Rekima S, Ilie M, Sudaka A, Hofman P, Van Obberghen-Schilling E (2017) Fibronectin-guided migration of carcinoma collectives. *Nat Commun* 8: 14105

Grither WR, Longmore GD (2018) Inhibition of tumor-microenvironment interaction and tumor invasion by small-molecule allosteric inhibitor of DDR2 extracellular domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 115: E7786-E7794

Hammerman PS, Sos ML, Ramos AH, Xu C, Dutt A, Zhou W, Brace LE, Woods BA, Lin W, Zhang J, Deng X, Lim SM, Heynck S, Peifer M, Simard JR, Lawrence MS, Onofrio RC, Salvesen HB, Seidel D, Zander T et al. (2011) Mutations in the DDR2 kinase gene identify a novel therapeutic target in squamous cell lung cancer. *Cancer Discov* 1: 78-89

Hirata E, Girotti MR, Viros A, Hooper S, Spencer-Dene B, Matsuda M, Larkin J, Marais R, Sahai E (2015) Intravital imaging reveals how BRAF inhibition generates drug-tolerant microenvironments with high integrin beta1/FAK signaling. *Cancer Cell* 27: 574-88

Jeitany M, Leroy C, Tosti P, Lafitte M, Le Guet J, Simon V, Bonenfant D, Robert B, Grillet F, Mollevi C, El Messaoudi S, Otandault A, Canterel-Thouennon L, Busson M, Thierry AR, Martineau P, Pannequin J, Roche S, Sirvent A (2018) Inhibition of DDR1-BCR signalling by nilotinib as a new therapeutic strategy for metastatic colorectal cancer. *EMBO Mol Med* 10

Jenkins MH, Croteau W, Mullins DW, Brinckerhoff CE (2015) The BRAF(V600E) inhibitor, PLX4032, increases type I collagen synthesis in melanoma cells. *Matrix Biol* 48: 66-77

Kalluri R (2016) The biology and function of fibroblasts in cancer. *Nat Rev Cancer* 16: 582-98

Kaukonen R, Jacquemet G, Hamidi H, Ivaska J (2017) Cell-derived matrices for studying cell proliferation and directional migration in a complex 3D microenvironment. *Nat Protoc* 12: 2376-2390

Kaukonen R, Mai A, Georgiadou M, Saari M, De Franceschi N, Betz T, Sihto H, Ventela S, Elo L, Jokitalo E, Westermarck J, Kellokumpu-Lehtinen PL, Joensuu H, Grenman R, Ivaska J (2016) Normal stroma suppresses cancer cell proliferation via mechanosensitive regulation of JMJD1a-mediated transcription. *Nat Commun* 7: 12237

Kaur A, Webster MR, Marchbank K, Behera R, Ndoye A, Kugel CH, 3rd, Dang VM, Appleton J, O'Connell MP, Cheng P, Valiga AA, Morissette R, McDonnell NB, Ferrucci L, Kossenkov AV, Meeth K, Tang HY, Yin X, Wood WH, 3rd, Lehrmann E et al. (2016) sFRP2 in the aged microenvironment drives melanoma metastasis and therapy resistance. *Nature* 532: 250-4

Kim HG, Tan L, Weisberg EL, Liu F, Canning P, Choi HG, Ezell SA, Wu H, Zhao Z, Wang J, Mandinova A, Griffin JD, Bullock AN, Liu Q, Lee SW, Gray NS (2013) Discovery of a potent and selective DDR1 receptor tyrosine kinase inhibitor. *ACS Chem Biol* 8: 2145-50

Kim MH, Kim J, Hong H, Lee SH, Lee JK, Jung E, Kim J (2016) Actin remodeling confers BRAF inhibitor resistance to melanoma cells through YAP/TAZ activation. *EMBO J* 35: 462-78

Konieczkowski DJ, Johannessen CM, Abudayyeh O, Kim JW, Cooper ZA, Piris A, Frederick DT, Barzily-Rokni M, Straussman R, Haq R, Fisher DE, Mesirov JP, Hahn WC, Flaherty KT, Wargo JA, Tamayo P, Garraway LA (2014) A melanoma cell state distinction influences sensitivity to MAPK pathway inhibitors. *Cancer Discov* 4: 816-27

Landowski TH, Olashaw NE, Agrawal D, Dalton WS (2003) Cell adhesion-mediated drug resistance (CAM-DR) is associated with activation of NF-kappa B (RelB/p50) in myeloma cells. *Oncogene* 22: 2417-21

Leitinger B (2014) Discoidin domain receptor functions in physiological and pathological conditions. *Int Rev Cell Mol Biol* 310: 39-87

Meads MB, Gatenby RA, Dalton WS (2009) Environment-mediated drug resistance: a major contributor to minimal residual disease. *Nat Rev Cancer* 9: 665-74

Miskolczi Z, Smith MP, Rowling EJ, Ferguson J, Barriuso J, Wellbrock C (2018) Collagen abundance controls melanoma phenotypes through lineage-specific microenvironment sensing. *Oncogene* 37: 3166-3182

Mondragon L, Mhaidly R, De Donatis GM, Tosolini M, Dao P, Martin AR, Pons C, Chiche J, Jacquin M, Imbert V, Proics E, Boyer L, Doye A, Luciano F, Neels JG, Coutant F, Fabien N, Sormani L, Rubio-Patino C, Bossowski JP et al. (2019) GAPDH Overexpression in the T Cell Lineage Promotes Angioimmunoblastic T Cell Lymphoma through an NF-kappaB-Dependent Mechanism. *Cancer Cell* 36: 268-287 e10

Muller J, Krijgsman O, Tsoi J, Robert L, Hugo W, Song C, Kong X, Possik PA, Cornelissen-Steijger PD, Geukes Foppen MH, Kemper K, Goding CR, McDermott U, Blank C, Haanen J, Graeber TG, Ribas A, Lo RS, Peeper DS (2014) Low MITF/AXL ratio predicts early resistance to multiple targeted drugs in melanoma. *Nat Commun* 5: 5712

Nadiminty N, Tummala R, Liu C, Yang J, Lou W, Evans CP, Gao AC (2013) NF-kappaB2/p52 induces resistance to enzalutamide in prostate cancer: role of androgen receptor and its variants. *Mol Cancer Ther* 12: 1629-37

Nazarian R, Shi H, Wang Q, Kong X, Koya RC, Lee H, Chen Z, Lee MK, Attar N, Sazegar H, Chodon T, Nelson SF, McArthur G, Sosman JA, Ribas A, Lo RS (2010) Melanomas acquire resistance to B-RAF(V600E) inhibition by RTK or N-RAS upregulation. *Nature* 468: 973-7

Pickup MW, Mouw JK, Weaver VM (2014) The extracellular matrix modulates the hallmarks of cancer. *EMBO Rep* 15: 1243-53

Poudel B, Lee YM, Kim DK (2015) DDR2 inhibition reduces migration and invasion of murine metastatic melanoma cells by suppressing MMP2/9 expression through ERK/NF-kappaB pathway. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 47: 292-8

Rambow F, Marine JC, Goding CR (2019) Melanoma plasticity and phenotypic diversity: therapeutic barriers and opportunities. *Genes Dev* 33: 1295-1318

Rathore M, Girard C, Ohanna M, Tichet M, Ben Jouira R, Garcia E, Larbret F, Gesson M, Audebert S, Lacour JP, Montaudie H, Prod'Homme V, Tartare-Deckert S, Deckert M (2019) Cancer cell-derived long pentraxin 3 (PTX3) promotes melanoma migration through a toll-like receptor 4 (TLR4)/NF-kappaB signaling pathway. *Oncogene* 38: 5873-5889

Reger de Moura C, Battistella M, Sohail A, Caudron A, Feugeas JP, Podgorniak MP, Pages C, Mazouz Dorval S, Marco O, Menashi S, Fridman R, Lebbe C, Mourah S, Jouenne F (2019) Discoidin domain receptors: A promising target in melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res* 32: 697-707

Rich L, Whittaker P (2005) Collagen and picrosirius red staining: a polarized light assessment of fibrillar hue and spatial distribution. *Braz J morphol Sci* 22: 97-104

Robert C, Grob JJ, Stroyakovskiy D, Karaszewska B, Hauschild A, Levchenko E, Chiarion Sileni V, Schachter J, Garbe C, Bondarenko I, Gogas H, Mandala M, Haanen J, Lebbe C, Mackiewicz A, Rutkowski P, Nathan PD, Ribas A, Davies MA, Flaherty KT et al. (2019) Five-Year Outcomes with Dabrafenib plus Trametinib in Metastatic Melanoma. *N Engl J Med* 381: 626-636

Robert G, Gaggioli C, Bailet O, Chavey C, Abbe P, Aberdam E, Sabatie E, Cano A, Garcia de Herreros A, Ballotti R, Tartare-Deckert S (2006) SPARC represses E-cadherin and induces mesenchymal transition during melanoma development. *Cancer Res* 66: 7516-23

Seguin L, Desgrosellier JS, Weis SM, Cheresch DA (2015) Integrins and cancer: regulators of cancer stemness, metastasis, and drug resistance. *Trends Cell Biol* 25: 234-40

Shain AH, Bastian BC (2016a) From melanocytes to melanomas. *Nat Rev Cancer* 16: 345-58

Shain AH, Bastian BC (2016b) The Genetic Evolution of Melanoma. *N Engl J Med* 374: 995-6

Shrivastava A, Radziejewski C, Campbell E, Kovac L, McGlynn M, Ryan TE, Davis S, Goldfarb MP, Glass DJ, Lemke G, Yancopoulos GD (1997) An orphan receptor tyrosine kinase family whose members serve as nonintegrin collagen receptors. *Mol Cell* 1: 25-34

Smith MP, Brunton H, Rowling EJ, Ferguson J, Arozarena I, Miskolczi Z, Lee JL, Girotti MR, Marais R, Levesque MP, Dummer R, Frederick DT, Flaherty KT, Cooper ZA, Wargo JA, Wellbrock C (2016) Inhibiting Drivers of Non-mutational Drug Tolerance Is a Salvage Strategy for Targeted Melanoma Therapy. *Cancer Cell* 29: 270-284

Smith MP, Sanchez-Laorden B, O'Brien K, Brunton H, Ferguson J, Young H, Dhomen N, Flaherty KT, Frederick DT, Cooper ZA, Wargo JA, Marais R, Wellbrock C (2014) The immune microenvironment confers resistance to MAPK pathway inhibitors through macrophage-derived TNFalpha. *Cancer Discov* 4: 1214-1229

Straussman R, Morikawa T, Shee K, Barzily-Rokni M, Qian ZR, Du J, Davis A, Mongare MM, Gould J, Frederick DT, Cooper ZA, Chapman PB, Solit DB, Ribas A, Lo RS, Flaherty KT, Ogino S, Wargo JA, Golub TR (2012) Tumour micro-environment elicits innate resistance to RAF inhibitors through HGF secretion. *Nature* 487: 500-4

Taniguchi K, Karin M (2018) NF-kappaB, inflammation, immunity and cancer: coming of age. *Nat Rev Immunol* 18: 309-324

