



**HAL**  
open science

# Rôle de MITF et du métabolisme des sphingolipides dans le mélanome cutané

Justine Leclerc

► **To cite this version:**

Justine Leclerc. Rôle de MITF et du métabolisme des sphingolipides dans le mélanome cutané. Biologie moléculaire. COMUE Université Côte d'Azur (2015 - 2019), 2019. Français. NNT : 2019AZUR4012 . tel-03167321

**HAL Id: tel-03167321**

**<https://theses.hal.science/tel-03167321v1>**

Submitted on 12 Mar 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

## Rôle de MITF et du métabolisme des sphingolipides dans le mélanome cutané

**Justine LECLERC**

INSERM U1065, Centre Méditerranéen de Médecine Moléculaire (C3M)

**Présentée en vue de l'obtention  
du grade de docteur en** Sciences de la Vie  
et de la Santé

**Mention :** Interactions moléculaires et  
cellulaires

**De l'Université Côte d'Azur**

**Dirigée par :** Dr. Corine Bertolotto

**Soutenue le :** 22 Mars 2019

**Devant le jury, composé de :**

Dr. Corine BERTOLOTTO, DR2, C3M,  
INSERM U1065, Nice

Dr. Cédric DELEVOYE, CR1, Institut Curie,  
UMR144, Paris

Dr. Philippe GUAL, DR2, C3M, INSERM  
U1065, Nice

Pr. Jean-Christophe MARINE, VIB,  
Belgique

Pr. Laurence NIETO, IPBS, UMR5089,  
Toulouse

Dr. Gilles PONZIO, DR2, IPMC, UMR7275,  
Valbonne

# **Rôle de MITF et du métabolisme des sphingolipides dans le mélanome cutané**

**Jury :**

**Président du jury :**

Dr. Philippe GUAL, DR2, INSERM U1065, C3M, Nice

**Rapporteurs :**

Pr. Laurence NIETO, Professeur, IPBS, UMR5089, Toulouse

Dr. Cédric DELEVOYE, CR1, Institut Curie, UMR144, Paris

**Examineurs :**

Pr. Jean-Christophe MARINE, Professeur, VIB Belgique

Dr. Gilles PONZIO, DR2, CNRS, IPMC, UMR7275, Valbonne

## Résumé

---

Le mélanome dérive des mélanocytes qui sont responsables de la couleur de la peau. C'est la forme la plus mortelle de cancer de la peau, représentant seulement 5% de ces cancers mais entraînant plus de 80% des décès par cancers cutanés. Le pronostic du mélanome métastatique reste sombre. En effet, ces dernières années les thérapies ciblées et immunothérapies ont émergées et ont permis d'augmenter pour la première fois la survie. Malgré tout, plus de 50% des patients ne répondent pas à ces traitements ou y deviennent résistants. Le facteur de transcription MITF (MICrophthalmia-associated Transcription Factor) est un acteur clé de la plasticité phénotypique des cellules de mélanome qui est impliquée dans les mécanismes de résistance. C'est pourquoi, il est nécessaire de continuer à comprendre les mécanismes moléculaires du développement et de la progression du mélanome et notamment le fonctionnement de MITF.

Les cellules cancéreuses présentent des dérégulations métaboliques, mais dans le mélanome, le métabolisme des lipides reste méconnu. Les sphingolipides représentent un groupe de lipides bioactifs qui exercent un rôle structural, mais aussi de transduction du signal et de régulation de processus biologiques importants tels que l'apoptose, la sénescence, la survie, l'inflammation et la migration. Par conséquent, comprendre les mécanismes moléculaires impliqués dans la régulation des sphingolipides et cibler les enzymes impliquées dans ce contrôle pourraient offrir de nouvelles cibles thérapeutiques.

Une étude a montré que la céramidase acide ASAH1 (N-Acylsphingosine Amidohydrolase 1), une enzyme localisée aux lysosomes et jouant un rôle clé dans le métabolisme des sphingolipides, présente la plus forte expression dans le mélanome comparée à d'autres types de cancers. Au cours de ma thèse, je me suis intéressée à l'étude du rôle d'ASAH1 dans le mélanome. De façon intéressante, mes travaux ont identifié l'existence de deux groupes de cellules de mélanome, exprimant un fort ou un faible niveau d'ASAH1. De plus, l'analyse de bases de données publiques a montré que l'expression d'ASAH1 était corrélée avec celle de MITF. J'ai montré qu'ASAH1 agit comme un rhéostat du changement phénotypique des cellules de mélanome. La faible expression d'ASAH1 induit l'activation de la cascade de signalisation intégrines  $\alpha V$ - $\beta 5$ -FAK et un comportement invasif. De plus, j'ai identifié ASAH1 comme une nouvelle cible de MITF, impliquant ainsi pour la première fois MITF dans la régulation du métabolisme des sphingolipides.

D'autre part, afin de déterminer si l'axe SK1/S1P/S1PR pouvait jouer un rôle dans la résistance, nous avons étudié l'expression des S1PRs dans plusieurs lignées de mélanome sensibles ou résistantes au PLX4032, et modulé l'expression de deux enzymes (SK1 et SPL) de l'axe du métabolisme des sphingolipides. Nos résultats ont révélé que le traitement au PLX4032 induisait une forte diminution d'expression des S1PR1/3 dans les cellules sensibles uniquement. L'augmentation du ratio

céramide/S1P par approche génétique ou pharmacologique permet la diminution d'expression des S1PR ainsi que l'inhibition de la croissance tumorale. Cet effet est associé à une diminution d'expression de MITF et BCL2. De plus, l'ABT-737 potentialise l'activité anti-tumorale observée lorsqu'on bloque les enzymes produisant la S1P dans les cellules de mélanome résistantes. Nos résultats indiquent que le ciblage de l'axe S1P/S1PR apporte de nouvelles options thérapeutiques pour les patients atteints de mélanome métastatique en récurrence après un traitement par l'inhibiteur de BRAF.

En conclusion, mes résultats offrent de nouveaux indices concernant l'implication du métabolisme des sphingolipides dans la transition phénotypique et la résistance des cellules de mélanome à des thérapies ciblées.

Mots clés : Mélanome, MITF, Métabolisme, Sphingolipides, ASAH1

## Abstract

---

Melanoma derives from melanocytes that are responsible for skin pigmentation. It's the deadliest form of skin cancer, as it accounts for more than 80% of total deaths by cutaneous cancer despite representing only 5% of them. The prognosis of metastatic melanoma remains poor. Indeed, targeted therapies and immunotherapies were developed over the last few years, allowing an increase of patient's survival for the first time. However, more than 50% of patients are unresponsive or become resistant to these treatments. The transcription factor MITF (MICrophthalmia-associated Transcription Factor) is a key actor of the phenotypic plasticity of melanoma cells that is involved in resistance mechanisms. Therefore, it is necessary to better understand the molecular mechanisms involved in the development and progression of melanoma, and especially which role MITF is playing in those mechanisms.

Cancer cells present metabolic alterations, but in melanoma the role of lipid metabolism remains poorly investigated. Sphingolipids represent a group of bioactive lipids that exert a structural role but also allow signal transduction and regulation of important biological processes such as apoptosis, senescence, survival, inflammation and migration. Therefore, understanding the molecular mechanisms involved in sphingolipids regulation and targeting enzymes playing a role in this control might offer new therapeutic targets for melanoma.

A study showed that acid ceramidase ASAH1 (N-Acylsphingosine Amidohydrolase 1), an enzyme localized in lysosomes and playing a key role in sphingolipid metabolism, is highly expressed in melanoma compared to other types of cancers. During my PhD, I focused my work on the role of ASAH1 in melanoma. Interestingly, I identified two types of melanoma cells, expressing high or low levels of ASAH1. Moreover, analysis of public databases showed that ASAH1 expression is correlated to MITF expression. I demonstrated that ASAH1 acts as a rheostat of the phenotypic switch in melanoma cells. Low expression of ASAH1 induces activation of integrin  $\alpha$ V- $\beta$ 5-FAK signaling cascade and triggers an invasive phenotype. Furthermore, I identified ASAH1 as a new target of MITF, involving for the first time MITF in regulation of sphingolipid metabolism.

On the other hand, in order to determine if SK1/S1P/S1PR axis could play a role in resistance, we studied S1PRs expression in several PLX4032-sensitive or resistant melanoma cell lines, then we modulated expression of two key enzymes (SK1 and SPL) of this metabolic axis. Our results showed that PLX4032 treatment induces a strong decrease of S1PR1/3 expression in sensitive cells only. Increasing ceramide/S1P ratio by genetic or pharmacological approach triggers the decrease of S1PR expression and inhibition of tumor growth. This effect is associated with a decrease of both MITF and BCL2 expressions. Moreover, ABT-737 potentiates the anti-tumoral activity seen when S1P-

producing enzymes are blocked in resistant melanoma cells. Our results indicate that targeting the S1P/S1PR axis brings new therapeutics options to patient with a recurrent metastatic melanoma after BRAF-inhibitor treatment.

To conclude, my results offer new clues regarding the involvement of the sphingolipid metabolism in the phenotypic switch and resistance of melanoma cells to targeted therapies.

Keywords : Melanoma, MITF, Metabolism, Sphingolipids, ASAH1

## Remerciements

---

Il y a des expériences qui changent une vie. La thèse en fait partie. Je ne pensais pas en m'engageant dans ces trois ans et demi apprendre tant. Oui, j'ai beaucoup grandi scientifiquement mais aussi personnellement et quand je me retourne et regarde les pages de ses dernières années, je veux l'écrire, je suis fière de ce parcours. Jamais je n'aurais cru, jeune étudiante en licence, être capable d'arriver jusque-là et nous voici 8 ans plus tard soutenant ma thèse. Il y a un avant et un après, et ces mots constituent le début de la suite...

Il y a eu des gros coups durs, des fous rires, des soirées et des week-ends dans les couloirs du C3M mais il y a tant qui ne peut pas s'écrire. Je suis très émue aujourd'hui de pouvoir remercier toutes les personnes sans qui ce travail n'aurait pas vu le jour.

Tout d'abord, je voudrais remercier tous les membres de mon jury d'avoir accepté de juger mon travail de thèse et de m'accorder de leur temps. J'en suis très honorée. Philippe, merci d'avoir accepté d'être le président de mon jury. C'était important pour moi de vous avoir face à moi en ce jour si spécial.

Merci à l'équipe du Pr. Thierry Levade et du Dr. Nathalie Andrieu-Abadie avec qui j'ai eu la chance de collaborer, qui nous a apporté une expertise en sphingolipides nous permettant de mener à bien mon projet de thèse. Merci pour toutes les discussions qui nous ont permis d'approfondir ce sujet vaste et très intéressant qui m'a passionné du début à la fin.

Je voudrais te remercier Robert de m'avoir accueillie dans ton équipe en Master puis en thèse. Tu m'as permis d'apprendre plein de choses au sein de cette équipe et je t'en remercie chaleureusement. Je tenais également à te remercier pour le temps que tu m'as consacré à chaque oral afin de me préparer au mieux à chaque question etc. Un grand merci pour ton temps et ta considération.

Corine, tu es celle sans qui rien n'aurait été possible. Merci d'avoir eu confiance en moi en Master, de m'avoir soutenue tout le long, de m'avoir poussé à donner le meilleur de moi-même et de m'avoir encouragée à faire cette thèse. Tu m'as poussée vers le haut. Merci pour ton soutien et tes encouragements à chaque étape, merci pour m'avoir permise d'assister à tous ces congrès où j'ai à chaque fois pu m'imprégner et admirer des intervenants passionnants dont certains que j'ai l'honneur d'avoir aujourd'hui dans mon jury de thèse. J'ai parfois eu mes moments négatifs et je m'en excuse sincèrement, j'ai l'impression qu'on devient un peu aliéné à défendre bec et ongle son projet. Mais contrairement à ce que certaines personnes ont pensé je ne suis pas folle, juste très concernée par mon travail et le bon fonctionnement du laboratoire qui pour moi est indissociable du travail de thésard. Merci pour toutes tes idées pour approfondir ce projet et les discussions scientifiques. J'ai beaucoup grandi et appris grâce à toi, à l'expérience et à l'autonomie que tu m'as permise d'acquérir. Ton



approbation, tes retours et tes mots de soutien sont très importants pour moi. Merci de m'avoir redonné confiance en qui je suis et en mon travail. Je crois qu'on a fait du bon travail ensemble et peut-être qu'un jour nos chemins se recroiseront. Ce sera toujours avec plaisir. Merci pour tout.

Je souhaiterais remercier ma mère qui a vécu de près cette thèse et mes états d'âme (beaucoup trop nombreux !). Sans toi je ne serais jamais arrivée là où j'en suis. Tu m'as soutenue (et surtout supportée) toutes ces années d'étude, fait de bons petits plats dans les moments durs, tu sais toujours LA chose qui me remonte le moral : LA NOURRITURE. Tu as été là même dans les non-dits, et il y en a eu de nombreux car j'ai toujours du mal à exprimer vraiment ce que je ressens quand ça ne va pas. Mais tu as toujours été là, tu es là aujourd'hui. Je ne te le dis pas assez, je t'aime. Merci d'être là au quotidien, même quand tu n'es pas là physiquement, je te sens veiller sur moi. Tout le temps. Tu es mon exemple de force mentale, (pour la physique on repassera, entre handicapées du genou on se comprend !) je n'ai jamais laissé tomber, et je ne laisserais jamais tomber grâce à ton image. Merci infiniment.

Jeff, tu es arrivé dans ma vie comme un mirage, je t'ai d'abord vu du coin de l'œil, je t'ai vu comme une connaissance, comme un collègue de travail. Tu m'as faite rire dès le début, j'ai remarqué à quel point tu étais une belle personne quand je te regardais. J'ai le sentiment que les personnes positives et entières se ressentent, comme un sixième sens, que quelqu'un va rentrer dans ta vie et t'aider à aller toujours plus loin. C'est ce que tu as fait et fait toujours depuis. Tu as tout bouleversé dans ma vie, m'a poussé à aller toujours plus loin, à surpasser mes peurs et mon syndrome de l'imposteur. Tu es mon meilleur ami, mon amour, ma moitié. Celui avec qui je partage tout et ne me juge pas. Celui qui sait sans que je dise. Celui qui comprend sans que j'explique. On en a vu beaucoup depuis tout ce temps, de très belles choses et des moins belles. Pourvu que l'on soit toujours là l'un pour l'autre dans le bonheur et l'adversité, avec ou sans ligament. J'ai grandi à tes côtés plus que les 22 précédentes années. Je me sens mieux que jamais grâce à toi. Merci. Et plus récemment merci de m'avoir poussée à accepter mon nouveau challenge de vie, en espérant que cela nous apportera tout ce qu'on souhaite. Je t'aime plus que tout, merci pour ton soutien.

Céline, tu es géniale ! Voilà en un mot ce que j'ai envie de te dire. Plus qu'une collègue de travail, tu es une amie très chère pour moi. Tu es quelqu'un de foncièrement bon, entier, bienveillant et altruiste. J'ai l'impression de regarder dans le miroir quand je te regarde car on est similaire sur beaucoup de points. Presque comme une grande sœur que je n'ai pas. Tu as compris beaucoup de choses, m'a fait comprendre beaucoup de choses. Tu as toujours été là même les soirs de déprime et désespoir. Parfois pour de longues discussions philosophiques plus ou moins profondes. Je ne sais comment te remercier pour tous ces cookies aux flocons d'avoine, muffins pralinoises et repas partagés. Je trouve qu'on forme un très bon binôme (ok trinôme Karine mais tu as ta partie après, ne sois pas jalouse) de travail et j'espère pouvoir continuer à travailler avec toi dans l'avenir...qui sait ? On y croit et peut-être que

dans quelques années je t'appellerais « patronne ». Toi qui va quitter ces locaux en même temps que moi, je te souhaite le meilleur pour la suite. D'avoir tout ce que tu souhaites dans la vie, car c'est ce que les personnes en or méritent. Avec toute mon affection, tu resteras l'unique personne avec qui j'essaie de reboucher des Falcon 50 avec des capuchons de marqueurs ou des bouchons de bouteilles de DMEM, et celle qui décolle les cellules plus vite que son ombre au PBS. Une pensée pour tous nos Jedi de folie en culture où migration rimait avec régression. A ton aptitude innée à trouver des surnoms à la hauteur d'une personne, merci énormément pour tous ces bons moments. On se retrouvera au meeting castor ;)

Karine. La première fois que je suis arrivée dans le labo, Corine m'avait prévenue « tu sais Karine est un peu spéciale, elle a son caractère mais elle est géniale ». Et ton caractère, on ne peut pas le louper à vrai dire ! Mais là encore, c'est parce que tu es quelqu'un d'entière, loin d'être hypocrite, tu dis tout avec plus ou moins de filtre. Sur la fin avec beaucoup moins de filtre...Moi aussi ! Ça doit être à cause de toi. Tu m'as quasiment tout appris ici techniquement parlant. Tu es le pilier du labo, rien ne tournerait sans toi, tu n'oublies pas que le sérum c'est FONDAMENTAL, tu es un rayon de soleil Karine. Ma belle étoile, celle qui m'a guidée sur les manips les plus périlleuses. J'aimerais travailler avec toi toute la vie car on croise rarement des gens comme toi. Je ne retrouverais plus jamais une Karine, tu es unique ! On peut toujours compter sur toi, tu es devenue mon amie aussi et parfois je dois l'admettre j'ai failli t'appeler « maman » au labo car tu es ma maman du labo. Toujours là. Merci, merci, merci d'être qui tu es Karine. Ne cache surtout pas ce caractère à qui que ce soit, il n'y a que les personnes à ton image qui ne s'en effraient pas. Ça permet une pré-sélection de qualité si tu vois ce que je veux dire. Je te souhaite tout le bonheur du monde, prends soin de toi et aime toi s'il te plaît, tu es magnifique, tu rayannes! Avec toute mon affection, je n'oublierai jamais ta façon de prononcer « input » et « sox10 » et ta faculté à transformer quelqu'un en crabe dans les couloirs. Tu resteras celle qui a sauvé plusieurs de mes manips grâce à tes bons conseils et ton expertise digne d'une personne possédant 26 masters et autant de doctorats.

Mickaël, merci pour m'avoir transmis tes connaissances et ta passion pour la bio, tu fais partie de ces personnes qui rendaient la fin de journée plus agréable (une pensée pour tous ces moments de folie et danses au labo dont Marina était la reine).

Robin, toi qui ne savais pas si tu serais un jour tonton ou tata, j'espère que tu le sais enfin. Toi aussi tu as égayé les fins de journée et tu as toujours partagé ta bonne humeur. Même quand tes membranes avaient passé la nuit sur la paillasse et que tu leur proposais d'oublier ce moment à 4°C.

Merci à tout le reste de l'équipe 1 et aux anciens du début de mon master : Alexandra, Tanisha...  
Merci à tous pour votre aide et votre soutien. Merci à toute l'équipe 12 qui faisait partie de l'équipe 1 au début de mon master.

Merci à toutes les personnes du C3M que j'ai connues, à l'équipe animalerie, au service imagerie. Notamment Maéva, qui est sûrement une des personnes les plus investies et impliquées que j'ai rencontrée ici. Je te souhaite le meilleur pour la suite. Merci aux gestionnaires d'équipe et Philippe Rostagno. Notamment Dominique, Virginie et Marie. Merci au personnel de la laverie. Le quotidien au labo serait plus compliqué sans toutes ces personnes qui nous « facilitent » le travail.

Merci à tous mes amis que je n'ai pas cité ici. Aurélie et Jonathan, Emmeline, Morgane, Lila, Ruxanda, Elsa, Ilona et à Estelle.

Merci à mes proches, mon père, mon frère et ma belle-sœur, ma nièce et le reste de ma famille. Annie, François et à tous ceux que j'oublie peut-être.

Je souhaite remercier toute mon ancienne équipe d'Azur Génétique qui a été l'amorce de tout ce que je suis devenue, qui a posé les bases de tout. C'est une expérience que je n'oublierais jamais, dans mon cœur et dans ma tête. Chaque expérience professionnelle m'a apporté quelque chose de différent dans ma vie, Bastien, Mickaël, Nicolas, Mathieu, il est impossible de vous oublier. Vous êtes tous répartis dans la France depuis, et toi, Mathieu fidèle au poste tu es toujours là. Merci pour toutes ces paroles pleines de sagesse. Il y a des choses que tu m'as dites et rabâchées à AG et que je n'ai comprises que pendant ma thèse. Merci.

Ces quelques pages marquent la fin d'un chapitre de ma vie. C'est la fin des études, la fin de la thèse, la fin de cette période de naïveté que constitue encore la vie d'étudiant. C'est le début de la vraie vie active, le début d'un nouveau départ loin ou près de tout, l'avenir me le dira. On se recroisera, peut-être sur des chemins différents, mais toujours avec la joie irradiante de se revoir et de se remémorer les bons moments. J'ai de la chance d'être si bien entourée et je me souhaite de l'être toujours autant.

A vous tous, merci.

# SOMMAIRE

---

Liste des abréviations .....	15
Table des illustrations.....	20
INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE .....	22
Chapitre 1. Le mélanome : des mélanocytes à leur transformation.....	23
A. LA PEAU ET LES MELANOCYTES.....	23
A.1. La structure de la peau.....	23
A.2. Les cellules de l'épiderme .....	25
A.3 Origine, localisations et rôles physiologiques des mélanocytes.....	26
A.5 Régulation de la mélanogenèse .....	30
A.6 Rôle de la pigmentation.....	31
A.7 Genèse d'un nævus.....	32
B. LE MÉLANOME CUTANÉ .....	32
B.1 Épidémiologie.....	32
B.2 Classification .....	32
B.3 Les facteurs de risques environnementaux .....	34
B.4 Les facteurs de risques constitutionnels.....	34
B.5 La formation d'un mélanome et son évolution.....	36
B.6 Les altérations génétiques prépondérantes dans le développement du mélanome .....	36
B.6.1 Les altérations somatiques .....	37
La voie de signalisation MAPK .....	37
La voie de signalisation des récepteurs à tyrosine kinase (RTKs) .....	38
TP53 .....	38
Cycline D1.....	38
La voie Wnt/ $\beta$ -caténine .....	39
La voie PI3K/AKT .....	39
RAC1 .....	39
MITF .....	40
B.6.2 Les altérations germinales .....	40
B.7 Comment traiter le mélanome métastatique?.....	41
B.7.1 Les traitements traditionnels.....	41
B.7.2 Les thérapies ciblées .....	41
B.7.3 Comment émergent les résistances aux thérapies ciblées? .....	42
Les résistances acquises .....	42

Les résistances intrinsèques.....	43
L'hétérogénéité intra et inter-tumorale.....	43
B.7.4 L'immunothérapie .....	44
B.7.5 Comment émergent les résistances aux immunothérapies?.....	45
B.7.6 Thérapies émergentes .....	45
Chapitre 2. MITF : un facteur de transcription pour le meilleur et pour le pire.....	47
A. GÉNÉRALITÉS SUR LA FAMILLE DES FACTEURS DE TRANSCRIPTION MIT/TFE.....	47
B. HOMÉOSTASIE DES MÉLANOCYTES.....	48
Comment MITF régule l'homéostasie des mélanocytes ?.....	48
En régulant des gènes cibles essentiels au niveau embryonnaire.....	49
En régulant des gènes cibles essentiels à la synthèse de mélanine.....	49
En régulant des gènes cibles essentiels à la survie des mélanocytes.....	49
En régulant des gènes cibles essentiels à la maintenance de l'ADN.....	50
En régulant des gènes cibles essentiels aux réponses immunitaires.....	50
C. RÉGULATIONS TRANSCRIPTIONNELLES ET POST-TRADUCTIONNELLES .....	51
C.1 Régulations transcriptionnelles de MITF .....	51
Régulateurs positifs de MITF.....	51
Régulateurs négatifs de MITF.....	52
C.2 Régulations post-traductionnelles de MITF .....	55
Phosphorylations .....	56
Acétylations.....	59
Ubiquitinations .....	59
SUMOylations.....	59
Autres régulations.....	60
D. RÔLE TUMORIGÈNE DE MITF .....	60
D.1 Amplification.....	60
D.2 Coopération avec la voie MAPK.....	60
D.3 Coopération d'autres voies de signalisation .....	62
D.4 Mutations.....	62
D.5 Oscillations du niveau d'expression de MITF : un interrupteur permettant de réguler les différents processus de la tumorigenèse .....	63
D.6 Remodelage de la chromatine par MITF.....	64
E. SÉNESCENCE .....	65
F. IMPLICATIONS DANS LE CYTOSOL .....	66
F.1 Mécanisme de régulation des motifs CLEAR.....	67
F.2 L'expression de MITF est corrélée avec beaucoup de gènes endolysosomaux .....	67

F.3 L'expression de MITF est corrélée négativement avec des gènes clefs de la macroautophagie.	68
Chapitre 3. Le métabolisme des sphingolipides	70
A. GÉNÉRALITÉS SUR LES SPHINGOLIPIDES	70
A.1 Synthèse des sphingolipides	70
A.2 Génération des sphingolipides	71
A.3 Catabolisme des sphingolipides dans les lysosomes	74
B. RÔLES DANS LA CELLULE	74
B.1 Les sphingolipides sont des composants des radeaux lipidiques	74
B.2 Les sphingolipides : acteurs de la transduction des signaux intracellulaires	75
B.3 Cibles des sphingolipides	75
B.4 Sphingolipides et cavéoles	78
C. SPHINGOLIPIDES ET MÉLANOME	79
C.1 Glucosylcéramidases	79
C.2 Céramides synthases	80
C.3 Sphingomyélinases	80
C.4 Céramides	81
C.5 Sphingosines kinases, S1P et ses récepteurs	83
C.6 Gangliosides	86
C.7 Inhibiteurs de sphingolipides et essais cliniques dans le mélanome	86
D. SPHINGOLIPIDES ET MITF	89
D.1 Effets des S1P sur MITF	89
D.2 Effet des céramides et enzymes associées sur MITF	90
Chapitre 4. ASAH1, la céramidase acide comme nouvelle approche thérapeutique	91
A. GÉNÉRALITÉS	91
B. RÉGULATION	93
B.1 Régulation transcriptionnelle	93
B.2 Régulation post-traductionnelle	94
B.3 Régulation de l'activité ASAH1	95
C. RÔLE PHYSIOLOGIQUE	95
C.1 Les réponses apportées par les modèles murins	96
C.2 Les maladies associées à un défaut d'activité de la céramidase acide : rôle dans l'inflammation	97
C.3 Le rôle d'ASAH1 dans la mort cellulaire et la différenciation	99
C.4 Les cibles d'ASAH1 et leur effet biologique	100
D. RÔLE TUMORIGÈNE	101
D.1 Inhibiteurs d'ASAH1	101

D.2 Rôles dans différents types de cancers .....	102
D.3 Rôles dans le mélanome .....	105
OBJECTIFS DE LA THESE .....	107
RÉSULTATS .....	110
RÉSULTATS NON PUBLIÉS .....	134
DISCUSSION ET PERSPECTIVES .....	134
Article 1: Lysosomal acid ceramidase ASAH1 controls the transition between invasive and proliferative phenotype in melanoma cells.....	135
Plasticité et hétérogénéité intra-tumorale.....	135
ASAH1 et son implication dans la migration, quels mécanismes, quelles cibles ? .....	137
<i>Comment l'inhibition d'ASAH1 peut-elle moduler les intégrines <math>\alpha V\beta 5</math> ?</i> .....	139
ASAH1, un rôle nucléaire ? .....	143
Régulation de MITF par ASAH1 : boucle de rétrocontrôle .....	145
ASAH1 et son rôle au lysosome, implications des lysosomes dans la migration .....	149
Article 2: Targeting the sphingosine-1-phosphate axis exerts potent antitumor activity in BRAF-i resistant melanomas. ....	157
<i>La modulation de l'axe SK1/S1P/S1PR dans le mélanome: nouvelle piste thérapeutique?</i> .....	157
<i>L'importance du profil lipidique</i> .....	159
Régulation de MITF par les S1PRs .....	159
Le système immunitaire et les S1PRs .....	161
CONCLUSION .....	163
RÉFÉRENCES.....	167
ANNEXES .....	211

## Liste des abréviations

---

**$\alpha$ -MSH:**  $\alpha$ -Melanocyte Stimulating Hormone  
**4EBP1:** Eukaryotic translation initiation factor 4E (eIF4E)-binding protein 1  
**ACD:** Adreno Cortical Dysplasia protein  
**ACP5:** Phosphatase Acide 5  
**ACTH:** Hormone AdrénocorticoTrophe  
**AG:** Acides Gras  
**ALMM:** Acral Lentiginous Malignant Melanoma  
**ALX3:** Aristaless-Like homeoboX 3  
**AMBRA1:** Activating Molecule in BECN1-Regulated Autophagy protein 1  
**AMM :** Autorisation de Mise sur le Marché  
**AMPc:** Adénosine MonoPhosphate cyclique  
**AP-2:** Activating protein 2  
**APAF-1:** Apoptotic Protease Activating Factor 1  
**APE1/REF1:** Human apurinic endonuclease/redox-factor 1  
**ASAH1:** N-AcylSphingosineAmidoHydrolase 1  
**ASP:** Agouti Signaling Protein  
**ATG3/7/12:** Autophagy-related protein 3/7/12

**BAF:** Barrier-to-Autointegration Factor  
**BAX:** Bcl-2-associated X  
**BCL2:** B-cell lymphoma 2  
**BORC:** Biogenesis of lysosome-related organelles complex-1

**C1P :** Céramide-1-Phosphate  
**CAPK:** Catabolite Activated Protein Kinase  
**CAR :** Récepteur Chimérique d'Antigènes  
**CAV1:** Cavéoline 1  
**CCL2:** Chemokine Ligand 2  
**CCL5/RANTES:** Regulated upon Activation, Normal T cell Expressed and presumably Secreted  
**CCN:** Cellules de la Crête Neurale  
**CCND1:** Cycline D1  
**CDK4:** Cyclin-Dependent Kinase 4  
**CDKN2A:** Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor 2A  
**CER :** Céramide  
**CERK :** Céramide Kinase  
**CERS :** Ceramide Synthase  
**CERT :** CERamide Transfert protein  
**CLCN7:** Chloride channel voltage-sensitive 7  
**CLEAR:** Coordinated Lysosomal Expression and Regulation  
**coA :** Palmitoyl Coenzyme A  
**CPA :** Cellules Présentatrices d'Antigènes  
**CRAC :** Cholesterol Recognition/interaction Amino Acid Consensus  
**CREB:** cAMP Responsive Element Binding protein



**CRM1** : Chromosomal Maintenance 1 ou Exportine 1  
**CTGF**: Connective Tissue Growth Factor  
**CTLA-4** : Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4

**DAG** : DiacylGlycérol  
**DCT**: DopaChrome Tautomérase  
**DIA1**: DIAphanous-related formin  
**DMG**: N,N-Dimethyl Glycine  
**DMS**: N, N-DiMéthylSphingosine  
**DNR** : DauNoRubicine  
**DOPA** : L-3-4dihydroxyphénylalanine  
**Drp1** : Dynamin-Related Protein 1  
**DTIC**: Dacarbazine

**EGF** : Facteur de Croissance Épidermique  
**EGF**: Epidermal Growth Factor  
**EGFR**: Epidermal Growth Factor Receptor  
**EPHA1**: EPHrin type-A receptor 1  
**ERK**: Extracellular signal-Regulated Kinases  
**ET-1**: EndoThéline-1  
**EtP**: Phosphoéthanolamine  
**ETV1**: E Twenty-six Variant 1  
**EZH2**: Enhancer of Zeste Homolog 2

**FACS**: Fluorescence Activated Cell Sorting  
**FAK**: Focal Adhesion Kinase  
**FIV**: Fécondation In Vitro  
**FLOT1**: FLOTilin-1  
**FOXA1**: Forkhead boX protein A1  
**FOXD3**: Forkhead-boX transcription factor D3  
**FUS**: FUsed in Sarcoma  
**FYCO1**: FYVE And Coiled-Coil Domain Containing 1

**GALCER**: Galactosyl Céramide  
**GBA2**:  $\beta$ -GlucocereBrosidase 2  
**GDP**: Guanosine DiPhosphate  
**GEF** : Facteur d'Échange de nucléotides Guanyliques  
**GLCCER**: Glucosyl Céramide  
**GLI2**: GLI Family Zinc Finger 2  
**GSEA**: Gene Set Enrichment Analysis  
**GSK3**: Glycogen Synthase Kinase 3  
**GSL**: GlycoSphingoLipides  
**GTP**: Guanosine TriPhosphate

**Hal**: Hexadécénal  
**HDAC**: Histone Déacétylases  
**HGF** : Facteur de Croissance des Hépatocytes  
**HIF1 $\alpha$** : Hypoxia-Inducible Factor 1- $\alpha$

**HMG:** High Mobility Group  
**HNSCC:** Head and Neck Squamous-Cell Carcinoma

**IGF1R:** Insulin Like Growth Factor 1 Receptor  
**IL-1R:** InterLeukin-1-Receptor

**JDE:** Jonction Dermo-Épidermique  
**JNKs:** Jun Nuclear Kinases

**KIF1B:** Kinesin Family Member 1B  
**KSR:** Kinase Suppressor of Ras

**LAMP:** Lysosome-Associated Membrane Protein  
**LAPTM4B :** Protéine Transmembranaire Associée au Lysosome 4B  
**LEF-1/TCF:** Lymphoid Enhancer Factor/ T Cell Factor  
**LLOMe:** L-leucy-L-leucine Methyl ester  
**LMM :** Lentigo Malignant Melanoma  
**lncRNA:** long non-coding RNA  
**LRO:** Lysosomal Related Organelles  
**LSD:** Lysosomal Storage Disorder

**M6P:** Mannose 6-Phosphate  
**M6PR:** Mannose 6-Phosphate Receptor  
**MAPK:** Mitogen Activated Protein Kinase  
**MDM2:** Mouse Double Minute 2  
**MEC:** Matrice Extra Cellulaire  
**MHC:** Major Histocompatibility Complex  
**MITF:** Microphthalmia-associated Transcription Factor  
**MMPs:** MétalloProtéases Matricielles  
**mTORC1:** mechanistic Target Of Rapamycin Complex 1

**NEDD9:** Neural precursor cell Expressed Developmentally Down-regulated protein 9  
**NF1:** NeuroFibromin 1  
**NFIB:** Nuclear Factor one B  
**NK :** Natural Killer  
**NLS :** Signal de Localisation Nucléaire  
**NMM:** Nodular Malignant Melanoma  
**NO:** Monoxyde d'azote  
**NOE:** N-OléoylEthanolamine

**OCT4:** OCTamer-binding Transcription factor 4  
**OIS:** Oncogene Induced Senescence  
**OSTM1:** OSTeopetrosis-associated TransMembrane protein 1

**PAP:** Phosphatidate Phosphatase  
**PAX3:** Paired Box 3  
**PBAF:** Polybromo-associated BAF  
**PCD:** Programmed-Cell Death

**PDE5A:** Phosphodiesterase 5A  
**PDGFR $\beta$ :** Platelet-Derived Growth Factor Receptor  $\beta$   
**PDK1:** Pyruvate Dehydrogenase Kinase 1  
**PD-L1:** Programmed Death-Ligand 1  
**PEG10:** Paternally Expressed Gene 10  
**PGC1- $\alpha$ :** Peroxisome proliferator-activated receptor Gamma Coactivator 1- $\alpha$   
**PGE2:** ProstaGlandine E2  
**PI:** PhosphatidylInositol  
**PI3K:** Phosphatidyl Inositol-3-Kinase  
**PIP3:** PhosphatidylInositol (3,4,5)-trisPhosphate  
**PKA:** Protéine Kinase A  
**PKC:** Protéine Kinase C  
**POMC:** Pro-Opio MélanoCortine  
**POT1:** Protection Of Telomeres protein 1  
**PP1:** Protéine Phosphatase 1  
**PRMT5:** Protein aRginine MethylTransferase 5  
**PTEN:** Phosphatase and TENSin homolog

**RAB7:** Ras-Associated Protein 7  
**RAC:** Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1  
**RANKL:** Receptor Activator of NF-KB Ligand  
**RB1:** Protéine du RétinoBlastome 1  
**RE :** Réticulum Endoplasmique  
**ROCK:** Rho-associated protein kinase  
**ROS :** Espèces réactives de l'oxygène  
**RPE:** Retinal Pigment Epithelium  
**RSK1:** Ribosomal S Kinase 1  
**RTK:** Receptor Tyrosine Kinases

**S1PP:** S1P Phosphatase  
**S1PR:** Sphingosine-1-Phosphate Receptor  
**S6K:** S6 kinase 1  
**SAHF:** Senescence-Associated Heterochromatin Foci  
**SAPD:** Saposine D  
**SAPKs:** Stress-Activated Protein Kinases  
**SASP :** Sénescence Associée à un Phénotype Sécrétoire  
**SCF:** Stem Cell Factor  
**SF-1:** Steroidogenic Factor 1  
**SK:** Sphingosines Kinases  
**SKIP:** SKI-interacting Protein  
**SM :** SphingoMyéline  
**SMases:** SphingoMyélinases  
**SNC :** Système Nerveux Central  
**SNCA :** Synucléine  $\alpha$   
**SOX10:** SRY-Box 10  
**SOX4:** SRY-Box 4  
**SOX9:** SRY-related high mobility group box 9  
**SP-1:** Specificity Protein 1

**SPL:** Sphingosine-1-Phosphate Lyase  
**SPNS2:** Spinster homologue 2  
**SPT:** Serine Palmitoyl Transférase  
**SSM:** Superficial Spreading Melanoma  
**STAT3:** Signal Transducer and Activator of Transcription 3  
**SUMO:** Small Ubiquitin-like Modifier

**TAFs:** Fibroblastes Associés aux Tumeurs  
**TAK1:** TGF $\beta$ Activated Kinase  
**TBX2:** T-BoX transcription factor 2  
**TCR:** T-cell receptor  
**TEM:** Transition Épithélio-Mésenchymateuse  
**TERF2IP:** TElomeric Repeat-binding Factor 2-Interacting Protein 1  
**TERT:** TElomerase Reverse Transcriptase  
**TFAP2A:** Transcription Factor AP-2 alpha  
**TGF $\beta$ :** Transforming Growth Factor  
**TNF:** Facteur de Nécrose Tumorale  
**TRP1:** Tyrosine-Related Protein 1  
**T-VEC :** Talimogene laherparepvec  
**TYR:** Tyrosinase

**UBC9:** Ubiquitin Conjugating Enzyme 9  
**ULK1:** Unc-51 Like Autophagy Activating Kinase 1  
**USP13:** Ubiquitin Specific Peptidase 13  
**UVRAG:** UV radiation resistance-associated gene

**VEGF:** Vascular Endothelial Growth Factor  
**VPS1:** Vacuolar protein sorting 1

**YY1:** Yin Yang 1

**ZEB1:** Zinc finger E-box-binding homeobox 1

# Table des illustrations

---

## INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

### Chapitre 1. Le mélanome : des mélanocytes à leur transformation

- Figure 1: La structure de la peau
- Figure 2: La structure de l'épiderme
- Figure 3: Les cellules de l'épiderme
- Figure 4: Migrations des mélanoblastes durant l'embryogenèse
- Figure 5: Synthèse des pigments mélaniques
- Figure 6: Maturation et structure des mélanosomes
- Figure 7: Représentation schématique des indices de Clark et Breslow
- Tableau 1: Description des différents phototypes

### Chapitre 2. MITF : un facteur de transcription pour le meilleur et pour le pire

- Figure 8: Représentation schématique de la protéine MITF
- Figure 9: Représentation des gènes cibles de MITF
- Figure 10: Représentation schématique du promoteur de MITF
- Figure 11: Représentation schématique des modifications post-traductionnelles retrouvées sur la protéine MITF
- Figure 12: Représentation schématique des voies de signalisation induisant des phosphorylations régulant l'expression de MITF
- Figure 13: Représentation schématique du réseau de gènes à motifs CLEAR régulés par MITF

### Chapitre 3. Le métabolisme des sphingolipides

- Figure 14: Vue d'ensemble du métabolisme des sphingolipides
- Figure 15: Représentation schématique des différentes voies de synthèse des sphingolipides
- Figure 16: Cibles intracellulaires et effets biologiques des sphingolipides
- Figure 17: Signalisation intracellulaire des céramides dans des cellules cancéreuses et leur effet tumeur suppresseur
- Figure 18: Signalisation intracellulaire des récepteurs à S1P (S1PR)
- Tableau 2: Description des différents traitements ciblant des sphingolipides dans le traitement de plusieurs types de cancers

### Chapitre 4. ASAH1, la céramidase acide comme nouvelle approche thérapeutique

- Figure 19: Schéma représentant la réaction d'hydrolyse du céramide par la céramidase acide (ASAH1) résultant en deux produits : la sphingosine et un acide gras libre.
- Figure 20: Schéma représentant l'organisation des différents domaines de la céramidase acide.
- Figure 21: Manifestations cliniques par organe des symptômes recensés chez les patients atteints de la maladie de Farber ou de SMA-PME

## **RÉSULTATS NON PUBLIÉS, DISCUSSION ET PERSPECTIVES**

- Figure 22: Localisation d'ASAHI dans les cellules 501MEL
- Figure 23: Co-localisation d'ASAHI et P-FAK dans les cellules 501MEL
- Figure 24: Localisation et expression de NEDD9 dans les cellules de mélanome
- Figure 25: Fractionnement cellulaire dans les cellules 501MEL
- Figure 26: ASAHI module l'expression de MITF et de ses cibles
- Figure 27: Expression des protéines de la famille CREB/ATF en fonction de la modulation d'expression d'ASAHI
- Figure 28: Effet de l'inhibition d'ASAHI sur CREB2, PTEN et PDE5A
- Figure 29: Viabilité des cellules de mélanome en réponse à un traitement par des agents lysosomotropes
- Figure 30: Marquage LAMP2 représentant la localisation des lysosomes dans des cellules de mélanome
- Figure 31: Analyse du contenu lysosomal dans les cellules de mélanome
- Figure 32: Marquage LAMP2 représentant la position des lysosomes en fonction de l'expression d'ASAHI
- Figure 33: Expression de marqueurs associés au positionnement des lysosomes dans les cellules de mélanome en fonction de la modulation d'expression d'ASAHI
- Figure 34: Schéma résumant les résultats publiés et non publiés de l'article 1

## **CONCLUSION**

- Figure 35: Schéma résumant les principaux résultats des deux études

# **INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE**

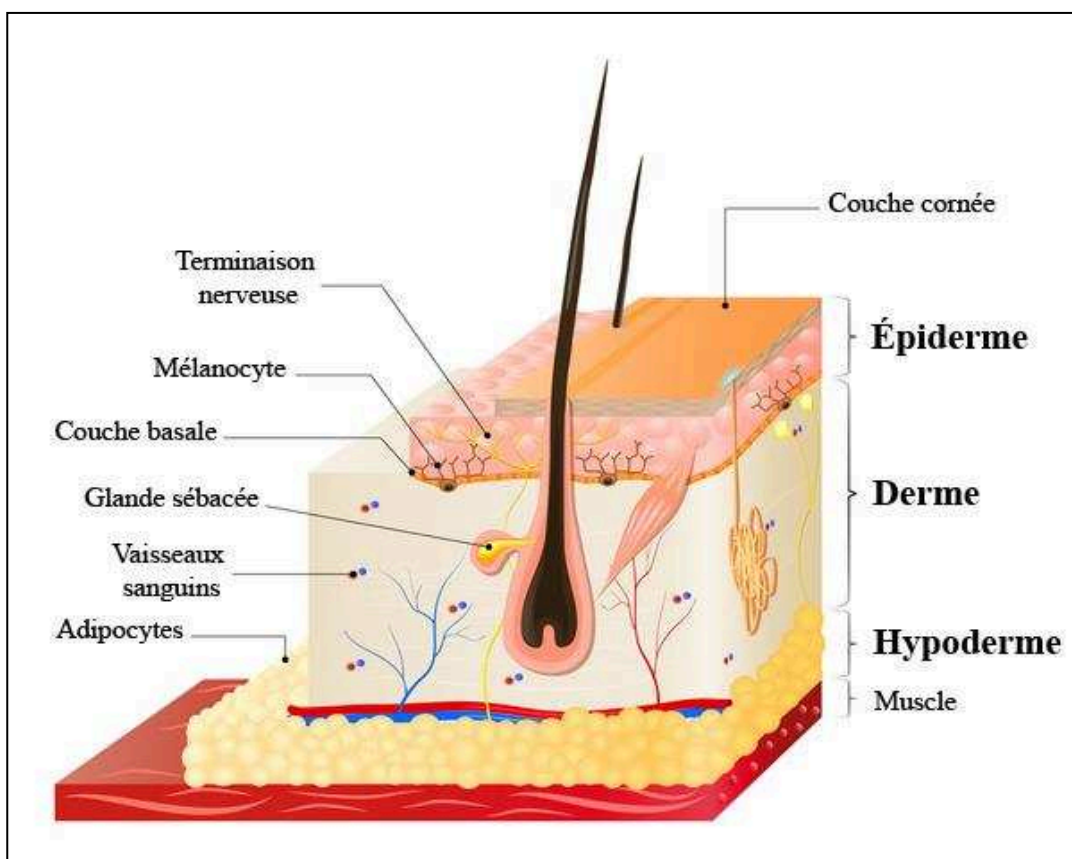
# Chapitre 1. Le mélanome : des mélanocytes à leur transformation

## A. LA PEAU ET LES MELANOCYTES

### A.1. La structure de la peau

La peau est le plus vaste organe du corps humain puisqu'elle en est le revêtement (Crickx, 2005). Sa structure complexe lui permet d'assurer l'intégrité de l'organisme contre divers types d'agressions extérieures (chimiques, physiques et biologiques). Sa superficie oscille entre 1,5 et 2,2m<sup>2</sup> pour environ 4kg (soit environ 7% de la masse corporelle). C'est une barrière physiologique entre l'organisme et l'environnement dont l'épaisseur varie entre 1,5 et 4mm. L'un de ses rôles est de protéger l'organisme des rayons ultraviolets provenant du spectre solaire, grâce à des cellules spécialisées produisant la mélanine, les mélanocytes.

La peau est composée de quatre régions différentes dont la plus superficielle est l'épiderme, suivie de la jonction dermo-épidermique, le derme et la plus profonde l'hypoderme (Cf. Figure 1) (McLafferty, 2012).



**Figure 1 : La structure de la peau**

La peau est une superposition de trois couches distinctes, de la plus externe à la plus interne : l'épiderme, le derme et l'hypoderme. Le derme est un tissu conjonctif permettant l'acheminement des nutriments à l'épiderme grâce aux vaisseaux sanguins et lymphatiques. Le derme contient également



*les terminaisons nerveuses. L'hypoderme quant à lui est un tissu adipeux vascularisé qui sert d'interface entre le derme et les structures mobiles comme les muscles et les tendons.*

Adapté de <https://ghr.nlm.nih.gov/>

**L'hypoderme**, d'origine mésoblastique, est un tissu conjonctif lâche richement vascularisé contenant les glandes sudoripares et le tissu adipeux sous-cutané ce qui lui permet d'assurer un rôle de réserve énergétique, d'isolant thermique et d'amortisseur mécanique contre les chocs. Il constitue le lien entre le derme et les structures sous-jacentes comme les muscles et tendons.

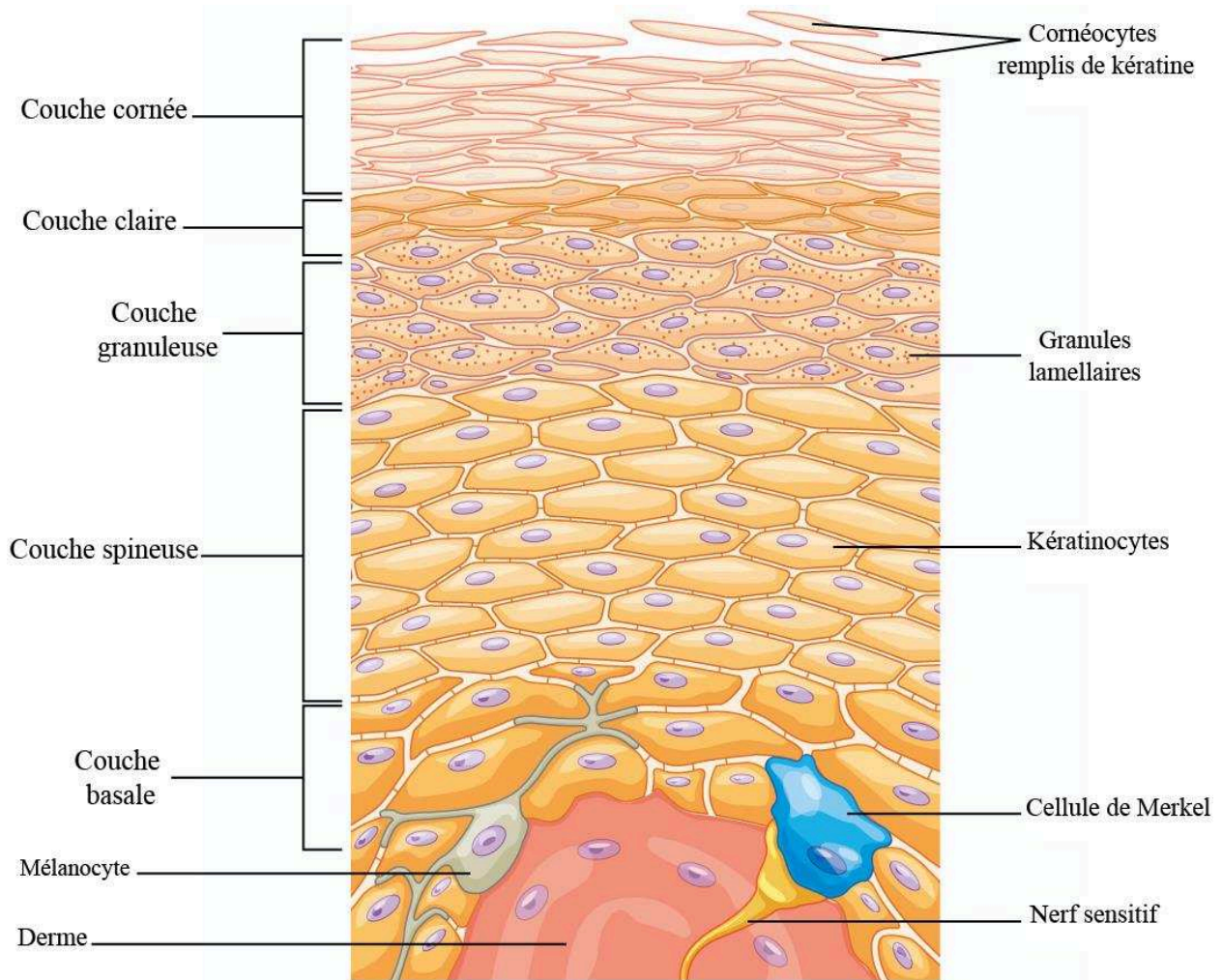
**Le derme**, tissu conjonctif dense d'origine mésoblastique, est constitué principalement de fibroblastes produisant la matrice extracellulaire contenant des fibrilles de collagène lui conférant son élasticité et sa solidité. Le derme héberge également les vaisseaux sanguins et lymphatiques permettant l'acheminement des nutriments à l'épiderme, des nerfs et des terminaisons nerveuses comprenant les récepteurs nerveux sensitifs et mécaniques responsables de la perception de la douleur et du toucher.

**La jonction dermo-épidermique (JDE)** constituée à la fois de kératinocytes et de fibroblastes est un support mécanique pour l'adhésion de l'épiderme. Elle permet aussi les échanges moléculaires entre les deux couches qui l'entourent.

Enfin, **l'épiderme** d'origine ectoblastique, majoritairement composé de kératinocytes, est un épithélium stratifié prépondérant puisqu'assurant la plupart des fonctions protectrices de la peau. C'est une barrière hydrique, physique, anti-oxydante, photo-protectrice mais également anti-microbienne (Madison, 2003).

On y distingue dans un ordre croissant de différenciation (Cf. Figure 2):

- la couche basale, représentant une seule épaisseur de cellules dont les kératinocytes les moins différenciés, quelques cellules de Merkel, et les mélanocytes (10 à 25% de la couche basale).
- la couche épineuse contenant les filaments intermédiaires de prékéatine. Cette couche est composée de kératinocytes avec granules de mélanine et des cellules de Langerhans.
- la couche granuleuse où les kératinocytes changent de morphologie. Ils deviennent progressivement aplatis, anucléés et dépourvus d'organites accumulant la kératine afin de créer la matrice externe.
- la couche claire où les kératinocytes sont denses et contiennent la kératohyaline qui leur donne cet aspect translucide et est une barrière hydrophobe prévenant les pertes d'eau.
- la couche cornée composée de cornéocytes. C'est la plus superficielle et elle constitue une barrière de kératinocytes remplis de kératine uniquement, protégeant l'organisme des agressions extérieures.



**Figure 2 : La structure de l'épiderme**

*L'épiderme est une succession de cinq couches différentes enrichies en kératinocytes se différenciant progressivement de la couche la plus interne à la plus externe.*

Adapté de <https://opentextbc.ca/anatomyandphysiology/chapter/5-1-layers-of-the-skin/>

## A.2. Les cellules de l'épiderme

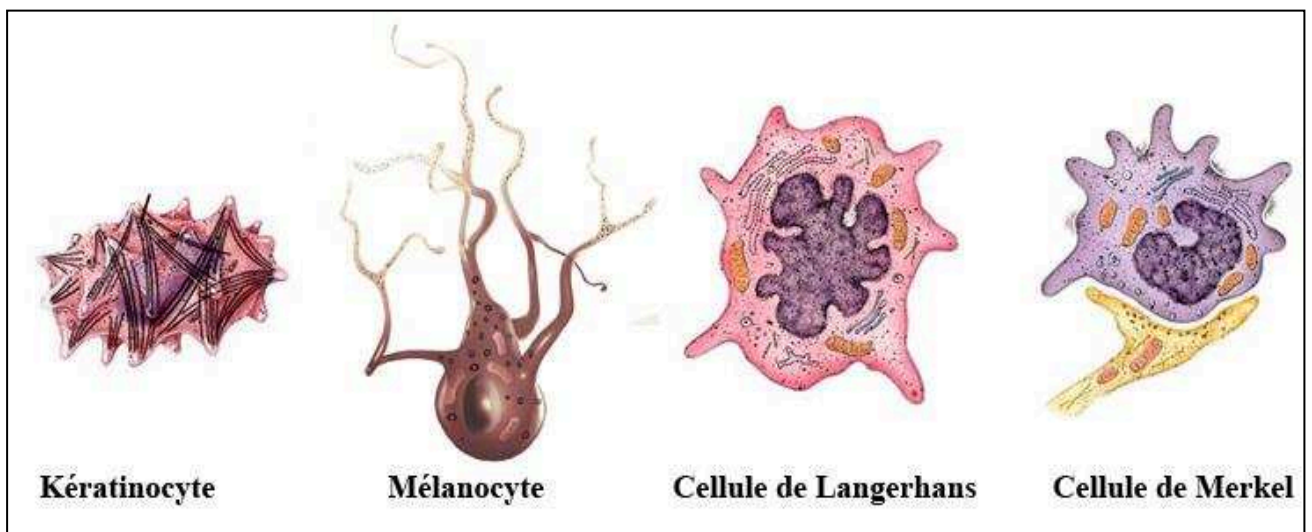
Les **kératinocytes** produisant la kératine, sont les cellules les plus abondantes de l'épiderme (90 à 95%), elles se différencient et s'étalent progressivement de la couche basale à la couche cornée devenant des cornéocytes. La cohésion intercornéocytaire est assurée par un ciment lipidique constitué en majorité par des céramides (40 à 50%) ainsi que de cholestérol et d'acides gras polyinsaturés en quantités égales (25% chacun). Cette caractéristique joue un rôle de barrière entre le milieu extérieur et l'organisme. De plus, les kératinocytes contiennent la mélanine transférée par les mélanocytes assurant la protection contre les radiations lumineuses.

Les **mélanocytes** (5% des cellules épidermiques), dont le rôle sera développé par la suite, sont des cellules dendritiques situées à la JDE mais également au niveau des follicules pileux. On les retrouve également dans l'oreille interne, les méninges, les yeux et le cœur (Thomas and Erickson, 2008). Ces cellules de forme dendritique, sont responsables de la pigmentation de la peau, leurs dendrites

permettent le transfert des mélanosomes de stade IV aux kératinocytes environnants conférant leur couleur à la peau, aux yeux et aux poils (Quevedo et al., 1975).

Les **cellules de Langerhans**, troisième population cellulaire de l'épiderme, constituent 3 à 5% des cellules épidermiques. Ce sont des cellules dendritiques présentatrices d'antigènes produites dans la moelle osseuse et migrant dans l'épiderme. On les retrouve au niveau de la couche basale et, lorsqu'elles sont activées, elles franchissent la JDE et migrent jusqu'aux ganglions lymphatiques afin d'activer le système immunitaire (Lappin et al., 1996).

Les **cellules de Merkel** sont des cellules neuro-épithéliales ayant un rôle de mécanocception très abondantes au niveau des lèvres, des paumes et de la pulpe des doigts et des pieds. Elles se trouvent dans la couche basale de l'épiderme en contact direct avec des neurones sensitifs.



**Figure 3 : Les cellules de l'épiderme**

*De gauche à droite on retrouve les cellules les plus abondantes dans l'épiderme, les kératinocytes, les mélanocytes et celles que l'on retrouve en minorité comme les cellules de Langerhans et de Merkel.*

Adapté de [www.vdsciences.com](http://www.vdsciences.com) et <http://chemistry.union.edu/siteoficial.ws>

**A.3 Origine, localisations et rôles physiologiques des mélanocytes**

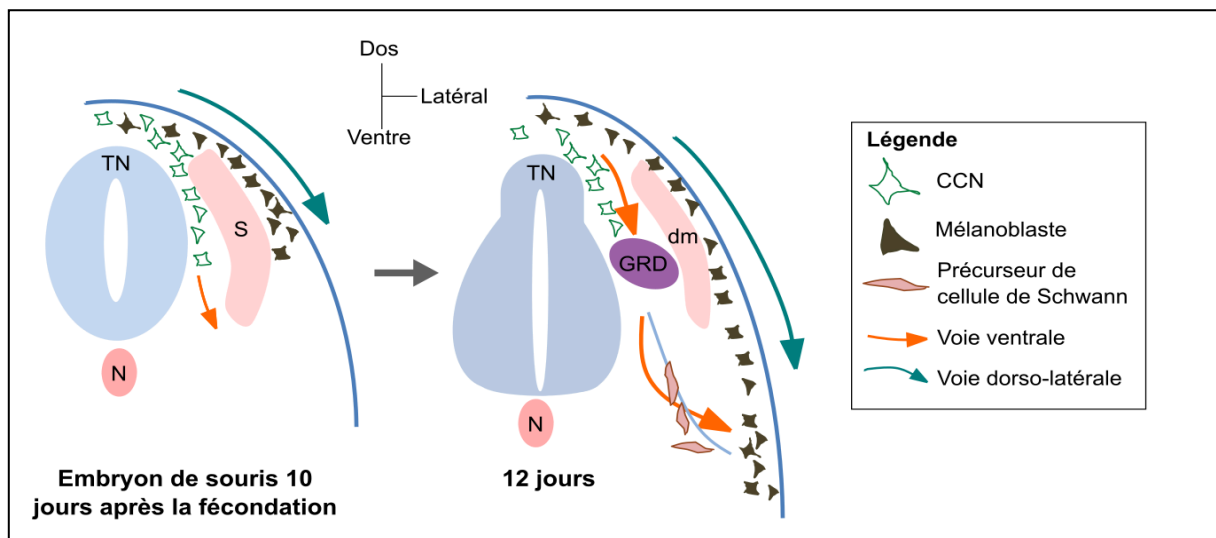
Les mélanocytes, qui représentent le deuxième type de cellules les plus abondantes de l'épiderme, sont responsables de la couleur de notre peau. Ils proviennent de la différenciation de cellules progénitrices provenant de la crête neurale nommées mélanoblastes. Les cellules de la crête neurale (CCN) sont produites lors de la gastrulation, on les retrouve au niveau dorsal du tube neural. Ces cellules vont migrer et coloniser différentes parties de l'organisme grâce à la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) et pourront donner différents types de cellules différenciées comme des cellules musculaires lisses, des adipocytes, des chondrocytes, des ostéoblastes mais aussi les mélanocytes, les cellules de Schwann et les neurones. C'est la trajectoire de migration des CCN qui est déterminante dans leur

devenir cellulaire (Bronner and LeDouarin, 2012). Deux types de migrations s'offrent à elles (Cf. Figure 4):

- La migration dorso-ventrale, entre les somites et le tube neural.
- La migration dorso-latérale, entre le dermomyotome et l'épiderme.

Les mélanoblastes subissent ce deuxième type de migration, le premier étant réservé aux cellules neuronales et gliales, notamment les cellules de Schwann (Le Douarin et al., 2004). Les mélanoblastes qui ont effectué une migration dorso-latérale vont ensuite atteindre l'épiderme afin de se différencier en mélanocytes et de produire la mélanine (Larue et al., 2013).

Des études ont montré qu'une fraction des mélanocytes de la peau provient également des cellules de la crête neurale migrant ventralement. Les précurseurs des cellules de Schwann, sont des cellules généralement présentes dans les gaines nerveuses. Ces cellules multipotentes précurseurs des nerfs innervant la peau peuvent donner soit des cellules de Schwann formant la gaine de myéline soit des mélanocytes. Ainsi, les mélanocytes cutanés proviennent directement des cellules de la crête neurale migrant par la voie dorso-latérale ou des précurseurs de cellules de Schwann migrant par la voie ventrale (Adameyko et al., 2009).



**Figure 4 : Migrations des mélanoblastes durant l'embryogenèse**

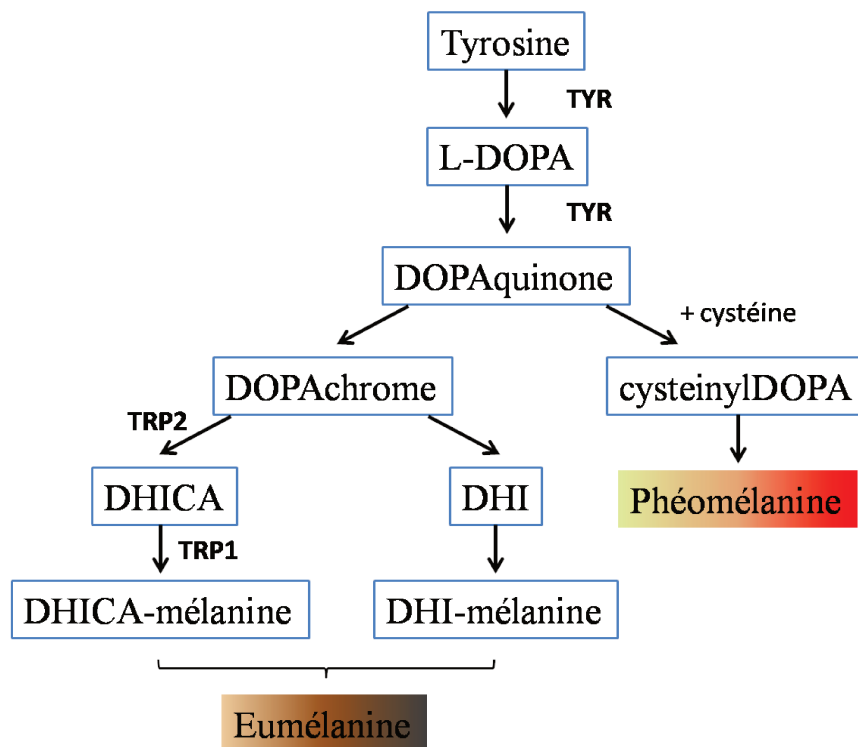
Les CCN précurseurs des mélanocytes empruntent soit une voie dorso-latérale directe, soit une voie ventrale indirecte. Dans ce second cas, les mélanocytes proviennent alors de la différenciation de précurseurs des cellules de Schwann qui migrent le long des nerfs (représentés par un trait bleu clair). S = somite; dm = dermomyotome; N = notochorde; TN = tube neural; GRD = ganglion de la racine dorsale. Adapté de Mort et al. 2015.

A l'âge adulte, on retrouve également des mélanocytes dans l'œil à l'origine de la pigmentation de l'iris et dans la cochlée de l'oreille interne où ils produisent l'endolymphe et permettent les échanges ioniques essentiels pour l'audition. Enfin, les mélanocytes sont présents au niveau de la pie-mère (leptoméninges) et du cœur où ils joueraient respectivement un rôle de cellules neuroendocrines, et de maintien du fonctionnement des valves cardiaques.

Les mélanocytes sont des cellules spécialisées dans la production de mélanine, le pigment définissant la couleur de la peau et des cheveux. La synthèse des pigments mélaniques résulte d'une cascade enzymatique permettant l'oxydation de la tyrosine en pigments (Cf. Figure 5). En effet, la tyrosine va être successivement transformée en L-3-4dihydroxyphénylalanine (DOPA) puis en dopaquinone sous l'action de la tyrosinase (TYR) c'est à ce stade que se décide l'orientation vers l'eumélanogénèse ou la phéomélanogénèse. L'eumélanine est un pigment de couleur marron-noir prédominante chez les individus à peau foncée à noire, produite grâce aux enzymes Tyrosine-Related Protein 1 (TRP1) et la Dopa Chrome Tautomérase (DCT/TRP2) (Hearing and Jimenez, 1987).

La phéomélanine est un pigment de couleur rouge-jaune prédominante chez les individus à peau claire et cheveux roux, sa production est dépendante de la présence en dérivés soufrés (cystéine et glutathion) dans les mélanocytes (Benathan et al., 1999).

On peut également retrouver des mélanines « mixtes » impliquant la polymérisation entre des monomères de phéomélanine et d'eumélanine en quantité variable.



**Figure 5 : Synthèse des pigments mélaniques**

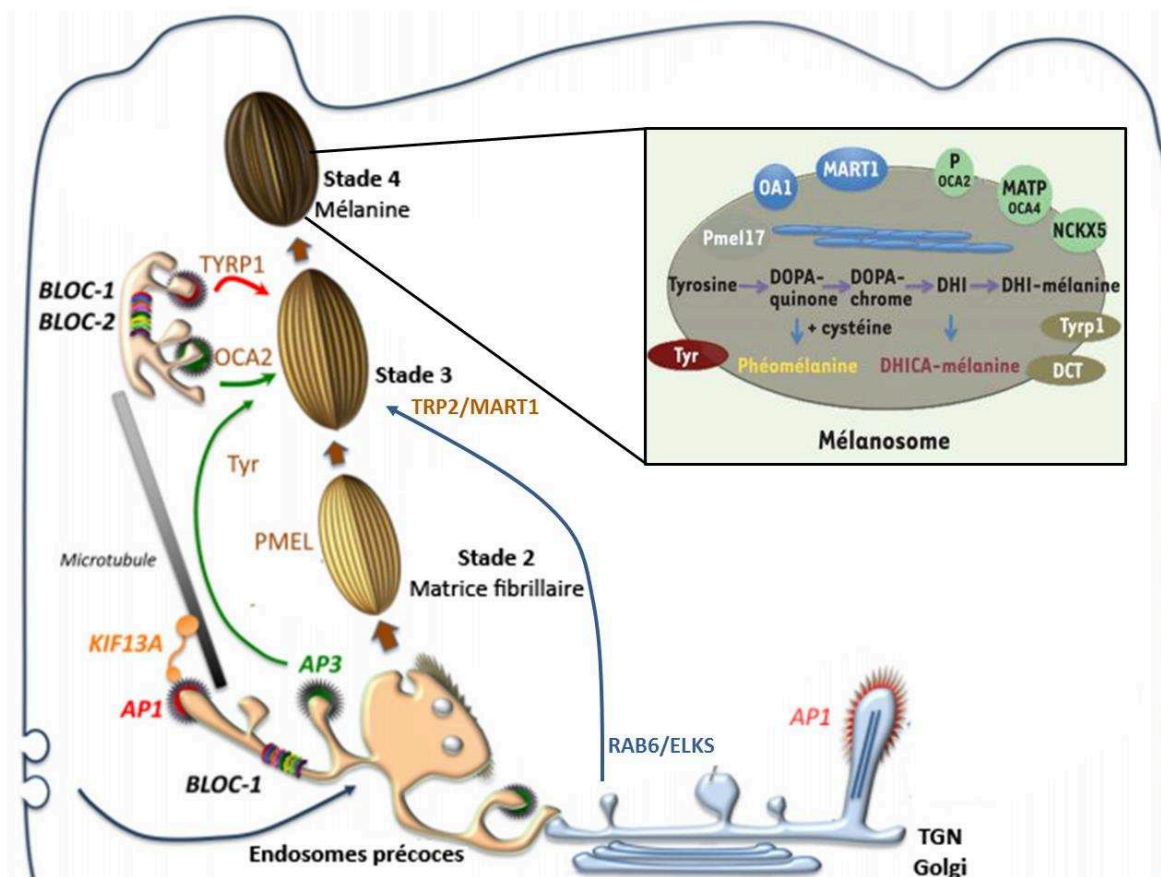
La synthèse de mélanine a pour substrat un acide aminé, la tyrosine, transformée par oxydation en L-dopa, puis en dopaquinone en présence d'oxygène moléculaire sous l'action de la tyrosinase. Les voies de synthèse divergent à partir de la synthèse de la dopaquinone, impliquant TRP1 et TRP2 dans l'eumélanogénèse, et l'incorporation de dérivés soufrés dans la phéomélanogénèse.

#### A.4 Les mélanosomes : biogenèse et transfert

Cette biosynthèse se réalise dans un compartiment dédié, les mélanosomes, des organites cytoplasmiques apparentés aux lysosomes (LRO : lysosomal related organelles). On retrouve des

caractéristiques communes comme un environnement acide, les LAMP (Lysosome-associated membrane protein) et des hydrolases acides. Ces vésicules d'origine endoplasmique suivent un processus de maturation à quatre étapes pour finir en organites striés riches en mélanine (Cf. Figure 6) (Basrur et al., 2003; Seiji et al., 1961).

- **Stade I** : le pré-mélanosome est une vésicule endosomale de forme quasi-sphérique.
- **Stade II** : le pré-mélanosome subit un changement de morphologie en devenant de forme ellipsoïdale due à la présence de fibres protéiques de nature amyloïde (constituées de la protéine PMEL17) sur lesquelles va se déposer la mélanine. Des vésicules recouvertes de clathrine issues du trans-Golgi et contenant la machinerie essentielle à la mélanogénèse vont fusionner avec les pré-mélanosomes pour former les mélanosomes matures de stade III/IV (Jimbow et al., 2000).
- **Stade III** : la mélanine synthétisée par des enzymes de la famille tyrosinase (TYR, TRP1 et TRP2) est déposée sur ces structures fibrillaires.
- **Stade IV** : l'accumulation de mélanine est à son apogée, on ne distingue plus les structures internes, le mélanosome apparaît très dense aux électrons en microscopie électronique à transmission (Raposo and Marks, 2007). A ce stade les mélanosomes sont acheminés à l'extrémité des dendrites mélanocytaires afin que la mélanine soit transférée aux 40 kératinocytes environnants.



### **Figure 6 : Maturation et structure des mélanosomes**

Les différents stades de maturation des mélanosomes (du stade I au IV). Les mélanosomes immatures émergent de domaines vacuolaires des endosomes précoces et sont maturés par le relargage de cargos provenant de domaines tubulovésiculaires recouverts des protéines AP1 ou AP3. Les domaines associés à KIF13A et AP1 migrent le long des microtubules pour délivrer certaines protéines (TYRP1, OCA2 et Tyr), les protéines BLOC-1 et BLOC-2 facilitent ce transport. TYRP1 et TYR sont acheminés via des vésicules provenant des endosomes précoces. TYRP2 et MART1 proviennent du réseau Golgien (Patwardhan et al. 2017). Les protéines contenues dans le mélanosome sont Pmel17 qui est le constituant majeur des fibres (en bleues), OAI (ocularalbinism type 1) impliqué dans la biogenèse du mélanosome, MART1 (aussi appelé MelanA) dont le rôle est méconnu mais a été identifié comme un antigène tumoral. Enfin OCA2, MATP (*OCA4*), *NCKX5 (SLC24A5)* sont des transporteurs d'ions et régulent le pH intra-mélanosome. *D'après Marks et al. 2013 et Delevoye et al. 2011.*

Le transport des mélanosomes est actif et effectué via le cytosquelette, à l'aide des microtubules depuis l'espace périnucléaire jusqu'aux dendrites, puis jusqu'à la pointe de ces derniers à l'aide des filaments d'actine (Passeron et al., 2004). La kinésine et la dynéine permettent respectivement le transport antérograde et rétrograde des mélanosomes dans le corps des dendrites. Une fois arrivés à la partie distale de ces derniers, les mélanosomes se lient à la myosine Va assurant via le réseau d'actine l'acheminement jusqu'à la pointe des dendrites (Wu et al., 2002). La petite protéine G RAB27A, régulée par Microphthalmia-associated transcription factor (MITF) (Chiaverini et al., 2008), est impliquée dans le transport des mélanosomes notamment au niveau de la liaison entre la myosine Va et les mélanosomes à l'extrémité des dendrites.

Quatre hypothèses sur le transfert des mélanosomes aux kératinocytes sont probables. Le premier mécanisme est une cytophagocytose où le kératinocyte phagocyterait l'extrémité dendritique du mélanocyte remplie de mélanosomes. Le second impliquerait la génération d'un nanotube entre le kératinocyte et le mélanocyte (à l'aide d'une fusion des membranes plasmiques) permettant le transfert des vésicules pigmentées. Le troisième mécanisme implique une fission de la membrane plasmique des mélanocytes contenant des mélanosomes qui sera par la suite phagocytée par le kératinocyte. Pour finir, le dernier mécanisme implique une exocytose des pigments nus de toute membrane qu'on appelle des mélanocores issus des mélanosomes dans le milieu extracellulaire, suivi d'une internalisation de ces « mélanocores » par les kératinocytes (Wu and Hammer, 2014).

### **A.5 Régulation de la mélanogénèse**

In vivo, les rayonnements UVA et UVB sont les principaux stimulateurs de la mélanogénèse (Park et al., 2009), ils induisent également la prolifération des mélanocytes et l'augmentation de la dendricité de ces derniers. Les UVB entraînent des dommages à l'ADN capables de stimuler l'activité de la tyrosinase dans les mélanocytes.

Les sécrétions des kératinocytes (pouvant être augmentées par les UV) agissent de façon paracrine sur les mélanocytes et stimulent la pigmentation. Les principales molécules agissant ainsi sont les deux

peptides dérivés de la pro-opiomélanocortine (POMC), l' $\alpha$ MSH (alpha melanocytestimulating hormone) et l'hormone adrénocorticotrope (ACTH), l'endothéline-1 (ET-1), le stem cell factor (SCF), le monoxyde d'azote (NO) et l'agouti signaling protein (ASP) (Cui et al., 2007).

D'un point de vue fondamental, les UV induisent un clivage de POMC produisant l'ACTH et l' $\alpha$ MSH qui vont aller se fixer sur MC1R (un récepteur à 7 hélices transmembranaires couplé aux protéines G), ceci entraîne une activation de l'adénylate cyclase produisant de l'AMPc et une activation de la protéine kinase A (PKA). Cette dernière peut aller phosphoryler CREB (cAMP responsive element binding protein) lui-même capable d'activer la transcription de gènes dont le promoteur présente un motif CRE (5'-TGACCTCA-3'), notamment MITF (Bertolotto et al., 1998a). MITF va ensuite se fixer sur les promoteurs de ses gènes cibles régulant la mélanogénèse tels que la TYR, DCT, TRP1 ce qui augmentera la synthèse de mélanine (Bertolotto et al., 1996; Bertolotto et al., 1998b).

La régulation du facteur de transcription MITF peut également se produire via l'induction de la voie des MAPK/ERK (Mitogen Activated Protein Kinase/Extracellular signal-Regulated Kinases) par l'AMPc. La voie MAPK/ERK peut phosphoryler MITF qui conduit à sa dégradation par le protéasome et donc à une inhibition de mélanogénèse. Cette régulation fine permet d'éviter l'accumulation de mélanine dans les mélanocytes qui peut être toxique pour la cellule (Wick et al., 1977).

D'autre part, la production de l'AMPc inhibe la voie PI3K (Phosphatidyl Inositol-3-Kinase)/AKT bloquant par conséquent les Rho-GTPases impliquées dans le remodelage du cytosquelette d'actine. Ceci va empêcher la génération de fibres de stress et permettre une augmentation de dendricité mélanocytaire (Busca and Ballotti, 2000).

## **A.6 Rôle de la pigmentation**

L'exposition de la peau humaine aux radiations solaires ou aux UV de source artificielle entraîne une altération du métabolisme, de la structure et de la fonction des mélanocytes. En effet, la conséquence directe est une augmentation de la pigmentation de la peau, communément appelée bronzage. Les mélanosomes vont se regrouper autour du matériel génétique contenu dans les kératinocytes c'est ce qu'on appelle le « capping » (Kobayashi et al., 1993). La plus protectrice des mélanines produites est l'eumélanine limitant la quantité des rayons UV atteignant l'épiderme et évitant la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS). L'eumélanine est environ 1000 fois plus photoprotectrice que la phéomélanine, photolabile et toxique pour la cellule puisque générant des dommages oxydatifs à l'ADN. C'est le ratio eumélanines/phéomélanines qui est prépondérant dans la photoprotection, plus il est grand plus cette dernière est élevée. Ce sont les personnes de phototype 1, dont la peau est claire et leurs cheveux roux, synthétisant peu d'eumélanines qui présentent le plus de risque de développer des cancers de la peau photo-induits (Valverde et al., 1995; Valverde et al., 1996).



## A.7 Genèse d'un nævus

Les mélanocytes se divisent moins de deux fois par an, cependant, on retrouve des néoplasmes mélanocytaires qui peuvent être des lésions bénignes communément appelées nævi ou des lésions malignes appelées mélanomes.

Les nævi ou « grains de beauté » résultent de la prolifération bénigne des mélanocytes. Les caucasiens possèdent en moyenne 25 nævi de 2mm de diamètre qui apparaissent dans les deux premières décennies de la vie de l'individu. La grosse majorité des nævi ne progressent pas en mélanomes (seulement 26% des mélanomes dérivent de nævi pré-existants). Cependant, des études récentes ont prouvé que tous les mélanocytes contenus dans un nævus portent la mutation BRAF<sup>V600E</sup>, indiquant que cette mutation est un évènement initiant la lésion bénigne (Shain et al., 2015).

Après l'acquisition de cette mutation initiatrice, le mélanocyte va proliférer de façon limitée dans le temps pour former un nævus avant d'entrer en sénescence.

Certaines cellules peuvent occasionnellement rentrer en mitose et se diviser pendant cet état de sénescence, mais ceci est contre-balançé par l'apoptose qui se produit à cause des stress oncogéniques. Ceci crée un certain équilibre justifiant que cliniquement la plupart des nævi n'évoluent pas en taille au cours des années.

## B. LE MÉLANOME CUTANÉ

Le mélanome cutané est la forme la plus mortelle de cancer de la peau. Il représente 5% des cancers cutanés mais entraîne 80% des décès. Ceci est dû au fait qu'il possède un fort potentiel métastatique au niveau des ganglions lymphatiques, du foie, des poumons mais également du système nerveux central. S'il est diagnostiqué précocement il pourra être retiré par exérèse chirurgicale, à l'inverse à un stade métastatique, le pronostic vital devient très mauvais.

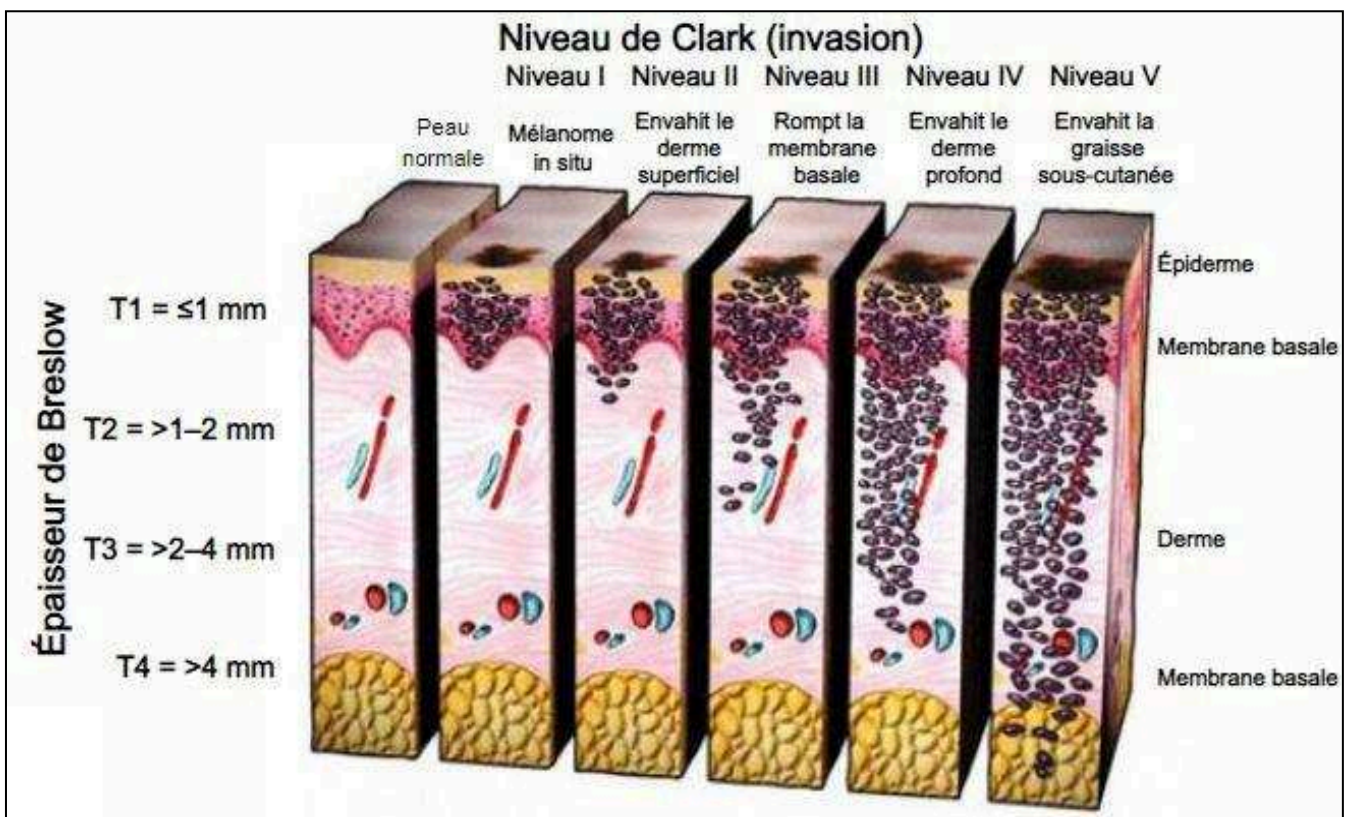
### B.1 Épidémiologie

L'incidence du mélanome a dramatiquement augmenté dans les populations caucasiennes ces trois dernières décennies et a atteint 230 000 nouveaux cas par an dans le monde chaque année (Organisation Mondiale de la Santé). En France, on en dénombrait 11100 nouveaux cas en 2012 associés à 1600 décès. Ce cancer est diagnostiqué chez des patients âgés de 55 à 60 ans en moyenne et la survie moyenne à 5 ans des patients a augmenté ces dernières années grâce au développement des thérapies ciblées et de l'immunothérapie (INCa).

### B.2 Classification

Les mélanomes sont classés selon deux indices : l'indice de Clark et l'indice de Breslow (Cf. Figure 7) (Breslow, 1970; Mihm et al., 1971). L'indice de Clark traduit le niveau d'infiltration en profondeur de la lésion :

- Clark I : intra-épidermique (mélanome in situ).
- Clark II : quelques cellules mélanocytaires atypiques infiltrent le derme papillaire.
- Clark III : tout le derme papillaire est envahi.
- Clark IV : envahissement du derme réticulaire.
- Clark V : atteinte de l'hypoderme.



**Figure 7 : Représentation schématique des indices de Clark et Breslow.**

Adapté de [www.med-ars.it](http://www.med-ars.it)

L'indice de Breslow (en mm) correspond à l'épaisseur de la tumeur et indique la distance maximum entre les cellules superficielles de la tumeur et la cellule maligne la plus profondément détectée. Le pronostic vital d'un patient est inversement corrélé à l'épaisseur de la tumeur.

Actuellement, la classification des mélanomes se fonde sur le site primaire du mélanome et la phase de croissance radiale pour distinguer les différents types de mélanomes (Clark et al., 1969):

- le **mélanome à extension superficielle ou Superficial Spreading Melanoma (SSM)**, est la forme la plus fréquente (70%), il évolue tout d'abord en extension horizontale pendant 2 à 5 ans en moyenne puis s'ensuit une extension verticale en direction du derme où le pronostic s'aggravera rapidement. Son développement est dû à des expositions solaires intermittentes et aux coups de soleil survenus au cours de la vie du patient. On le retrouve particulièrement chez les individus de phototype I et II.
- le **mélanome nodulaire ou Nodular Malignant Melanoma (NMM)** représente 20% des mélanomes. Il a une progression beaucoup plus rapide que le SSM, agressif, il infiltrera le derme puis les ganglions lymphatiques. On le retrouve sur des zones non photo-exposées.
- le **mélanome du Dubreuilh ou Lentigo Malignant Melanoma (LMM)** concerne 5% à 10% des mélanomes et est lié à une photo-exposition chronique. Il survient de façon quasi exclusive chez les personnes âgées (>60ans), à évolution lente (5 à 15 ans). Il se situe sur des zones exposées telles que la tête et le cou.
- le **mélanome acral-lentigineux ou Acral Lentiginous Malignant Melanoma (ALMM)** (2 à 10%), atteint préférentiellement les individus de phototype V et VI au niveau des paumes de main, de la voûte plantaire et au niveau unguéal. Ce type de mélanome n'est pas lié à une exposition chronique mais est très agressif ce qui lui confère un mauvais pronostic.
- le **mélanome des muqueuses** (1%), se localise au niveau buccal, nasal ou génital et n'est pas lié à la photo-exposition.

Enfin, il est à noter qu'on retrouve également des mélanomes au niveau de l'uvée ou de la conjonctive (500 nouveaux cas/an en France) qu'on appelle **mélanomes oculaires** (Pandiani et al., 2017).

### B.3 Les facteurs de risques environnementaux

L'exposition aux rayonnements ultraviolets (UVA ou UVB), qu'ils soient naturels ou artificiels est associée à un risque accru de développer un mélanome. Notamment les expositions intenses et ponctuelles pendant l'enfance, qui constituent un risque élevé de développer un SSM à l'âge adulte. Récemment, il a été mis en évidence que l'obésité était un facteur de risque augmentant de 1,17 à 1,31 le risque de développer un mélanome chez l'homme (Clement et al., 2017).

### B.4 Les facteurs de risques constitutionnels

Le premier facteur de risque visible est la couleur de notre peau et notre aptitude à bronzer correspondant au phototype (de I à VI) (Fitzpatrick, 1988) (Tableau 1). Ce sont les sujets de phototypes I et II qui ont le risque le plus élevé de développer un mélanome. En effet, leurs mélanocytes produisent moins de mélanine, ils ne bronzent pas et ne peuvent donc pas se protéger des effets délétères des rayonnements UV. La prise de coup de soleil augmente le risque de développer un mélanome. Selon une étude américaine, cinq coups de soleil à l'adolescence suffiraient à augmenter de 80% les risques de développer un mélanome.

	Réaction au soleil	Description du type de peau
<b>Phototype I</b>	Ne bronze pas, attrape systématiquement des coups de soleil.	Peau très claire associée à des taches de rousseur.  Cheveux blonds ou roux.
<b>Phototype II</b>	Bronze difficilement.  Attrape souvent des coups de soleil.	Peau très claire.  Cheveux blonds ou châains.  Taches de rousseur apparaissent au soleil.  Yeux clairs.
<b>Phototype III</b>	A parfois des coups de soleil.  Bronze progressivement.	Peau claire.  Cheveux blonds ou châains.
<b>Phototype IV</b>	Attrape peu de coups de soleil.  Bronze bien.	Peau mate.  Cheveux châains ou bruns.  Yeux foncés.
<b>Phototype V</b>	A rarement des coups de soleil.  Bronze facilement.	Peau foncée.  Yeux foncés.
<b>Phototype VI</b>	Peau foncée.  N'a jamais de coups de soleil.	Peau noire.

**Tableau 1:** Description des différents phototypes selon Fitzpatrick et al. 1988.

Comme dit dans le sous-chapitre précédent, le nombre de nævi constitue également un risque lorsque leur nombre est supérieur à 50. De plus, la présence de nævi congénitaux de grande taille est également un facteur de risque du mélanome (Krengel et al., 2006).

Environ 10% des mélanomes sont héréditaires, les gènes de prédisposition identifiés confèrent un risque élevé (CDKN2A, CDK4, RB1, POT1, ACD, TERT, TERF2IP), un risque intermédiaire (MC1R et MITF) ou un faible risque (TYR, TRP1, ASP) de développer un mélanome (Potrony et al., 2015). Des mutations ou délétions peuvent se produire au locus 9p21 sur le gène CDKN2A (Cyclin-

Dependent Kinase inhibitor 2A) codant pour les suppresseurs de tumeurs p16<sup>INK4A</sup> et p14<sup>ARF</sup>. On peut retrouver des mutations activatrices de CDK4 en moindre proportion. Enfin des mutations activatrices de RB1 entraînent un grand risque de développer non seulement un rétinoblastome mais également un mélanome. Des variants de MC1R sont susceptibles d'augmenter le risque de mélanome tout comme l'identification de la mutation MITF<sup>E318K</sup> dans le mélanome qui augmente de quatre fois le risque de développer un mélanome (Bertolotto et al., 2011).

Concernant les gènes de faible susceptibilité, ils sont en général associés à la pigmentation. Seuls, ils n'augmentent pas plus de deux fois le risque de développer un mélanome mais peuvent augmenter la pénétrance d'autres gènes de susceptibilité. Cependant, il reste de très nombreux mélanomes héréditaires à la génétique méconnue à ce jour.

### **B.5 La formation d'un mélanome et son évolution**

La transformation d'un mélanocyte en mélanome est liée à l'accumulation d'altérations génétiques permettant l'expansion clonale. Ce phénomène nécessite l'activation d'oncogènes et l'inhibition de gènes suppresseurs de tumeur. Il est associé à l'activation des voies de prolifération, à l'inhibition des voies de sénescence et d'apoptose. Néanmoins, la dégénérescence d'un nævus préexistant en mélanome ne se produit que dans 25% des cas. Le modèle de Clark est communément admis et retrace les différentes étapes que peut subir un mélanome qu'il soit généré de novo ou dérivant d'un nævus. L'évolution de chaque mélanome est variable selon le patient et est même propre à chaque tumeur.

Dans le cas d'un nævus préexistant, les cellules contenues peuvent échapper au processus de sénescence et proliférer pour donner un mélanome. La première phase radiale de croissance permet la prolifération des cellules de façon horizontale sans franchir la lame basale. La phase verticale de croissance est importante puisqu'on y distingue une transition épithélio-mésenchymateuse des cellules permettant progressivement l'invasion du derme, avant d'acquérir leur pouvoir métastatique permettant l'intravasation dans les vaisseaux sanguins ou lymphatiques puis leur extravasation vers des sites secondaires (tissus et organes).

### **B.6 Les altérations génétiques prépondérantes dans le développement du mélanome**

Le mélanome est le cancer présentant le plus fort taux de mutations somatiques par rapport aux autres tumeurs solides (Alexandrov et al., 2013). Certaines de ces mutations présentent des signatures UV induisant des substitutions cytosine à thymidine, démontrant le rôle de l'exposition solaire dans le développement du mélanome. L'analyse d'exomes et de génomes de centaines de mélanomes a permis de mettre en évidence des altérations génétiques redondantes permettant de classer les mélanomes en différents sous-groupes (Hayward et al., 2017; Hodis et al., 2012; Krauthammer et al., 2012). Les

quatre sous-groupes sont basés sur les mutations les plus fréquemment retrouvées : BRAF, NRAS, NF1 et les triple sauvage (enrichis en mutations KIT).

### **B.6.1 Les altérations somatiques**

#### **La voie de signalisation MAPK**

La voie de signalisation MAPK/ERK transmet les réponses cellulaires en réponse aux facteurs de croissance qui se lient aux RTKs. Environ 90% des mélanomes présentent des mutations activatrices dans au moins un des gènes impliqués dans cette voie de signalisation. La famille des sérine/thréonine kinases RAF composée de trois isoformes ARAF, BRAF et CRAF est activée par les petites GTPases RAS. En effet, suite à la liaison de facteurs de croissances, hormones ou cytokines aux RTKs, il y aura une activation de la protéine RAS avec recrutement de la famille RAF entraînant la phosphorylation de MEK1/2 puis d'ERK1/2. Les kinases ERK activeront des substrats cytoplasmiques qui seront transloqués dans le noyau afin de phosphoryler des facteurs de transcription impliqués dans la prolifération et la survie.

La sérine/thréonine protéine kinase BRAF est la plus mutée dans les mélanomes (50 à 60% des cas). La mutation BRAF<sup>V600E</sup> découverte en 2002 (Davies et al., 2002) a permis l'émergence des thérapies ciblées pour traiter les mélanomes. La mutation sur la valine 600 active constitutivement la kinase et la voie de signalisation associée. L'oncogène BRAF a un rôle prépondérant dans la transformation tumorale en régulant des gènes comme la cycline D, HIF1 $\alpha$ , le VEGF, certaines métalloprotéases (MMPs) et certaines intégrines. Cependant, un modèle murin possédant un allèle conditionnel BRAF<sup>V600E</sup> inducible dans les mélanocytes a confirmé que cette mutation n'est pas suffisante pour induire la transformation maligne des mélanocytes, créant uniquement des lésions naeviques (Dankort et al., 2009; Dhomen et al., 2009). Afin de permettre la formation d'un mélanome la mutation BRAF<sup>V600E</sup> doit être associée à d'autres événements mutationnels. En effet, dans 44% des cas de mélanomes mutés BRAF<sup>V600E</sup>, une mutation inactivatrice ou une délétion de PTEN (phosphatase and tensin homolog) est retrouvée. On retrouve également des mutations des gènes CDKN2A ou TP53.

La famille des protéines RAS sont des petites GTPases qui font partie de la famille des protéines G monomériques. On retrouve les isoformes HRAS, NRAS et KRAS dont NRAS est la deuxième protéine la plus mutée dans les mélanomes cutanés (entre 10 à 30%). La mutation oncogénique se produit à la glutamine 61 (Q61L et Q61R sont les plus fréquentes) et elle est également souvent retrouvée dans les naevi congénitaux. Cette mutation oncogénique rend la protéine constitutivement active puisque l'hydrolyse du GTP en GDP est empêchée. RAS régule les voies RAF/MAPK/ERK ainsi que la voie PI3K et est donc également impliquée dans la survie, la prolifération mais aussi la migration cellulaire. Tout comme la mutation BRAF elle n'est pas suffisante pour induire un

mélanome (Denoyelle et al., 2006). A noter que les mutations NRAS et BRAF sont en général mutuellement exclusives.

Enfin, dans cette voie de signalisation, on retrouve la protéine NF1 (neurofibromin 1) qui est une GTPase régulant négativement la voie RAS/RAF en accélérant l'hydrolyse du GTP lié à RAS. Une mutation perte de fonction est retrouvée dans 14% des cas de mélanomes, ce qui a pour conséquence d'activer les voies en aval telles que ERK et PI3K (Lau et al., 2000).

### **La voie de signalisation des récepteurs à tyrosine kinase (RTKs)**

Plusieurs récepteurs à tyrosine kinase peuvent stimuler anormalement la voie MAPK dans le mélanome (Easty et al., 2011). La protéine KIT par exemple, est un RTK jouant un rôle dans le développement des mélanocytes (Nishikawa et al., 1991). Des mutations activatrices ou des amplifications de KIT ont été identifiées dans 5% des mélanomes chroniquement exposés au soleil. C-MET est également un RTK augmenté dans les mélanomes jouant plutôt un rôle dans la migration des cellules. D'autres exemples de RTK impliqués dans la mélanomagenèse sont des récepteurs à l'Epidermal Growth Factor (EGFR), comme l'ephrin receptor 2 (EPHA1), ERBB4 et PDGFR $\beta$  également important dans le processus de résistance.

### **TP53**

Contrairement à la plupart des cancers, le mélanome est rarement associé à des mutations du gène TP53. Muté dans environ 1 à 5% des cas, la fonction apoptotique de p53 semble déficiente dans le cas du mélanome (Viros et al., 2014). Ceci serait lié à la perte germinale de p14<sup>ARF</sup> qui interagit directement avec p53 pour empêcher la liaison avec MDM2 (Mouse Double Minute 2) qui ubiquitine p53 pour permettre sa dégradation. L'absence de p14<sup>ARF</sup> ajoutée à la surexpression fréquente de MDM2 dans le mélanome (Muthusamy et al., 2006) expliquerait le défaut d'apoptose dépendante de p53 dans cette pathologie. De plus, APAF-1 qui est une cible de p53 et agit dans la cascade apoptotique induite par p53, est méthylé dans le mélanome entraînant sa perte d'expression et donc l'incapacité pour la cellule de répondre normalement aux signaux d'apoptose suite à l'activation de p53 (Yu et al., 2009).

### **Cycline D1**

La cycline D1 (CCND1) code pour la protéine majeure du contrôle du cycle cellulaire. La cycline D1 contrôle la prolifération cellulaire à travers la liaison et stimulation de CDK4 et CDK6, qui résulte en la phosphorylation de la protéine du rétinoblastome nécessaire à la progression du cycle cellulaire de la phase G1 à la phase S. CCND1 est amplifiée dans environ 50% des cas de mélanome. De plus, l'amplification de CCND1 a été démontrée comme impliquée dans le développement de la résistance aux inhibiteurs de BRAF (Smalley et al., 2008).

### **La voie Wnt/ $\beta$ -caténine**

La voie Wnt/ $\beta$ -caténine est importante durant le développement des mélanocytes (Dorsky et al., 1998). Cette voie de signalisation est activée dans 1/3 des mélanomes se traduisant par la présence intra-nucléaire de la  $\beta$ -caténine. Mutée dans 1 à 2% des cas de mélanome CTNNB1 code pour la protéine  $\beta$ -caténine qui régule l'expression de MITF, cycline D1, c-MYC, et BRN2. Ces mutations sont exclusivement retrouvées dans des contextes BRAF ou NRAS mutés confirmant l'interaction fonctionnelle entre la voie  $\beta$ -caténine et la voie des MAPK. Plus récemment, il semble que cette voie de signalisation soit reliée à un statut hypo-méthylé, un infiltrat de cellules T réduit, une condition d'échappement au système immunitaire et une faible immunogénicité (Massi et al., 2017; Nsengimana et al., 2018; Spranger et al., 2015).

### **La voie PI3K/AKT**

La PI3K catalyse la phosphorylation du phosphatidylinositol (PI) et produit des PIP3 qui sont impliquées dans l'activation de la kinase AKT. Les PIP3 servent d'ancrage pour les protéines kinases PDK1 et AKT, la première phosphorylant et activant la deuxième sur la thréonine 308. Ainsi activée, AKT pourra moduler des substrats contrôlant la progression de la cellule dans le cycle, le métabolisme ou les capacités migratoires. Les mutations de BRAF sont très souvent associées à la stimulation de la voie PI3K (Tsao et al., 2004). La perte de PTEN (soit par mutation dans 12% des cas soit par délétion dans 20% des mélanomes), un inhibiteur de la voie PI3K est un événement majeur permettant la stimulation aberrante de cette voie de signalisation. Dans des mélanocytes murins, la mutation oncogénique BRAF<sup>V600E</sup> associée à la perte de PTEN entraîne le développement d'un mélanome avec une pénétrance de 100%, une courte latence et l'invasion à des tissus distants (Dankort et al., 2009). La voie PI3K peut également être activée par des mutations de gènes impliqués dans la voie. Bien que la PI3K elle-même soit rarement mutée, des mutations activatrices d'AKT3 ont été rapportées dans 20% des cas de mélanomes (Stahl et al., 2004). Pour finir, la résistance au vémurafénib est médiée par l'activation de la voie IGF1R/PI3K (Villanueva et al., 2010) ou via l'activation de la voie PDGFR/PI3K (Sun et al., 2014a).

### **RAC1**

Des résultats récents provenant d'un séquençage d'exomes ont permis l'identification d'une mutation récurrente de proline à sérine P29S sur RAC1 rendant la protéine constitutivement active. Cette mutation concerne 5 à 9% des mélanomes et est la troisième plus fréquente dans les mélanomes exposés au soleil après les mutations BRAF et NRAS. La mutation P29S est en effet induite par une substitution C>T qui est une signature UV. Cette mutation confère une augmentation de l'épaisseur de la tumeur, une augmentation du taux de mitoses, des ulcérations et souvent des invasions des ganglions lymphatiques au moment du diagnostic. Elle serait également responsable de la résistance



aux thérapies ciblées avec les inhibiteurs de RAF/MEK (Watson et al., 2014). De plus, cette mutation augmente également l'expression de PD-L1, un traitement anti-PD1 ou anti-PD-L1 pourrait donc être bénéfique aux patients porteurs de cette mutation.

## **MITF**

MITF est amplifié dans 10% des mélanomes primaires et dans 15% des mélanomes métastatiques (Garraway et al., 2005). Plusieurs mutations ponctuelles ont été retrouvées dans 2% des mélanomes métastatiques qui pourraient altérer les modifications post-traductionnelles de MITF mais aussi son activité transcriptionnelle (Cronin et al., 2009). Récemment, la mutation somatique MITF<sup>E87R</sup> a été démontrée comme favorisant la progression tumorale via la protéine S100A4 (Nordlinger et al., 2018).

### **B.6.2 Les altérations germinales**

Comme expliqué dans la partie « Facteurs de risques constitutionnels », 10% des mélanomes sont héréditaires. Certains gènes impliqués dans cette hérédité confèrent des risques élevés on parle de forte pénétrance et à l'inverse de faible pénétrance.

#### **Gènes à forte pénétrance**

Les mutations germinales de CDKN2A (35% des cas) et CDK4 (très rares cas) sont associées à un risque élevé de développer un mélanome. Le gène suppresseur de tumeur CDKN2A code pour p16<sup>INK4a</sup> et P14<sup>ARF</sup>.

- La protéine p16<sup>INK4A</sup> inhibe l'activité de cyclineD1/CDK4 et CDK6, par conséquent les mutations inactivatrices sur p16<sup>INK4A</sup> induiront une augmentation de ces protéines qui résultera en une hyperphosphorylation de RB, la libération du facteur de transcription E2F et la progression du cycle cellulaire en G1/S. Ceci correspond physiologiquement à un échappement du processus de sénescence induit par les mutations oncogéniques (OIS pour « Oncogene Induced Senescence »).

- La protéine p14<sup>ARF</sup> stabilise p53 en inhibant la dégradation induite par l'ubiquitine ligase MDM2. La stabilisation de p53 conduit à l'arrêt du cycle cellulaire et à l'entrée en sénescence ou bien à l'apoptose des cellules.

- Le faible pourcentage de mutation retrouvé dans la protéine CDK4 confirme son rôle prépondérant dans la prolifération, la progression du cycle cellulaire. Néanmoins, la mutation retrouvée qui est CDK4<sup>R24C</sup> rend la protéine insensible à la régulation par p16<sup>INK4A</sup> permettant l'activation constitutive du complexe CDK4/cycline D1.

#### **Gènes à pénétrance modérée**

La mutation germinale de MITF qui change la glutamine 318 en lysine (MITF<sup>E318K</sup>) prédispose les porteurs au mélanome. Celle-ci est également associée à de multiples mélanomes primaires ainsi

qu'au mélanome nodulaire et pourrait donc jouer un rôle dans l'agressivité du mélanome. Mécanistiquement, cette mutation altère son activité transcriptionnelle et retarde l'apparition de la sénescence dans les mélanocytes (Bonet et al., 2017).

### **Gènes à faible pénétrance**

La plupart des gènes à faible pénétrance sont impliqués dans la pigmentation. En effet, les variants de MC1R associés à un phototype I (V60L, R151C, R160W, D294H) augmentent de 2 à 4 fois le risque de développer un mélanome. La voie MC1R induit la phosphorylation des protéines de réparation de dommages à l'ADN. Des mutations de MC1R compromettent leur activation et donc la stabilité génomique. De plus, MC1R interagit avec PTEN et stabilise son expression, certains variants de MC1R empêchent cette interaction, favorisant l'activation de la voie PI3K (Cao et al., 2013).

## **B.7 Comment traiter le mélanome métastatique?**

Une grande majorité des mélanomes sont diagnostiqués précocement ce qui permet de les retirer par exérèse chirurgicale. Dès lors qu'un ganglion est atteint, un curage chirurgical est effectué (lorsque l'épaisseur de Breslow est >0.8mm). A un stade métastatique le pronostic devient très mauvais car l'efficacité des traitements n'est malheureusement pas encore optimale, avec un problème majeur : les résistances primaires et acquises aux traitements. En effet, malgré les avancées thérapeutiques spectaculaires de ces dernières années, la plupart des patients atteints de mélanome métastatique succombent encore à la maladie (Grob et al., 2015).

### **B.7.1 Les traitements traditionnels**

La chimiothérapie a été l'un des premiers traitements pour les mélanomes métastatiques. De 1974 à 2011, la dacarbazine était utilisée pour améliorer les réponses cliniques mais aucune amélioration de la survie globale n'était observée. La résistance à l'apoptose des cellules de mélanome et le fait que ce type de traitement touche principalement les cellules à prolifération accrue (épargnant donc les cellules à caractère souche ou initiatrices de mélanomes qui sont quiescentes) sont les raisons principales de résistances à ce traitement. Actuellement, ce traitement a été remplacé par des approches ciblées mais la chimiothérapie reste le traitement palliatif des mélanomes réfractaires et en rechute suite à une résistance à d'autres traitements.

### **B.7.2 Les thérapies ciblées**

La caractérisation des altérations génétiques le plus souvent retrouvées dans les mélanomes a permis l'émergence des thérapies ciblées pour cibler spécifiquement la forme oncogénique BRAF<sup>V600E</sup> qui est détectée dans 50% des mélanomes. Les inhibiteurs spécifiques de BRAF<sup>V600E</sup>, comme le PLX4032 (Vemurafenib ou Zelboraf®), le GSK2118436 (Dabrafenib ou Tafinlar®) agissent comme des inhibiteurs compétitifs de la liaison de l'ATP sur la kinase. Ils ont reçu une autorisation de mise sur le

marché (AMM) en 2011. Néanmoins, 25% des patients présentent une résistance primaire au traitement et n'y répondent pas. Le reste des patients présentent une augmentation de survie globale de 5 mois sans progression du mélanome. Malheureusement, dans la plupart des cas une résistance secondaire apparaît, avec une rechute très agressive après 6 à 9 mois de traitement (Johannessen et al., 2010; Nazarian et al., 2010; Wagle et al., 2011).

Face aux échecs de la monothérapie ciblée à cause des résistances acquises ou intrinsèques, les patients porteurs d'un mélanome avec une mutation BRAF<sup>V600E/V/D</sup> seront systématiquement traités par combinaison d'un inhibiteur de BRAF et d'un inhibiteur de MEK (Vémurafénib + Cobimétinib ou Dabrafénib + Tramétinib). Ce combo permet de limiter ces résistances. En effet, le taux de réponse est augmenté avec une survie globale passant de 5 mois à 12 mois avec des effets secondaires moindres.

### **B.7.3 Comment émergent les résistances aux thérapies ciblées?**

On distingue deux types de résistances : les résistances acquises et les résistances intrinsèques. Les résistances acquises concernent les patients traitées par les inhibiteurs de BRAF, qui montrent une réponse initiale au traitement puis rechutent par mécanisme de résistance. Les résistances intrinsèques concernent les patients d'emblée non-répondeurs aux inhibiteurs de BRAF.

#### **Les résistances acquises**

La plupart des rechutes observées à la suite d'un traitement par thérapie ciblée sont dues à la réactivation de la voie des MAPK et/ou de la voie PI3K (Shi et al., 2012). Parmi les multiples mécanismes de résistance, on observe une augmentation d'expression des kinases CRAF et COT1, des mutations activatrices de NRAS, MEK1 ou AKT1, des épissages aberrants de BRAF, l'activation de la PI3K par la perte de PTEN et une activation constitutionnelle des RTKs. Une autre manière d'activer la voie PI3K a été identifiée, en activant le récepteur à l'insuline IGF-1R. Court-circuiter cette activation par un inhibiteur de la PI3K ou de l'IGF-1R en combinaison d'un inhibiteur de MEK pourrait venir à bout de cette résistance (Villanueva et al., 2010).

Concrètement, les cellules devenues résistantes à la thérapie ciblée présentent une transition métabolique vers la phosphorylation oxydative alors que les cellules cancéreuses sont davantage glycolytiques. L'inhibition de BRAF induit la biogenèse mitochondriale grâce à une augmentation de PGC1 $\alpha$  qui est régulé par MITF, rendant les cellules dépendantes des mitochondries pour leur survie (Zhang et al., 2016).

Suite au traitement au vémurafénib on note également des changements d'expression de plusieurs protéines telles que MITF, NGFR/CD271, AXL et des récepteurs EGFR et PDGFR.

Très récemment, le récepteur d'aryl hydrocarbène a été impliqué dans l'émergence de populations résistantes suggérant l'utilisation d'antagonistes de ce récepteur comme le resveratrol à utiliser en combinaison avec les inhibiteurs de BRAF (Corre et al., 2018). De plus, l'activation de la voie PI3K a été démontrée comme activant les enzymes U<sub>34</sub> (jouant un rôle dans la synthèse de protéines) ce qui promeut la glycolyse des cellules de mélanomes en augmentant la traduction de la protéine HIF1 $\alpha$  (Rapino et al., 2018). L'haploinsuffisance de l'histone déacétylase SIRT6 permet la survie des cellules de mélanomes traitées au vémurafénib. Cette perte partielle de SIRT6 permet l'expression d'IGFBP2 grâce à une accessibilité de la chromatine accrue. IGFBP2 permet l'activation de la voie IGF1R/PI3K/AKT. Cette étude démontre que la combinaison d'un inhibiteur du récepteur IGF-1R avec le vémurafénib entraîne la mort des cellules de mélanomes haploinsuffisantes pour SIRT6 in vitro et in vivo (Strub et al., 2018).

### **Les résistances intrinsèques**

Les différentes altérations à l'origine d'une absence de réponse aux inhibiteurs de BRAF sont la perte du suppresseur de tumeur PTEN, la surexpression d'HGF et MET, l'amplification de CCND1, l'inactivation de NF1 ou des mutations de MEK1.

Pour résumer, la détermination du statut PTEN a été montrée comme essentielle avant un traitement aux inhibiteurs puisque son absence est associée non seulement à l'inefficacité du vémurafénib mais aussi à une plus courte survie sans progression. Le facteur de croissance des hépatocytes (HGF) et son récepteur MET interviennent dans la résistance en rendant les cellules moins sensibles au vémurafénib. Les cellules du stroma sécrètent ce facteur agissant de façon paracrine sur les cellules tumorales. Ce phénomène démontre l'importance du microenvironnement tumoral dans les mécanismes de résistance. L'amplification de CCND1 retrouvée dans 17% des cas de mélanomes facilite la progression tumorale. Enfin, l'inactivation de NF1 et les mutations retrouvées dans MEK1 entraînent pas ou peu de réponse à la thérapie ciblée (Charles and Rehm, 2014).

### **L'hétérogénéité intra et inter-tumorale**

L'un des problèmes majeurs des thérapies citées ci-dessus et de celles évoquées par la suite sont l'hétérogénéité inter-tumorale évidemment, mais également intra-tumorale. De façon surprenante les inhibiteurs de BRAF utilisés en clinique augmentent la prolifération des cellules tumorales de génotype BRAF sauvage. En effet, ces dernières forment des homodimères CRAF-CRAF ou hétérodimères BRAF-CRAF capables d'activer les MAPK. Ce mécanisme de résistance favorise au sein d'une tumeur l'émergence de sous-clones BRAF sauvages insensibles au traitement par pression de sélection.

On peut également noter des gènes aux expressions oscillatoires suivant la progression tumorale comme le très connu MITF mais aussi AXL, ZEB1, GLI2, BRN2, CD271... Ces gènes ont des

expressions variables et sont souvent reconnus comme ayant un rôle dans la transition phénotypique des cellules de mélanome. En effet, les cellules de mélanome sont identifiées par un statut prolifératif ou invasif, chacun étant associé à des expressions spécifiques de gènes essentiels dans ces processus.

#### **B.7.4 L'immunothérapie**

Une meilleure connaissance de l'immunologie des tumeurs a conduit au développement des inhibiteurs de points de contrôle immunitaires qui ont révolutionné le traitement des mélanomes ces dernières années (Franklin et al., 2017). Ces travaux ont d'ailleurs permis l'obtention du prix Nobel de Médecine 2018 aux équipes de Allison et Honjo (Ishida et al., 1992; Leach et al., 1996).

Les lymphocytes T (LyT) jouent un rôle central dans les réponses anti-tumorales. Ils utilisent un récepteur, le TCR, pour reconnaître les antigènes tumoraux à la surface des cellules tumorales. Le TCR fonctionne de concert avec de nombreuses molécules capables de moduler son activité de manière positive (molécules dites de co-stimulation telles que CD28) ou de manière négative pour empêcher une activation excessive du système immunitaire (molécules dites co-inhibitrices telles que CTLA-4 et PD1).

Brièvement, CTLA-4 (Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4) exprimé après activation lymphocytaire va entrer en compétition avec CD28 pour se fixer sur les molécules de surface B7 situées sur les cellules présentatrices d'antigènes (CPA). L'affinité de CTLA-4 pour B7 est supérieure à celle de CD28 et empêche la fonction de co-stimulation de CD28.

En 2010, un anticorps anti-CTLA-4 a été développé et a obtenu l'AMM, l'ipilimumab qui prévient ce mécanisme restaurant l'activation des cellules T et la destruction des cellules tumorales. Cette thérapie est prescrite chez les patients BRAF sauvage et démontre pour la première fois une augmentation de la survie globale des patients (20% de réponse et une survie prolongée à 3 ans). Dorénavant, cette thérapie est également utilisée en première ligne pour les patients BRAF mutés. Malgré tout, une majorité des patients ne répondent pas à ce traitement.

De même, la liaison de PD-1 à son ligand PDL1 régule négativement l'activité de la voie de signalisation CD28 et TCR entraînant une diminution des fonctions T effectrices. En 2012, des anticorps développés contre le récepteur PD1, le nivolumab et le pembrolizumab, annulent cet effet et potentialisent les effets anti-tumoraux du système immunitaire. Ces traitements présentent un taux de réponse de 43% avec une survie supérieure à 2 ans. Cette immunothérapie est prescrite en première ligne chez les patients BRAF sauvage ou après un échec par traitement à l'ipilimumab ou aux thérapies ciblées. A noter qu'il existe également des anticorps anti-PDL1 (Avelumab et Atezolizumab) qui ont reçu une AMM pour les carcinomes à cellules de Merkel et une autorisation temporaire d'utilisation (ATU) pour d'autres types de cancers.

Des études récentes sur les traitements combinés entre le nivolumab et l'ipilimumab démontrent une plus forte efficacité avec un taux de réponse objective de 59% versus 11% en monothérapie ipilimumab (Postow et al., 2015).

Pour terminer, l'ensemble de ces thérapies (thérapies ciblées et immunothérapies) sont envisagées en thérapies néo-adjuvantes et/ou thérapies adjuvantes. Le premier cas signifiant une thérapie administrée avant le traitement principal (en général l'exérèse de la tumeur), une thérapie adjuvante est quant à elle administrée après le premier traitement. Pour le moment, très peu de résultats sont disponibles quant aux thérapies néo-adjuvantes mais elles semblent avoir un effet bénéfique. Quant aux thérapies adjuvantes elles sont couramment utilisées pour traiter les mélanomes métastatiques comme expliqué dans cette partie. Cependant, l'avenir de ces traitements serait peut-être de combiner les thérapies néo-adjuvantes et adjuvantes (Robert, 2018).

### **B.7.5 Comment émergent les résistances aux immunothérapies?**

La première raison qui expliquerait une résistance aux immunothérapies est l'absence d'antigènes tumoraux (Gubin et al., 2014), ou le développement de mécanismes évitant la présentation de ces antigènes sur les MHC par les cellules tumorales. La deuxième possibilité est l'exclusion tumorale rendant l'infiltrat lymphocytaire incapable d'atteindre la tumeur et enfin une troisième possibilité peut être l'existence de systèmes d'inhibition des lymphocytes T bien que les tumeurs soient infiltrées. Des mutations touchant principalement la voie de l'INF (mutation JAK1/JAK2 et B2M) ont été retrouvées et rendent les cellules tumorales insensibles aux IFN- $\gamma$ . L'activation oncogénique de la voie MAPK entraîne la production de VEGF et d'IL-8 qui ont des effets inhibiteurs sur le recrutement et la fonction des cellules T. L'activation de la voie PI3K semble également problématique pour l'activation de la réponse immunitaire. La délétion de PTEN empêchant fortement l'expression de l'IFN- $\gamma$ , du granzyme B et l'infiltration des CD8<sup>+</sup> dans la tumeur. C'est pourquoi les patients porteurs d'une délétion PTEN ne sont pas susceptibles de recevoir une thérapie de transfert de cellules T (décrite dans la partie suivante) (Sharma et al., 2017).

### **B.7.6 Thérapies émergentes**

Ayant reçu une AMM en 2015, la thérapie par virus oncolytique semble être une nouvelle opportunité pour les patients atteints de mélanome métastatique. Talimogene laherparepvec (T-VEC), est un herpès simplex virus de type 1 modifié. Il est directement injecté dans un nodule métastatique et même s'il pénètre à la fois les cellules saines et tumorales, il ne se réplique que dans les cellules de mélanome. Ceci entraîne la lyse des cellules tumorales avec relargage d'antigènes spécifiques à la tumeur reconnus par les CPA et activant les réponses T. Le taux de réponse objective est d'environ 28% (Domingues et al., 2018). Des études cliniques sont toujours en cours pour savoir si cette thérapie

apporte un bénéfice cumulé avec les thérapies conventionnelles, avec les thérapies ciblées ou avec les immunothérapies.

Une approche encore en cours d'étude est prometteuse, il s'agit du transfert adoptif de cellules T. Très chronophage, il s'agit de récolter des lymphocytes T de patients et de les rendre spécifiques à des antigènes du mélanome du patient. La stratégie la plus efficace semblant être de produire des lymphocytes T mémoires plutôt qu'effecteurs car ils améliorent la fonction anti-tumorale. Enfin, une des dernières approches thérapeutiques est un transfert adoptif de cellules T avec un récepteur chimérique d'antigènes (CAR). Les CARs sont constitués d'un domaine extracellulaire qui est un anticorps à fragment variable reconnaissant un lipide, une protéine ou un carbohydrate, d'un domaine transmembranaire et d'un domaine intracellulaire stimulant la cellule T pour détruire la cellule tumorale. Des plasmides ou des rétrovirus permettent de générer ces cellules CAR-T dans lesquelles il faut placer un CAR contre un antigène ayant le maximum d'effet contre les cellules tumorales. Il existe encore peu d'études dans le mélanome mais les antigènes proposés sont le ganglioside GD2, VEGFR2, c-MET, CD70 qui sont tous en phase 1 d'étude clinique (Simon and Uslu, 2018).

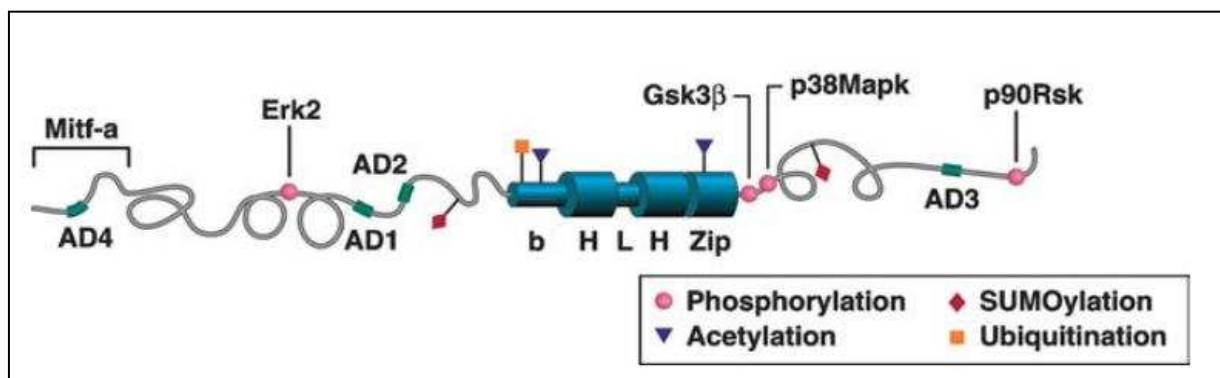
Pour finir, des études cliniques en phase 3 sont en cours sur l'utilisation du combo vémurafénib et tramétinib en combinaison avec le pembrolizumab (anti-PD1) ou avec l'atezolizumab (anti-PDL1) (Ascierto et al., 2018). Les résultats semblent prometteurs sans toxicité supplémentaire par rapport aux traitements seuls. Le taux de réponse est de 67% (cohorte de 15 patients) avec une médiane de survie de 20 mois environ sans progression tumorale.

## Chapitre 2. MITF : un facteur de transcription pour le meilleur et pour le pire

### A. GÉNÉRALITÉS SUR LA FAMILLE DES FACTEURS DE TRANSCRIPTION MIT/TFE

Le locus microphthalmia a été identifié en 1942 (Hertwig et al. 1942), son nom provient du fait que les souris avec des mutations dans ce locus présentent de petits yeux, des défauts de pigmentation, de la surdité et des défauts de développement dans les mastocytes et ostéoclastes. 50 ans plus tard le gène qui correspond à ce locus a été cloné (Hodgkinson et al., 1993; Tachibana et al., 1994) et son produit, appelé MITF (MICrophthalmia associated Transcription Factor), identifié comme un facteur de transcription à motif hélice-boucle-hélice-glissière à leucine (ou bHLH-LZ) qui fonctionne en dimère. La glissière à leucine confère la stabilité et la spécificité des dimères de la famille MiT/TFE. MITF est un membre de la famille MiT/TFE qui est très conservé chez toutes les espèces de vertébrés. 11 isoformes ont été décrits dans la littérature chez l'homme, ces derniers sont dus à des promoteurs alternatifs et dans la majorité des cas la séquence codante est partagée (de l'exon 2 à 9) seul le N-terminus de la protéine diffère (Levy et al., 2006). MITF-M est l'isoforme majoritairement exprimé dans les mélanocytes, son premier exon est unique en comparaison aux autres isoformes et autres membres de la famille MiT/TFE dû à l'absence de l'exon 1b (Fuse et al., 1999). MITF est très bien conservé dans l'évolution de l'homme au poisson-zèbre et les mutations sur ce locus entraînent des défauts pigmentaires chez l'homme, les souris, les rats, les poissons-zèbres et d'autres espèces.

MITF possède quatre domaines de transactivation. AD1 possédant une région très conservée dans les différents membres de la famille TFE responsable de l'interaction avec CBP/p300. AD2 qui est important pour l'activité de MITF dans les ostéoclastes (Takeda et al., 2000b), AD3 semble avoir un faible pouvoir transactivateur et AD4 se retrouve uniquement dans l'exon 1a de l'isoforme MITF-A (Cf. Figure 8).



**Figure 8 : Représentation schématique de la protéine MITF**

MITF est un facteur de transcription à motif hélice-boucle-hélice. Les différents domaines fonctionnels ont été caractérisés et sont représentés sur ce schéma de l'isoforme MITF-A avec



certaines modifications post-traductionnelles. Certaines protéines interagissant avec MITF sont également représentées. Adapté de (Steingrimsdottir et al., 1994).

Les facteurs de transcription à motif hélice-boucle-hélice se lient à des motifs particuliers dits E-box (5'-CANNTG-3') présents dans les gènes cibles de ces facteurs de transcription. La première hélice a été démontrée comme essentielle pour la liaison à l'ADN tandis que la deuxième joue son rôle au niveau de la dimérisation de la protéine (Ferre-D'Amare et al., 1994). La spécificité de liaison de ces facteurs de transcription réside dans la séquence centrale de la boîte E et dans les nucléotides flanquants cette séquence. MITF se lie à l'ADN sous forme de dimères qui peuvent être des hétérodimères ou des homodimères. En effet, les membres de la famille TFE comme le facteur de transcription EB (TFEB), TFE3, TFEC peuvent dimériser avec MITF. Cette caractéristique permet une variété d'opportunités de régulation de gènes cibles. Il est à noter que la spécificité des cibles peut être également modulée par la formation d'homodimères qui se révèlent être des hétérodimères car des modifications post-traductionnelles différentes peuvent se produire sur chaque monomère.

Certaines modifications post-traductionnelles sont très conservées entre les membres de cette famille. Par exemple, la SUMOylation et la phosphorylation apparaissent toutes deux sur des résidus homologues de plusieurs membres de cette famille. En effet, le résidu S211 dans la protéine TFEB (qui peut être phosphorylé) est conservé dans chaque membre de la famille MIT/TFE (Puertollano et al., 2018). Dans la suite de ce chapitre, lorsque je mentionnerai MITF cela correspondra à l'isoforme MITF-M sauf indication contraire.

## **B. HOMÉOSTASIE DES MÉLANOCYTES**

### *Comment MITF régule l'homéostasie des mélanocytes ?*

L'implication de ce facteur de transcription décrit comme le « master gene » de la pigmentation a pu être mise en évidence grâce à différentes approches de perte de fonction. Chez la souris, à un stade embryonnaire l'inactivation de MITF va entraîner la naissance d'une souris totalement blanche ainsi qu'une dépigmentation des yeux, une microphthalmie et une surdité. Ce phénotype étant dû à l'absence totale de mélanocytes dans ces souris.

Chez l'homme, des mutations hétérozygotes de MITF entraînent le syndrome de Waardenburg de type IIA dont la transmission est autosomique dominante, caractérisé par une hypopigmentation hétérogène de la peau, des cheveux, une hétérochromie et une surdité (Read and Newton, 1997). Ces mutations sont pour la plupart non-sens induisant une protéine tronquée ou causant des modifications d'épissage de MITF résultant en des protéines non fonctionnelles dans tous les cas. Chez l'homme on ne retrouve que des mutations hétérozygotes de MITF probablement car l'inactivation totale de ce gène est létale. Le piébaldisme caractérisé par une achromie triangulaire (souvent associé à une mèche de cheveux

blancs frontale) est un trouble autosomique dominant dû à des mutations du gène c-Kit (plus de 60 mutations reportées). Le stem-cell factor stimule la voie du récepteur tyrosine kinase KIT qui régule MITF d'où les défauts pigmentaires observés chez ces patients (Fleischman et al., 1991; Kasamatsu et al., 2008; Tachibana, 1999).

#### ***En régulant des gènes cibles essentiels au niveau embryonnaire...***

Les sites de liaison de MITF sur les promoteurs des gènes impliqués dans la pigmentation sont définis par une séquence plus large que le motif E-box, appelée M-box (5'-AGTCATGTGCT-3') (Lowings et al., 1992). L'isoforme MITF-M va spécifiquement activer des gènes essentiels à la différenciation du mélanocyte, DCT, TYR, TRP1 tout en inhibant des gènes exprimés dans les CCN comme les facteurs SOX9 (SRY-related high mobility group box 9), SNAIL2 et FOXD3 (forkhead-box transcription factor D3) (Adameyko et al., 2012; Goding, 2000; Mort et al., 2015). L'expression ectopique de MITF-M dans des CCN chez le poisson-zèbre est suffisante à établir un destin mélanocytaire (Lister et al., 1999). Le gène SLUG est régulé par MITF et est essentielle pour une migration efficace des CCN afin d'éviter tout défaut pigmentaire. En effet, certains patients possédant des mutations de SLUG présentent un syndrome de Waardenburg de type 2.

#### **En régulant des gènes cibles essentiels à la synthèse de mélanine...**

Concernant les gènes directement impliqués dans la synthèse de pigments, MITF est capable d'induire l'expression de MC1R, MLANA, PMEL17, RAB27A, MYOVI. MLANA permet la maturation des mélanosomes et la biosynthèse des mélanines, Pmel17 compose les fibres permettant d'accumuler la mélanine, Rab27a et Myosine Va servent à ancrer le mélanosome à l'actine sous corticale et par conséquent, aident à l'acheminement des mélanosomes à l'extrémité des dendrites.