Tichet M, Prod'Homme V, Fenouille N, Ambrosetti D, Mallavialle A, Cerezo M, Ohanna M, Audebert S, Rocchi S, Giaccherio D, Boukari F, Allegra M, Chambard JC, Lacour JP, Michiels JF, Borg JP, Deckert M, Tartare-Deckert S (2015) Tumour-derived SPARC drives vascular permeability and extravasation through endothelial VCAM1 signalling to promote metastasis. *Nat Commun* 6: 6993

Titz B, Lomova A, Le A, Hugo W, Kong X, Ten Hoeve J, Friedman M, Shi H, Moriceau G, Song C, Hong A, Atefi M, Li R, Komisopoulou E, Ribas A, Lo RS, Graeber TG (2016) JUN dependency in distinct early and late BRAF inhibition adaptation states of melanoma. *Cell Discov* 2: 16028

Tu MM, Lee FYF, Jones RT, Kimball AK, Saravia E, Graziano RF, Coleman B, Menard K, Yan J, Michaud E, Chang H, Abdel-Hafiz HA, Rozhok AI, Duex JE, Agarwal N, Chauca-Diaz A, Johnson LK, Ng TL, Cambier JC, Clambey ET et al. (2019) Targeting DDR2 enhances tumor response to anti-PD-1 immunotherapy. *Sci Adv* 5: eaav2437

Valiathan RR, Marco M, Leitinger B, Kleer CG, Fridman R (2012) Discoidin domain receptor tyrosine kinases: new players in cancer progression. *Cancer Metastasis Rev* 31: 295-321

Verfaillie A, Imrichova H, Atak ZK, Dewaele M, Rambow F, Hulselmans G, Christiaens V, Svetlichnyy D, Luciani F, Van den Mooter L, Claerhout S, Fiers M, Journe F, Ghanem GE, Herrmann C, Halder G, Marine JC, Aerts S (2015) Decoding the regulatory landscape of melanoma reveals TEADS as regulators of the invasive cell state. *Nat Commun* 6: 6683

Vogel W, Gish GD, Alves F, Pawson T (1997) The discoidin domain receptor tyrosine kinases are activated by collagen. *Mol Cell* 1: 13-23

von Massenhausen A, Sanders C, Bragelmann J, Konantz M, Queisser A, Vogel W, Kristiansen G, Duensing S, Schrock A, Bootz F, Brossart P, Kirfel J, Lengerke C, Perner S (2016) Targeting DDR2 in head and neck squamous cell carcinoma with dasatinib. *Int J Cancer* 139: 2359-69

Widmer DS, Cheng PF, Eichhoff OM, Belloni BC, Zipser MC, Schlegel NC, Javelaud D, Mauviel A, Dummer R, Hoek KS (2012) Systematic classification of melanoma cells by phenotype-specific gene expression mapping. *Pigment Cell Melanoma Res* 25: 343-53

Yeung DA, Shanker N, Sohail A, Weiss BA, Wang C, Wellmerling J, Das S, Ganju RK, Miller JLC, Herr AB, Fridman R, Agarwal G (2019) Clustering, Spatial Distribution, and Phosphorylation of Discoidin Domain Receptors 1 and 2 in Response to Soluble Collagen I. *J Mol Biol* 431: 368-390

Young HL, Rowling EJ, Bugatti M, Giurisato E, Luheshi N, Arozarena I, Acosta JC, Kamarashev J, Frederick DT, Cooper ZA, Reuben A, Gil J, Flaherty KT, Wargo JA, Vermi W, Smith MP, Wellbrock C, Hurlstone A (2017) An adaptive signaling network in melanoma inflammatory niches confers tolerance to MAPK signaling inhibition. *J Exp Med* 214: 1691-1710

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Composition, topology and mechanical properties of fibroblast-derived 3D ECMs.

A Images show collagen matrix gel contraction by HDF (human dermal fibroblasts), skin-MAF (melanoma associated fibroblasts isolated from skin lesions), LN-FRC (lymph node fibroblast reticular cells), and LN-MAF (melanoma associated fibroblasts isolated from metastatic lymph node).

B Immunofluorescence analysis of fibronectin (green) and collagen (red) fibers on decellularized ECM produced by human fibroblasts. Fibers orientation was quantified using ImageJ software. Scale bar, 10 μm . Images of picrosirius red stained collagen are shown.

C Collagens identified by mass spectrometry in fibroblast-derived ECM produced by HDF, skin MAF or by two FRCs (FRC#2 and FRC#5). See Supplementary data for the complete list of matrisome core proteins and matrisome-associated proteins ($n = 3$).

D Atomic force microscopy (AFM) measurement of the elastic properties (Young's modulus) of fibroblast-derived ECMs ($n = 2$).

Figure 2. Fibroblast-derived 3D ECM confers drug-protective action to human melanoma cells against anti-BRAF^{V600E} therapies.

A Scheme of the ECM-mediated drug protection assay.

B Illustration of the BRAF^{V600E} pathway and the MAPK pathway inhibitors used in the study.

C Time-lapse imaging of the proliferation of NuLight-labeled 501MEL cells plated on plastic (left panel), Coll-1 (collagen-1; middle panel) or LN-MAF-derived ECM (right panel) treated with vehicle or 2 μM Vemurafenib using the IncuCyte ZOOM system.

D Quantification of proliferation of NuLight-labeled 1205Lu cells plated for 48 h on plastic or on the indicated fibroblast-derived ECM prior a 96 h treatment with 5 μM Vemurafenib. * $P < 0.05$, **** $P < 0.001$, two-way ANOVA followed by Sidak's multiple comparison test.

E Quantification of the proliferation of 1205Lu cells plated for 48 h on plastic or FRC-derived-ECM prior treatment with 2 μM Vemurafenib and 0.01 μM Trametinib for 96 h. **** $P < 0.001$, two-way ANOVA followed by Sidak's multiple comparison test.

F Flow cytometry analysis of cell cycle distribution of 501MEL cells cultured on plastic or MAF-derived ECM and treated with vehicle or 2 μM Vemurafenib. The percentage of cells in different phases of the cell cycle is indicated.

G, H, I Immunoblotting of protein extracts from 1205Lu and 501MEL cell lines and short-term melanoma cultures (MM029) cultivated as described above on plastic or the indicated fibroblast-derived ECM in the presence or not of Vemurafenib 5 μ M (G), 2 μ M (H, I), or the dual RAF/MEKi RO5126766 1 μ M (H) for 48 h, using antibodies against P-MEK1/2, P-ERK1/2, P-Rb, E2F1, Survivin, p27KIP1, BIM or BAX. HSP60, loading control.

Figure 3. Expression of DDR1 and DDR2 in human melanoma.

A Meta-analysis of 363 cutaneous melanoma from TCGA (skin cutaneous melanoma, PanCancer Atlas) (<http://www.cbioportal.org/>) showing the percentage of samples with genetic alterations of *DDR1* and *DDR2*. Cases with missense (green) and truncating (blue) mutations, amplification (red) and mRNA overexpression (pink) are indicated; gray, individual cases.

B Immunohistochemical analysis of DDR1 and DDR2 levels on human melanoma tissue microarrays. Representative IHC images and quantification (right bar histograms) of DDR1 and DDR2 expression in normal skin, naevus, primary melanoma (PM) and lymph node melanoma metastases (MM). Scale bar, 100 μ m. Samples were scored as low, medium or high for DDR1 or DDR2 expression (naevus, n = 12; PM, n = 30; MM, n = 20).

C, D, E Immunoblotting of equal amounts of protein extracts from melanoma cell lines (C), isogenic pairs of parental sensitive and BRAFi-resistant cell lines (D) or short-term cell cultures from BRAF mutant patients using antibodies against DDR1, DDR2 or markers of the melanoma cell phenotype switching *AXL*, *MITF* or *SOX10*. ERK2, loading control.

F Box and whisker plots (10th to 90th percentile) show *DDR1* and *DDR2* expression across proliferative (Prol, n=53) versus invasive (Inv, n=33) cell states of melanoma cultures within the Mannheim, Philadelphia, and Zurich cohorts (GSE4840, GSE4841 and GSE4843, respectively data sets). The expression of *AXL* and *MITF* is shown as differentiation control markers. ns, non significant ($p > 0.05$); **** $p < 0.0001$ two-tailed Mann Whitney test.

Figure 4. Inhibition of DDR1 and DDR2 by genetic or pharmacological approaches abrogates ECM-mediated resistance to BRAF^{V600E} pathway inhibition.

A Immunoblotting of protein extracts of siCTRL-, siDDR1#1-, siDDR2#1- or siDDR1#1/siDDR2#1-transfected 1205Lu cells plated on MAF-derived ECM treated with vehicle or 5 μ M Vemurafenib for 96 h, using antibodies against DDR1, DDR2, P-MEK1/2, P-ERK1/2, P-Rb or Survivin. HSP60, loading control.

B Immunoblotting of protein extracts from short-term melanoma cell cultures MM099 transfected with siCTRL-, the combination siDDR1#1/siDDR2#1 or siDDR1#2/siDDR2#2 prior being cultivated on FRC-derived ECM and treated with vehicle or 2 μ M Vemurafenib combined with 0.01 μ M Trametinib, using antibodies against DDR1, DDR2, P-ERK1/2 or cleaved Caspase 3. HSP60, loading control.

C Immunoblot analysis of collagen I (Coll-I)-induced DDR1 and DDR2 tyrosine phosphorylation in 1205Lu cells. Cells were incubated with 10 μ g/ml of Coll-I in the presence or not of 7 μ M Imatinib or 1 μ M DDR1-IN-1 for 18 h. After cell lysis, DDR2 autophosphorylation was analyzed with anti-P-DDR2 following immunoprecipitation (IP) with anti-DDR2 antibodies. DDR1 autophosphorylation was analyzed in total cell lysates with anti-P-DDR1. HSP60 was used as loading control.

D Time-lapse imaging of proliferation of NuLight-labeled 1205Lu cells plated for 48 h on MAF-derived ECM prior treatment with 5 μ M Vemurafenib in the presence or not of 7 μ M Imatinib or 1 μ M DDR1-IN-1 for the indicated time (left). The histograms show quantification of cell proliferation at the experiment end point (right). ****P<0.001, Kruskal-Wallis test followed by Dunn's multiple comparison test.

E Immunoblotting of protein extracts from 1205Lu cells cultivated on MAF-derived ECM, treated or not with 5 μ M Vemurafenib and/or 7 μ M Imatinib using antibodies against P-Rb, P-ERK1/2, Survivin or cleaved Caspase 3. HSP60, loading control.

F Flow cytometry analysis of cell death (Annexin V/PI labeling) in 1205Lu cells plated on FRC-derived ECM and treated with vehicle or 5 μ M Vemurafenib in the presence or not of 7 μ M Imatinib or 1 μ M DDR1-IN-1. Right bar histograms show the distribution of cells (% of total) across the different forms of death.

Figure 5. Interaction of melanoma cells with 3D-ECM induces the clustering of DDR1 and DDR2 upon BRAFi treatment.

A Representative images of 1205 cells cultivated on collagen-I (Coll-I) or FRC-derived ECM for 48 h prior treatment with vehicle or 5 μ M Vemurafenib for 96 h. Immunofluorescence for Phospho-DDR1 (P-DDR1) (red; top panels) and Phospho-DDR2 (P-DDR2) (red; bottom panels), F-actin (green) and nuclei (blue) is shown. Enlarged images of P-DDR1 and P-DDR2 immunostaining are shown. White arrows indicate P-DDR1 and P-DDR2 cell membrane linear clustering. Scale bar = 10 μ m.

B, C Quantification of globular *versus* linear clusters of phosphorylated DDR1 and DDR2 (B) and of cell area (C) from immunofluorescence staining shown in (A) using Image J software. Data are from >50 individual cells (n=3). ****P<0.0001, Kruskal-Wallis test followed by Dunn's multiple comparisons test.

D Quantification of 1205Lu cell proliferation following cultures on Coll-I or FRC-derived 3D-ECM in the presence or not of 5 μ M Vemurafenib showing as a control the drug protective effect of fibroblast-derived ECM against BRAFi compared to Collagen I coating.

Figure 6. Targeting DDR1 and DDR2 by Imatinib sensitizes melanoma tumors to BRAF^{V600E} inhibition.

A Outline of the experimental set up and treatment regimens.

B 1205Lu cells were s.c. inoculated into nude mice and when tumors reached 75 mm³, mice were treated with the indicated mono- or combo-therapy for 30 days. Graphs show tumor growth following treatment by indicated drugs. Data shown are mean \pm SEM of tumor volume (n = 6; ****P<0.0001, two-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparison test).

C Scatter plot graphs showing the tumor weight upon treatment by the indicated mono- or combo-therapy. Data shown are mean \pm SEM of tumor weight. ***P<0.0002, Kruskal-Wallis test followed by Dunn's multiple comparison test; ns, non significant.

D Immunofluorescence stainings using anti-cleaved Caspase 3 (red), anti-Ki67 (green) and DAPI in tumor sections of 1205Lu-derived xenografts from (B). Scale bar, 100 μ m. A microphotograph of the tumor size in each treated group is shown (representative of n=5 to 10).

E Kaplan-Meier survival curves of mice treated with vehicle, Imatinib, Vemurafenib or Vemurafenib/Imatinib. Median time to progression was 18, 20, 36 and 48 days, respectively. Log rank (Mantel-Cox) for Vemurafenib vs Vemurafenib/Imatinib mesylate. ****p < 0.0001.

F Mouse body weight was measured at the indicated day. Data shown are mean \pm SEM (n = 10).

Figure 7. Imatinib normalizes collagen deposition and remodeling induced upon BRAFi treatment.

A Sections of 1205Lu xenografts from Fig. 6B were stained with picosirius red and imaged under transmission light (upper panels) or polarized light (middle panels) (scale bar, 500 μ m) or imaged by second harmonic generation (SHG) microscopy (lower panels) (scale bar, 50 μ m) to examine collagen fiber network upon the mono or combined regimens.

B Quantification of collagen maturity and fiber thickness in 1205Lu xenografts stained with picosirius red using polarized light microscopy. Birefringence hue and amount of collagen fibers were quantified as a percent of total tissue area.

C Quantification of collagen fibers using SHG microscopy in tumor sections from (A). *** $p < 0.0002$, Mann-Whitney test.

Figure 8. Targeting the non-canonical NF κ B2 pathway overcomes DDR1/2-dependent MM-DR to BRAF/MEK inhibition and leads to apoptotic melanoma cell death.

A Immunoblotting of protein extracts from 1205Lu cells cultivated on MAF-derived ECM treated with vehicle or 5 μ M Vemurafenib and/or 7 μ M Imatinib, for the indicated time using antibodies against P-ERK1/2, P-Rb, Survivin, cleaved Caspase 3, RelB, P-p65 and HSP60 as loading control.

B Immunoblot analysis of protein extracts from siCTRL- or siDDR1/2-transfected SKMEL5 cells plated on FRC-derived ECM in the presence of 2 μ M Vemurafenib and 0.01 μ M Trametinib for 96 h using antibodies against DDR1, DDR2, P-ERK1/2, E2F1, Survivin, cleaved Caspase 3, RelB, p100/p52 and HSP60 as loading control were used.

C Illustration of the non-canonical p52/RelB NF κ B2 pathway and inhibitors used in the study.

D Immunoblot analysis of protein extracts from 1205Lu cells cultivated on MAF-derived ECM for 96 h in the presence of Vemurafenib and/or a pan-IKK inhibitor (IKKi, BMS-345541 3 μ M) using antibodies against P-ERK1/2, P-Rb, Survivin, RelB, P-p65 and HSP60 as loading control.

E Immunoblotting of protein extracts obtained from SKMEL5 cells that were plated on FRC-derived ECM and treated with 5 μ M Vemurafenib in combination or not with the 5 μ M DDR1/2 inhibitor DDR1-IN-1 or 10 μ M NIK inhibitor (NIKi) for 96 h. Antibodies against P-ERK1/2, P-Rb, Survivin, cleaved Caspase 3, RelB, p100/p52 and HSP60 as loading control were used.

Figure 9. Model of DDR1/DDR2-dependent matrix-mediated drug resistance to MAPK-targeting therapies in melanoma. BRAF-mutated melanoma cells adapt to BRAF/MEK inhibition by turning on a drug tolerance pathway that is initiated by collagen-rich environments interacting with cancer cell DDR1/2. Clustered DDR1/2 activates a non-canonical NF κ B2 (p52/RelB) resistance pathway that is therapeutically targetable with clinically approved compounds such as Imatinib or with pre-clinically tested NIK inhibitors.

SUPPLEMENTARY FIGURE LEGENDS

Supplementary Figure 1. Quantitative mass spectrometry analysis of fibroblast-derived ECM.

Complete list of core matrisome and matrisome-associated proteins detected by mass spectrometry of fibroblast-derived ECM produced by HDF, skin MAF or by two lymphatic FRCs (FRC#2 and FRC#5). The table provides the Mascot results and the molar % (iBAQ score) for identified proteins at 1% FDR. Identified proteins were matched with the human matrisome database (Naba A, Ding H, Whittaker CA, Hynes RO. <http://matrisomeproject.mit.edu>) to retrieve the division and the category. The blue histogram and the values correspond to the molar % calculated for the entire dataset or for the different matrisome categories.

Supplementary Figure 2. Blocking β 1 integrin/FAK pathway does not inhibit ECM-mediated resistance to BRAF inhibition.

A Quantification of 501MEL cell proliferation following 48 h of culture on plastic or FRC-derived ECM prior to treatment with 2 μ M Vemurafenib in the presence or not of β 1 integrin blocking antibodies (10 μ g/ml) or FAK inhibitor (5 μ M) for 7 h. ns, non significant, * P <0.05, Kruskal-Wallis test.

B Immunoblotting of protein extracts from siCTRL- or siFAK-transfected 501MEL cells plated on FRC-derived ECM treated with vehicle or 2 μ M Vemurafenib or 1 μ M dual RAF/MEK inhibitor RO5126766 for 72 h, using antibodies against FAK, P-MEK1/2, P-ERK1/2, P-Rb, Cyclin D1 or survivin. HSP60, loading control.

Supplementary Figure 3. Inhibition of DDR1 and DDR2 by genetic or pharmacological approaches abrogates ECM-mediated resistance to BRAF^{V600E} pathway inhibition.

A Immunoblotting of protein extracts of siCTRL-, siDDR1#2-, siDDR2#2- or siDDR1#2/siDDR2#2-transfected 1205Lu cells plated on MAF-derived ECM in the presence or not of 5 μ M Vemurafenib for 96 h, using antibodies against DDR1, DDR2, P-MEK1/2, P-ERK1/2, P-Rb or survivin. HSP60, loading control (n=2).

B Time-lapse imaging of proliferation of NuLight-labeled 1205Lu plated for 48 h on FRC-derived ECM prior treatment with 5 μ M Vemurafenib in the presence or not of 7 μ M Imatinib

or 1 μM DDR1-IN-1 for the indicated time. Right bar histograms show quantification of cell proliferation at the experiment end point. **** $P < 0.001$, Kruskal-Wallis test.

C Immunoblotting of protein extracts from 1205Lu cells cultivated on FRC-derived ECM for 96 h in the presence of 5 μM Vemurafenib, 0.01 μM Trametinib or the combination of 2 μM Vemurafenib and 0.01 μM Trametinib, in the presence or not of 5 μM Imatinib or 10 μM Nilotinib using anti-P-MEK1/2, P-ERK1/2, P-Rb, E2F1, Survivin, or Cleaved Caspase 3 antibodies ($n=2$). HSP60, loading control.

Supplementary Figure 4. Analysis of the phospho-proteome of BRAFi-treated melanoma cells cultivated on 3D-ECM.

A Kinases and phosphorylated substrates were detected using an immunoblot array (Proteome Profiler Human phospho-kinase array kit). 501MEL cells were cultured on plastic or 3D-ECM for 48 h prior treatment with 2 μM Vemurafenib for additional 2 days before preparation of cell lysates and immunoblot array analysis following manufacturer's instructions.

B Mean pixel density was analyzed using Image J software.

Supplementary Figure 5. Analysis of phospho-AKT levels in BRAFi/MEKi-treated melanoma cells cultivated on 3D-ECM.

A Immunoblotting of protein extracts from 501MEL cells plated on plastic or FRC-derived ECM in the presence or not of 2 μM Vemurafenib, 1 μM RO5126766, 0.01 μM Trametinib or the combination 0.01 μM Trametinib/2 μM Vemurafenib for 72 h, using antibodies against P-ERK1/2, P-AKT, P-Rb or p27KIP1. HSP60, loading control.

B Immunoblotting of protein extracts from 1205Lu cells plated on plastic or FRC-derived ECM in the presence or not of 2 μM or 5 μM Vemurafenib or 1 μM dual RAF/MEKi RO5126766 for 72 h, using antibodies against P-ERK1/2, P-AKT, P-Rb or p27KIP1. HSP60, loading control.

Supplementary Figure 6. Pharmacological targeting of DDR1/2 or NIK decreases expression of NF κ B2/p52 and RelB in ECM-cultivated and BRAFi-treated melanoma cells.

A Immunoblot analysis of protein extracts from siCTRL- or siDDR1/2-transfected short-term MM099 cells plated on FRC-derived ECM in the presence of 2 μM Vemurafenib and 0.1 μM Trametinib for 96 h. Anti-DDR1, DDR2, P-ERK1/2, RelB, p100/p52 and HSP60 as loading control were used.

B Immunoblot analysis of protein extracts from 1205Lu cells plated on FRC-derived ECM and treated with or without 5 μ M Vemurafenib in the presence or not of DDR1/2 inhibitor (DDR1-IN-1, 5 μ M) or NIK inhibitor (NIKi, 10 μ M) for 96 h. Antibodies against P-ERK1/2, RelB, p100/p52 and HSP60 as loading control were used.