#### **En régulant des gènes cibles essentiels à la survie des mélanocytes...**

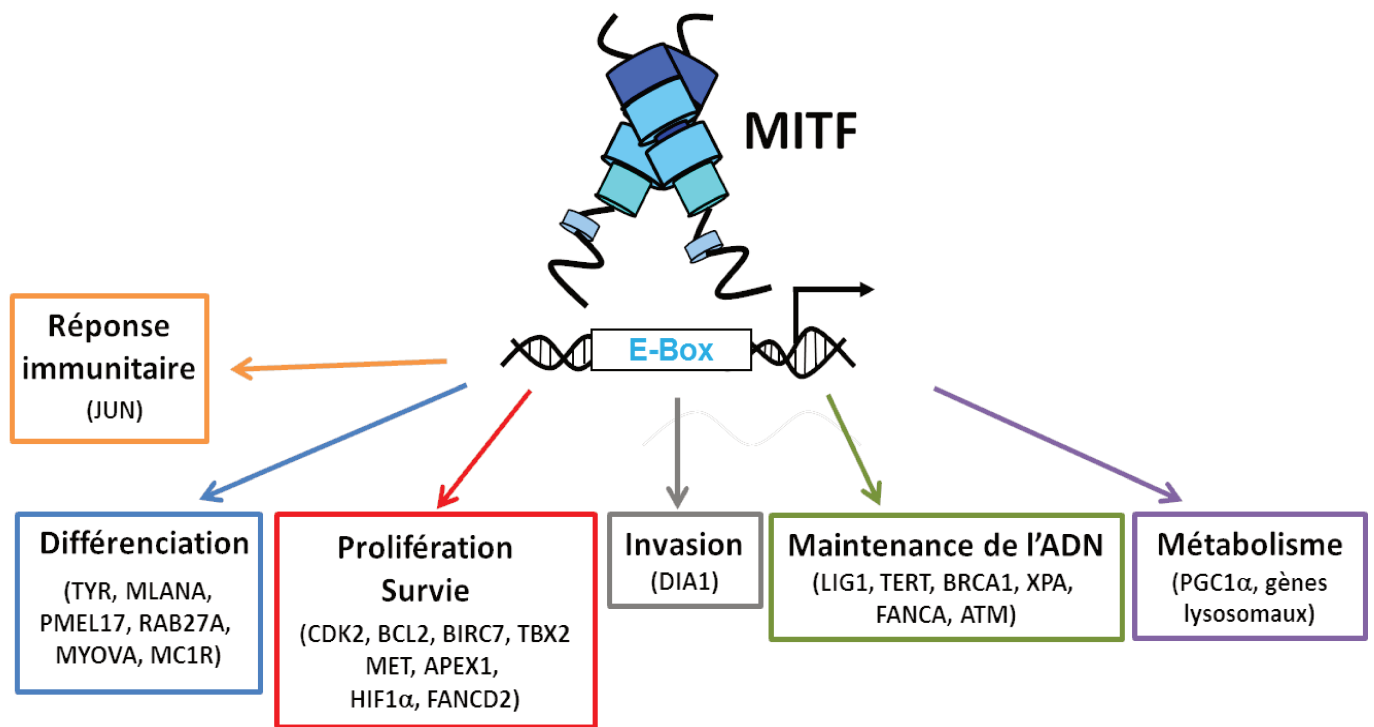
L'absence de mélanocytes dans les souris déficientes pour MITF suggère un rôle de MITF dans les processus de prolifération et de survie. En effet, MITF régule les gènes suivants :

- BCL2 qui est un facteur anti-apoptotique, des mutations dans ce gène chez la souris induisent la mort par apoptose des mélanoblastes contenus dans les follicules pileux.
- CDK2 (cyclin-dependent kinase 2), le promoteur de ce gène chevauche les régions régulatrices de PMEL17 qui est aussi régulé par MITF jouant un rôle dans la mélanogenèse comme mentionné précédemment (Du et al., 2004).
- BIRC7 un autre facteur anti-apoptotique, MET qui est un RTK, APEX1 et HIF1 $\alpha$  qui protègent la cellule des stimuli pro-apoptotiques (Cheli et al., 2010).
- FANCD2 agit en aval de MITF. FANCD2 joue un rôle dans la prolifération et la survie des cellules de mélanomes (Bourseguin et al., 2016).

- MITF active TBX2 qui réprime CDKN2A et joue donc un rôle dans le maintien de la prolifération et la suppression de la sénescence dans le mélanome (Vance et al., 2005).

**En régulant des gènes cibles essentiels à la maintenance de l'ADN...**

MITF régule le gène *LIG1* impliqué dans la réplication de l'ADN mais aussi des gènes impliqués dans la maintenance et la réparation du génome tels que *TERT*, *BRCA1*, *XPA*, *FANCA*, *ATM* (Beuret et al., 2011; Strub et al., 2011; Xia et al., 2017).



**Figure 9 : Représentation des gènes cibles de MITF**

MITF régule ses gènes cibles en se fixant à des motifs spécifiques nommés « E-box ». MITF régule des gènes impliqués dans des processus biologiques très importants pour les mélanocytes comme la différenciation, la prolifération, la survie, la réponse immunitaire, la maintenance de l'ADN, l'invasion et le métabolisme. Ces deux derniers processus seront discutés plus tard dans ce chapitre.

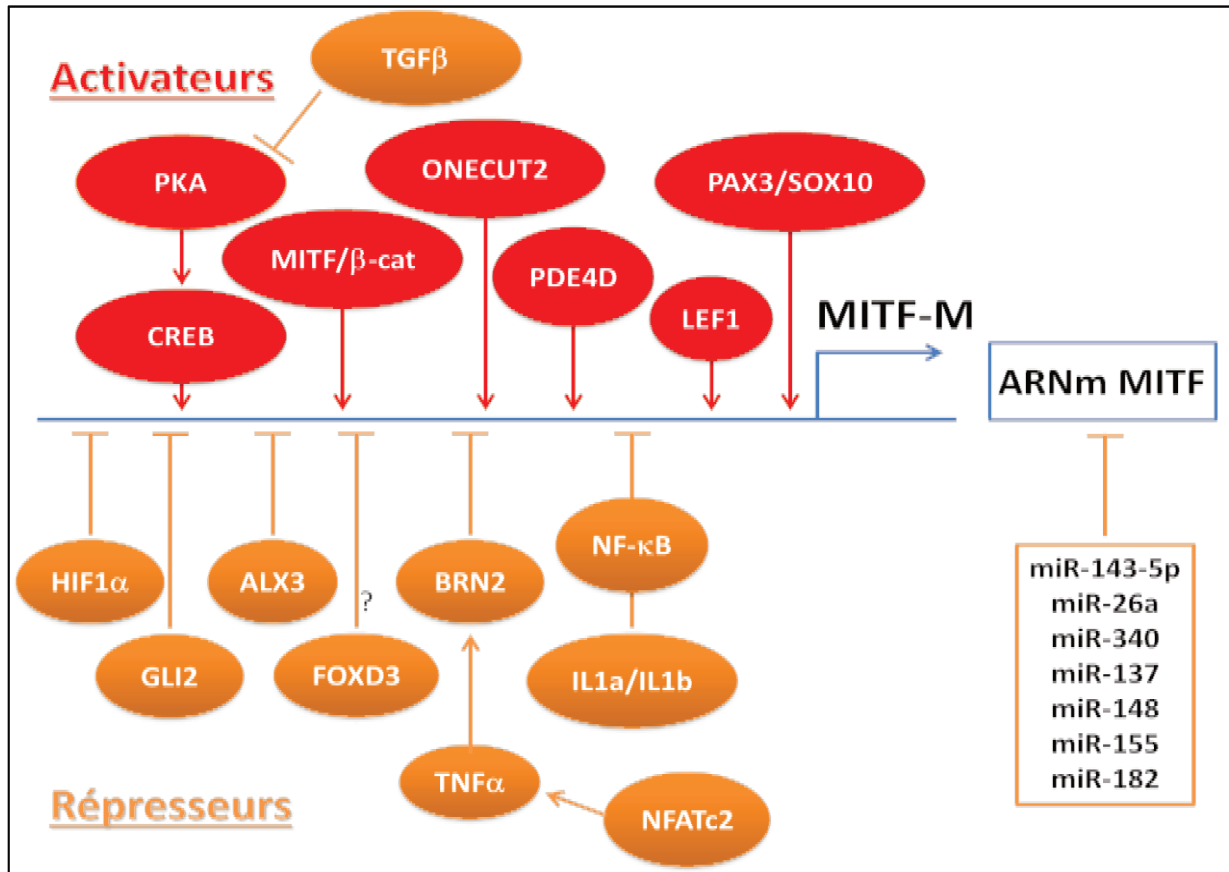
**En régulant des gènes cibles essentiels aux réponses immunitaires...**

MITF est capable de réprimer c-Jun en se fixant à la région régulatrice du gène *JUN*. En effet, l'inhibition de MITF augmente l'expression de c-Jun potentialisant l'expression de cytokines inflammatoires telles que le  $TNF-\alpha$ . Ce phénotype  $MITF^{low}/c-Jun^{high}$  permet le recrutement des cellules immunitaires dans le microenvironnement tumoral impliquant donc MITF dans les réponses immunitaires au sein d'un mélanome (Riesenberg et al., 2015).

Pour résumer MITF possède un rôle central dans les mélanocytes puisqu'il est à la fois nécessaire pour leur établissement et leur maintien et ce en régulant un panel très varié de gènes ayant des rôles différents dans la cellule (Cf. Figure 9).

## C. RÉGULATIONS TRANSCRIPTIONNELLES ET POST-TRADUCTIONNELLES

### C.1 Régulations transcriptionnelles de MITF



**Figure 10** : Représentation schématique du promoteur de MITF

Les premiers 2kb en amont du site d'initiation de la transcription de MITF sont représentés ici avec les différents sites de liaison des acteurs régulant la transcription de MITF qu'ils soient activateurs ou répresseurs. Adapté de (Hartman and Czyz, 2015).

#### Régulateurs positifs de MITF

##### PAX3 et SOX10

Les mutations dans les gènes PAX3 et SOX10 entraînent des syndromes de Waardenburg de types I, III et IV (le type II étant causé par des mutations au locus MITF). Ces deux gènes sont exprimés dans les CCN au cours du développement embryonnaire et bien avant que MITF ne soit exprimé ce qui a permis de formuler l'hypothèse que PAX3 et SOX10 pourraient réguler MITF.

SOX10 est un facteur de transcription avec un domaine de liaison à l'ADN homologue au domaine HMG (High Mobility Group) du gène SRY. PAX3 est un facteur de transcription à domaine « paired-box » jouant un rôle dans la différenciation des CCN. Il a été démontré que PAX3 et SOX10 régulent

MITF en se fixant à des séquences dans son promoteur, de plus PAX3 est capable de réguler négativement MITF via l'action de POU3F2/BRN2 dans les mélanomes (Watanabe et al., 1998).

### **$\alpha$ -MSH/MC1R/CREB**

L' $\alpha$ -MSH se lie à son récepteur MC1R, ceci entraîne l'activation de l'adénylate cyclase et résulte en une augmentation d'AMP cyclique ce qui stimule la phosphorylation de la protéine liant l'élément de réponse à l'AMPc (CREB) par la PKA. Cette protéine peut se lier à des éléments de réponses à l'AMPc (CRE), c'est ainsi que P-CREB va se fixer sur le promoteur de MITF et réguler sa transcription. Il a été montré que cette régulation nécessite la coopération de SOX10 qui doit se lier 100pb en amont de CREB (Huber et al., 2003).

### **La voie Wnt/ $\beta$ -caténine**

Lorsque la voie Wnt est activée, la protéine  $\beta$ -caténine s'accumule en intracellulaire et pourra ensuite activer ses gènes cibles grâce à sa liaison avec un membre de la famille des facteurs de transcription LEF-1/TCF (Lymphoid Enhancer Factor/ T Cell Factor) possédant un domaine HMG. L'ajout exogène de Wnt-3a induit l'expression de MITF-M dans des mélanocytes (Takeda et al., 2000b). De plus, le site de liaison de LEF1 à MITF a été identifié et démontre une liaison du tandem  $\beta$ -caténine/LEF-1 activant la transcription de MITF. De façon intéressante, on a également pu observer une boucle de rétrocontrôle positif via un complexe MITF/ $\beta$ -caténine qui peut se fixer sur le promoteur MITF et stimuler sa transcription.

### **ONECUT2**

Onecut-2 appartient aux facteurs de transcription ONECUT qui possèdent un homéodomaine. Il est exprimé dans les mélanocytes et semble essentiel à leur homéostasie mais aucune mutation spontanée de ce gène n'a été retrouvée à ce jour. Néanmoins, son inactivation entraîne des défauts du développement de la rétine chez la souris (Goetz et al., 2014). Onecut-2 régule MITF en se fixant à son promoteur (Jacquemin et al., 2001).

### **Régulateurs négatifs de MITF**

#### **FOXD3**

Les CCN expriment FOXD3 bien avant d'exprimer MITF et de se différencier en mélanocytes. FOXD3 a été montré comme réprimant l'expression de MITF dans le développement embryonnaire des poissons-zèbres, des poulets et dans des B16-F10 qui sont des cellules murines de mélanomes (Curran et al., 2009; Thomas and Erickson, 2009). Cependant, le mécanisme de répression de FOXD3 sur MITF reste méconnu.

## **POU3F2 ou BRN2**

Le facteur de transcription BRN2 possède un domaine POU qui lui permet de se lier au promoteur de MITF et d'entraîner sa répression. BRN2 est régulé par la  $\beta$ -caténine et par BRAF (Goodall et al., 2004a; Goodall et al., 2004b). BRN2 a également été montré comme un régulateur positif de MITF mais uniquement dans le contexte de la mutation oncogénique BRAF (Goodall et al., 2008). BRN2 et MITF sont co-exprimés dans les cellules de mélanome mais leur expression est inversement corrélée. Ceci est permis grâce à une régulation très fine médiée par le microRNA miR-211 dont la transcription est induite par MITF et qui réprime celle de Brn2 (Boyle et al., 2011).

### **La voie TGF $\beta$**

Le transforming growth factor  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) réprime l'expression de MITF et semble maintenir les mélanocytes dans un état souche et quiescent. Le TGF- $\beta$  réprime l'activité de la PKA ce qui réduit la phosphorylation de CREB dont dépend l'expression de MITF. D'un autre côté, une des cibles de la voie TGF- $\beta$ /SMAD est GLI2 un facteur de transcription Kruppel-like qui agit dans la voie de signalisation Hedgehog. Un site de fixation de GLI2 a été identifié sur la région promotrice de MITF et ce facteur a été démontré comme inhibant également l'expression de MITF (Pierrat et al., 2012).

### **La voie TNF $\alpha$**

Des approches perte de fonction ont permis de prouver que le nuclear factor of activated T cells 2 (NFATC2) est un facteur essentiel dans la dé-différenciation des mélanomes. Cette étude a également prouvé un lien entre le tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ) lié à la membrane et NFATC2. En effet, NFATC2 contrôle la dé-différenciation en induisant du TNF- $\alpha$  lié à la membrane, ce dernier régule l'axe c-myc/BRN2 permettant la régulation de MITF par extension. Il a été montré que les cellules exprimant fortement NFATC2 mais faiblement MITF étaient moins immunogènes, impliquant MITF dans les mécanismes d'échappement du système immunitaire (Perotti et al., 2016).

### **L'hypoxie**

Dans des conditions hypoxiques, il a été observé une activation de DEC1 par le facteur inductible par l'hypoxie (HIF1 $\alpha$ ) qui a pour conséquence de réprimer MITF. Ce mécanisme pourrait contribuer à la variabilité intra-tumorale entre des zones hypoxiques avec une faible expression de MITF intracellulaire et les zones oxygénées avec une plus forte expression de MITF (Cheli et al., 2012).

### **Autres**

Dans une espèce africaine de souris *Rhabdomys pumilio* qui possède des motifs à rayures, il a été montré que la génération des bandes claires étaient dues à une répression de MITF par le facteur de

transcription aristaless-like homeobox 3 (ALX3). Les auteurs de cette étude pensent que ce mécanisme est sûrement étendu à d'autres mammifères mais cette hypothèse reste à prouver (Mallarino et al., 2016).

Ci-après quelques mécanismes encore méconnus seront résumés.

Un mécanisme de répression intéressant a été reporté dans des cellules de mélanomes exprimant l'interleukin-1-receptor (IL-1R). La stimulation des cellules de mélanomes avec de l'IL-1a ou IL-1b entraîne une réduction de l'expression de MITF et ce processus pourrait nécessiter l'action de la voie NF- $\kappa$ B (Kholmanskikh et al., 2010). En accord avec ce papier, un rôle répresseur de la voie NF- $\kappa$ B sur l'expression de MITF a également été rapporté (Konieczkowski et al., 2014).

Une corrélation inverse a été observée entre les gains du nombre de copies chromosomiques liées à MYC en 8q24 et l'expression de MITF (Pouryazdanparast et al., 2012).

Une corrélation positive entre les expressions de PDE4D et MITF a été observée, l'expression de PDE4D est augmentée dans le mélanome en comparaison aux naevi, enfin lorsque PDE4D est inhibé dans des cellules de mélanomes cela diminue fortement le niveau d'ARNm de MITF. PDE4D semble donc réguler MITF mais on ne sait pas si ce mécanisme est direct (Lin et al., 2013).

Ces dernières années la découverte des ARN non-codants a permis de révéler des mécanismes de régulations méconnus jusqu'alors et le rôle prépondérant de micro acteurs comme les miRNA mais aussi de plus gros comme les long non-coding RNA (lncRNA). Ci-après je vais tenter de résumer les ARN non-codants les plus connus dans la régulation de MITF, cette liste étant non-exhaustive mais permettant de comprendre que la régulation de MITF est un sujet vaste dont tous les aspects n'ont pas encore été découverts.

**miR-211** est induit par MITF et aurait un rôle suppresseur de tumeur. Il a très récemment été démontré que cet axe est aussi un inducteur d'autophagie dans des conditions de stress (Ozturk et al., 2018). En effet, miR-211 inhibe RICTOR ce qui permet la translocation de MITF dans le noyau pour transcrire ses gènes cibles reliés à l'autophagie. De plus, comme expliqué ci-dessus, le miR-211 inhibe BRN2, cette boucle permettant une régulation très fine des niveaux d'expression de MITF et BRN2 (Boyle et al., 2011). A noter que les **miR-204** et **miR-211** sont les deux miRNA les plus induits par un traitement au vémurafenib. Bien que de la même famille de miRNA, ils possèdent deux rôles distincts. Le premier miRNA est sous le contrôle de STAT3 et cible AP1S2 ce qui inhibe la migration. Le deuxième miRNA cible EDEM1 et empêche la dégradation de la tyrosinase par la voie de signalisation ERAD (ER-associated degradation), ce qui lui confère un rôle dans la pigmentation observée sous vémurafenib (Vitiello et al., 2017).

La surexpression du **miR-143-5p** diminue l'expression de la TGF $\beta$ activated kinase (TAK1) ce qui augmente la prolifération et la migration des mélanocytes tout en diminuant MITF (Ji et al., 2018).

Le **miR-26a** se fixe en 3'-UTR de MITF et inhibe donc son expression, dans des cellules de mélanome cela permet une inhibition de prolifération, un arrêt en G0/G1 et une réduction de l'invasion in vitro et in vivo (Qian et al., 2017).

Le **miR-340** inhibe la différenciation des ostéoclastes en inhibant MITF (Zhao et al., 2017).

Il a été démontré que les hommes atteints de mélanome ont moins de chances de survie que les femmes. Ceci semble lié à la présence du récepteur aux androgènes dans les tumeurs, qui augmenterait la migration des cellules de mélanome en modulant l'axe MITF-AXL. Cet axe altèrerait la signalisation **miRNA-539-3-p/USP13** ce qui augmente la dégradation de MITF en inhibant la déubiquitineuse USP13. En restaurant l'expression de MITF les auteurs ont pu inverser le phénotype migratoire de ces cellules (Wang et al., 2017).

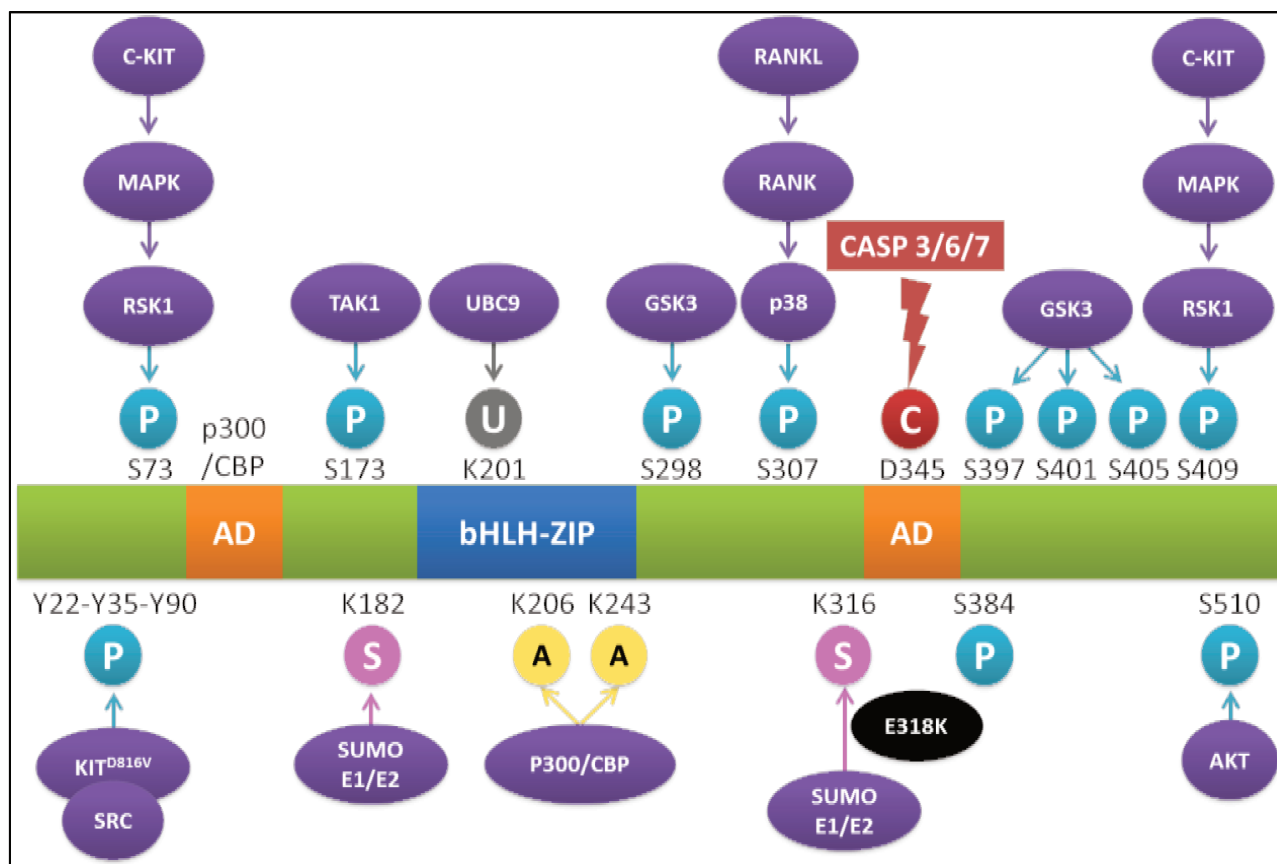
Enfin les **miR-137**, **miR-148**, **miR-155** et **miR-182** inhibent l'expression de MITF (Arts et al., 2015; Bemis et al., 2008; Hafliadottir et al., 2010; Segura et al., 2009).

Ces dernières années les recherches se sont concentrées sur ces micro ARN d'où cette multitude d'études répertoriées ci-dessus mais ce panel pourra sûrement être étoffé dans les années à venir de nouveaux régulateurs parmi les lncRNA, les ARNsn et autres... A noter la très récente étude du lncRNA SAMMSON, qui est co-amplifié avec MITF dans les mélanomes, se situant également sur le chromosome 3p, 30kb après la séquence de MITF. Ce lncRNA n'est pas retrouvé dans les mélanocytes et dans les phases précédant la phase verticale de croissance des mélanomes. De plus, on ne retrouve pas de différence de son niveau d'expression dans les cellules MITF<sup>high</sup> et MITF<sup>low</sup>. Les cellules de mélanomes sont dépendantes de ce lncRNA indépendamment du statut mutationnel. Il constitue donc une nouvelle vulnérabilité à exploiter pour des approches thérapeutiques (Leucci et al., 2016).

## C.2 Régulations post-traductionnelles de MITF

MITF est également soumis à de nombreuses régulations post-traductionnelles qui permettent de réguler très finement son expression pour permettre une multitude de signaux intracellulaires allant de la différenciation des mélanocytes à la tumorigenèse (Cf. Figure 11).





**Figure 11 : Représentation schématique des modifications post-traductionnelles retrouvées sur la protéine MITF**

Modifications post-traductionnelles incluant les phosphorylations (P), les sumoylations (S), les ubiquitinations (U) et probables acétylations (A) ainsi que la mutation E318K. Adapté de (Wellbrock and Arozarena, 2015).

### Phosphorylations

Le RTK c-Kit possède un rôle important dans le développement des mélanocytes tout comme MITF. C-KIT active la MAPK et la ribosomale S kinase 1 (RSK1) qui vont phosphoryler MITF sur sa sérine 73 et sa sérine 409 respectivement (Hemesath et al., 1998; Wu et al., 2000). Ces phosphorylations favorisent l'ubiquitination et la dégradation au protéasome de MITF. À noter que la phosphorylation sur la sérine 73 de MITF est requise pour l'interaction de MITF avec p300/CBP *in vitro*. Des expériences de mutagenèse sur ces deux sérines ont un effet mineur sur la pigmentation dans des souris (Bauer et al., 2009; Debbache et al., 2012), néanmoins, cela permettrait de stabiliser la protéine, d'éviter l'ubiquitination par UBC9 sur la lysine 201 et l'envoi au protéasome. La phosphorylation sur la sérine 409, qui faciliterait l'activité transcriptionnelle de MITF, a été rapportée comme interférant avec la liaison de la E3 SUMO-protéine ligase PIAS3 sur le domaine leucine-zipper de MITF (Levy et al., 2003).

Le rôle de la voie MAPK dans la modulation de l'expression de MITF a été clairement démontré dans le cadre du mélanome. Dans des mélanocytes primaires humains, l'activation de la voie MAPK par

ajout de BRAF<sup>V600E</sup> exogène réprime l'expression de MITF. De plus, les inhibiteurs de BRAF et MEK augmentent l'expression de MITF et ses cibles dans des lignées de mélanomes. Ces données suggèrent une régulation de MITF au niveau de la stabilité de la protéine (via une dégradation dépendante de l'ubiquitination) ainsi qu'à un niveau transcriptionnel.

L'AMPc est capable d'inhiber la voie PI3K/AKT ce qui active la kinase GSK3. MITF est phosphorylé par la glycogène synthase kinase 3 (GSK3) sur plusieurs résidus, dont le premier identifié était le S298. L'effet de cette phosphorylation reste méconnu car deux études se contredisent l'une démontrant une transactivation de la tyrosinase et l'autre ne montrant aucun effet (Grill et al., 2013; Takeda et al., 2000a). Récemment, des phosphorylations au niveau du C-terminus ont été identifiées et semblent altérer la stabilité de la protéine MITF (Ploper et al., 2015). Les résidus phosphorylés en C-term sont S397, S401 et S405, et ne sont possibles qu'après la phosphorylation sur la sérine 409 par la RSK1 qui serait un élément déclencheur de ces autres phosphorylations.

Indépendamment de la kinase GSK3, des essais kinases in vitro et in vivo ont démontré que AKT pouvait phosphoryler MITF sur sa S510 ce qui conduit à la dégradation de MITF par le protéasome. Cette phosphorylation entraîne une augmentation d'affinité entre MITF et p53 qui forment un complexe régulant l'expression de CDKN1A, la phosphorylation S510 augmente de façon transitoire son expression (Wang et al., 2016).

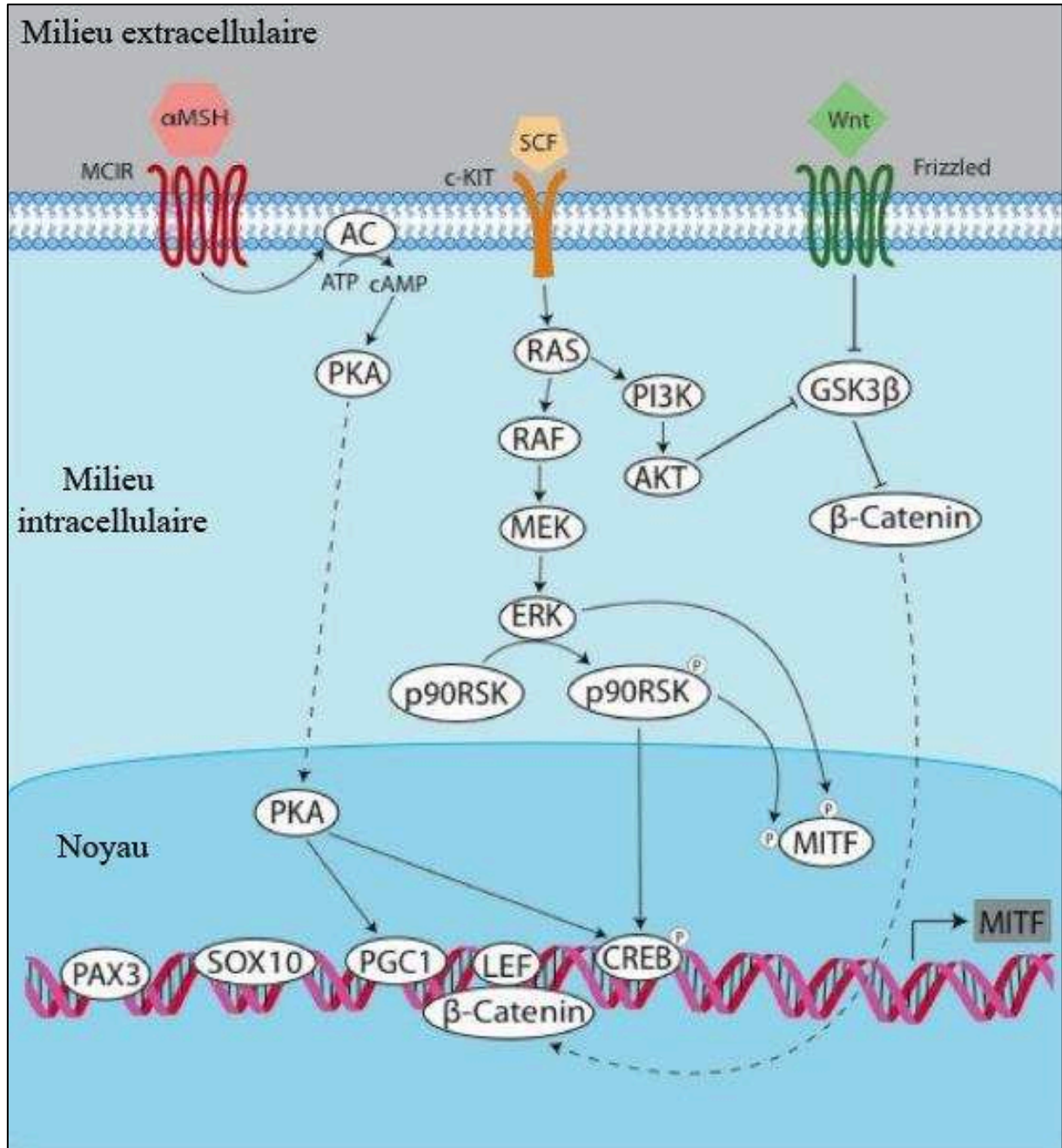
Dans le cadre de la mutation oncogénique KIT<sup>D816V</sup>, un complexe se forme entre les kinases KIT, SRC et le facteur de transcription MITF ce qui entraînera sa phosphorylation et changera complètement le profil transcriptionnel de ces cellules. Les phosphorylations sont retrouvées sur les tyrosines Y22, Y35 et Y90 et entraînent une activation des voies de signalisation en faveur de la prolifération, de la suppression de la sénescence, de la survie et de l'invasion. En prévenant cette phosphorylation par inhibition du complexe, les cellules de mélanomes deviennent sensibles aux inhibiteurs de SRC (Phung et al., 2017).

#### Phosphorylations spécifiques aux ostéoclastes

Des événements de phosphorylations se produisant dans les ostéoclastes et leurs précurseurs restent à démontrer dans les cellules de la lignée mélanocytaire. La Cdc25c-associated protein kinase (C-TAK1) peut phosphoryler MITF sur sa sérine 173 promouvant sa séquestration dans le cytoplasme en complexe avec les protéines 14-3-3 (Bronisz et al., 2006). Ceci empêche MITF d'aller réguler des gènes essentiels à la différenciation des ostéoclastes.

L'oncogène fused in sarcoma (FUS) a été identifié comme un co-facteur partenaire de MITF. Sa liaison à MITF est dépendante de la phosphorylation Ser-307 par la p38 MAPK en réponse à RANKL (Receptor Activator of NF-KB Ligand). FUS est également capable d'augmenter la liaison de BRG1 avec MITF permettant un remodelage de la chromatine et la régulation de gènes cibles importants

pour le lignage des ostéoclastes (Bronisz et al., 2014). Dans des cellules de mélanomes il a également été démontré la formation de complexes entre MITF-BRG1 (Keenen et al., 2010), que je décris dans un prochain sous-chapitre « remodelage de la chromatine par MITF ». Ce complexe est également requis pour l'activation de gènes mélanocytaires (de la Serna et al., 2006).



**Figure 12 :** Représentation schématique des voies de signalisation induisant des phosphorylations régulant l'expression de MITF

La régulation de MITF est complexe avec de multiples régulateurs en amont impliquant de multiples voies de signalisation. Cette régulation s'effectue dans des mélanocytes normaux et pathologiques. Adapté de (Hsiao and Fisher, 2014).

## Acétylations

MITF pourrait également être activé par acétylation sur les lysines 206 et 243 mais ceci n'a jamais été démontré (Cheli et al., 2010). Des expériences de mutagenèse ont démontré qu'une mutation sur K206 diminuait fortement l'activité de MITF et que la seconde K243 entraînait une forme hyperactive augmentant la prolifération des cellules de mélanomes (Grill et al., 2013).

## Ubiquitinations

MITF peut être ubiquitiné sur la lysine K201 par la E2 ligase UBC9, une mutation sur ce site ou une inhibition du protéasome résultent en une stabilisation et une accumulation de MITF (Xu et al., 2000) indiquant que l'ubiquitination induit la dégradation de MITF. Quand on utilise de la cycloheximide pour bloquer la synthèse protéique, la demi-vie basale de MITF est de 30min dans des cellules HEK293T (Zhao et al., 2011) et de 2,5h dans des mélanocytes non stimulés. A l'inverse lorsqu'il y a une surexpression de la déubiquitinase USP13 (qui a été démontrée comme un régulateur majeur du renouvellement de la protéine MITF), la demi-vie se retrouve augmentée jusqu'à 4h. Ceci suggère un renouvellement rapide de MITF qui est finement régulé. Ce processus ne peut se produire sans la présence des phosphorylations S73 et S409 sur MITF.

## SUMOylations

Les SUMOylations sont des processus réversibles et labiles induisant des processus biologiques différents suivant le substrat. MITF peut subir des modifications par des small ubiquitin-like modifier (SUMO). Des études *in vitro*, ont montré que ces modifications se produisent sur les K182 et K316 et sont dépendantes des enzymes SUMO E1 et E2. De façon intéressante, la double mutation de ces lysines en arginines démontre une liaison à l'ADN normale, une stabilité et une localisation nucléaire maintenues ainsi qu'une augmentation de transcription des promoteurs contenant de multiples sites de fixation de MITF (E-box) et non pas de ceux n'en contenant qu'un. Cette double mutation permet également une plus forte coopération SOX10-MITF sur le promoteur DCT (Murakami and Arnheiter, 2005).

Récemment, une mutation germinale E318K a été découverte sur MITF qui interfère avec la sumoylation en K316 et qui pré-dispose au mélanome et au carcinome rénal (Bertolotto et al., 2011). Au niveau fonctionnel, la mutation augmente la liaison de MITF à certaines cibles changeant le profil transcriptionnel induit. Notre papier récemment publié, démontre que la mutation MITF<sup>E318K</sup> retarde le programme de sénescence dans des mélanocytes et qu'elle favorise la progression tumorale dans un modèle murin BRAF<sup>V600E/+</sup>;Pten<sup>-/-</sup> (Bonet et al., 2017). Il est à noter que dans les ostéoclastes, la sumoylation en E316 réprime l'interaction MITF-FUS-BRG1 ce qui inhibe l'activité transcriptionnelle de MITF (Bronisz et al., 2014).

## **Autres régulations**

En 2005, mon équipe a également pu démontrer que MITF peut être un substrat des caspases et ont identifié un site de clivage au niveau de l'asparagine 345 au niveau du C-term. Le fragment C-term ainsi généré sensibilise les cellules aux signaux apoptotiques. Une forme non clivable de MITF rend les cellules de mélanomes résistantes aux stimuli apoptotiques (Larribere et al., 2005).

Ci-après quelques mécanismes encore méconnus seront résumés.

La suppression d'ETV1 (E twenty-six variant 1) a été associée à une diminution d'expression protéique de MITF. De plus, l'oncogène ETV1 est amplifié (>6copies/cellules) dans 13% des mélanomes primaires et 18% des mélanomes métastatiques ce qui augmente l'expression de MITF et est nécessaire pour la transformation de mélanocytes immortalisés par NRAS<sup>G12D</sup> et ETV1 (Jane-Valbuena et al., 2010).

PRMT5 (proteine arginine methyltransferase 5) est une enzyme impliquée dans les modifications post-traductionnelles de protéines. L'expression de PRMT5 est augmentée dans les mélanomes et la déplétion de cette protéine entraîne une forte diminution d'expression protéique de MITF indiquant que PRMT5 semble réguler positivement MITF (Nicholas et al., 2013).

## **D. RÔLE TUMORIGÈNE DE MITF**

### **D.1 Amplification**

MITF joue un rôle dans la mélanomagenèse, mais contrairement au rôle de MITF durant le développement, -dans lequel on retrouve des phénotypes bien définis d'absence de protéine fonctionnelle entraînant des défauts pigmentaires- le rôle de MITF dans la tumorigenèse est plus complexe. La première étude qui a démontré le rôle de MITF comme un oncogène a montré qu'il était amplifié dans 10 à 20% des mélanomes (Garraway et al., 2005). Cette amplification semble liée à la progression de la maladie puisque les tumeurs métastatiques présentent une plus fréquente amplification de MITF que des tumeurs primaires ou des naevi. L'amplification de MITF est corrélée avec une diminution de la survie globale des patients. Cependant, le niveau d'expression de MITF reste très variable de façon inter-tumorale et intra-tumorale et on ne peut vraiment définir si MITF fonctionne comme un suppresseur de tumeur ou un oncogène.

### **D.2 Coopération avec la voie MAPK**

Plusieurs études démontrent son rôle oncogénique médié par différents acteurs, en effet, MITF coopère avec BRAF<sup>V600E</sup> pour transformer des mélanocytes primaires humains. Cette mutation réprime l'expression de MITF dans les mélanomes ce qui a pour conséquence une prolifération anarchique. Une réintroduction exogène de MITF rétablissant un niveau normal de prolifération dans des cellules

mutées BRAF<sup>V600E</sup> (Wellbrock and Marais, 2005). Ceci suggère que MITF a un rôle anti-prolifératif, réprimé par la signalisation BRAF, qui est un évènement majeur pour la progression tumorale des tumeurs présentant la mutation oncogénique BRAF. Trois ans plus tard les mêmes auteurs définissent un modèle expliquant comment avoir suffisamment d'expression de MITF pour induire l'expression de ses gènes cibles CDK2, CDK4 et BCL2 permettant la prolifération des cellules de mélanomes. D'un côté la voie de signalisation BRAF va phosphoryler MITF et induire sa dégradation par le protéasome, de l'autre cette même voie induit l'expression du facteur de transcription BRN2 qui stimule l'expression de MITF. Cet équilibre d'expression, -pas assez élevé pour induire une différenciation et pas assez faible pour entraîner la sénescence ou l'apoptose- permet la prolifération et la survie des cellules (Wellbrock et al., 2008). Néanmoins, des résultats opposés ont été obtenus par le groupe de C. Goding montrant que BRN2 réprime l'expression de MITF (Goodall et al., 2008). Ceci pourrait s'expliquer par le contexte cellulaire et notamment par le microenvironnement influençant les niveaux d'expression de certains facteurs de transcription et de co-facteurs régulant MITF (Vance and Goding, 2004) ce qui jouerait sur le rôle activateur/répresseur de BRN2.

Une étude sur l'interaction entre MITF et l'oncogène BRAF a récemment été effectuée in vivo, dans laquelle le mutant BRAF a été couplé avec un mutant de MITF hypomorphe et sensible à la température dans le modèle du poisson-zèbre (Johnson et al., 2011). Quand les poissons-zèbres sont cultivés à une faible température les niveaux d'expression de MITF sont faibles, à l'inverse, à haute température il n'y a plus suffisamment d'expression de MITF pour permettre le développement des mélanocytes. Trois ans plus tard, la même équipe a réutilisé ce modèle de faible niveau d'expression de MITF inductible avec l'oncogène BRAF. Ils ont pu constater que ni la coexpression de BRAF<sup>V600E</sup> et de MITF<sup>WT</sup> ni la corexpression de BRAF<sup>V600E</sup> avec la version hypomorphe de MITF cultivé à une haute température n'induisaient la formation de tumeurs. Cependant, la combinaison de BRAF<sup>V600E</sup> avec le mutant hypomorphe de MITF résulte en la formation de naevi et de tumeurs quand les poissons sont cultivés à une faible température, indiquant que le faible niveau d'expression de MITF à cette température suffit pour interagir avec BRAF oncogénique et facilite le développement du mélanome in vivo (Lister et al., 2014). Par la suite, ils ont laissé les tumeurs se développer et ont observé qu'en passant à haute température les tumeurs régressaient indiquant que la présence de MITF même à un faible niveau est nécessaire non seulement pour le développement mais aussi pour la maintenance de la tumeur. Pour finir, s'ils effectuaient la même expérience puis permettaient la réexpression de MITF les tumeurs revenaient aux mêmes endroits indiquant qu'une population de cellules est capable de persister à l'endroit de la tumeur et que la ré-expression de MITF est suffisante pour permettre à nouveau la progression d'une tumeur.

### D.3 Coopération d'autres voies de signalisation

Comme dit précédemment MITF est une cible de la voie Wnt, la  $\beta$ -caténine se fixe sur le promoteur de MITF et l'active. L'induction de prolifération cellulaire par la voie Wnt dans des lignées de mélanome humain est dépendante de l'induction de l'expression de MITF. La suppression de la croissance clonogénique des cellules de mélanomes par la perturbation de l'axe LEF1/TCF est restaurée par l'expression de MITF (Widlund et al., 2002).

La croissance indépendante de l'ancrage est permise grâce aux cibles de MITF telles que PGC1 $\alpha$ , c-MET et CDK2 (Du et al., 2004). Durant ce processus, des espèces réactives à l'oxygène (ROS) sont produites par le détachement des cellules tumorales à la matrice extracellulaire (MEC), ces ROS peuvent être réduites grâce aux cibles de PGC1 $\alpha$ . C-MET a également un rôle prépondérant dans la croissance indépendante de l'ancrage dépendante de KRAS dans les cancers mutés KRAS (De Luca et al., 2015; Fisher et al., 2011; Haq et al., 2013).

Le RTK TYRO3 est surexprimé dans les lignées de mélanomes et dans les mélanomes primaires, ce récepteur est capable via SOX10 de réguler l'expression de MITF. TYRO3 empêche la mise en place de la sénescence induite par l'oncogène BRAF et transforme ainsi les mélanocytes immortalisés (Zhu et al., 2009).

MITF supprime l'invasion médiée par la voie RHO/ROCK à travers la régulation de DIA1 (Carreira et al., 2006). En effet, diaphanous-related formin (DIAPH1 ou DIA1), promeut la polymérisation de l'actine et coordonne le cytosquelette d'actine et le réseau de microtubules à la périphérie de la cellule. L'inhibition de MITF réduit l'expression de DIA1, cause la réorganisation du cytosquelette et l'augmentation de l'invasion dépendante de ROCK, à l'inverse lorsque MITF est fortement exprimé l'invasion est réduite. De plus, la régulation de DIA1 par MITF contrôle la dégradation de p27(Kip1) de façon à ce que lorsque MITF est inhibé, le cycle cellulaire est arrêté en G1 via p27(Kip1).

### D.4 Mutations

Des mutations somatiques de MITF ont été identifiées dans 14% des mélanomes primaires et dans 22% des mélanomes métastatiques et altèrent son activité transcriptionnelle (Cronin et al., 2009). Une de ces altérations a plus précisément été étudiée, la mutation MITF<sup>E87R</sup> a été démontrée comme favorisant la progression tumorale via la protéine S100A4 (Nordlinger et al., 2018). Comme dit dans les sous chapitres précédents la mutation germinale MITF<sup>E318K</sup> inhibe la sumoylation au site K316 ce qui stimule l'activité transcriptionnelle de MITF, prédispose au mélanome, retarde la sénescence et promeut la progression tumorale (Bertolotto et al., 2011; Bonet et al., 2017).

## D.5 Oscillations du niveau d'expression de MITF : un interrupteur permettant de réguler les différents processus de la tumorigenèse

Comme on a pu le voir, il est très difficile de définir quel niveau d'expression exact de MITF est requis pour échapper à la tumorigenèse ou la provoquer. Le paramètre qui n'a pas été mentionné jusqu'ici et qui permet en partie de mieux comprendre ces phénomènes c'est le temps. Les gènes cibles de MITF ne doivent pas être exprimés en même temps. Des modèles ont été définis et revus au cours des années pour concilier les différents rôles de MITF suivant son niveau d'expression et son niveau d'activité régulé par des co-facteurs et modifications post-traductionnelles (Carreira et al., 2006). Ainsi de forts niveaux d'expressions de MITF sont associés à la différenciation des mélanocytes et inversement la très faible expression de MITF est associée au processus de sénescence (Giuliano et al., 2010). Des niveaux intermédiaires permettent plutôt la prolifération des cellules de mélanomes. L'expression de MITF peut donc être considérée comme le rhéostat entre ces deux phénomènes.

Un groupe a donc défini deux phénotypes distincts suivant l'expression de MITF, les cellules MITF-high (exprimant de forts niveaux d'expression de MITF) possèdent un phénotype prolifératif plutôt contrôlé par la voie Wnt et les cellules MITF-low (exprimant de faibles niveaux d'expression de MITF) possèdent un phénotype invasif en partie contrôlé par la voie TGF $\beta$  (Hoek et al., 2008). Les cellules tumorales sont capables de passer d'un phénotype à l'autre durant la progression tumorale.

L'expression de BRN2 a été associée à ces phénotypes, en effet, les cellules BRN2<sup>high</sup>/MITF<sup>low</sup> sont peu pigmentées et invasives, à l'inverse les cellules BRN2<sup>low</sup>/MITF<sup>high</sup> seront pigmentées et prolifératives. Il a été montré que lorsque les cellules effectuent une TEM, les cellules qui se différencient sont BRN2<sup>high</sup>/MITF<sup>low</sup> puis une fois leur site secondaire atteint afin d'établir une tumeur secondaire elles deviennent BRN2<sup>low</sup>/MITF<sup>high</sup>. Ces changements sont donc réversibles indiquant que les cellules de mélanomes sont plastiques (Pinner et al., 2009). On retrouve ces mêmes caractéristiques pour les cellules AXL<sup>high</sup>/MITF<sup>low</sup> et inversement AXL<sup>low</sup>-MITF<sup>high</sup> (Muller et al., 2014).

Il est évident que dans une grande majorité d'études nous observons un phénomène à un temps  $t$  et on ne peut actuellement définir un historique exact des niveaux d'expression de MITF très précis, même si celui-ci se précise au cours du temps.

Ces dernières années des expériences de RT-qPCR de cellules uniques ont révélé une expression de MITF hétérogène dans la lignée de cellules de mélanomes 501mel confirmant les observations précédentes (Ennen et al., 2015). Ceci a également été observé sur des tumeurs de patients où une sous-population MITF<sup>low</sup> et AXL<sup>high</sup> a été retrouvée (Tirosh et al., 2016). La sous-population MITF<sup>low</sup>/AXL<sup>high</sup> a été démontrée comme résistante aux thérapies ciblées c'est pourquoi on doit



continuer à mieux comprendre cette alternance de phénotype pour pouvoir cibler au mieux ces cellules.

L'inhibition transitoire de MITF augmente le nombre de cellules initiatrices de mélanomes. En effet, l'inhibition de MITF induit l'expression d'OCT4 et de NANOG, deux marqueurs de cellules souches (Cheli et al., 2011). Cette population MITF<sup>low</sup> est associée à une division très lente au sein de la tumeur, elle possède un fort potentiel tumorigénique *in vivo* et est capable de reformer une tumeur hétérogène dans des souris immunocompétentes. Ces cellules sont considérées comme quiescentes.

### **D.6 Remodelage de la chromatine par MITF**

MITF est impliqué dans le remodelage de la chromatine ce qui lui permet de réguler une partie de ses gènes cibles. MITF peut recruter les histones acétyltransférases p300 et CBP pour activer la transcription de gènes. MITF peut s'associer à BRG1 qui est un composant du complexe SWI/SNF avec BAF et PBAF pour réguler des gènes impliqués dans la pigmentation. Des analyses de chip-seq ont révélé d'autres combinaisons possibles avec MITF, SOX10, TFAP2A et YY1 pour recruter BRG1 et moduler l'expression de gènes de la pigmentation et du développement des mélanocytes.

L'inhibition de BRG1 par approche siRNA dans des cellules de mélanome entraîne un phénotype très similaire à l'inhibition de MITF, les cellules ont une morphologie et un profil de cellules sénescents, avec une réduction d'expression des gènes cibles de MITF. L'inhibition de MITF induit une sénescence associée à un phénotype sécrétoire (SASP) avec une expression accrue de CCL2, CTGF, SERPINE1 et plusieurs autres facteurs sécrétés parmi lesquels 15 d'entre eux sont retrouvés lorsque l'on inhibe BRG1. Des données supplémentaires ont permis de conclure que BRG1 est essentiel pour l'expression de MITF et qu'il agit comme un co-facteur de MITF puisque l'expression ectopique de MITF dans des cellules BRG1-invalidées ne suffit pas à rétablir le profil transcriptionnel attendu. De plus, BRG1 est recruté par plusieurs facteurs de transcriptions sur différents sites dans le génome des cellules 501mel démontrant le rôle prépondérant du remodelage de la chromatine (Laurette et al., 2015). En effet, une inhibition de BRG1 cause une inhibition d'ostéopontine, de l'IGF1, TGFβ2 et de la survivine, des facteurs associés à la progression tumorale et à un rôle anti-apoptotique. BRG1 régule donc d'autres gènes indépendamment de MITF qui sont impliqués dans la tumorigénèse (Ondrusova et al., 2013).

Des expériences de séquençage à haut débit (chip-seq) ont permis la détection d'un site de liaison de BRN2 sur le promoteur du nuclear factor one b (NFIB) dans des cellules 501mel (Kobi et al., 2010). NFIB est un facteur de transcription de la famille NFI qui joue un rôle dans le développement de nombreux organes dont les poumons et le cerveau. L'inhibition de MITF augmente l'expression de NFIB et EZH2 mais il ne semble pas exister une interaction directe entre ces gènes. Néanmoins, l'inhibition de MITF augmente l'expression de BRN2 et la régulation de NFIB et EZH2 (enhancer of

zeste homolog 2) pourrait s'effectuer par ce biais. EZH2 est une enzyme histone lysine N-méthyltransferase impliquée dans la méthylation des histones et donc la répression transcriptionnelle. L'équipe de Smith a pu démontrer que NFIB régulait MITF via une augmentation d'expression d'EZH2. EZH2 serait donc capable de réprimer l'expression de MITF en méthylant la chromatine démontrant que la régulation NFIB-MITF est dynamique et réversible et peut donc être impliquée dans les changements phénotypiques (prolifératif/invasif) (Fane et al., 2017).

## E. SÉNESCENCE

La sénescence cellulaire a été identifiée en 1961, elle se définit par un processus d'arrêt définitif de la prolifération en réponse au vieillissement cellulaire (Hayflick and Moorhead, 1961). Au cours des mitoses, les extrémités des télomères se raccourcissent progressivement. La télomérase permet de prévenir ce raccourcissement, or, dans les cellules somatiques l'activité de cette enzyme est rare voire inexistante. Dans ce cas, quand la taille des télomères devient critique, un signal anti-prolifératif est activé et cela conduit à un arrêt permanent du cycle cellulaire par un processus appelé sénescence répllicative. La sénescence est associée à un changement phénotypique et morphologique particulier. Les cellules s'élargissent, on observe une augmentation de la granulosité, une expression élevée de l'activité SA- $\beta$ -galactosidase, un remaniement de la chromatine avec des foyers d'hétérochromatine SAHF (Senescence-Associated Heterochromatin Foci) enrichis en méthylations empêchant l'expression des gènes de la famille E2F impliqués dans la progression du cycle cellulaire (Rastogi et al., 2006).

La sénescence peut survenir précocement à la suite de plusieurs stimuli comme l'activation d'oncogènes, un stress oxydatif, des dommages à l'ADN ou l'ajout de drogues pharmaceutiques. On parle de sénescence prématurée présentant les mêmes caractéristiques que la sénescence traditionnelle.

Les mélanocytes sont également soumis à la sénescence (Schwahn et al., 2005), celle-ci dépend de p16INK4a puisque son inactivation augmente le nombre de mitoses dans les mélanocytes (Sviderskaya et al., 2002), mais aussi à l'inhibition de CDK2, CDK4 et à la déphosphorylation de Rb réprimant les gènes sous le contrôle de E2F. L'image de la sénescence dans les mélanocytes étant la formation de nævi suite aux mutations oncogéniques BRAF<sup>V600E</sup>, NRAS<sup>Q61R</sup> ou HRAS<sup>G12V</sup>. On parle d'oncogene-induced senescence (OIS).

Dans les mélanocytes sénescents MITF est très faiblement exprimé voire absent, de plus, dans des lignées de mélanomes l'inhibition de MITF déclenche l'entrée en sénescence de ces cellules. MITF peut donc être considéré comme un facteur anti-sénescence. La sénescence induite par l'absence de MITF semble indépendante de p16INK4a mais nécessiterait p53. Le stress oxydatif peut également causer des dommages à l'ADN et la sénescence via p53 (Lewis et al., 2008). Pour éviter l'accumulation de ROS, des enzymes de détoxification existent et transforment les ROS en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

MITF régule l'expression du complexe APE1/REF1 détoxifiant et p53 le réprime (Liu et al., 2009; Zaky et al., 2008). La diminution de ce complexe provoque la sénescence dans des cellules souches mésenchymateuses (Heo et al., 2009). Enfin, T-box transcription factor 2 (TBX2) est une autre cible de MITF, ce facteur de transcription réprime CDKN2A (p16INK4A). MITF active TBX2 et joue donc un rôle dans le maintien de la prolifération et la suppression de la sénescence dans le mélanome (Vance et al., 2005). Rappelons que MITF régule positivement CDKN2A, WAF1 (p21Cip1) et CCND1 qui sont mutés dans les mélanomes ou amplifié dans 25% des cas de mélanome pour CCND1.

Pour finir, MITF<sup>E318K</sup> empêche le programme de sénescence dans des mélanocytes primaires humains. L'étude des tumeurs MITF<sup>WT</sup> et des tumeurs MITF<sup>E318K</sup> a montré une répression de CDKN2B et CDKN2A dans les tumeurs MITF<sup>E318K</sup> (Bonet et al., 2017). L'échappement au processus de sénescence des mélanocytes ayant une mutation oncogénique BRAF permettra le développement du mélanome.

## **F. IMPLICATIONS DANS LE CYTOSOL**

Récemment, MITF, TFEB et TFE3 ont été décrits comme des régulateurs de la fonction lysosomale et du métabolisme. De nombreux gènes reliés aux lysosomes ou à l'autophagie possèdent un ou des motifs à 10 paires de bases 5'-GTCACGTGAC-3' nommés « Coordinated Lysosomal Expression and Regulation » elements (CLEAR elements). Les éléments CLEAR sont reconnus par la famille MITF et permettent la transcription des gènes contenant ces éléments dans leur promoteur (Martina et al., 2014a; Sardiello et al., 2009). Une expérience d'immunoprécipitation de la chromatine sur l'ensemble du génome a révélé une liaison de TFEB aux éléments CLEAR avec une augmentation d'expression des protéines lysosomales (Palmieri et al., 2011). 471 cibles directes de TFEB ont été identifiées, comprenant des protéines impliquées dans l'acidification des lysosomes, des enzymes de dégradation ainsi que des protéines impliquées dans l'autophagie et l'endo/exo phagocytose. D'une façon comparable, TFE3 et MITF peuvent se lier aux motifs CLEAR et induire la biogenèse lysosomale et l'autophagie (Martina et al., 2014b; Ploper et al., 2015). Le système d'autophagie est un processus catabolique des agrégats protéiques et autres macromolécules. Ce processus est très important dans la cellule saine mais aussi dans les cellules cancéreuses qui utilisent l'autophagie comme mécanisme de survie. L'autophagie a des propriétés cytoprotectrices et oncoprotectrices puisqu'elle permet d'éviter les stress oxydatifs, de prévenir les dommages à l'ADN et de maintenir le métabolisme même en conditions de déplétions d'acides aminés (AA) (Kenific and Debnath, 2015; White, 2012).

Actuellement, on sait que les cellules cancéreuses subissent une reprogrammation adaptative de leur métabolisme pour utiliser différents substrats pour maintenir leur besoin de proliférer. L'effet Warburg fait également partie de cette reprogrammation métabolique, les cellules passant de la phosphorylation oxydative pour leur besoin en ATP à la glycolyse (Warburg, 1956). L'autophagie participe à cette

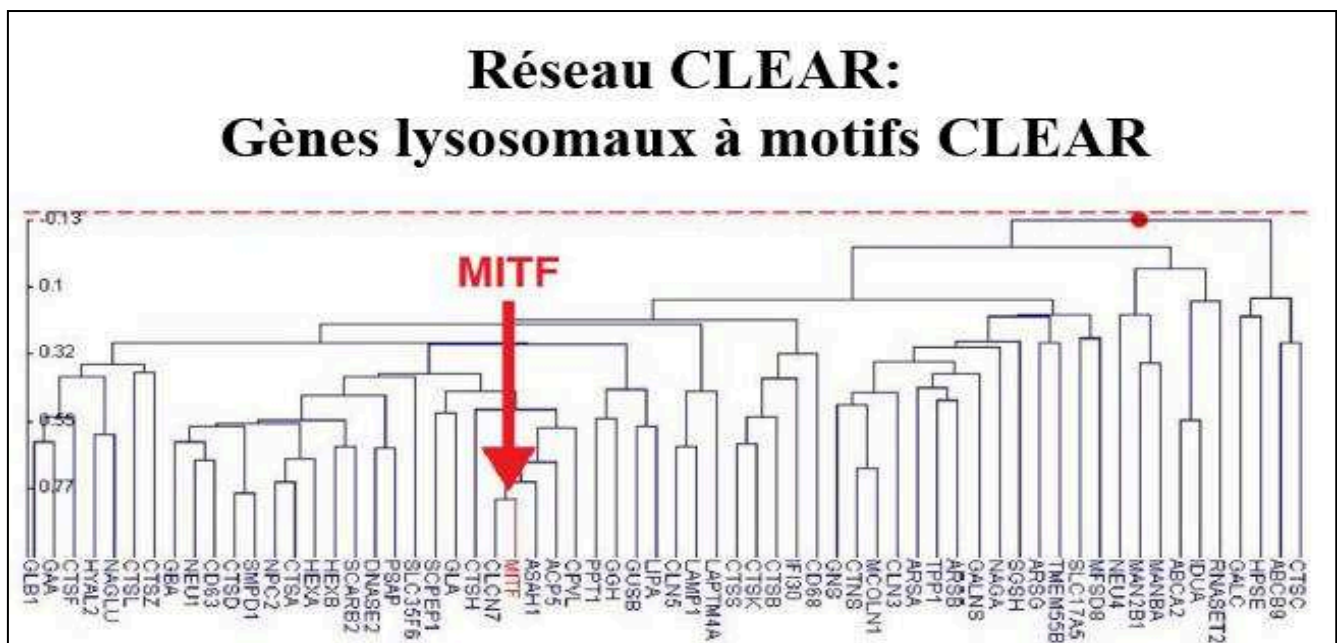
reprogrammation en dégradant les lipides et protéines dans les lysosomes pour que ces substrats participent à la biosynthèse des membranes et des acides nucléiques.

### F.1 Mécanisme de régulation des motifs CLEAR

TFEB et TFE3 sont recrutés à la membrane externe des lysosomes en interagissant via leurs 30 premiers résidus N-terminaux avec les Rag guanosine triphosphatases (GTPases). En condition riche en nutriments, mTORC1 actif est recruté à la surface des lysosomes où il pourra phosphoryler en Ser142 TFEB (possiblement en Ser211 également et en Ser 321 pour TFE3), ce qui déclenche la liaison de ces facteurs de transcription aux chaperones cytosoliques 14-3-3. Ceci occasionne la séquestration cytoplasmique de TFEB et TFE3 empêchant ces facteurs de transcription d'aller réguler leurs gènes cibles. A l'inverse, quand la cellule se retrouve en restriction nutritionnelle ou qu'il y a un stress lysosomal (par un traitement à la chloroquine par exemple), l'activité mTORC est inhibée, TFEB et TFE3 non-phosphorylés seront transloqués dans le noyau, se lient aux motifs CLEAR et régulent leurs gènes cibles pour restaurer une homéostasie nutritionnelle grâce à une augmentation de production de lysosomes, d'autophagosomes et d'exocytose (Martina et al., 2014b).

### F.2 L'expression de MITF est corrélée avec beaucoup de gènes endolysosomaux

Une analyse GSEA (Gene Set Enrichment Analysis) d'une puce à ADN effectuée sur 51 lignées de mélanomes différentes a été effectuée et a permis de corréler l'expression de MITF à tous les gènes lysosomaux contenant des motifs CLEAR dans leur promoteur/enhancer (Ploper et al., 2015). De façon intéressante, ceci n'a pas été le cas avec TFEB. De plus, la surexpression de MITF a permis de confirmer ces résultats en montrant l'activation de ces gènes lysosomaux. Néanmoins, malgré cette augmentation significative d'endolysosomes/MVB (multivesicular body), ces derniers ne sont pas complètement fonctionnels puisqu'ils ne peuvent pas dégrader des protéines endocytées.



### **Figure 13 : Représentation schématique du réseau de gènes à motifs CLEAR régulés par MITF**

Dans les lignées de mélanomes *MITF* corrèle avec l'expression de beaucoup de gènes lysosomaux contenant des motifs CLEAR. Cette analyse de puce ADN a utilisé 51 lignées de mélanomes divisées en sous-groupes : MITF-low, MITF-high. Cette puce a démontré que les lignées de mélanomes exprimant fortement MITF présentaient également une forte expression des gènes lysosomaux contenant un ou plusieurs motifs CLEAR. Cette figure montre l'ensemble de ces gènes répertoriés dont l'expression corrèle à celle de MITF dans cette étude. Adapté de Ploper et al, 2015.

D'autres études démontrent que certains isoformes de MITF peuvent jouer le même rôle que TFEB et TFE3, MITF-A semble se localiser à la membrane lysosomale, se lier aux Rag GTPases et transloquer dans le noyau lorsque mTOR est inhibé de façon similaire à ce qu'on observe pour TFEB et TFE3. Dans le cas de TFEB, les sérines 142 et 211 sont requises pour la séquestration cytoplasmique. Pour MITF, la sérine 173 a été démontrée comme analogue à la S211 et est requise pour la séquestration cytoplasmique de MITF-A par les protéines 14-3-3 (Martina and Puertollano, 2013). Il est donc important de rappeler que les activités de TFEB, TFE3 et des isoformes MITF-A et MITF-D sont régulées par l'homéostasie nutritionnelle qui détermine la localisation sub-cellulaire de ces protéines selon la phosphorylation par mTOR. Cependant, l'isoforme MITF-M échappe à cette régulation car on ne retrouve pas la même homologie que ces protéines en N-term (les 30 résidus de liaison à la membrane lysosomale étant absents), la partie N-term de MITF-M étant unique et spécifique à cet isoforme. C'est pourquoi MITF-M est un facteur de transcription constitutif. La même observation a été réalisée dans le modèle de la drosophile, les auteurs ont démontré que MITF régulait l'expression de gènes codant pour des sous-unités de V-ATPases ainsi que plusieurs gènes impliqués dans l'axe lysosome-autophagie. L'inhibition de MITF conduit à des lysosomes anormaux et empêche la fusion des autophagosomes ainsi que la dégradation des lipides (Bouche et al., 2016).

Pour finir, l'étude de Ploper et al. (Cf. Figure 13) a permis d'identifier que l'expression des gènes lysosomaux comme la céramidase acide (ASAHI), le GM2 ganglioside activator (GM2A), la phosphatase acide (ACP5), le chloride channel voltage-sensitif 7 (CLCN7), l'osteopetrosis-associated transmembrane protein 1 (OSTM1), la cathepsine K et de multiples ATPases corrélait avec celle de MITF (Ploper et al. 2015). Leur hypothèse serait que MITF pourrait se lier au motif CLEAR tout comme TFEB et activer l'expression de ces gènes lysosomaux.

### **F.3 L'expression de MITF est corrélée négativement avec des gènes clefs de la macroautophagie**

L'étude des gènes reliés aux autophagosomes a montré des gènes à l'expression positivement corrélée à celle de MITF (ATG3, UVRAG, VPS1, SNCA et AMBRA1) mais d'autres comme ATG7, ATG12 et ATG5 étaient négativement corrélés avec MITF. Le profil est vraiment différent de celui observé avec les gènes lysosomaux tous positivement corrélés avec l'expression de MITF. Cette observation est surprenante puisque les gènes de l'autophagie possèdent également des motifs CLEAR dans leur

promoteur ainsi qu'un T flanquant en 5' essentiel pour la liaison de MITF. De plus, dans des cellules RPE (Retinal Pigment Epithelium), MITF-A active l'autophagie mais pas les gènes lysosomaux.

Une étude très récente a pour la première fois démontré un rôle spécifique de MITF dans l'autophagie impliquant la surexpression du miR-211. Dans des conditions de stress incluant des restrictions de nutriments et une inhibition de mTOR, l'axe MITF-miR211 constitue une nouvelle boucle de régulation contrôlant l'activité autophagique dans les cellules. Le miR-211 inhibe RICTOR en se liant à son ARNm ce qui cause une inhibition de la voie de signalisation mTORC1 stimulant la translocation nucléaire de MITF et l'activation des gènes d'autophagie. Ce mécanisme est ubiquitaire puisque MITF et le miR-211 ont été co-exprimés dans plusieurs lignées cellulaires provenant de différents tissus (y compris une lignée de cellules de mélanome), et ces effets étaient tissu-indépendant (Ozturk et al., 2018).

Pour conclure, bien que MITF régule l'expression de nombreux gènes requis pour la biogenèse des mélanosomes et que ces organelles sont assimilées à des LRO, les mélanosomes sont très différents des endosomes et lysosomes et représentent un lignage d'organelles au profil protéomique unique (Raposo and Marks, 2007). C'est pourquoi on ne peut pas assimiler la régulation des gènes lysosomaux à une simple régulation de gènes reliés aux mélanosomes. Puisque la famille MiT peut dimériser avec les différents membres, il y a de multiples possibilités de « crosstalk » et de compensations entre les différents membres. Par exemple, dans les ostéoclastes TFE3 et MITF ont des fonctions redondantes. La contribution de chaque membre -voire de chaque isoforme dans le cas de MITF- dans la biogenèse des organelles pourrait dépendre de la présence de nutriments, du type cellulaire et des différents stimuli subis par la cellule.

## Chapitre 3. Le métabolisme des sphingolipides

### A. GÉNÉRALITÉS SUR LES SPHINGOLIPIDES

Les sphingolipides sont des lipides membranaires amphiphiles caractérisés par la présence d'une sphingosine, une longue chaîne amino et hydroxy-alkylique. Après plus d'un siècle d'études, on connaît maintenant leur structure, leurs propriétés physico-chimiques, leur distribution et leur quantité dans les cellules et tissus de différentes espèces animales y compris l'homme (Sonnino et al., 2006). Le compartiment de destination finale des sphingolipides est la membrane plasmique. Cependant, ils doivent subir de nombreuses modifications intracellulaires, c'est pourquoi on en retrouve une portion non négligeable dans des organelles cytoplasmiques (Hannun and Obeid, 2018).

#### A.1 Synthèse des sphingolipides

Le métabolisme des sphingolipides possède une voie unique d'entrée via la serine palmitoyl transférase (SPT) qui forme le premier sphingolipide de novo. La voie de sortie passe par la sphingosine-1-phosphate lyase (SPL), qui permet la formation de métabolites simples qui seront réutilisés par la cellule. Les sphingolipides sont caractérisés par une longue chaîne carbonée sphingoïde (18 à 20 atomes de carbones) appelée également sphingosine (base insaturée) ou dihydrosphingosine (base saturée).

A partir de cette base sphingoïde, l'ajout d'un phosphate sur le groupement hydroxyle en C1 aboutit à la formation de la sphingosine-1-phosphate molécule biologiquement active. Des acides gras (AG) peuvent se fixer par N-acylation sur la base sphingoïde pour former d'autres sphingolipides. Les AG peuvent être saturés ou monoinsaturés avec des longueurs de chaîne et des degrés d'hydroxylation variables. La sphingosine N-acylée est appelée céramide (Cer). Elle peut avoir différentes fonctions biologiques selon la nature de la chaîne acylée qui la compose. Le céramide est communément placé au centre du métabolisme des sphingolipides car il est à l'origine de la formation des sphingolipides plus complexes.

Pour les sphingolipides les plus simples, l'ajout d'un phosphate par une céramide kinase (CerK) génère du céramide-1-phosphate (C1P) tandis que la condensation avec une phosphocholine conduit à la formation de la sphingomyéline (SM). Le céramide peut aussi donner du glucosylcéramide (GlcCer) ou du galactosylcéramide (GalCer) par addition respective d'un glucose ou d'un galactose.

Puisqu'il s'agit de composés amphiphiles, les sphingolipides contiennent un groupement hydrophile en N-term, (on parle de tête polaire) suivi par exemple d'un saccharide, d'un oligosaccharide et une phosphocholine. On retrouve également une chaîne hydrophobe (ou queue apolaire) appelée céramide, dans laquelle la sphingosine est liée à un acide gras situé à la partie externe de la membrane plasmique. C'est pourquoi ces lipides sont des composés asymétriques de la membrane plasmique,

enrichis dans le feuillet externe de celle-ci. Cependant, il n'est pas exclu qu'une petite portion puisse de façon transitoire être insérée dans le feuillet interne grâce au groupement hydrophile faisant face au cytosol. Longtemps considérés comme des simples composants de la membrane plasmique, les sphingolipides sont désormais reconnus comme des lipides bioactifs jouant un rôle majeur dans de nombreux processus biologiques comme la prolifération, la différenciation, la migration, l'angiogenèse ou l'apoptose; pour revue : (Hannun and Obeid, 2008).

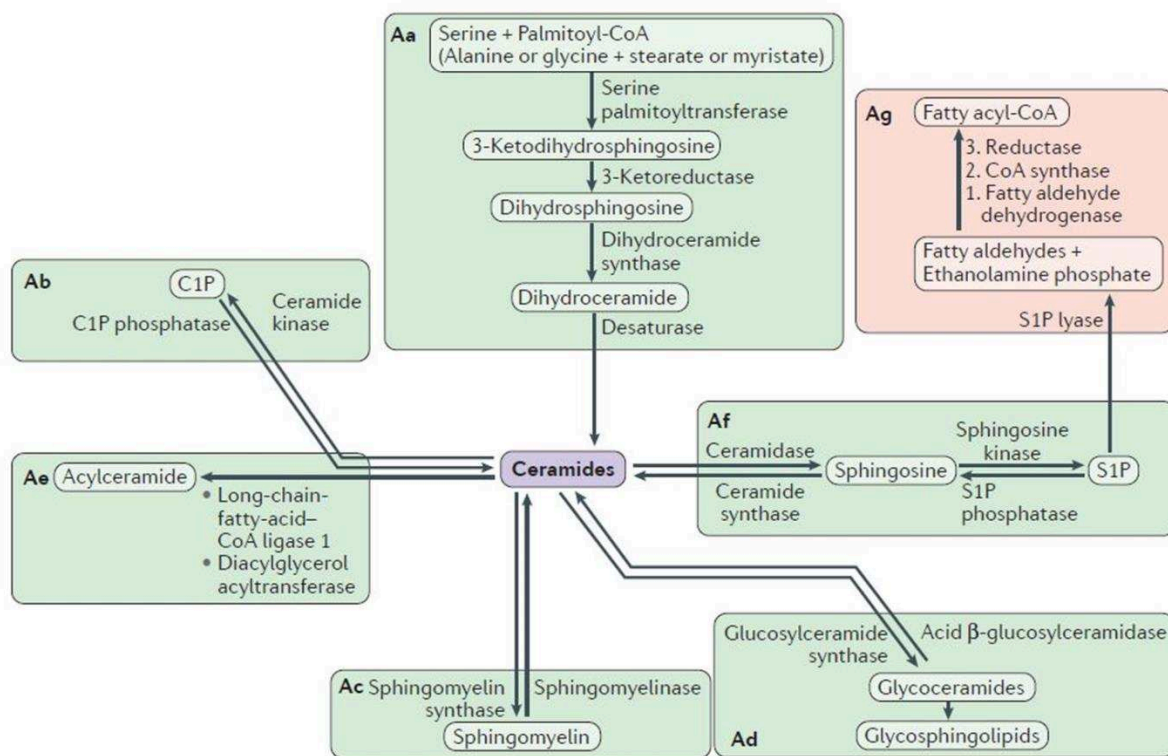
## A.2 Génération des sphingolipides

La biosynthèse des sphingolipides débute dans le réticulum endoplasmique (RE) avec la condensation d'une sérine avec un palmitoyl coenzyme A (coA) par la sérine palmitoyltransférase (SPT) (Cf. Figure 14 et 15). Le produit de cette réaction est la 3-keto-dihydrosphingosine qui est réduite en dihydrosphingosine par la 3-ketoreductase. Une acylation se produit sur la dihydrosphingosine par une (dihydro-)ceramide synthase (CerS) donnant un dihydroceramide. Cette synthèse de novo est achevée par une désaturase qui permet de générer le céramide à partir du dihydroceramide.

Ces céramides nouvellement synthétisés peuvent ensuite être transformés en cinq lipides plus complexes : (1) en ceramide-1-phosphate (C1P) par la Cer kinase, (2) en sphingomyéline l'un des sphingolipides les plus abondant par la sphingomyéline synthase, (3) en ceramide phosphoéthanolamine par la sphingomyéline synthase 2, (4) en galactosylceramide par la galactosylceramide synthase et (5) en glucosylceramide (GlcCer) par la glucosylceramide synthase. Ces réactions se produisent dans le RE ou dans le Golgi du côté cytosolique ou du côté du lumen. La sélection d'une de ces transformations s'effectue suivant l'expression des enzymes correspondantes. Une fois ces lipides complexes synthétisés, ils sont acheminés à la membrane plasmique via le trafic vésiculaire.

Les céramides peuvent être transportés du RE au Golgi par un processus vésiculaire ou par un transporteur cytosolique, la ceramide transfert protein (CERT) (Funato and Riezman, 2001). En plus de toutes les enzymes générant ces différents sphingolipides, les transporteurs représentent des cibles supplémentaires permettant de moduler le métabolisme des sphingolipides et ses effets biologiques. En effet, réguler l'expression de la CERT semble modifier la sensibilité de cellules cancéreuses à la chimiothérapie (Lee et al., 2012a; Swanton et al., 2007).





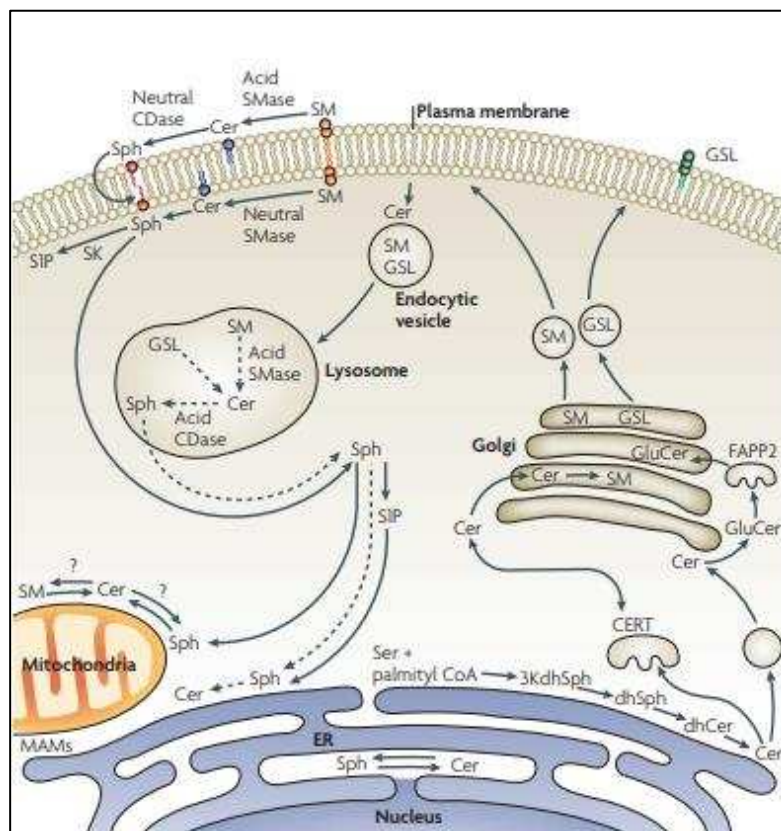
**Figure 14 : Vue d'ensemble du métabolisme des sphingolipides**

Les céramides, les sphingolipides les plus simples sont au centre de ce métabolisme. **Aa** La biosynthèse de novo est représentée ici et s'effectue dans le RE, les principaux substrats sont la sérine et le palmitoyl-CoA mais l'alanine ou la glycine et le stéarate ou myristate peuvent aussi être utilisés. **Ab-Ad** Les céramides sont la base des sphingolipides complexes qui sont produits essentiellement dans le Golgi à l'aide de modifications sur la position C-1. **Ae** Les céramides peuvent être acylés pour former des acyl-céramides. **Af** Voie catabolique des sphingolipides, la SM, les C1P et glycosphingolipides sont hydrolysés pour donner des céramides. Les céramides pourront ensuite être déacylés pour générer des sphingosines qui pourront donner des S1P. **Ag** Sortie du métabolisme des sphingolipides initiée par la S1P lyase qui clive la S1P en phosphoéthanolamine et acide gras. SM : sphingomyéline, S1P : sphingosine-1-phosphate, C1P : ceramide-1-phosphate. Adapté de Hannun et Obeid, 2018.

Les céramides peuvent également être synthétisés via la voie dite de recyclage (ou « salvage pathway ») dans les lysosomes. C'est-à-dire que la sphingosine et d'autres sphingolipides complexes vont être recyclés pour redonner des céramides à l'aide de plusieurs enzymes.

Notamment, l'hydrolyse de la SM en céramide est catalysée par des sphingomyélinases (SMases). Les SMases sont caractérisées et classées en fonction de leur pH optimal d'action (neutre, acide, alcaline). La SMase alcaline s'exprime par exemple uniquement dans l'intestin et le foie tandis que les SMases neutre et acide sont ubiquitaires. Les glycosphingolipides (GSL) pourront redonner des céramides grâce à une acide-β-glucosylcéramidase. Enfin, la C1P phosphatase pourra convertir les C1P en céramides.

Quelle que soit la voie de synthèse du céramide, ce dernier peut subir une déacylation par des céramidases (CDases) qui possèdent une localisation subcellulaire différente selon leur pH optimal d'action (alcaline, neutre ou acide). Nous discuterons du rôle de la céramidase acide (ASAHI) dans le chapitre suivant. La dégradation du céramide donne de la sphingosine (Sph), un lipide bioactif qui inhibe la progression du cycle cellulaire et/ou favorise l'apoptose. La sphingosine peut être phosphorylée par les sphingosines kinases (SK) situées dans le cytosol ou sur la membrane plasmique et donner de la sphingosine 1-phosphate. La S1P peut être recyclée en sphingosine sous l'action d'une S1P phosphatase (S1PP) ou bien être dégradée au niveau du RE de manière irréversible par la S1P lyase (SPL), aboutissant à la formation d'hexadécénal (Hal) et de phosphoéthanolamine (EtP). Ces deux métabolites peuvent redonner des palmitates qui pourront être ré-utilisés pour une synthèse de novo de sphingolipides.



**Figure 15 : Représentation schématique des différentes voies de synthèse des sphingolipides**

Les céramides peuvent être générés de deux façons :- par la biosynthèse de novo s'effectuant dans le RE, les céramides générés pourront ensuite être modifiés en lipides plus complexes dans l'appareil de Golgi avant de rejoindre leur destination finale : la membrane plasmique. D'un autre côté, on retrouve la voie de recyclage dans les lysosomes afin de régénérer des céramides à partir des lipides complexes pouvant être à nouveau utilisés pour une synthèse de novo. De Hannun et Obeid, 2008.

Dans la cellule, la concentration cellulaire en céramide est 30 fois supérieure à celle de la sphingosine, elle-même 100 fois supérieure à celle de la S1P (Alshaker et al., 2013). Les niveaux intracellulaires de S1P sont donc faibles par rapport aux niveaux de céramide. La concentration en S1P étant finement

régulée par trois familles d'enzyme mentionnées plus haut : les SKs, les S1PPs et la SPL qui maintiennent un équilibre entre la biosynthèse et la dégradation de la S1P.

### **A.3 Catabolisme des sphingolipides dans les lysosomes**

La dégradation des sphingolipides membranaires se déroule dans les lysosomes, le trafic de la membrane aux lysosomes s'effectue via le trafic endosomal à l'aide d'endosomes précoces et tardifs. Durant leur trajet jusqu'aux lysosomes, les sphingolipides membranaires peuvent être détournés vers l'appareil de Golgi pour être glycosylés, former des sphingolipides plus complexes et retourner à la membrane plasmique. Ce processus semble plus fréquent dans certains tissus et notamment dans les neurones (Riboni et al., 1994). Après avoir atteint les lysosomes, les sphingolipides seront catalysés en plus simples molécules (Kolter and Sandhoff, 2005) mais quelques intermédiaires sous forme de glycolipides échappent aux lysosomes et atteignent l'appareil de Golgi pour être recyclés grâce à la voie de recyclage. Ces glycolipides sont les gangliosides, constitués d'un céramide lié par une liaison éther à un ou plusieurs ose(s) chargé(s). Malheureusement, ces mécanismes sont méconnus et on ignore comment s'effectue le transfert entre les lysosomes et le Golgi ni sur la régulation de ce phénomène. Néanmoins, la présence soluble de ganglioside en complexe avec des protéines dans le cytosol pourrait refléter le trafic relié au recyclage de ces intermédiaires.

D'un autre côté, nous savons que les lysosomes interagissent avec de nombreuses organelles intracellulaires ainsi qu'avec la membrane plasmique. Des processus de fusions membranaires pourraient être responsables du transfert de certains lipides à d'autres compartiments cellulaires.

Les produits de dégradation finaux de la sphingosine (l'héxadécenal et la phosphoéthanolamine) quittent les lysosomes grâce à des protéines membranaires spécifiques et peuvent à nouveau prendre part à la biosynthèse de novo des sphingolipides. Le recyclage de la sphingosine peut couvrir jusqu'à 80% des besoins cellulaires dans certains types cellulaires.

## **B. RÔLES DANS LA CELLULE**

### **B.1 Les sphingolipides sont des composants des radeaux lipidiques**

Les sphingolipides sont des composés retrouvés dans l'ensemble des membranes plasmiques des mammifères, et sont particulièrement abondants dans le système nerveux, notamment dans les neurones. L'insertion des sphingolipides à proximité du cholestérol dans la membrane entraîne la formation de domaines à la fluidité réduite maintenant connus sous le nom de « radeaux lipidiques » (Sonnino et al., 2006). Leur concentration est très élevée dans les radeaux lipidiques retrouvés dans les neurones. Les radeaux lipidiques contiennent peu de protéines, ils sont cependant impliqués dans de nombreux processus cellulaires qui sont modulés par des interactions spécifiques entre des

glycosphingolipides et des protéines ou à travers la réorganisation dynamique des sphingolipides (Prinetti et al., 2009). Des études ont prouvé que des changements d'organisation de la membrane plasmique causent systématiquement des changements au niveau des sphingolipides (en quantité ou en organisation), et ceci a pour conséquence de moduler les fonctions cellulaires.

## **B.2 Les sphingolipides : acteurs de la transduction des signaux intracellulaires**

La première hypothèse reliant les sphingolipides à la transduction du signal a été énoncée lorsque les chercheurs ont découvert la sphingosine. Ils ont observé que ce lipide inhibait l'activité de la protéine kinase C (PKC) (Hannun et al., 1986). Par la suite, on a découvert qu'un ligand extracellulaire particulier pouvait en se liant à son récepteur activer une sphingomyélinase, générer des céramides et entraîner les effets intracellulaires reliés à ce ligand.

L'activation de la signalisation reliée aux sphingolipides peut être effectuée par plusieurs types de stimuli dont des agents physiques (radiation ionisante, chaleur), par des molécules hydrophiles (cytokines, facteurs de croissance, antigènes, drogues, toxines) et par des molécules hydrophobes (stéroïdes) ainsi que des toxines et des microorganismes (bactéries et virus). Ces stimuli génèrent en majorité des céramides mais peuvent également former d'autres sphingolipides. Le contenu en sphingosine, S1P, C1P peut être augmenté après l'ajout de cytokines, de facteurs de croissance etc. Ces changements de concentration intracellulaires sont extrêmement hétérogènes variant de 20-30% à 2000%. Cependant, ces variations sont reliées au type cellulaire étudié plutôt qu'à la nature du stimulus.

De la même façon, les enzymes reliées au métabolisme des sphingolipides sont soumises aux stimuli extracellulaires qui peuvent être :

- Une interaction spécifique entre des protéines se liant à des récepteurs membranaires après la formation du complexe récepteur-ligand.
- L'action de protéases comme les ICE-like protéases (Pronk et al., 1996).
- Des métabolites produits par une autre voie de signalisation.

Par exemple, le diacylglycérol (DAG) est un inducteur de la SMase acide, l'acide arachidonique est un inducteur de la SMase neutre. Quant aux céramidases et SMases neutres, elles sont modulées respectivement par le PDGF et le NGF suite à une activation de l'activité tyrosine kinase.

## **B.3 Cibles des sphingolipides**

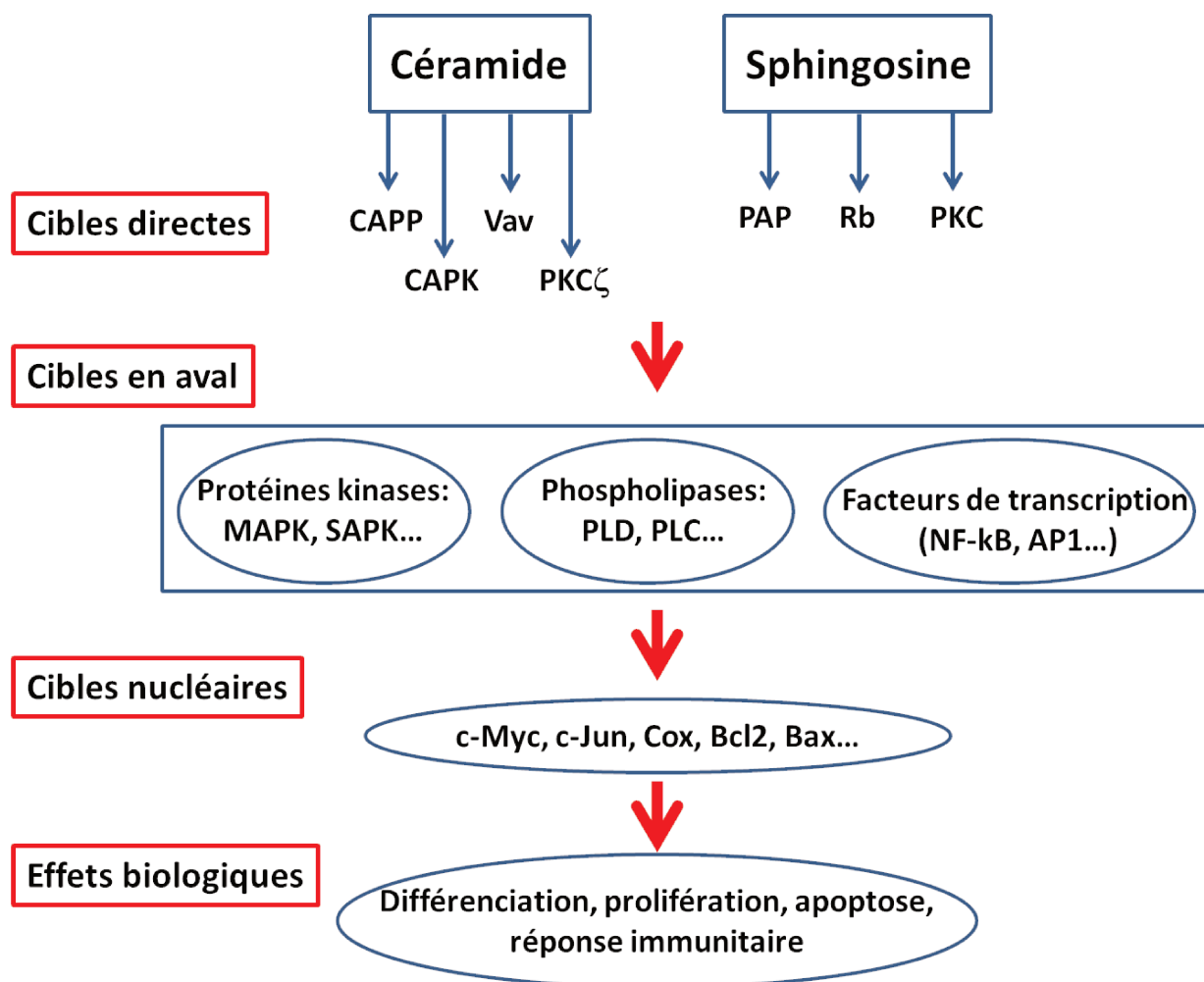
Les céramides peuvent activer une protéine kinase liée à la membrane qui est la CAPK (catabolite activated protein kinase) également appelée KSR (kinase suppressor of Ras) (Jarvis et al., 1996; Zhang et al., 1997). Cette CAPK/KSR peut phosphoryler et activer la kinase RAF reliant la voie de recyclage à la voie de signalisation MAPK. Une cible directe des céramides est Vav, un facteur d'échange des nucléotides

guanyliques capable d'activer Ras, reliant d'une autre façon les céramides à la voie MAPK. Les céramides peuvent induire la PKC $\zeta$  (Bourbon et al., 2002; Muller et al., 1995) qui a été impliquée dans la régulation du potentiel membranaire, l'inhibition d'AKT et qui aurait des fonctions pro-apoptotiques. Les céramides stimulent l'activité de la cathepsine D (Heinrich et al., 2004) et la CAPP (ceramide-activated protein phosphatase) qui est une phosphatase de type 2a régulant différents processus cellulaires, par la suite identifiée comme étant la PP2A. PP2A entraîne l'inhibition de c-Myc et de l'apoptose, la déphosphorylation de c-Jun, l'inactivation de la PKC $\alpha$ , l'inhibition des effets de l'insuline sur la voie MAPK et l'activation de la protéine 14-3-3. Il est à noter également que les sphingolipides modulent la concentration en AMPc en modulant des protéines G ou en modulant des signaux intervenant en amont des adénylates cyclases.

Des niveaux intracellulaires élevés de céramides semblent inhiber l'activation de la PLD. Ceci se produit notamment dans les cellules sénescentes qui augmentent leur concentration intracellulaire de céramide de façon considérable et spécifique (d'environ quatre fois) (Venable et al., 1995). En effet, l'addition de céramides exogènes (C6-céramides) induit un phénotype de sénescence caractérisé par l'inhibition de synthèse d'ADN et de la mitose. De plus, ceci induit une déphosphorylation de Rb et inhibe la protéine AP-1 régulant la prolifération, la différenciation et l'apoptose.

Le rôle des céramides dans l'activation de la voie NF- $\kappa$ B est encore méconnu. L'activation de cette voie peut se produire suite à l'activation des SMases grâce à une augmentation des céramides intracellulaires. Un modèle propose que le céramide est un second messager activant la voie NF- $\kappa$ B via la stimulation de la PKC $\zeta$  qui est capable de phosphoryler et d'inactiver I $\kappa$ -B (Lozano et al., 1994). Cette activation semble très similaire à une transactivation via TNF- $\alpha$  ou PLC (activée par PKC $\zeta$ ) et elle nécessite la PKC $\zeta$  puisqu'un mutant dominant négatif de cette protéine inhibe complètement cette régulation.

Les SAPKs (stress-activated protein kinases) aussi connues sous le nom de JNKs (Jun nuclear kinases) peuvent être activées par la voie MAPK mais sont stimulées préférentiellement par des stress cellulaires et par le TNF- $\alpha$ . Le TNF- $\alpha$  active les SAPKs permettant la phosphorylation et l'activation de c-Jun et ATF-2 (Kyriakis et al., 1994; Sanchez et al., 1994). Le TNF- $\alpha$  est également capable d'activer l'hydrolyse de la sphingomyéline en céramide et est considérée comme une phase précoce de l'activation des SAPKs conduisant à l'apoptose. En effet, l'ajout de céramides exogènes ou de SMases induit l'activité SAPK et augmente l'expression du gène C-JUN confirmant que les céramides agissent en amont des SAPK.



**Figure 16** : Cibles intracellulaires et effets biologiques des sphingolipides

Les mécanismes d'action de la sphingosine restent méconnus malgré un nombre croissant d'effets recensés en aval de la sphingosine. On sait que la sphingosine est capable d'inhiber la protéine kinase C (PKC) (Hannun et al., 1986) ainsi que la PAP (phosphatidate phosphatase) produisant les DAG (Gomez-Munoz et al., 1992; Jamal et al., 1991). La sphingosine est également capable d'induire la déphosphorylation de la protéine Rb (Dbaibo et al., 1995). Les sphingosines sont augmentées dans les cellules cancéreuses après des stress tels que la chimiothérapie, des dommages à l'ADN et les stimuli apoptotiques. Suite à une inhibition de la SK, le niveau de sphingosine augmente (Hannun and Obeid, 2018). Tout comme les céramides, la sphingosine peut induire la mort cellulaire par apoptose et nécrose (Xu et al., 2016).

Les S1P sont les sphingolipides les plus solubles et sont présents dans de très faibles quantités de l'ordre du nanomolaire dans la cellule (mais dans de fortes concentrations nanomolaires dans le sérum où ils interagissent avec des lipoprotéines et l'albumine). Ils interagissent avec les S1PRs qui sont des protéines G couplées à des récepteurs (GPCRs) de haute affinité et strictement spécifiques aux S1P. Il existe cinq S1PRs (S1PR1-5) qui ont des expressions tissus-spécifiques et qui sont cruciaux pour

activer les voies de signalisation et donc entraîner différentes fonctions biologiques. Les S1P semblent également avoir des fonctions S1PR-indépendantes telle que l'induction de la sortie du calcium mais le mécanisme est encore méconnu (Chalfant and Spiegel, 2005).

#### **B.4 Sphingolipides et cavéoles**

Ces structures issues de l'invagination de la membrane plasmique sont structurellement similaires aux radeaux lipidiques et sont nommées cavéoles. Ce sont des structures de 50 à 100nm riches en cholestérol et sphingolipides très abondantes dans les cellules endothéliales, les adipocytes, cellules musculaires lisses et fibroblastes. Elles sont stabilisées par des protéines d'échaffaudage nommées les cavéolines (24 kDa) qui se lient à forte affinité au cholestérol via une séquence consensus de reconnaissance du cholestérol (CRAC). La cavéoline 1 est la principale composante de ces invaginations, qui se retrouve au niveau du feuillet interne de la membrane plasmique possédant des sites de phosphorylation, ubiquitination et sumoylation. Les cavéolines 2 et 3 se retrouvent respectivement dans les poumons et dans les muscles, la cavéoline 2 ne pouvant former des cavéoles par elle seule et doit s'associer en hétérodimère avec la cavéoline 1 pour cela.

La genèse des cavéoles débute dans le RE avec la traduction des cavéolines qui sont ensuite maturées dans le Golgi avant d'être transportées à la membrane plasmique via une voie de sécrétion nécessitant le ganglioside GM1 (qui est un glycosphingolipide) et des protéines liées aux glycosylphosphatidylinositols. Dans le Golgi, les cavéolines sont associées au cholestérol via le site CRAC. Avant d'arriver à la membrane plasmique les cavéolines subissent une palmitoylation, arrivées à la membrane plasmique elles peuvent s'assembler avec d'autres cavéolines pour former des cavéoles avec l'aide de protéines structurales nommées cavines (environ 50 kDa). Des complexes vont donc se former avec la cavine-1, la cavéoline 1 et des phospholipides (phosphatidylserine et phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate), ceci a pour effet de façonner la cavéole et d'entraîner l'invagination de la membrane et la stabilisation du complexe. En plus de ces lipides, la composition des cavéoles est très similaire à celles des radeaux lipidiques, avec des quantités importantes de sphingolipides et de cholestérol. On retrouve également une concentration accrue de gangliosides (GM1 et GM3).

Les cavéoles semblent être essentielles à la régulation des fonctions cellulaires via leur influence sur des récepteurs membranaires. Les cavéoles contiennent des protéines de signalisation spécifiques incluant les protéines Ras, les protéines G, les récepteurs de facteurs de croissance mais aussi les intégrines. Elles contrôlent le niveau de cholestérol libre dans les cellules affectant donc des processus de signalisation. Elles semblent aussi être des transporteurs de nutriments tels que le glucose et les AG pour leur permettre de traverser la membrane plasmique mais ce mécanisme est méconnu. Elles peuvent avoir un rôle de réparation de dommages membranaires en réponse à des stress physiques, étant en quelque sorte des réservoirs à composants qui peuvent s'évagner sous l'action de stress

mécanique. La dissociation des cavéoles est un processus impliquant la restructuration des cavéolines, des ubiquitinations, des internalisations et finalement des dégradations (Martinez-Outschoorn et al., 2015).

Le rôle pro-tumoral ou tumeur suppresseur de la cavéoline 1 est complexe puisqu'il semble dépendre du type de la tumeur et de la progression tumorale ainsi que des partenaires de la cavéoline 1. Un exemple spécifique démontrant l'importance des partenaires d'interaction de la cavéoline 1 est l'interaction CAV1/E-cadherin à la membrane plasmique. Dans des cellules cancéreuses primaires où l'E-cadhérine est généralement exprimée, CAV1 a des fonctions anti-prolifératives et pro-apoptotiques en inhibant la survivine. A l'inverse dans des cellules à fort pouvoir métastatique de colon ou de mélanome, l'E-cadhérine est fortement inhibée, dans ce cas CAV1 perd sa capacité anti-tumorale (Parton and Simons, 2007).

L'absence des cavéoles semble créer un microenvironnement catabolique dans les tumeurs, favorisant le métabolisme oxydatif et contribuant à une faible survie globale des patients (Martinez-Outschoorn et al., 2015). Un haut niveau d'expression de la cavéoline 1 semble essentiel pour la progression tumorale à un stade de mélanome primaire (Felicetti et al., 2009). Néanmoins, à un stade métastatique la perte de la cavéoline 1 est associée à une faible survie globale des patients atteints de mélanome et cancer du pancréas (Wu et al., 2011).

## **C. SPHINGOLIPIDES ET MÉLANOME**

Le rôle du métabolisme des sphingolipides dans le cadre du mélanome est encore méconnu. Peu d'études sont référencées. Pourtant, des altérations de ce métabolisme sont associées aux mélanomes. Le ciblage de ces lipides ainsi que des enzymes permettant leur génération semble pertinent pour améliorer les traitements existants contre le mélanome cutané.

### **C.1 Glucosylcéramidases**

La  $\beta$ -glucocérobrosidase 2 (GBA2, aussi appelée  $\beta$ -glucosidase acide) possède une activité glucosylcéramidase permettant la conversion de GlcCer en céramide. L'activité de cette enzyme est inhibée dans les mélanomes en comparaison aux mélanocytes. Ceci résulte en une accumulation du substrat GlcCer et une diminution des céramides dans les cellules tumorales. Cette observation est due à des mutations de la région promotrice de GBA2 chez des patients atteints de mélanome. De plus, des patients atteints de la maladie de Gaucher – due à la perte d'activité de GBA1 – ont un risque accru de développer un mélanome (Landgren et al., 2007; Sorli et al., 2013). La maladie de Parkinson a également été associée à des mutations de GBA1. Une étude a montré que les patients atteints de la maladie de Parkinson ont sept fois plus de risque de développer un mélanome (Pan et al., 2011).



## C.2 Céramides synthases

Il existe plusieurs types de céramides qui ont des fonctions biologiques différentes. Les CerS1 et CerS6 génèrent des C18-céramides et C16-céramides respectivement qui ont des rôles opposés concernant l'apoptose et la prolifération. En effet, l'axe CerS1/C18- ceramide conduit à l'apoptose et diminue la progression tumorale (Karahatay et al., 2007; Koybasi et al., 2004; Senkal et al., 2007). De leur côté, les C16-céramide promeuvent la prolifération des cellules tumorales et leur augmentation de concentration dans le sérum des patients est associée à des métastases ganglionnaires (Senkal et al., 2010; Senkal et al., 2011).

Le rôle des céramides synthases a été peu étudié dans le contexte du mélanome. Néanmoins, une étude démontre que l'inhibition de cette CerS6 induit l'expression du transporteur de glucose 1 (GLUT1) qui inhibe l'expression de WNT5A ce qui conduit à une prolifération et une invasion accrue ainsi qu'à une augmentation de la glycolyse (Tang et al., 2016). Ceci va à l'encontre de plusieurs études démontrant que WNT5A est un facteur de croissance stimulant la prolifération et l'invasion des cellules de mélanomes (Da Forno et al., 2008; Weeraratna et al., 2002). C'est pourquoi les auteurs pensent que cette augmentation d'invasion et de prolifération ne passe pas par la voie de signalisation WNT5A. Ainsi, la CerS6 pourrait agir tel un suppresseur de tumeur et sa surexpression pourrait être une option thérapeutique pour le traitement des mélanomes (Tang et al., 2016).

La CerS2 permet la synthèse de céramides à longues chaînes (C22-C24). Cette céramide synthase semble être un gène de prédisposition au mélanome (Amos et al., 2011).

## C.3 Sphingomyélinases

Dans les vaisseaux sanguins, les cellules de mélanomes peuvent s'agréger avec les plaquettes pour former des caillots, adhérer aux cellules endothéliales puis extravaser pour former des niches métastatiques. De façon intéressante, cette interaction entre les cellules de mélanomes et les plaquettes résulte en l'activation de la SMase acide et le relargage de céramides. La pré-incubation de cellules de mélanomes avec de la SMase acide recombinante permet la colonisation de ces cellules dans les poumons, démontrant la nécessité de cette enzyme dans la mise en place de métastases (Becker et al., 2017).

L'expression de la SMase acide est inversement corrélée avec la progression tumorale, c'est-à-dire que l'expression de la SMase acide est forte dans les nævi puis décroissante du stade mélanome primaire à métastatique. Ceci pourrait être en désaccord avec l'étude évoquée précédemment. Néanmoins, on peut imaginer qu'un certain niveau d'expression de SMase acide est requis pour l'établissement des métastases puis qu'une fois celles-ci installées, l'expression de cette enzyme décroît pour permettre la prolifération des tumeurs secondaires (Bizzozero et al., 2014).

Des faibles niveaux d'expression de la SMase acide sont corrélés avec une augmentation de la résistance des cellules à certains traitements comme la cisplatine, la gemcitabine et la doxorubicine (Cervia et al., 2016; Grammatikos et al., 2007; van Hell et al., 2017). La surexpression de la SMase ou l'ajout exogène de SMase recombinante agit en combinaison avec l'irradiation des cellules de mélanomes in vitro et in vivo et induit la mort cellulaire, suggérant que leur utilisation pourrait être envisagée en tant qu'agent anti-néoplasique (Smith and Schuchman, 2008).

#### C.4 Céramides

Les céramides sont considérés comme des lipides suppresseurs de tumeur. Il est maintenant établi que les céramides sont des molécules favorisant la mort cellulaire dans de nombreux cancers. Les céramides peuvent déclencher plusieurs mécanismes de mort cellulaire tels que l'apoptose, la nécroptose, la mort par autophagie ou mitophagie (Baran et al., 2011; Beckham et al., 2013c; Dany et al., 2016; Dany and Ogretmen, 2015; Saddoughi et al., 2013).

Certains stress comme l'hypoxie, l'absence de facteurs de croissance ou des dommages de l'ADN induisent une augmentation des niveaux de céramide dans la cellule (Pettus et al., 2002). Ensuite, les céramides pourront s'associer à des protéines reliées à la mort cellulaire pour induire cette dernière. Concrètement, plusieurs mécanismes ont été étudiés (Cf. Figure 17) :

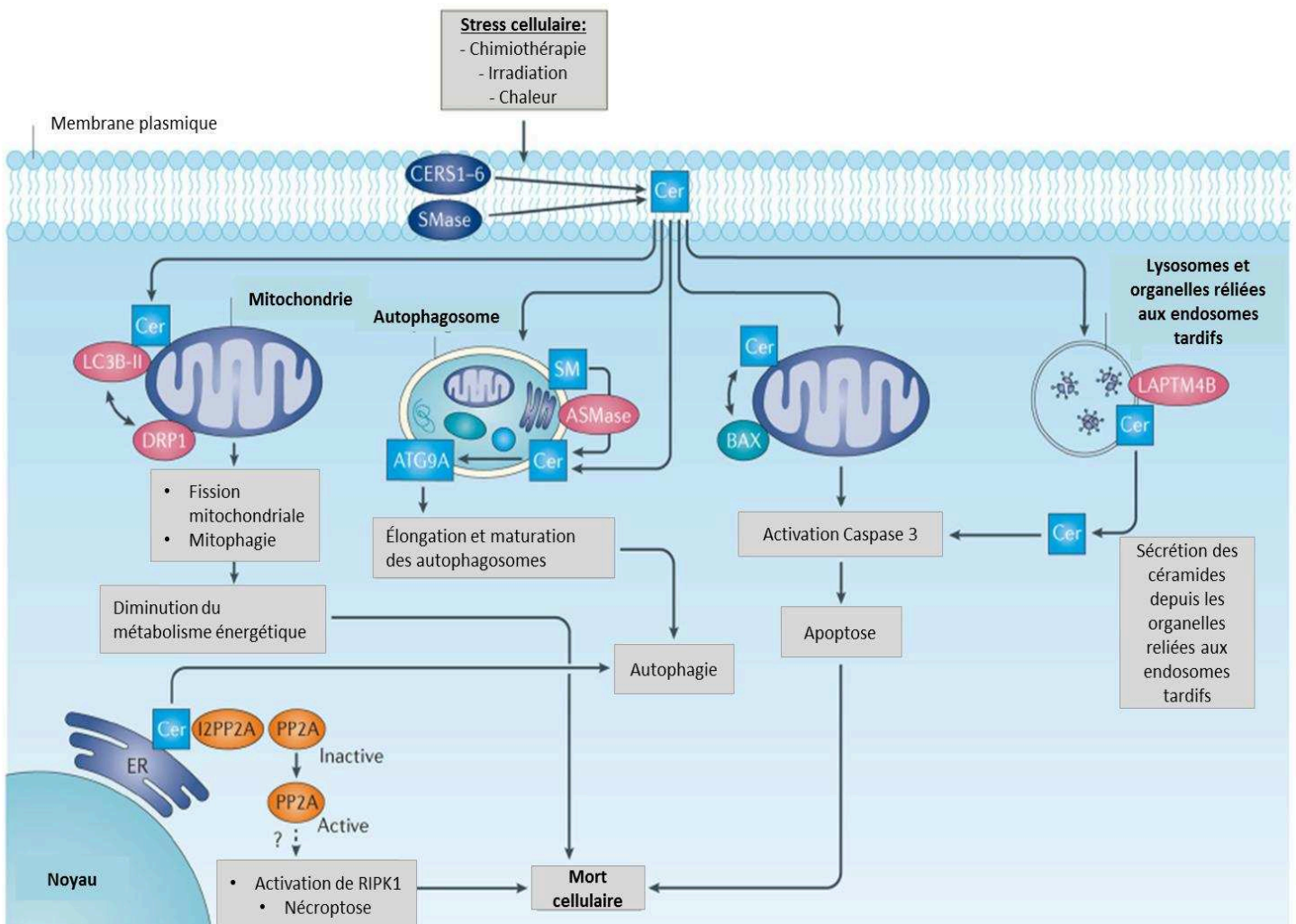
- Les céramides se lient et inactivent l'inhibiteur de la protéine phosphatase 2A (I2PP2A). PP2A étant elle-même une protéine suppresseur de tumeur (Salas et al., 2011; Yeh et al., 2004). PP2A pourra donc être active et inhiber des protéines anti-apoptotiques telles que BCL2 (Mukhopadhyay et al., 2009). FTY720 peut également activer PP2A entraînant la nécroptose dépendante de RIPK1 dans des cellules cancéreuses de poumons (Saddoughi et al., 2013).
- Les céramides peuvent aussi agir sur la télomérase en inactivant c-myc ce qui inhibe l'expression de la télomérase. Ceci aura pour conséquence d'empêcher l'élongation des télomères après chaque réplication entraînant l'entrée en sénescence ou la mort cellulaire (Kravetka et al., 2003; Ogretmen et al., 2001).
- Les céramides s'accumulent dans la membrane mitochondriale ce qui permet le recrutement de BAX à la mitochondrie et conduit à la perméabilisation membranaire, l'activation des caspases et l'apoptose en réponse aux irradiations (Chipuk et al., 2012).
- De plus, la régulation du transport des céramides depuis les organelles reliées aux endosomes tardifs grâce à la protéine transmembranaire associée au lysosome 4B (LAPTM4B) stabilise les membranes lysosomales et entraîne l'activation de la caspase 3 et l'apoptose médiée par les céramides en réponse à la chimiothérapie (Blom et al., 2015).
- En réponse aux inhibiteurs de tyrosine kinase ou à la chimiothérapie, les céramides se localisent dans les mitochondries des cellules tumorales et servent de molécule d'ancrage à la protéine reliée à

l'autophagie LC3B-II permettant le recrutement des autophagosomes entraînant la mitophagie. Cette localisation des céramides aux mitochondries est permise par l'activation de la dynamin-related protein 1 (Drp1) entraînant la fission mitochondriale (Dany et al., 2016; Dany and Ogretmen, 2015).

- L'autophagie des cellules tumorales est induite par les céramides du RE entraînant la perméabilisation des membranes autophagosomales et lysosomales permettant le relargage de la cathépsine et donc l'apoptose dans des gliomes (Hernandez-Tiedra et al., 2016).

- L'hydrolyse des SM permettant la génération des céramides via la SMase acide promeut l'élongation et la maturation des membranes des autophagosomes via le recrutement d'ATG9A (autophagy-related protein 9A), suggérant un rôle des céramides dans l'initiation de la formation des autophagosomes (Corcelle-Termeau et al., 2016).

- Pour finir, l'ajout de céramides à chaînes courtes (C6) entraîne la diminution d'expression des intégrines  $\beta 1$ ,  $\beta 4$  et  $\alpha V\beta 6$  à la surface de la membrane plasmique (Morad et al., 2016). Ceci réduit l'adhérence, la migration et le pouvoir métastatique des cellules de mélanomes.



**Figure 17 : Signalisation intracellulaire des céramides dans des cellules cancéreuses et leur effet tumeur suppressueur**

En réponse aux stress cellulaires, le niveau de céramide intracellulaire augmente grâce aux CERS et aux SMases ce qui résulte en la mort cellulaire et la suppression tumorale régulée par de multiples

mécanismes impliquant des cibles directes et indirectes des céramides. Figure adaptée de (Ogretmen, 2018).

Dans le contexte du mélanome cutané, quelques études ont confirmé que l'augmentation de céramides est requise pour induire la mort cellulaire et une meilleure réponse aux traitements. L'ajout de C6-céramide dans 5 lignées cellulaires de mélanome est cytotoxique et anti-prolifératif. En effet, les C6-céramide induisent une apoptose dépendante des caspases en activant la protéine phosphatase 1 (PP1) (Jiang et al., 2016). Un court traitement (30 minutes) par ces mêmes céramides réduit l'expression des intégrines, active la PI3K et la PKC $\zeta$  conduisant à la suppression de la migration cellulaire et la diminution de l'extravasation des cellules tumorales (Zhang et al., 2015).

Concernant l'implication de la céramidase acide dans le mélanome je l'aborderais en détail dans le chapitre suivant.

### **C.5 Sphingosines kinases, S1P et ses récepteurs**

Contrairement aux céramides, le traitement de cellules de mélanomes avec de la S1P inhibe la mort cellulaire induite après un traitement par une drogue. Cette protection est associée à une expression accrue de BCL2 et est due à une réduction de la perméabilisation de la membrane externe mitochondriale (Bektas et al., 2005). Cependant, cet effet peut être prévenu en pré-traitant les cellules de mélanomes avec des C6-céramides (Zou et al., 2016). Dans des stades avancés de mélanomes, on retrouve une activité élevée de sphingosine kinase 1 (SK1) liée à une augmentation des niveaux de S1P cellulaires. En inhibant la SK1 par une approche siRNA il est possible d'inhiber la prolifération et d'induire l'apoptose dans des cellules de mélanomes. Ce phénomène est permis grâce à la réduction de pAKT et de la cycline D1 et une augmentation d'expression de p21 et de la caspase-3 clivée (Madhunapantula et al., 2012). Il en est de même avec l'inhibiteur de la SK1 (SK1-I) qui diminue le niveau cellulaire de S1P, augmente celui des céramides, entraîne un blocage du cycle cellulaire en G2-M et induit l'apoptose. De plus, une expérience d'allogreffe réalisée avec des B16F10 avec un traitement anticorps anti-S1P bloque la progression tumorale via l'inhibition de VEGF et bFGF qui ne peuvent donc stimuler les cellules endothéliales (Visentin et al., 2006). De façon intéressante, une étude a montré que les mutations oncogéniques BRAF<sup>V600E</sup> et NRAS<sup>Q61L</sup> qui activent la voie MAPK conduisent également à l'augmentation d'expression et d'activité de la SK1 (Albinet et al., 2014). Ces résultats suggèrent que cibler la SK1 dans le mélanome pourrait être une thérapie à envisager.

L'analogue de sphingosine FTY720 -qui agit en tant que puissant agoniste des récepteurs S1PR en induisant leur internalisation et leur dégradation-, provoque la mort cellulaire par nécrose et autophagie via un mécanisme semblant impliquer l'activité des V-ATPases (Tay et al., 2015). Il permet également de réduire la progression tumorale en inhibant l'angiogenèse (LaMontagne et al., 2006). Enfin dans une autre étude, FTY720 réduit la viabilité et permet l'expression de marqueurs

apoptotiques dans des lignées cellulaires de mélanomes résistantes à la cisplatine (Ishitsuka et al., 2014).

Une étude récente a montré que l'alpinumisoflavone, un flavonoïde issu d'une plante nommée *Derris eriocarpa* a des effets anti-métastatiques sur les cellules de mélanome. L'ajout de ce composé va augmenter le miR-124 qui inhibe la SK1 et cela réduit l'expression de COX2. In vitro ceci conduit à une inhibition de l'adhérence cellulaire, la migration et l'invasion cellulaire. Dans un modèle de souris in vivo, cette drogue supprime les métastases pulmonaires (Gao et al., 2017).

Les sphingosines kinases jouent d'autres rôles dans la pathologie du mélanome.

Par exemple, l'inhibition de la SK1 induit la réponse immunitaire dans un mélanome. L'infiltrat de macrophages M2 est souvent de mauvais pronostic, or, lorsqu'on inhibe la SK1 cela réduit le pourcentage de ces derniers dans l'infiltrat immunitaire en faveur des M1. L'infiltration des macrophages M1 permet le recrutement des lymphocytes T et donc le rejet de la tumeur. Cette étude implique la SK1 dans le recrutement des macrophages dans la tumeur (Mrad et al., 2016).

Le stroma ou microenvironnement tumoral est constitué de cellules normales d'origine mésenchymateuse, incluant des fibroblastes, des cellules endothéliales, des cellules inflammatoires (macrophages, neutrophiles, lymphocytes), des cellules souches mésenchymateuses et des adipocytes qui sont inclus dans une matrice extracellulaire (MEC). Les fibroblastes associés à ce stroma sont appelés des fibroblastes associés aux cancers (CAFs ou encore myofibroblastes) qui sécrètent des facteurs de croissance, des composants de la MEC (collagène, fibronectine...) et des MMPs. La SK1 facilite également les échanges entre les cellules de mélanomes et les CAFs dans une métastase. Une étude indique que le milieu conditionné de cellules de mélanomes invalidées pour SK1 ajouté sur des fibroblastes dermiques les convertit en CAFs entraînant l'augmentation d'expression de MMP-2, MMP-9 et de SK1 avec un relargage de protéases et de S1P. Cette conversion s'effectue via l'activation de la voie TGF- $\beta$  qui est un régulateur positif de la SK1 (Yamanaka et al., 2004).

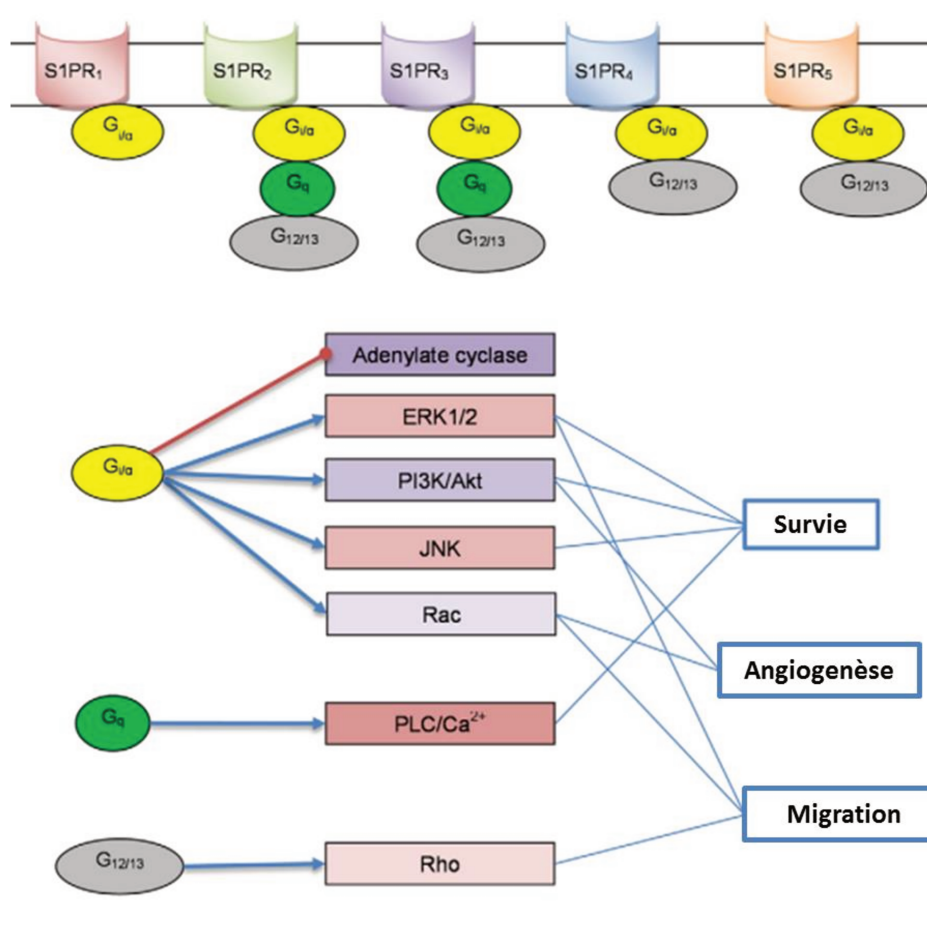
En effet, l'expression de la SK1 dans les CAFs promeut la dissémination des cellules de mélanomes de façon S1P-dépendante via le S1PR3 (Albinet et al., 2014). Néanmoins, une étude présente des résultats opposés où la S1P peut inhiber la migration de B16F10. Cette inhibition passe par le S1PR2 puisque la surexpression de ce récepteur favorise le blocage de la migration (Arikawa et al., 2003). Une autre étude a confirmé ces résultats liés au S1PR2 puisqu'une inactivation totale de S1PR2 in vivo augmente la progression tumorale et l'angiogenèse (Du et al., 2010). Ces résultats démontrent que l'effet des S1P est dépendant du récepteur sur lequel elles se fixent (Cf. Figure 18), c'est pourquoi ces différents récepteurs méritent une étude approfondie pour comprendre comment les moduler afin de permettre un traitement efficace du mélanome. De façon intéressante, une expérience in vivo a prouvé que l'absence de S1P dans le microenvironnement tumoral empêche la prise tumorale en xénogreffes

et la colonisation pulmonaire suite à une injection dans la veine caudale. La S1P est donc nécessaire à l'exécution de ces processus tumoraux (Albinet et al., 2014; Ponnusamy et al., 2012).

A noter que l'effet de la sphingosine kinase 2 (SK2), localisée principalement dans le noyau, est complètement méconnu dans le mélanome.

Récemment, un criblage de plus de 810 lignées de souris mutées a été effectué afin de déterminer des nouveaux régulateurs du processus de colonisation métastatique. La plus grosse réduction de métastases pulmonaires a été constatée chez des souris mutantes pour le gène SPNS2 (S1P transporteur spinster homologue 2). SPNS2 est un transporteur de S1P permettant d'acheminer le S1P intracellulaire à l'extérieur de la cellule de façon S1PR-indépendante. La délétion de SPNS2 entraîne une lymphopénie circulante avec une accumulation des lymphocytes T et des lymphocytes NK (natural killer) dans les poumons. Ceci permet une élimination efficace des cellules tumorales et une diminution globale des métastases chez la souris (van der Weyden et al., 2017).

En conclusion, mon travail de thèse réalisé en collaboration avec l'équipe du Pr. Levade et du Dr. Andrieu-Abadie, a permis de montrer que le traitement au vémurafénib induisait une forte diminution des S1PR1 et S1PR3 dans des cellules sensibles à ce traitement ce qui n'est pas le cas des cellules résistantes. L'augmentation du ratio céramide/S1P via un traitement au SK1-I ou la surexpression de la SPL permet une diminution des S1PR et une re-sensibilisation des cellules de mélanome résistantes au traitement (Garandau et al., 2019).



**Figure 18 : Signalisation intracellulaire des récepteurs à S1P (S1PR)**

La S1P se lie à ses récepteurs et active les protéines G liées aux S1PR (i.e. Gi, Gq, G12/13). Les protéines G ainsi activées déclenchent les voies de signalisation en aval telles que la voie Rho, JNK, AKT/ERK, PLC/CA2<sup>+</sup> et l'adénylate cyclase. Adapté de Patmanathan et al. 2017.

### C.6 Gangliosides

Une augmentation de gangliosides a été observée dans les cellules de mélanomes. Certains gangliosides sont même considérés comme des antigènes spécifiques au mélanome. On les retrouve également augmentés dans le sérum de patients atteints de mélanome. Ce qui pourrait donc en faire des marqueurs prédictifs d'une mauvaise évolution de la pathologie (Nicolae et al., 2011).

### C.7 Inhibiteurs de sphingolipides et essais cliniques dans le mélanome

De nombreuses études utilisant des analogues de céramides exogènes ou des agents mimant leurs effets ont été réalisées pour induire la mort cellulaire dans plusieurs types de cellules cancéreuses. Plusieurs modifications ont été apportées à la structure et à la méthode de transport de ces molécules jusqu'à la cellule afin d'optimiser leur efficacité.

Par exemple, l'ajout d'un cycle pyridine à la base sphingoïde augmente la solubilité dans l'eau et dans la membrane, et permet l'accumulation de ces analogues dans la mitochondrie chargée négativement

et/ou dans le noyau des cellules cancéreuses (Dany et al., 2016). De plus, cela permet de cibler spécifiquement les mitochondries des cellules cancéreuses puisqu'elles sont chargées plus négativement que les mitochondries issues de cellules saines (Modica-Napolitano and Aprille, 2001). Les Pyr-Cer ciblent donc préférentiellement les cellules malignes avec une toxicité moindre dans les cellules saines.

D'autres analogues ont été générés tels que le C16-sérinol, la 4,6-diene-ceramide, l'adamantyl-ceramide, benzene-C4-céramide... Tous sont capables d'induire l'apoptose dans différents types de cellules cancéreuses. De plus, le traitement des cellules avec ces analogues résulte en la genèse de céramides endogènes à longues chaînes via la voie de recyclage ce qui rajoute des effets anti-cancéreux post-traitement (Bieberich et al., 2000; Crawford et al., 2003; Struckhoff et al., 2004).

Pour l'acheminement de ces analogues à la cellule, la génération de liposome permet de franchir la membrane plasmique plus aisément et permet donc une plus forte accumulation de céramides dans la cellule (Stover and Kester, 2003). L'ajout de ces liposomes sur les cellules empêche la phosphorylation d'AKT et stimule de l'activité caspase 3/7 de façon plus efficace qu'un ajout de céramides exogènes libres sur la cellule. Les liposomes sont également effectifs dans un modèle in vivo où ils permettent de réduire la croissance tumorale dans des modèles murins de cancer du sein (Stover et al., 2005).

D'un autre côté des approches ont été développées pour cibler les enzymes SK et les S1P en tant qu'approche thérapeutique. Il existe des inhibiteurs non spécifiques comme :

- le N, N-diméthylsphingosine (DMS) qui a des propriétés anti-tumorales dans des lignées de cellules cancéreuses et dans des souris immunodéficientes mais les effets secondaires sont la toxicité au niveau du foie et l'hémolyse.
- la L-threodihydrosphingosine (Safingol) qui est en phase 1 d'essai clinique pour les cancers de la prostate et ovariens.

Enfin, le SK1-II présente également des effets anti-tumoraux in vivo (De Luca et al., 2005; Gamble et al., 2006; Kedderis et al., 1995).

Il existe un inhibiteur spécifique de SK1 qui est le SK1-I ayant des effets anti-tumoraux in vivo et in vitro via l'inhibition des niveaux de S1P (Nagahashi et al., 2012; Paugh et al., 2008).

Pour finir, un anticorps monoclonal contre la S1P (Sphingomab) a été développé, il est efficace pour neutraliser les S1P et a des effets anti-cancéreux dans de nombreux modèles comme le cancer du sein, des ovaires, des poumons et les mélanomes (Ponnusamy et al., 2012). Le sphingomab peut neutraliser l'angiogenèse induite par le VEGF et est actuellement en phase 1 ou 2 d'essai clinique pour des maladies de dégénérescence maculaire et quelques types de cancers (Sabbadini, 2011).



<b>Composé</b>	<b>Cible/Mécanisme d'action</b>	<b>Statut</b>	<b>Type de cancer ciblé</b>
<b>Pyridinium ceramides</b>	Accumulation mitochondriale	In vitro	Cancer des poumons, du sein et mélanome
<b>C16-serinol</b>	Analogue des céramides	In vitro	Cancer du sein
<b>4,6-diene-ceramide</b>	Analogue des céramides	In vitro	Neuroblastome
<b>Nanoparticules de céramides</b>	Liposomes favorisant la pénétration des céramides dans la cellule	In vivo et in vitro	Cancer du sein et leucémie
<b>D-MAPP</b>	Inhibiteur de céramidase	In vitro	Carcinome à cellules squameuses
<b>B-13</b>	Inhibiteur de la céramidase acide	In vitro	Cancer de la prostate et du colon
<b>Diméthyl-sphingosine</b>	SK1, SK2	In vivo et in vitro	Leucémie, cancer du colon, du sein et mélanome
<b>Safingol</b>	SK1, SK2	Phase 1	Tumeurs solides
<b>SK1-II</b>	SK1, SK2	In vivo et in vitro	Cancer du sein
<b>Phenoxodiol</b>	SK1, SK2	In vivo et in vitro	Cancer des ovaires et de la prostate
<b>SK1-I</b>	SK1	In vivo et in vitro	Glioblastome, cancer du sein, la leucémie myéloïde aigue et le mélanome
<b>FTY-720</b>	S1PR1, I2PP2A	In vivo et in vitro AMM pour la sclérose en plaques	Cancer de la vessie, de la prostate, du sein, lymphome et mélanome
<b>VPC03090</b>	S1PR1 et S1PR3	In vivo et in vitro	Cancer du sein
<b>Sphingomab</b>	S1P	Phase 1/2	Cancer des poumons, du sein, des ovaires et mélanome

**Tableau 2:** Description des différents traitements ciblant des sphingolipides dans le traitement de plusieurs types de cancers. Adapté de Dany, 2017.

## D. SPHINGOLIPIDES ET MITF

### D.1 Effets des S1P sur MITF

Une expérience utilisant des B16F10 traitées avec des fractions riches en lipides provenant de placentas humains a démontré que cela conduit à la production de mélanine en induisant l'expression de la tyrosinase. Une analyse par spectrométrie de masse MALDI-TOF a permis de confirmer la présence de sphingosine et S1P ainsi que d'acide palmitique (C16 :0) et de l'acide oléique (C18 :0). Cette fraction du placenta riche en lipides induit l'activation de la voie p38 MAPK aboutissant à la phosphorylation de CREB qui active MITF et ses gènes cibles (Saha et al., 2006; Singh et al., 2005).

De façon intéressante, une application topique d'une fraction purifiée de sphingolipides sur des souris C57BL/6J âgées et grises présentant une forte diminution d'expression de MITF permet d'inverser le phénotype en conduisant à la repousse de poils noirs avec des mélanocytes différenciés présentant une forte expression de MITF (Saha et al., 2009). Cette observation suggère que certains sphingolipides seraient capables d'activer l'expression de MITF dans des cellules de mélanome. Cependant, l'addition de S1P sur des cellules murines immortalisées Mel-Ab cause une diminution de la synthèse de mélanine par une activation de la voie ERK, la phosphorylation de MITF sur sa S73 et sa dégradation au protéasome. Cet effet a été associé à la diminution d'expression de TYR et TRP1 médiée par l'activation du S1PR3 (Kim et al., 2003).

L'effet du FTY-720 a également été étudié dans le processus de pigmentation à l'aide des Mel-Ab. FTY-720 est capable de diminuer la pigmentation de façon dose dépendante et ce de façon indépendante de la signalisation S1P. En effet, l'ajout de FTY-720 diminue l'expression de MITF et ses cibles sans activation de la voie MAPK. Néanmoins, une diminution d'expression de  $\beta$ -caténine (au niveau des ARNm et protéique) a été constatée indiquant que FTY-720 pourrait inhiber MITF via la voie Wnt (Lee et al., 2011).

Enfin une étude récente réalisée avec mon laboratoire a permis de montrer l'implication des S1PR dans la résistance au vémurafénib. Lorsque les cellules de mélanomes sensibles sont traitées au vémurafénib l'expression des S1PR1 et S1PR3 diminue de même que l'expression de MITF et BCL2, ce n'est pas le cas dans les cellules résistantes. L'augmentation du ratio céramide/S1P via un traitement au SK1-I ou la surexpression de la SPL permet une diminution des S1PR et une re-sensibilisation des cellules de mélanome résistantes au traitement (Garandau et al., 2018). De plus, il a été mis en évidence un changement du contenu en sphingolipides plasmatiques chez des patients atteints de mélanome. Chez des patients répondeurs au vémurafénib on retrouve une augmentation des C24-céramides. Néanmoins, il n'existe pas d'étude suivie au cours de la progression du mélanome sur le contenu des SL et ceci mériterait d'être réalisé pour améliorer la compréhension du contenu des SL et de leur effet au cours de la tumorigénèse, et à terme améliorer la réponse aux thérapies actuelles.