Supplementary Table 1: List of antibodies used in this study

Primary Antibody	Company	Catalog number	Dilutions
AXL (C89E7)	Cell Signaling	8661	WB 1:1000
BAX	Cell Signaling	2772	WB 1:1000
BIM (H-191)	Santa Cruz	sc-11425	WB 1:1000
Caspase 3	Cell Signaling	9662	WB 1:500
Cleaved Caspase 3	Cell Signaling	9661	IF 1:100
Collagen I	Abcam	ab34710	IF 1:500
Cyclin D1 (DCS-6)	BD Biosciences	556470	WB 1:1000
Cyclin D1 (DCS-6)	BioLegend	681902	WB 1:1000
DDR1 (D1G6) XP®	Cell Signaling	5583	WB 1:1000 IHC 1:100
DDR2	Cell Signaling	12133	WB 1:1000
DDR2 (3B11E4)	Santa Cruz	sc-81707	IHC 1:50
E2F1	Cell Signaling	3742	WB 1:1000
ERK2	Santa Cruz	sc-1647	WB 1:1000
FAK	Upstate	05-182	WB 1:1000
Fibronectin (EP5)	Santa Cruz	sc-8422	IF 1:200
HSP60 (K19)	Santa Cruz	sc-1722	WB 1:1000
Ki67	Abcam	ab16667	IF 1:250
MEK2	GeneTex	GTX630542	WB 1:1000
MITF (C5)	Invitrogen	MA5-14146	WB 1:1000
NFkB2 p100/p52 (18D10)	Cell Signaling	3017	WB 1:1000
p-DDR1 (Tyr792)	Cell Signaling	11994	WB 1:1000 IF 1:100
p-DDR2 (Tyr740)	R&D System	MAB25382	WB 1:1000 IF 1:100
p-ERK1/2 (Thr202/ Tyr204)	Cell Signaling	9101	WB 1:1000
p-FAK (Tyr397)	Cell Signaling	3283	WB 1:1000
p-MEK1/2 (Ser 221) (166F8)	Cell Signaling	2338	WB 1:1000
p-P65 (Ser536) (93H3)	Cell Signaling	3033	WB 1:1000
p-PDGFRb (Tyr751)	R&D System	AF1767	WB 1:500
p-Rb (Ser795)	Cell Signaling	9301	WB 1:1000
p27Kip1 (D69C12)	Cell Signaling	3686	WB 1:1000
PDGFRb (C82A3)	Cell Signaling	4564	WB 1:1000
Rb (4H1)	Cell Signaling	9309	WB 1:1000
RelB (C1E4)	Cell Signaling	4922	WB 1:1000
SOX10	Abcam	ab155279	WB 1:1000
Survivin	Cell Signaling	2808	WB 1:1000

Secondary Antibody	Company	Catalog number	Dilutions
Anti-mouse IgG, HRP-linked Antibody	Cell Signaling	7076	WB 1:2000
Anti-rabbit IgG, HRP-linked Antibody	Cell Signaling	7074	WB 1:2000
Goat anti-Rabbit, Alexa Fluor® 488	Invitrogen	A11034	IF 1:200
Goat anti-Rabbit, Alexa Fluor® 594	Invitrogen	A11012	IF 1:200
mouse anti-goat IgG-HRP	Santa Cruz	sc-2354	WB 1:5000