## D.2 Effet des céramides et enzymes associées sur MITF

L'ajout de C2-céramides exogènes sur des mélanocytes diminue la synthèse de mélanine. Ceci est dû à une inhibition de l'expression de MITF. Concrètement, l'ajout de C2-céramides entraîne un retard d'activation de la voie ERK (>1h) et une activation encore plus tardive de la voie AKT/PKB (>3h) (Kim et al., 2002).

D'un autre côté, la SMase acide réprime l'expression de MITF. A des stades tardifs de progression du mélanome la SMase acide est inhibée et l'expression de MITF augmente. La SMase acide régule MITF via la voie MAPK grâce à la phosphorylation de MITF et son envoi au protéasome. La faible expression de la SMase acide et la forte expression de MITF ainsi que de ses cibles BCL2, CDK2, TYR et c-Met stimulent la prolifération des cellules de mélanome (Bizzozero et al., 2014).

L'étude de Ploper évoquée dans le chapitre précédent a mis en évidence une corrélation entre l'expression d'ASAH1 (N-Acyl Sphingosine AmidoHydrolase 1), la céramidase acide catalysant les céramides en sphingosines et l'expression de MITF. Mon travail de thèse a permis de démontrer qu'ASAH1 est une cible de MITF, et qu'une inhibition par siRNA dirigé contre MITF diminue les niveaux intracellulaires de sphingosines. Ces résultats relient pour la première fois MITF au métabolisme des sphingolipides de façon directe. L'inhibition d'ASAH1 dans des cellules de mélanomes entraîne une diminution de la prolifération due à une entrée en sénescence ainsi qu'une augmentation de la migration des cellules via une augmentation d'expression des intégrines  $\alpha V\beta 5$  et de la phosphorylation de FAK (Leclerc et al., 2018; Ploper et al., 2015)

## Chapitre 4. ASAH1, la céramidase acide comme nouvelle approche thérapeutique

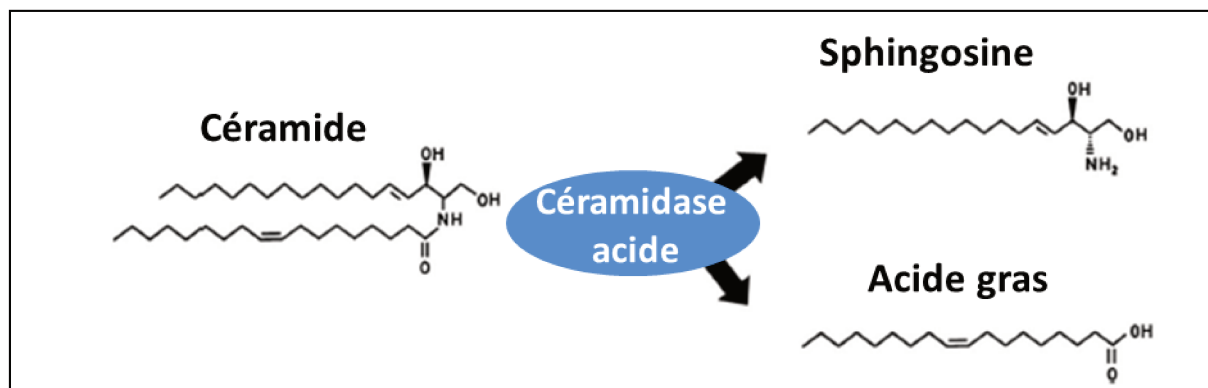
### A. GÉNÉRALITÉS

L'Homme possède cinq céramidases différentes, classées selon leur pH optimal (alcaline, neutre et acide), leur localisation cellulaire, leur structure primaire et leur fonction. La céramidase neutre (nCDase/ASAH2) est importante pour le catabolisme et la digestion des sphingolipides intestinaux, elle régule les métabolites du tractus intestinal. Il existe trois céramidases alcalines (ACER1, ACER2, et ACER3) qui ont des rôles dans la différenciation cellulaire, l'apoptose résultant des dommages à l'ADN et la prolifération cellulaire. Quant à la céramidase acide (aCDase ; ASAH1), elle représente la céramidase la plus étudiée de cette famille et est localisée dans les lysosomes où elle régule le métabolisme des sphingolipides dans la membrane interne de ces organelles.

La céramidase acide (aCDase) aussi appelée ASAH1 pour N-acyl sphingosine amidohydrolase 1 est la première céramidase découverte en 1966 (Gatt, 1966) dans des extraits de cerveau de rat. Cette découverte a défini que cette enzyme permettait l'hydrolyse de la liaison amide des céramides générant de la sphingosine et un acide gras (Cf. Figure 19). La céramidase acide possède un pH optimal de 4,5 ce qui permet de catalyser l'hydrolyse des céramides en sphingosines et acides gras (Mao and Obeid, 2008). L'enzyme a été purifiée 32 ans plus tard en 1995 et identifiée comme un hétérodimère composé d'une sous-unité  $\alpha$  (13kDa) et d'une sous-unité  $\beta$  (40kDa) (Bernardo et al., 1995). Le gène ASAH1 a été cloné en 1996 à partir de fibroblastes humains et de bibliothèques d'ADNc hypophysaires donnant un ADNc de 2330 paires de bases (pb) et une protéine de 395 acides aminés (Li et al., 1999). Cinq ans plus tard, la même équipe a montré que la biosynthèse de l'aCDase débute par la production d'un précurseur de 53 kDa (Ferlinz et al., 2001). Cette étude a identifié la présence de sites de glycosylation sur la sous-unité  $\beta$ . De façon intéressante, l'aCDase semble pouvoir catalyser la réaction inverse, suggérant l'utilisation d'AG (avec des chaînes en C12) et de sphingosine pour produire des céramides. Cette réaction a un pH optimal plus élevé de 6 au lieu de 4,5 (Okino et al., 2003).

La céramidase acide est localisée dans les lysosomes et est ubiquitaire même si son expression est beaucoup plus élevée dans le cœur, les reins et plus faiblement dans le placenta, les poumons et les muscles squelettiques (Li et al., 1999). Les enzymes lysosomales sont en général transloquées dans le lumen du RE puis transportées dans le Golgi et sont soumises à plusieurs modifications post-traductionnelles. L'une d'entre elles permet la liaison d'un résidu mannose 6-phosphate (M6P) au précurseur de l'enzyme et est nécessaire pour l'adressage de ces enzymes aux endosomes/lysosomes. Cet adressage s'effectue via le récepteur au mannose 6-phosphate (M6PR). En effet, des résidus M6P se lient au M6PR dans le Golgi permettant l'adressage aux compartiments acides de la cellule.

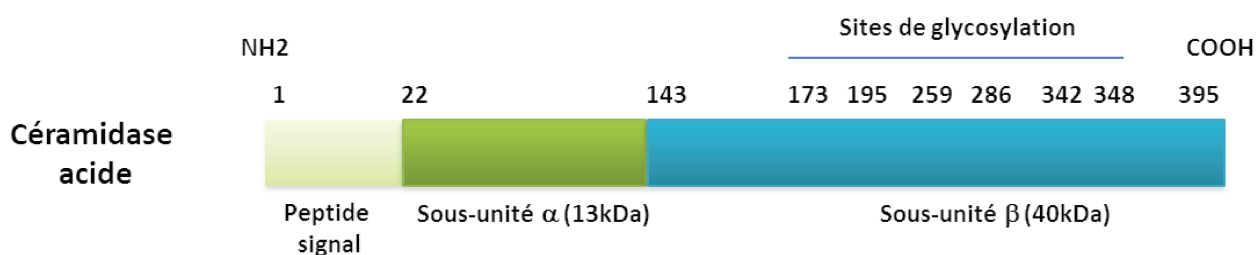
L'absence ou la malformation de ces résidus évite l'adressage correct à ces organelles et conduit à la sécrétion des protéines lysosomales dans le milieu extracellulaire (Ferlinz et al., 2001).



**Figure 19** : Schéma représentant la réaction d'hydrolyse du céramide par la céramidase acide (ASAHI) résultant en deux produits : la sphingosine et un acide gras libre. Adapté de Yu et al. 2018.

La céramidase acide est une enzyme glycosylée de 50kDa appartenant aux hydrolases N-terminal nucléophiles (Ntn). Ces protéines sont synthétisées sous la forme de proenzymes inactives qui sont activées grâce à un clivage autoprotéolytique d'une liaison peptidique interne (Pei and Grishin, 2003; Schulze et al., 2007). Ce clivage autoprotéolytique se produit sur la liaison peptidique précédant la cystéine 143 générant une enzyme hétérodimérique mature (Shtraizent et al., 2008). La nouvelle extrémité N-terminale de la sous-unité  $\beta$ , au niveau de la cystéine 143, semble être responsable de l'hydrolyse des substrats de l'aCDase, les céramides. Néanmoins, le mécanisme par lequel cet autoclivage permet l'activité catalytique de l'enzyme est méconnu.

La céramidase acide a besoin de la protéine Saposine D pour une activité enzymatique optimale (Azuma et al., 1994). Les saposines sont des petites protéines lysosomales qui possèdent une poche globulaire permettant de prendre en charge des lipides, de les extraire de la membrane pour conduire à leur catabolisme par des hydrolases (Ahn et al., 2003). Cependant, une étude récente a démontré qu'aucune interaction directe ne peut se faire entre ASAHI et la saposine D (Gebai et al., 2018). Une autre étude suggère que la saposine D pourrait être impliquée dans la rupture de la membrane pour faciliter l'accès aux céramides par les aCDases (Ciaffoni et al., 2003).



**Figure 20** : Schéma représentant l'organisation des différents domaines de la céramidase acide. Adapté de Coant et al. 2016.

## B. RÉGULATION

Lorsque la céramidase acide est une enzyme maturée il existe de nombreuses façons d'influencer son activité, via le pH, les ions, les lipides et d'autres protéines.

### B.1 Régulation transcriptionnelle

Le gène de la céramidase acide humaine s'étend sur 30kb comprenant 14 exons et 13 introns et son locus se situe sur le chromosome 8 (8p21.3-22). L'ARNm quant à lui s'étend sur 2,4kb. Comme énoncé précédemment la région promotrice putative de l'aCDase humaine a été caractérisée grâce à son clonage par Li et al (Li et al., 1999).

Il a été démontré qu'elle contient des séquences de liaison consensus de plusieurs facteurs de transcription incluant AP-2, SP-1 et NF- $\kappa$ B (Park and Schuchman, 2006). Un essai luciférase effectué par cette même équipe, a permis de prouver que la région promotrice entre -297pb et -154pb est essentielle pour l'activité promotrice d'ASAH1 et qu'une région de 34pb riche en GC peut se lier à KLF6, SP-1 et AP-2. KLF6 fait partie de la famille KLF et est un facteur de transcription contenant trois domaines à doigt de zinc à la fin de son domaine C-terminal, ce qui lui permet de se lier aux régions riches en GC sur les promoteurs de ses gènes cibles. Cette famille de facteurs de transcription est impliquée dans la prolifération et la différenciation cellulaire. KLF6 est un régulateur positif d'ASAH1 (Park and Schuchman, 2006). Ces expériences ont été réalisées dans des NIH3T3 qui sont des fibroblastes murins puis confirmés dans des cellules humaines de glioblastome et de cancer ovarien.

Dans des cellules de carcinome surrénalien humain (H295R), une équipe a mis en évidence que l'activation de la voie de signalisation ACTH induit le recrutement de CREB sur de multiples régions du promoteur d'ASAH1. Ensuite, CREB promeut le recrutement des coactivateurs CBP et p300 sur ces régions permettant la régulation positive d'ASAH1. Cette activation transcriptionnelle est accompagnée d'une augmentation de la triméthylation de la lysine 4 sur l'histone H3 (H3K4) le long du promoteur d'ASAH1 (Lucki and Sewer, 2009).

Dans un modèle de cancer du sein (lignée cellulaire MCF-7), les auteurs ont démontré que la génistéine – qui est un isoflavone présentant des effets agonistes et antagonistes sur la prolifération cellulaire des MCF-7 dépendantes aux oestrogènes – active GPR30 (une protéine couplée aux protéines G), qui conduit à la cascade de signalisation c-Src et MAPK via la  $G\alpha_i$ . L'activation de la voie MAPK permet la phosphorylation du récepteur à l'oestrogène  $\alpha$  ( $ER\alpha$ ) et son recrutement sur le promoteur d'ASAH1. Cette cascade permet l'induction de la transcription d'ASAH1 et une

augmentation d'expression protéique associée à une augmentation de la prolifération cellulaire de ces cellules cancéreuses (Lucki and Sewer, 2011).

Dans des cellules de cancer du colon (HT29) la surexpression de la CerS6 induit une augmentation des C16-céramides associée à de l'apoptose. De plus, une augmentation de sphingosine intracellulaire associée à une augmentation d'expression d'ASAHI a été observée. Cette augmentation d'expression et d'activité de l'enzyme peut être inhibée grâce à un inhibiteur pharmacologique de JNK. Un essai luciférase a permis de démontrer que la CerS6 est bien capable d'induire la transcription d'ASAHI de façon dépendante à la voie JNK (Tirodkar et al., 2015).

Dans des cellules cancéreuses de colon (HCT 116), l'expression d'ASAHI est inversement corrélée à l'activité de la protéine p53 suggérant qu'ASAHI pourrait être régulée de façon p53-dépendante (Klobucar et al., 2018). Des observations similaires avaient déjà été faites par une équipe ayant démontré que l'inhibition pharmacologique d'ASAHI par N-oléylethanolamine (NOE) dans les carcinomes squameux de la tête et du cou (HNSCC) augmente l'expression de p-p53 et donc de son activité renforçant la possibilité d'une régulation d'ASAHI par p53 (Roh et al., 2016).

Pour finir, mon travail de thèse a permis de démontrer que dans plusieurs lignées cellulaires de mélanome, MITF est capable d'induire la transcription d'ASAHI en se liant directement sur son promoteur permettant son expression et une augmentation de son activité enzymatique (Leclerc et al., 2018). Ceci met en évidence une nouvelle régulation tissu-spécifique d'ASAHI reliant pour la première fois MITF au métabolisme des sphingolipides de façon directe.

## **B.2 Régulation post-traductionnelle**

Après la traduction de l'ARNm, l'aCDase néosynthétisée va subir plusieurs modifications nécessaires pour son adressage, sa stabilité et son activité. La maturation du précurseur depuis le RE jusqu'au Golgi implique l'acquisition de 5-6 N-glycosylations (ajoutant 2kDa par résidu Asparagine) augmentant le poids moléculaire de la protéine de 44 kDa à 53-55kDa (Ferlinz et al., 2001). La protéine maturée pourra ensuite procéder à un clivage auto-protéolytique donnant les deux sous-unités mentionnées précédemment. La sous-unité  $\alpha$  de 13kDa n'est pas glycosylée, c'est la sous-unité  $\beta$  qui possède toutes les N-glycosylations. Trois d'entre elles (les glycosylations en 173, 259 et 352) sont essentielles pour le clivage auto-protéolytique et l'activité de l'enzyme (Bernardo et al., 1995). Les deux sous-unités sont essentielles pour l'activité enzymatique puisque l'expression de la sous-unité  $\beta$  seule n'entraîne aucune activité dans des cellules COS-1 (Li et al., 1999). De plus, une maladie associée à un déficit d'activité de l'aCDase, la maladie de Farber (dont j'expliciterais les symptômes dans un autre sous-chapitre), est due à des mutations d'ASAHI qui se retrouvent sur les deux sous-unités (Park and Schuchman, 2006).

Comme expliqué précédemment, l'ajout de résidus M6P sur l'enzyme dans le Golgi permet l'adressage correct aux vésicules acides permettant le bon fonctionnement de l'aCDase. Lorsque l'enzyme ne peut être maturée à cause de l'absence des résidus M6P par exemple, l'aCDase sera sécrétée, n'ira jamais dans les compartiments acides et gardera sa proforme en monomère de 44 kDa (Bernardo et al., 1995).

A noter, qu'un des moyens de réguler l'activité d'ASAH1 est de moduler l'expression et la localisation de la saposine D qui est un cofacteur activateur d'ASAH1.

### **B.3 Régulation de l'activité ASAH1**

De façon intéressante, une étude a identifié la cystatine SA comme un nouvel inhibiteur d'aCDase. La cystatine Sa est un inhibiteur de cystéines protéases. De multiples expériences ont permis de confirmer que cela n'était pas dû à une inhibition de maturation de l'enzyme mais plutôt à un encombrement stérique. En effet, la cystatine SA semble agir tel un inhibiteur compétitif avec les céramides, empêchant la liaison des céramides dans la poche active (Eliyahu et al., 2011).

Le tamoxifène a de nombreux effets aspécifiques, l'un d'eux est d'inhiber l'activité d'ASAH1. L'ajout de tamoxifène induit une diminution du niveau de sphingosine intracellulaire mais pas de la SIP. Ceci semble être dû à une compensation par l'activité d'autres céramidases (neutres et alcalines). La première démonstration de l'inhibition d'ASAH1 par le tamoxifène a été effectuée dans une lignée cellulaire de cancer du sein mutée p53 (MDA-MB-468) (Morad et al., 2012). D'autres études ont confirmé cet effet dans un large panel de cellules cancéreuses provenant de cancer de la prostate, du sein, du pancréas, du colon et de leucémie (Morad et al., 2013; Morad et al., 2015). Des indices concernant le mécanisme d'action du tamoxifène ont été présentés dans une étude publiée en 2006 (Elojeimy et al., 2006) dans laquelle ce groupe utilise la désipramine. Un anti-dépresseur tricyclique, amphiphilique et agent lysosomotrope similaire à la chloroquine. Ce groupe a montré que l'inhibition de l'aCDase par la désipramine dans les cellules cancéreuses de la prostate (DU145) était due à une dégradation cathépsine B-dépendante des protéines ASAH1. Grâce à cette étude, Morad et al (Morad et al., 2013) ont pu mettre en évidence une perméabilisation membranaire accompagnée par une diminution dose dépendante des protéines ASAH1 lorsque les cellules cancéreuses sont traitées par du tamoxifène. L'inhibition de plusieurs protéases a confirmé que seule l'inhibition de la cathépsine B prévenait l'inhibition d'ASAH1 à la suite d'un traitement par le tamoxifène.

## **C. RÔLE PHYSIOLOGIQUE**

Le clonage du gène ASAH1 a également permis la construction de modèles murins déficients en céramidase acide conduisant à une meilleure compréhension du rôle de cette enzyme.



## C.1 Les réponses apportées par les modèles murins

### Invalidation génique d'ASAH1

Le premier modèle murin étudié était invalidé pour le gène ASAH1 induisant une perte totale d'activité céramidase acide et conduisant à la létalité avant le stade embryonnaire 8.5 (Li et al., 2002). Cette létalité est induite par de l'apoptose des cellules (Eliyahu et al., 2007). L'ajout exogène de S1P est capable de sauver le phénotype ASAH1  $-/-$  et d'éviter la mort par apoptose. Des analyses d'embryons sauvages ont mis en évidence un début d'expression d'ASAH1 au stade 7 jusqu'au stade 17 au moins. Puis grâce à des analyses de cellules uniques, on a pu définir qu'en réalité ASAH1 s'exprime déjà au stade 2 cellules. De plus, l'ajout d'aCDase recombinante dans le milieu de culture est capable de réduire l'apoptose d'œufs non fertilisés de souris, bovins, et humains et augmente la production d'embryons durant une fécondation in vitro (FIV) (Eliyahu et al., 2010).

Un modèle murin de délétion hétérozygote permet une espérance de vie normale avec une accumulation des céramides progressive et lente débutant à 4-6 mois.

L'expression d'ASAH1 est donc essentielle dès les premiers stades embryonnaires. De façon intéressante, de l'aCDase recombinante pourrait être utilisée en supplément de culture pour améliorer la production d'embryons par approche de FIV.

### Invalidation conditionnelle d'ASAH1

Les modèles d'invalidation totale d'ASAH1 n'apportent malheureusement que peu de réponses sur les rôles physiologiques d'ASAH1. C'est pourquoi un modèle d'invalidation inductible par le tamoxifène a été construit (Eliyahu et al., 2012). Les souris sont induites au tamoxifène à cinq semaines, l'expression d'ASAH1 est fortement diminuée dans les ovaires et particulièrement dans les cellules de la thèque ce qui prévient le développement des follicules du stade secondaire au stade follicule De Graaf. Ce phénotype est associé à une diminution d'expression de BCL2 et de l'hormone anti-mullérienne qui expliquent le manque d'ovocytes matures.

### Modèle knock-in de déficit d'ASAH1

Les études les plus récentes ont été effectuées dans des souris knock-in portant les mutations retrouvées dans les lipogranulomatoses, notamment dans la maladie de Farber (Alayoubi et al., 2013). Dans une souris homozygote mutée P362R (correspondant à une mutation retrouvée dans un phénotype de Farber sévère) on retrouve les caractéristiques de cette maladie : un retard de croissance évident à 3 semaines, une perte de poids progressive et la mort entre 7 et 13 semaines. La cause de la mort est inconnue mais plusieurs signes sont observés à ce stade tels qu'une léthargie, une dystrophie générale et une faible préhension des pattes antérieures qui s'aggrave avec l'âge. Le foie, le thymus et les ganglions lymphatiques sont pâles et élargis, les ovaires sont plus petits et contiennent peu de follicules, enfin une augmentation systémique des niveaux de céramides est observée et une grosse

infiltration des macrophages dans les organes (Alayoubi et al., 2013; Dworski et al., 2015). Néanmoins, on ne retrouve pas des nodules sous-cutanés et une inflammation des articulations comme chez les patients atteints de la maladie de Farber ce qui est sûrement dû à une mort précoce. Pour finir, une augmentation systémique de la protéine chimioattractante 1 (MCP-1) aussi appelée CCL2 a été constatée et qui pourrait être à l'origine de la réponse inflammatoire stimulant l'infiltration des macrophages dans les organes (Dworski et al., 2017). La réexpression d'ASAH1 par lentivirus durant les 3 premiers jours de vie de ces souris réduit considérablement les niveaux de CCL2 et permet un sauvetage partiel du phénotype. Ce modèle de souris récapitule la physiopathologie de la maladie de Farber et à ce titre, est prometteur pour le développement futur de thérapies ciblant les maladies lysosomales. Récemment, un modèle portant une double inactivation d'ASAH1 et de CCL2 a été généré et permet une réduction significative de l'inflammation et de l'accumulation des sphingolipides dans le foie et les poumons mais pas dans le cerveau. De même, on retrouve encore une infiltration de macrophages dans les tissus, probablement due à une compensation par d'autres forts niveaux de cytokines inflammatoires telles que MCP-3 et MCP-5 (Yu et al., 2018).

## **C.2 Les maladies associées à un défaut d'activité de la céramidase acide : rôle dans l'inflammation**

### La maladie de Farber

La maladie de Farber est une maladie très rare, autosomale récessive entraînant une accumulation de sphingolipides dans les lysosomes (et plus particulièrement des céramides).

En 1952 le premier cas de patient atteint de la maladie de Farber a été référencé, il s'agit d'une lipogranulomatose décrite chez un enfant de 14 mois (Farber, 1952). L'étiologie étant méconnue, Sidney Farber a établi que cette maladie était un mélange entre les troubles métaboliques lipidiques (maladies de Gaucher, Niemann-Pick et Tay-Sachs) et d'autres maladies inflammatoires caractérisées par des lésions granulomateuses et un stockage des lipides partiel (maladie de Schüller-Christian). D'autres cas ont été décrits chez de jeunes enfants (Schultze and Lang, 1960), les symptômes regroupent des lipogranulomatoses au niveau des articulations très douloureuses parfois associées à des érosions des os, une voix rauque, des perturbations de certains organes (poumons, foie, rate, ganglion, cœur). Les premiers cas décrits de malades atteints de cette pathologie sont décédés à 14, 13 et 9 mois respectivement à cause d'insuffisance respiratoire. Les analyses histologiques suite aux autopsies ont révélé la présence de macrophages spumeux (macrophages remplis de lipides) dans la plupart des organes y compris les poumons, la plèvre, le péricarde, le foie, la rate, les ganglions lymphatiques, la synovie et le système nerveux central (SNC). En 1958, un cas a été reporté et a progressé très lentement permettant au patient de survivre jusqu'à l'âge de 16, son décès étant dû à une insuffisance respiratoire et une atélectasie du poumon gauche (Zetterstrom, 1958). Cependant, ce patient ne présentait aucun retard mental mais avait des nodules douloureux sur les articulations, paupières, nez, lèvres... Ce cas a permis de démontrer que la maladie possède un large spectre de

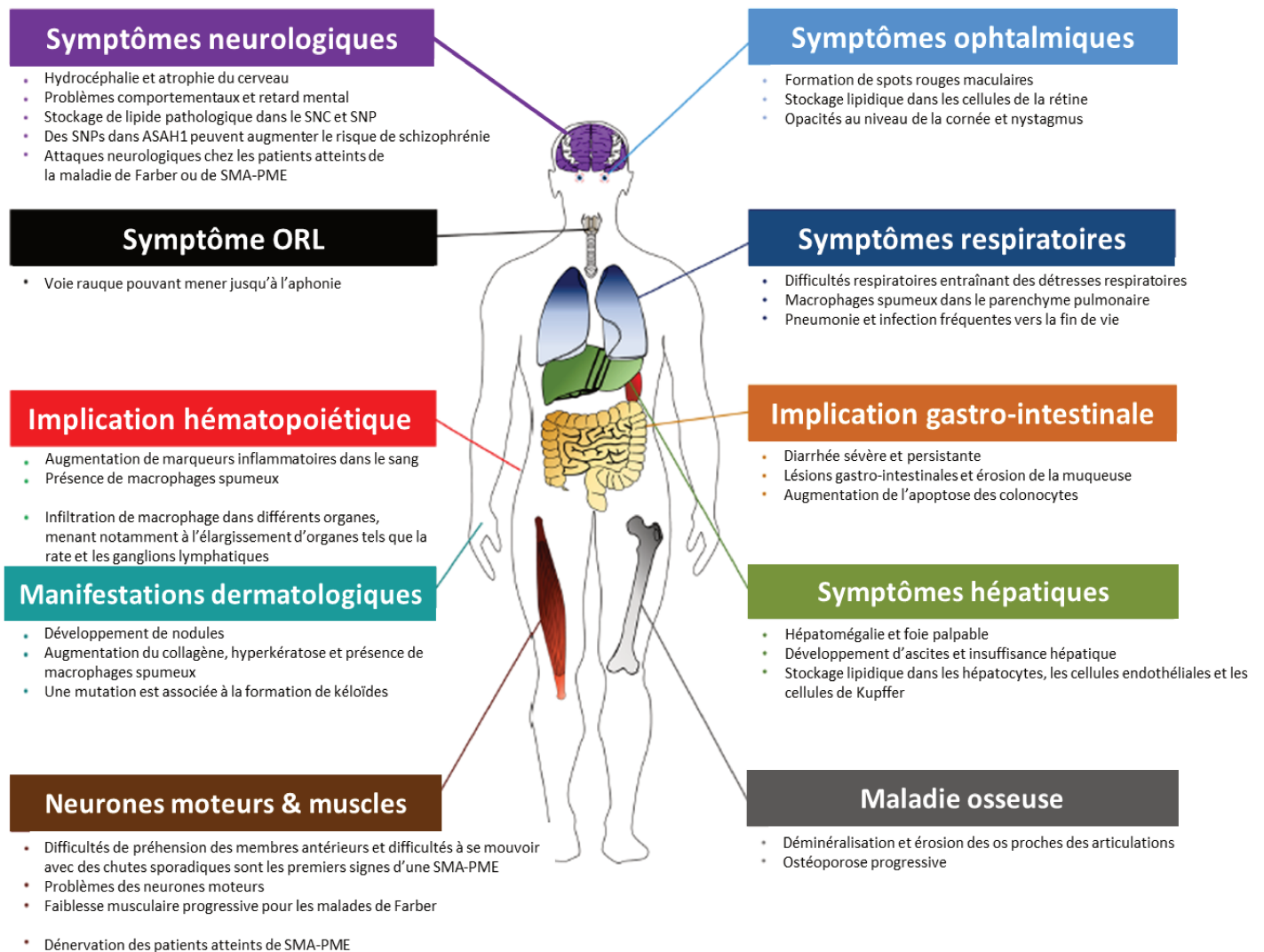
symptômes et peut être à progression lente dans certains cas, parfois sans atteinte du SNC (Cf. Figure 21). Quelques années plus tard, l'accumulation de céramides dans les tissus des patients a été mise en évidence ainsi qu'une diminution de l'activité aCDase (Dulaney et al., 1976; Sugita et al., 1972). L'accumulation de la majorité des céramides dans les lysosomes ont confirmé la fonction de cette enzyme et ont défini la maladie de Farber comme étant une « lysosomal storage disorder » (LSD). Trois types généraux de la maladie ont été décrits :

- une maladie de Farber se déclarant très tôt entre 1 et 3 ans avec atteinte du SNC et des symptômes sévères.
- une maladie aux symptômes intermédiaires avec prédominance des nodules aux articulations et pas d'atteinte systématique du SNC.
- une maladie atténuée avec des symptômes moins sévères sans atteinte du SNC dont les patients peuvent survivre jusqu'à l'adolescence voire l'âge adulte.

Plus de 100 cas ont été décrits jusqu'à nos jours mais on ne connaît pas l'incidence de cette maladie car en plus d'être rare elle est souvent diagnostiquée tardivement du fait que les symptômes ressemblent à des maladies inflammatoires des articulations.

#### L'amyotrophie spinale proximale avec épilepsie myoclonique progressive (SMA-PME)

La SMA-PME est une forme rare d'atrophie spinale musculaire touchant les enfants. Elle est caractérisée par un déficit des neurones moteurs et une épilepsie myoclonique progressive parfois associée à une perte de l'audition, des dysfonctions cognitives et des atrophies cérébrales (Cf. Figure 21). Il s'agit une nouvelle fois d'une maladie autosomale récessive touchant le gène *ASAH1* (Zhou et al., 2012). L'activité d'*ASAH1* est réduite d'environ 70%, les symptômes, moins sévères que ceux retrouvés chez les patients atteints de la maladie de Farber, permettent une survie jusqu'à 30 ans pour certains patients. L'activité résiduelle de l'enzyme varie selon les patients mais est d'environ 5 à 30% (Gan et al., 2015). Le début de la maladie est plus tardif que chez les patients atteints de la maladie de Farber, les premiers symptômes apparaissant entre 1 et 10 ans. Une question demeure, comment des mutations sur le même gène entraînant un déficit d'activité sur la même enzyme donnent des effets cliniques si distincts? Il se pourrait que cela soit dû au pourcentage de l'activité résiduelle d'*ASAH1*, qu'il y ait un seuil critique entraînant des symptômes plus sévères dans la maladie de Farber alors qu'une activité résiduelle plus élevée correspond plutôt à un SMA-PME.



**Figure 21 : Manifestations cliniques par organe des symptômes recensés chez les patients atteints de la maladie de Farber ou de SMA-PME** Adapté de Yu et al. 2018.

### C.3 Le rôle d'ASAH1 dans la mort cellulaire et la différenciation

Les lymphocytes normaux et de Farber sont tout autant sensibles à l'apoptose en réponse à des stress tels que la staurosporine, les irradiations et des drogues anti-cancéreuses. Il en est de même pour les fibroblastes. Ces résultats suggèrent que la céramidase acide ne joue pas de rôle dans l'apoptose des lymphocytes et les fibroblastes, et que malgré les forts niveaux circulants de céramides, les cellules présentent la même sensibilité face à des stimuli apoptotiques (Burek et al., 2001).

L'expression d'ASAH1 est également responsable de la différenciation des kératinocytes en réponse au calcium. En effet, l'inhibition de l'enzyme réduit significativement l'expression de la kératine 1 et de l'involucrine induites par le calcium, deux protéines très importantes fortement exprimées dans les kératinocytes différenciés (Houben et al., 2006).

#### C.4 Les cibles d'ASAHI et leur effet biologique

La PGE2 favorise l'inflammation et la progression tumorale via la voie PI3K/AKT et l'activation de la PKC. Une étude a démontré que l'usage de la désipramine inhibait l'induction de la cyclooxygénase 2 par le TNF- $\alpha$  ainsi que la production de prostaglandine E2 (PGE2). Des expériences ont permis de démontrer que la désipramine qui était connue comme étant un inhibiteur spécifique de l'aSMase, est également un inhibiteur de l'aCDase et que ces effets observés en aval étaient bien dus à une inhibition d'ASAHI (Zeidan et al., 2006).

ASAHI est capable de réguler une chimiokine pro-inflammatoire CCL5 (aussi appelée RANTES) et ceci de façon S1P-indépendante. Cette régulation semble uniquement se produire via l'action de la sphingosine (Jenkins et al., 2011). Cette chimiokine occasionne le recrutement des leucocytes sur les sites inflammatoires et est essentielle à l'activation et la prolifération des cellules NK (Natural Killer).

Dans des cellules de carcinome surrénalien (H295R), un modèle inductible de shRNA dirigé contre ASAHI a mis en évidence que l'inhibition de cette enzyme augmente la transcription de multiples gènes tels que le cytochrome P450 monooxygénase (CYP)17A1, CYP11B1/2, CYP21A2, des lipases sensibles aux hormones, le récepteur à la mélanocortine 2...De plus, cette inhibition induit l'expression de membres de la famille des récepteurs nucléaires 4 (NR4A), du cortisol et la sécrétion de la déhydroépiandrostérone (Lucki et al., 2012a). Les auteurs ont démontré qu'ASAHI est retrouvé dans les noyaux de ces cellules et supprime l'activité du facteur SF-1 (steroidogenic factor 1) en se liant aux promoteurs de ses gènes cibles expliquant toutes les régulations citées ci-dessus (Lucki et al., 2012b). Néanmoins, ASAHI ne contient aucun NLS (signal de localisation nucléaire) mais les auteurs suggèrent que son import nucléaire pourrait être effectué grâce à ses nombreuses N-glycosylations. En effet, un mécanisme indépendant des NLS a été décrit permettant l'import nucléaire de glycoprotéines via l'utilisation de protéines liant les glucides (comme la lectine) (Duverger et al., 1995). ASAHI semble donc être un co-répresseur qui pourrait agir en inhibant l'acétylation de l'histone H3 sur les promoteurs des gènes cibles de SF1 (Lucki et al., 2012b). De façon intéressante, une étude double-hybride chez la levure a mis en évidence des interactions protéiques entre ASAHI et TSC22D1, et entre ASAHI et SETDB1 (Stelzl et al., 2005). TSC22D1 est un facteur de transcription possédant un domaine glissière à leucine considéré comme un répresseur. SETDB1 est une histone-lysine N-méthyltransférase pouvant donc moduler la chromatine et réprimer l'expression de gènes. Il serait donc intéressant d'étudier le rôle de ces protéines dans la répression par ASAHI décrite dans ces papiers.

Dans plusieurs lignées cellulaires cancéreuses, une corrélation a été établie entre l'expression d'ASAHI et la phosphorylation d'AKT. Ceci est dû au fait qu'ASAHI active la voie AKT via la SK1 qui permet la génération de S1P à partir de la sphingosine produite par l'activité d'ASAHI. Ces S1P

peuvent ensuite procéder à l'activation de la PI3K via les S1PR2. C'est pourquoi les cellules cancéreuses exprimant fortement ASAH1 sont insensibles à la chimiothérapie mais sont à l'inverse sensibles aux inhibiteurs d'AKT (Beckham et al., 2013b).

En conséquence, l'impact d'ASAH1 sur la localisation nucléaire de PTEN qui inhibe la voie AKT/PI3K a été étudié. Des analyses immunohistochimiques ont révélé une absence de PTEN nucléaire chez des tumeurs de la prostate de patients surexprimant ASAH1. Cette inhibition est accompagnée de l'activation d'AKT par la S1P. En effet, la S1P promeut la formation d'un complexe entre Crm1 (chromosomal maintenance 1 ou exportine 1) et PTEN suggérant que cette perte de localisation nucléaire est un événement actif médié par l'exportine 1 (Beckham et al., 2013a). Ces deux études permettent de mieux comprendre le rôle pro-survie des cellules surexprimant ASAH1. Une étude propose une coopération entre AKT2 et ASAH1 conférant des propriétés invasives et une résistance à l'apoptose des cellules cancéreuses (Berndt et al., 2013).

La pannexine 1 (Panx1) est un canal conduisant au relargage de l'ATP impliqué dans les inflammations tissulaires, l'obésité et plusieurs maladies dégénératives chroniques. L'adiponectine peut bloquer l'activité des canaux Panx1 dans les podocytes. L'inhibition d'ASAH1 peut prévenir la régulation négative de l'adiponectine sur ces canaux. Inversement, des ajouts exogènes de sphingosine ou S1P peuvent bloquer l'activité de Panx1 alors que l'augmentation des céramides ne module pas son activité. Ces résultats démontrent que l'adiponectine inhibe les canaux Panx1 dans les podocytes via l'activation de la céramidase acide et l'augmentation intracellulaire de S1P (Li et al., 2018a).

## **D. RÔLE TUMORIGÈNE**

Un nombre croissant d'études démontre qu'ASAH1 est constitutivement surexprimé dans de nombreux cancers résultant en de faibles niveaux intracellulaires de céramides en faveur de la S1P (Schuchman, 2016). Ceci promeut la prolifération et la survie des cellules tumorales, c'est le cas dans les cancers de la prostate, du sein, des HNSCC, des mélanomes et autres (Realini et al., 2016; Roh et al., 2016; Vethakanraj et al., 2015). Ces données suggèrent que l'inhibition d'ASAH1 pourrait être une approche thérapeutique entraînant la mort cellulaire et permettant de s'affranchir des résistances aux chimiothérapies. Ces découvertes ont permis le développement rapide d'inhibiteurs dirigés contre ASAH1 et étudiés dans plusieurs modèles cellulaires et murins (Saied and Arenz, 2016).

### **D.1 Inhibiteurs d'ASAH1**

Le premier inhibiteur d'aCDase décrit était la N-oleoylethanolamine (NOE) et représentait l'inhibiteur d'ASAH1 le plus utilisé *in vitro*. La génération d'analogues de structure de NOE ont permis de définir que ce dernier était peu efficace par son manque de spécificité, c'est pourquoi d'autres inhibiteurs ont été développés par la suite. Le B13 est un des inhibiteurs d'ASAH1 augmentant les céramides

intracellulaires, il semble très efficace in vitro mais n'a pas une action directe sur ASAH1, sa structure ne pouvant permettre son accumulation dans les lysosomes. Un autre inhibiteur d'ASAH1 est l'ARN14988 qui cible spécifiquement les cellules de mélanomes à faible dose, étant peu cytotoxique sur les cellules saines (IC50 : 87 $\mu$ M) et semble très spécifique d'ASAH1 (Realini et al., 2016).

Le seul inhibiteur à avoir été utilisé en clinique est le carmofur. Il s'agit d'un analogue de la pyrimidine, dérivé du 5-fluorouracil. Il a été utilisé pour la première fois en 1981 au Japon pour le traitement des cancers du côlon (Sato et al., 1999; Watanabe et al., 2006). Le carmofur peut pénétrer la barrière hémato-encéphalique mais on ne sait pas si cela lui permet de cibler les tumeurs cérébrales (Realini et al., 2013). Le carmofur est hautement insoluble dans une solution aqueuse et aucune solution intraveineuse n'est donc disponible, c'est pourquoi de nombreux dérivés de ce composé ont été synthétisés et ont montré des résultats prometteurs (Realini et al., 2013). De plus, le carmofur entouré de nanogel augmente sa solubilité et inhibe plus efficacement la croissance tumorale dans des souris en comparaison au composé seul (Miyazaki and Tabata, 2009). Un inhibiteur d'ASAH1 ciblant spécifiquement le lysosome a été développé à partir de la liaison du B13 avec la N,N-diméthyl glycine (DMG) ce qui forme la drogue LCL521 qui permet une meilleure inhibition de la croissance tumorale grâce à sa spécificité accrue (Bai et al., 2017).

A l'avenir une cristallographie d'ASAH1 pourrait permettre le développement d'inhibiteurs à l'aide de la structure du site actif de l'enzyme, l'étude de Gebai et al publiée cette année ouvre cette possibilité (Gebai et al., 2018). A noter que des inhibiteurs beaucoup plus efficaces ont vu le jour récemment (Realini et al., 2016), même si l'accès au lysosome par la drogue reste une problématique à résoudre. En effet, dans cette étude l'IC50 sur des cellules intactes est supérieur à celui observé in vitro qui peut être dû à un problème d'accessibilité de la drogue au lysosome ou de stabilité de la molécule. L'utilisation d'anticorps contre la protéine sécrétée ou les S1P est aussi une approche pertinente pour inhiber les effets d'ASAH1.

## **D.2 Rôles dans différents types de cancers**

ASAH1 est surexprimé dans les carcinomes squameux de la tête et du cou (HNSCC) et son expression est inversement corrélée avec la sensibilité des lignées cellulaires HNSCC à l'apoptose induite par la voie Fas. L'inhibition d'ASAH1 re-sensibilise ces lignées à l'apoptose induite en réponse au ligand Fas (FasL), suggérant que l'activité aCDase module la PCD indépendante des caspases (Elojeimy et al., 2007).

L'irradiation de cellules de glioblastome augmente l'expression d'ASAH1. Le traitement avec de la N-oléylethanolamine (NOE), un agoniste de PPAR- $\alpha$  prévient l'augmentation d'ASAH1 suite aux irradiations et entraîne une augmentation des niveaux de céramides intracellulaires permettant

l'apoptose cellulaire. NOE inhibe à la fois l'activité d'ASAHI mais aussi le niveau de protéines, cependant, le mécanisme d'action est inconnu (Hara et al., 2004; Sugita et al., 1975). NOE augmente les céramides et accroît l'apoptose des cellules de fibrosarcomes murins L929 (Strelow et al., 2000) et des cellules dendritiques (Kanto et al., 2001). Dans des trophoblastes traités avec NOE pendant deux heures, l'inhibition d'ASAHI est capable d'annuler les effets anti-apoptotiques du facteur de croissance épidermique (EGF), les céramides étant augmentés de 50% par rapport aux contrôles non-traités (Payne et al., 1999).

La daunorubicine (DNR) est un agent intercalant de l'ADN empêchant la réplication de l'ADN. Lorsqu'on traite des cellules d'hépatoblastome (HepG2) avec de la DNR ceci conduit à une augmentation d'expression d'ASAHI. A nouveau l'ajout de NOE ou une inhibition d'ASAHI via un siRNA permettent de re-sensibiliser ces cellules à la DNR. A l'inverse l'ajout de S1P inhibe l'effet de la DNR (Morales et al., 2007). L'activation d'ASAHI a donc un effet protecteur suite à l'ajout de NOE ou de DNR sur les cellules cancéreuses probablement en contre-balançant l'augmentation de céramides induite par ces traitements en les hydrolysant en S1P. De plus, l'ajout de NOE sur ces cellules d'hépatoblastomes avec un traitement vinblastine ou de la doxorubicine diminue significativement la survie cellulaire en comparaison à un traitement vinblastine ou doxorubicine seule. Ces résultats démontrent une potentialisation des chimiothérapies et de l'inhibition d'ASAHI sur la mort cellulaire (Strelow et al., 2000).

L'hypoxie induit l'expression protéique d'ASAHI et diminue la sensibilité de plusieurs lignées cellulaires cancéreuses à l'apoptose induite par la fenretinide qui est un agoniste des récepteurs à l'acide rétinoïque (RAR) causant une augmentation des ROS et des céramides intracellulaires. L'ajout de NOE sur des cellules en hypoxie re-sensibilise les cellules aux différentes chimiothérapies. De plus, l'inhibition d'ASAHI par approche siRNA inhibe la prolifération des cellules tumorales in vivo et favorise la thérapie par DNR permettant de conclure que l'inhibition d'ASAHI est requise pour l'efficacité des chimiothérapies (Batra et al., 2004).

Dans des cellules cancéreuses de la prostate (DU145), la surexpression d'ASAHI promeut la prolifération tumorale in vitro et in vivo ce qui se traduit par une prolifération plus rapide in vitro et des tumeurs plus grosses qui se développent plus vite chez la souris immunodéficiente. La surexpression d'ASAHI prévient également l'augmentation intracellulaire de céramides et en conséquence l'apoptose induite par différents stimuli (comme la doxorubicine, la cisplatine, l'etoposide ou la gemcitabine) (Saad et al., 2007). En 2011, une équipe a démontré que la surexpression d'ASAHI dans des cellules cancéreuses de la prostate accroît la densité lysosomale ainsi que l'autophagie. Par ailleurs, l'inhibition de l'autophagie par la 3-méthyladénine sensibilise les cellules à un traitement C6-céramide. Ils ont donc conclu que l'activité d'ASAHI est importante pour



l'autophagie des cellules cancéreuses de la prostate et qu'une augmentation d'autophagie potentialise la résistance aux céramides (Turner et al., 2011).

Les macrophages alvéolaires expriment fortement ASAHI de façon constitutive ce qui corrèle avec de forts niveaux de sphingosine intracellulaire. L'inhibition d'ASAH1 dans ces cellules par NOE est suffisante pour déclencher la mort cellulaire de ces macrophages soulignant l'importance de cette enzyme pour la survie des macrophages alvéolaires (Monick et al., 2004). De façon intéressante, lors d'un traitement NOE, l'ajout de sphingosine exogène ou de Safingol protège les cellules de l'apoptose en réactivant les voies de signalisation PI3K/AKT et ERK qui sont inhibées par le traitement NOE.

Un autre inhibiteur d'ASAH1, le B13, induit l'apoptose dans des cellules cancéreuses de la prostate (Samsel et al., 2004). Cet inhibiteur utilisé en combinaison avec la thérapie conventionnelle par irradiation est beaucoup plus efficace sur des xénogreffes de ces cellules en comparaison à l'irradiation seule. Ces résultats démontrent les effets synergiques que peuvent avoir les inhibiteurs d'ASAH1 avec les thérapies conventionnelles. La céramidase acide contribue également aux propriétés invasives des cellules tumorales. Les cellules de cancer de la prostate dans lesquelles ASAHI a été surexprimé migrent trois fois plus rapidement que les cellules contrôles (Selzner et al., 2001). Ces cellules surexprimant ASAHI sont plus adhérentes au collagène et à la fibronectine que les cellules contrôles. Un pré-traitement avec du LCL204 et B13 qui sont des inhibiteurs d'ASAH1 préviennent cette augmentation de migration. L'ajout de B13 sur des souris immunodéficientes avec des xénogreffes de cellules cancéreuses de colon prévient la progression tumorale et les métastases sans aucune toxicité sur les cellules saines (Selzner et al., 2001).

Deux lignées cellulaires de cancer du côlon (SW403, et la lignée très métastatique Lovo) ont été injectées de façon intra-caudale dans des souris immunodéficientes. Des injections intra-péritonéales de B13 ont permis de réduire de façon significative la prise tumorale, 9/14 souris ne présentant aucune tumeur. Les souris ayant développé des tumeurs dans cette expérience ont tout de même eu une masse tumorale significativement diminuée par rapport au groupe contrôle (Szulc et al., 2008).

Dans des cellules de cancer du sein MCF7, le Ceranib-2 (un inhibiteur d'ASAH1) réduit la viabilité cellulaire de façon dose et temps dépendante. Les auteurs suggèrent que cet effet est médié par une apoptose médiée par la modulation du potentiel membranaire mitochondrial (Vejselova et al., 2016). Il est néanmoins essentiel de mentionner quelques études relatives au cancer du sein qui présentent des résultats contradictoires. La première étude a démontré qu'une forte expression d'ASAH1 était associée à un meilleur pronostic dans les cancers du sein invasifs (Sanger et al., 2015). L'augmentation d'expression d'ASAH1 est également corrélée à un bon pronostic chez des patientes atteintes d'un cancer du sein hormono-dépendant (Ruckhaberle et al., 2009). Cependant, une autre

étude affirme que l'expression d'ASAH1 corrèle positivement avec une atteinte des ganglions lymphatiques chez des patientes atteintes de cancer du sein, l'étude proposant même de l'utiliser en tant que marqueur prédictif de ce statut (Li et al., 2018b).

ASAH1 semble donc être une enzyme très importante dans de multiples processus tumoraux comme la prolifération, l'apoptose, la résistance, le pouvoir métastatique et la colonisation. Cette enzyme représente une balance entre la mort cellulaire et la survie, ceci constitue donc une opportunité thérapeutique à envisager dans les différents types de cancers mentionnés ci-dessus. Néanmoins, il est à noter que son expression pourrait varier au cours de la tumorigenèse et avoir des rôles opposés suivant le cancer observé.

Comme dit précédemment, l'expression d'ASAH1 est corrélée à un bon pronostic dans les cancers du sein ER-positifs, indiquant ainsi qu'une expression élevée d'ASAH1 n'est pas nécessairement un indicateur tumoral défavorable et d'une survie plus faible (Ruckhaberle et al., 2009).

### **D.3 Rôles dans le mélanome**

L'expression d'ASAH1 est également retrouvée dans les mélanocytes mais est particulièrement élevée dans des lignées cellulaires de mélanomes à phénotype prolifératif. L'expression d'ASAH1 est beaucoup plus forte dans les mélanomes en comparaison à d'autres types de cancers solides (Leclerc et al., 2018; Realini et al., 2016).

Une autre étude a suggéré qu'ASAH1 a un rôle dans l'autophagie des cellules de mélanomes. En effet, la dacarbazine (DTIC, une drogue utilisée dans le traitement des mélanomes métastatiques jusqu'au développement des thérapies ciblées) diminue l'activité d'ASAH1 dans les cellules de mélanomes A375. Cet effet est médié par l'activation de la cathépsine B par les ROS. Ceci entraîne une diminution de l'autophagie. De plus, de la même façon que dans d'autres cancers mentionnés dans la partie précédente, la surexpression d'ASAH1 rend les cellules résistantes à la DTIC alors qu'une inhibition par approche siRNA les sensibilise à cette drogue (Bedia et al., 2011).

Afin de définir de meilleurs outils pronostics et des marqueurs prédictifs de l'évolution du mélanome, un groupe a étudié les auto-anticorps retrouvés dans le sérum de patients atteints de mélanomes. Cette étude a mis en évidence qu'une élévation d'auto-anticorps dirigés contre ASAH1 dans le sérum est négativement corrélée avec une atteinte des ganglions métastatiques de façon très significative. Ces résultats suggèrent que l'augmentation de ces anticorps joue un rôle important pour la prévention des métastases de mélanomes. Les auteurs proposent d'utiliser ces résultats pour identifier les patients à haut risque de développer des métastases (Liu et al., 2010; Sabel et al., 2011).

De plus, une méta-analyse de plusieurs types de cancers dont le mélanome, a mis en évidence que l'expression d'ASAH1 a une corrélation positive avec de nombreux gènes immunitaires chez des

patients répondeurs aux thérapies par rapport à ceux étant non-répondeurs. Cette étude suggère qu'ASAHI pourrait avoir des capacités immunomodulatoires (Stoll et al., 2015).

L'invalidation totale d'ASAHI par système Crispr-Cas9 dans des cellules A375 réduit la prolifération cellulaire. Les clones ASAHI-null arborent une accumulation importante de céramides à longues chaînes et un blocage du cycle cellulaire avec une entrée en sénescence (cet effet étant comparable à l'ajout de céramides exogènes). Ces mêmes cellules perdent également leur capacité de cellules initiateuses de mélanomes et d'auto-renouvellement suggérant un rôle majeur d'ASAHI dans la maintenance du potentiel tumorigène et de l'auto-renouvellement des cellules invasives (Lai et al., 2017).

Mon travail de thèse a permis de démontrer que l'inhibition d'ASAHI dans des cellules de mélanomes entraîne une diminution de la prolifération due à une entrée en sénescence en accord avec les travaux précédents (Lai et al., 2017; Realini et al., 2016). De plus, nous avons observé qu'une augmentation de la migration des cellules via l'expression des intégrines  $\alpha V\beta 5$  et de la phosphorylation de FAK (Leclerc et al., 2018). Ce phénotype invasif peut être sauvé par ajout exogène de sphingosine.

Toutes ces études démontrent un rôle important d'ASAHI dans la progression du mélanome et il est nécessaire de mieux comprendre comment varie l'expression de cette enzyme au cours des différents processus tumoraux afin de mieux cibler ASAHI et d'éventuellement l'utiliser comme marqueur prédictif.

## **OBJECTIFS DE LA THESE**

Malgré des avancées majeures dans le traitement du mélanome, plus de 50% des patients ne répondent pas aux traitements ou développent des résistances. Ces résistances primaires ou secondairement acquises peuvent être induites par des événements génétiques, mais la plasticité phénotypique sous-jacente à des changements de l'expression génique dans des cellules génétiquement identiques est maintenant acceptée comme la principale source des résistances. Cette plasticité permet aux cellules de mélanome de s'adapter et d'échapper à l'effet cytotoxique des drogues. Plusieurs études ont montré que le facteur de transcription MITF joue un rôle clé dans la plasticité des cellules de mélanome.

Il reste donc primordial de mieux comprendre les mécanismes moléculaires impliqués dans le développement de cette tumeur et le rôle de MITF.

Une analyse des données publiques et obtenues au laboratoire de profils transcriptomiques de cellules de mélanome montrait que l'expression de la céramidase acide ASAH1 (N-Acylsphingosine Amidohydrolase 1), une enzyme qui contrôle le métabolisme des sphingolipides, est élevée dans les cellules prolifératives et plus faible dans les cellules invasives, suggérant qu'ASAH1 peut jouer un rôle de rhéostat dans la transition phénotypique des cellules de mélanome. De plus, une autre analyse de données publiques indiquait une corrélation entre l'expression de MITF et d'ASAH1. Le rôle d'ASAH1 dans le mélanome n'était pas clairement élucidé. C'est pourquoi, au cours de ma thèse, mon objectif a été de déterminer, le rôle et la régulation d'ASAH1 dans les cellules de mélanome en utilisant des approches gain et perte de fonction.

Dans ce but, j'ai étudié:

- L'expression et l'activité d'ASAH1 dans différentes lignées humaines de mélanome
- Les mécanismes impliqués dans la régulation d'ASAH1
- Le rôle d'ASAH1 dans le mélanome

Mon second travail de thèse a porté sur l'étude des effets de l'axe SK1/S1P/S1PRs sur la résistance thérapeutique dans le cadre du mélanome. Aucune étude ne s'est intéressée au rôle du métabolisme des sphingolipides dans la résistance aux thérapies ciblées dans le mélanome. L'objectif de cette deuxième étude était donc de déterminer si ce métabolisme et particulièrement celui de la S1P est impliqué dans la résistance au mélanome cutané au vémurafénib et d'identifier les voies de signalisation altérées par ces dérégulations métaboliques. Nous avons donc étudié l'expression des récepteurs S1PRs en fonction de la réponse de plusieurs lignées de mélanome humain à l'inhibiteur de BRAF et de MEK. Nous avons également utilisé des modèles de résistance acquise *in vitro* à l'inhibiteur de BRAF et enfin une approche *in vivo* chez la souris immunodéprimée. Pour finir, nous avons évalué l'impact de la dérégulation du ratio céramide/S1P sur l'expression de MITF.

**Article 1: Lysosomal acid ceramidase ASAH1 controls the transition between invasive and proliferative phenotype in melanoma cells.**

**Article 2: Targeting the sphingosine-1-phosphate axis exerts potent antitumor activity in BRAF-i resistant melanomas.**

# RÉSULTATS

**Article 1: Lysosomal acid ceramidase ASAH1 controls the transition between invasive and proliferative phenotype in melanoma cells.**

La première partie de mon travail de thèse a porté sur l'étude de la céramidase acide ASAH1 dans le mélanome cutané. Il s'agit de mon travail principal de thèse réalisé au sein du laboratoire.

La plasticité phénotypique et par conséquent la génération de l'hétérogénéité intra-tumorale sont responsables de la résistance aux traitements des mélanomes métastatiques. La plasticité des cellules de mélanome promeut la transition entre les phénotypes prolifératifs et invasifs caractérisés par différents programmes transcriptionnels dans lesquels MITF est un régulateur majeur. Dans ce cadre, nous avons montré qu'ASAH1, une enzyme contrôlant le métabolisme des sphingolipides agit tel un rhéostat de la transition phénotypique dans les cellules de mélanome. La faible expression d'ASAH1 (constitutive ou induite par un siRNA) est associée à un phénotype invasif impliquant l'activation de la cascade de signalisation ITG $\alpha$ V $\beta$ 5/FAK. Inversement, la ré-expression d'ASAH1 (par infection lentivirale) dans des cellules invasives exprimant faiblement ASAH1 induit un phénotype prolifératif. En accord avec ce résultat, des biopsies humaines de mélanome ont révélé un marquage hétérogène d'ASAH1 et une faible expression d'ASAH1 au niveau du front invasif tumoral. Nous avons également pu identifier ASAH1 comme une nouvelle cible de MITF, impliquant pour la première fois MITF dans le métabolisme des sphingolipides. Nos résultats apportent de nouveaux indices sur les mécanismes sous-jacents à la plasticité phénotypique des cellules de mélanome et identifient de nouvelles cibles anti-métastatiques.





# Lysosomal acid ceramidase ASAH1 controls the transition between invasive and proliferative phenotype in melanoma cells

Justine Leclerc<sup>1</sup> · David Garandau<sup>2</sup> · Charlotte Pandiani<sup>1</sup> · Céline Gaudel<sup>1</sup> · Karine Bille<sup>1</sup> · Nicolas Nottet<sup>2</sup> · Virginie Garcia<sup>3</sup> · Pascal Colosetti<sup>4</sup> · Sophie Pagnotta<sup>5</sup> · Philippe Bahadoran<sup>1,6</sup> · Garance Tondeur<sup>7</sup> · Baharia Mograbi<sup>8</sup> · Stéphane Dalle<sup>7</sup> · Julie Caramel<sup>7</sup> · Thierry Levade<sup>3</sup> · Robert Ballotti<sup>1</sup> · Nathalie Andrieu-Abadie<sup>3</sup> · Corine Bertolotto<sup>1</sup>

Received: 24 February 2018 / Revised: 25 July 2018 / Accepted: 24 August 2018  
© Springer Nature Limited 2018

## Abstract

Phenotypic plasticity and subsequent generation of intratumoral heterogeneity underly key traits in malignant melanoma such as drug resistance and metastasis. Melanoma plasticity promotes a switch between proliferative and invasive phenotypes characterized by different transcriptional programs of which MITF is a critical regulator. Here, we show that the acid ceramidase ASAH1, which controls sphingolipid metabolism, acted as a rheostat of the phenotypic switch in melanoma cells. Low ASAH1 expression was associated with an invasive behavior mediated by activation of the integrin  $\alpha$ v $\beta$ 5-FAK signaling cascade. In line with that, human melanoma biopsies revealed heterogeneous staining of ASAH1 and low ASAH1 expression at the melanoma invasive front. We also identified ASAH1 as a new target of MITF, thereby involving MITF in the regulation of sphingolipid metabolism. Together, our findings provide new cues to the mechanisms underlying the phenotypic plasticity of melanoma cells and identify new anti-metastatic targets.

---

These authors contributed equally: Justine Leclerc, David Garandau, Nathalie Andrieu-Abadie, Corine Bertolotto.

**Electronic supplementary material** The online version of this article (<https://doi.org/10.1038/s41388-018-0500-0>) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Corine Bertolotto  
bertolot@unice.fr

<sup>1</sup> Team 1, Biology and Pathologies of Melanocytes, Equipe labellisée ARC 2015, Université Côte d'Azur, Inserm U1065, C3M, Nice, France

<sup>2</sup> Université Côte d'Azur, Inserm U1065, C3M, Nice, France

<sup>3</sup> Team 4, Sphingolipids, Metabolism, Cell Death and Tumor Progression, Université Toulouse III, Toulouse, Inserm, UMR1037, CRCT, Toulouse, France

<sup>4</sup> CarMeN Laboratory, INSERM U1060, INRA1397, INSA, Lyon, France

<sup>5</sup> Université Côte d'Azur, Centre Commun de Microscopie Appliquée, Nice, France

<sup>6</sup> CHU NICE, Département de Dermatologie, Nice, France

<sup>7</sup> Université de Lyon, Inserm, U1052, CNRS 5286, Equipe Labellisée Ligue contre le Cancer, Lyon, France

<sup>8</sup> INSERM ERI21/EA 4319, Nice F-06107, France

## Introduction

Cancer cells including melanoma cells display a high degree of intertumoral heterogeneity as well as intratumoral heterogeneity (ITH) [1, 2]. ITH is dynamically controlled by not only the tumor microenvironment but also the intrinsic plastic capacity of the cells and is recognized as the main therapy resistance mechanism. Therefore, the molecular mechanisms behind the plastic capacity of cancer cells and the underlying heterogeneity must be fully elucidated in order to develop effective and lasting therapies.

Melanoma cells can be classified into at least two major states, i.e., proliferative and invasive. A model derived from these findings, the “phenotype-switching” model, predicts that melanoma cells may switch between these two states [3]. ITH can be, at least in part, understood by this phenotypic switch. Most importantly, melanoma phenotype switching is associated with intrinsic and acquired resistance to targeted therapies, which is the major cause for the resultant mortality of patients with cancer [4–7]. It also negatively impacts on immune checkpoint blockade and impairs immunotherapy efficiency [8, 9]. The lineage-specific transcription factor, microphthalmia-associated transcription factor (MITF), which acts as a bona fide

melanoma oncogene [10–13], is a key driver of the transition between the proliferative and the invasive state of melanoma cells [14–17]. However, how MITF regulates the phenotypic switch of melanoma cells is not fully elucidated.

Cancer cells rewire their metabolic pathways to satisfy their abnormal demands for proliferation and survival [18]. In cancer cells, the most common metabolic change is the use of glycolysis even in normoxic condition, a phenomenon called “Warburg effect” [19]. There are a number of targets involved in glycolysis, which are currently exploited for potential therapeutic drug strategies [20]. However, as functionally plastic cells, malignant melanoma cells can rewire their metabolism towards oxidative phosphorylation, or glutaminolysis, two processes limiting drug efficacy [8, 21, 22]. Several lines of evidence indicate that cancer cells also show alterations in other metabolic pathways such as lipid metabolism [23, 24]. In melanoma, the role of lipid metabolism is poorly elucidated.

Here, by comparing the transcriptomic profile of invasive and proliferative melanoma cells, we found that the expression of acid ceramidase ASAH1, a key enzyme of sphingolipid metabolism [25], was among the top differentially expressed genes, suggesting that ASAH1 might be critical to the phenotypic switch. We performed a comprehensive characterization of ASAH1, function and regulation in melanoma. We found that ASAH1 loss drove the transcriptional reprogramming of proliferative melanoma cells into an invasive cell subpopulation characterized by a reduced expression of E-cadherin and activation of the integrin  $\alpha$ v $\beta$ 5-focal adhesion kinase (FAK) signaling cascade. Conversely, forced expression of ASAH1 in invasive melanoma cells reduced their motile features and rendered them more proliferative. We also identified ASAH1 as a target of MITF, which is a key driver in the phenotypic transition. These data also causally involve for the first time MITF in the regulation of sphingolipid metabolism.

Together, our findings reveal that lysosomal ASAH1 and the sphingolipid metabolism drive the transition between the proliferative and the invasive phenotype in melanoma cells, which is at the origin of intratumoral heterogeneity and a source of therapy resistance.

## Results

### ASAH1 controls the phenotype switching of melanoma cells

To identify genes differentially expressed between proliferative and invasive melanoma cells, we performed transcriptomic analysis. Using both melanoma cell lines and melanoma cells freshly isolated from human biopsies we

found that the acid ceramidase ASAH1, which is located at the lysosome and which controls the sphingolipid metabolism, was among the genes most differentially expressed between the two phenotypes (Fig. 1a). We confirmed this observation using data from another source (Supplementary Fig. 1a) [26]. Further, analysis of publicly available datasets revealed significantly higher expression of ASAH1 in melanoma cells compared to other human cancer cell lines, strengthening the key role of ASAH1 in melanoma cells (Fig. 1b).

Analysis of publicly available datasets showed a positive correlation between ASAH1 and the transcription factor MITF (Fig. 1c and Supplementary Fig. 1B).

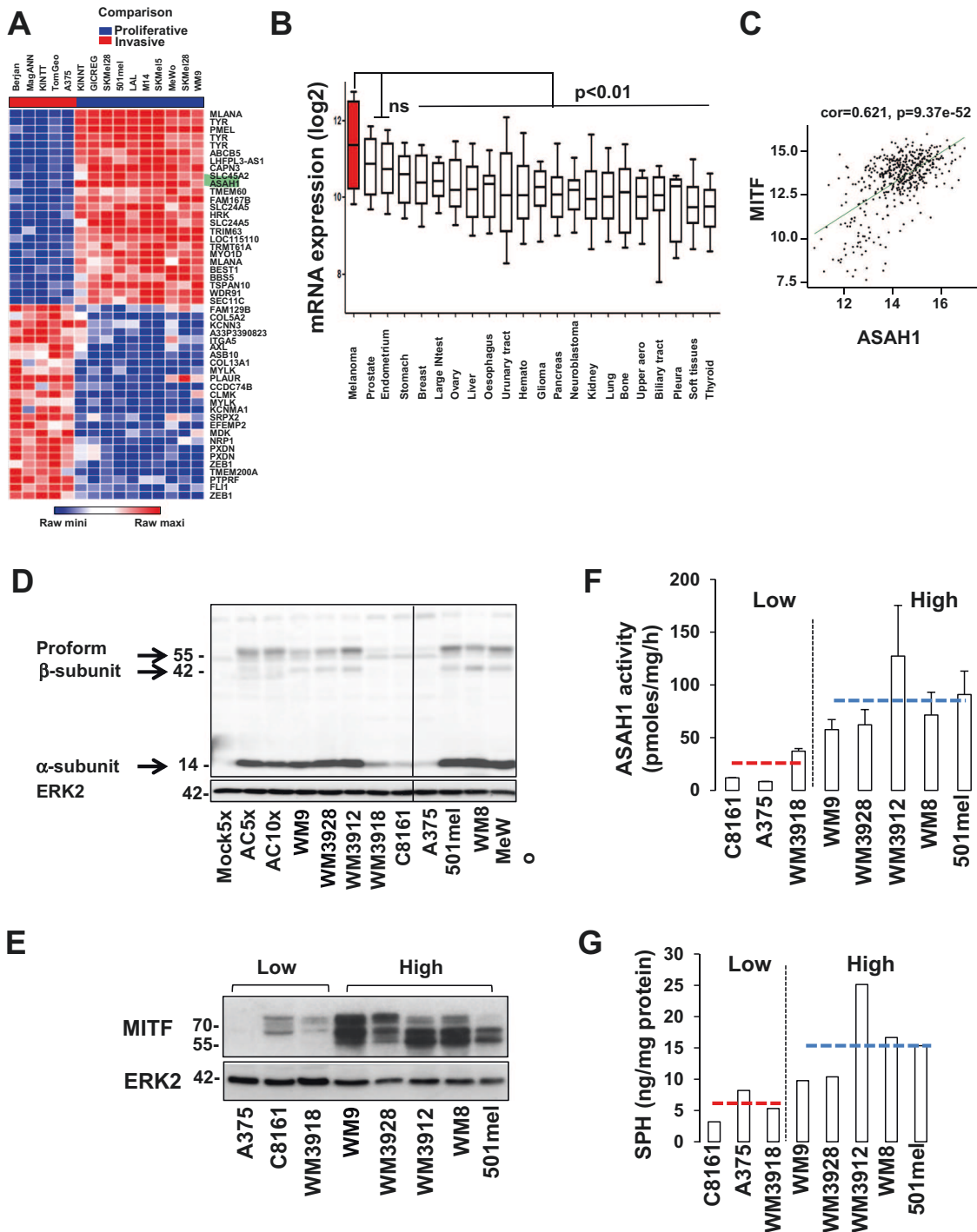
ASAH1 expression was next studied by quantitative polymerase chain reaction (Q-PCR) in another set of melanoma cell lines expressing MITF at different levels. Two groups of melanoma cells were distinguished, one expressing low to very low messenger RNA (mRNA) level of ASAH1 (ASAH1<sup>low</sup>) and the other expressing high mRNA level of ASAH1 (ASAH1<sup>high</sup>) (Supplementary Fig. 1C). We next assessed ASAH1 at the protein level. ASAH1 is a glycoprotein processed from a 55 kDa precursor into an active heterodimeric enzyme with  $\alpha$  (14 kDa) and  $\beta$  (37 kDa) subunits [27]. Immunoblots with a homemade antibody [28] easily detected the proform and the  $\alpha$  and  $\beta$  active subunits (lanes 4–6 and lanes 10–12) in melanoma cells with high ASAH1 mRNA expression, whereas the different forms were hardly detectable in cells with low ASAH1 mRNA (lanes 7–9) (Fig. 1d). Because of homemade antibody restriction, we also tested two commercially available antibodies. Only one antibody gave positive results leading to the detection of the proform and of the  $\beta$ -subunit (Supplementary Fig. 1D). The different melanoma cell lines analyzed for MITF expression resulted in the detection of two groups with low/absent MITF expression (MITF<sup>low</sup>) and high MITF expression (MITF<sup>high</sup>) (Fig. 1e and Supplementary Fig. 1E).

Using the fluorogenic substrate Rbm14–12 [29], we measured the activity of ASAH1, which varied accordingly with the level of expression (Fig. 1f). We next performed a comprehensive lipidomic analysis, using ultra-performance liquid chromatography/mass spectrometry. Lipidomic analysis revealed higher sphingosine level in ASAH1<sup>high</sup> cells, consistent with an ASAH1 activity, compared to ASAH1<sup>low</sup> cells (Fig. 1g). Of note, we found no correlation between expression of ASAH1 and the BRAF mutational status.

Together, our results indicate that ASAH1 is highly expressed and active in about 60% of melanoma cells and its expression correlates with that of MITF.

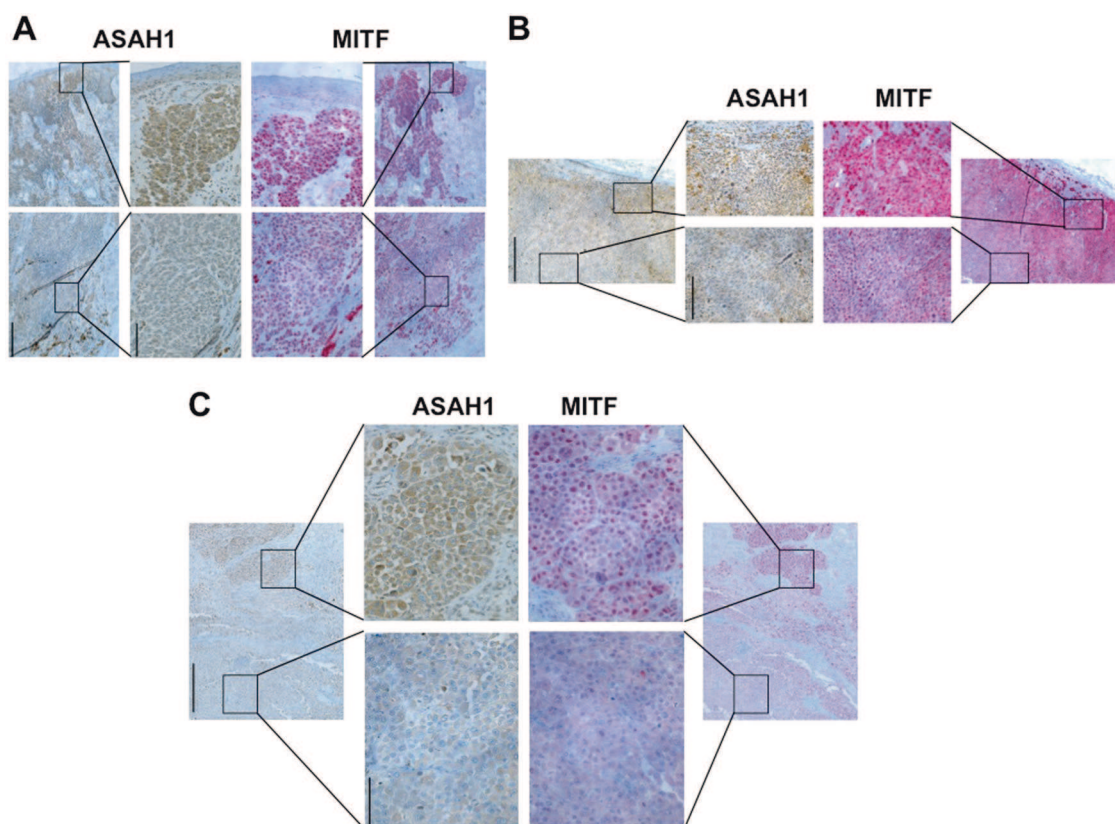
### ASAH1 expression in human melanoma samples

Immunohistochemical staining of MITF and ASAH1 proteins was performed in a series of human melanoma



**Fig. 1** Acid ceramidase ASAH1 is expressed in melanoma cells. **a** Heatmap showing the expression of genes in the invasive (red group) and proliferative (blue group) cells. The data were analyzed using the Morpheus software (<https://software.broadinstitute.org/morpheus/>). A relative color scheme based on the minimum and maximum values in each row was used to convert values to color. The relative levels are indicated by varying color intensity (low, blue; high, red). **b** Box plots showing the relative ASAH1 mRNA across the different tumor types, extracted from in the NCI60 line datasets. **c** Co-expression of MITF and ASAH1 in melanoma from the TCGA database. Gene expression data were log<sub>2</sub> transformed. Pearson's correlation coefficient, used to measure similarity between gene profiles, is shown. **d** Immunoblot to

ASAH1 of total cell extracts from the indicated melanoma cell lines with a non-commercial antibody showing the proform (55 kDa), the β (40 kDa) and α (14 kDa) active subunits. Detection of ERK2 serves as a loading control. **e** Immunoblot to MITF of total cell extracts isolated from the indicated melanoma cell lines. MITF is detected as a doublet of 55–72 kDa. Detection of ERK2 serves as a loading control. **f** ASAH1 activity in a panel of melanoma cells. Values represent mean + SD of two independent experiments. **g** Cellular lipids were extracted, and sphingolipid concentration was determined by LC/MS. Data represent the quantity of sphingosine (SPH) in ng/mg proteins and are the means + SD of two independent determinations



**Fig. 2** Expression of MITF and ASAHI in human melanoma samples. **a, b** IHC analyses of MITF and ASAHI expression at superficial and deep sites of primary melanoma sample. The images exemplify correlation between MITF and ASAHI expression within the lesions.

Magnification  $\times 4$ , scale bar: 500  $\mu\text{m}$  and magnification  $\times 20$ , scale bar: 100  $\mu\text{m}$ . **c** IHC analyses of MITF and ASAHI expression in a cutaneous metastatic melanoma sample. Magnification  $\times 4$ , scale bar: 500  $\mu\text{m}$  and magnification  $\times 20$ , scale bar: 100  $\mu\text{m}$

samples, including primary malignant melanoma and metastatic samples. Areas of high and low MITF and ASAHI expression were observed in cutaneous metastasis of melanoma (Fig. 2a, b). Thus, the correlation between MITF and ASAHI expression was also observed in vivo.

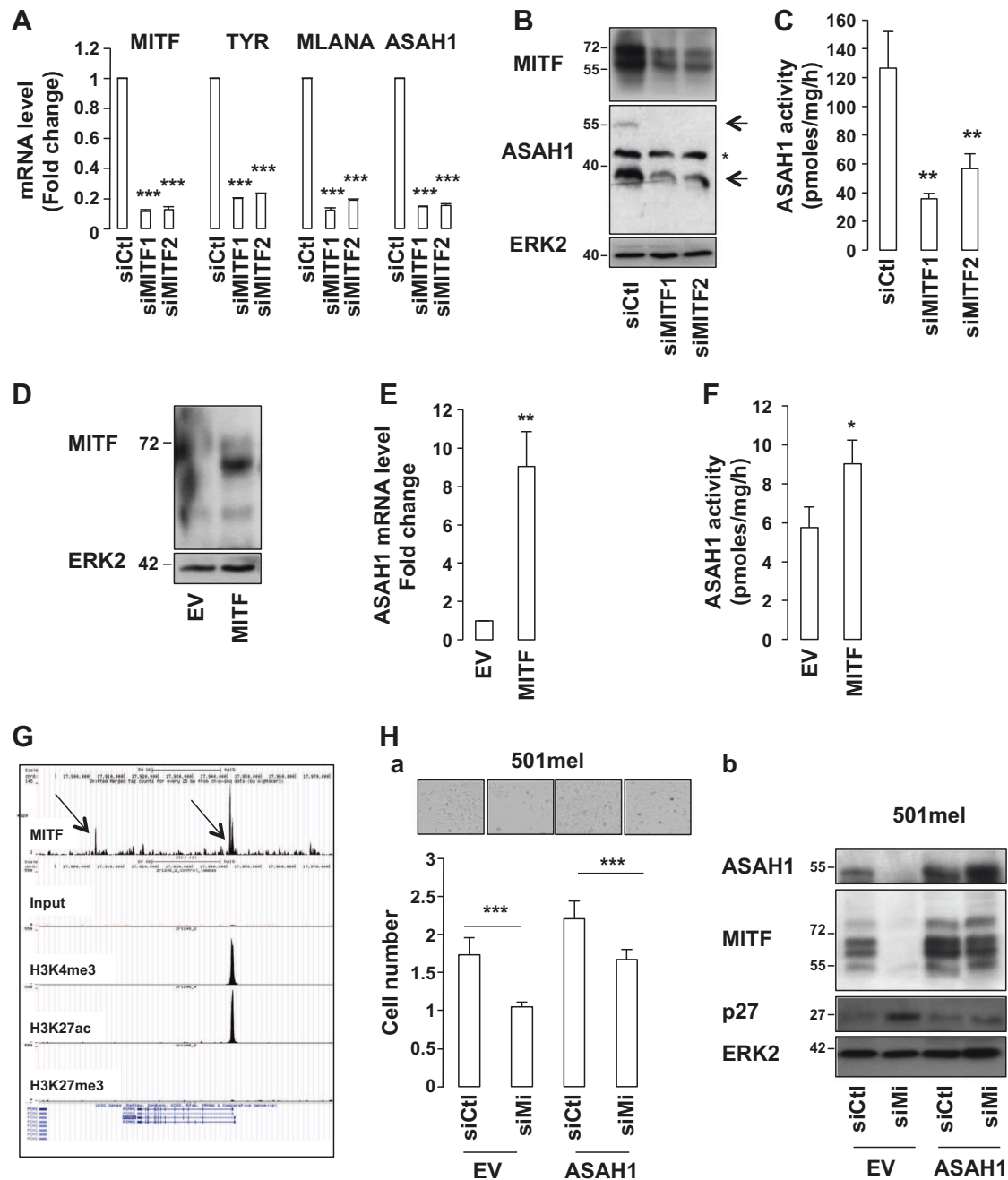
Interestingly, within thick primary melanomas, a distinct gradient was observed, where nuclear MITF and cytoplasmic ASAHI were strongly expressed in superficial sites with weaker or absent staining at the invasive sites of the lesion (Fig. 2c), strengthening the notion that ASAHI loss correlates with a loss of MITF and a gain of motile ability and aggressiveness. In conclusion, our results confirm in vivo the correlation between MITF and ASAHI.

### MITF drives expression of ASAHI

Our previous observations suggested that ASAHI was a downstream target of MITF. To assess this hypothesis, we silenced MITF with two different small interfering RNAs (siRNAs). As expected, the siRNA reduced the expression of mRNA for MITF and its target genes *MLANA* and *TYR*. MITF inhibition also strongly decreased ASAHI mRNA (Fig. 3a and Supplementary Fig. 2A–B). Similar observations were

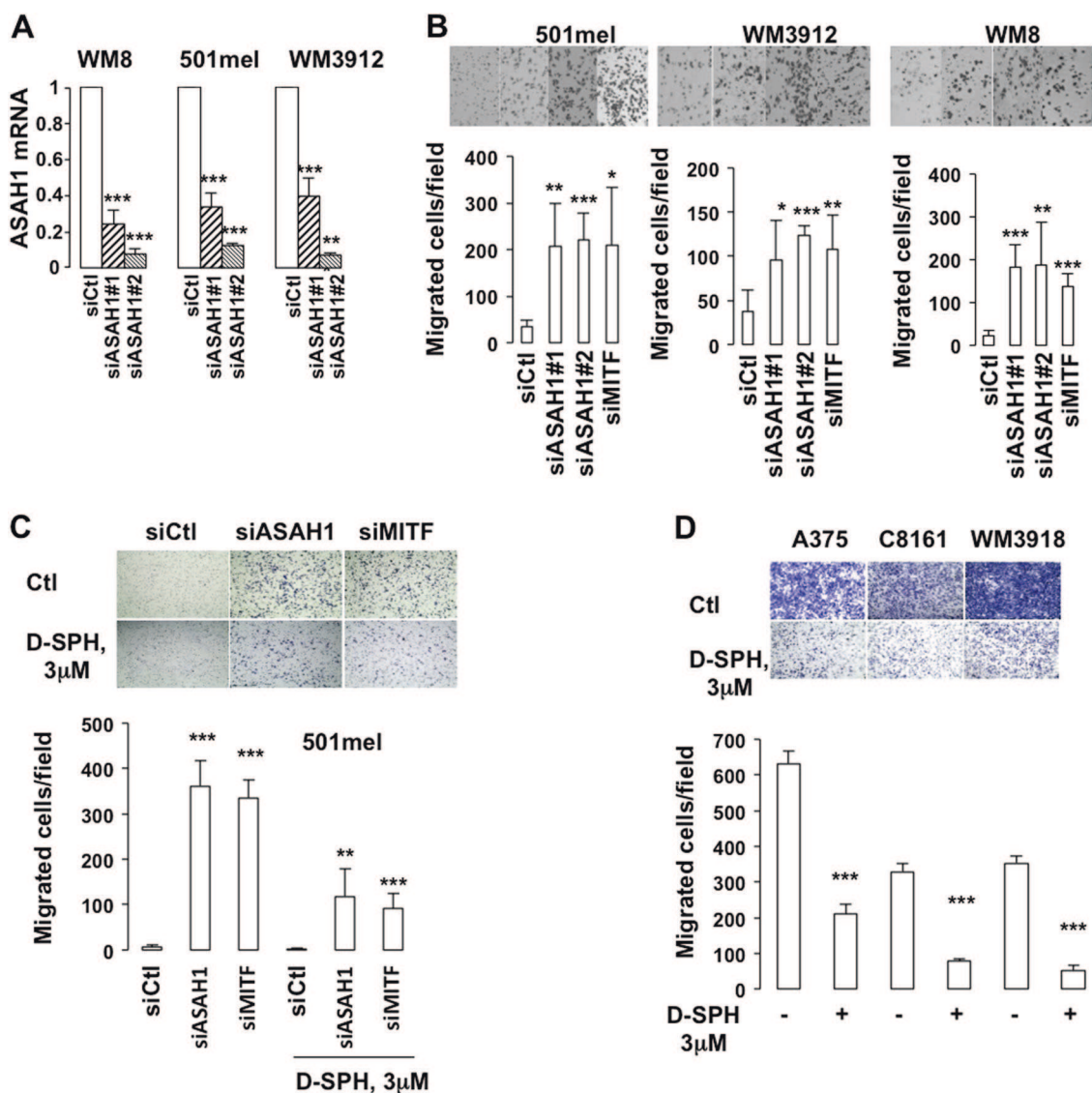
obtained at the protein level showing that MITF inhibition caused a reduction in the proform and the  $\beta$ -active subunit of ASAHI (Fig. 3b). Accordingly, MITF inhibition reduced ASAHI activity (Fig. 3c) and consequently the quantity of sphingosine (SPH) (Supplementary Fig. 2C).

Conversely, we assessed whether MITF was sufficient to drive the expression of ASAHI. Forced expression of MITF in two different melanocyte cells, as shown by immunoblot (Fig. 3d and Supplementary Fig. 2D), enhanced the expression and activity of ASAHI (Fig. 3e and Supplementary Fig. 2E) compared with cells transduced with an empty vector (Fig. 3f). MITF is a transcription factor that binds to DNA to control the expression of its targets. Using recently described MITF chromatin immunoprecipitation-sequencing (ChIP-seq) dataset [30], we identified significantly enriched MITF-binding sites in the genomic region of *ASAHI* (Fig. 3g). MITF binding at the promoter region overlapped with the binding of H3K27ac and H3K4me3, two histone marks associated with active transcription [31], thereby indicating that MITF controlled the expression of ASAHI at the transcriptional level. In line with that, MITF stimulated the activity of *ASAHI* promoter (Supplementary Fig. 2F).



**Fig. 3** ASAH1 is a direct target of the MITF transcription factor. **a** mRNA expression of MITF and two of its target genes (Tyrosinase and MLANA) and ASAH1 in 501mel melanoma cell lines determined by qRT-PCR. Values represent mean + SD of three independent experiments performed in triplicate; \*\*\* $p < 0.001$ . **b** Immunoblot to MITF and ASAH1 of 501mel melanoma cells transfected with control or *Mitf*-specific siRNA. Detection of ERK2 serves as a loading control. **c** ASAH1 activity of 501mel melanoma cells transfected with control or *Mitf*-specific siRNA. Values represent mean + SD of three independent experiments; \*\* $p < 0.01$ . **d** Immunoblot to MITF of Mel-ST melanocyte cells transduced with an empty adenoviral vector or a vector encoding MITF. **e** mRNA expression of ASAH1 in Mel-ST melanocyte cells transduced with an empty adenoviral vector or a vector encoding MITF determined by qRT-PCR. Values represent mean + SD of three independent experiments performed in triplicate; \*\* $p < 0.01$ . **f** ASAH1 activity in Mel-ST melanocyte cells transduced

with an empty adenoviral vector or a vector encoding MITF. Values represent mean + SD of three independent experiments performed in triplicate; \* $p < 0.05$ . **g** ChIP-seq profile showing significant MITF-binding peaks in the ASAH1 genomic region (black arrowheads). The sequence under peak shows the presence of MITF-binding sites. The scale bar indicates the size of the genomic region in kilobases (kB). The H3K27ac and H3K4me3 tracks associated with active transcription, and the H3K27me3 track associated with the repression of transcription were obtained in control 501mel cells [31] and were aligned with the ChIP-seq profile of MITF [30]. **h.a** Cell count of 501mel melanoma cells infected with an empty vector or a vector encoding ASAH1 and transfected with control or MITF siRNA. Representative micrographs are shown. Values represent mean + SD of three independent experiments; \*\*\* $p < 0.001$ . **h.b** Immunoblot of 501mel melanoma cells infected with an empty vector or a vector encoding ASAH1 and transfected with control or MITF siRNA



**Fig. 4** ASAHI controls melanoma cell proliferation and motile features. **a** ASAHI mRNA expression in melanoma cells transfected with control or two different ASAHI (ASAHI#1 and ASAHI#2) or MITF siRNAs. Values represent mean + SD of three independent experiments performed in triplicate; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ . **b** Boyden chamber experiments of melanoma cells transfected with a control or two different ASAHI siRNAs (ASAHI#1 and ASAHI#2) or with a MITF siRNA. Representative images are shown. Values represent

mean + SD of three independent experiments; \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  and \*\*\* $p < 0.001$ . **c** Boyden chamber experiments. The 501mel melanoma cells were transfected for 48 h with ASAHI or MITF siRNA before being exposed to 3  $\mu$ M D-sphingosine (D-SPH) for 5 h. Values represent mean + SD of three independent experiments; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ . **d** Boyden chamber experiments. Invasive melanoma cells were exposed to 3  $\mu$ M D-SPH for 5 h. Values represent mean + SD of three independent experiments; \*\*\* $p < 0.001$

We next addressed the functional importance of ASAHI in MITF effects. Forced expression of ASAHI rescued the reduction of cell proliferation mediated by MITF inhibition. Forced expression of ASAHI also slightly enhanced the number of cells compared to the control condition (Fig. 3ha). Further, an increase in expression in the cell cycle inhibitor p27 was observed upon MITF inhibition by siRNA, but did not occur in these cells when they were transduced with ASAHI. Together, these results demonstrate the causal role of ASAHI in MITF proliferative

activity (Fig. 3hb). Almost no cell death was found in these conditions (Supplementary Fig. 2G). Of note, immunoblot also showed that forced expression of ASAHI was associated with an increase in MITF expression, thereby suggesting a bidirectional regulation between MITF and ASAHI.

Collectively, our findings identify ASAHI as a new MITF target gene and demonstrate for the first time the involvement of MITF in the control of sphingolipid metabolism.

## ASAH1 controls the switch between the proliferative and invasive phenotype in melanoma cells

We next assessed the impact of ASAH1 knockdown in ASAH1<sup>high</sup> cells on short-term cell growth, colony formation assay and apoptosis detection in various melanoma lines transfected with siRNA against ASAH1 versus a control siRNA. To rule out non-specific effects, different siRNAs were used. As expected, the siRNA triggered a strong decrease in expression of mRNA and protein for ASAH1 (Fig. 4a and Supplementary Fig. 3A) and translated into a decrease in ASAH1 activity (Supplementary Fig. 3B). Of note, siASAH1#2 displayed stronger effect than siASAH1#1 and was used in the following experiments as siASAH1. Electron microscopy revealed that ASAH1-inhibited melanoma cells compared to control cells were characterized by an accumulation of intracellular vacuoles rich in sphingolipid (Supplementary Fig. 3C) typically resembling the phenotype of cells from patients with lysosomal storage disorders [32]. ASAH1 inhibition dramatically reduced the number of cells in short-term cell growth (Supplementary Fig. 3D) or in colony formation assays (Supplementary Fig. 3E). Remarkably, the growth arrest caused by ASAH1 reduction was comparable to that of MITF inhibition, in agreement with ASAH1 being a target gene of MITF (Supplementary Fig. 3D-E). Fluorescence-activated cell sorting analysis of 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI)-stained cells did not reveal a significant difference in cell death between control cells or cells in which ASAH1 or MITF were inhibited (Supplementary Fig. 3F).

Conversely, we investigated the effect of ASAH1 forced expression in ASAH1<sup>low</sup> cells. ASAH1 upregulation in WM3918 cells was confirmed by Q-PCR and immunoblot (Supplementary Fig. 4A-B). Further, forced expression of ASAH1 did not change its cellular localization (Supplementary Fig. 4C) and it translated into more ASAH1 activity (Supplementary Fig. 4D). Melanoma cells with forced expression of ASAH1 proliferated faster than native parental control cells (Supplementary Fig. 4E) and displayed a reduced motility (Supplementary Fig. 4F). Analysis of The Cancer Genome Atlas–Skin Cutaneous Melanoma (TCGA-SKCM) dataset revealed accordingly an association of ASAH1 with the proliferative signature described in Verfaillie et al. [33] (Supplementary Fig. 4G).

In addition, ASAH1-inhibited cells underwent morphological changes. They exhibited an increased dendritic morphology (Supplementary Fig. 5a). Moreover, adherence monitored either by microscopic observation after seeding (Supplementary Fig. 5B-C) or monitored in real time using the xCELLigence technology showed that cells with reduced ASAH1 expression adhered faster than that with high ASAH1 expression (Supplementary Fig. 5D). Similar observations were obtained in cells transfected with MITF

siRNA (Supplementary Fig. 5D). These changes suggested that ASAH1 controlled the motile ability of melanoma cells.

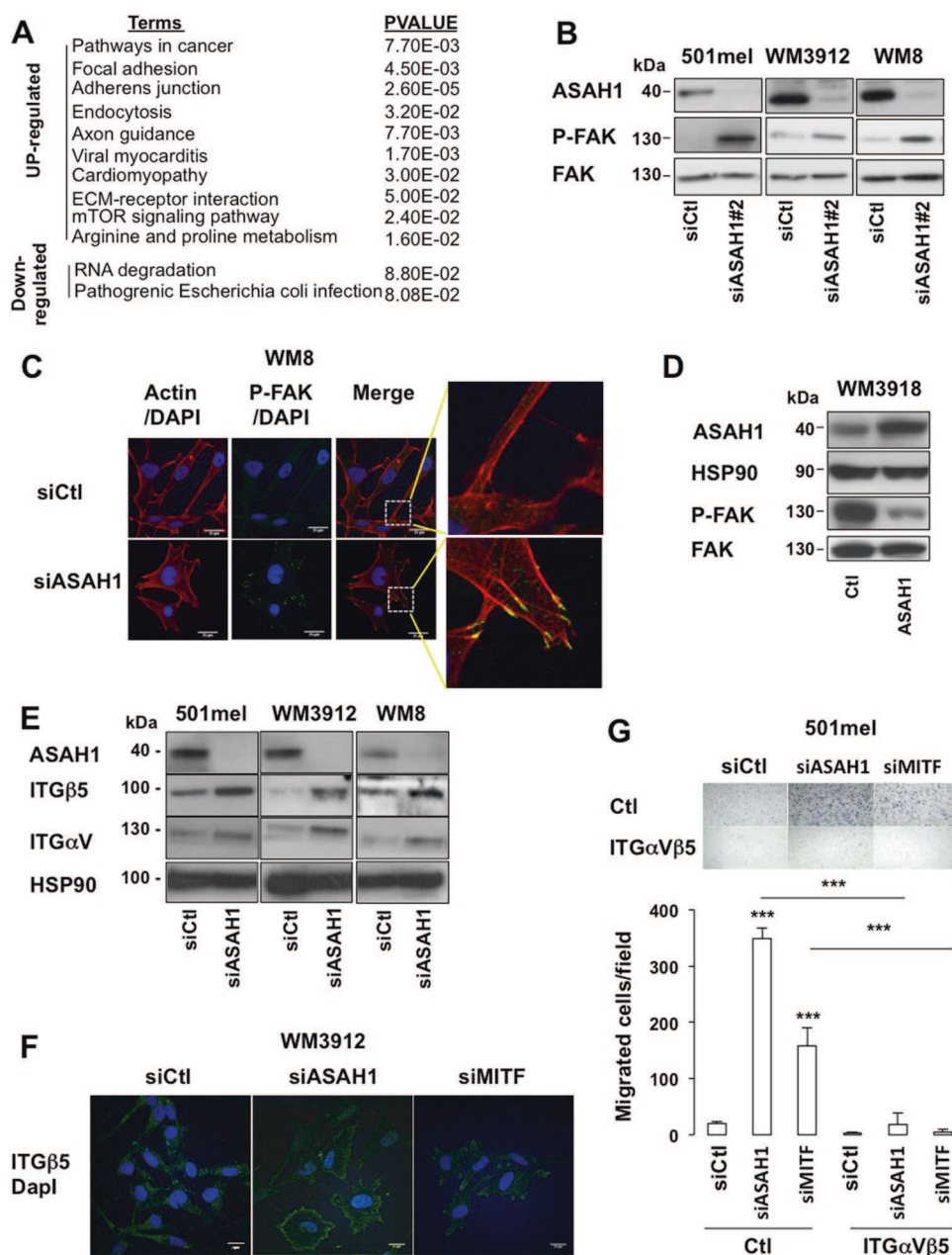
Boyden chamber motility studies and scratch wound assays in different melanoma cell lines demonstrated that ASAH1 reduction enhanced cell migration compared to control cells (Fig. 4b and Supplementary Fig. 5E-F). ASAH1 reduction stimulated cell migration to the same extent as MITF inhibition. Conversely, melanoma cells with forced expression of ASAH1 displayed reduced motile ability (Supplementary Fig. 4F). In line with that, MITF and ASAH1 low melanoma cells have higher invasive capacities than MITF and ASAH1 high cells (Supplementary Fig. 5G). To demonstrate that the observed effects were dependent on ASAH1 activity, exogenous sphingosine was used to restore functional ASAH1 metabolic cascade. Short-term exposure to sphingosine at concentrations from 1 to 5  $\mu$ M had no effect on cell number (Supplementary figure 6A-B). However, it dramatically reduced melanoma cell migration induced by the loss of ASAH1 or MITF (Fig. 4c and Supplementary figures 6C-D) and impaired migration of ASAH1<sup>low</sup> melanoma cells (Fig. 4d).

Epithelial-to-mesenchymal transition (EMT)-inducing transcription factors enhance mesenchymal (loss of epithelial characteristics such as E-cadherin expression) and motile features. TWIST1 is an EMT-controlling factor particularly important in melanoma [34]. Interestingly, we observed that ASAH1 reduction in ASAH1<sup>high</sup> cells enhanced TWIST1 expression (Supplementary figure 7A) and caused a loss of E-cadherin expression (Supplementary figure 7B), whereas ASAH1 forced expression in ASAH1<sup>low</sup> cells had the opposite effect, reducing TWIST1 (Supplementary figure 7C) and stimulating E-cadherin expression (Supplementary figure 7D). These features translated into an enhanced sphere formation ability of ASAH1-inhibited melanoma cells (Supplementary figure 7E). Thus, ASAH1 impacts on the mechanical and mesenchymal features of melanoma cells. Collectively, our findings demonstrate that ASAH1 acts as a rheostat to control the switch between proliferative and invasive states in melanoma cells.

## ASAH1, through activation of the ITG $\alpha$ V $\beta$ 5/FAK signaling cascade, controls motility of melanoma cells

To broadly dissect the molecular mechanisms by which ASAH1 exerts its effect in melanoma cells, we performed a gene expression profiling of ASAH1 knocked down cells compared to control cells. Top canonical pathways of the differentially expressed genes captured in the Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery (DAVID) tool were related to cell migration and trafficking such as “pathways in cancer”, “focal adhesion” and “ECM-

**Fig. 5** ASAH1 controls cell migration via the integrin/FAK cascade. **a** Top significantly deregulated pathways upon ASAH1 downregulation in three different melanoma cell lines (501mel, WM3912, WM8) transfected with control or ASAH1 siRNA. **b** Immunoblot to total and phosphorylated FAK (Y397) after ASAH1 downregulation (48 h) compared to control siRNA. **c** Confocal microscopy images of phosphorylated FAK (Y397) localization after ASAH1 downregulation (48 h) compared to control siRNA. **d** Immunoblot to total and phosphorylated FAK (Y397), ASAH1 and HSP90 (loading control) in WM3918 with forced expression of ASAH1 compared to the parental cells. **e** Immunoblot to ITG $\beta$ 5, ITG $\alpha$ V and HSP90 (loading control) in 501mel, WM3912 and WM8 melanoma cells transfected with a control or ASAH1 siRNA. **f** Immunofluorescence of ITG $\beta$ 5 in WM3912. **g** Boyden chamber experiments with control IgG Ctl) or ITG $\alpha$ V $\beta$ 5 neutralizing antibody (ITG $\alpha$   $\beta$ 5). Values represent mean  $\pm$  SD of three independent experiments;  $***p < 0.001$ . Representative images are shown



receptor interaction” (Fig. 5a), thereby strengthening the observation that ASAH1 loss is associated with an enhanced motile capacity of melanoma cells. Of note, our transcriptomic analysis also revealed a reduction in expression of several MITF target genes. The expression in MITF mRNA itself was slightly downregulated in the three cell lines but did not reach the statistical threshold. Nevertheless, at the protein level, forced expression of ASAH1 enhanced MITF (Fig. 3hb) and ASAH1 siRNA reduced MITF expression (Supplementary figure 7F).

We next focused our attention on FAK which is linked to integrin signals to promote cell migration. Immunoblot showed that ASAH1 silencing in different cell types

resulted in a significant increase in FAK phosphorylation (Fig. 5b). Such treatment had no effect on the levels of FAK protein. Immunofluorescence staining of cells following ASAH1 siRNA treatment revealed that FAK localized to focal adhesions compared to control cells in which FAK was more cytoplasmic (Fig. 5c and Supplementary figure 8A). Conversely, forced expression of ASAH1 inhibited FAK phosphorylation (Fig. 5d). Gene expression profiling revealed the increased expression of integrin  $\beta$ 5 that was confirmed at the protein level (ITG $\beta$ 5) (Fig. 5e). ITG $\beta$ 5 can associate with integrin  $\alpha$ V (ITG $\alpha$ V). Transcriptomic profiling showed a small increase in expression of mRNA for ITGAV in ASAH1-inhibited cells, even though the



difference did not reach statistical significance. However, a statistically significant difference in ITGAV mRNA between control and ASAHI-inhibited cells was observed by Q-PCR and was strengthened at the protein level by western blot (Fig. 5e and Supplementary figure 8B). Further, both integrins play critical role in cell migration, invasion and tumorigenesis. Q-PCR and immunoblot revealed the recurrent increased expression in ITG $\alpha$ V upon ASAHI inhibition in different melanoma cells (Fig. 5e). As shown by immunofluorescence, ITG $\beta$ 5 staining was confined predominantly to the cellular periphery in ASAHI knocked down cells compared to its cytoplasmic localization in control cells (Fig. 5f). In cells treated with MITF siRNA, ITG $\beta$ 5 generated a pattern of staining similar to that obtained with ASAHI inhibition (Fig. 5f). We next thought to determine whether ITG $\alpha$ V $\beta$ 5 was causally involved in melanoma cell migration mediated by ASAHI inhibition. Whereas treatment with an ITG $\alpha$ V $\beta$ 5 blocking antibody had no effect on cell survival (Supplementary figure 8C), it dramatically impaired melanoma cell migration (Fig. 5g and Supplementary figure 8D-E). ITG $\alpha$ V $\beta$ 5 blocking antibody exhibited similar causal effect in melanoma cell migration mediated by MITF inhibition. Altogether, our data demonstrate that ASAHI controls melanoma cell plasticity and migration through integrin-mediated FAK activation.

## Discussion

Here, we demonstrate that the lysosomal acid ceramidase ASAHI, which controls sphingolipid metabolism, acts as a driver of the phenotypic switch, thereby contributing to an intratumoral heterogeneity. We showed that whereas melanoma cells with high expression of ASAHI displayed a proliferative activity, low ASAHI cells had enhanced motile ability. ASAHI was previously shown to play an important role in melanoma proliferation [35]. We also identified ASAHI as a target of MITF in melanoma cells, thereby implying for the first time MITF in the regulation of sphingolipid metabolism. Until now, an enhanced transcription of ASAHI has been reported by cAMP-responsive element binding protein (CREB) in human adrenal corticocarcinoma cells [36] and by estrogen receptor- $\alpha$  (ER $\alpha$ ) and specificity protein-1 (Sp1) in breast cancer cells [37]. Thus, our study adds new clues to the regulation of ASAHI.

Elevated ASAHI expression has been reported in various types of human cancers such as prostate, breast and head and neck [38, 39] and has been associated to increased malignancy and worse clinical outcome [40–42]. However, ASAHI expression correlates with a good prognosis in ER-positive breast cancer [43, 44], thereby indicating that high ASAHI expression is not necessarily an indicator of unfavorable tumor features and lower survival.

Further, defects in the *ASAH1* gene result in the lysosomal storage disease Farber (FD) lipogranulomatosis, with an invariably fatal outcome [45]. FD patients are not prone to develop cancer. However, individuals with the most common “classical” form of FD die at approximately 2 years of age, before melanoma can develop. The data gathered here on the role of ASAHI in melanoma cells highlighted genes and signaling cascades that might serve as new potential therapeutic targets in the FD patients.

The pro- or anti-tumoral role of ASAHI can be explained by tissue-specific functions or by its involvement during specific stages of cancer. Supporting this idea, MITF expression must transiently decrease to enable melanoma cell migration and invasion but high MITF expression must be recovered to allow the growth of the metastases [14, 16, 46]. In response to microenvironmental signals, MITF exhibits an oscillatory pattern of expression and melanoma cells switch back-and-forth between proliferative and invasive to drive the metastatic disease [3, 8, 16]. ASAHI might follow the same oscillatory model as MITF.

MITF-silenced melanoma cells also display features of senescence [30, 47]. ASAHI-depleted cells were positive for the senescence-associated  $\beta$ -galactosidase staining (Supplementary figure 7G), in agreement with a previous report [48], and also displayed traces of the pro-inflammatory secretome, illustrated by an increased expression of CCL2 and CYR61, as we previously reported in MITF low cells [49, 50]. Melanoma cells with reduced expression of ASAHI exhibited a molecular program linked to invasion that partially overlapped that of MITF loss. Transcriptomic analysis of melanoma cells transfected with ASAHI siRNA revealed no change compared to control cells in ZEB1 or SNAIL and an increase in TWIST1, BRN2 or SLUG expression, which are critical factors for melanoma progression and metastasis [34, 51, 52]. Additionally, only insulin-like growth factor receptor 1 (IGF1R), out of other critical tyrosine kinase receptors (PDGFRB, AXL, EGFR, ERBB3, EPHA2) that were reported to be deregulated in the MITF low invasive phenotype [6, 8, 53], was enhanced in ASAHI-silenced melanoma cells. Thus, the gene expression signature of ASAHI-inhibited cells appeared intermediate between the proliferative and invasive phenotypes reported for MITF. This is consistent with previous reports showing that a subgroup of profiled melanoma cell lines was intermediate between the two states [26, 54]. Further, melanoma cells with both proliferative and invasive phenotypes have been recently described [55].

Noteworthy, melanoma cells expressing classical markers of senescence were reported to retain their ability to migrate and invade [56]. This is consistent with our findings demonstrating that ASAHI loss induced a senescence-like phenotype and enhanced the motile ability of melanoma cells. Lai et al. [48] also showed that ASAHI-null cells lose

the ability to form cancer-initiating cells. Contrastingly, we demonstrated that cells in which ASAH1 expression was inhibited via siRNA gain a motile mesenchymal phenotype, which is a feature of cancer stem populations. This discrepancy can be explained by the complete compared to transient inhibition of ASAH1 that prevents adaptation through plastic ability of melanoma cells. The partial loss-of-function phenotype generated by RNA interference (RNAi) may more accurately recapitulate the effects of microenvironment than the complete loss-of-function phenotype. Furthermore, the transcriptomic analysis revealed that ASAH1 inhibition by siRNA triggered a slight decrease in expression of mRNA for MITF, yet it did not reach the statistical threshold. Nevertheless, at the protein level, forced expression of ASAH1 enhanced MITF expression and ASAH1 siRNA reduced MITF expression. These observations suggested a complex post-transcriptional regulation of MITF by ASAH1 that needs further studies to be elucidated. Migration requires the coordinated regulation of both E-cadherin-mediated cell–cell adhesions and integrin-mediated adhesions that contact the surrounding extracellular matrix (ECM) [57]. In line with that, E-cadherin inhibition and increased expression of TWIST1, a known E-cadherin transcriptional repressor [34, 58], paralleled ASAH1 loss. Supporting our data, sphingosine-1-phosphate (S1P) production, which is produced by ASAH1 activity, has been reported to suppress migration of breast cancer cells through E-cadherin re-expression and enhanced cell–cell adhesion [59]. Besides, we observed that ASAH1 loss favored anchorage-independent growth, and correlates with acquisition of mesenchymal properties and with integrin activation. Accordingly, cells with reduced ASAH1 expression displayed heightened integrin and FAK signaling. Among integrin, we identified integrin  $\alpha$ V $\beta$ 5 as the main dimer responsible for melanoma cell migration mediated by ASAH1 inhibition. In highly invasive melanoma cells, integrin  $\alpha$ V $\beta$ 5 was also shown to regulate vascular endothelial growth factor (VEGF)-A secretion and activation of the vascular endothelium, a key step in the extravasation process and formation of distant metastasis [60]. Our transcriptomic analysis revealed that VEGF-C is one of the top deregulated genes upon ASAH1 reduction. Additional candidates that may reflect aspects of migration and heterogeneity of melanoma cells include several transcription factors, such as BRN2 and NFIB, that were found increased in our transcriptomic analysis of ASAH1-inhibited cells. Recently, NFIB has been shown to mediate BRN2-driven melanoma cell migration and invasion through upregulation of EZH2 and downregulation of MITF [61, 62]. However, in our transcriptomic analysis EZH2 mRNA expression was inhibited after ASAH1 inhibition by siRNA, instead of being increased as reported in response to BRN2 forced expression [61]. Thus, these observations

suggest that the increase in motile and invasive properties evoked by ASAH1 inhibition and by BRN2 forced expression are different.

Altogether, we show that ASAH1 influences the phenotypic switch in melanoma cells and that melanoma cells acquire motile properties after the loss of ASAH1. Further, our findings point out to a link between metabolism of sphingolipid and melanoma cell plasticity and open new therapeutic perspectives in melanoma.

## Materials and methods

### Cell cultures and reagent

All human melanoma cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 7% fetal calf serum at 37 °C in a humidified CO<sub>2</sub> incubator. The human melanoma cell lines WM3912, WM8 and WM3918 are a gift of Dr. M Herlyn (The Wistar Institute, Philadelphia, PA). Other melanoma cell lines were purchased from the American Tissue Culture Collection. All cell lines were regularly tested for mycoplasma contamination.

### Human tumor samples and immunohistochemical analyses

Twenty BRAF<sup>V600</sup>-mutated melanoma tumor samples were obtained through the Biological Resource Center of the Hôpital Lyon Sud, Hospices Civils de Lyon, and were used with the patient's written informed consent. This study was approved by the scientific board of the Hospices Civils de Lyon. Formalin-fixed, paraffin-embedded and 3  $\mu$ m-thick tissue sections underwent immunohistochemical (IHC) staining using commercially available antibodies against MITF (C5/D5, mouse monoclonal, 1/200, Roche) and ASAH1 (ab74469, 1/100, Abcam, Cambridge, MA, USA) and Ultraview red detection or DAB revelation. For MITF, the staining was nuclear while for ASAH1 the staining was cytoplasmic. A blinded evaluation of the staining was carried out by experienced pathologists.

### Gain- and loss-of-function experiments

Briefly, cells were transfected with 20 nM of siRNA plus 5  $\mu$ l lipofectamine<sup>TM</sup> RNAiMAX in opti-MEM medium (Invitrogen, San Diego, CA, USA). Control (siC) and siRNAs for MITF have been previously described [63]. siRNAs to ASAH1 were from Invitrogen.

Cells were infected with lentiviral particles for ASAH1 and when indicated 24 h later they were transfected with control or MITF siRNA for 72 h.

## Cell count and viability

Cell count and viability were determined in flow cytometry by adding DAPI at 1 µg/ml and for a short time to the population of cells.

## Colony formation assay

The 501mel melanoma cells were transfected with control or ASAH1 siRNA for 48 h. Cells were trypsinized, seeded in 6-well plates ( $3 \times 10^3$ ) and were then placed in a 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> incubator. Colonies of cells were stained with 0.04% crystal violet/2% ethanol in phosphate-buffered saline for 30 min after for 14 days. Picture of crystal violet-stained wells were taken. The colony formation assay was performed in triplicate.

## Anchorage-independent growth

The 501mel melanoma cells were transfected with control or siRNA to ASAH1 and next subjected to a two-layer soft agar assay in 6-well plates. Cells ( $1.5 \times 10^4$ ) were mixed with 2 ml of 1× culture medium with 10% fetal bovine serum (FBS) and 0.3% agar, cooled to 42 °C, and plated on top of a solidified bottom layer of 2 ml of 1% noble agar in cell respective 1× culture medium. Every 2 days, 1 ml of growth medium was added into the wells. After 1 week, bright-field images were taken using a Zeiss Axiovert S100. The number of colonies grown in soft agar was quantified, and the colony size (i.e., image area) was calculated using Zeiss ZEN software.

## LC/MS analysis of sphingolipids and ASAH1 activity

Sphingolipids were extracted and prepared as previously published [64] and analyzed by liquid chromatography/mass spectrometry (LC/MS) as previously described [29]. ASAH1 activity was measured as previously reported [29].

## Immunofluorescence and confocal experiments

Cells were fixed and permeabilized as previously described [49] before being exposed to anti-ASAH1 1:100 (Sigma, HPA005468) antibodies and then with 1:1000 dilution of anti-rabbit Alexa Fluor 594 labeled secondary antibody (Invitrogen, San Diego, CA, USA). Confocal optical sections of cells were obtained with a Zeiss LSM510Meta microscope (Zeiss, Göttingen Germany) using a 63× NA1.4 Plan-Apochromat oil immersion lens. The parameters of the system were adjusted to avoid saturation.

## Western blot assays

Western blots were carried out as previously described [46]. Cell lysates (30 µg) were separated by SDS-PAGE,

transferred onto a polyvinylidene difluoride membrane and then probed with antibodies to MITF (Abcam, Ab12039), ASAH1 (Sigma, HPA005468), ERK2 (Santa Cruz Biotechnology, clone D-2), phospho-ERK1/2 (Thr202/Tyr204) (Cell Signaling Technology Inc., #2370), anti-phosphoFAK (Cell Signaling Technology Inc., #3283), total FAK (Millipore, clone 4.47), p27 (Ozyme, #3686), ITGβ5 (Cell Signaling Technology Inc., D24A5), ITGαV (Santa Cruz biotechnology, p2W7), to integrin αVβ5 (Abcam, ab24694), E-cadherin (Ozyme, #5296) and HSP90 (Santa Cruz Biotechnology, sc-13119). Horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit or anti-mouse antibodies were from Dakopatts (Glostrup, Denmark). Proteins were visualized with the ECL system (Amersham). The western blots shown are representative of at least three independent experiments.

## Migration assays

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

Cell migration was also studied in classical wound healing assays. Cells were grown to form a confluent monolayer and next were wounded with a p200 pipette tip. Pictures (10×) of the same areas were recorded using an Axiovert 200M microscope (Zeiss) equipped with a Cool-Snap™ES camera (Photometric®, Roper Scientific).

## mRNA preparation, real-time/quantitative PCR

mRNA isolation was carried out with Trizol (Invitrogen), according to standard procedure. QRT-PCR was carried out with SYBR® Green I and Multiscribe Reverse Transcriptase (Applied Biosystems) and monitored by an ABI Prism 7900 Sequence Detection System (Applied Biosystems, Foster City, CA). Detection of SB34 gene was used to normalize the results. Primers were designed for each complementary DNA with Primer Express Software (Applied Biosystems) and are available upon request.

## Gene expression profiling and bioinformatics

Total RNA of three different cell lines transfected with control scrambled siRNA or siRNA to ASAH1 was isolated with TRIZOL. Integrity of RNA was assessed using an Agilent BioAnalyser 2100 (Agilent Technologies) (RNA Integrity Number (RIN) above 8). RNA samples were then

labeled with Cy3 dye using the low RNA input QuickAmp kit (Agilent) as recommended by the supplier. Then, 600 ng of labeled cRNA probe was hybridized on  $8 \times 60$  K high-density SurePrint G3 gene expression human Agilent microarrays. Data analyses were performed using R (<http://www.r-project.org/>). The quality control was performed using the Bioconductor package arrayQualityMetrics and custom R scripts. We used a linear modeling approach to calculate log ratios, moderated *t* statistics, log odds ratios of differential expression (B statistic), and *p* values for each comparison of interest. The *p* values were adjusted for multiple testing using the Benjamini and Hochberg method, which controls the false discovery rate. Differentially expressed genes were selected based on  $\text{AbsLogFC} > 1$  and adjusted *p* value  $< 0.05$ . Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathway enrichment analysis was performed using DAVID (<http://david.abcc.ncifcrf.gov/>).  $P < 0.05$  was used as the threshold criterion.

The experimental data and microarray design have been deposited in the NCBI Gene Expression Omnibus (GEO) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) under the accession number GSE115385.

To assess the link between ASAH1 and the three phenotypes (proliferative, invasive, immune) described in Verfaillie et al. [33], we used the SKCM dataset from TCGA. RNA-sequencing (RNA-seq) and clinical data were available for 472 patients and downloaded from the TCGA data portal (<https://portal.gdc.cancer.gov/>). RNA-seq data were normalized using the Bioconductor package DESeq2 and log<sub>2</sub> transformed. Patients were next classified and assigned to one of the three phenotypes using molecular marker genes characteristic of each phenotype and by computing a *z*-score based on the following formula:  $z\text{-score} = (\text{expression in sample} - \text{mean expression in all samples}) / \text{standard deviation of expression in all samples}$ . We next computed the median of *z*-scores of each phenotype and then associated the phenotype with the higher value to each patient. We compared the ASAH1 expression in tumor samples, distinguished by the inferred phenotypes. The *p* values were calculated by the Wilcoxon rank sum test.

## Statistical analysis

Data are presented as averages  $\pm$  SD and were analyzed by two-sided student *t*-test. A *p* value  $\leq 0.05$  between the experimental and control groups was considered statistical significant. Degree of similarity analysis of genes with similar patterns of expression to MITF across the melanomas was performed using Pearson's correlation coefficient.

**Acknowledgements** This work was supported by Inserm, La Société Française de Dermatologie, and by a grant from INCA (INCA\_10573). CP is a fellowship from la Ligue Nationale contre le Cancer. The authors thank Dr. M Sewer (San Diego, USA) for providing the ASAH1 promoter vector. WM3912, WM8, WM3928 and WM3918 human melanoma cell lines were a kind gift from H Meenhard and G Zhang (Wistar melanoma Institute, Philadelphia, USA).

**Author contributions** CB, NA-A, RB and TL designed the research, analyzed the results and wrote the manuscript. GT, SD, JC and PB performed and analyzed the immunohistochemistry experiments. NN performed the bioinformatics analysis. JL, DG, CP, CG, KB, VG, PC, SP and BM performed all the other experiments.

## Compliance with ethical standards

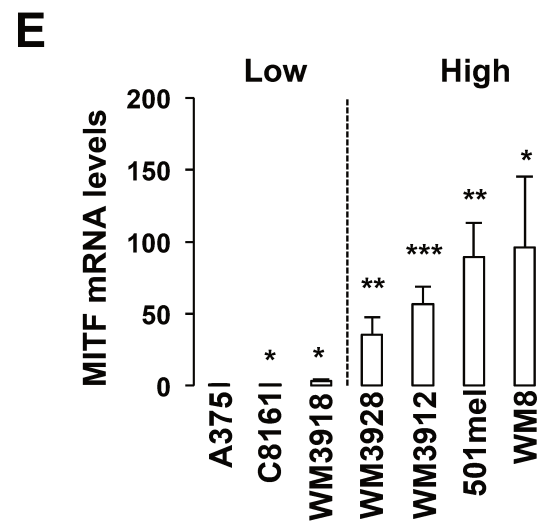
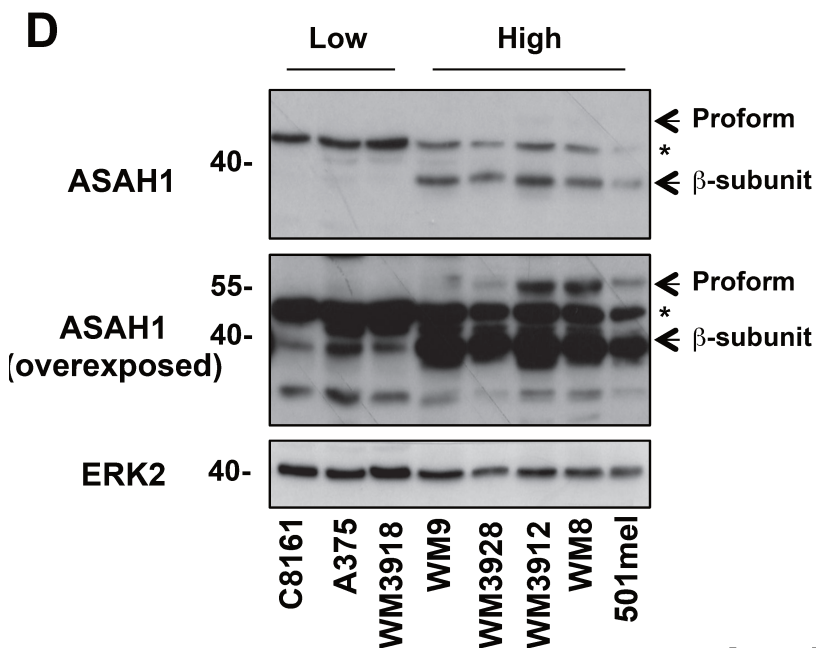
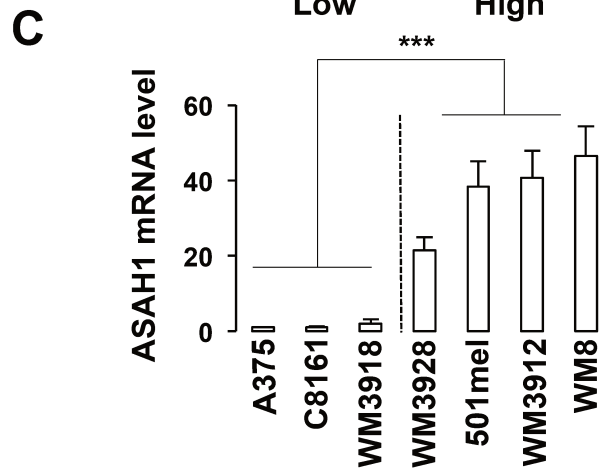
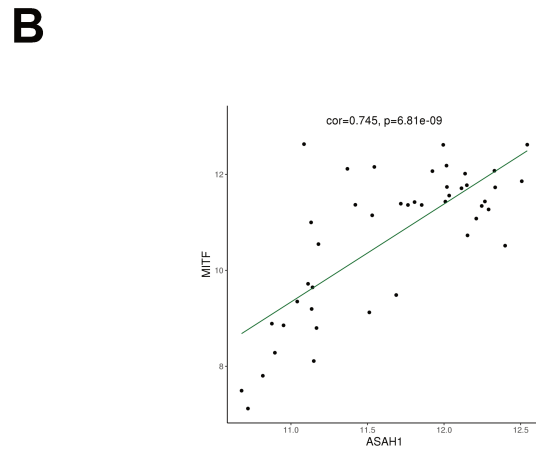
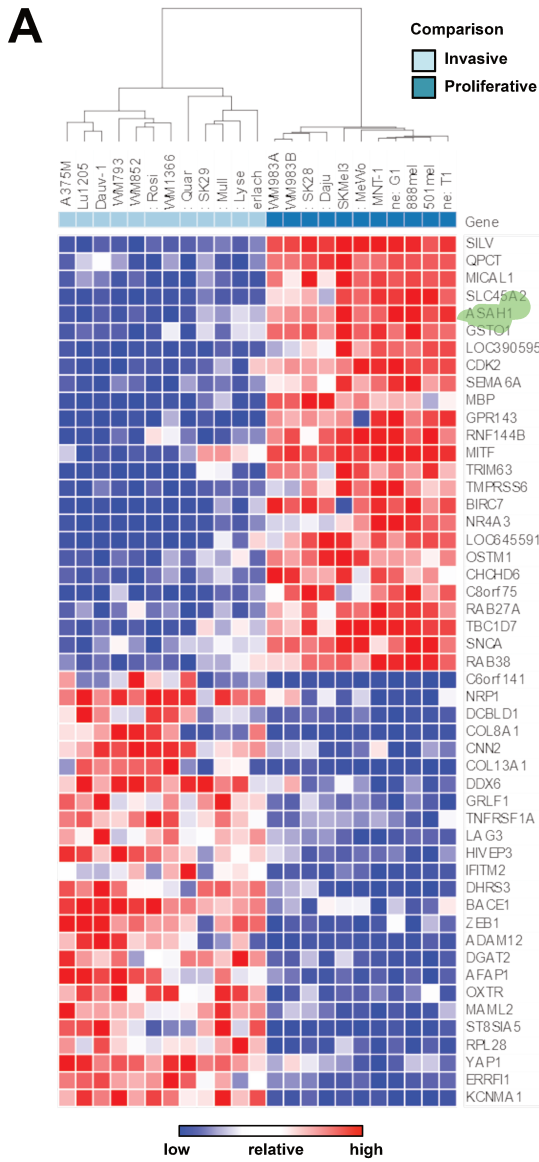
**Conflict of interest** The authors declare that they have no conflict of interest.

## References

- Colombino M, Sini M, Lissia A, De Giorgi V, Stanganelli I, Ayala F, et al. Discrepant alterations in main candidate genes among multiple primary melanomas. *J Transl Med.* 2014;12:117.
- Kemper K, Krijgsman O, Cornelissen-Steijger P, Shahrabi A, Weeber F, Song JY, et al. Intra- and inter-tumor heterogeneity in a vemurafenib-resistant melanoma patient and derived xenografts. *EMBO Mol Med.* 2015;7:1104–18.
- 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.
- Johannessen CM, Johnson LA, Piccioni F, Townes A, Frederick DT, Donahue MK, et al. A melanocyte lineage program confers resistance to MAP kinase pathway inhibition. *Nature.* 2013;504:138–42.
- Konieczkowski DJ, Johannessen CM, Abudayyeh O, Kim JW, Cooper ZA, Piris V, et al. A melanoma cell state distinction influences sensitivity to MAPK pathway inhibitors. *Cancer Discov.* 2014;4:816–27.
- Muller J, Krijgsman O, Tsoi J, Robert L, Hugo W, Song C, et al. Low MITF/AXL ratio predicts early resistance to multiple targeted drugs in melanoma. *Nat Commun.* 2014;5:5712.
- Van Allen EM, Foye A, Wagle N, Kim W, Carter SL, McKenna A, et al. Successful whole-exome sequencing from a prostate cancer bone metastasis biopsy. *Prostate Cancer Prostatic Dis.* 2014;17:23–27.
- Falletta P, Sanchez-Del-Campo L, Chauhan J, Efferm M, Kenyon A, Kershaw CJ, et al. Translation reprogramming is an evolutionarily conserved driver of phenotypic plasticity and therapeutic resistance in melanoma. *Genes Dev.* 2017;31:18–33.
- Riesenberg S, Groetchen A, Siddaway R, Bald T, Reinhardt J, Smorra D, et al. MITF and c-Jun antagonism interconnects melanoma dedifferentiation with pro-inflammatory cytokine responsiveness and myeloid cell recruitment. *Nat Commun.* 2015;6:8755.
- Bertolotto C, Lesueur F, Giuliano S, Strub T, de Lichy M, Bille K, et al. A SUMOylation-defective MITF germline mutation predisposes to melanoma and renal carcinoma. *Nature.* 2011;480:94–98.
- Paillerets BB, Lesueur F, Bertolotto C. A germline oncogenic MITF mutation and tumor susceptibility. *Eur J Cell Biol.* 2014;93:71–5.

12. Bonet C, Luciani F, Ottavi JF, Leclerc J, Jouenne FM, Boncompagni M, et al. Deciphering the role of oncogenic MITF318K in senescence delay and melanoma progression. *J Natl Cancer Inst* 2017; 109. djw340
13. Yokoyama S, Woods SL, Boyle GM, Aoude LG, MacGregor S, Zismann V, et al. A novel recurrent mutation in MITF predisposes to familial and sporadic melanoma. *Nature*. 2011;480:99–103.
14. Carreira S, Goodall J, Denat L, Rodriguez M, Nuciforo P, Hoek KS, et al. Mitf regulation of Dia1 controls melanoma proliferation and invasiveness. *Genes Dev*. 2006;20:3426–39.
15. Cheli Y, Ohanna M, Ballotti R, Bertolotto C. Fifteen-year quest for microphthalmia-associated transcription factor target genes. *Pigment Cell Melanoma Res*. 2010;23:27–40.
16. Cheli Y, Giuliano S, Botton T, Rocchi S, Hofman V, Hofman P, et al. Mitf is the key molecular switch between mouse or human melanoma initiating cells and their differentiated progeny. *Oncogene*. 2011;30:2307–18.
17. Cheli Y, Giuliano S, Fenouille N, Allegra M, Hofman V, Hofman P, et al. Hypoxia and MITF control metastatic behaviour in mouse and human melanoma cells. *Oncogene*. 2012;31:2461–70.
18. Cairns RA, Harris IS, Mak TW. Regulation of cancer cell metabolism. *Nat Rev Cancer*. 2011;11:85–95.
19. Warburg O. On respiratory impairment in cancer cells. *Science*. 1956;124:269–70.
20. Ganapathy-Kanniappan S, Geschwind JF. Tumor glycolysis as a target for cancer therapy: progress and prospects. *Mol Cancer*. 2013;12:152.
21. Haq R, Shoag J, Andreu-Perez P, Yokoyama S, Edelman H, Rowe GC, et al. Oncogenic BRAF regulates oxidative metabolism via PGC1alpha and MITF. *Cancer Cell*. 2013;23:302–15.
22. Vazquez F, Lim JH, Chim H, Bhalla K, Girmun G, Pierce K, et al. PGC1alpha expression defines a subset of human melanoma tumors with increased mitochondrial capacity and resistance to oxidative stress. *Cancer Cell*. 2013;23:287–301.
23. Currie E, Schulze A, Zechner R, Walther TC, Farese RV Jr. Cellular fatty acid metabolism and cancer. *Cell Metab*. 2013;18:153–61.
24. Morad SA, Cabot MC. Ceramide-orchestrated signalling in cancer cells. *Nat Rev Cancer*. 2013;13:51–65.
25. Ferlinz K, Kopal G, Bernardo K, Linke T, Bar J, Breiden B, et al. Human acid ceramidase: processing, glycosylation, and lysosomal targeting. *J Biol Chem*. 2001;276:35352–60.
26. Rambow F, Job B, Petit V, Gesbert F, Delmas V, Seberg H, et al. New functional signatures for understanding melanoma biology from tumor cell lineage-specific analysis. *Cell Rep*. 2015;13:840–53.
27. Shtraizent N, Eliyahu E, Park JH, He X, Shalgi R, Schuchman EH. Autoproteolytic cleavage and activation of human acid ceramidase. *J Biol Chem*. 2008;283:11253–9.
28. Zhou J, Tawk M, Tiziano FD, Veillet J, Bayes M, Nolent F, et al. Spinal muscular atrophy associated with progressive myoclonic epilepsy is caused by mutations in ASAH1. *Am J Hum Genet*. 2012;91:5–14.
29. Bedia C, Casas J, Garcia V, Levade T, Fabrias G. Synthesis of a novel ceramide analogue and its use in a high-throughput fluorogenic assay for ceramidases. *Chembiochem*. 2007;8:642–8.
30. Strub T, Giuliano S, Ye T, Bonet C, Keime C, Kobi D, et al. Essential role of microphthalmia transcription factor for DNA replication, mitosis and genomic stability in melanoma. *Oncogene*. 2011;30:2319–32.
31. Ohanna M, Cerezo M, Nottet N, Bille K, Didier R, Beranger G, et al. Pivotal role of NAMPT in the switch of melanoma cells toward an invasive and drug-resistant phenotype. *Genes Dev*. 2018;32:448–61.
32. Walkley SU, Vanier MT. Secondary lipid accumulation in lysosomal disease. *Biochim Biophys Acta*. 2009;1793:726–36.
33. 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.
34. Caramel J, Papadogeorgakis E, Hill L, Browne GJ, Richard G, Wierinckx A, et al. A switch in the expression of embryonic EMT-inducers drives the development of malignant melanoma. *Cancer Cell*. 2013;24:466–80.
35. Realini N, Palese F, Pizzirani D, Pontis S, Basit A, Bach A, et al. Acid ceramidase in melanoma: expression, localization, and effects of pharmacological inhibition. *J Biol Chem*. 2016;291:2422–34.
36. Lucki N, Sewer MB. The cAMP-responsive element binding protein (CREB) regulates the expression of acid ceramidase (ASAH1) in H295R human adrenocortical cells. *Biochim Biophys Acta*. 2009;1791:706–13.
37. Lucki NC, Sewer MB. Genistein stimulates MCF-7 breast cancer cell growth by inducing acid ceramidase (ASAH1) gene expression. *J Biol Chem*. 2011;286:19399–409.
38. Don AS, Lim XY, Couttas TA. Re-configuration of sphingolipid metabolism by oncogenic transformation. *Biomolecules*. 2014;4:315–53.
39. Truman JP, Garcia-Barros M, Obeid LM, Hannun YA. Evolving concepts in cancer therapy through targeting sphingolipid metabolism. *Biochim Biophys Acta*. 2014;1841:1174–88.
40. Cheng JC, Bai A, Beckham TH, Marrison ST, Yount CL, Young K, et al. Radiation-induced acid ceramidase confers prostate cancer resistance and tumor relapse. *J Clin Invest*. 2013;123:4344–58.
41. Eloeimy S, Liu X, McKillop JC, El-Zawahry AM, Holman DH, Cheng JY, et al. Role of acid ceramidase in resistance to FasL: therapeutic approaches based on acid ceramidase inhibitors and FasL gene therapy. *Mol Ther*. 2007;15:1259–63.
42. Mahdy AE, Cheng JC, Li J, Eloeimy S, Meacham WD, Turner LS, et al. Acid ceramidase upregulation in prostate cancer cells confers resistance to radiation: AC inhibition, a potential radiosensitizer. *Mol Ther*. 2009;17:430–8.
43. Ruckhaberle E, Holtrich U, Engels K, Hanker L, Gatje R, Metzler D, et al. Acid ceramidase 1 expression correlates with a better prognosis in ER-positive breast cancer. *Climacteric*. 2009;12:502–13.
44. Sanger N, Ruckhaberle E, Gyorffy B, Engels K, Heinrich T, Fehm T, et al. Acid ceramidase is associated with an improved prognosis in both DCIS and invasive breast cancer. *Mol Oncol*. 2015;9:58–67.
45. Park JH, Schuchman EH. Acid ceramidase and human disease. *Biochim Biophys Acta*. 2006;1758:2133–8.
46. Bonet C, Giuliano S, Ohanna M, Bille K, Allegra M, Lacour JP, et al. Aurora B is regulated by the mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase (MAPK/ERK) signaling pathway and is a valuable potential target in melanoma cells. *J Biol Chem*. 2012;287:29887–98.
47. Giuliano S, Cheli Y, Ohanna M, Bonet C, Beuret L, Bille K, et al. Microphthalmia-associated transcription factor controls the DNA damage response and a lineage-specific senescence program in melanomas. *Cancer Res*. 2010;70:3813–22.
48. Lai M, Realini N, La Ferla M, Passalacqua I, Matteoli G, Ganesan A, et al. Complete acid ceramidase ablation prevents cancer-initiating cell formation in melanoma cells. *Sci Rep*. 2017;7:7411.
49. Ohanna M, Giuliano S, Bonet C, Imbert V, Hofman V, Zangari J, et al. Senescent cells develop a PARP-1 and nuclear factor- $\kappa$ B-associated secretome (PNAS). *Genes Dev*. 2011;25:1245–61.
50. Ohanna M, Cheli Y, Bonet C, Bonazzi VF, Allegra M, Giuliano S, et al. Secretome from senescent melanoma engages the STAT3

- pathway to favor reprogramming of naive melanoma towards a tumor-initiating cell phenotype. *Oncotarget*. 2013;4:2212–24.
51. Gupta PB, Kuperwasser C, Brunet JP, Ramaswamy S, Kuo WL, Gray JW, et al. The melanocyte differentiation program predisposes to metastasis after neoplastic transformation. *Nat Genet*. 2005;37:1047–54.
  52. Pinner S, Jordan P, Sharrock K, Bazley L, Collinson L, Marais R, et al. Intravital imaging reveals transient changes in pigment production and Brn2 expression during metastatic melanoma dissemination. *Cancer Res*. 2009;69:7969–77.
  53. Villanueva J, Vultur A, Lee JT, Somasundaram R, Fukunaga-Kalabis M, Cipolla AK, et al. Acquired resistance to BRAF inhibitors mediated by a RAF kinase switch in melanoma can be overcome by cotargeting MEK and IGF-1R/PI3K. *Cancer Cell*. 2010;18:683–95.
  54. Widmer DS, Cheng PF, Eichhoff OM, Belloni BC, Zipser MC, Schlegel NC, et al. Systematic classification of melanoma cells by phenotype-specific gene expression mapping. *Pigment Cell Melanoma Res*. 2012;25:343–53.
  55. Reinhardt J, Landsberg J, Schmid-Burgk JL, Ramis BB, Bald T, Glodde N, et al. MAPK signaling and inflammation link melanoma phenotype switching to induction of CD73 during immunotherapy. *Cancer Res*. 2017;77:4697–709.
  56. Webster MR, Xu M, Kinzler KA, Kaur A, Appleton J, O'Connell MP, et al. Wnt5A promotes an adaptive, senescent-like stress response, while continuing to drive invasion in melanoma cells. *Pigment Cell Melanoma Res*. 2015;28:184–95.
  57. Canel M, Serrels A, Frame MC, Brunton VG. E-cadherin-integrin crosstalk in cancer invasion and metastasis. *J Cell Sci*. 2013;126:393–401.
  58. Vesuna F, van Diest P, Chen JH, Raman V. Twist is a transcriptional repressor of E-cadherin gene expression in breast cancer. *Biochem Biophys Res Commun*. 2008;367:235–41.
  59. Wang F, Van Brocklyn JR, Edsall L, Nava VE, Spiegel S. Sphingosine-1-phosphate inhibits motility of human breast cancer cells independently of cell surface receptors. *Cancer Res*. 1999;59:6185–91.
  60. Desch A, Strozzyk EA, Bauer AT, Huck V, Niemeyer V, Wieland T, et al. Highly invasive melanoma cells activate the vascular endothelium via an MMP-2/integrin  $\alpha$ v $\beta$ 5-induced secretion of VEGF-A. *Am J Pathol*. 2012;181:693–705.
  61. Fane ME, Chhabra Y, Hollingsworth DE, Simmons JL, Spoerri L, Oh TG, et al. NFIB mediates BRN2 driven melanoma cell migration and invasion through regulation of EZH2 and MITF. *EBioMedicine*. 2017;16:63–75.
  62. Goodall J, Carreira S, Denat L, Kobi D, Davidson I, Nuciforo P, et al. Brn-2 represses microphthalmia-associated transcription factor expression and marks a distinct subpopulation of microphthalmia-associated transcription factor-negative melanoma cells. *Cancer Res*. 2008;68:7788–94.
  63. Larribere L, Hilmi C, Khaled M, Gaggioli C, Bille K, Auberger P, et al. The cleavage of microphthalmia associated transcription factor, MITF, by caspases plays an essential role in melanocyte and melanoma cell apoptosis. *Genes Dev*. 2005;19:1980–5.
  64. Merrill AH Jr, Sullards MC, Allegood JC, Kelly S, Wang E. Sphingolipidomics: high-throughput, structure-specific, and quantitative analysis of sphingolipids by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Methods*. 2005;36:207–24.



## Supplementary figures

### Figure S1: ASAH1 displays an elevated expression in melanoma compared to other tumor.

(A) The data from Rambow et al.<sup>26</sup> were analysed using the Morpheus software (<https://software.broadinstitute.org/morpheus/>). A relative color scheme based on the minimum and maximum values in each row was used to convert values to color. The relative levels are indicated by varying color intensity (low-blue, high-red).

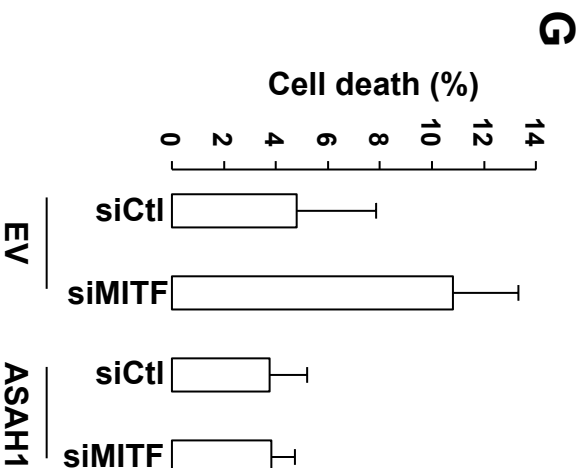
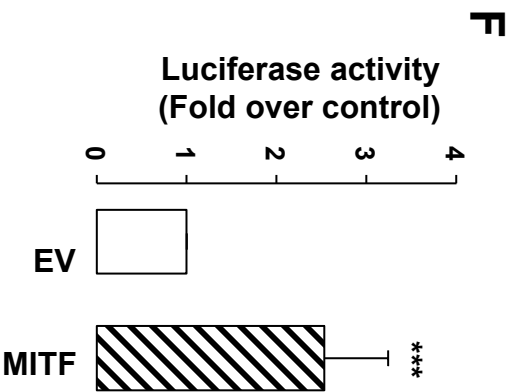
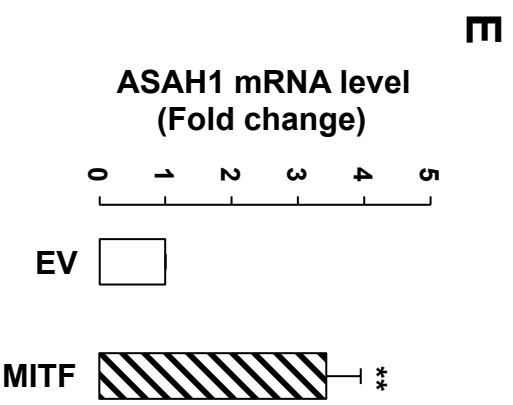
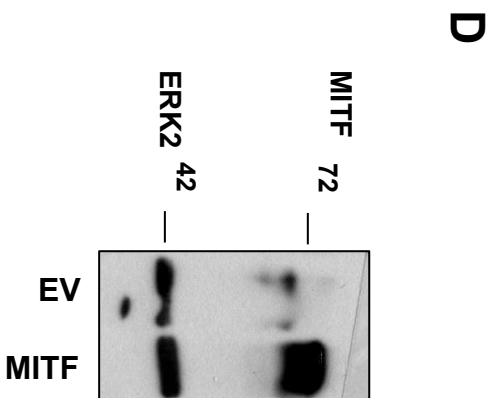
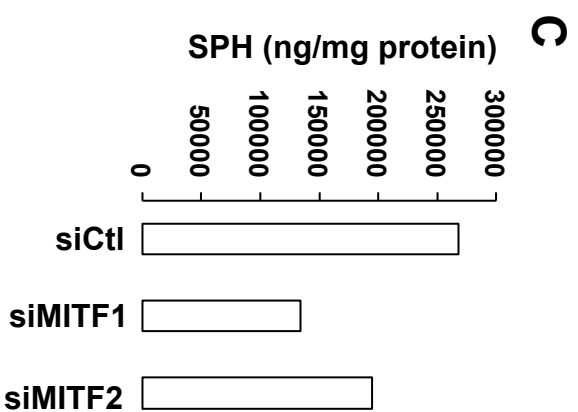
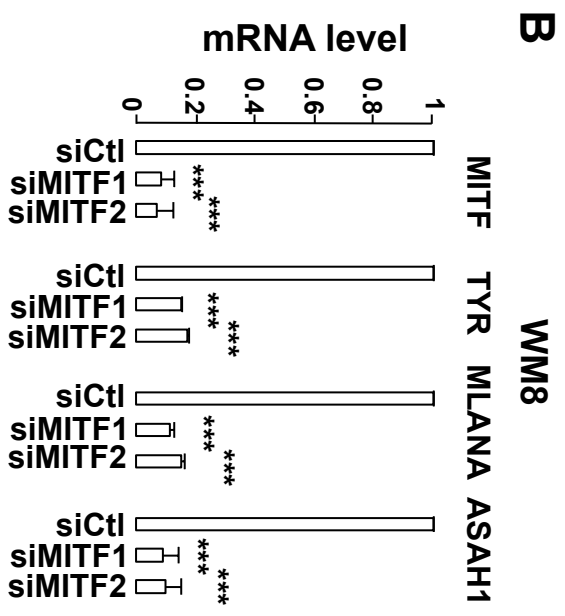
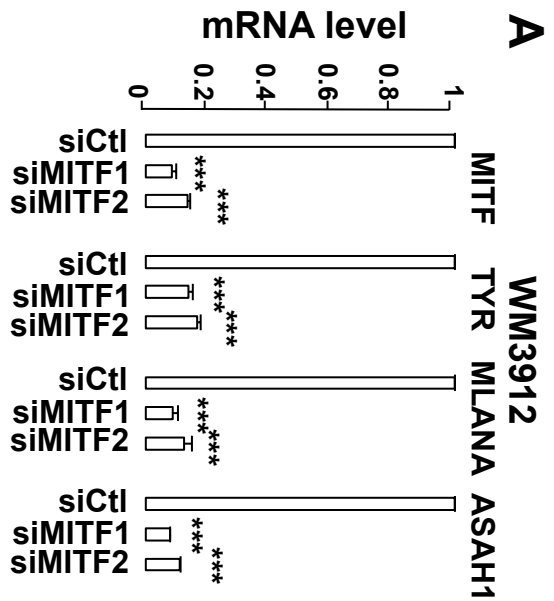
(B) Correlation between ASAH1 and MITF genes expression in melanoma tumors extracted from dataset GSE19234. Gene expression data were log<sub>2</sub> transformed. Pearson's correlation coefficient, used to measure similarity between gene profiles, is shown.

(C) ASAH1 mRNA expression in melanoma cell lines determined by qRT-PCR. Values represent mean + SD of three independent experiments performed in triplicate. \*\*\*p<0.001.

- Immunoblot to ASAH1 with a commercial antibody (HPA005468, Sigma) of total cell extracts isolated from the indicated melanoma cell lines showing the proform (55 kDa) and the b (40 kDa) active subunits. Detection of ERK2 serves as a loading control. The asterisk indicates a non-specific band.

- MITF mRNA expression in melanoma cell lines determined by qRT-PCR. Values represent mean + SD of three independent experiments performed in triplicate. \*p<0.05; \*\*p<0.01; \*\*\*p<0.001.





## Figure S2: MITF controls ASAH1 expression

(A-B) mRNA expression of MITF, two of its target genes (TYROSINASE and MLANA) and ASAH1 in WM3912 and WM8 melanoma cell lines determined by qRT-PCR. Values represent mean + SD of three independent experiments performed in triplicate. \*\*\* $p < 0.001$ .

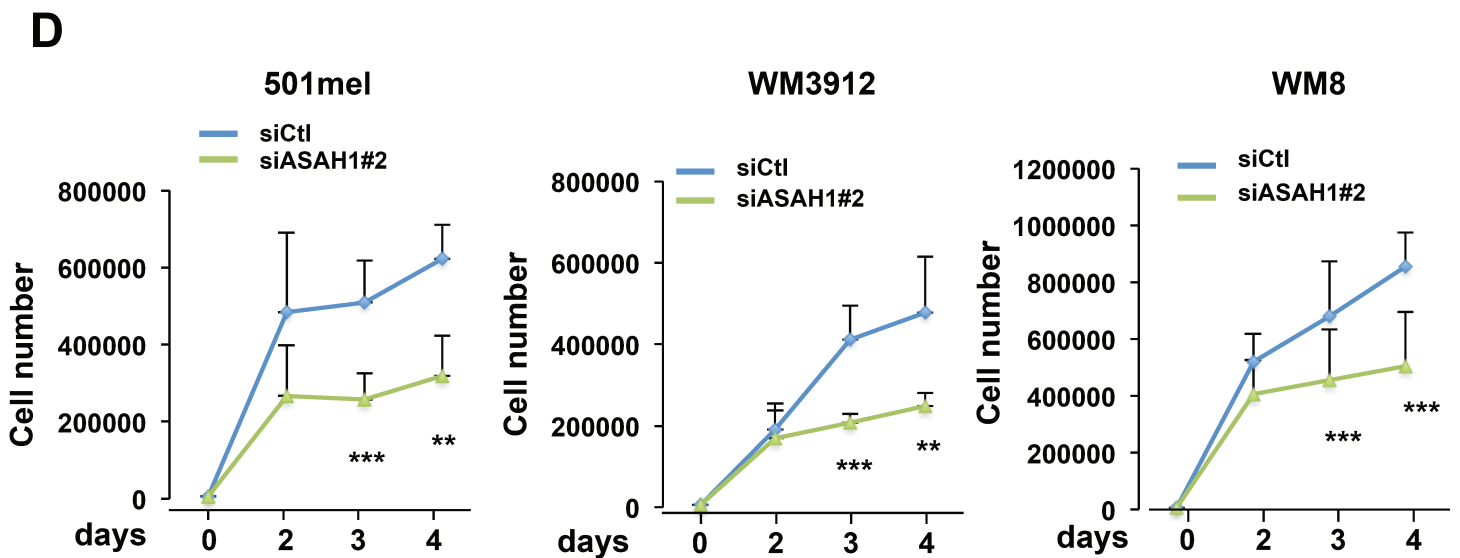
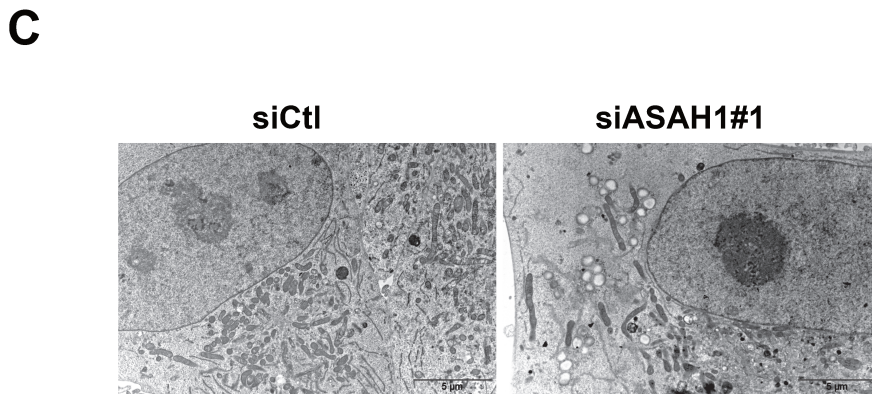
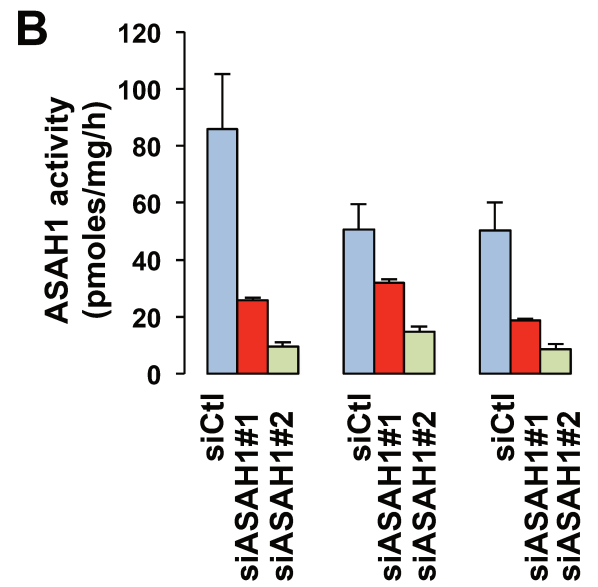
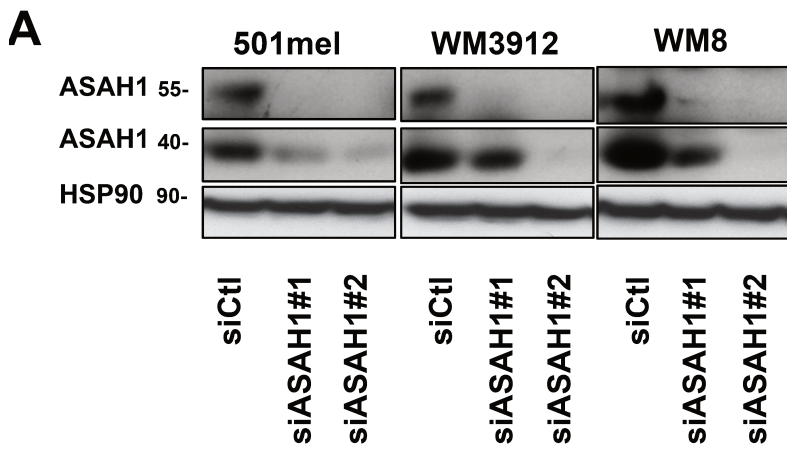
(C) Cellular lipids were extracted, and sphingolipid concentration was determined by LC/MS in control or MITF-suppressed 501mel cells. Data represent the levels of sphingosine (SPH) in ng/mg proteins.

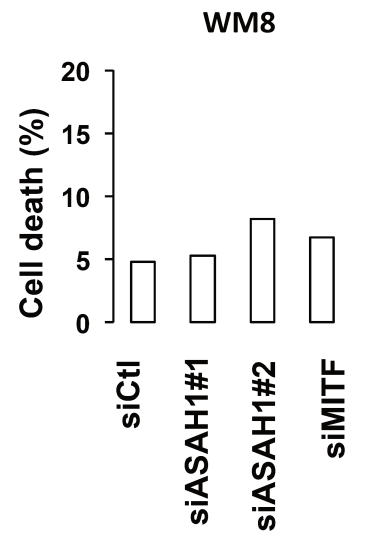
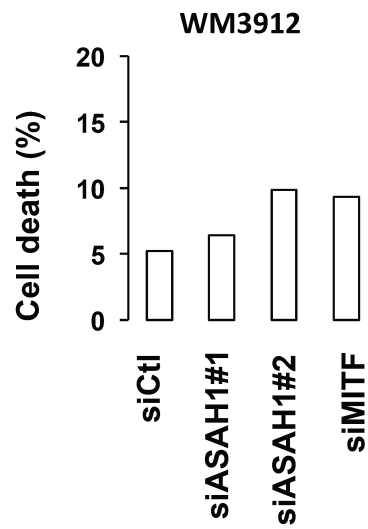
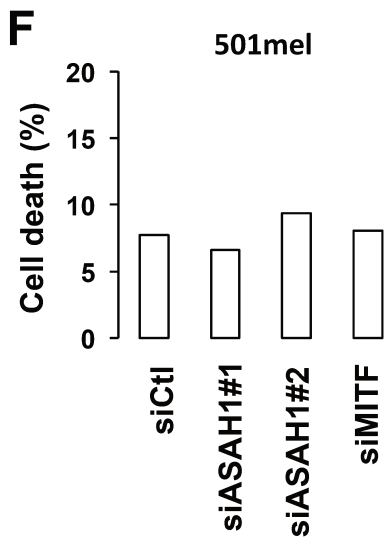
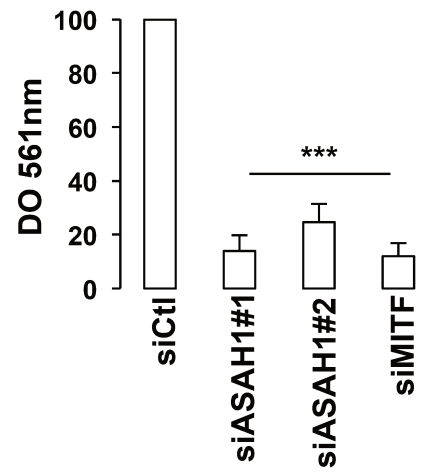
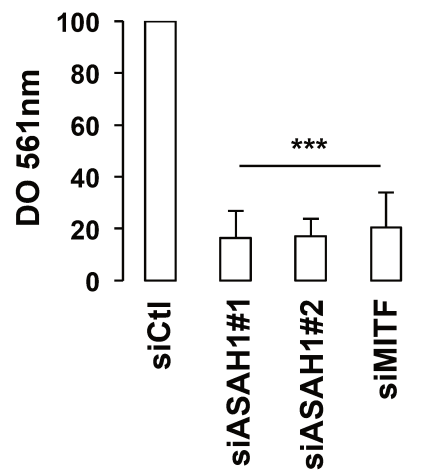
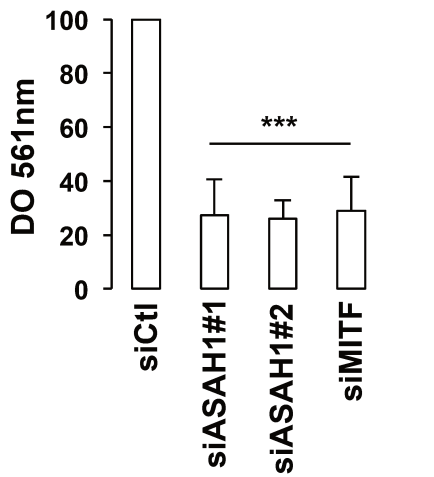
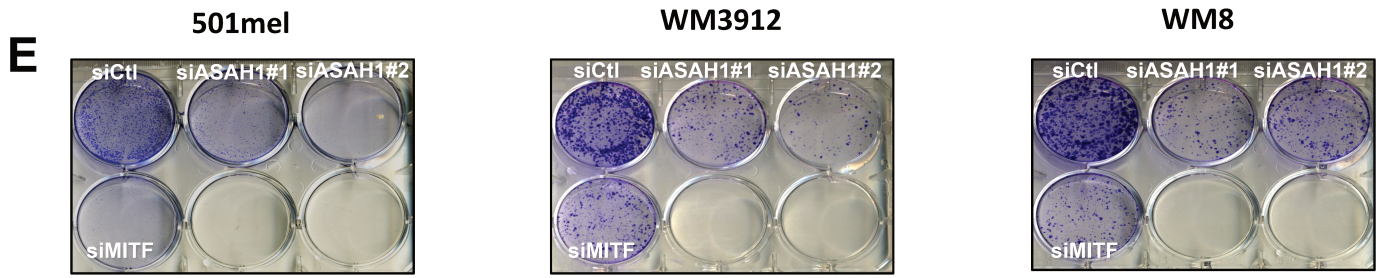
(D) Immunoblot to MITF and ERK2 (loading control) in 501mel melanoma cells with forced expression of MITF compared to control cells.

(E) ASAH1 mRNA expression in 501mel melanoma cells, transduced with an empty adenoviral vector or a vector encoding MITF (72 hrs), as determined by qRT-PCR. Values represent mean + SD of three independent experiments performed in triplicate. \*\* $p < 0.01$ .

(F) Luciferase assay using 501mel cells transfected with the ASAH1 promoter (Lucki et al. 2009) and with empty pcDNA3 vector or with a vector encoding wild type MITF. Forty-eight hours post-transfection, luciferase activity was assayed and normalized by the  $\beta$ -galactosidase activity. Results are expressed as fold stimulation of the basal luciferase activity from cells transfected with empty vector. Data are means + SE of three experiments performed in triplicate. \*\*\* $p < 0.001$ .

(G) 501mel melanoma cells infected with empty or ASAH1 encoding lentiviruses and transfected with control or MITF siRNA were stained with DAPI. DAPI positive cells were monitored by FACS.





### Figure S3: ASAH1 loss inhibits cell proliferation

(A) Immunoblot to ASAH1 of 501mel (left), WM3912 (middle) and WM8 (right) melanoma cells transfected with a control (siCtl) or two different ASAH1 (siASAH1#1 and siASAH1#2) siRNA. The proform (55 kDa) and the  $\beta$  (40 kDa) active subunit are shown. The  $\alpha$  (14 kDa) active subunit is not recognized by the commercial antibody. Detection of ERK2 serves as a loading control.

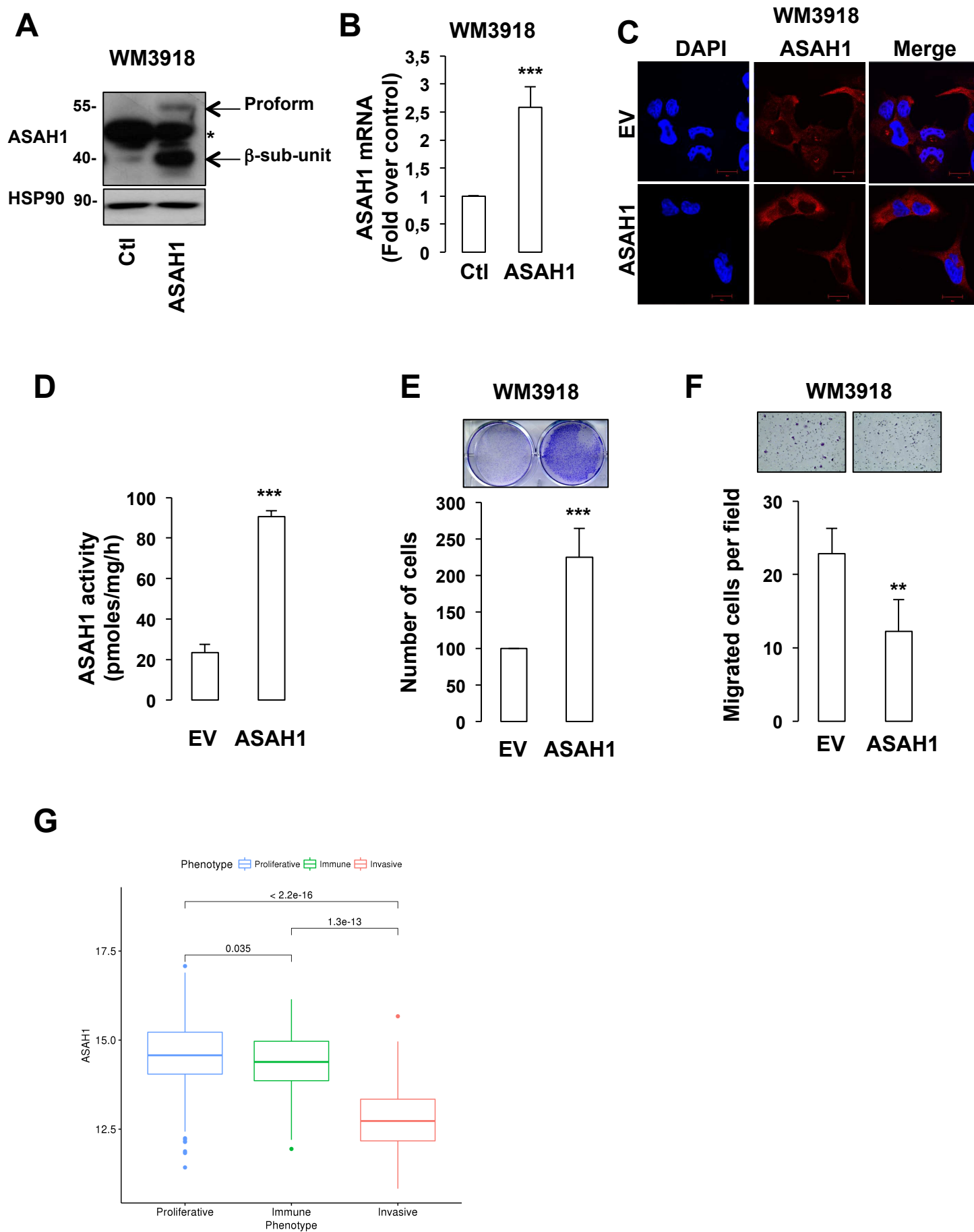
(B) ASAH1 activity in the corresponding melanoma cells. Values represent mean + SD of two independent experiments.

(C) TEM images of WM8 melanoma cells transfected with control or ASAH1 siRNA. Scale bars, 5  $\mu\text{m}$ .

(D) Cell count over time. Values represent mean + SD of three independent experiments. \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ .

(E) Colony formation assay of melanoma cells transfected with control, ASAH1 (ASAH1#1 and ASAH1#2) or MITF siRNA. Colonies were stained with crystal violet after 14 days (representative micrographs are shown) and destained. The relative absorbance, which reflects the number of colony was measured on a spectrophotometer. Values represent mean + SD of three independent experiments. \*\*\* $p < 0.001$ .

(F) FACS analysis of DAPI staining in 501mel (left), WM3912 (middle) and WM8 (right) melanoma cells transfected with a control (siCtl), two ASAH1 (siASAH1#1 and siASAH1#2) or MITF (siMITF) siRNA. DAPI positive cells represent dying cells. Results are expressed in %.



Leclerc\_Supplemental figure 4

#### **Figure S4: ASAH1 controls melanoma cell proliferation**

(A) Immunoblot to ASAH1 of WM3918 melanoma cell line with forced expression of ASAH1 compared to the parental WM3918 cells.

(B) Expression of mRNA for ASAH1 measured using qRT-PCR analysis after forced expression of ASAH1 in WM3918 ASAH1<sup>low</sup> melanoma lines compared to the parental cell lines. Values represent mean + SD of three independent experiments.

\*\*\*p<0.001.

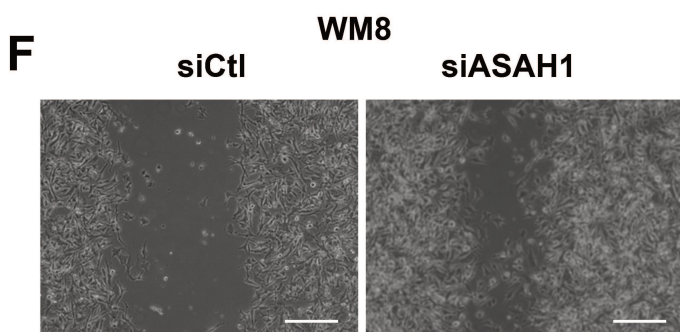
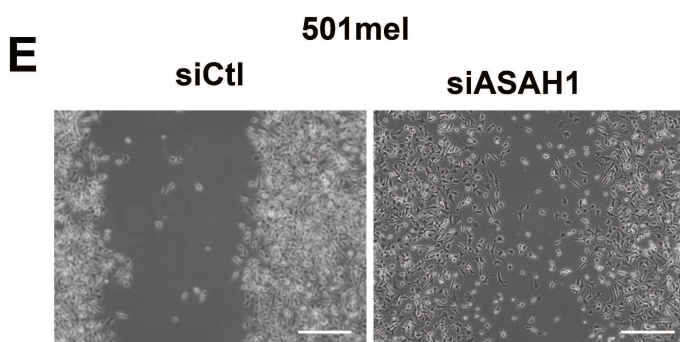
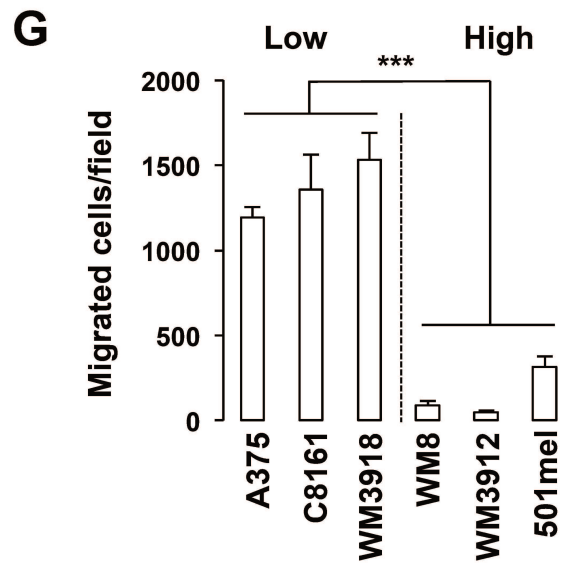
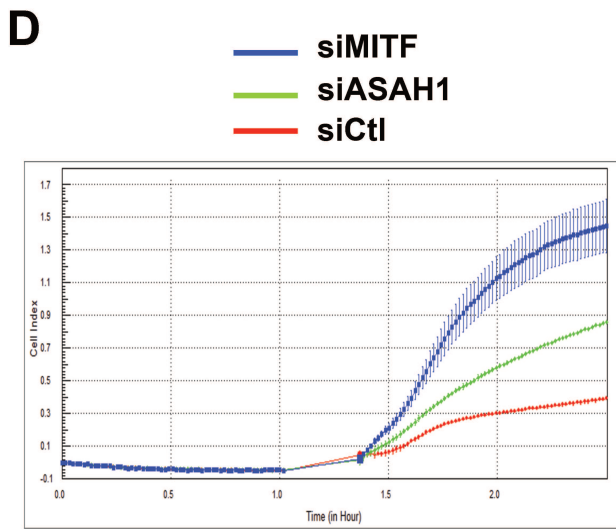
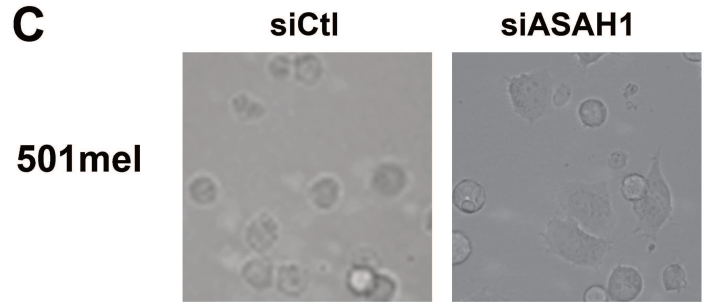
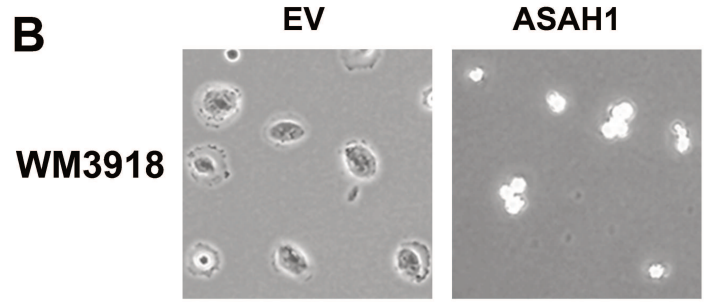
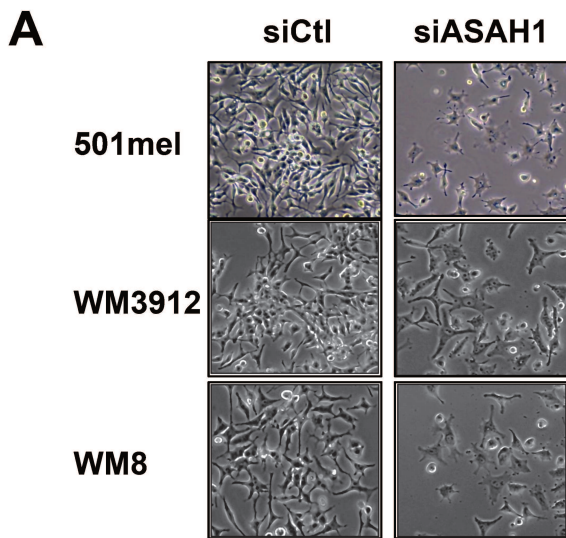
(C) Confocal microscopy images of ASAH1 in control or expressing ASAH1 WM3918 melanoma cells. Scale bar: 20  $\mu$ m

(D) ASAH1 activity after forced expression of ASAH1 in WM918 melanoma cells. Values represent mean + SD of three independent experiments. \*\*\*p<0.001.

(E) Colony formation was assessed 10 days later. Values represent mean + SD of two independent experiments. \*\*\*p<0.001. Representative micrographs are shown.

(F) Migration capacity of WM3918 melanoma cell lines with forced expression of ASAH1 compared to the parental cells.

(G) Analysis of ASAH1 association with the three phenotypes (proliferative, invasive, immune) described in Verfaillie *et al.* (Verfaillie et al. 2015) from the TCGA SKCM dataset. P-values were calculated by the Wilcoxon rank sum test.





### Figure S5: ASAH1 impacts on melanoma cell adhesion

(A) Phase contrast microscopy images of melanoma cells upon ASAH1 suppression.

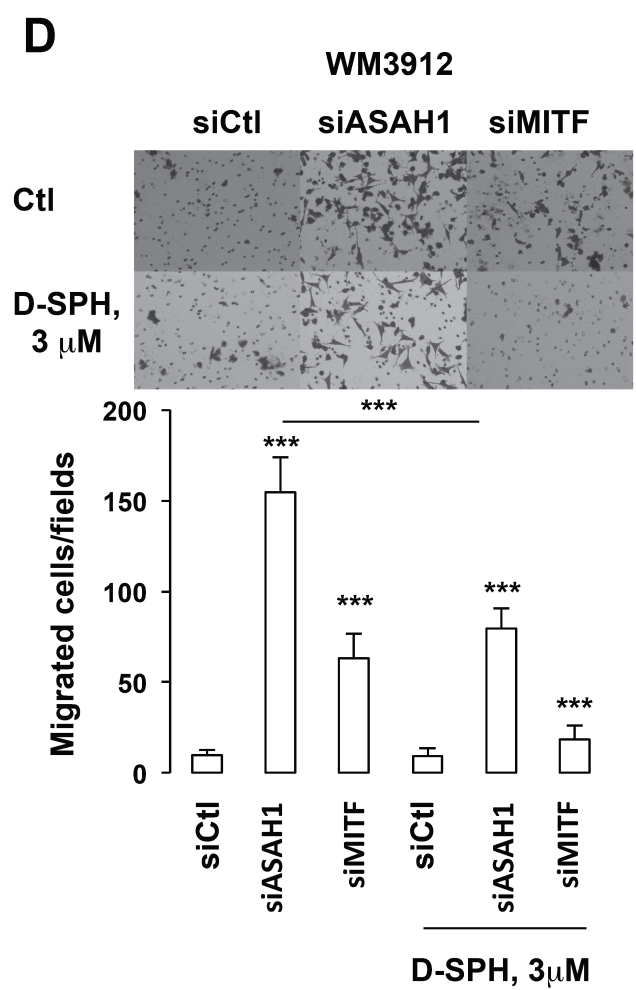
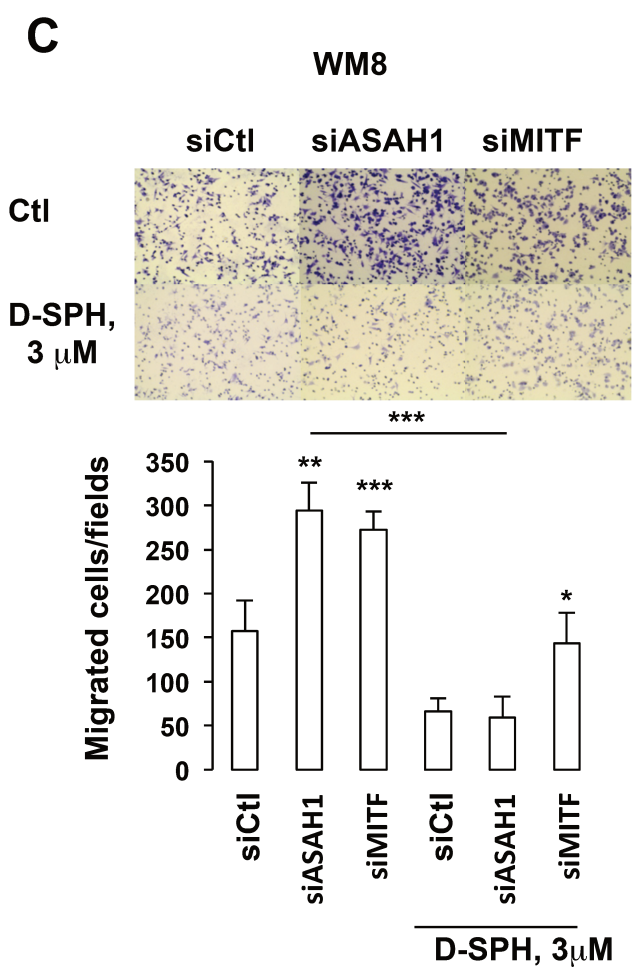
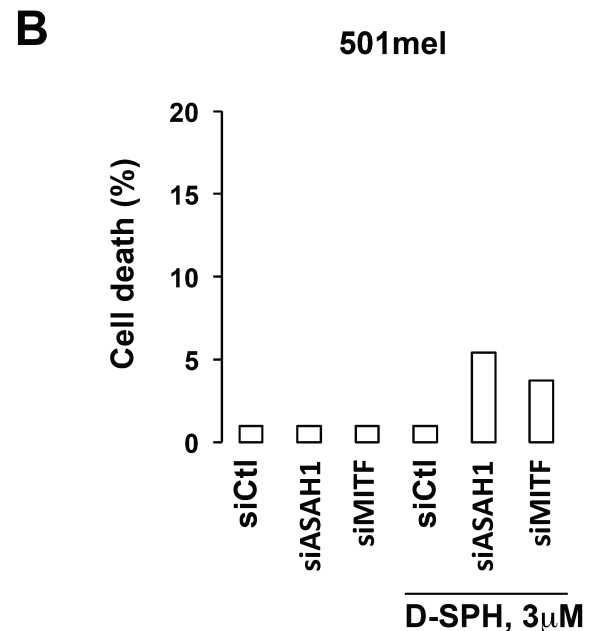
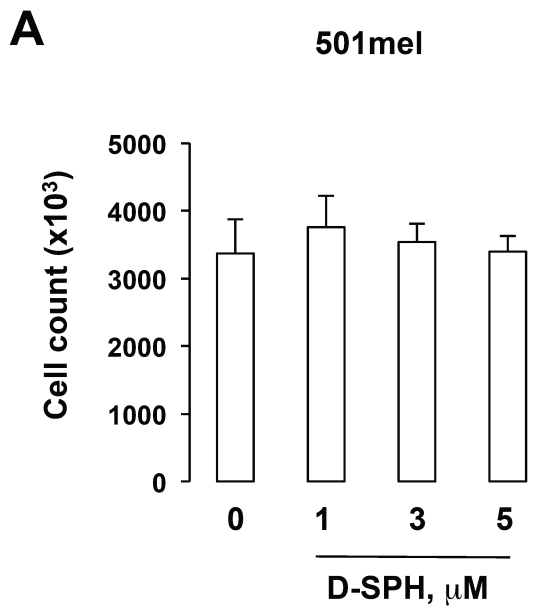
(B) Adhesion assay of ASAH1<sup>low</sup> melanoma cells infected with control or ASAH1 lentiviruses.

(C) Adhesion assay of ASAH1<sup>high</sup> melanoma cells transfected with control or ASAH1 siRNA.

(D) xCelligence impedance assay measuring adhesion of ASAH1<sup>high</sup> melanoma cells transfected with control, ASAH1 or MITF siRNA.

(E-F) Migration ability of 501mel and WM8 melanoma cells was determined using wound healing assays. Pictures from the same area were taken at time 0 and 24 hours after the wound. Representative images are shown. Magnification: 10X and scale bar = 200  $\mu$ m.

(G) Migration capacity of representative ASAH1<sup>high</sup> and ASAH1<sup>low</sup> melanoma cell lines with Boyden chamber assay. Values represent mean + SD of three independent experiments. \*\*\*p<0.001.

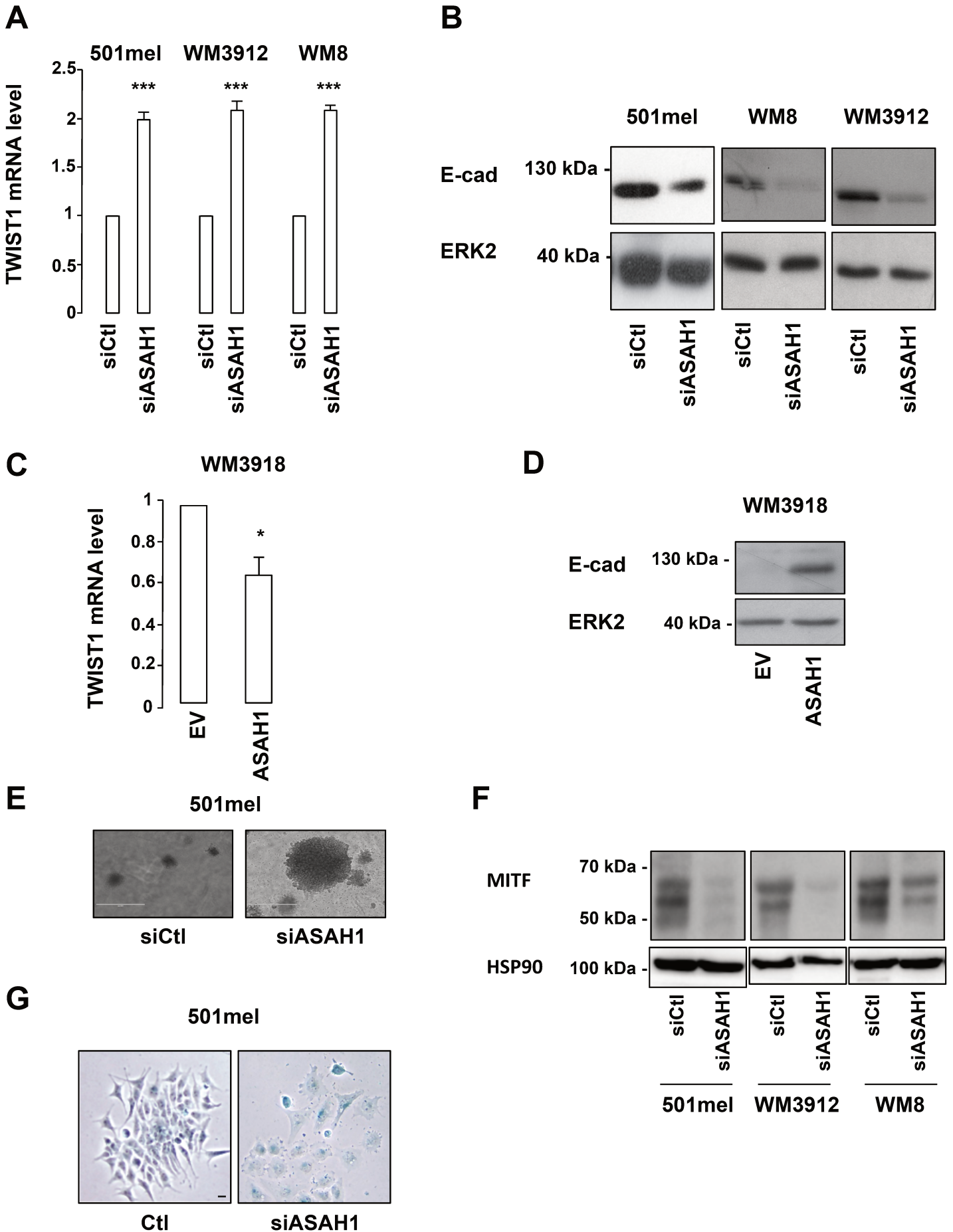


**Figure S6: Exogenous sphingosine prevents ASAH1 and MITF-knockdown induced migration**

(A) Number of 501mel melanoma cells in control condition or after treatment with D-sphingosine (D-SPH) 1  $\mu$ M, 3  $\mu$ M and 5  $\mu$ M for 24 hrs.

(B) FACS analysis of DAPI staining in 501mel melanoma cells transfected with control (siCtl), ASAH1 (siASAH1) or MITF (siMITF) siRNA were left untreated or were incubated with D-sphingosine (3  $\mu$ M) the last 5 hours. Cells positive for DAPI represent dying cells. Results are expressed in %.

(C-D) Boyden chambers experiments. Cells were transfected for 48 hrs with ASAH1 or MITF siRNA before being exposed to 3  $\mu$ M D-sphingosine (D-SPH) for 5 hrs. Values represent mean + SD of three independent experiments. \* $p$ <0.05; \*\* $p$ <0.01; \*\*\* $p$ <0.001.



### **Figure S7: ASAH1 controls mesenchymal features**

(A) TWIST mRNA in 501mel, WM3912 and WM8 melanoma cells transfected with control or ASAH1 siRNA. Values represent mean + SD of three independent experiments. \*\*\* $p < 0.001$ .

(B) Immunoblot to E-cadherin and ERK2 (loading control) in 501mel, WM3912 and WM8 melanoma cells transfected with a control or ASAH1 siRNA.

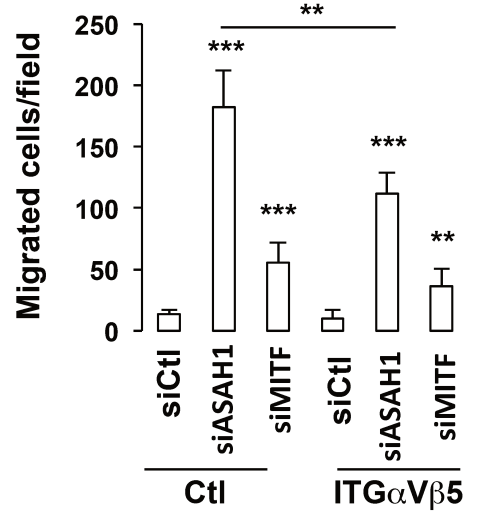
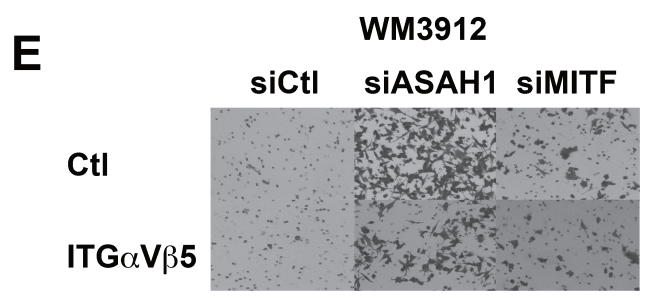
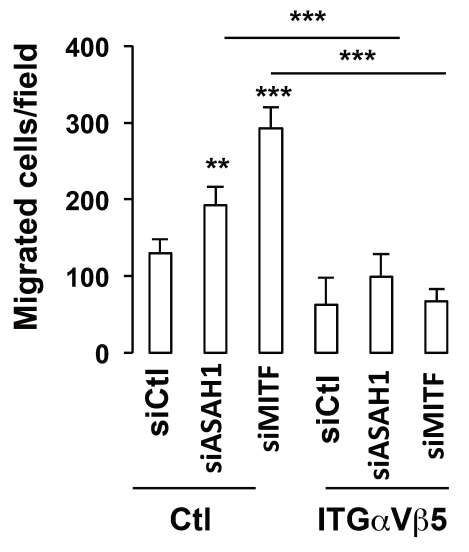
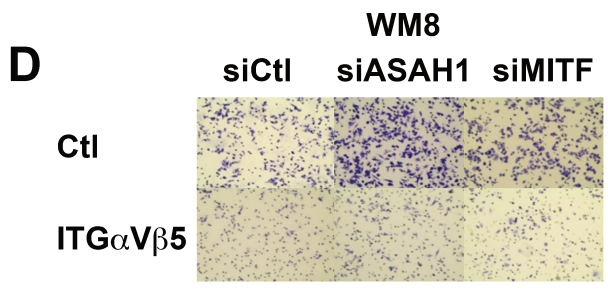
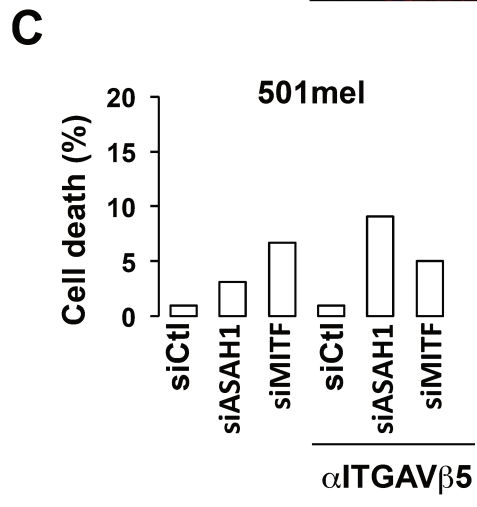
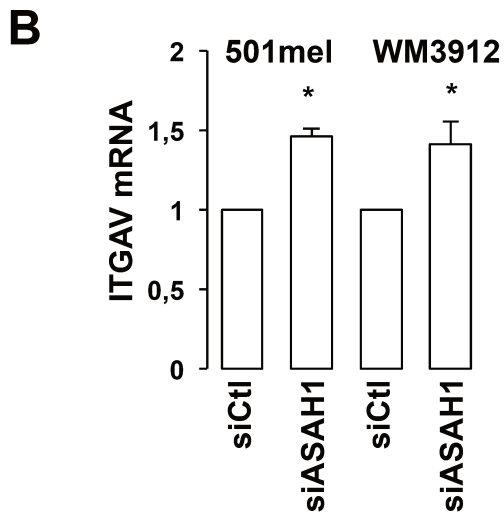
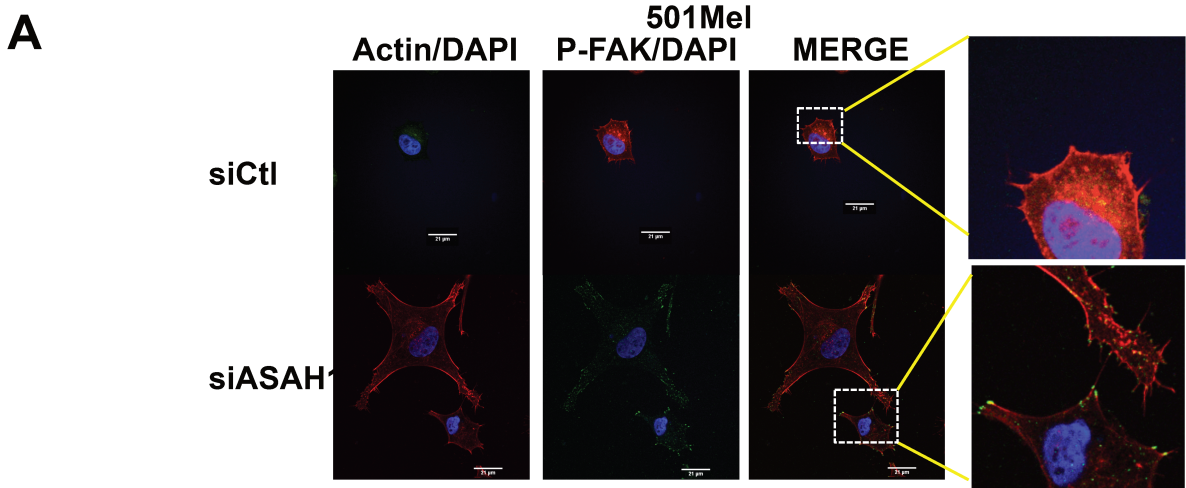
(C) TWIST mRNA in WM3918 with forced expression of ASAH1 compared to the parental cells. Values represent mean + SD of three independent experiments. \* $p < 0.05$ .

(D) Immunoblot to E cadherin and ERK2 (loading control) in WM3918 melanoma cells with forced expression of ASAH1 compared to parental cells.

(E) Anchorage independent growth of 501mel melanoma cells transfected with control siRNA or ASAH1 siRNA for 48 hrs. Colonies were observed after 10 days.

(F) Immunoblot to MITF and HSP90 (loading control) in 501mel, WM3912 and WM8 melanoma cells transfected with control siRNA or ASAH1 siRNA. Representative images are shown.

(G) 501mel melanoma cells transfected with control siRNA or ASAH1 siRNA were stained for SA- $\beta$ -Gal activity and visualized under phase-contrast microscopy. Bars, 10  $\mu$ M. Representative images are shown.



**Figure S8: ASAH1 controls melanoma cells migration through regulation of the integrin/FAK signaling cascade**

(A) Confocal microscopy images of localization of phosphorylated FAK (Y397) after forced expression of ASAH1 in 501mel melanoma cells compared to control cells.

Representative images are shown. Scale bar: 21  $\mu\text{m}$ .

(B) ITGAV mRNA level in ASAH1 depleted cells. Values represent mean + SD of three independent experiments. \* $p < 0.05$ .

(C) FACS analysis of DAPI staining in 501mel melanoma cells transfected with a control (siCtl), ASAH1 (siASAH1) or MITF (siMITF) siRNA in presence of control IgG (Ctl) or ITG $\alpha$ V $\beta$ 5 neutralizing antibody (ITG $\alpha$ V $\beta$ 5) the last 5 hours. Cells positive for DAPI represent dying cells. Results are expressed in %.

(D-E) Boyden chamber assays with WM8 and WM3912 melanoma cells transfected with control, ASAH1 or MITF siRNA in presence of control IgG (Ctl) or ITG $\alpha$ V $\beta$ 5 neutralizing antibody. Values represent mean + SD of three independent experiments. Representative images are shown. \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ .

**Article 2: Targeting the sphingosine-1-phosphate axis exerts potent antitumor activity in BRAF-i resistant melanomas.**

La deuxième partie de mon travail de thèse a porté sur l'étude des S1PRs et de l'axe SK1/S1P/S1PRs dans la résistance des cellules de mélanome à l'inhibiteur de BRAF. Il s'agit d'un travail collaboratif réalisé avec l'équipe du Pr. Thierry Levade et du Dr. Nathalie Andrieu-Abadie au sein du CRCT concrétisé par la signature d'un papier en co-first publié dans le journal *Molecular Cancer Therapeutics*.

La résistance aux thérapies ciblées est un problème majeur chez les patients atteints de mélanome métastatique. De nombreux évènements génétiques et épigénétiques peuvent expliquer ce phénomène. Néanmoins, le rôle des sphingolipides dans le cadre du mélanome n'a que peu été étudié. Afin de déterminer si l'axe SK1/S1P/S1PR pouvait jouer un rôle dans la résistance, nous avons étudié l'expression des S1PRs dans plusieurs lignées de mélanome sensibles ou résistantes au PLX4032, puis nous avons modulé l'expression de deux enzymes clés du métabolisme des sphingolipides (SK1 et SPL). Nos résultats ont révélé que le traitement au PLX4032 induisait une forte diminution d'expression des S1PR1/3 dans les cellules sensibles uniquement. L'augmentation du ratio céramide/S1P par approche génétique ou pharmacologique permet la diminution d'expression des S1PR ainsi que l'inhibition de la croissance tumorale. Cet effet est associé à une diminution d'expression de MITF et BCL2. De plus, l'ABT-737 potentialise l'activité anti-tumorale observée lorsqu'on bloque les enzymes produisant la S1P dans les cellules de mélanome résistantes. Nos résultats indiquent que le ciblage de l'axe S1P/S1PR apporte de nouvelles options thérapeutiques pour les patients atteints de mélanome métastatique en récurrence après un traitement par l'inhibiteur de BRAF.



# Targeting the Sphingosine 1-Phosphate Axis Exerts Potent Antitumor Activity in BRAFi-Resistant Melanomas



David Garandau<sup>1</sup>, Justine Noujarède<sup>1</sup>, Justine Leclerc<sup>2</sup>, Caroline Imbert<sup>1</sup>, Virginie Garcia<sup>1</sup>, Marie-Lise Bats<sup>1</sup>, Florian Rambow<sup>3</sup>, Julia Gilhodes<sup>4</sup>, Thomas Filleron<sup>4</sup>, Nicolas Meyer<sup>5</sup>, Stéphanie Brayer<sup>5</sup>, Silvia Arcucci<sup>1</sup>, Sophie Tartare-Deckert<sup>2</sup>, Bruno Ségui<sup>1</sup>, Jean-Christophe Marine<sup>3,6</sup>, Thierry Levade<sup>1,6</sup>, Corine Bertolotto<sup>2</sup>, and Nathalie Andrieu-Abadie<sup>1</sup>

## Abstract

BRAF inhibitors (BRAFi) are used to treat patients with melanoma harboring the V600E mutation. However, resistance to BRAFi is inevitable. Here, we identified sphingosine 1-phosphate (S1P) receptors as regulators of BRAF<sup>V600E</sup>-mutant melanoma cell-autonomous resistance to BRAFi. Moreover, our results reveal a distinct sphingolipid profile, that is, a tendency for increased very long-chain ceramide species, in the plasma of patients with melanoma who achieve a response to BRAFi therapy as compared with patients with progressive disease. Treatment with BRAFi resulted in a strong decrease in S1PR1/3 expression in

sensitive but not in resistant cells. Genetic and pharmacologic interventions, that increase ceramide/S1P ratio, down-regulated S1PR expression and blocked BRAFi-resistant melanoma cell growth. This effect was associated with a decreased expression of MITF and Bcl-2. Moreover, the BH3 mimetic ABT-737 improved the antitumor activity of approaches targeting S1P-metabolizing enzymes in BRAFi-resistant melanoma cells. Collectively, our findings indicate that targeting the S1P/S1PR axis could provide effective therapeutic options for patients with melanoma who relapse after BRAFi therapy.

## Introduction

Changes in lipid profiles are often associated with an altered metabolic phenotype in tumor cells, which has been recognized as a hallmark of cancers (1). Therefore, lipid metabolism can be exploited to develop therapeutic strategies to treat cancer. We recently showed that sphingolipid (SL) metabolism is strongly altered in cutaneous melanoma in favor of metabolites that promote tumor progression (2–4). SLs are a class of lipids, which regulate key biological processes underlying cancer development including cell death, proliferation, migration, and tumor stroma

remodeling (5). Both the expression and activity of several SL-metabolizing enzymes are dysregulated in melanoma, limiting the accumulation of the anti-oncometabolite ceramide and, conversely, facilitating the production of the oncometabolite sphingosine 1-phosphate (S1P; ref. 6). Moreover, in preclinical melanoma models, a S1P-neutralizing antibody could impair tumor angiogenesis (7) and lung metastasis (8).

Melanoma is the deadliest form of skin cancer and one of the most rapidly growing cancers worldwide (9). The BRAF inhibitors (BRAFi) vemurafenib and dabrafenib or the MEK inhibitors trametinib and cobimetinib achieve remarkable antitumor responses in patients with BRAF<sup>V600E</sup> melanoma with improvements in overall survival. However, initial tumor shrinkage is transient and the vast majority of patients with metastatic tumors develop secondary resistance (10). In addition, about 20% to 40% of patients exhibit primary resistance to BRAFi (11).

Interestingly, dysregulations in key signaling pathways of cell metabolism have been associated to melanoma cell-autonomous resistance to BRAFi. For instance, alterations in the PI3K-AKT-mTORC (12) or MITF-PGC-1 $\alpha$  (13) pathways can lead to resistance of melanoma cells to vemurafenib. Dysregulation of SL metabolism has been reported to modulate resistance to conventional chemotherapy in several types of cancer. Indeed, increasing the ceramide/S1P ratio by sphingosine kinase 1 (SPHK1)-specific siRNA can sensitize cancer cells to chemotherapies (14). Moreover, high expression levels of SPHK1 correlate with reduced cumulative disease-specific survival in tamoxifen-treated patients with ER-positive breast cancer (15). Elevated SPHK1 expression has also been associated with resistance of non-small cell lung cancer cells to docetaxel or doxorubicin (16) as well as chronic

<sup>1</sup>Université Fédérale de Toulouse Midi-Pyrénées, Université Toulouse III Paul-Sabatier, Inserm, Centre de Recherches en Cancérologie de Toulouse, Toulouse, France. <sup>2</sup>Université Nice Sophia-Antipolis, Inserm, Centre Méditerranéen de Médecine Moléculaire, Nice, France. <sup>3</sup>VIB, Center for the Biology of Disease, Leuven, Belgium. <sup>4</sup>Bureau des essais cliniques, Institut Universitaire du Cancer de Toulouse-Oncopôle, Toulouse, France. <sup>5</sup>Service de Dermatologie-Oncologie, Institut Universitaire du Cancer de Toulouse-Oncopôle, Toulouse, France. <sup>6</sup>Laboratoire de Biochimie Métabolique, CHU Toulouse, France

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

D. Garandau, J. Noujarède, J. Leclerc, C. Bertolotto, and N. Andrieu-Abadie contributed equally to this article.

**Corresponding Author:** Nathalie Andrieu-Abadie, Inserm UMR1037, Oncopôle de Toulouse, 2 avenue Hubert Curien CS 53717, Toulouse cedex 1 31037, France. Phone: (33) 5 82 74 16 20; Fax: (33) 5 82 74 16 85; E-mail: [nathalie.andrieu@inserm.fr](mailto:nathalie.andrieu@inserm.fr)

doi: 10.1158/1535-7163.MCT-17-1141

©2018 American Association for Cancer Research.

myeloid leukemia cells to imatinib (17). Despite an altered metabolism in melanoma cells, the role of SLs in the resistance of tumor cells to BRAFi is currently unknown.

S1P, which is generated either by SPHK1 or SPHK2, is the natural ligand of a family of five specific G protein-coupled receptors, termed S1PRs. These receptors play a critical role in chemoresistance of different cancers. For instance, tamoxifen resistance is associated with high expression of S1PR1 and S1PR3 in ER-positive breast cancer patients (15). Moreover, FTY720, a structural analog of sphingosine that inhibits S1PR1 signaling and induces proteasomal degradation of SPHK1, reduces resistance of prostate cancer cells to camptothecin (18, 19).

In this study, we used bioinformatic and lipidomic approaches to analyze how SLs are related to the human melanoma cell-autonomous resistance to BRAFi. We also investigated how S1P-dependent signaling pathways are affected in resistant tumor cells, to identify novel therapeutic targets for patients who relapse on first-line targeted therapies.

## Materials and Methods

### Cell culture and generation of stable SPL-overexpressing cells

Human melanoma cell lines were grown either in RPMI (M249), DMEM (A375, WM1346, WM-266.4, and WM9), or MEM (SK-MEL28) medium supplemented with 7% (WM9) or 10% heat-inactivated FBS in the presence of 5% CO<sub>2</sub> in a humidified atmosphere at 37°C. A375, SK-MEL28, and WM-266.4 cells were obtained from ATCC (LGC). WM1346 cells and WM9 cells were kindly provided by Dr. M. Herlyn (The Wistar Institute, Philadelphia, PA). All melanoma cell lines carry the BRAF<sup>V600E</sup> mutation, except WM1346 cells, which express the oncogenic N-RAS<sup>Q61K</sup> mutation. PLX-resistant melanoma cells M249<sup>R</sup> (20), WM9<sup>R</sup> (21), and A375<sup>R</sup> (22) were generated by chronic PLX exposure of parental M249<sup>S</sup>, WM9<sup>S</sup>, and A375<sup>S</sup> cells, respectively. All three resistant sublines showed elevated levels of p-ERK1/2 upon PLX exposure. To guarantee cell line authenticity, melanoma cell lines were used for a limited number of passages and routinely tested for the expression of MelanA/MART1. Cell lines were tested for the absence of mycoplasma contamination by PCR once every 2 weeks.

A375-vector and A375-SPL cells were generated by transduction using an empty and a human SPL-encoding lentiviral pTRIP-DU3-CMV-MCS plasmid, respectively. Selection was started 48 hours after transduction using 1 µg/mL puromycin. WM9<sup>R</sup>-vector and WM9<sup>R</sup>-SPL were obtained after transfection with an empty pcDNA5/TO plasmid (Invitrogen) and a plasmid containing the cDNA encoding human SPL, respectively. Transfection was carried out using the Lipofectamine 2000 reagent (Invitrogen). Stable transfectants were then selected using 3 µg/mL blasticidin.

### Quantitative RT-PCR

Nonconfluent cells were harvested, and RNA was extracted (RNeasy Kit; Qiagen) according to the manufacturer's protocol and treated with RNase-free DNase (Qiagen). RNA quality was assessed by automated gel electrophoresis (Experion; Bio-Rad). One microgram of RNA was reverse transcribed (SuperScript II; Invitrogen) and the cDNA used as a template for qPCR. The reactions were performed in duplicate on the StepOne instrument (Applied Biosystems) using SYBR Green PCR Kit and primer assay (QuantiTect; Qiagen). Results were quantified using the StepOne

system software. GAPDH and β-actin transcripts were analyzed for normalization.

### Mass spectrometric analysis of cellular and plasma sphingolipids

Blood samples of patients with BRAF<sup>V600</sup>-positive metastatic melanoma treated with vemurafenib or dabrafenib were obtained from the Institut Universitaire du Cancer de Toulouse-Oncopôle. All patients gave written informed consent for blood acquisition according to an Institutional Review Board approved protocol. Blood was centrifuged (2,400 × g, 20 minutes, 4°C) to obtain plasma and then stored at -70°C until analysis. Lipidomic analyses were performed on 0.2 mL of plasma from six patients (median age at the diagnosis: 60; 60% females), for whom clinical data and response to BRAFi were known. All patients received at least three treatment cycles (each cycle is 4 weeks) with BRAFi and were classified as "responders" when the tumor regressed or remained stable or "nonresponders" when progression of the tumor was observed according to RECIST criteria.

Plasma and melanoma cell SLs were analyzed after lipid extraction and quantified by ultra-performance liquid chromatography using an Agilent 1290 UPLC system coupled to a G6460 triple quadrupole spectrometer (Agilent Technologies; ref. 3).

### Cell viability and flow cytometry

For cytotoxicity assays, cells were incubated with medium containing or not FBS and vemurafenib (PLX; Selleckchem), ABT-737 (A-779024.0)/ABT-793 (A-793844.0; Abbott Laboratories, Chicago, IL), C<sub>16</sub>-ceramide (Avanti Polar Lipids), FTY-720 (Selleckchem), SKI-I (Enamine, Riga, Latvia), or W146 (Sigma-Aldrich) for the indicated times at 37°C. Control conditions always included the same organic solvent at the same concentration as that used to dissolve the pharmacologic compound tested. Cell viability was assessed using the MTT assay (Euromedex).

For cytometry analyses, cells were treated or not with PLX (5 µmol/L) for 48 hours in medium containing 7% FBS in the absence or presence of 5 µmol/L SKI-I, JTE-013 (Sigma-Aldrich), W146, or CAY-10444 (Cayman Chemical). Phosphatidylserine externalization was evaluated after labeling with Annexin-V-FITC (250 ng/mL) and propidium iodide (12.5 µg/mL; AbCys) and analyzed using a BD LSRFortessa flow cytometer.

### Western blot analyses

Equal amounts of proteins were electrophoresed on a 10% to 15% SDS-PAGE, transferred to a nitrocellulose membrane (Perkin-Elmer) and blotted with monoclonal anti-S1PR1, anti-S1PR3 (Epitomics), or polyclonal anti-S1PR2 (Abgent). Monoclonal anti-Bcl-2 (50E3), anti-MITF (D5G7V), anti-β-actin, and polyclonal anti-SPHK1 antibodies were from Cell Signaling Technology. Polyclonal anti-SPL was from Abcam. Proteins were detected using an ECL detection system (Bio-Rad).

### Animal studies

All procedures and animal housing were approved by the ethical committee according to European legislation translated to French law as Décret 2013-118 on February 1, 2013. Five millions WM9 cells were intradermally injected into the flank of 6-week-old female nude mice (Janvier). When tumors reached a volume of 50 to 100 mm<sup>3</sup>, mice were randomly divided into three experimental groups (*n* = 6–10 per group). The control group received excipient/vehicle (10% DMSO/5% Cremophore/5%

Tween/80% glucose) only. SKI-I and PLX groups received SKI-I (100 mg/kg body weight in vehicle) and PLX (37.5 mg/kg) daily by intraperitoneal injection for 13 days, respectively. The average tumor size for each respective group was normalized to the tumor volume at the first day of treatment.

### Bioinformatics

Gene expression data for melanoma cell lines (log<sub>2</sub> transformed) were downloaded from the Cancer Cell Line Encyclopedia (CCLE) cohort (<https://genome-cancer.ucsc.edu/>). In addition, the BRAFi response profile of 28 BRAF<sup>V600E</sup>-mutated melanoma cancer cell lines was also analyzed (23).

*S1PR1*, *S1PR3*, and *SPHK1* mRNA levels were assessed in patients with metastatic melanoma of the Cancer Genome Atlas (TCGA) skin cutaneous melanoma (SKCM) cohort ( $n = 369$ ). Level 3 data were interpreted using gene transcription estimates as in RSEM normalized and centered log<sub>2</sub> counts (<https://genome-cancer.ucsc.edu/>). Expression levels were correlated using Pearson product-moment correlation.

### Statistical analyses

All statistical analyses were performed using GraphPad Prism 6 software. Results are expressed as mean  $\pm$  SEM, and group comparisons were performed with an unpaired two-tailed Student *t* test for comparison of 2 groups, or one-way ANOVA followed by the *post hoc* Tukey test for comparison of experiments that consisted of  $\geq 3$  groups. The Mann-Whitney *U* test was used to test statistical significance of differences in mean tumor growth between independent groups after treatment. A *P* value less than 0.05 was considered statistically significant (\*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.01$ ; \*\*\*,  $P < 0.001$ ).

## Results

### Melanoma cell expression of S1PR correlates with resistance to BRAFi

To test whether S1P-dependent signaling pathways are related to the resistance of melanoma cells to BRAFi, we examined a series of BRAF<sup>V600E</sup>-mutant melanoma cell lines from the Cancer Cell Line Encyclopedia (CCLE) for which IC<sub>50</sub> values, that is, drug concentrations causing 50% growth inhibition, of the selective BRAFi PLX-4720 (the closely related precursor of PLX-4032) were available (23). Bioinformatic analysis revealed that the levels of *S1PR1* and *S1PR3* transcripts positively correlate with resistance of melanoma cells to the BRAFi (Fig. 1A). In contrast, no significant relationship was detected between the expression of other S1PR, that is, *S1PR2*, *S1PR24*, and *S1PR25*, and the sensitivity of melanoma cells to the BRAFi.

To confirm these results, S1PR expression was monitored in BRAFi-resistant sublines derived from BRAF<sup>V600E</sup>-positive melanoma cells. M249<sup>R</sup> (Fig. 1B), WM9<sup>R</sup> (Fig. 1C), and A375<sup>R</sup> (Supplementary Fig. S1A) cells displayed strong resistance to PLX-4032 (PLX) compared with their PLX-sensitive parental counterparts. Of interest was the finding that whereas the expression of *S1PR1* and, to a lesser extent, *S1PR3* was reduced in parental melanoma cells upon PLX incubation, it was not affected in the corresponding PLX-resistant sublines treated or not with the inhibitor (Fig. 1D and E; Supplementary S1B). In contrast, the expression of *S1PR2* was not significantly reduced in all PLX-treated melanoma cells. These results indicate that *S1PR1* and *S1PR3* expression remains unchanged in PLX-resistant cells upon exposure to

PLX, and could represent a potential therapeutic target for overcoming acquired BRAFi resistance.

To test this hypothesis, PLX-induced cell death was analyzed in the presence of S1PR antagonists. As expected, whereas WM9<sup>S</sup> cells treated with PLX underwent apoptosis, WM9<sup>R</sup> cells were insensitive to the drug (Supplementary Fig. S1C). Remarkably, cotreatment of WM9<sup>R</sup> cells with PLX and the *S1PR1* antagonist W146 (24) or the *S1PR3* antagonist CAY-10444 (25) strongly increased apoptosis as compared to the effects of each compound alone. The *S1PR2* antagonist JTE-013 had no significant effect (Fig. 1F). The combination of W146 and CAY-10444 was not more efficient than treatment with W146 alone. In contrast, incubation of WM9<sup>R</sup> cells with FTY720 (26), a sphingosine analog which decreases *S1PR1* expression and *SPHK1* activity (27), induced a more potent cytotoxic effect than W146 (Fig. 1F and G), suggesting that *SPHK1* could control melanoma cell resistance to BRAFi.

### BRAFi-resistant melanoma cells are susceptible to decreased S1PR expression due to altered ceramide/S1P ratio

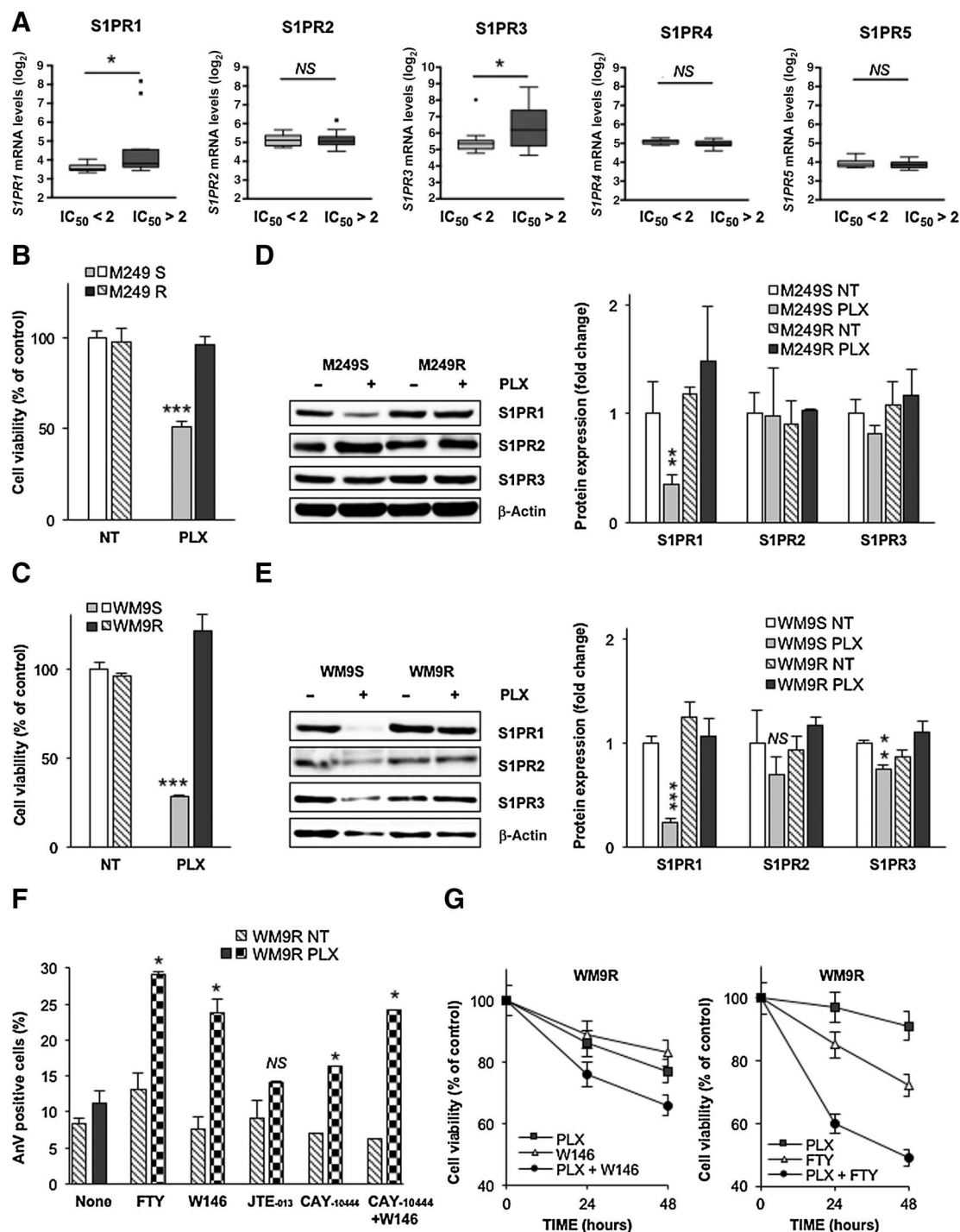
Bioinformatic analysis of an RNA-seq dataset obtained from a collection of 369 human metastatic melanomas (TCGA) revealed positive correlations between the mRNA expression of *S1PR1* and *S1PR3* as well as *SPHK1* (Fig. 2A). In accordance with these observations, PLX strongly reduced *SPHK1* expression (Fig. 2B) as well as *SPHK1* enzymatic activity (Fig. 2C) in WM9<sup>S</sup> cells as compared with WM9<sup>R</sup> cells. Moreover, BRAFi treatment led to increased ceramide/S1P ratio (Fig. 2D, right) through the elevation of virtually all ceramide molecular species (Fig. 2D, left) in sensitive cells only. Of note, ceramides containing very long-chain fatty acids (i.e., C24) were the most abundant species.

To determine whether plasma SL concentrations were associated to the response of patients with melanoma to BRAFi, peripheral blood from patients who received at least three cycles of BRAFi was collected for measurement of SLs by mass spectrometry. Among the six patients tested, three patients had progressive disease (nonresponders) and three patients exhibited a partial response (responders). Remarkably, plasma SL analysis revealed higher ceramide/S1P ratios in responders in comparison with nonresponders (Supplementary Fig. S2, right). Levels of very long-chain ceramides species showed a tendency to increase in responders, whereas no change in other ceramide species (Supplementary Fig. S2, left) was observed.

In addition, inhibition of *SPHK1* enzymatic activity in BRAFi-resistant cells with the nonlipid *SPHK* inhibitor SKI-I (Fig. 3A; ref. 28), which increases the ceramide/S1P ratio (Fig. 3B) in BRAFi-resistant cells, was associated with increased apoptosis as compared with untreated cells or cells exposed to PLX (Fig. 3C). No difference was observed between SKI-I alone and the combination SKI-I and PLX in both BRAFi-sensitive and -resistant melanoma cells (Supplementary Fig. S3). To extend our observations *in vivo*, we next transplanted WM9 cells in the flanks of nude mice and monitored the formation of tumors upon injection of PLX or SKI-I. Although administration of PLX resulted in minimal changes in WM9<sup>R</sup> tumor growth as compared with WM9<sup>S</sup> (Fig. 3D), injection of SKI-I led to a significant decrease in the size of WM9<sup>R</sup> tumors (Fig. 3E).

The S1P lyase (SPL), which irreversibly degrades S1P, is underexpressed in human melanoma cells compared with healthy melanocytes (2). To validate our hypothesis that increasing the

Garandau et al.

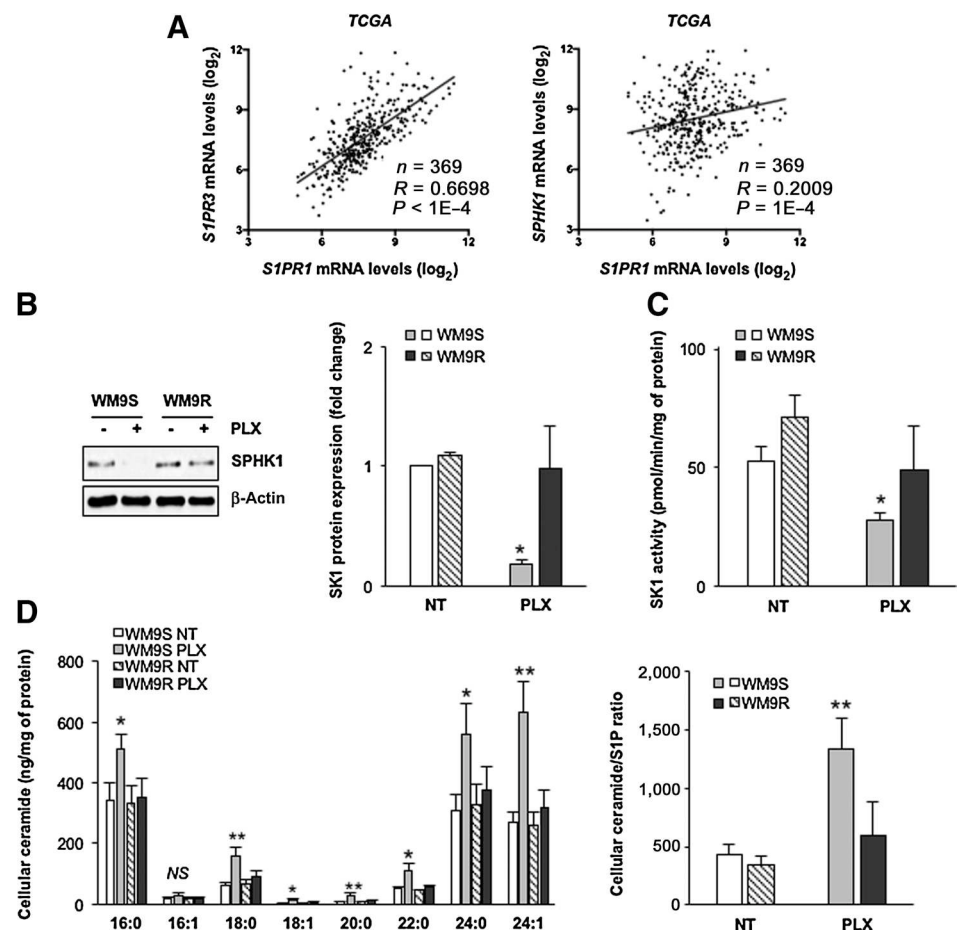
**Figure 1.**

Differential effect of PLX on SIPR expression in BRAFi-sensitive and BRAFi-resistant cells. **A**, Correlation between relative SIPR expression and sensitivity of melanoma cells to PLX-4720. *S1PR1-5* mRNA levels are displayed according to the IC<sub>50</sub> values of PLX-4720 ( $\mu\text{mol/L}$ ) in a panel of BRAF<sup>V600</sup> melanoma cells ( $n = 28$ , Tukey box plot, Student *t* test). **B-E**, PLX-sensitive (S) and -resistant (R) cells were treated with 1  $\mu\text{mol/L}$  (**B, D**: M249) or 5  $\mu\text{mol/L}$  (**C, E**: WM9) PLX. **B** and **C**, Cell viability was assessed after 48 hours using the MTT test. Results are expressed as percentage of the value determined in the absence of the drug. Data are mean  $\pm$  SEM of three independent experiments. Statistical differences relative to untreated cells are shown (Student *t* test). **D** and **E**, Left: Expression of S1PR1, S1PR2, and S1PR3 was assessed by Western blot analysis after 24 hours. Right: Levels of SIPRs normalized to  $\beta$ -actin and relative to untreated cells (mean  $\pm$  SEM of two to three independent experiments). Statistical differences relative to untreated cells are shown (Student *t* test). **F** and **G**, WM9<sup>R</sup> cells were treated or not with PLX (5  $\mu\text{mol/L}$ ) for 24 or 48 hours in medium containing 7% FBS in the absence (none) or presence of W146, JTE-013, CAY10444, or FTY-720 (5  $\mu\text{mol/L}$ ). **F**, After 48 hours, cells were labeled with Annexin-V-FITC and propidium iodide, and analyzed by flow cytometry. Percentages (mean  $\pm$  SEM of three independent experiments) of Annexin-V-positive cells are indicated. **G**, Cell viability was assessed using the MTT test. Results are expressed as percentage of the value determined at the corresponding time in the absence of the drug. Data are mean  $\pm$  SEM of three independent experiments. Statistical differences relative to untreated cells are shown (Student *t* test). NS, not significant.

**Figure 2.**

Low cellular and plasma ceramide/S1P ratios are associated with resistance of melanomas to BRAFi.

**A**, *S1PR3* and *SPHK1* mRNA levels according to *S1PR1* expression in 369 human metastatic melanoma tumors from the TCGA database (Pearson correlation test). **B–D**, PLX-sensitive (S) and -resistant (R) WM9 cells were treated or not with 5  $\mu$ mol/L of PLX for 24 hours in medium containing 7% FBS. SPHK1 expression (**B**) and enzymatic activity (**C**) were determined. **B**, Left: Representative immunoblot of at least three independent experiments; right: Levels of SPHK1 normalized to  $\beta$ -actin and relative to untreated cells. **D**, Cellular lipids were extracted, quantified by mass spectrometry, and normalized to protein content. Left: Levels of individual ceramide species; right: Ratios of total ceramide/S1P. Results are representative of three different experiments. Statistical differences relative to untreated cells are shown (Student *t* test).



ceramide/S1P ratio could be an attractive therapeutic strategy for BRAFi-resistant melanoma cells, we next assessed cell viability of SPL-overexpressing WM9<sup>R</sup> cells following PLX exposure. Overexpression of SPL in WM9<sup>R</sup> cells (Fig. 3F), which resulted in a two-fold increase in ceramide/S1P ratio (Fig. 3G), significantly sensitized WM9<sup>R</sup> cells to PLX (Fig. 3H). Interestingly, treatment with exogenous C<sub>16</sub>-ceramide reduced cell viability of WM9<sup>R</sup> cells and the wild-type BRAF melanoma cell line WM1346, which is intrinsically resistant to BRAFi (Fig. 3I).

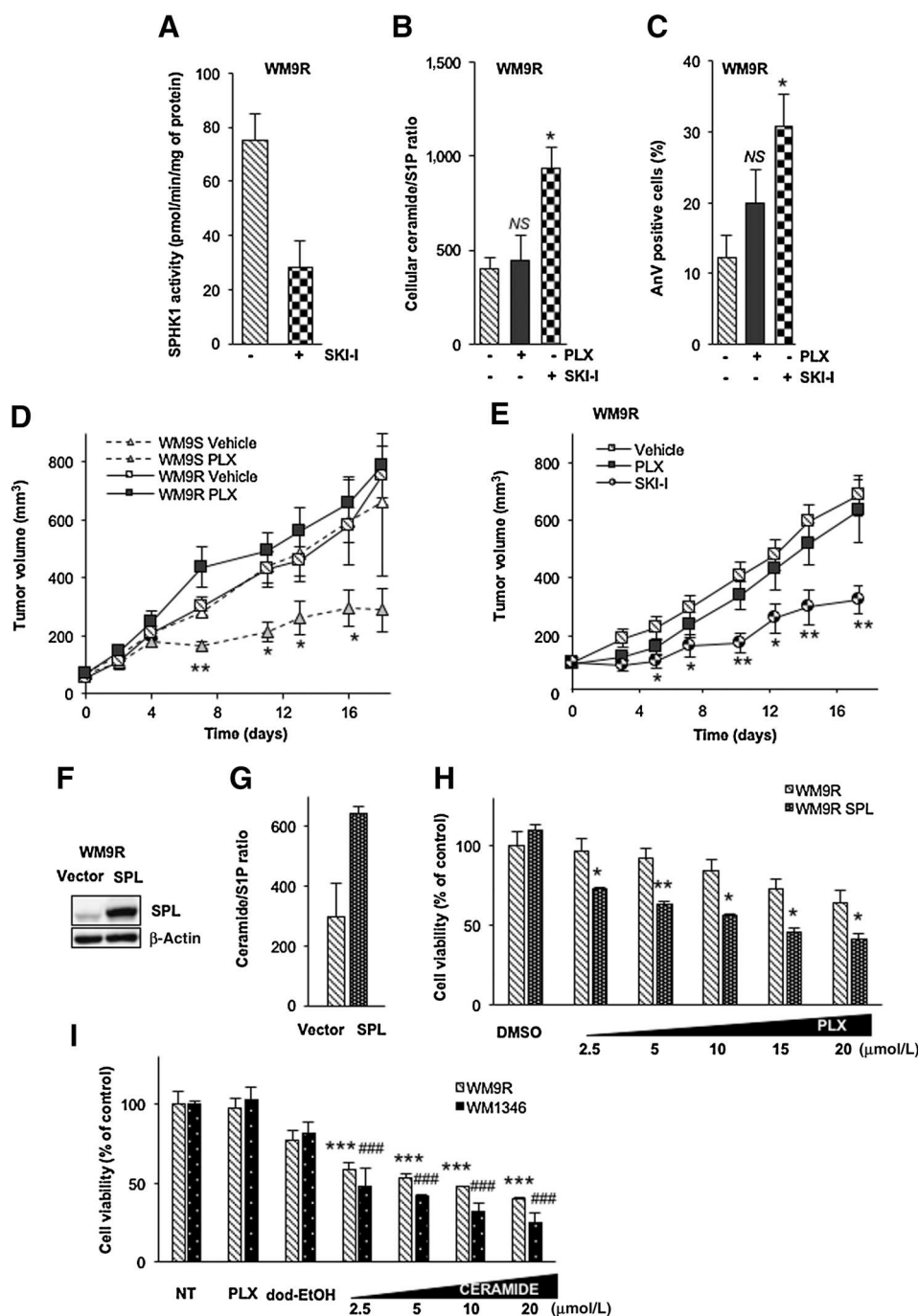
Given that inhibition of SPHK1 may result in decreased S1PR expression, as previously described in SPHK1 knocked-down MCF-7 breast cancer cells (29), S1PR expression was next assessed in cells incubated with SKI-I. Fig. 4A shows that treatment with SKI-I reduced S1PR1 and S1PR3 expression in both PLX-sensitive and -resistant WM9 cells. In contrast, S1PR2 expression was not altered. Of note, a marked decrease of S1PR1 expression was also observed in SPL-overexpressing WM9<sup>R</sup> cells upon PLX treatment (Fig. 4B).

Collectively, these data indicate that increasing the ceramide/S1P ratio impairs S1PR expression and exerts both *in vitro* and *in vivo* powerful antitumor activity in BRAFi-resistant melanoma cells in a cell-autonomous manner.

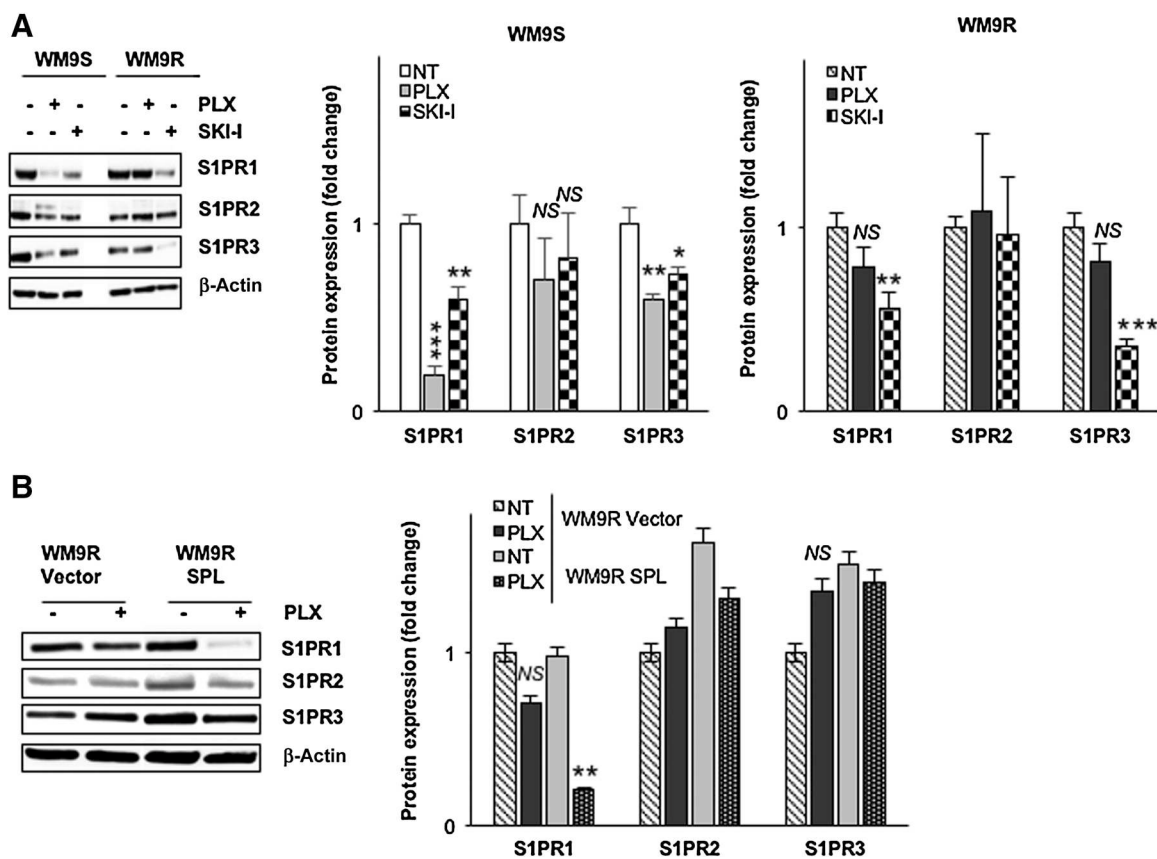
#### Downregulation of S1PR expression due to altered ceramide/S1P ratio reduces MITF-mediated resistance to PLX

Previous studies have documented the role of ceramide (30) and S1P/S1PR axis (31) in regulating the expression of the key

melanocytic transcription factor MITF. Importantly, it was recently shown that MITF expression contributes to BRAFi resistance (13, 32). To explore the molecular mechanisms underlying the role of S1PR in melanoma cell resistance to BRAFi, we evaluated MITF expression in several melanoma cells upon SKI-I treatment. In line with previous reports, MITF expression was not reduced in PLX-resistant melanoma cells upon PLX treatment (Fig. 5A, right) compared with their sensitive counterparts (Fig. 5A, left). In contrast, incubation with SKI-I reduced the transcript levels of MITF and one of its target gene TYR, in both WM9 cell lines. Similar results were obtained by analyzing MITF protein expression (Fig. 5B). Of interest, MITF levels were partially restored in WM9 cells upon incubation with exogenous S1P. Moreover, MITF expression was no longer reduced in S1PR1-overexpressing WM9<sup>S</sup> cells following PLX exposure as compared with WM9<sup>S</sup> cells expressing an empty vector. PLX-induced cell death was abolished in these conditions (Supplementary Fig. S4A–S4C). A reduced expression of MITF upon SKI-I treatment was also observed in other melanoma cell lines carrying the BRAF<sup>V600E</sup> mutation (Fig. 5C). These modifications were accompanied by a decrease in cell viability of PLX-sensitive (WM9<sup>S</sup>, M249<sup>S</sup>, and SK-MEL28) as well as PLX-resistant (WM9<sup>R</sup> and M249<sup>R</sup>) cells (Fig. 5D). In accordance, overexpression of SPL, which leads to decreased S1PR1 expression (Fig. 4B), resulted in a reduction of MITF levels (Fig. 5E) and sensitization of melanoma cells to BRAFi (Fig. 5F).

**Figure 3.**

Increasing the ceramide/SIP ratio impairs the growth of PLX-resistant WM9 cells. **A–C**, WM9<sup>R</sup> cells were treated or not with 5 μmol/L PLX or SKI-I for 24 (**A**, **B**) or 48 (**C**) hours in medium containing 7% FBS. **A**, SPHK1 enzymatic activity was determined. **B**, Cellular lipids were extracted, quantified by mass spectrometry and normalized to protein content. Ratios of total ceramide/SIP are presented and are representative of three different experiments. **C**, Cells were labeled with Annexin-V-FITC and propidium iodide, and analyzed by flow cytometry. Percentages (mean ± SEM of two independent experiments) of Annexin-V-positive cells are indicated. Statistical differences relative to untreated WM9<sup>R</sup> cells were determined (one-way ANOVA with *post hoc* Tukey test). **D** and **E**, Four days after intradermal injection of 5 × 10<sup>6</sup> WM9 cells, melanoma-bearing mice (*n* = 6–10 per group) were treated with vehicle, SKI-I or PLX for 2 weeks and final tumor volumes were monitored. Statistical differences relative to vehicle treated WM9<sup>S-</sup> (**D**) or WM9<sup>R-</sup> (**E**) bearing mice were determined using the Mann-Whitney *U* test. **F–H**, Control (Vector) or SPL-overexpressing WM9<sup>R</sup> melanoma cells were treated (**H**) or not (**F**, **G**) with the indicated concentrations of PLX for 48 hours in medium containing 7% FBS. **F**, SPL expression was determined by Western blot analysis. **G**, Cellular lipids were extracted, quantified by mass spectrometry, and normalized to protein content. Ratios of total ceramide/SIP are presented and are representative of three different experiments. **H**, Cell viability was assessed using the MTT test. Results are expressed as percentage of the value determined in the absence of the drug (DMSO) and are mean ± SEM of three independent experiments. **I**, Cell viability was monitored on PLX-resistant WM9 or WM1346 melanoma cells treated or not with C<sub>16</sub>-ceramide at the indicated concentrations for 48 hours. C<sub>16</sub>-ceramide was dissolved in dodecane/ethanol (dod-EtOH; 2:98, v/v) and added to the medium without FBS. Results are expressed as percentage of the value determined in the absence of the drug. Statistical differences were determined using Student *t* test.



**Figure 4.**

Downregulation of S1PR expression by SKI-I or overexpression of SPL. WM9<sup>S/R</sup> (A) or SPL-overexpressing WM9<sup>R</sup> (B) melanoma cells were treated or not with 5  $\mu$ mol/L of PLX or SKI-I for 24 hours in medium containing 7% FBS. Left: Expression of S1PR1, S1PR2 and S1PR3 was assessed by Western blot analysis. Right: Levels of S1PRs normalized to  $\beta$ -actin and relative to nontreated cells (mean  $\pm$  SEM of three independent experiments). Statistical differences relative to nontreated cells are shown (Student *t* test).

#### Downregulation of S1PR expression due to altered ceramide/S1P ratio potentiates Bcl-2 inhibitor-induced apoptosis

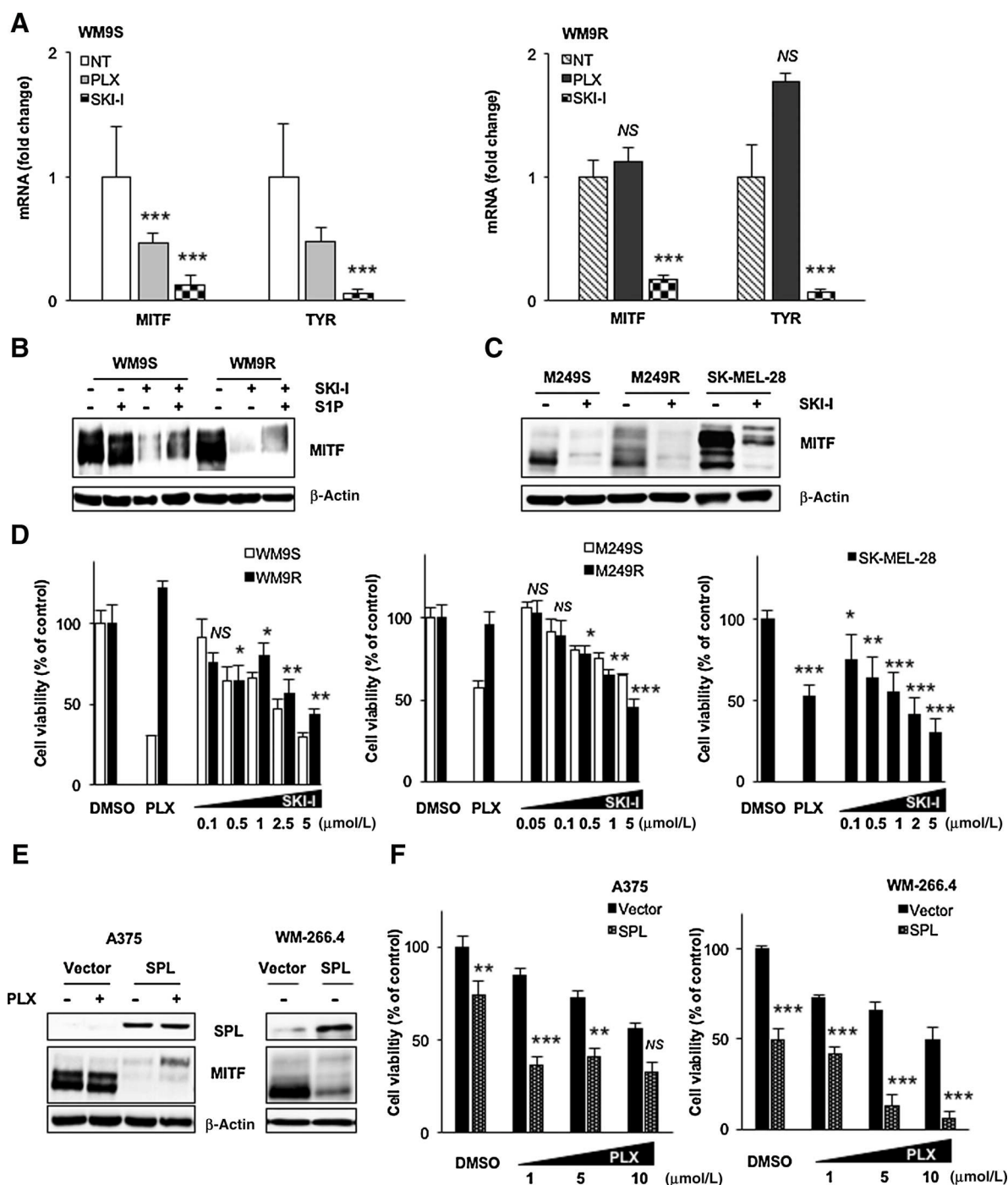
Because MITF directly regulates Bcl-2 (33), which contributes to melanoma cell resistance to BRAFi (34), we next assessed Bcl-2 expression in cells treated or not with SKI-I. As expected, upon PLX treatment WM9<sup>R</sup> cells (Fig. 6) or S1PR1-overexpressing WM9<sup>S</sup> cells (Supplementary Fig. S4C) did not exhibit a decrease in Bcl-2 mRNA (Fig. 6A) and protein (Fig. 6B; Supplementary S4C) upon PLX as compared with WM9<sup>S</sup> cells. In contrast, expression of Bcl-2 was significantly reduced in WM9<sup>R</sup> cells incubated with SKI-I (Fig. 6A and B) whereas that of Bcl2A1, Bcl-xL, and Mcl-1 did not differ significantly (Fig. 6A). To ensure Bcl-2 could regulate apoptosis in melanoma upon S1PR downregulation, we next examined cell death following cotreatment with the BH3-mimetic ABT-737 (35) and SKI-I. As shown in Fig. 6C, whereas ABT-737 did not resensitize WM9<sup>R</sup> cells to PLX, it enhanced apoptosis induced by SKI-I as compared with untreated cells or cells incubated with the inactive enantiomer ABT-793 (35). This result was confirmed in SPL-overexpressing A375 cells, in which ABT-737 displayed strong synergistic lethality when combined with SPL overexpression whereas ABT-737 alone was not cytotoxic (Fig. 6D). Taken together, these data suggest that combination

of S1PR downregulation and BH3-mimetics may represent a promising strategy for treating PLX-resistant melanomas.

#### Discussion

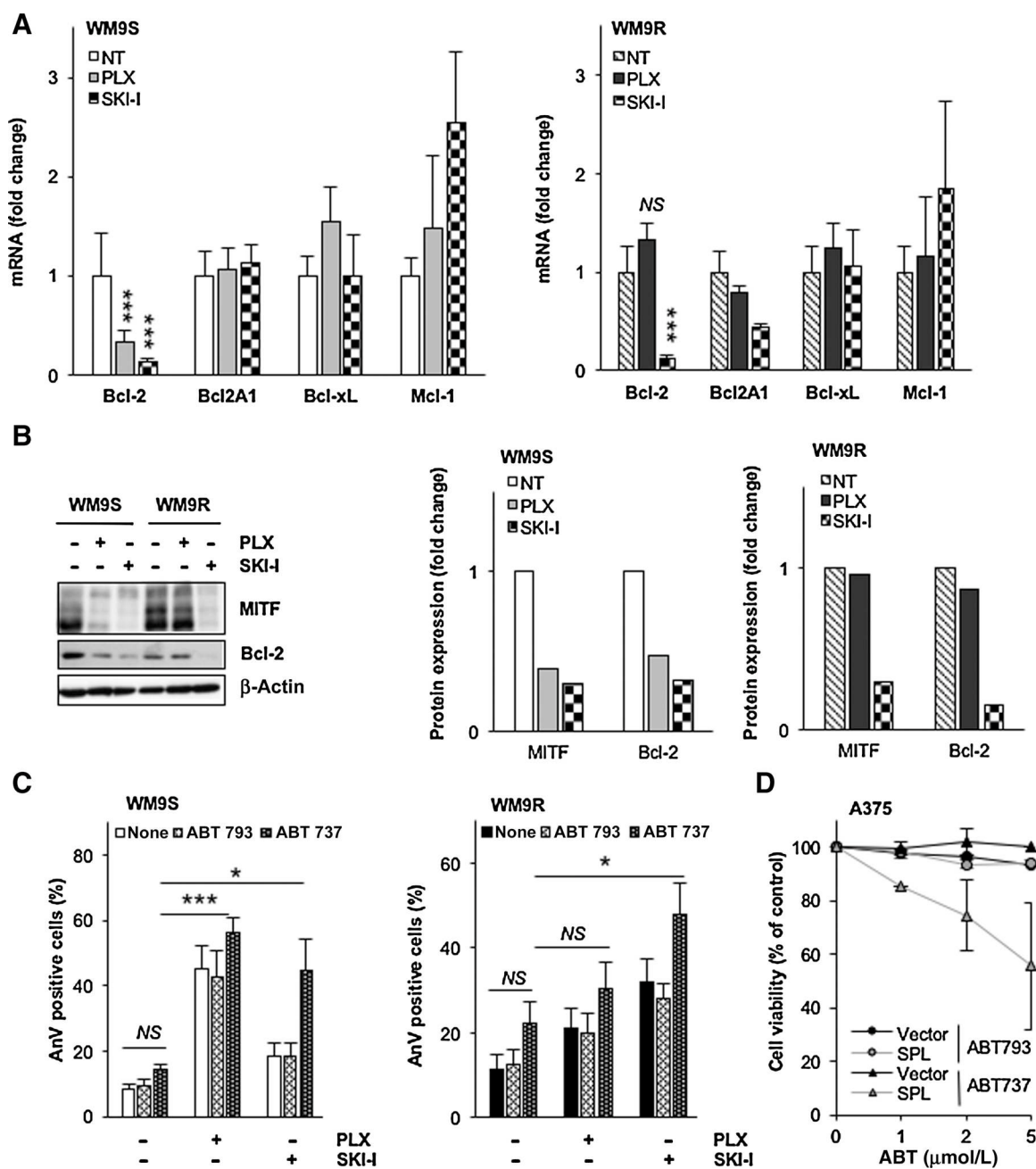
SLs are pleiotropic lipids, which are integrated into the wider cellular metabolic network (36). Altered SL metabolism contributes to cancer progression and represents an exploitable target for the development of new treatments. A BRAF<sup>V600E</sup>-dependent increase of S1P levels was reported in melanoma cells (4, 37); however, the effect of therapies targeting the S1P axis on the response of melanoma cells to BRAFi has never been investigated.

Here, we describe, for the first time, changes in the plasma SL profile of patients with melanoma with progressive disease as compared with patients who respond to BRAFi therapy. In particular, our data reveal a tendency for increased plasma C<sub>24</sub>-ceramide in responders versus nonresponders. To further determine the relationship between SL changes and timing of response or progression during BRAFi therapy, measurement of plasma SLs should be carried out on larger patient cohorts, before treatment and more frequently during the treatment. Previous studies reported that changes in circulating SL levels may serve as novel biomarkers for monitoring response to therapy. For instance,

**Figure 5.**

Targeting of S1P/S1PR axis inhibits MITF expression and exerts antitumor effects on melanoma cells. **A**, WM9 cells were treated or not with 5 μmol/L PLX for 24 hours in medium containing 7% FBS in the absence or presence of 5 μmol/L SKI-I. Relative mRNA levels are depicted for MITF and TYR. Results are mean ± SEM of three independent experiments. **B** and **C**, Melanoma cell lines were incubated or not with 5 μmol/L SKI-I for 24 hours in medium containing FBS in the presence or absence of 2 μmol/L S1P. Expression of MITF was assessed by Western blot analysis. **D**, Melanoma cells were incubated or not with PLX (5 μmol/L) or the indicated concentrations of SKI-I for 48 hours. Cell viability was assessed using the MTT test. Results are expressed as percentage of the value determined at the corresponding time in the absence of the drug (DMSO). Data are mean ± SEM of two independent experiments. Statistical differences relative to untreated cells were determined (Student *t* test). **E** and **F**, Control (Vector) or SPL-overexpressing A375 or WM266.4 melanoma cells were incubated or not with 5 μmol/L (**E**) or the indicated concentrations (**F**) of PLX for 24 (**E**) or 48 (**F**) hours. **E**, Left: Expression of SPL and MITF was assessed by Western blot analysis. Right: Levels of proteins normalized to β-actin and relative to non-treated cells. **F**, Cell viability was assessed using the MTT test. Results are expressed as percentage of the value determined in the absence of the drug. Data are means ± SEM of three independent experiments. Statistical differences relative to nontreated control melanoma cells were determined (Student *t* test).



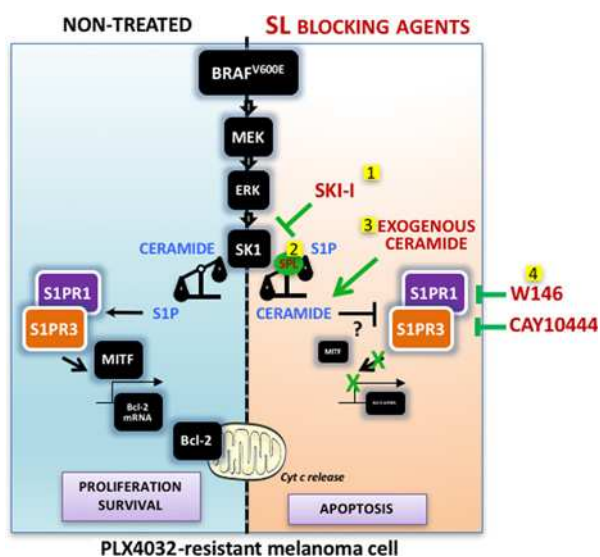


**Figure 6.**

Combined targeting of S1P/S1PR axis and Bcl-2 synergistically reduces PLX-resistant melanoma cell viability. **A–C**, WM9 cells were treated or not with PLX (5 μmol/L) for 24 (**A**, **B**) or 48 (**C**) hours in medium containing 7% FBS in the absence or presence of 5 μmol/L SKI-I, ABT-793, or ABT-737. **A**, Relative mRNA level is depicted for Bcl-2, Bcl2A1, Bcl-xL, and Mcl-1. Results represent mean ± SEM of three independent experiments. Statistical differences relative to untreated cells were determined (Student *t* test). **B**, Left: Expression of MITF and Bcl-2 was assessed by Western blot analysis. Right: Levels of proteins normalized to β-actin and relative to untreated cells. **C**, Cells were labeled with Annexin-V-FITC and propidium iodide, and analyzed by flow cytometry. Percentages (mean ± SEM of three independent experiments) of Annexin-V-positive cells are indicated. Statistical differences were determined using one-way ANOVA with post hoc Tukey test. **D**, Control (Vector) or SPL-overexpressing A375 melanoma cells were incubated or not with the indicated concentrations of ABT-793 or ABT-737 for 48 hours. Cell viability was assessed using the MTT test. Results are expressed as percentage of the value determined in the absence of the drug. Data are mean ± SEM of two independent experiments.

increased serum C<sub>18</sub>-ceramide levels were described in head and neck squamous cell carcinoma patients responding to a therapy combining gemcitabine with doxorubicin in comparison with nonresponders (38).

Our data also show that sensitivity of BRAF<sup>V600</sup>-mutated melanoma cells to PLX is negatively correlated with S1PR1/3 expression. S1PR expression was not affected by PLX in cells that exhibit acquired resistance to the BRAFi compared with their sensitive



**Figure 7.**

Targeting the S1P axis leads to BRAFi-resistant melanoma cell death. SPHK1 is activated by the RAF/MEK/ERK pathway in melanoma cells harboring the activating BRAF<sup>V600E</sup> mutation. This effect was associated with an increased expression of MIF and Bcl-2, leading to increased cell proliferation and survival. Inhibition of SPHK1 by SKI-I (1), overexpression of SPL (2), treatment with cell-permeable short chain ceramide (3), or antagonism of S1PR1 or S1PR3 (4) reduced MIF and Bcl-2 expression and induced melanoma cell death.

counterparts. Accordingly, PLX-resistant melanoma cells could be re-sensitized to BRAFi by cotreatment with S1PR1 or S1PR3 antagonists (Fig. 7). Of note, expression of those receptors is also strongly increased in chemo-resistant breast cancer cells (15), whereas that of other S1PR subtypes is rather reduced. Moreover, S1PR1 expression is also associated to unfavorable clinicopathologic features in nonmuscle invasive urothelial carcinoma (39). FTY720, which acts as a functional antagonist of S1PR1 by inducing its internalization and degradation (40), was reported to stimulate apoptosis in drug-resistant multiple myeloma cells (41) and sensitize radio-resistant breast cancer cells (42). However, FTY720 could exert its antitumoral effects through to a direct inhibition of SPHK1 (43). The SKI-I inhibitor induces the proteasomal degradation of SPHK1 and increases the ceramide/S1P ratio and apoptosis (44). Our results show that elevation of ceramide/S1P ratio, induced by SKI-I treatment or SPL overexpression, causes a decrease in S1PR expression in melanoma cells (Fig. 7). The molecular mechanism by which the ceramide/S1P ratio influences S1PR expression is currently under investigation. siRNA knockdown of SPHK1 was reported to reduce S1PR3 expression and signaling in S1P-treated breast cancer cells. In addition, S1P binding to S1PR3 activates SPHK1, suggesting that SPHK1, ceramide/S1P ratio, and S1PR function in an amplification loop to promote cancer progression (29).

Although little is known about the regulation of S1PR3 in cancer, S1PR1 has been extensively studied. The oncogenic K-Ras mutant has recently been shown to stimulate S1PR3 expression through the binding of the transcription factor SMAD3 to the promoter region of S1PR3 in human lung adenocarcinomas (45). S1PR1 is transcriptionally regulated by the STAT3 and reciprocally, S1PR1 participates in a positive feedback loop with STAT3

pathway in cancer, thereby promoting tumor progression and metastasis (46). Consistent with this notion, FTY720, which decreases the expression of SPHK1 and S1PR1, could inhibit the NF- $\kappa$ B/IL-6/STAT3 amplification cascade linked to the development of colitis-associated cancer (27). siRNA knockdown of SPHK1 also led to a significant reduction of leptin-induced STAT3 phosphorylation in ER-negative breast cancer cells (47). In addition, the loss of SPL elicits STAT3 activation (48). Importantly, STAT3 activation signaling is a negative prognostic factor in human melanoma (49) and inhibition of STAT3 signaling reduces PLX-resistant melanoma cell growth (50). Future studies on the relationship between the intracellular ceramide/S1P ratio controlled by SPHK1 and SPL, S1PR1/3, and STAT3 may reveal additional insights into the molecular mechanism underlying the acquired resistance of melanoma cells to BRAFi.

We also provide evidence that downregulation of S1PR expression mitigates MIF-mediated resistance to PLX (Fig. 7). A growing body of evidence indicates that a fraction of patients relapse with tumors having greatly increased MIF (51). Consequently, targeting MIF, which plays a key role in the initial phases of drug-induced tolerance, can sensitize acquired resistant cells to BRAF and MEK inhibitors (32). A previous study has shown that FTY720 downregulates MIF and tyrosinase expression without ERK activation (52). In contrast, topical application of a purified SL fraction, containing some sphingoid bases, to age-onset gray-haired C57BL/6J mouse skin, induced the re-growth of black hair with differentiated melanocytes expressing MIF (6, 53). In line with these observations, we show that S1P itself is able to activate MIF expression when added to melanoma cells (Fig. 6B). However, MIF expression is also increased in B16 murine melanoma at late stages of progression, i.e., when ceramide levels are reduced by downregulation of acid sphingomyelinase (30). Here, we describe, for the first time, that the S1P axis represents a critical regulator of the MIF-mediated signaling pathways that control melanoma cell-autonomous resistance to BRAFi. However, the S1P axis is also a key player of the tumor microenvironment remodeling in melanoma as it promotes angiogenesis (7), stromagenesis (4) and the macrophage M2 phenotype (54). In particular, it elicits the release of TGF- $\beta$  from melanoma cells, thus promoting the recruitment and phenotypic shift of the tumor macrophages (54) as well as the differentiation of quiescent fibroblasts into activated fibroblasts (4). Interestingly, activated fibroblasts and macrophages were shown to provide resistance of melanoma cells to targeted therapies by secreting HGF (55) or TNF (56), respectively. Whether the "inside-out" signaling of S1P is associated to these phenomena is of particular interest and is currently under investigation.

An important hallmark of melanoma is resistance to apoptosis, which is mediated by low levels of BH3-only proteins and/or high levels of Bcl-2-like prosurvival proteins (57). Here, we demonstrate that the ceramide/S1P ratio controls Bcl-2 levels without significantly modifying Bcl-2-A1 expression, both being regulated by MIF. Consistent with these results, high levels of SPHK1 activity were associated with high expression of Bcl-2 and reported to counteract Fas and ceramide-mediated cell death in A375 human melanoma cells (58). Moreover, we show that strategies leading to S1PR downregulation cooperate with ABT-737 to induce apoptosis in PLX-resistant melanoma cells. This combination was more effective than the combination of PLX and ABT-737. Combining Bcl-2 inhibitors and BRAFi led to higher levels of caspase-dependent apoptosis and reduced tumor growth *in vivo*

more efficiently than monotherapy (34). However, this combination was not always effective against cell lines established from patients with acquired resistance to vemurafenib (59). Collectively, our results propose an alternative combination drug therapy based on SIPR downregulation in order to exert potent antitumor activity against BRAFi-resistant melanomas.

### Disclosure of Potential Conflicts of Interest

N. Meyer has received speakers bureau honoraria from Roche, BMS, MSD, Novartis. Pierre Fabre is a consultant/advisory board member of Roche, BMS, MSD, Novartis, and Pierre Fabre: French pharmaceutical laboratory. No potential conflicts of interest were disclosed by the other authors.

### Authors' Contributions

**Conception and design:** C. Bertolotto, N. Andrieu-Abadie

**Development of methodology:** D. Garandau, J. Noujarède, J. Leclerc, C. Imbert, V. Garcia, N. Meyer, S. Arcucci

**Acquisition of data (provided animals, acquired and managed patients, provided facilities, etc.):** M.-L. Bats, T. Filleron, N. Meyer, S. Brayer, J.-C. Marine  
**Analysis and interpretation of data (e.g., statistical analysis, biostatistics, computational analysis):** M.-L. Bats, F. Rambow, J. Gilhodes, T. Filleron, N. Meyer, T. Levade

**Writing, review, and/or revision of the manuscript:** N. Meyer, B. Ségui, J.-C. Marine, T. Levade

**Administrative, technical, or material support (i.e., reporting or organizing data, constructing databases):** S. Tartare-Deckert, C. Bertolotto  
**Study supervision:** C. Bertolotto, N. Andrieu-Abadie

### Acknowledgments

The authors would like to thank Dr. C. Colacios for critical reading and Mrs M. Fraisse for technical assistance. Financial support by INSERM (to N. Andrieu-Abadie), Paul Sabatier University (to T. Levade), Ligue Nationale Contre le Cancer (to T. Levade, EL2013-5 LEVADE, Equipe Labellisée 2013), and the Société Française de Dermatologie (to N. Andrieu-Abadie) is gratefully acknowledged. We thank Dr. R.S. Lo (University of California) for M249 cells. C. Imbert is a recipient of a fellowship from LNCC. D. Garandau is a recipient of a fellowship from Association pour la Recherche contre le Cancer. We thank the staff of the animal (Anexplo platform, Toulouse, France), flow cytometry and vectorology (Inserm UMR1037; Toulouse, France) facilities. We acknowledge the assistance of Drs. A. Dupuy, F. Riols, and J. Bertrand-Michel from the MetaToul-lipidomic facility (Inserm UMR1048; Toulouse, France). We also thank Drs. G. Fabriàs and J. Casas (Department of Biomedical Chemistry, IQAC-CSIC, Barcelona, Spain) for lipidomic analysis on the plasma samples.

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

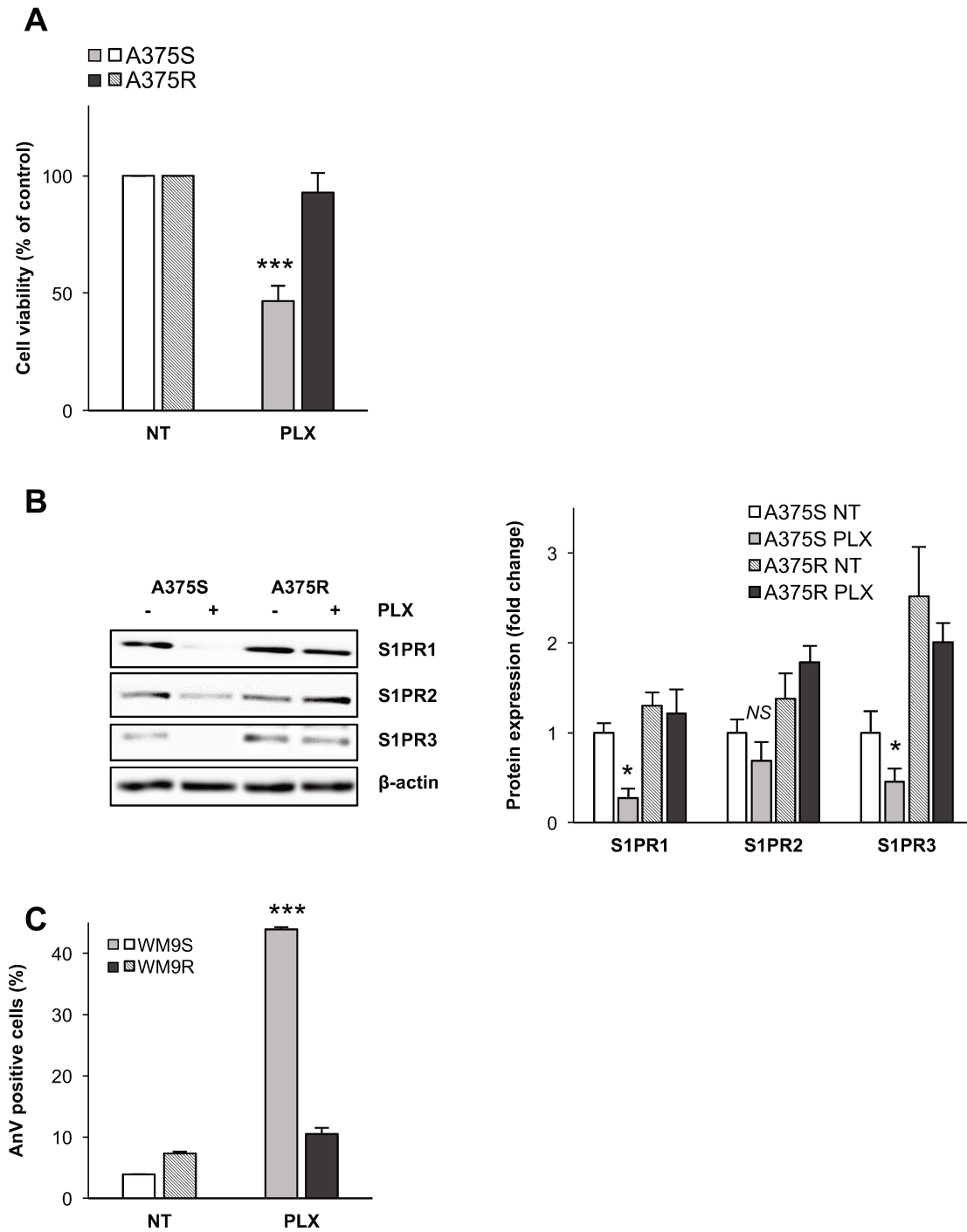
Received November 16, 2017; revised June 4, 2018; accepted November 20, 2018; published first November 27, 2018.