Figure 1

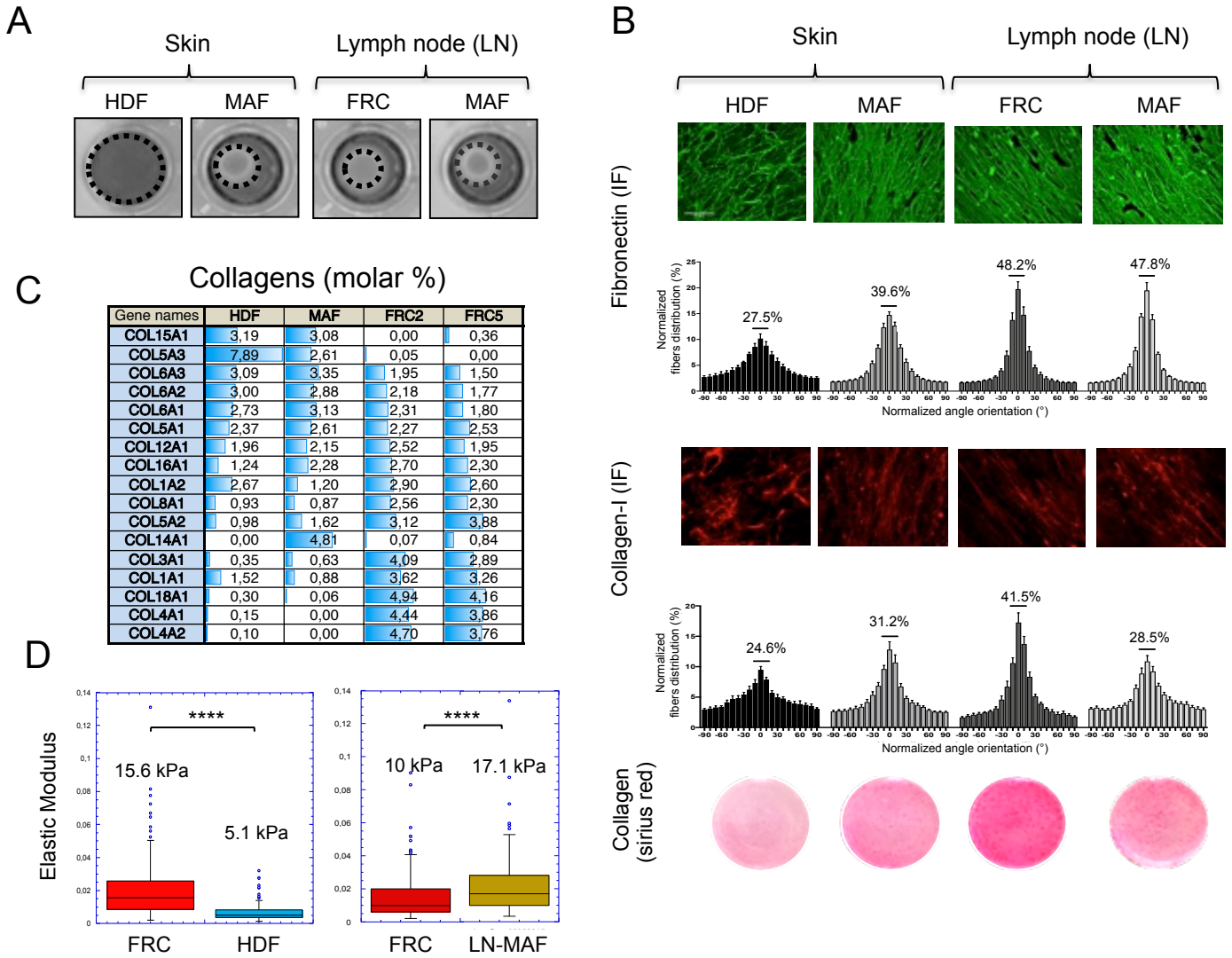


Figure 2

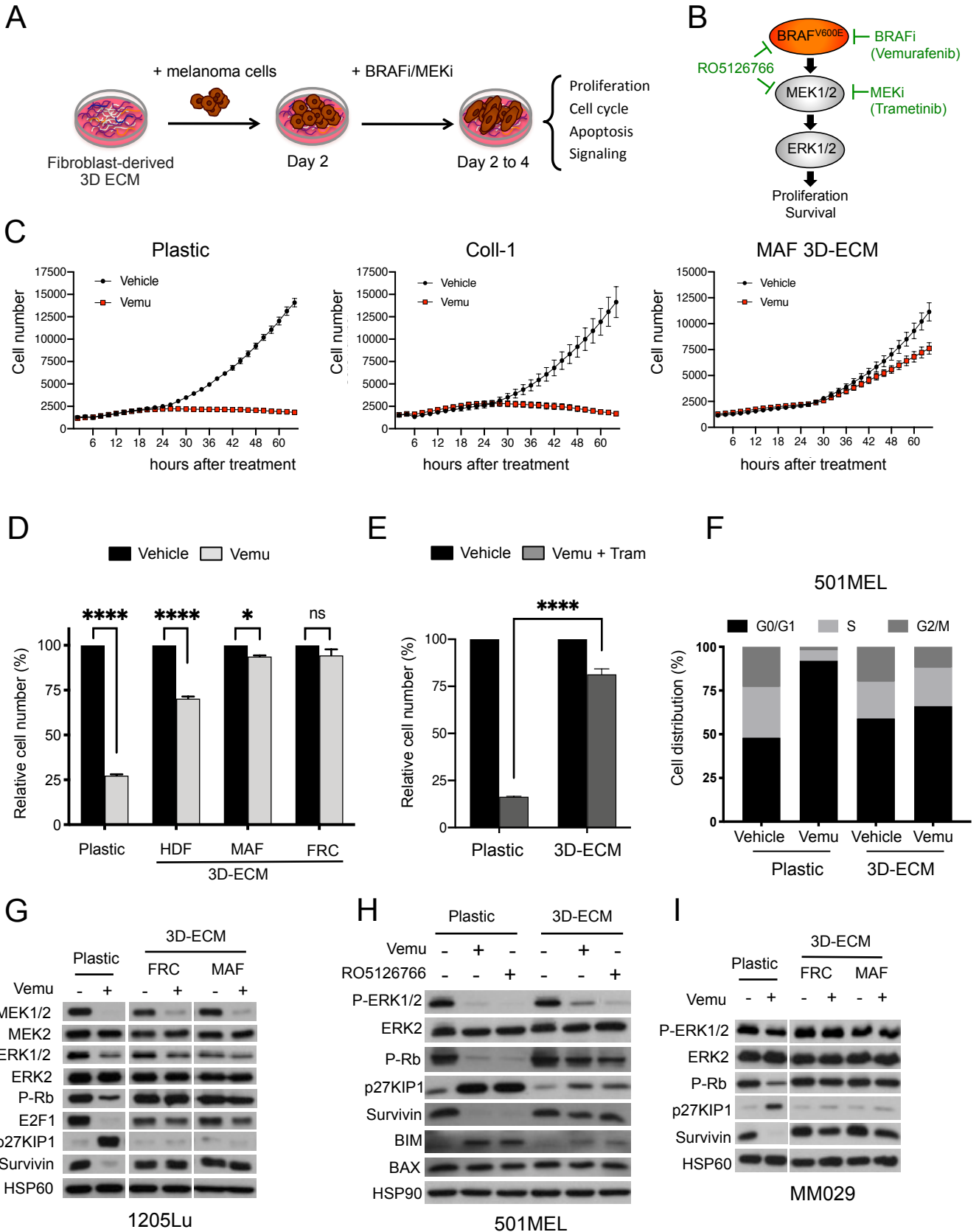


Figure 3

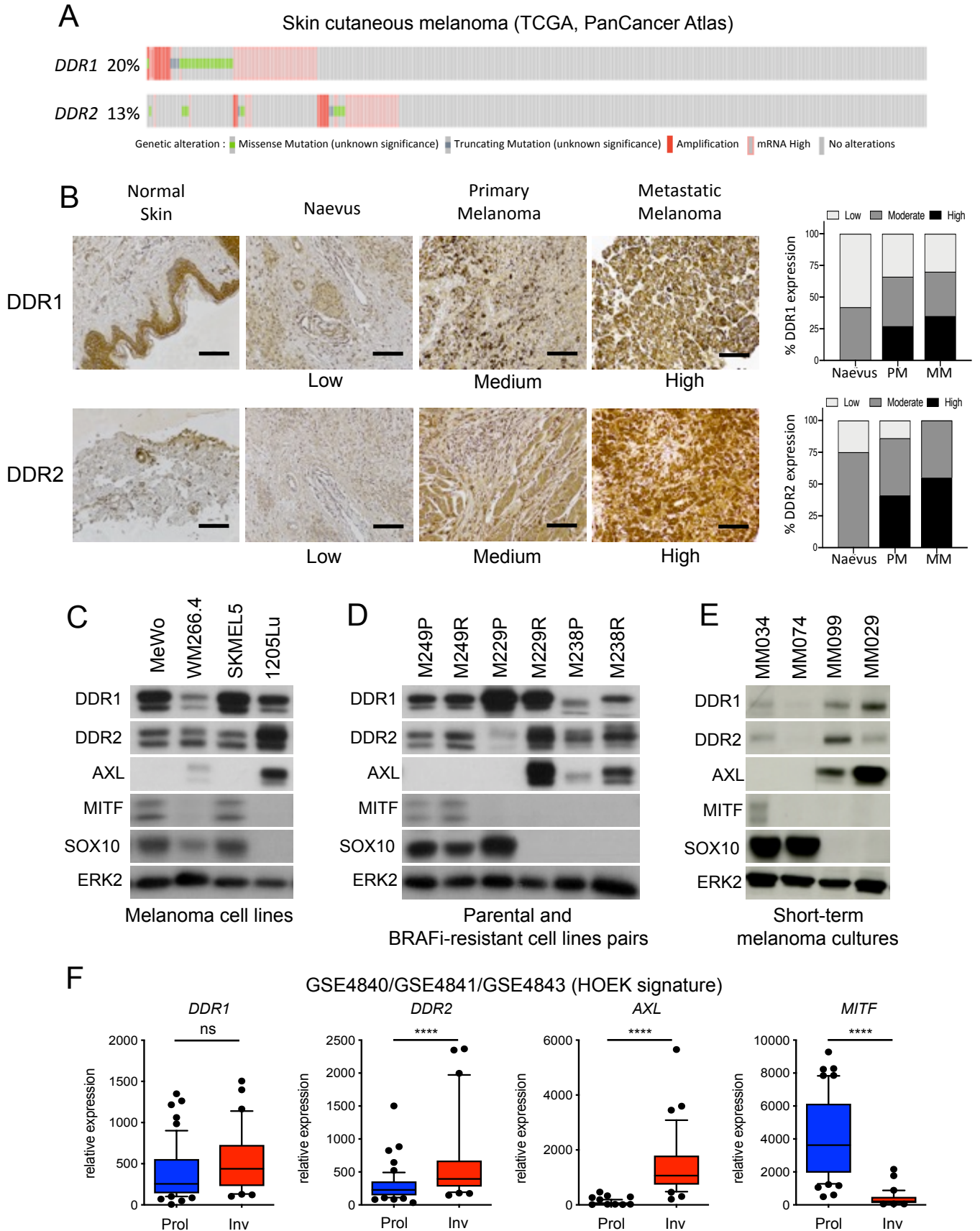
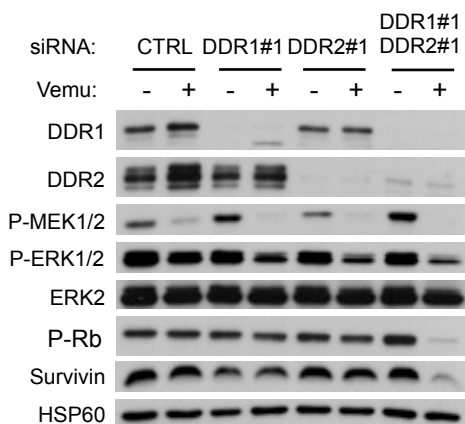