### References

- Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011;144:646–74.
- Colie S, Van Veldhoven PP, Kedjhour B, Bedia C, Albinet V, Sorli SC, et al. Disruption of sphingosine 1-phosphate lyase confers resistance to chemotherapy and promotes oncogenesis through Bcl-2/Bcl-xL upregulation. *Cancer Res* 2009;69:9346–53.
- Sorli SC, Colie S, Albinet V, Dubrac A, Touriol C, Guilbaud N, et al. The nonlysosomal beta-glucosidase GBA2 promotes endoplasmic reticulum stress and impairs tumorigenicity of human melanoma cells. *FASEB J* 2013;27:489–98.
- Albinet V, Bats ML, Huwiler A, Rochaix P, Chevreau C, Segui B, et al. Dual role of sphingosine kinase-1 in promoting the differentiation of dermal fibroblasts and the dissemination of melanoma cells. *Oncogene* 2014;33:3364–73.
- Proia RL, Hla T. Emerging biology of sphingosine 1-phosphate: its role in pathogenesis and therapy. *J Clin Invest* 2015;125:1379–87.
- Garandau D, Mrad M, Levade T, Perrotta C, Diab-Assaf M, Andrieu-abadie N. Dysregulation of sphingolipid metabolism in melanoma: roles in pigmentation, cell survival and tumor progression. In: Hannun YALC, Mao C, Obeid LM, editors. *Bioactive sphingolipids in cancer biology and therapy*. Switzerland: Springer International Publishing; 2015.
- Visentin B, Vekich JA, Sibbald BJ, Cavalli AL, Moreno KM, Matteo RG, et al. Validation of an anti-sphingosine 1-phosphate antibody as a potential therapeutic in reducing growth, invasion, and angiogenesis in multiple tumor lineages. *Cancer Cell* 2006;9:225–38.
- Ponnusamy S, Selvam SP, Mehrotra S, Kawamori T, Snider AJ, Obeid LM, et al. Communication between host organism and cancer cells is modulated by systemic sphingosine kinase 1/sphingosine 1-phosphate signaling to regulate tumour metastasis. *EMBO Mol Med* 2012;4:761–75.
- Gershenwald JE, Guy GP Jr. Stemming the rising incidence of melanoma: calling prevention to action. *J Natl Cancer Inst* 2016;108:1–5.
- Welsh SJ, Rizos H, Scolyer RA, Long GV. Resistance to combination BRAF and MEK inhibition in metastatic melanoma: where to next? *Eur J Cancer* 2016;62:76–85.
- Flaherty KT, Infante JR, Daud A, Gonzalez R, Kefford RF, Sosman J, et al. Combined BRAF and MEK inhibition in melanoma with BRAF V600 mutations. *N Engl J Med* 2012;367:1694–703.
- Shi H, Kong X, Ribas A, Lo RS. Combinatorial treatments that overcome PDGFRbeta-driven resistance of melanoma cells to V600EB-RAF inhibition. *Cancer Res* 2011;71:5067–74.
- Haq R, Shoaq J, Andreu-Perez P, Yokoyama S, Edelman H, Rowe GC, et al. Oncogenic BRAF regulates oxidative metabolism via PGC1alpha and MITF. *Cancer Cell* 2013;23:302–15.
- Ponnusamy S, Meyers-Needham M, Senkal CE, Saddoughi SA, Sentelle D, Selvam SP, et al. Sphingolipids and cancer: ceramide and sphingosine 1-phosphate in the regulation of cell death and drug resistance. *Future Oncol* 2010;6:1603–24.
- Watson C, Long JS, Orange C, Tannahill CL, Mallon E, McGlynn LM, et al. High expression of sphingosine 1-phosphate receptors, S1P1 and S1P3, sphingosine kinase 1, and extracellular signal-regulated kinase-1/2 is associated with development of tamoxifen resistance in estrogen receptor-positive breast cancer patients. *Am J Pathol* 2010;177:2205–15.
- Song L, Xiong H, Li J, Liao W, Wang L, Wu J, et al. Sphingosine kinase-1 enhances resistance to apoptosis through activation of PI3K/Akt/NF-kappaB pathway in human non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 2011;17:1839–49.
- Baran Y, Salas A, Senkal CE, Gunduz U, Bielawski J, Obeid LM, et al. Alterations of ceramide/sphingosine 1-phosphate rheostat involved in the regulation of resistance to imatinib-induced apoptosis in K562 human chronic myeloid leukemia cells. *J Biol Chem* 2007;282:10922–34.
- Tonelli F, Lim KG, Loveridge C, Long J, Pitson SM, Tigyi G, et al. FIY720 and (S)-FIY720 vinylphosphonate inhibit sphingosine kinase 1 and promote its proteasomal degradation in human pulmonary artery smooth muscle, breast cancer and androgen-independent prostate cancer cells. *Cell Signal* 2010;22:1536–42.
- Gao Y, Gao F, Chen K, Tian ML, Zhao DL. Sphingosine kinase 1 as an anticancer therapeutic target. *Drug Des Devel Ther* 2015;9:3239–45.
- Nazarian R, Shi H, Wang Q, Kong X, Koya RC, Lee H, et al. Melanomas acquire resistance to B-RAF(V600E) inhibition by RTK or N-RAS upregulation. *Nature* 2010;468:973–7.
- Bonet C, Giuliano S, Ohanna M, Bille K, Allegra M, Lacour JP, et al. Aurora B is regulated by the mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase (MAPK/ERK) signaling pathway and is a valuable potential target in melanoma cells. *J Biol Chem* 2012;287:29887–98.
- Corazao-Rozas P, Guerreschi P, Jendoubi M, Andre F, Jonneaux A, Scalbert C, et al. Mitochondrial oxidative stress is the Achilles' heel of melanoma cells resistant to Braf-mutant inhibitor. *Oncotarget* 2013;4:1986–98.
- Barretina J, Caponigro G, Stransky N, Venkatesan K, Margolin AA, Kim S, et al. The Cancer Cell Line Encyclopedia enables predictive modelling of anticancer drug sensitivity. *Nature* 2012;483:603–7.

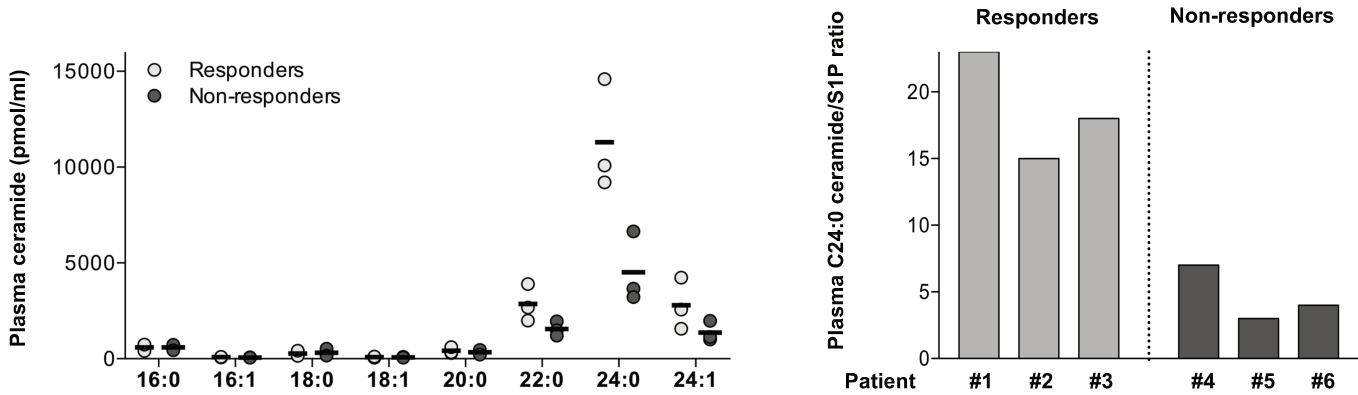
24. Sanna MG, Wang SK, Gonzalez-Cabrera PJ, Don A, Marsolais D, Matheu MP, et al. Enhancement of capillary leakage and restoration of lymphocyte egress by a chiral S1P1 antagonist in vivo. *Nat Chem Biol* 2006;2:434–41.
25. Koide Y, Hasegawa T, Takahashi A, Endo A, Mochizuki N, Nakagawa M, et al. Development of novel EDG3 antagonists using a 3D database search and their structure-activity relationships. *J Med Chem* 2002;45:4629–38.
26. Suzuki S, Enosawa S, Kakefuda T, Shinomiya T, Amari M, Naoe S, et al. A novel immunosuppressant, FY720, with a unique mechanism of action, induces long-term graft acceptance in rat and dog allotransplantation. *Transplantation* 1996;61:200–5.
27. Liang J, Nagahashi M, Kim EY, Harikumar KB, Yamada A, Huang WC, et al. Sphingosine 1-phosphate links persistent STAT3 activation, chronic intestinal inflammation, and development of colitis-associated cancer. *Cancer Cell* 2013;23:107–20.
28. Sharma AK, Sk UH, Gimbora MA, Hengst JA, Wang X, Yun J, et al. Synthesis and bioactivity of sphingosine kinase inhibitors and their novel aspirinyl conjugated analogs. *Eur J Med Chem* 2010;45:4149–56.
29. Long JS, Edwards J, Watson C, Tovey S, Mair KM, Schiff R, et al. Sphingosine kinase 1 induces tolerance to human epidermal growth factor receptor 2 and prevents formation of a migratory phenotype in response to sphingosine 1-phosphate in estrogen receptor-positive breast cancer cells. *Mol Cell Biol* 2010;30:3827–41.
30. Bizzozero L, Cazzato D, Cervia D, Assi E, Simbari F, Pagni F, et al. Acid sphingomyelinase determines melanoma progression and metastatic behaviour via the microphthalmia-associated transcription factor signalling pathway. *Cell Death Differ* 2014;21:507–20.
31. Kim DS, Park SH, Jeong YM, Kwon SB, Miller AJ, Fisher DE, et al. Sphingosine 1-phosphate decreases melanin synthesis via microphthalmia-associated transcription factor phosphorylation through the S1P3 receptor subtype. *J Pharm Pharmacol* 2011;63:409–16.
32. Smith MP, Brunton H, Rowling EJ, Ferguson J, Arozarena I, Miskolczi Z, et al. Inhibiting drivers of non-mutational drug tolerance is a salvage strategy for targeted melanoma therapy. *Cancer Cell* 2016;29:270–84.
33. McGill GG, Horstmann M, Widlund HR, Du J, Motyckova G, Nishimura EK, et al. Bcl2 regulation by the melanocyte master regulator Mitf modulates lineage survival and melanoma cell viability. *Cell* 2002;109:707–18.
34. Serasinghe MN, Missert DJ, Asciola JJ, Podgrabska S, Wieder SY, Izadmehr S, et al. Anti-apoptotic BCL-2 proteins govern cellular outcome following B-RAF(V600E) inhibition and can be targeted to reduce resistance. *Oncogene* 2015;34:857–67.
35. Oltersdorf T, Elmore SW, Shoemaker AR, Armstrong RC, Augeri DJ, Belli BA, et al. An inhibitor of Bcl-2 family proteins induces regression of solid tumours. *Nature* 2005;435:677–81.
36. Aguilera-Romero A, Gehin C, Riezman H. Sphingolipid homeostasis in the web of metabolic routes. *Biochim Biophys Acta* 2014;1841:647–56.
37. Madhunapantula SV, Hengst J, Gowda R, Fox TE, Yun JK, Robertson GP. Targeting sphingosine kinase-1 to inhibit melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res* 2012;25:259–74.
38. Saddoughi SA, Garrett-Mayer E, Chaudhary U, O'Brien PE, Afrin LB, Day TA, et al. Results of a phase II trial of gemcitabine plus doxorubicin in patients with recurrent head and neck cancers: serum C(1)(8)-ceramide as a novel biomarker for monitoring response. *Clin Cancer Res* 2011;17:6097–105.
39. Go H, Kim PJ, Jeon YK, Cho YM, Kim K, Park BH, et al. Sphingosine 1-phosphate receptor 1 (S1PR1) expression in non-muscle invasive urothelial carcinoma: association with poor clinical outcome and potential therapeutic target. *Eur J Cancer* 2015;51:1937–45.
40. Brinkmann V, Billich A, Baumruker T, Heining P, Schmoeder R, Francis G, et al. Fingolimod (FTY720): discovery and development of an oral drug to treat multiple sclerosis. *Nat Rev Drug Discov* 2010;9:883–97.
41. Yasui H, Hideshima T, Raje N, Roccaro AM, Shiraishi N, Kumar S, et al. FTY720 induces apoptosis in multiple myeloma cells and overcomes drug resistance. *Cancer Res* 2005;65:7478–84.
42. Marvaso G, Barone A, Amodio N, Raimondi L, Agosti V, Altomare E, et al. Sphingosine analog fingolimod (FTY720) increases radiation sensitivity of human breast cancer cells in vitro. *Cancer Biol Ther* 2014;15:797–805.
43. Rosa R, Marciano R, Malapelle U, Formisano L, Nappi L, D'Amato C, et al. Sphingosine kinase 1 overexpression contributes to cetuximab resistance in human colorectal cancer models. *Clin Cancer Res* 2013;19:138–47.
44. Loveridge C, Tonelli F, Leclercq T, Lim KG, Long JS, Berdyshev E, et al. The sphingosine kinase 1 inhibitor 2-(p-hydroxyanilino)-4-(p-chlorophenyl) thiazole induces proteasomal degradation of sphingosine kinase 1 in mammalian cells. *J Biol Chem* 2010;285:38841–52.
45. Zhao J, Liu J, Lee JF, Zhang W, Kandouz M, VanHecke GC, et al. TGF-beta/SMAD3 pathway stimulates sphingosine 1-phosphate receptor 3 expression: implication of sphingosine-1-phosphate receptor 3 in lung adenocarcinoma progression. *J Biol Chem* 2016;291:27343–53.
46. Lee H, Deng J, Kujawski M, Yang C, Liu Y, Herrmann A, et al. STAT3-induced S1PR1 expression is crucial for persistent STAT3 activation in tumors. *Nat Med* 2010;16:1421–8.
47. Alshaker H, Wang Q, Frampton AE, Krell J, Waxman J, Winkler M, et al. Sphingosine kinase 1 contributes to leptin-induced STAT3 phosphorylation through IL-6/gp130 transactivation in oestrogen receptor-negative breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2015;149:59–67.
48. Degagne E, Pandurangan A, Bandhuvula P, Kumar A, Eltanawy A, Zhang M, et al. Sphingosine 1-phosphate lyase downregulation promotes colon carcinogenesis through STAT3-activated microRNAs. *J Clin Invest* 2014;124:5368–84.
49. Lee I, Fox PS, Ferguson SD, Bassett R, Kong LY, Schacherer CW, et al. The expression of p-STAT3 in stage IV melanoma: risk of CNS metastasis and survival. *Oncotarget* 2012;3:336–44.
50. Liu F, Cao J, Wu J, Sullivan K, Shen J, Ryu B, et al. Stat3-targeted therapies overcome the acquired resistance to vemurafenib in melanomas. *J Invest Dermatol* 2013;133:2041–9.
51. Ji Z, Erin Chen Y, Kumar R, Taylor M, Jenny Njauw CN, Miao B, et al. MITF modulates therapeutic resistance through EGFR signaling. *J Invest Dermatol* 2015;135:1863–72.
52. Lee JE, Kim SY, Jeong YM, Yun HY, Baek KJ, Kwon NS, et al. The regulatory mechanism of melanogenesis by FTY720, a sphingolipid analogue. *Exp Dermatol* 2011;20:237–41.
53. Saha B, Singh SK, Mallick S, Bera R, Datta PK, Mandal M, et al. Sphingolipid-mediated restoration of Mitf expression and repigmentation in vivo in a mouse model of hair graying. *Pigment Cell Melanoma Res* 2009;22:205–18.
54. Mrad M, Imbert C, Garcia V, Rambow F, Therville N, Carpentier S, et al. Downregulation of sphingosine kinase-1 induces protective tumor immunity by promoting M1 macrophage response in melanoma. *Oncotarget* 2016;7:71873–86.
55. Straussman R, Morikawa T, Shee K, Barzily-Rokni M, Qian ZR, Du J, et al. Tumour micro-environment elicits innate resistance to RAF inhibitors through HGF secretion. *Nature* 2012;487:500–4.
56. Smith MP, Sanchez-Laorden B, O'Brien K, Brunton H, Ferguson J, Young H, et al. The immune microenvironment confers resistance to MAPK pathway inhibitors through macrophage-derived TNFalpha. *Cancer Discov* 2014;4:1214–29.
57. Hartman ML, Czyz M. Anti-apoptotic proteins on guard of melanoma cell survival. *Cancer Lett* 2013;331:24–34.
58. Bektas M, Jolly PS, Muller C, Eberle J, Spiegel S, Geilen CC. Sphingosine kinase activity counteracts ceramide-mediated cell death in human melanoma cells: role of Bcl-2 expression. *Oncogene* 2005;24:178–87.
59. Wroblewski D, Mijatov B, Mohana-Kumaran N, Lai F, Gallagher SJ, Haass NK, et al. The BH3-mimetic ABT-737 sensitizes human melanoma cells to apoptosis induced by selective BRAF inhibitors but does not reverse acquired resistance. *Carcinogenesis* 2013;34:237–47.

# Figure S1



**Figure S1:** Differential effect of PLX on S1PR expression and cell death in BRAFi-sensitive and BRAFi-resistant cells. **(A-B)** A375<sup>S</sup> and A375<sup>R</sup> cells were treated or not with PLX (5  $\mu$ M) for 24 **(B)** or 48 **(A)** hours in medium containing 7% FBS. **(A)** Cell viability was assessed using the MTT test. Results are expressed as percentage of the value determined at the corresponding time in the absence of the drug (NT). Data are means  $\pm$  s.e.m. of 3 independent experiments. **(B)** Cell lysates (30  $\mu$ g of protein) were subjected to SDS-PAGE and immunoblotted with anti-S1PR1, anti-S1PR2, anti-S1PR3 and  $\beta$ -actin antibodies. Left: Representative immunoblot of at least 3 independent experiments. Right: Levels of S1PRs normalized to  $\beta$ -actin and relative to non-treated (NT) cells. **(C)** WM9<sup>S</sup> and WM9<sup>R</sup> cells were incubated for 48 hours in medium containing 7% FBS in the absence (NT) or presence of PLX (5  $\mu$ M). Cells were labeled with Annexin-V-FITC and propidium iodide, and analyzed by flow cytometry. Percentages (mean  $\pm$  s.e.m. of 3 independent experiments) of Annexin-V-positive cells are indicated. Statistical differences relative to untreated cells are shown (Student's *t*-test). NS, not significant.

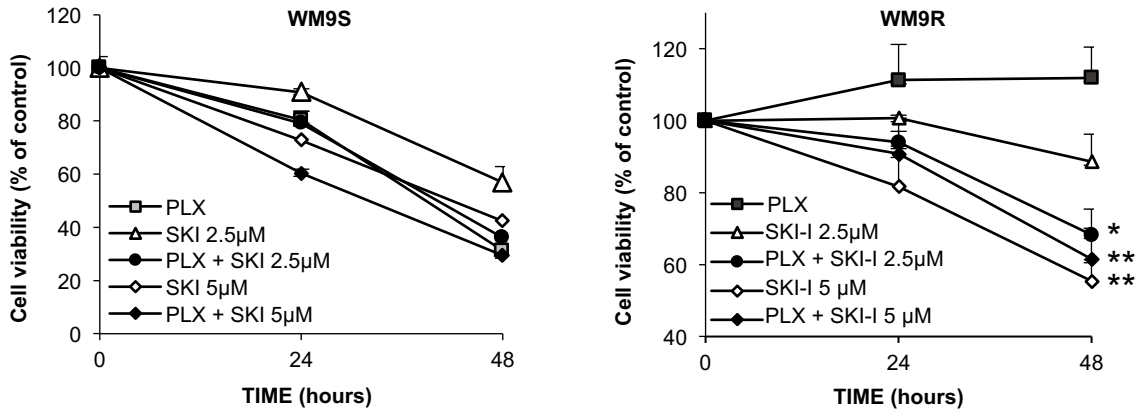
## Figure S2



**Figure S2:** Distinct SL profile between responders and non-responders to BRAFi.

Plasma SL levels in 6 patients with BRAFV600-positive metastatic melanoma, classified as Responders (#1, 2 and 3) and Non-responders (# 4, 5 and 6). Left: Levels of individual ceramide species; Right: Ratios of C24-ceramide/S1P. The sample size in both subgroups is too small to be determined as significant.

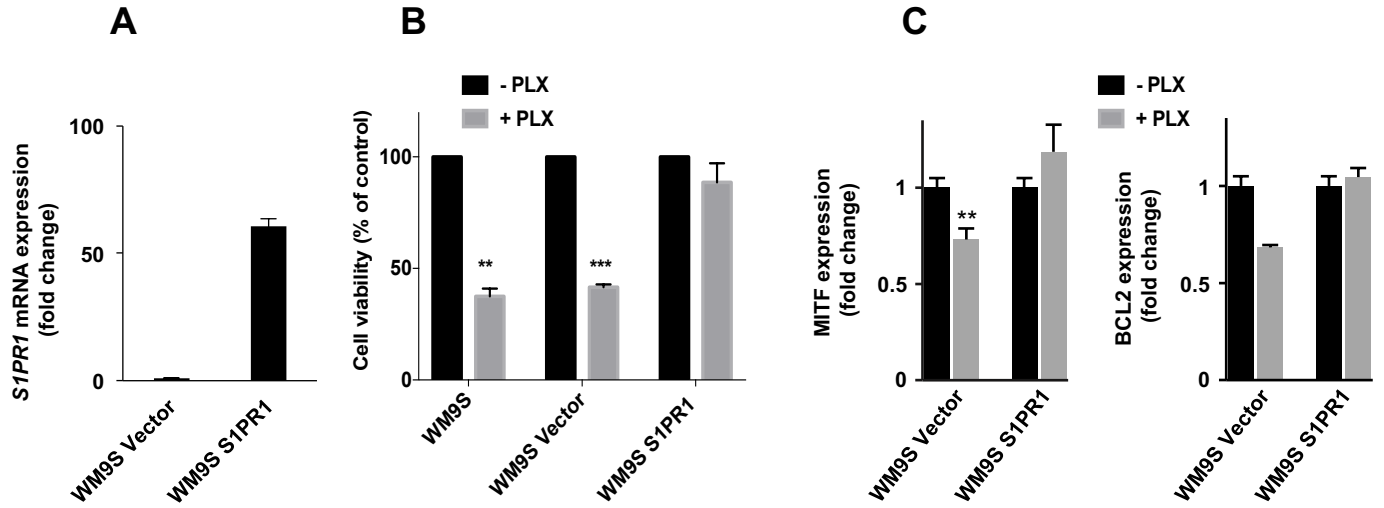
**Figure S3**



**Figure S3:** SKI-I induces cell death in both PLX-sensitive and -resistant melanoma cells.

WM9<sup>S</sup> and WM9<sup>R</sup> cells were treated or not with PLX (5 µM) for 48 hours in 7% FBS supplemented medium containing or not SKI-I at the indicated concentrations. Cell viability was then assessed using the MTT test. Results are expressed as percentage of the value determined at the corresponding time in the absence of the drug. Data are means ± s.e.m. of 3 independent experiments. Statistical differences relative to untreated cells are shown (Student's *t*-test).

## Figure S4



**Figure S4:** MITF expression is dependent on S1PR1 in PLX-treated melanoma cells (A-C) S1PR1 expression (A), cell viability (B) and MITF and Bcl-2 expression (C) were quantified in control (Vector) or S1PR1-overexpressing (S1PR1) WM9<sup>S</sup> melanoma cells treated or not with 5  $\mu$ M of PLX for 24 or 48 hours in medium containing 7% FBS. Results are expressed as percentage of the value determined in the absence of the drug and are means  $\pm$  s.e.m. of 2-3 independent experiments. Statistical differences were determined using Student's t-test.



**RÉSULTATS NON PUBLIÉS**  
**DISCUSSION ET PERSPECTIVES**

## **Article 1: Lysosomal acid ceramidase ASAH1 controls the transition between invasive and proliferative phenotype in melanoma cells.**

### **Plasticité et hétérogénéité intra-tumorale**

Dans cette étude nous avons mis en évidence l'importance de l'expression d'ASAH1 dans le mélanome. En effet, ASAH1 semble être un gène important qui contrôle la transition phénotypique qui a été impliquée dans l'hétérogénéité intratumorale observée dans les mélanomes et qui a été montrée pour contribuer aux résistances thérapeutiques et aux récurrences. Nous avons démontré que les cellules de mélanomes exprimant fortement ASAH1 ont un phénotype prolifératif, et qu'à l'inverse les cellules exprimant faiblement ASAH1 présentent un phénotype invasif. Précédemment, il avait déjà été montré qu'ASAH1 a un rôle important pour la prolifération des cellules de mélanomes (Realini et al., 2016).

Nous avons démontré qu'ASAH1 est une cible de MITF, impliquant pour la première fois MITF dans la régulation du métabolisme des sphingolipides. Jusqu'à présent, des régulations d'ASAH1 ont été rapportées dans des cellules de carcinomes surrenaliens via CREB (Lucki and Sewer, 2009), et par ER- $\alpha$  et SP1 dans des cellules de cancers du sein (Lucki and Sewer, 2011). De plus, dans des fibroblastes murins et plusieurs lignées de cellules cancéreuses humaines, il a été montré que KLF6 est un activateur d'ASAH1 en se fixant à son promoteur (Park et al., 2005). Notre étude permet d'ajouter MITF aux régulateurs d'ASAH1, constituant une nouvelle régulation tissu-spécifique d'ASAH1.

De façon générale, plusieurs études démontrent que l'expression élevée d'ASAH1 est associée à un mauvais pronostic dans différents cancers comme celui de la prostate, du sein et les carcinomes de la tête et du cou (Don et al., 2014; Truman et al., 2014). Cette expression élevée est également associée à une plus forte agressivité de la tumeur (Cheng et al., 2013; Elojeimy et al., 2007; Mahdy et al., 2009). Ces études ont abouti à la conclusion qu'une inhibition d'ASAH1 dans les cancers serait bénéfique. Cependant, d'autres études ont indiqué que l'expression d'ASAH1 corrèle avec un bon pronostic dans les cancers du sein hormono-dépendant (Ruckhaberle et al., 2009; Sanger et al., 2015). L'expression élevée d'ASAH1 n'est donc pas nécessairement un indicateur de mauvais pronostic et pourrait dépendre du type de cancer observé et de la progression tumorale. En effet, notre étude tend à démontrer que l'expression d'ASAH1 peut varier au cours des processus tumoraux. De ce fait, une étude approfondie de l'expression et du rôle d'ASAH1 au cours de la tumorigenèse de différents cancers pourrait s'avérer utile afin de mieux traiter les patients.

Des mutations dans le gène ASAH1 sont à l'origine de la maladie de Farber qui est mortelle très précocement. Cette maladie ne confère pas de risque accru de développer un cancer. Néanmoins, l'issue fatale de la maladie survient dans la plupart des cas avant 2 ans. Or le mélanome ne survient pas avant l'âge de 15 ans. Notre étude dans le mélanome a mis en évidence des gènes et des voies de signalisation régulés par ASAH1, qui pourraient être étudiés dans le cadre de la maladie de Farber afin de proposer de nouvelles approches thérapeutiques. A noter que les patients atteints de cette pathologie

présentent un profil unique de surexpression de la chimiokine inflammatoire CCL2; que nous avons retrouvée fortement surexprimée dans les cellules de mélanome dont l'expression d'ASAH1 a été inhibée.

Le rôle pro ou anti-tumoral d'ASAH1 pourrait être expliqué par des fonctions tissu-spécifique de cette protéine ou par des variations d'expression durant le processus tumorigène. Cette hypothèse est confortée par les observations suggérant que l'expression de MITF doit être réprimée de façon transitoire pour permettre la migration des cellules de mélanome, puis cette expression doit à nouveau être élevée pour permettre la prolifération des cellules métastatiques (Bonet et al., 2012; Carreira et al., 2006; Cheli et al., 2011). En réponse à des stimuli environnementaux, MITF présente une expression oscillatoire permettant un changement réversible des cellules de mélanome entre un phénotype prolifératif et invasif permettant l'apparition et la croissance des métastases (Cheli et al., 2011; Falletta et al., 2017; Hoek et al., 2008). ASAH1 pourrait également présenter ce profil d'expression et d'activité dans les cellules de mélanomes puisqu'étant une cible de MITF.

Les cellules de mélanomes dans lesquelles l'expression de MITF est inhibée par approche siRNA sont sénescents (Giuliano et al., 2010; Strub et al., 2011). Les cellules dont l'expression d'ASAH1 est inhibée par siRNA sont également positives pour le marquage  $\beta$ -galactosidase, un des marqueurs les plus utilisés pour détecter la sénescence (Cf. Figure supplémentaire 7G). Cette observation est en accord avec des résultats publiés précédemment (Lai et al., 2017). A noter qu'il a été montré que les cellules de mélanomes sénescents gardent leur capacité migratoire et invasive (Webster et al., 2015). Ces cellules présentent également un sécrétome pro-inflammatoire illustré par une augmentation d'expression de CCL2 et CYR61 qui a déjà été décrit dans des cellules MITF<sup>low</sup> (dont l'expression de MITF a été inhibée par siRNA) (Ohanna et al., 2013; Ohanna et al., 2011). Les cellules ASAH1<sup>low</sup> (dont l'expression d'ASAH1 a été inhibée par siRNA) présentent un profil qui se superpose partiellement à celui observé dans les cellules MITF<sup>low</sup>. L'analyse transcriptomique a révélé que les cellules transfectées avec un siRNA dirigé contre ASAH1 n'ont pas de changement d'expression de ZEB1 ou SNAIL mais présentent une augmentation de TWIST1, BRN2 et SLUG qui sont des facteurs essentiels à la progression tumorale et à l'invasion (Caramel et al., 2013; Pinner et al., 2009). De plus, seul le récepteur IGF1R présente une augmentation d'expression dans les cellules ASAH1<sup>low</sup> ce n'est pas le cas d'autres récepteurs à tyrosine kinase tels que PDGFRB, AXL, EGFR, ERBB3 et EPHA2 qui sont dérégulés dans les cellules MITF<sup>low</sup> (Falletta et al., 2017; Muller et al., 2014; Villanueva et al., 2010). Il semble donc que le profil des cellules ASAH1<sup>low</sup> soit intermédiaire entre un phénotype prolifératif et invasif décrits précédemment (Rambow et al., 2015; Widmer et al., 2012). De plus, des cellules de mélanomes présentant les deux phénotypes ont été décrites très récemment (Reinhardt et al., 2017).

Nos résultats démontrent que la perte d'expression d'ASAH1 induit un phénotype de sénescence et augmente la migration des cellules de mélanomes. A l'inverse, il a été montré que des cellules invalidées totalement pour ASAH1 perdent leur capacité de cellules initiatrices de mélanomes (Lai et al., 2017). Nos résultats obtenus par approche siRNA entraînent un phénotype mésenchymateux plutôt associé aux cellules souches. Cette contradiction pourrait être expliquée par le fait que la perte totale d'ASAH1 dans ces cellules ne permet pas une certaine plasticité cellulaire. La perte de fonction partielle de cette protéine générée par approche siRNA pourrait être plus physio-pathologique quant à l'observation des effets du microenvironnement tumoral en comparaison à une approche Crispr-Cas9.

### **ASAH1 et son implication dans la migration, quels mécanismes, quelles cibles ?**

La migration requiert la régulation de la E-cadhérine, un médiateur des adhérences intercellulaires et celle des intégrines permettant les échanges avec la MEC (Canel et al., 2013). Les cellules ASAH1<sup>low</sup> présentent une inhibition d'E-cadhérine et une augmentation d'expression de TWIST1 permettant la transition épithélio-mésenchymateuse (Caramel et al., 2013; Vesuna et al., 2008). Il avait déjà été démontré que la production de S1P supprime la migration de cellules de cancers du sein grâce à la ré-expression d'E-cadhérine augmentant l'adhérence intercellulaire (Wang et al., 1999). De plus, la perte d'expression d'ASAH1 favorise la croissance indépendante de l'ancrage et corrèle avec l'acquisition de propriétés mésenchymateuses via l'activation des intégrines  $\alpha V\beta 5$ . Dans des cellules de mélanomes invasives, ces mêmes intégrines régulent la sécrétion de VEGF-A (vascular endothelial growth factor) favorisant l'extravasation et la formation de métastases (Desch et al., 2012). Notre analyse transcriptomique a révélé une très forte augmentation de VEGF-C dans les cellules dont l'expression d'ASAH1 a été inhibée. Il serait donc intéressant de vérifier ces résultats in vivo afin de confirmer si l'expression d'ASAH1 est nécessaire pour potentialiser la colonisation et la croissance des cellules métastatiques. Néanmoins, nos résultats sont en contradiction avec une étude récente où ASAH1 semblerait être plutôt un activateur de l'angiogenèse via une augmentation d'expression du VEGF dans des cellules de cordon ombilical humain (HUVECs) (Cho et al., 2018). Toutefois, ces cellules ne représentent pas forcément un modèle physio-pathologique pertinent permettant d'élucider le rôle d'ASAH1 dans les processus tumoraux.

Les facteurs de transcription BRN2 et NFIB reflètent l'hétérogénéité intratumorale du mélanome et ont un rôle dans la migration de ces cellules. Leur expression est fortement augmentée dans les cellules dont l'expression d'ASAH1 est inhibée. Récemment, il a été montré que NFIB est impliqué dans la migration des cellules de mélanome observée lorsque l'expression de BRN2 est augmentée. Cette migration implique une augmentation d'expression de BRN2 réprimant MITF et induisant l'expression du facteur de transcription NFIB qui active EZH2 (Fane et al., 2017; Goodall et al., 2008). On ne retrouve pas d'augmentation d'expression d'EZH2 dans notre analyse transcriptomique, EZH2 étant même inhibé dans nos cellules ASAH1<sup>low</sup> malgré une forte augmentation d'expression de

BRN2. Par conséquent, l'augmentation de migration observée dans nos cellules ASAHI<sup>low</sup> ne semble pas s'effectuer selon l'axe de signalisation BRN2/NFIB/EZH2 rapporté dans la littérature (Fane et al., 2017). Il est néanmoins probable que l'activation de NFIB permette la transcription d'autres cibles impliquées dans la migration expliquant ce phénotype.

En effet, NFIB joue un rôle dans le maintien de la quiescence des cellules souches dans certains tissus à l'âge adulte (Chang et al., 2013; Harris et al., 2015; Rolando et al., 2016). NFIB semble également moduler le destin cellulaire grâce à sa régulation par MYC et son interaction avec SOX2, ces deux facteurs de transcription sont impliqués dans la pluripotence des cellules (Engelen et al., 2011; Mollaoglu et al., 2017). Comme il a été démontré dans les études précédentes, NFIB régule des changements intrinsèques à la cellule mais il est également un facteur jouant un rôle sur le microenvironnement tumoral promouvant l'agressivité des tumeurs. En effet, NFIB est capable de réguler les endothélines (des facteurs sécrétés régulant les échanges intercellulaires). Ces endothélines stimulent l'angiogenèse, la migration et l'invasion (Chang et al., 2013; Rosano et al., 2013).

Un autre gène plus fortement exprimé lorsqu'on inhibe ASAHI est le facteur de transcription SOX4. Dans des cellules de mélanomes, SOX4 promeut la migration et l'invasion à travers une activation de la voie NF- $\kappa$ B, et l'augmentation des MMP2 et MMP9 au niveau des ARNm et des protéines (Cheng et al., 2017). Dans des cellules de cancer du côlon, SOX4 peut se fixer sur le promoteur de CYR61 et activer sa transcription modulant la prolifération, la migration et la survie des cellules tumorales (Wu et al., 2014). A noter que SOX4 peut être régulé par le miRNA miR-30a-5p qui évite la progression tumorale de multiples cellules tumorales et notamment des cellules de mélanomes (Liu et al., 2018). Parmi les régulateurs positifs potentiels de SOX4, on retrouve le long ARN non-codant CASC15 (Fernando et al., 2017) qui est retrouvé augmenté dans notre analyse transcriptomique. Ce locus très proche de SOX4, est activement transcrit dans des cellules de mélanomes métastatiques et son augmentation est associée à la progression métastatique au cerveau dans des modèles de xénogreffes. De plus, CASC15 semble être un régulateur du changement phénotypique entre un état prolifératif ou invasif (Lessard et al., 2015). Pour finir, une étude très récente prouve que CASC15 permet d'inhiber l'expression de PDCD4 (programmed cell death 4) en recrutant EZH2 et en augmentant la méthylation de la région promotrice de PDCD4. La surexpression de PDCD4 inhibe la prolifération et l'invasion des cellules de mélanomes et entraîne l'apoptose (Yin et al., 2018). Une étude du lien entre ce long ARN non-codant et ASAHI permettrait potentiellement d'expliquer l'action d'ASAHI dans le processus de migration et de changement phénotypique.

Pour finir, la cavéoline 1 (impliquée dans la formation des cavéoles) est également augmentée dans notre analyse transcriptomique dans les cellules dont l'expression d'ASAHI a été inhibée. Le rôle de cette protéine est controversé. Une inhibition de cavéoline 1 semble réduire la croissance tumorale (Felicetti et al., 2009). En effet, la cavéoline semble être sécrétée et cela est associé à des micro-

vésicules permettant la stimulation de la croissance indépendante de l'ancrage, de la migration et de l'invasion. Une corrélation positive entre la quantité de microvésicules dans le milieu de culture, l'expression de MMP9 et celle de la cavéoline 1 a été observée (Felicetti et al., 2009). De façon contradictoire, une autre étude réalisée dans des cellules de mélanomes murins, démontre que l'expression de cavéoline stimule la prolifération tout en inhibant la migration, l'invasion et la colonisation pulmonaire. L'expression de la cavéoline 1 est réduite dans des lignées de mélanomes métastatiques et des tissus métastatiques humains. La cavéoline 1 (CAV1) semble donc agir en tant que gène anti-métastatique (Trimmer et al., 2010). Une troisième étude démontre que dans des cellules de cancer du sein l'inhibition de cavéoline 1 réduit la migration et qu'à l'inverse dans des cellules de mélanomes murins cela augmente la migration. Contrairement aux fibroblastes, CAV1 ne se relocalise pas aux extrémités des cellules métastatiques, ce phénotype invasif nécessite sa phosphorylation sur la tyrosine 14 (Y14) (Urta et al., 2012). Une étude in vivo montre que la surexpression de CAV1 réduit la formation de tumeurs sous-cutanées mais promeut les métastases via l'activation de Rac1 (Lobos-Gonzalez et al., 2013). La perte de PTEN augmente l'expression de CAV1 ce qui entraîne la dissociation de la  $\beta$ -caténine de la protéine membranaire E-cadhérine et promeut donc les métastases (Conde-Perez et al., 2015). La phosphorylation en Y14 est très importante pour le rôle de la cavéoline 1 dans les métastases mais n'est pas nécessaire pour son rôle de « suppresseur de tumeur » (Ortiz et al., 2016). La phosphorylation de la cavéoline déterminerait donc son rôle suppresseur de tumeur ou plutôt métastatique. L'hypoxie augmente l'expression de la cavéoline de façon HIF1 $\alpha$ -dépendante. L'augmentation de la migration induite par l'hypoxie peut être inversée par une inhibition de CAV1. La migration associée à l'hypoxie peut également être évitée par ajout d'un inhibiteur de Src kinase (le PP2) qui prévient la phosphorylation en Y14 de CAV1. En conclusion, son effet serait dépendant du statut mutationnel des cellules de mélanome (Castillo Bennett et al., 2018).

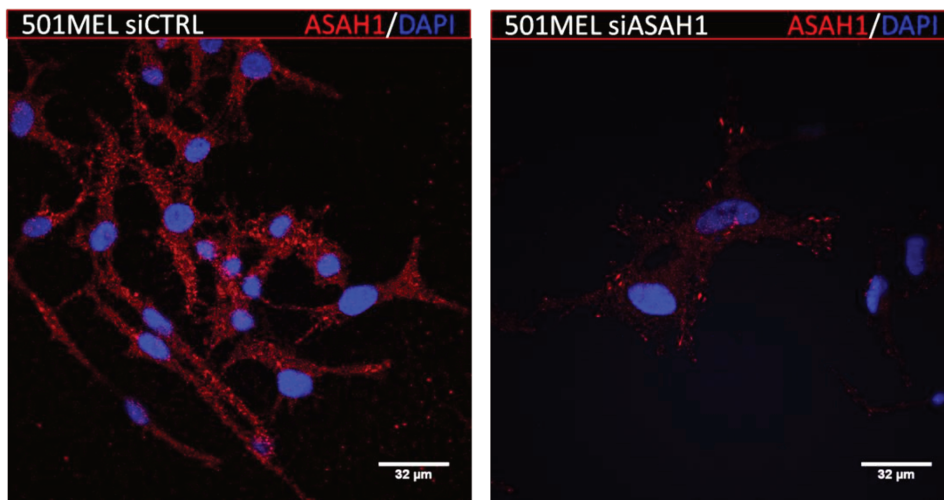
### ***Comment l'inhibition d'ASAHI peut-elle moduler les intégrines $\alpha V\beta 5$ ?***

Une des questions soulevées par ce travail est : comment les intégrines  $\alpha V\beta 5$  sont surexprimées quand ASAH1 est inhibé?

Tout d'abord il est probable que la modulation d'expression d'ASAHI induise un changement de la composition des sphingolipides à la membrane plasmique et plus particulièrement au niveau des radeaux lipidiques voire des cavéoles. Il a déjà été montré que la composition lipidique des plaques d'adhésions focales était importante pour maintenir le contact des cellules épithéliales à la MEC (Marquez et al., 2008). Ceci pourrait moduler le recrutement des différentes intégrines à la membrane plasmique et favoriser celui des intégrines  $\alpha V\beta 5$  permettant la migration observée dans notre étude. De plus, il a été montré un lien entre la distribution des sphingolipides dans la membrane et le cytosquelette (Kraft, 2016). Cependant, comment une protéine lysosomale modulant les sphingolipides dans cet organelle peut jouer sur la composition en sphingolipides à la membrane

plasmique? Les sphingolipides de la membrane plasmique sont acheminés jusqu'au lysosome pour être recyclés par les enzymes lysosomales. Si l'une de ces enzymes n'est plus active (ou moins active) il est possible que cela change le devenir de ces lipides recyclés, qui peuvent redonner des céramides à partir des S1P, et rentrer dans un cycle de synthèse de novo. En conséquence, la composition en sphingolipides de la membrane plasmique pourrait être altérée.

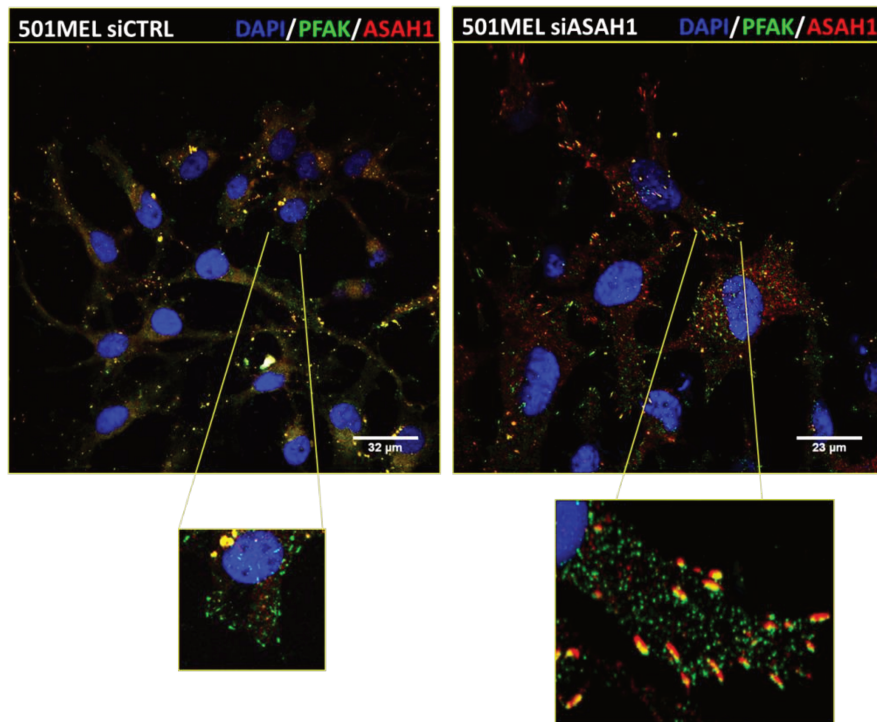
Une autre hypothèse serait qu'ASAH1 se localiserait au niveau des adhésions focales ou au niveau des radeaux lipidiques et régulerait directement cette composition en sphingolipides. En effet, l'anticorps que nous avons majoritairement utilisé dans nos expériences et dans l'article qui vous est présenté ici reconnaît la sous-unité  $\beta$  et la proforme d'ASAH1. Or, nous avons testé par la suite un anticorps de chez Santa Cruz (sc-136275) ne présentant aucune bande non spécifique en western blot (contrairement au précédent) et reconnaissant la proforme et la sous-unité  $\alpha$  d'ASAH1 (Cf. Figure 28).



**Figure 22: Localisation d'ASAHI dans les cellules 501MEL**

*Immunofluorescences représentant un marquage ASAHI/DAPI avec l'anticorps dirigé contre la céramidase acide reconnaissant la sous-unité  $\alpha$  et la proforme (sc-136275) dans des cellules 501MEL transfectées avec un siCTRL ou siASAHI durant 48h.*

En immunofluorescence, alors que le marquage est punctiforme et cytoplasmique sur des cellules transfectées avec un siCTRL, je constate une diminution de signal cytoplasmique et, ce qui semble être une relocalisation de la protéine au niveau des adhésions focales (Cf. Figure 22, expérience reproduite trois fois dans trois lignées différentes).



**Figure 23: Co-localisation d'ASAHI et P-FAK dans les cellules 501MEL**

Immunofluorescences représentant un marquage *PFAK/ASAHI/DAPI* avec l'anticorps dirigé contre la céramidase acide reconnaissant la sous-unité  $\alpha$  et la proforme (*sc-136275*) et l'anticorps P-FAK (*CST#3283*) dans des cellules 501MEL transfectées avec un siCTRL ou siASAHI durant 48h.

J'ai par la suite confirmé qu'ASAHI colocalisait en partie avec la protéine P-FAK au niveau des adhésions focales (Cf. Figure 23). Malheureusement, on ne peut pas savoir s'il s'agit de la proforme ou de la sous-unité  $\alpha$ . Cependant, je n'ai jamais observé ce type de marquage avec l'anticorps précédent. On peut donc supposer qu'il s'agirait de la sous-unité  $\alpha$ . La question qui persiste est : pourquoi? Est-ce un problème de spécificité de l'anticorps, est-ce vraiment un résultat? Dans ce dernier cas cela mériterait d'effectuer une expérience de fractionnement cellulaire précis afin de déterminer si ASAHI peut se retrouver dans la membrane plasmique. Il serait également intéressant de réaliser un co-marquage flotilin-1 (*FLOT1*)/ASAHI ou de la sous-unité  $\beta$  de la choléra toxine + ASAHI qui marquent tous deux les radeaux lipidiques et nous permettraient de valider une partie de notre hypothèse.

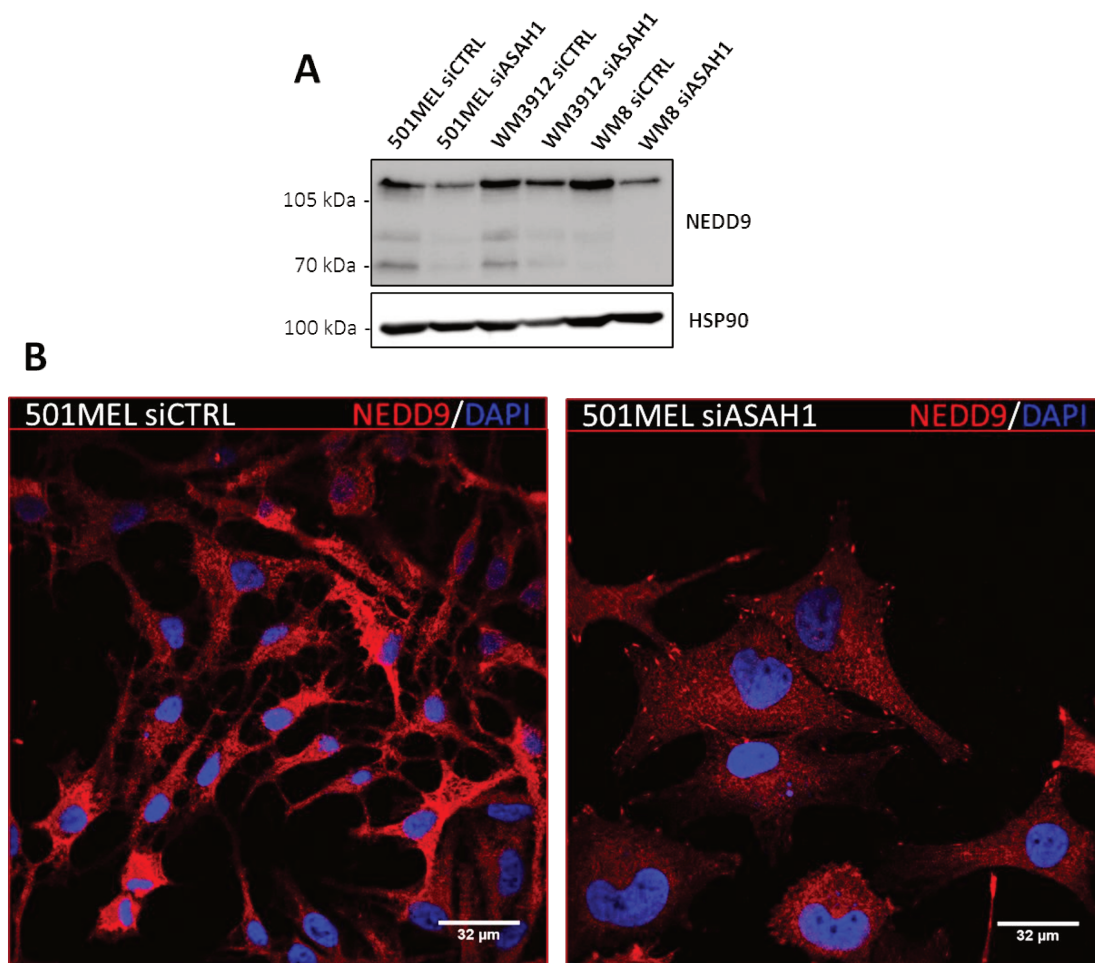
Dans notre analyse transcriptomique le gène *NEDD9* (Neural precursor cell expressed developmentally down-regulated protein 9) est régulé positivement lorsqu'on inhibe ASAHI dans nos cellules. Cette protéine peut se retrouver au niveau des adhésions focales (Kim et al., 2006). Elle est régulée par un complexe *CDH1* (E-cadhérine)/*APC*/*SMAD3* qui peut ubiquitiner *NEDD9* et permettre sa dégradation (Nourry et al., 2004). Or, lorsqu'on inhibe ASAHI, l'expression de la E-cadhérine diminue ce qui pourrait expliquer cette augmentation d'expression de *NEDD9*. De plus, l'activation de *NEDD9* est capable de stimuler la transcription de *SNAIL* et *SLUG* qui sont importants pour la



transition épithélio-mésenchymateuse (Kong et al., 2011). Ces deux gènes sont également surexprimés lorsqu'on inhibe ASAHI. NEDD9 a été associé au statut métastatique des mélanomes (Kim et al., 2006). L'inhibition de cette protéine dans des cellules de cancer du sein renforce le trafic (via les cavéoles) des intégrines liées à leur ligand aux endosomes précoces ce qui empêche donc leur recyclage. NEDD9 peut se lier directement à CAV1 et on le retrouve localisé dans les vésicules CAV1+ qui sont des cavéoles internalisées contenant notamment des intégrines. La coopération NEDD9/CAV1 permet de rompre le complexe intégrine/ligand et de permettre le recyclage des intégrines libres à la membrane afin d'être à nouveau activées. En l'absence de NEDD9, le trafic des intégrines des endosomes précoces aux endosomes tardifs est diminué, ceci augmente le retour des intégrines liées à leur ligand des endosomes à la membrane plasmique sans la libération de leur ligand ce qui réduit la migration et l'adhésion (Kozyulina et al., 2015). Dans nos cellules, nous retrouvons à la fois une augmentation de CAV1, NEDD9 et des intégrines  $\alpha V\beta 5$ . Il est donc probable que l'augmentation de ces intégrines soit favorisée par l'action du complexe CAV1/NEDD9 qui permettrait une augmentation du trafic endo-lysosomal et donc une dynamique de recyclage des intégrines.

Néanmoins, lorsque nous avons observé l'expression protéique de NEDD9 dans nos lignées transfectées avec un siASAH1 nous avons plutôt observé une inhibition de NEDD9 (Cf. Figure 24A). Cependant, on retrouve NEDD9 localisé au niveau des adhésions focales semblant être également co-localisé avec ASAHI/P-FAK si l'on observe les immunofluorescences précédentes (Cf. Figure 24B et 23).

Afin de se retrouver aux adhésions focales, NEDD9 doit être phosphorylé par la caséine kinase 1 $\delta$  (CK1 $\delta$ ) ce qui favorise son interaction avec PLK1 (polo kinase 1). Une fois ce complexe formé, ceci permettra la translocation de NEDD9 à la membrane plasmique au niveau des adhésions focales (Lee et al., 2018). PLK1 semble augmenté lorsqu'on inhibe ASAHI (analyse transcriptomique) et permettrait peut-être d'expliquer la localisation aux adhésions focales de NEDD9. NEDD9 semble être également régulé via la voie de signalisation TCF4/miR-125b. TCF4 serait capable d'activer le miR-125b qui inhibe l'expression de NEDD9 bloquant donc la migration/invasion (Rambow et al., 2016).



**Figure 24: Localisation et expression de NEDD9 dans les cellules de mélanome**

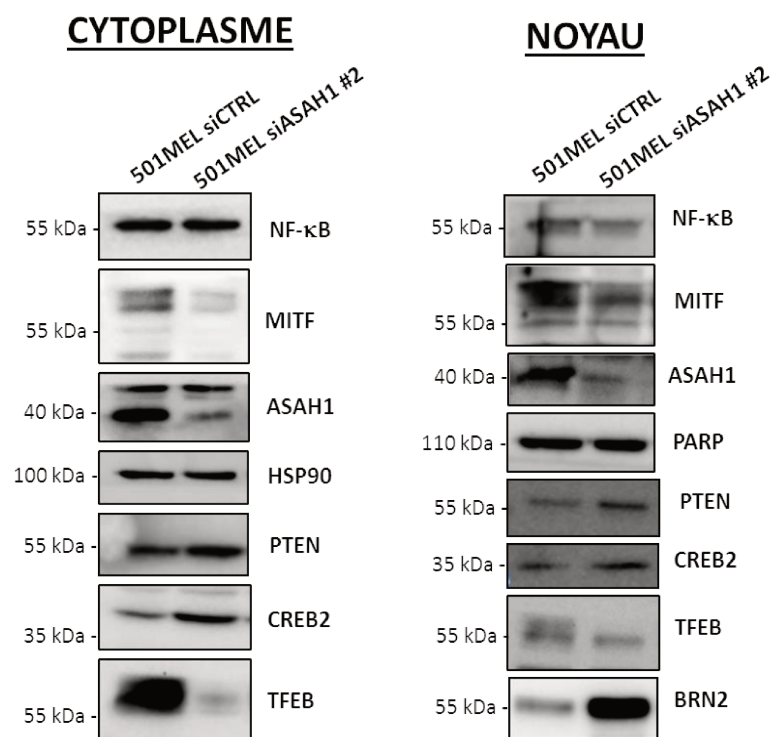
**A.** Western blot des protéines NEDD9 en utilisant HSP90 en contrôle de charge. Les cellules 501MEL, WM3912, WM8 ont été transfectées 48H avec un siRNA dirigé contre ASA1 ou contrôle.

**B.** Immunofluorescences représentant un marquage NEDD9/DAPI avec l'anticorps dirigé contre NEDD9 (Abcam 2G9) dans des cellules 501MEL transfectées avec un siCTRL ou siASA1 durant 48h.

### ASA1, un rôle nucléaire ?

Realini et al. ont démontré à l'aide d'imagerie confocale qu'ASA1 est localisé majoritairement dans le cytosol dans les cellules de mélanomes dans des structures qui semblent être vésiculaires correspondant sûrement à des lysosomes. A l'inverse, ils ont noté une localisation fortement nucléaire dans des mélanocytes humains (Realini et al., 2016). Ce résultat est très intéressant car il a par ailleurs été démontré qu'ASA1 pouvait se localiser au noyau dans des cellules surrénales (H295R) (Lucki et al., 2012b) et agir en tant que co-répresseur de SF-1. Il est très probable qu'ASA1 agisse également en tant que protéine co-régulatrice dans des mélanocytes et que certains effets dus à la régulation d'ASA1 dans ces cellules se retrouvent abolis dans des cellules de mélanomes. Une piste à explorer serait donc de forcer une relocalisation nucléaire d'ASA1 dans des cellules de mélanomes et d'observer les différentes voies de signalisation et processus tumoraux reliés à ASA1. Une question

qui se pose est de savoir si dans des cellules de mélanomes certaines glycosylations d'ASAH1 sont perdues? Ces glycosylations pourraient permettre la localisation de cette protéine dans le noyau car ASAH1 ne contient aucun NLS. La restauration de ces modifications post-traductionnelles relocaliserait peut-être ASAH1 dans le noyau. Afin de vérifier si dans nos lignées de mélanomes nous pouvions également voir une expression nucléaire d'ASAH1, j'ai effectué un fractionnement cellulaire révélant que c'était bien le cas dans nos cellules traitées avec un siCTRL et que l'on perdait cette expression en transfectant les cellules avec un siASAH1 comme attendu (Cf. Figure 25). De plus sur ces WB nous pouvons observer les augmentations d'expression de PTEN, CREB2 (que je discute par la suite) et BRN2 lorsqu'on inhibe ASAH1. A noter également que l'on constate une diminution d'expression de TFEB dans les 501MEL siASAH1.



**Figure 25: Fractionnement cellulaire dans les cellules 501MEL**

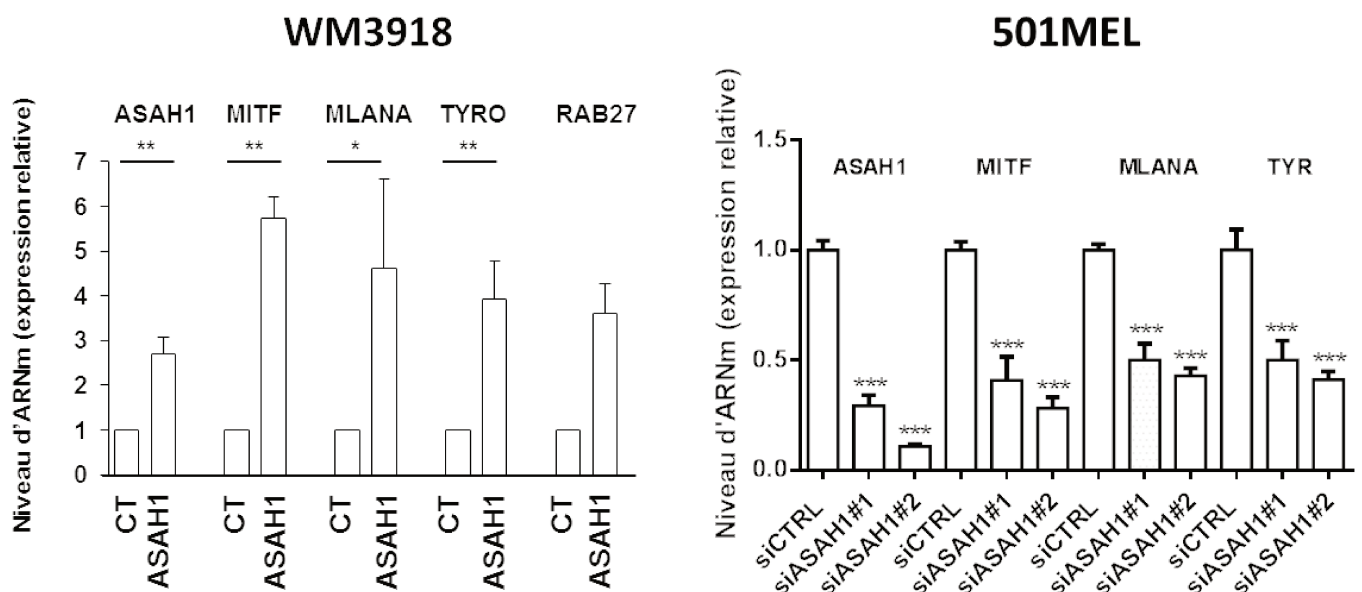
Western blot des protéines NF- $\kappa$ B, MITF, ASAH1, PTEN, CREB2, TFEB, BRN2 en utilisant HSP90 en contrôle de charge cytoplasmique et PARP en contrôle de charge nucléaire. Les cellules 501MEL ont été transfectées 48H avec un siRNA dirigé contre ASAH1 ou contrôle.

De façon intéressante, une étude double-hybride chez la levure a mis en évidence des interactions protéiques entre ASAH1 et TSC22D1, et entre ASAH1 et SETDB1 (Stelzl et al., 2005). TSC22D1 est un facteur de transcription possédant un domaine glissière à leucine considéré comme un répresseur. SETDB1 est une histone-lysine N-méthyltransférase pouvant donc moduler la chromatine et réprimer l'expression de gènes. A noter que ces gènes sont inhibés dans les cellules traitées avec un siASAH1. Il serait donc intéressant d'étudier le rôle de ces protéines dans les effets d'ASAH1 dans des mélanocytes ou cellules de mélanomes. Lucki et al. ont également démontré que dans les cellules

H295R la saposine-D qui est une protéine co-activatrice d'ASAH1 possède une localisation nucléaire. Il est donc possible d'imaginer des complexes ASAH1-SAPD-SETDB1 ou ASAH1-SAPD-TSC22D1 associé à d'autres protéines qui réguleraient l'expression de certains gènes impliqués dans des processus tumoraux. La SK2, dont le rôle est méconnu dans le mélanome, est une sphingosine kinase nucléaire générant des SIP à partir de la sphingosine. La SIP peut se lier aux histones déacétylases HDAC1 et HDAC2 et inhibe leur activité enzymatique. La SK2 peut s'associer aux HDAC1 et HDAC2 pour les inhiber, ce qui permet la transcription des gènes p21 ou de c-fos. Les HDAC sont donc des cibles intracellulaires des SIP, reliant la SIP à la régulation épigénétique (Hait et al., 2009). D'autres enzymes comme la SMase et la sphingomyéline synthase ont également été détectées dans des extraits nucléaires de plusieurs lignées cellulaires (Albi and Magni, 1997; Albi and Magni, 1999; Neitcheva and Peeva, 1995; Tamiya-Koizumi et al., 1989). La nature hydrophobe de ces lipides bioactifs suggère qu'ils seraient produits de façon intra-nucléaire et dynamique, et que ces lipides auraient des rôles uniques dans le noyau indépendamment de leur rôle cytoplasmique. Il est donc tentant de formuler l'hypothèse qu'ASAH1 pourrait moduler ou coopérer avec des enzymes régulant l'expression génique.

### Régulation de MITF par ASAH1 : boucle de rétrocontrôle

Une des données particulièrement intéressante de ce projet est que lorsqu'on inhibe ASAH1, on observe une diminution d'expression de MITF au niveau des ARNm et des protéines (Cf. Figure supplémentaire 7F et figure 26). Cette boucle de rétrocontrôle avait déjà été observée précédemment (Lai et al., 2017). De même lorsqu'on surexprime ASAH1, les expressions de MITF et de ses cibles sont stimulées (Cf. Figure 26).

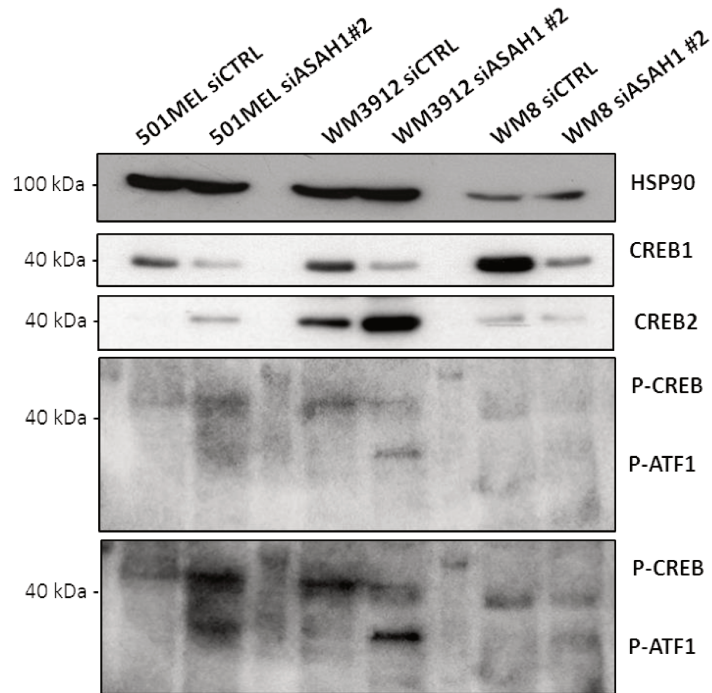


**Figure 26: ASAH1 module l'expression de MITF et de ses cibles**

RT-qPCR réalisées sur des cellules surexprimant ASAH1 (WM3918 à gauche) et sur des cellules dont l'expression d'ASAH1 a été inhibée par siRNA (501MEL à droite). Le niveau relatif d'ARNm dans les cellules a été vérifié pour les gènes ASAH1, MITF, MLANA, TYR, RAB7.

Notre analyse transcriptomique a révélé que ONECUT2 est surexprimé dans les cellules ASAH1<sup>low</sup> en comparaison aux cellules contrôles. L'expression de ONECUT2 est associée à un phénotype invasif dans des cellules de cancers du côlon (Sun et al., 2014b). ONECUT2 est un facteur déterminant dans les processus métastatiques du cancer de la prostate (Rotinen et al., 2018). De façon intéressante, ONECUT2 a été démontré comme un activateur de l'expression de MITF grâce à sa fixation sur son promoteur (Jacquemin et al., 2001) mais il existe d'autres gènes pouvant être régulés par ONECUT2. ONECUT2 peut activer PEG10 mais également réprimer d'autres gènes tels que FOXA1 important dans les cancers de la prostate. Il serait intéressant de vérifier si ONECUT2 pourrait également réprimer MITF dans les cellules de mélanomes.

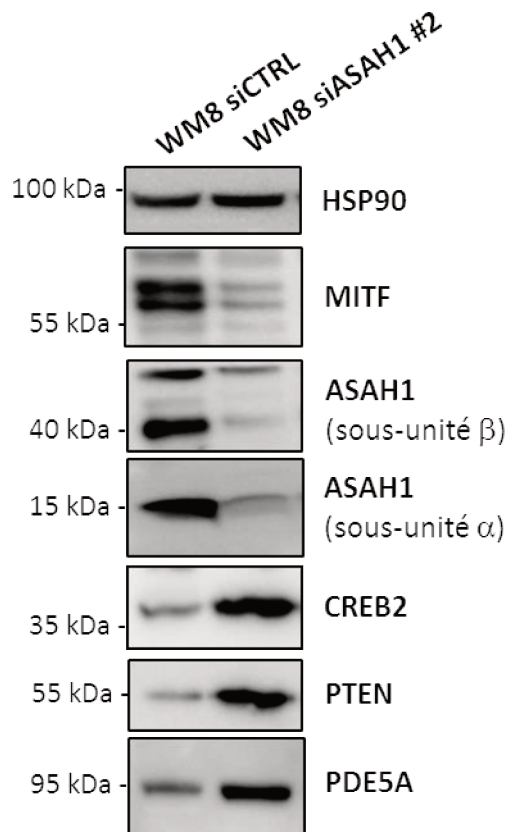
ASAH1 n'est pas un facteur de transcription et ne peut donc pas réguler MITF directement. Comme discuté plus haut, ASAH1 pourrait former des complexes avec des protéines co-régulatrices permettant ce rôle. Il a également été montré que l'inhibition d'ASAH1 augmente l'expression de l'acétyl-histone H3 activant des gènes stéroïdogènes (Lucki et al., 2012b). ASAH1 pourrait donc jouer un rôle dans la régulation épigénétique et réguler ainsi l'expression de MITF. D'autre part, on sait que CREB1 peut réguler l'expression de MITF positivement. Dans nos cellules traitées par siASAH1, on observe une diminution d'expression de CREB1 ainsi qu'une diminution de sa phosphorylation dans 2/3 lignées de mélanomes étudiées (Cf. Figure 27). Nous avons également constaté une augmentation de CREB2 et de la phosphorylation d'ATF1 qui est une protéine partageant 90% d'homologie avec CREB2 et pouvant former des complexes ATF1/CREB2 pour réguler des gènes cibles. CREB2 semble être exprimé de façon ubiquitaire et sa surexpression permet la répression de transcription de gènes contenant des motifs CRE (Karpinski et al., 1992). CREB2 serait également un inhibiteur compétitif de CREB1 (Zhou et al., 2007). Il serait donc intéressant de savoir si dans ce cadre CREB2 serait capable de réprimer MITF lorsqu'on inhibe ASAH1.



**Figure 27: Expression des protéines de la famille CREB/ATF en fonction de la modulation d'expression d'ASAHI**

Western blot des protéines CREB1, CREB2, P-CREB1 et P-ATF1 en utilisant HSP90 en contrôle de charge. Trois lignées différentes de mélanome sont représentées, les 501MEL, WM3912 et WM8 transfectées avec un siRNA dirigé contre ASAHI ou contrôle.

De plus, nous avons observé une augmentation protéique de PTEN et de la phosphodiesterase PDE5A dans les cellules transfectées avec un siASAHI (Cf. Figure 28). Ces protéines sont capables d'inhiber CREB1 (Gu et al., 2011; Puerta et al., 2010; Zhang et al., 2012). Des inhibiteurs de phosphodiesterases sont capables de restaurer l'expression de CREB (Puerta et al., 2010). Dans ce système, il y a donc trois processus distincts qui pourraient expliquer l'inhibition de MITF lorsqu'ASAHI est inhibé ; le premier via l'augmentation de CREB2 capable de réprimer CREB1, le deuxième via une augmentation de PTEN qui inhibe CREB1, enfin l'augmentation de phosphodiesterases prévient la phosphorylation de CREB1 (Krahe et al., 2009).



**Figure 28: Effet de l'inhibition d'ASAHI sur CREB2, PTEN et PDE5A**

Western blot des protéines MITF, ASAHI, CREB2, PTEN et PDE5A en utilisant HSP90 en contrôle de charge. Les cellules WM8 ont été transfectées avec un siRNA dirigé contre ASAHI ou contrôle.

A noter que les cavéoles semblent contrôler la dendricité et la morphologie des mélanocytes ainsi que la production d'AMPC. En effet, une transfection avec un siRNA dirigé contre CAV1 sur des mélanocytes potentialise la production d'AMPC dans ceux-ci (Résultats non publiés, présentation ESPCR 2018 Cédric Delevoye). Dans nos cellules de mélanomes traitées avec un siASAHI, nous avons observé une forte augmentation d'expression de CAV1 ce qui pourrait donc inhiber la production d'AMPC.

Afin de savoir lequel de ces trois systèmes pourrait réguler MITF via ASAHI, il faudrait traiter ou non les cellules transfectées avec nos siRNA (CTRL/ASAHI) avec de la forskoline, un activateur de l'adénylate cyclase et/ou avec l'IBMX, un inhibiteur à spectre large des phosphodiesterases. Il serait également intéressant de transfecter les cellules avec un siBRN2 pour voir si cela peut potentialiser l'effet avec les molécules précédentes qui modulent l'activité de CREB1. Enfin, nous pourrions tester l'effet de l'inhibition de PTEN sur l'expression de MITF lorsqu'on inhibe ou surexprime ASAHI.

Une des perspectives concernant la boucle de régulation MITF-ASAHI serait de réaliser une analyse protéomique de nos cellules transfectées avec un siCTRL ou siASAHI et d'identifier les protéines co-régulatrices qui pourraient se lier à ASAHI et expliquer la régulation de MITF observée lorsqu'on

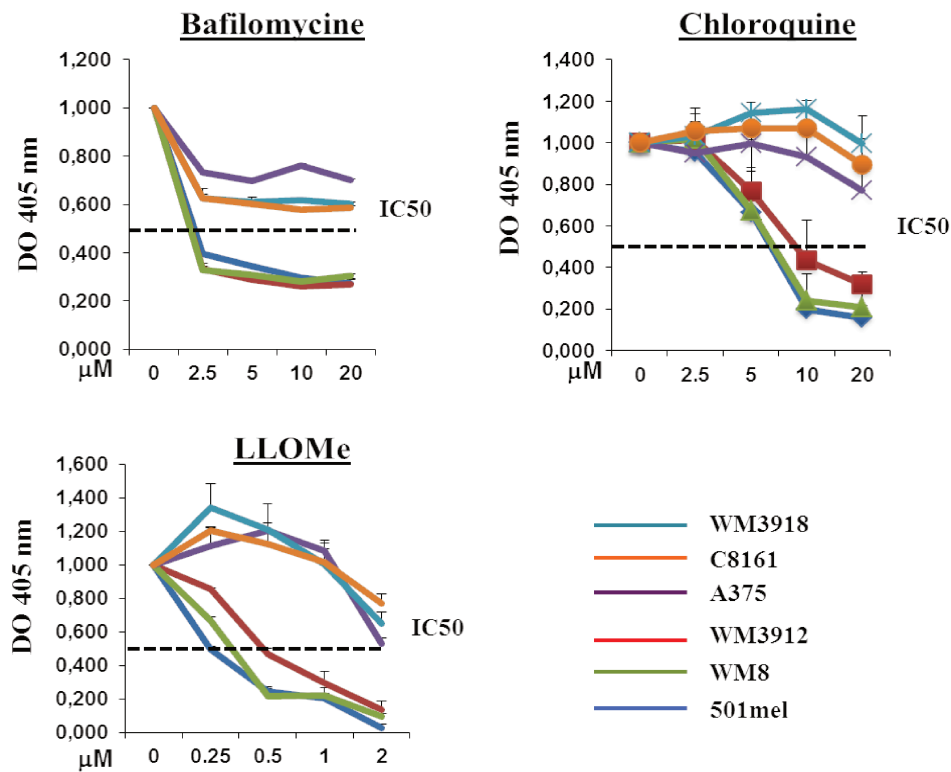
module l'expression d'ASAHI. Il est aussi imaginable qu'un autre processus rentre en jeu dans cette régulation fine, comme une régulation par d'autres acteurs tels que des miRNA ou autre.

### **ASAHI et son rôle au lysosome, implications des lysosomes dans la migration**

ASAHI catabolise les céramides au lysosome. Des mutations d'ASAHI ont été associées à la maladie de Farber qui fait partie des pathologies lysosomales et se caractérise par une accumulation intra-lysosomale de céramides (Chen and Decker, 1982). Cependant, on ne sait pas comment cette accumulation de céramides, perturbe l'activité des lysosomes. La membrane des lysosomes contient des pompes à protons et des canaux ioniques qui permettent de maintenir, à l'intérieur du lysosome, un pH acide nécessaire au fonctionnement des hydrolases acides qu'ils contiennent (Mauvezin et al., 2015). Il est probable que l'accumulation de céramides et la perte de production de sphingosine et de sphingosine-1-phosphate change la composition de la membrane du lysosome et modifie le recrutement de protéines clés pour l'activité des lysosomes.

La première observation que nous avons faite dans nos différentes lignées de mélanomes est qu'elles réagissaient différemment à un traitement par un agent lysosomotrope. Nous avons traité nos cellules avec les composés suivants: de la L-leucy-L-leucine methyl ester (LLOMe) qui est un agent permettant la perméabilisation de la membrane lysosomale, provoquant une perte du gradient de protons et un relargage de marqueurs lysosomaux dont la taille est d'environ 10kDa. Néanmoins, les cathépsines ne sont pas relarguées dans le cytoplasme (Repnik et al., 2017). La bafilomycine (Baf) a également été utilisée et est une drogue inhibant l'autophagie en phase tardive. Elle constitue un inhibiteur des V-ATPases bloquant l'acidification des lysosomes. Enfin, nous avons traité les cellules avec la chloroquine qui s'accumule préférentiellement dans les lysosomes, bloque l'autophagie en augmentant le pH lysosomal. Dans toutes les conditions de traitement avec ces composés, nous avons observé que les lignées à phénotype prolifératif (501MEL, WM3912 et WM8) avaient une IC50 plus faible que les lignées à phénotype invasif (A375, C8161, WM3918). Ces observations indiquent donc que les cellules invasives semblent moins sensibles à une perte de fonction lysosomale ou de l'autophagie (Cf. Figure 29)

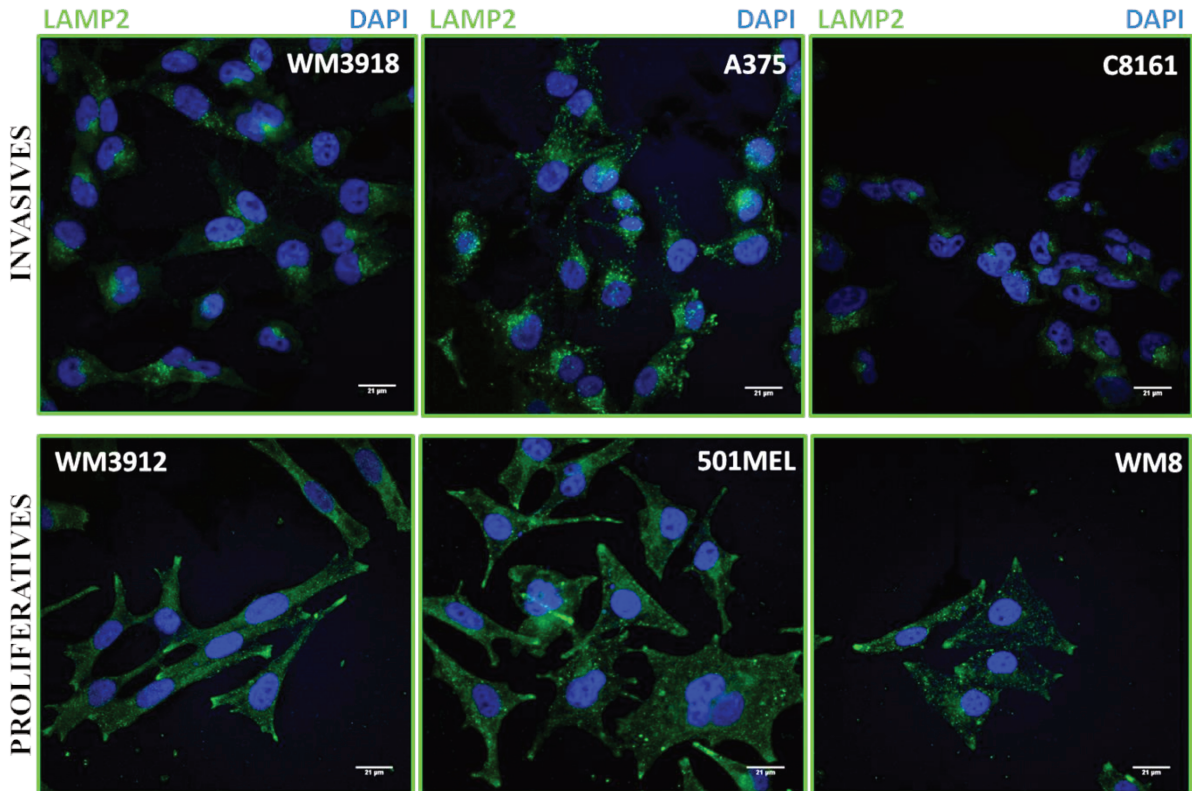




**Figure 29: Viabilité des cellules de mélanome en réponse à un traitement par des agents lysosomotropes**

Absorbance à 405nm reflétant le pourcentage de cellules vivantes après 48h de traitement avec les trois drogues : Bafilomycine, Chloroquine et LLOMe. Mesure faite grâce au kit XTT provenant de promega (G3580) n=3.

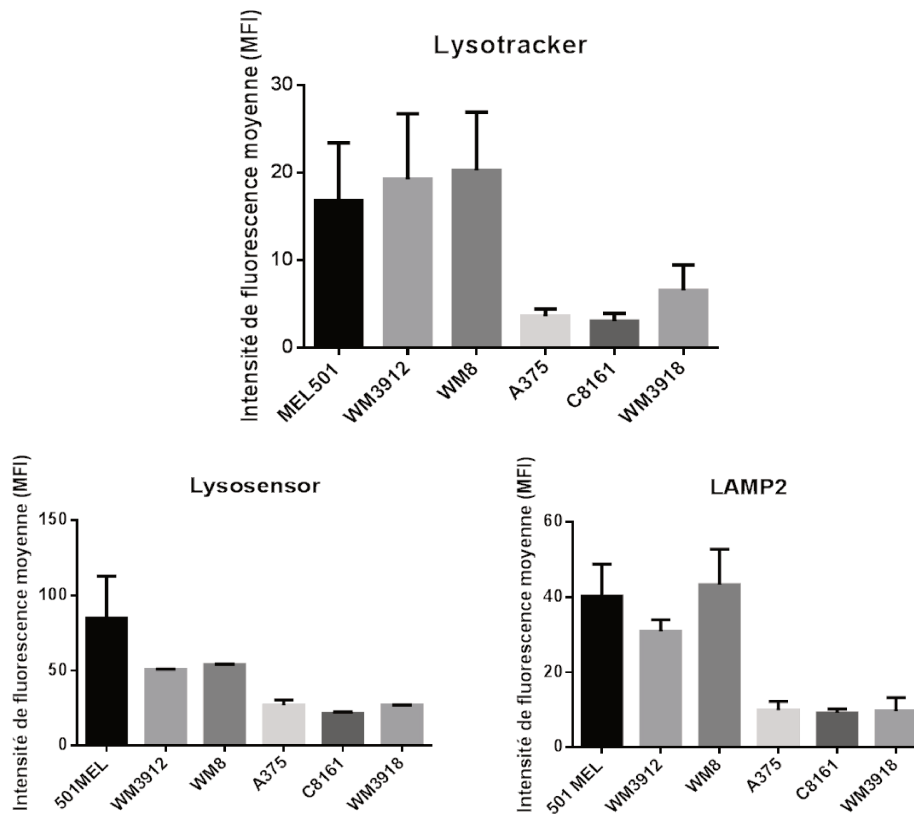
Lorsqu'on examine le contenu lysosomal de ces lignées par immunofluorescence à l'aide d'un marquage LAMP2 (qui est une protéine située au niveau de la membrane des lysosomes), on constate une nette accumulation périnucléaire dans les cellules invasives par rapport aux cellules prolifératives qui ont des lysosomes plus dispersés dans tout le cytoplasme et jusqu'aux extrémités cellulaires (Cf. Figure 30).



**Figure 30: Marquage LAMP2 représentant la localisation des lysosomes dans des cellules de mélanome**

Immunofluorescences représentant un marquage LAMP2/DAPI avec l'anticorps dirigé contre LAMP2 (Santa Cruz H4B4) dans des cellules 501MEL, WM3912, WM8, A375, C8161 et WM3918. La barre d'échelle représente 21µm.

De plus, on constate également que la masse lysosomale semble moins importante dans les cellules invasives comparée à celle observée dans les cellules prolifératives. C'est ce que nous avons confirmé avec une analyse par cytométrie en flux à l'aide de différents marqueurs comme le lysotracker et le lysosensor qui sont des sondes s'accumulant dans les vésicules acides ce qui favorise leur protonation et l'activation du fluorophore lié à la sonde. Le lysotracker présente une intensité de fluorescence indépendante du pH et marque la masse lysosomale permettant sa quantification. Le lysosensor aura une intensité dépendante du pH, plus le lysosome sera acide plus l'intensité moyenne de fluorescence sera élevée. On peut constater que dans les cellules invasives, on retrouve moins de lysosomes et ceux-ci sont moins acides que ceux des cellules prolifératives ce qui pourrait altérer leur fonction (Cf. Figure 31). Il est probable que l'autophagie de ces cellules soit également altérée si le pH lysosomal n'est pas assez acide. Pourtant, ce phénotype n'empêche pas ces cellules de survivre malgré des lysosomes qui semblent dysfonctionnels.



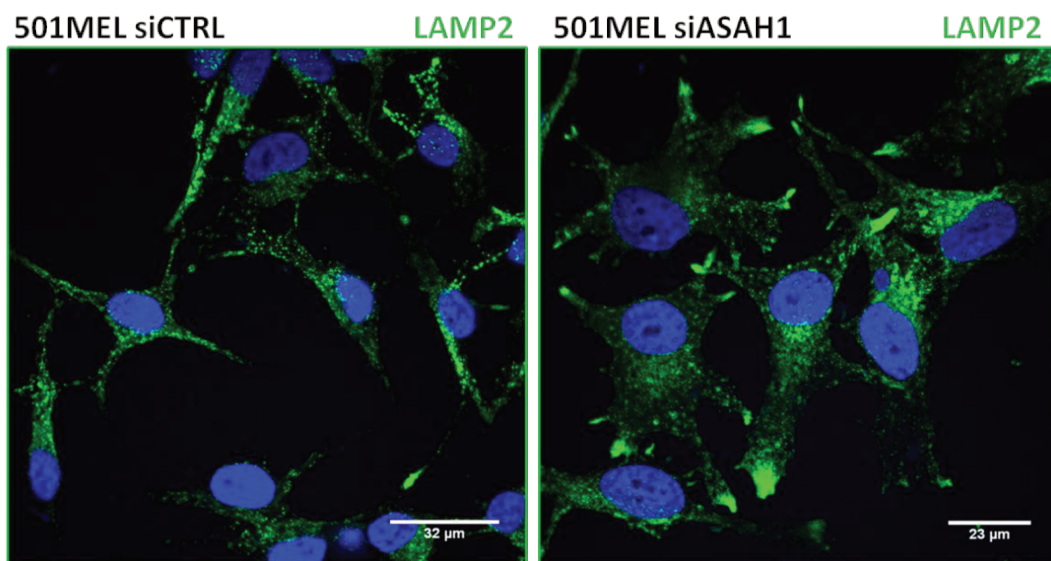
**Figure 31: Analyse du contenu lysosomal dans les cellules de mélanome**

Analyse par cytométrie en flux des cellules 501MEL, WM3912, WM8, A375, C8161 et WM3918 à l'aide de sondes fluorescences Lysotracker et Lysosensor (Respectivement L7528 et L7533). Ainsi qu'un marquage LAMP2 (H4B4) couplé à un anticorps secondaire couplé à un fluorophore alexa fluor 488 (A-11059).

Dans les cellules transfectées avec un siASAHI, on observe deux populations différentes de lysosomes, l'une localisée en périnucléaire et l'autre est relocalisée en périphérie des cellules, au niveau des extrémités dendritiques (Cf. Figure 32, observation dans trois lignées différentes répétée trois fois). La maturation des lysosomes commence dans des endosomes précoces qui changent leur composition en lipides et protéines lorsqu'ils deviennent des endosomes tardifs et lysosomes. Cette maturation s'effectue au niveau périnucléaire.

Cependant, le positionnement des lysosomes est dépendant des nutriments disponibles pour la cellule. Le complexe BORC promeut la dispersion des lysosomes en se couplant à la GTPase Arl8 et aux kinésines KIF1B et KIF5B. L'interaction de BORC avec Ragulator régule négativement cette dispersion qui est indépendante de l'activité mTORC1. La déplétion d'acides aminés cause une accumulation périnucléaire des lysosomes en renforçant cette interaction BORC/Ragulator (Pu et al., 2017). Les lysosomes périphériques participent à la réparation de la membrane plasmique et indiquent la disponibilité en nutriments en activant mTORC1 (mechanistic target of rapamycin complex 1). Les lysosomes périnucléaires sont relativement immobiles et fusionnent avec les autophagosomes pour

générer les auto-lysosomes (Cabukusta and Neefjes, 2018). Bien que ces mécanismes soient grandement méconnus, il semble que le mécanisme de transport en périphérie puisse avoir des rôles différents suivant les protéines impliquées dans ce transport. Par exemple, le complexe FYCO1/Rab7 qui aide les lysosomes à aller en périphérie semble favoriser la prolifération et la formation de protrusions, suggérant que ce complexe aiderait à la fusion des lysosomes avec la membrane plasmique (Raiborg et al., 2015). Le complexe BORC semble essentiel à la fusion autophagosome-lysosome car il permettrait le transport rétrograde des lysosomes lorsqu'il est en complexe avec la protéine SKIP (Jia et al., 2017).



**Figure 32:** Marquage LAMP2 représentant la position des lysosomes en fonction de l'expression d'ASAHI

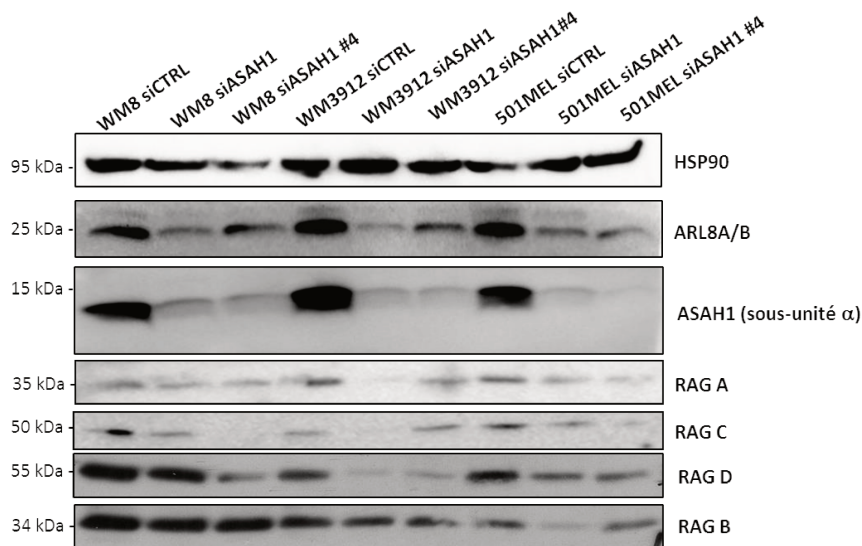
Immunofluorescences représentant un marquage LAMP2/DAPI avec l'anticorps dirigé contre LAMP2 (Santa Cruz H4B4) dans des cellules 501MEL transfectées avec un siCTRL ou siASAHI durant 48h. La barre d'échelle représente 32μm à gauche et 23μm à droite.

La position des lysosomes est également associée à l'activité de mTORC1 et la disponibilité des nutriments. Par exemple, l'activation de mTORC1 dans des conditions riches en nutriments induit la dispersion des lysosomes en périphérie. Lorsque les nutriments ne sont pas disponibles les lysosomes vont subir un transport rétrograde où la fusion autophagosome-lysosome pourra se produire. On peut imaginer que dans les cellules ASAHI<sup>low</sup> on retrouve une population périnucléaire en cours de maturation à cause de conditions pauvres en nutriments et que ce déficit en nutriment pousse la cellule à migrer afin de se retrouver dans un environnement plus propice et riche en nutriments. Ce serait peut-être le rôle de la deuxième population de lysosomes en périphérie qui favorisent la migration des cellules cancéreuses. Afin de mieux comprendre nos observations, il serait très intéressant d'étudier les marqueurs évoqués précédemment, ainsi que les protéines impliquées dans les différentes phases de

l'autophagie (de la plus précoce à la plus tardive) dans le but de définir si les lysosomes sont fonctionnels dans les cellules ASAHI<sup>low</sup>.

Ragulator est un facteur d'échange de nucléotides guanyliques (GEF) pour la petite GTPase RagA et RagB qui font partie de complexes hétérodimériques avec RagC et RagD (Bar-Peled et al., 2012). Ce facteur active RagA/B recrutant mTORC1 à la membrane lysosomale (Sancak et al., 2010). mTORC1 activé et localisé au lysosome promeut la synthèse protéique par la phosphorylation de S6K et 4EBP1 (Burnett et al., 1998) tout en inhibant l'autophagie en phosphorylant ULK1 (Chan et al., 2007). La restriction en acides aminés bloque cette voie de signalisation, entraîne la dissociation de mTORC1 de la membrane lysosomale inhibant la synthèse protéique et activant l'autophagie. Inhiber l'activité de mTORC1 maintient la localisation des lysosomes en périphérie à l'aide d'une diminution d'expression de KIF2A et ARL8B ce qui augmente la fusion autophagosome-lysosome. Il serait intéressant d'étudier les acteurs de la régulation du positionnement des lysosomes dans nos cellules et ce, d'autant plus que l'augmentation de mTORC1 et l'inhibition d'autophagie sont associées à la tumorigenèse. A l'inverse la dispersion des lysosomes est associée aux métastases (Nishimura et al., 2003; Nishimura et al., 2000; Nishimura et al., 2004). Il est probable que la position des lysosomes en périphérie dans les cellules transfectées avec un siASAH1 joue un rôle dans leur migration. Ceci pourrait être une conséquence du relargage de certaines protéines essentielles à la migration, expliquant peut-être également la présence de la sous-unité  $\alpha$  d'ASAH1 au niveau des adhésions focales alors que cette protéine est lysosomale. De plus, il semble que le relargage des cathepsines grâce la sécrétion du contenu lysosomal hors des cellules de mélanomes potentialise la migration (Eding et al., 2015).

Des résultats préliminaires semblent démontrer que lorsqu'on inhibe ASAHI, on diminuerait l'expression des Rag A/B/C/D et d'Arl8A/B (Cf. Figure 33). Ceci pourrait inhiber l'action de Ragulator et empêcher le transport rétrograde des lysosomes situés en périphérie. De plus, Arl8A/B semble nécessaire pour la fusion des autophagosomes/lysosomes chez la drosophile (Boda et al., 2018).

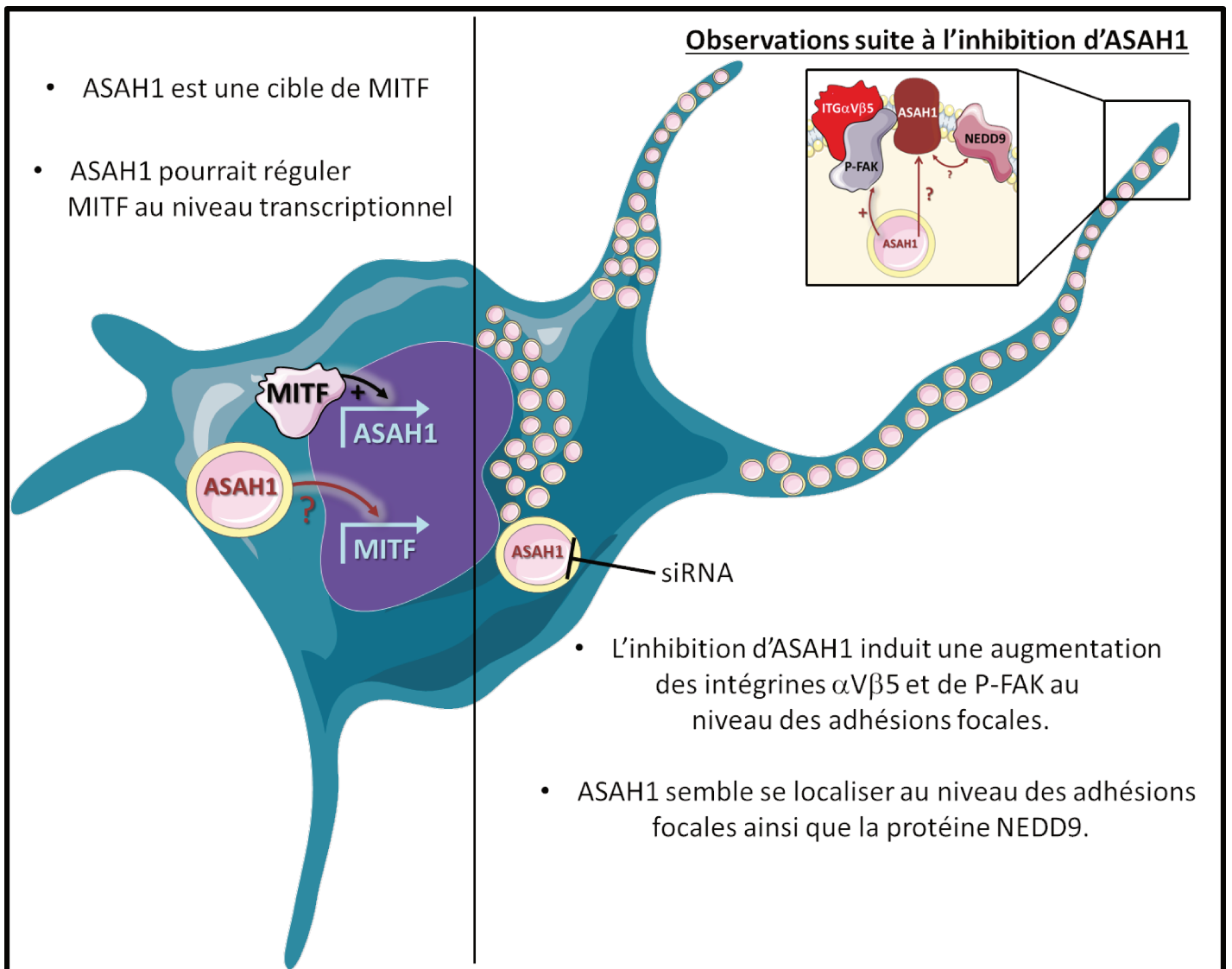


**Figure 33: Expression de marqueurs associés au positionnement des lysosomes dans les cellules de mélanome en fonction de la modulation d'expression d'ASAHI**

Western blot des protéines ARL8A/B, ASAHI, RAGA, RAGB, RAGC, RAGD en utilisant HSP90 en contrôle de charge. Les cellules 501MEL, WM3912, WM8 ont été transfectées 48H avec un siRNA dirigé contre ASAHI, ou contrôle.

Pour finir, une étude récente démontre que des cellules de mélanome sont capables d'augmenter la sécrétion lysosomale à la synapse lytique (avec les lymphocytes T) ce qui a pour conséquence la dégradation de la perforine par les cathépsines et un défaut de pénétration du granzyme B dans les cellules de mélanome (Khazen et al., 2016). De façon intéressante, une étude parue récemment, démontre que la surexpression de MITF est associée à un plus faible recrutement des cellules immunitaires dans les tumeurs en accord avec des résultats précédemment publiés en 2015 (Riesenberg et al., 2015; Wiedemann et al., 2018). ASAHI étant une cible de MITF, on peut se demander si la surexpression d'ASAHI aurait ce même effet. Dans un modèle murin de colite, l'inactivation d'ASAHI dans les cellules myéloïdes empêche le recrutement des neutrophiles dans la muqueuse du côlon à cause d'une inhibition de la production des cytokines et chimiokines. La perte d'ASAHI dans les cellules myéloïdes protège de l'apparition d'un cancer relié à cette maladie. Même si ces résultats sont tissu-spécifique, il semble qu'ASAHI pourrait avoir un rôle dans l'attraction des leucocytes (Espaillat et al., 2018).

A ce titre, une des perspectives de notre travail serait d'étudier l'effet d'ASAHI dans la réponse immunitaire contre les cellules de mélanomes.



**Figure 34:** Schéma résumant les résultats publiés et non publiés de l'article 1

*Le noyau est schématisé en violet. Les vésicules roses représentent les lysosomes qui s'accumulent en périnucléaire et à l'extrémité des dendrites lorsqu'on inhibe ASAH1. Le zoom sur l'extrémité des dendrites représente la membrane plasmique et les potentielles interactions entre certaines protéines suite à l'inhibition d'ASAH1.*

## **Article 2: Targeting the sphingosine-1-phosphate axis exerts potent antitumor activity in BRAF-i resistant melanomas.**

Les sphingolipides jouent un rôle dans de nombreux processus biologiques et contribuent à la progression de multiples cancers. Il a déjà été montré que les inhibiteurs de SK et les antagonistes des S1PRs représentaient des pistes thérapeutiques intéressantes dans plusieurs cancers (Kunkel et al., 2013).

### ***La modulation de l'axe SK1/S1P/S1PR dans le mélanome: nouvelle piste thérapeutique?***

Concernant le mélanome, on sait que les cellules mutées BRAF<sup>V600E</sup> présentent une augmentation intracellulaire de S1P (Albinet et al., 2014; Madhunapantula et al., 2012). Néanmoins, on ne connaît pas l'effet des thérapies ciblées sur l'axe S1P/SK1/S1PR dans les cellules de mélanome. Dans cette étude, nous avons démontré l'importance des S1PR1 et S1PR3 dans la résistance des cellules de mélanome aux thérapies ciblées. En effet, leur expression diminue dans des cellules sensibles à la suite d'un traitement vémurafénib ce qui n'est pas le cas des cellules résistantes. Le traitement des cellules résistantes par des antagonistes spécifiques de S1PR1 et S1PR3 (W146 et CAY10444 respectivement) permet de re-sensibiliser les cellules au vémurafénib. De manière intéressante, le ciblage de S1PR2 (par JTE-013) n'a aucun effet sur la sensibilité des cellules de mélanomes résistantes, démontrant la spécificité des récepteurs S1PR1 et S1PR3 dans le phénomène de résistance (Cf. Figure 1F). Précédemment, il avait déjà été prouvé que l'expression de ces récepteurs augmente dans des cellules de cancer de la prostate résistantes à la chimiothérapie (Akao et al., 2006) et cellules de cancers du sein (Watson et al., 2010). Nous avons vérifié que le niveau des ARNm des S1PRs dans les cellules WM9S et WM9R était en accord avec les niveaux d'expression protéiques observés dans ces mêmes cellules en réponse au vémurafénib (Cf. Figure 1A). Ceci suggère une régulation transcriptionnelle des S1PRs. Il est probable que le régulateur impliqué soit STAT3 (signal transducer and activator of transcription 3) qui régule transcriptionnellement S1PR1 conduisant à une boucle d'amplification et d'activation persistante de STAT3 dans les cellules résistantes (Lee et al., 2010).

Afin de déterminer l'implication de STAT3 dans cette régulation, les cellules de mélanome seront traitées par vémurafénib en combinaison ou non avec le SK1-I et nous vérifierons l'activation de STAT3 par sa phosphorylation sur la tyrosine 705 (qui induit sa dimérisation, translocation nucléaire et sa liaison à l'ADN). De plus, une étude a montré que l'inhibition de l'axe STAT3-PAX3 (par la molécule WP1066) inhibe la croissance des cellules de mélanomes résistantes au vémurafénib (Liu et al., 2013). Ces données sont très intéressantes étant donné que PAX3 est un régulateur positif de MITF. Nous pourrions donc étudier l'effet de cette molécule sur l'expression de S1PR1 et de MITF dans nos cellules de mélanomes.



Le récepteur S1PR1 a été plus étudié que le S1PR3. S1PR1 est régulé au niveau transcriptionnel par STAT3 et réciproquement, S1PR1 peut réguler positivement STAT3 constituant une boucle de rétrocontrôle positive entre ces deux protéines. Cette boucle de rétrocontrôle promeut la progression tumorale et les métastases (Lee et al., 2010). En accord avec ces observations, FTY720 (qui diminue l'expression de la SK1 et de S1PR1) peut inhiber la voie de signalisation NF- $\kappa$ B/IL-6/STAT3 associée au développement des cancers liés aux colites (Liang et al., 2013). L'inhibition de SK1 entraîne également une réduction de la phosphorylation de STAT3 induite par la leptine dans des cancers du sein non-hormonaux dépendant (Alshaker et al., 2015).

La signalisation via S1PR3 entraîne l'expansion des cellules souches cancéreuses ALDH<sup>+</sup> (aldéhyde déshydrogénase). Ceci se produit via l'activation de Notch en réponse à la stimulation par ajout de S1P exogène (Hirata et al., 2014). Les cellules souches cancéreuses qui surexpriment SK1 ont une plus forte croissance tumorale in vivo pouvant être avortée par l'inhibition de S1PR3. Cependant, on ne sait pas si la signalisation S1P-S1PR3 favorise les caractéristiques souches des cellules cancéreuses. La mutation oncogénique sur K-Ras<sup>G12D</sup> a été démontrée comme stimulant l'expression de S1PR3 dans des adénocarcinomes pulmonaires humains (Zhao et al., 2016). De plus, dans le même modèle, l'activation de S1PR3 par TGF $\beta$ -SMAD3 augmente la progression tumorale et les métastases (Zhao et al., 2016).

Le FTY720 est un antagoniste de S1PR1, il induit son internalisation et sa dégradation (Brinkmann et al., 2010). Ceci s'effectue via l'ubiquitination du récepteur par l'ubiquitine ligase WWP2 sur de nombreux résidus lysines entraînant sa dégradation au protéasome (Oo et al., 2011). Cette dégradation peut donc être inhibée par un traitement MG132 (Oo et al., 2007).

Le FTY720 stimule l'apoptose dans des cellules résistantes de myélome multiple (Yasui et al., 2005) et re-sensibilise des cellules de cancer du sein radio-résistantes (Marvaso et al., 2014) et des cellules de cancer de la prostate (Pchejetski et al., 2010). Cette molécule pourrait agir via l'inhibition directe de SK1 (Rosa et al., 2013). Le SK1-I induit quant à lui la dégradation par le protéasome de SK1 et augmente le ratio céramide:S1P et donc l'apoptose (Loveridge et al., 2010). Nos résultats démontrent que l'augmentation du ratio céramide:S1P induite par le SK1-I diminue l'expression des S1PR1 et S1PR3 dans les cellules de mélanome mais le mécanisme reste méconnu. Néanmoins, une inhibition de SK1 par siRNA réduit l'expression de S1PR3 et la signalisation induite par les S1PRs dans des cellules de cancers du sein. De plus, la S1P peut se lier au S1PR3 et activer la SK1 (Long et al., 2010). Ces résultats suggèrent que la SK1, le ratio céramide:S1P et les S1PR fonctionnent comme une boucle d'amplification qui promeut la progression tumorale.

La SPL est l'unique voie de sortie du métabolisme des sphingolipides via l'hydrolyse de la S1P. Cette enzyme est inhibée au niveau protéique dans des tissus cancéreux de côlon et ceci intensifie la

croissance tumorale via le miR-181b-1 activé par STAT3. Cette signalisation se produit à la suite d'une accumulation de S1P et/ou via la signalisation des S1PRs (Degagne et al., 2014). A l'inverse, la ré-expression de la SPL potentialise l'apoptose dépendante de p53 et p38 permettant la réduction de la signalisation S1P dans les cellules cancéreuses de côlon et les xénogreffes (Oskouian et al., 2006). De la même façon que lorsqu'on traite les cellules par SK1-I, la surexpression de SPL permet de diminuer l'expression du S1PR1 (et non S1PR3 contrairement au SK1-I) dans les cellules résistantes. Cette inhibition de S1PR1 re-sensibilise les cellules résistantes à un traitement au vémurafénib (Cf. Figure 3H). Il serait intéressant d'étudier par quelle voie de signalisation passe cette stimulation d'apoptose, et notamment étudier p53 et p38.

Pour conclure, l'activation de la voie de signalisation STAT3 est associée à la progression du mélanome et régule le caractère souche des cellules de mélanome (Lee et al., 2012b; Ohanna et al., 2013). De plus, l'inhibition de STAT3 réduit la prolifération des cellules de mélanomes résistantes au vémurafénib (Liu et al., 2013). Il est donc nécessaire de mieux comprendre les relations entre la SK1, la SPL, les récepteurs S1PR1/3 et STAT3 pour mieux cibler les cellules de mélanomes résistantes au vémurafénib. En perspective, il serait intéressant d'observer par immunohistochimie l'expression de ces enzymes et récepteurs dans des coupes de tumeurs provenant de patients répondeurs ou non-répondeurs au vémurafénib afin de confirmer ces résultats *in vivo*. De plus, il serait intéressant d'étudier la modulation de ces protéines dans la résistance primaire du mélanome aux thérapies ciblées. Des anomalies de la voie PI3K/AKT ou de protéines apoptotiques peuvent en être responsables mais l'implication de la voie SK1/S1P/S1PR est méconnu dans ce phénomène.

### ***L'importance du profil lipidique***

Nos résultats ont mis en évidence un changement de composition en sphingolipides dans le plasma des patients non-répondeurs au traitement par inhibiteur de BRAF par rapport aux patients qui répondent à ce traitement. On note une augmentation de C24-céramide dans les patients qui répondent au vémurafénib (Cf. Figure 2D et S2). Il avait déjà été décrit une augmentation de C18-céramide chez des patients atteints d'un cancer de la tête et du cou traités avec une combinaison de gemcitabine et doxorubicine en comparaison avec des patients non répondeurs (Saddoughi et al., 2011). Ce premier résultat est très intéressant mais nécessiterait une étude approfondie avec une cohorte de patients plus importante et surtout une analyse au cours de la progression de la maladie.

### **Régulation de MITF par les S1PRs**

Plusieurs études ont montré l'implication de MITF dans la résistance du mélanome aux inhibiteurs de BRAF (Haq et al., 2013; Johannessen et al., 2013; Muller et al., 2014). Les sphingolipides sont capables de moduler l'expression de MITF. En effet, une augmentation de céramide régule négativement l'expression de MITF (Bektas et al., 2005). A l'inverse, une autre équipe a montré que la

S1P peut inhiber l'expression de MITF via une signalisation S1PR3-dépendante (Kim et al., 2011). Nous nous sommes donc demandé quels pouvaient être les effets de la modulation des S1PRs sur l'expression de MITF et ses cibles.

Dans cette étude, nous avons observé une diminution de l'expression de MITF au niveau ARNm et protéique dans les cellules résistantes traitées avec le SK1-I (Cf. Figure 5A). Cet inhibiteur augmente le ratio céramide:S1P (Cf. Figure 3B). De plus, un ajout exogène de S1P restaure l'expression de MITF (Cf. Figure 5B). L'inhibition de MITF est accompagnée d'une diminution d'expression de S1PR1 dans les cellules sensibles, et de S1PR1 et S1PR3 dans les cellules résistantes. La restauration de S1PR1 dans les cellules sensibles est suffisante pour restaurer l'expression de MITF (Cf. Figure S4). On peut donc se demander si S1PR1 seul est responsable de la régulation de MITF. De la même façon, la surexpression de SPL inhibe l'expression de MITF au niveau protéique (Cf. Figure 5E). Des résultats non publiés démontrent que cela n'est pas dû à une régulation transcriptionnelle mais que cela est permis grâce à l'activation de ERK qui peut phosphoryler MITF et entraîner sa dégradation par le protéasome. Ceci a été prouvé par ajout de MG132 bloquant le protéasome dans des cellules surexprimant SPL, dans ce cas l'expression de MITF n'est plus diminuée (résultats non publiés).

L'expression de MITF semble donc fortement corrélée à la sensibilité des cellules de mélanome. Il faut rappeler néanmoins qu'une forte ou faible expression de MITF dans les cellules de mélanome peuvent conférer la résistance. L'équipe de Peeper démontre que les cellules MITF<sup>low</sup> tolèrent de plus fortes concentrations d'inhibiteurs de la voie MAPK que les cellules MITF<sup>high</sup> et peuvent donc devenir résistantes (Muller et al., 2014).

En conclusion, nos résultats montrent que l'inhibition de l'expression des S1PR1/3 atténue la résistance au vémurafénib médiée par MITF (Cf. Figure 7). En effet, il a été montré que les patients résistants présentent une augmentation d'expression de MITF dans les tumeurs (Ji et al., 2015). Par conséquent, cibler MITF pourrait re-sensibiliser les cellules résistants aux inhibiteurs de la voie MAPK (Arozarena et al., 2016). Précédemment, il a été montré que le FTY720 peut inhiber l'expression de MITF et de la tyrosinase de façon ERK-indépendante (Lee et al., 2011).

Dans ce travail, nous décrivons pour la première fois que l'axe S1P est un régulateur de la résistance aux inhibiteurs de la voie MAPK médiée par MITF. De plus, on sait que la S1P est un acteur clé du microenvironnement tumoral et promeut l'angiogenèse (Visentin et al., 2006), la différenciation en macrophages de type M2 (Mrad et al., 2016) ainsi que la différenciation de fibroblastes quiescents en fibroblastes associés aux tumeurs (Albinet et al., 2014). De façon intéressante, les fibroblastes et les macrophages peuvent induire la résistance des cellules de mélanomes aux thérapies ciblées en

sécrétant de l'HGF ou du TNF respectivement (Smith et al., 2014; Straussman et al., 2012). Il serait donc intéressant de savoir si le flux de S1P est associé à ce phénomène.

Les cellules de mélanomes peuvent être résistantes à l'apoptose, ceci se traduit par une faible expression de protéines pro-apoptotiques ou une augmentation d'expression de Bcl2 et des protéines pro-survie (Hartman and Czyz, 2013). Le facteur de transcription MITF est impliqué dans la survie des mélanocytes et des cellules de mélanomes car il régule la transcription de deux gènes pro-survie : Bcl2 et Bcl2A1. Nous avons démontré que le ratio céramide/S1P contrôle l'expression de Bcl2 sans modifier significativement celle de Bcl2-A1 alors que ces deux protéines sont régulées par MITF. De plus, il a été montré qu'une forte activité de SK1 est associée à une forte expression de Bcl2 et neutralise la mort cellulaire induite par Fas-ligand et les céramides dans les cellules A375 (Bektas et al., 2005).

Enfin, nous avons montré qu'une inhibition des S1PR coopère avec l'ABT-737 (inhibiteur de Bcl2, BclXL et BclW (Merino et al., 2018)) pour induire l'apoptose dans les cellules résistantes au vémurafénib. Cette combinaison étant plus efficace qu'une combinaison vémurafénib/ABT-737. En effet, la combinaison vémurafénib/ABT-737 augmente l'apoptose dépendante des caspases et réduit la croissance tumorale *in vivo* plus efficacement qu'une monothérapie (Serasinghe et al., 2015). Néanmoins, cette combinaison n'est pas toujours efficace sur des lignées de patients présentant une résistance acquise au vémurafénib (Wroblewski et al., 2013). La combinaison SK1-I et ABT-737 est efficace dans les sensibles et résistantes. Néanmoins, l'ABT-737 est un inhibiteur à spectre large et il serait intéressant de tester l'ABT-199 qui est spécifique de Bcl2 et utilisé en clinique (AMM pour les lymphomes). Concernant l'inhibiteur de SK1, le seul en phase d'essai clinique est le Safingol mais il cible SK1 et SK2, le SK1-I étant le seul inhibiteur spécifique de SK1 pour le moment. Des tests généralisés à d'autres lignées de mélanomes et des tests *in vivo* pourraient être réalisés pour confirmer l'efficacité de l'ABT-199 et/ou ABT-737 et ces molécules pourraient être utilisées en combinaison avec le SK1-I comme alternative aux thérapies ciblées. En conclusion, nos résultats proposent une thérapie alternative fondée sur la combinaison de l'inhibition des S1PR et des inhibiteurs de BRAF pour une meilleure efficacité anti-tumorale sur les mélanomes résistants à la thérapie ciblée.

### **Le système immunitaire et les S1PRs**

La signalisation S1P/S1PR a été associée aux fonctions immunitaires dans des cellules cancéreuses. En effet, l'activation de S1PR1 par STAT3 entraîne une boucle de rétrocontrôle positif stimulant STAT3 (comme mentionné précédemment). Cette boucle de rétrocontrôle est retrouvée dans les cellules cancéreuses mais également les cellules immunitaires dans le micro-environnement tumoral ce qui stimule la progression tumorale (Lee et al., 2010).

Récemment, un criblage de plus de 810 lignées de souris mutées a été effectué afin de déterminer des nouveaux régulateurs du processus de colonisation métastatique. La plus grosse réduction de métastases pulmonaires a été constatée chez des souris mutantes pour le gène SPNS2 (S1P transporteur spinster homologue 2). SPNS2 est un transporteur de S1P permettant la sécrétion du S1P intracellulaire dans le sang et la lymphe. SPNS2 est un transporteur exprimé dans les cellules endothéliales mais pas dans les érythrocytes ou les plaquettes. L'expression de SPNS2 par les cellules endothéliales est requise pour la maintenance du gradient de S1P dans la lymphe qui permet la circulation des lymphocytes. En effet, la concentration de S1P est plus forte dans la lymphe que dans les ganglions lymphatiques, ce gradient guide les lymphocytes jusqu'à la lymphe puis jusqu'à la circulation sanguine (la concentration en S1P étant plus forte dans la circulation sanguine que dans la lymphe) (Fang et al., 2017). La délétion de SPNS2 entraîne une lymphopénie circulante avec une accumulation des lymphocytes T et des lymphocytes NK (natural killer) dans les poumons. De façon intéressante, les souris mutantes pour le gène SPNS2 présentent une forte diminution de S1P dans le sérum et une augmentation de S1P dans les poumons. Ceci permet une élimination efficace des cellules tumorales et une diminution globale des métastases chez la souris (van der Weyden et al., 2017).

Cette observation (même si elle représente un phénotype indépendant des S1PRs), nous permet de formuler l'hypothèse que les S1PRs pourraient jouer un rôle dans la réponse immunitaire contre les cellules de mélanome. En effet, les S1PRs permettent à la S1P de jouer un rôle autocrine mais également paracrine. Il est probable que la modulation de ces récepteurs pourrait moduler la réponse immune. En effet, les S1PRs sont d'ores et déjà ciblés pour traiter la sclérose en plaque. Une analyse phosphoprotéomique de lésions du cerveau chez des patients atteints de sclérose en plaque a révélé l'augmentation de la phosphorylation de S1PR1 à la sérine 351 qui exacerbe l'inflammation médiée par les lymphocytes Th17 (Garris et al., 2013). Cependant, on ne sait pas si la phosphorylation de S1PR1 module la fonction immunitaire dans le cadre du cancer ou de la suppression tumorale. De façon intéressante, la sécrétion de S1P de cellules en mort cellulaire constitue un signal attractif recrutant les macrophages et accentuant la phagocytose des cellules apoptotique et la tolérance immunitaire (Luo et al., 2016).

Chez les patients atteints de sclérose en plaque, le S1PR1 serait responsable de la sortie des lymphocytes depuis les ganglions lymphatiques. Le S1PR4 permettrait la modulation des cellules dendritiques et lymphocytes Th17. Le S1PR5 permettrait le recrutement des lymphocytes NK (natural killer) (Chaudhry et al., 2017). Il serait donc intéressant, en perspective de ce travail, d'étudier l'effet de la modulation des S1PRs en combinaison avec une immunothérapie pour savoir si cela aurait un effet synergique. De façon plus fondamentale, l'étude de la modulation des S1PRs sur le recrutement des leucocytes dans la tumeur permettrait de mieux comprendre ce phénomène.

## **CONCLUSION**

Pour conclure ces deux papiers de thèse et faire un parallèle entre ces deux études, nous pourrions étudier l'expression d'ASAH1 dans les cellules sensibles et résistantes au vémurafénib. Des résultats préliminaires que j'ai obtenus montrent que la modulation d'ASAH1 dans les cellules sensibles ne permet pas d'instaurer une résistance. De même dans les cellules résistantes où la modulation d'ASAH1 ne restaure pas la sensibilité des cellules au vémurafénib (non publié).

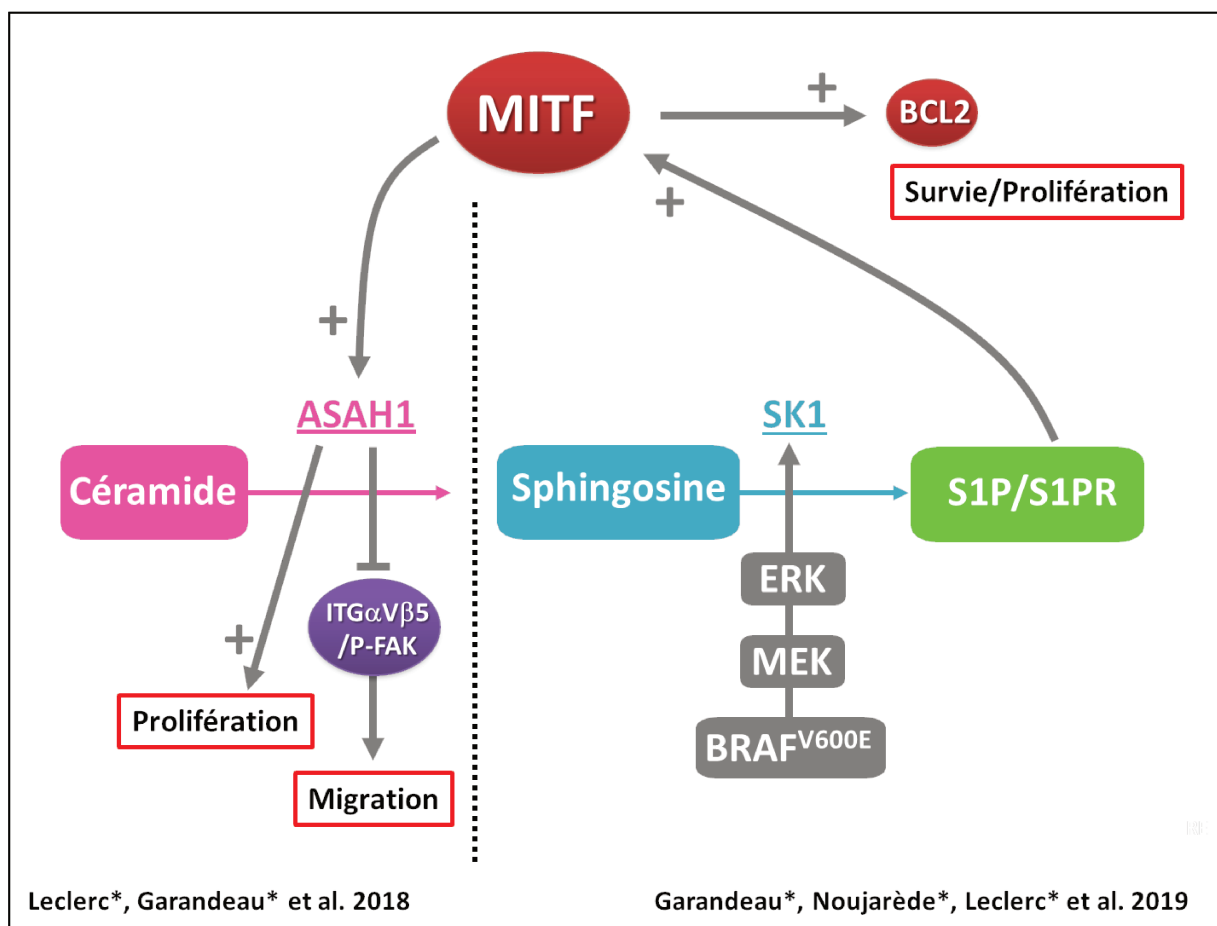
J'ai également observé que l'expression d'ASAH1 est inhibée dans les cellules résistantes au vémurafénib (non publié). Comme il existe une boucle de rétrocontrôle entre MITF et ASAH1, ces résultats sont en accord avec le fait que les cellules MITF<sup>low</sup> ont un phénotype plus agressif et invasif ainsi qu'avec mes observations que l'inhibition d'ASAH1 diminue la prolifération et stimule la motilité des cellules de mélanomes.

Par contre, ASAH1 catalyse les céramides en sphingosine puis la SK1 prend le relais pour phosphoryler les sphingosines en S1P. Il semble donc que ces résultats soient en contradiction avec mon deuxième papier de thèse. En effet, la S1P, qui dérive de la sphingosine produite par ASAH1, a été impliquée dans la résistance. De plus, l'inhibition de l'axe S1P/S1PR re-sensibilise les cellules résistantes (Garandea et al., 2018). Or, une inhibition d'ASAH1 devrait être observée dans les cellules sensibles puisqu'altérant la production de sphingosine (substrat de la SK1). Cependant, on retrouve cette inhibition d'ASAH1 dans des cellules résistantes. Toutefois, nous n'avons pas observé d'augmentation significative du niveau intracellulaire de céramides dans ces cellules (résultats non publiés). Il est donc possible que les céramides ne soient pas accumulés (suite à une inhibition d'ASAH1) grâce à l'intervention d'autres enzymes telles que la SMase, la CK, ou la cérébrosidase qui génèrent d'autres sphingolipides complexes pour éviter l'accumulation des céramides qui seraient toxiques pour la cellule. On pourrait tout à fait imaginer un autre mécanisme de résistance impliquant des enzymes liées à la modification des céramides plutôt que des sphingosines.

De plus, il faut rappeler que mon deuxième papier de thèse se concentre sur le contenu total en sphingolipides générés à la fois à la membrane plasmique et au lysosome. En effet, on retrouve la SK1 dans ces deux compartiments puisqu'elle permet la phosphorylation de la sphingosine générée à la membrane plasmique et au lysosome. On peut supposer que le métabolisme des sphingolipides au niveau des lysosomes ne serait peut-être pas impliqué dans la résistance et que ce serait plutôt les sphingolipides générés à la membrane plasmique qui joueraient un rôle dans ce phénomène. Il serait par contre intéressant d'étudier les effets des céramidases neutres et alcalines (non lysosomales) dans la résistance des cellules de mélanome. A noter que dans notre étude, lorsqu'on inhibe ASAH1 dans des cellules de mélanome, nous n'observons pas de système de compensation avec les autres céramidases (non publié).

Le contenu en sphingolipides pourrait être un facteur clé de la sensibilité des cellules de mélanomes aux traitements. Il est essentiel d'étudier le profil lipidique des cellules de mélanomes au cours de la progression de la maladie afin de mieux comprendre leur rôle. Notamment, il serait intéressant d'observer le contenu en sphingolipides des cellules exprimant de forts ou faibles niveaux d'ASAH1/MITF pour mieux comprendre le phénomène de transition phénotypique et peut-être le lier au contenu en sphingolipides intracellulaires.

Pour finir, ce travail a permis de mieux comprendre l'impact que pouvait avoir le métabolisme des sphingolipides sur les cellules de mélanomes. Notamment, dans les mécanismes de transition phénotypique et de résistance (Cf. Figure 35). On retrouve tout de même des contradictions entre nos études qui pourraient refléter l'utilisation de lignées de mélanome différentes dont le statut mutationnel est variable. La voie des sphingolipides est dynamique et réversible, c'est pourquoi il est essentiel de mieux comprendre leur rôle et leur régulation dans la progression tumorale et la réponse aux traitements afin de les utiliser comme marqueurs ou cibles thérapeutiques.



**Figure 35** : Schéma résumant les principaux résultats des deux études

Dans mon premier papier de thèse, j'ai démontré que le facteur de transcription MITF était capable de réguler la céramidase acide ASAH1. Cette enzyme est capable de stimuler la prolifération et inhibe la migration des cellules de mélanome via l'inhibition des intégrines  $\alpha V \beta 5$ . ASAH1 joue donc un rôle



dans la transition phénotypique des cellules de mélanomes entre un phénotype invasif ou prolifératif. Dans le deuxième papier, nous avons démontré que dans des cellules résistantes au PLX4032, *l'activation de la voie RAF/MEK/ERK permet l'activation de la SK1 et donc l'accumulation de son produit, les SIP. Ceci permet d'activer l'expression de MITF et d'une de ses cibles, BCL2, favorisant la prolifération et la survie des cellules de mélanome résistantes au PLX4032. D'autre part, l'inhibition des récepteurs SIPR1/3 ou l'augmentation du ratio céramide/SIP permet la re-sensibilisation des cellules résistantes (non montré ici).*

## **RÉFÉRENCES**

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

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

Ahn, V.E., Faull, K.F., Whitelegge, J.P., Fluharty, A.L., and Prive, G.G. (2003). Crystal structure of saposin B reveals a dimeric shell for lipid binding. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100, 38-43.

Akao, Y., Banno, Y., Nakagawa, Y., Hasegawa, N., Kim, T.J., Murate, T., Igarashi, Y., and Nozawa, Y. (2006). High expression of sphingosine kinase 1 and S1P receptors in chemotherapy-resistant prostate cancer PC3 cells and their camptothecin-induced up-regulation. *Biochemical and biophysical research communications* 342, 1284-1290.

Alayoubi, A.M., Wang, J.C., Au, B.C., Carpentier, S., Garcia, V., Dworski, S., El-Ghamrasni, S., Kirouac, K.N., Exertier, M.J., Xiong, Z.J., et al. (2013). Systemic ceramide accumulation leads to severe and varied pathological consequences. *EMBO molecular medicine* 5, 827-842.

Albi, E., and Magni, M.P. (1997). Chromatin neutral sphingomyelinase and its role in hepatic regeneration. *Biochemical and biophysical research communications* 236, 29-33.

Albi, E., and Magni, M.V. (1999). Sphingomyelin synthase in rat liver nuclear membrane and chromatin. *FEBS letters* 460, 369-372.

Albinet, V., Bats, M.L., Huwiler, A., Rochaix, P., Chevreau, C., Segui, B., Levade, T., and Andrieu-Abadie, N. (2014). Dual role of sphingosine kinase-1 in promoting the differentiation of dermal fibroblasts and the dissemination of melanoma cells. *Oncogene* 33, 3364-3373.

Alexandrov, L.B., Nik-Zainal, S., Wedge, D.C., Aparicio, S.A., Behjati, S., Biankin, A.V., Bignell, G.R., Bolli, N., Borg, A., Borresen-Dale, A.L., et al. (2013). Signatures of mutational processes in human cancer. *Nature* 500, 415-421.

Alshaker, H., Sauer, L., Monteil, D., Ottaviani, S., Srivats, S., Bohler, T., and Pchejetski, D. (2013). Therapeutic potential of targeting SK1 in human cancers. *Advances in cancer research* 117, 143-200.