Figure 4

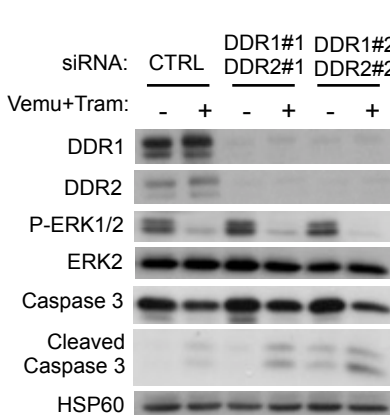
A

1205Lu on 3D-ECM

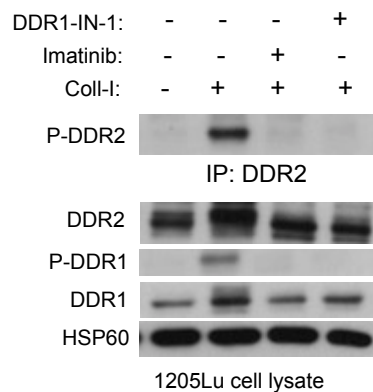


B

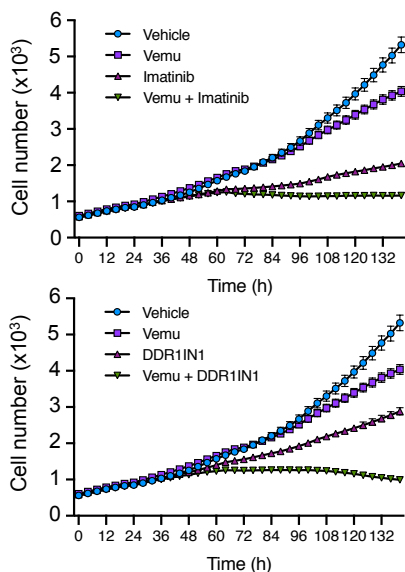
MM099 on 3D-ECM



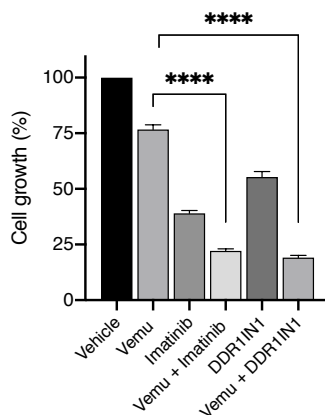
C



D

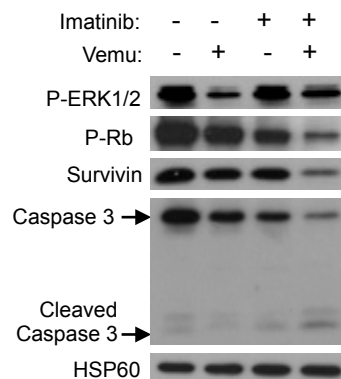


1205Lu on 3D-ECM

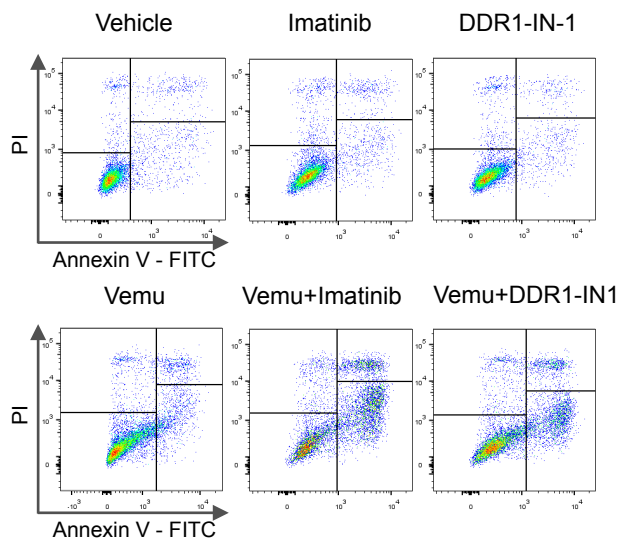


E

1205Lu on 3D-ECM



F



1205Lu on 3D-ECM

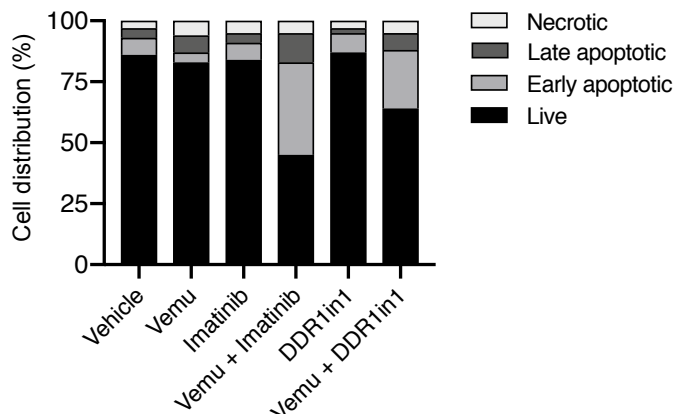


Figure 5

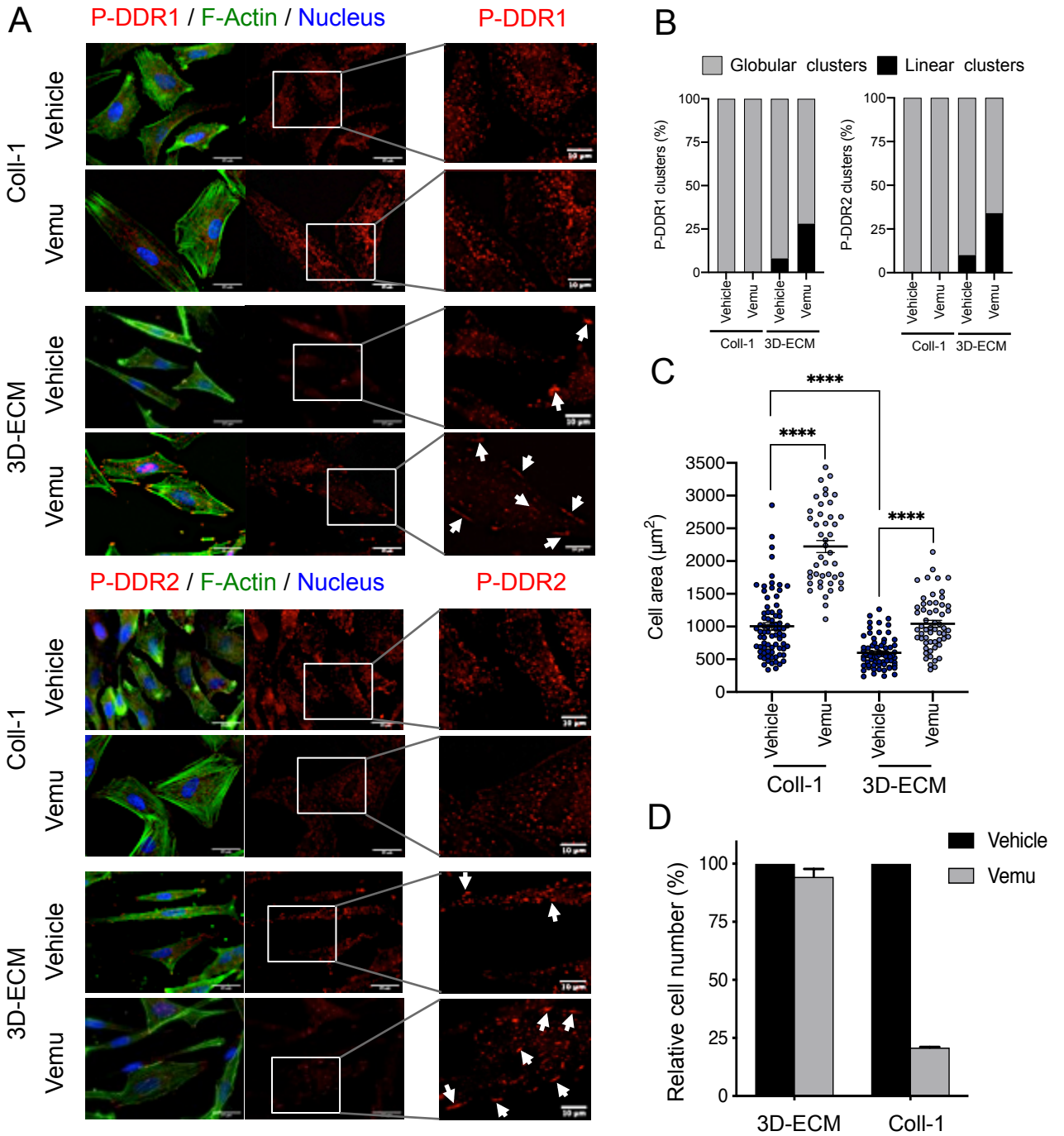


Figure 7

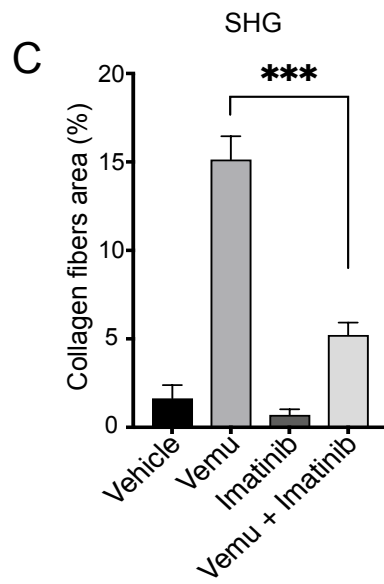
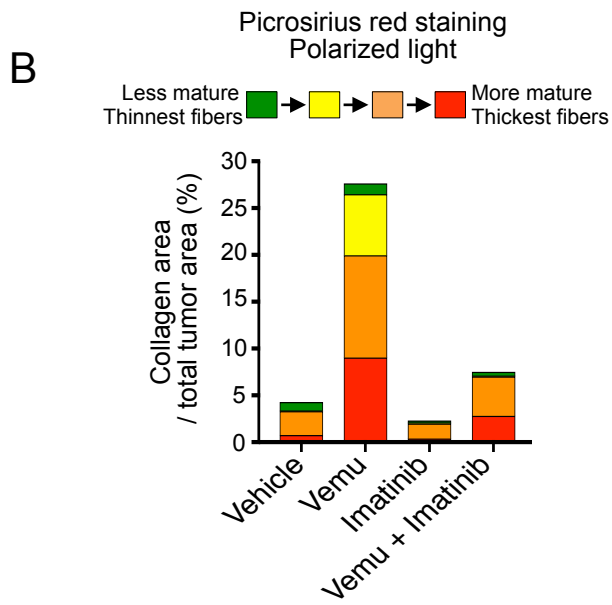
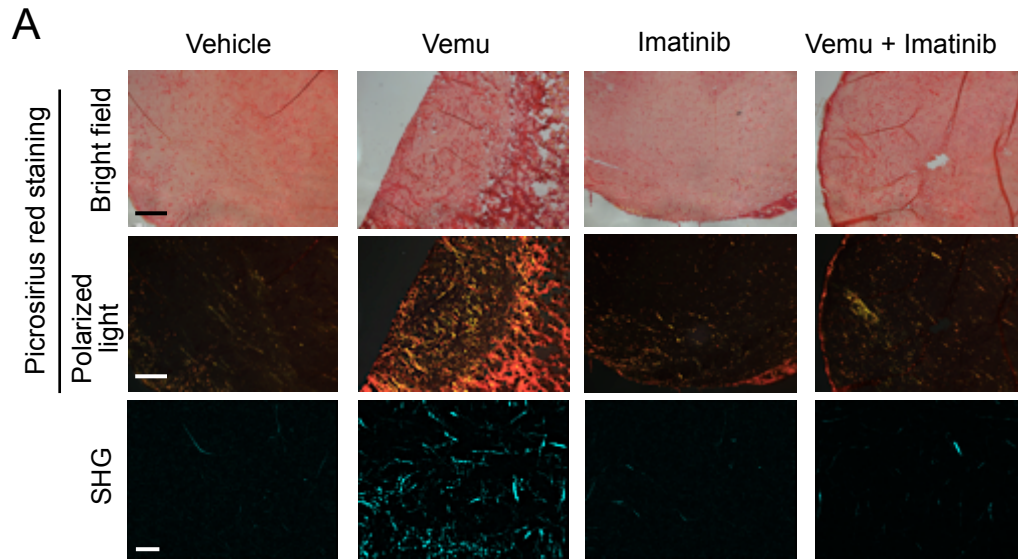


Figure 8

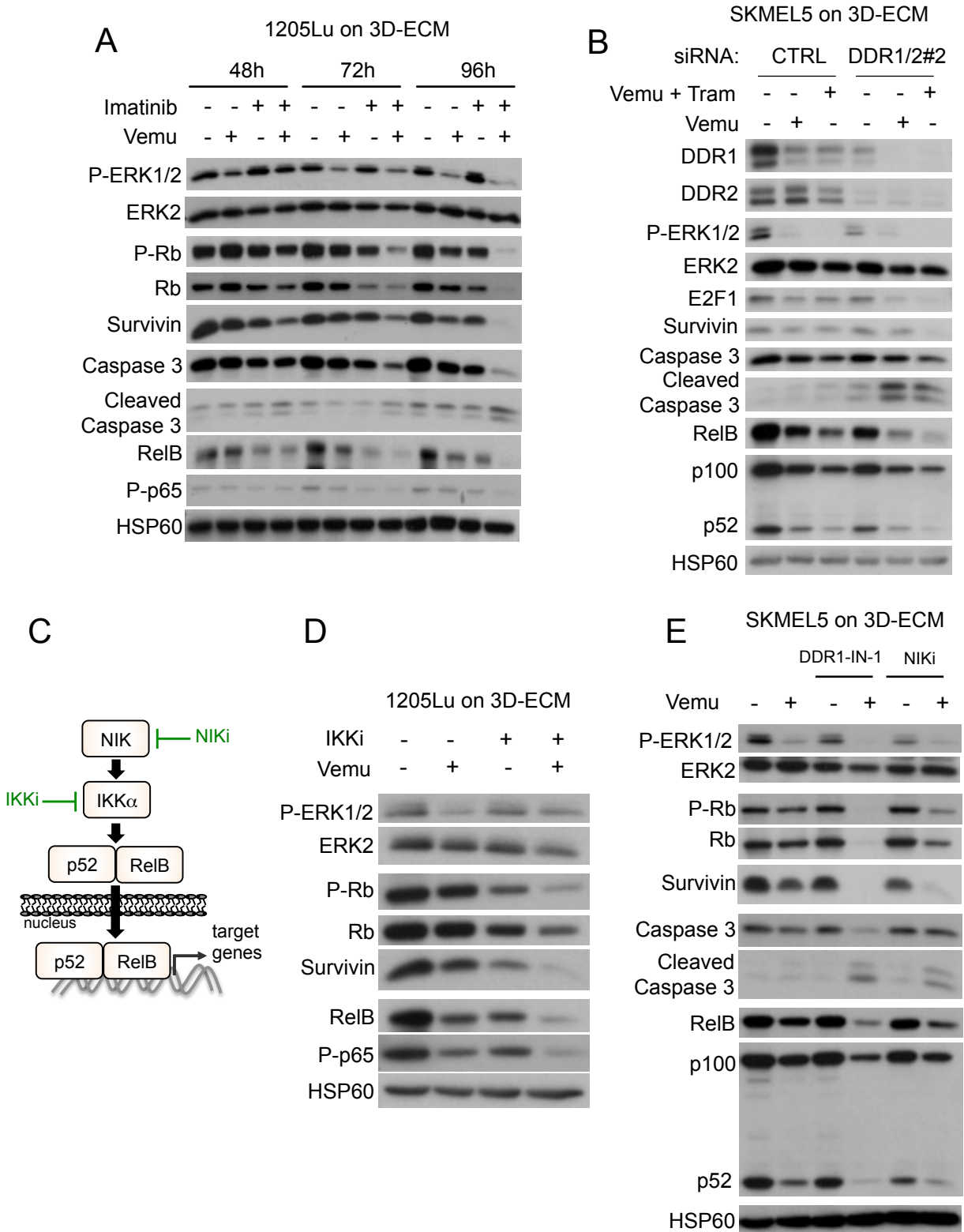
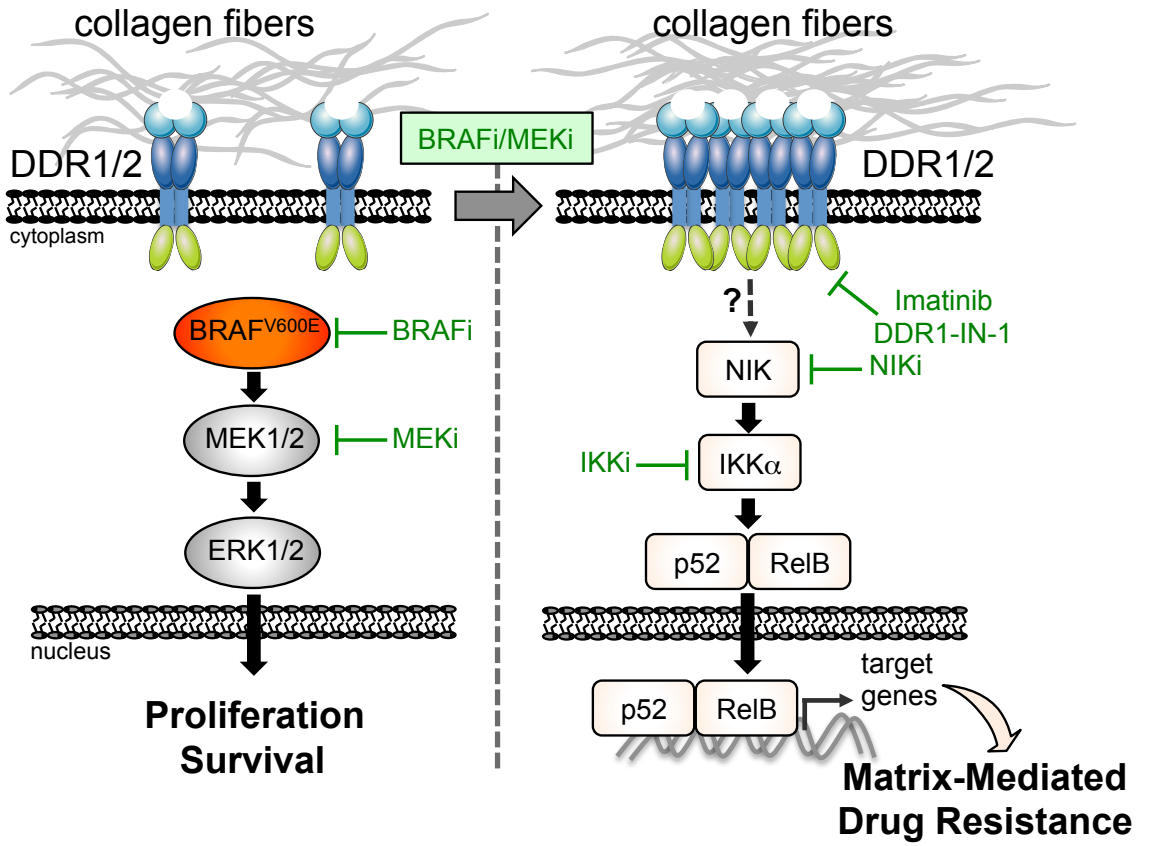