Alshaker, H., Wang, Q., Frampton, A.E., Krell, J., Waxman, J., Winkler, M., Stebbing, J., Cooper, C., Yague, E., and Pchejetski, D. (2015). Sphingosine kinase 1 contributes to leptin-induced STAT3 phosphorylation through IL-6/gp130 transactivation in oestrogen receptor-negative breast cancer. *Breast cancer research and treatment* 149, 59-67.

Amos, C.I., Wang, L.E., Lee, J.E., Gershenwald, J.E., Chen, W.V., Fang, S., Kosoy, R., Zhang, M., Qureshi, A.A., Vattathil, S., et al. (2011). Genome-wide association study identifies novel loci predisposing to cutaneous melanoma. *Human molecular genetics* 20, 5012-5023.

Arikawa, K., Takuwa, N., Yamaguchi, H., Sugimoto, N., Kitayama, J., Nagawa, H., Takehara, K., and Takuwa, Y. (2003). Ligand-dependent inhibition of B16 melanoma cell migration and invasion via endogenous S1P2 G protein-coupled receptor. Requirement of inhibition of cellular RAC activity. *The Journal of biological chemistry* 278, 32841-32851.

Arozarena, I., Smith, M.P., and Wellbrock, C. (2016). Targeting MITF in the tolerance-phase. *Oncotarget* 7, 54094-54095.

Arts, N., Cane, S., Hennequart, M., Lamy, J., Bommer, G., Van den Eynde, B., and De Plaen, E. (2015). microRNA-155, induced by interleukin-1 $\beta$ , represses the expression of microphthalmia-associated transcription factor (MITF-M) in melanoma cells. *PloS one* 10, e0122517.

Ascierto, P.A., Flaherty, K., and Goff, S. (2018). Emerging Strategies in Systemic Therapy for the Treatment of Melanoma. American Society of Clinical Oncology educational book American Society of Clinical Oncology Annual Meeting, 751-758.

Azuma, N., O'Brien, J.S., Moser, H.W., and Kishimoto, Y. (1994). Stimulation of acid ceramidase activity by saposin D. *Archives of biochemistry and biophysics* 311, 354-357.

**B**ai, A., Mao, C., Jenkins, R.W., Szulc, Z.M., Bielawska, A., and Hannun, Y.A. (2017). Anticancer actions of lysosomally targeted inhibitor, LCL521, of acid ceramidase. *PloS one* 12, e0177805.

Bar-Peled, L., Schweitzer, L.D., Zoncu, R., and Sabatini, D.M. (2012). Ragulator is a GEF for the rag GTPases that signal amino acid levels to mTORC1. *Cell* 150, 1196-1208.

Baran, Y., Bielawski, J., Gunduz, U., and Ogretmen, B. (2011). Targeting glucosylceramide synthase sensitizes imatinib-resistant chronic myeloid leukemia cells via endogenous ceramide accumulation. *Journal of cancer research and clinical oncology* 137, 1535-1544.

Basrur, V., Yang, F., Kushimoto, T., Higashimoto, Y., Yasumoto, K., Valencia, J., Muller, J., Vieira, W.D., Watabe, H., Shabanowitz, J., et al. (2003). Proteomic analysis of early melanosomes: identification of novel melanosomal proteins. *Journal of proteome research* 2, 69-79.

Batra, S., Reynolds, C.P., and Maurer, B.J. (2004). Fenretinide cytotoxicity for Ewing's sarcoma and primitive neuroectodermal tumor cell lines is decreased by hypoxia and synergistically enhanced by ceramide modulators. *Cancer research* 64, 5415-5424.

Bauer, G.L., Praetorius, C., Bergsteinsdottir, K., Hallsson, J.H., Gisladdottir, B.K., Schepsky, A., Swing, D.A., O'Sullivan, T.N., Arnheiter, H., Bismuth, K., et al. (2009). The role of MITF phosphorylation sites during coat color and eye development in mice analyzed by bacterial artificial chromosome transgene rescue. *Genetics* 183, 581-594.

Becker, K.A., Beckmann, N., Adams, C., Hessler, G., Kramer, M., Gulbins, E., and Carpinteiro, A. (2017). Melanoma cell metastasis via P-selectin-mediated activation of acid sphingomyelinase in platelets. *Clinical & experimental metastasis* 34, 25-35.

- Beckham, T.H., Cheng, J.C., Lu, P., Marrison, S.T., Norris, J.S., and Liu, X. (2013a). Acid ceramidase promotes nuclear export of PTEN through sphingosine 1-phosphate mediated Akt signaling. *PloS one* 8, e76593.
- Beckham, T.H., Cheng, J.C., Lu, P., Shao, Y., Troyer, D., Lance, R., Marrison, S.T., Norris, J.S., and Liu, X. (2013b). Acid ceramidase induces sphingosine kinase 1/S1P receptor 2-mediated activation of oncogenic Akt signaling. *Oncogenesis* 2, e49.
- Beckham, T.H., Lu, P., Jones, E.E., Marrison, T., Lewis, C.S., Cheng, J.C., Ramshesh, V.K., Beeson, G., Beeson, C.C., Drake, R.R., et al. (2013c). LCL124, a cationic analog of ceramide, selectively induces pancreatic cancer cell death by accumulating in mitochondria. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 344, 167-178.
- Bedia, C., Casas, J., Andrieu-Abadie, N., Fabrias, G., and Levade, T. (2011). Acid ceramidase expression modulates the sensitivity of A375 melanoma cells to dacarbazine. *The Journal of biological chemistry* 286, 28200-28209.
- Bektas, M., Jolly, P.S., Muller, C., Eberle, J., Spiegel, S., and Geilen, C.C. (2005). Sphingosine kinase activity counteracts ceramide-mediated cell death in human melanoma cells: role of Bcl-2 expression. *Oncogene* 24, 178-187.
- Bemis, L.T., Chen, R., Amato, C.M., Classen, E.H., Robinson, S.E., Coffey, D.G., Erickson, P.F., Shellman, Y.G., and Robinson, W.A. (2008). MicroRNA-137 targets microphthalmia-associated transcription factor in melanoma cell lines. *Cancer research* 68, 1362-1368.
- Benathan, M., Virador, V., Furumura, M., Kobayashi, N., Panizzon, R.G., and Hearing, V.J. (1999). Co-regulation of melanin precursors and tyrosinase in human pigment cells: roles of cysteine and glutathione. *Cellular and molecular biology* 45, 981-990.
- Bernardo, K., Hurwitz, R., Zenk, T., Desnick, R.J., Ferlinz, K., Schuchman, E.H., and Sandhoff, K. (1995). Purification, characterization, and biosynthesis of human acid ceramidase. *The Journal of biological chemistry* 270, 11098-11102.
- Berndt, N., Patel, R., Yang, H., Balasis, M.E., and Sebt, S.M. (2013). Akt2 and acid ceramidase cooperate to induce cell invasion and resistance to apoptosis. *Cell cycle* 12, 2024-2032.
- Bertolotto, C., Abbe, P., Hemesath, T.J., Bille, K., Fisher, D.E., Ortonne, J.P., and Ballotti, R. (1998a). Microphthalmia gene product as a signal transducer in cAMP-induced differentiation of melanocytes. *The Journal of cell biology* 142, 827-835.
- Bertolotto, C., Bille, K., Ortonne, J.P., and Ballotti, R. (1996). Regulation of tyrosinase gene expression by cAMP in B16 melanoma cells involves two CATGTG motifs surrounding the TATA box: implication of the microphthalmia gene product. *The Journal of cell biology* 134, 747-755.
- Bertolotto, C., Busca, R., Abbe, P., Bille, K., Aberdam, E., Ortonne, J.P., and Ballotti, R. (1998b). Different cis-acting elements are involved in the regulation of TRP1 and TRP2 promoter activities by cyclic AMP: pivotal role of M boxes (GTCATGTGCT) and of microphthalmia. *Molecular and cellular biology* 18, 694-702.

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

Beuret, L., Ohanna, M., Strub, T., Allegra, M., Davidson, I., Bertolotto, C., and Ballotti, R. (2011). BRCA1 is a new MITF target gene. *Pigment cell & melanoma research* 24, 725-727.

Bieberich, E., Kawaguchi, T., and Yu, R.K. (2000). N-acylated serinol is a novel ceramide mimic inducing apoptosis in neuroblastoma cells. *The Journal of biological chemistry* 275, 177-181.

Bizzozero, L., Cazzato, D., Cervia, D., Assi, E., Simbari, F., Pagni, F., De Palma, C., Monno, A., Verdelli, C., Querini, P.R., et al. (2014). Acid sphingomyelinase determines melanoma progression and metastatic behaviour via the microphthalmia-associated transcription factor signalling pathway. *Cell death and differentiation* 21, 507-520.

Blom, T., Li, S., Dichlberger, A., Back, N., Kim, Y.A., Loizides-Mangold, U., Riezman, H., Bittman, R., and Ikonen, E. (2015). LAPTM4B facilitates late endosomal ceramide export to control cell death pathways. *Nature chemical biology* 11, 799-806.

Boda, A., Lorincz, P., Takats, S., Csizmadia, T., Toth, S., Kovacs, A.L., and Juhasz, G. (2018). Drosophila Arl8 is a general positive regulator of lysosomal fusion events. *Biochimica et biophysica acta Molecular cell research* 1866, 533-544.

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

Bonet, C., Luciani, F., Ottavi, J.F., Leclerc, J., Jouenne, F.M., Boncompagni, M., Bille, K., Hofman, V., Bossis, G., Marco de Donatis, G., et al. (2017). Deciphering the Role of Oncogenic MITFE318K in Senescence Delay and Melanoma Progression. *Journal of the National Cancer Institute* 109.

Bouche, V., Espinosa, A.P., Leone, L., Sardiello, M., Ballabio, A., and Botas, J. (2016). Drosophila Mitf regulates the V-ATPase and the lysosomal-autophagic pathway. *Autophagy* 12, 484-498.

Bourbon, N.A., Sandirasegarane, L., and Kester, M. (2002). Ceramide-induced inhibition of Akt is mediated through protein kinase C $\zeta$ : implications for growth arrest. *The Journal of biological chemistry* 277, 3286-3292.

Bourseguin, J., Bonet, C., Renaud, E., Pandiani, C., Boncompagni, M., Giuliano, S., Pawlikowska, P., Karmous-Benailly, H., Ballotti, R., Rosselli, F., et al. (2016). FANCD2 functions as a critical factor downstream of MITF to maintain the proliferation and survival of melanoma cells. *Scientific reports* 6, 36539.

Boyle, G.M., Woods, S.L., Bonazzi, V.F., Stark, M.S., Hacker, E., Aoude, L.G., Dutton-Regester, K., Cook, A.L., Sturm, R.A., and Hayward, N.K. (2011). Melanoma cell invasiveness is regulated by

miR-211 suppression of the BRN2 transcription factor. *Pigment cell & melanoma research* 24, 525-537.

Breslow, A. (1970). Thickness, cross-sectional areas and depth of invasion in the prognosis of cutaneous melanoma. *Annals of surgery* 172, 902-908.

Brinkmann, V., Billich, A., Baumruker, T., Heining, P., Schmouder, R., Francis, G., Aradhye, S., and Burtin, P. (2010). Fingolimod (FTY720): discovery and development of an oral drug to treat multiple sclerosis. *Nature reviews Drug discovery* 9, 883-897.

Bronisz, A., Carey, H.A., Godlewski, J., Sif, S., Ostrowski, M.C., and Sharma, S.M. (2014). The multifunctional protein fused in sarcoma (FUS) is a coactivator of microphthalmia-associated transcription factor (MITF). *The Journal of biological chemistry* 289, 326-334.

Bronisz, A., Sharma, S.M., Hu, R., Godlewski, J., Tzivion, G., Mansky, K.C., and Ostrowski, M.C. (2006). Microphthalmia-associated transcription factor interactions with 14-3-3 modulate differentiation of committed myeloid precursors. *Molecular biology of the cell* 17, 3897-3906.

Bronner, M.E., and LeDouarin, N.M. (2012). Development and evolution of the neural crest: an overview. *Developmental biology* 366, 2-9.

Burek, C., Roth, J., Koch, H.G., Harzer, K., Los, M., and Schulze-Osthoff, K. (2001). The role of ceramide in receptor- and stress-induced apoptosis studied in acidic ceramidase-deficient Farber disease cells. *Oncogene* 20, 6493-6502.

Burnett, P.E., Blackshaw, S., Lai, M.M., Qureshi, I.A., Burnett, A.F., Sabatini, D.M., and Snyder, S.H. (1998). Neurabin is a synaptic protein linking p70 S6 kinase and the neuronal cytoskeleton. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95, 8351-8356.

Busca, R., and Ballotti, R. (2000). Cyclic AMP a key messenger in the regulation of skin pigmentation. *Pigment cell research / sponsored by the European Society for Pigment Cell Research and the International Pigment Cell Society* 13, 60-69.

**C**abukusta, B., and Neefjes, J. (2018). Mechanisms of lysosomal positioning and movement. *Traffic* 19, 761-769.

Canel, M., Serrels, A., Frame, M.C., and Brunton, V.G. (2013). E-cadherin-integrin crosstalk in cancer invasion and metastasis. *Journal of cell science* 126, 393-401.

Cao, J., Wan, L., Hacker, E., Dai, X., Lenna, S., Jimenez-Cervantes, C., Wang, Y., Leslie, N.R., Xu, G.X., Widlund, H.R., et al. (2013). MC1R is a potent regulator of PTEN after UV exposure in melanocytes. *Molecular cell* 51, 409-422.

Caramel, J., Papadogeorgakis, E., Hill, L., Browne, G.J., Richard, G., Wierinckx, A., Saldanha, G., Osborne, J., Hutchinson, P., Tse, G., et al. (2013). A switch in the expression of embryonic EMT-inducers drives the development of malignant melanoma. *Cancer cell* 24, 466-480.

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

Castillo Bennett, J., Silva, P., Martinez, S., Torres, V.A., and Quest, A.F.G. (2018). Hypoxia-Induced Caveolin-1 Expression Promotes Migration and Invasion of Tumor Cells. *Current molecular medicine* 18, 199-206.

Cervia, D., Assi, E., De Palma, C., Giovarelli, M., Bizzozero, L., Pambianco, S., Di Renzo, I., Zecchini, S., Moscheni, C., Vantaggiato, C., et al. (2016). Essential role for acid sphingomyelinase-inhibited autophagy in melanoma response to cisplatin. *Oncotarget* 7, 24995-25009.

Chalfant, C.E., and Spiegel, S. (2005). Sphingosine 1-phosphate and ceramide 1-phosphate: expanding roles in cell signaling. *Journal of cell science* 118, 4605-4612.

Chan, E.Y., Kir, S., and Tooze, S.A. (2007). siRNA screening of the kinome identifies ULK1 as a multidomain modulator of autophagy. *The Journal of biological chemistry* 282, 25464-25474.

Chang, C.Y., Pasolli, H.A., Giannopoulou, E.G., Guasch, G., Gronostajski, R.M., Elemento, O., and Fuchs, E. (2013). NFIB is a governor of epithelial-melanocyte stem cell behaviour in a shared niche. *Nature* 495, 98-102.

Charles, E.M., and Rehm, M. (2014). Key regulators of apoptosis execution as biomarker candidates in melanoma. *Molecular & cellular oncology* 1, e964037.

Chaudhry, B.Z., Cohen, J.A., and Conway, D.S. (2017). Sphingosine 1-Phosphate Receptor Modulators for the Treatment of Multiple Sclerosis. *Neurotherapeutics : the journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics* 14, 859-873.

Cheli, Y., Giuliano, S., Botton, T., Rocchi, S., Hofman, V., Hofman, P., Bahadoran, P., Bertolotto, C., and Ballotti, R. (2011). Mitf is the key molecular switch between mouse or human melanoma initiating cells and their differentiated progeny. *Oncogene* 30, 2307-2318.

Cheli, Y., Giuliano, S., Fenouille, N., Allegra, M., Hofman, V., Hofman, P., Bahadoran, P., Lacour, J.P., Tartare-Deckert, S., Bertolotto, C., et al. (2012). Hypoxia and MITF control metastatic behaviour in mouse and human melanoma cells. *Oncogene* 31, 2461-2470.

Cheli, Y., Ohanna, M., Ballotti, R., and Bertolotto, C. (2010). Fifteen-year quest for microphthalmia-associated transcription factor target genes. *Pigment cell & melanoma research* 23, 27-40.

Chen, W.W., and Decker, G.L. (1982). Abnormalities of lysosomes in human diploid fibroblasts from patients with Farber's disease. *Biochimica et biophysica acta* 718, 185-192.

Cheng, J.C., Bai, A., Beckham, T.H., Marrison, S.T., Yount, C.L., Young, K., Lu, P., Bartlett, A.M., Wu, B.X., Keane, B.J., et al. (2013). Radiation-induced acid ceramidase confers prostate cancer resistance and tumor relapse. *The Journal of clinical investigation* 123, 4344-4358.



Cheng, Q., Wu, J., Zhang, Y., Liu, X., Xu, N., Zuo, F., and Xu, J. (2017). SOX4 promotes melanoma cell migration and invasion through the activation of the NF-kappaB signaling pathway. *International journal of molecular medicine* 40, 447-453.

Chiaverini, C., Beuret, L., Flori, E., Busca, R., Abbe, P., Bille, K., Bahadoran, P., Ortonne, J.P., Bertolotto, C., and Ballotti, R. (2008). Microphthalmia-associated transcription factor regulates RAB27A gene expression and controls melanosome transport. *The Journal of biological chemistry* 283, 12635-12642.

Chipuk, J.E., McStay, G.P., Bharti, A., Kuwana, T., Clarke, C.J., Siskind, L.J., Obeid, L.M., and Green, D.R. (2012). Sphingolipid metabolism cooperates with BAK and BAX to promote the mitochondrial pathway of apoptosis. *Cell* 148, 988-1000.

Cho, S.M., Lee, H.K., Liu, Q., Wang, M.W., and Kwon, H.J. (2018). A guanidine-based synthetic compound suppresses angiogenesis via inhibition of acid ceramidase. *ACS chemical biology*.

Ciaffoni, F., Tatti, M., Salvioli, R., and Vaccaro, A.M. (2003). Interaction of saposin D with membranes: effect of anionic phospholipids and sphingolipids. *The Biochemical journal* 373, 785-792.

Clark, W.H., Jr., From, L., Bernardino, E.A., and Mihm, M.C. (1969). The histogenesis and biologic behavior of primary human malignant melanomas of the skin. *Cancer research* 29, 705-727.

Clement, E., Lazar, I., Muller, C., and Nieto, L. (2017). Obesity and melanoma: could fat be fueling malignancy? *Pigment cell & melanoma research* 30, 294-306.

Conde-Perez, A., Gros, G., Longvert, C., Pedersen, M., Petit, V., Aktary, Z., Viros, A., Gesbert, F., Delmas, V., Rambow, F., et al. (2015). A caveolin-dependent and PI3K/AKT-independent role of PTEN in beta-catenin transcriptional activity. *Nature communications* 6, 8093.

Corcelle-Termeau, E., Vindelov, S.D., Hamalisto, S., Mograbi, B., Keldsbo, A., Brasen, J.H., Favaro, E., Adam, D., Szyniarowski, P., Hofman, P., et al. (2016). Excess sphingomyelin disturbs ATG9A trafficking and autophagosome closure. *Autophagy* 12, 833-849.

Corre, S., Tardif, N., Mouchet, N., Leclair, H.M., Boussemart, L., Gautron, A., Bachelot, L., Perrot, A., Soshilov, A., Rogiers, A., et al. (2018). Sustained activation of the Aryl hydrocarbon Receptor transcription factor promotes resistance to BRAF-inhibitors in melanoma. *Nature communications* 9, 4775.

Crawford, K.W., Bittman, R., Chun, J., Byun, H.S., and Bowen, W.D. (2003). Novel ceramide analogues display selective cytotoxicity in drug-resistant breast tumor cell lines compared to normal breast epithelial cells. *Cellular and molecular biology* 49, 1017-1023.

Cronin, J.C., Wunderlich, J., Loftus, S.K., Prickett, T.D., Wei, X., Ridd, K., Vemula, S., Burrell, A.S., Agrawal, N.S., Lin, J.C., et al. (2009). Frequent mutations in the MITF pathway in melanoma. *Pigment cell & melanoma research* 22, 435-444.

Cui, R., Widlund, H.R., Feige, E., Lin, J.Y., Wilensky, D.L., Igras, V.E., D'Orazio, J., Fung, C.Y., Schanbacher, C.F., Granter, S.R., et al. (2007). Central role of p53 in the suntan response and pathologic hyperpigmentation. *Cell* 128, 853-864.

Curran, K., Raible, D.W., and Lister, J.A. (2009). Foxd3 controls melanophore specification in the zebrafish neural crest by regulation of Mitf. *Developmental biology* 332, 408-417.

**D**a Forno, P.D., Pringle, J.H., Hutchinson, P., Osborn, J., Huang, Q., Potter, L., Hancox, R.A., Fletcher, A., and Saldanha, G.S. (2008). WNT5A expression increases during melanoma progression and correlates with outcome. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 14, 5825-5832.

Dankort, D., Curley, D.P., Cartlidge, R.A., Nelson, B., Karnezis, A.N., Damsky, W.E., Jr., You, M.J., DePinho, R.A., McMahon, M., and Bosenberg, M. (2009). Braf(V600E) cooperates with Pten loss to induce metastatic melanoma. *Nature genetics* 41, 544-552.

Dany, M., Gencer, S., Nganga, R., Thomas, R.J., Oleinik, N., Baron, K.D., Szulc, Z.M., Ruvolo, P., Kornblau, S., Andreeff, M., et al. (2016). Targeting FLT3-ITD signaling mediates ceramide-dependent mitophagy and attenuates drug resistance in AML. *Blood* 128, 1944-1958.

Dany, M., and Ogretmen, B. (2015). Ceramide induced mitophagy and tumor suppression. *Biochimica et biophysica acta* 1853, 2834-2845.

Davies, H., Bignell, G.R., Cox, C., Stephens, P., Edkins, S., Clegg, S., Teague, J., Woffendin, H., Garnett, M.J., Bottomley, W., et al. (2002). Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature* 417, 949-954.

Dbaibo, G.S., Wolff, R.A., Obeid, L.M., and Hannun, Y.A. (1995). Activation of a retinoblastoma-protein-dependent pathway by sphingosine. *The Biochemical journal* 310 ( Pt 2), 453-459.

de la Serna, I.L., Ohkawa, Y., Higashi, C., Dutta, C., Osias, J., Kommajosyula, N., Tachibana, T., and Imbalzano, A.N. (2006). The microphthalmia-associated transcription factor requires SWI/SNF enzymes to activate melanocyte-specific genes. *The Journal of biological chemistry* 281, 20233-20241.

De Luca, A., Fiorillo, M., Peiris-Pages, M., Ozsvari, B., Smith, D.L., Sanchez-Alvarez, R., Martinez-Outschoorn, U.E., Cappello, A.R., Pezzi, V., Lisanti, M.P., et al. (2015). Mitochondrial biogenesis is required for the anchorage-independent survival and propagation of stem-like cancer cells. *Oncotarget* 6, 14777-14795.

De Luca, T., Morre, D.M., Zhao, H., and Morre, D.J. (2005). NAD<sup>+</sup>/NADH and/or CoQ/CoQH<sub>2</sub> ratios from plasma membrane electron transport may determine ceramide and sphingosine-1-phosphate levels accompanying G1 arrest and apoptosis. *BioFactors* 25, 43-60.

Debbache, J., Zaidi, M.R., Davis, S., Guo, T., Bismuth, K., Wang, X., Skuntz, S., Maric, D., Pickel, J., Meltzer, P., et al. (2012). In vivo role of alternative splicing and serine phosphorylation of the microphthalmia-associated transcription factor. *Genetics* 191, 133-144.

- Degagne, E., Pandurangan, A., Bandhuvula, P., Kumar, A., Eltanawy, A., Zhang, M., Yoshinaga, Y., Nefedov, M., de Jong, P.J., Fong, L.G., et al. (2014). Sphingosine-1-phosphate lyase downregulation promotes colon carcinogenesis through STAT3-activated microRNAs. *The Journal of clinical investigation* 124, 5368-5384.
- Denoyelle, C., Abou-Rjaily, G., Bezrookove, V., Verhaegen, M., Johnson, T.M., Fullen, D.R., Pointer, J.N., Gruber, S.B., Su, L.D., Nikiforov, M.A., et al. (2006). Anti-oncogenic role of the endoplasmic reticulum differentially activated by mutations in the MAPK pathway. *Nature cell biology* 8, 1053-1063.
- Desch, A., Strozyk, E.A., Bauer, A.T., Huck, V., Niemeyer, V., Wieland, T., and Schneider, S.W. (2012). Highly invasive melanoma cells activate the vascular endothelium via an MMP-2/integrin  $\alpha$ 5 $\beta$ 1-induced secretion of VEGF-A. *The American journal of pathology* 181, 693-705.
- Dhomen, N., Reis-Filho, J.S., da Rocha Dias, S., Hayward, R., Savage, K., Delmas, V., Larue, L., Pritchard, C., and Marais, R. (2009). Oncogenic Braf induces melanocyte senescence and melanoma in mice. *Cancer cell* 15, 294-303.
- Domingues, B., Lopes, J.M., Soares, P., and Populo, H. (2018). Melanoma treatment in review. *ImmunoTargets and therapy* 7, 35-49.
- Don, A.S., Lim, X.Y., and Couttas, T.A. (2014). Re-configuration of sphingolipid metabolism by oncogenic transformation. *Biomolecules* 4, 315-353.
- Dorsky, R.I., Moon, R.T., and Raible, D.W. (1998). Control of neural crest cell fate by the Wnt signalling pathway. *Nature* 396, 370-373.
- Du, J., Widlund, H.R., Horstmann, M.A., Ramaswamy, S., Ross, K., Huber, W.E., Nishimura, E.K., Golub, T.R., and Fisher, D.E. (2004). Critical role of CDK2 for melanoma growth linked to its melanocyte-specific transcriptional regulation by MITF. *Cancer cell* 6, 565-576.
- Du, W., Takuwa, N., Yoshioka, K., Okamoto, Y., Gonda, K., Sugihara, K., Fukamizu, A., Asano, M., and Takuwa, Y. (2010). S1P(2), the G protein-coupled receptor for sphingosine-1-phosphate, negatively regulates tumor angiogenesis and tumor growth in vivo in mice. *Cancer research* 70, 772-781.
- Dulaney, J.T., Milunsky, A., Sidbury, J.B., Hobolth, N., and Moser, H.W. (1976). Diagnosis of lipogranulomatosis (Farber disease) by use of cultured fibroblasts. *The Journal of pediatrics* 89, 59-61.
- Duverger, E., Pellerin-Mendes, C., Mayer, R., Roche, A.C., and Monsigny, M. (1995). Nuclear import of glycoconjugates is distinct from the classical NLS pathway. *Journal of cell science* 108 ( Pt 4), 1325-1332.
- Dworski, S., Berger, A., Furlonger, C., Moreau, J.M., Yoshimitsu, M., Trentadue, J., Au, B.C., Paige, C.J., and Medin, J.A. (2015). Markedly perturbed hematopoiesis in acid ceramidase deficient mice. *Haematologica* 100, e162-165.

Dworski, S., Lu, P., Khan, A., Maranda, B., Mitchell, J.J., Parini, R., Di Rocco, M., Hugle, B., Yoshimitsu, M., Magnusson, B., et al. (2017). Acid Ceramidase Deficiency is characterized by a unique plasma cytokine and ceramide profile that is altered by therapy. *Biochimica et biophysica acta Molecular basis of disease* 1863, 386-394.

**E**asty, D.J., Gray, S.G., O'Byrne, K.J., O'Donnell, D., and Bennett, D.C. (2011). Receptor tyrosine kinases and their activation in melanoma. *Pigment cell & melanoma research* 24, 446-461.

Eding, C.B., Domert, J., Waster, P., Jerhammar, F., Rosdahl, I., and Ollinger, K. (2015). Melanoma growth and progression after ultraviolet a irradiation: impact of lysosomal exocytosis and cathepsin proteases. *Acta dermato-venereologica* 95, 792-797.

Eliyahu, E., Park, J.H., Shtraizent, N., He, X., and Schuchman, E.H. (2007). Acid ceramidase is a novel factor required for early embryo survival. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 21, 1403-1409.

Eliyahu, E., Shtraizent, N., He, X., Chen, D., Shalgi, R., and Schuchman, E.H. (2011). Identification of cystatin SA as a novel inhibitor of acid ceramidase. *The Journal of biological chemistry* 286, 35624-35633.

Eliyahu, E., Shtraizent, N., Martinuzzi, K., Barritt, J., He, X., Wei, H., Chaubal, S., Copperman, A.B., and Schuchman, E.H. (2010). Acid ceramidase improves the quality of oocytes and embryos and the outcome of in vitro fertilization. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 24, 1229-1238.

Eliyahu, E., Shtraizent, N., Shalgi, R., and Schuchman, E.H. (2012). Construction of conditional acid ceramidase knockout mice and in vivo effects on oocyte development and fertility. *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology* 30, 735-748.

Elojeimy, S., Holman, D.H., Liu, X., El-Zawahry, A., Villani, M., Cheng, J.C., Mahdy, A., Zeidan, Y., Bielwaska, A., Hannun, Y.A., et al. (2006). New insights on the use of desipramine as an inhibitor for acid ceramidase. *FEBS letters* 580, 4751-4756.

Elojeimy, S., Liu, X., McKillop, J.C., El-Zawahry, A.M., Holman, D.H., Cheng, J.Y., Meacham, W.D., Mahdy, A.E., Saad, A.F., Turner, L.S., et al. (2007). Role of acid ceramidase in resistance to FasL: therapeutic approaches based on acid ceramidase inhibitors and FasL gene therapy. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 15, 1259-1263.

Engelen, E., Akinci, U., Bryne, J.C., Hou, J., Gontan, C., Moen, M., Szumska, D., Kockx, C., van Ijcken, W., Dekkers, D.H., et al. (2011). Sox2 cooperates with Chd7 to regulate genes that are mutated in human syndromes. *Nature genetics* 43, 607-611.

Ennen, M., Keime, C., Kobi, D., Mengus, G., Lipsker, D., Thibault-Carpentier, C., and Davidson, I. (2015). Single-cell gene expression signatures reveal melanoma cell heterogeneity. *Oncogene* 34, 3251-3263.

Espaillet, M.P., Snider, A.J., Qiu, Z., Channer, B., Coant, N., Schuchman, E.H., Kew, R.R., Sheridan, B.S., Hannun, Y.A., and Obeid, L.M. (2018). Loss of acid ceramidase in myeloid cells suppresses intestinal neutrophil recruitment. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 32, 2339-2353.

**F**alletta, P., Sanchez-Del-Campo, L., Chauhan, J., Effern, M., Kenyon, A., Kershaw, C.J., Siddaway, R., Lisle, R., Freter, R., Daniels, M.J., et al. (2017). Translation reprogramming is an evolutionarily conserved driver of phenotypic plasticity and therapeutic resistance in melanoma. *Genes & development* 31, 18-33.

Fane, M.E., Chhabra, Y., Hollingsworth, D.E.J., Simmons, J.L., Spoerri, L., Oh, T.G., Chauhan, J., Chin, T., Harris, L., Harvey, T.J., et al. (2017). NFIB Mediates BRN2 Driven Melanoma Cell Migration and Invasion Through Regulation of EZH2 and MITF. *EBioMedicine* 16, 63-75.

Fang, V., Chaluvadi, V.S., Ramos-Perez, W.D., Mendoza, A., Baeyens, A., Rivera, R., Chun, J., Cammer, M., and Schwab, S.R. (2017). Gradients of the signaling lipid SIP in lymph nodes position natural killer cells and regulate their interferon-gamma response. *Nature immunology* 18, 15-25.

Farber, S. (1952). A lipid metabolic disorder: disseminated lipogranulomatosis; a syndrome with similarity to, and important difference from, Niemann-Pick and Hand-Schuller-Christian disease. *AMA American journal of diseases of children* 84, 499-500.

Felicetti, F., Parolini, I., Bottero, L., Fecchi, K., Errico, M.C., Raggi, C., Biffoni, M., Spadaro, F., Lisanti, M.P., Sargiacomo, M., et al. (2009). Caveolin-1 tumor-promoting role in human melanoma. *International journal of cancer* 125, 1514-1522.

Ferlinz, K., Kopal, G., Bernardo, K., Linke, T., Bar, J., Breiden, B., Neumann, U., Lang, F., Schuchman, E.H., and Sandhoff, K. (2001). Human acid ceramidase: processing, glycosylation, and lysosomal targeting. *The Journal of biological chemistry* 276, 35352-35360.

Fernando, T.R., Contreras, J.R., Zampini, M., Rodriguez-Malave, N.I., Alberti, M.O., Anguiano, J., Tran, T.M., Palanichamy, J.K., Gajeton, J., Ung, N.M., et al. (2017). The lncRNA CASC15 regulates SOX4 expression in RUNX1-rearranged acute leukemia. *Molecular cancer* 16, 126.

Ferre-D'Amare, A.R., Pognonec, P., Roeder, R.G., and Burley, S.K. (1994). Structure and function of the b/HLH/Z domain of USF. *The EMBO journal* 13, 180-189.

Fisher, K.W., Das, B., Kortum, R.L., Chaika, O.V., and Lewis, R.E. (2011). Kinase suppressor of ras 1 (KSR1) regulates PGC1alpha and estrogen-related receptor alpha to promote oncogenic Ras-dependent anchorage-independent growth. *Molecular and cellular biology* 31, 2453-2461.

Fitzpatrick, T.B. (1988). The validity and practicality of sun-reactive skin types I through VI. *Archives of dermatology* 124, 869-871.

Fleischman, R.A., Saltman, D.L., Stastny, V., and Zneimer, S. (1991). Deletion of the c-kit protooncogene in the human developmental defect piebald trait. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88, 10885-10889.

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

Funato, K., and Riezman, H. (2001). Vesicular and nonvesicular transport of ceramide from ER to the Golgi apparatus in yeast. *The Journal of cell biology* 155, 949-959.

Fuse, N., Yasumoto, K., Takeda, K., Amae, S., Yoshizawa, M., Uono, T., Takahashi, K., Tamai, M., Tomita, Y., Tachibana, M., et al. (1999). Molecular cloning of cDNA encoding a novel microphthalmia-associated transcription factor isoform with a distinct amino-terminus. *Journal of biochemistry* 126, 1043-1051.

**G**amble, J.R., Xia, P., Hahn, C.N., Drew, J.J., Drogemuller, C.J., Brown, D., and Vadas, M.A. (2006). Phenoxodiol, an experimental anticancer drug, shows potent antiangiogenic properties in addition to its antitumour effects. *International journal of cancer* 118, 2412-2420.

Gan, J.J., Garcia, V., Tian, J., Tagliati, M., Parisi, J.E., Chung, J.M., Lewis, R., Baloh, R., Levade, T., and Pierson, T.M. (2015). Acid ceramidase deficiency associated with spinal muscular atrophy with progressive myoclonic epilepsy. *Neuromuscular disorders : NMD* 25, 959-963.

Gao, M., Chang, Y., Wang, X., Ban, C., and Zhang, F. (2017). Reduction of COX-2 through modulating miR-124/SPHK1 axis contributes to the antimetastatic effect of alpinumisoflavone in melanoma. *American journal of translational research* 9, 986-998.

Garandeau, D., Noujarede, J., Leclerc, J., Imbert, C., Garcia, V., Bats, M.L., Rambow, F., Gilhodes, J., Filleron, T., Meyer, N., et al. (2018). Targeting the sphingosine 1-phosphate axis exerts potent antitumor activity in BRAFi-resistant melanomas. *Molecular cancer therapeutics*.

Garandeau, D., Noujarede, J., Leclerc, J., Imbert, C., Garcia, V., Bats, M.L., Rambow, F., Gilhodes, J., Filleron, T., Meyer, N., et al. (2019). Targeting the Sphingosine 1-Phosphate Axis Exerts Potent Antitumor Activity in BRAFi-Resistant Melanomas. *Molecular cancer therapeutics* 18, 289-300.

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

Garris, C.S., Wu, L., Acharya, S., Arac, A., Blaho, V.A., Huang, Y., Moon, B.S., Axtell, R.C., Ho, P.P., Steinberg, G.K., et al. (2013). Defective sphingosine 1-phosphate receptor 1 (S1P1) phosphorylation exacerbates TH17-mediated autoimmune neuroinflammation. *Nature immunology* 14, 1166-1172.

Gatt, S. (1966). Enzymatic hydrolysis of sphingolipids. I. Hydrolysis and synthesis of ceramides by an enzyme from rat brain. *The Journal of biological chemistry* 241, 3724-3730.

Gebai, A., Gorelik, A., Li, Z., Illes, K., and Nagar, B. (2018). Structural basis for the activation of acid ceramidase. *Nature communications* 9, 1621.

Giuliano, S., Cheli, Y., Ohanna, M., Bonet, C., Beuret, L., Bille, K., Loubat, A., Hofman, V., Hofman, P., Ponzio, G., et al. (2010). Microphthalmia-associated transcription factor controls the DNA damage response and a lineage-specific senescence program in melanomas. *Cancer research* 70, 3813-3822.

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

Goetz, J.J., Martin, G.M., Chowdhury, R., and Trimarchi, J.M. (2014). Onecut1 and Onecut2 play critical roles in the development of the mouse retina. *PLoS one* 9, e110194.

Gomez-Munoz, A., Hamza, E.H., and Brindley, D.N. (1992). Effects of sphingosine, albumin and unsaturated fatty acids on the activation and translocation of phosphatidate phosphohydrolases in rat hepatocytes. *Biochimica et biophysica acta* 1127, 49-56.

Goodall, J., Carreira, S., Denat, L., Kobi, D., Davidson, I., Nuciforo, P., Sturm, R.A., Larue, L., and Goding, C.R. (2008). Brn-2 represses microphthalmia-associated transcription factor expression and marks a distinct subpopulation of microphthalmia-associated transcription factor-negative melanoma cells. *Cancer research* 68, 7788-7794.

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

Goodall, J., Wellbrock, C., Dexter, T.J., Roberts, K., Marais, R., and Goding, C.R. (2004b). The Brn-2 transcription factor links activated BRAF to melanoma proliferation. *Molecular and cellular biology* 24, 2923-2931.

Grammatikos, G., Teichgraber, V., Carpinteiro, A., Trarbach, T., Weller, M., Hengge, U.R., and Gulbins, E. (2007). Overexpression of acid sphingomyelinase sensitizes glioma cells to chemotherapy. *Antioxidants & redox signaling* 9, 1449-1456.

Grill, C., Bergsteinsdottir, K., Ogmundsdottir, M.H., Pogenberg, V., Schepsky, A., Wilmanns, M., Pingault, V., and Steingrimsdottir, E. (2013). MITF mutations associated with pigment deficiency syndromes and melanoma have different effects on protein function. *Human molecular genetics* 22, 4357-4367.

Grob, J.J., Long, G.V., Schadendorf, D., and Flaherty, K. (2015). Disease kinetics for decision-making in advanced melanoma: a call for scenario-driven strategy trials. *The Lancet Oncology* 16, e522-526.

Gu, T., Zhang, Z., Wang, J., Guo, J., Shen, W.H., and Yin, Y. (2011). CREB is a novel nuclear target of PTEN phosphatase. *Cancer research* 71, 2821-2825.

Gubin, M.M., Zhang, X., Schuster, H., Caron, E., Ward, J.P., Noguchi, T., Ivanova, Y., Hundal, J., Arthur, C.D., Krebber, W.J., et al. (2014). Checkpoint blockade cancer immunotherapy targets tumour-specific mutant antigens. *Nature* 515, 577-581.

**H**aflidadottir, B.S., Bergsteinsdottir, K., Praetorius, C., and Steingrimsson, E. (2010). miR-148 regulates Mitf in melanoma cells. *PloS one* 5, e11574.

Hait, N.C., Allegood, J., Maceyka, M., Strub, G.M., Harikumar, K.B., Singh, S.K., Luo, C., Marmorstein, R., Kordula, T., Milstien, S., et al. (2009). Regulation of histone acetylation in the nucleus by sphingosine-1-phosphate. *Science* 325, 1254-1257.

Hannun, Y.A., Loomis, C.R., Merrill, A.H., Jr., and Bell, R.M. (1986). Sphingosine inhibition of protein kinase C activity and of phorbol dibutyrate binding in vitro and in human platelets. *The Journal of biological chemistry* 261, 12604-12609.

Hannun, Y.A., and Obeid, L.M. (2008). Principles of bioactive lipid signalling: lessons from sphingolipids. *Nature reviews Molecular cell biology* 9, 139-150.

Hannun, Y.A., and Obeid, L.M. (2018). Sphingolipids and their metabolism in physiology and disease. *Nature reviews Molecular cell biology* 19, 175-191.

Haq, R., Shoag, J., Andreu-Perez, P., Yokoyama, S., Edelman, H., Rowe, G.C., Frederick, D.T., Hurley, A.D., Nellore, A., Kung, A.L., et al. (2013). Oncogenic BRAF regulates oxidative metabolism via PGC1alpha and MITF. *Cancer cell* 23, 302-315.

Hara, S., Nakashima, S., Kiyono, T., Sawada, M., Yoshimura, S., Iwama, T., Banno, Y., Shinoda, J., and Sakai, N. (2004). p53-Independent ceramide formation in human glioma cells during gamma-radiation-induced apoptosis. *Cell death and differentiation* 11, 853-861.

Harris, L., Genovesi, L.A., Gronostajski, R.M., Wainwright, B.J., and Piper, M. (2015). Nuclear factor one transcription factors: Divergent functions in developmental versus adult stem cell populations. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* 244, 227-238.

Hartman, M.L., and Czyz, M. (2013). Anti-apoptotic proteins on guard of melanoma cell survival. *Cancer letters* 331, 24-34.

Hartman, M.L., and Czyz, M. (2015). MITF in melanoma: mechanisms behind its expression and activity. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 72, 1249-1260.

Hayflick, L., and Moorhead, P.S. (1961). The serial cultivation of human diploid cell strains. *Experimental cell research* 25, 585-621.

Hayward, N.K., Wilmott, J.S., Waddell, N., Johansson, P.A., Field, M.A., Nones, K., Patch, A.M., Kakavand, H., Alexandrov, L.B., Burke, H., et al. (2017). Whole-genome landscapes of major melanoma subtypes. *Nature* 545, 175-180.

Hearing, V.J., and Jimenez, M. (1987). Mammalian tyrosinase--the critical regulatory control point in melanocyte pigmentation. *The International journal of biochemistry* 19, 1141-1147.



- Heinrich, M., Neumeier, J., Jakob, M., Hallas, C., Tchikov, V., Winoto-Morbach, S., Wickel, M., Schneider-Brachert, W., Trauzold, A., Hethke, A., et al. (2004). Cathepsin D links TNF-induced acid sphingomyelinase to Bid-mediated caspase-9 and -3 activation. *Cell death and differentiation* 11, 550-563.
- Hemesath, T.J., Price, E.R., Takemoto, C., Badalian, T., and Fisher, D.E. (1998). MAP kinase links the transcription factor Microphthalmia to c-Kit signalling in melanocytes. *Nature* 391, 298-301.
- Heo, J.Y., Jing, K., Song, K.S., Seo, K.S., Park, J.H., Kim, J.S., Jung, Y.J., Hur, G.M., Jo, D.Y., Kweon, G.R., et al. (2009). Downregulation of APE1/Ref-1 is involved in the senescence of mesenchymal stem cells. *Stem cells* 27, 1455-1462.
- Hernandez-Tiedra, S., Fabrias, G., Davila, D., Salanueva, I.J., Casas, J., Montes, L.R., Anton, Z., Garcia-Taboada, E., Salazar-Roa, M., Lorente, M., et al. (2016). Dihydroceramide accumulation mediates cytotoxic autophagy of cancer cells via autolysosome destabilization. *Autophagy* 12, 2213-2229.
- Hirata, N., Yamada, S., Shoda, T., Kurihara, M., Sekino, Y., and Kanda, Y. (2014). Sphingosine-1-phosphate promotes expansion of cancer stem cells via S1PR3 by a ligand-independent Notch activation. *Nature communications* 5, 4806.
- Hodgkinson, C.A., Moore, K.J., Nakayama, A., Steingrimsson, E., Copeland, N.G., Jenkins, N.A., and Arnheiter, H. (1993). Mutations at the mouse microphthalmia locus are associated with defects in a gene encoding a novel basic-helix-loop-helix-zipper protein. *Cell* 74, 395-404.
- Hodis, E., Watson, I.R., Kryukov, G.V., Arold, S.T., Imielinski, M., Theurillat, J.P., Nickerson, E., Auclair, D., Li, L., Place, C., et al. (2012). A landscape of driver mutations in melanoma. *Cell* 150, 251-263.
- Hoek, K.S., Eichhoff, O.M., Schlegel, N.C., Dobbeling, U., Kobert, N., Schaerer, L., Hemmi, S., and Dummer, R. (2008). In vivo switching of human melanoma cells between proliferative and invasive states. *Cancer research* 68, 650-656.
- Houben, E., Holleran, W.M., Yaginuma, T., Mao, C., Obeid, L.M., Rogiers, V., Takagi, Y., Elias, P.M., and Uchida, Y. (2006). Differentiation-associated expression of ceramidase isoforms in cultured keratinocytes and epidermis. *Journal of lipid research* 47, 1063-1070.
- Hsiao, J.J., and Fisher, D.E. (2014). The roles of microphthalmia-associated transcription factor and pigmentation in melanoma. *Archives of biochemistry and biophysics* 563, 28-34.
- Huber, W.E., Price, E.R., Widlund, H.R., Du, J., Davis, I.J., Wegner, M., and Fisher, D.E. (2003). A tissue-restricted cAMP transcriptional response: SOX10 modulates alpha-melanocyte-stimulating hormone-triggered expression of microphthalmia-associated transcription factor in melanocytes. *The Journal of biological chemistry* 278, 45224-45230.

Ishida, Y., Agata, Y., Shibahara, K., and Honjo, T. (1992). Induced expression of PD-1, a novel member of the immunoglobulin gene superfamily, upon programmed cell death. *The EMBO journal* 11, 3887-3895.

Ishitsuka, A., Fujine, E., Mizutani, Y., Tawada, C., Kanoh, H., Banno, Y., and Seishima, M. (2014). FTY720 and cisplatin synergistically induce the death of cisplatin-resistant melanoma cells through the downregulation of the PI3K pathway and the decrease in epidermal growth factor receptor expression. *International journal of molecular medicine* 34, 1169-1174.

Jacquemin, P., Lannoy, V.J., O'Sullivan, J., Read, A., Lemaigre, F.P., and Rousseau, G.G. (2001). The transcription factor onecut-2 controls the microphthalmia-associated transcription factor gene. *Biochemical and biophysical research communications* 285, 1200-1205.

Jamal, Z., Martin, A., Gomez-Munoz, A., and Brindley, D.N. (1991). Plasma membrane fractions from rat liver contain a phosphatidate phosphohydrolase distinct from that in the endoplasmic reticulum and cytosol. *The Journal of biological chemistry* 266, 2988-2996.

Jane-Valbuena, J., Widlund, H.R., Perner, S., Johnson, L.A., Dibner, A.C., Lin, W.M., Baker, A.C., Nazarian, R.M., Vijayendran, K.G., Sellers, W.R., et al. (2010). An oncogenic role for ETV1 in melanoma. *Cancer research* 70, 2075-2084.

Jarvis, W.D., Grant, S., and Kolesnick, R.N. (1996). Ceramide and the induction of apoptosis. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 2, 1-6.

Jenkins, R.W., Clarke, C.J., Canals, D., Snider, A.J., Gault, C.R., Heffernan-Stroud, L., Wu, B.X., Simbari, F., Roddy, P., Kitatani, K., et al. (2011). Regulation of CC ligand 5/RANTES by acid sphingomyelinase and acid ceramidase. *The Journal of biological chemistry* 286, 13292-13303.

Ji, K., Zhang, P., Zhang, J., Fan, R., Liu, Y., Yang, S., Hu, S., Liu, X., and Dong, C. (2018). MicroRNA 143-5p regulates alpaca melanocyte migration, proliferation and melanogenesis. *Experimental dermatology* 27, 166-171.

Ji, Z., Erin Chen, Y., Kumar, R., Taylor, M., Jenny Njauw, C.N., Miao, B., Frederick, D.T., Wargo, J.A., Flaherty, K.T., Jonsson, G., et al. (2015). MITF Modulates Therapeutic Resistance through EGFR Signaling. *The Journal of investigative dermatology* 135, 1863-1872.

Jia, R., Guardia, C.M., Pu, J., Chen, Y., and Bonifacino, J.S. (2017). BORC coordinates encounter and fusion of lysosomes with autophagosomes. *Autophagy* 13, 1648-1663.

Jiang, F., Jin, K., Huang, S., Bao, Q., Shao, Z., Hu, X., and Ye, J. (2016). Liposomal C6 Ceramide Activates Protein Phosphatase 1 to Inhibit Melanoma Cells. *PloS one* 11, e0159849.

Jimbrow, K., Park, J.S., Kato, F., Hirosaki, K., Toyofuku, K., Hua, C., and Yamashita, T. (2000). Assembly, target-signaling and intracellular transport of tyrosinase gene family proteins in the initial stage of melanosome biogenesis. *Pigment cell research / sponsored by the European Society for Pigment Cell Research and the International Pigment Cell Society* 13, 222-229.

Johannessen, C.M., Boehm, J.S., Kim, S.Y., Thomas, S.R., Wardwell, L., Johnson, L.A., Emery, C.M., Stransky, N., Cogdill, A.P., Barretina, J., et al. (2010). COT drives resistance to RAF inhibition through MAP kinase pathway reactivation. *Nature* 468, 968-972.

Johannessen, C.M., Johnson, L.A., Piccioni, F., Townes, A., Frederick, D.T., Donahue, M.K., Narayan, R., Flaherty, K.T., Wargo, J.A., Root, D.E., et al. (2013). A melanocyte lineage program confers resistance to MAP kinase pathway inhibition. *Nature* 504, 138-142.

Johnson, S.L., Nguyen, A.N., and Lister, J.A. (2011). *mitfa* is required at multiple stages of melanocyte differentiation but not to establish the melanocyte stem cell. *Developmental biology* 350, 405-413.

**K**anto, T., Kalinski, P., Hunter, O.C., Lotze, M.T., and Amoscato, A.A. (2001). Ceramide mediates tumor-induced dendritic cell apoptosis. *Journal of immunology* 167, 3773-3784.

Karahatay, S., Thomas, K., Koybasi, S., Senkal, C.E., Elojeimy, S., Liu, X., Bielawski, J., Day, T.A., Gillespie, M.B., Sinha, D., et al. (2007). Clinical relevance of ceramide metabolism in the pathogenesis of human head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC): attenuation of C(18)-ceramide in HNSCC tumors correlates with lymphovascular invasion and nodal metastasis. *Cancer letters* 256, 101-111.

Karpinski, B.A., Morle, G.D., Huggenvik, J., Uhler, M.D., and Leiden, J.M. (1992). Molecular cloning of human CREB-2: an ATF/CREB transcription factor that can negatively regulate transcription from the cAMP response element. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89, 4820-4824.

Kasamatsu, S., Hachiya, A., Higuchi, K., Ohuchi, A., Kitahara, T., and Boissy, R.E. (2008). Production of the soluble form of KIT, s-KIT, abolishes stem cell factor-induced melanogenesis in human melanocytes. *The Journal of investigative dermatology* 128, 1763-1772.

Kedderis, L.B., Bozigian, H.P., Kleeman, J.M., Hall, R.L., Palmer, T.E., Harrison, S.D., Jr., and Susick, R.L., Jr. (1995). Toxicity of the protein kinase C inhibitor safingol administered alone and in combination with chemotherapeutic agents. *Fundamental and applied toxicology : official journal of the Society of Toxicology* 25, 201-217.

Keenen, B., Qi, H., Saladi, S.V., Yeung, M., and de la Serna, I.L. (2010). Heterogeneous SWI/SNF chromatin remodeling complexes promote expression of microphthalmia-associated transcription factor target genes in melanoma. *Oncogene* 29, 81-92.

Kenific, C.M., and Debnath, J. (2015). Cellular and metabolic functions for autophagy in cancer cells. *Trends in cell biology* 25, 37-45.

Khazen, R., Muller, S., Gaudenzio, N., Espinosa, E., Puissegur, M.P., and Valitutti, S. (2016). Melanoma cell lysosome secretory burst neutralizes the CTL-mediated cytotoxicity at the lytic synapse. *Nature communications* 7, 10823.

Kholmanskikh, O., van Baren, N., Brasseur, F., Ottaviani, S., Vanacker, J., Arts, N., van der Bruggen, P., Coulie, P., and De Plaen, E. (2010). Interleukins 1alpha and 1beta secreted by some melanoma cell lines strongly reduce expression of MITF-M and melanocyte differentiation antigens. *International journal of cancer* 127, 1625-1636.

Kim, D.S., Hwang, E.S., Lee, J.E., Kim, S.Y., Kwon, S.B., and Park, K.C. (2003). Sphingosine-1-phosphate decreases melanin synthesis via sustained ERK activation and subsequent MITF degradation. *Journal of cell science* 116, 1699-1706.

Kim, D.S., Kim, S.Y., Chung, J.H., Kim, K.H., Eun, H.C., and Park, K.C. (2002). Delayed ERK activation by ceramide reduces melanin synthesis in human melanocytes. *Cellular signalling* 14, 779-785.

Kim, D.S., Park, S.H., Jeong, Y.M., Kwon, S.B., Miller, A.J., Fisher, D.E., and Park, K.C. (2011). Sphingosine-1-phosphate decreases melanin synthesis via microphthalmia-associated transcription factor phosphorylation through the S1P3 receptor subtype. *The Journal of pharmacy and pharmacology* 63, 409-416.

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

Klobucar, M., Grbcic, P., Pavelic, S.K., Jonjic, N., Visentin, S., and Sedic, M. (2018). Acid ceramidase inhibition sensitizes human colon cancer cells to oxaliplatin through downregulation of transglutaminase 2 and beta1 integrin/FAK-mediated signalling. *Biochemical and biophysical research communications* 503, 843-848.

Kobayashi, N., Muramatsu, T., Yamashina, Y., Shirai, T., Ohnishi, T., and Mori, T. (1993). Melanin reduces ultraviolet-induced DNA damage formation and killing rate in cultured human melanoma cells. *The Journal of investigative dermatology* 101, 685-689.

Kobi, D., Steunou, A.L., Dembele, D., Legras, S., Larue, L., Nieto, L., and Davidson, I. (2010). Genome-wide analysis of POU3F2/BRN2 promoter occupancy in human melanoma cells reveals Kitl as a novel regulated target gene. *Pigment cell & melanoma research* 23, 404-418.

Kolter, T., and Sandhoff, K. (2005). Principles of lysosomal membrane digestion: stimulation of sphingolipid degradation by sphingolipid activator proteins and anionic lysosomal lipids. *Annual review of cell and developmental biology* 21, 81-103.

Kong, C., Wang, C., Wang, L., Ma, M., Niu, C., Sun, X., Du, J., Dong, Z., Zhu, S., Lu, J., et al. (2011). NEDD9 is a positive regulator of epithelial-mesenchymal transition and promotes invasion in aggressive breast cancer. *PloS one* 6, e22666.

Konieczkowski, D.J., Johannessen, C.M., Abudayyeh, O., Kim, J.W., Cooper, Z.A., Piris, A., Frederick, D.T., Barzily-Rokni, M., Straussman, R., Haq, R., et al. (2014). A melanoma cell state distinction influences sensitivity to MAPK pathway inhibitors. *Cancer discovery* 4, 816-827.

Koybasi, S., Senkal, C.E., Sundararaj, K., Spassieva, S., Bielawski, J., Osta, W., Day, T.A., Jiang, J.C., Jazwinski, S.M., Hannun, Y.A., et al. (2004). Defects in cell growth regulation by C18:0-ceramide and longevity assurance gene 1 in human head and neck squamous cell carcinomas. *The Journal of biological chemistry* 279, 44311-44319.

Kozyulina, P.Y., Loskutov, Y.V., Kozyreva, V.K., Rajulapati, A., Ice, R.J., Jones, B.C., and Pugacheva, E.N. (2015). Prometastatic NEDD9 Regulates Individual Cell Migration via Caveolin-1-Dependent Trafficking of Integrins. *Molecular cancer research : MCR* 13, 423-438.

Kraft, M.L. (2016). Sphingolipid Organization in the Plasma Membrane and the Mechanisms That Influence It. *Frontiers in cell and developmental biology* 4, 154.

Krahe, T.E., Wang, W., and Medina, A.E. (2009). Phosphodiesterase inhibition increases CREB phosphorylation and restores orientation selectivity in a model of fetal alcohol spectrum disorders. *PloS one* 4, e6643.

Krauthammer, M., Kong, Y., Ha, B.H., Evans, P., Bacchiocchi, A., McCusker, J.P., Cheng, E., Davis, M.J., Goh, G., Choi, M., et al. (2012). Exome sequencing identifies recurrent somatic RAC1 mutations in melanoma. *Nature genetics* 44, 1006-1014.

Kraveka, J.M., Li, L., Bielawski, J., Obeid, L.M., and Ogretmen, B. (2003). Involvement of endogenous ceramide in the inhibition of telomerase activity and induction of morphologic differentiation in response to all-trans-retinoic acid in human neuroblastoma cells. *Archives of biochemistry and biophysics* 419, 110-119.

Krengel, S., Hauschild, A., and Schafer, T. (2006). Melanoma risk in congenital melanocytic naevi: a systematic review. *The British journal of dermatology* 155, 1-8.

Kunkel, G.T., Maceyka, M., Milstien, S., and Spiegel, S. (2013). Targeting the sphingosine-1-phosphate axis in cancer, inflammation and beyond. *Nature reviews Drug discovery* 12, 688-702.

Kyriakis, J.M., Banerjee, P., Nikolakaki, E., Dai, T., Rubie, E.A., Ahmad, M.F., Avruch, J., and Woodgett, J.R. (1994). The stress-activated protein kinase subfamily of c-Jun kinases. *Nature* 369, 156-160.

**L**ai, M., Realini, N., La Ferla, M., Passalacqua, I., Matteoli, G., Ganesan, A., Pistello, M., Mazzanti, C.M., and Piomelli, D. (2017). Complete Acid Ceramidase ablation prevents cancer-initiating cell formation in melanoma cells. *Scientific reports* 7, 7411.

LaMontagne, K., Littlewood-Evans, A., Schnell, C., O'Reilly, T., Wyder, L., Sanchez, T., Probst, B., Butler, J., Wood, A., Liau, G., et al. (2006). Antagonism of sphingosine-1-phosphate receptors by FTY720 inhibits angiogenesis and tumor vascularization. *Cancer research* 66, 221-231.

Landgren, O., Turesson, I., Gridley, G., and Caporaso, N.E. (2007). Risk of malignant disease among 1525 adult male US Veterans with Gaucher disease. *Archives of internal medicine* 167, 1189-1194.

- Lappin, M.B., Kimber, I., and Norval, M. (1996). The role of dendritic cells in cutaneous immunity. *Archives of dermatological research* 288, 109-121.
- Larribere, L., Hilmi, C., Khaled, M., Gaggioli, C., Bille, K., Auberger, P., Ortonne, J.P., Ballotti, R., and Bertolotto, C. (2005). The cleavage of microphthalmia-associated transcription factor, MITF, by caspases plays an essential role in melanocyte and melanoma cell apoptosis. *Genes & development* 19, 1980-1985.
- Larue, L., de Vuyst, F., and Delmas, V. (2013). Modeling melanoblast development. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 70, 1067-1079.
- Lau, N., Feldkamp, M.M., Roncari, L., Loehr, A.H., Shannon, P., Gutmann, D.H., and Guha, A. (2000). Loss of neurofibromin is associated with activation of RAS/MAPK and PI3-K/AKT signaling in a neurofibromatosis 1 astrocytoma. *Journal of neuropathology and experimental neurology* 59, 759-767.
- Laurette, P., Strub, T., Koludrovic, D., Keime, C., Le Gras, S., Seberg, H., Van Otterloo, E., Imrichova, H., Siddaway, R., Aerts, S., et al. (2015). Transcription factor MITF and remodeller BRG1 define chromatin organisation at regulatory elements in melanoma cells. *eLife* 4.
- Le Douarin, N.M., Creuzet, S., Couly, G., and Dupin, E. (2004). Neural crest cell plasticity and its limits. *Development* 131, 4637-4650.
- Leach, D.R., Krummel, M.F., and Allison, J.P. (1996). Enhancement of antitumor immunity by CTLA-4 blockade. *Science* 271, 1734-1736.
- Leclerc, J., Garandeau, D., Pandiani, C., Gaudel, C., Bille, K., Nottet, N., Garcia, V., Colosetti, P., Pagnotta, S., Bahadoran, P., et al. (2018). Lysosomal acid ceramidase ASAH1 controls the transition between invasive and proliferative phenotype in melanoma cells. *Oncogene*.
- Lee, A.J., Roylance, R., Sander, J., Gorman, P., Endesfelder, D., Kschischo, M., Jones, N.P., East, P., Nicke, B., Spassieva, S., et al. (2012a). CERT depletion predicts chemotherapy benefit and mediates cytotoxic and polyploid-specific cancer cell death through autophagy induction. *The Journal of pathology* 226, 482-494.
- Lee, H., Deng, J., Kujawski, M., Yang, C., Liu, Y., Herrmann, A., Kortylewski, M., Horne, D., Somlo, G., Forman, S., et al. (2010). STAT3-induced S1PR1 expression is crucial for persistent STAT3 activation in tumors. *Nature medicine* 16, 1421-1428.
- Lee, I., Fox, P.S., Ferguson, S.D., Bassett, R., Kong, L.Y., Schacherer, C.W., Gershenwald, J.E., Grimm, E.A., Fuller, G.N., and Heimberger, A.B. (2012b). The expression of p-STAT3 in stage IV melanoma: risk of CNS metastasis and survival. *Oncotarget* 3, 336-344.
- Lee, J.E., Kim, S.Y., Jeong, Y.M., Yun, H.Y., Baek, K.J., Kwon, N.S., Park, K.C., and Kim, D.S. (2011). The regulatory mechanism of melanogenesis by FTY720, a sphingolipid analogue. *Experimental dermatology* 20, 237-241.

- Lee, K.H., Hwang, J.A., Kim, S.O., Kim, J.H., Shin, S.C., Kim, E.E., Lee, K.S., Rhee, K., Jeon, B.H., Bang, J.K., et al. (2018). Phosphorylation of human enhancer filamentation 1 (HEF1) stimulates interaction with Polo-like kinase 1 leading to HEF1 localization to focal adhesions. *The Journal of biological chemistry* 293, 847-862.
- Lessard, L., Liu, M., Marzese, D.M., Wang, H., Chong, K., Kawas, N., Donovan, N.C., Kiyohara, E., Hsu, S., Nelson, N., et al. (2015). The CASC15 Long Intergenic Noncoding RNA Locus Is Involved in Melanoma Progression and Phenotype Switching. *The Journal of investigative dermatology* 135, 2464-2474.
- Leucci, E., Vendramin, R., Spinazzi, M., Laurette, P., Fiers, M., Wouters, J., Radaelli, E., Eyckerman, S., Leonelli, C., Vanderheyden, K., et al. (2016). Melanoma addiction to the long non-coding RNA SAMMSON. *Nature* 531, 518-522.
- Levy, C., Khaled, M., and Fisher, D.E. (2006). MITF: master regulator of melanocyte development and melanoma oncogene. *Trends in molecular medicine* 12, 406-414.
- Levy, C., Sonnenblick, A., and Razin, E. (2003). Role played by microphthalmia transcription factor phosphorylation and its Zip domain in its transcriptional inhibition by PIAS3. *Molecular and cellular biology* 23, 9073-9080.
- Lewis, D.A., Yi, Q., Travers, J.B., and Spandau, D.F. (2008). UVB-induced senescence in human keratinocytes requires a functional insulin-like growth factor-1 receptor and p53. *Molecular biology of the cell* 19, 1346-1353.
- Li, C.M., Park, J.H., He, X., Levy, B., Chen, F., Arai, K., Adler, D.A., Disteché, C.M., Koch, J., Sandhoff, K., et al. (1999). The human acid ceramidase gene (ASAH): structure, chromosomal location, mutation analysis, and expression. *Genomics* 62, 223-231.
- Li, C.M., Park, J.H., Simonaro, C.M., He, X., Gordon, R.E., Friedman, A.H., Ehleiter, D., Paris, F., Manova, K., Hepbildikler, S., et al. (2002). Insertional mutagenesis of the mouse acid ceramidase gene leads to early embryonic lethality in homozygotes and progressive lipid storage disease in heterozygotes. *Genomics* 79, 218-224.
- Li, G., Zhang, Q., Hong, J., Ritter, J.K., and Li, P.L. (2018a). Inhibition of pannexin-1 channel activity by adiponectin in podocytes: Role of acid ceramidase activation. *Biochimica et biophysica acta Molecular and cell biology of lipids* 1863, 1246-1256.
- Li, Y.H., Liu, H.T., Xu, J., Xing, A.Y., Zhang, J., Wang, Y.W., Yin, G., and Gao, P. (2018b). The value of detection of S100A8 and ASAH1 in predicting the chemotherapy response for breast cancer patients. *Human pathology* 74, 156-163.
- Liang, J., Nagahashi, M., Kim, E.Y., Harikumar, K.B., Yamada, A., Huang, W.C., Hait, N.C., Allegood, J.C., Price, M.M., Avni, D., et al. (2013). Sphingosine-1-phosphate links persistent STAT3 activation, chronic intestinal inflammation, and development of colitis-associated cancer. *Cancer cell* 23, 107-120.

- Lin, D.C., Xu, L., Ding, L.W., Sharma, A., Liu, L.Z., Yang, H., Tan, P., Vadgama, J., Karlan, B.Y., Lester, J., et al. (2013). Genomic and functional characterizations of phosphodiesterase subtype 4D in human cancers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110, 6109-6114.
- Lister, J.A., Capper, A., Zeng, Z., Mathers, M.E., Richardson, J., Paranthaman, K., Jackson, I.J., and Elizabeth Patton, E. (2014). A conditional zebrafish MITF mutation reveals MITF levels are critical for melanoma promotion vs. regression in vivo. *The Journal of investigative dermatology* 134, 133-140.
- Lister, J.A., Robertson, C.P., Lepage, T., Johnson, S.L., and Raible, D.W. (1999). nacre encodes a zebrafish microphthalmia-related protein that regulates neural-crest-derived pigment cell fate. *Development* 126, 3757-3767.
- Liu, E., Sun, X., Li, J., and Zhang, C. (2018). miR30a5p inhibits the proliferation, migration and invasion of melanoma cells by targeting SOX4. *Molecular medicine reports* 18, 2492-2498.
- Liu, F., Cao, J., Wu, J., Sullivan, K., Shen, J., Ryu, B., Xu, Z., Wei, W., and Cui, R. (2013). Stat3-targeted therapies overcome the acquired resistance to vemurafenib in melanomas. *The Journal of investigative dermatology* 133, 2041-2049.
- Liu, F., Fu, Y., and Meyskens, F.L., Jr. (2009). MiTF regulates cellular response to reactive oxygen species through transcriptional regulation of APE-1/Ref-1. *The Journal of investigative dermatology* 129, 422-431.
- Liu, Y., He, J., Xie, X., Su, G., Teitz-Tennenbaum, S., Sabel, M.S., and Lubman, D.M. (2010). Serum autoantibody profiling using a natural glycoprotein microarray for the prognosis of early melanoma. *Journal of proteome research* 9, 6044-6051.
- Lobos-Gonzalez, L., Aguilar, L., Diaz, J., Diaz, N., Urra, H., Torres, V.A., Silva, V., Fitzpatrick, C., Lladser, A., Hoek, K.S., et al. (2013). E-cadherin determines Caveolin-1 tumor suppression or metastasis enhancing function in melanoma cells. *Pigment cell & melanoma research* 26, 555-570.
- Long, J.S., Edwards, J., Watson, C., Tovey, S., Mair, K.M., Schiff, R., Natarajan, V., Pyne, N.J., and Pyne, S. (2010). Sphingosine kinase 1 induces tolerance to human epidermal growth factor receptor 2 and prevents formation of a migratory phenotype in response to sphingosine 1-phosphate in estrogen receptor-positive breast cancer cells. *Molecular and cellular biology* 30, 3827-3841.
- Loveridge, C., Tonelli, F., Leclercq, T., Lim, K.G., Long, J.S., Berdyshev, E., Tate, R.J., Natarajan, V., Pitson, S.M., Pyne, N.J., et al. (2010). The sphingosine kinase 1 inhibitor 2-(p-hydroxyanilino)-4-(p-chlorophenyl)thiazole induces proteasomal degradation of sphingosine kinase 1 in mammalian cells. *The Journal of biological chemistry* 285, 38841-38852.
- Lowings, P., Yavuzer, U., and Goding, C.R. (1992). Positive and negative elements regulate a melanocyte-specific promoter. *Molecular and cellular biology* 12, 3653-3662.



Lozano, J., Berra, E., Municio, M.M., Diaz-Meco, M.T., Dominguez, I., Sanz, L., and Moscat, J. (1994). Protein kinase C zeta isoform is critical for kappa B-dependent promoter activation by sphingomyelinase. *The Journal of biological chemistry* 269, 19200-19202.

Lucki, N., and Sewer, M.B. (2009). The cAMP-responsive element binding protein (CREB) regulates the expression of acid ceramidase (ASAH1) in H295R human adrenocortical cells. *Biochimica et biophysica acta* 1791, 706-713.

Lucki, N.C., Bandyopadhyay, S., Wang, E., Merrill, A.H., and Sewer, M.B. (2012a). Acid ceramidase (ASAH1) is a global regulator of steroidogenic capacity and adrenocortical gene expression. *Molecular endocrinology* 26, 228-243.

Lucki, N.C., Li, D., Bandyopadhyay, S., Wang, E., Merrill, A.H., and Sewer, M.B. (2012b). Acid ceramidase (ASAH1) represses steroidogenic factor 1-dependent gene transcription in H295R human adrenocortical cells by binding to the receptor. *Molecular and cellular biology* 32, 4419-4431.

Lucki, N.C., and Sewer, M.B. (2011). Genistein stimulates MCF-7 breast cancer cell growth by inducing acid ceramidase (ASAH1) gene expression. *The Journal of biological chemistry* 286, 19399-19409.

Luo, B., Gan, W., Liu, Z., Shen, Z., Wang, J., Shi, R., Liu, Y., Liu, Y., Jiang, M., Zhang, Z., et al. (2016). Erythropoietin Signaling in Macrophages Promotes Dying Cell Clearance and Immune Tolerance. *Immunity* 44, 287-302.

**M**adhunapantula, S.V., Hengst, J., Gowda, R., Fox, T.E., Yun, J.K., and Robertson, G.P. (2012). Targeting sphingosine kinase-1 to inhibit melanoma. *Pigment cell & melanoma research* 25, 259-274.

Madison, K.C. (2003). Barrier function of the skin: "la raison d'etre" of the epidermis. *The Journal of investigative dermatology* 121, 231-241.

Mahdy, A.E., Cheng, J.C., Li, J., Elojeimy, S., Meacham, W.D., Turner, L.S., Bai, A., Gault, C.R., McPherson, A.S., Garcia, N., et al. (2009). Acid ceramidase upregulation in prostate cancer cells confers resistance to radiation: AC inhibition, a potential radiosensitizer. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 17, 430-438.

Mallarino, R., Henegar, C., Mirasierra, M., Manceau, M., Schradin, C., Vallejo, M., Beronja, S., Barsh, G.S., and Hoekstra, H.E. (2016). Developmental mechanisms of stripe patterns in rodents. *Nature* 539, 518-523.

Mao, C., and Obeid, L.M. (2008). Ceramidases: regulators of cellular responses mediated by ceramide, sphingosine, and sphingosine-1-phosphate. *Biochimica et biophysica acta* 1781, 424-434.

Marquez, M.G., Nieto, F.L., Fernandez-Tome, M.C., Favale, N.O., and Sterin-Speziale, N. (2008). Membrane lipid composition plays a central role in the maintenance of epithelial cell adhesion to the extracellular matrix. *Lipids* 43, 343-352.

- Martina, J.A., Diab, H.I., Li, H., and Puertollano, R. (2014a). Novel roles for the MiTF/TFE family of transcription factors in organelle biogenesis, nutrient sensing, and energy homeostasis. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 71, 2483-2497.
- Martina, J.A., Diab, H.I., Lishu, L., Jeong, A.L., Patange, S., Raben, N., and Puertollano, R. (2014b). The nutrient-responsive transcription factor TFE3 promotes autophagy, lysosomal biogenesis, and clearance of cellular debris. *Science signaling* 7, ra9.
- Martina, J.A., and Puertollano, R. (2013). Rag GTPases mediate amino acid-dependent recruitment of TFEB and MITF to lysosomes. *The Journal of cell biology* 200, 475-491.
- Martinez-Outschoorn, U.E., Sotgia, F., and Lisanti, M.P. (2015). Caveolae and signalling in cancer. *Nature reviews Cancer* 15, 225-237.
- Marvaso, G., Barone, A., Amodio, N., Raimondi, L., Agosti, V., Altomare, E., Scotti, V., Lombardi, A., Bianco, R., Bianco, C., et al. (2014). Sphingosine analog fingolimod (FTY720) increases radiation sensitivity of human breast cancer cells in vitro. *Cancer biology & therapy* 15, 797-805.
- Massi, D., Romano, E., Rulli, E., Merelli, B., Nassini, R., De Logu, F., Bieche, I., Baroni, G., Cattaneo, L., Xue, G., et al. (2017). Baseline beta-catenin, programmed death-ligand 1 expression and tumour-infiltrating lymphocytes predict response and poor prognosis in BRAF inhibitor-treated melanoma patients. *European journal of cancer* 78, 70-81.
- Mauvezin, C., Nagy, P., Juhasz, G., and Neufeld, T.P. (2015). Autophagosome-lysosome fusion is independent of V-ATPase-mediated acidification. *Nature communications* 6, 7007.
- McLafferty, E. (2012). The integumentary system: anatomy, physiology and function of skin. *Nursing standard* 27, 35-42.
- Merino, D., Kelly, G.L., Lessene, G., Wei, A.H., Roberts, A.W., and Strasser, A. (2018). BH3-Mimetic Drugs: Blazing the Trail for New Cancer Medicines. *Cancer cell* 34, 879-891.
- Mihm, M.C., Jr., Clark, W.H., Jr., and From, L. (1971). The clinical diagnosis, classification and histogenetic concepts of the early stages of cutaneous malignant melanomas. *The New England journal of medicine* 284, 1078-1082.
- Miyazaki, N., and Tabata, Y. (2009). Anti-tumor activity of carmofur water-solubilized by lactic acid oligomer-grafted pullulan nanogels. *Journal of nanoscience and nanotechnology* 9, 4797-4804.
- Modica-Napolitano, J.S., and Aprille, J.R. (2001). Delocalized lipophilic cations selectively target the mitochondria of carcinoma cells. *Advanced drug delivery reviews* 49, 63-70.
- Mollaoglu, G., Guthrie, M.R., Bohm, S., Bragelmann, J., Can, I., Ballieu, P.M., Marx, A., George, J., Heinen, C., Chalishazar, M.D., et al. (2017). MYC Drives Progression of Small Cell Lung Cancer to a Variant Neuroendocrine Subtype with Vulnerability to Aurora Kinase Inhibition. *Cancer cell* 31, 270-285.

Monick, M.M., Mallampalli, R.K., Bradford, M., McCoy, D., Gross, T.J., Flaherty, D.M., Powers, L.S., Cameron, K., Kelly, S., Merrill, A.H., Jr., et al. (2004). Cooperative prosurvival activity by ERK and Akt in human alveolar macrophages is dependent on high levels of acid ceramidase activity. *Journal of immunology* 173, 123-135.

Morad, S.A., Bridges, L.C., Almeida Larrea, A.D., Mayen, A.L., MacDougall, M.R., Davis, T.S., Kester, M., and Cabot, M.C. (2016). Short-chain ceramides depress integrin cell surface expression and function in colorectal cancer cells. *Cancer letters* 376, 199-204.

Morad, S.A., Levin, J.C., Shanmugavelandy, S.S., Kester, M., Fabrias, G., Bedia, C., and Cabot, M.C. (2012). Ceramide--antiestrogen nanoliposomal combinations--novel impact of hormonal therapy in hormone-insensitive breast cancer. *Molecular cancer therapeutics* 11, 2352-2361.

Morad, S.A., Levin, J.C., Tan, S.F., Fox, T.E., Feith, D.J., and Cabot, M.C. (2013). Novel off-target effect of tamoxifen--inhibition of acid ceramidase activity in cancer cells. *Biochimica et biophysica acta* 1831, 1657-1664.

Morad, S.A., Tan, S.F., Feith, D.J., Kester, M., Claxton, D.F., Loughran, T.P., Jr., Barth, B.M., Fox, T.E., and Cabot, M.C. (2015). Modification of sphingolipid metabolism by tamoxifen and N-desmethyltamoxifen in acute myelogenous leukemia--Impact on enzyme activity and response to cytotoxics. *Biochimica et biophysica acta* 1851, 919-928.

Morales, A., Paris, R., Villanueva, A., Llacuna, L., Garcia-Ruiz, C., and Fernandez-Checa, J.C. (2007). Pharmacological inhibition or small interfering RNA targeting acid ceramidase sensitizes hepatoma cells to chemotherapy and reduces tumor growth in vivo. *Oncogene* 26, 905-916.

Mort, R.L., Jackson, I.J., and Patton, E.E. (2015). The melanocyte lineage in development and disease. *Development* 142, 1387.

Mrad, M., Imbert, C., Garcia, V., Rambow, F., Therville, N., Carpentier, S., Segui, B., Levade, T., Azar, R., Marine, J.C., et al. (2016). Downregulation of sphingosine kinase-1 induces protective tumor immunity by promoting M1 macrophage response in melanoma. *Oncotarget* 7, 71873-71886.

Mukhopadhyay, A., Saddoughi, S.A., Song, P., Sultan, I., Ponnusamy, S., Senkal, C.E., Snook, C.F., Arnold, H.K., Sears, R.C., Hannun, Y.A., et al. (2009). Direct interaction between the inhibitor 2 and ceramide via sphingolipid-protein binding is involved in the regulation of protein phosphatase 2A activity and signaling. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 23, 751-763.

Muller, G., Ayoub, M., Storz, P., Rennecke, J., Fabbro, D., and Pfizenmaier, K. (1995). PKC zeta is a molecular switch in signal transduction of TNF-alpha, bifunctionally regulated by ceramide and arachidonic acid. *The EMBO journal* 14, 1961-1969.

Muller, J., Krijgsman, O., Tsoi, J., Robert, L., Hugo, W., Song, C., Kong, X., Possik, P.A., Cornelissen-Steijger, P.D., Geukes Foppen, M.H., et al. (2014). Low MITF/AXL ratio predicts early resistance to multiple targeted drugs in melanoma. *Nature communications* 5, 5712.

Murakami, H., and Arnheiter, H. (2005). Sumoylation modulates transcriptional activity of MITF in a promoter-specific manner. *Pigment cell research / sponsored by the European Society for Pigment Cell Research and the International Pigment Cell Society* 18, 265-277.

Muthusamy, V., Hobbs, C., Nogueira, C., Cordon-Cardo, C., McKee, P.H., Chin, L., and Bosenberg, M.W. (2006). Amplification of CDK4 and MDM2 in malignant melanoma. *Genes, chromosomes & cancer* 45, 447-454.

Nagahashi, M., Ramachandran, S., Kim, E.Y., Allegood, J.C., Rashid, O.M., Yamada, A., Zhao, R., Milstien, S., Zhou, H., Spiegel, S., et al. (2012). Sphingosine-1-phosphate produced by sphingosine kinase 1 promotes breast cancer progression by stimulating angiogenesis and lymphangiogenesis. *Cancer research* 72, 726-735.

Nazarian, R., Shi, H., Wang, Q., Kong, X., Koya, R.C., Lee, H., Chen, Z., Lee, M.K., Attar, N., Sazegar, H., et al. (2010). Melanomas acquire resistance to B-RAF(V600E) inhibition by RTK or N-RAS upregulation. *Nature* 468, 973-977.

Neitcheva, T., and Peeva, D. (1995). Phospholipid composition, phospholipase A2 and sphingomyelinase activities in rat liver nuclear membrane and matrix. *The international journal of biochemistry & cell biology* 27, 995-1001.

Nicholas, C., Yang, J., Peters, S.B., Bill, M.A., Baiocchi, R.A., Yan, F., Sif, S., Tae, S., Gaudio, E., Wu, X., et al. (2013). PRMT5 is upregulated in malignant and metastatic melanoma and regulates expression of MITF and p27(Kip1). *PloS one* 8, e74710.

Nicolae, I., Nicolae, C.D., Coman, O.A., Stefanescu, M., Coman, L., and Ardeleanu, C. (2011). Serum total gangliosides level: clinical prognostic implication. *Romanian journal of morphology and embryology = Revue roumaine de morphologie et embryologie* 52, 1277-1281.

Nishikawa, S., Kusakabe, M., Yoshinaga, K., Ogawa, M., Hayashi, S., Kunisada, T., Era, T., Sakakura, T., and Nishikawa, S. (1991). In utero manipulation of coat color formation by a monoclonal anti-c-kit antibody: two distinct waves of c-kit-dependency during melanocyte development. *The EMBO journal* 10, 2111-2118.

Nishimura, Y., Itoh, K., Yoshioka, K., Tokuda, K., and Himeno, M. (2003). Overexpression of ROCK in human breast cancer cells: evidence that ROCK activity mediates intracellular membrane traffic of lysosomes. *Pathology oncology research : POR* 9, 83-95.

Nishimura, Y., Itoh, K., Yoshioka, K., Uehata, M., and Himeno, M. (2000). Small guanosine triphosphatase Rho/Rho-associated kinase as a novel regulator of intracellular redistribution of lysosomes in invasive tumor cells. *Cell and tissue research* 301, 341-351.

Nishimura, Y., Yoshioka, K., Bernard, O., Himeno, M., and Itoh, K. (2004). LIM kinase 1: evidence for a role in the regulation of intracellular vesicle trafficking of lysosomes and endosomes in human breast cancer cells. *European journal of cell biology* 83, 369-380.

Nordlinger, A., Dror, S., Elkahoun, A., Del Rio, J., Stubbs, E., Golan, T., Malcov, H., Prickett, T.D., Cronin, J.C., Parikh, S., et al. (2018). Mutated MITF-E87R in Melanoma Enhances Tumor Progression via S100A4. *The Journal of investigative dermatology* 138, 2216-2223.

Nourry, C., Maksumova, L., Pang, M., Liu, X., and Wang, T. (2004). Direct interaction between Smad3, APC10, CDH1 and HEF1 in proteasomal degradation of HEF1. *BMC cell biology* 5, 20.

Nsengimana, J., Laye, J., Folia, A., O'Shea, S., Muralidhar, S., Pozniak, J., Droop, A., Chan, M., Walker, C., Parkinson, L., et al. (2018). beta-Catenin-mediated immune evasion pathway frequently operates in primary cutaneous melanomas. *The Journal of clinical investigation* 128, 2048-2063.

**O**gretmen, B. (2018). Sphingolipid metabolism in cancer signalling and therapy. *Nature reviews Cancer* 18, 33-50.

Ogretmen, B., Schady, D., Usta, J., Wood, R., Kraveka, J.M., Luberto, C., Birbes, H., Hannun, Y.A., and Obeid, L.M. (2001). Role of ceramide in mediating the inhibition of telomerase activity in A549 human lung adenocarcinoma cells. *The Journal of biological chemistry* 276, 24901-24910.

Ohanna, M., Cheli, Y., Bonet, C., Bonazzi, V.F., Allegra, M., Giuliano, S., Bille, K., Bahadoran, P., Giaccherio, D., Lacour, J.P., et al. (2013). Secretome from senescent melanoma engages the STAT3 pathway to favor reprogramming of naïve melanoma towards a tumor-initiating cell phenotype. *Oncotarget* 4, 2212-2224.

Ohanna, M., Giuliano, S., Bonet, C., Imbert, V., Hofman, V., Zangari, J., Bille, K., Robert, C., Bressac-de Paillerets, B., Hofman, P., et al. (2011). Senescent cells develop a PARP-1 and nuclear factor- $\kappa$ B-associated secretome (PNAS). *Genes & development* 25, 1245-1261.

Okino, N., He, X., Gatt, S., Sandhoff, K., Ito, M., and Schuchman, E.H. (2003). The reverse activity of human acid ceramidase. *The Journal of biological chemistry* 278, 29948-29953.

Ondrusova, L., Vachtenheim, J., Reda, J., Zakova, P., and Benkova, K. (2013). MITF-independent pro-survival role of BRG1-containing SWI/SNF complex in melanoma cells. *PloS one* 8, e54110.

Oo, M.L., Chang, S.H., Thangada, S., Wu, M.T., Rezaul, K., Blaho, V., Hwang, S.I., Han, D.K., and Hla, T. (2011). Engagement of S1P(1)-degradative mechanisms leads to vascular leak in mice. *The Journal of clinical investigation* 121, 2290-2300.

Oo, M.L., Thangada, S., Wu, M.T., Liu, C.H., Macdonald, T.L., Lynch, K.R., Lin, C.Y., and Hla, T. (2007). Immunosuppressive and anti-angiogenic sphingosine 1-phosphate receptor-1 agonists induce ubiquitinylation and proteasomal degradation of the receptor. *The Journal of biological chemistry* 282, 9082-9089.

Ortiz, R., Diaz, J., Diaz, N., Lobos-Gonzalez, L., Cardenas, A., Contreras, P., Diaz, M.I., Otte, E., Cooper-White, J., Torres, V., et al. (2016). Extracellular matrix-specific Caveolin-1 phosphorylation on tyrosine 14 is linked to augmented melanoma metastasis but not tumorigenesis. *Oncotarget* 7, 40571-40593.

Oskouian, B., Sooriyakumaran, P., Borowsky, A.D., Crans, A., Dillard-Telm, L., Tam, Y.Y., Bandhuvula, P., and Saba, J.D. (2006). Sphingosine-1-phosphate lyase potentiates apoptosis via p53- and p38-dependent pathways and is down-regulated in colon cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 17384-17389.

Ozturk, D.G., Kocak, M., Akcay, A., Kinoglu, K., Kara, E., Buyuk, Y., Kazan, H., and Gozuacik, D. (2018). MITF-MIR211 axis is a novel autophagy amplifier system during cellular stress. *Autophagy*, 1-16.

**P**almieri, M., Impey, S., Kang, H., di Ronza, A., Pelz, C., Sardiello, M., and Ballabio, A. (2011). Characterization of the CLEAR network reveals an integrated control of cellular clearance pathways. *Human molecular genetics* 20, 3852-3866.

Pan, T., Li, X., and Jankovic, J. (2011). The association between Parkinson's disease and melanoma. *International journal of cancer* 128, 2251-2260.

Pandiani, C., Beranger, G.E., Leclerc, J., Ballotti, R., and Bertolotto, C. (2017). Focus on cutaneous and uveal melanoma specificities. *Genes & development* 31, 724-743.

Park, H.Y., Kosmadaki, M., Yaar, M., and Gilchrist, B.A. (2009). Cellular mechanisms regulating human melanogenesis. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 66, 1493-1506.

Park, J.H., Eliyahu, E., Narla, G., DiFeo, A., Martignetti, J.A., and Schuchman, E.H. (2005). KLF6 is one transcription factor involved in regulating acid ceramidase gene expression. *Biochimica et biophysica acta* 1732, 82-87.

Park, J.H., and Schuchman, E.H. (2006). Acid ceramidase and human disease. *Biochimica et biophysica acta* 1758, 2133-2138.

Parton, R.G., and Simons, K. (2007). The multiple faces of caveolae. *Nature reviews Molecular cell biology* 8, 185-194.

Passeron, T., Bahadoran, P., Bertolotto, C., Chiaverini, C., Busca, R., Valony, G., Bille, K., Ortonne, J.P., and Ballotti, R. (2004). Cyclic AMP promotes a peripheral distribution of melanosomes and stimulates melanophilin/Slac2-a and actin association. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 18, 989-991.

Paugh, S.W., Paugh, B.S., Rahmani, M., Kapitonov, D., Almenara, J.A., Kordula, T., Milstien, S., Adams, J.K., Zipkin, R.E., Grant, S., et al. (2008). A selective sphingosine kinase 1 inhibitor integrates multiple molecular therapeutic targets in human leukemia. *Blood* 112, 1382-1391.

Payne, S.G., Brindley, D.N., and Guilbert, L.J. (1999). Epidermal growth factor inhibits ceramide-induced apoptosis and lowers ceramide levels in primary placental trophoblasts. *Journal of cellular physiology* 180, 263-270.

Pchejetski, D., Bohler, T., Brizuela, L., Sauer, L., Doumerc, N., Golzio, M., Salunkhe, V., Teissie, J., Malavaud, B., Waxman, J., et al. (2010). FTY720 (fingolimod) sensitizes prostate cancer cells to radiotherapy by inhibition of sphingosine kinase-1. *Cancer research* 70, 8651-8661.

Pei, J., and Grishin, N.V. (2003). Peptidase family U34 belongs to the superfamily of N-terminal nucleophile hydrolases. *Protein science : a publication of the Protein Society* 12, 1131-1135.

Perotti, V., Baldassari, P., Molla, A., Vegetti, C., Bersani, I., Maurichi, A., Santinami, M., Anichini, A., and Mortarini, R. (2016). NFATc2 is an intrinsic regulator of melanoma dedifferentiation. *Oncogene* 35, 2862-2872.

Pettus, B.J., Chalfant, C.E., and Hannun, Y.A. (2002). Ceramide in apoptosis: an overview and current perspectives. *Biochimica et biophysica acta* 1585, 114-125.

Phung, B., Kazi, J.U., Lundby, A., Bergsteinsdottir, K., Sun, J., Goding, C.R., Jonsson, G., Olsen, J.V., Steingrimsdottir, E., and Ronnstrand, L. (2017). KIT(D816V) Induces SRC-Mediated Tyrosine Phosphorylation of MITF and Altered Transcription Program in Melanoma. *Molecular cancer research : MCR* 15, 1265-1274.

Pierrat, M.J., Marsaud, V., Mauviel, A., and Javelaud, D. (2012). Expression of microphthalmia-associated transcription factor (MITF), which is critical for melanoma progression, is inhibited by both transcription factor GLI2 and transforming growth factor-beta. *The Journal of biological chemistry* 287, 17996-18004.

Pinner, S., Jordan, P., Sharrock, K., Bazley, L., Collinson, L., Marais, R., Bonvin, E., Goding, C., and Sahai, E. (2009). Intravital imaging reveals transient changes in pigment production and Brn2 expression during metastatic melanoma dissemination. *Cancer research* 69, 7969-7977.

Ploper, D., Taelman, V.F., Robert, L., Perez, B.S., Titz, B., Chen, H.W., Graeber, T.G., von Euw, E., Ribas, A., and De Robertis, E.M. (2015). MITF drives endolysosomal biogenesis and potentiates Wnt signaling in melanoma cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 112, E420-429.

Ponnusamy, S., Selvam, S.P., Mehrotra, S., Kawamori, T., Snider, A.J., Obeid, L.M., Shao, Y., Sabbadini, R., and Ogretmen, B. (2012). Communication between host organism and cancer cells is transduced by systemic sphingosine kinase 1/sphingosine 1-phosphate signalling to regulate tumour metastasis. *EMBO molecular medicine* 4, 761-775.

Postow, M.A., Chesney, J., Pavlick, A.C., Robert, C., Grossmann, K., McDermott, D., Linette, G.P., Meyer, N., Giguere, J.K., Agarwala, S.S., et al. (2015). Nivolumab and ipilimumab versus ipilimumab in untreated melanoma. *The New England journal of medicine* 372, 2006-2017.

Potrony, M., Badenas, C., Aguilera, P., Puig-Butille, J.A., Carrera, C., Malveyh, J., and Puig, S. (2015). Update in genetic susceptibility in melanoma. *Annals of translational medicine* 3, 210.

Pouryazdanparast, P., Brenner, A., Haghighat, Z., Guitart, J., Rademaker, A., and Gerami, P. (2012). The role of 8q24 copy number gains and c-MYC expression in amelanotic cutaneous melanoma.

Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc 25, 1221-1226.

Prinetti, A., Loberto, N., Chigorno, V., and Sonnino, S. (2009). Glycosphingolipid behaviour in complex membranes. *Biochimica et biophysica acta* 1788, 184-193.

Pronk, G.J., Ramer, K., Amiri, P., and Williams, L.T. (1996). Requirement of an ICE-like protease for induction of apoptosis and ceramide generation by REAPER. *Science* 271, 808-810.

Pu, J., Keren-Kaplan, T., and Bonifacino, J.S. (2017). A Ragulator-BORC interaction controls lysosome positioning in response to amino acid availability. *The Journal of cell biology* 216, 4183-4197.

Puerta, E., Hervias, I., Barros-Minones, L., Jordan, J., Ricobaraza, A., Cuadrado-Tejedor, M., Garcia-Osta, A., and Aguirre, N. (2010). Sildenafil protects against 3-nitropropionic acid neurotoxicity through the modulation of calpain, CREB, and BDNF. *Neurobiology of disease* 38, 237-245.

Puertollano, R., Ferguson, S.M., Brugarolas, J., and Ballabio, A. (2018). The complex relationship between TFEB transcription factor phosphorylation and subcellular localization. *The EMBO journal* 37.

**Q**ian, H., Yang, C., and Yang, Y. (2017). MicroRNA-26a inhibits the growth and invasiveness of malignant melanoma and directly targets on MITF gene. *Cell death discovery* 3, 17028.

Quevedo, W.C., Fitzpatrick, T.B., Pathak, M.A., and Jimbow, K. (1975). Role of light in human skin color viariation. *American journal of physical anthropology* 43, 393-408.

**R**aiborg, C., Wenzel, E.M., Pedersen, N.M., Olsvik, H., Schink, K.O., Schultz, S.W., Vietri, M., Nisi, V., Bucci, C., Brech, A., et al. (2015). Repeated ER-endosome contacts promote endosome translocation and neurite outgrowth. *Nature* 520, 234-238.

Rambow, F., Bechadergue, A., Luciani, F., Gros, G., Domingues, M., Bonaventure, J., Meurice, G., Marine, J.C., and Larue, L. (2016). Regulation of Melanoma Progression through the TCF4/miR-125b/NEDD9 Cascade. *The Journal of investigative dermatology* 136, 1229-1237.

Rambow, F., Job, B., Petit, V., Gesbert, F., Delmas, V., Seberg, H., Meurice, G., Van Otterloo, E., Dessen, P., Robert, C., et al. (2015). New Functional Signatures for Understanding Melanoma Biology from Tumor Cell Lineage-Specific Analysis. *Cell reports* 13, 840-853.

Rapino, F., Delaunay, S., Rambow, F., Zhou, Z., Tharun, L., De Tullio, P., Sin, O., Shostak, K., Schmitz, S., Piepers, J., et al. (2018). Codon-specific translation reprogramming promotes resistance to targeted therapy. *Nature* 558, 605-609.

Raposo, G., and Marks, M.S. (2007). Melanosomes--dark organelles enlighten endosomal membrane transport. *Nature reviews Molecular cell biology* 8, 786-797.



- Rastogi, S., Joshi, B., Dasgupta, P., Morris, M., Wright, K., and Chellappan, S. (2006). Prohibitin facilitates cellular senescence by recruiting specific corepressors to inhibit E2F target genes. *Molecular and cellular biology* 26, 4161-4171.
- Read, A.P., and Newton, V.E. (1997). Waardenburg syndrome. *Journal of medical genetics* 34, 656-665.
- Realini, N., Palese, F., Pizzirani, D., Pontis, S., Basit, A., Bach, A., Ganesan, A., and Piomelli, D. (2016). Acid Ceramidase in Melanoma: EXPRESSION, LOCALIZATION, AND EFFECTS OF PHARMACOLOGICAL INHIBITION. *The Journal of biological chemistry* 291, 2422-2434.
- Realini, N., Solorzano, C., Pagliuca, C., Pizzirani, D., Armirotti, A., Luciani, R., Costi, M.P., Bandiera, T., and Piomelli, D. (2013). Discovery of highly potent acid ceramidase inhibitors with in vitro tumor chemosensitizing activity. *Scientific reports* 3, 1035.
- Reinhardt, J., Landsberg, J., Schmid-Burgk, J.L., Ramis, B.B., Bald, T., Glodde, N., Lopez-Ramos, D., Young, A., Ngiow, S.F., Nettersheim, D., et al. (2017). MAPK Signaling and Inflammation Link Melanoma Phenotype Switching to Induction of CD73 during Immunotherapy. *Cancer research* 77, 4697-4709.
- Repnik, U., Borg Distefano, M., Speth, M.T., Ng, M.Y.W., Progida, C., Hoflack, B., Gruenberg, J., and Griffiths, G. (2017). L-leucyl-L-leucine methyl ester does not release cysteine cathepsins to the cytosol but inactivates them in transiently permeabilized lysosomes. *Journal of cell science* 130, 3124-3140.
- Riboni, L., Bassi, R., and Tettamanti, G. (1994). Effect of brefeldin A on ganglioside metabolism in cultured neurons: implications for the intracellular traffic of gangliosides. *Journal of biochemistry* 116, 140-146.
- Riesenberg, S., Groetchen, A., Siddaway, R., Bald, T., Reinhardt, J., Smorra, D., Kohlmeyer, J., Renn, M., Phung, B., Aymans, P., et al. (2015). MITF and c-Jun antagonism interconnects melanoma dedifferentiation with pro-inflammatory cytokine responsiveness and myeloid cell recruitment. *Nature communications* 6, 8755.
- Robert, C. (2018). Is earlier better for melanoma checkpoint blockade? *Nature medicine* 24, 1645-1648.
- Roh, J.L., Park, J.Y., Kim, E.H., and Jang, H.J. (2016). Targeting acid ceramidase sensitises head and neck cancer to cisplatin. *European journal of cancer* 52, 163-172.
- Rolando, C., Erni, A., Grison, A., Beattie, R., Engler, A., Gokhale, P.J., Milo, M., Wegleiter, T., Jessberger, S., and Taylor, V. (2016). Multipotency of Adult Hippocampal NSCs In Vivo Is Restricted by Drosha/NFIB. *Cell stem cell* 19, 653-662.
- Rosa, R., Marciano, R., Malapelle, U., Formisano, L., Nappi, L., D'Amato, C., D'Amato, V., Damiano, V., Marfe, G., Del Vecchio, S., et al. (2013). Sphingosine kinase 1 overexpression contributes to cetuximab resistance in human colorectal cancer models. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 19, 138-147.

Rosano, L., Spinella, F., and Bagnato, A. (2013). Endothelin 1 in cancer: biological implications and therapeutic opportunities. *Nature reviews Cancer* 13, 637-651.

Rotinen, M., You, S., Yang, J., Coetzee, S.G., Reis-Sobreiro, M., Huang, W.C., Huang, F., Pan, X., Yanez, A., Hazelett, D.J., et al. (2018). ONECUT2 is a targetable master regulator of lethal prostate cancer that suppresses the androgen axis. *Nature medicine* 24, 1887-1898.

Ruckhaberle, E., Holtrich, U., Engels, K., Hanker, L., Gatje, R., Metzler, D., Karn, T., Kaufmann, M., and Rody, A. (2009). Acid ceramidase 1 expression correlates with a better prognosis in ER-positive breast cancer. *Climacteric : the journal of the International Menopause Society* 12, 502-513.

**S**aad, A.F., Meacham, W.D., Bai, A., Anelli, V., Elojeimy, S., Mahdy, A.E., Turner, L.S., Cheng, J., Bielawska, A., Bielawski, J., et al. (2007). The functional effects of acid ceramidase overexpression in prostate cancer progression and resistance to chemotherapy. *Cancer biology & therapy* 6, 1455-1460.

Sabbadini, R.A. (2011). Sphingosine-1-phosphate antibodies as potential agents in the treatment of cancer and age-related macular degeneration. *British journal of pharmacology* 162, 1225-1238.

Sabel, M.S., Liu, Y., Griffith, K.A., He, J., Xie, X., and Lubman, D.M. (2011). Clinical utility of serum autoantibodies detected by protein microarray in melanoma. *International journal of proteomics* 2011, 413742.

Saddoughi, S.A., Garrett-Mayer, E., Chaudhary, U., O'Brien, P.E., Afrin, L.B., Day, T.A., Gillespie, M.B., Sharma, A.K., Wilhoit, C.S., Bostick, R., et al. (2011). Results of a phase II trial of gemcitabine plus doxorubicin in patients with recurrent head and neck cancers: serum C(1)(8)-ceramide as a novel biomarker for monitoring response. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 17, 6097-6105.

Saddoughi, S.A., Gencer, S., Peterson, Y.K., Ward, K.E., Mukhopadhyay, A., Oaks, J., Bielawski, J., Szulc, Z.M., Thomas, R.J., Selvam, S.P., et al. (2013). Sphingosine analogue drug FTY720 targets I2PP2A/SET and mediates lung tumour suppression via activation of PP2A-RIPK1-dependent necroptosis. *EMBO molecular medicine* 5, 105-121.

Saha, B., Singh, S.K., Mallick, S., Bera, R., Datta, P.K., Mandal, M., Roy, S., and Bhadra, R. (2009). Sphingolipid-mediated restoration of Mitf expression and repigmentation in vivo in a mouse model of hair graying. *Pigment cell & melanoma research* 22, 205-218.

Saha, B., Singh, S.K., Sarkar, C., Mallick, S., Bera, R., and Bhadra, R. (2006). Transcriptional activation of tyrosinase gene by human placental sphingolipid. *Glycoconjugate journal* 23, 259-268.

Saied, E.M., and Arenz, C. (2016). Inhibitors of Ceramidases. *Chemistry and physics of lipids* 197, 60-68.

Salas, A., Ponnusamy, S., Senkal, C.E., Meyers-Needham, M., Selvam, S.P., Saddoughi, S.A., Apohan, E., Sentelle, R.D., Smith, C., Gault, C.R., et al. (2011). Sphingosine kinase-1 and sphingosine

1-phosphate receptor 2 mediate Bcr-Abl1 stability and drug resistance by modulation of protein phosphatase 2A. *Blood* 117, 5941-5952.

Samsel, L., Zaidel, G., Drumgoole, H.M., Jelovac, D., Drachenberg, C., Rhee, J.G., Brodie, A.M., Bielawska, A., and Smyth, M.J. (2004). The ceramide analog, B13, induces apoptosis in prostate cancer cell lines and inhibits tumor growth in prostate cancer xenografts. *The Prostate* 58, 382-393.

Sancak, Y., Bar-Peled, L., Zoncu, R., Markhard, A.L., Nada, S., and Sabatini, D.M. (2010). Ragulator-Rag complex targets mTORC1 to the lysosomal surface and is necessary for its activation by amino acids. *Cell* 141, 290-303.

Sanchez, I., Hughes, R.T., Mayer, B.J., Yee, K., Woodgett, J.R., Avruch, J., Kyriakis, J.M., and Zon, L.I. (1994). Role of SAPK/ERK kinase-1 in the stress-activated pathway regulating transcription factor c-Jun. *Nature* 372, 794-798.

Sanger, N., Ruckhaberle, E., Gyorffy, B., Engels, K., Heinrich, T., Fehm, T., Graf, A., Holtrich, U., Becker, S., and Karn, T. (2015). Acid ceramidase is associated with an improved prognosis in both DCIS and invasive breast cancer. *Molecular oncology* 9, 58-67.

Sardiello, M., Palmieri, M., di Ronza, A., Medina, D.L., Valenza, M., Gennarino, V.A., Di Malta, C., Donaudy, F., Embrione, V., Polishchuk, R.S., et al. (2009). A gene network regulating lysosomal biogenesis and function. *Science* 325, 473-477.

Sato, S., Ueyama, T., Fukui, H., Miyazaki, K., and Kuwano, M. (1999). [Anti-tumor effects of carmofur on human 5-FU resistant cells]. *Gan to kagaku ryoho Cancer & chemotherapy* 26, 1613-1616.

Schuchman, E.H. (2016). Acid ceramidase and the treatment of ceramide diseases: The expanding role of enzyme replacement therapy. *Biochimica et biophysica acta* 1862, 1459-1471.

Schultze, G., and Lang, E.K. (1960). Disseminated lipogranulomatosis: report of a case. *Radiology* 74, 428-431.

Schulze, H., Schepers, U., and Sandhoff, K. (2007). Overexpression and mass spectrometry analysis of mature human acid ceramidase. *Biological chemistry* 388, 1333-1343.

Schwahn, D.J., Timchenko, N.A., Shibahara, S., and Medrano, E.E. (2005). Dynamic regulation of the human dopachrome tautomerase promoter by MITF, ER-alpha and chromatin remodelers during proliferation and senescence of human melanocytes. *Pigment cell research / sponsored by the European Society for Pigment Cell Research and the International Pigment Cell Society* 18, 203-213.

Segura, M.F., Hanniford, D., Menendez, S., Reavie, L., Zou, X., Alvarez-Diaz, S., Zakrzewski, J., Blochin, E., Rose, A., Bogunovic, D., et al. (2009). Aberrant miR-182 expression promotes melanoma metastasis by repressing FOXO3 and microphthalmia-associated transcription factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106, 1814-1819.

Seiji, M., Fitzpatrick, T.B., and Birbeck, M.S. (1961). The melanosome: a distinctive subcellular particle of mammalian melanocytes and the site of melanogenesis. *The Journal of investigative dermatology* 36, 243-252.

Selzner, M., Bielawska, A., Morse, M.A., Rudiger, H.A., Sindram, D., Hannun, Y.A., and Clavien, P.A. (2001). Induction of apoptotic cell death and prevention of tumor growth by ceramide analogues in metastatic human colon cancer. *Cancer research* 61, 1233-1240.

Senkal, C.E., Ponnusamy, S., Bielawski, J., Hannun, Y.A., and Ogretmen, B. (2010). Antiapoptotic roles of ceramide-synthase-6-generated C16-ceramide via selective regulation of the ATF6/CHOP arm of ER-stress-response pathways. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 24, 296-308.

Senkal, C.E., Ponnusamy, S., Manevich, Y., Meyers-Needham, M., Saddoughi, S.A., Mukhopadhyay, A., Dent, P., Bielawski, J., and Ogretmen, B. (2011). Alteration of ceramide synthase 6/C16-ceramide induces activating transcription factor 6-mediated endoplasmic reticulum (ER) stress and apoptosis via perturbation of cellular Ca<sup>2+</sup> and ER/Golgi membrane network. *The Journal of biological chemistry* 286, 42446-42458.

Senkal, C.E., Ponnusamy, S., Rossi, M.J., Bialewski, J., Sinha, D., Jiang, J.C., Jazwinski, S.M., Hannun, Y.A., and Ogretmen, B. (2007). Role of human longevity assurance gene 1 and C18-ceramide in chemotherapy-induced cell death in human head and neck squamous cell carcinomas. *Molecular cancer therapeutics* 6, 712-722.

Serasinghe, M.N., Missert, D.J., Ascioffa, J.J., Podgrabinska, S., Wieder, S.Y., Izadmehr, S., Belbin, G., Skobe, M., and Chipuk, J.E. (2015). Anti-apoptotic BCL-2 proteins govern cellular outcome following B-RAF(V600E) inhibition and can be targeted to reduce resistance. *Oncogene* 34, 857-867.

Shain, A.H., Yeh, I., Kovalyshyn, I., Sriharan, A., Talevich, E., Gagnon, A., Dummer, R., North, J., Pincus, L., Ruben, B., et al. (2015). The Genetic Evolution of Melanoma from Precursor Lesions. *The New England journal of medicine* 373, 1926-1936.

Sharma, P., Hu-Lieskovan, S., Wargo, J.A., and Ribas, A. (2017). Primary, Adaptive, and Acquired Resistance to Cancer Immunotherapy. *Cell* 168, 707-723.

Shi, H., Moriceau, G., Kong, X., Lee, M.K., Lee, H., Koya, R.C., Ng, C., Chodon, T., Scolyer, R.A., Dahlman, K.B., et al. (2012). Melanoma whole-exome sequencing identifies (V600E)B-RAF amplification-mediated acquired B-RAF inhibitor resistance. *Nature communications* 3, 724.

Shtraizent, N., Eliyahu, E., Park, J.H., He, X., Shalgi, R., and Schuchman, E.H. (2008). Autoproteolytic cleavage and activation of human acid ceramidase. *The Journal of biological chemistry* 283, 11253-11259.

Simon, B., and Uslu, U. (2018). CAR-T cell therapy in melanoma: A future success story? *Experimental dermatology* 27, 1315-1321.

Singh, S.K., Sarkar, C., Mallick, S., Saha, B., Bera, R., and Bhadra, R. (2005). Human placental lipid induces melanogenesis through p38 MAPK in B16F10 mouse melanoma. *Pigment cell research /*

sponsored by the European Society for Pigment Cell Research and the International Pigment Cell Society 18, 113-121.

Smalley, K.S., Lioni, M., Dalla Palma, M., Xiao, M., Desai, B., Egyhazi, S., Hansson, J., Wu, H., King, A.J., Van Belle, P., et al. (2008). Increased cyclin D1 expression can mediate BRAF inhibitor resistance in BRAF V600E-mutated melanomas. *Molecular cancer therapeutics* 7, 2876-2883.

Smith, E.L., and Schuchman, E.H. (2008). Acid sphingomyelinase overexpression enhances the antineoplastic effects of irradiation in vitro and in vivo. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 16, 1565-1571.

Smith, M.P., Sanchez-Laorden, B., O'Brien, K., Brunton, H., Ferguson, J., Young, H., Dhomen, N., Flaherty, K.T., Frederick, D.T., Cooper, Z.A., et al. (2014). The immune microenvironment confers resistance to MAPK pathway inhibitors through macrophage-derived TNFalpha. *Cancer discovery* 4, 1214-1229.

Sonnino, S., Prinetti, A., Mauri, L., Chigorno, V., and Tettamanti, G. (2006). Dynamic and structural properties of sphingolipids as driving forces for the formation of membrane domains. *Chemical reviews* 106, 2111-2125.

Sorli, S.C., Colie, S., Albinet, V., Dubrac, A., Touriol, C., Guilbaud, N., Bedia, C., Fabrias, G., Casas, J., Segui, B., et al. (2013). The nonlysosomal beta-glucosidase GBA2 promotes endoplasmic reticulum stress and impairs tumorigenicity of human melanoma cells. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 27, 489-498.

Spranger, S., Bao, R., and Gajewski, T.F. (2015). Melanoma-intrinsic beta-catenin signalling prevents anti-tumour immunity. *Nature* 523, 231-235.

Stahl, J.M., Sharma, A., Cheung, M., Zimmerman, M., Cheng, J.Q., Bosenberg, M.W., Kester, M., Sandirasegarane, L., and Robertson, G.P. (2004). Deregulated Akt3 activity promotes development of malignant melanoma. *Cancer research* 64, 7002-7010.

Steingrimsson, E., Moore, K.J., Lamoreux, M.L., Ferre-D'Amare, A.R., Burley, S.K., Zimring, D.C., Skow, L.C., Hodgkinson, C.A., Arnheiter, H., Copeland, N.G., et al. (1994). Molecular basis of mouse microphthalmia (mi) mutations helps explain their developmental and phenotypic consequences. *Nature genetics* 8, 256-263.

Stelzl, U., Worm, U., Lalowski, M., Haenig, C., Brembeck, F.H., Goehler, H., Stroedicke, M., Zenkner, M., Schoenherr, A., Koeppen, S., et al. (2005). A human protein-protein interaction network: a resource for annotating the proteome. *Cell* 122, 957-968.

Stoll, G., Bindea, G., Mlecnik, B., Galon, J., Zitvogel, L., and Kroemer, G. (2015). Meta-analysis of organ-specific differences in the structure of the immune infiltrate in major malignancies. *Oncotarget* 6, 11894-11909.

Stover, T., and Kester, M. (2003). Liposomal delivery enhances short-chain ceramide-induced apoptosis of breast cancer cells. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 307, 468-475.

Stover, T.C., Sharma, A., Robertson, G.P., and Kester, M. (2005). Systemic delivery of liposomal short-chain ceramide limits solid tumor growth in murine models of breast adenocarcinoma. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 11, 3465-3474.

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

Strelow, A., Bernardo, K., Adam-Klages, S., Linke, T., Sandhoff, K., Kronke, M., and Adam, D. (2000). Overexpression of acid ceramidase protects from tumor necrosis factor-induced cell death. *The Journal of experimental medicine* 192, 601-612.

Strub, T., Ghiraldini, F.G., Carcamo, S., Li, M., Wroblewska, A., Singh, R., Goldberg, M.S., Hasson, D., Wang, Z., Gallagher, S.J., et al. (2018). SIRT6 haploinsufficiency induces BRAF(V600E) melanoma cell resistance to MAPK inhibitors via IGF signalling. *Nature communications* 9, 3440.

Strub, T., Giuliano, S., Ye, T., Bonet, C., Keime, C., Kobi, D., Le Gras, S., Cormont, M., Ballotti, R., Bertolotto, C., et al. (2011). Essential role of microphthalmia transcription factor for DNA replication, mitosis and genomic stability in melanoma. *Oncogene* 30, 2319-2332.

Struckhoff, A.P., Bittman, R., Burow, M.E., Clejan, S., Elliott, S., Hammond, T., Tang, Y., and Beckman, B.S. (2004). Novel ceramide analogs as potential chemotherapeutic agents in breast cancer. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 309, 523-532.

Sugita, M., Dulaney, J.T., and Moser, H.W. (1972). Ceramidase deficiency in Farber's disease (lipogranulomatosis). *Science* 178, 1100-1102.

Sugita, M., Willians, M., Dulaney, J.T., and Moser, H.W. (1975). Ceramidase and ceramide synthesis in human kidney and cerebellum. Description of a new alkaline ceramidase. *Biochimica et biophysica acta* 398, 125-131.

Sun, C., Wang, L., Huang, S., Heynen, G.J., Prahallad, A., Robert, C., Haanen, J., Blank, C., Wesseling, J., Willems, S.M., et al. (2014a). Reversible and adaptive resistance to BRAF(V600E) inhibition in melanoma. *Nature* 508, 118-122.

Sun, Y., Shen, S., Liu, X., Tang, H., Wang, Z., Yu, Z., Li, X., and Wu, M. (2014b). MiR-429 inhibits cells growth and invasion and regulates EMT-related marker genes by targeting Onecut2 in colorectal carcinoma. *Molecular and cellular biochemistry* 390, 19-30.

Sviderskaya, E.V., Hill, S.P., Evans-Whipp, T.J., Chin, L., Orlow, S.J., Easty, D.J., Cheong, S.C., Beach, D., DePinho, R.A., and Bennett, D.C. (2002). p16(Ink4a) in melanocyte senescence and differentiation. *Journal of the National Cancer Institute* 94, 446-454.

Swanton, C., Marani, M., Pardo, O., Warne, P.H., Kelly, G., Sahai, E., Elustondo, F., Chang, J., Temple, J., Ahmed, A.A., et al. (2007). Regulators of mitotic arrest and ceramide metabolism are determinants of sensitivity to paclitaxel and other chemotherapeutic drugs. *Cancer cell* 11, 498-512.

Szulc, Z.M., Mayroo, N., Bai, A., Bielawski, J., Liu, X., Norris, J.S., Hannun, Y.A., and Bielawska, A. (2008). Novel analogs of D-e-MAPP and B13. Part 1: synthesis and evaluation as potential anticancer agents. *Bioorganic & medicinal chemistry* 16, 1015-1031.

**T**achibana, M. (1999). A cascade of genes related to Waardenburg syndrome. *The journal of investigative dermatology Symposium proceedings* 4, 126-129.

Tachibana, M., Perez-Jurado, L.A., Nakayama, A., Hodgkinson, C.A., Li, X., Schneider, M., Miki, T., Fex, J., Francke, U., and Arnheiter, H. (1994). Cloning of MITF, the human homolog of the mouse microphthalmia gene and assignment to chromosome 3p14.1-p12.3. *Human molecular genetics* 3, 553-557.

Takeda, K., Takemoto, C., Kobayashi, I., Watanabe, A., Nobukuni, Y., Fisher, D.E., and Tachibana, M. (2000a). Ser298 of MITF, a mutation site in Waardenburg syndrome type 2, is a phosphorylation site with functional significance. *Human molecular genetics* 9, 125-132.

Takeda, K., Yasumoto, K., Takada, R., Takada, S., Watanabe, K., Udono, T., Saito, H., Takahashi, K., and Shibahara, S. (2000b). Induction of melanocyte-specific microphthalmia-associated transcription factor by Wnt-3a. *The Journal of biological chemistry* 275, 14013-14016.

Tamiya-Koizumi, K., Umekawa, H., Yoshida, S., and Kojima, K. (1989). Existence of Mg<sup>2+</sup>-dependent, neutral sphingomyelinase in nuclei of rat ascites hepatoma cells. *Journal of biochemistry* 106, 593-598.

Tang, Y., Cao, K., Wang, Q., Chen, J., Liu, R., Wang, S., Zhou, J., and Xie, H. (2016). Silencing of CerS6 increases the invasion and glycolysis of melanoma WM35, WM451 and SK28 cell lines via increased GLUT1-induced downregulation of WNT5A. *Oncology reports* 35, 2907-2915.

Tay, K.H., Liu, X., Chi, M., Jin, L., Jiang, C.C., Guo, S.T., Verrills, N.M., Tseng, H.Y., and Zhang, X.D. (2015). Involvement of vacuolar H(+)-ATPase in killing of human melanoma cells by the sphingosine kinase analogue FTY720. *Pigment cell & melanoma research* 28, 171-183.

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

Thomas, A.J., and Erickson, C.A. (2009). FOXD3 regulates the lineage switch between neural crest-derived glial cells and pigment cells by repressing MITF through a non-canonical mechanism. *Development* 136, 1849-1858.

Tirodkar, T.S., Lu, P., Bai, A., Scheffel, M.J., Gencer, S., Garrett-Mayer, E., Bielawska, A., Ogretmen, B., and Voelkel-Johnson, C. (2015). Expression of Ceramide Synthase 6 Transcriptionally Activates Acid Ceramidase in a c-Jun N-terminal Kinase (JNK)-dependent Manner. *The Journal of biological chemistry* 290, 13157-13167.

Tirosh, I., Izar, B., Prakadan, S.M., Wadsworth, M.H., 2nd, Treacy, D., Trombetta, J.J., Rotem, A., Rodman, C., Lian, C., Murphy, G., et al. (2016). Dissecting the multicellular ecosystem of metastatic melanoma by single-cell RNA-seq. *Science* 352, 189-196.

Trimmer, C., Whitaker-Menezes, D., Bonuccelli, G., Milliman, J.N., Daumer, K.M., Aplin, A.E., Pestell, R.G., Sotgia, F., Lisanti, M.P., and Capozza, F. (2010). CAV1 inhibits metastatic potential in melanomas through suppression of the integrin/Src/FAK signaling pathway. *Cancer research* 70, 7489-7499.

Truman, J.P., Garcia-Barros, M., Obeid, L.M., and Hannun, Y.A. (2014). Evolving concepts in cancer therapy through targeting sphingolipid metabolism. *Biochimica et biophysica acta* 1841, 1174-1188.

Tsao, H., Goel, V., Wu, H., Yang, G., and Haluska, F.G. (2004). Genetic interaction between NRAS and BRAF mutations and PTEN/MMAC1 inactivation in melanoma. *The Journal of investigative dermatology* 122, 337-341.

Turner, L.S., Cheng, J.C., Beckham, T.H., Keane, T.E., Norris, J.S., and Liu, X. (2011). Autophagy is increased in prostate cancer cells overexpressing acid ceramidase and enhances resistance to C6 ceramide. *Prostate cancer and prostatic diseases* 14, 30-37.

**U**rra, H., Torres, V.A., Ortiz, R.J., Lobos, L., Diaz, M.I., Diaz, N., Hartel, S., Leyton, L., and Quest, A.F. (2012). Caveolin-1-enhanced motility and focal adhesion turnover require tyrosine-14 but not accumulation to the rear in metastatic cancer cells. *PloS one* 7, e33085.

**V**alverde, P., Healy, E., Jackson, I., Rees, J.L., and Thody, A.J. (1995). Variants of the melanocyte-stimulating hormone receptor gene are associated with red hair and fair skin in humans. *Nature genetics* 11, 328-330.

Valverde, P., Manning, P., Todd, C., McNeil, C.J., and Thody, A.J. (1996). Tyrosinase may protect human melanocytes from the cytotoxic effects of the superoxide anion. *Experimental dermatology* 5, 247-253.

van der Weyden, L., Arends, M.J., Campbell, A.D., Bald, T., Wardle-Jones, H., Griggs, N., Velasco-Herrera, M.D., Tuting, T., Sansom, O.J., Karp, N.A., et al. (2017). Genome-wide in vivo screen identifies novel host regulators of metastatic colonization. *Nature* 541, 233-236.

van Hell, A.J., Haimovitz-Friedman, A., Fuks, Z., Tap, W.D., and Kolesnick, R. (2017). Gemcitabine kills proliferating endothelial cells exclusively via acid sphingomyelinase activation. *Cellular signalling* 34, 86-91.

Vance, K.W., Carreira, S., Brosch, G., and Goding, C.R. (2005). Tbx2 is overexpressed and plays an important role in maintaining proliferation and suppression of senescence in melanomas. *Cancer research* 65, 2260-2268.

Vance, K.W., and Goding, C.R. (2004). The transcription network regulating melanocyte development and melanoma. *Pigment cell research / sponsored by the European Society for Pigment Cell Research and the International Pigment Cell Society* 17, 318-325.



Vejselova, D., Kutlu, H.M., and Kus, G. (2016). Examining impacts of ceranib-2 on the proliferation, morphology and ultrastructure of human breast cancer cells. *Cytotechnology* 68, 2721-2728.

Venable, M.E., Lee, J.Y., Smyth, M.J., Bielawska, A., and Obeid, L.M. (1995). Role of ceramide in cellular senescence. *The Journal of biological chemistry* 270, 30701-30708.

Vesuna, F., van Diest, P., Chen, J.H., and Raman, V. (2008). Twist is a transcriptional repressor of E-cadherin gene expression in breast cancer. *Biochemical and biophysical research communications* 367, 235-241.

Vethakanraj, H.S., Babu, T.A., Sudarsanan, G.B., Duraisamy, P.K., and Ashok Kumar, S. (2015). Targeting ceramide metabolic pathway induces apoptosis in human breast cancer cell lines. *Biochemical and biophysical research communications* 464, 833-839.

Villanueva, J., Vultur, A., Lee, J.T., Somasundaram, R., Fukunaga-Kalabis, M., Cipolla, A.K., Wubbenhorst, B., Xu, X., Gimotty, P.A., Kee, D., et al. (2010). Acquired resistance to BRAF inhibitors mediated by a RAF kinase switch in melanoma can be overcome by cotargeting MEK and IGF-1R/PI3K. *Cancer cell* 18, 683-695.

Viros, A., Sanchez-Laorden, B., Pedersen, M., Furney, S.J., Rae, J., Hogan, K., Ejima, S., Girotti, M.R., Cook, M., Dhomen, N., et al. (2014). Ultraviolet radiation accelerates BRAF-driven melanomagenesis by targeting TP53. *Nature* 511, 478-482.

Visentin, B., Vekich, J.A., Sibbald, B.J., Cavalli, A.L., Moreno, K.M., Matteo, R.G., Garland, W.A., Lu, Y., Yu, S., Hall, H.S., et al. (2006). Validation of an anti-sphingosine-1-phosphate antibody as a potential therapeutic in reducing growth, invasion, and angiogenesis in multiple tumor lineages. *Cancer cell* 9, 225-238.

Vitiello, M., Tuccoli, A., D'Aurizio, R., Sarti, S., Gianecchini, L., Lubrano, S., Marranci, A., Evangelista, M., Peppicelli, S., Ippolito, C., et al. (2017). Context-dependent miR-204 and miR-211 affect the biological properties of amelanotic and melanotic melanoma cells. *Oncotarget* 8, 25395-25417.

**W**agle, N., Emery, C., Berger, M.F., Davis, M.J., Sawyer, A., Pochanard, P., Kehoe, S.M., Johannessen, C.M., Macconail, L.E., Hahn, W.C., et al. (2011). Dissecting therapeutic resistance to RAF inhibition in melanoma by tumor genomic profiling. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 29, 3085-3096.

Wang, C., Zhao, L., Su, Q., Fan, X., Wang, Y., Gao, S., Wang, H., Chen, H., Chan, C.B., and Liu, Z. (2016). Phosphorylation of MITF by AKT affects its downstream targets and causes TP53-dependent cell senescence. *The international journal of biochemistry & cell biology* 80, 132-142.

Wang, F., Van Brocklyn, J.R., Edsall, L., Nava, V.E., and Spiegel, S. (1999). Sphingosine-1-phosphate inhibits motility of human breast cancer cells independently of cell surface receptors. *Cancer research* 59, 6185-6191.

Wang, Y., Ou, Z., Sun, Y., Yeh, S., Wang, X., Long, J., and Chang, C. (2017). Androgen receptor promotes melanoma metastasis via altering the miRNA-539-3p/USP13/MITF/AXL signals. *Oncogene* 36, 1644-1654.

Warburg, O. (1956). On respiratory impairment in cancer cells. *Science* 124, 269-270.

Watanabe, A., Takeda, K., Ploplis, B., and Tachibana, M. (1998). Epistatic relationship between Waardenburg syndrome genes MITF and PAX3. *Nature genetics* 18, 283-286.

Watanabe, M., Kodaira, S., Takahashi, T., Tominaga, T., Hojo, K., Kato, T., Kunitomo, K., Isomoto, H., Ohashi, Y., and Yasutomi, M. (2006). Randomized trial of the efficacy of adjuvant chemotherapy for colon cancer with combination therapy incorporating the oral pyrimidine 1-hexylcarbamoyl-5-fluorouracil. *Langenbeck's archives of surgery* 391, 330-337.

Watson, C., Long, J.S., Orange, C., Tannahill, C.L., Mallon, E., McGlynn, L.M., Pyne, S., Pyne, N.J., and Edwards, J. (2010). High expression of sphingosine 1-phosphate receptors, S1P1 and S1P3, sphingosine kinase 1, and extracellular signal-regulated kinase-1/2 is associated with development of tamoxifen resistance in estrogen receptor-positive breast cancer patients. *The American journal of pathology* 177, 2205-2215.

Watson, I.R., Li, L., Cabeceiras, P.K., Mahdavi, M., Gutschner, T., Genovese, G., Wang, G., Fang, Z., Tepper, J.M., Stemke-Hale, K., et al. (2014). The RAC1 P29S hotspot mutation in melanoma confers resistance to pharmacological inhibition of RAF. *Cancer research* 74, 4845-4852.

Webster, M.R., Xu, M., Kinzler, K.A., Kaur, A., Appleton, J., O'Connell, M.P., Marchbank, K., Valiga, A., Dang, V.M., Perego, M., et al. (2015). Wnt5A promotes an adaptive, senescent-like stress response, while continuing to drive invasion in melanoma cells. *Pigment cell & melanoma research* 28, 184-195.

Weeraratna, A.T., Jiang, Y., Hostetter, G., Rosenblatt, K., Duray, P., Bittner, M., and Trent, J.M. (2002). Wnt5a signaling directly affects cell motility and invasion of metastatic melanoma. *Cancer cell* 1, 279-288.

Wellbrock, C., and Arozarena, I. (2015). Microphthalmia-associated transcription factor in melanoma development and MAP-kinase pathway targeted therapy. *Pigment cell & melanoma research* 28, 390-406.

Wellbrock, C., and Marais, R. (2005). Elevated expression of MITF counteracts B-RAF-stimulated melanocyte and melanoma cell proliferation. *The Journal of cell biology* 170, 703-708.

Wellbrock, C., Rana, S., Paterson, H., Pickersgill, H., Brummelkamp, T., and Marais, R. (2008). Oncogenic BRAF regulates melanoma proliferation through the lineage specific factor MITF. *PLoS one* 3, e2734.

White, E. (2012). Deconvoluting the context-dependent role for autophagy in cancer. *Nature reviews Cancer* 12, 401-410.

Wick, M.M., Byers, L., and Frei, E., 3rd (1977). L-dopa: selective toxicity for melanoma cells in vitro. *Science* 197, 468-469.

Widlund, H.R., Horstmann, M.A., Price, E.R., Cui, J., Lessnick, S.L., Wu, M., He, X., and Fisher, D.E. (2002). Beta-catenin-induced melanoma growth requires the downstream target Microphthalmia-associated transcription factor. *The Journal of cell biology* 158, 1079-1087.

Widmer, D.S., Cheng, P.F., Eichhoff, O.M., Belloni, B.C., Zipser, M.C., Schlegel, N.C., Javelaud, D., Mauviel, A., Dummer, R., and Hoek, K.S. (2012). Systematic classification of melanoma cells by phenotype-specific gene expression mapping. *Pigment cell & melanoma research* 25, 343-353.

Wiedemann, G.M., Aithal, C., Kraechan, A., Heise, C., Cadilha, B.L., Zhang, J., Duewell, P., Ballotti, R., Endres, S., Bertolotto, C., et al. (2018). Microphthalmia-Associated Transcription Factor (MITF) Regulates Immune Cell Migration into Melanoma. *Translational oncology* 12, 350-360.

Wroblewski, D., Mijatov, B., Mohana-Kumaran, N., Lai, F., Gallagher, S.J., Haass, N.K., Zhang, X.D., and Hersey, P. (2013). The BH3-mimetic ABT-737 sensitizes human melanoma cells to apoptosis induced by selective BRAF inhibitors but does not reverse acquired resistance. *Carcinogenesis* 34, 237-247.

Wu, G., Zhu, Y.Z., and Zhang, J.C. (2014). Sox4 up-regulates Cyr61 expression in colon cancer cells. *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology* 34, 405-412.

Wu, K.N., Queenan, M., Brody, J.R., Potoczek, M., Sotgia, F., Lisanti, M.P., and Witkiewicz, A.K. (2011). Loss of stromal caveolin-1 expression in malignant melanoma metastases predicts poor survival. *Cell cycle* 10, 4250-4255.

Wu, M., Hemesath, T.J., Takemoto, C.M., Horstmann, M.A., Wells, A.G., Price, E.R., Fisher, D.Z., and Fisher, D.E. (2000). c-Kit triggers dual phosphorylations, which couple activation and degradation of the essential melanocyte factor Mi. *Genes & development* 14, 301-312.

Wu, X., and Hammer, J.A. (2014). Melanosome transfer: it is best to give and receive. *Current opinion in cell biology* 29, 1-7.

Wu, X.S., Rao, K., Zhang, H., Wang, F., Sellers, J.R., Matesic, L.E., Copeland, N.G., Jenkins, N.A., and Hammer, J.A., 3rd (2002). Identification of an organelle receptor for myosin-Va. *Nature cell biology* 4, 271-278.

**X**ia, M., Chen, K., Yao, X., Xu, Y., Yao, J., Yan, J., Shao, Z., and Wang, G. (2017). Mediator MED23 Links Pigmentation and DNA Repair through the Transcription Factor MITF. *Cell reports* 20, 1794-1804.

Xu, R., Wang, K., Mileva, I., Hannun, Y.A., Obeid, L.M., and Mao, C. (2016). Alkaline ceramidase 2 and its bioactive product sphingosine are novel regulators of the DNA damage response. *Oncotarget* 7, 18440-18457.

Xu, W., Gong, L., Haddad, M.M., Bischof, O., Campisi, J., Yeh, E.T., and Medrano, E.E. (2000). Regulation of microphthalmia-associated transcription factor MITF protein levels by association with the ubiquitin-conjugating enzyme hUBC9. *Experimental cell research* 255, 135-143.

**Y**amanaka, M., Shegogue, D., Pei, H., Bu, S., Bielawska, A., Bielawski, J., Pettus, B., Hannun, Y.A., Obeid, L., and Trojanowska, M. (2004). Sphingosine kinase 1 (SPHK1) is induced by transforming growth factor-beta and mediates TIMP-1 up-regulation. *The Journal of biological chemistry* 279, 53994-54001.

Yasui, H., Hideshima, T., Raje, N., Roccaro, A.M., Shiraishi, N., Kumar, S., Hamasaki, M., Ishitsuka, K., Tai, Y.T., Podar, K., et al. (2005). FTY720 induces apoptosis in multiple myeloma cells and overcomes drug resistance. *Cancer research* 65, 7478-7484.

Yeh, E., Cunningham, M., Arnold, H., Chasse, D., Monteith, T., Ivaldi, G., Hahn, W.C., Stukenberg, P.T., Shenolikar, S., Uchida, T., et al. (2004). A signalling pathway controlling c-Myc degradation that impacts oncogenic transformation of human cells. *Nature cell biology* 6, 308-318.

Yin, Y., Zhao, B., Li, D., and Yin, G. (2018). Long non-coding RNA CASC15 promotes melanoma progression by epigenetically regulating PDCD4. *Cell & bioscience* 8, 42.

Yu, F.P.S., Dworski, S., and Medin, J.A. (2018). Deletion of MCP-1 Impedes Pathogenesis of Acid Ceramidase Deficiency. *Scientific reports* 8, 1808.

Yu, H., McDaid, R., Lee, J., Possik, P., Li, L., Kumar, S.M., Elder, D.E., Van Belle, P., Gimotty, P., Guerra, M., et al. (2009). The role of BRAF mutation and p53 inactivation during transformation of a subpopulation of primary human melanocytes. *The American journal of pathology* 174, 2367-2377.

**Z**aky, A., Busso, C., Izumi, T., Chattopadhyay, R., Bassiouny, A., Mitra, S., and Bhakat, K.K. (2008). Regulation of the human AP-endonuclease (APE1/Ref-1) expression by the tumor suppressor p53 in response to DNA damage. *Nucleic acids research* 36, 1555-1566.

Zeidan, Y.H., Pettus, B.J., Elojeimy, S., Taha, T., Obeid, L.M., Kawamori, T., Norris, J.S., and Hannun, Y.A. (2006). Acid ceramidase but not acid sphingomyelinase is required for tumor necrosis factor- $\alpha$ -induced PGE2 production. *The Journal of biological chemistry* 281, 24695-24703.

Zetterstrom, R. (1958). Disseminated lipogranulomatosis (Farber's disease). *Acta paediatrica* 47, 501-510.

Zhang, G., Frederick, D.T., Wu, L., Wei, Z., Krepler, C., Srinivasan, S., Chae, Y.C., Xu, X., Choi, H., Dimwamwa, E., et al. (2016). Targeting mitochondrial biogenesis to overcome drug resistance to MAPK inhibitors. *The Journal of clinical investigation* 126, 1834-1856.

Zhang, P., Fu, C., Hu, Y., Dong, C., Song, Y., and Song, E. (2015). C6-ceramide nanoliposome suppresses tumor metastasis by eliciting PI3K and PKC $\zeta$  tumor-suppressive activities and regulating integrin affinity modulation. *Scientific reports* 5, 9275.

- Zhang, X.C., Piccini, A., Myers, M.P., Van Aelst, L., and Tonks, N.K. (2012). Functional analysis of the protein phosphatase activity of PTEN. *The Biochemical journal* 444, 457-464.
- Zhang, Y., Yao, B., Delikat, S., Bayoumy, S., Lin, X.H., Basu, S., McGinley, M., Chan-Hui, P.Y., Lichenstein, H., and Kolesnick, R. (1997). Kinase suppressor of Ras is ceramide-activated protein kinase. *Cell* 89, 63-72.
- Zhao, H., Zhang, J., Shao, H., Liu, J., Jin, M., Chen, J., and Huang, Y. (2017). miRNA-340 inhibits osteoclast differentiation via repression of MITF. *Bioscience reports* 37.
- Zhao, J., Liu, J., Lee, J.F., Zhang, W., Kandouz, M., VanHecke, G.C., Chen, S., Ahn, Y.H., Lonardo, F., and Lee, M.J. (2016). TGF-beta/SMAD3 Pathway Stimulates Sphingosine-1 Phosphate Receptor 3 Expression: IMPLICATION OF SPHINGOSINE-1 PHOSPHATE RECEPTOR 3 IN LUNG ADENOCARCINOMA PROGRESSION. *The Journal of biological chemistry* 291, 27343-27353.
- Zhao, X., Fiske, B., Kawakami, A., Li, J., and Fisher, D.E. (2011). Regulation of MITF stability by the USP13 deubiquitinase. *Nature communications* 2, 414.
- Zhou, J., Tawk, M., Tiziano, F.D., Veillet, J., Bayes, M., Nolent, F., Garcia, V., Servidei, S., Bertini, E., Castro-Giner, F., et al. (2012). Spinal muscular atrophy associated with progressive myoclonic epilepsy is caused by mutations in *ASAH1*. *American journal of human genetics* 91, 5-14.
- Zhou, L., Li, Y., Nie, T., Feng, S., Yuan, J., Chen, H., and Yang, Z. (2007). Clenbuterol inhibits SREBP-1c expression by activating CREB1. *Journal of biochemistry and molecular biology* 40, 525-531.
- Zhu, S., Wurdak, H., Wang, Y., Galkin, A., Tao, H., Li, J., Lyssiotis, C.A., Yan, F., Tu, B.P., Miraglia, L., et al. (2009). A genomic screen identifies *TYRO3* as a MITF regulator in melanoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106, 17025-17030.
- Zou, Y., Fan, G., and Wang, X. (2016). Pre-clinical assessment of A-674563 as an anti-melanoma agent. *Biochemical and biophysical research communications* 477, 1-8.

## **ANNEXES**

**Article 3: Deciphering the role of oncogenic MITF<sup>E318K</sup> in senescence delay and melanoma progression.**

**Article 4: Focus on cutaneous and uveal melanoma specificities.**

**Article 5: Pathways from senescence to melanoma: focus on MITF sumoylation.**

## ARTICLE

# Deciphering the Role of Oncogenic MITF<sup>E318K</sup> in Senescence Delay and Melanoma Progression

Caroline Bonet\*, Flavie Luciani\*, Jean-François Ottavi\*, Justine Leclerc, Fanélie-Marie Jouenne, Marina Boncompagni, Karine Bille, Véronique Hofman, Guillaume Bossis, Gian Marco de Donatis, Thomas Strub, Yann Cheli, Mickaël Ohanna, Frédéric Luciano, Sandrine Marchetti, Stéphane Rocchi, Marie-Christine Birling, Marie-Françoise Avril, Nicolas Poulalhon, Thomas Luc, Corine Bertolotto

**Affiliations of authors:** INSERM, U1065 (équipe 1), Equipe labélisée ARC 2016, C3M, Nice, France (CBo, JFO, JL, MB, KB, YC, MO, SR, CBe); University of Nice Sophia-Antipolis, UFR Médecine, Nice, France (CBo, JFO, JL, MB, KB, VH, YC, MO, SR, CBe); Center for Human Genetics, KU Leuven, Leuven, Belgium (FL); Center for the Biology of Disease, VIB, Leuven, Belgium (FL); Service de Génétique, Institut de Cancérologie Gustave Roussy, Villejuif, France (FMJ); Inserm, ER121/EA 4319, Nice, France (VH); CNRS-UMR 5535, Montpellier, France (GB); INSERM, U1065 (équipe 12), C3M, Nice, France (GMdD); Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire, CNRS, INSERM, Université de Strasbourg, Illkirch, France (TS); INSERM, U1065 (équipe 2), C3M, Nice, France (FL, SM); Institut Clinique de la Souris-Mouse Clinical Institute, Illkirch, France (MGB); AP-HP, Hôpital Cochin -Tarnier, Service de Dermatologie et Faculté Paris Descartes, Paris, France (MFA); Centre Hospitalier Universitaire de Lyon, Department of Dermatology, Lyon, France (NP, TL).

See the Notes section for the full list of authors and affiliations.

**Correspondence to:** Corine Bertolotto, PhD, INSERM, U1065 (équipe 1), Equipe labélisée ARC 2016, C3M, 06204, Nice, France (e-mail: bertolot@unice.fr).

\*Authors contributed equally to this work.

## Abstract

**Background:** MITF encodes an oncogenic lineage-specific transcription factor in which a germline mutation (MITF<sup>E318K</sup>) was identified in human patients predisposed to both nevus formation and, among other tumor types, melanoma. The molecular mechanisms underlying the oncogenic activity of MITF<sup>E318K</sup> remained uncharacterized.

**Methods:** Here, we compared the SUMOylation status of endogenous MITF by proximity ligation assay in melanocytes isolated from wild-type (n = 3) or E318K (n = 4) MITF donors. We also used a newly generated Mitf<sup>E318K</sup> knock-in (KI) mouse model to assess the role of Mitf<sup>E318K</sup> (n = 7 to 13 mice per group) in tumor development in vivo and performed transcriptomic analysis of the tumors to identify the molecular mechanisms. Finally, using immortalized or normal melanocytes (wild-type or E318K MITF, n = 2 per group), we assessed the role of MITF<sup>E318K</sup> on the induction of senescence mediated by BRAF<sup>V600E</sup>. All statistical tests were two-sided.

**Results:** We demonstrated a decrease in endogenous MITF SUMOylation in melanocytes from MITF<sup>E318K</sup> patients (mean of cells with hypoSUMOylated MITF, MITF<sup>E318K</sup> vs MITF<sup>WT</sup>, 94% vs 44%, difference = 50%, 95% CI = 21.8% to 67.2%, P = .004). The Mitf<sup>E318K</sup> mice were slightly hypopigmented (mean melanin content Mitf<sup>WT</sup> vs Mitf<sup>E318K/+</sup>, 0.54 arbitrary units [AU] vs 0.36 AU, difference = -0.18, 95% CI = -0.36 to -0.007, P = .04). We provided genetic evidence that Mitf<sup>E318K</sup> enhances BRAF<sup>V600E</sup>-induced nevus formation in vivo (mean nevus number for Mitf<sup>E318K</sup>, BRAF<sup>V600E</sup> vs Mitf<sup>WT</sup>, BRAF<sup>V600E</sup>, 68 vs 44, difference = 24, 95% CI = 9.1 to 38.9, P = .006). Importantly, although Mitf<sup>E318K</sup> was not sufficient to cooperate with BRAF<sup>V600E</sup> alone in promoting metastatic melanoma, it accelerated tumor formation on a BRAF<sup>V600E</sup>, Pten-deficient background (median survival, Mitf<sup>E318K/+</sup> = 42 days, 95% CI = 31 to 46 vs Mitf<sup>WT</sup> = 51 days, 95% CI = 50 to 55, P < .001). Transcriptome analysis suggested a decrease in senescence in tumors from Mitf<sup>E318K</sup> mice. We confirmed this hypothesis by in vitro experiments, demonstrating that Mitf<sup>E318K</sup> impaired the

Received: May 4, 2016; Revised: November 12, 2016; Accepted: December 22, 2016

© The Author 2017. Published by Oxford University Press. All rights reserved. For Permissions, please e-mail: journals.permissions@oup.com.



ability of human melanocytes to undergo BRAF<sup>V600E</sup>-induced senescence.

**Conclusions:** We characterized the functions of melanoma-associated MITF<sup>E318K</sup> mutations. Our results demonstrate that MITF<sup>E318K</sup> reduces the program of senescence to potentially favor melanoma progression in vivo.

Microphthalmia-associated transcription factor (MITF) is a key transcription factor that plays a pivotal role in melanocytes and melanoma development. MITF is also involved in the implementation of the resistance to targeted or immunotherapy (1,2). Although the role of MITF was a matter of debate a few years ago, it appears now that melanoma cells are able to switch from a low-MITF to a high-MITF phenotype, thereby adapting to micro-environmental conditions such as hypoxia, inflammation, or drug treatments (3–5). MITF is part of a transcriptional program implemented by melanoma cells to switch from an invasive/mesenchymal status to a differentiated/fast-growing phenotype (6). MITF silencing was also demonstrated to inhibit melanoma cell proliferation and to induce senescence (7,8).

A few years ago, a germline variant of MITF (p.E318K) was reported to predispose carriers to melanoma and kidney cancer (9,10). Using in vitro assays, we and others demonstrated that this mutation impairs MITF SUMOylation and affects the transcriptional activity of MITF. However, the mechanisms by which MITF<sup>E318K</sup> contributes to melanoma progression remain uncharacterized.

Senescence, a state of stable cell cycle arrest, is a tumor suppressor mechanism that is activated in response to oncogenic events (oncogene-induced senescence [OIS]). One of the best examples of senescence in vivo is human nevus, a benign proliferation of cutaneous melanocytes and an early step in melanoma progression. Nevi frequently express oncogenic BRAF<sup>V600E</sup> and can remain growth-arrested for decades because of OIS (11,12), demonstrating that senescence provides an efficient suppression of cell proliferation. Primary melanoma can be viewed as a paradigm of senescence evasion, and the bypass of BRAF<sup>V600E</sup>-induced senescence triggers melanoma progression (13,14).

Here, we thought to evaluate the effect of the E318K mutation on endogenous MITF SUMOylation using proximity ligation assay (PLA). We also used a newly generated Mitf<sup>E318K</sup> knock-in (KI) mouse model and transcriptomic analysis of tumors to characterize the molecular mechanisms by which MITF<sup>E318K</sup> favors melanoma development in vivo. According to the results obtained, we hypothesized that MITF<sup>E318K</sup> favors senescence bypass. To evaluate this hypothesis, we assessed the pro-senescence effect of BRAF<sup>V600E</sup> in immortalized or normal melanocytes expressing wild-type or E318K MITF.

## Methods

Melanocytes were obtained from skin biopsies and were collected with participants' informed signed consent. Cells were transduced with an empty or BRAF<sup>V600E</sup> lentiviral particles. Interactions between MITF and SUMO were detected by in situ proximity ligation assay (Sigma). Mitf<sup>E318K/+</sup> knock-in (KI) mice were generated at the Mouse Clinical Institute in Illkirch, France (<http://www-mci.u-strasbg.fr>). Animal experiments were performed at the Animal Facilities of the C3M institute and the KU Leuven under the conditions established by the European Community (Directive 86/609/CCE) and according to French and Belgian laws. Gene expression arrays were performed by the Nice-Sophia Antipolis Genomics Platform. Mean values of ratios and Benjamini-Hochberg-adjusted *P* values are shown. Senescence β-galactosidase staining was assessed according to

manufacturer's protocol (Ozyme). All statistical tests were two-sided. We used the *t* test to calculate 95% confidence intervals on differences between means and to obtain the *P* value (GraphPad Prism and MedCalc).

## Cell Culture and Infection

The immortalized human Mel-ST melanocytes and human melanoma cell lines 501mel were cultured in DMEM supplemented with 7% fetal bovine serum (FBS). Cells were incubated in tissue culture incubators at 37°C with a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere. Immortalized human Mel-ST melanocytes were transduced with an empty adenovirus (EV) or adenoviruses encoding either myc-tagged MITF wild-type (Mi<sup>WT</sup>) or myc-tagged MITF<sup>E318K</sup> (Mi<sup>E318K</sup>). In the oncogene-induced senescence experiments, Mel-ST cells were transduced with either empty or BRAF<sup>V600E</sup> lentiviral particles 24 hours before the addition of the adenoviral particles.

Epidermal cell suspensions were obtained from adult (age 32 to 68 years) skin biopsies (a 6 mm punch) by overnight digestion in PBS containing 0.5% dispase grade II at 4°C, followed by a one-hour digestion with trypsin/EDTA solution (0.05%:0.02% in PBS) at 37°C. Cells were grown in MCDB 153 medium supplemented with FCS 2% 0.4 μg/mL, hydrocortisone 5 μg/mL, insulin 16 nM PMA, 1 ng/mL b-FGF, and penicillin/streptomycin (100 U/mL:50 μg/mL) in a humidified atmosphere containing 5% CO<sub>2</sub> at 37°C. Melanocytes were isolated from patients with the MITF p.E318K variant: lower back of a patient age 64 years (HM1-Mi<sup>E318K</sup>), left forearm of a patient age 51 years (HM2-Mi<sup>E318K</sup>), right forearm of a patient age 32 years (HM3-Mi<sup>E318K</sup>), and lower back of a patient age 68 years (HM4-Mi<sup>E318K</sup>). Melanocytes were also isolated from healthy individuals: lower back of a patient age 35 years (HM1-Mi<sup>WT</sup>) and abdominoplasty of a patient age 52 years (HM2-Mi<sup>WT</sup>). Patients with the MITF<sup>E318K</sup> mutation signed an informed consent form according to the Declaration of Helsinki Principles.

## Generation of the Mitf<sup>E318K</sup> Mouse Model

Mitf<sup>E318K/+</sup> knock-in (KI) mice were generated at the Mouse Clinical Institute in Illkirch, France (<http://www-mci.u-strasbg.fr>). A targeting vector was used to modify the endogenous Mitf locus in mouse embryonic stem (ES) cells and was constructed as follows. A fragment encompassing the Mitf exon 9 was amplified by polymerase chain reaction (PCR) from C57BL/6 mouse embryonic stem (ES) cell genomic DNA. A point mutation (c.952 G > A) was introduced into this fragment, and the mutated fragment was then subcloned into a vector containing a floxed neomycin resistance (NeoR) cassette. A 5' homologous arm and a 3' homologous arm were amplified by PCR and subcloned in the targeting vector to generate the final targeting construct. The ES cells were electroporated, and the ES cell clones containing the appropriate modification, which were identified by Southern blotting, were microinjected into C57BL/6 blastocysts to generate chimeric mice that exhibited germline transmission of the Mitf<sup>E318K</sup> allele. Chimeras (L2) were crossed with Cre TG C57BL/6 mice to excise the floxed NeoR cassette in the F1 progenies (L-).

Finally, the F1 mice (L-) were crossed with C57BL/6 mice to generate F2 mice. Intercrosses involving heterozygous *Mitf*<sup>E318K/+</sup> mice resulted in progenies with the appropriate genotypes at the expected Mendelian ratio.

## Mouse Strains and In Vivo Experiments

Mouse experiments were performed at the Animal Facilities of the Centre Méditerranéen de Médecine Moléculaire (C3M) and the KU Leuven under the conditions established by the European Community (Directive 86/609/CCE) and according to French and Belgian laws. All mouse experiments at the C3M have been approved by the local ethical committee (APAFIS#1710-2015090309232483v2).

The mice were maintained in a temperature-controlled facility (22°C) on a 12-hour light/dark cycle and were given free access to standard laboratory chow (UAR, Epinay-S/Orge, France). The inducible mouse melanoma model was obtained by crossing the *Tyr::CreER*<sup>T2</sup> (15), *Pten*<sup>f/f</sup> (16), *BRAF*<sup>CA/+</sup> (17), and *Mitf*<sup>E318K</sup> mouse strains to generate the experimental *BRAF*<sup>CA/+</sup>, *Pten*<sup>f/f</sup> with WT *Mitf* mice, and the *Mitf*<sup>E318K/+</sup>, *BRAF*<sup>CA/+</sup>, *Pten*<sup>f/f</sup> mice, which were genotyped and treated as described. For melanoma induction, we applied 1 µl of 4-hydroxytamoxifen (4-OHT, Sigma) 20 mM in EtOH on the back skin of mice (sex-matched mice) age three weeks for three consecutive days. Survival curves were determined using a Kaplan-Meier analysis using GraphPad Prism version 5 (GraphPad software, San Diego, CA) and are presented as survival days after 4-hydroxytamoxifen application (n = 7 to 13 mice per group). Tumor samples were collected for RNA preparation.

## Statistical Analysis

We used the t test to calculate 95% confidence intervals (CIs) on differences between means, and to obtain the P value we used GraphPad Prism and MedCalc (MedCalc Software's, Ostend, Belgium). All statistical tests were two-sided. For survival analysis, the Kaplan-Meier curves were performed with GraphPad Prism and the statistical analysis (median survival, CI, and P value) was performed with MedCalc. A P value of .05 or less was considered statistically significant when comparing the experimental and control groups.

## Results

### Study of Endogenous MITF<sup>E318K</sup> SUMOylation in Patients' Melanocytes

The MITF missense substitution p.E318K occurs in a consensus SUMOylation site. Furthermore, after overexpression of MITF and SUMO, we and others demonstrated that the mutation reduces MITF SUMOylation (9,10). However, these artifact conditions do not confirm that endogenous MITF SUMOylation is indeed affected. To remove this doubt, we used a proximity ligation assay (PLA) with anti-MITF and anti-SUMO antibodies. Experiments in melanocytes isolated from patients harboring the MITF<sup>E318K</sup> mutation revealed a dramatic decrease in the number of dots compared with melanocytes isolated from the skin of healthy donors, reflecting MITF hypo-SUMOylation in MITF<sup>E318K</sup> melanocytes (Figure 1A). Quantification of dots in three cultures of normal human melanocytes (NHM) and four cultures of MITF<sup>E318K</sup> melanocytes demonstrated a statistically significant increase in the number of cells exhibiting a low level

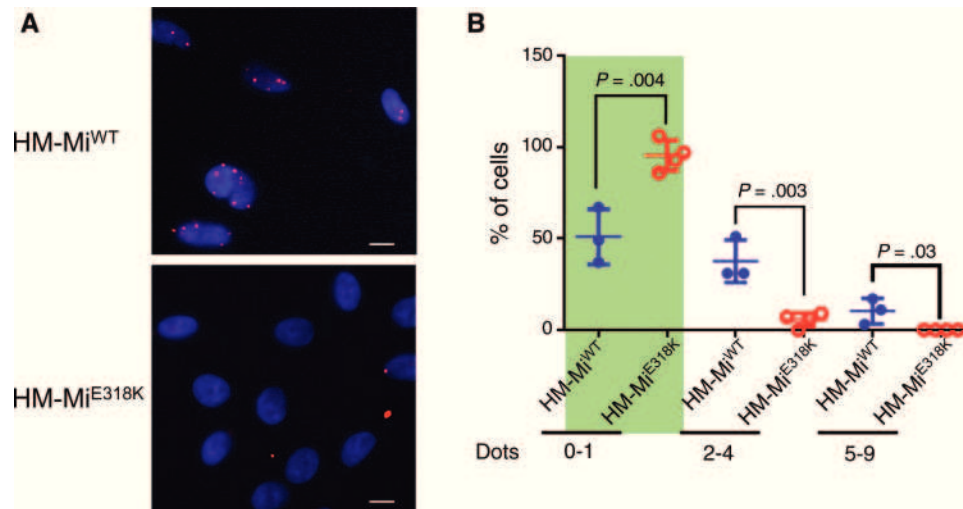
of MITF SUMOylation in the MITF<sup>E318K</sup> melanocytes (mean = 0–1 dot, green background for MITF<sup>E318K</sup> vs MITF<sup>WT</sup> 94% vs 44%, difference = 50%, 95% CI = 21.8 to 67.2, P = .004), whereas the number of NHM displaying between two to four or five to nine dots was markedly increased compared with MITF<sup>E318K</sup> melanocytes (Figure 1B). Collectively, these results indicate a global loss of MITF SUMOylation in the MITF<sup>E318K</sup> melanocytes. Appropriate controls, including the use of anacardic acid, a SUMOylation inhibitor, or cells in which wild-type or mutant MITF<sup>E318K</sup> was expressed, validated our approach (Supplementary Figure 1, available online).

### Role of *Mitf*<sup>E318K</sup> in Melanoma Development In Vivo

To establish the role of MITF<sup>E318K</sup> in melanoma occurrence in vivo, we generated a new knock-in (KI) mouse model that expresses *Mitf*<sup>E318K</sup> from its endogenous promoter (Supplementary Figure 2, available online). Noteworthy, heterozygous and homozygous *Mitf*<sup>E318K</sup> mice are slightly hypopigmented, resulting in a subtle reduction in the color of the coat, ear, tail and paws compared with control littermates. Fontana-Masson silver stain and melanin quantitation confirmed that the level of melanization was decreased in ear and tail tissues from *Mitf*<sup>E318K</sup> mice compared with control littermates (mean melanin content AU *Mitf*<sup>WT</sup> vs *Mitf*<sup>E318K</sup>, 0.54 AU vs 0.36 AU, difference = -0.18 AU, 95% CI = -0.36 to -0.007, P = .04) (Figure 2, A and B; Supplementary Figure 3, available online).

The *Mitf*<sup>E318K</sup> mutant mice also did not exhibit signs of nevi or melanoma development within 24 months of birth. Next, we generated *Mitf*<sup>E318K/+</sup> mice in a *Tyr::CreER*<sup>T2/+</sup>, *BRAF*<sup>CA/+</sup> background, and analyzed melanoma development following topical application of 4-hydroxy-tamoxifen on the back skin of adult mice. Compared with *Mitf* wild-type control littermates, a statistically significant increase in the number of nevi was observed in *Mitf*<sup>E318K/+</sup>, *BRAF*<sup>V600E/+</sup> mice (mean nevus number for *Mitf*<sup>E318K/+</sup>, *BRAF*<sup>V600E/+</sup> vs *Mitf*<sup>WT</sup>, *BRAF*<sup>V600E/+</sup> 68 vs 44, difference = 24, 95% CI = 9.1 to 38.9, P = .006) (Figure 2C; Supplementary Figure 4A, available online). Kaplan-Meier analysis revealed no statistically significant difference in the survival between *Mitf*<sup>E318K/+</sup> and wild-type *Mitf* mice (Supplementary Figure 4B, available online). In this mouse model, *Mitf*<sup>E318K</sup> did not decrease the median latency of melanoma development or increase its penetrance. Tumors from both groups were all predominantly amelanotic and histologically comparable. The tumor cells displayed a spindle-morphology and were only locally invasive (Supplementary Figure 4C, available online).

Then, we investigated whether *Mitf*<sup>E318K</sup> might facilitate melanomagenesis on the *BRAF*<sup>V600E/+</sup>, *Pten*-deficient background. After topical application of 4-hydroxy-tamoxifen on the back skin of adult mice *Mitf*<sup>E318K/+</sup>, *Tyr::CreER*<sup>T2/+</sup>, *BRAF*<sup>CA/+</sup>, *Pten*<sup>f/f</sup> mice, melanoma development was analyzed. Pigmented lesions developed earlier and faster in the *Mitf*<sup>E318K/+</sup>, *BRAF*<sup>V600E/+</sup>, *Pten*<sup>-/-</sup> mice compared with *BRAF*<sup>V600E/+</sup>, *Pten*<sup>-/-</sup> control littermates (Figure 2D). Tumors from both groups exhibited comparable histological features with a spindle morphology as described above (Supplementary Figure 4D, available online). Importantly, *Mitf*<sup>E318K/+</sup>, *BRAF*<sup>V600E/+</sup>, *Pten*<sup>-/-</sup> mice displayed a decreased survival time compared with *Mitf*<sup>WT</sup>, *BRAF*<sup>V600E/+</sup>, *Pten*<sup>-/-</sup> mice (*Mitf*<sup>E318K/+</sup>, median survival = 42 days, 95% CI = 31 to 46, vs *Mitf*<sup>WT</sup> = 51 days, 95% CI = 50 to 55, P < .001) (Figure 2E). These data indicate that *Mitf*<sup>E318K</sup> favors melanoma progression on the *BRAF*<sup>V600E/+</sup>, *Pten*<sup>-/-</sup> background.



**Figure 1.** SUMOylation status of endogenous MITF<sup>E318K</sup>. **A**) MITF-SUMO interactions detected by PLA in normal human melanocytes isolated from the skin of three different MITF wild-type donors (HM-Mi<sup>WT</sup>) or from four different patients carrying the MITF<sup>E318K</sup> mutation (HM-Mi<sup>E318K</sup>). Scale bar = 10  $\mu$ m. **B**) Automatic quantification of the image data from 100 cells per patient was performed with the BlobFinder software. The graph presents the number of 0-1 dots, 2-4 dots, or 5-9 dots/nuclei (abscissa) and frequency of cells (ordinates) with dots/nuclei. The results are expressed as mean  $\pm$  SD. The Student's t test was used to compare two samples. All statistical tests were two-sided. The green box highlights the increased proportion of MITF<sup>E318K</sup> cells with 0-1 dots/nuclei compared with MITF<sup>WT</sup> cells.

To better understand the mechanisms by which Mitf<sup>E318K</sup> favors melanoma development, we profiled the transcriptomes of Mitf wild-type and Mitf<sup>E318K</sup> tumors. Statistical analysis showed that 300 genes were differentially expressed between Mitf<sup>E318K/+</sup>, BRAF<sup>V600E/+</sup>, Pten<sup>-/-</sup> and BRAF<sup>V600E/+</sup>, Pten<sup>-/-</sup> tumors. In total, 131 genes were upregulated and 169 were downregulated. The list of the top 50 up- and downregulated genes is presented in [Supplementary Table 1](#) (available online). Among the top activated biological functions associated with the genes differentially expressed, Ingenuity Pathway Analysis identified “Hematological System development” ( $P$  value range from .002 to < .001), and the annotations included “quantity of blood cells,” “quantity of leukocytes,” and “quantity of B lymphocytes,” with a  $Z$  score between 1.66 and 2.48 ([Supplementary Table 2](#), available online). Indeed, *Cd79a* and *Cd79b*, which are known B cell markers, were among the most upregulated genes ([Supplementary Table 1](#), available online), and 10 out of 14 regulated genes fitted with an increase in B lymphocyte infiltration ([Supplementary Figure 5](#), available online). Our findings suggested an increase in B-cell infiltration in the Mitf<sup>E318K/+</sup>, BRAF<sup>V600E/+</sup>, Pten<sup>-/-</sup> tumors that might favor tumor progression in these mice.

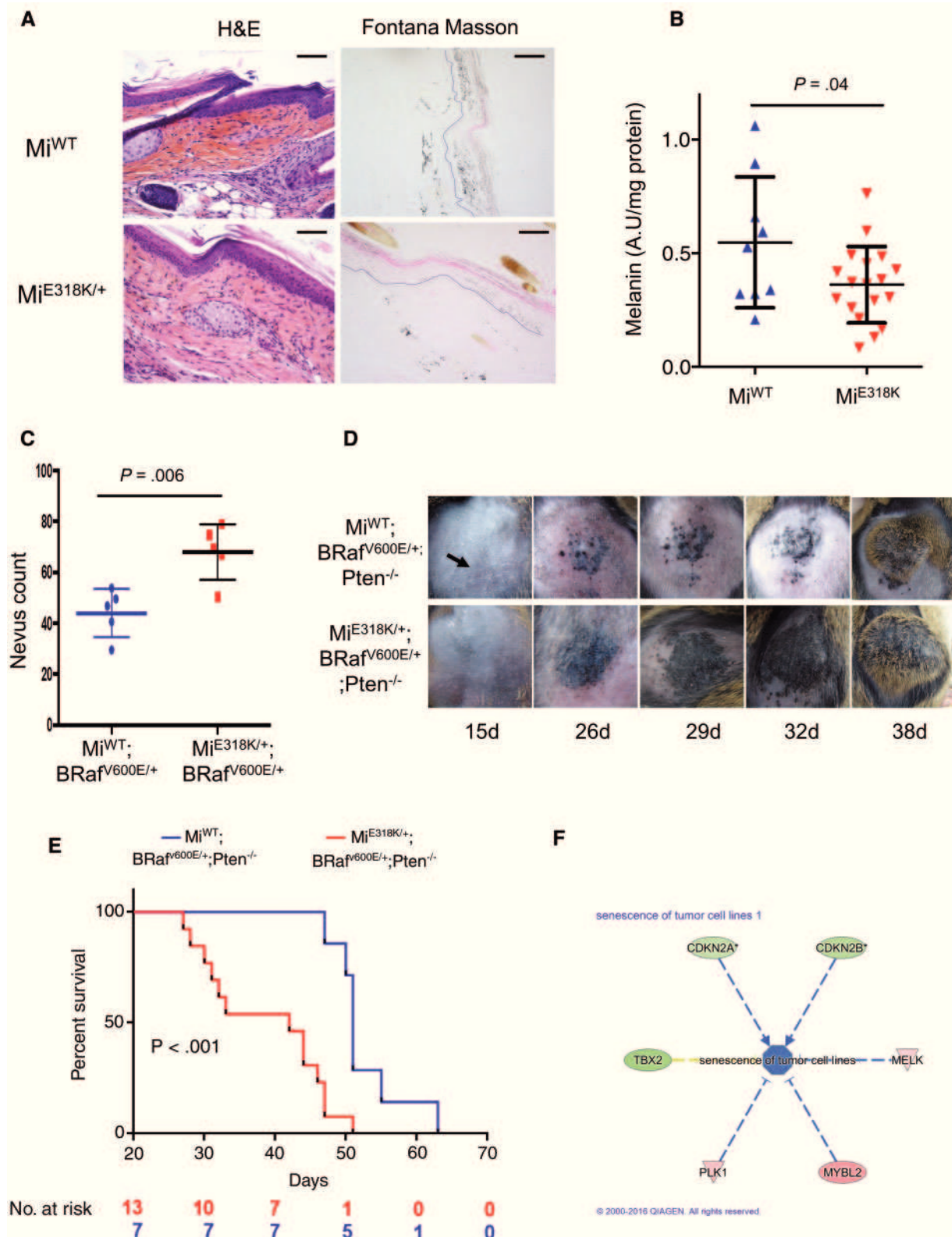
Ingenuity Pathway Analysis also identified “G1 phase” ( $Z$ -score = -1.958,  $P$  = .001) and “senescence of tumor cells” ( $Z$ -score = -1.6,  $P$  = .001) as top biological functions inhibited in Mitf<sup>E318K/+</sup>, BRAF<sup>V600E/+</sup>, Pten<sup>-/-</sup> tumors compared with BRAF<sup>V600E/+</sup>, Pten<sup>-/-</sup> tumors. Within the “senescence of tumor cells” pathway, the expression of five out of six genes in Mitf<sup>E318K/+</sup>, BRAF<sup>V600E/+</sup>, Pten<sup>-/-</sup> tumors were consistent with an inhibition of senescence ([Figure 2F](#)). Among them, the cyclin-dependent kinase inhibitors *Cdkn2a* (encoding both p16/Ink4A and p19Arf) and *Cdkn2b* play key roles in melanocyte senescence (18). These observations suggest that MITF<sup>E318K</sup> might exert its pro-melanoma effect through an inhibition of oncogene-induced senescence.

### Effect of MITF<sup>WT</sup> and MITF<sup>E318K</sup> in BRAF<sup>V600E</sup>-Induced Senescence

To test this hypothesis, we used immortalized Mel-ST melanocytes as a model system. These cells express undetectable

levels of MITF (19), thus allowing direct comparison of phenotypes induced by exogenous wild-type and mutant without interference with endogenously expressed MITF. After transduction, Mel-ST melanocytes expressed comparable levels of wild-type or mutant MITF<sup>E318K</sup> ([Figure 3A](#)). As expected, forced BRAF<sup>V600E</sup> expression induced a robust stimulation of ERK phosphorylation in all conditions ([Figure 3A](#)). BRAF<sup>V600E</sup> stimulated SA- $\beta$ -gal activity that was barely affected by forced expression of MITF<sup>WT</sup>, while forced expression of MITF<sup>E318K</sup> almost completely prevented the induction of SA- $\beta$ -gal activity ([Figure 3B](#)). BRAF<sup>V600E</sup> also decreased bromodeoxyuridine (BrdU) incorporation in control (EV+EV vs EV+BRAF<sup>V600E</sup>, 40% vs 13%, difference = -27%, 95% CI = -33.1% to -20.3%,  $P$  < .001) and to a lesser extent in MITF<sup>WT</sup> cells (Mi<sup>WT</sup>+EV vs Mi<sup>WT</sup>+BRAF<sup>V600E</sup>, 40% vs 25%, difference = -15%, 95% CI = -26.8% to -4.6%,  $P$  = .02), whereas BRAF<sup>V600E</sup> did not affect BrdU incorporation in cells with forced expression of MITF<sup>E318K</sup> ([Figure 3C](#)). MITF<sup>E318K</sup> efficiently prevented the increase in SA- $\beta$ -gal activity ([Figure 3B](#)) and the decrease in BrdU incorporation ([Figure 3C](#)) caused by BRAF<sup>V600E</sup>. Importantly, the level of both cell cycle inhibitors p21 and p16 was reduced in MITF<sup>E318K</sup> compared with wild-type MITF-expressing cells ([Figure 3A](#)). Consistent with these observations, expression of MITF<sup>E318K</sup> but not MITF impaired BRAF<sup>V600E</sup>-increased cell size and granularity, two additional senescence parameters ([Supplementary Figure 6, A and B](#), available online).

Using melanocytes isolated from skin of healthy donors or patients with the MITF<sup>E318K</sup> mutation, we confirmed that MITF<sup>E318K</sup> impaired oncogene-induced senescence. Indeed, forced expression of BRAF<sup>V600E</sup> in both wild-type MITF and MITF<sup>E318K</sup> melanocytes promoted activation of ERK ([Figure 3D](#)). BRAF<sup>V600E</sup> induced SA- $\beta$ Gal staining in two different wild-type MITF melanocyte cultures (HM1-Mi<sup>WT</sup> + EV vs HM1-Mi<sup>WT</sup> + BRAF<sup>V600E</sup> 10% vs 46%, difference = 36%, 95% CI = 15.1% to 56.7%,  $P$  = .009 and HM2-Mi<sup>WT</sup> + EV vs HM2-Mi<sup>WT</sup> + BRAF<sup>V600E</sup> 8% vs 65%, difference = 57%, 95% CI = 22.2% to 91.0%,  $P$  = .01) but not in two different MITF<sup>E318K</sup> melanocyte cultures ([Figure 3, E and F](#)). However, MITF<sup>E318K</sup> melanocytes did undergo senescence upon forced expression of BRAF<sup>V600E</sup> when cultured for a longer



**Figure 2.** Effect of *Mitf*<sup>E318K</sup> on pigmentation, nevus number count, and melanomagenesis in melanoma-prone mouse models. **A)** Hematoxylin and eosin and Fontana-Masson staining of tail sections of 10-month-old mice with the indicated genotypes. Scale bar = 150  $\mu$ m. **B)** Melanin content were determined from three biopsies from ears of 10-month-old mice with the indicated genotypes (*Mitf*<sup>WT</sup>, n = 3 and *Mitf*<sup>E318K</sup>, n = 6). Melanin amount is expressed in arbitrary units (AU) per mg of proteins. The results are expressed as mean  $\pm$  SD. The Student's t test was used to compare two samples. All statistical tests were two-sided. **C)** The number of nevi was determined by counting three different areas (representing almost the whole back) of *BRaf*<sup>V600E/+</sup>, *Mitf*<sup>WT</sup>, mice (n = 5) or *BRaf*<sup>V600E/+</sup>, *Mitf*<sup>E318K/+</sup>, mice (n = 5) between age 25 and 29 days after 4-hydroxy-tamoxifen (4-OHT) application. The results are expressed as mean  $\pm$  SD. The Student's t test was used to compare two samples. All statistical tests were two-sided. **D)** Tumor phenotype after localized application of 4-OHT at the adult stage. Representative time-lapse photographs are presented.

period of time (not shown). It should be noted that MITF<sup>E318K</sup> melanocyte cultures displayed a decreased doubling time compared with MITF<sup>WT</sup> melanocytes (57 hours vs 67 hours) (Supplementary Figure 6C, available online).

One may wonder why MITF<sup>E318K</sup> can exert its antisenesescence effect in Mel-ST and human melanocytes, which are not supposed to have a constitutive activation of the PI3K pathway, in contrast to the mouse model. However, when assessing AKT activation in Mel-ST and in human melanocytes in our culture medium, we observed a basal phosphorylation of AKT, indicating an activation of the PI3K pathway (Supplementary Figure 6, D and E, available online). Therefore, in cultured cells, MITF<sup>E318K</sup> might also cooperate with PI3K to prevent senescence. In conclusion, these findings demonstrate that the naturally occurring MITF<sup>E318K</sup> mutant severely impairs oncogene-induced senescence.

## Discussion

SUMOylation is difficult to investigate given the dynamic and labile nature of this process. Forced expression of both the SUMO machinery and the target has been widely used to efficiently detect the SUMO-modified proteins, yet it may generate some unspecific SUMO conjugation. Detecting endogenous SUMOylation remains a challenge. Here, using PLA, we demonstrated for the first time the endogenous hypo-SUMOylated status of MITF<sup>E318K</sup>.

To establish the link between the MITF<sup>E318K</sup> melanoma susceptibility genes and pathogenesis mechanisms, we also constructed a new mouse model harboring the endogenous MITF<sup>E318K</sup> point mutation. In this model, we observed pigmentation lightening. Additionally, upon BRAF<sup>V600E/+</sup> expression, our results reveal an increase in nevus count. Both observations were consistent with the phenotypes described in MITF<sup>E318K</sup> heterozygous patients (10,20). These data suggest that melanocytes expressing both BRAF<sup>V600E</sup> and MITF<sup>E318K</sup> can proliferate longer before entering senescence. This finding is reminiscent of patients with biallelic inactivation of the cell cycle inhibitor CDKN2A, which results in enhanced cell proliferation, who displays an increased number of nevi (21). The decrease in pigmentation might be ascribed to impairment of the differentiation process.

Mitf<sup>E318K</sup> affects melanoma development in the BRAF<sup>V600E/+</sup>, Pten<sup>-/-</sup> mice background but not in a BRAF<sup>V600E/+</sup>-only background. This finding suggests that MITF<sup>E318K</sup> should cooperate with the PI3K pathway to overcome senescence.

Activation of the PI3K pathway was thought to fully overcome BRAF<sup>V600E</sup>-induced senescence (14,22). However, stabilized  $\beta$ -catenin, which can act as an antisenesescence effect, accelerates melanoma progression in BRAF<sup>V600E/+</sup>, Pten<sup>-/-</sup> mice (23,24). MITF<sup>E318K</sup>, which accelerates melanoma progression in BRAF<sup>V600E/+</sup>, Pten<sup>-/-</sup> mice, might also exert an antisenesescence effect in vivo.

Transcriptome analysis of wild-type or Mitf<sup>E318K/+</sup> tumors in the BRAF<sup>V600E/+</sup>, Pten<sup>-/-</sup> background suggests that Mitf<sup>E318K</sup> might prevent senescence and favor cell proliferation. This hypothesis has been confirmed in cultured cells as we demonstrated that

Mitf<sup>E318K</sup> inhibits BRAF<sup>V600E</sup>-induced senescence. This observation appears at odds with mice results indicating that MITF<sup>E318K</sup> requires PI3K activation to exert its promelanoma effect. However, in cultured cells, despite the absence of an activating mutation in the PI3K pathway, we observed a basal activation of AKT that might strengthen the antisenesescence effect of MITF<sup>E318K</sup>.

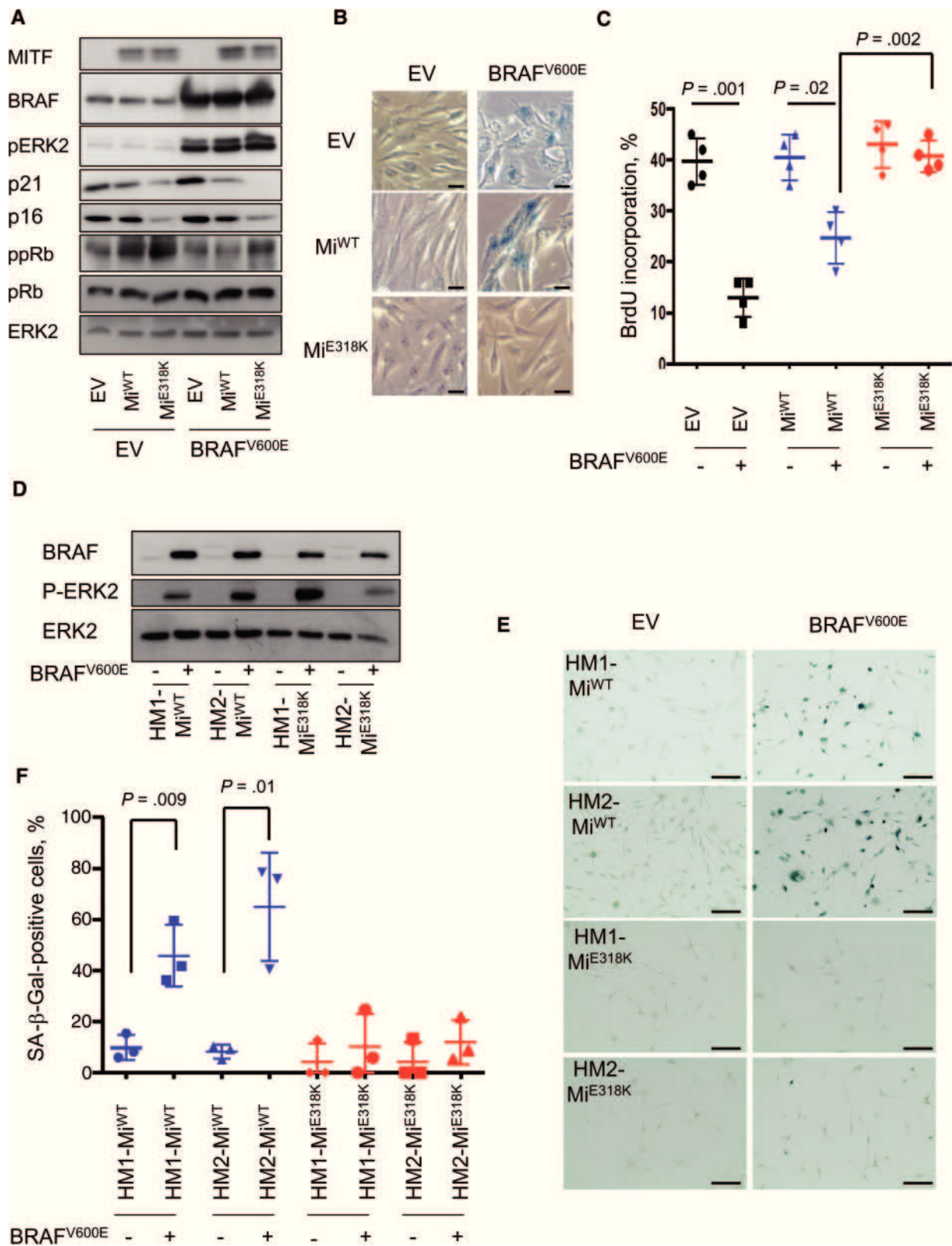
Among the genes differentially regulated in the mouse tumors, none are MITF or MITF<sup>E318K</sup> targets. Noteworthy, transcriptomic analysis in cultured melanoma cells did not allow us to identify specific MITF<sup>E318K</sup> targets (unpublished data). However, we and others have demonstrated an increase in the transcriptional activity of MITF<sup>E318K</sup> (9,10). Thus, we were unable to find the appropriate window to identify the MITF<sup>E318K</sup> targets, or MITF<sup>E318K</sup> might induce a weak effect on a large set of genes that cannot pass the statistical threshold. This is not surprising given that MITF<sup>E318K</sup> is not strongly oncogenic but rather a medium penetrance susceptibility allele. Furthermore, this finding is consistent with our ChIP-seq experiments demonstrating that MITF<sup>E318K</sup> is redistributed over the genome on a larger repertoire of low-affinity genomic sequence compared with wild-type MITF (9).

SUMOylation could induce a conformational change of MITF and impact the MITF interaction with its partner proteins. In addition, SUMO creates specific interactions with proteins containing SUMO-interacting motifs (SIMs) through a noncovalent bound. Therefore, the MITF<sup>E318K</sup> mutation will severely impair these interactions. Interestingly, the related family members TFE3 and TFEB (25,26) are among the known MITF interactors. This interaction with MITF might be affected by the E318K mutation. Although the functional roles of MITF-TFE heterodimers in melanoma remain to be elucidated, it should be noted that TFE3 and TFEB are involved in kidney cancer (27), the incidence of which is also increased in carriers of the MITF<sup>E318K</sup> mutation. Additionally, MITF interacts with the chromatin remodeler BRG1 (25,28); thus, MITF could impact chromatin organization and global transcriptional regulation. Again, the MITF<sup>E318K</sup> mutation and the resulting SUMOylation alteration might affect the MITF interaction with BRG1, leading to the modification of the MITF target gene repertoire. This hypothesis is strengthened by the identification of a potential SUMO-interacting motif in BRG1 (GPS-SUMO, <http://sumosp.biocuckoo.org/>). However, only a small proportion of the available proteins typically needs to be SUMOylated to achieve a biological effect (29). Because of this process, referred to as the "SUMO enigma," it has not been possible to identify such SUMO-dependent MITF interactors to date.

This study has some limitations already mentioned above. First, we have not been able to identify specific MITF<sup>E318K</sup> target genes that could explain the effect of the mutation. To unmask such genes, we are currently evaluating the effect of Mitf<sup>E318K</sup> at early time points after the BRAF and Pten oncogenic activation. Second, due to the general scarcity and lability of SUMOylation, it has not been possible to identify changes in MITF<sup>E318K</sup> interactors that might mediate the pro-oncogenic effect of this mutation. An in vitro approach using recombinant SUMOylated or non-SUMOylated MITF and protein microarrays might solve

Figure 2. Continued

E) Kaplan-Meier survival plot of Mitf<sup>E318K</sup> (n = 13) or wild-type Mitf (n = 7) littermates after localized induction in the BRAF<sup>V600E/+</sup>, Pten<sup>-/-</sup> background. P value (log-rank Mantel-Cox test) is indicated. The number of mice at risk is shown. F) Circular network showing the genes differentially regulated between Mitf<sup>WT</sup> and Mitf<sup>E318K</sup> and associated with senescence. The regulation of five out of six genes is consistent with an inhibition of "senescence in tumor cells" (blue dotted lines). The genes upregulated in Mitf<sup>E318K</sup> tumors are noted in red, and genes that are downregulated are noted in green. The yellow line indicates that the finding underlying the relationship is inconsistent with the state of the downstream node based on existing literature data.



**Figure 3.** Oncogene-induced senescence in MITF<sup>WT</sup> and MITF<sup>E318K</sup> melanocyte cells. **A**) Mel-ST melanocytes were transduced with control (EV) or BRAF<sup>V600E</sup> lentiviral particles and an empty adenovirus (EV) or adenoviruses encoding either myc-tagged MITF wild-type (Mi<sup>WT</sup>) or myc-tagged MITF<sup>E318K</sup> for three weeks and were subjected to immunoblot analysis with the indicated antibodies. **B**) Same as (A) but senescence was analyzed by histochemistry to determine the level of β-galactosidase activity measured at pH 6.0. Representative images of senescent cells are shown. Scale bar = 15 μm. **C**) Same as (A) but examined for BrdU incorporation. Values represent the mean ± SD. All statistical tests were two-sided. The Student's t test was used to compare two samples. **D**) Immunoblot analysis of human melanocytes from two healthy individuals (HM1-Mi<sup>WT</sup>, HM2-Mi<sup>WT</sup>) or from two different patients carrying the MITF<sup>E318K</sup> mutation (HM1-Mi<sup>E318K</sup>, HM2-Mi<sup>E318K</sup>) who were transduced with control (EV) or BRAF<sup>V600E</sup> lentiviral particles for 15 days. **E**) Melanocytes were treated as described in (D) and stained for SA-βGal activity. Representative images of senescent cells are presented. Scale bar = 50 μm. **F**) Quantification of SA-βGal staining. Values represent the mean ± SD. All statistical tests were two-sided. The Student's t test was used to compare two samples.

this problem and disclose a direct molecular alteration caused by p.E318K mutation.

In conclusion, genetic association studies have been widely used in the search for cancer susceptibility genetic variants, but few studies have established the link between these variants and the pathogenesis mechanisms. This approach should allow important insights into the pathways of tumor development and might ultimately lead to more effective individually targeted cancer prevention strategies. Here, we characterized the alterations of MITF functions caused by the p.E318K mutation. Our results demonstrate that MITF<sup>E318K</sup> impaired the implementation of the senescence program and thus potentially favors melanoma progression.

## Funding

This work was funded by la Société Française de Dermatologie, Melanoma Research Alliance (MRA Team Science Award #269626), ANR-13-BSV1-0025-01 to RB, Fondation pour la Recherche Médicale, La Ville de Nice, Cancéropôle PACA to CB, INCa grant 2013-1-MELA-05 to BBdP, Grant Fondation Gustave Roussy 2009, No. PRI-2010-18 to BBdP, Grant 2011 ITMO-Plan Cancer to BBdP, ICGC No. 201102 to BBdP.

## Notes

Authors: Caroline Bonet\*, Flavie Luciani\*, Jean-François Ottavi\*, Justine Leclerc, Fanélie-Marie Jouenne, Marina Boncompagni, Karine Bille, Véronique Hofman, Guillaume Bossis, Gian Marco de Donatis, Thomas Strub, Yann Cheli, Mickaël Ohanna, Frédéric Luciano, Sandrine Marchetti, Stéphane Rocchi, Marie-Christine Birling, Marie-Françoise Avril, Nicolas Poulalhon, Thomas Luc, Paul Hofman, Jean-Philippe Lacour, Irwin Davidson, Brigitte Bressac-de Paillerets\*, Robert Ballotti\*, Jean-Christophe Marine\*, Corine Bertolotto

\*Authors contributed equally to this work.

Affiliations of authors: INSERM, U1065 (équipe 1), Equipe labélisée ARC 2016, C3M, Nice, France (CBo, JFO, JL, MB, KB, YC, MO, SR, RB, CBe); University of Nice Sophia-Antipolis, UFR Médecine, Nice, France (CBo, JFO, JL, MB, KB, VH, YC, MO, SR, PH, RB, CBe); Center for Human Genetics, KU Leuven, Leuven, Belgium (FL, JCM); Center for the Biology of Disease, VIB, Leuven, Belgium (FL, JCM); Service de Génétique, Institut de Cancérologie Gustave Roussy, Villejuif, France (FMJ, BBdP); Inserm, ERI21/EA 4319, Nice, France (VH, PH); CNRS-UMR 5535, Montpellier, France (GB); INSERM, U1065 (équipe 12), C3M, Nice, France (GMdD); Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire, CNRS, INSERM, Université de Strasbourg, Illkirch, France (TS, ID); INSERM, U1065 (équipe 2), C3M, Nice, France (FL, SM); Institut Clinique de la Souris-Mouse Clinical Institute, Illkirch, France (MCB); AP-HP, Hôpital Cochin -Tarnier, Service de Dermatologie et Faculté Paris Descartes, Paris, France (MFA); Centre Hospitalier Universitaire de Lyon, Department of Dermatology, Lyon, France (NP, TL); Centre Hospitalier Universitaire de Nice, Service de Dermatologie, Nice, France (JPL); INSERM U1186, Immunologie intégrative des tumeurs et génétique oncologique, Paris, France (BBdP).

The funders had no role in the design of the study; the collection, analysis, and interpretation of the data; the writing of the manuscript; and the decision to submit the manuscript for publication.

The authors would like to thank H. Arnheiter (NIH, Bethesda, MD) and Lionel Larue and Véronique Delmas (Institut Curie,

Paris, France) for their helpful comments on experiments involving mouse models and James Wordsworth for his assistance in proximity ligation assay. We acknowledge the support of the Nice-Sophia Antipolis Genomics Platform for microarray analysis. The authors would also like to thank the C3M and VIB animal facilities. The Mel-ST melanocytes were kindly provided by Dr. Robert Weinberg (Whitehead Institute, Cambridge, MA).

CBe, JCM, BB-DP, RB, and ID designed, analyzed, and wrote the manuscript. GB, FL, and SR participated in the scientific discussions. MCB contributed to the creation of the mouse model. MFA, NP, TL, PH, JPL, and SM collected biological samples. CBo, FL, JL, JFO, FMJ, MB, KB, VH, MO, GMDD, TS, and YC performed the functional analysis.

The authors disclose no potential conflicts of interest.

## References

- Johannessen CM, Johnson LA, Piccioni F, et al. A melanocyte lineage program confers resistance to MAP kinase pathway inhibition. *Nature*. 2013;504(7478):138–142.
- Muller J, Krijgsman O, Tsoi J, et al. Low MITF/AXL ratio predicts early resistance to multiple targeted drugs in melanoma. *Nat Commun*. 2014;5:5712.
- Cheli Y, Giuliano S, Fenouille N, et al. Hypoxia and MITF control metastatic behaviour in mouse and human melanoma cells. *Oncogene*. 2012;31(19):2461–2470.
- Ohanna M, Cheli Y, Bonet C, et al. Secretome from senescent melanoma engages the STAT3 pathway to favor reprogramming of naive melanoma towards a tumor-initiating cell phenotype. *Oncotarget*. 2013;4(12):2212–2224.
- Ohanna M, Giuliano S, Bonet C, et al. Senescent cells develop a PARP-1 and nuclear factor- $\kappa$ B-associated secretome (PNAS). *Genes Dev*. 2011;25(12):1245–1261.
- Hoek KS, Goding CR. Cancer stem cells versus phenotype-switching in melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res*. 2010;23(6):746–759.
- Giuliano S, Cheli Y, Ohanna M, et al. Microphthalmia-associated transcription factor controls the DNA damage response and a lineage-specific senescence program in melanomas. *Cancer Res*. 2010;70(9):3813–3822.
- Strub T, Giuliano S, Ye T, et al. Essential role of microphthalmia transcription factor for DNA replication, mitosis and genomic stability in melanoma. *Oncogene*. 2011;30(20):2319–2332.
- Bertolotto C, Lesueur F, Giuliano S, et al. A SUMOylation-defective MITF germline mutation predisposes to melanoma and renal carcinoma. *Nature*. 2011;480(7375):94–98.
- Yokoyama S, Woods SL, Boyle GM, et al. A novel recurrent mutation in MITF predisposes to familial and sporadic melanoma. *Nature*. 2011;480(7375):99–103.
- Davies H, Bignell GR, Cox C, et al. Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature*. 2002;417(6892):949–954.
- Michaloglou C, Vredeveld LC, Soengas MS, et al. BRAF<sup>E600</sup>-associated senescence-like cell cycle arrest of human naevi. *Nature*. 2005;436(7051):720–724.
- Kuilman T, Michaloglou C, Vredeveld LC, et al. Oncogene-induced senescence relayed by an interleukin-dependent inflammatory network. *Cell*. 2008;133(6):1019–1031.
- Vredeveld LC, Possik PA, Smit MA, et al. Abrogation of BRAFV600E-induced senescence by PI3K pathway activation contributes to melanomagenesis. *Genes Dev*. 2012;26(10):1055–1069.
- Bosenberg M, Muthusamy V, Curley DP, et al. Characterization of melanocyte-specific inducible Cre recombinase transgenic mice. *Genesis*. 2006;44(5):262–267.
- Groszer M, Erickson R, Scripture-Adams DD, et al. Negative regulation of neural stem/progenitor cell proliferation by the Pten tumor suppressor gene in vivo. *Science*. 2001;294(5549):2186–2189.
- Dankort D, Filenova E, Collado M, et al. A new mouse model to explore the initiation, progression, and therapy of BRAFV600E-induced lung tumors. *Genes Dev*. 2007;21(4):379–384.
- McNeal AS, Liu K, Nakhate V, et al. CDKN2B loss promotes progression from benign melanocytic nevus to melanoma. *Cancer Discov*. 2015;5(10):1072–1085.
- Gupta PB, Kuperwasser C, Brunet JP, et al. The melanocyte differentiation program predisposes to metastasis after neoplastic transformation. *Nat Genet*. 2005;37(10):1047–1054.
- Sturm RA, Fox C, McClenahan P, et al. Phenotypic characterization of nevus and tumor patterns in MITF E318K mutation carrier melanoma patients. *J Invest Dermatol*. 2014;134(1):141–149.
- Sviderskaya EV, Gray-Schopfer VC, Hill SP, et al. p16/cyclin-dependent kinase inhibitor 2A deficiency in human melanocyte senescence, apoptosis, and immortalization: Possible implications for melanoma progression. *J Natl Cancer Inst*. 2003;95(10):723–732.

22. Dankort D, Curley DP, Cartlidge RA, et al. Braf(V600E) cooperates with Pten loss to induce metastatic melanoma. *Nat Genet.* 2009;41(5):544–552.
23. Damsky WE, Curley DP, Santhanakrishnan M, et al. beta-catenin signaling controls metastasis in Braf-activated Pten-deficient melanomas. *Cancer Cell.* 2011;20(6):741–754.
24. Delmas V, Beermann F, Martinozzi S, et al. Beta-catenin induces immortalization of melanocytes by suppressing p16INK4a expression and cooperates with N-Ras in melanoma development. *Genes Dev.* 2007;21(22):2923–2935.
25. Laurette P, Strub T, Koludrovic D, et al. Transcription factor MITF and remodeler BRG1 define chromatin organisation at regulatory elements in melanoma cells. *Elife.* 2015;4.
26. Pogenberg V, Ogmundsdottir MH, Bergsteinsdottir K, et al. Restricted leucine zipper dimerization and specificity of DNA recognition of the melanocyte master regulator MITF. *Genes Dev.* 2012;26(23):2647–2658.
27. Bressac de-Paillerets B, Lesueur F, Bertolotto C. A germline oncogenic MITF mutation and tumor susceptibility. *Eur J Cell Biol.* 2014;93(1–2):71–75.
28. Mehta G, Kumarasamy S, Wu J, et al. MITF interacts with the SWI/SNF subunit, BRG1, to promote GATA4 expression in cardiac hypertrophy. *J Mol Cell Cardiol.* 2015;88:101–110.
29. Wilkinson KA, Henley JM. Mechanisms, regulation and consequences of protein SUMOylation. *Biochem J.* 2010;428(2):133–145.
30. Alexandrov LB, Nik-Zainal S, Wedge DC, et al. Signatures of mutational processes in human cancer. *Nature.* 2013;500(7463):415–421.



# Focus on cutaneous and uveal melanoma specificities

Charlotte Pandiani, Guillaume E. Béranger, Justine Leclerc, Robert Ballotti, and Corine Bertolotto

U1065, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale Centre Méditerranéen de Médecine Moléculaire, Université Côte d'Azur, 06200 Nice, France

**Cutaneous melanoma (CM) and uveal melanoma (UM) derive from cutaneous and uveal melanocytes that share the same embryonic origin and display the same cellular function. However, the etiopathogenesis and biological behaviors of these melanomas are very different. CM and UM display distinct landscapes of genetic alterations and show different metastatic routes and tropisms. Hence, therapeutic improvements achieved in the last few years for the treatment of CM have failed to ameliorate the clinical outcomes of patients with UM. The scope of this review is to discuss the differences in tumorigenic processes (etiologic factors and genetic alterations) and tumor biology (gene expression and signaling pathways) between CM and UM. We develop hypotheses to explain these differences, which might provide important clues for research avenues and the identification of actionable vulnerabilities suitable for the development of new therapeutic strategies for metastatic UM.**

## Physiological function of melanocytes

Melanocytes are cells responsible for the synthesis of melanin pigments within organelles called melanosomes through an enzymatic cascade involving tyrosinase, tyrosinase-related protein-1 (TYRP1), and TYRP2/DCT (dopachrome tautomerase). Two types of pigment are produced: the brown/black pigment eumelanin and the orange/yellow pigment pheomelanin; the latter is formed in the presence of cysteine or glutathione. The proportion of these two types of melanin defines the variation in skin and iris color. The ratio of eumelanin/pheomelanin is significantly greater in both dark brown skin and eyes than in pale skin and eyes with light-colored irises (hazel, green, yellow-brown, and blue in color) (Rees 2004; Wakamatsu et al. 2008).

Melanocytes derive from neural crest cells. These undifferentiated cells, called melanoblasts, migrate to their

final location, where they synthesize melanin. They are found in various parts of the human body, such as the skin, eyes, meninges, heart, and cochlea. The role and function of melanocytes are well established in skin but not in other anatomical locations.

In the epidermis, melanocytes transfer melanin-containing melanosomes to neighboring keratinocytes to ensure homogeneous pigmentation and provide efficient skin protection against the harmful effects of ultraviolet radiation (UVR) from solar light (Brenner and Hearing 2008).

In the eyes, melanocytes can be found in (1) the conjunctiva, a nonkeratinized epithelium that covers the anterior part of the sclera and the internal surface of the eyelids, and (2) all areas of the uvea: the iris, ciliary body, and choroid. The role of melanocytes in the conjunctiva remains unknown. The quantity and quality of melanin pigment in the iris determine eye color. However, in contrast to the skin, the iris color remains stable after exposure to sunlight. Furthermore, the presence of melanin in uveal melanocytes is thought to contribute to eye protection against ocular diseases that can cause blindness, including age-related macular degeneration and uveal melanoma (UM) (Sarna 1992). However, how melanin mediates this protection remains mostly unknown.

The presence of melanocytes in organs that are not exposed to UVR indicates that these cells might have functions other than those solely related to photoprotection. Melanocytes in the stria vascularis of the cochlea are involved in the generation of endolymph-mediated action potentials necessary for normal hearing (Barrenas and Lindgren 1990; Tachibana 1999) and in equilibrium function (Takeda et al. 2007). Brain melanocytes are associated with neuroendocrine functions and may also protect against oxidative damage (Zecca et al. 2008). Heart melanocytes play a role in the mechanical properties of the valves (Carneiro et al. 2015) and have been shown to be involved in atrial arrhythmia (Levin et al. 2009).

[Keywords: cancer; melanoma; skin]

Corresponding author: bertolot@unice.fr

Article is online at <http://www.genesdev.org/cgi/doi/10.1101/gad.296962.117>.

© 2017 Pandiani et al. This article is distributed exclusively by Cold Spring Harbor Laboratory Press for the first six months after the full-issue publication date (see <http://genesdev.cshlp.org/site/misc/terms.xhtml>). After six months, it is available under a Creative Commons License (Attribution-NonCommercial 4.0 International), as described at <http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>.

In this review, we provide several hypotheses to explain why cells sharing the same embryonic origin and cellular functions (i.e., melanin synthesis) are subjected to different tumor transformation processes. We discuss the biological and genetic differences between skin and eye melanomas and, based on these differences, how treatment and clinical outcomes are affected (Table 1).

### Classification and prognosis of cutaneous melanoma (CM) and ocular melanoma (OM)

Both CM and OM arise from melanocyte transformation and represent deadly forms of cancer. Their rate is higher among Caucasians compared with African Americans (McLaughlin et al. 2005; Jovanovic et al. 2013). In most cases, they both occur de novo but can also develop from pre-existing melanocytic lesions such as nevi or primary acquired melanocytosis (Tsao et al. 2003; Jovanovic et al. 2013).

The incidence of CM, which develops from cutaneous melanocytes, has increased dramatically in white popula-

tions over the past several decades to reach 230,000 new cases worldwide each year (World Health Organization) and accounts for 1.6% of all diagnosed cancers.

A clinico-anatomical classification (Clark's classification) based on the site of cancer occurrence and histological morphology distinguished the following five types of CM: superficial spreading melanoma, nodular melanoma, lentigo maligna melanoma, mucosal melanoma, and acral melanoma (Clark et al. 1986). Superficial spreading melanoma presents as an enlarging patch during the radial growth phase, which subsequently extends downward through the skin in the vertical growth phase. Nodular melanoma, which presents as a nodule, has a propensity to grow vertically and display aggressive behaviors. Lentigo maligna melanoma grows in diameter slowly over many years. It is associated with cumulative sun exposure and thus is found most often in the elderly. Acral melanoma involves the nonpigmented palmoplantar and subungual areas, and mucosal melanoma can occur in all mucosal surfaces. These lesions have been termed acral lentiginous melanoma because they share several features and often present a lentiginous component (Arrington et al. 1977).

**Table 1.** Comparison of cutaneous melanoma (CM) and UM features

	OM		CM
	UM	Conjunctival melanoma	SSM, NM, AM, MM, LM
Incidence worldwide	8000	800	230,000
Median survival rate	2–8 mo	8 mo	6–10 mo
Hereditary cases	1%–2%		10%
Main susceptibility alleles	OCA2–HERC2, BAP1		Cell cycle (CDKN2A, CDK4, RB1), DNA damage (BRCA1), telomere maintenance (TERT, POT1, ACD, TERF2IP), pigmentation (MC1R, MITF, TYR, TYRP1, OCA2)
UV radiation involvement	No	Possible	Yes
Mutation burden	Low		High
Somatic genetic alterations			
Gain of function	GNAQ/GNA11, SF3B1, EIF1AX, CYSTLR2, PLCβ4	BRAF, NRAS, TERT	BRAF, NRAS, MEK1/2, PIK3CA, PIK3CG, AKT1/AKT3, RAC1, KIT
Loss of function	BAP1		CDKN2A, PTEN, NF1, RASA2
Signaling pathways activation	ARF6–TRIO–RHO–RAC–YAP PLCβ/PKC		ERK PI3K/AKT
Chromosome anomalies	“Simple,” loss of 3, 1p, and 6q and gain of 6p and 8q		“Complex”
Dissemination	Hematogenous	Lymphogenous and hematogenous	Lymphogenous and hematogenous
Common first metastatic sites	Liver	Regional lymph nodes	Regional lymph nodes
Targeted therapies	No	Anti-BRAF, anti-MEK to be tested	Anti-BRAF, anti-MEK
Immunotherapies	Inefficient	No	Anti-CTLA4, anti-PD1, anti-PDL1

(OM) Ocular melanoma; (SSM) superficial spreading melanoma; (NM) nodular melanoma; (AM) acral melanoma; (MM) mucosal melanoma; (LM) lentigo maligna melanoma; (BAP1) BRCA1-associated protein; (CDKN2A) cyclin-dependent kinase (CDK) inhibitor 2A; (BRAF) brain rapidly accelerated fibrosarcoma; (TERT) telomerase reverse transcriptase; (MC1R) melanocortin-1 receptor; (MITF) microphthalmia-associated transcription factor; (GNAQ) guanine nucleotide-binding protein G(q) subunit α; (GNA11) guanine nucleotide-binding protein subunit α-11; (SF3B1) splicing factor 3B, subunit 1; (EIF1AX) eukaryotic translation initiation factor 1A, X-linked; (PLCβ) phospholipase C β; (PI3K) phosphatidylinositol-3-kinase; (PKC) protein kinase C; (AKT) protein kinase B; (RAC1) Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1; (PTEN) phosphatase and tensin homolog; (NF1) neurofibromin 1; (RASA2) RAS (Rous sarcoma) p21 protein activator 2; (ARF6) ADP-ribosylation factor 6; (YAP) yes-associated protein; (ERK) extracellular regulated kinase; (CTLA4) cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4; (PD1) programmed cell death 1; (PDL1) PD ligand 1.

Very early stage skin-localized melanoma (Breslow <1 mm) can be cured by wide surgical excision and has a 5-yr survival rate of >98%. In contrast, when diagnosis is delayed, CM becomes increasingly more devastating, and individuals display an increased risk of developing lymph node and visceral metastases. CM is believed to spread mainly via the lymphatic route, although hematogenous diffusion has also been reported (Zbytek et al. 2008). Almost all organs can be involved, but the most common sites for distant CM metastases are the lungs, liver, bones, and brain. Until 2012, studies have shown that patients with distant metastatic CM had a median survival rate typically ranging from 6 to 10 mo and a 5-yr survival rate of ~15%–20% (Tas 2012).

OM, which originates from eye melanocytes, is the most common primary malignancy in the adult population. OM is classified based on the anatomic site of origin as conjunctival melanoma or UM. The large majority of OM originates from the uvea (95%), comprising the posterior uvea (choroid 90% and ciliary body 5%) and the anterior uvea (iris 5%). The UM staging system is based on the largest basal tumor diameter, ciliary body involvement, and extraocular involvement (Kujala and Kivela 2005). Approximately 8000 new cases of UM and 800 new cases of conjunctival melanoma are diagnosed worldwide each year. CM is 20–30 times more common than UM and 360–900 times more common than conjunctival melanoma (Singh and Topham 2003; Wong et al. 2014). In contrast to the incidence of UM, which has remained stable over the last three decades, the incidence of conjunctival melanoma is increasing (Triay et al. 2009). In the early stages, UM usually presents as a pigmented choroidal nodular mass in the eye fundus, growing toward the vitreous space with a typical mushroom shape. It can extend through sclera or the optic nerve in advanced stages. Symptoms of UM include blurred vision and seeing flashing lights and shadows, but most UM tumors are initially completely asymptomatic and are diagnosed by an ophthalmologist during a routine sight test, accounting for their frequent late stage diagnosis. Despite successful treatment of the primary tumor, only 1%–3% of patients have detectable extraocular lesions at diagnosis; up to 50% of patients develop metastases. Consequently, micrometastases appear to be established several years before the diagnosis of UM. UM spreads mainly via the bloodstream (i.e., hematogenously) (Dithmar et al. 2000). In 80%–90% of UM cases, the liver is the most common metastatic site, with the second most common site being the lung (Rietschel et al. 2005; Singh et al. 2005). Importantly, a nonliver first metastasis has been correlated with improved survival. At the metastatic stage, long-term survival is rare. Patients with liver metastases have a median survival time of 2–8 mo, and 80% of patients die within 1 yr (Diener-West et al. 2005). Conjunctival melanoma is a completely different entity and generally presents as a pigmented nodular lesion that is usually on the bulbar conjunctiva and often involves the limbus (Shields et al. 2011b). Most conjunctival tumors do not cause symptoms and are diagnosed during a routine eye examination by an ophthalmologist. Approximately

20%–30% of people will develop metastatic disease. Conjunctival melanoma disseminates via the lymphatics and the bloodstream to invade the lungs, brain, liver, skin, bones, and gastrointestinal tract but can undergo direct extension to the eyeball and orbit (Kenawy et al. 2013). The melanoma-specific survival rate is 86% at 5 yr and 71% at 10 yr (Missotten et al. 2005).

### Risk factors and genetic predisposition

The etiology of melanoma is complex and heterogeneous because it involves environmental, phenotypic, and genetic risk factors.

The major risk factors for CM include a personal and familial history of CM, a large number of nevi/dysplastic nevi, sun exposure, and skin reactions to sun exposure according to the phototype. Approximately 10% of CM is estimated to exhibit familial inheritance. Mutations in *cyclin-dependent kinase (CDK) inhibitor 2A (CDKN2A)* are found in up to 40% of cases of familial melanoma (Hussussian et al. 1994). *CDKN2A* encodes completely distinct proteins from two alternatively spliced transcripts, p16<sup>INK4a</sup> (inhibitor of kinase a) and p14<sup>ARF</sup> (alternative reading frame). p16<sup>INK4a</sup> inhibits CDK4 and CDK6, thus preventing phosphorylation of the retinoblastoma tumor suppressor RB1 and blocking *E2F* transcriptional activation. p14<sup>ARF</sup> inhibits human double minute 2 (HDM2), leading to p53 stabilization and increased expression of its target gene, *CDKN1A*.

The second high-risk CM susceptibility gene, for which only a few families have been reported to carry mutations, is *CDK4*. Germline mutations in *CDK4* contain arginine at position 24 instead of cysteine (p.R24C) or histidine (p.R24H) and prevent its interaction with p16<sup>INK4A</sup> (Zuo et al. 1996).

Additionally, germline inactivation of *RB1* predisposes carriers to CM, at least those who survive their retinoblastoma, a rare cancer of the eye (Fletcher et al. 2004). Hence, multiple mechanisms operate in CM to overcome the RB-dependent G1 arrest, thereby favoring improper progression from G1 to S phase and allowing uncontrolled cell proliferation. Furthermore, RB plays a pivotal role in the induction and maintenance of senescence. Therefore, all of the above-described alterations in the RB pathway favor senescence bypass, which is a mandatory step toward melanoma progression (Sherr and McCormick 2002).

In recent years, other high-risk genes have been discovered and may explain ~1%–2% of familial CM. Although not discussed in detail here, these candidates are associated with genes implicated in DNA repair, such as the gene encoding *BRCA-1-associated protein (BAP1)* (Wiesner et al. 2011), and in telomere maintenance, including *POT1*, *ACD*, *TERF2IP*, and *TERT* (*telomerase reverse transcriptase*) (for review, see Aoude et al. 2015). Thus, the process of senescence appears to be central to the development of melanoma because the melanoma susceptibility genes mentioned above are also linked to cellular senescence.

In addition to these rare but highly penetrant mutations, which confer a high risk of CM, more common

single-nucleotide polymorphisms (SNPs) represent low to intermediate CM susceptibility alleles. Two susceptibility genes with medium penetrance, *melanocortin-1 receptor* (*MC1R*) and *microphthalmia-associated transcription factor* (*MITF*), have also been implicated in the risk of CM. *MC1R* encodes the melanocyte-stimulating hormone receptor that acts by activating the cyclic adenosine monophosphate/protein kinase A (cAMP/PKA) pathway to control MITF expression and the pigmentation process (Bertolotto et al. 1998a, b). *MC1R* variants reduce the ability to stimulate eumelanin production, causing melanocytes to favor pheomelanin synthesis, and are responsible for the red hair color (RHC) phenotype (Schiøth et al. 1999). Furthermore, *MC1R* interacts with PTEN (phosphatase and tensin homolog) and protects it from degradation, allowing moderation of the downstream phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K) signaling pathway. Interestingly, the *MC1R* RHC variants do not interact with PTEN (Cao et al. 2013) and therefore might favor sustained activation of the PI3K pathway, which supports senescence bypass in the context of BRAF<sup>V600E</sup> (brain rapidly accelerated fibrosarcoma V600E) melanoma cells (Dankort et al. 2009; Vredeveld et al. 2012). Moreover, *MC1R* is also linked to DNA repair mechanisms (for review, see Herraiz et al. 2017). Therefore, alterations of *MC1R* functions in photoprotective melanin synthesis, DNA repair, and senescence bypass by RHC variants might explain the increased risk of melanoma in carriers.

*MITF* is a master regulator gene of melanocyte development and differentiation (Steingrímsson et al. 2004) and has also been associated with melanoma development and progression (Garraway et al. 2005). Recently, we and others identified a recurrent germline mutation in *MITF* (p.E318K) that predisposes carriers to melanoma (Bresnac-de-Paillerets et al. 2002; Bertolotto et al. 2011; Yokoyama et al. 2011; Ghiorzo et al. 2013). Additionally, variants of pigmentation genes (*MC1R*, *ASIP*, *MATP*, *TYRP1*, *SLC45A2*, and *OCA2*) or nonpigmentation genes (*MTAP*, *PARP1*, and *CASP8*) represent low penetrance mutations (for review, see Aoude et al. 2015). Although both medium to low penetrance genes per se have a weak impact on melanoma predisposition, they can act as modifiers of high-risk genes and somatic mutations and can dramatically impact melanoma development.

UM also occurs in a familial setting in 1%–2% of cases (Krygier et al. 2001). Major risk factors include fair skin and light eye color, a large number of dysplastic nevi, the presence of oculodermal melanocytosis or nevus of Ota, variation in the *HERC2/OCA2* region that influences the human pigmentation phenotype (Sturm and Larsson 2009; Ferguson et al. 2016), and infrequent mutations in the tumor predisposition syndrome gene *BAP1* (Harbour et al. 2010; Gupta et al. 2015). UM patients have a significantly increased risk of CM (Scelo et al. 2004), but the mechanisms underlying this risk remain unexplained. Variants in *MC1R* that were shown to influence the quality and quantity of melanin production do not play a role in the susceptibility to developing UM (Metzelaar-Blok et al. 2001; Hearle et al. 2003a,b; Vajdic et al. 2003). Likewise, current data argue against an important role of the

*CDKN2A* gene in UM susceptibility. However, methylation of the *p16<sup>INK4A</sup>* gene and inhibition of its expression or cyclin D overexpression have been reported (van der Velden et al. 2001). Moreover, although RB and p53 are infrequently mutated in UM, their respective pathways may be functionally inactivated (Brantley and Harbour 2000a, b). Tumor rarity and the few population-based studies restrict robust conclusions regarding potential risk factors for conjunctival melanoma.

## Acquired risk factors: genetic alterations

### CM

Recently, Bastian (2014) updated the classification of melanoma by integrating the huge amount of data revealing the genetic alterations in melanoma in association with specific clinical or histopathological characteristics and different environmental factors such as UVR, thereby providing an integrated taxonomy of melanocytic neoplasia. These acquired genetic alterations are depicted below (Fig. 1). In this review, we mainly refer to driver mutations, which, by definition, confer a selective growth advantage to the cells in which they occur (Vogelstein et al. 2013).

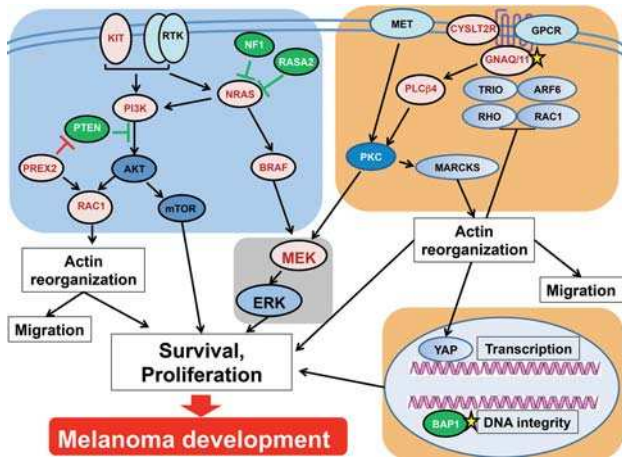
Whole-genome and whole-exome sequencing of large CM series confirmed the presence of *BRAF* (50%) and *NRAS* (20%–25%) mutations that had been identified previously using candidate gene approaches and also revealed a panel of novel frequent somatic genetic alterations that activate oncogenes or inactivate tumor suppressor genes (Berger et al. 2012; Hodis et al. 2012; Krauthammer et al. 2012; Network 2015).

The Ras family consists of the three isoforms *HRAS*, *NRAS*, and *KRAS*, each encoding a membrane-localized small GTPase that triggers the activation of RAF family serine/threonine kinases (ARAF, RAF1, and BRAF) and the downstream ERK (extracellular regulated kinase) pathway. The ERK pathway plays a very important role in tumor development, particularly in melanoma development, because it is involved in the control of several key cellular processes, including migration, survival, and proliferation (Dhillon et al. 2007).

Somatic *NRAS* mutations are concentrated within two hot spots that occur most frequently in exon 1 (leading to the substitution of glycine at position 12 [p.G12V]) or exon 2 (leading to the substitution of glutamine at position 61 [Q61K/L/R]) (Platz et al. 2008). The mutations prevent GTP (guanosine triphosphate) hydrolysis and lock *NRAS* in a permanently active state that continually activates downstream effectors such as BRAF.

Ninety percent of the hot spot somatic mutations in the serine/threonine protein kinase *BRAF* cause the amino acid substitution p.V600E in exon 15 (Davies et al. 2002). This mutation disrupts the normal intramolecular interaction that holds BRAF in an inactive conformation, thereby constitutively activating BRAF (Garnett and Marais 2004). Mutations in *BRAF* and *NRAS* occur in a mutually exclusive pattern.

Remarkably, among the new recurrent driver mutations that have been identified, two genes, neurofibromin



**Figure 1.** Main genetic and signaling pathway alterations in UMs and CMs. Signaling modules implicated in CMs (blue box), UMs (orange boxes), and both lesions (gray box). Gain-of-function (red) and loss-of-function (green) mutations are indicated as well as genes mutated in both UM and CM (yellow star). In CM, growth factor binding to receptor tyrosine kinase or mutations trigger the activation of the RAS (Rous sarcoma)–BRAF–MEK–ERK (extracellular regulated kinase) and/or PI3K–AKT (protein kinase B)–mTOR signaling cascades. In UM, ligand binding to G-protein-coupled receptors (GPCRs), among which is CYSLTR2 (cysteinyl leukotriene receptor 2), enables GNAQ/11 [guanine nucleotide-binding protein G(q) subunit  $\alpha$ /guanine nucleotide-binding protein subunit  $\alpha$ -1] to signal to downstream effectors such as ARF6 (ADP-ribosylation factor 6), TRIO, and PLC $\beta$  (phospholipase C  $\beta$ ) and triggers activation of multiple signaling pathways. These pathways include the TRIO–RHO–RAC (Ras-related C3 botulinum toxin)–YAP (yes-associated protein) cascade, which is involved in actin cytoskeleton reorganization and PKC (protein kinase C)–ERK, which controls cell proliferation. Moreover, BAP1, which is lost in a large proportion of UM, controls DNA integrity, proliferation, and survival of melanoma cells, the dysregulation of which is involved in transformation. Note that GNAQ/11 and BAP1 are also affected to a lesser extent in CMs.

1 (*NF1*) and *RAS* (*Rous sarcoma*) *p21* protein activator 2 (*RASA2*), which are mutated in ~15% and 5% of CM, respectively, function as RAS-GAP. *NF1* and *RASA2* undergo loss-of-function mutations that increase the level of active RAS-GTP and the activation of downstream ERK and PI3K signaling pathways (Hodis et al. 2012; Krauthammer et al. 2012, 2015; Arafah et al. 2015).

Mutations in *MAP2K1* (*mitogen-activated protein kinase kinase 1*; also called *MEK1*) and *MAP2K2* (*MEK2*), which function downstream from BRAF, have also been identified in 8% of cases and confer resistance to MEK and BRAF inhibitors (Emery et al. 2009; Nikolaev et al. 2011; Villanueva et al. 2013).

Altogether, mutations in the genes discussed above are found in >80% of CM patients and result in constitutive activation of the ERK signaling pathway.

It is noteworthy that these driver mutations do not necessarily translate into tumor induction, since *NRAS* and *BRAF* mutations are frequently found in congenital (Bauer et al. 2007) and common acquired (Pollock et al. 2003)

nevi, respectively. The nevus is thought to be a pre-tumoral lesion that displays blunted progression toward melanoma by senescence (Michaloglou et al. 2005; Denoyelle et al. 2006; Zhuang et al. 2008). Additional epigenetic or genetic alterations of *CDKN2A* or in the PI3K pathway are required to allow melanoma development (Ackermann et al. 2005; Dankort et al. 2009; Dhomen et al. 2009; Vredeveld et al. 2012). Consistent with these findings, recurrent somatic mutations in *BRAF* are frequently associated with a deletion in *PTEN* (7%) and/or *CDKN2A*, which also occurs at a somatic level in a large proportion of melanomas (30%). A recent study from our laboratory supports this idea, demonstrating that the *MITF*<sup>E318K</sup> variant functions by inhibiting cell cycle inhibitors, including p16<sup>INK4A</sup>, to delay the implementation of BRAF<sup>V600E</sup>-mediated oncogene-induced senescence (OIS) (Bonet et al. 2017).

Hence, the PI3K pathway and *CDKN2A* represent important modulators of ERK-dependent melanoma tumor progression (Tsao et al. 2004; Janku et al. 2011; Shull et al. 2012) by favoring OIS bypass and CM development.

PI3K also plays an instrumental role in melanoma. PI3K activation stimulates the downstream kinase AKT (protein kinase B) and engages pleiotropic cellular responses, including the regulation of cell motility, survival, and proliferation. In CM, the PI3K pathway can be activated as a consequence of constitutive *NRAS* activation and activating mutations or amplification in the catalytic subunit of *PI3K* (*PIK3CA* 4% and *PIK3CG* 3%) (<http://cbioportal.org>; Janku et al. 2011; Shull et al. 2012) as well as *AKT* (1%–4%) (Davies et al. 2008). However, the inactivation of *PTEN* that occurs in 20%–30% of CM cases due to mutations (8%), deletion (6%), or epigenetic silencing is the main cause of PI3K pathway activation (Wu et al. 2003; Mirmohammadsadegh et al. 2006). Supporting the key role of the PI3K pathway in melanoma, mutations in other effectors of the PI3K pathway have also been reported. The AKT family can activate  $\beta$ -catenin, another factor that is important for melanoma formation, which can also be altered by mutations (7% in The Cancer Genome Atlas [TCGA] cohort) (for reviews, see Larue and Delmas 2006; Bennett 2008).  $\beta$ -Catenin activation can impair OIS (Damsky et al. 2011) and, through p16<sup>INK4A</sup> inhibition, promote senescence evasion and immortalization in mouse melanocytes (Delmas et al. 2007). *PTEN* loss can also act through a PI3K-independent and caveolin-dependent pathway to trigger nuclear  $\beta$ -catenin shuttling, p16<sup>INK4A</sup> repression, and senescence bypass (Conde-Perez et al. 2015).

Also operating downstream from AKT, the mTOR signaling pathway is commonly affected (>15% of melanoma cases) by mutations in *MTOR*, *TSC1*, *TSC2*, *RICTOR*, and *RPTOR*, as observed in the TCGA melanoma cohort (<http://cbioportal.org>; Cerami et al. 2012; Gao et al. 2013). However, further studies are required to determine their potential contribution to CM development.

Mutations in *RAC1* (*Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1*), one of the key targets/ effectors of PI3K, occur at a frequency of ~4%–7%. *RAC1* belongs to the Rho family of genes that includes >20 members and encodes GTP

hydrolases, which are known to affect the cell cytoskeleton and motility. Additionally, aberrant activation of PREX2 (phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate-dependent RAC exchange factor 2), a member of the DBL family of guanine nucleotide exchange factors (GEFs) specific for RAC1, has been identified in 14% of cases. PREX2 has also been reported as a PTEN-interacting protein and negative regulator of its phosphatase activity (Fine et al. 2009; Berger et al. 2012). However, whether *PREX2* is a true melanoma driver gene has been questioned recently and thus remains to be formally determined (Horrigan et al. 2017).

Of note, 50% of CMs harbor genetic alterations in genes encoding *PTEN*, catalytic subunits of *PI3K*, *AKT*, and *RAC1*, which function in the PI3K signaling pathway.

CM can also display mutations or amplification in the transmembrane receptor tyrosine kinase *KIT* (5%–8% of cases). These alterations appear to be more frequent in acral, mucosal, or lentigo maligna melanomas (Curtin et al. 2006; Beadling et al. 2008). They lead to stem cell factor (SCF/*KIT* ligand)-independent activation of *KIT* and its associated downstream signaling cascade, including MAPK/ERK, PI3K, and phospholipase C (Carvajal et al. 2011; Allegra et al. 2014).

Most importantly, whole-genome/exome studies of CM have also led to the identification of frequent mutations in other genes, including the tumor suppressor gene *TP53* (19%), the subunit of the PBAF chromatin remodeling complex *ARID2* (7%), or the serine/threonine phosphatase *PPP6C* (12%), which is involved in the control of the cell cycle. The presence of recurrent somatic mutations in the *TERT* promoter (~75% of metastases and 33% of primary lesions) has been reported in CM (Patel et al. 2016). All of these mutations might also function to inhibit or delay OIS. A large panel of other (not discussed in this review), less frequently mutated genes has been revealed, all of which might represent CM drivers or modifying genes and are potential targets for new therapeutic approaches (for reviews, see Bertolotto 2013; Shtivelman et al. 2014; Zhang et al. 2016; Weyden et al. 2017).

Thus, this mutational landscape emphasizes the importance of the ERK and PI3K signaling pathways as well as the bypass of senescence in CM development, progression, and resistance to therapies.

## UM

Similar large-scale whole-genome and whole-exome sequencing studies performed in UM validated previously occurring mutations mainly in *GNAQ* [guanine nucleotide-binding protein G(q) subunit  $\alpha$ ] or *GNA11* [guanine nucleotide-binding protein subunit  $\alpha$ -11] (83%), *BAP1* (40%), *SF3B1* (splicing factor 3B, subunit 1) (20%), and *EIF1AX* (eukaryotic translation initiation factor 1A, X-linked) (8%) (Decatur et al. 2016; Johansson et al. 2016; Moore et al. 2016). These studies also pinpointed other driver genes that provide a basis for identifying molecular frameworks for the design of therapeutic strategies.

The  $\alpha$  subunit of the heterotrimeric G proteins (*GNAQ*) or its paralog (*GNA11*) share 90% sequence

homology and represent the most frequently mutated genes in UM. Ninety-seven percent of the hot spot somatic mutations cause the amino acid substitution p.Q209L (the most common) or p.Q209P in exon 5. The other 3% of mutations cause a p.R183C amino acid change in exon 4. The Q209 mutation triggers a complete loss of intrinsic GTPase activity and renders *GNAQ*/*GNA11* constitutively active to prolong its downstream signaling. In contrast, the R183 mutation is weakly activating because it causes only a partial loss of intrinsic GTPase activity. The Q209 and R183 mutations occur in a mutually exclusive pattern in UM. Mutations in *GNAQ* or *GNA11* are found in 45% and 32% of primary UM, respectively, and 22% and 57% of metastatic UM, respectively (Onken et al. 2008; Van Raamsdonk et al. 2009, 2010). Although differences between *GNAQ* and *GNA11* signaling have not been elucidated, these findings suggest that *GNA11* mutant tumors have a greater tendency to metastasize. GTP-*GNAQ*/11 and  $\beta$ - $\gamma$  subunits transfer the signal from the receptor to downstream effectors that stimulate diverse signaling pathways, including the MAPK pathway, possibly via DAG (diacylglycerol)-mediated activation of protein kinase C (PKC) isoforms, the ADP-ribosylation factor 6 (ARF6)–TRIO–RHO/RAC implicated in cytoskeletal organization, and yes-associated protein 65 (YAP), a key component of the HIPPO signaling pathway (Feng et al. 2014; Yu et al. 2014; Yoo et al. 2016). ARF6 acts as a proximal node of oncogenic *GNAQ* signaling and contributes to activation of the downstream pathways (Yoo et al. 2016). Of note, no ARF6 mutations have been discovered to date in UM or other cancers.

The importance of *GNAQ* in UM is highlighted by the observation that mutations in upstream regulators and downstream effectors were identified recently. Cysteinyl leukotriene receptor 2 (*CYSLTR2*) is a seven-transmembrane G protein-coupled receptor (GPCR) and a member of the rhodopsin-like family that responds to purinergic or pyrimidinergic nucleotides (P2Ys). As a member of the GPCR family, *CYSLTRs* signal through activation of *GNAQ*/11 (Mong et al. 1988). Recurrent p.L129Q as well as p.R136H mutations in *CYSLTR2* have been discovered in UM patients (Moore et al. 2016). Only p.L129Q *CYSLTR2*, which favors the transition toward an active conformation, is oncogenic. *CYSLTRs* are activated by cysteine-containing leukotrienes (LTC4, LTD4 [leukotriene D4], and LTE4), which are lipid mediators and robust inflammatory mediators. LTC4 and LTD4 are potent mitogens of normal human epidermal melanocytes (Morelli et al. 1989). Leukotrienes also have roles in multiple diseases, including cancer. LTD4, a *CYSLTR2* agonist, facilitates cell survival and proliferation of intestinal epithelial cells through  $\beta$ -catenin activation (Mezhybovska et al. 2005). LTD4 also regulates the survival and migration of human colon cancer cells by regulation of an anti-apoptotic member of the *BCL2* family and activating integrin, respectively (Massoumi et al. 2003; Wikstrom et al. 2003a,b). Collectively, these data are consistent with a role for LTD4 in cancer, including UM. Additionally, in response to a pathobiological event, *CYSLTR2* can mediate an increase in vascular

permeability in some tissues (Beller et al. 2004), a process that might contribute to UM blood dissemination.

Among the downstream effectors of GNAQ/11 are members of the phospholipase C (PLC) family (mainly PLC $\beta$ ), which hydrolyzes PIP<sub>2</sub> (phosphatidylinositol-2 phosphate) to generate IP<sub>3</sub> (inositol trisphosphate) and DAG. IP<sub>3</sub> triggers the release of calcium ions from the endoplasmic reticulum, whereas DAG activates the PKC signaling cascade. A recurrent mutation in *PLCB4*, which encodes p.D630Y, was identified recently in UM patients (Johansson et al. 2016; Moore et al. 2016). This mutation is located in the Y domain of the highly conserved catalytic core of *PLCB4*, which is activated by direct interaction with GNAQ (Lyon and Tesmer 2013). A novel mutation in *PLCB3*, encoding p.K898N, has also been discovered (Johansson et al. 2016). Again, this mutation lies in a domain, the CTD linker, that is linked to GNAQ activation (Lyon and Tesmer 2013). However, the role of *PLCB3* as a UM driver gene remains to be demonstrated. Mutations in *CYSLTR2*, *GNAQ*, *GNA11*, and *PLCB4* are mutually exclusive, suggesting that they operate in the same pathway.

UM metastases are also associated with inactivating somatic mutations in *BAP1* in ~80% of cases, which generally cause protein truncations and are associated with a poor prognosis (Harbour et al. 2010). *BAP1* is a chromatin-associated deubiquitinase that induces poly (ADP-ribose)-dependent recruitment of the polycomb deubiquitylase complex PR-DUB (polycomb-repressive deubiquitylase) to sites of DNA damage and is required for efficient assembly of the homologous recombination (HR) factors BRCA1 and RAD51 (An et al. 2014). Consequently, its mutation impairs its function in DNA double-strand break repair (Ismail et al. 2014). Moreover, *BAP1* impacts histone H2A ubiquitination, regulates transcriptional programs that support the maintenance of melanocytic cell identity, and blocks their transition toward a stem-like phenotype (Landreville et al. 2012; Matatall et al. 2013).

Dysregulation of the activity of two other genes, *SF3B1* and *EIF1AX*, has prognostic value in UM.

*EIF1AX* is a component of the 43S preinitiation complex (PIC), which mediates the recruitment of the small 40S ribosomal subunit to the 5' cap of messenger RNAs. It is not clear how these mutations might promote cancer, but the dysregulation of mRNA translation is a frequent feature of neoplasia (Bhat et al. 2015). Recurrent mutations in *EIF1AX* are found mainly in low metastatic risk tumors with no ciliary body involvement (Furney et al. 2013; Martin et al. 2013; Johansson et al. 2016), meaning they are associated with a good prognosis.

*SF3B1* encodes a core component of the U2 small nuclear ribonucleoprotein (snRNP) complex of the spliceosome involved in 3' splice site recognition during RNA splicing (Furney et al. 2013; Zhang and Manley 2013; Alsafadi et al. 2016). Alternative splicing contributes to structural transcript variation and proteome diversity, a process involved in disease progression (Sveen et al. 2016). The *SF3B1* missense hot spot mutations (p.R625C, p.R625H, p.K666T, and p.K700E) are associated with low risk for metasta-

sis (Furney et al. 2013; Harbour et al. 2013; Martin et al. 2013; Alsafadi et al. 2016). Recently, Harbour's group (Field et al. 2016a,b) has shown that *SF3B1* mutations often occur in tumors expressing the oncogene *preferentially expressed antigen in melanoma (PRAME)*, which is an independent biomarker for metastasis. *PRAME* expression appears to be inversely associated with *EIF1AX* mutations.

*BAP1*, *SF3B1*, and *EIF1AX* mutations are almost mutually exclusive with each other (Martin et al. 2013; Decatur et al. 2016; Royer-Bertrand et al. 2016; Yavuziyigitoglu et al. 2016).

Finally, whole-genome/exome studies have revealed somatic missense or truncating mutations in a panel of other genes, but their roles in UM remain to be elucidated (Johansson et al. 2016; Royer-Bertrand et al. 2016).

Interestingly, GNAQ/11 mutations have also been identified in ~5% of skin melanomas, but oncogenic driver mutations similar to those identified in UM (Q209P or Q209L) are found in only ~2% of CM cases (<http://cbioportal.org>). One Q209 mutation was found in a CM from chronically sun-damaged skin among the 74 samples analyzed (Van Raamsdonk et al. 2010). Furthermore, *PLCB4* is recurrently mutated with a high frequency (21%–28%) in CM (Wei et al. 2011; Hodis et al. 2012; The Cancer Genome Atlas Network 2015; Krauthammer et al. 2015). However, none of these mutations is identical to those found in UM, and no hot spot mutations can be found, indicating that they are unlikely to function as driver mutations. It should be noted that *TRIO* is also affected in 10% of CM. In 5% of the cases, these alterations seem to be passenger mutations, but, in the remaining 5%, *TRIO* is amplified (<http://cbioportal.org>) and might participate in CM development. Nevertheless, elucidation of the role of GNAQ/11 and its downstream effectors, *PLCB4* and *TRIO*, in CM requires additional investigation.

Finally, *BAP1* is affected in 40% of UM cases, and the majority of the alterations is truncating mutations. In contrast, *BAP1* is affected in 3% of CM cases, but truncation mutations are a rare event (<http://cbioportal.org>).

Little is known about the genetic perturbations in conjunctival melanomas. Nevertheless, primary and metastatic conjunctival melanomas harbor *BRAF*, mainly p.V600E (27%–50%) and *NRAS* p.Q61K/R/L (18%) mutations (Griewank et al. 2013). Mutations in the promoter of *TERT* are also detected in conjunctival melanomas (32%) but not in UM (Griewank and Murali 2013). They harbor a UV signature identical to those found in CM that mediates increased expression of *TERT* by generating new binding motifs for Ets transcription factors (Horn et al. 2013). Therefore, from a genetic perspective, conjunctival melanoma seems to have more similarities to CM than to UM.

### Cytogenetic alterations

Before the use of deep sequencing approaches, the genetic modifications in CM and UM were determined by cytogenetic studies. Comparative genomic hybridization was

used to map copy number abnormalities. The frequent chromosomal aberrations are reported below.

CM exhibits complex cytogenetic alterations (for review, see van den Bosch et al. 2010). They are characterized by frequent losses involving chromosomes 4, 5, 6q, 8p, 9p, 10q, 11q, 12q, 14, 15, 16, 21, and 22, whereas gains most often occurred at 1q, 6p, 7, 8q, 18, and 20q (Bastian et al. 1998; Pirker et al. 2003). It is worth mentioning the rearrangement in chromosome 1, where *NRAS* (1p13 region) and *AKT3* (1q44 region) are located; of chromosome 7, harboring the *BRAF* gene (7q34); and of chromosome 9 with *CDKN2A* (9p21).

In UM, chromosomal aberrations include mainly monosomy 3 (50%) as well as 6p and 8q gain. UM tumors with monosomy 3 and polysomy 8q correlate with high metastatic risk and poor prognosis (de Lange et al. 2015; Versluis et al. 2015). Monosomy 3 occurs in 50% of the analyzed cases, is rather specific for UM because this chromosomal aberration is rarely encountered in other cancer types, and is the most widely used predictor of UM metastatic disease (van den Bosch et al. 2012). Chromosome 3 likely hosts tumor suppressor genes. One of the most studied is *BAP1*. Conversely, genes that can contribute to tumor progression are located in the 8q region, such as *MYC* (8q24) (Muller et al. 2010) or *ASAP1* (*DDEF1*; 8q24) (Meyer and Penn 2008). Interestingly, ArfGAP with the SH3 domain, ankyrin repeat, and PH domain (*ASAP1*) is a GTPase-activating protein for ARF1 as well as ARF6 (Furman et al. 2002). Although the gain of chromosome 8q is also found in 25% of CM, co-occurrence of both monosomy 3 and the gain of 8q is rare in CM. UM tumors with such a 6p gain are less likely to show chromosome 3 loss and are associated with better survival. Moreover, chromosome 10, which contains *PTEN*, is also altered in UM (27%) but to a lower frequency compared with CM (60%). *PTEN* down-regulation seems to occur in UM lesions with high genomic instability, supporting a role late in tumor progression (Ehlers et al. 2008).

Several other DNA copy number alterations, including the gain of 1q or loss of 8p, 1p, and 6q, also characterize UM (Aalto et al. 2001; Trolet et al. 2009; Damato et al. 2010; Royer-Bertrand et al. 2016).

Collectively, CM tumors display very complex karyotypes that cannot be used to provide valuable prognostic information. In contrast, UM presents a relatively “simple” karyotype, with recurrent chromosomal anomalies, which has valuable prognostic impact for patients. Consequently, high-risk patients may benefit from accurate surveillance (including of the liver, which is the most common metastatic site) or enter clinical trials investigating adjuvant therapy.

### The gene expression program

Cytological and histochemical methods have long been recognized as useful for analyzing the intertumor and intratumor heterogeneity in CM. More recently, high-throughput approaches (DNA arrays and RNA sequencing) have confirmed that CM displays a high degree of

intertumor heterogeneity even in the same individual (Kemper et al. 2015). Intratumoral heterogeneity was validated at the single-cell level (Ennen et al. 2015; Tirosh et al. 2016). Tumor phenotypic heterogeneity may be caused by genetic heterogeneity but also may be generated by the impact of the tumor microenvironment without any requirement for new or additional genetic events. Understanding and deciphering tumor heterogeneity remain a challenge to cancer therapy.

CM cells can be classified into at least two major states, i.e., proliferative and invasive (Hoek et al. 2008). A model derived from these findings, the “phenotype-switching” model, predicts that melanoma cells are plastic and may switch between these two states to generate intratumoral heterogeneity (Hoek and Goding 2010). This model postulates that high MITF activity triggers a differentiation phenotype, whereas low MITF activity is associated with mesenchymal transition and an invasive phenotype (Carreira et al. 2006; Cheli et al. 2011; Ohanna et al. 2011). More recently, a larger gene repertoire linked to activation of the HIPPO–YAP pathway (Muller et al. 2014; Verfaillie et al. 2015) and metabolic stress responses (Falletta et al. 2017) has been established as an indicator of this plasticity. Previous reports have demonstrated that phenotype switching toward a more mesenchymal cell state is associated with intrinsic and acquired resistance to targeted therapies (Johannessen et al. 2013; Konieczkowski et al. 2014; Muller et al. 2014; Van Allen et al. 2014). Melanoma phenotype switching also negatively impacts immune checkpoint blockade and impairs the efficiency of immunotherapy (Landsberg et al. 2012; Riesenberger et al. 2015; Falletta et al. 2017).

Intertumor heterogeneity has also been described in UM. Molecular analyses classify UM into two prognostically significant molecular classes (Onken et al. 2004, 2006, 2010a). Class 1 UM tumors, which have been further divided into well-defined class 1A and class 1B, retain a differentiated melanocytic phenotype and have a low to intermediate metastatic risk, respectively. *EIF1AX* and *SF3B1* are associated with class 1, with *SF3B1* showing a particular association with class 1B (Harbour et al. 2013). Class 2 UM tumors exhibit a dedifferentiated stem cell-like and epithelioid phenotype that is associated with monosomy of chromosome 3 and a high metastatic risk (Field and Harbour 2014). Interestingly, the class 2 expression program is mainly a consequence of monosomy 3 and loss of function of *BAP1*. Indeed, depletion of *BAP1* in cultured class 1 UM cells induced a loss of the melanocyte differentiation markers and the acquisition of a class 2 gene expression profile (Landreville et al. 2012; Matatall et al. 2013).

The gene expression profile capable of distinguishing class 1 and class 2 primary UM has been further restricted to a set of 12 genes (Table 2). This set has been shown to be more accurate than all other clinical and pathologic factors, such as chromosome 3 status (monosomy 3), cytopathology, and tumor size, in predicting the development of metastases (Onken et al. 2010b).

Importantly, coexistence of the spindle and epithelioid cells in some UM tumors revealed by histopathological



**Table 2.** Gene expression signature in UM

Gene symbol	Gene name	Genomic location	Direction in class 2 primary UM	Function	Correlation with survival in CM; <i>P</i> -value
<i>CDH1</i> *	E-cadherin	16q22.1	Up	Cell–cell adhesion, mobility and proliferation of epithelial cells	No
<i>ECM1</i> *	Extracellular matrix protein 1	1q21.2	Up	Cell adhesion, cell-to-cell communication and differentiation	No
<i>RAB31</i> *	RAB31, member RAS oncogene family	18p11.22	Up	Regulator of vesicle trafficking	No
<i>HTR2B</i> *	5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 2B	2q37.1	Up	Receptor	Positive ( <i>P</i> = 0.044)
<i>ID2</i> <sup>†</sup>	Inhibitor of DNA binding 2	2p25.1	Down	Transcriptional regulator	Positive ( <i>P</i> = 0.008)
<i>EIF1B</i> *	Eukaryotic translation initiation factor 1B	3p22.1	Down	Poly(A) RNA binding and translation initiation factor activity	No
<i>FXR1</i> *	Fragile X mental retardation autosomal homolog 1	3q26.33	Down	Nucleic acid binding and RNA binding	No
<i>LMCD1</i> *	LIM and cysteine-rich domains 1	3p25.3	Down	Protein–protein interactions, Transcriptional regulator	No
<i>ROBO1</i> <sup>†</sup>	Roundabout, axon guidance receptor 1	3p12.3	Down	Receptor	No
<i>SATB1</i> *	SATB homeobox 1	3p24.3	Down	Transcriptional regulator	Positive ( <i>P</i> = 0.046)
<i>MTUS1</i> <sup>†</sup>	Microtubule-associated tumor suppressor 1	8p22	Down	Signaling	Positive ( <i>P</i> = 0.019)
<i>LTA4H</i> *	Leukotriene A4 hydrolase	12q23.1	Down	Poly(A) RNA binding and peptidase activity	No
<i>AZGP1</i> <sup>†</sup>	α-2-glycoprotein 1, zinc	7q22.1	Down	Metabolism	No
<i>ENPP2</i> <sup>†</sup>	Ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 2 (autotaxin)	8q24.12	Down	Metabolism	No
<i>EDNRB</i> <sup>†</sup>	Endothelin receptor type B	13q22.3	Down	Receptor	Positive ( <i>P</i> = 0.004)
<i>GPR37</i> <sup>†</sup>	G protein-coupled receptor 37 (endothelin receptor type B-like)	7q31.33	Down	Receptor	No
<i>IL12RB2</i> <sup>†</sup>	Interleukin 12 receptor, β 2	1 p31.3	Down	Receptor	No
<i>SPP1</i> <sup>†</sup>	Secreted phosphoprotein 1 (osteopontin, bone sialoprotein I, early T-lymphocyte activation 1)	4q22.1	Down	Cell matrix interaction	No
<i>VAMP8</i> <sup>†</sup>	Vesicle-associated membrane protein 8 (endobrevin)	2p11.2	Down	Regulator of vesicle trafficking	Positive ( <i>P</i> = 0.006)

List of genes that distinguishes low metastatic risk (class 1 signature) and high metastatic risk (class 2 signature) primary UMs (Onken et al. 2004, 2010b). This list contains the high stringency genes that discriminate class 1 and class 2 genes (†) (fold change >5 and false discovery rate <0.001) (Onken et al. 2006) and the set of 12 genes (\*) that has been proposed using a clinically practical PCR-based prognosis assay to identify high-risk patients (Onken et al. 2010b). The direction of the gene expression change in class 2 versus class 1 primary UMs is shown (fourth column). Kaplan-Meier survival analysis for TCGA CM data between the lower and upper quartiles was computed (sixth column). A positive correlation indicates that high gene expression is associated with a good prognosis (*P*-value is given). “No” indicates no correlation. Thus, some genes may have important functions in both UM and CM.

analysis suggests the existence of intratumor heterogeneity in addition to intertumor heterogeneity.

Furthermore, UM metastasis and poor patient outcome are associated with monosomy 3 and the loss of differentiation markers. Remarkably, *MITF*, which controls melanocyte differentiation (Bertolotto et al. 1998a; Cheli et al. 2010) is located in 3p13. Moreover, in skin melanocyte cells, *MITF* controls the expression of a repertoire of genes involved in DNA repair and replication (Giuliano et al. 2010; Strub et al. 2011). Consequently, one might hypothesize that, in UM, monosomy 3 triggers a reduction

of both *BAP1* and *MITF* levels and dampens accurate DNA repair, favoring chromosomal instability and UM progression.

In support of this idea, tumors with disomy 3 contain fewer chromosomal abnormalities, rarely metastasize, and thus are associated with a better survival rate (Onken et al. 2010a; Shields et al. 2011a), which might be explained by the maintenance of *MITF*. Moreover, *MITF* haploinsufficiency might favor UM cell switching from a differentiated to undifferentiated metastatic-prone phenotype as observed for CM and therefore might contribute

to metastasis development. Collectively, these observations suggest that MITF, which is a nexus in CM pathology, might also play a critical role in UM.

Activation of the transcriptional coactivator YAP, a critical downstream effector of the HIPPO signaling pathway, has been reported in both CM and UM (Feng et al. 2014; Nallet-Staub et al. 2014; Yu et al. 2014). YAP is activated in UM cells downstream from the oncogenic mutation of GNAQ/11 and is required for GNAQ/11-induced tumorigenicity in UM. The YAP-TEAD cascade seems to be implemented in CM cells that have lost MITF and engages in an invasive gene expression program (Verfaillie et al. 2015). These observations suggest that these signaling molecules (MITF, BAP1, and YAP) may represent suitable pharmacological intervention strategies in both tumor types.

### Role of UV

It has long been suspected that UVR exposure was the main environmental risk factor for melanoma. However, the link with melanoma development was not fully understood until recently. Large-scale genomic studies have revealed a higher rate of somatic mutations in CM tumors than in any other tumor types (Lawrence et al. 2013), with a median of 16.8 mutations per megabase (Berger et al. 2012; Hodis et al. 2012; Krauthammer et al. 2012; The Cancer Genome Atlas Network 2015). The highest average mutation rate was observed in chronically sun-damaged skin melanomas (21 per megabase), whereas acral and mucosal melanomas displayed a very low mutational load (The Cancer Genome Atlas Network 2015). These studies have unequivocally provided genomic evidence for a direct mutagenic role of UV light in melanoma pathogenesis. The mutations are predominantly C-to-T or tandem CC-to-TT transitions at specific dipyrimidine sequences, which is the mutational signature of UVB light (Harris 2013), or G-to-T substitutions that might reflect a transversion following oxidative DNA damage (Cheng et al. 1992). Specifically, it was found that 46% and 9% of melanoma driver mutations can be attributed to C > T or G > T mutations, respectively (Hodis et al. 2012). BRAF<sup>V600</sup> variants, particularly BRAF<sup>V600E</sup>, which is the main driver gene in melanoma, do not bear the traditional UVB signature mutations. However, sunlight UV is also composed of UVA, which is thought to promote mutagenic lesions through oxidative damage (Besaratina et al. 2004). Accordingly, DNA lesions induced by UVA exposure resemble the BRAF<sup>V600E</sup> variant mutation (Thomas 2006; Besaratina and Pfeifer 2008).

From the genomic analyses, it appears that UM tumors have a low mutation burden. Johansson et al. (2016) identified a mean of 10.6 protein-changing mutations per sample, which is consistent with other studies reporting 17 variants per tumor on average (Royer-Bertrand et al. 2016). The mean mutation rate across the UM patient genomes ranges between 0.24 and 0.50 per megabase, which is lower than that of metastatic CM, and the mutation spectrum is not consistent with an UVR signature

(Johansson et al. 2016; Royer-Bertrand et al. 2016), strengthening the lack of UV involvement in UM etiology. However, a C-to-T transition has been described in few cases of UM with a GNAQ/11 R183 mutation, suggesting a possible role of UV in UM.

### Comparative biology of UM and CM

#### *Why are driver mutations different in UM and CM?*

As mentioned above, despite the fact that both CM and UM are derived from melanocytes that originate from neural crest cells, the driver mutation landscape is completely different in these two neoplasms. This difference might be ascribed to the lack of UVR involvement in UM etiology, while UVR is a proven risk factor for CM.

However, the risk of intraocular melanoma is much higher in Caucasians than in African Americans and people with light-colored eyes (Seddon et al. 1990; Vajdic et al. 2002; Tsai et al. 2005), suggesting a possible link to sunlight exposure. Further studies have also proposed a role for short-wavelength blue-light exposure in the etiology of UM (de Lange et al. 2015). Blue light, which is part of the visible light spectrum, reaches deeper into the eye and causes damage to the back of the eye. Although only a part of blue light is harmful, our exposure to it is increasing due to the use of digital devices and modern lighting, which emit blue light. Furthermore, as has been shown for CM, the pheomelanin pigment pathway might contribute to uveal melanomagenesis by a UVR-independent carcinogenic mechanism that depends on oxidative damage (Mittra et al. 2012). Again, this is consistent with the fact that both CM and OM are more common in individuals with pale skin and eyes with light-colored irises in comparison with those with dark-brown skin and eyes (Tsai et al. 2005).

Of note, the main driver mutations—GNAQ/11<sup>Q209L</sup> (c.626A > T) and CYSLTR2<sup>L129Q</sup> (c.386T > A) in UM and BRAF<sup>V600E</sup> (c.1799T > A) in CM—display homologous base substitutions, which are not related to UVR, suggesting a converging mutational mechanism.

In addition to understanding the cause of the mutations, it is also important to consider why causative driver mutations are not identical in UM and CM. It should be noted that BRAF and NRAS mutations dominate in lesions arising in an epithelial context such as conjunctival melanoma and CM, excluding blue nevi and blue-nevus-like melanoma. GNAQ/11 mutations are found in melanocytic lesions with an extraepithelial location.

Indeed, GNAQ/11 mutations are not restricted solely to UM but are also found in melanocytic lesions located in leptomeninges (diffuse melanocytosis and meningeal melanomatosis) and dermis (nevus of Ota, blue nevi, and blue nevus-like melanomas) (Van Raamsdonk et al. 2009, 2010; Murali et al. 2012). Most of these lesions arise in the craniofacial region, albeit blue nevi can be found anywhere on the body. A plausible explanation for GNAQ/11 mutation predominance in nonepithelial melanocytes involves subtle geographic variances in the embryonic origin of epithelial and nonepithelial melanocytes. Along the

embryonic axis, several distinct neural crest populations differ in both their migratory pathways and range of derivatives (Bronner-Fraser 1994). In this context, it has been suggested that nonepithelial melanocytes derive from the cranial rather than the truncal neural crest (Francis et al. 2016), which indicates that although the melanocytes have the same embryonic origin (i.e., the neural crest), they might behave differently as a function of their relative anterior–posterior position (Mayor and Thevenau 2013). However, blue nevi located on the legs, for instance, are unlikely to derive from the cranial neural crest.

Furthermore, it should be noted that epidermal melanocytes interact with epithelial cells, whereas noncutaneous melanocytes interact with mesodermal stroma. The growth and differentiation of epidermal melanocytes appear to be dependent on KIT signaling, whereas noncutaneous melanocytes seem more dependent on the endothelin and hepatocyte growth factor (HGF) signaling pathways (Wilson et al. 2004; Aoki et al. 2009). Therefore, it could be argued that CM and UM acquire the same mutations, but direct cell contact or the paracrine signal produced by the tissue-specific environment might allow proliferation of cells only with specific mutational events and therefore favor selection of specific driver mutations.

Finally, Adameyko et al. (2009) showed that Schwann cells, which also originate from the neural crest and differentiate to form myelin sheaths that surround the mature nerve, constitute another source of melanocytes. A mutation in *GNA11* has been reported in a melanotic Schwannoma, a soft tissue benign neoplasm of Schwann cells, which shares histologic features with melanocytic tumors and Schwannomas (Tatsi et al. 2016). Because the mutational spectra of these lesions overlap, it has been hypothesized previously that both cell types could derive from the same developmental mechanism (Van Raamsdonk et al. 2010; Bastian 2014).

#### *Why are gene expression signatures different in UM and CM?*

In both CM and UM, extensive efforts have been undertaken to identify genes or sets of genes that can predict the clinical outcome of the patients, including metastasis development and survival. As mentioned earlier, the study of numerous primary UM patients has led to a well-defined molecular classification (Table 2). Class 2 UM has the poorest survival prognosis and is characterized by an increase in epithelial markers such as E-cadherin (*CDH1*) and a loss of differentiation markers such as *tyrosinase (TYR)* or *DCT*. For CM, the gene expression signature has been obtained by analysis of metastatic melanoma cell lines or short-term cultures and defines a high-MITF/differentiated group endowed with fast proliferation capacity and a low-MITF/poorly differentiated group with highly invasive behavior. The low-MITF CM generally lost epithelial markers such as E-cadherin and gained a mesenchymal phenotype. In these analyses, the use of tumor tissue for UM versus cultured metastatic cells for CM might explain this apparent discrepancy. Of note, analysis of CM tumor tissue also identified a “keratin sub-

class” of CM with high expression levels of keratin and epithelial markers (*CDH1*), indicating a worse prognosis (The Cancer Genome Atlas Network 2015). However, this subclass also displays a high level of differentiation markers, in contrast to reports for primary UM samples. The natures of analyzed UM and CM samples are not similar. Primary lesions are predominant in UM cohorts, while CM tissues are mainly from metastatic samples (80%), of which ~50% are lymph node metastases (The Cancer Genome Atlas Network 2015).

The natural history of metastatic tumor development requires, first, an *in situ* proliferation phase followed by an invasion phase, allowing melanoma cells to reach metastatic sites. Once at the metastatic site, cells with invasive properties can migrate and colonize other organs or proliferate to promote an increased tumor size, functional failure of the affected organ, and, ultimately, patient death. Therefore, survival will be affected by the ability of tumor cells to implement both the invasive and subsequent proliferative programs. In primary skin melanoma lesions, cells must enable the invasive program, while metastatic cells require only the proliferative program. Accordingly, the gene expression signature associated with poor prognosis might be different if it stems from primary UM lesions or CM metastatic samples.

Despite the invaluable basic information provided by gene expression analyses of melanoma lesions, their translation into clinical advances are currently minimal for CM. Furthermore, primary CM shows a very high level of contamination by keratinocytes that may hinder accurate gene expression profiling. For UM, gene expression profiling has a real clinical impact, perhaps because the analyzed samples are more homogenous.

#### *Why does UM display prominent liver tropism?*

Metastasizing UM displays a tropism to the liver in 90% of cases, while CM does not demonstrate such a preferential tropism. Indeed, CM cells disseminate to skin or lymph nodes and almost equivalently to the lungs, liver, brain, and bones (Balch et al. 2003). Several factors might be important for favoring UM liver metastasis progression, such as the invasion route used by tumoral cells. It is accepted that CM cells prefer the lymphatic system, while UM cells spread almost exclusively hematogenously. The hematogenous routes might favor dissemination of tumor cells from the eye to the liver rather than to others organs. It is also possible that the specific loose structure of the liver endothelial vasculature, presenting large fenestrae (Wisse et al. 2008), might favor liver colonization by UM cells. Another mechanism could be related to the metabolic status, which has been shown in breast cancer cells to dictate the site of metastasis (Dupuy et al. 2015).

Finally, recent data demonstrated that UM-derived exosomes expressing integrin  $\alpha V$ /integrin  $\beta 5$  are taken up by liver-specific cells to prepare the premetastatic niches and steer the liver tropism of UM cells (Hoshino et al. 2015). In addition to favoring the nesting of UM cells, the liver might also provide a favorable environment for sustaining the growth of UM. This phenomenon could be achieved

through liver production of HGF, which stimulates the proliferation and survival of UM cells expressing the surface receptor c-Met (Bakalian et al. 2008). A complete identification of the mechanisms mediating this tropism will undoubtedly help to improve patient surveillance and outcome.

### From bench to bedside: the therapeutic options

The identification of specific biological, molecular, and genetic tumor features have led to the development of “personalized therapy”; i.e., therapies tailored to patient-specific molecular aberrations. More precisely, the discovery of the BRAF<sup>V600E</sup> mutation led to the development of BRAF (vemurafenib and dabrafenib) and MEK (trametinib and cobimetinib) inhibitors (Sullivan and Flaherty 2015b). Bitherapy, combining both BRAF and MEK inhibitors, is the reference treatment for patients with metastatic CM harboring a mutation at codon 600 of BRAF; however, in some centers, it is superseded by immunotherapy (described below). The targeted therapies have allowed, for the first time, a >12-mo increase in the median overall survival of the patients (Long et al. 2014; Ugurel et al. 2016). However, despite the success of these treatments, most patients eventually develop secondary resistance and relapse.

The genetic studies suggest that conjunctival melanoma behaves more similarly to CM than UM. Although there is no standard recommendation for the treatment of patients with conjunctival melanoma, there is ample evidence to test patients for mutations at codon 600 of BRAF and assess the efficacy of the BRAF and MEK inhibitors.

Currently, there is no systemic treatment for UM once it has spread. UM metastases are remarkably refractory to conventional chemotherapy and nonsensitive to external radiotherapy. Mortality rates have not changed in the last decades. In patients with UM metastases, BRAF and/or MEK inhibitors are generally ineffective due to the absence of the BRAF mutation (for review, see Oliva et al. 2016). However, because a phase 2 trial showed promising results with the MEK inhibitor selumetinib (Carvajal et al. 2014), there are several ongoing trials for UM patients assessing the efficacy of selumetinib in combination with chemotherapies or with PKC and AKT inhibitors (Chattopadhyay et al. 2016).

Nevertheless, the discovery of *GNAQ*, *GNA11*, *CYSLTR2*, and *PLCB4* mutations has paved the road toward specific targeted therapies for UM. In this context, FR900359, a selective inhibitor of GNAQ/11/14, has been identified recently and shown to blunt the signaling downstream from GNAQ<sup>R183C</sup> and GNAQ<sup>Q209L</sup> (Schrage et al. 2015). Moreover, compounds with anti-CYSLTR2 activity are currently being tested in phase 2 clinical trials (Wunder et al. 2010). As CYSLTR2 functions upstream of GNAQ/11, CYSLTR2 inhibitors are expected to be efficient only in UM without GNAQ/11 or PLCB4 mutations.

Inhibitors of TRIO (Blangy et al. 2006; Schmidt and Debant 2013) or ARF6 (Yoo et al. 2016) have been described and would be of wider use because they will block

oncogenic signaling downstream from mutated GNAQ/11 and CYSLTR2, overall representing ~95% of the UM cases. These inhibitors might not be efficient in UM with PLCB4 mutations.

Finally, CM and UM might be sensitive to the same inhibitors. For example, UM with mutations in EIF1AX might benefit from inhibitors of the formation of the EIF4F complex, which is required downstream from EIF1AX for the regulation of cap-dependent translation. Such inhibitors have been described and have shown some efficacy in a preclinical model of CM (Boussemaert et al. 2014). The potential targets and drugs are summarized in Table 3.

Additionally, studies have elucidated how CTLA4 (cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4) and PD-1 (programmed cell death 1) decrease activation of the immune system, thereby leading to the development of monoclonal antibodies against CTLA4 (ipilimumab) and PD-1 (nivolumab and pembrolizumab). These antibodies have demonstrated clear clinical benefits in patients with metastatic CM. Indeed, objective response rates are obtained at 15%–30% and demonstrate durable responses, reaching an 18-mo increase in median survival (Hodi et al. 2010; Topalian et al. 2014; Carlino and Long 2016). The combination of ipilimumab and nivolumab showed even greater improvements in patient overall survival compared with anti-CTLA4 or anti-PD1 monotherapy (Kaufman et al. 2013; Sullivan and Flaherty 2015a). Clinical trials investigating antibodies against PDL1 (programmed cell death ligand 1), a PD1 ligand, have demonstrated promising activity in advanced CM, albeit with generally lower response rates than PD1 antibodies (Tsai et al. 2014; Mahoney et al. 2015).

Until now, immunotherapeutic approaches targeting immune checkpoints have revealed limited efficacy in metastatic UM (Danielli et al. 2012; Algazi et al. 2016; van der Kooij et al. 2017). Ipilimumab has failed to demonstrate a clear objective clinical response (for review, see Oliva et al. 2016). Similarly, anti-PD1 (either pembrolizumab or nivolumab) or anti-PDL1 (Algazi et al. 2016) has demonstrated poor clinical activity (Algazi et al. 2016; van der Kooij et al. 2017).

The weak response of metastatic UM to immunotherapies might be ascribed to the maintenance of ocular immune privilege, which has been involved in the suppression of both adaptive and innate immune effector mechanisms (McKenna and Chen 2010). Moreover, the CM response to immunotherapies seems to be correlated to the mutational burden, which is thought to generate neoantigens (Johansson et al. 2016; Royer-Bertrand et al. 2016). The low mutational burden of UM might also explain the moderate response to immunotherapies.

Clinical trials evaluating the efficacy of pembrolizumab in monotherapy, which nevertheless has shown a more favorable response in one study (Kottschade et al. 2016), and the combination of ipilimumab and nivolumab are currently under way (Chattopadhyay et al. 2016). In the absence of rational treatment options for metastatic UM, immunotherapy should be considered, and additional clinical trials should be scheduled. In support of this

**Table 3.** Clinically relevant targets in UM

Drugs	Targets	Indication	Clinical trials in UM	Comments
ONO-6950	CYSLTR2	Asthma		Asthma: NCT01551147
HAMI3379	CYSLTR2	Asthma		Preclinical development
FR900359	GNAQ/11	Asthma		Preclinical development
NAV-2729	ARF6	Inflammatory conditions		Preclinical development
ITX3	TRIO			Preclinical development
TRIP	TRIO			Preclinical development
FL3	EIF1AX			Preclinical development
Crizotinib	MET	Lung cancer	NCT02223819	FDA-approved
Cabozantinib	MET	Kidney cancer	NCT01835145	FDA-approved
Verteporfin	YAP	Retinopathy		FDA-approved
Sotrastaurin	PKC	DLBCL, UM	NCT01801358 NCT01430416 NCT02273219	Trials in combination with MEK of PI3K inhibitors
LXS-196	PKC	UM	NCT02601378	
Trametinib	MEK	CM	NCT01979523	FDA-approved in combination with BRAF inhibitor
Selumetinib (Adjuvant)	MEK	Thyroid cancer	NCT02768766 NCT01143402	

Novel potential treatment strategies (first column) against essential genetic pathway alterations (second column), clinical indications (third column), clinical trials that are under way (fourth column), and the stages of drug development (fifth column) are indicated. (DLBCL) Diffuse large B-cell lymphoma.

idea, combination therapies of checkpoint inhibitors with local, targeted, and immunotherapy for metastatic UM must be explored to determine whether they could improve patient prognosis.