Figure 9



Supplementary Figure 1

ECM Glycoproteins (molar %)

Gene names	HDF	MAF	FRC2	FRC5
FN1	0,57	1,45	3,59	2,92
TGFB1	0,97	3,17	2,54	2,15
EMILIN2	7,07	4,02	0,00	0,00
TNC	1,72	5,17	2,17	1,05
FBN1	2,13	0,33	3,59	3,42
FBN2	6,05	0,10	2,82	1,81
FBLN1	1,19	6,02	0,15	1,51
FBLN2	2,71	3,14	1,38	1,68
FBLN5	0,27	1,80	4,19	2,73
THBS1	1,45	1,61	2,06	1,67
THBS2	0,04	0,00	4,79	4,95
DPT	4,44	5,25	0,39	0,28
CYR61	0,94	0,17	4,35	3,15
EFEMP2	1,26	2,14	3,40	2,30
EFEMP1	0,44	0,00	3,05	3,28
NID1	0,39	0,07	4,41	3,48
NID2	0,26	0,32	4,39	3,38
MFAP2	2,09	0,57	3,84	3,48
IGFBP3	4,78	3,36	0,00	0,00
IGFBP5	1,01	0,00	5,11	4,87
IGFBP7	0,00	0,00	10,37	0,74
LTBP2	2,66	0,59	3,85	3,34
LTBP1	0,26	0,03	5,29	4,17
MXRA5	4,13	6,33	0,00	0,00
TNXB	5,14	1,98	0,04	0,20
ELN	7,78	1,65	0,00	0,00
AEBP1	4,03	3,97	1,56	1,23
LAMB2	2,17	0,55	1,21	0,21
EMILIN1	2,23	2,46	2,52	2,23
THSD4	2,25	0,05	3,68	3,01
ECM1	1,46	3,09	3,48	2,85
LAMA5	0,17	0,00	0,00	0,72
SBSPON	0,00	0,00	0,00	0,00
SPARC	0,03	0,03	7,16	3,26
HMCN1	0,00	11,11	0,00	0,00
PCOLCE	1,95	1,35	5,72	1,07
ABI3BP	0,00	0,18	0,00	0,00
CTGF	0,00	0,00	8,14	2,01
LAMC1	0,27	0,07	3,77	2,40
PXDN	0,28	0,00	5,48	3,35
LAMB4	0,35	0,05	3,88	3,19
SPON2	0,00	0,00	6,42	4,69
SRPX2	0,07	0,00	5,61	4,58
LAMA4	0,13	0,02	4,07	2,21
MFGE8	0,03	0,00	6,96	3,62
TINAGL1	0,01	0,00	3,04	3,26
LAMB1	0,02	0,00	4,20	2,48

Proteoglycans (molar %)

Gene names	HDF	MAF	FRC2	FRC5
BGN	0,95	0,56	3,59	2,96
HSPG2	0,44	1,75	3,99	3,28
DCN	4,09	1,77	2,52	1,95
LUM	5,63	0,81	2,39	1,69
VCAN	0,96	0,31	2,59	3,26
PRELP	10,34	0,77	0,00	0,00
FMOD	10,78	0,34	0,00	0,00

ECM Regulators (molar %)

Gene names	HDF	MAF	FRC2	FRC5
LOX	0,04	0,67	5,29	3,40
LOXL1	1,95	1,89	3,91	3,10
LOXL2	0,01	0,15	5,44	4,06
LOXL3	0,00	0,00	0,00	0,00
LOXL4	0,64	2,13	5,23	2,02
TGM2	1,89	0,61	4,08	2,36
HTRA1	0,97	2,15	1,88	1,49
SERPINH1	0,27	0,17	5,95	3,61
CSTB	1,27	7,01	2,53	0,30
TIMP3	3,48	2,23	0,93	2,91
CD109	3,64	7,47	0,00	0,00
CTSB	0,38	0,85	6,41	3,09
MMP14	0,00	0,00	8,86	2,25
ADAMTSL1	0,00	0,59	6,61	2,93
ADAMTSL4	7,92	0,88	0,33	0,55
SERPINE2	0,82	0,18	3,63	3,17
SERPINE1	0,00	0,00	5,11	3,71
CTSK	0,86	10,25	0,00	0,00
P4HA2	0,00	0,00	8,30	2,56
P4HA1	0,00	0,00	6,87	3,47
PLOD2	0,00	0,00	8,57	1,96
PLOD1	0,00	0,00	7,47	3,45
HTRA3	4,76	6,35	0,00	0,00
F13A1	2,18	0,41	3,38	2,19
TIMP1	0,00	0,00	8,45	2,66
LEPRE1	0,00	0,00	6,78	3,97
SULF1	0,00	0,00	6,57	4,13

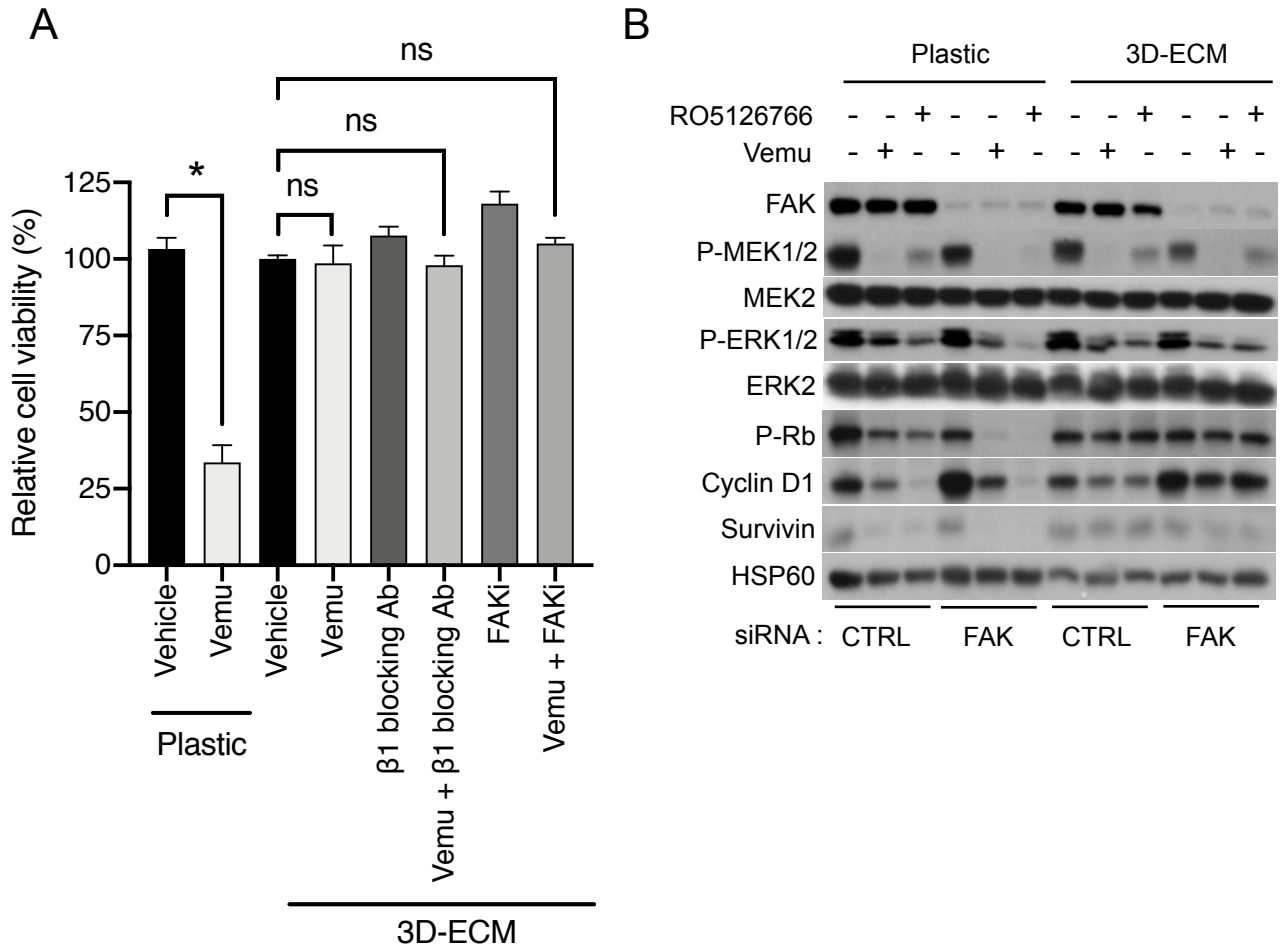
ECM-affiliated proteins (molar %)

Gene names	HDF	MAF	FRC2	FRC5
LGALS1	1,00	1,18	5,47	2,91
LGALS8	0,36	1,63	7,84	1,04
LGALS3	0,40	2,82	5,66	2,20
ANXA2;ANXA2P2	1,21	1,07	4,75	2,47
ANXA1	0,66	0,27	5,88	2,83
ANXA6	0,12	0,05	8,59	2,03
ANXA5	0,18	0,22	7,66	2,69
GREM1	0,18	0,49	4,57	2,41

Secreted Factors (molar %)

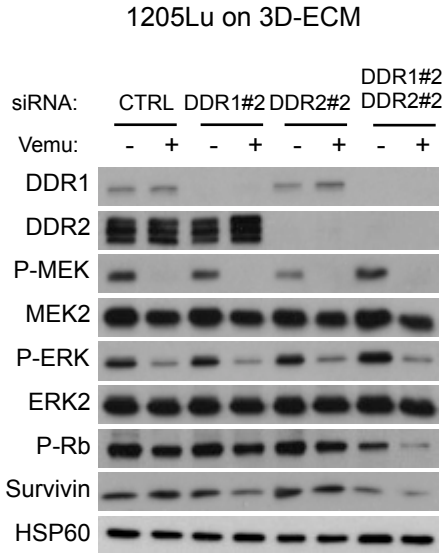
Gene names	HDF	MAF	FRC2	FRC5
S100A4	9,17	1,94	0,00	0,00
S100A6	3,80	1,10	3,12	2,00
S100A9	1,95	3,39	1,42	1,83
S100A10	1,04	0,45	6,38	3,10
S100A11	2,02	0,21	5,49	2,79
S100A13	1,28	5,46	3,44	0,80
CXCL12	5,80	4,96	0,16	0,14
GDF15	0,15	0,00	4,72	4,51
WNT5A	9,64	0,00	0,97	0,14
WGF2	0,58	0,70	3,63	3,00
ANGPTL4	0,24	0,00	5,21	3,80
ANGPTL2	8,42	2,69	0,00	0,00