Moreover, strategies using genetically modified T-cell-based adoptive immunotherapy approaches, including chimeric antigen receptor (CAR) and engineered T-cell receptor (TCR) T-cell therapies, have yielded encouraging clinical responses by overcoming immune evasion and redirecting the specificity of cytotoxic T lymphocytes to tumor cells (Sharpe and Mount 2015). Due to advances in sequencing technology, somatically mutated UM antigens (neoantigens) have been identified and have become compelling targets for immunotherapy. Adoptive immunotherapies could therefore represent therapeutic options for low mutation burden cancers such as UM.

Furthermore, PRAME is associated with class 1b metastatic UM (Field et al. 2016a) and is immunogenic, increasing the attractiveness of the development of novel immune therapies for PRAME. Phase 1 clinical trials are currently evaluating the safety and immunogenicity of a PRAME vaccine (Gutzmer et al. 2016). This new strategy might soon be offered to patients with UM and improve their outcome.

## Conclusion

Cutaneous and uveal melanocytes share the same embryonic origin and the same cellular function; however, they are subjected to different oncogenic transformation processes. In recent years, immense progress has been achieved in the cellular and molecular characterization of UM and skin melanoma. Large-scale genomic studies have demonstrated the direct mutagenic role of UVR in CM pathogenesis, whereas there is no conclusive proof

linking UV exposure to UM etiology. The majority of CM (80%) carries a mutation in BRAF, NRAS, or NF1, leading to the deregulation of the ERK pathway. In UM, activating mutations in GNAQ/11 dominate (83%) and engage specific signaling pathways, including ARF6/TRIO/RHO/RAC/YAP and PLC $\beta$ /PKC/ERK cascades. Moreover, recurrent genetic alterations in BAP1, which functions in the cell cycle, cell identity, and genome integrity, are found in UM (40%) and are associated with the development of metastasis. UM metastases display a very strong liver tropism, while CM metastases involve, almost equivalently, the lungs, liver, bones, and brain. Because of these cellular and molecular differences, the recently developed therapies (targeted and immunotherapies) that show clinical activity for metastatic CM are still ineffective in patients with metastatic UM.

Nevertheless, recent discoveries have delineated the contours of UM disease and identified targets for rational therapies. The concerted effort of talented researchers and clinicians working in the field will undoubtedly replicate in UM the extraordinary clinical advances recently achieved in CM.

## Acknowledgments

We thank Dr. L. Larue (Institut Curie, Paris, France) and R. Kelsh (University of Bath, Bath, UK) for helpful discussions. This work was funded by Institut National du Cancer grant INCa\_10573 to C.B. The team is "Equipe Labellisée Fondation ARC" to R.B. C.P. is a recipient from the La Ligue Nationale Contre le Cancer.

## References

Aalto Y, Eriksson L, Seregard S, Larsson O, Knuutila S. 2001. Concomitant loss of chromosome 3 and whole arm losses and

- gains of chromosome 1, 6, or 8 in metastasizing primary uveal melanoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **42**: 313–317.
- Ackermann J, Fruttschi M, Kaloulis K, McKee T, Trumpp A, Beer-  
mann F. 2005. Metastasizing melanoma formation caused by  
expression of activated N-Ras<sup>Q61K</sup> on an INK4a-deficient  
background. *Cancer Res* **65**: 4005–4011.
- Adameyko I, Lallemand F, Aquino JB, Pereira JA, Topilko P, Mul-  
ler T, Fritz N, Beljajeva A, Mochii M, Liste I, et al. 2009.  
Schwann cell precursors from nerve innervation are a cellular  
origin of melanocytes in skin. *Cell* **139**: 366–379.
- Algazi AP, Tsai KK, Shoushtari AN, Munhoz RR, Eroglu Z, Piu-  
lats JM, Ott PA, Johnson DB, Hwang J, Daud AI, et al. 2016.  
Clinical outcomes in metastatic uveal melanoma treated  
with PD-1 and PD-L1 antibodies. *Cancer* **122**: 3344–3353.
- Allegra M, Giaccherio D, Segalen C, Dumaz N, Butori C, Hofman  
V, Hofman P, Lacour JP, Bertolotto C, Bahadoran P, et al. 2014.  
A new KIT mutation (N505I) in acral melanoma confers con-  
stitutive signaling, favors tumorigenic properties, and is sensi-  
tive to imatinib. *J Invest Dermatol* **134**: 1473–1476.
- Alsafadi S, Houy A, Battistella A, Popova T, Wassef M, Henry E,  
Tirode F, Constantinou A, Piperno-Neumann S, Roman-Ro-  
man S, et al. 2016. Cancer-associated SF3B1 mutations affect  
alternative splicing by promoting alternative branchpoint usa-  
ge. *Nat Commun* **7**: 10615.
- An HK, Kim KS, Lee JW, Park MH, Moon HI, Park SJ, Baik JS, Kim  
CH, Lee YC. 2014. Mimulone-induced autophagy through  
p53-mediated AMPK/mTOR pathway increases caspase-me-  
diated apoptotic cell death in A549 human lung cancer cells.  
*PLoS One* **9**: e114607.
- Aoki H, Yamada Y, Hara A, Kunisada T. 2009. Two distinct types  
of mouse melanocyte: differential signaling requirement for  
the maintenance of non-cutaneous and dermal versus epider-  
mal melanocytes. *Development* **136**: 2511–2521.
- Aoude LG, Wadt KA, Pritchard AL, Hayward NK. 2015. Genetics  
of familial melanoma: 20 years after CDKN2A. *Pigment Cell  
Melanoma Res* **28**: 148–160.
- Arafah R, Qutob N, Emmanuel R, Keren-Paz A, Madore J, Elkah-  
loun A, Wilmott JS, Gartner JJ, Di Pizio A, Winograd-Katz S,  
et al. 2015. Recurrent inactivating RASA2 mutations in mel-  
anoma. *Nat Genet* **47**: 1408–1410.
- Arrington JH III, Reed RJ, Ichinose H, Kremenz ET. 1977. Plantar  
lentiginous melanoma: a distinctive variant of human cutane-  
ous malignant melanoma. *Am J Surg Pathol* **1**: 131–143.
- Bakalian S, Marshall JC, Logan P, Faingold D, Maloney S, Di  
Cesare S, Martins C, Fernandes BF, Burnier MN Jr. 2008. Mo-  
lecular pathways mediating liver metastasis in patients with  
uveal melanoma. *Clin Cancer Res* **14**: 951–956.
- Balch CM, Buzaid AC, Soong SJ, Atkins MB, Cascinelli N, Coit  
DG, Fleming ID, Gershenwald JE, Houghton A Jr, Kirkwood  
JM, et al. 2003. New TNM melanoma staging system: linking  
biology and natural history to clinical outcomes. *Semin Surg  
Oncol* **21**: 43–52.
- Barrenas ML, Lindgren F. 1990. The influence of inner ear mel-  
anin on susceptibility to TTS in humans. *Scand Audiol* **19**:  
97–102.
- Bastian BC. 2014. The molecular pathology of melanoma: an in-  
tegrated taxonomy of melanocytic neoplasia. *Annu Rev  
Pathol* **9**: 239–271.
- Bastian BC, LeBoit PE, Hamm H, Brocker EB, Pinkel D. 1998.  
Chromosomal gains and losses in primary cutaneous melano-  
mas detected by comparative genomic hybridization. *Cancer  
Res* **58**: 2170–2175.
- Bauer J, Curtin JA, Pinkel D, Bastian BC. 2007. Congenital mel-  
anocytic nevi frequently harbor NRAS mutations but no BRAF  
mutations. *J Invest Dermatol* **127**: 179–182.
- Beadling C, Jacobson-Dunlop E, Hodi FS, Le C, Warrick A, Patter-  
son J, Town A, Harlow A, Cruz F III, Azar S, et al. 2008. KIT  
gene mutations and copy number in melanoma subtypes.  
*Clin Cancer Res* **14**: 6821–6828.
- Beller TC, Maekawa A, Friend DS, Austen KF, Kanaoka Y. 2004.  
Targeted gene disruption reveals the role of the cysteinyl leu-  
kotriene 2 receptor in increased vascular permeability and in  
bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice. *J Biol Chem*  
**279**: 46129–46134.
- Bennett DC. 2008. How to make a melanoma: what do we know  
of the primary clonal events? *Pigment Cell Melanoma Res* **21**:  
27–38.
- Berger MF, Hodis E, Heffernan TP, Deribe YL, Lawrence MS, Pro-  
topopov A, Ivanova E, Watson IR, Nickerson E, Ghosh P, et al.  
2012. Melanoma genome sequencing reveals frequent PREX2  
mutations. *Nature* **485**: 502–506.
- Bertolotto C. 2013. Melanoma: from melanocyte to genetic alter-  
ations and clinical options. *Scientifica* **2013**: 635203.
- Bertolotto C, Abbe P, Hemesath TJ, Bille K, Fisher DE, Ortonne  
JP, Ballotti R. 1998a. Microphthalmia gene product as a signal  
transducer in cAMP-induced differentiation of melanocytes.  
*J Cell Biol* **142**: 827–835.
- Bertolotto C, Busca R, Abbe P, Bille K, Aberdam E, Ortonne JP,  
Ballotti R. 1998b. Different *cis*-acting elements are involved  
in the regulation of TRP1 and TRP2 promoter activities by cy-  
clic AMP: pivotal role of M boxes (GTCATGTGCT) and of  
microphthalmia. *Mol Cell Biol* **18**: 694–702.
- Bertolotto C, Lesueur F, Giuliano S, Strub T, de Lichy M, Bille K,  
Dessen P, d’Hayer B, Mohamdi H, Remenieras A, et al. 2011. A  
SUMOylation-defective MITF germline mutation predisposes  
to melanoma and renal carcinoma. *Nature* **480**: 94–98.
- Besaratinia A, Pfeifer GP. 2008. Sunlight ultraviolet irradiation  
and BRAF V600 mutagenesis in human melanoma. *Hum  
Mutat* **29**: 983–991.
- Besaratinia A, Synold TW, Xi B, Pfeifer GP. 2004. G-to-T transver-  
sions and small tandem base deletions are the hallmark of mu-  
tations induced by ultraviolet a radiation in mammalian cells.  
*Biochemistry* **43**: 8169–8177.
- Bhat M, Robichaud N, Hulea L, Sonenberg N, Pelletier J, Topisir-  
ovic I. 2015. Targeting the translation machinery in cancer.  
*Nat Rev Drug Discov* **14**: 261–278.
- Blangy A, Bouquier N, Gauthier-Rouviere C, Schmidt S, Debant  
A, Leonetti JP, Fort P. 2006. Identification of TRIO–GEF1  
chemical inhibitors using the yeast exchange assay. *Biol  
Cell* **98**: 511–522.
- Bonet C, Luciani F, Ottavi JF, Leclerc J, Jouenne FM, Boncom-  
pagni M, Bille K, Hofman V, Bossis G, De Donatis GM, et al.  
2017. Deciphering the role of oncogenic MITF318K in senes-  
cence delay and melanoma progression. *J Natl Cancer Inst*  
doi: 10.1093/jnci/djw340.
- Boussemart L, Malka-Mahieu H, Girault I, Allard D, Hemmings-  
son O, Tomasic G, Thomas M, Basmadjian C, Ribeiro N,  
Thuaud F, et al. 2014. eIF4F is a nexus of resistance to anti-  
BRAF and anti-MEK cancer therapies. *Nature* **513**: 105–109.
- Brantley MA Jr, Harbour JW. 2000a. Deregulation of the Rb  
and p53 pathways in uveal melanoma. *Am J Pathol* **157**:  
1795–1801.
- Brantley MA Jr, Harbour JW. 2000b. Inactivation of retinoblasto-  
ma protein in uveal melanoma by phosphorylation of sites in  
the COOH-terminal region. *Cancer Res* **60**: 4320–4323.
- Brenner M, Hearing VJ. 2008. The protective role of melanin  
against UV damage in human skin. *Photochem Photobiol*  
**84**: 539–549.

- Bressac-de-Paillerets B, Avril MF, Chompret A, Demenais F. 2002. Genetic and environmental factors in cutaneous malignant melanoma. *Biochimie* **84**: 67–74.
- Bronner-Fraser M. 1994. Neural crest cell formation and migration in the developing embryo. *FASEB J* **8**: 699–706.
- The Cancer Genome Atlas Network. 2015. Genomic classification of cutaneous melanoma. *Cell* **161**: 1681–1696.
- Cao J, Wan L, Hacker E, Dai X, Lenna S, Jimenez-Cervantes C, Wang Y, Leslie NR, Xu GX, Widlund HR, et al. 2013. MC1R is a potent regulator of PTEN after UV exposure in melanocytes. *Mol Cell* **51**: 409–422.
- Carlino MS, Long GV. 2016. Ipilimumab combined with nivolumab: a standard of care for the treatment of advanced melanoma? *Clin Cancer Res* **22**: 3992–3998.
- Carneiro F, Kruihof BP, Balani K, Agarwal A, Gaussin V, Kos L. 2015. Relationships between melanocytes, mechanical properties and extracellular matrix composition in mouse heart valves. *J Long Term Eff Med Implants* **25**: 17–26.
- Carreira S, Goodall J, Denat L, Rodriguez M, Nuciforo P, Hoek KS, Testori A, Larue L, Goding CR. 2006. Mitf regulation of Dial controls melanoma proliferation and invasiveness. *Genes Dev* **20**: 3426–3439.
- Carvajal RD, Antonescu CR, Wolchok JD, Chapman PB, Roman RA, Teitcher J, Panageas KS, Busam KJ, Chmielowski B, Lutzky J, et al. 2011. KIT as a therapeutic target in metastatic melanoma. *JAMA* **305**: 2327–2334.
- Carvajal RD, Sosman JA, Quevedo JF, Milhem MM, Joshua AM, Kudchadkar RR, Linette GP, Gajewski TF, Lutzky J, Lawson DH, et al. 2014. Effect of selumetinib vs chemotherapy on progression-free survival in uveal melanoma: a randomized clinical trial. *JAMA* **311**: 2397–2405.
- Cerami E, Gao J, Dogrusoz U, Gross BE, Sumer SO, Aksoy BA, Jacobsen A, Byrne CJ, Heuer ML, Larsson E, et al. 2012. The cBio cancer genomics portal: an open platform for exploring multidimensional cancer genomics data. *Cancer Discov* **2**: 401–404.
- Chattopadhyay C, Kim DW, Gombos DS, Oba J, Qin Y, Williams MD, Esmaeli B, Grimm EA, Wargo JA, Woodman SE, et al. 2016. Uveal melanoma: from diagnosis to treatment and the science in between. *Cancer* **122**: 2299–2312.
- Cheli Y, Ohanna M, Ballotti R, Bertolotto C. 2010. Fifteen-year quest for microphthalmia-associated transcription factor target genes. *Pigment Cell Melanoma Res* **23**: 27–40.
- Cheli Y, Giuliano S, Botton T, Rocchi S, Hofman V, Hofman P, Bahadoran P, Bertolotto C, Ballotti R. 2011. Mitf is the key molecular switch between mouse or human melanoma initiating cells and their differentiated progeny. *Oncogene* **30**: 2307–2318.
- Cheng KC, Cahill DS, Kasai H, Nishimura S, Loeb LA. 1992. 8-hydroxyguanine, an abundant form of oxidative DNA damage, causes G → T and A → C substitutions. *J Biol Chem* **267**: 166–172.
- Clark WH Jr, Elder DE, Van Horn M. 1986. The biologic forms of malignant melanoma. *Hum Pathol* **17**: 443–450.
- Conde-Perez A, Gros G, Longvert C, Pedersen M, Petit V, Aktary Z, Viros A, Gesbert F, Delmas V, Rambow F, et al. 2015. A caveolin-dependent and PI3K/AKT-independent role of PTEN in  $\beta$ -catenin transcriptional activity. *Nat Commun* **6**: 8093.
- Curtin JA, Busam K, Pinkel D, Bastian BC. 2006. Somatic activation of KIT in distinct subtypes of melanoma. *J Clin Oncol* **24**: 4340–4346.
- Damato B, Dopierala JA, Coupland SE. 2010. Genotypic profiling of 452 choroidal melanomas with multiplex ligation-dependent probe amplification. *Clin Cancer Res* **16**: 6083–6092.
- Damsky WE, Curley DP, Santhanakrishnan M, Rosenbaum LE, Platt JT, Gould Rothberg BE, Taketo MM, Dankort D, Rimm DL, McMahon M, et al. 2011.  $\beta$ -Catenin signaling controls metastasis in Braf-activated Pten-deficient melanomas. *Cancer Cell* **20**: 741–754.
- Danielli R, Ridolfi R, Chiarion-Sileni V, Queirolo P, Testori A, Plummer R, Boitano M, Calabro L, Rossi CD, Giacomo AM, et al. 2012. Ipilimumab in pretreated patients with metastatic uveal melanoma: safety and clinical efficacy. *Cancer Immunol Immunother* **61**: 41–48.
- Dankort D, Curley DP, Cartlidge RA, Nelson B, Karnezis AN, Damsky WE Jr, You MJ, DePinho RA, McMahon M, Bosenberg M. 2009. Braf(V600E) cooperates with Pten loss to induce metastatic melanoma. *Nat Genet* **41**: 544–552.
- Davies H, Bignell GR, Cox C, Stephens P, Edkins S, Clegg S, Teague J, Woffendin H, Garnett MJ, Bottomley W, et al. 2002. Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature* **417**: 949–954.
- Davies MA, Stemke-Hale K, Tellez C, Calderone TL, Deng W, Prieto VG, Lazar AJ, Gershenwald JE, Mills GB. 2008. A novel AKT3 mutation in melanoma tumours and cell lines. *Br J Cancer* **99**: 1265–1268.
- Decatur CL, Ong E, Garg N, Anbunathan H, Bowcock AM, Field MG, Harbour JW. 2016. Driver mutations in uveal melanoma: associations with gene expression profile and patient outcomes. *JAMA Ophthalmol* **134**: 728–733.
- de Lange MJ, Razzaq L, Versluis M, Verlinde S, Dogrusoz M, Bohringer S, Marinkovic M, Luyten GP, de Keizer RJ, de Gruijl FR, et al. 2015. Distribution of GNAQ and GNA11 mutation signatures in uveal melanoma points to a light dependent mutation mechanism. *PLoS One* **10**: e0138002.
- Delmas V, Beermann F, Martinozzi S, Carreira S, Ackermann J, Kumasaka M, Denat L, Goodall J, Luciani F, Viros A, et al. 2007.  $\beta$ -Catenin induces immortalization of melanocytes by suppressing p16INK4a expression and cooperates with NRas in melanoma development. *Genes Dev* **21**: 2923–2935.
- Denoyelle C, Abou-Rjaily G, Bezrookove V, Verhaegen M, Johnson TM, Fullen DR, Pointer JN, Gruber SB, Su LD, Nikiforov MA, et al. 2006. Anti-oncogenic role of the endoplasmic reticulum differentially activated by mutations in the MAPK pathway. *Nat Cell Biol* **8**: 1053–1063.
- Dhillon AS, Hagan S, Rath O, Kolch W. 2007. MAP kinase signaling pathways in cancer. *Oncogene* **26**: 3279–3290.
- Dhomen N, Reis-Filho JS, da Rocha Dias S, Hayward R, Savage K, Delmas V, Larue L, Pritchard C, Marais R. 2009. Oncogenic Braf induces melanocyte senescence and melanoma in mice. *Cancer Cell* **15**: 294–303.
- Diener-West M, Reynolds SM, Agugliaro DJ, Caldwell R, Cumming K, Earle JD, Hawkins BS, Hayman JA, Jaiyesimi I, Jampol LM, et al. 2005. Development of metastatic disease after enrollment in the COMS trials for treatment of choroidal melanoma: Collaborative Ocular Melanoma Study Group report no. 26. *Arch Ophthalmol* **123**: 1639–1643.
- Dithmar S, Diaz CE, Grossniklaus HE. 2000. Intraocular melanoma spread to regional lymph nodes: report of two cases. *Retina* **20**: 76–79.
- Dupuy F, Tabaries S, Andrzejewski S, Dong Z, Blagih J, Annis MG, Omeroglu A, Gao D, Leung S, Amir E, et al. 2015. PDK1-dependent metabolic reprogramming dictates metastatic potential in breast cancer. *Cell Metab* **22**: 577–589.
- Ehlers JP, Worley L, Onken MD, Harbour JW. 2008. Integrative genomic analysis of aneuploidy in uveal melanoma. *Clin Cancer Res* **14**: 115–122.
- Emery CM, Vijayendran KG, Zipser MC, Sawyer AM, Niu L, Kim JJ, Hatton C, Chopra R, Oberholzer PA, Karpova MB, et al.

2009. MEK1 mutations confer resistance to MEK and B-RAF inhibition. *Proc Natl Acad Sci* **106**: 20411–20416.
- Ennen M, Keime C, Kobi D, Mengus G, Lipsker D, Thibault-Carpentier C, Davidson I. 2015. Single-cell gene expression signatures reveal melanoma cell heterogeneity. *Oncogene* **34**: 3251–3263.
- Falletta P, Sanchez-Del-Campo L, Chauhan J, Efferm M, Kenyon A, Kershaw CJ, Siddaway R, Lisle R, Freter R, Daniels MJ, et al. 2017. Translation reprogramming is an evolutionarily conserved driver of phenotypic plasticity and therapeutic resistance in melanoma. *Genes Dev* **31**: 18–33.
- Feng X, Degese MS, Iglesias-Bartolome R, Vaque JP, Molinolo AA, Rodrigues M, Zaidi MR, Ksander BR, Merlino G, Sodhi A, et al. 2014. Hippo-independent activation of YAP by the GNAQ uveal melanoma oncogene through a trio-regulated rho GTPase signaling circuitry. *Cancer Cell* **25**: 831–845.
- Ferguson R, Vogelsang M, Ucisik-Akkaya E, Rai K, Pilarski R, Martinez CN, Rendleman J, Kazlow E, Nagdimov K, Osman I, et al. 2016. Genetic markers of pigmentation are novel risk loci for uveal melanoma. *Sci Rep* **6**: 31191.
- Field MG, Harbour JW. 2014. Recent developments in prognostic and predictive testing in uveal melanoma. *Curr Opin Ophthalmol* **25**: 234–239.
- Field MG, Decatur CL, Kurtenbach S, Gezgin G, van der Velden PA, Jager MJ, Kozak KN, Harbour JW. 2016a. PRAME as an independent biomarker for metastasis in uveal melanoma. *Clin Cancer Res* **22**: 1234–1242.
- Field MG, Durante MA, Decatur CL, Tarlan B, Oelschlagel KM, Stone JF, Kuznetsov J, Bowcock AM, Kurtenbach S, Harbour JW. 2016b. Epigenetic reprogramming and aberrant expression of PRAME are associated with increased metastatic risk in class 1 and class 2 uveal melanomas. *Oncotarget* **7**: 59209–59219.
- Fine B, Hodakoski C, Koujak S, Su T, Saal LH, Maurer M, Hopkins B, Keniry M, Sulis ML, Mense S, et al. 2009. Activation of the PI3K pathway in cancer through inhibition of PTEN by exchange factor P-REX2a. *Science* **325**: 1261–1265.
- Fletcher O, Easton D, Anderson K, Gilham C, Jay M, Peto J. 2004. Lifetime risks of common cancers among retinoblastoma survivors. *J Natl Cancer Inst* **96**: 357–363.
- Francis JH, Wiesner T, Milman T, Won HH, Lin A, Lee V, Albert DM, Folberg R, Berger MF, Char DH, et al. 2016. Investigation of somatic GNAQ, GNA11, BAP1 and SF3B1 mutations in ophthalmic melanocytomas. *Ocul Oncol Pathol* **2**: 171–177.
- Furman C, Short SM, Subramanian RR, Zetter BR, Roberts TM. 2002. DEF-1/ASAP1 is a GTPase-activating protein (GAP) for ARF1 that enhances cell motility through a GAP-dependent mechanism. *J Biol Chem* **277**: 7962–7969.
- Furney SJ, Pedersen M, Gentien D, Dumont AG, Rapinat A, Desjardins L, Turajlic S, Piperno-Neumann S, de la Grange P, Roman-Roman S, et al. 2013. SF3B1 mutations are associated with alternative splicing in uveal melanoma. *Cancer Discov* **3**: 1122–1129.
- Gao J, Aksoy BA, Dogrusoz U, Dresdner G, Gross B, Sumer SO, Sun Y, Jacobsen A, Sinha R, Larsson E, et al. 2013. Integrative analysis of complex cancer genomics and clinical profiles using the cBioPortal. *Science Signal* **6**: pii.
- Garnett MJ, Marais R. 2004. Guilty as charged: B-RAF is a human oncogene. *Cancer Cell* **6**: 313–319.
- Garraway LA, Widlund HR, Rubin MA, Getz G, Berger AJ, Ramaswamy S, Beroukhi R, Milner DA, Granter SR, Du J, et al. 2005. Integrative genomic analyses identify MITF as a lineage survival oncogene amplified in malignant melanoma. *Nature* **436**: 117–122.
- Ghiorzo P, Pastorino L, Queirolo P, Bruno W, Tibiletti MG, Nasti S, Andreotti V, Pailletets BB, Bianchi Scarra G. 2013. Prevalence of the E318K MITF germline mutation in Italian melanoma patients: associations with histological subtypes and family cancer history. *Pigment Cell Melanoma Res* **26**: 259–262.
- Giuliano S, Cheli Y, Ohanna M, Bonet C, Beuret L, Bille K, Loubat A, Hofman V, Hofman P, Ponzio G, et al. 2010. Microphthalmia-associated transcription factor controls the DNA damage response and a lineage-specific senescence program in melanomas. *Cancer Res* **70**: 3813–3822.
- Griewank KG, Murali R. 2013. Pathology and genetics of uveal melanoma. *Pathology* **45**: 18–27.
- Griewank KG, Westkemper H, Murali R, Mach M, Schilling B, Wiesner T, Schimming T, Livingstone E, Sucker A, Grabellus F, et al. 2013. Conjunctival melanomas harbor BRAF and NRAS mutations and copy number changes similar to cutaneous and mucosal melanomas. *Clin Cancer Res* **19**: 3143–3152.
- Gupta MP, Lane AM, DeAngelis MM, Mayne K, Crabtree M, Gragoudas ES, Kim IK. 2015. Clinical Characteristics of uveal melanoma in patients with germline BAP1 mutations. *JAMA Ophthalmol* **133**: 881–887.
- Gutzmer R, Rivoltini L, Levchenko E, Testori A, Utikal J, Ascierto PA, Demidov L, Grob JJ, Ridolfi R, Schadendorf D, et al. 2016. Safety and immunogenicity of the PRAME cancer immunotherapeutic in metastatic melanoma: results of a phase I dose escalation study. *ESMO Open* **1**: e000068.
- Harbour JW, Onken MD, Roberson ED, Duan S, Cao L, Worley LA, Council ML, Matatall KA, Helms C, Bowcock AM. 2010. Frequent mutation of BAP1 in metastasizing uveal melanomas. *Science* **330**: 1410–1413.
- Harbour JW, Roberson ED, Anbunathan H, Onken MD, Worley LA, Bowcock AM. 2013. Recurrent mutations at codon 625 of the splicing factor SF3B1 in uveal melanoma. *Nat Genet* **45**: 133–135.
- Harris RS. 2013. Cancer mutation signatures, DNA damage mechanisms, and potential clinical implications. *Genome Med* **5**: 87.
- Hearle N, Damato BE, Humphreys J, Wixey J, Green H, Stone J, Easton DF, Houlston RS. 2003a. Contribution of germline mutations in BRCA2, P16(INK4A), P14(ARF) and P15 to uveal melanoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **44**: 458–462.
- Hearle N, Humphreys J, Damato BE, Wort R, Talaban R, Wixey J, Green H, Easton DF, Houlston RS. 2003b. Role of MC1R variants in uveal melanoma. *Br J Cancer* **89**: 1961–1965.
- Herraiz C, Garcia-Borrón JC, Jimenez-Cervantes C, Olivares C. 2017. MC1R signaling. Intracellular partners and pathophysiological implications. *Biochim Biophys Acta* doi: 10.1016/j.bbdis.2017.02.027.
- Hodi FS, O'Day SJ, McDermott DF, Weber RW, Sosman JA, Haanen JB, Gonzalez R, Robert C, Schadendorf D, Hassel JC, et al. 2010. Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. *N Engl J Med* **363**: 711–723.
- Hodis E, Watson IR, Kryukov GV, Arold ST, Imielinski M, Theurillat JP, Nickerson E, Auclair D, Li L, Place C, et al. 2012. A landscape of driver mutations in melanoma. *Cell* **150**: 251–263.
- Hoek KS, Goding CR. 2010. Cancer stem cells versus phenotype-switching in melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res* **23**: 746–759.
- Hoek KS, Eichhoff OM, Schlegel NC, Dobbeling U, Kobert N, Schaerer L, Hemmi S, Dummer R. 2008. In vivo switching of human melanoma cells between proliferative and invasive states. *Cancer Res* **68**: 650–656.



- Horn S, Figl A, Rachakonda PS, Fischer C, Sucker A, Gast A, Kadel S, Moll I, Nagore E, Hemminki K, et al. 2013. TERT promoter mutations in familial and sporadic melanoma. *Science* **339**: 959–961.
- Horrigan SK, Courville P, Sampey D, Zhou F, Cai S, Reproducibility Project: Cancer B. 2017. Replication study: melanoma genome sequencing reveals frequent PREX2 mutations. *Elife* **6**: e21634.
- Hoshino A, Costa-Silva B, Shen TL, Rodrigues G, Hashimoto A, Tesic Mark M, Molina H, Kohsaka S, Di Giannatale A, Ceder S, et al. 2015. Tumour exosome integrins determine organotropic metastasis. *Nature* **527**: 329–335.
- Hussussian CJ, Struewing JP, Goldstein AM, Higgins PA, Ally DS, Sheahan MD, Clark WH Jr, Tucker MA, Dracopoli NC. 1994. Germline p16 mutations in familial melanoma. *Nat Genet* **8**: 15–21.
- Ismail IH, Davidson R, Gagne JP, Xu ZZ, Poirier GG, Hendzel MJ. 2014. Germline mutations in BAP1 impair its function in DNA double-strand break repair. *Cancer Res* **74**: 4282–4294.
- Janku F, Lee JJ, Tsimberidou AM, Hong DS, Naing A, Falchook GS, Fu S, Luthra R, Garrido-Laguna I, Kurzrock R. 2011. PIK3CA mutations frequently coexist with RAS and BRAF mutations in patients with advanced cancers. *PLoS One* **6**: e22769.
- Johannessen CM, Johnson LA, Piccioni F, Townes A, Frederick DT, Donahue MK, Narayan R, Flaherty KT, Wargo JA, Root DE, et al. 2013. A melanocyte lineage program confers resistance to MAP kinase pathway inhibition. *Nature* **504**: 138–142.
- Johansson P, Aoude LG, Wadt K, Glasson WJ, Warriar SK, Hewitt AW, Kiilgaard JF, Heegaard S, Isaacs T, Franchina M, et al. 2016. Deep sequencing of uveal melanoma identifies a recurrent mutation in PLCB4. *Oncotarget* **7**: 4624–4631.
- Jovanovic P, Mihajlovic M, Djordjevic-Jocic J, Vlajkovic S, Cekic S, Stefanovic V. 2013. Ocular melanoma: an overview of the current status. *Int J Clin Exp Pathol* **6**: 1230–1244.
- Kaufman HL, Kirkwood JM, Hodi FS, Agarwala S, Amatruda T, Bines SD, Clark JI, Curti B, Ernstoff MS, Gajewski T, et al. 2013. The Society for Immunotherapy of Cancer consensus statement on tumour immunotherapy for the treatment of cutaneous melanoma. *Nat Rev Clin Oncol* **10**: 588–598.
- Kemper K, Krijgsman O, Cornelissen-Steijger P, Shahrabi A, Weeber F, Song JY, Kuilman T, Vis DJ, Wessels LF, Voest EE, et al. 2015. Intra- and inter-tumor heterogeneity in a vemurafenib-resistant melanoma patient and derived xenografts. *EMBO Mol Med* **7**: 1104–1118.
- Kenawy N, Lake SL, Coupland SE, Damato BE. 2013. Conjunctival melanoma and melanocytic intra-epithelial neoplasia. *Eye (Lond)* **27**: 142–152.
- Konieczkowski DJ, Johannessen CM, Abudayyeh O, Kim JW, Cooper ZA, Piris A, Frederick DT, Barzily-Rokni M, Straussman R, Haq R, et al. 2014. A melanoma cell state distinction influences sensitivity to MAPK pathway inhibitors. *Cancer Discov* **4**: 816–827.
- Kottschade LA, McWilliams RR, Markovic SN, Block MS, Villasboas Bisneto J, Pham AQ, Esplin BL, Dronca RS. 2016. The use of pembrolizumab for the treatment of metastatic uveal melanoma. *Melanoma Res* **26**: 300–303.
- Krauthammer M, Kong Y, Ha BH, Evans P, Bacchicocchi A, McCusker JP, Cheng E, Davis MJ, Goh G, Choi M, et al. 2012. Exome sequencing identifies recurrent somatic RAC1 mutations in melanoma. *Nat Genet* **44**: 1006–1014.
- Krauthammer M, Kong Y, Bacchicocchi A, Evans P, Pornputtpong N, Wu C, McCusker JP, Ma S, Cheng E, Straub R, et al. 2015. Exome sequencing identifies recurrent mutations in NF1 and RASopathy genes in sun-exposed melanomas. *Nat Genet* **47**: 996–1002.
- Krygier G, Lombardo K, Vargas C, Alvez I, Costa R, Ros M, Echenique M, Navarro V, Delgado L, Viola A, et al. 2001. Familial uveal melanoma: report on three sibling cases. *Br J Ophthalmol* **85**: 1007–1008.
- Kujala E, Kivela T. 2005. Tumor, node, metastasis classification of malignant ciliary body and choroidal melanoma evaluation of the 6th edition and future directions. *Ophthalmology* **112**: 1135–1144.
- Landreville S, Agapova OA, Matatall KA, Kneass ZT, Onken MD, Lee RS, Bowcock AM, Harbour JW. 2012. Histone deacetylase inhibitors induce growth arrest and differentiation in uveal melanoma. *Clin Cancer Res* **18**: 408–416.
- Landsberg J, Kohlmeyer J, Renn M, Bald T, Rogava M, Cron M, Fatho M, Lennerz V, Wolfel T, Holzel M, et al. 2012. Melanomas resist T-cell therapy through inflammation-induced reversible dedifferentiation. *Nature* **490**: 412–416.
- Larue L, Delmas V. 2006. The WNT/ $\beta$ -catenin pathway in melanoma. *Front Biosci* **11**: 733–742.
- Lawrence MS, Stojanov P, Polak P, Kryukov GV, Cibulskis K, Sivachenko A, Carter SL, Stewart C, Mermel CH, Roberts SA, et al. 2013. Mutational heterogeneity in cancer and the search for new cancer-associated genes. *Nature* **499**: 214–218.
- Levin MD, Lu MM, Petrenko NB, Hawkins BJ, Gupta TH, Lang D, Buckley PT, Jochems J, Liu F, Spurney CF, et al. 2009. Melanocyte-like cells in the heart and pulmonary veins contribute to atrial arrhythmia triggers. *J Clin Invest* **119**: 3420–3436.
- Long GV, Stroyakovskiy D, Gogas H, Levchenko E, de Braud F, Larkin J, Garbe C, Jouary T, Hauschild A, Grob JJ, et al. 2014. Combined BRAF and MEK inhibition versus BRAF inhibition alone in melanoma. *N Engl J Med* **371**: 1877–1888.
- Lyon AM, Tesmer JJ. 2013. Structural insights into phospholipase C- $\beta$  function. *Mol Pharmacol* **84**: 488–500.
- Mahoney KM, Freeman GJ, McDermott DF. 2015. The next immune-checkpoint inhibitors: PD-1/PD-L1 blockade in melanoma. *Clin Ther* **37**: 764–782.
- Martin M, Masshofer L, Temming P, Rahmann S, Metz C, Bornfeld N, van de Nes J, Klein-Hitpass L, Hinnebusch AG, Horsthemke B, et al. 2013. Exome sequencing identifies recurrent somatic mutations in EIF1AX and SF3B1 in uveal melanoma with disomy 3. *Nat Genet* **45**: 933–936.
- Massoumi R, Nielsen CK, Azemovic D, Sjolander A. 2003. Leukotriene D4-induced adhesion of Caco-2 cells is mediated by prostaglandin E2 and upregulation of  $\alpha 2\beta 1$ -integrin. *Exp Cell Res* **289**: 342–351.
- Matatall KA, Agapova OA, Onken MD, Worley LA, Bowcock AM, Harbour JW. 2013. BAP1 deficiency causes loss of melanocytic cell identity in uveal melanoma. *BMC Cancer* **13**: 371.
- Mayor R, Theveneau E. 2013. The neural crest. *Development* **140**: 2247–2251.
- McKenna KC, Chen PW. 2010. Influence of immune privilege on ocular tumor development. *Ocul Immunol Inflamm* **18**: 80–90.
- McLaughlin CC, Wu XC, Jemal A, Martin HJ, Roche LM, Chen VW. 2005. Incidence of noncutaneous melanomas in the U. S. *Cancer* **103**: 1000–1007.
- Metzelaar-Blok JA, ter Huurne JA, Hurks HM, Keunen JE, Jager MJ, Gruijs NA. 2001. Characterization of melanocortin-1 receptor gene variants in uveal melanoma patients. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **42**: 1951–1954.
- Meyer N, Penn LZ. 2008. Reflecting on 25 years with MYC. *Nat Rev Cancer* **8**: 976–990.
- Mezhybovska M, Wikstrom K, Ohd JF, Sjolander A. 2005. Pro-inflammatory mediator leukotriene D4 induces transcriptional

- activity of potentially oncogenic genes. *Biochem Soc Transac* **33**: 698–700.
- Michaloglou C, Vredeveld LC, Soengas MS, Denoyelle C, Kuilman T, van der Horst CM, Majoor DM, Shay JW, Mooi WJ, Peeper DS. 2005. BRAF600-associated senescence-like cell cycle arrest of human naevi. *Nature* **436**: 720–724.
- Mirmohammadsadegh A, Marini A, Nambiar S, Hassan M, Tannapfel A, Ruzicka T, Hengge UR. 2006. Epigenetic silencing of the PTEN gene in melanoma. *Cancer Res* **66**: 6546–6552.
- Missotten GS, Keijser S, De Keizer RJ, De Wolff-Rouendaal D. 2005. Conjunctival melanoma in the Netherlands: a nationwide study. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **46**: 75–82.
- Mitra D, Luo X, Morgan A, Wang J, Hoang MP, Lo J, Guerrero CR, Lennerz JK, Mihm MC, Wargo JA, et al. 2012. An ultraviolet-radiation-independent pathway to melanoma carcinogenesis in the red hair/fair skin background. *Nature* **491**: 449–453.
- Mong S, Miller J, Wu HL, Crooke ST. 1988. Leukotriene D4 receptor-mediated hydrolysis of phosphoinositide and mobilization of calcium in sheep tracheal smooth muscle cells. *J Pharmacol Exp Ther* **244**: 508–515.
- Moore AR, Ceraudo E, Sher JJ, Guan Y, Shoushtari AN, Chang MT, Zhang JQ, Walczak EG, Kazmi MA, Taylor BS, et al. 2016. Recurrent activating mutations of G-protein-coupled receptor CYSLTR2 in uveal melanoma. *Nat Genet* **48**: 675–680.
- Morelli JG, Yohn JJ, Lyons MB, Murphy RC, Norris DA. 1989. Leukotrienes C4 and D4 as potent mitogens for cultured human neonatal melanocytes. *J Invest Dermatol* **93**: 719–722.
- Muller T, Stein U, Poletti A, Garzia L, Rothley M, Plaumann D, Thiele W, Bauer M, Galasso A, Schlag P, et al. 2010. ASAP1 promotes tumor cell motility and invasiveness, stimulates metastasis formation in vivo, and correlates with poor survival in colorectal cancer patients. *Oncogene* **29**: 2393–2403.
- Muller J, Krijgsman O, Tsoi J, Robert L, Hugo W, Song C, Kong X, Possik PA, Cornelissen-Steijger PD, Foppen MH, et al. 2014. Low MITF/AXL ratio predicts early resistance to multiple targeted drugs in melanoma. *Nat Commun* **5**: 5712.
- Murali R, Wiesner T, Rosenblum MK, Bastian BC. 2012. GNAQ and GNA11 mutations in melanocytomas of the central nervous system. *Acta Neuropathol* **123**: 457–459.
- Nallet-Staub F, Marsaud V, Li L, Gilbert C, Dodier S, Bataille V, Sudol M, Herlyn M, Mauviel A. 2014. Pro-invasive activity of the Hippo pathway effectors YAP and TAZ in cutaneous melanoma. *J Invest Dermatol* **134**: 123–132.
- Network TCGA. 2015. Genomic classification of cutaneous melanoma. *Cell* **161**: 1681–1696.
- Nikolaev SI, Rimoldi D, Iseli C, Valsesia A, Robyr D, Gehrig C, Harshman K, Guipponi M, Bukach O, Zoete V, et al. 2011. Exome sequencing identifies recurrent somatic MAP2K1 and MAP2K2 mutations in melanoma. *Nat Genet* **44**: 133–139.
- Ohanna M, Giuliano S, Bonet C, Imbert V, Hofman V, Zangari J, Bille K, Robert C, Bressac-de Paillerets B, Hofman P, et al. 2011. Senescent cells develop a PARP-1 and nuclear factor- $\kappa$ B-associated secretome (PNAS). *Genes Dev* **25**: 1245–1261.
- Oliva M, Rullan AJ, Piulats JM. 2016. Uveal melanoma as a target for immune-therapy. *Ann Transl Med* **4**: 172.
- Onken MD, Worley LA, Ehlers JP, Harbour JW. 2004. Gene expression profiling in uveal melanoma reveals two molecular classes and predicts metastatic death. *Cancer Res* **64**: 7205–7209.
- Onken MD, Ehlers JP, Worley LA, Makita J, Yokota Y, Harbour JW. 2006. Functional gene expression analysis uncovers phenotypic switch in aggressive uveal melanomas. *Cancer Res* **66**: 4602–4609.
- Onken MD, Worley LA, Long MD, Duan S, Council ML, Bowcock AM, Harbour JW. 2008. Oncogenic mutations in GNAQ occur early in uveal melanoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **49**: 5230–5234.
- Onken MD, Worley LA, Harbour JW. 2010a. Association between gene expression profile, proliferation and metastasis in uveal melanoma. *Curr Eye Res* **35**: 857–863.
- Onken MD, Worley LA, Tuscan MD, Harbour JW. 2010b. An accurate, clinically feasible multi-gene expression assay for predicting metastasis in uveal melanoma. *J Mol Diagnostics* **12**: 461–468.
- Patel PL, Suram A, Mirani N, Bischof O, Herbig U. 2016. Derepression of hTERT gene expression promotes escape from oncogene-induced cellular senescence. *Proc Natl Acad Sci* **113**: E5024–E5033.
- Pirker C, Holzmann K, Spiegl-Kreinecker S, Elbling L, Thallinger C, Pehamberger H, Micksche M, Berger W. 2003. Chromosomal imbalances in primary and metastatic melanomas: over-representation of essential telomerase genes. *Melanoma Res* **13**: 483–492.
- Platz A, Eghazi S, Ringborg U, Hansson J. 2008. Human cutaneous melanoma: a review of NRAS and BRAF mutation frequencies in relation to histogenetic subclass and body site. *Mol Oncol* **1**: 395–405.
- Pollock PM, Harper UL, Hansen KS, Yudt LM, Stark M, Robbins CM, Moses TY, Hostetter G, Wagner U, Kakareka J, et al. 2003. High frequency of BRAF mutations in nevi. *Nat Genet* **33**: 19–20.
- Rees JL. 2004. The genetics of sun sensitivity in humans. *Am J Hum Genet* **75**: 739–751.
- Riesenberg S, Groetchen A, Siddaway R, Bald T, Reinhardt J, Smorra D, Kohlmeyer J, Renn M, Phung B, Aymans P, et al. 2015. MITF and c-Jun antagonism interconnects melanoma dedifferentiation with pro-inflammatory cytokine responsiveness and myeloid cell recruitment. *Nat Commun* **6**: 8755.
- Rietschel P, Panageas KS, Hanlon C, Patel A, Abramson DH, Chapman PB. 2005. Variates of survival in metastatic uveal melanoma. *J Clin Oncol* **23**: 8076–8080.
- Royer-Bertrand B, Torsello M, Rimoldi D, El Zaoui I, Cisarova K, Pescini-Gobert R, Raynaud F, Zografos L, Schalenbourg A, Speiser D, et al. 2016. Comprehensive genetic landscape of uveal melanoma by whole-genome sequencing. *Am J Hum Genet* **99**: 1190–1198.
- Sarna T. 1992. Properties and function of the ocular melanin—a photobiophysical view. *J Photochem Photobiol B Biol* **12**: 215–258.
- Scelo G, Constantinescu V, Csiki I, Zaridze D, Szeszenia-Dabrowska N, Rudnai P, Lissowska J, Fabianova E, Cassidy A, Slamova A, et al. 2004. Occupational exposure to vinyl chloride, acrylonitrile and styrene and lung cancer risk (europe). *Cancer Causes Control* **15**: 445–452.
- Schioth HB, Phillips SR, Rudzish R, Birch-Machin MA, Wikberg JE, Rees JL. 1999. Loss of function mutations of the human melanocortin 1 receptor are common and are associated with red hair. *Biochem Biophys Res Commun* **260**: 488–491.
- Schmidt S, Debant A. 2013. Aptamer-derived peptide inhibitors of Rho guanine nucleotide exchange factors. *Enzymes* **33**: 147–168.
- Schrage R, Schmitz AL, Gaffal E, Annala S, Kehraus S, Wenzel D, Bullesbach KM, Bald T, Inoue A, Shinjo Y, et al. 2015. The experimental power of FR900359 to study Gq-regulated biological processes. *Nat Commun* **6**: 10156.
- Seddon JM, Gragoudas ES, Glynn RJ, Egan KM, Albert DM, Blitzer PH. 1990. Host factors, UV radiation, and risk of uveal

- melanoma. A case-control study. *Arch Ophthalmol* **108**: 1274–1280.
- Sharpe M, Mount N. 2015. Genetically modified T cells in cancer therapy: opportunities and challenges. *Dis Model Mech* **8**: 337–350.
- Sherr CJ, McCormick F. 2002. The RB and p53 pathways in cancer. *Cancer Cell* **2**: 103–112.
- Shields CL, Ganguly A, Bianciotto CG, Turaka K, Tavallali A, Shields JA. 2011a. Prognosis of uveal melanoma in 500 cases using genetic testing of fine-needle aspiration biopsy specimens. *Ophthalmology* **118**: 396–401.
- Shields CL, Markowitz JS, Belinsky I, Schwartzstein H, George NS, Lally SE, Mashayekhi A, Shields JA. 2011b. Conjunctival melanoma: outcomes based on tumor origin in 382 consecutive cases. *Ophthalmology* **118**: 389–395.e1–2.
- Shtivelman E, Davies MQ, Hwu P, Yang J, Lotem M, Oren M, Flaherty KT, Fisher DE. 2014. Pathways and therapeutic targets in melanoma. *Oncotarget* **5**: 1701–1752.
- Shull AY, Latham-Schwark A, Ramasamy P, Leskoske K, Oroian D, Birtwistle MR, Buckhaults PJ. 2012. Novel somatic mutations to PI3K pathway genes in metastatic melanoma. *PLoS One* **7**: e43369.
- Singh AD, Bergman L, Seregard S. 2005. Uveal melanoma: epidemiologic aspects. *Ophthalmol Clin North Am* **18**: 75–84.
- Singh AD, Topham A. 2003. Incidence of uveal melanoma in the United States: 1973–1997. *Ophthalmology* **110**: 956–961.
- Steingrimsson E, Copeland NG, Jenkins NA. 2004. Melanocytes and the microphthalmia transcription factor network. *Annu Rev Genet* **38**: 365–411.
- Strub T, Giuliano S, Ye T, Bonet C, Keime C, Kobi D, Le Gras S, Cormont M, Ballotti R, Bertolotto C, et al. 2011. Essential role of microphthalmia transcription factor for DNA replication, mitosis and genomic stability in melanoma. *Oncogene* **30**: 2319–2332.
- Sturm RA, Larsson M. 2009. Genetics of human iris colour and patterns. *Pigment Cell Melanoma Res* **22**: 544–562.
- Sullivan RJ, Flaherty KT. 2015a. Immunotherapy: anti-PD-1 therapies—a new first-line option in advanced melanoma. *Nat Rev Clin Oncol* **12**: 625–626.
- Sullivan RJ, Flaherty KT. 2015b. New strategies in melanoma: entering the era of combinatorial therapy. *Clin Cancer Res* **21**: 2424–2435.
- Sveen A, Kilpinen S, Ruusulehto A, Lothe RA, Skotheim RI. 2016. Aberrant RNA splicing in cancer; expression changes and driver mutations of splicing factor genes. *Oncogene* **35**: 2413–2427.
- Tachibana M. 1999. Sound needs sound melanocytes to be heard. *Pigment Cell Res* **12**: 344–354.
- Takeda K, Takahashi NH, Shibahara S. 2007. Neuroendocrine functions of melanocytes: beyond the skin-deep melanin maker. *Tohoku J Exp Med* **211**: 201–221.
- Tas F. 2012. Metastatic behavior in melanoma: timing, pattern, survival, and influencing factors. *J Oncol* **2012**: 647684.
- Tatsi C, Bacopoulou F, Lyssikatos C, Belyavskaya E, Fauz FR, Stratakis CA. 2016. Sporadic melanotic schwannoma with overlapping features of melanocytoma bearing a GNA11 mutation in an adolescent girl. *Pediatr Blood Cancer*.
- Thomas NE. 2006. BRAF somatic mutations in malignant melanoma and melanocytic naevi. *Melanoma Res* **16**: 97–103.
- Tirosh I, Izar B, Prakadan SM, Wadsworth MH II, Treacy D, Trombetta JJ, Rotem A, Rodman C, Lian C, Murphy G, et al. 2016. Dissecting the multicellular ecosystem of metastatic melanoma by single-cell RNA-seq. *Science* **352**: 189–196.
- Topalian SL, Sznol M, McDermott DF, Kluger HM, Carvajal RD, Sharfman WH, Brahmer JR, Lawrence DP, Atkins MB, Powderly JD, et al. 2014. Survival, durable tumor remission, and long-term safety in patients with advanced melanoma receiving nivolumab. *J Clin Oncol* **32**: 1020–1030.
- Triay E, Bergman L, Nilsson B, All-Ericsson C, Seregard S. 2009. Time trends in the incidence of conjunctival melanoma in Sweden. *Br J Ophthalmol* **93**: 1524–1528.
- Trolet J, Hupe P, Huon I, Lebigot I, Decraene C, Delattre O, Sastre-Garau X, Saule S, Thiery JP, Plancher C, et al. 2009. Genomic profiling and identification of high-risk uveal melanoma by array CGH analysis of primary tumors and liver metastases. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **50**: 2572–2580.
- Tsai KK, Zarzoso I, Daud AI. 2014. PD-1 and PD-L1 antibodies for melanoma. *Hum Vaccin Immunother* **10**: 3111–3116.
- Tsai T, Vu C, Henson DE. 2005. Cutaneous, ocular and visceral melanoma in African Americans and Caucasians. *Melanoma Res* **15**: 213–217.
- Tsao H, Bevona C, Goggins W, Quinn T. 2003. The transformation rate of moles (melanocytic nevi) into cutaneous melanoma: a population-based estimate. *Arch Dermatol* **139**: 282–288.
- Tsao H, Goel V, Wu H, Yang G, Haluska FG. 2004. Genetic interaction between NRAS and BRAF mutations and PTEN/MMAC1 inactivation in melanoma. *J Invest Dermatol* **122**: 337–341.
- Ugurel S, Rohmel J, Ascierto PA, Flaherty KT, Grob JJ, Hauschild A, Larkin J, Long GV, Lorigan P, McArthur GA, et al. 2016. Survival of patients with advanced metastatic melanoma: the impact of novel therapies. *Eur J Cancer* **53**: 125–134.
- Vajdic CM, Krickler A, Giblin M, McKenzie J, Aitken J, Giles GG, Armstrong BK. 2002. Sun exposure predicts risk of ocular melanoma in Australia. *Int J Cancer* **101**: 175–182.
- Vajdic C, Krickler A, Duffy DL, Aitken JF, Stark M, ter Huurne JA, Martin NG, Armstrong BK, Hayward NK. 2003. Ocular melanoma is not associated with CDKN2A or MC1R variants—a population-based study. *Melanoma Res* **13**: 409–413.
- Van Allen EM, Wagle N, Sucker A, Treacy DJ, Johannessen CM, Goetz EM, Place CS, Taylor-Weiner A, Whittaker S, Kryukov GV, et al. 2014. The genetic landscape of clinical resistance to RAF inhibition in metastatic melanoma. *Cancer Discov* **4**: 94–109.
- van den Bosch T, Kilic E, Paridaens D, de Klein A. 2010. Genetics of uveal melanoma and cutaneous melanoma: two of a kind? *Dermatol Res Pract* **2010**: 360136.
- van den Bosch T, van Beek JG, Vaarwater J, Verdijk RM, Naus NC, Paridaens D, de Klein A, Kilic E. 2012. Higher percentage of FISH-determined monosomy 3 and 8q amplification in uveal melanoma cells relate to poor patient prognosis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **53**: 2668–2674.
- van der Kooij MK, Joosse A, Speetjens FM, Hospers GA, Bisschop C, de Groot JW, Koornstra R, Blank CU, Kapiteijn E. 2017. Anti-PD1 treatment in metastatic uveal melanoma in the Netherlands. *Acta Oncol* **56**: 101–103.
- van der Velden PA, Metzelaar-Blok JA, Bergman W, Monique H, Hurks H, Frants RR, Gruis NA, Jager MJ. 2001. Promoter hypermethylation: a common cause of reduced p16(INK4a) expression in uveal melanoma. *Cancer Res* **61**: 5303–5306.
- Van Raamsdonk CD, Bezrookove V, Green G, Bauer J, Gaugler L, O'Brien JM, Simpson EM, Barsh GS, Bastian BC. 2009. Frequent somatic mutations of GNAQ in uveal melanoma and blue naevi. *Nature* **457**: 599–602.
- Van Raamsdonk CD, Griewank KG, Crosby MB, Garrido MC, Vemula S, Wiesner T, Obenauf AC, Wackernagel W, Green G, Bouvier N, et al. 2010. Mutations in GNA11 in uveal melanoma. *N Engl J Med* **363**: 2191–2199.

- Verfaillie A, Imrichova H, Atak ZK, Dewaele M, Rambow F, Hulselmans G, Christiaens V, Svetlichnyy D, Luciani F, Van den Mooter L, et al. 2015. Decoding the regulatory landscape of melanoma reveals TEADS as regulators of the invasive cell state. *Nat Commun* **6**: 6683.
- Versluis M, de Lange MJ, van Pelt SI, Ruivenkamp CA, Kroes WG, Cao J, Jager MJ, Luyten GP, van der Velden PA. 2015. Digital PCR validates 8q dosage as prognostic tool in uveal melanoma. *PLoS One* **10**: e0116371.
- Villanueva J, Infante JR, Krepler C, Reyes-Urbe P, Samanta M, Chen HY, Li B, Swoboda RK, Wilson M, Vultur A, et al. 2013. Concurrent MEK2 mutation and BRAF amplification confer resistance to BRAF and MEK inhibitors in melanoma. *Cell Rep* **4**: 1090–1099.
- Vogelstein B, Papadopoulos N, Velculescu VE, Zhou S, Diaz LA Jr, Kinzler KW. 2013. Cancer genome landscapes. *Science* **339**: 1546–1558.
- Vredeveld LC, Possik PA, Smit MA, Meissl K, Michaloglou C, Horlings HM, Ajouaou A, Kortman PC, Dankort D, McMahon M, et al. 2012. Abrogation of BRAF<sup>V600E</sup>-induced senescence by PI3K pathway activation contributes to melanomagenesis. *Genes Dev* **26**: 1055–1069.
- Wakamatsu K, Hu DN, McCormick SA, Ito S. 2008. Characterization of melanin in human iridal and choroidal melanocytes from eyes with various colored irides. *Pigment Cell Melanoma Res* **21**: 97–105.
- Wei X, Walia V, Lin JC, Teer JK, Prickett TD, Gartner J, Davis S, Program NCS, Stemke-Hale K, Davies MA, et al. 2011. Exome sequencing identifies GRIN2A as frequently mutated in melanoma. *Nat Genet* **43**: 442–446.
- Weyden LV, Arends MJ, Campbell AD, Bald T, Wardle-Jones H, Griggs N, Velasco-Herrera MD, Tuting T, Sansom OJ, Karp NA, et al. 2017. Genome-wide in vivo screen identifies novel host regulators of metastatic colonization. *Nature* **541**: 233–236.
- Wiesner T, Obenaus AC, Murali R, Fried I, Griewank KG, Ulz P, Windpassinger C, Wackernagel W, Loy S, Wolf I, et al. 2011. Germline mutations in BAP1 predispose to melanocytic tumors. *Nat Genet* **43**: 1018–1021.
- Wikstrom K, Juhas M, Sjolander A. 2003a. The anti-apoptotic effect of leukotriene D4 involves the prevention of caspase 8 activation and Bid cleavage. *Biochem J* **371**: 115–124.
- Wikstrom K, Ohd JF, Sjolander A. 2003b. Regulation of leukotriene-dependent induction of cyclooxygenase-2 and Bcl-2. *Biochem Biophys Res Commun* **302**: 330–335.
- Wilson YM, Richards KL, Ford-Perriss ML, Panthier JJ, Murphy M. 2004. Neural crest cell lineage segregation in the mouse neural tube. *Development* **131**: 6153–6162.
- Wisse E, Jacobs F, Topal B, Frederik P, De Geest B. 2008. The size of endothelial fenestrae in human liver sinusoids: implications for hepatocyte-directed gene transfer. *Gene Ther* **15**: 1193–1199.
- Wong JR, Nanji AA, Galor A, Karp CL. 2014. Management of conjunctival malignant melanoma: a review and update. *Expert Rev Ophthalmol* **9**: 185–204.
- Wu H, Goel V, Haluska FG. 2003. PTEN signaling pathways in melanoma. *Oncogene* **22**: 3113–3122.
- Wunder F, Tinel H, Kast R, Geerts A, Becker EM, Kolkhof P, Hutter J, Erguden J, Harter M. 2010. Pharmacological characterization of the first potent and selective antagonist at the cysteinyl leukotriene 2 (CysLT<sub>2</sub>) receptor. *Br J Pharmacol* **160**: 399–409.
- Yavuziyigitoglu S, Koopmans AE, Verdijk RM, Vaarwater J, Eussen B, van Bodegom A, Paridaens D, Kilic E, de Klein A. 2016. Uveal melanomas with SF3B1 mutations: a distinct subclass associated with late-onset metastases. *Ophthalmology* **123**: 1118–1128.
- Yokoyama S, Woods SL, Boyle GM, Aoude LG, MacGregor S, Zisemann V, Gartside M, Cust AE, Haq R, Harland M, et al. 2011. A novel recurrent mutation in MITF predisposes to familial and sporadic melanoma. *Nature* **480**: 99–103.
- Yoo JH, Shi DS, Grossmann AH, Sorensen LK, Tong Z, Mleynek TM, Rogers A, Zhu W, Richards JR, Winter JM, et al. 2016. ARF6 is an actionable node that orchestrates oncogenic GNAQ signaling in uveal melanoma. *Cancer Cell* **29**: 889–904.
- Yu FX, Luo J, Mo JS, Liu G, Kim YC, Meng Z, Zhao L, Peyman G, Ouyang H, Jiang W, et al. 2014. Mutant Gq/11 promote uveal melanoma tumorigenesis by activating YAP. *Cancer Cell* **25**: 822–830.
- Zbytek B, Carlson JA, Granese J, Ross J, Mihm MC Jr, Slominski A. 2008. Current concepts of metastasis in melanoma. *Expert Rev Dermatol* **3**: 569–585.
- Zecca L, Casella L, Albertini A, Bellei C, Zucca FA, Engelen M, Zadlo A, Szweczyk G, Zareba M, Sarna T. 2008. Neuromelanin can protect against iron-mediated oxidative damage in system modeling iron overload of brain aging and Parkinson's disease. *J Neurochem* **106**: 1866–1875.
- Zhang J, Manley JL. 2013. Misregulation of pre-mRNA alternative splicing in cancer. *Cancer Discov* **3**: 1228–1237.
- Zhang T, Dutton-Regester K, Brown KM, Hayward NK. 2016. The genomic landscape of cutaneous melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res* **29**: 266–283.
- Zhuang D, Mannava S, Grachtchouk V, Tang WH, Patil S, Wawrzyniak JA, Berman AE, Giordano TJ, Prochownik EV, Soengas MS, et al. 2008. C-MYC overexpression is required for continuous suppression of oncogene-induced senescence in melanoma cells. *Oncogene* **27**: 6623–6634.
- Zuo L, Weger J, Yang Q, Goldstein AM, Tucker MA, Walker GJ, Hayward N, Dracopoli NC. 1996. Germline mutations in the p16INK4a binding domain of CDK4 in familial melanoma. *Nat Genet* **12**: 97–99.

## REVIEW

## Pathways from senescence to melanoma: focus on MITF sumoylation

J Leclerc<sup>1,2</sup>, R Ballotti<sup>1,2</sup> and C Bertolotto<sup>1,2</sup>

Cutaneous melanoma is a deadly skin cancer that originates from melanocytes. The development of cutaneous melanoma involves a complex interaction between environmental factors, mainly ultraviolet radiation from sunlight, and genetic alterations. Melanoma can also occur from a pre-existing nevus, a benign lesion formed from melanocytes harboring oncogenic mutations that trigger proliferative arrest and senescence entry. Senescence is a potent barrier against tumor progression. As such, the acquisition of mutations that suppress senescence and promote cell division is mandatory for cancer development. This topic appears central to melanoma development because, in humans, several somatic and germline mutations are related to the control of cellular senescence and proliferative activity. Consequently, primary melanoma can be viewed as a paradigm of senescence evasion. In support of this notion, a sumoylation-defective germline mutation in microphthalmia-associated transcription factor (*MITF*), a master regulator of melanocyte homeostasis, is associated with the development of melanoma. Interestingly, this *MITF* variant has also been recently reported to negatively impact the program of senescence. This article reviews the genetic alterations that have been shown to be involved in melanoma and that alter the process of senescence to favor melanoma development. Then, the transcription factor *MITF* and its sumoylation-defective mutant are described. How sumoylation misregulation can change *MITF* activity and impact the process of senescence is discussed. Finally, the contribution of such information to the development of anti-malignant melanoma strategies is evaluated.

*Oncogene* (2017) 36, 6659–6667; doi:10.1038/onc.2017.292; published online 21 August 2017

## MELANOMA

Cutaneous melanoma is a deadly form of skin cancer that originates from melanocytes, the melanin-producing cells of the skin. Its incidence has dramatically increased in white populations over the past several decades to reach 230 000 new cases worldwide each year (World Health Organization). Early stage skin localized malignant melanoma can be cured with surgery. However, when it has spread, metastatic melanoma has a very poor prognosis.

Cutaneous melanoma is a complex neoplasm that requires multiple environmental and genetic hits that work in concert to steer the acquisition of malignant properties.

In recent years, large-scale genomic studies of cutaneous melanoma established that the mutational signature of ultraviolet radiation of sunlight accounts for 46% of driver mutations,<sup>1–5</sup> thereby confirming the role of ultraviolet radiation in melanoma pathogenesis. Furthermore, these studies highlighted the recurrent somatic oncogenic mutations in the serine/threonine kinase *BRAF* (59–66% of the cases)<sup>6,7</sup> and in the small GTPase *NRAS* (15–20% of the cases) as well as mutations in *NF1* (14% of the cases, 55–75% of them predicted to be loss-of-function and putative driver mutations), which promotes the upregulation of *RAS* activity. These genetic alterations demonstrated the importance of the *ERK* signaling pathway in the disease and led to the classification of melanoma into four subtypes, including the triple wild type.<sup>5</sup>

The dissection of the molecular mechanisms involved in cutaneous melanoma also showed a frequent activation of the

*PI3K/AKT* signaling pathway, mainly as a consequence of constitutive *NRAS* activation, *AKT* activation<sup>8</sup> or the inactivation of the phosphatase and tensin homolog (*PTEN*) (20–30% of the cases).<sup>9</sup> Mutations of *β-catenin* (7% in the TCGA cohort), which operates downstream of *AKT*, were also found in melanoma cells.<sup>10,11</sup> The mutations described above are the most common and are considered important drivers for melanoma, affecting the process of cellular senescence and proliferation (Figure 1), which will be discussed later in this review. The *PI3K* effector *RAC1*, a member of the small GTPase Rho family that influences cell migration and cell-cycle progression, is also mutated (4–7% of the cases) and is considered a driver in melanomagenesis.<sup>2,4,12–14</sup> Mutations in equivalent residues in the related Rho family GTPases *RAC2* and *RHOT1* have also been discovered,<sup>2</sup> as well as an activating mutation in *CDC42* that was shown to be a driver in melanoma.<sup>2</sup> Of note, oncogenic *RAC1* was shown to reduce levels of p53.<sup>15</sup> Furthermore, mutations in other genes, including the transmembrane receptor tyrosine kinase *KIT* (5–8% of cases), the subunit of the *PBAF* chromatin-remodeling complex *ARID2* (7%), the serine/threonine phosphatase *PPP6C* (12%), the *Ras* GTPase activating protein 1 *RASA2* (5%) and the mitogen-activated protein kinase kinase *MAP2K1* and 2 (8%), the *TERT* promoter (75% of metastases), the guanine nucleotide-binding protein G(q) subunit alpha (*GNAQ11*, 5%), the phospholipase C beta 4 (*PLCB4*, 21–28%) and a large repertoire of other, less frequently mutated genes (not detailed here), have also been identified.<sup>1,2,4,16–19</sup>

<sup>1</sup>INSERM, U1065 (équipe 1), Equipe labélisée ARC 2016, C3M, Nice, France and <sup>2</sup>Université Côte d'Azur, Inserm, C3M, Nice, France. Correspondence: Dr C Bertolotto, C3M, INSERM, U1065 (équipe 1), Equipe labélisée ARC 2016, C3M, Avenue Saint Antoine de Ginestière, Nice 06204, France.

E-mail: bertolot@unice.fr

Received 21 April 2017; revised 9 July 2017; accepted 11 July 2017; published online 21 August 2017



shortening might have a role in nevus formation.<sup>47</sup> In support of this idea, nevus size and number have been associated with telomere length,<sup>48</sup> and telomere dysfunction-induced DNA damage foci have been detected in nevi.<sup>49</sup> Collectively, these observations suggest that both premature and replicative dependent senescence might have occurred in nevi (reviewed in refs 50,51). Interestingly, both types of senescence are associated with stimulation of the DNA Damage Response (DDR) signaling pathway, which converges towards the activation of retinoblastoma (RB) protein. Thus, one might hypothesize that both senescence programs have independent abilities to ensure robustness in tumor suppression and may prevent further nevi growth and transformation when a tumor suppressor is inactivated.

### SENESCENCE BYPASS AND MELANOMA

Melanoma originates from a pre-existing nevus in 25% of cases, inferred from a melanoma contiguous to an adjacent nevus remnant; however, melanoma can obliterate an associated nevus.<sup>33,52</sup> An increased number of nevi/atypical nevi represents a major melanoma risk factor.

The dogma is that senescence bypass represents a prerequisite for malignant transformation. Accordingly, p16<sup>INK4A</sup> or p53, which are major determinants of cellular senescence, are inactivated in most human cancers<sup>53</sup> and telomerase or an alternative mechanism called ALT (alternative telomere lengthening) is repressed.<sup>54</sup>

Once formed, the nevus-like lesions can remain static and do not progress to malignancy unless they are coupled with other alterations, such as a loss of p16<sup>INK4a</sup>,<sup>39,41,43,55–57</sup> p53<sup>40,58</sup> or Pten.<sup>33,41</sup> The receptor tyrosine kinase TYRO3 has also been shown to mediate BRAF<sup>V600E</sup>-induced senescence bypass in primary melanocytes, inducing the transformation of non-tumorigenic cell lines.<sup>59</sup> Likewise, the proto-oncogene C-MYC, the expression of which is enhanced in melanoma cells compared with melanocytes, suppresses oncogene-induced senescence.<sup>29</sup> This process involves the loss of the B56 $\alpha$  subunit of the PP2A tumor suppressor complex (PP2A-B56 $\alpha$ ), an MYC degradation complex, which leads to an increase in C-MYC expression.<sup>60</sup> Accordingly, the depletion of PP2A-B56 $\alpha$  in normal human melanocytes upregulated C-MYC protein levels and suppressed BRAF<sup>V600E</sup>-induced and, less efficiently, NRAS<sup>C61R</sup>-induced senescence.<sup>60</sup>

Of note, melanoma is thought to originate *de novo* in 75% of cases. In this context, senescence might not be efficiently established due to dysfunction in senescence programs and thus might lead immediately to the malignant conversion of melanocytes. This may be the consequence of pre-existing mutations or epigenetic alterations that impair senescence and proliferation arrest. However, even in this case melanoma can originate from senescent melanocytes that are too few to form a visible nevus.

Melanoma susceptibility genes and their role in senescence bypass

Melanoma occurs in a familial context in approximately 10% of cases. Gene mutations that contribute to an inherited susceptibility for melanoma, which increase the risk to the carrier, have been highlighted. These include mutations in rare but clearly highly penetrant melanoma predisposition genes and more common lower penetrant genes (Figure 1).

Even though there is still no disease process, the identification of a melanoma susceptibility allele would help to better predict which patients might benefit from increased surveillance and earlier detection of potentially dangerous lesions. However, these susceptibility alleles, such as p16<sup>INK4A</sup>, which was discussed earlier, can act as modifiers of somatic mutations to dramatically influence the onset of the disease.<sup>61,62</sup> Importantly, the early

detection of potentially dangerous lesions remains the best strategy to reduce the tumor burden of advance disease and for the optimal clinical outcome of patients suffering from melanoma.

Rare highly penetrant melanoma-causing variants include cyclin-dependent kinase Inhibitor 2A (*CDKN2A*), cyclin-dependent kinase 4 (*CDK4*) and retinoblastoma protein 1 (*RB1*) (for review ref. 63). *CDKN2A* encodes for p16<sup>INK4A</sup> and p14<sup>ARF</sup> from an alternate reading frame. Mutations in this gene mainly affect both p16<sup>INK4A</sup> and p14<sup>ARF</sup> or p16<sup>INK4A</sup> only, but in few cases, they can also specifically inactivate p14<sup>ARF</sup>.<sup>64,65</sup> p16<sup>INK4A</sup> inhibits the cyclin-dependent kinases 4/6 and cyclin D complexes.<sup>57,66</sup> p14<sup>ARF</sup> inhibits human double minute 2 (*HDM2*), which triggers p53 stabilization, leading to the increased expression of the cyclin-dependent kinase inhibitor p21<sup>CIP1</sup> (*CDKN1A*).<sup>67</sup> Activating *CDK4* mutations prevent the binding and inhibition of *CDK4* by p16<sup>INK4A</sup>.<sup>68</sup> The relevance of p16<sup>INK4A</sup> or p14<sup>ARF</sup> varies among species and cell types. Human melanocyte senescence showed a higher dependency on the p16<sup>INK4A</sup> pathway compared with the p14<sup>ARF</sup> pathway.<sup>69,70</sup> Moreover, the role of p53 with regard to senescence is different in human melanocytes compared with fibroblasts.<sup>69,71</sup> Both the p16<sup>INK4A</sup> and the p14<sup>ARF</sup>/p53/p21<sup>CIP1</sup> axis operate to maintain the RB in an inactive state.

Because RB has a critical role in the induction and maintenance of senescence,<sup>53</sup> all the above-described alterations in the RB pathway favor senescence bypass and proliferation, which is a mandatory step toward melanoma progression.<sup>72</sup>

Accordingly, human melanocytes isolated from individuals with a biallelic inactivation of p16<sup>INK4A</sup><sup>69</sup> or with p16<sup>INK4A</sup>-knockdown,<sup>73</sup> both of which have functional p14<sup>ARF</sup>, have greater lifespans in culture. Furthermore, mouse melanocytes with a heterozygous inactivation of p16<sup>INK4A</sup> show defective senescence.<sup>70</sup> Likewise, individuals that carry a monoallelic inactivation of *CDKN2A* show multiple large nevi suggestive of extended proliferation before senescence.<sup>64</sup> These observations strengthen the critical role of p16<sup>INK4A</sup> in human melanocyte senescence *in vitro* and *in vivo*. However, p16<sup>INK4A</sup>-deficient human melanocytes still stop proliferating, which indicates that additional factors, such as p53, may impose a p16<sup>INK4A</sup>-independent checkpoint to affect growth arrest.<sup>69,74</sup> Although p14<sup>ARF</sup>, which controls the p53 level, had no clear reported role in human melanocyte senescence,<sup>70,71</sup> it has been recently reported to control radical oxygen species production<sup>75</sup> through a short acidic motif often targeted by familial melanoma mutations in *CDKN2A*.<sup>76</sup> Radical oxygen species are involved in the maintenance of melanocyte senescence.<sup>77,78</sup>

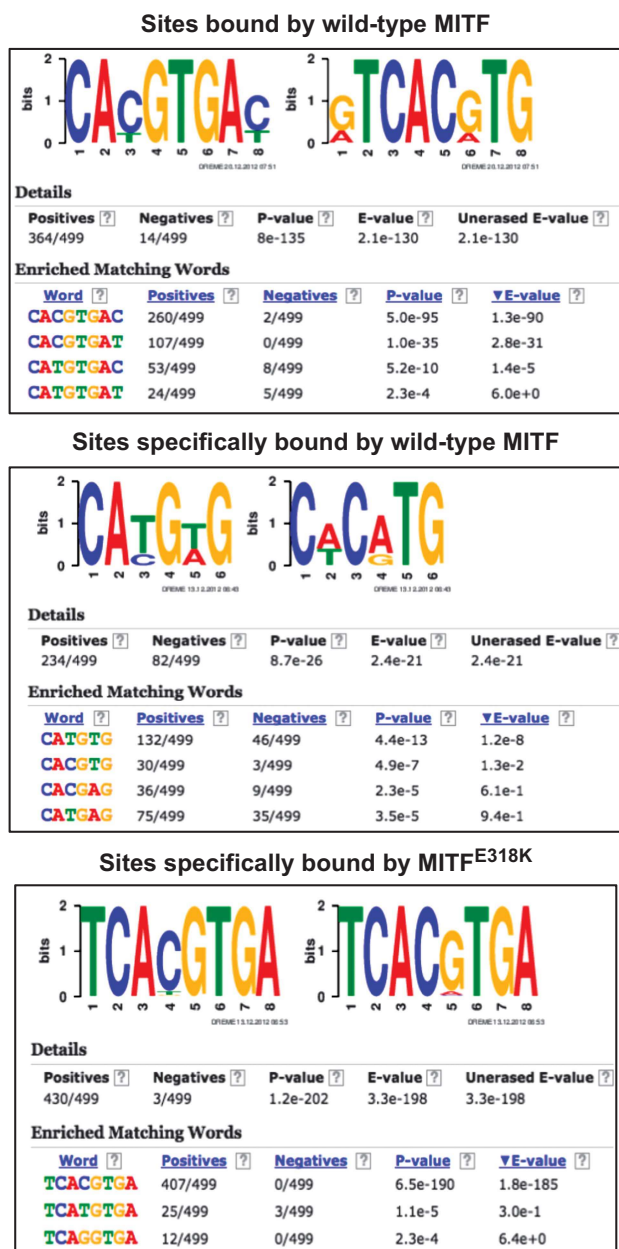
Other high-risk melanoma susceptibility genes include the *BRCA-1 associated protein* (*BAP1*) and the telomere maintenance genes *POT1*, *ACD*, *TERF2IP* and *TERT* (reviewed in ref. 63). *BAP1* regulates genome stability during cell replication by controlling cellular recovery from DNA damage.<sup>79</sup> The telomere controlling genes protect chromosome extremities from cellular DDR and genomic instability.<sup>80</sup> DDR transiently stops cell-cycle progression until damage is removed, but persistent DDR triggers cellular senescence.

Mutations in the *CDKN2A*, *RB1*, *BAP1* and *TERT* also occur at a somatic level.<sup>5</sup>

Collectively, the high-risk melanoma susceptibility genes converge to overcome the RB-dependent growth arrest, which mediates senescence bypass, and to render cells genomically instable, both of which favor melanoma development.

Low- to moderate-risk genes have a weaker impact on melanoma susceptibility. Low melanoma risk genes are primarily associated with pigmentation that plays a key role in the prevention of sunburns, a risk factor for melanoma. Nevertheless, some are linked to cell survival or metabolism.<sup>63</sup>

Moderate-risk genes include microphthalmia-associated transcription factor (*MITF*)<sup>81–84</sup> and its upstream regulator melanocortin 1 receptor (*MC1R*). In addition to controlling pigmentation,<sup>85,86</sup> both *MC1R* and *MITF* could also exert pro-melanoma effects and



**Figure 2.** MITF<sup>E318K</sup> displays modified DNA binding activity. The MEME program was used to analyze the top 500 wild-type MITF-binding sites in the ChIP-seq data set from Bertolotto *et al.*<sup>81</sup> This analysis revealed that highly occupied MITF sites are composed of the CACGTG or CATGTG core motif flanked by a highly represented A and a C/T (List 1, upper panel). In contrast, an analogous analysis of 500 sites only bound by wild-type MITF (List 2, middle panel), mainly sites that exhibit low occupancy, indicates the presence of non-canonical E-box motifs. A subset of sites in this list are also bound by MITF<sup>E318K</sup>, although these sites are not necessarily among the top 500 bound by the mutant. An analysis of the top 500 sites bound selectively by MITF<sup>E318K</sup> (List 3, lower panel) revealed the presence of an extended palindromic E-box, in which the CACGTG or CATGTG core motifs are flanked by A and T. In each panel, the numbers of motifs with each consensus sequence are shown along with the relevant *P* and *E* values.

regulate cellular senescence. Indeed, MC1R signaling induces the phosphorylation of DNA repair proteins to mediate the repair of ultraviolet radiation-induced DNA damage.<sup>87,88</sup> Melanocytes that express loss of function MC1R variants display compromised DDR

activation and genomic stability,<sup>88</sup> which predisposes the cell to malignant transformation. Furthermore, MC1R has been shown to interact with PTEN and to stabilize its expression.<sup>89</sup> Some MC1R variants, in contrast to the wild-type form, do not interact with PTEN<sup>89</sup> and therefore might favor the sustained activation of the PI3K pathway that facilitates senescence.

MITF is the conductor of melanocyte lineage development<sup>90</sup> and function<sup>85,91</sup> (reviewed in ref. 92). Furthermore, MITF may act, *per se*, as a bona fide melanoma oncogene.<sup>93,94</sup> It has also been recently associated with intrinsic and acquired resistance to targeted therapies<sup>94–97</sup> and it has a negative impact on immunotherapy efficiency.<sup>98,99</sup> To explain the different functions of MITF in the melanocyte lineage, a rheostat model has been established that stipulates that the expression level, post-translational modification and co-factors create a bar code-like situation, which channels MITF towards a specific subset of target genes and determines either pro- or anti-oncogenic MITF activity.<sup>100</sup>

The recurrent germline mutation in MITF that changes glutamate 318 into a lysine (MITF<sup>E318K</sup>) predisposes carriers to certain cancers, including melanoma.<sup>81–84,101</sup> Furthermore, the MITF<sup>E318K</sup> variant has been associated with multiple primary melanoma and nodular melanoma and thus could play a role in the fast-growing and aggressive form of the disease.<sup>82,84,101</sup> Mechanistically, MITF<sup>E318K</sup> has recently been shown to weaken the process of cellular senescence in melanocytes.<sup>102</sup> The way in which the MITF E318K mutation impacts MITF activity and the process of senescence is the focus of the following section.

#### MITF and sumoylation

MITF can be sumoylated.<sup>81,84,103,104</sup> Sumoylation is a highly dynamic and reversible ubiquitination-like post-translational modification that triggers the covalent attachment of a small peptide (SUMO) to a target protein.<sup>105</sup> Sumoylation events usually occur at a consensus motif site (YKXE) and are critically dependent on the acidic residue at +2 (E) of the acceptor lysine (K). Sumoylation is a multistep process that involves the consecutive actions of E1 (SAE1/SAE2), E2 (UBC9) and E3 (PIAS) enzymes that catalyze the attachment of SUMO to target proteins, while deconjugation is promoted by SUMO-specific proteases.<sup>106</sup> The ligase involved in the SUMO modification of MITF has not been pinpointed. However, MITF has been previously demonstrated to bind PIAS3,<sup>107,108</sup> which functions as a SUMO ligase for MITF. Thus, PIAS3 might act as an E3 sumo ligase for MITF.

Sumoylation dysregulation has been reported at the global level by affecting the activity of the enzymes of the conjugation/deconjugation machinery or at the level of individual proteins by modifying the accessibility of the targeted lysines.

Although a number of individual proteins exhibit changes in sumoylation, only a few examples of mutations exist, such as in lamin-A, that directly impact a SUMO-consensus site.<sup>109</sup> The clear establishment of the relevance of sumoylation alterations in these diseases is difficult. The hyposumoylated MITF<sup>E318K</sup> variant is another example. Indeed, the codon 318 in MITF is located in a sumoylation consensus site (YKXE), and accordingly, MITF<sup>E318K</sup> severely impaired the sumoylation of MITF both *in vitro*<sup>81,84</sup> and *in situ*.<sup>102</sup>

To better understand how MITF<sup>E318K</sup> mediates pro-tumoral effects, a combination of immortalized human melanocytes, human melanocytes isolated from healthy or MITF<sup>E318K</sup> patients and mouse models was used.<sup>102</sup>

MITF<sup>E318K</sup> appears nevogenic in mice, in agreement with what has been reported in humans.<sup>83,84,101</sup> However, an increased number of nevi due to the presence of MITF<sup>E318K</sup> was only observed in the oncogenic BRaf<sup>V600E</sup> setting.<sup>102</sup> Compared with humans, mice grow in a relatively homogeneous environment with less variation in diet and environmental exposures and have



much longer telomeres that restrain chromosomal abnormalities, thereby preventing the acquisition of other potential alterations required for nevus development.<sup>110</sup> Moreover, non-follicular melanocytes are scarce in normal mouse skin and are mainly located in the hair follicle, which may have implications for the incidence of nevi.

These additional (epi)genetic alterations mediated by environmental factors likely co-exist in human MITF<sup>E318K</sup> nevi. Of note, MITF<sup>E318K</sup> melanocytes have a shorter doubling time compared with wild-type MITF. Thus, melanocytes that constitutively express MITF<sup>E318K</sup> could have an altered ability to enter senescence upon the induction of oncogenic BRAF<sup>V600E</sup>, leading to an increased nevus number *in vivo*. Accordingly, cultured MITF<sup>E318K</sup> melanocytes displayed delayed BRAF<sup>V600E</sup>-induced senescence and reduced expression of p16<sup>INK4A</sup>, how MITF<sup>E318K</sup> inhibits p16<sup>INK4A</sup> expression remains to be elucidated. In agreement with this finding, patients with a biallelic inactivation of the cell-cycle inhibitor *CDKN2A* exhibit an increased number of nevi.<sup>69</sup> Furthermore, *Mitf*<sup>E318K</sup> facilitates melanomagenesis on the oncogenic BRAF<sup>V600E</sup> and Pten-deficient background; these two mutations are frequently identified in human melanomas, thereby recapitulating the genetic events found in a subset of human melanomas.<sup>111</sup>

A comparison of *Mitf* wild type or *Mitf*<sup>E318K</sup> tumors revealed that *Mitf*<sup>E318K</sup> reduces the levels of the cell-cycle inhibitors *CDKN2B* and *CDKN2A*, which, as discussed earlier, are critically required to prevent the melanocyte to melanoma progression. Remarkably, *CDKN2B* is a kidney cancer predisposition gene,<sup>112</sup> the incidence of which is also increased in MITF<sup>E318K</sup> carriers.<sup>81,113</sup> Consistently,  $\beta$ -catenin, which regulates MITF expression,<sup>114</sup> has also been shown *in vivo* to promote senescence evasion via the inhibition of p16<sup>INK4A</sup> expression<sup>56</sup> and to facilitate melanomagenesis in the oncogenic BRAF<sup>V600E</sup> and Pten-deficient background.<sup>115</sup> Collectively, these observations strengthen the idea that MITF<sup>E318K</sup> impairs the implementation of the senescence program and favors melanoma progression.

Sumoylation impacts protein localization, stability or activity.<sup>116</sup> It has been shown to modulate the activity of a large number of proteins, mostly transcription factors, and to be involved in many biologically important functions, including DNA damage repair, the response to stress and cellular senescence.<sup>116,117</sup> Perturbations of such modifications are therefore likely to contribute to human diseases such as cancer.<sup>118</sup> Accordingly, in humans, environmental stresses that influence melanoma progression, such as ultraviolet radiation<sup>119</sup> and hypoxia,<sup>120</sup> trigger the production of reactive oxygen species. These stimuli alter the process of sumoylation<sup>121</sup> and senescence.<sup>122</sup>

One evident answer to why MITF<sup>E318K</sup> favors melanomagenesis is that the mutation reduces the sumoylation of MITF. The inhibition of MITF sumoylation does not appear to affect MITF cellular localization or stability;<sup>81,103,104</sup> sumoylation changes the transcriptional activity<sup>81,84</sup> and target sequences of MITF, which could explain the pro-tumoral effects. Indeed, compared with wild-type MITF, MITF<sup>E318K</sup> is redistributed over the genome on a larger repertoire of low-affinity genomic sequence.<sup>81</sup> Actually, the E318K mutation modulates MITF DNA binding due to its preference for an extended palindromic E-box 5'-TCACGTGA (versus 5'-CACGTGAC/T for wild-type MITF), thereby altering MITF's target gene specificity (Figure 2). Briefly, strong MITF<sup>E318K</sup> binding requires an extended 8-base pair palindrome or an M-box.<sup>123</sup> Sites with a 6-base pair E-box are bound with lower affinity, and the diminished specificity allows MITF<sup>E318K</sup> to bind with lower affinity to more degenerate E-boxes, thus accounting for the larger number of weakly bound sites that were found with this mutant. In contrast, few sites with the extended 8-base pair palindrome are among the top 500 bound by wild-type MITF, which indicates that the full palindrome is not required for the strong binding of wild-type MITF. Nevertheless, an understanding

of the precise mechanisms of changes in site selection will require further studies.

Additionally, we cannot rule out the possibility that the E318K mutation exerts a sumoylation independent effect by altering other post-translation modifications such as acetylation or ubiquitination of the new lysine, or more generally, the MITF conformation.

## THERAPEUTIC OPTIONS THAT TARGET SUMOYLATION AND SENESCENCE

Recent genomic studies permitted a better understanding of melanoma pathogenesis and have been instrumental in the development of newer therapies to target driver mutations. An understanding of the molecular mechanisms also permitted the development of efficient immunotherapy strategies. Despite the success of recent treatments that utilized targeted therapies (BRAF, MEK) and immunotherapies (anti-CTLA-4, anti-PD1) that substantially extended the median overall survival of patients suffering from metastatic melanoma,<sup>124,125</sup> the therapeutic options are far from perfect, as clinical responses are either transient or limited to restricted subsets of melanoma patients.

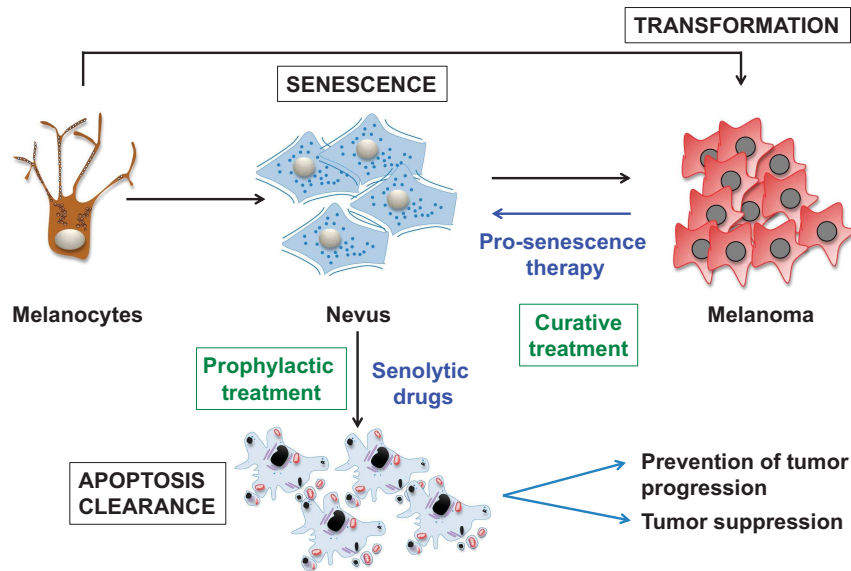
Therefore, approaches that could represent therapeutic strategies to improve malignant melanoma treatment and/or to impair its progression are discussed below.

The SUMO pathway has been considered a potential target in cancer treatment. The loss of SAE1/2 enzymatic activity in human mammary epithelial cells drives synthetic lethality with c-MYC.<sup>126</sup> The RNAi depletion of UBC9 impairs the *in vitro* and *in vivo* growth of KRAS mutant colorectal cancer cells.<sup>127</sup> Furthermore, the global inhibition of sumoylation with chemicals such as the E1 inhibitor anacardic acid has been shown to promote the death of acute myeloid leukemia cell lines *in vitro* and to reduce tumor growth *in vivo*.<sup>121</sup> However, sumoylation inhibition might not be appropriate for melanoma as it is expected to reduce MITF sumoylation and to favor melanoma progression. In contrast, the global upregulation of sumoylation via the use of inhibitors of SENP activity that are currently under development<sup>128</sup> could represent a valid anti-melanoma strategy.

As discussed in this review, cancers develop via senescence suppression and the stimulation of cell proliferation. Given that p16<sup>INK4A</sup> is a barrier to senescence evasion and plays a key role in melanomagenesis, the restoration of genetic alterations and the epigenetic reactivation of *CDKN2A* may represent strategies for the prevention and therapy of cancer.<sup>129</sup> Melanoma cells already have a powerful pro-senescence signal that exists in dormancy via the activation of BRAF or NRAS that discerns the cancer cells from their normal counterparts. In support of this notion, the depletion of MITF<sup>N30-132</sup> or c-MYC<sup>29</sup> reactivated senescence in BRAF<sup>V600E</sup> or NRAS<sup>Q61R</sup> expressing melanoma cells. As such, pro-senescence therapy already has a built-in specificity for melanoma cells that might be exploited to improve current melanoma treatment.

Accordingly, senescence induction in human breast cancer and lung carcinoma following chemotherapy is correlated to a favorable outcome.<sup>133,134</sup> However, *in vivo*, effective tumor regression has been associated with the clearance of senescent cells by the immune system.<sup>135,136</sup> Therapy-induced senescence can enhance long-term outcomes, but tumors eventually reappear.<sup>137</sup>

Actually, senescent cells are growth arrested but they remain viable and metabolically active, and this leaves a door open for growth reset. The inactivation of p53 was reported to reverse the replicative senescence of some cells, but it failed to overcome oncogene-induced senescence.<sup>138</sup> Senescence reversibility might depend on the expression of cellular p16<sup>INK4A</sup>, which provides a dominant barrier against proliferation.<sup>138</sup> Furthermore, senescence is associated with the chronic secretion of multiple bioactive factors, which is called senescence-associated secretory



**Figure 3.** Model of melanocyte to melanoma transformation and therapeutic strategies. Melanoma can develop *de novo* from a melanocyte or from a pre-existing nevus. A nevus is a benign proliferation of melanocytes. The growth arrest of nevus melanocytes results from senescence induced by oncogenes such as BRAF<sup>V600E</sup>. Once formed, a nevus can remain growth arrested for decades. However, a nevus can reverse ‘oncogene-induced senescence’ and undergo malignant conversion. The development of prophylactic treatments to prevent the switch from benign nevi to melanoma by allowing the clearance of senescent cells by senolytic drugs or the development of curative treatments that use pro-senescence therapy associated with senolytic drugs could represent therapeutic strategies (in blue).

phenotype. Senescence-associated secretory phenotype comprises pro-inflammatory cytokines or chemokines, extracellular matrix proteases and growth factors<sup>139,140</sup> that influence the cellular microenvironment. Some of these secreted molecules may have autocrine effects that enforce cellular senescence,<sup>37,141</sup> whereas others may exert non-cell-autonomous effects that favor tumorigenesis in nearby non-senescent cells.<sup>131,142,143</sup>

Thus, cellular senescence can exert both beneficial and detrimental effects, depending on the senescence signal, tissue context and secreted molecules. The challenge lies in the suppression of the activity of the anti-senescence factors and the enhancement of the activity of pro-senescence factors.

Of note, senescence-associated secretory phenotype was not detected when cells were induced to senesce with the forced expression of p16<sup>INK4A</sup>, and it was suggested that p53 signaling was necessary.<sup>144</sup> In melanocytes, compelling evidence shows the critical role of p16<sup>INK4A</sup> in the control of proliferative activity and the ability to senesce *in vitro* and *in vivo*.<sup>64,69,70</sup> Thus, one might hypothesize that nevi do not produce a secretome. However, in atypical nevi, which are associated with an increased risk of developing melanoma, p16<sup>INK4A</sup> can be mutated and p53 can be reactivated. This finding suggests that some nevi can produce senescence-associated secretory phenotype factors and create a microenvironment that causes regrowth in the nevus.

In the context of aging, senescent cells accumulate in tissues. They might disrupt tissue structure and be causally implicated in the generation of age-related diseases, including cancers. As such, the clearance of senescent cells can prevent or postpone tissue dysfunction and extend the healthspan. Indeed, the selective removal of senescent cells by the BH3 mimetic ABT263 in sublethally irradiated or normally aged mice has health benefits in part through the rejuvenation of aged tissue stem cells.<sup>145</sup> Furthermore, the elimination of p16<sup>INK4A</sup>-positive senescent cells in progeroid mice, via the stimulation of apoptosis, delays the acquisition of age-related pathologies.<sup>146</sup> Likewise, a FOXO4 peptide that perturbs the FOXO4 interaction with p53 has been shown to induce apoptosis in senescent cells.<sup>147</sup> *In vivo*, FOXO4 peptides neutralize doxorubicin-induced chemotoxicity and restore tissue function.<sup>147</sup>

Anti-senescence therapies that utilize senolytic drugs, which selectively kill senescent cells, are under development.<sup>148–150</sup> These drugs may improve the healthy lifespan, but they might also be useful in cancer treatment, as a prophylactic approach to eliminate benign pro-tumoral cells. This prophylactic approach could be exploited in patients at a high risk of developing melanoma. In addition, the BRAF inhibitor vemurafenib, which is approved for clinical use, or chemotherapeutic drugs have been shown to induce a senescence-like phenotype in melanoma cells.<sup>131,142,151</sup> Thus, pro-senescence therapies associated with senolytic drugs might also be used to kill malignant melanoma cells (Figure 3).

#### CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

We are very grateful to Dr I Davidson (IGBMC, Strasbourg) for the analysis of the ChIP-sequencing data set by the MEME program and his helpful discussion. This work was funded by INCa grants INCa\_10573 to CB and INCa\_2013-070 to RB and ANR-13-BSV1-0025-01 to RB and from La ville de Nice.

#### REFERENCES

- Berger MF, Hodis E, Heffernan TP, Deribe YL, Lawrence MS, Protopopov A *et al*. Melanoma genome sequencing reveals frequent PREX2 mutations. *Nature* 2012; **485**: 502–506.
- Hodis E, Watson IR, Kryukov GV, Arold ST, Imielinski M, Theurillat JP *et al*. A landscape of driver mutations in melanoma. *Cell* 2012; **150**: 251–263.
- Krauthammer M, Kong Y, Bacchicocchi A, Evans P, Pornputtpong N, Wu C *et al*. Exome sequencing identifies recurrent mutations in NF1 and RASopathy genes in sun-exposed melanomas. *Nat Genet* 2015; **47**: 996–1002.
- Krauthammer M, Kong Y, Ha BH, Evans P, Bacchicocchi A, McCusker JP *et al*. Exome sequencing identifies recurrent somatic RAC1 mutations in melanoma. *Nat Genet* 2012; **44**: 1006–1014.
- Network TCGA. Genomic classification of cutaneous melanoma. *Cell* 2015; **161**: 1681–1696.
- Davies H, Bignell GR, Cox C, Stephens P, Edkins S, Clegg S *et al*. Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature* 2002; **417**: 949–954.

- 7 Pollock PM, Meltzer PS. A genome-based strategy uncovers frequent BRAF mutations in melanoma. *Cancer Cell* 2002; **2**: 5–7.
- 8 Davies MA, Stenke-Hale K, Tellez C, Calderone TL, Deng W, Prieto VG *et al*. A novel AKT3 mutation in melanoma tumours and cell lines. *Br J Cancer* 2008; **99**: 1265–1268.
- 9 Wu H, Goel V, Haluska FG. PTEN signaling pathways in melanoma. *Oncogene* 2003; **22**: 3113–3122.
- 10 Larue L, Delmas V. The WNT/Beta-catenin pathway in melanoma. *Front Biosci* 2006; **11**: 733–742.
- 11 Rubinfeld B, Robbins P, El-Gamil M, Albert I, Porfiri E, Polakis P. Stabilization of beta-catenin by genetic defects in melanoma cell lines. *Science* 1997; **275**: 1790–1792.
- 12 Davis MJ, Ha BH, Holman EC, Halaban R, Schlessinger J, Boggon TJ. RAC1P29S is a spontaneously activating cancer-associated GTPase. *Proc Natl Acad Sci USA* 2013; **110**: 912–917.
- 13 Li A, Ma Y, Jin M, Mason S, Mort RL, Blyth K *et al*. Activated mutant NRAS(Q61K) drives aberrant melanocyte signaling, survival, and invasiveness via a Rac1-dependent mechanism. *J Invest Dermatol* 2012; **132**: 2610–2621.
- 14 Machesky LM, Sansom OJ. Rac1 in the driver's seat for melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res* 2012; **25**: 762–764.
- 15 Xue Y, Li NL, Yang JY, Chen Y, Yang LL, Liu WC. Phosphatidylinositol 3'-kinase signaling pathway is essential for Rac1-induced hypoxia-inducible factor-1 (alpha) and vascular endothelial growth factor expression. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2011; **300**: H2169–H2176.
- 16 Arafeh R, Qutob N, Emmanuel R, Keren-Paz A, Madore J, Elkahlon A *et al*. Recurrent inactivating RASA2 mutations in melanoma. *Nat Genet* 2015; **47**: 1408–1410.
- 17 Cancer Genome Atlas N. Genomic classification of cutaneous melanoma. *Cell* 2015; **161**: 1681–1696.
- 18 Pandiani C, Beranger GE, Leclerc J, Ballotti R, Bertolotto C. Focus on cutaneous and uveal melanoma specificities. *Genes Dev* 2017; **31**: 724–743.
- 19 Villanueva J, Infante JR, Krepler C, Reyes-Urube P, Samanta M, Chen HY *et al*. Concurrent MEK2 mutation and BRAF amplification confer resistance to BRAF and MEK inhibitors in melanoma. *Cell reports* 2013; **4**: 1090–1099.
- 20 Pollock PM, Harper UL, Hansen KS, Yudt LM, Stark M, Robbins CM *et al*. High frequency of BRAF mutations in nevi. *Nat Genet* 2003; **33**: 19–20.
- 21 Bauer J, Curtin JA, Pinkel D, Bastian BC. Congenital melanocytic nevi frequently harbor NRAS mutations but no BRAF mutations. *J Invest Dermatol* 2007; **127**: 179–182.
- 22 Bastian BC, LeBoit PE, Pinkel D. Mutations and copy number increase of HRAS in Spitz nevi with distinctive histopathological features. *Am J Pathol* 2000; **157**: 967–972.
- 23 Kuilman T, Michaloglou C, Mooi WJ, Peeper DS. The essence of senescence. *Genes Dev* 2010; **24**: 2463–2479.
- 24 Gray-Schopfer VC, Cheong SC, Chong H, Chow J, Moss T, Abdel-Malek ZA *et al*. Cellular senescence in naevi and immortalisation in melanoma: a role for p16? *Br J Cancer* 2006; **95**: 496–505.
- 25 Mackenzie Ross AD, Cook MG, Chong H, Hossain M, Pandha HS, Bennett DC. Senescence evasion in melanoma progression: uncoupling of DNA-damage signaling from p53 activation and p21 expression. *Pigment Cell Melanoma Res* 2013; **26**: 226–235.
- 26 Tran S, Rizos H. Human nevi lack distinguishing senescence traits. *Aging* 2013; **5**: 98–99.
- 27 Tran SL, Rizos H. Monitoring oncogenic B-RAF-induced senescence in melanocytes. *Methods Mol Biol* 2013; **965**: 313–326.
- 28 Michaloglou C, Vredeveld LC, Soengas MS, Denoyelle C, Kuilman T, van der Horst CM *et al*. BRAFV600E-associated senescence-like cell cycle arrest of human naevi. *Nature* 2005; **436**: 720–724.
- 29 Zhuang D, Mannava S, Grachtchouk V, Tang WH, Patil S, Wawrzyniak JA *et al*. C-MYC overexpression is required for continuous suppression of oncogene-induced senescence in melanoma cells. *Oncogene* 2008; **27**: 6623–6634.
- 30 Denoyelle C, Abou-Rjaily G, Bezrookove V, Verhaegen M, Johnson TM, Fullen DR *et al*. Anti-oncogenic role of the endoplasmic reticulum differentially activated by mutations in the MAPK pathway. *Nat Cell Biol* 2006; **8**: 1053–1063.
- 31 Larrubere L, Wu H, Novak D, Galach M, Bernhardt M, Orouji E *et al*. NF1 loss induces senescence during human melanocyte differentiation in an iPSC-based model. *Pigment Cell Melanoma Res* 2015; **28**: 407–416.
- 32 Haferkamp S, Tran SL, Becker TM, Scurr LL, Kefford RF, Rizos H. The relative contributions of the p53 and pRb pathways in oncogene-induced melanocyte senescence. *Aging* 2009; **1**: 542–556.
- 33 Vredeveld LC, Possik PA, Smit MA, Meissl K, Michaloglou C, Horlings HM *et al*. Abrogation of BRAFV600E-induced senescence by PI3K pathway activation contributes to melanomagenesis. *Genes Dev* 2012; **26**: 1055–1069.
- 34 McNeal AS, Liu K, Nakhate V, Natale CA, Duperret EK, Capell BC *et al*. CDKN2B loss promotes progression from benign melanocytic nevus to melanoma. *Cancer Discov* 2015; **5**: 1072–1085.
- 35 Wajapeyee N, Serra RW, Zhu X, Mahalingam M, Green MR. Oncogenic BRAF induces senescence and apoptosis through pathways mediated by the secreted protein IGFBP7. *Cell* 2008; **132**: 363–374.
- 36 Scurr LL, Pupo GM, Becker TM, Lai K, Schrama D, Haferkamp S *et al*. IGFBP7 is not required for B-RAF-induced melanocyte senescence. *Cell* 2010; **141**: 717–727.
- 37 Kuilman T, Michaloglou C, Vredeveld LC, Douma S, van Doorn R, Desmet CJ *et al*. Oncogene-induced senescence relayed by an interleukin-dependent inflammatory network. *Cell* 2008; **133**: 1019–1031.
- 38 Kuilman T, Peeper DS. Senescence-messaging secretome: SMS-ing cellular stress. *Nat Rev Cancer* 2009; **9**: 81–94.
- 39 Goel VK, Ibrahim N, Jiang G, Singhal M, Fee S, Flotte T *et al*. Melanocytic nevus-like hyperplasia and melanoma in transgenic BRAFV600E mice. *Oncogene* 2009; **28**: 2289–2298.
- 40 Patton EE, Widlund HR, Kutok JL, Kopani KR, Amatruda JF, Murphey RD *et al*. BRAF mutations are sufficient to promote nevi formation and cooperate with p53 in the genesis of melanoma. *Curr Biol* 2005; **15**: 249–254.
- 41 Dankort D, Curley DP, Cartledge RA, Nelson B, Karnezis AN, Damsky WE Jr. *et al*. Braf(V600E) cooperates with Pten loss to induce metastatic melanoma. *Nat Genet* 2009; **41**: 544–552.
- 42 Dhomen N, Reis-Filho JS, da Rocha Dias S, Hayward R, Savage K, Delmas V *et al*. Oncogenic Braf induces melanocyte senescence and melanoma in mice. *Cancer Cell* 2009; **15**: 294–303.
- 43 Ackermann J, Fruttschi M, Kaloulis K, McKee T, Trumpp A, Beermann F. Metastatic melanoma formation caused by expression of activated N-RasQ61K on an INK4a-deficient background. *Cancer Res* 2005; **65**: 4005–4011.
- 44 Bartek J, Lukas J, Bartkova J. DNA damage response as an anti-cancer barrier: damage threshold and the concept of 'conditional haploinsufficiency'. *Cell Cycle* 2007; **6**: 2344–2347.
- 45 Di Micco R, Fumagalli M, Cicalese A, Piccinin S, Gasparini P, Luise C *et al*. Oncogene-induced senescence is a DNA damage response triggered by DNA hyper-replication. *Nature* 2006; **444**: 638–642.
- 46 Mallette FA, Gaumont-Leclerc MF, Ferbeyre G. The DNA damage signaling pathway is a critical mediator of oncogene-induced senescence. *Genes Dev* 2007; **21**: 43–48.
- 47 Abdallah P, Luciano P, Runge KW, Lisby M, Geli V, Gilson E *et al*. A two-step model for senescence triggered by a single critically short telomere. *Nat Cell Biol* 2009; **11**: 988–993.
- 48 Bataille V, Kato BS, Falchi M, Gardner J, Kimura M, Lens M *et al*. Nevus size and number are associated with telomere length and represent potential markers of a decreased senescence in vivo. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2007; **16**: 1499–1502.
- 49 Suram A, Kaplunov J, Patel PL, Ruan H, Cerutti A, Boccardi V *et al*. Oncogene-induced telomere dysfunction enforces cellular senescence in human cancer precursor lesions. *EMBO J* 2012; **31**: 2839–2851.
- 50 Bastian BC. The longer your telomeres, the larger your nevus? *Am J Dermatopathol* 2003; **25**: 83–84.
- 51 Bennett DC. Genetics of melanoma progression: the rise and fall of cell senescence. *Pigment Cell Melanoma Res* 2016; **29**: 122–140.
- 52 Bastian BC. The molecular pathology of melanoma: an integrated taxonomy of melanocytic neoplasia. *Annu Rev Pathol* 2014; **9**: 239–271.
- 53 Ben-Porath I, Weinberg RA. The signals and pathways activating cellular senescence. *Int J Biochem Cell Biol* 2005; **37**: 961–976.
- 54 Neumann AA, Reddel RR. Telomere maintenance and cancer—look, no telomerase. *Nat Rev Cancer* 2002; **2**: 879–884.
- 55 Conde-Perez A, Gros G, Longvert C, Pedersen M, Petit V, Aktary Z *et al*. A caveolin-dependent and PI3K/AKT-independent role of PTEN in beta-catenin transcriptional activity. *Nat Commun* 2015; **6**: 8093.
- 56 Delmas V, Beermann F, Martinuzzi S, Carreira S, Ackermann J, Kumasaka M *et al*. Beta-catenin induces immortalization of melanocytes by suppressing p16INK4a expression and cooperates with N-Ras in melanoma development. *Genes Dev* 2007; **21**: 2923–2935.
- 57 Haferkamp S, Becker TM, Scurr LL, Kefford RF, Rizos H. p16INK4a-induced senescence is disabled by melanoma-associated mutations. *Aging Cell* 2008; **7**: 733–745.
- 58 Viros A, Sanchez-Laorden B, Pedersen M, Furney SJ, Rae J, Hogan K *et al*. Ultraviolet radiation accelerates BRAF-driven melanomagenesis by targeting TP53. *Nature* 2014; **511**: 478–482.
- 59 Zhu S, Wurdak H, Wang Y, Galkin A, Tao H, Li J *et al*. A genomic screen identifies TYRO3 as a MITF regulator in melanoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009; **106**: 17025–17030.

- 60 Mannava S, Omilian AR, Wawrzyniak JA, Fink EE, Zhuang D, Miecznikowski JC *et al*. PP2A-B56alpha controls oncogene-induced senescence in normal and tumor human melanocytic cells. *Oncogene* 2012; **31**: 1484–1492.
- 61 Box NF, Duffy DL, Chen W, Stark M, Martin NG, Sturm RA *et al*. MC1R genotype modifies risk of melanoma in families segregating CDKN2A mutations. *Am J Hum Genet* 2001; **69**: 765–773.
- 62 Demenais F, Mohamdi H, Chaudru V, Goldstein AM, Newton Bishop JA, Bishop DT *et al*. Association of MC1R variants and host phenotypes with melanoma risk in CDKN2A mutation carriers: a GenoMEL study. *J Natl Cancer Inst* 2010; **102**: 1568–1583.
- 63 Aoude LG, Wadt KA, Pritchard AL, Hayward NK. Genetics of familial melanoma: 20 years after CDKN2A. *Pigment Cell Melanoma Res* 2015; **28**: 148–160.
- 64 Gruis NA, van der Velden PA, Sandkuijl LA, Prins DE, Weaver-Feldhaus J, Kamb A *et al*. Homozygotes for CDKN2 (p16) germline mutation in Dutch familial melanoma kindreds. *Nat Genet* 1995; **10**: 351–353.
- 65 Rizos H, Puig S, Badenas C, Malvey J, Darmanian AP, Jimenez L *et al*. A melanoma-associated germline mutation in exon 1beta inactivates p14ARF. *Oncogene* 2001; **20**: 5543–5547.
- 66 Sherr CJ, Beach D, Shapiro GL. Targeting CDK4 and CDK6: from discovery to therapy. *Cancer Discov* 2016; **6**: 353–367.
- 67 Basu S, Murphy ME. Genetic Modifiers of the p53 Pathway. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2016; **6**: a026302.
- 68 Zuo L, Weger J, Yang Q, Goldstein AM, Tucker MA, Walker GJ *et al*. Germline mutations in the p16INK4a binding domain of CDK4 in familial melanoma. *Nat Genet* 1996; **12**: 97–99.
- 69 Sviderskaya EV, Gray-Schopfer VC, Hill SP, Smit NP, Evans-Whipp TJ, Bond J *et al*. p16/cyclin-dependent kinase inhibitor 2A deficiency in human melanocyte senescence, apoptosis, and immortalization: possible implications for melanoma progression. *J Natl Cancer Inst* 2003; **95**: 723–732.
- 70 Sviderskaya EV, Hill SP, Evans-Whipp TJ, Chin L, Orlow SJ, Easty DJ *et al*. p16 (INK4a) in melanocyte senescence and differentiation. *J Natl Cancer Inst* 2002; **94**: 446–454.
- 71 Ha L, Ichikawa T, Anver M, Dickens R, Lowe S, Sharpless NE *et al*. ARF functions as a melanoma tumor suppressor by inducing p53-independent senescence. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; **104**: 10968–10973.
- 72 Sherr CJ, McCormick F. The RB and p53 pathways in cancer. *Cancer Cell* 2002; **2**: 103–112.
- 73 Fung C, Pupo GM, Scolyer RA, Kefford RF, Rizos H. p16(INK) (4a) deficiency promotes DNA hyper-replication and genetic instability in melanocytes. *Pigment Cell Melanoma Res* 2013; **26**: 236–246.
- 74 Terzian T, Torchia EC, Dai D, Robinson SE, Murao K, Stieglmann RA *et al*. p53 prevents progression of nevi to melanoma predominantly through cell cycle regulation. *Pigment Cell Melanoma Res* 2010; **23**: 781–794.
- 75 Christensen C, Bartkova J, Mistrik M, Hall A, Lange MK, Ralfkiaer U *et al*. A short acidic motif in ARF guards against mitochondrial dysfunction and melanoma susceptibility. *Nat Commun* 2014; **5**: 5348.
- 76 Hewitt C, Lee WuC, Evans G, Howell A, Elles RG, Jordan R *et al*. Germline mutation of ARF in a melanoma kindred. *Hum Mol Genet* 2002; **11**: 1273–1279.
- 77 Meierjohann S. Oxidative stress in melanocyte senescence and melanoma transformation. *Eur J Cell Biol* 2014; **93**: 36–41.
- 78 Passos JF, Nelson G, Wang C, Richter T, Simillion C, Proctor CJ *et al*. Feedback between p21 and reactive oxygen production is necessary for cell senescence. *Mol Syst Biol* 2010; **6**: 347.
- 79 Carbone M, Yang H, Pass HI, Krausz T, Testa JR, Gaudino G. BAP1 and cancer. *Nat Rev Cancer* 2013; **13**: 153–159.
- 80 Robles-Espinoza CD, Velasco-Herrera MdC, Hayward NK, Adams DJ. Telomere-regulating genes and the telomere interactome in familial cancers. *Mol Cancer Res* 2015; **13**: 211–222.
- 81 Bertolotto C, Lesueur F, Giuliano S, Strub T, de Lichy M, Bille K *et al*. A SUMOylation-defective MITF germline mutation predisposes to melanoma and renal carcinoma. *Nature* 2011; **480**: 94–98.
- 82 Ghiorzo P, Pastorino L, Queirolo P, Bruno W, Tibiletti MG, Nasti S *et al*. Prevalence of the E318K MITF germline mutation in Italian melanoma patients: associations with histological subtypes and family cancer history. *Pigment Cell Melanoma Res* 2013; **26**: 259–262.
- 83 Sturm RA, Fox C, McClenahan P, Jagirdar K, Ibarrola-Villava M, Banan P *et al*. Phenotypic characterization of nevus and tumor patterns in MITF E318K mutation carrier melanoma patients. *J Invest Dermatol* 2014; **134**: 141–149.
- 84 Yokoyama S, Woods SL, Boyle GM, Aoude LG, MacGregor S, Zismann V *et al*. A novel recurrent mutation in MITF predisposes to familial and sporadic melanoma. *Nature* 2011; **480**: 99–103.
- 85 Bertolotto C, Abbe P, Hemesath TJ, Bille K, Fisher DE, Ortonne JP *et al*. Microphthalmia gene product as a signal transducer in cAMP-induced differentiation of melanocytes. *J Cell Biol* 1998; **142**: 827–835.
- 86 Valverde P, Healy E, Jackson I, Rees JL, Thody AJ. Variants of the melanocyte-stimulating hormone receptor gene are associated with red hair and fair skin in humans. *Nat Genet* 1995; **11**: 328–330.
- 87 Jarrett SG, Wolf Horrell EM, Boulanger MC, D'Orazio JA. Defining the contribution of MC1R physiological ligands to ATR phosphorylation at Ser435, a predictor of DNA repair in melanocytes. *J Invest Dermatol* 2015; **135**: 3086–3095.
- 88 Swope V, Alexander C, Starner R, Schwemmer S, Babcock G, Abdel-Malek ZA. Significance of the melanocortin 1 receptor in the DNA damage response of human melanocytes to ultraviolet radiation. *Pigment Cell Melanoma Res* 2014; **27**: 601–610.
- 89 Cao J, Wan L, Hacker E, Dai X, Lenna S, Jimenez-Cervantes C *et al*. MC1R is a potent regulator of PTEN after UV exposure in melanocytes. *Mol Cell* 2013; **51**: 409–422.
- 90 Steingrimsson E, Copeland NG, Jenkins NA. Melanocytes and the microphthalmia transcription factor network. *Annu Rev Genet* 2004; **38**: 365–411.
- 91 Bertolotto C, Busca R, Abbe P, Bille K, Aberdam E, Ortonne JP *et al*. Different cis-acting elements are involved in the regulation of TRP1 and TRP2 promoter activities by cyclic AMP: pivotal role of M boxes (GTCATGTGCT) and of microphthalmia. *Mol Cell Biol* 1998; **18**: 694–702.
- 92 Cheli Y, Ohanna M, Ballotti R, Bertolotto C. Fifteen-year quest for microphthalmia-associated transcription factor target genes. *Pigment Cell Melanoma Res* 2010; **23**: 27–40.
- 93 Garraway LA, Widlund HR, Rubin MA, Getz G, Berger AJ, Ramaswamy S *et al*. Integrative genomic analyses identify MITF as a lineage survival oncogene amplified in malignant melanoma. *Nature* 2005; **436**: 117–122.
- 94 Johannessen CM, Johnson LA, Piccioni F, Townes A, Frederick DT, Donahue MK *et al*. A melanocyte lineage program confers resistance to MAP kinase pathway inhibition. *Nature* 2013; **504**: 138–142.
- 95 Konieczkowski DJ, Johannessen CM, Abudayyeh O, Kim JW, Cooper ZA, Piris A *et al*. A melanoma cell state distinction influences sensitivity to MAPK pathway inhibitors. *Cancer Discov* 2014; **4**: 816–827.
- 96 Muller J, Krijgsman O, Tsoi J, Robert L, Hugo W, Song C *et al*. Low MITF/AXL ratio predicts early resistance to multiple targeted drugs in melanoma. *Nat Commun* 2014; **5**: 5712.
- 97 Van Allen EM, Wagle N, Sucker A, Treacy DJ, Johannessen CM, Goetz EM *et al*. The genetic landscape of clinical resistance to RAF inhibition in metastatic melanoma. *Cancer Discov* 2013; **4**: 94–109.
- 98 Falletta P, Sanchez-Del-Campo L, Chauhan J, Efferm M, Kenyon A, Kershaw CJ *et al*. Translation reprogramming is an evolutionarily conserved driver of phenotypic plasticity and therapeutic resistance in melanoma. *Genes Dev* 2017; **31**: 18–33.
- 99 Riesenber S, Groetchen A, Siddaway R, Bald T, Reinhardt J, Smorra D *et al*. MITF and c-Jun antagonism interconnects melanoma dedifferentiation with pro-inflammatory cytokine responsiveness and myeloid cell recruitment. *Nat Commun* 2015; **6**: 8755.
- 100 Carreira S, Goodall J, Denat L, Rodriguez M, Nuciforo P, Hoek KS *et al*. Mitf regulation of Dia1 controls melanoma proliferation and invasiveness. *Genes Dev* 2006; **20**: 3426–3439.
- 101 Potrony M, Puig-Butille JA, Aguilera P, Badenas C, Tell-Marti G, Carrera C *et al*. Prevalence of MITF p.E318K in patients with melanoma independent of the presence of CDKN2A causative mutations. *JAMA Dermatol* 2016; **152**: 405–412.
- 102 Bonet C, Luciani F, Ottavi JF, Leclerc J, Jouenne FM, Boncompagni M *et al*. Deciphering the role of oncogenic MITFE318K in senescence delay and melanoma progression. *J Natl Cancer Inst* 2017; **109**: doi:10.1093/jnci/djw340.
- 103 Miller AJ, Levy C, Davis IJ, Razin E, Fisher DE. Sumoylation of MITF and its related family members TFE3 and TFEB. *J Biol Chem* 2005; **280**: 146–155.
- 104 Murakami H, Arnheiter H. Sumoylation modulates transcriptional activity of MITF in a promoter-specific manner. *Pigment Cell Res* 2005; **18**: 265–277.
- 105 Wilkinson KA, Henley JM. Mechanisms, regulation and consequences of protein SUMOylation. *Biochem J* 2010; **428**: 133–145.
- 106 Gareau JR, Lima CD. The SUMO pathway: emerging mechanisms that shape specificity, conjugation and recognition. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2010; **11**: 861–871.
- 107 Levy C, Sonnenblick A, Razin E. Role played by microphthalmia transcription factor phosphorylation and its Zip domain in its transcriptional inhibition by PIAS3. *Mol Cell Biol* 2003; **23**: 9073–9080.
- 108 Sonnenblick A, Levy C, Razin E. Interplay between MITF, PIAS3, and STAT3 in mast cells and melanocytes. *Mol Cell Biol* 2004; **24**: 10584–10592.
- 109 Zhang YQ, Sarge KD. Sumoylation regulates lamin A function and is lost in lamin A mutants associated with familial cardiomyopathies. *J Cell Biol* 2008; **182**: 35–39.
- 110 Walrath JC, Hawes JJ, Van Dyke T, Reilly KM. Genetically engineered mouse models in cancer research. *Adv Cancer Res* 2010; **106**: 113–164.
- 111 Tsao H, Goel V, Wu H, Yang G, Haluska FG. Genetic interaction between NRAS and BRAF mutations and PTEN/MMAC1 inactivation in melanoma. *J Invest Dermatol* 2004; **122**: 337–341.

- 112 Jafri M, Wake NC, Ascher DB, Pires DE, Gentle D, Morris MR *et al*. Germline mutations in the CDKN2B tumor suppressor gene predispose to renal cell carcinoma. *Cancer Discov* 2015; **5**: 723–729.
- 113 de-Paillerets BB, Lesueur F, Bertolotto C. A germline oncogenic MITF mutation and tumor susceptibility. *Eur J Cell Biol* 2013; **93**: 71–75.
- 114 Widlund HR, Horstmann MA, Price ER, Cui J, Lessnick SL, Wu M *et al*. Beta-catenin-induced melanoma growth requires the downstream target microphthalmia-associated transcription factor. *J Cell Biol* 2002; **158**: 1079–1087.
- 115 Damsky WE, Curley DP, Santhanakrishnan M, Rosenbaum LE, Platt JT, Gould Rothberg BE *et al*. Beta-catenin signaling controls metastasis in Braf-activated Pten-deficient melanomas. *Cancer Cell* 2011; **20**: 741–754.
- 116 Andreou AM, Tavernarakis N. SUMOylation and cell signalling. *Biotechnol J* 2009; **4**: 1740–1752.
- 117 Andreou AM, Tavernarakis N. Roles for SUMO modification during senescence. *Adv Exp Med Biol* 2010; **694**: 160–171.
- 118 Seeler JS, Dejean A. SUMO and the robustness of cancer. *Nat Rev Cancer* 2017; **17**: 184–197.
- 119 Jhappan C, Noonan FP, Merlino G. Ultraviolet radiation and cutaneous malignant melanoma. *Oncogene* 2003; **22**: 3099–3112.
- 120 Bedogni B, Powell MB. Skin hypoxia: a promoting environmental factor in melanomagenesis. *Cell Cycle* 2006; **5**: 1258–1261.
- 121 Bossis G, Sarry JE, Kifagi C, Ristic M, Saland E, Vergez F *et al*. The ROS/SUMO axis contributes to the response of acute myeloid leukemia cells to chemotherapeutic drugs. *Cell Rep* 2014; **7**: 1815–1823.
- 122 Scurr LL, Haferkamp S, Rizos H. The role of sumoylation in senescence. *Adv Exp Med Biol* 2017; **963**: 215–226.
- 123 Lowings P, Yavuzer U, Goding CR. Positive and negative elements regulate a melanocyte-specific promoter. *Mol Cell Biol* 1992; **12**: 3653–3662.
- 124 Robert C, Schachter J, Long GV, Arance A, Grob JJ, Mortier L *et al*. Pembrolizumab versus ipilimumab in advanced melanoma. *N Engl J Med* 2015; **372**: 2521–2532.
- 125 Tentori L, Lacal PM, Graziani G. Challenging resistance mechanisms to therapies for metastatic melanoma. *Trends Pharmacol Sci* 2013; **34**: 656–666.
- 126 Kessler JD, Kahle KT, Sun T, Meerbrey KL, Schlabach MR, Schmitt EM *et al*. A SUMOylation-dependent transcriptional subprogram is required for Myc-driven tumorigenesis. *Science* 2012; **335**: 348–353.
- 127 Yu B, Swatkoski S, Holly A, Lee LC, Giroux V, Lee CS *et al*. Oncogenesis driven by the Ras/Raf pathway requires the SUMO E2 ligase Ubc9. *Proc Natl Acad Sci USA* 2015; **112**: E1724–E1733.
- 128 Kumar A, Zhang KY. Advances in the development of SUMO specific protease (SENPs) inhibitors. *Comput Struct Biotechnol J* 2015; **13**: 204–211.
- 129 Zhao R, Choi BY, Lee MH, Bode AM, Dong Z. Implications of Genetic and Epigenetic Alterations of CDKN2A (p16<sup>INK4a</sup>) in cancer. *EBioMedicine* 2016; **8**: 30–39.
- 130 Giuliano S, Cheli Y, Ohanna M, Bonet C, Beuret L, Bille K *et al*. Microphthalmia-associated transcription factor controls the DNA damage response and a lineage-specific senescence program in melanomas. *Cancer Res* 2010; **70**: 3813–3822.
- 131 Ohanna M, Giuliano S, Bonet C, Imbert V, Hofman V, Zangari J *et al*. Senescent cells develop a PARP-1 and nuclear factor- $\kappa$ B-associated secretome (PNAS). *Genes Dev* 2011; **25**: 1245–1261.
- 132 Strub T, Giuliano S, Ye T, Bonet C, Keime C, Kobi D *et al*. Essential role of microphthalmia transcription factor for DNA replication, mitosis and genomic stability in melanoma. *Oncogene* 2011; **30**: 2319–2332.
- 133 Schmitt CA, Fridman JS, Yang M, Lee S, Baranov E, Hoffman RM *et al*. A senescence program controlled by p53 and p16<sup>INK4a</sup> contributes to the outcome of cancer therapy. *Cell* 2002; **109**: 335–346.
- 134 te Poele RH, Okorokov AL, Jardine L, Cummings J, Joel SP. DNA damage is able to induce senescence in tumor cells in vitro and in vivo. *Cancer Res* 2002; **62**: 1876–1883.
- 135 Liu Y, Hawkins OE, Su Y, Vilgelm AE, Sobolik T, Thu YM *et al*. Targeting aurora kinases limits tumour growth through DNA damage-mediated senescence and blockade of NF- $\kappa$ B impairs this drug-induced senescence. *EMBO Mol Med* 2013; **5**: 149–166.
- 136 Xue W, Zender L, Miething C, Dickins RA, Hernando E, Krizhanovskiy V *et al*. Senescence and tumour clearance is triggered by p53 restoration in murine liver carcinomas. *Nature* 2007; **445**: 656–660.
- 137 Dorr JR, Yu Y, Milanovic M, Beuster G, Zasada C, Dabritz JH *et al*. Synthetic lethal metabolic targeting of cellular senescence in cancer therapy. *Nature* 2013; **501**: 421–425.
- 138 Beausejour CM, Krtolica A, Galimi F, Narita M, Lowe SW, Yaswen P *et al*. Reversal of human cellular senescence: roles of the p53 and p16 pathways. *EMBO J* 2003; **22**: 4212–4222.
- 139 Coppe JP, Desprez PY, Krtolica A, Campisi J. The senescence-associated secretory phenotype: the dark side of tumor suppression. *Annu Rev Pathol* 2010; **5**: 99–118.
- 140 Rodier F, Coppe JP, Patil CK, Hoeijmakers WA, Munoz DP, Raza SR *et al*. Persistent DNA damage signalling triggers senescence-associated inflammatory cytokine secretion. *Nat Cell Biol* 2009; **11**: 973–979.
- 141 Acosta JC, O’Loughlin A, Banito A, Guijarro MV, Augert A, Raguz S *et al*. Chemokine signaling via the CXCR2 receptor reinforces senescence. *Cell* 2008; **133**: 1006–1018.
- 142 Ohanna M, Cheli Y, Bonet C, Bonazzi VF, Allegra M, Giuliano S *et al*. Secretome from senescent melanoma engages the STAT3 pathway to favor reprogramming of naive melanoma towards a tumor-initiating cell phenotype. *Oncotarget* 2013; **4**: 2212–2224.
- 143 Olumi AF, Grossfeld GD, Hayward SW, Carroll PR, Tlsty TD, Cunha GR. Carcinoma-associated fibroblasts direct tumor progression of initiated human prostatic epithelium. *Cancer Res* 1999; **59**: 5002–5011.
- 144 Coppe JP, Rodier F, Patil CK, Freund A, Desprez PY, Campisi J. Tumor suppressor and aging biomarker p16<sup>INK4a</sup> induces cellular senescence without the associated inflammatory secretory phenotype. *J Biol Chem* 2011; **286**: 36396–36403.
- 145 Chang J, Wang Y, Shao L, Laberge RM, Demaria M, Campisi J *et al*. Clearance of senescent cells by ABT263 rejuvenates aged hematopoietic stem cells in mice. *Nat Med* 2016; **22**: 78–83.
- 146 Baker DJ, Wijshake T, Tchkonia T, LeBrasseur NK, Childs BG, van de Sluis B *et al*. Clearance of p16<sup>INK4a</sup>-positive senescent cells delays ageing-associated disorders. *Nature* 2011; **479**: 232–236.
- 147 Baar MP, Brandt RM, Putavet DA, Klein JD, Derks KW, Bourgeois BR *et al*. Targeted apoptosis of senescent cells restores tissue homeostasis in response to chemotoxicity and aging. *Cell* 2017; **169**: 132–147 e116.
- 148 Kirkland JL, Tchkonia T. Clinical strategies and animal models for developing senolytic agents. *Exp Gerontol* 2015; **68**: 19–25.
- 149 Zhu Y, Tchkonia T, Pirtskhalava T, Gower AC, Ding H, Giorgadze N *et al*. The Achilles’ heel of senescent cells: from transcriptome to senolytic drugs. *Aging Cell* 2015; **14**: 644–658.
- 150 Zhu Y, Tchkonia T, Fuhrmann-Stroissnigg H, Dai HM, Ling YY, Stout MB *et al*. Identification of a novel senolytic agent, navitoclax, targeting the Bcl-2 family of anti-apoptotic factors. *Aging Cell* 2016; **15**: 428–435.
- 151 Haferkamp S, Borst A, Adam C, Becker TM, Motschenbacher S, Windhovel S *et al*. Vemurafenib induces senescence features in melanoma cells. *J Invest Dermatol* 2013; **133**: 1601–1609.