Supplementary Figure 2

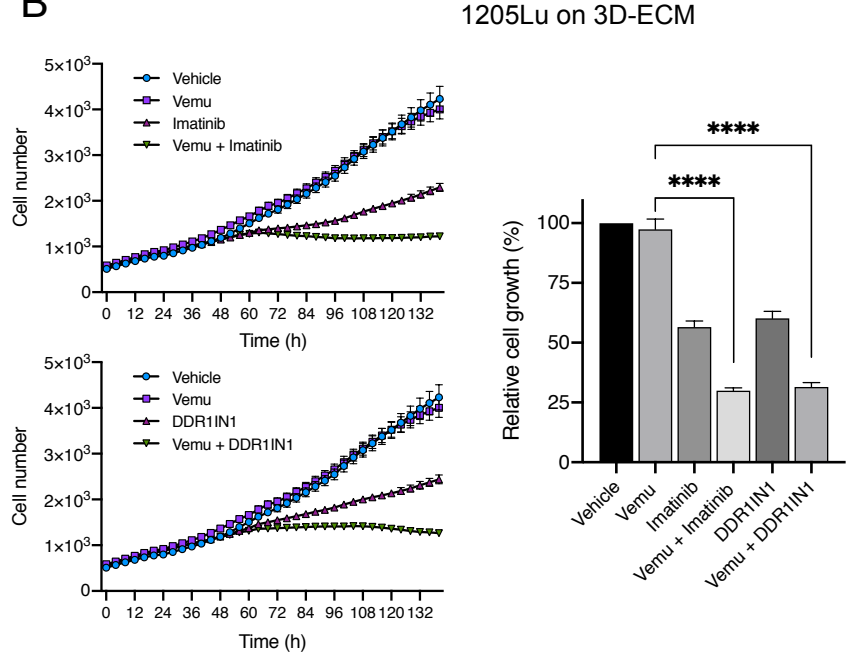


Supplementary Figure 3

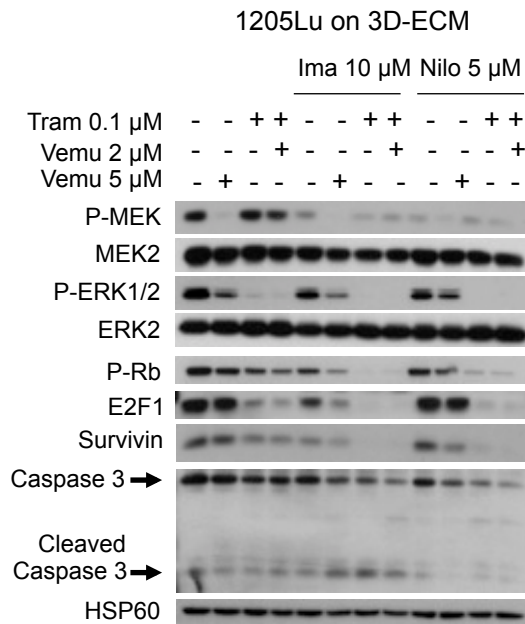
A



B

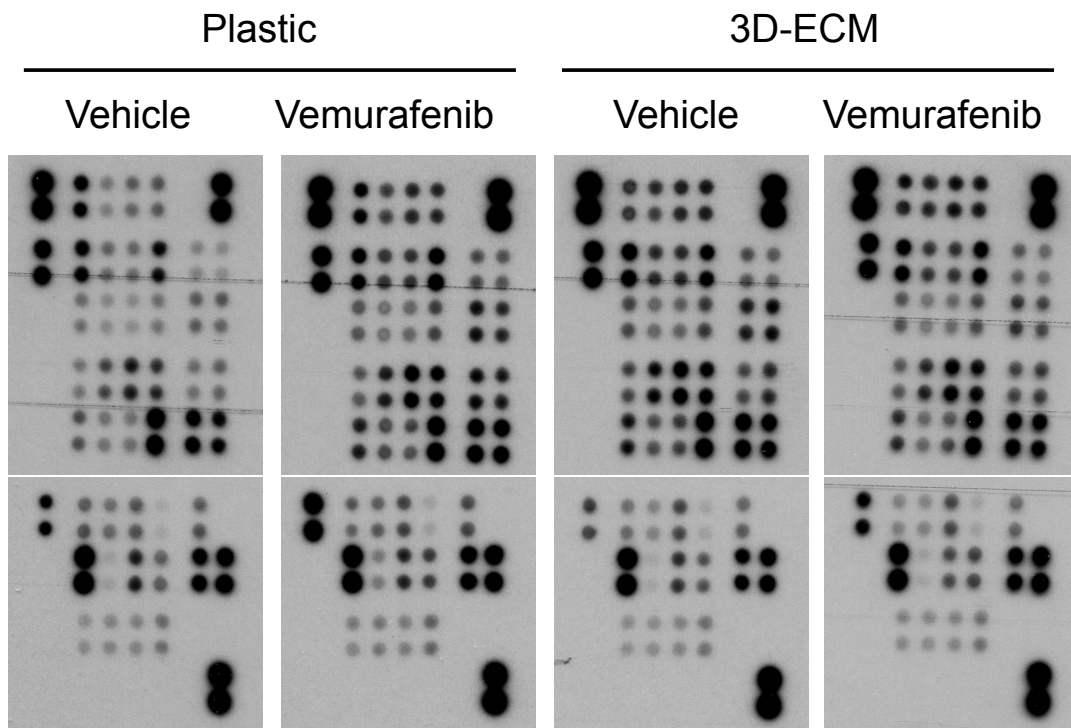


C

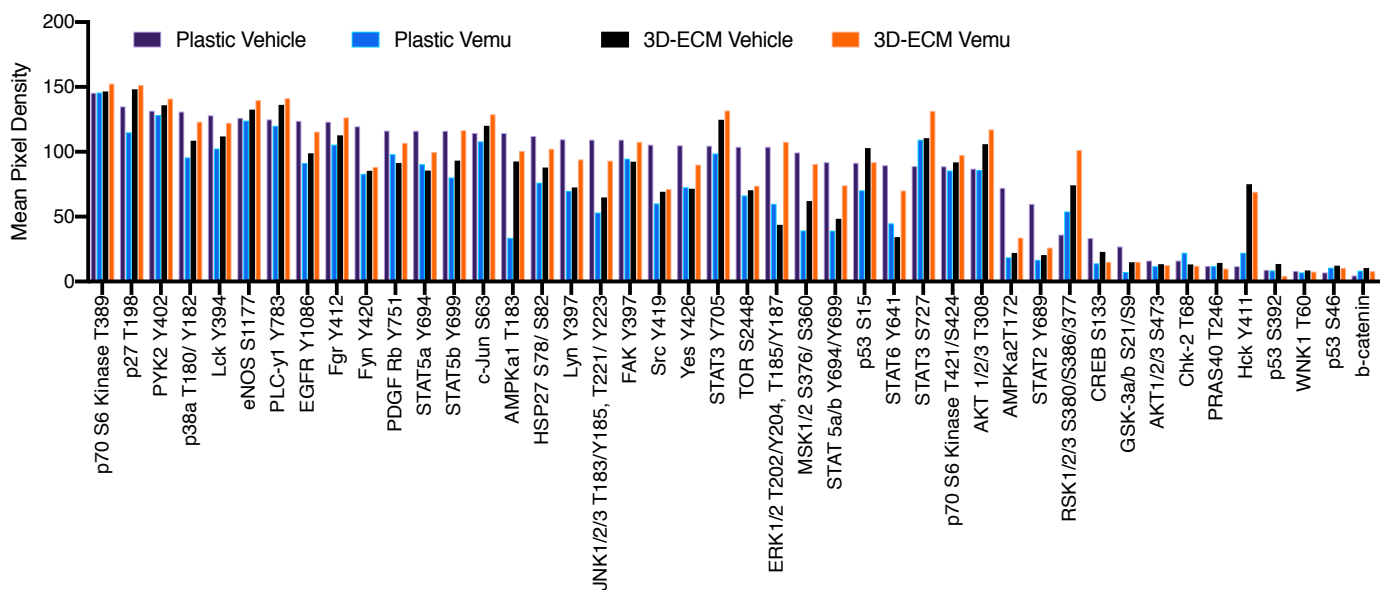


Supplementary Figure 4

A

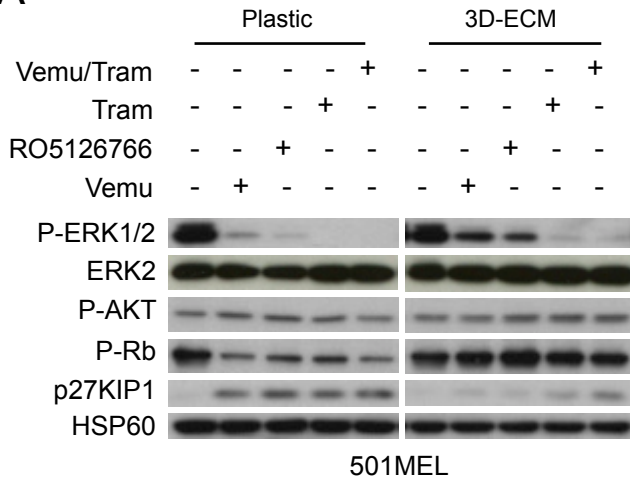


B

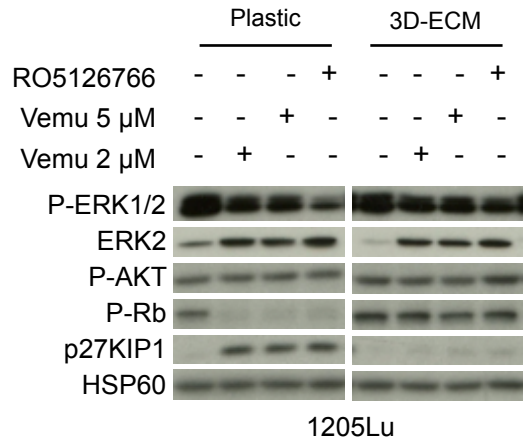


Supplementary Figure 5

A

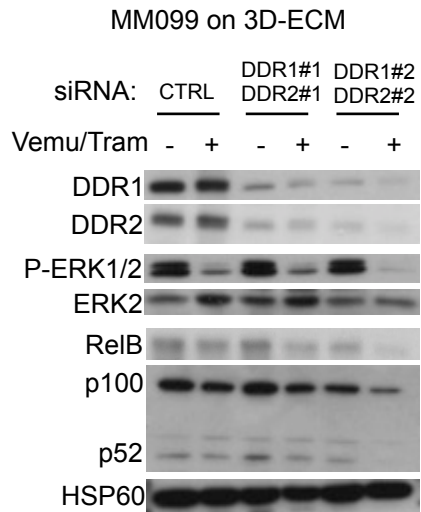


B



Supplementary Figure 6

A



B

